



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ –
ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑ –
ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Διευθυντής ΠΜΣ : Καθηγητής ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Εκτίμηση και επίδραση των endocrine disruptors στους
γαμέτες»

ΣΠΥΡΙΔΟΥΛΑ ΧΑΝΤΖΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

ΛΑΡΙΣΑ
Οκτώβριος 2019

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)**

Γεώργιος-Σπυρίδων Ανυφαντής
Επίκουρος Καθηγητής Εμβρυολογίας Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής

Αλέξανδρος Δαπόντε
Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής

Χριστίνα Μεσσήνη
Λέκτορας Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ευκαιρία της ολοκλήρωσης αυτής της προσπάθειας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Κύριο Δαπόντε Αλέξανδρο για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω σε αυτό. Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον καθηγητή της διπλωματικής μου εργασίας Κύριο Ανυφαντή Γεώργιο-Σπυρίδων για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της παρούσας εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κυρία Μεσσήνη Χριστίνα για την παρακολούθηση καθώς και την εποπτεία της παρούσας εργασίας.

Είμαι επιπλέον ευγνώμων στον καθηγητή κύριο Ανάργυρο Μουλά και την ομάδα του που υποστήριξαν την παρούσα εργασία στο εργαστήριο Χημείας του Τεχνολογικού και Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Λάρισας και αφιέρωσαν χρόνο και προσπάθεια για τη διεξαγωγή αυτής της μελέτης, αλλά κυρίως στην Κυρία Μαρία Βάιου για την πλήρη υποστήριξη και τις συμβουλές της.

Πριν κλείσω, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του Μεταπτυχιακού Προγράμματος για όσα έμαθα κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Σπυριδούλα Χαντζή

**«Εκτίμηση και επίδραση των endocrine disruptors στους
γαμέτες»**

ΣΠΥΡΙΔΟΥΛΑ ΧΑΝΤΖΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, 2019

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Επιβλέπων:** **Γεώργιος-Σπυρίδων Ανυφαντής**
Επίκουρος Καθηγητής Εμβρυολογίας Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας
- Σύμβουλος :** **Αλέξανδρος Δαπόντε**
Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας
- Μέλος :** **Χριστίνα Μεσσήνη**
Λέκτορας Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	Σελίδα
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1. Ενδοκρινικό σύστημα	12
2. Ενδοκρινικοί διαταράκτες (endocrine disruptors, EDCs)	15
2.1 Ορισμοί EDCs	17
2.2 Προέλευση των ενδοκρινικών διαταρακτών	18
2.3 Μηχανισμοί δράσης των ενδοκρινικών διαταρακτών	19
2.4 Επιδράσεις των ενδοκρινικών διαταρακτών στην αναπαραγωγική λειτουργία	21
3. Η δισφαινόλη Α (Bisphenol A, BPA)	24
4. Χρωματογραφία	26
4.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)	27
4.2 Οργανολογία HPLC	28
ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	34
ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ	34
1. Ασθενείς	34
2. Συλλογή-εκτίμηση ωαρίων και λήψη-κατάψυξη ωοθυλακικού υγρού	34
3. Συλλογή-εκτίμηση σπερματοζωαρίων και λήψη- κατάψυξη σπερματικού πλάσματος	35
4. Αντιδραστήρια για εκχύλιση και HPLC-FL	36
5. Οργανολογία HPLC-UV/FLD	36
6. Συνθήκες της HPLC-UV/FLD	37
7. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης	38

