ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΕ ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΥΣ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΕΣ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΚΑΡΖΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ Κ. ΡΙΖΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2018

UNIVERSITY OF CRETE

SCHOOL OF SCIENCES AND ENGINEERING

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

GENERAL POSTGRADUATE PROGRAMME

Master Thesis

INVESTIGATION AND ASSESSMENT OF PRENATAL EXPOSURE TO ENDOCRINE DISRUPTORS

VASILIKI KARZI

Master Thesis Supervisor: Prof. APOSTOLOS K. RIZOS

HERAKLION 2018

Εξεταστική Επιτροπή

Απόστολος Κ. Ρίζος

Καθηγητής Φυσικοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης (Επιβλέπων)

Αριστείδης Μ. Τσατσάκης

Καθηγητής Τοξικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Εμμανουήλ Ν. Τζατζαράκης

Επίκουρος Καθηγητής Τοξικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου για τη βοήθεια που μου προσέφεραν. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω, τον Καθηγητή κ. Απόστολο Ρίζο, που μου έδωσε την ευκαιρία να διεκπεραιώσω την εργασία μου, σχετικά με τον προσδιορισμό των επιπέδων των PBsκαι TCS και την επιβάρυνση εγκύων γυναικών και των εμβρύων τους.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Αριστείδη Τσατσάκη, Διευθυντή του Εργαστηρίου Τοξικολογίας και Εγκληματολογικής Χημείας για την παραχώρηση των χώρων του εργαστηρίου του για την διεξαγωγή των πειραμάτων μου.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Τζατζαράκη για τις πολύτιμες συμβουλές και την υπομονή του, καθώς και τα λοιπά μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια, την άριστη συνεργασία και τη συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τον μαιευτήρα/γυναικολόγο κ.Σταύρο Σηφάκη και τη μαία Πελαγία Ξεζονάκη για την πολύτιμη συνεργασία τους.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την υποστήριξη τους.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Η μεταπτυχιακή φοιτήτρια Βασιλική Καρζή γεννήθηκε στην Αθήνα, Αττική, Ελλάδα, το 1992. Τον Ιούλιο του 2015 αποφοίτησε από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Το Μάρτιο του 2015 ολοκλήρωσε την διπλωματική εργασία της στο Εργαστήριο Τοξικολογίας και Εγκληματολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης με τίτλο «Προσδιορισμός των επιπέδων της δισφαινόλης Α σε δείγματα τροφίμων και αναψυκτικών», ενώ το διάστημα Απρίλιος–Ιούνιος του ίδιου έτους εκπόνησε την πρακτική άσκησή της στο προαναφερθέν εργαστήριο. Από τον Οκτώβριο του 2015 είναι μέλος της Ένωσης Ελλήνων Χημικών καθώς και μεταπτυχιακή φοιτήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης σε συνεργασία με το Εργαστήριο Τοξικολογίας και Εγκληματολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Το ερευνητικό της έργο επικεντρώνεται τόσο στην ανάπτυξη όσο και στην εφαρμογή χρωματογραφικών μεθόδων για την ανάλυση τροφίμων, ποτών αλλά και βιολογικών δειγμάτων. Σκοπός των αναλύσεων αυτών είναι ο προσδιορισμός της έκθεσης του ανθρώπου σε περιβαλλοντικούς ενδοκρινικούς διαταράκτες που βρίσκονται κυρίως σε είδη καθημερινής χρήσης. Όσον αφορά τη μεταπτυχιακή της εργασία, πρόκειται να μελετήσει την επιβάρυνση και τις δυσμενείς για την υγεία συνέπειες της έκθεσης εγκύων γυναικών, και των βρεφών τους, σε ενδοκρινικούς διαταράκτες.

Ανακοινώσεις σε Συνέδρια

- Tzatzarakis MN, Katsikantami I, Vakonaki E, **Karzi V**, Kavvalakis M, Chatzinikolaou A, Tsakris I, Tsatsakis A, Rizos A. Monitoring of pesticide residues in apples from Greek market. 53rd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2017). 10-13 September 2017. *Toxicology Letters*. 2017; 280:S177.
- Katsikantami I, **Karzi V**, Tzatzarakis MN, Vakonaki E, Stavroulaki A, Xezonaki P, Sifakis S, Tsatsakis AM, Rizos A. Phenolic endocrine disruptors' concentration levels in hair of Greek pregnant women. 53rd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX). 10-13 September 2017. *Toxicology Letters*. 2017; 280:S248.
- Fragkiadoulaki I, Stivaktakis P, Kalogeraki A, Tsiaousis I, Kalliantasi A, **Karzi V**, Stratidakis A, Mamoulakis C, Tsatsakis AM. Micronuclei frequency and blood cell

number in rabbit contrast-induced nephrotoxicity model with antioxidants as a preventive strategy. 53rd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), 10-13 September 2017.*Toxicology Letters*. 2017; 280:S125.

- Tzatzarakis MN, Vakonaki E, **Karzi V**, Katsikantami I, Kavvalakis M, Rizos AK, Tsatsakis A.M. Levels of Bisphenol A and Triclosan in head hair samples of Greek adults and children. International conference «Hygiene, toxicology, professional pathology: traditions and modernity», dedicated to 125 anniversary of the Federal Scientific Centre of Hygiene named after F.F.Erisman., November 9-10, 2016, Moscow.
- Tzatzarakis MN, **Karzi V**, Vakonaki E, Katsikantami I, Kiriakakis M, Tsakiris I, Kavvalakis M, Rizos AK, Tsatsakis, AM. (2016). Endocrine disruptor compound's levels in hair of Greek children. 52nd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX) Fibes Congress Center Seville, Spain, 04th-07th September 2016. *ToxicologyLetters*, 2016; 258:S78.
- Tzatzarakis MN, **Karzi V**, Vakonaki E, Barbounis E, Tsitsimpikou C, Vardavas AI, Tsakiris I, Rizos AK, Tsatsakis AM. Bisphenol A in beverages and canned foods of the Greek market. 51st Congress of the European, Societies of Toxicology (EUROTOX), 13-16 September 2015.*Toxicology Letters*. 2015; 238 (2):S81.

<u>Δημοσιεύσεις</u>

- **Karzi V**, Tzatzarakis MN, Vakonaki E, Alegakis T, Katsikantami I, Sifakis S, Rizos A, Tsatsakis AM. Biomonitoring of bisphenol A, triclosan and perfluorooctanoic acid in hair samples of children and adults. *Journal of Applied Toxicology*. 2018: In press.
- Tzatzarakis MN, **Karzi V**, Vakonaki E, Goumenou M, Kavvalakis M, Stivaktakis P, Tsitsimpikou C, Tsakiris I, Rizos AK, Tsatsakis AM. Bisphenol A in soft drinks and canned foods and data evaluation. *Food Additives and Contaminants Part B Surveill*.2016; 11:1-6.

CURICULUM VITAE

Vasiliki Karzi was born in Athens, Attiki, Greece in 1992. In July 2015 she graduated from Chemistry Department of University of Crete. In March 2015 she accomplished her graduation thesis in Laboratory of Toxicology and Forensic Sciences, Medical School, University of Crete on the topic "Bisphenol A in soft drinks and canned foods in the Greek market" and the period April to June of the same year she completed her internship in the same laboratory. Since October 2015 she is a member of Society of Greek Chemists and an MSc student at Chemistry Department, University of Crete, in collaboration with the Laboratory of Toxicology and Forensic Chemistry, Medical School, University of Crete.

Her scientific research is focused on both developing and applying chromatographic methods for analysis of food, beverages and biological samples so as to determine human exposure to environmental endocrine disruptors found mostly in daily products. Concerning her master thesis, she is going to study the body burden and the adverse health impacts of endocrine disruptors in pregnant women and their infants.

Abstracts in Congresses:

- Tzatzarakis MN, Katsikantami I, Vakonaki E, **Karzi V**, Kavvalakis M, Chatzinikolaou A, Tsakris I, Tsatsakis A, Rizos A. Monitoring of pesticide residues in apples from Greek market. 53rd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2017). 10-13 September 2017. *Toxicology Letters*. 2017; 280:S177.
- Katsikantami I, **Karzi V**, Tzatzarakis MN, Vakonaki E, Stavroulaki A, Xezonaki P, Sifakis S, Tsatsakis AM, Rizos A. Phenolic endocrine disruptors' concentration levels in hair of Greek pregnant women. 53rd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX). 10-13 September 2017. *Toxicology Letters*. 2017; 280:S248.
- Fragkiadoulaki I, Stivaktakis P, Kalogeraki A, Tsiaousis I, Kalliantasi A, **Karzi V**, Stratidakis A, Mamoulakis C, Tsatsakis AM. Micronuclei frequency and blood cell number in rabbit contrast-induced nephrotoxicity model with antioxidants as a preventive strategy. 53rd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), 10-13 September 2017.*Toxicology Letters*. 2017; 280:S125.
- Tzatzarakis MN, Vakonaki E, **Karzi V**, Katsikantami I, Kavvalakis M, Rizos AK,

Tsatsakis A.M. Levels of Bisphenol A and Triclosan in head hair samples of Greek adults and children. International conference «Hygiene, toxicology, professional pathology: traditions and modernity», dedicated to 125 anniversary of the Federal Scientific Centre of Hygiene named after F.F.Erisman., November 9-10, 2016, Moscow.

- Tzatzarakis MN, **Karzi V**, Vakonaki E, Katsikantami I, Kiriakakis M, Tsakiris I, Kavvalakis M, Rizos AK, Tsatsakis, AM. (2016). Endocrine disruptor compound's levels in hair of Greek children. 52nd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX) Fibes Congress Center Seville, Spain, 04th-07th September 2016. *ToxicologyLetters*, 2016; 258:S78.
- Tzatzarakis MN, **Karzi V**, Vakonaki E, Barbounis E, Tsitsimpikou C, Vardavas AI, Tsakiris I, Rizos AK, Tsatsakis AM. Bisphenol A in beverages and canned foods of the Greek market. 51st Congress of the European, Societies of Toxicology (EUROTOX), 13-16 September 2015.*Toxicology Letters*. 2015; 238 (2):S81.

Publications:

- **Karzi V**, Tzatzarakis MN, Vakonaki E, Alegakis T, Katsikantami I, Sifakis S, Rizos A, Tsatsakis AM. Biomonitoring of bisphenol A, triclosan and perfluorooctanoic acid in hair samples of children and adults. *Journal of Applied Toxicology*. 2018: In press.
- Tzatzarakis MN, **Karzi V**, Vakonaki E, Goumenou M, Kavvalakis M, Stivaktakis P, Tsitsimpikou C, Tsakiris I, Rizos AK, Tsatsakis AM. Bisphenol A in soft drinks and canned foods and data evaluation. *Food Additives and Contaminants Part B Surveill*.2016; 11:1-6.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων των ουσιών, που έχουν ενοχοποιηθεί ως ενδοκρινικοί διαταράκτες, parabens (PBs) και triclosan (TCS) σε δείγματα τριχών κεφαλής και αμνιακού υγρού εγκύων γυναικών κατά την αμνιοπαρακέντηση στο 1ο ή 2ο τρίμηνο της εγκυμοσύνης τους. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε καταγραφή της έκθεσης και επιβάρυνσης των εγκύων γυναικών και των εμβρύων τους σε αυτές τις ουσίες. Τα δείγματα ελήφθησαν τη χρονική περίοδο 2016-2017 από έγκυες γυναίκες η πλειοψηφία των οποίων κατοικούσε στο Νομό Ηρακλείου Κρήτης και οι οποίες επισκέφθηκαν το Μαιευτήριο «Μητέρα» Κρήτης για αμνιοπαρακέντηση.

Συλλέχθηκαν 95 δείγματα τρίχας και 99 δείγματα αμνιακού υγρού, ενώ παράλληλα οι συμμετέχουσες συμπλήρωσαν ερωτηματολόγια σχετικά με τα σωματομετρικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά τους, τις διατροφικές τους συνήθειες, τη χρήση προϊόντων προσωπικής φροντίδας και υγιεινής, το ιατρικό και μαιευτικό ιστορικό τους. Έπειτα από 5-12 μήνες μετά τον τοκετό οι συμμετέχουσες γυναίκες κλήθηκαν να απαντήσουν σε συμπληρωματικό ερωτηματολόγιο σχετικό με τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά των βρεφών και τα πιθανά προβλήματα υγείας τους.

Η επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με υγρή–υγρή εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα στην περίπτωση των αμνιακών υγρών και με στερεή–υγρή εκχύλιση με μεθανόλη στην περίπτωση των τριχών. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας (liquid chromatography, LC) συζευγμένο με φασματόμετρο μάζας (mass spectrometry, MS).

Η αξιολόγηση της αναλυτικής μεθόδου πραγματοποιήθηκε με τον προσδιορισμό της γραμμικότητας (R^2), της ανάκτησης (% recovery), της ακρίβειας (% accuracy), της επαναληψιμότητας (% inter day precision) και της ευαισθησίας (όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ)). Η ακρίβεια της μεθόδου ανάλυσης των δειγμάτων αμνιακού υγρού υπολογίσθηκε 96,17% για το MePB, 95,86% για το EtPB, 96,65% για το BePB, 94,27% για το BuPB και 99,71% για το TCS. Η ανάκτηση ήταν 99,30%, 83,36%, 113,41%, 90,74% και 69,95%, ενώ η επαναληψιμότητα ήταν 15,23%, 12,25%, 9,99%, 14,27% και 18,77%, αντίστοιχα. Στα δείγματα τρίχας η ακρίβεια υπολογίσθηκε 94,0% για το MePB, 103,8% για το EtPB, 98,9% για το BePB, 136,2% για το BuPB και 91,4% για το TCS. Οι αντίστοιχες τιμές για την ανάκτηση ήταν 112,08%, 110,69%, 104,68%, 81,62% και 97,48% και για την επαναληψιμότητα 21,15%, 10,32%, 23,19%, 21,43% και 15,89%. Για τα δείγματα αμνιακού υγρού, τα LOD και LOQ της μεθόδου προσδιορίστηκαν 0,07 και 0,23 ng/ml για το MePB, 0,31 και 1,02 ng.ml για το EtPB, 0,17 και 0,57 ng/ml για το BePB, 0,12 και 0,40 ng/ml για το BuPB και 0,73 και 2,45 ng/ml για το TCS, αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες τιμές για τα δείγματα τρίχας ήταν 3,62 και 12,08 pg/mg για το MePB, 0,54 και 1,81 pg/mg για το EtPB, 0,88 και 2,93 pg/mg για το BePB, 0,28

και 0,94 pg/mg για το BuPB και 1,28 και 4,27 pg/mg για το TCS. Το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης υπολογίσθηκε R^2>0,99 τόσο στα πρότυπα όσο και στα φορτισμένα διαλύματα των δειγμάτων αμνιακού υγρού και τρίχας. Τόσο η γραμμικότητα όσο και οι υπόλοιποι αναλυτικοί παράμετροι υποδηλώνουν την καταλληλότητα των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δειγμάτων αμνιακού υγρού και τρίχας.

Μεγαλύτερο ποσοστό θετικότητας παρουσίασαν τα δείγματα τρίχας με ποσοστά 90 – 100% για όλες τις ενώσεις (εκτός του BePB (15,8%)). Στα δείγματα αμνιακού υγρού μεγαλύτερο ποσοστό θετικότητας παρουσίασε το MePB (21,2%), ενώ το ποσοστό θετικότητας για τις υπόλοιπες ενώσεις δεν ξεπέρασε το 5,1%. Οι τιμές της μέσης συγκέντρωσης στα δείγματα αμνιακού υγρού ήταν για το MePB 6,6 ng/ml (0,1 – 18,8 ng/ml), για τοEtPB 9,2 ng/ml (1,3 – 17,1 ng/ml), για το BePB 0,6 ng/ml (βρέθηκε μόνο ένα θετικό δείγμα), για το BuPB 0,4 ng/ml (0,2 – 0,6 ng/ml), και για τοTCS 1,8 ng/ml (0,9 – 2,4 ng/ml). Οι αντίστοιχες μέσες συγκεντρώσεις για τα δείγματα τρίχας βρέθηκαν 4501,2 pg/mg (17,6 – 27437,0 pg/mg) για το MePB, 510,1 pg/mg (11,0 – 4224,5 pg/mg) για το EtPB, 22,9 pg/mg (2,1 – 66,6 pg/mg) για το BePB, 237,1 pg/mg (1,8 – 2513,7 pg/mg) για το BuPB και 245,0 pg/mg (8,8 – 8070,2 pg/mg) για το TCS.

Οι τιμές συγκέντρωσης στα δείγματα αμνιακού υγρού ήταν σαφώς πολύ μικρότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες των ούρων, και συμβαδίζουν με αυτές που παρατίθενται στη βιβλιογραφία. Από την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων αλλά και των δεδομένων των ερωτηματολογίων, προέκυψε ότι η συχνή χρήση προϊόντων προσωπικής φροντίδας και υγιεινής, όπως μακιγιάζ, σπρέι/γέλη για τα μαλλιά και αντηλιακά, συνδέεται με αυξημένες συγκεντρώσεις των PBs στην τρίχα των εγκύων αλλά και στο αμνιακό υγρό. Ακόμη, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση των συγκεντρώσεων του BePB στα δείγματα τρίχας με το ύψος των βρεφών και του TCS με την εμφάνιση προβλημάτων υγείας στα βρέφη, όπως αλλεργίες και αναπνευστικά προβλήματα.

Λέξεις κλειδιά: parabens, triclosan, έγκυες γυναίκες, τρίχα, αμνιακό υγρό, βιοπαρακολούθηση, LC-MS

ABSTRACT

The aim of this study was the qualitative and quantitative determination of parabens (PBs) and triclosan (TCS) levels, which are characterized as endocrine disruptors, in head hair and amniotic fluid samples of pregnant women during amniocentesis in the 1st or 2nd trimester of their pregnancy. Also, the exposure and the burden of pregnant women and their infants were recorded. The sampling took place during the 2016-2017 period in the maternity hospital "Mitera" in Heraklion, Crete and the majority of the participating women were residents of Heraklion's region.

In total, 95 samples of head hair and 99 samples of amniotic fluid were collected. The participants completed questionnaires related to their somatometric and demographic characteristics, their dietary habits, the use of personal care products and their medical and obstetrical history. Additionally, 5-12 months after the childbirth, the participants answered a supplementary questionnaire related to the somatometric characteristics and possible health problems of their infants.

Sample processing was performed by liquid–liquid extraction with ethyl acetate for the amniotic fluid samples and by solid–liquid extraction with methanol for the hair samples. The analysis was held using a liquid chromatography–mass spectrometry system (LC-MS).

The validation of the used method was performed by determining the linearity (R^2), recovery (%), accuracy (%), inter day precision (%) and sensitivity (limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)). The % accuracy of the amniotic fluid analysis method was 96.17% for MePB, 95.86% for EtPB, 96.65% for BePB, 94.27% for BuPB and 96.17% for TCS. The recovery was 99.30%, 83.36%, 113.41%, 90.74% and 69.95% while the inter day precision (RSD) was 15.23%, 12.25%, 9,99%, 14.27% and 18.77%, respectively. For hair samples, the precision was 94.0% for MePB, 103.8% for EtPB, 98.9% for BePB, 136.2% for BuPB and 91.4% for TCS. The corresponding values for the recovery were 112.08%, 110.69%, 104.68%, 81.62% and 97.48%, while for the inter day precision (RSD) were 21.15%, 10.32%, 23.19%, 21.43% and 15.89%. For the amniotic fluid samples, the LOD and LOQ were calculated 0.07 and 0.23 ng/ml for MePB, 0.31 and 1.02 ng/ml for EtPB, 0.17 and 0.57 ng/ml for BePB, 0.12 and 0.40 ng/ml for BuPB and 0.73 and 2.45 ng/ml for TCS, respectively. For the hair samples, the corresponding values were 3.62 and 12.08 pg/mg for MePB, 0.54 and1.81 pg/mg for EtPB, 0.88 and 2.93 pg/mg for BePB, 0.28 and 0.94 pg/mg for BuPB and 1.28 and 4.27 pg/mg for TCS. The square of the correlation coefficient was $R^2 > 0.99$ for both amniotic fluid and hair samples. The linearity and the other analytical parameters indicate the suitability of the methods that were used for the analysis of the samples.

Hair samples showed a higher percentage of positive samples for all compounds (90-100% except from BePB (15.8%)). In amniotic fluid samples, MePB was the most detected (21.2%), while the

percentage of positive samples for the other compounds did not exceed 5.1%. The mean concentration levels of amniotic fluid samples was 6.6 ng/ml for MePB (0.1 – 18.8 ng/ml); 9.2 ng/ml (1.3 – 17.1 ng/ml) for EtPB; 0.6 ng/ml for BePB (only one positive sample); 0.4 ng/ml (0.2 – 0.6 ng/ml) for BuPB and 1.8 ng/ml (0.9 – 2.4 ng/ml) for TCS. For the hair samples the mean concentration levels were 4501.2 pg/mg (17.6 – 27437.0 pg/mg) for MePB; 510.1 pg/mg (11.0 – 4224.5 pg/mg) for EtPB; 22.9 pg/mg (2.1 – 66.6 pg/mg) for BePB; 237.1 pg/mg (1.8 – 2513.7 pg/mg) for BuPB and 245.0 pg/mg (8.8 – 8070.2 pg/mg) for TCS.

The concentration levels of the amniotic fluid samples were much lower than the respective levels in urine and in agreement with the reported levels in the literature. The statistical analysis of both results and questionnaires' data showed that the frequent use of personal care and hygiene products, such as makeup, hairspray and sunscreens, is correlated with higher concentration levels of PBs in hair and amniotic fluid of the pregnant women. Additionally, positive correlation was observed between the BePB levels in hair and the infants' height. Finally, TCS levels were correlated with the presence or not of health problems in infants, such as allergies and respiratory problems.

Keywords: parabens, triclosan, pregnant women, hair, amniotic fluid, biomonitoring, LC-MS

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 17

1.1. Ενδοκρινικοί διαταράκτες. 17

1.2. Parabens (PBs). 17

1.2.1. Σύνθεση και ιδιότητες. 17

1.2.2. Ιστορική αναδρομή και νομοθεσία. 20

1.2.3. Πηγές έκθεσης. 22

1.2.4. Μεταβολισμός. 23

1.2.5. Επιπτώσεις στην υγεία. 25

1.3. Triclosan (TCS). 28

1.3.1. Σύνθεση και ιδιότητες. 28

1.3.2. Ιστορική αναδρομή και νομοθεσία. 31

1.3.5. Επιπτώσεις στην υγεία. 33

1.4. Βιολογικά δείγματα. 35

1.4.1. Αμνιακό υγρό. 35

1.4.2. Τρίχα. 37

1.5. Οργανολογία. 38

1.5.1. Υγρή Χρωματογραφία. 38

1.5.2. Φασματομετρία Μάζας. 40

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ. 42

2.1. Σχεδιασμός και υλοποίηση πειράματος. 42

2.1.1. Ομάδα μελέτης. 42

2.1.2. Ερωτηματολόγιο εγκύου (Ερωτηματολόγιο Α και Β). 42

2.1.3. Ερωτηματολόγιο βρέφους (Ερωτηματολόγιο Γ). 43

2.1.4. Στατιστικές μέθοδοι. 43

2.2. Οργανολογία. 44

2.2.1 Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας. 44

2.2.2. Λοιπός εξοπλισμός..... 44
2.3. Αντιδραστήρια..... 45
2.4. Πειραματική διαδικασία..... 45
2.4.1. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων. 45
2.4.2. Παρασκευή επιμολυσμένων δειγμάτων..... 46
2.4.3. Μέθοδος επεξεργασίας δειγμάτων..... 46
2.4.4. Ανάλυση δειγμάτων με Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας. 47
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... 48
3.1. Χαρακτηριστικά γυναικών και εγκυμοσύνης..... 48
3.2. Αποτελέσματα τοκετού (παιδιά). 51
3.3. Χρήση καλλυντικών και προϊόντων προσωπικής φροντίδας..... 53
3.3.1. Προϊόντα καθημερινής χρήσης και προσωπικής υγιεινής. 53
3.3.2. Διατροφικές συνήθειες..... 54
3.4. Επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου..... 56
3.4.1. Δείγματα αμνιακού υγρού..... 56
3.4.2. Δείγματα τρίχας. 59
3.5. Επίπεδα ενδοκρινικών διαταρακτών στα μελετώμενα βιολογικά υλικά..... 62
3.5.1. Επίπεδα PBs και TCS. 62
3.5.2. Συσχέτιση επιπέδων PBs και TCS με τα χαρακτηριστικά των βρεφών. 69
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ. 72
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ. 77

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ …….…….…..….. 87

I. Ερωτηματολόγια …….…… 87
II. Παραδείγματα χρωματογραφημάτων ……...…… 92

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

APCI: Atmospheric – pressurechemicalionization

BePB: Benzylparaben

BMI: Bodymassindex

BuPB: Butyl paraben

EtPB: Ethyl paraben

IS: Internal standard

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

LC: Liquid chromatography

LOD: Limit of detection

LOQ: Limit of quantification

MS: Mass spectrometer

MePB: Methyl paraben

NAD^+: Nicotinamide adenine dinucleotide$^+$

PBs: Parabens

pHBA: para-hydroxybenzoic acid

PPARα: Peroxisome proliferator-activated receptor α

PPARγ: Peroxisome proliferator-activated receptor γ

PrPB: Propyl paraben

RSD: Relative Standard Deviation

Rt: Retention time

T_3: Triiodothyronine

T_4: Thyroxine

TCS: Triclosan

TSH: Thyroid – stimulating hormone

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ενδοκρινικοί διαταράκτες.

Το σώμα μας έχει τρία σημαντικά συστήματα επικοινωνιών: το νευρικό σύστημα, το ανοσοποιητικό σύστημα και το ενδοκρινικό σύστημα το οποίο είναι ένα δίκτυο αδένων που απελευθερώνουν ορμόνες. Το ενδοκρινικό σύστημα κατέχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του ανθρώπινου οργανισμού και συχνά επηρεάζεται από εξωτερικά ερεθίσματα. Έχει αποδειχθεί ότι μια μεγάλη ποικιλία συνθετικών αλλά και φυσικών παραγόντων – ουσιών αλληλεπιδρούν με το ενδοκρινικό σύστημα. Αν η αλληλεπίδραση με μία συγκεκριμένη ουσία οδηγήσει σε επιπτώσεις στην υγεία ενός οργανισμού ή στους απογόνους του, τότε η ουσία αυτή χαρακτηρίζεται ως ενδοκρινικός διαταράκτης (endocrine disruptor, ED) (European Food Safety Authority, 2013). Συνήθως, οι ενδοκρινικοί διαταράκτες δρουν ανταγωνιστικά σε σχέση με υποδοχείς ορμονών ή αλληλεπιδρώντας με κυτταρικούς, και όχι μόνο, παράγοντες που εμπλέκονται στη σύνθεση και σωστή λειτουργία των ορμονών.

Στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε με τις εξής ενώσεις:

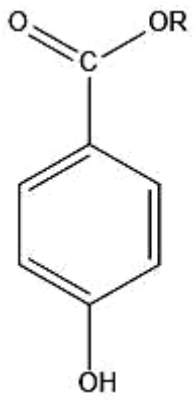
- Παραβένια (Parabens, PBs):
  - Μέθυλ–παραβένιο (Methyl paraben, MePB)
  - Αίθυλ–παραβένιο (Ethyl paraben, EtPB)
  - Βούτυλ–παραβένιο (Butyl paraben, BuPB)
  - Βένζυλ–παραβένιο (Benzyl paraben, BePB)
- Τρικλοζάνη (Triclosan, TCS)

1.2. Parabens (PBs).

1.2.1. Σύνθεση και ιδιότητες.

Τα parabens (PBs) είναι εστέρες του παρα-υδροξυβενζοϊκού οξέος (*para*-hydroxybenzoic acid, pHBA) (Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, 2008), ή 4-υδρόξυβενζοϊκού οξέος

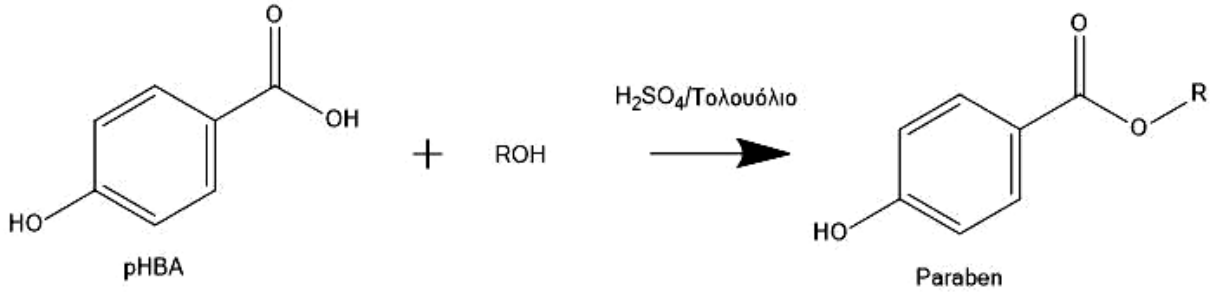
κατά IUPAC με συντακτικό τύπο $C_7H_6O_3R$, όπου R είναι μία αλκυλική ομάδα ή ένας βενζυλικός δακτύλιος στην περίπτωση του benzyl paraben (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1. Δομή των εστέρων του παρα-υδρόξυβενζοϊκού οξέος (Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, 2008).