8. Απομόνωση της ΒΡΑ σε δείγματα σπερματικού πλάσματος και ωοθυλακικού υγρού	38
9. Επεξεργασία αποτελεσμάτων	39
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	41
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ	49
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αυξημένη παγκόσμια βιομηχανική δραστηριότητα έχει εκθέσει τον άνθρωπο σε μια μεγάλη ποικιλία χημικών ουσιών, μερικές από τις οποίες, που ονομάζονται «ενδοκρινικοί διαταράκτες», μπορούν να διαταράξουν το ενδοκρινικό σύστημα στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι χημικές ουσίες που προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές (EDCs) περιλαμβάνουν μια ομάδα χημικών ενώσεων που έχουν εξεταστεί εκτενώς λόγω των πιθανών επιβλαβών επιδράσεων στην υγεία των ανθρώπων. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στις βλαβερές συνέπειες των EDCs στο αναπαραγωγικό σύστημα. Η δισφαινόλη Α (BPA) είναι ένας από τους ενδοκρινικούς διαταράκτες που σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία φαίνεται να έχει αρνητική επίδραση στο αναπαραγωγικό σύστημα του ανθρώπου. Έτσι έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια αναλυτικές μέθοδοι για την ποσοτικοποίηση των EDCs σε ανθρώπινα βιολογικά υγρά με σκοπό την διερεύνηση και την άμεση ενημέρωση σχετικά με τον κίνδυνο για την υγεία που συνδέεται με την έκθεση σε αυτές τις ενώσεις. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) εφαρμόζεται συχνά στη μέτρηση σχετικά πολικών EDCs, για παράδειγμα μεταβολιτών της δισφαινόλης Α, του φυτοοιστρογόνου και του φθαλικού άλατος σε ανθρώπινα βιολογικά δείγματα. Για την ανίχνευση των EDCs με HPLC, χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι ανίχνευσης όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, ο φθορισμός, η ηλεκτροχημική ανίχνευση και η φασματομετρία μάζας. Αυτές οι μέθοδοι ανίχνευσης επιλέγονται κατάλληλα λαμβάνοντας υπόψη την ευαισθησία και την εκλεκτικότητά τους και τα χαρακτηριστικά των αναλυόμενων ουσιών.

Στην παρούσα μελέτη λήφθηκαν δείγματα ωοθυλακικού υγρού και πλάσματος σπέρματος από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής στη Πανεπιστημιακή Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Εκτιμήθηκε η ποσότητα της δισφαινόλης Α τόσο σε δείγματα των αντρών όσο και των γυναικών με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης και ανιχνευτή φθορισμού (HPLC-FLD). Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν έγινε στατιστική

ανάλυση για την επίδραση της δισφαινόλης Α στους θηλυκούς γαμέτες, καθώς σε κανένα δείγμα πλάσματος σπέρματος δεν ανιχνεύτηκε ΒΡΑ. Από τη στατιστική ανάλυση δεν προέκυψε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση της δισφαινόλης Α με τις παραμέτρους που εξετάστηκαν. Πιθανές αιτίες για τα αποτελέσματα αυτά είναι τόσο ο μικρός αριθμός δειγμάτων που δεν επιτρέπει να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα, όσο και η ευαισθησία της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε.

Λέξεις κλειδιά: ενδοκρινικός διαταράκτης, δισφαινόλη Α, Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης, ωοθυλακικό υγρό, πλάσμα σπέρματος

ABSTRACT

Increased worldwide industrial activity has exposed humans to a wide variety of chemicals, some of which, termed 'endocrine disruptors', can disrupt the endocrine system in the body. Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) include a group of chemicals that have been extensively tested for their potential harmful effects on human's system health. During the last decades, particular attention has been paid to the harmful effects of EDC on the reproductive system. Bisphenol A (BPA) is one of the endocrine disruptors that, according to existing bibliography, appears to have a negative effect on the human reproductive system. Thus, in recent years, analytical methods have been developed to quantify EDCs in human biological fluids for the purpose of investigating and immediately informing on the health risk associated with exposure to these compounds. High-performance liquid chromatography (HPLC) is often applied to the measurement of relatively polar EDCs, for example metabolites of bisphenol A, plant estrogens and phthalate in human biological samples. For the detection of EDCs by HPLC, various detection methods such as UV, fluorescence, electrochemical detection and mass spectrometry are used. These detection methods are appropriately selected taking into account their sensitivity and selectivity and the characteristics of the analyzed substances.