Αν και γενικά υπάρχει η πεποίθηση ότι τα PBs είναι ανθρωπογενείς ενώσεις, κάτι τέτοιο δεν είναι απολύτως ορθό καθώς έχει βρεθεί ότι κάποιοι οργανισμοί τα παράγουν φυσικά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το στέλεχος A4B-17 του γένους των θαλάσσιων βακτηρίων *Microbulbifer*, το οποίο παράγει μεγάλες ποσότητες pHBA καθώς και βουτανικού, επτανικού και εννεανικού εστέρα του pHBA (butyl-, heptyl- και nonyl paraben, αντίστοιχα) (Peng et al., 2006). Ωστόσο τα φυσικά παραγόμενα PBs δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία καθώς οι καταναλωτικές απαιτήσεις είναι μεγάλες.

Η παρασκευή τους πραγματοποιείται κυρίως με εστεροποίηση του παρα-υδρόξυβενζοϊκού οξέος (pHBA) με περίσσεια της αντίστοιχης αλκοόλης παρουσία ενός καταλύτη (π.χ. πυκνό θειϊκό οξύ) (Liao et al., 2002). Συνήθως, οι αλκυλικοί υποκαταστάτες ποικίλουν από μέθυλ έως βούτυλ ή και βένζυλ ομάδες (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2. Αντίδραση παρασκευής PBs με εστεροποίηση του pHBA.

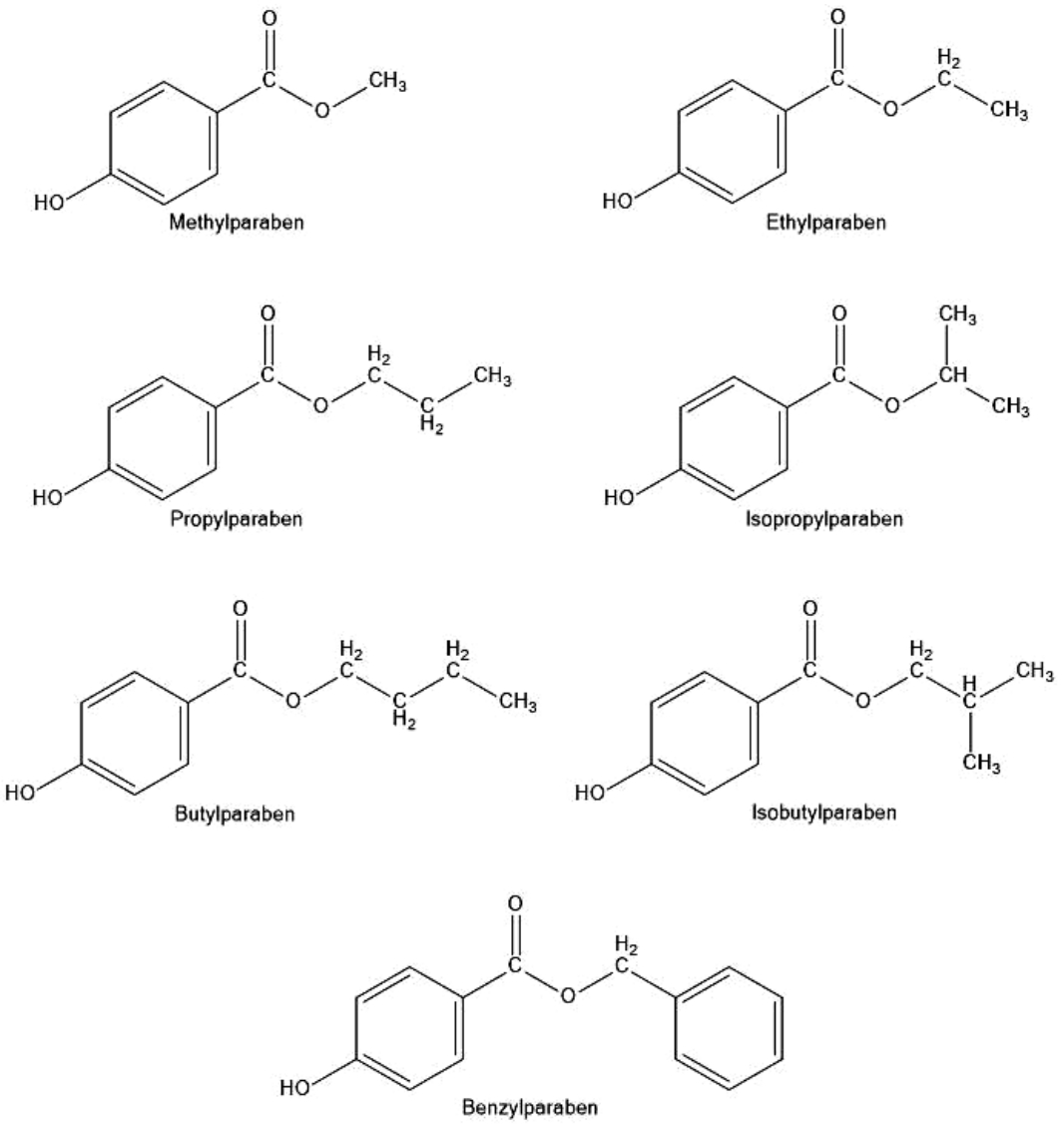
Αν και σε όξινα υδατικά διαλύματα παραμένουν σταθερά, σε αλκαλικά διαλύματα υδρολύονται σε pHBA και την αντίστοιχη αλκοόλη. Έχει αποδειχθεί ότι όσο αυξάνεται το μήκος της αλυσίδας τόσο αυξάνεται και η αντίσταση του εστέρα στην υδρόλυση (Błędzka et al., 2014). Σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο αυτές που χρησιμοποιούνται για τη χλωρίωση του νερού, το χλώριο αντιδρά με τα PBs και παράγονται χλωριωμένα παράγωγα, αντίδραση της οποίας η ταχύτητα αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας (Canosa et al., 2006). Μάλιστα, αρκούν μόλις λίγα λεπτά επαφής του χλωριωμένου νερού βρύσης με τα καλλυντικά ώστε να παραχθούν χλωριωμένα και βρωμιωμένα παραπροϊόντα. Το φαινόμενο αυτό προκαλεί ανησυχία καθώς τα διχλωριωμένα παράγωγα είναι ιδιαιτέρως σταθερά και η οιστρογονική τους δράση είναι ακόμα άγνωστη (Canosa et al., 2006). Ακόμη, τα διχλωριωμένα αυτά παράγωγα είναι περισσότερο τοξικά για τους υδρόβιους οργανισμούς από τις αντίστοιχες μητρικές ενώσεις.

Οι ιδιότητες οι οποίες καθιστούν τα PBs ιδανικά ως συντηρητικά είναι οι εξής:

- Ευρύ φάσμα δραστικότητας ενάντια σε μύκητες και βακτήρια
- Χημική σταθερότητα σε ευρύ φάσμα θερμοκρασιών και σε τιμές pH = 4,5–7,5
- Αδράνεια
- Επαρκή διαλυτότητα στο νερό
- Σχετικά ασφαλής χρήση
- Χαμηλό κόστος παραγωγής
- Μη αντιληπτή οσμή ή γεύση
- Καμία αλλαγή στη συνοχή ή το χρώμα του προϊόντος

1.2.2. Ιστορική αναδρομή και νομοθεσία.

Οι εστέρες του pHBA, δηλαδή τα PBs, άρχισαν να κατασκευάζονται με σκοπό την αντικατάσταση του σαλικυλικού και βενζοϊκού οξέος, των οποίων κύριο μειονέκτημα είναι η αποτελεσματικότητα τους σε αρκετά όξινο pH. Αξίζει να σημειωθεί ότι με τον όρο «parabens» αναφερόμαστε στα benzyl-, butyl-, isobutyl-, propyl-, isopropyl-, ethyl- και methyl-paraben (Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, 2008) (Εικόνα 1.3).



Εικόνα1.3. Δομή των parabens (Darbre & Harvey, 2008).

Στις αρχές της δεκαετίας του 1920 ο T. Sabalitschka συνέθεσε διάφορους άλκυλο- και άρυλο-εστέρες του pHBA και το 1923 πρότεινε τη χρήση αυτών των εστέρων ως συντηρητικά σε τρόφιμα και φαρμακευτικά προϊόντα (Sabalitschka, 1930). Παρά τις πλεονεκτικές φυσικές

ιδιότητες και τα καλύτερα τοξικολογικά χαρακτηριστικά τους σε σχέση με άλλα παρόμοια συντηρητικά, η χρήση των PBs στα τρόφιμα περιορίστηκε σχετικά γρήγορα λόγω των οργανοληπτικών ιδιοτήτων τους. Ωστόσο, η παραγωγή και χρήση τους σε φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα εκτινάχθηκε με πολύ γρήγορους ρυθμούς, γεγονός το οποίο οφείλεται στην αποτελεσματική δράση τους ακόμα και σε ελαφρώς όξινο ή ουδέτερο pH. Μάλιστα, πλέον θεωρείται ότι είναι το πιο κοινό συστατικό, μετά το νερό, σε καλλυντικά προϊόντα. Το 1984 έγινε εκτίμηση της ασφάλειας των MePB, EtPB, PrPB και BuPB τα οποία χαρακτηρίστηκαν ασφαλή στις τότε εφαρμογές τους (Elder, 1984). Η ίδια ομάδα ανέφερε δύο χρόνια μετά ότι τα υπάρχοντα δεδομένα δεν ήταν αρκετά για να υποστηριχτεί το ίδιο για το BePB (Elder, 1986).

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.) το επιτρεπτό όριο PBs που μπορεί να εμπεριέχεται σε καλλυντικά προϊόντα είναι 0,4% για έναν εστέρα και 0,8% για το σύνολο των PBs (Scientific Committee on Consumer Safety, 2010a). Η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) των Ηνωμένων Πολιτειών και η Health Canada του Καναδά έχουν προτείνει τα ίδια όρια για τα PBs όπως αυτά της Ε.Ε. Ωστόσο, δεν υπάρχει νομοθεσία σε καμία από αυτές τις χώρες, μόνο κατευθυντήριες οδηγίες και έτσι η εκάστοτε παραγωγική μονάδα επιλέγει αν θα τις ακολουθήσει (Kirchhof & de Gannes, 2013). Στην Ιαπωνία η μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση PBs είναι 1,0% για το σύνολο τους (Masten et al., 2005). Το 2011, η κυβέρνηση της Δανίας αποφάσισε να προτείνει πρόσθετους περιορισμούς απαγορεύοντας τη χρήση των PrPB, isoPrPB, BuPB και isoBuPB σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας που προορίζονται για παιδιά κάτω των 3 ετών (Scientific Committee on Consumer Safety, 2011). Η Επιστημονική Επιτροπή για την Ασφάλεια των Καταναλωτών (Scientific Committee on Consumer Safety, SCCS) εκτίμησε ότι η ασφάλεια των καταναλωτών είναι διασφαλισμένη όταν το συνολικό περιεχόμενο των καλλυντικών προϊόντων σε BuPB και PrPB δεν υπερβαίνει το 0,19% (Scientific Committee on Consumer Safety, 2011). Λίγα χρόνια μετά, το 2014, η SCCS αναθεώρησε το ποσοστό αυτό μειώνοντας το στο 0,14% (είτε το καθένα ξεχωριστά είτε μίγμα αυτών). Ταυτόχρονα απαγορεύθηκε η χρήση των δύο αυτών PBs σε προϊόντα που έρχονται σε επαφή με την «περιοχή πάνας» παιδιών κάτω των 3 ετών, καθώς το δέρμα είναι ερεθισμένο σε αυτή την περιοχή και αυξάνει τις πιθανότητες διείσδυσής τους στο δέρμα (Official Journal of the European Union, 2014b). Λίγο νωρίτερα την ίδια χρονιά, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή ανακοίνωσε ότι τα MePB και EtPB είναι ασφαλή

στις μέγιστες εγκεκριμένες συγκεντρώσεις, ενώ απαγόρευσε την χρήση των isoPrPB, isoBuPB, phenylPB, BePB και pentylPB (Official Journal of the European Union, 2014a).

1.2.3. Πηγές έκθεσης.

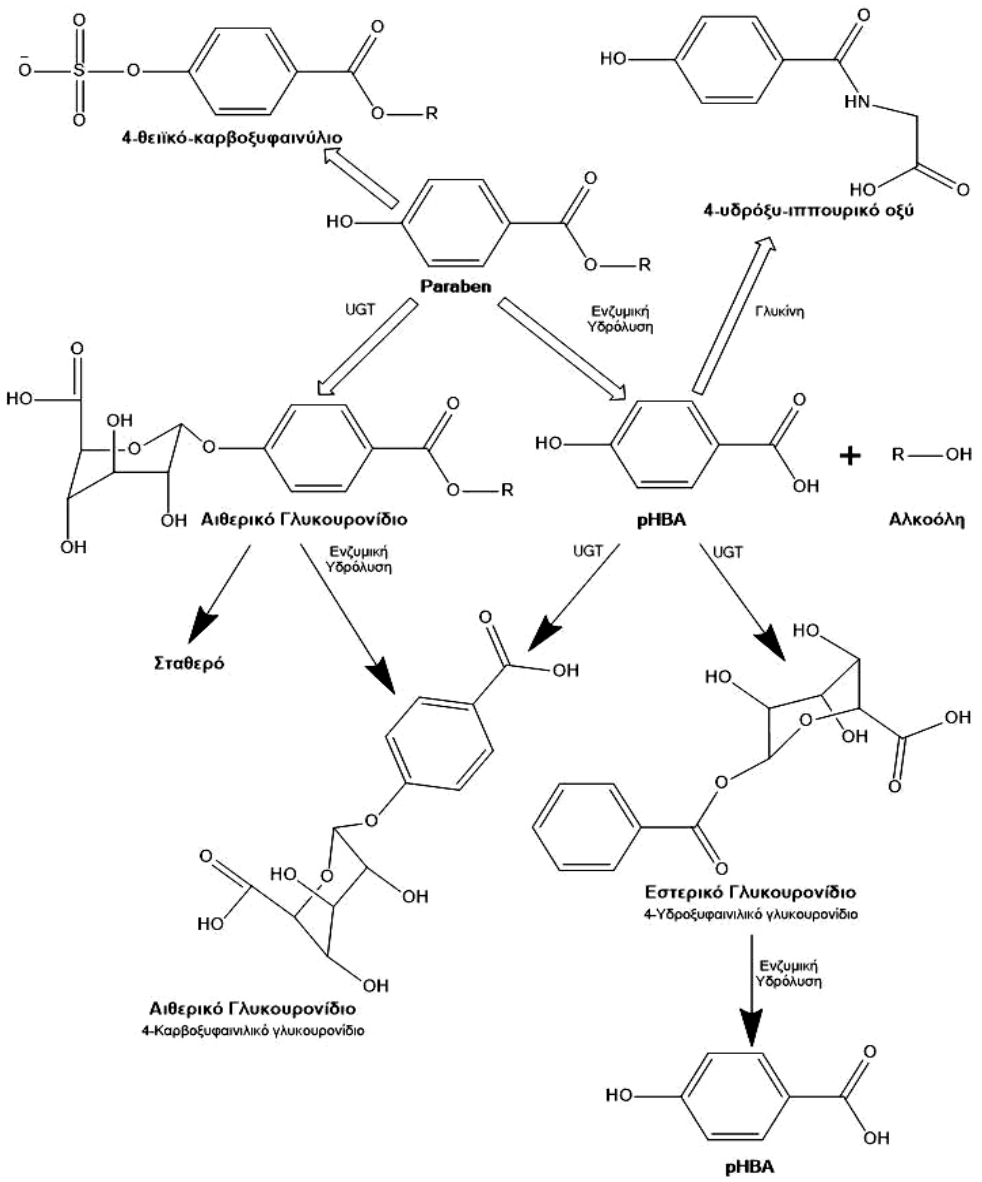
Τα PBs αποτελούν έκδοχα (αδρανή συστατικά) σε φαρμακευτικά προϊόντα όπου χρησιμοποιούνται ως αντιμικροβιακά συντηρητικά. Για αυτό το λόγο θεωρείται ότι τα φάρμακα πιθανώς να αποτελούν σημαντική πηγή έκθεσης σε PBs (Dodge et al., 2015). Ωστόσο τα PBs χρησιμοποιούνται και ως συντηρητικά σε πληθώρα προϊόντων προσωπικής φροντίδας, όπως αποσμητικά, λοσιόν και κρέμες, καλλυντικά, οδοντόκρεμες, προϊόντα για τα μαλλιά και το ξύρισμα, συσκευασίες τροφίμων και βιομηχανικά προϊόντα (Giulivo et al., 2016). Οι Liao και Kannan ανακάλυψαν την ύπαρξη PBs σε κάποια είδη χαρτιού, όπως υγρά μαντηλάκια, χαρτονομίσματα, εισιτήρια, επαγγελματικές κάρτες, χάρτινα δοχεία τροφίμων, φυλλάδια και εφημερίδες (Liao and Kannan, 2014). Ανησυχητικό είναι το γεγονός της ύπαρξης των ενώσεων αυτών και σε μωρομάντηλα, καθώς τα μωρά και τα μικρά παιδιά αποτελούν ευπαθή ομάδα του πληθυσμού. Τα PBs εντοπίζονται επίσης σε κατεργασμένα τρόφιμα όπου χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα, αλλά και σε φυσικά προϊόντα όπως έδειξε μία σχετικά πρόσφατη έρευνα σε μύρτιλα (Juhász & Marmur, 2014). Σε έρευνα που διεξήχθη στην Κίνα ανιχνεύθηκαν PBs σε δημητριακά και προϊόντα όπως κρέας, ψάρια και θαλασσινά, αυγά, γαλακτοκομικά προϊόντα, προϊόντα από φασόλια, φρούτα, μπισκότα, αναψυκτικά, λάδια για το μαγείρεμα, καρυκεύματα και άλλα (Liao et al., 2013).

Η ευρεία παραγωγή και χρήση των PBs ήταν αναμενόμενο να οδηγήσει σε μόλυνση του περιβάλλοντος. Τα επιφανειακά ύδατα είναι πιο επιρρεπή στη μόλυνση εξαιτίας της θέσης τους. Τα PBs μπορούν να απελευθερωθούν στο υδατικό περιβάλλον κυρίως μέσω των απορρίψεων από την επεξεργασία των λυμάτων αλλά και μέσω της εναπόθεσης σωματιδίων της ατμόσφαιρας (Giulivo et al., 2016). Εξαιτίας των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, όπως η διαλυτότητα και οι τιμές του συντελεστή κατανομής νερού – οκτανόλης που ενισχύουν τη συγγένεια με την οργανική ύλη, αυτές οι ενώσεις μπορούν να συσσωρευτούν σε ιζήματα, γεωργικά εδάφη (Núñez et al., 2008), βούρκους (Albero et al., 2012) και ζώντες οργανισμούς (Ramaswamy et al., 2011) και με αυτό τον τρόπο να περάσουν στην τροφική αλυσίδα.

Τα PBs είναι παρόντα και στη σκόνη αλλά και τον αέρα στο εσωτερικό του σπιτιού εξαιτίας της χρήσης προϊόντων που τα περιέχουν (Canosa et al., 2007). Έτσι, ο άνθρωπος τελικά εκτίθεται στα PBs είτε μέσω της αναπνοής είτε μέσω της δερματικής απορρόφησης είτε μέσω της κατάποσης.

1.2.4. Μεταβολισμός.

Γενικά θεωρείται ότι τα PBs απορροφούνται είτε χορηγηθούν διά του στόματος είτε υποδόρια (Aubert et al., 2012). Μάλιστα, το 2005 έρευνα υποστήριξε ότι τα PBs ύστερα από εφαρμογή στο ανθρώπινο δέρμα υδρολύονται γρήγορα και σχεδόν εξ ολοκλήρου σε pHBA οπότε η απορρόφηση της μητρικής ένωσης από τον οργανισμό είναι ελάχιστη (Soni et al., 2005). Αφού υδρολυθούν, εκκρίνονται στα ούρα είτε ως μεταβολίτης pHBA είτε ως προϊόντα συζεύξεως της μητρικής ένωσης ή του κύριου μεταβολίτη της με γλυκίνη, γλυκουρονίδιο ή σουλφίδιο (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4. Μεταβολικά μονοπάτια των PBs στον ανθρώπινο οργανισμό (Abbas et al., 2010).

Τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν ότι τα PBs δεν συσσωρεύονται στο σώμα και οι συγκεντρώσεις τους στο αίμα ελαχιστοποιούνται πολύ γρήγορα (Boberg et al., 2010). Ύστερα από εφαρμογή τους στο δέρμα, απορροφούνται από αυτό και μεταβολίζονται από εστεράσες. Το μέγεθος της απορρόφησης εξαρτάται από το μήκος της αλυσίδας και τη μορφή του PB. Γενικά, η διέλευση από το δέρμα μειώνεται όσο το μήκος της αλυσίδας της προς διέλευση ουσίας αυξάνεται (Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, 2008). Μετά την πρόσληψη από το δέρμα, τα PBs και οι μεταβολίτες τους (συζευγμένοι ή μη) εκκρίνονται στα ούρα και τη χολή. Σε αντίστοιχη δια του στόματος πρόσληψη, τα PBs μεταβολίζονται από εστεράσες

στο έντερο και το συκώτι και εκτός από την έκκριση σε ούρα και χολή, παρουσιάζονται και στα κόπρανα (Boberg et al., 2010).

1.2.5. Επιπτώσεις στην υγεία.

1.2.5.1. Ενδοκρινικό σύστημα.

Τα PBs έχουν μελετηθεί τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* συστήματα ώστε να εξακριβωθεί η οιστρογονική τους δραστηριότητα. Σε μελέτη που έγινε από τον Byford και τους συνεργάτες του για την οιστρογονική δραστηριότητα τεσσάρων PBs (MePB, EtPB, PrPB και BuPB) και την ικανότητά τους να προσδένονται στον υποδοχέα βρέθηκε ότι οι ενώσεις αυτές προσδένονται στον υποδοχέα *α* της 17*β*-οιστραδιόλης, ωστόσο η πιθανότητα πρόσδεσής τους είναι 10.000–100.000 φορές μικρότερη από εκείνη της 17*β*-οιστραδιόλης (Byford et al., 2002). Παρόμοια συμπεριφορά παρουσίασε και το BePB όσον αφορά στην ικανότητά του να μιμείται τη δράση της 17*β*-οιστραδιόλης και να ρυθμίζει το γονίδιο ERE-CAT που σχετίζεται με τα MCF-7 καρκινικά κύτταρα του στήθους αλλά και την επιρροή που έχει στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών. Το BePB έδειξε παρόμοια δράση με την 17*β*-οιστραδιόλη σε συγκεντρώσεις όμως 1.000–10.000 μεγαλύτερες από εκείνη (Darbre et al., 2003). Αξίζει να σημειωθεί ότι η συγγένεια των PBs για τον υποδοχέα *α* και *β* της οιστραδιόλης, δηλαδή η οιστρογονική δραστηριότητά τους, αυξάνεται με την αύξηση του μήκους και των διακλαδώσεων της αλυσίδας των εστέρων αυτών (Byford et al., 2002; Okubo et al., 2001). Πρόσφατα, ο Engeli και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν *in vitro* πειράματα με σκοπό την εκτίμηση της οιστρογονικής δραστηριότητας των PBs επιβεβαιώνοντας την παραπάνω θεώρηση (Engeli et al., 2017). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι περισσότερες μελέτες, όπως και οι παραπάνω, αφορούν στην επίδραση ενός και όχι συνδυασμού PBs, που θα μπορούσαν να δράσουν συνεργικά και να επιφέρουν εντονότερες επιδράσεις.

Όπως είναι φυσικό, αυτή η αποδιοργάνωση των οιστρογόνων επιφέρει αλλαγές σε όλο το σώμα. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η έκθεση σε PBs μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές του βάρους των ωοθηκών, των επινεφριδίων, του θυρεοειδή αδένα, του ήπατος και των νεφρών (Vo et al., 2010). Ακόμη, έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στη μορφολογία της μήτρας, όπως υπερτροφία του μυομητρίου, και ιστοπαθολογικές ανωμαλίες στις ωοθήκες όπως αύξηση των

κυστικών ωοθηλακίων και αραίωση του θυλακικού επιθηλίου. Η μείωση των επιπέδων της οιστραδιόλης και της θυροξίνης στο αίμα αποτελούν επίσης αποτέλεσμα της έκθεσης σε PBs.

Τα PBs δεν επηρεάζουν μόνο το αναπαραγωγικό σύστημα των γυναικών. Έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν αντι-ανδρογονική δραστηριότητα με την πρόσδεση τους σε ανδρογονικούς υποδοχείς (Satoh et al., 2005) αλλά και προκαλώντας αναστολή της δράσης της τεστοστερόνης που επάγει τη μεταγραφή (Chen et al., 2007). Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε αρουραίους και ποντίκια έδειξαν ότι έπειτα από έκθεση σε PBs (ιδιαίτερα σε PB μεγάλης αλκυλικής αλυσίδας και διακλαδώσεων όπως το BuPB) παρουσιάστηκε μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων και των επιπέδων τεστοστερόνης. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν μειωμένα αποθέματα σπερματοζωαρίων στην ουρά της επιδιδυμίδας, καθώς και μειωμένος αριθμός και παραγωγή σπερματοζωαρίων ανά ημέρα (Oishi, 2001; Oishi, 2002). Αυτό επιβεβαιώθηκε και από έρευνα που έγινε σε αρουραίους που κυοφορούσαν και υπόκειντο έκθεση σε BuPB. Όπως αποδείχθηκε το BuPB επηρέασε το αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών αρουραίων που γεννήθηκαν, καθώς εμφάνισαν μειωμένη κινητικότητα και αριθμό σπερματοζωαρίων (Kang et al., 2002).

1.2.5.2. Καρκίνος.

Τα μέχρι τώρα δεδομένα της επιστημονικής κοινότητας δεν επιβεβαιώνουν περιπτώσεις πρόκλησης καρκίνου έπειτα από έκθεση σε PBs. Τα PBs προσδένονται ανταγωνιστικά στον υποδοχέα *γ* της οιστραδιόλης ο οποίος είναι διαγνωστικός δείκτης και στόχος για τη θεραπεία του καρκίνου του στήθους (Zhang et al., 2013) γι' αυτό και η συχνή εμφάνιση καρκίνου του στήθους στο άνω εξωτερικό τεταρτημόριο του στήθους (περίπου 60% του συνόλου των καρκίνων στήθους) γέννησε υποψίες για το κατά πόσον σχετίζεται η χρήση προϊόντων, τα οποία περιέχουν PBs, στη μασχάλη με την ανάπτυξη καρκίνου. Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε και από το γεγονός ότι ασθενείς με αυξημένη χρήση αποσμητικών στη μασχάλη εμφάνισαν καρκίνο του στήθους σε μικρότερη ηλικία (Darbre & Harvey, 2008). Η μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του στήθους στο άνω εξωτερικό τεταρτημόριο μπορεί να οφείλεται στην μεγαλύτερη ποσότητα επιθηλιακού ιστού σε αυτή την περιοχή του στήθους, ωστόσο η συνεχής αύξηση των καρκίνων σε αυτό το σημείο τα τελευταία χρόνια δεν μπορεί να ερμηνευθεί μόνο από την κατανομή του ιστού και σίγουρα υπάρχει κάποιος παράγοντας ο οποίος δεν έχει ερμηνευθεί ακόμα (Barr et al., 2012). Θεωρείται μάλιστα πιθανό η

οιστρογονική δραστηριότητα των PBs να επηρεάζει μόνο καρκίνους που εξαρτώνται από οιστρογόνα όπως ο καρκίνος του στήθους. Το 2007 ο Prusakiewicz και οι συνεργάτες του αποκάλυψαν ότι τα PBs μπορούν να εμποδίσουν την σουλφυδίωση των οιστρογόνων εμποδίζοντας τη δράση των σουλφοτρανσφερασών, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της ελεύθερης οιστραδιόλης (Prusakiewicz et al., 2007) και το 2013 οι Wróbel και Gregoraszczuk ανέφεραν ότι τα PBs ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του καρκίνου του στήθους (MCF-7) αυξάνοντας την έκκριση της οιστραδιόλης και τη δράση της αρωματάσης. (Wróbel & Gregoraszczuk, 2013).

Η χρήση των PBs σε πληθώρα καλλυντικών προϊόντων και προϊόντων προσωπικής φροντίδας τα οποία εφαρμόζονται στο δέρμα αναμένεται να επηρεάζει τα διάφορα στρώματα και τις λειτουργίες του δέρματος. Το 2007 ο Ishiwatari και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι το MePB μπορεί πράγματι να επηρεάσει τη γήρανση και διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, καθώς επηρεάζεται ο ρυθμός πολλαπλασιασμού και η μορφολογία των κερατινοκυττάρων, η έκφραση της συνθάσης του υαλουρονικού και ο τύπος κολλαγόνου IV (Ishiwatari et al., 2006). Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι τα MePB και EtPB επάγουν το οξειδωτικό στρες στο δέρμα και ότι το MePB είναι επιβλαβές για τα κερατινοκύτταρα του δέρματος όταν συνδυαστεί με έκθεση σε UVB ακτινοβολία. Η επαγόμενη από UVB ακτινοβολία παραγωγή ελευθέρων ριζών και μονοξειδίου του αζώτου καθώς και η ενεργοποίηση των NFκB και AP-1 (παράγοντες μεταγραφής του πυρήνα) στα κερατινοκύτταρα ενισχύεται σημαντικά από το MePB. Επίσης, έπειτα από συνδυασμό UVB ακτινοβολίας και MePB παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων των (HaCaT) κερατινοκυττάρων. Οι αλλαγές αυτές εκτιμάται πως είναι πιθανό να συνεισφέρουν στον κυτταρικό θάνατο, φαινόμενο το οποίο παρατηρήθηκε έπειτα από ταυτόχρονη έκθεση σε MePB και UVB ακτινοβολία (Handa et al., 2006). Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα καθώς και η συνεχής αύξηση εμφάνισης καρκίνων του δέρματος (3–8% ανά έτος στις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες) από την δεκαετία του 1960 που πρωτοεμφανίστηκαν τα PBs στην αγορά (Thompson et al., 2005), έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι ίσως τα PBs παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση αυτού του τύπου καρκίνου (Darbre & Harvey, 2008).

1.2.5.3. Άλλες επιπτώσεις.

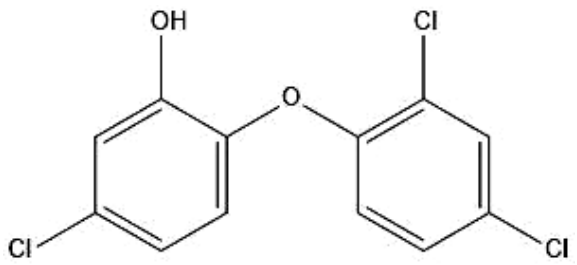
Έχει αποδειχθεί ότι τα PBs επηρεάζουν και τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, επάγοντας την εμφάνιση παχυσαρκίας. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι προάγουν τη συσσώρευση των λιπιδίων, τη λιπογένεση σε κύτταρα ποντικών και επηρεάζουν τη λιπώδη μετατροπή των ανθρώπινων πολυδυναμικών στρωματικών κυττάρων (human adipose–derived multipotent stromal cells (hADSC)) που προέρχονται από το λιπώδη ιστό (Hu et al., 2013). Οι επιδράσεις αυτές επιτυγχάνονται μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και/ή με τους υποδοχείς που ενεργοποιούνται από τον πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων (PPARγ). Όπως και στις προηγούμενες επιδράσεις τους, η δραστικότητα των PBs, όσον αφορά τη λιπογένεση, αυξάνεται με την αύξηση του μήκους και των διακλαδώσεων της αλκυλικής αλυσίδας.

Ακόμη, το EtPB έχει συσχετιστεί με την 8-οξο-2'-δεοξυγουανοσίνη εγκύων γυναικών, η οποία αποτελεί δείκτη των οξειδωτικών βλαβών του DNA (Kang et al., 2013), ενώ τα PrPB και BuPB με βλάβες στο DNA και χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Tayama et al., 2008) προκαλώντας ανησυχίες για την εν δυνάμει γενοτοξικότητα που μπορεί να εμφανίσουν. Τα PBs έχουν επίσης συσχετιστεί με την ευαισθησία σε αεροαλλεργιογόνα (Savage et al., 2012) και την εμφάνιση αλλεργικής δερματίτιδας εξ επαφής (Deza & Giménez-Arnau, 2017).

1.3. Triclosan (TCS).

1.3.1. Σύνθεση και ιδιότητες.

Το TCS είναι μία χλωριωμένη αρωματική ένωση που έχει λειτουργικές ομάδες αντιπροσωπευτικές τόσο των αιθέρων όσο και των φαινολών. Σύμφωνα με την IUPAC, η ονομασία του είναι 5-χλώρο-2-(2,4-διχλωροφαινόξυ) φαινόλη και ο συντακτικός του τύπος είναι $C_{12}H_7Cl_3O_2$. Αποτελείται από δύο φαινυλικούς δακτυλίους ενωμένους με ένα άτομο οξυγόνου όπως γίνεται στην περίπτωση των αιθέρων. Ο ένας δακτύλιος έχει 2 άτομα χλωρίου σε μέτα θέση μεταξύ τους ενώ ο άλλος έχει ένα άτομο χλωρίου και μία υδροξυλική ομάδα σε μέτα θέση μεταξύ τους (Εικόνα 1.5).

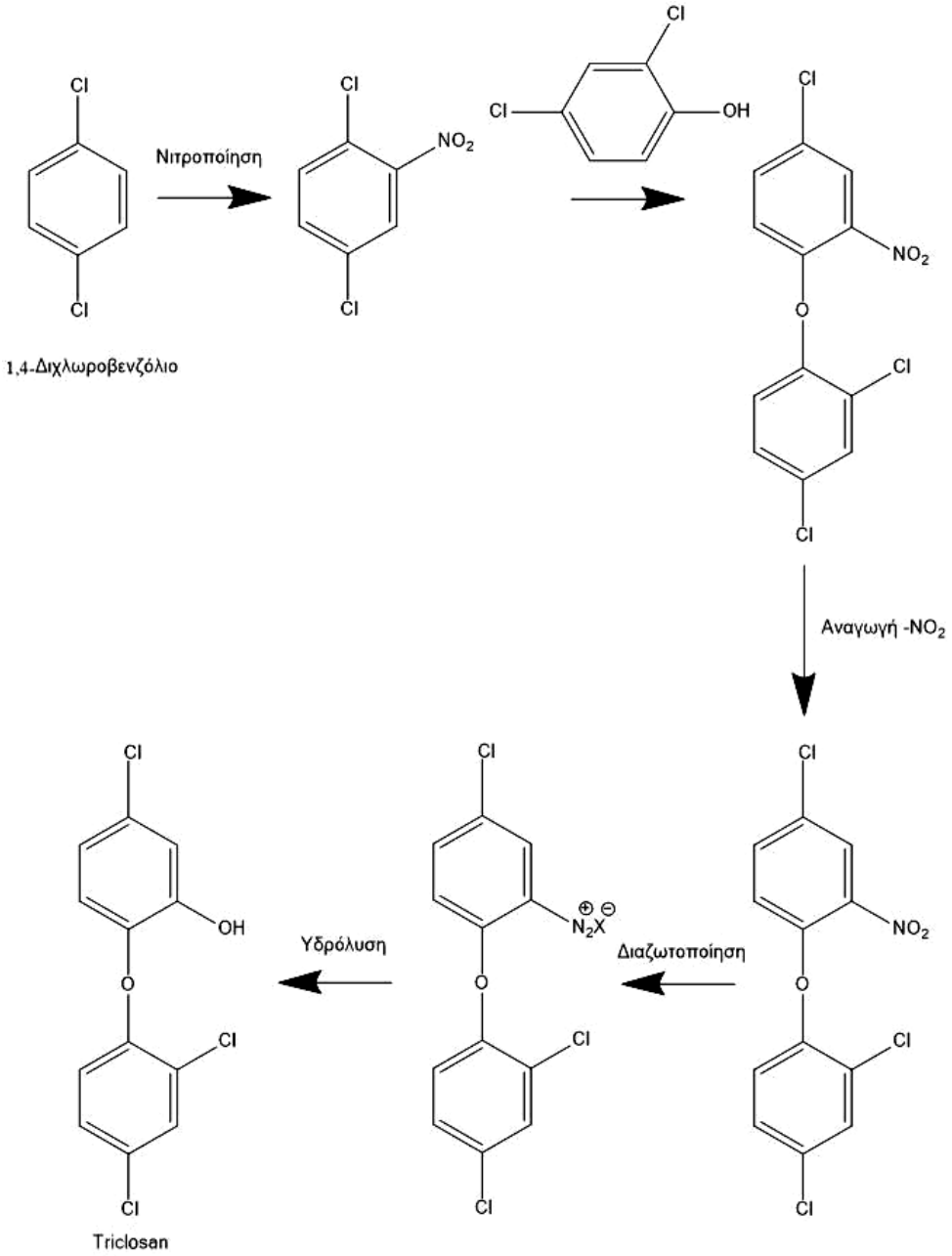


Εικόνα 1.5. Δομή του triclosan (U.S. Food and Drug Administration, 2008).

Θεωρητικά το TCS μπορεί να συντεθεί με αρκετούς μηχανισμούς. Από τους επικρατέστερους είναι ο παρακάτω (Εικόνα 1.6) με πρόδρομη ένωση το 1,4-διχλωροβενζόλιο (Gerhardus Johannes Lourens, 1999).

Σύμφωνα με την εταιρία που εισήγαγε το TCS στην αγορά, είναι πρακτικά αδιάλυτο στο νερό, μερικώς διαλυτό σε αλκαλικά διαλύματα και εύκολα διαλυτό στους μη πολικούς οργανικούς διαλύτες. Επίσης, παραμένει σταθερό σε θερμοκρασίες 150-200˚C αν δεν θερμανθεί για διάστημα μεγαλύτερο των δύο ωρών (Ciba-Geigy Company, Βασιλεία, Γερμανία). Θεωρείται αντιμικροβιακός παράγοντας με πολλαπλούς στόχους καθώς έχει τη δυνατότητα να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες και να επηρεάζει κάποιες από τις λειτουργίες, γεγονός το οποίο δικαιολογεί και την ευρεία χρήση του (Bhargava & Leonard, 1996).

Αν και είναι ιδιαιτέρως σταθερό σε υψηλά και χαμηλά pH, το TCS μπορεί να αποικοδομηθεί στο περιβάλλον με τη βοήθεια του φωτός και να παραχθούν χλωριωμένες φαινόλες, χλωρο υδρόξυ διφαίνυλ-αιθέρες, κ.ά. Κάποια από αυτά τα παράγωγα εμφανίζουν μεγαλύτερη τοξικότητα από το TCS αλλά έχει αποδειχθεί ότι αποικοδομούνται, όπως και το TCS, από βακτήρια όπως τα *Pseudomonas*, *Burkholderia* και *Sphingomonas* (Field & Sierra-Alvarez, 2008a; Field & Sierra-Alvarez, 2008b). Το TCS είναι επίσης ευπαθές στην υδατική φωτόλυση με χρόνο ημιζωής μικρότερο από μία ώρα σε αβιοτικές συνθήκες και έως 10 ημέρες σε νερό λίμνης (Scientific Committeeon Consumer Safety, 2010b).



Εικόνα 1.6. Μηχανισμός παραγωγής triclosan (Gerhardus Johannes Lourens, 1999).

1.3.2. Ιστορική αναδρομή και νομοθεσία.

Το TCS άρχισε να παράγεται από την εταιρία Ciba-Geigy (Βασιλεία, Ελβετία) στις αρχές της δεκαετίας του ’60. Στην αγορά κυκλοφόρησε σε πρώτη φάση με την ονομασία Irgasan DP300 για εφαρμογή στο δέρμα και Irgacare MP για προϊόντα στοματικής υγιεινής. Πλέον διανέμεται ως επί το πλείστον από την Ciba Specialty Chemicals Corporation, High Point, Βόρεια Καρολίνα (Jones et al., 2000) και έχει λάβει και άλλες κωδικές ονομασίες καθώς χρησιμοποιείται σε διαφορετικές κατηγορίες προϊόντων και με διαφορετική εφαρμογή (Scientific Committee on Consumer Safety, 2010).

Από το 1986 έχει επιτραπεί από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα η χρήση του TCS ως συντηρητικό σε καλλυντικά προϊόντα σε συγκεντρώσεις έως 0,3% (European Commission. 2010). Μάλιστα, λίγα χρόνια αργότερα ο Οργανισμός Προστασίας του Περιβάλλοντος των Η.Π.Α. (US Environmental Protection Agency, US EPA) επέτρεψε τη χρήση του TCS ως αντιμικροβιακό φυτοφάρμακο για μυκητοκτόνες/μυκητοστατικές και βακτηριοστατικές εφαρμογές (Federally Registered Pesticides, 1993). Το 1997 η FDA ενέκρινε τη χρήση TCS σε οδοντόκρεμες που στοχεύουν σε ασθένειες των ούλων (U.S. Food and Drug Administration, 1997), ενώ 3 χρόνια αργότερα επιτράπηκε από την Επιστημονική Επιτροπή Τροφίμων (Scientific Committee on Food, SCF) η χρήση του TCS σε υλικά που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα, όπως μαγειρικά σκεύη και δοχεία συσκευασίας τροφίμων, ούτως ώστε να διασφαλίζεται η μη μόλυνση αυτών από βακτήρια και άλλους μικροοργανισμούς (Scientific Committee on Consumer Safety, 2010b). Ωστόσο 10 χρόνια μετά η χρήση αυτή του TCS απαγορεύτηκε καθώς περνά από τα υλικά αυτά στα τρόφιμα και καταλήγει στον άνθρωπο. Τον Ιανουάριο του 2016 η Ευρωπαϊκή Επιτροπή επανεξέτασε τη χρήση του TCS, μη εγκρίνοντας πλέον τη χρήση του ως ενεργή ουσία σε βιοκτόνα που χρησιμοποιούνται σε προϊόντα προσωπικής υγιεινής (Official Journal of the European Union, 2016).

1.3.3. Πηγές έκθεσης.

Το TCS είναι μία αντιμικροβιακή ουσία με ευρύ φάσμα δράσης και χρησιμοποιείται ως αντισηπτικό, απολυμαντικό ή συντηρητικό σε πληθώρα προϊόντων. Συγκεκριμένα συναντάται σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας όπως οδοντόκρεμες, στοματικά διαλύματα, αποσμητικά, σαπούνια και κρέμες αλλά και σε ιατρικές συσκευές, υφάσματα, υγρά σαπούνια

πιάτων, παιχνίδια και πλαστικά μαγειρικά σκεύη. Η χρήση του TCS στα διάφορα προϊόντα προσωπικής φροντίδας είχε αρχικά κριθεί ασφαλής. Η εκτίμηση όμως αυτή είχε γίνει για τη χρήση του εκάστοτε προϊόντος και όχι του συνόλου και χωρίς να εκτιμηθεί η έκθεση σε αυτό μέσω και άλλων προϊόντων όπως πλαστικών μαγειρικών σκευών ή υφασμάτων (Scientific Committee on Consumer Safety, 2010b).

Εκτός από την άμεση έκθεση σε TCS, μέσω της επαφής με προϊόντα που το περιέχουν, έχει καταγραφεί και έμμεση έκθεση. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως στο παρελθόν είχε επιτραπεί η χρήση του TCS σε υλικά που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα ωστόσο η χρήση αυτή απαγορεύθηκε σύντομα καθώς το TCS περνά από τα υλικά αυτά στα τρόφιμα και καταλήγει στον άνθρωπο. Αν και η απαγόρευση αυτή έχει εφαρμοσθεί από το 2010 (Scientific Committee on Consumer Safety, 2010b), τέτοια υλικά τα οποία περιέχουν TCS όπως είναι φυσικό χρησιμοποιούνται ακόμα με αποτέλεσμα την συνεχή έκθεση μας σε αυτά.

Η ευρεία χρήση του TCS οδηγεί στην απόρριψη του στα λύματα. Η ημιτελής αφαίρεση του από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων καθώς και η απόρριψη βιοστερεών, τα οποία περιέχουν TCS, στα εδάφη, οδηγούν στην διασπορά του στα εδάφη και τα επιφανειακά ύδατα. Το TCS έχει ανιχνευθεί σε εισροές, εκροές και βιοστερεά εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων, καθώς και σε λίμνες, ποτάμια και θάλασσες σε όλο τον κόσμο (Scientific Committee on Consumer Safety, 2010b).

1.3.4. Μεταβολισμός.

Έρευνες έχουν δείξει ότι όταν το TCS εισέρχεται στον οργανισμό από το στόμα απορροφάται άμεσα από το γαστρεντερικό σωλήνα και μεταβολίζεται στη φάση ΙΙ του μεταβολισμού. Στη φάση αυτή το TCS συζευγνύεται μέσω της υδροξυλικής του ομάδας με το γλυκουρονίδιο ή σουλφίδιο (U.S. Food and Drug Administration, 2008). Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση της επιδερμικής έκθεσης σε TCS. Οι λιποφιλικές ιδιότητες επιτρέπουν την απορρόφησή του από το δέρμα και τη διείσδυση του στον οργανισμό μέσω του αίματος σε διάστημα μίας ώρας από την εφαρμογή του στο δέρμα. Θεωρείται ότι το μεγαλύτερο μέρος του μεταβολισμού του πραγματοποιείται κατά το πέρασμά του από την κεράτινη στιβάδα και μέσω των κερατινοκυττάρων της βασικής στιβάδας της επιδερμίδας. Ακόμη, το TCS μπορεί να περάσει ταχέως στον οργανισμό μέσω των θυλάκων της τρίχας έχοντας μεταβολιστεί

ελάχιστα έως καθόλου (Moss et al., 2000). Η απομάκρυνση του από τον οργανισμό γίνεται όπως και στην περίπτωση των PBs μέσω των ούρων και των κοπράνων ως επί το πλείστον στη συζευγμένη του μορφή (U.S. Food and Drug Administration, 2008).

1.3.5. Επιπτώσεις στην υγεία.

1.3.5.1. Ενδοκρινικό σύστημα.

Το TCS δρα ως βιοκτόνο με πολλαπλούς κυτταροπλασματικούς και μεμβρανικούς στόχους. Ωστόσο, στα καταναλωτικά προϊόντα βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις οπότε και δρα περισσότερο ως βακτηριοστατικό εμποδίζοντας τη σύνθεση λιπαρών οξέων των βακτηρίων (Russell, 2004). Το TCS προσδένεται στη βακτηριακή ενόυλ-ρεδουκτάση ενισχύοντας έτσι τη συγγένεια της με το NAD^+. Η ενίσχυση της συγγένειας αυτής οδηγεί στο σχηματισμό ενός σταθερού συμπλόκου ρεδουκτάσης - NAD^+ - TCS το οποίο δεν μπορεί να συμμετάσχει στη σύνθεση των λιπαρών οξέων (Heath et al., 1999). Τα λιπαρά οξέα είναι απαραίτητα για την δομή των κυτταρικών μεμβρανών. Ευτυχώς στον ανθρώπινο οργανισμό δεν υπάρχει το ένζυμο ενόυλ-ρεδουκτάση και έτσι δεν επηρεάζεται από αυτή την δράση του TCS.

Μελέτες σε αρουραίους έχουν δείξει ότι το TCS σε δόσεις της τάξης των mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα μπορεί να επιφέρει μείωση στην T_4 του ορού του αίματος χωρίς όμως να ακολουθούν αυτή τη μείωση η T_3 και η TSH. Θεωρείται πως η υποθυροξυναιμία παρουσιάζεται εξαιτίας της αυξημένης απομάκρυνσης της T_4 από το σώμα γεγονός το οποίο αποδίδεται στην αυξημένη δράση των φάσεων I και II του μεταβολισμού. Ωστόσο δεν υπάρχουν αρκετά πειραματικά δεδομένα για να υποστηρίξουν την υπόθεση αυτή. Μάλιστα, φαίνεται ότι οι επιδράσεις στον θυρεοειδή αδένα των αρουραίων ίσως να μην είναι πολύ σχετικές με τις αντίστοιχες του ανθρώπου γιατί ο αδένας των αρουραίων εμφανίζει αυξημένη δραστηριότητα σε σχέση με του ανθρώπου και ακόμη, οι δόσεις που χορηγήθηκαν στα πειραματόζωα ήταν πολύ μεγαλύτερες σε σχέση με τις αντίστοιχες που έχουν καταγραφεί στον άνθρωπο. Μέχρι τώρα, έρευνες σε ανθρώπινο πληθυσμό δεν έχουν αναφέρει δυσμενείς επιπτώσεις στη λειτουργία του θυρεοειδή αδένα (Witorsch, 2014).

Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι το TCS προσδένεται στους ανδρογονικούς υποδοχείς (Gee et al., 2008) και επίσης εμποδίζει την παραγωγή της τεστοστερόνης (Kumar et al., 2008). Σε έρευνα με αντικείμενο τις επιδράσεις του TCS στο

αρσενικό σύστημα αναπαραγωγής, καταγράφηκε η μείωση του βάρους του σώματος των αρουραίων αλλά και του προστάτη (Lan et al., 2013). Είναι φυσικό να θεωρούμε ότι η μείωση του βάρους συγκεκριμένων οργάνων του οργανισμού σχετίζεται με τη συνολική μείωση του βάρους του σώματος, μπορεί όμως και να οφείλεται σε στοχευμένη τοξικότητα του TCS στο συγκεκριμένο όργανο (Clegg et al., 2001). Στην ίδια μελέτη στους αρσενικούς αρουραίους, παρατηρήθηκε ασθενής βλάβη στην ουρά της επιδιδυμίδας και στους όρχεις. Παράλληλα παρατηρήθηκε μειωμένη παραγωγή σπερματοζωαρίων και αυξημένη εμφάνιση ανωμαλιών στη μορφολογία των σπερματοζωαρίων (Lan et al., 2013). Αυξημένα ποσοστά ανωμαλιών στη μορφολογία των σπερματοζωαρίων παρουσιάστηκαν και σε έρευνα σε άντρες στην Πολωνία με αυξημένες συγκεντρώσεις TCS στα ούρα (Zurewicz et al., 2018).

Εκτός από τη συγγένεια που παρουσιάζει το TCS με τους ανδρογονικούς υποδοχείς, έχει αποδειχθεί η συγγένεια του και με τους οιστρογονικούς υποδοχείς. Ωστόσο τα αποτελέσματα των ερευνών που έχουν προηγηθεί έρχονται σε αντιπαράθεση, και έτσι δεν θεωρείται πως υπάρχει σαφή εικόνα για τις πιθανές επιδράσεις στο αναπαραγωγικό σύστημα των γυναικών. Επίσης, οι περισσότερες μελέτες έχουν ως ομάδα ελέγχου πειραματόζωα, όποτε πρόκειται και για μεταβολικά συστήματα που διαφέρουν έστω και λίγο από του ανθρώπου, όπως διαφέρει και ο τρόπος αλλά και οι ποσότητες οι οποίες χορηγούνται θέτοντας σε αμφισβήτηση αυτά τα αποτελέσματα (Witorsch et al., 2014). Παρόλα αυτά ενδιαφέρον προκαλεί το εύρημα πειραμάτων σε καρκινικές σειρές προβάτων περί αναστολής της σουλφονυλίωσης της οιστραδιόλης (James et al., 2010) η οποία συνδέεται με αποβολή κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης (Tong et al., 2005).

1.3.5.2. Καρκίνος.

Σύμφωνα με την Επιτροπή Αξιολόγησης του Καρκίνου των Η.Π.Α. (US EPA's Cancer Assessment Review Committee) τα αποτελέσματα πειραμάτων σε ποντίκια έδειξαν ότι το TCS ενεργοποιεί τον υποδοχέα *α* που ενεργοποιείται από τον πολλαπλασιαστή των υπεροξυσωμάτων (PPARα) και έτσι αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του ήπατος. Ωστόσο υπάρχουν αμφιβολίες σχετικά με το πόσο πιθανό είναι αυτό στην περίπτωση του ανθρώπου καθώς η δράση των ανθρώπινων υπεροξυσωμάτων είναι σχεδόν 10 φορές μικρότερη από την αντίστοιχη των ποντικών και δεν έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχουν σε καρκινογένεση στον άνθρωπο (US Environmental Protection Agency, 2008a).

1.3.5.3. Άλλες επιπτώσεις.

Έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε αρουραίους έδειξε ότι η χορήγηση μεγάλων δόσεων TCS (>300 mg/kg ανά ημέρα) οδήγησε σε μειωμένη κίνηση, πολυδιψία και πολυουρία. Παρόλα αυτά δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στο βάρος και την ιστοπαθολογία του εγκεφάλου και στα περιφερικά νεύρα (US Environmental Protection Agency, 2008b) .

Το TCS θεωρείται και αλλεργιογόνο. Έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την ευαισθησία σε εισπνεόμενα και εποχικά αλλεργιογόνα, όχι όμως σε αλλεργιογόνες τροφές. Επίσης, σε παιδιά που ήταν ήδη ευαίσθητα σε αλλεργίες παρατηρήθηκε συσχέτιση της αλλεργικής ρινίτιδας με την έκθεση σε TCS (Bertelsen et al., 2013). Αν και το TCS βρίσκεται κυρίως σε προϊόντα που έρχονται σε επαφή με το δέρμα, δεν έχουν παρατηρηθεί έντονα φαινόμενα δερματικών ερεθισμών, με κάποιες μεμονωμένες εξαιρέσεις ανθρώπων οι οποίοι είχαν ευαισθησία στα συγκεκριμένα προϊόντα και εμφάνισαν δερματίτιδα εξ επαφής (Rodricks et al., 2010).

Τέλος, το TCS μπορεί να αντιδράσει με το χλώριο του χλωριωμένου νερού βρύσης παράγοντας ενώσεις όπως η 2,4-διχλωροφαινόλη. Μάλιστα, η χλωρίωση του φαινυλικού δακτυλίου του TCS και η διάσπαση του αιθερικού δεσμού θεωρούνται κύρια μονοπάτια αποικοδόμησης του στο υδάτινο περιβάλλον (Canosa et al., 2005). Ανησυχητικό είναι όμως το γεγονός ότι οι παραγόμενες αυτές ενώσεις μπορούν να μετατραπούν σε διοξίνες αν εκτεθούν σε UV ακτινοβολία (Bedoux et al., 2012).

1.4. Βιολογικά δείγματα.

1.4.1. Αμνιακό υγρό.

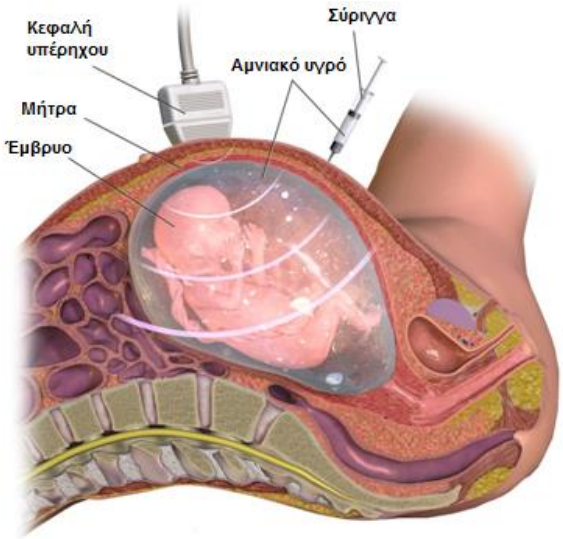
Το αμνιακό υγρό είναι το υγρό το οποίο περιβάλλει το έμβρυο στην κοιλιά της μητέρας. Συνήθως έχει ένα υποκίτρινο χρώμα και πάντα περιβάλλεται και αυτό και το έμβρυο από ένα σάκο, τον λεγόμενο αμνιακό σάκο. Το αμνιακό υγρό παράγεται διαμέσου της διάχυσης από το πλάσμα της μητέρας. Η σύνθεση του αλλάζει ανάλογα με το στάδιο της κύησης. Στην αρχή της κύησης το αμνιακό υγρό περιέχει ηλεκτρολύτες και νερό αλλά περίπου την 14^{η} εβδομάδα της κύησης γίνεται πλούσιο σε αλβουμίνη, ουρία, ουρικό οξύ, κρεατινίνη, λεκιθίνη,

σφιγγομυελίνη, χολυρεθρίνη, φρουκτόζη και λιπίδια (Biologydictionary.net, 2014; Lowdermilk, Perry & Cashion, 2010).

Το αμνιακό υγρό είναι ένα πλούσιο μίγμα θρεπτικών ουσιών και παραγόντων ανάπτυξης που παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εμβρύου όσο και στην αντιμικροβιακή προστασία του. Συγκεκριμένα (Lowdermilk, Perry & Cashion, 2010):

- Βοηθά να διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία του σώματος.
- Αποτελεί πηγή υγρών για το έμβρυο και ταυτόχρονα αποθηκεύει τα άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού του.
- Προφυλάσσει το έμβρυο από τραυματισμούς με τη διασπορά και άμβλυνση των εξωτερικών δυνάμεων.
- Επιτρέπει την ελευθερία κινήσεων για την ανάπτυξη του μυοσκελετικού συστήματος.

Αφού το αμνιακό υγρό συντίθεται από το πλάσμα της μητέρας αναμένεται ότι περνάει στο αίμα (και κατ' επέκταση στο πλάσμα) της μητέρας να περνάει και στο έμβρυο. Η πλέον διαδεδομένη μέθοδος για την εξακρίβωση στοιχείων όπως το φύλο του εμβρύου, χρωμοσωμικές ανωμαλίες, πιθανές μολύνσεις ή και άλλων παραγόντων που μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη του εμβρύου, είναι η αμνιοπαρακέντηση (Εικόνα 1.7) (Biologydictionary.net, 2014). Στην παρούσα μελέτη έγινε λήψη αμνιακού υγρού με τη διαδικασία της αμνιοπαρακέντησης κατά το 2^{ο} τρίμηνο της εγκυμοσύνης για την ταυτοποίηση των προαναφερόμενων ενώσεων σε αυτό και την εκτίμηση της έκθεσης του εμβρύου σε αυτές τις ενώσεις.



Εικόνα 1.7. Απεικόνιση αμνιοπαρακέντησης (Biologydictionary.net, 2014).

1.4.2. Τρίχα.

Γενικά, η τρίχα θεωρείται μη συμβατική βιολογική μήτρα σε σχέση με τις συχνά αναλυόμενες βιολογικές μήτρες όπως το αίμα και τα ούρα. Η ανάλυση τρίχας μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με την έκθεση σε οποιαδήποτε ουσία είτε στο κοντινό είτε και στο λίγο πιο μακρινό παρελθόν (Samanidou, 2016). Η συγκέντρωση της εκάστοτε ουσίας στην τρίχα εξαρτάται από:

- Τη δοσολογία της ουσίας η οποία εισήλθε στον οργανισμό (όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της ουσίας τόσο μεγαλύτερο είναι και το χρονικό διάστημα που θα είναι ανιχνεύσιμη στην τρίχα).
- Την απόσταση από τη ρίζα της τρίχας
- Την πολικότητα του φαρμάκου
- Τη φάση ανάπτυξης της τρίχας. Υπάρχουν τρεις φάσεις ανάπτυξης: η αναγενής φάση (περίοδος ανάπτυξης της τρίχας που διαρκεί 2 έως 6 χρόνια), η καταγενής φάση (περίοδος κατά την οποία η τρίχα αρχίζει να αλλοιώνεται/αδρανοποιείται και διαρκεί 1 έως 2 εβδομάδες) και η τελογενής φάση (περίοδος κατά την οποία απομακρύνονται οι παλιές/αδρανοποιημένες τρίχες και διαρκεί 3 έως 4 μήνες) (WebMD, 2010).
- Το ρυθμό ανάπτυξης της τρίχας που σχετίζεται με πιθανές φαρμακευτικές αγωγές, το φύλο, την ηλικία ή τις εποχιακές διακυμάνσεις.