In the present study, follicular fluid and sperm plasma samples were taken from assisted reproduction therapy patients at the University Hospital of Larisa, Greece. The amount of bisphenol A in both male and female samples was estimated using High Pressure Liquid Chromatography and Fluorescence Detector (HPLC-FLD). The results obtained were statistically analyzed for the effect of bisphenol A on female gametes, as no BPA was detected in any sperm plasma samples. Statistical analysis did not show any statistically significant correlation of bisphenol A with the parameters examined. Possible causes for these results are both the small number of samples that does not allow us to make safe conclusions as though the sensitivity of the method used.

Key words: endocrine disruptor, bisphenol A, follicular fluid, sperm plasma, High Pressure Liquid Chromatography and Fluorescence Detector (HPLC-FLD)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες (EDCs) είναι εξωγενείς ουσίες που η χημική δομή τους ομοιάζει με εκείνη των φυσικών ορμονών του οργανισμού. Γι' αυτό μπορούν να τις «μιμηθούν» ανατρέποντας έτσι την φυσιολογική - ομαλή λειτουργία τους. Ενδοκρινική διατάραξη μπορεί να προκληθεί από μεμονωμένες ουσίες ή μίγματά τους. Έχει διαπιστωθεί ότι οι ενδοκρινείς διαταράκτες επιδρούν στη σύνθεση, την έκκριση, τη μεταφορά, το μεταβολισμό, τη δράση και τον καταβολισμό των ορμονών, καθώς και στη σύνδεσή τους στις δεσμευτικές πρωτεΐνες. Έτσι μέσω της αλληλεπίδρασης με τα ενδογενή ορμονικά συστήματα μπορούν να επηρεάσουν και να αλλοιώσουν τη λειτουργία (-εις) του ορμονικού /ενδοκρινικού συστήματος με άμεση και πρωταρχική επίδραση στον προγραμματισμό της ανάπτυξης και ομαλής εξέλιξης του οργανισμού καθώς και της αναπαραγωγής. Οι επιδράσεις τους δεν περιορίζονται μόνο στον ίδιο τον οργανισμό αλλά μπορούν να επεκταθούν και στους απογόνους του. Καθοριστική για το είδος και τον βαθμό της επίδρασης των EDCs είναι η ηλικία και το στάδιο ανάπτυξης του οργανισμού όταν γίνεται η έκθεση. Αναπόφευκτα τα αρχικά στάδια της ζωής (δηλαδή το εμβρυακό-παιδικό) μέχρι και την ολοκλήρωση της εφηβείας είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα. Οι ενδοκρινείς διαταράκτες προκαλούν επιδράσεις ακόμα και όταν βρίσκονται σε απειροελάχιστες ποσότητες και ιδίως όταν κάποιος εκτίθεται σε πολλούς διαφορετικούς διαταράκτες ταυτόχρονα. Οι επιδράσεις αυξάνονται αν η έκθεση είναι συνεχής ή επαναλαμβανόμενη. Το πρόβλημα εντείνεται ακόμα περισσότερο γιατί με την έκθεση η επίδραση που προκαλείται δεν μπορεί άμεσα να διαπιστωθεί γιατί οι ενδοκρινείς διαταράκτες κυρίως αλλοιώνουν λειτουργίες του οργανισμού. Το αποτέλεσμα της επίδρασης μπορεί να διαπιστώνεται σταδιακά και πολύ αργότερα.

1.Ενδοκρινικό σύστημα

Οι πολυκύτταροι οργανισμοί διαθέτουν δυο συστήματα ελέγχου για το συντονισμό της λειτουργίας των κυττάρων τους. Τα συστήματα αυτά είναι το νευρικό και το ενδοκρινικό τα οποία λειτουργούν σαν ζευγάρι και ρυθμίζουν τις περισσότερες εσωτερικές λειτουργίες του οργανισμού.