Αν και η δειγματοληψία της τρίχας είναι μη παρεμβατική, π.χ. σε σχέση με τη δειγματοληψία του αίματος που απαιτεί βελόνα, υπάρχουν κάποια μειονεκτήματά της τα οποία δυσχεραίνουν την ανάλυσή της (Samanidou, 2016). Η ανθρώπινη τρίχα αποτελείται από πρωτεΐνες (65-95%, κυρίως κερατίνη), νερό (15-35%) και σε πολύ μικρότερο ποσοστό λιπίδια (1-9%). Υπάρχει επίσης η πιθανότητα να περιέχει κάποια ιχνοστοιχεία και βαρέα μέταλλα σε ιχνοποσότητες (Flanagan et al., 2007). Τα συστατικά αυτά σε συνδυασμό με περιβαλλοντικές επιμολύνσεις και διαφοροποιήσεις στο χρώμα (και άρα στη σύσταση σε πρωτεΐνες όπως η μελανίνη) είναι εμπόδιο για την ανάλυση καθώς αποτελούν «βρωμιά». Η χρήση καλλυντικών προϊόντων στα μαλλιά είναι ένας ακόμα παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη. Το πρόβλημα των παραπάνω συστατικών και επιμολύνσεων έγκειται στο ότι πέρα από την «βρωμιά» που θα επιφέρουν στην ανάλυση, μπορεί η ανίχνευση της εκάστοτε ουσίας να οφείλεται σε εξωτερική επιμόλυνση και όχι από την είσοδο της στον οργανισμό (Samanidou,

2016). Γι' αυτό το λόγο, πριν την ανάλυση επιβάλλεται το «πλύσιμο» της τρίχας με νερό και ήπιους οργανικούς διαλύτες όπως η μεθανόλη.

1.5. Οργανολογία.

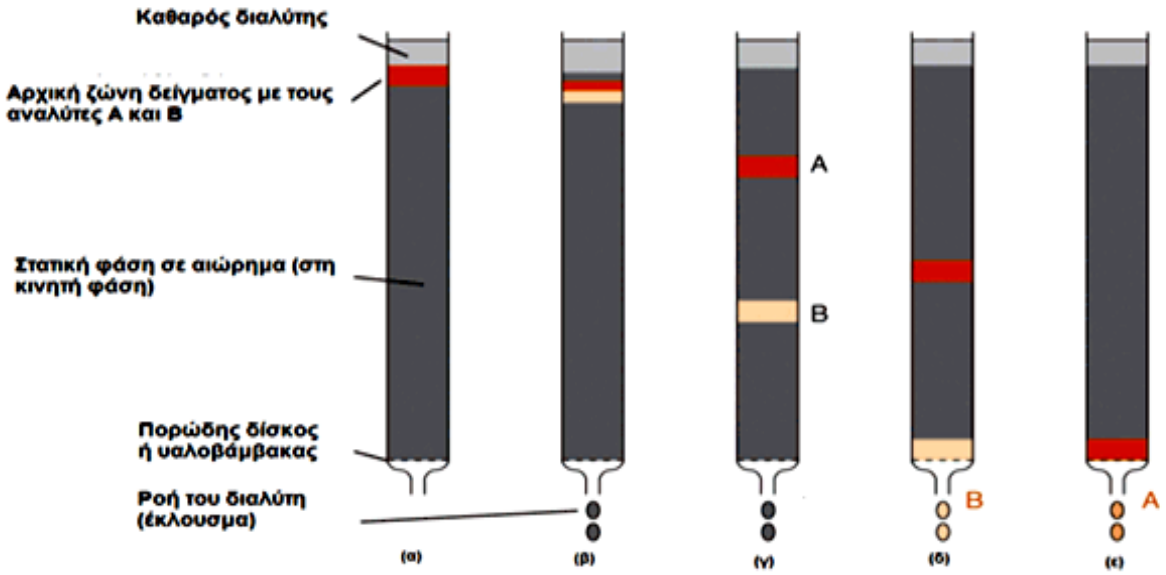
1.5.1. Υγρή Χρωματογραφία.

Πατέρας της χρωματογραφίας θεωρείται ο Ρώσος βοτανολόγος M.S. Tswett, ο οποίος δήλωσε ότι «χρωματογραφία είναι μία μέθοδος κατά την οποία τα συστατικά ενός μίγματος διαχωρίζονται μέσω μίας προσροφητικής στήλης σε ένα ρέον σύστημα» (Flanagan et al., 2007). Συγκεκριμένα, το 1903 ο Tswett εφάρμοσε τη χρωματογραφία προσρόφησης για τον διαχωρισμό φυτικών χρωστικών, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έναν υδρογονάνθρακα και σκόνη ενός υδατάνθρακα (ινουλίνη) ως στατική φάση (Harris, 2007).

Ουσιαστικά, η χρωματογραφία βασίζεται στην ίδια αρχή με την εκχύλιση καθώς πρόκειται για μεταφορά μίας ουσίας από μία φάση σε μία άλλη. Η μόνη διαφορά με την εκχύλιση είναι ότι στην περίπτωση της χρωματογραφίας η μία φάση παραμένει σταθερή (στατική φάση) ενώ η άλλη μετακινείται (κινητή φάση). Η κινητή φάση, δηλαδή ο διαλύτης που κινείται μέσα στη στήλη, μπορεί να είναι υγρό ή αέριο. Η στατική φάση, δηλαδή το πληρωτικό υλικό της στήλης το οποίο παραμένει σταθερό, είναι συνήθως ένα υγρό μεγάλου ιξώδους, χημικά δεσμευμένο στο εσωτερικό ενός τριχοειδούς σωλήνα ή στην επιφάνεια στερεών σωματιδίων με τα οποία έχει πληρωθεί η στήλη. Εναλλακτικά, τα στερεά σωματίδια που πληρώνουν τη στήλη αποτελούν τα ίδια τη στατική φάση. Στην Εικόνα 1.8 φαίνεται η βασική αρχή που διέπει τη χρωματογραφία: η διαλυμένη ουσία που εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια προς τη χρωματογραφική στήλη παραμένει και περισσότερο στη στήλη (Harris, 2007).

Ανάλογα με τον μηχανισμό ισορροπίας η χρωματογραφία διακρίνεται σε χρωματογραφία προσρόφησης, κατανομής, ιονανταλλαγής, μοριακού αποκλεισμού και χημικής συγγένειας. Η χρωματογραφία επίσης διακρίνεται ανάλογα με την τεχνική με την οποία επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός σε: χρωματογραφία ανάλυσης μετώπου, χρωματογραφία αντικατάστασης και

χρωματογραφία έκλουσης. Σήμερα, λόγω της ευρείας εφαρμογής της, η χρωματογραφία έκλουσης[1] είναι συνώνυμη με τον όρο χρωματογραφία. (Harris, 2007).

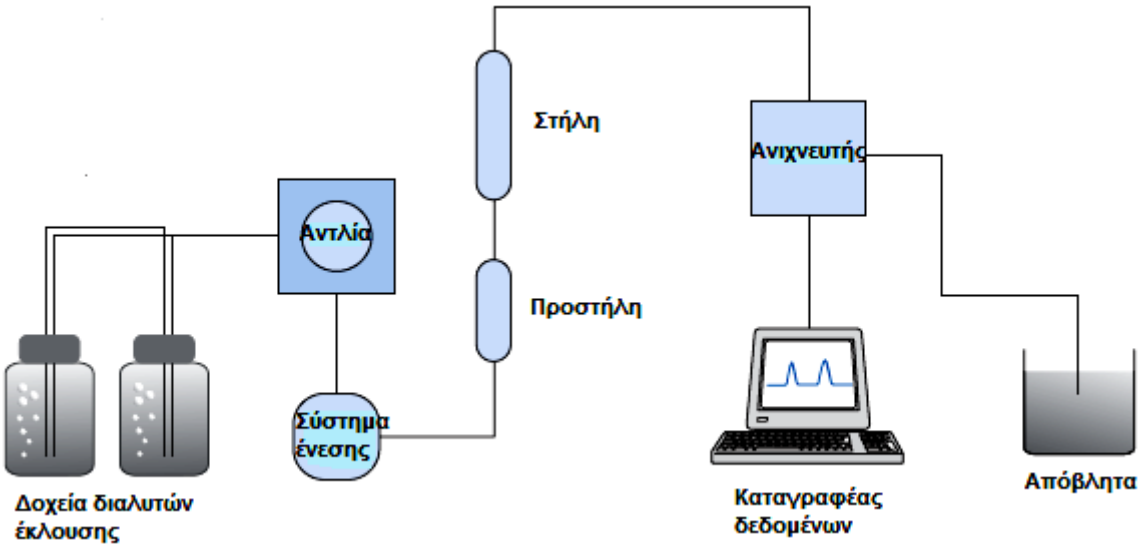


Εικόνα 1.8. Η αρχή της χρωματογραφίας (Harris, 2007).

Στην περίπτωσή μας κρίθηκε ότι καταλληλότερη μέθοδος διαχωρισμού είναι η Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC), καθώς έχει τη δυνατότητα να αναλύσει υψηλού μοριακού βάρους και/ή πολικές ενώσεις, με σχετικά χαμηλό κόστος σε σχέση με άλλες χρωματογραφικές μεθόδους (Flanagan et al., 2007). Η LC είναι ουσιαστικά μία χρωματογραφία προσρόφησης όπου η κινητή φάση είναι ένα υγρό και η στερεή φάση ένα πορώδες υλικό, συνήθως πυριτία (silica, SiO_2) (Harris, 2007). Ένα τυπικό σύστημα LC αποτελείται από το δοχείο και την υψηλής πίεσης αντλία του διαλύτη έκλουσης (ή των διαλυτών έκλουσης σε περίπτωση συστημάτων, όπως το δικό μας, όπου έχουμε βαθμιδωτή έκλουση), το σύστημα ένεσης δειγμάτων, μία προστατευτική προστήλη, μία πληρωμένη στήλη, έναν ανιχνευτή και φυσικά ένα σύστημα καταγραφής των δεδομένων (Εικόνα 1.9). Η υγροχρωματογραφία χρησιμοποιεί υψηλή πίεση για να αναγκάσει τον διαλύτη να μετακινηθεί

[1]Έκλουση είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα υγρό ή ένα αέριο διέρχεται από μία χρωματογραφική στήλη.

μέσω της στήλης, να αλληλεπιδράσει με τα μόρια της στατικής φάσης αλλά και του προς ανάλυση μίγματος και να επιτευχθεί ο διαχωρισμός (Flanagan et al., 2007).



Εικόνα 1.9. Ένα τυπικό σύστημα υγρής χρωματογραφίας (Flanagan et al., 2007).

1.5.2. Φασματομετρία Μάζας.

Η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) είναι μία τεχνική για τη μελέτη των μαζών ατόμων, μορίων ή θραυσμάτων μορίων. Όταν ένας αναλύτης[2] ιοντίζεται σχηματίζονται ένα χαρακτηριστικό ιόν, που αντιπροσωπεύει το αρχικό άτομο ή μόριο, και/ή μία ομάδα ιόντων διαφορετικών μαζών που αντιπροσωπεύουν θραύσματα ιονισμένων ατόμων ή μορίων. Τα ιόντα στη συνέχεια διαχωρίζονται με χρήση μαγνητικών και/ή ηλεκτροστατικών πεδίων σε υψηλό κενό. Το διάγραμμα της σχετικής αφθονίας σε σχέση με το λόγο μάζα προς φορτίο, *m/z*, κάθε ιόντος συνιστούν ένα φάσμα μάζας (Flanagan et al., 2007).

Τα βασικά στοιχεία ενός φασματόμετρου μάζας είναι μία συσκευή εισόδου, μία πηγή ιόντων και ένα σύστημα επιλογής ιόντων (αναλυτής μαζών) υπό κενό, ένας ανιχνευτής και ένα σύστημα καταγραφής δεδομένων. Τα ιόντα εισέρχονται στο φασματόμετρο από τη συσκευή

[2]Αναλύτης καλείται οποιαδήποτε ουσία (ή μίγμα ουσιών) πρόκειται να αναλυθεί.

εισόδου μέσω μίας σχισμής εστίασης. Η ηλεκτρική ενέργεια που προσδίδεται από την κίνηση σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, δίνει στα σωματίδια αδράνεια ανάλογη με τη μάζα τους. Ο αναλύτης στη συνέχεια κατευθύνει τα σωματίδια αυτά προς έναν ανιχνευτή βάσει του m/z και εναλλάσσοντας ένα ηλεκτρικό και/ή ένα μαγνητικό πεδίο. Τα μικρότερα ιόντα έχουν το μεγαλύτερο φορτίο και κινούνται πιο γρήγορα.

Τα κυριότερα είδη φασματομέτρων μάζας είναι το τετραπολικό φασματόμετρο μάζας διαπερατότητας, το φασματόμετρο μάζας χρόνου πτήσης, το τετραπολικό φασματόμετρο μάζας παγίδευσης ιόντων και το φασματόμετρο κινητικότητας ιόντος. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένα τετραπολικό φασματόμετρο μάζας. Όπως υποδηλώνει και το όνομά του, αποτελείται από τέσσερις παράλληλες ράβδους στις οποίες εφαρμόζονται συνεχές ρεύμα και εναλλασσόμενο δυναμικό ραδιοσυχνοτήτων. Το εύρος μαζών και η διακριτική ικανότητα του οργάνου εξαρτώνται από το μήκος και τη διάμετρο των ράβδων. Μεγαλύτερη διάμετρος δίνει αυξημένη ευαισθησία (μεγαλύτερο εύρος μαζών), ενώ στενότερες ή μακρύτερες ράβδοι προσδίδουν στο όργανο καλύτερη διακριτική ικανότητα. Τα ιόντα εστιάζονται και περνούν στο χώρο ανάμεσα στις ράβδους. Η κίνησή τους εξαρτάται από τα ηλεκτρικά πεδία έτσι ώστε μόνο ιόντα με συγκεκριμένο m/z να περνούν στον ανιχνευτή.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.

2.1. Σχεδιασμός και υλοποίηση πειράματος.

2.1.1. Ομάδα μελέτης.

Η ομάδα μελέτης αποτελείτο από 100 έγκυες γυναίκες που έκαναν αμνιοπαρακέντηση κατά το 1^{ο} ή 2^{ο} τρίμηνο της εγκυμοσύνης. Κατά τη διάρκεια της αμνιοπαρακέντησης συλλέχθηκαν από τον εξεταστή γυναικολόγο δείγματα αμνιακού υγρού καθώς και δείγματα τριχών κεφαλής. Παράλληλα, οι εξεταζόμενες γυναίκες κλήθηκαν να απαντήσουν σε ειδικά δομημένα ερωτηματολόγια σχετιζόμενα με τις καθημερινές συνήθειες (Ερωτηματολόγιο Α) και το ιατρικό ιστορικό της εγκύου (Ερωτηματολόγιο Β). Ένα τρίτο ερωτηματολόγιο (Ερωτηματολόγιο Γ) συμπληρώθηκε 5-12 μήνες μετά από τον τοκετό για να συλλεχθούν πληροφορίες ως προς την υγεία του βρέφους και τα σωματομετρικά του χαρακτηριστικά.

2.1.2. Ερωτηματολόγιο εγκύου (Ερωτηματολόγιο Α και Β).

Το ερωτηματολόγιο της εγκύου αποτελείτο από ερωτήσεις σχετιζόμενες με μια σειρά πληροφοριών πριν και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Πιο συγκεκριμένα συλλέχθηκαν: α) δημογραφικές πληροφορίες (π.χ. ηλικία, διαμονή, εκπαίδευση), β) σωματομετρικές μετρήσεις (ύψος, βάρος, BMI) πριν και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, γ) ατομικές συνήθειες (π.χ. κάπνισμα, αλκοόλ κ.ά.) πριν και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, δ) ατομικό ιατρικό ιστορικό (π.χ. προβλήματα γυναικολογικά, αναπνευστικά), ε) διατροφικές συνήθειες (π.χ. κατανάλωση κρέατος), στ) πηγές έκθεσης σε ενδοκρινικούς διαταράκτες (π.χ. PBs) μέσω της χρήσης πλαστικών, καλλυντικών και προϊόντων ατομικής υγιεινής.

Οι ερωτήσεις που σχετίζονται σε διατροφικές συνήθειες ήταν στην μορφή κατανάλωσης ανά εβδομάδα, ενώ οι ερωτήσεις της έκθεσης σε μορφή ποιοτικών δεδομένων συχνότητας (πχ ποτέ, σπάνια, συχνά, καθημερινά).

Τα ερωτηματολόγια παρατίθενται στο Παράρτημα Ι στο τέλος του κειμένου.

2.1.3. **Ερωτηματολόγιο βρέφους** (Ερωτηματολόγιο Γ)**.**

Το συγκεκριμένο ερωτηματολόγιο αποτελείτο από μία σειρά ερωτήσεων που σχετίζονται με στοιχεία του νεογέννητου (βάρος, ύψος, περίμετρος κεφαλής), το είδος της κύησης (φυσιολογικός τοκετός, καισαρική) και πιθανά προβλήματα υγείας (αναπνευστικά κ.ά.).

Το ερωτηματολόγιο απαντήθηκε από τη μητέρα μέσα σε χρόνο 5-12 μήνες από τον τοκετό και παρατίθενται στο Παράρτημα Ι στο τέλος του κειμένου.

2.1.4. Στατιστικές μέθοδοι.

Οι συνεχείς μεταβλητές εκφράστηκαν σε μορφή μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις περιγραφής χρησιμοποιήθηκαν μέτρα όπως η διάμεσος, ελάχιστη μέγιστη τιμή και τεταρτημόρια. Οι διακριτές μεταβλητές έχουν εκφραστεί στη μορφή συχνοτήτων και %συχνοτήτων. Η συσχέτιση διακριτών μεταβλητών έγινε με τον έλεγχο χ^2 του Pearson, ενώ η συσχέτιση συνεχών μεταβλητών με τον συντελεστή συσχέτισης r του Pearson ή τον αντίστοιχο μη παραμετρικό του Spearman. Οι μεταβολές σε ζευγαρωτές μετρήσεις διακριτών μεταβλητών έγινε είτε με τον έλεγχο McNemar για 2x2 πίνακες είτε με τον έλεγχο McNemar-Bowker για nxn πίνακες.

Οι συγκεντρώσεις των μετρούμενων ενδοκρινικών διαταρακτών (MePB, EtPB, BuPB, BePB, TCS) εκφράστηκαν όπου ήταν απαραίτητο – λόγω μεγάλης διασποράς – σε λογαριθμική κλίμακα.

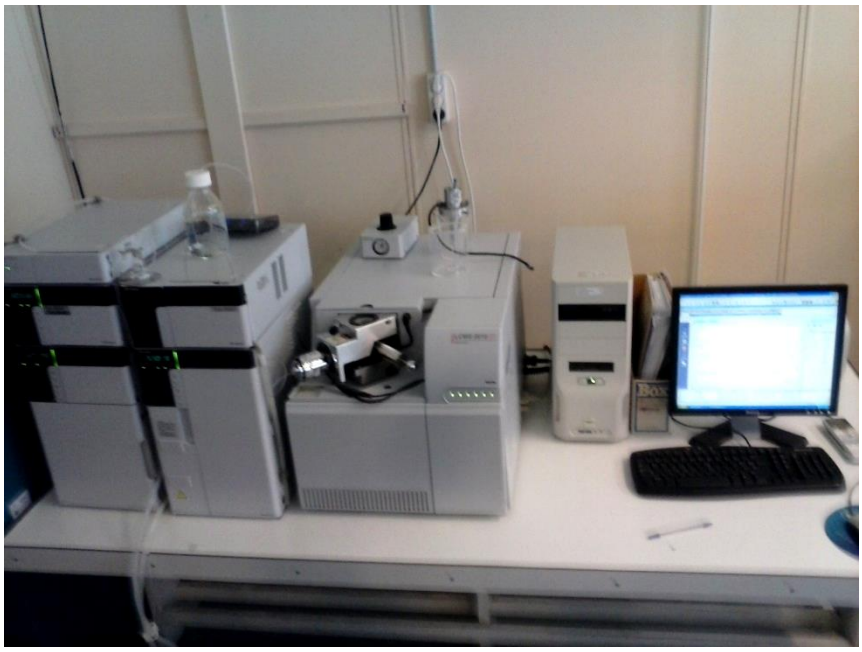
Για την γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν απλά ομαδοποιημένα και αθροιστικά ραβδογράμματα (simple, grouped and stacked barcharts), διαγράμματα διασποράς (scatter plots) και θηκογράμματα (Box and Whisker plots).

Η καταχώριση των δεδομένων έγινε σε λογιστικό φύλο EXCEL 2017 ενώ η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα IBM SPSS Statistics 23.0. Ως επίπεδο σημαντικότητας για την αποδοχή ή απόρριψη των στατιστικών υποθέσεων τέθηκε το p=0,05.

2.2. Οργανολογία.

2.2.1 Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας.

Το κύριο όργανο ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας άμεσα συζευγμένο με ένα φασματόμετρο μαζών της εταιρίας Shimadzu (μοντέλο LC-MS 2010 EV), εξοπλισμένο με αυτόματο δειγματολήπτη (Εικόνα 1.10). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε πηγή ιονισμού APCI (χημικός ιονισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση) και ως αναλυτής μαζών χρησιμοποιήθηκε αναλυτής με τετράπολο φίλτρου μάζας (quadropole mass filter).



Εικόνα 1.1. Το σύστημα LC-MSπου χρησιμοποιήθηκε.

2.2.2. Λοιπός εξοπλισμός.

Για τη ζύγιση των αντιδραστηρίων (σε στερεή μορφή) αλλά και των στερεών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ένας αναλυτικός ζυγός ακριβείας 4^{ου} δεκαδικού ψηφίου, της εταιρείας AND (μοντέλο ER-120A), με δυνατότητα μέγιστου βάρους ζύγισης 120gr. Για την ανακίνηση των μιγμάτων χρησιμοποιήθηκε σύστημα vortex της εταιρείας Velpscientific (μοντέλο Zx^3) και ανακινητήρας (μοντέλο GFL 3025). Για την εξάτμιση-ξήρανση των δειγμάτων (απομάκρυνση του διαλύτη εκχύλισης), χρησιμοποιήθηκε σύστημα εξάτμισης υπό

ροή αζώτου, της εταιρείας Techne (μοντέλο dri-block DB-3A). Ακόμη, χρησιμοποιήθηκε φυγόκεντρος της εταιρείας Hettich zentrifugen (μοντέλο Rotofix 32A) αλλά και φυγόκεντρος της εταιρίας Heraeus (μοντέλο Biofuge Primo R).

2.3. Αντιδραστήρια.

Τα methyl paraben (≥99%), ethyl paraben (99%), propyl paraben (≥99%), butyl paraben (≥99%), benzyl paraben (99%), ο οξικός αιθυλεστέρας (ethyl acetate, HPLC grade), το υδροχλωρικό οξύ (hydrochloric acid, ≥37%) και το οξικό αμμώνιο (ammonium acetate, BioXtra, ≥98%) αγοράσθηκαν από την Sigma – Aldrich (St. Louis, MO, USA). Το triclosan (100%) αγοράσθηκε από την Honeywell–Fluka (Seelze, Germany), η μεθανόλη (methanol, LC-MS grade) και το ακετονιτρίλιο (acetonitrile, LC-MS grade) από την Honeywell–Riedel de Haën (Seelze, Germany), το φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (phosphate buffer saline) από την Fluka Biochemika (Steinheim, Switzerland), το ένζυμο *β*-glucuronidase from *Escherichia Coli* από την Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) και η phenobarbital-d_5από την Isotec Inc. (Miamisburg, OH, USA). Τέλος, το υπερκάθαρο νερό παράχθηκε από το σύστημα καθαρισμού Direct-Q 3UVτης εταιρίας Merck (Darmstadt, Germany).

2.4. Πειραματική διαδικασία.

2.4.1. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων.

Σε πρώτη φάση, παρασκευάστηκε μεθανολικό διάλυμα του εσωτερικού προτύπου (IS), phenobarbital-d^5, συγκέντρωσης 10 ppm και μεθανολικό πρότυπο διάλυμα των PBs και TCS στην ίδια συγκέντρωση. Έπειτα από αραιώσεις παρασκευάστηκαν διαλύματα PBs και TCS συγκέντρωσης 1 και 0.1 ppm. Χρησιμοποιώντας τα παραπάνω διαλύματα παρασκευάστηκαν τελικά 7 πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 0,025, 0,05, 0,1, 0,25 και 0,5 ppm. Τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -20°C. Τα ίδια πρότυπα διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση και των δύο βιολογικών δειγμάτων.

2.4.2. Παρασκευή επιμολυσμένων δειγμάτων.

2.4.2.1. Επιμολυσμένα δείγματα αμνιακού υγρού.

Για την παρασκευή των επιμολυσμένων δειγμάτων (spiked) χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αμνιακού υγρού τα οποία ήταν αρνητικά στις προς ανάλυση ενώσεις και εμβολιάσθηκαν με διάλυμα PBs (1 ppm) και TCS (1 ppm) σε συγκεντρώσεις 0, 5, 10, 25, 50 και 100 ng/ml.

2.4.2.2. Επιμολυσμένα δείγματα τρίχας.

Για την παρασκευή των αντίστοιχων επιμολυσμένων δειγμάτων (spiked) τρίχας ακολουθήθηκαν τα βήματα που περιγράφονται παραπάνω (παράγραφος 2.4.2.1.). Τα δείγματα τρίχας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αρνητικά στις προς ανάλυση ενώσεις και εμβολιάσθηκαν με διάλυμα PBs (1 ppm) και TCS (1 ppm) σε συγκεντρώσεις 0, 5, 10, 25, 50 και 100 pg/mg.

2.4.3. Μέθοδος επεξεργασίας δειγμάτων.

2.4.3.1. Επεξεργασία δειγμάτων αμνιακού υγρού.

Για την επεξεργασία των δειγμάτων αμνιακού υγρού ελήφθησαν 1000 μl από κάθε δείγμα και τοποθετήθηκαν σε γυάλινα σωληνάκια με καπάκι, αφού πρωτύτερα τα δείγματα είχαν φυγοκεντρηθεί προκειμένου να απομακρυνθούν πήγματα ή άλλες ανεπιθύμητες ακαθαρσίες. Στη συνέχεια, προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 10 μl ενζύμου *β*-glucuronidase, για να γίνει υδρόλυση των συζευγμένων (γλυκουρονιδιωμένων) ενώσεων και 250 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού οξέος 0,1M με pH 6,5, ώστε να δημιουργηθεί το κατάλληλο περιβάλλον για να δράσει το ένζυμο. Τα δείγματα επωάστηκαν σε υδατόλουτρο στους 37˚C για 12 ώρες. Μετά την επώαση, προστέθηκαν 100 μl υδροχλωρικού οξέος 2M και ακολούθησε εκχύλιση με 2 ml οξικό αιθυλεστέρα. Τα δείγματα ανακινήθηκαν για 20 λεπτά και στη συνέχεια το εκχύλισμα, δηλαδή η οργανική φάση, μεταφέρθηκε σε γυάλινα σωληνάκια εξάτμισης. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για ακόμα 2 φορές. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό ροή αζώτου, επαναδιαλυτοποίηση του υπολείμματος της εξάτμισης σε 100 μl μεθανόλης και μεταφορά σε φιαλίδια των 2 ml (στο εσωτερικό των οποίων έχουν τοποθετηθεί inserts) για ανάλυση στο σύστημα LC-MS.

2.4.3.2. Επεξεργασία δειγμάτων τρίχας.

Αρχικά, ζυγίστηκαν στο ζυγό περίπου 100 mg τρίχας από κάθε δείγμα (ανάλογα με τη διαθεσιμότητα) και τοποθετήθηκαν σε γυάλινα σωληνάκια με καπάκι. Πριν γίνει η επεξεργασία των δειγμάτων, η τρίχα πλύθηκε δύο φορές με υπερκάθαρο νερό και δύο φορές με μεθανόλη, για να απομακρυνθεί τυχών εξωτερική επιμόλυνση. Όταν η τρίχα στέγνωσε, προστέθηκαν 2 ml μεθανόλης σε κάθε σωληνάκι και ακολούθησε εκχύλιση για 4 ώρες σε υδατόλουτρο υπερήχων υπό θέρμανση. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν ανακίνηση των δειγμάτων με σύστημα vortex για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα των ουσιών από τα τοιχώματα αλλά και για να επιτευχθεί καλύτερη εκχύλιση. Με το πέρας των τεσσάρων ωρών τα σωληνάκια απομακρύνθηκαν από το υδατόλουτρο και το υγρό τους περιεχόμενο, δηλαδή η μεθανόλη και οι εκχυλιζόμενες ουσίες, μεταφέρθηκαν σε γυάλινα σωληνάκια εξάτμισης. Ακολούθησε εξάτμιση και επαναδιαλυτοποίηση, ομοίως με τα δείγματα αμνιακού υγρού, και ανάλυση στο σύστημα LC-MS.

2.4.4. Ανάλυση δειγμάτων με Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας.

2.4.4.1. Συνθήκες λειτουργίας Υγρού Χρωματογράφου.

Στο σύστημα της υγρής χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκε κολώνα τύπου Discovery C18 (25cm) της εταιρίας Supelco, η οποία λειτουργούσε σε φούρνο θερμοκρασίας 30°C. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 5 mM οξικό αμμώνιο (διαλύτης A) και ακετονιτρίλιο (διαλύτης B). Η ροή του χρωματογράφου ήταν 0,6 ml/min και η συνολική διάρκεια του προγράμματος για κάθε δείγμα ήταν 25 λεπτά.

2.4.4.2. Συνθήκες λειτουργίας Φασματόμετρου Μάζας.

Ο ιονισμός του δείγματος πραγματοποιήθηκε με πηγή χημικού ιονισμού υπό ατμοσφαιρική πίεση (APCI), σε ρύθμιση αρνητικού ιονισμού. Για τη λήψη των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος SIM (Selecting Ion Monitoring). Τα θραύσματα και οι χρόνοι κατακράτησης (Rt) που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1. Παράμετροι ανίχνευσης των ενώσεων.

	Rt (min)	Κύριο ιόν (m/z)	Δευτερεύοντα ιόντα (m/z)
MePB	13,07	151,05	194,0
EtPB	14,87	165,05	208,1
BuPB	17,87	227,1	287,15
BePB	17,93	193,05	236,05
TCS	22,0	286,95	289,0, 291,0
IS	12,47	236,05	-

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Χαρακτηριστικά γυναικών και εγκυμοσύνης.

Ένα σύνολο από 100 γυναίκες συμμετείχε στην έρευνα και τα σωματομετρικά τους χαρακτηριστικά καθώς και η ηλικία τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. Η συλλογή των στοιχείων έδειξε ότι οι συμμετέχουσες έγκυες είχαν μια μέση τιμή ηλικίας 35,2 ± 5,8 έτη με εύρος από 16,5 – 44,0 έτη. Το μέσο βάρος πριν την εγκυμοσύνη ήταν 66,4 ± 16,7, ενώ την περίοδο της αμνιοπαρακέντησης ήταν υψηλότερο κατά 4,1 ± 3,8. Αντίστοιχα η μέτρηση του BMI έδειξε ότι οι έγκυες είχαν υψηλότερη τιμή κατά 1,5 ± 1,4 Kg/m^2 κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης από ότι πριν την εγκυμοσύνη.

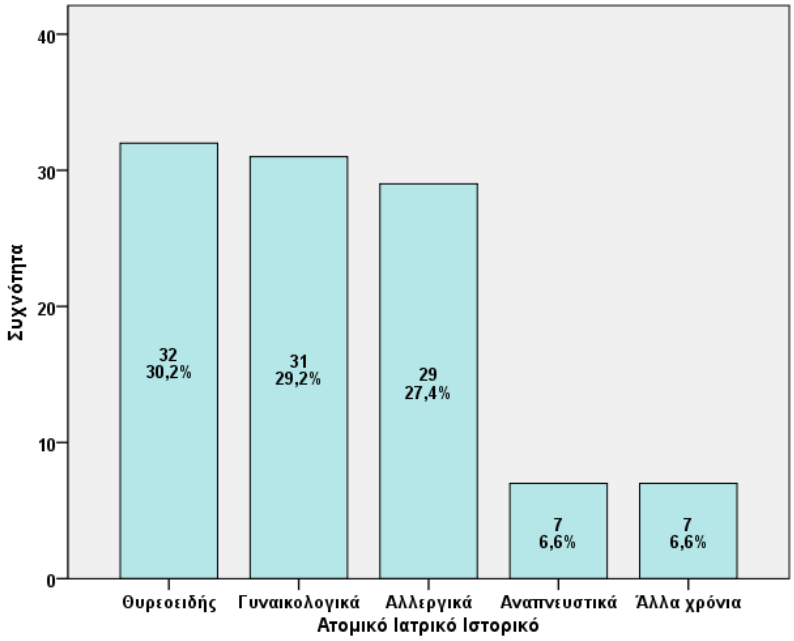
Πίνακας 3.1. Ηλικία και σωματομετρικά χαρακτηριστικά συμμετεχουσών γυναικών

	Μέση Τιμή	**Τυπική απόκλιση**	**Διάμεσος**	**Ελάχιστο**	**Μέγιστο**
Ηλικία (έτη)	35,2	5,8	36,5	16,5	44,0
Ύψος (cm)	164,8	5,9	165,0	150,0	180,0
Βάρος Προ εγκυμοσύνης (Kg)	66,4	16,7	63,3	40,0	147,0
Βάρος Κατά την εγκυμοσύνη (Kg)	70,6	16,1	69,0	43,0	150,0
Μεταβολή Βάρους (Kg)	4,1	3,8	4,0	-8,0	13,0
BMI Προ εγκυμοσύνης (Kg/m^2)	24,4	5,6	22,9	16,0	45,4
BMI Κατά την εγκυμοσύνη (Kg/m^2)	25,9	5,3	25,0	17,2	46,3
Μεταβολή BMI (Kg/m^2)	1,5	1,4	1,5	-3,0	5,2

Άλλα μετρούμενα δημογραφικά χαρακτηριστικά έδειξαν ότι το εκπαιδευτικό επίπεδο των γυναικών ήταν: 5 γυναίκες (5,3%) στην α' βάθμια εκπαίδευση, 20 γυναίκες (21,1%) στην β' βάθμια και 70 γυναίκες (73,7%) στην γ' βάθμια εκπαίδευση.

Στο Διάγραμμα 3.1 παρουσιάζεται με μορφή ραβδογράμματος η συχνότητα αυτοαναφερόμενων συμπτωμάτων και προβλημάτων υγείας. Τα προβλήματα θυρεοειδούς ήταν τα συχνότερα (32 γυναίκες, 30,2%), ακολουθούμενα από τα γυναικολογικά (31 γυναίκες, 29,2%) και τα αλλεργικά (29 γυναίκες, 27,4%), ενώ 7 γυναίκες (6,6%) είχαν αναπνευστικά ή άλλα προβλήματα υγείας.

Οι συμμετέχουσες γυναίκες είχαν από 0 έως 5 τοκετούς με τις καισαρικές να κυμαίνονται από 0 έως 2. Για ένα σημαντικό ποσοστό γυναικών (41,4%, 41 γυναίκες) επρόκειτο για την πρώτη εγκυμοσύνη τους, ενώ πάνω από 3 τοκετούς είχε το 5,0% των γυναικών (5 γυναίκες) (Πίνακας 3.2). Η διάμεση εβδομάδα αμνιοπαρακέντησης ήταν η $17^{η}$ ενώ το εύρος της εξέτασης κυμάνθηκε από την $15^{η}$ εβδομάδα (1 περίπτωση) έως την $31^{η}$ εβδομάδα (2 περιπτώσεις).



Διάγραμμα 2. %Συχνότητα αυτοαναφερόμενων συμπτωμάτων των εγκύων.

Πίνακας 3.2. Αριθμός φυσιολογικών τοκετών και καισαρικών τομών.

Αριθμός		**0**	**1**	**2**	**3**	**5**
Φυσιολογικών τοκετών	**n**	73	17	4	4	1
	%	73,7	17,2	4,0	4,0	1,0
Καισαρικών τομών	**n**	67	29	3		
	%	67,7	29,3	3,0		
Τοκετών	**n**	41	46	7	4	1
	%	41,4	46,5	7,1	4,0	1,0

Σε ότι αφορά τα χαρακτηριστικά της μελετώμενης τρέχουσας κύησης/τοκετού τα στοιχεία καταγράφονται στον Πίνακα 3.3. Από ένα σύνολο 85 γυναικών που απάντησαν σε αυτή την ενότητα ερωτήσεων οι 16 (18,6%) δήλωσαν ότι είχαν κάποιο πρόβλημα στην κύηση (όπως

προβλήματα στην αιμάτωση του πλακούντα, διαβήτη κύησης, κ.ά.), ενώ οι 15 (17,6%) είχαν πρόωρο τοκετό. Ο αριθμός των καισαρικών τομών υπερτερούσε σημαντικά των φυσιολογικών τοκετών (55 κυήσεις, 64,7%).

Πίνακας 3.3. Χαρακτηριστικά μελετώμενης τρέχουσας κύησης.

		n	%
Προβλήματα κύησης	**Όχι**	69	81,2
	Ναι	16	18,8
Τοκετός	**Φυσιολογικός**	30	35,3
	Καισαρική	55	64,7
Πρόωρη κύηση	**Πρόωρη**	15	17,6
	Πλήρης (>37η εβδομάδα)	70	82,4

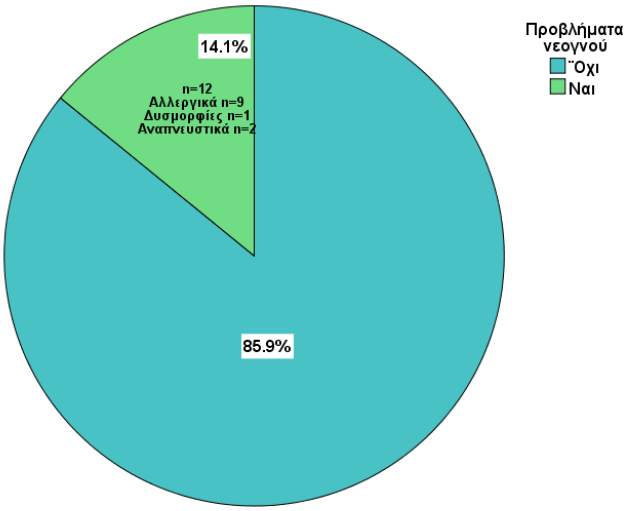
3.2. Αποτελέσματα τοκετού (παιδιά).

Οι ερωτήσεις που μελετώνται σε αυτή την ενότητα σχετίζονται με τα αποτελέσματα της κύησης (νεογνά). Από τα στοιχεία της μελέτης, που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4 προκύπτει ότι γεννήθηκαν 44 κορίτσια (51,8%) με μέσο βάρος 2981 ± 670 gr ενώ το αντίστοιχο βάρος των αγοριών ήταν υψηλότερο (3048 ± 559 gr) χωρίς όμως να παρατηρηθεί στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0,621). Το μέσο ύψος για κάθε φύλο ήταν 50 ± 3 cm ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0,790). Αντίστοιχη εικόνα παρατηρήθηκε και στην περίμετρο κεφαλής (θήλυ 35 ± 2 cm, άρρεν 35 ± 1 cm) (p=0,949).

Πίνακας 3.4.Σωματομετρικά χαρακτηριστικά νεογνών

	Φύλο παιδιού	N	Μέση Τιμή	Τυπική Απόκλιση	Διάμεσος	Ελάχιστο	Μέγιστο	p
Βάρος παιδιού (gr)	**Θήλυ**	**44**	2981	670	3185	640	4400	0,621
	Άρρεν	**41**	3048	559	3040	1800	4250	
Ύψος παιδιού (cm)	**Θήλυ**	**39**	50	3	50	41	56	0,790
	Άρρεν	**39**	50	3	51	42	57	
Περίμετρος κεφαλής (cm)	**Θήλυ**	**39**	35	2	35	28	41	0,949
	Άρρεν	**35**	35	1	35	32	38	

Τα προβλήματα που παρουσίασαν τα νεογνά μέχρι και την ημέρα της συνέντευξης έδειξαν ποσοστό προβλημάτων 14,1 % (n=12 νεογνά). Από τα σύνολο των 12 νεογνών τα 9 (75,0%) παρουσίασαν κάποιο είδος αλλεργικού προβλήματος, τα 2 νεογνά (16,7%) αναπνευστικά προβλήματα, ενώ 1 νεογνό παρουσίασε δυσμορφίες στα γεννητικά όργανα (8,3%).



Διάγραμμα 3.2. Προβλήματα υγείας νεογνών μέχρι τη χρονική στιγμή της συνέντευξης.

3.3. Χρήση καλλυντικών και προϊόντων προσωπικής φροντίδας.

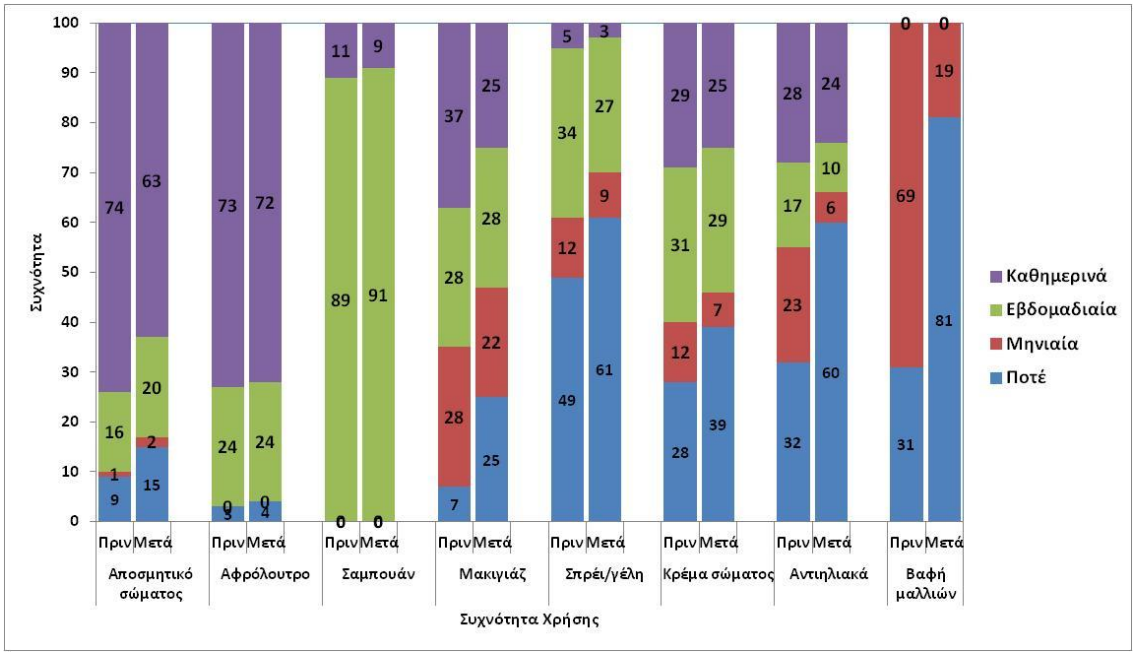
3.3.1. Προϊόντα καθημερινής χρήσης και προσωπικής υγιεινής.

Στο Διάγραμμα 3.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα με βάση την κατανάλωση διαφόρων ειδών που σχετίζονται με την προσωπική περιποίηση και υγιεινή. Παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις στην συχνότητα χρήσης μεταξύ των εγκύων πριν και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και οι αλλαγές εξετάστηκαν με το έλεγχο McNemar-Bowker. Παρά το γεγονός ότι υπήρξε μείωση στην καθημερινή χρήση όλων των προϊόντων δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

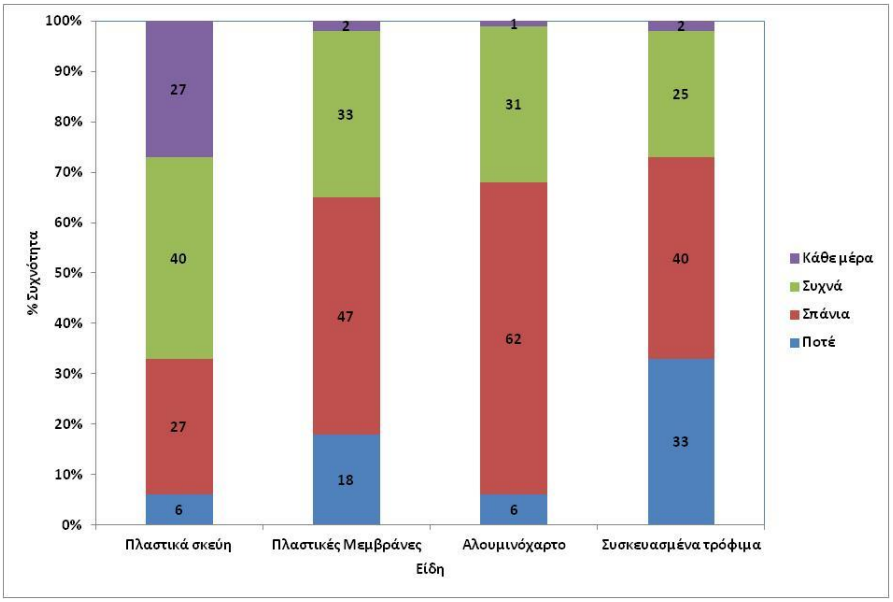
Συγκεκριμένα, στην χρήση αφρόλουτρου δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στις συνήθειες χρήσης (McNemar-Bowker=1,00, df=2, p=0,607), ομοίως και στη χρήση σαμπουάν (McNemarp=0,500) και κρέμας σώματος (McNemar-Bowker=8,91, df=6, p=0,179).

Αντίθετα, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση λόγω μείωσης στην χρήση αποσμητικού σώματος σε σχέση με την περίοδο πριν την εγκυμοσύνη (McNemar-Bowker=12,00, df=4, p=0,017), στη χρήση μακιγιάζ (McNemar-Bowker=26,20, df=6, p<0,001), στην χρήση γέλης ή σπρέι (McNemar-Bowker=13,57, df=5, p=0,019), στην χρήση αντιηλιακών (McNemar-Bowker=25,3, df=5, p<0,001) και στη χρήση βαφής μαλλιών (McNemarp<0,001).

Η χρήση πλαστικών συσκευασιών, μεμβρανών και γενικά ειδών που χρησιμοποιούνται σε καθημερινή οικιακή χρήση καταγράφεται στο Διάγραμμα 3.4. Η καθημερινή χρήση πλαστικών σκευών ήταν υψηλή (27 γυναίκες, 27,0%) όπως επίσης και η αντίστοιχη συχνή χρήση (40 γυναίκες, 40,0%) τους. Μόνο 2 γυναίκες έκαναν χρήση πλαστικής μεμβράνης και συσκευασμένων τροφίμων σε καθημερινή βάση, ενώ αντίστοιχα συχνή χρήση έκαναν 33 και 25 γυναίκες.



Διάγραμμα 3.3. Συχνότητα χρήσης ειδών προσωπικής υγιεινής και περιποίησης πριν και κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης.

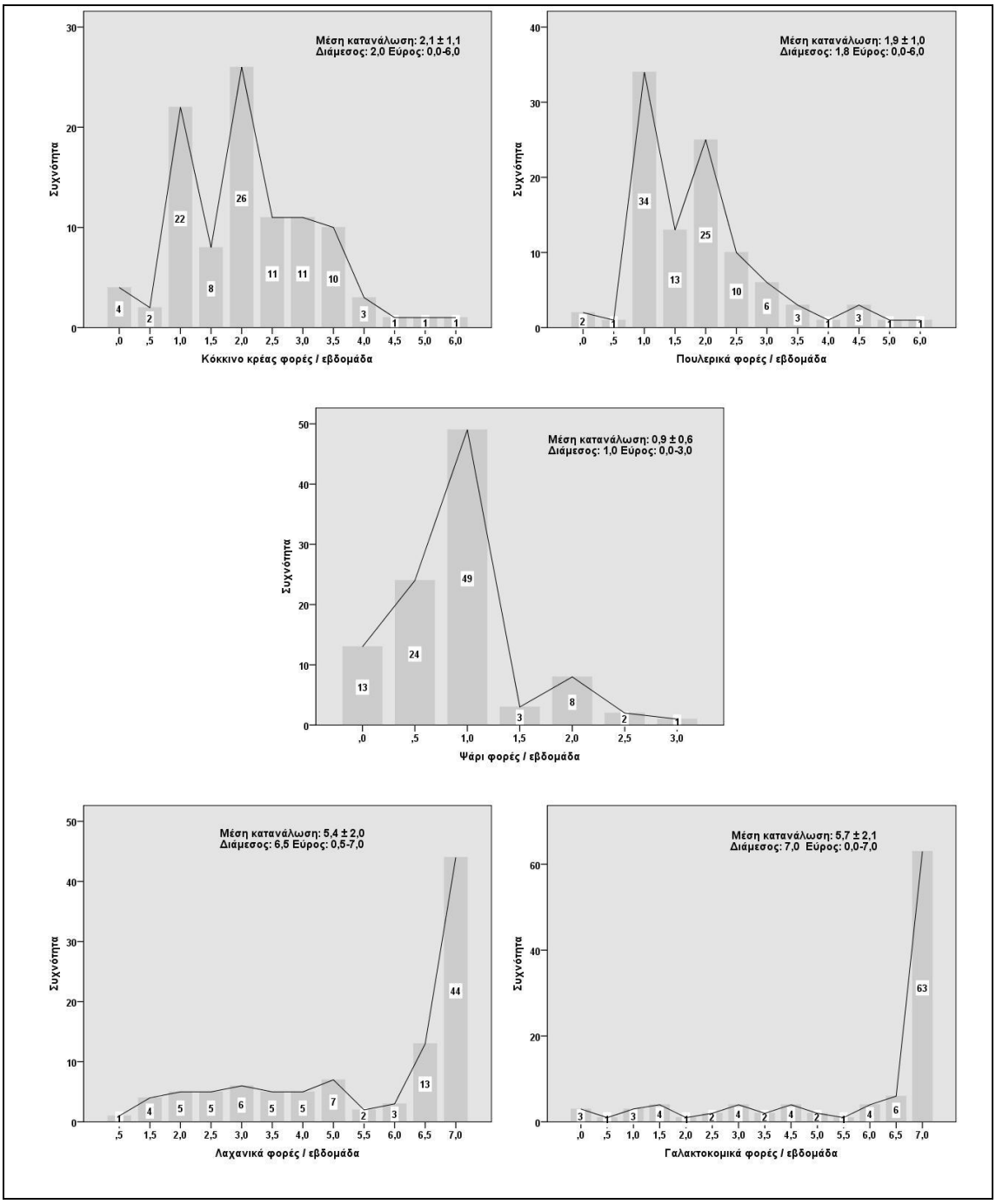


Διάγραμμα 3.4. Συχνότητα χρήσης ειδών καθημερινής οικιακής χρήσης.

3.3.2. Διατροφικές συνήθειες.

Οι διατροφικές συνήθειες των γυναικών καταγράφονται σε αυτή την ενότητα. Στο Διάγραμμα 3.5 παρουσιάζεται η συχνότητα κατανάλωσης βασικών κατηγοριών τροφίμων, καθώς και

βασικά περιγραφικά στατιστικά. Οι ερωτώμενες γυναίκες δήλωσαν σε μεγάλη συχνότητα καθημερινή κατανάλωση σε λαχανικά (44, 44,0%) και σε γαλακτοκομικά (63, 63,0%) ενώ οι αντίστοιχες μέσες καταναλώσεις κυμαίνονται υψηλά σε 5,4 ± 2,0 φορές/εβδομάδα και 5,7 ± 2,1 φορές/εβδομάδα. Η κατανάλωση κόκκινου κρέατος είναι υψηλότερη με διάμεση τιμή 2 φορές ενώ οι αντίστοιχες σε πουλερικά και ψάρι είναι 1,9 και 1,1 φορές/εβδομάδα.



Διάγραμμα 3.5. Καταγραφή καταναλώσεων σε βασικές κατηγορίες τροφίμων.

3.4. Επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου.

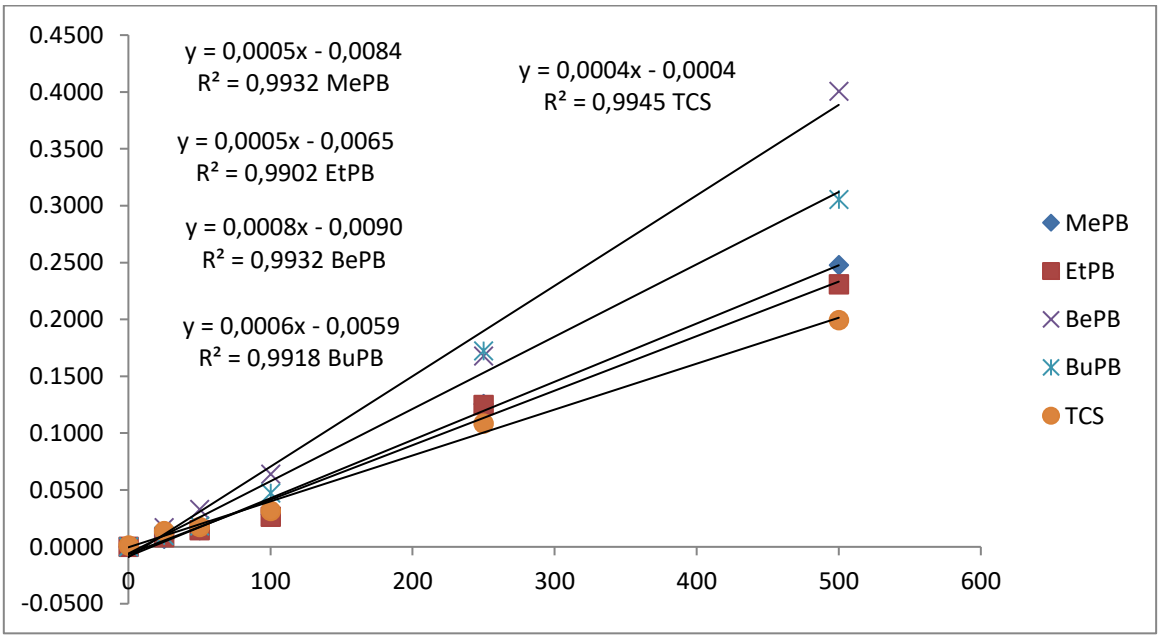
3.4.1. Δείγματα αμνιακού υγρού.

3.4.1.1. Γραμμικότητα.

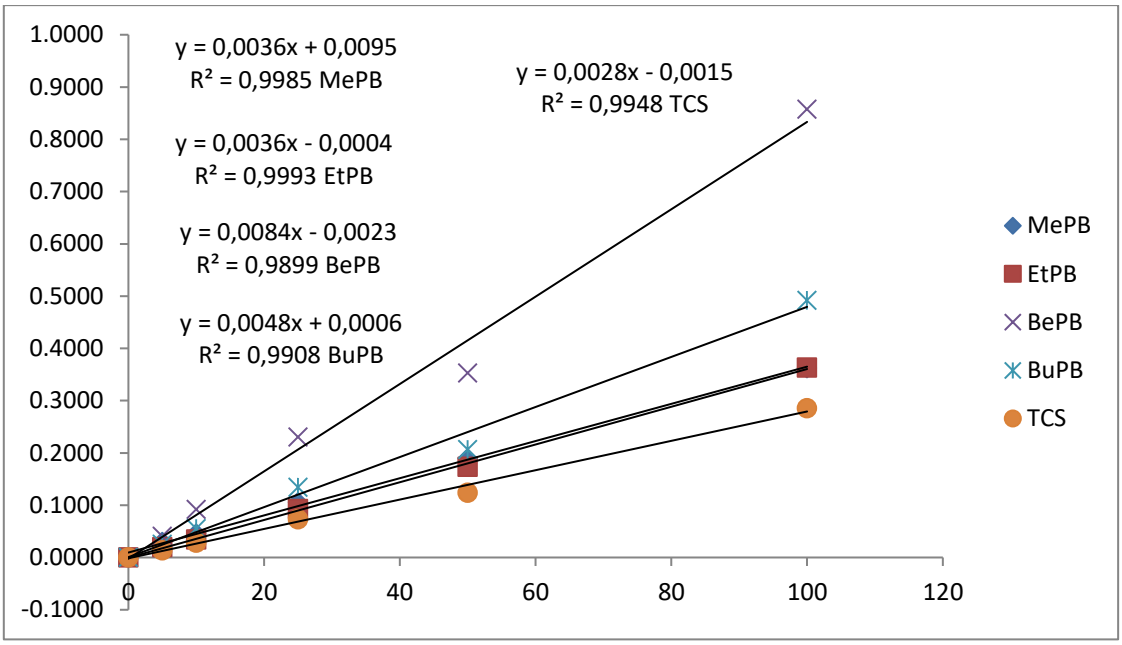
Τα πρότυπα διαλύματα των ενώσεων που μας ενδιαφέρουν είχαν συγκεντρώσεις 0, 25, 50, 100, 250 και 500 ng/ml. Το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης (R^2), που χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο γραμμικότητας βρέθηκε 0,9932 για το MePB, 0,9902 για το EtPB, 0,9932 για το BePB, 0,9918 για το BuPB και για το 0,9945 TCS.

Τα επιμολυσμένα διαλύματα αμνιακού υγρού είχαν συγκεντρώσεις 0, 5, 10, 25, 50 και 100 ng/ml. Το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης βρέθηκε 0,9968 για το MePB, 0,9998 για το EtPB, 0,9936 για το BePB, 0,9929 για το BuPB και 0,9974 για το TCS.

Στα Διαγράμματα 3.6 και 3.7 δίνονται οι καμπύλες των πρότυπων και επιμολυσμένων διαλυμάτων των MePB, EtPB, BePB, BuPB και TCS, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 3.6. Καμπύλες πρότυπων διαλυμάτων.



Διάγραμμα 3.7. Καμπύλες επιμολυσμένων δειγμάτων αμνιακού υγρού.

3.4.1.2. Αναλυτικοί παράμετροι.

Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) υπολογίσθηκαν με βάσει το λόγο σήματος προς θόρυβο (S/N) και βρέθηκαν για το MePB 0,07 και 0,23, για το EtPB 0,31 και 1,02, για το BePB 0,17 και 0,57, για το BuPB 0,12 και 0,40, και για το TCS 0,73 και 2,45 ng/ml, αντίστοιχα.

Ένας παράγοντας–κριτήριο της απόδοσης της μεθόδου που συχνά χρησιμοποιείται είναι η % ανάκτηση. Για τη μέθοδο που εφαρμόσθηκε στα δείγματα αμνιακού υγρού η μέση ανάκτηση του MePB βρέθηκε 99,30 ± 29,90%, του EtPB 82,36 ± 13,18%, του BePB 113,41 ± 14,46%, του BuPB 90,74 ± 13,99% και του TCS 69,95 ± 4,35%.