- Το νευρικό σύστημα είναι ένα σύστημα ελέγχου με ταχεία δράση, το οποίο εκτελεί γρήγορο έλεγχο στέλνοντας ηλεκτρικά σήματα μέσω των νεύρων σε συγκεκριμένα όργανα και ιστούς.
- Το ενδοκρινικό σύστημα έχει βραχεία δράση καθώς είναι μια συλλογή μηνυματοφόρων μορίων, τις ορμόνες, που μεταφέρονται από το αίμα και μπορούν να καταλήξουν σε όλα τα σημεία του σώματος.

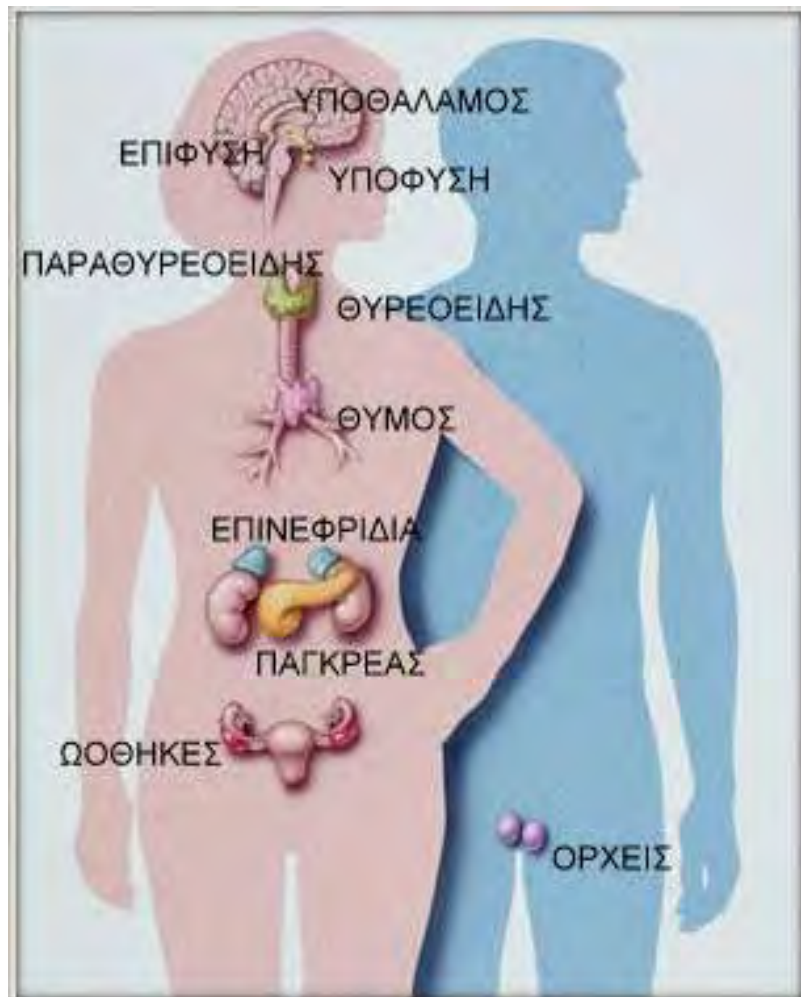
Το ενδοκρινικό σύστημα απαντάται σε όλα τα θηλαστικά, ψάρια, πτηνά και άλλα είδη οργανισμών. Αποτελείται από:

- Ενδοκρινείς αδένες, οι οποίοι εκκρίνουν ορμόνες στο εξωκυττάριο υγρό που περιβάλλει τα αδενικά κύτταρα, ως απόκριση σε συγκεκριμένα ερεθίσματα. Στη συνέχεια διαχέεται στο αίμα μέσω του οποίου στη ακολούθως μπορεί να μεταφερθεί σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος.
- Ορμόνες, μια μεγάλη κατηγορία χημικών μηνυματοφόρων μορίων οι οποίες εκκρίνονται από τους ενδοκρινείς αδένες και μεταφέρονται μέσω του αίματος στα κύτταρα πάνω στα οποία δρουν.
- Ορμονικοί υποδοχείς των κυττάρων-στόχων της ορμόνης, οι οποίοι αφού συνδεθούν με την ορμόνη ενεργοποιούνται και πυροδοτούν μια αλληλουχία γεγονότων που οδηγεί στην απάντηση του κυττάρου στο συγκεκριμένο μήνυμα.