Η μέση ακρίβεια της μεθόδου για τα αποτελέσματα που προέκυψαν υπολογίσθηκε για το MePB 96,17 ± 18,02%, για το EtPB 95,86 ± 14,60%, για το BePB 96,65 ± 11,74%, για το BuPB 94,27 ± 11,30% και για το TCS 99,71 ± 12,54%.

Στην παρούσα εργασία ως μέτρο της επαναληψιμότητας χρησιμοποιήθηκε το % inter day precision, δηλαδή η επαναληψιμότητα των μετρήσεων μεταξύ των ημερών που έγιναν τα πειράματα, και η οποία υπολογίζεται με το λόγο του RSD προς το μέσο όρο της συγκέντρωσης. Έτσι, ο μέσος όρος του % inter day precision που υπολογίσθηκε από τα

επιμολυσμένα δείγματα είναι 15,23 ± 7,13% για το MePB, 12,25 ± 3,35% για το EtPB, 9,99 ± 4,35% για το BePB, 14,27 ± 9,17% για το BuPB και 18,77 ± 5,17% για το TCS.

Πίνακας 3.5. Τιμές αναλυτικών παραμέτρων ανά επίπεδο και αριθμός επαναλήψεων (N) του πειράματος για τους ενδοκρινικούς διαταράκτες στα δείγματα αμνιακού υγρού.

ng/ml	**MePB**	**EtPB**	**BePB**	**BuPB**	**TCS**	***N***
	% recovery					
5	148,13	104,87	122,81	104,14	70,60	
10	105,54	81,64	125,90	102,35	71,26	
25	90,20	79,41	119,64	93,47	72,96	4
50	78,67	71,96	90,46	70,72	61,95	
100	73,94	73,95	108,25	83,00	71,47	
	% accuracy					
5	111,29	108,44	101,25	97,31	109,77	
10	65,36	70,94	84,30	81,91	81,21	
25	106,39	102,84	110,80	108,41	109,12	4
50	99,82	96,22	84,58	83,57	92,29	
100	97,97	100,84	102,31	100,12	106,15	
	% inter day precision					
5	19,77	22,08	33,85	17,26	11,67	
10	10,46	12,52	4,84	8,15	25,44	
25	23,28	16,46	14,64	27,75	12,88	4
50	19,04	11,73	8,16	8,85	17,75	
100	8,14	8,30	12,30	12,32	18,99	

Πίνακας 3.6. Συνοπτική παρουσίαση των αναλυτικών παραμέτρων για τους ενδοκρινικούς διαταράκτες στα δείγματα αμνιακού υγρού.

	LOD (ng/ml)	**LOQ (ng/ml)**	**% recovery**	**% accuracy**	**Interday precision (%RSD)**	**R^2 (πρότυπα διαλύματα)**	**R^2 (επιμολυ-σμένων δειγμάτων)**
MePB	0,07	0,23	99,30 ± 29,90	96,17 ± 18,02	15,23 ± 7,13	0,9932	0,9968
EtPB	0,23	1,02	82,36 ± 13,18	95,86 ± 14,60	12,25 ± 3,35	0,9902	0,9998
BePB	0,17	0,57	113,41 ± 14,46	96,65 ± 11,74	9,99 ± 4,35	0,9932	0,9936
BuPB	0,12	0,40	90,74 ± 13,99	94,27 ± 11,30	14,27 ± 9,17	0,9918	0,9929
TCS	0,73	2,45	69,95 ± 4,35	99,71 ± 12,54	18,77 ± 5,17	0,9945	0,9974

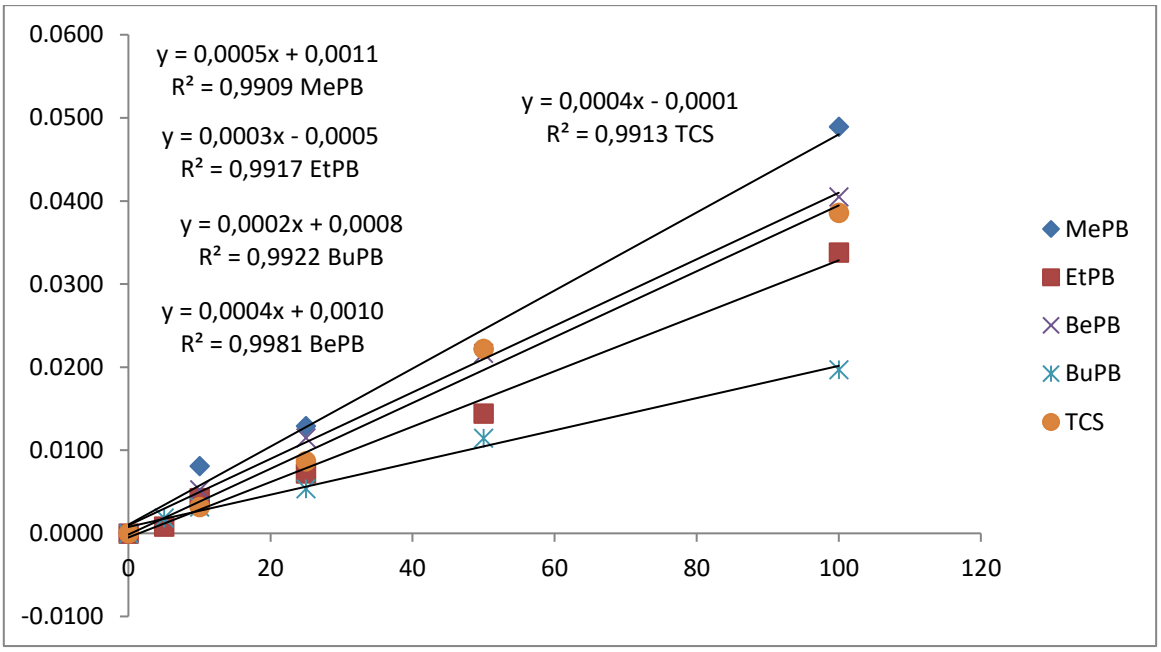
3.4.2. Δείγματα τρίχας.

3.4.2.1. Γραμμικότητα.

Τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν τις ίδιες συγκεντρώσεις και R^2 με αυτά που αναφέρονται στην Ενότητα 3.4.1.1. (Διαγράμματα 3.6 & 3.7).

Τα επιμολυσμένα δείγματα τρίχας είχαν συγκεντρώσεις 0, 5, 10, 25, 50 και 100 pg/mg. Το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης βρέθηκε 0,9909 για το MePB, 0,9917 για το EtPB, 0,9981 για το BePB, 0,9922 για το BuPB και 0,9913 για το TCS.

Στο Διάγραμμα 3.8 δίνονται οι καμπύλες των επιμολυσμένων δειγμάτων των MePB, EtPB, BePB, BuPB και TCS, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 3.8. Καμπύλες επιμολυσμένων δειγμάτων τρίχας.

3.4.2.2. Αναλυτικοί παράμετροι.

Όπως και στην περίπτωση των δειγμάτων αμνιακού υγρού έτσι και στα δείγματα τρίχας, υπολογίσθηκαν, με βάσει το λόγο σήματος προς θόρυβο (S/N), το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ).

Για τη μέθοδο που εφαρμόσθηκε στα δείγματα τρίχας η μέση % ανάκτηση του MePB βρέθηκε 112,08 ± 27,65%, του EtPB 110,69 ± 41,08%, του BePB 104,68 ± 51,63%, του BuPB 81,62 ± 48,15% και του TCS 97,48 ± 10,84%.

Η ακρίβεια της μεθόδου υπολογίσθηκε για το MePB 94,0 ± 19,5%, για το EtPB 103,80 ± 13,30%, για το BePB 98,90 ± 20,40%, για το BuPB 136,2 ± 8,1 % και για το TCS 91,40 ± 19,10%.

Όπως περιγράφηκε και προηγουμένως (Ενότητα 3.4.1.2.) ως μέτρο της επαναληψιμότητας χρησιμοποιήθηκε το % inter day precision. Ο μέσος όρος του inter day precision (%RSD), που υπολογίσθηκε από τα επιμολυσμένα δείγματα, είναι 21,15 ± 7,80% για το MePB, 10,32 ± 8,83% για το EtPB, 23,19 ± 7,59% για το BePB, 21,43 ± 12,26% για το BuPB και 15,89 ± 5,10% για το TCS.

Πίνακας 3.7. Τιμές αναλυτικών παραμέτρων ανά επίπεδο και αριθμός επαναλήψεων (N) του πειράματος για τους ενδοκρινικούς διαταράκτες στα δείγματα τρίχας.

pg/mg	MePB	EtPB	BePB	BuPB	TCS	*N*
	% recovery					
10	141,95	169,15	177,97	151,08	89,25	6
25	125,07	109,49	102,28	74,98	90,48	
50	103,20	83,57	76,61	57,80	112,84	
100	78,12	80,57	61,87	42,64	97,35	
	% accuracy					
10	116,23	115,07	70,63	-	81,75	6
25	103,10	101,51	119,55	134,12	102,92	
50	84,35	85,99	102,81	129,23	111,34	
100	72,35	112,75	102,50	145,10	69,68	
	% inter day precision					
10	23,23	4,87	27,48	39,70	23,36	6
25	27,69	19,71	27,45	13,51	14,61	
50	12,52	1,00	25,89	16,92	11,90	
100	-	15,71	11,95	15,58	13,69	

Πίνακας 3.8. Συνοπτική παρουσίαση των αναλυτικών παραμέτρων για τους ενδοκρινικούς διαταράκτες στα δείγματα τρίχας.

	LOD (pg/mg)	LOQ (pg/mg)	% recovery	% accuracy	Interday precision (%RSD)	R^2 (πρότυπα διαλύματα)	R^2 (επιμολυ-σμένων δειγμάτων)
MePB	3,62	12,08	112,08 ± 27,65	94,0 ± 19,5	21,15 ± 7,80	0,9932	0,9909
EtPB	0,54	1,81	110,69 ± 41,08	103,80 ±13,30	10,32 ±8,83	0,9902	0,9917
BePB	0,88	2,93	104,68 ± 51,63	98,90 ± 20,40	23,19 ± 7,59	0,9932	0,9981
BuPB	0,28	0,94	81,62 ± 48,15	136,2 ± 8,1	21,43 ± 12,26	0,9918	0,9922
TCS	1,28	4,27	97,48 ± 10,84	91,40 ± 19,10	15,89 ± 5,10	0,9945	0,9913

3.5. Επίπεδα ενδοκρινικών διαταρακτών στα μελετώμενα βιολογικά υλικά.

3.5.1. Επίπεδα PBs και TCS.

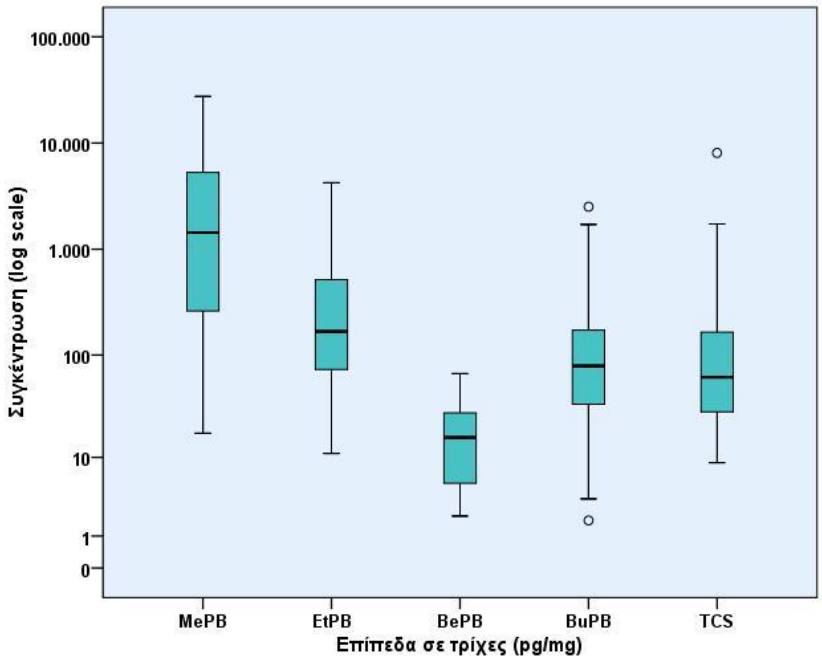
Το σύνολο των γυναικών που δέχθηκαν να δώσουν αμνιακό υγρό για ανάλυση ήταν 99 (99,0% ποσοστό απόκρισης). Χαμηλά ποσοστά ανίχνευσης των MePB (21,2%), EtPB (2,0%), BePB (1,0%), BuPB (2,0%) και TCS (5,1%) παρατηρήθηκαν στα δείγματα αμνιακού υγρού. Οι μέσες τιμές των ουσιών (ng/ml) κυμάνθηκαν σε 6,6 ± 5,7 για το MePB, 9,2 ± 11,2 για το EtPB, 0,6 για το BePB, 0,4 ± 0,3 για το BuPB και 1,8 ± 0,7 για το TCS.

Η αντίστοιχη μελέτη για τις τρίχες έγινε σε 95 γυναίκες (95,0%) που δέχθηκαν να δώσουν δείγμα. 100 % ποσοστό ανίχνευσης καταγράφηκε για τις ουσίες MePB και EtPB. Οι μέσες τιμές των δύο ουσιών ήταν 4501,02 ± 6756,1 pg/mg και 510,1 ± 857,6 pg/mg, αντίστοιχα. Υψηλά ποσοστά παρατηρήθηκαν επίσης για τις ουσίες BuPB και TCS (91,6% και 98,9%, αντίστοιχα) με μέσες τιμές 237,1 ± 422,3 και 245,0 ± 859,5 pg/mg, αντίστοιχα. Το χαμηλότερο ποσοστό θετικότητας αλλά και επιπέδων ανίχνευσης καταγράφηκε για την ουσία BePB (15.8%) με εύρος τιμών 2,1 – 66,6pg/mg.

Στον Πίνακα 3.9 δίνονται τα επίπεδα των ενδοκρινικών διαταρακτών στα δείγματα αμνιακού υγρού και τρίχας, ενώ στο Διάγραμμα 3.9 παρουσιάζονται τα επίπεδα στα δείγματα τρίχας (λογαριθμική κλίμακα) σε μορφή θηκογράμματος.

Πίνακας 3.9. Επίπεδα θετικών δειγμάτων ενδοκρινικών διαταρακτών σε αμνιακό υγρό και τρίχα εγκύων γυναικών.

		N		Μέση Τιμή	Διάμεσος	Τυπική απόκλιση	Ελάχιστο	Μέγιστο
		>LOD	>LOD (%)					
Αμνιακό υγρό (ng/ml)	**MePB**	21	21,2	6,6	5,0	5,7	0,1	18,8
	EtPB	2	2,0	9,2	9,2	11,2	1,3	17,1
	BePB	1	1,0	0,6	0,6	-	0,6	0,6
	BuPB	2	2,0	0,4	0,4	0,3	0,2	0,6
	TCS	5	5,1	1,8	2,0	0,7	0,9	2,4
Τρίχα (pg/mg)	**MePB**	95	100,0	4501,2	1437,1	6756,1	17,6	27437,0
	EtPB	95	100,0	510,1	167,3	857,6	11,0	4224,5
	BePB	15	15,8	22,9	15,9	24,1	2,1	66,6
	BuPB	87	91,6	237,1	78,6	422,3	1,8	2513,7
	TCS	94	98,9	245,0	61,6	859,5	8,8	8070,2



Διάγραμμα 3.9. Επίπεδα PBs και TCS σε δείγματα τρίχας (λογαριθμική κλίμακα).

Η ανάλυση των επιπέδων ενδοκρινικών διαταρακτών με τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά των γυναικών (βάρος, BMI και μεταβολή αυτών) δεν έδειξε καμία συσχέτιση (p>0,050) (Πίνακας 3.10).

Πίνακας 3.10. Συσχέτιση κατά Spearman των επιπέδων ενδοκρινικών διαταρακτών στην τρίχα με σωματομετρικά χαρακτηριστικά της εγκύου.

		MePB	EtPB	BePB	BuPB	TCS
Βάρος (προ εγκυμοσύνης)	r	0,122	0,139	-0,208	0,038	0,143
	p	0,237	0,179	0,458	0,727	0,170
Βάρος (κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης)	r	0,089	0,118	-0,174	0,006	0,147
	p	0,396	0,257	0,535	0,954	0,160
BMI (προ εγκυμοσύνης)	r	0,080	0,093	-0,204	0,068	0,101
	p	0,441	0,369	0,467	0,534	0,332
BMI (κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης)	r	0,053	0,080	-0,143	0,041	0,117
	p	0,609	0,442	0,611	0,711	0,263

Στον Πίνακα 3.11 οι διαφορές στα επίπεδα των ενδοκρινικών διαταρακτών στα δείγματα αμνιακού υγρού και τρίχας εξετάστηκαν με βάση αυτοαναφερόμενες χρήσεις προϊόντων προσωπικής φροντίδας και υγιεινής. Η χρήση αποσμητικών (πριν και στη διάρκεια της εγκυμοσύνης) και η χρήση κρέμας σώματος (πριν και στη διάρκεια της εγκυμοσύνης) κωδικοποιημένη σε δύο βασικές κατηγορίες (ποτέ/μηνιαία και εβδομαδιαία/καθημερινά) δεν έδειξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά παρότι στις περισσότερες περιπτώσεις η πιο συχνή χρήση είχε υψηλότερες συγκεντρώσεις ενδοκρινικών διαταρακτών.

Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και στα υπόλοιπα είδη ατομικής υγιεινής με εξαίρεση τα επίπεδα MePB στα δείγματα τριχών στην χρήση μακιγιάζ πριν την εγκυμοσύνη (p=0,028) και στην χρήση σπρέι/γέλης μαλλιών κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (p=0,036). Τα επίπεδα MePB στο αμνιακό υγρό παρουσίασαν διαφορά στην αυτοαναφερόμενη χρήση πριν την εγκυμοσύνη (p=0,020) αλλά η σχέση ήταν αντίθετη από την αναμενόμενη (εβδομαδιαία/καθημερινή χρήση 4,7 ± 4,8, ποτέ/μηνιαία 11,1 ± 5,4).

Στα επίπεδα BuPB στα δείγματα τρίχας υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σχετιζόμενη με τη χρήση αντηλιακών πριν (p=0,041) όσο και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (p=0,024). Στατιστική διαφοροποίηση σχετιζόμενη με τη χρήση αντηλιακών πριν την εγκυμοσύνη παρουσίασαν και τα επίπεδα EtPB (p=0,033)

Πίνακας 3.11. Διαφορές επιπέδων ενδοκρινικών διαταρακτών στα δείγματα τρίχας και αμνιακού υγρού σε σχέση με τη χρήση ειδών προσωπικής υγιεινής (μέρος Α).

	Αποσμητικά (πριν)					**Αποσμητικά (κατά τη διάρκεια)**				
	Ποτέ/ Μηνιαία		**Εβδομαδιαία/ Καθημερινά**			**Ποτέ/ Μηνιαία**		**Εβδομαδιαία / Καθημερινά**		
	Μέση Τιμή	**Τυπική Απόκλιση**	**Μέση Τιμή**	**Τυπική Απόκλιση**	**p**	**Μέση Τιμή**	**Τυπική Απόκλιση**	**Μέση Τιμή**	**Τυπική Απόκλιση**	**p**
MePB$^{\alpha}$	17,7		6,0	5,2	0,137	10,7	7,9	5,9	5,2	0,315
TCS$^{\alpha}$	2,0		1,7	0,7	1,000	2,0		1,7	0,7	1,000
MePB$^{\tau}$	3910,9	9526,3	4555,4	6516,8	0,144	4430,7	8436,9	4514,4	6457,3	0,262
EtPB$^{\tau}$	283,7	451,3	530,9	884,4	0,520	305,5	354,7	548,4	918,4	0,846
BePB$^{\tau}$	2,1		24,4	24,3	0,105	2,1		24,4	24,3	0,105
BuPB$^{\tau}$	170,6	150,3	242,9	438,2	0,357	140,5	115,2	255,6	456,6	0,304
TCS$^{\tau}$	105,6	150,7	256,2	892,0	0,846	104,5	123,9	269,6	929,0	0,702
	Μακιγιάζ (πριν)					**Μακιγιάζ (κατά τη διάρκεια)**				
MePB$^{\alpha}$	11,1	5,4	4,7	4,8	**0,020 ***	8,2	6,1	5,1	5,2	0,205
TCS$^{\alpha}$	1,1	0,3	2,2	0,2	0,083	0,9		2,0	0,5	0,157
MePB$^{\tau}$	3204,9	6613,7	5159,6	6784,2	**0,028**	3597,8	6686,6	5280,5	6784,1	0,114
EtPB$^{\tau}$	463,3	761,5	533,8	907,5	0,969	528,2	885,2	494,4	841,7	0,511
BePB$^{\tau}$	8,9	7,8	29,9	26,7	0,142	10,1	7,6	31,4	27,8	0,195
BuPB$^{\tau}$	191,8	286,7	259,7	476,6	0,666	172,9	251,8	291,8	522,6	0,831
TCS$^{\tau}$	145,6	226,6	296,3	1045,2	0,690	188,1	320,3	295,1	1143,1	0,332
	Σπρέι/Γέλη μαλλιών (πριν)					**Σπρέι/Γέλη μαλλιών (κατά τη διάρκεια)**				
MePB$^{\alpha}$	8,7	6,3	5,5	5,2	0,205	8,5	5,7	4,8	5,2	0,091
TCS$^{\alpha}$	1,4	0,6	2,3	0,1	0,083	1,4	0,6	2,3	0,1	0,083
MePB$^{\tau}$	3766,3	6474,8	5653,2	7111,3	0,078	3838,3	6473,1	6087,2	7265,6	**0,036**
EtPB$^{\tau}$	489,2	850,6	542,7	879,4	0,272	561,0	968,3	388,3	497,3	0,579
BePB$^{\tau}$	22,1	24,2	25,2	27,4	0,794	24,1	25,8	15,3	4,6	0,865
BuPB$^{\tau}$	199,9	306,6	295,1	557,7	0,951	230,2	417,2	252,5	441,3	0,551
TCS$^{\tau}$	164,0	246,5	369,8	1337,0	0,685	279,1	1001,3	164,7	348,7	0,197

	Κρέμα σώματος (πριν)					Κρέμα σώματος (κατά τη διάρκεια)				
MePB$^{\alpha}$	7,2	4,9	5,9	6,6	0,260	6,6	4,8	6,5	7,0	0,434
TCS$^{\alpha}$	1,9	0,8	1,7	0,7	0,564	1,6	1,1	1,8	0,5	1,000
MePB$^{\tau}$	4278,7	5917,8	4643,1	7287,2	0,497	4842,1	6697,8	4219,2	6856,2	0,446
EtPB$^{\tau}$	484,9	835,3	526,1	878,4	0,825	442,6	785,6	565,9	916,8	0,468
BePB$^{\tau}$	27,6	26,7	21,2	24,2	0,296	23,3	25,1	22,7	24,9	0,540
BuPB$^{\tau}$	263,2	391,7	222,6	441,2	0,067	222,6	359,7	248,9	470,6	0,682
TCS$^{\tau}$	215,9	350,2	263,9	1071,0	0,082	209,2	333,3	275,2	1130,8	0,121
	Αντιηλιακά (πριν)				**p**	**Αντιηλιακά (κατά τη διάρκεια)**				
MePB$^{\alpha}$	7,4	5,4	5,9	6,0	0,394	5,9	5,5	7,5	6,1	0,570
TCS$^{\alpha}$	1,6	0,6	2,4		0,157	1,5	0,7	2,2	0,3	0,248
MePB$^{\tau}$	4869,4	6995,3	4055,8	6508,9	0,828	5369,5	7772,1	2708,6	3352,7	0,557
EtPB$^{\tau}$	304,6	467,5	758,6	1124,9	**0,033**	481,6	855,2	568,9	873,8	0,830
BePB$^{\tau}$	10,5	6,8	33,7	28,9	0,132	14,9	11,8	28,2	29,1	0,637
BuPB$^{\tau}$	172,0	336,1	317,2	502,0	**0,041**	143,3	240,4	434,8	619,9	**0,024**
TCS$^{\tau}$	304,9	1145,7	174,0	252,4	0,782	284,1	1028,9	161,6	242,8	0,522

$^{\alpha}$: αναφέρεται στις τιμές των δειγμάτων αμνιακού υγρού

$^{\tau}$: αναφέρεται στις τιμές των δειγμάτων τρίχας

*: στατιστικά σημαντικές διαφορές

Στον Πίνακα 3.12 οι αναλύσεις των επιπέδων ενδοκρινικών διαταρακτών τόσο στα δείγματα αμνιακού υγρού όσο και στα δείγματα τριχών δεν έδειξαν καμία στατιστικά σημαντική διαφορά (p>0,100) στην χρήση προϊόντων ατομικής υγιεινής (αφρόλουτρο, σαμπουάν) και προσωπικής φροντίδας (βαφή μαλλιών).

Πίνακας 3.12.Διαφορές επιπέδων ενδοκρινικών διαταρακτών στα δείγματα τρίχας και αμνιακού υγρού σε σχέση με τη χρήση ειδών προσωπικής υγιεινής (μέρος Β)

	Αφρόλουτρο (πριν)					**Αφρόλουτρο (κατά τη διάρκεια)**				
	Εβδομαδιαία		**Καθημερινά**			**Εβδομαδιαία**		**Καθημερινά**		
	Μέση Τιμή	**Τυπική Απόκλιση**	**Μέση Τιμή**	**Τυπική Απόκλιση**	**p**	**Μέση Τιμή**	**Τυπική Απόκλιση**	**Μέση Τιμή**	**Τυπική Απόκλιση**	**p**
MePB$^{\alpha}$	4,4	0,7	6,9	6,1	0,614	8,5	7,0	6,6	5,9	0,823
TCS$^{\alpha}$	-	-	1,8	0,7				1,8	0,7	
MePB$^{\tau}$	4699,9	6863,4	4577,7	6880,8	0,937	4500,7	6762,8	4678,5	6953,7	0,919
EtPB$^{\tau}$	630,4	1053,8	490,2	812,2	0,326	600,3	1037,3	504,1	820,0	0,572
BePB$^{\tau}$	27,1	26,8	16,8	20,0	0,322	27,1	26,8	16,8	20,0	0,322
BuPB$^{\tau}$	353,0	645,7	211,2	346,1	0,675	337,1	631,3	216,1	350,3	0,777
TCS$^{\tau}$	134,6	210,6	286,6	987,8	0,644	148,7	212,7	285,4	1002,4	0,918
	Σαμπουάν (πριν)				**p**	**Σαμπουάν (κατά τη διάρκεια)**				
MePB$^{\alpha}$	6,7	6,0	5,8	3,7	0,841	6,7	6,0	5,8	3,7	0,841
TCS$^{\alpha}$	2,0	0,5	0,9	-	0,157	2,0	0,5	0,9	-	0,157
MePB$^{\tau}$	4841,1	7036,6	1905,7	3118,1	0,099	4730,5	6990,5	2309,6	3338,2	0,395
EtPB$^{\tau}$	492,6	832,5	643,2	1067,4	0,464	483,4	824,9	765,1	1154,1	0,760
BePB$^{\tau}$	20,9	22,2	35,9	42,5	0,610	20,9	22,2	35,9	42,5	0,610
BuPB$^{\tau}$	255,2	442,2	80,1	64,3	0,443	250,1	437,8	89,0	70,1	0,685
TCS$^{\tau}$	156,7	269,3	911,0	2392,3	0,277	158,2	267,8	1064,5	2645,7	0,365
	Βαφή Μαλλιών (πριν)					**Βαφή μαλλιών (κατά τη διάρκεια)**				
	Ποτέ		**Μηνιαία**			**Ποτέ**		**Μηνιαία**		
	Μέση Τιμή	**Τυπική Απόκλιση**	**Μέση Τιμή**	**Τυπική Απόκλιση**	**p**	**Μέση Τιμή**	**Τυπική Απόκλιση**	**Μέση Τιμή**	**Τυπική Απόκλιση**	**p**
MePB$^{\alpha}$	10,3	7,5	5,4	4,7	0,215	6,4	5,3	7,2	8,1	0,929
TCS$^{\alpha}$	1,9	0,8	1,7	0,7	0,564	1,8	0,7			
MePB$^{\tau}$	3966,1	6592,1	4736,3	6863,4	0,865	4561,0	6923,7	4261,8	6209,3	0,926
EtPB$^{\tau}$	595,5	1069,4	472,5	752,6	0,942	564,2	910,0	293,5	573,7	0,149
BePB$^{\tau}$	14,0	8,4	25,1	26,4	0,885	21,8	24,2	25,8	27,2	0,514
BuPB$^{\tau}$	229,6	368,1	240,5	447,5	0,905	255,3	441,7	162,2	331,3	0,123
TCS$^{\tau}$	173,2	235,7	277,0	1022,7	0,267	245,0	938,6	245,0	441,6	0,335

$^{\alpha}$: αναφέρεται στις τιμές των δειγμάτων αμνιακού υγρού

$^{\tau}$: αναφέρεται στις τιμές των δειγμάτων τρίχας

Η μελετώμενη χρήση στα επίπεδα ενδοκρινικών διαταρακτών σε σχέση με την αυτοαναφερόμενη χρήση ειδών συσκευασίας έδειξε ότι δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,250$).

Πίνακας 3.13. Διαφορές επιπέδων ενδοκρινικών διαταρακτών σε σχέση με τη χρήση ειδών συσκευασίας σε αμνιακά υγρά και τρίχες εγκύων.

	Πλαστικά σκεύη				
	Ποτέ/Σπάνια		Εβδομαδιαία/Καθημερινά		
	Μέση Τιμή	Τυπική Απόκλιση	Μέση Τιμή	Τυπική Απόκλιση	p
MePB[α]	5,9	6,1	6,8	5,7	0,753
TCS[α]	2,0		1,7	0,7	0,732
MePB[τ]	5125,7	8080,1	4184,0	6021,3	0,524
EtPB[τ]	460,2	952,7	535,4	812,1	0,689
BePB[τ]	16,6	21,5	30,1	26,5	0,296
BuPB[τ]	279,5	470,0	214,8	397,5	0,500
TCS[τ]	114,1	307,0	309,4	1024,6	0,303
	Χρήση πλαστικής μεμβράνης				
MePB[α]	5,9	6,1	6,8	5,7	0,753
TCS[α]	2,0		1,7	0,7	0,732
MePB[τ]	5125,7	8080,1	4184,0	6021,3	0,524
EtPB[τ]	460,2	952,7	535,4	812,1	0,689
BePB[τ]	16,6	21,5	30,1	26,5	0,296
BuPB[τ]	279,5	470,0	214,8	397,5	0,500
TCS[τ]	114,1	307,0	309,4	1024,6	0,303

[α]: αναφέρεται στις τιμές των δειγμάτων αμνιακού υγρού
[τ]: αναφέρεται στις τιμές των δειγμάτων τρίχας

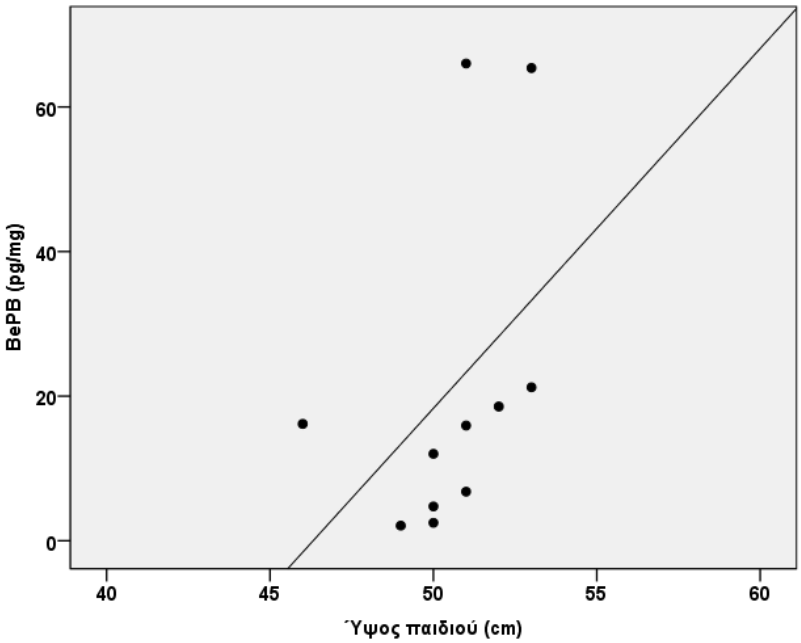
3.5.2. Συσχέτιση επιπέδων PBs και TCS με τα χαρακτηριστικά των βρεφών.

Τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά των βρεφών σχετίστηκαν με τα μετρούμενα επίπεδα PBs και TCS στο αμνιακό υγρό και τα δείγματα τριχών των γυναικών κατά την αμνιοπαρακέντηση. Παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το ύψος των βρεφών και τα επίπεδα BePB στις τρίχες των μητέρων τους (rs=0,664, p=0,026). (Πίνακας 3.14, Διάγραμμα 3.10).

Πίνακας 3.14. Διαφορές επιπέδων PBs και TCS σε αμνιακό υγρό και δείγματα τριχών εγκύων σε σχέση με σωματομετρικά χαρακτηριστικά των βρεφών.

		Βάρος παιδιού (gr)		Ύψος παιδιού (cm)		Περίμετρος κεφαλής (cm)	
		r	**p**	**r**	**p**	**r**	**p**
Spearman's rho	**MePB$^{\alpha}$**	-0,089	0,726	-0,149	0,581	-0,143	0,597
	TCS$^{\alpha}$	-0,800	0,200	0,738	0,262	0,316	0,684
	MePB$^{\tau}$	0,189	0,089	0,191	0,101	0,119	0,323
	EtPB$^{\tau}$	-0,075	0,502	-0,111	0,343	-0,043	0,723
	BePB$^{\tau}$	0,445	0,170	**0,664***	**0,026**	0,067	0,844
	BuPB$^{\tau}$	-0,096	0,409	-0,050	0,680	-0,055	0,662
	TCS$^{\tau}$	0,203	0,070	0,133	0,258	0,028	0,820

$^{\alpha}$: αναφέρεται στις τιμές των δειγμάτων αμνιακού υγρού
$^{\tau}$: αναφέρεται στις τιμές των δειγμάτων τρίχας
*: στατιστικά σημαντικές διαφορές



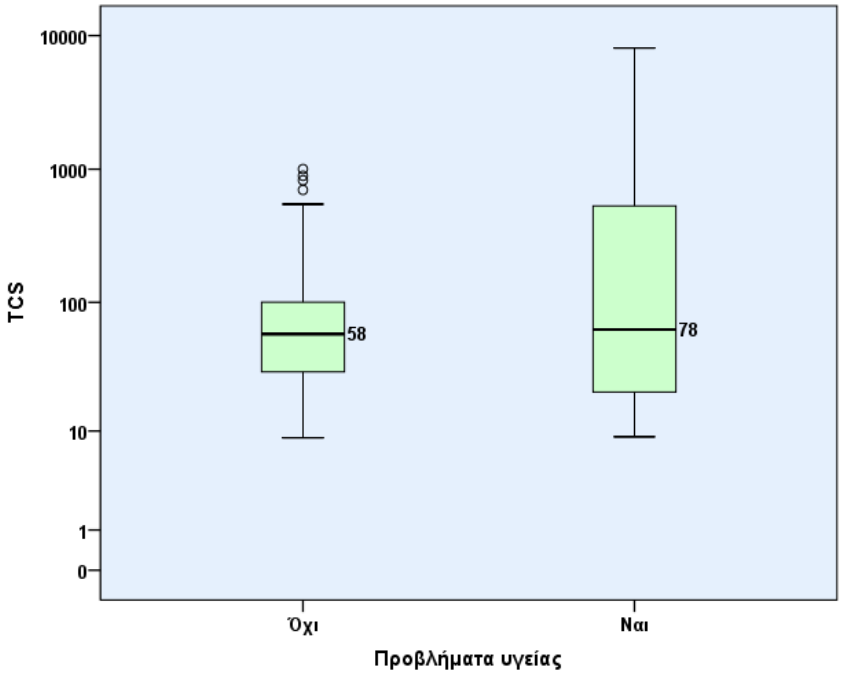
Διάγραμμα 3.10. Συσχέτιση επιπέδων BePB στις τρίχες γυναικών κατά την αμνιοπαρακέντηση με το ύψος των βρεφών κατά τη γέννηση.

Τα επίπεδα TCS στις τρίχες των μητέρων δείχνουν να είναι στατιστικά υψηλότερα στις περιπτώσεις κατά τις οποίες τα παιδιά που γεννήθηκαν παρουσίασαν κάποιο πρόβλημα υγείας (948,7 ± 2296,2 pg/mg) σε σχέση με τις περιπτώσεις που δεν παρουσιάστηκε (13,5 ± 215,8 pg/mg) (p=0,004). (Πίνακας 3.15, Διάγραμμα 3.11).

Πίνακας 3.15. Διαφορές επιπέδων ενδοκρινικών διαταρακτών στα δείγματα τρίχας των εγκύων σε σχέση με τα προβλήματα υγείας που παρουσίασαν τα βρέφη.

		Προβλήματα υγείας				
		Όχι		**Ναι**		
		Μέση Τιμή	**Τυπική Απόκλιση**	**Μέση Τιμή**	**Τυπική Απόκλιση**	**p**
Τρίχα	**MePB**	4665,4	6617,1	2057,6	2397,9	0,183
	EtPB	539,9	925,0	436,5	500,2	0,708
	BePB	23,6	24,9	9,4	3,7	0,459
	BuPB	270,6	463,5	199,3	360,0	0,616
	TCS	139,5	215,8	948,7	2296,2	**0,004***

*: στατιστικά σημαντικές διαφορές



Διάγραμμα 3.11. Διαφοροποίηση επιπέδων TCS στα δείγματα τρίχας των εγκύων κατά την αμνιοπαρακέντηση σε σχέση με την ύπαρξη ή μη προβλημάτων υγείας στα βρέφη.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων των PBs και TCS σε δείγματα τριχών κεφαλής και αμνιακού υγρού εγκύων γυναικών. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε καταγραφή των σωματομετρικών χαρακτηριστικών της μητέρας και του βρέφους, αλλά και των κοινωνικοοικονομικών, διατροφικών και άλλων συνηθειών της μητέρας μέσω σχετικών ερωτηματολογίων.

Μέχρι τώρα υπάρχουν ελάχιστες αναφορές στη βιβλιογραφία σχετικά με τον προσδιορισμό των επιπέδων των PBs και του TCS σε δείγματα τρίχας (τρεις αναφορές για τα PBs και μόλις μια για το TCS) και μάλιστα η ομάδα ελέγχου τους αποτελείται από πολύ μικρό αριθμό ατόμων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των προηγούμενων μελετών τα επίπεδα των συγκεντρώσεων του MePB κυμαίνονται από 78 έως 624 pg/mg, του EtPB από 7 έως 1980 pg/mg και για το TCS από <LOD (LOD=276 pg/mg) έως 1870 pg/mg, ενώ για τα BuPB και BePB δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές (Martín et al., 2015; Martín et al. 2016). Στα δείγματα τρίχας της παρούσας μελέτης, οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων των ενώσεων κυμάνθηκαν στο εύρος τιμών που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία και συγκεκριμένα για το MePB η μέση τιμή συγκέντρωσης ήταν 4501,2 pg/mg, για το EtPB 510,1 pg/mg, για το BePB 22,9 pg/mg, για το BuPB 237,1 pg/mgκαι για το TCS 245,0 pg/mg (Πίνακας 4.1).

Όπως παρατηρείται, οι συγκεντρώσεις των PBs και TCS στα δείγματα τριχών είναι αρκετά υψηλές. Ωστόσο δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για το κατά πόσον οι συγκεντρώσεις προέρχονται από έκθεση της εγκύου στις ενώσεις αυτές, απορρόφηση στον οργανισμό και μεταφορά μέσω του αίματος και των αιμοφόρων αγγείων στο τριχωτό της κεφαλής ή από εξωτερική επιμόλυνση και απορρόφηση των ουσιών από την τρίχα. Οι πλύσεις που γίνονται στην τρίχα με νερό και μεθανόλη εξασφαλίζουν μόνο τον επιφανειακό καθαρισμό της τρίχας.

Όπως και στην περίπτωση των δειγμάτων τρίχας έτσι και για τα δείγματα αμνιακού υγρού οι αναφορές στη βιβλιογραφία είναι ελάχιστες όσον αφορά τον προσδιορισμό των PBs και του TCS (δυο αναφορές για PBs και δυο για το TCS). Το εύρος των επιπέδων των συγκεντρώσεων στη βιβλιογραφία είναι 0,89 – 55,24 ng/ml για το MePB, <LOD (LOD=0,65 ng/ml) – 11,24 ng/ml για το EtPB, <LOD (LOD=0,2 ng/ml) – 10,22 ng/ml για το BuPB, <LOD (LOD=2,3 ng/ml) – 26,72 ng/ml για το TCS, ενώ δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές

αναφορές για το BePB (Philippat et al., 2013; Shekhar et al., 2016). Οι τιμές που βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη βρίσκονται εντός των ορίων που ορίζονται από τις βιβλιογραφικές αναφορές. Συγκεκριμένα, η μέση τιμή συγκέντρωσης για το MePB ήταν 6,6 ng/ml, για το EtPB 9,2 ng/ml, για το BePB 0,6 ng/ml, για το BuPB 0,4 ng/ml και για τοTCS 1,8 ng/ml (Πίνακας 4.1).

Πίνακας 4.1. Παράθεση τιμών των συγκεντρώσεων PBs και TCS σε τρίχα και αμνιακό υγρό όπως αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

	Πληθυσμός	**MePB**	**EtPB**	**BePB**	**BuPB**	**TCS**	**Χώρα**	**Μελέτη**
Τρίχα	N=95 γυναίκες	17,6 – 27437 pg/mg	11 – 4224,5 pg/mg	2,1 – 66,6 pg/mg	1,8 – 2513,7 pg/mg	8,8 – 8070,2 pg/mg	Ελλάδα	*Παρούσα μελέτη*
	N=4 γυναίκες		<LOD[1] – 1,98 ng/mg			<LOD[2] – 1,87 ng/mg	Γερμανία	*Martín et al., 2015*
	N=6 εθελοντές	78 – 624 ng/gr	7 – 42 ng/gr				Ισπανία	*Martín et al., 2016*
Αμνιακό υγρό	N=99 γυναίκες	0,1 – 18,8 ng/ml	1,3 – 17,1 ng/ml	0,6 ng/ml	0,2 – 0,6 ng/ml	0,9 – 2,4 ng/ml	Ελλάδα	*Παρούσα μελέτη*
	N=97 γυναίκες	<LOD[3] - 3,3 μg/l	<LOD[4] μg/l		<LOD[5] – 0,3 μg/l	<LOD[6] – 19,4 μg/l	Η.Π.Α.	*Philippat et al., 2013*
	N=40 γυναίκες	0,89 – 55,24 ng/ml	<LOD[7] – 11,24 ng/ml		0,47 – 10,22 ng/ml	2,36 – 26,72 ng/ml	Ινδία	*Shekhar et al., 2016*

[1]: LOD= 0,149 ng/mg, [2]: LOD=0,276 ng/mg, [3]: LOD=1,0 μg/l, [4]: LOD=1,0 μg/l, [5]: LOD=0,2 μg/l, [6]: LOD=2,3 μg/l, [7]: LOD=0,65 ng/ml

Το αμνιακό υγρό περιέχει (εκτός των διαφορών θρεπτικών ουσιών) τα ούρα του εμβρύου, οπότε θα μπορούσαμε κατά κάποιο τρόπο να συγκρίνουμε τις συγκεντρώσεις των ουσιών που μας ενδιαφέρουν στο αμνιακό υγρό με τις αντίστοιχες στα ούρα. Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, οι τιμές των συγκεντρώσεων του MePB, EtPB, BuPB, BePB και TCS στα ούρα είναι 0,8 – 866 ng/ml, <1 – 222 ng/ml, 0,08 – 303 ng/ml, 0,03 ng/ml και 0,07 – 1706 ng/ml, αντίστοιχα (Honda et al., 2018; Kim et al., 2018; Sakhi et al., 2018). Παρατηρείται

λοιπόν ότι οι συγκεντρώσεις των PBs και TCS στο αμνιακό υγρό είναι σαφώς μικρότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες των ούρων. Η εξαιρετικά μικρή συγκέντρωση του BePB σε δείγματα ούρων εξηγεί τη μη ύπαρξη τιμών στη βιβλιογραφία που αφορούν το αμνιακό υγρό αλλά και το χαμηλό ποσοστό θετικότητας στην μελέτη αυτή (μόλις 1,0%).

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα οι συγκεντρώσεις των PBs στα ούρα ακολουθούν την εξής τάση MePB > EtPB > BuPB > BePB. Η ίδια κατανομή/σειρά παρατηρείται και στα αποτελέσματα των αμνιακών υγρών της παρούσας μελέτης, όμως έχοντας υπόψη το πολύ χαμηλό ποσοστό θετικότητας για τα EtPB, BuPB και BePB (2,0, 2,0 και 1,0 %, αντίστοιχα) δεν μπορεί να προκύψει κάποιο έγκυρο αποτέλεσμα. Παρόλα αυτά η κατανομή των ποσοστών των θετικών δειγμάτων ακολουθεί παρόμοιο μοτίβο με τα ούρα. Μεγαλύτερο ποσοστό θετικότητας παρουσιάζει το MePB και ακολουθούν τα υπόλοιπα. Αξιοσημείωτο είναι να αναφερθεί ότι σε πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Κορέα παρατηρήθηκαν στα ούρα των συμμετεχόντων/ουσών πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε EtPB, γεγονός το οποίο αποδόθηκε στην άδεια που έδωσε το Υπουργείο Ασφάλειας Τροφίμων και Φαρμάκων της Κορέας για χρήση του EtPB ως συντηρητικό σε τρόφιμα (Kim et al., 2018).

Τα δεδομένα που ελήφθησαν από τα ερωτηματολόγια υποδεικνύουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης προβλημάτων στη λειτουργία του θυρεοειδούς αδένα. Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης σε PBs και TCS και της εμφάνισης προβλημάτων στη λειτουργία του θυρεοειδούς αδένα, όπως αλλαγές στο βάρος του αδένα (Vo et al., 2010) και μείωση των επιπέδων της T_4 (Witorsch, 2014). Ωστόσο, η εφαρμογή παρόμοιας συσχέτισης στην παρούσα έρευνα θα ήταν ανακριβής καθώς από τα δεδομένα που ελήφθησαν δεν μπορούμε να συμπεράνουμε πρόκληση ή ενίσχυση των προβλημάτων του θυρεοειδούς αδένα εξαιτίας της έκθεσης στις εν λόγω ουσίες.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις του MePB σε αμνιακό υγρό και τρίχα μεταξύ των εγκύων που χρησιμοποιούσαν προϊόντα μακιγιάζ καθημερινά ή εβδομαδιαία και εκείνων που χρησιμοποιούσαν σπάνια ή ποτέ, πριν την εγκυμοσύνη ($p=0,020$ & $0,028$ για τα δείγματα αμνιακού υγρού και τρίχας, αντίστοιχα) (Πίνακας 3.11). Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ούρα 261 εθελοντών παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε propyl paraben στα άτομα που χρησιμοποιούσαν ανά δύο μέρες ή/και συχνότερα προϊόντα μακιγιάζ (Kim et al., 2018),

ωστόσο στην παρούσα μελέτη δεν εξετάσθηκε το propyl paraben και έτσι δεν μπορούμε να έχουμε σαφή σύγκριση. Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε συσχέτιση του MePB και EtPB με την αυξημένη ή μη χρήση προϊόντων περιποίησης του δέρματος και προσωπικής υγιεινής (όπως κρέμες, σαμπουάν, οδοντόκρεμες), όμως παρόμοια συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Θετική συσχέτιση μεταξύ της χρήσης προϊόντων προσωπικής φροντίδας και υγιεινής και της συγκέντρωσης των PBs στα ούρα γυναικών παρατηρήθηκε και από τον Sakhi και τους συνεργάτες του (Sakhi et al., 2018). Συγκεκριμένα, οι ερευνητές παρατήρησαν αυξημένα επίπεδα MePB σε περιπτώσεις συχνής χρήσης κρέμας χεριών και αρώματος, αυξημένα επίπεδα EtPB σε περιπτώσεις συχνής χρήσης κρέμας χεριών και σώματος, αποσμητικού, προϊόντων για τα μαλλιά και αρώματος και αυξημένα επίπεδα TCS σε περιπτώσεις συχνής χρήσης σαπουνιού για τα χέρια και σαμπουάν. Αν και στη βιβλιογραφία δεν αναφέρεται τέτοιου είδους συσχέτιση, στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις του MePB στα δείγματα τρίχας μεταξύ των εγκύων που χρησιμοποιούσαν προϊόντα για τα μαλλιά (σπρέι/γέλη) καθημερινά ή εβδομαδιαία και εκείνων που χρησιμοποιούσαν σπάνια ή ποτέ, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (p=0,036) (Πίνακας 3.11).

Βιβλιογραφικά δεν υπάρχει συσχέτιση αντηλιακών και PBs, ωστόσο στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα του EtPB στα δείγματα τρίχας μεταξύ των γυναικών που χρησιμοποιούσαν αντηλιακά καθημερινά ή εβδομαδιαία και εκείνων που χρησιμοποιούσαν σπάνια ή ποτέ, πριν την εγκυμοσύνη (p=0,033). Παράλληλα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα του BuPB στα δείγματα τρίχας μεταξύ των γυναικών που χρησιμοποιούσαν αντηλιακά καθημερινά ή εβδομαδιαία και εκείνων που χρησιμοποιούσαν σπάνια ή ποτέ, πριν και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (p=0,041 & 0,024 πριν και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, αντίστοιχα).

Ωστόσο δεν υπήρξε άλλου είδους συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων PBs και TCS και της χρήσης προϊόντων προσωπικής φροντίδας και υγιεινής. Φαίνεται λοιπόν ότι δεν υπάρχει ταύτιση των αποτελεσμάτων με τη βιβλιογραφία αλλά ούτε και ταύτιση των δεδομένων της βιβλιογραφίας μεταξύ τους γεγονός το οποίο αποδίδεται στις διαφορές στην συχνότητα χρήσης των προϊόντων από τα άτομα που συμπεριλαμβάνονται στην εκάστοτε μελέτη αλλά

και στα διαφορετικά προϊόντα που χρησιμοποιούν (διαφορετική περιεκτικότητα σε PBs και TCS).

Η συσχέτιση των επιπέδων PBs και TCS στα δείγματα τρίχας των εγκύων με τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά των βρεφών έδειξε υπαρκτή αλλά ασθενή συσχέτιση των επιπέδων BePB και του ύψους των βρεφών (rs=0,664, p=0,026) (Πίνακας 3.14, Διάγραμμα 3.10). Η συσχέτιση των επιπέδων BePB με το ύψος των βρεφών είναι σε συμφωνία με παρόμοια αναφορά στη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, σε μελέτη που διεξήχθη στην Κίνα σε 436 παιδιά ηλικίας 3 ετών, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση των επιπέδων EtPB με το βάρος και το ύψος των παιδιών (p=0,01) αλλά και του συνόλου των PBs (MePB, EtPB, PrPB, BuPB, BePB) με το ύψος των παιδιών (p=0,02) (Guo et al., 2017). Τέλος, από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων του TCS με την εμφάνιση ή μη προβλημάτων υγείας (αλλεργίες και αναπνευστικά προβλήματα) στα βρέφη (p=0,004). Αν και στη βιβλιογραφία υπάρχουν έρευνες που υποστηρίζουν την επιδείνωση ή αύξηση της ευαισθησίας των παιδιών σε προϋπάρχουσες αλλεργίες που σχετίζονται με το περιβάλλον και το φαγητό (Lee-Sarwar et al., 2017), δεν υπάρχει συσχέτιση των αλλεργιών με την προγεννητική έκθεση.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

Abbas S, Greige-Gerges H, Karam N, Piet M-H, Netter P, Magdalou J. Metabolism of Parabens (4-Hydroxybenzoic Acid Esters) by Hepatic Esterases and UDP-Glucuronosyltransferases in Man. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2010;25(6):568-577.

Albero B, Pérez, RA, Sánchez-Brunete C., Tadeo JL. Occurrence and analysis of parabens in municipal sewage sludge from wastewater treatment plants in Madrid (Spain). *Journal of Hazardous Materials.* 2012; 239–240: 48–55.

Aubert N, Ameller T, Legrand JJ. Systemic exposure to parabens: Pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [14C]-methyl-, propyl- and butyl paraben in rats after oral, topical or subcutaneous administration. *Food and Chemical Toxicology*.2012; 50:445-454.

Barr L, Metaxas G, Harbach CA, Savoy LA, Darbre PD. Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum. *Journal of Applied Toxicology*. 2012; 32:219-232.

Bedoux G, Roig B, Thomas O, Dupont V, Le Bot B. Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosanand by-products in the environment.Environmental Science and Pollution Research International. 2012; 19(4):1044-1065.

Bertelsen RJ, Longnecker MP, Løvik M, Calafat AM, Carlsen K-H, London SJ,LødrupCarlsen KC. Triclosan exposure and allergic sensitization in Norwegian children. *Allergy*. 2013; 68(1):84-91.

Bhargava HN, Leonard PA. Triclosan: Applications and safety. *American Journal of Infection Control*. 1996; 24(3):209-218.

Biologydictionary.net Editors. “Amniotic fluid”. [online] 2014. Available: https://biologydictionary.net/amniotic-fluid/#prettyPhoto**.** (Accessed November 4, 2014).

Błędzka D, Gromadzińska J, Wąsowicz W. Parabens. From environmental studies to human health. *Enviornment International*. 2014; 67:27-42.

Boberg J, Taxvig C, Christiansen S, Hass U. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reproductive Toxicology*. 2010; 30(2):301-312.

Byford JR, Shaw LE, Drew MG, Pope GS, Sauer MJ, Darbre PD. Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2002; 80(1):49–60.

Canosa P, Morales S, Rodríguez I, Rubí E, Cela R, Gómez M. Aquatic degradation of triclosanand formation of toxic chlorophenols in presence of low concentrations of free chlorine.*Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2005; 383(7-8):1119-1126.

Canosa P, Rodríguez I, RubíE, Negreira N, Cela R. Formation of halogenated by-products of parabens in chlorinated water. *Analytica Chimica Acta*. 2006; 575:106–13.

Canosa P, Pérez-Palacios D, Garrido-López A, Tena MT, Rodríguez I, Rubí E, Cela R. Pressurized liquid extraction with in-cell clean-up followed by gas chromatography–tandem mass spectrometry for the selective determination of parabens and triclosan in indoor dust. *Journal of Chromatography A*. 2007; 1161:105–12.

Chen J, Ahn KC, Gee NA, Gee SJ, Hammock BD, Lasley BL. Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2007; 221:278–84.

Clegg ED, Perreault D, Klinefelter GR. Assessment of male reproductive toxicity. In: *Principles and Methods of Toxicology*.Hayes AW, editor. Philadelphia: Taylor & Francis. 2001; 1263–3000.

Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Final amended report on the safety assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in cosmetic products. *International Journal of Toxicology*. 2008; 27 Suppl 4:1-82.

Darbre PD, Byford JR, Shaw LE, Hall S, Coldham NG, Pope GS, Sauer MJ. Oestrogenic activity of benzylparaben. *Journal of Applied Toxicology*. 2003; 23(1):43–51.

Darbre.DP, Harvey WP. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *Journal of Applied Toxicology*. 2008; 28: 561–578.

Deza G,Giménez-Arnau AM. Allergic contact dermatitis in preservatives: current standing and future options. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2017; 17(4):263-268.

Dodge LE, Kelley KE, Williams PL, Michelle A. Williams, Hernández-Díaz S, Missmer AS, Hauser R. Medications as a source of paraben exposure. *Reproductive Toxicology*. 2015; 52(617):93-100.

Elder, R. Final report on the safety of methylparaben, propylparaben, butylparaben, and ethylparaben. *Journal of the American College of Toxicology*. 1984; 3(5): 147–209.

Elder, R. Final report on the safety of benzylparaben. *Journal of the American College of Toxicology*. 1986; 5(5):301–307.

Engeli RT, Rohrer SR, Vuorinen A, Herdlinge S, Kaserer T, Leugger S, Schuster D, OdermattA. Interference of paraben compounds with estrogen metabolism by inhibition of 17β-hydroxysteroid dehydrogenases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(9).pii: E2007.

European Commission. 2010. Council Directive 76/768/EEC of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. Annex VI: List of preservatives which cosmetic products may contain.

European Food Safety Authority.Scientific Opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors: Scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods for assessing effects mediated by these substances on human health and the environment, 2013;11(3):3132 [84 pp.].

Federally Registered Pesticides. 2nd ed. Port Huron (MI): North American Compendiums, Inc; 1993.

Field JA, Sierra-Alvarez R. Microbial degradation of chlorinated dioxins. *Chemosphere*. 2008a; 71:1015-1018.

Field JA, Sierra-Alvarez R. Microbial degradation of chlorinated benzenes. *Biodegradation*. 2008b; 19:463-48

Flanagan RJ, Taylor A, Watson ID, Whelpton R. *Fundamentals of Analytical Toxicology*. John Wiley & Sons Ltd. England. 2007.

Gee RH, Charles A, Taylor N, Darbre PD. Oestrogenic and androgenic activity of triclosan in breast cancer cells. *Journal of Applied Toxicology*. 2008; 28:78–91.

Gerhardus Johannes Lourens, The Dow Chemical Company assignee. Process for producing diphenylethers and esters. WO1999010310A1. March 04, 1999.

Giulivo M, Lopez de Alda M, Capri E, Barceló D. Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environmental Research*. 2016; 151:251-264.

Guo J, Wu C, Lu D, Jiang S, Liang W, Chang X, Xu H, Wang G, Zhou Z. Urinary paraben concentrations and their associations with anthropometric measures of children aged 3 years. *Environmental Pollution*. 2017; 222:307-314.

Handa O, Kokura S, Adachi S, Takagi T, Naito Y, Tanigawa T, Yoshida N, Yoshikawa T. Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes. *Toxicology*. 2006; 227:62–72.

Harris DC. Quantitative Chemical Analysis. W.H. Freeman and Company. USA. 2007. Μεταφρ. Χανιωτάκης Ν. Φουσκάκη Μ. Ηράκλειο. Ελλάδα. 2010.

Heath R.J, Rubin JR, Holland DR, Zhang E, Snow ME, Rock CO. Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty aci*d* synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*.1999; 274:11110–11114.

Honda M, Robinson M, Kannan K. Parabens in human urine from several Asian countries, Greece, and the United States. *Chemosphere*. 2018; 201:13-19.

Hu P, Chen X, Whitener RJ, Boder ET, Jones JO, Porollo A, Chen J, Zhao L. Effects of parabens on adipocyte differentiation. *Toxicological Sciences*. 2013; 131(1): 56–70.

Ishiwatari S, Suzuki T, Hitomi T, Yoshinl S, Matsukuma S, Tsuji T. Effects of methyl paraben on skin keratinocytes. *Journal of Applied Toxicology*. 2007; 27:1–9.

James MO, Li W, Summerlot DP, Rowland-Faux L, Wood CE. Triclosan is a potent inhibitor of estradiol and estrone sulfonation in sheep placenta. *Environment International*. 2010; 36:942–949.

Jones RD, Jampani HB, Newman JL, Lee AS. Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *American Journal of Infection Control*. 2000; 28(2):184-196.

Juhász ML, Marmur ES. A review of selected chemical additives in cosmetic products. *Dermatology and Therapy*. 2014; 27: 317–322.

Jurewicz J, Radwan M, Wielgomas B, PawełKałużny P,Klimowska A,Radwan P,Hanke W. Environmental levels of triclosan and male fertility. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018; 25(6):5484–5490.

Kang KS, Che JH, Ryu DY, Kim TW, Li GX, Lee YS. Decreased sperm number and motile activity on the F1 off- spring maternally exposed to butyl p-hydroxybenzoic acid (butyl paraben). *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2002; 64(3):227–235.

Kang S, Kim S, Park J, Kim HJ, Lee J, Choi G, Kim S,Kim SY,Moon HB,Kim S,Kho YL,Choi K. Urinary paraben concentrations among pregnant women and their matching newborn infants of Korea, and the association with oxidative stress biomarkers. *Science of the Total Environment*. 2013; 461–462:214–21.

Kim S, Lee S, Shin C, et al. Urinary parabens and triclosan concentrations and associated exposure characteristics in a Korean population—A comparison between night-time and first-morning urine. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2018; In press.

Kirchhof MG, de Gannes GC. The health controversies of parabens. *Skin Therapy Letter*. 2013; 18:5–7.

Kumar V, Balomajumder C, Roy P. Disruption of LH-induced testosterone biosynthesis in testicular Leydig cells by triclosan: probable mechanism of action. *Toxicology*.2008; 250:124–31.

Lan Z,Hyung Kim T,Shun Bi K,Hui Chen X,Sik Kim H. Triclosan exhibits a tendency to accumulate in the epididymis and shows sperm toxicity in male Sprague-Dawley rats. *Environmental Toxicology*. 2015; 30(1):83-91.

Lee-Sarwar K, Hauser R, Calafat AM, Ye X, O'Connor GT, Sandel M, Bacharier LB, Zeiger RS, Laranjo N, Gold DR, Weiss ST, Litonjua AA, Savage JH. Prenatal and early-life triclosan and paraben exposure and allergic outcomes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017; In press.

Liao C., Chen L., Kannan K. Occurrence of parabens in foodstuffs from China and its implications for human dietary exposure. *Environment International*. 2013; 57–58: 68–74.

Liao C., Kannan K. Concentrations and composition profiles of parabens in currency bills and paper products including sanitary wipes. *Science of the Total Environment*. 2014; 475: 8–15.

Liao X, Raghavan GSV, Yaylayan VA. A novelway to prepare n-butylparaben under micro-wave. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2002; 43:45–8.

Lowdermilk DL, Perry SE, Cashion K. *Maternity Nursing*. Mosby Inc. USA. 2010.

Martín J, Möder M, Gaudl A, Alonso E, Reemtsma T. Multi-class method for biomonitoring of hair samples using gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015; 407(29):8725–8734.

Martín J, Santos JL, Aparicio I, Alonso E. Analytical method for biomonitoring of endocrine-disrupting compounds (bisphenol A, parabens, perfluoroalkyl compounds and a brominated flame retardant) in human hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2016; 945:95–101.

Masten SA. Butylparaben review of toxicological literature butylparaben [CAS no. 94-26- 8]. *Review of Toxicological Literature*. 2005;1–64.

Moss T, Howes D, Williams FM. Percutaneous penetration and dermal metabolism of triclosan (2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether). *Food and Chemical Toxicology*. 2000;38(4):361-370.

Núñez L, Tadeo JL, García-Valcárcel AI, Turiel E. Determination of parabens in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chormatography A*. 2008; 1214 (1–2): 178–182.

Official Journal of the European Union. Regulation (EC) No 358/2014 of the European Parliament and of the Council of 9April 2014 on cosmetic products. 2014;L 107:5–9.

Official Journal of the European Union. Regulation (EC) No 1004/2014 of the European Parliament and of the Council of 18September 2014 on cosmetic products. 2014;L 282:5–8.

Official Journal of the European Union. 2016. Commission Implementing Decision (EU) 2016/110not approving triclosan as an existing active substance for use in biocidal products for product-type 1. 2016; L21:86-87.

Oishi S. Effects of butylparaben on the male reproductive sys- tem in rats. *Toxicology and Industrial Health*.2001; 17(1):31–39.

Oishi S. Effects of butyl paraben on the male reproductive system in mice. *Archives of Toxicology*. 2002; 76(7):423–429

Okubo T, Yokoyama Y, Kano K, Kano I. ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER alpha and PR. *Food and Chemical Toxicology*.2001; 39(12):1225–1232.

Peng X, Yu Y, Tang C, Tan J, Huang Q, Wang Z. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. *Science of the Total Environment*. 2008; 397:158–66.

Philippat C, Wolff MS, Calafat AM, Ye X, Bausell R, Meadows M, Stone J, Slama R, Engel SM. Prenatal exposure to environmental phenols: Concentrations in amniotic fluid and variability in urinary concentrations during pregnancy. *Environmental Health Perspectives*. 2013; 121(10):1225-1231.

Prusakiewicz JJ, Harville HM, Zhang Y, Ackermann C, Voorman RL. Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: possible link to paraben estrogenic effects. *Toxicology*. 2007; 232:248‑256.

Ramaswamy BR, Kim, JW, Isobe T, Chang KH. Amano A, Miller TW, Siringan FP, Tanabe S. Determination of preservative and antimicrobial compounds in fish from Manila Bay, Philippines using ultra high performance liquid chromatography tandem mass

spectrometry, and assessment of human dietary exposure**.** *Journal of Hazardous Materials*. 2011; 192 (3): 1739–1745.

Rodricks J V., Swenberg JA, Borzelleca JF, Maronpot RR, Shipp AM. Triclosan: A critical review of the experimental data and development of margins of safety for consumer products. *Critical Reviews in Toxicology*. 2010; 40(5):422-484.

Russell AD. Whither triclosan? Journal of Antimicrobial Chemotherapy.2004; 53: 693–695.

Sabalitschka T. Application of ethyl p-hydroxybenzoate in maintenance of sterility, in sterilization and in disinfection.*Archives of Pharmacy*. 1930; 268:653-673.

Sakhi AK, Sabaredzovic A, Papadopoulou E, Cequier E, Thomsen C. Levels, variability and determinants of environmental phenols in pairs of Norwegian mothers and children. *Environment International*. 2018; 114:242-251.

Samanidou VF. The challenges in hair analysis from the perspective of an analytical chemist. *Journal of Applied Bioanalysis*. 2016; 2(4):103-107.

Satoh K, Nonaka R, Ohyama K, Nagai K. Androgenic and antiandrogenic effects of alkylphenols and parabens assessed using the reporter gene assay with stably transfected CHO-K1 cells (AR-Eco-Screen system). *Journal of Health Sciences*. 2005; 51:557–68.

Savage JH, Matsui EC, Wood RA, Keet CA. Urinary levels of triclosan and parabens are associated with aeroallergen and food sensitization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012; 130:453–60.

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). Opinion on parabens. 2010a**;** 1–36.

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). Opinion on triclosan–Antimicrobial resistance. SCCP/1251/09. 2010b.

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). Clarification on opinion SCCS/1348/10 in the light of the Danish clause of safeguard banning the use of parabens in cosmetic products intended for children under three years of age. 2011**;** 1–51.

Shekhar S, Sood S, Showkat S, Lite C, Chandrasekhar A, Vairamani M, Barathi S, Santosh W. Detection of phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) from maternal blood

plasma and amniotic fluid in Indian population. *General and Comparative Endocrinology*. 2016; 241:100-107.

Soni, MG, Garabin, IG, Burdock, GA. Safety assessment of ester of p-hydroxybenzoic acid (parabens).*Food and Chemical Toxicology*.2005; 43:985-1015.

Tayama S, Nakagawa Y, Tayama K. Genotoxic effects of environmental estrogen-like compounds in CHO-K1 cells. *Mutation Research*. 2008; 649: 114–125.

Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *The Lancet*.2005; 365:687–701.

Tong MH, Jiang H, Liu P, Lawson JA, Brass LF, Song WC. Spontaneous fetal loss caused by placental thrombosis in estrogen sulfotransferase [mdash] deficient mice. *NatureMedicine*.2005; 11(2):153–159.

US Environmental Protection Agency (EPA). 2008a. Cancer assessment document: evaluation of the carcinogenic potential of triclosan. Final, January 4, 2008. Washington (DC): US Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances.

US Environmental Protection Agency (EPA). 2008b. 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol (triclosan): toxicology chapter for the reregistration eligibility decision (RED) document.

U.S. Food and Drug Administration(FDA) approves first toothpaste for gum disease. FDA Talk Paper. July 14, 1997.

U.S. Food and Drug Administration. 2008. Nomination Profile Triclosan [CAS 3380-34-5], Supporting Information for Toxicological Evaluation by the National Toxicology Program.

Vo TTB, Yoo YM, Choi KC, Jeung EB. Potential estrogenic effect(s) of parabens at the pre-pubertal stage of a postnatal female rat model. *Reproductive Toxicology*. 2010; 29:306–16.

WebMD. “Hair Loss:The Science of Hair”. [online] 2010. Available: https://www.webmd.com/skin-problems-and-treatments/hair-loss/science-hair#2-5. (Accessed March 1, 2010).

Witorsch RJ. Critical analysis of endocrine disruptive activity of triclosan and its relevance to human exposure through the use of personal care products. *Critical Reviews in Toxicology*. 2014; 44(6):535-555.

Wróbel A, Gregoraszczuk EL. Effects of single and repeated in vitro exposure of three forms of parabens, methyl-, butyl- and propylparabens on the proliferation and estradiol secretion in MCF-7 and MCF-10A cells. *Pharmacological Reports*. 2013; 65:484-493.

Zhang Z, Sun L, Hu Y, Jiao J, Hu J. Inverse antagonist activities of parabens on human oestrogen-related receptor γ (ERRγ): in vitro and in silico studies. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2013; 270:16–22.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

I. Ερωτηματολόγια.

(Ερωτηματολόγιο Α)

Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τμήμα Ιατρικής
Τομέας Μορφολογίας
Εργαστήριο Τοξικολογίας και Εγκληματολογικής Χημείας

Ερωτηματολόγιο Α Κωδικός:.....

(Συμπληρώνεται από τη μητέρα)

Στοιχεία Μητέρας

Ονοματεπώνυμο:.....

Τηλέφωνο επικοινωνίας: κινητό.....σταθερό.....

Όνομα υπεύθυνου γυναικολόγου:..... τηλέφωνο επικοινωνίας:.....

Τόπος κατοικίας : Αγροτική περιοχή [ ] Αστική περιοχή [ ]

Ηλικία:..... ετών

Ύψος:..... cm

Σωματικό βάρος πριν την εγκυμοσύνη..... κιλά και κατά την εγκυμοσύνη..... κιλά

Επίπεδο Μόρφωσης: Α/Βάθμια Εκπαίδευση [ ] Β/Βάθμια Εκπαίδευση [ ] Γ/Βάθμια Εκπαίδευση [ ]

Επάγγελμα: Δημόσιος Τομέας [ ] Ιδιωτικός Τομέας [ ]

Θέση εργασίας:.....

Γενικές Ερωτήσεις

1. Περιβάλλον

Ύπαρξη πλαστικής ταπετσαρίας τοίχου ή δαπέδου:
ναι, στο σπίτι [ ] ναι, στο χώρο εργασίας [ ] όχι [ ]
Χρήση αποσμητικού χώρου:
ναι, στο σπίτι [ ] ναι, στο χώρο εργασίας [ ] όχι [ ]

2. Χρήση νερού

Πηγή πόσιμου νερού στο σπίτι:
νερό δικτύου [ ] εμφιαλωμένο νερό [ ]
Παρουσία πλαστικών στο δίκτυο ύδρευσης του σπιτιού:
πλαστική δεξαμενή αποθήκευσης του νερού [ ]
πλαστικοί σωλήνες μεταφοράς του νερού [ ]
όχι [ ]

3. Χρήση προϊόντων καθαριότητας και προσωπικής φροντίδας

- Χρήση καθαριστικών τις τελευταίες 24 ώρες:

[ ] Υγρό σαπούνι
[ ] Υγρό απορρυπαντικό πιάτων
[ ] Μαλακτικό ρούχων
[ ] Απολυμαντικά
[ ] Υφάσματα με αντιμικροβιακή προστασία (επαγγελματικές στολές, μαξιλαροθήκες, σεντόνια)
[ ] Είδη καθαρισμού (σφουγγάρια κουζίνας, σκούπα, σφουγγαρίστρα, κτλ)

[1]

- Συχνότητα χρήσης καλλυντικών και προϊόντων περιποίησης πριν την εγκυμοσύνη:

	Καθημερινά	Εβδομαδιαία	Μηνιαία	Ποτέ
Αποσμητικό σώματος	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Αφρόλουτρο	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Σαμπουάν	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Άρωμα	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Προϊόντα μακιγιάζ	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Βερνίκι νυχιών	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Σπρέι/γέλη μαλλιών	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Κρέμα/λοσιόν σώματος	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Αντηλιακό	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Βαφές μαλλιών	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]

- Συχνότητα χρήσης καλλυντικών και προϊόντων περιποίησης μετά την εγκυμοσύνη:

	Καθημερινά	Εβδομαδιαία	Μηνιαία	Ποτέ
Αποσμητικό σώματος	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Αφρόλουτρο	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Σαμπουάν	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Άρωμα	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Προϊόντα μακιγιάζ	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Βερνίκι νυχιών	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Σπρέι/γέλη μαλλιών	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Κρέμα/λοσιόν σώματος	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Αντηλιακό	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
Βαφές μαλλιών	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]

4. Διατροφικές συνήθειες

- Αποθήκευση τροφίμων σε πλαστικά σκεύη:

Καθημερινά [ ] συχνά [ ] σπάνια [ ] ποτέ [ ]

- Χρήση πλαστικής μεμβράνης περιτύλιξης τροφίμων:

καθημερινά [ ] συχνά [ ] σπάνια [ ] ποτέ [ ]

- Χρήση αλουμινόχαρτου:

καθημερινά [ ] συχνά [ ] σπάνια [ ] ποτέ [ ]

- Κατανάλωση συσκευασμένων τροφίμων:

καθημερινά [ ] συχνά [ ] σπάνια [ ] ποτέ [ ]

Συσκευασία: πλαστικό [ ] αλουμίνιο [ ] χαρτί [ ] άλλο.....

- Κατανάλωση αναψυκτικών:

καθημερινά [ ] συχνά [ ] σπάνια [ ] ποτέ [ ]

Συσκευασία: πλαστικό [ ] αλουμίνιο [ ] χαρτί [ ] άλλο.....

- Κατανάλωση συσκευασμένων χυμών:

καθημερινά [ ] συχνά [ ] σπάνια [ ] ποτέ [ ]

Συσκευασία: πλαστικό [ ] αλουμίνιο [ ] χαρτί [ ] άλλο.....

- Κατανάλωση snak (πατατάκια, γαριδάκια,κτλ):

καθημερινά [ ] συχνά [ ] σπάνια [ ] ποτέ [ ]

Χρήση αντικολλητικών μαγειρικών σκευών: ναι [ ] όχι [ ]

[2]

- Συχνότητα κατανάλωσης:

Κόκκινου κρέατος..... φορές ανά εβδομάδα (βοδινό, χοιρινό, αρνί, κατσίκι)
Λαχανικών..... φορές ανά εβδομάδα
Πουλερικών..... φορές ανά εβδομάδα
Γαλακτοκομικών προϊόντων..... φορές ανά εβδομάδα
Ψάρι..... φορές ανά εβδομάδα

- Κάπνισμα πριν την κύηση: ποτέ [ ] σπάνια [ ] συστηματικά [ ] Έτη καπνίσματος:.....
- Κάπνισμα κατά την κύηση: ποτέ [ ] σπάνια [ ] συστηματικά [ ]
- Κατανάλωση οινοπνεύματος κατά την κύηση: ποτέ [ ] σπάνια [ ] συστηματικά [ ]
- Λήψη φαρμάκων τις τελευταίες 24 ώρες:
  με τη μορφή κάψουλας: ναι [ ] όχι [ ]
  με τη μορφή δισκίων: ναι [ ] όχι [ ]

[3]

(Ερωτηματολόγιο Β)

Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τμήμα Ιατρικής
Τομέας Μορφολογίας
Εργαστήριο Τοξικολογίας και Εγκληματολογικής Χημείας

Ερωτηματολόγιο Β

(Συμπληρώνεται από την μητέρα)

1. Κωδικός:……
2. Ημερομηνία Δειγματοληψίας: …./…./……..

Ιατρικό Ιστορικό Μητέρας

Χρόνιες ασθένειες: ναι [ ] όχι [ ] Αν ναι, ποιες;……

Αναπνευστικά προβλήματα: ναι [ ] όχι [ ] Αν ναι, ποια;……

Αλλεργικά συμπτώματα: ναι [ ] όχι [ ] Αν ναι, ποια;……

Λήψη φαρμάκων προ της κύησης: ναι [ ] όχι [ ] Αν ναι, ποια;……

Γυναικολογικό πρόβλημα: ναι [ ] όχι [ ] Αν ναι τι πρόβλημα;……

Γυναικολογική επέμβαση: ναι [ ] όχι [ ] Αν ναι, για ποιο λόγο……

Μαιευτικό Ιστορικό

Αριθμός φυσιολογικών τοκετών:……..

Καισαρική τομή: ναι [ ] όχι [ ] Αν ναι, αιτία καισαρικής:……

Προβλήματα σε προηγούμενη κύηση: ναι [ ] όχι [ ] Αν ναι, ποια;……

Αποβολές: ναι [ ] όχι [ ]

Αν ναι, σε ποια εβδομάδα κύησης……..και ποια η αιτία της αποβολής: ……

Γέννηση νεκρού παιδιού: ναι [ ] όχι [ ]

Προβλήματα υγείας προηγούμενων παιδιών: ναι [ ] όχι [ ] Αν ναι, ποια;……

Παρούσα Κύηση

Αιτία αμνιοπαρακέντησης:……

Αποτέλεσμα αμνιοπαρακέντησης:……

Εβδομάδα κύησης:……

Δίδυμος κύηση: ναι [ ] όχι [ ]

Εξωσωματική γονιμοποίηση: ναι [ ] όχι [ ]

Προβλήματα στην παρούσα κύηση: ναι [ ] όχι [ ] Αν ναι, ποια;……

Νοσηλεία κατά τη διάρκεια της κύησης: ναι [ ] όχι [ ]

Φάρμακα κατά τη διάρκεια της κύησης: ναι [ ] όχι [ ] Αν ναι, ποια;……

Δείγματα που ελήφθησαν: Ούρα [ ] Αμνιακό υγρό [ ] Τρίχες [ ] Αίμα [ ]

[1]

(Ερωτηματολόγιο Γ)

ΠανεπιστήμιοΚρήτης
Τμήμα Ιατρικής
Τομέας Μορφολογίας
Εργαστήριο Τοξικολογίας και Εγκληματολογικής Χημείας

Ερωτηματολόγιο Γ

(Συμπληρώνεται τηλεφωνικά)

Κωδικός..:.....

Μετέπειτα Εξέλιξη Κύησης- Τοκετός

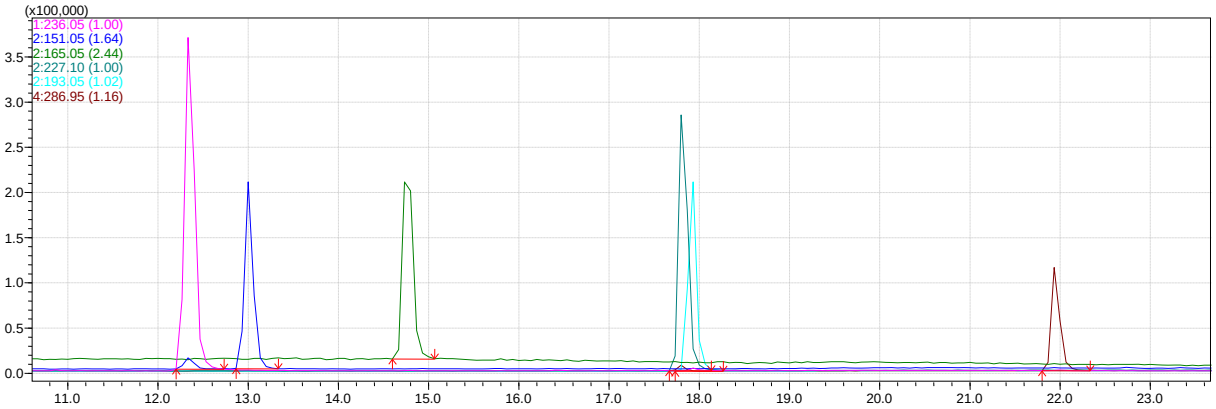
Προβλήματα από την αμνιοπαρακέντηση έως το τέλος της κύησης: ναι [ ] όχι [ ]
Αν ναι, ποια;.....
Ημερομηνία τοκετού: .../.../.....
Πρόωρος τοκετός: ναι [ ] όχι [ ] Εβδομάδα κύησης:.....
Είδος τοκετού:Φυσιολογικός Τοκετός [ ] Καισαρική τομή [ ]

Στοιχεία νεογνού

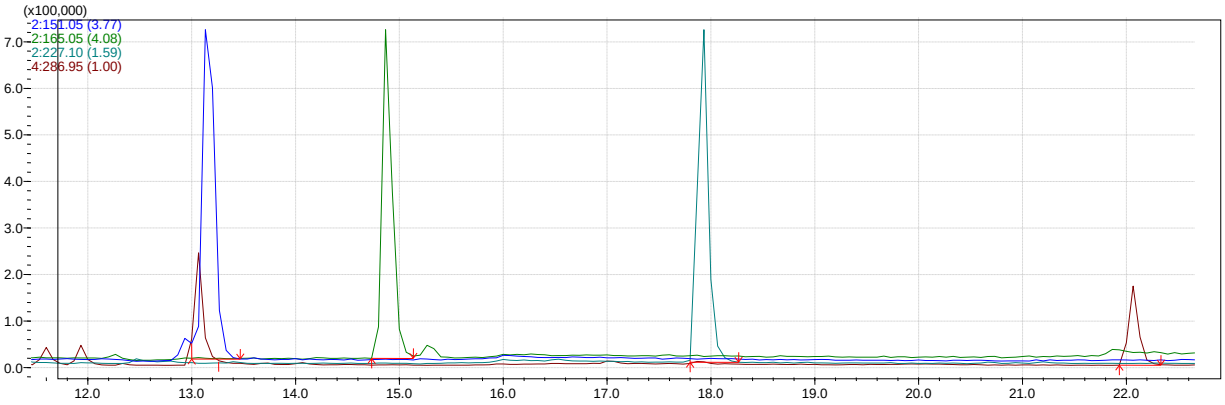
Φύλο: άρρεν [ ] θήλυ [ ]
Βάρος: ..... gr
Ύψος:.....cm
Περίμετρος κεφαλής: ..... cm
Δυσμορφίες γεννητικών οργάνων: ναι [ ] όχι [ ]
Αναπνευστικά προβλήματα: ναι [ ] όχι [ ]Αν ναι, ποια;.....
Αλλεργικά συμπτώματα: ναι [ ] όχι [ ]Αν ναι, ποια;.....
Άλλα προβλήματα υγείας:.....
.....

[1]

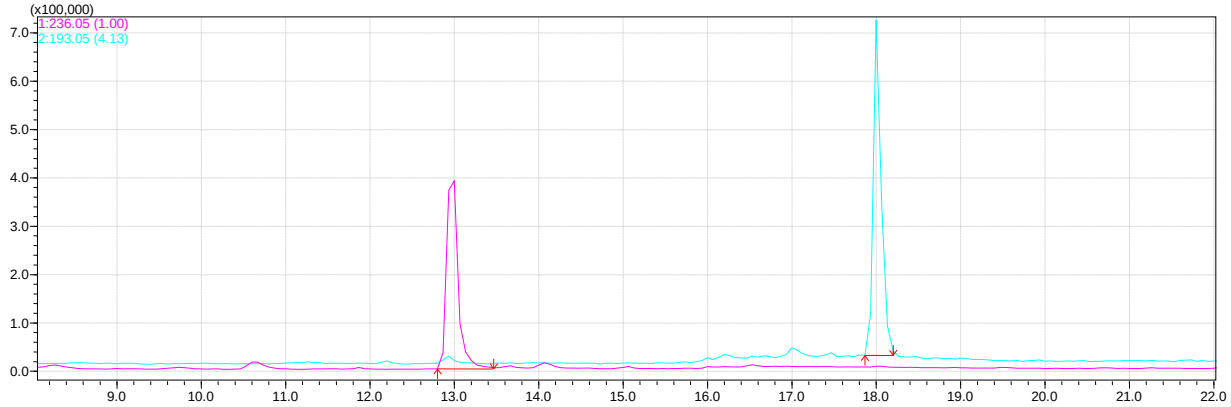
II. **Παραδείγματα χρωματογραφημάτων.**



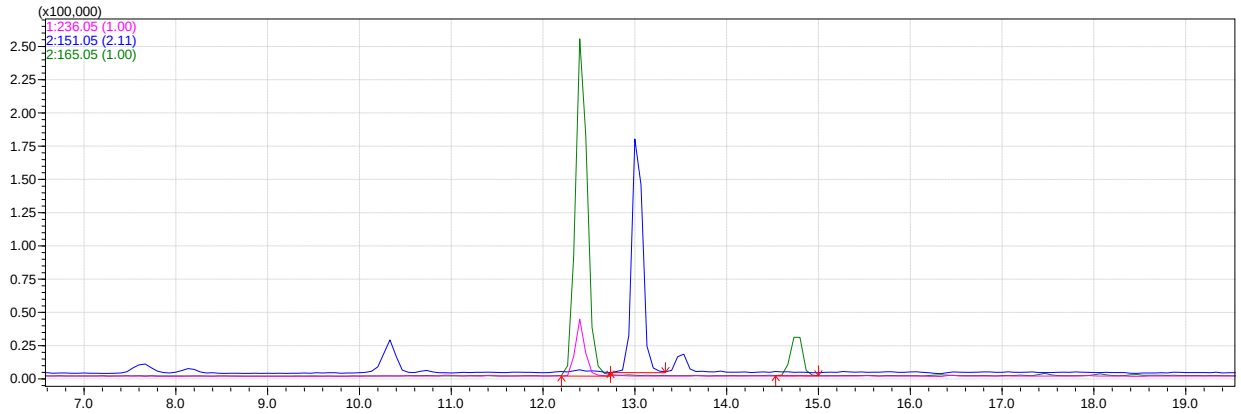
Χρωματογράφημα 1. Πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 250 ng/ml. (Rt = 12,33 min για το IS, 13,0 min για το MePB, 14,73 min για το EtPB, 17,8 min για το BuPB, 17,93 min για το BePB, 21,9 min για το TCS)



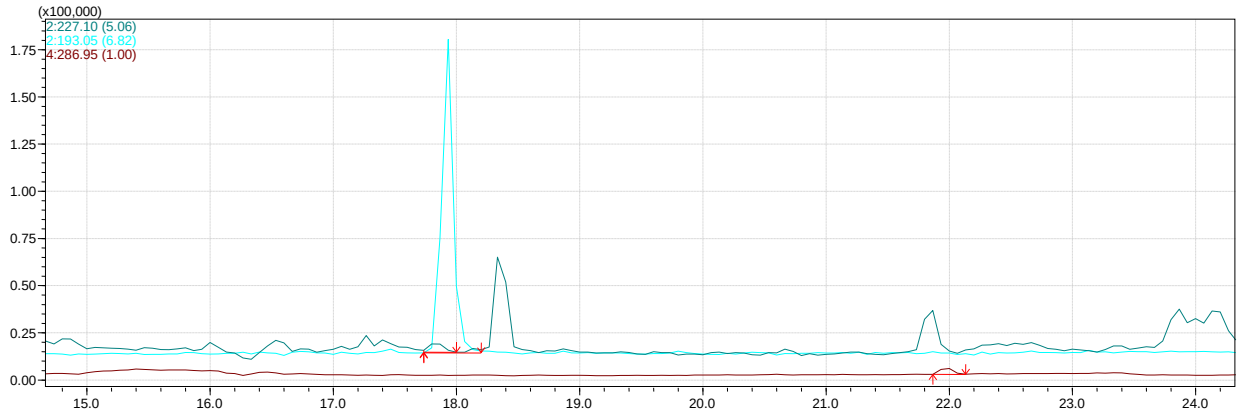
Χρωματογράφημα 2. Επιμολυσμένο δείγμα αμνιακού υγρού συγκέντρωσης 100 ng/ml. (Rt = 13,13 min για το MePB, 14,87 min για το EtPB, 17,9 min για το BuPB, 22,07 min για το TCS)



Χρωματογράφημα 3. Επιμολυσμένο δείγμα αμνιακού υγρού συγκέντρωσης 100 ng/ml. (Rt = 13,0 min για το IS, 18,0 min για το BePB)



Χρωματογράφημα 4. Δείγμα τρίχας. (Rt = 12,33 min για το IS, 13,0 min για το MePB, 14,7 min για το EtPB)



Χρωματογράφημα 5. Δείγμα τρίχας. (Rt = 17,8 min για το BuPB, 17,93 min για το BePB, 21,9 min για το TCS)