Το ενδοκρινικό σύστημα διαφέρει από τα περισσότερα συστήματα οργάνων του σώματος αφού οι διάφοροι αδένες του δεν παρουσιάζουν ανατομική συνέχεια. Παρόλα αυτά οι αδένες αυτοί αποτελούν ένα κανονικό σύστημα, από λειτουργικής άποψης, ρυθμίζοντας όλες τις βιολογικές διεργασίες στο σώμα από τη σύλληψη και καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού. Στις λειτουργίες του, μεταξύ άλλων, περιλαμβάνονται η ανάπτυξη του εγκεφάλου και του νευρικού συστήματος, η ανάπτυξη και η

λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος, η ρύθμιση του μεταβολισμού κ.α.

Οι σημαντικότεροι ενδοκρινείς αδένες είναι ο υποθάλαμος, η υπόφυση, η επίφυση, ο θυρεοειδής και οι παραθυρεοειδείς, ο θύμος, τα επινεφρίδια. Διάφορα άλλα όργανα στο σώμα περιέχουν ενδοκρινή ιστό και είναι υπό τον έλεγχο της υπόφυσης αν και δεν είναι αποκλειστικά ενδοκρινείς αδένες, αυτά είναι το πάγκρεας, οι ωοθήκες, οι όρχις καθώς και τα νεφρά.



Εικόνα 1: Το ανθρώπινο ενδοκρινικό σύστημα σε άντρα και γυναίκα
(<http://momfatale.gr>)

Ορμόνες	Θέση Παραγωγής	Στόχος	Λειτουργία
Θυρεοτροπίνη (TSH)	Θυρεοειδής αδένας	Πρόσθιος λοβός υπόφυσης (Αδενούποφυση)	Ρύθμιση εκκρίσεων θυροειδούς (ορμόνες) που ελέγχουν την κατανάλωση οξυγόνου και τον μεταβολικό ρυθμό.
Αδρενοκορτικοτροπίνη (ACTH)	Αδενούποφυση	Φλοιός επινεφριδίων	Ρύθμιση των επινεφριδίων που παράγουν ορμόνες (αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη) οι οποίες επηρεάζουν την καρδιά, το αναπνευστικό και κυκλοφοριακό σύστημα, το άγχος.
Ωοθυλακιοτροπίνη (FSH)	Αδενούποφυση	Ωοθήκες, όρχις	Ρυθμίζει τον αναπαραγωγικό κύκλο στις γυναίκες (σε συνδυασμό με την LH) και την έκκριση ήθλικών γεννητικών ορμονών. Στα αρσενικά, οι δύο ορμόνες (FSH και LH) ρυθμίζουν την παραγωγή τεστοστερόνης κλπ
Ωχρινοτρόπος (LH)	Αδενούποφυση	Ωοθήκες, όρχις	Λειτουργεί σε συνδυασμό με την FSH.
Αυξητική ορμόνη (GH)	Αδενούποφυση	Πολλά μέρη	Ρυθμίζει την ανάπτυξη του σώματος στα παιδιά.
Προλακτίνη	Αδενούποφυση	Στήθος	Προωθεί την παραγωγή γάλακτος από τα στήθη.
Αντιδιουρητική ορμόνη (Βαζοπρεσίνη)	Υποθάλαμος, Νευροϋπόφυση	Νεφρά	Ρυθμίζει το ισοζύγιο υγρών του σώματος.
Ωκυτοκίνη	Υποθάλαμος, Νευροϋπόφυση	Γεννητικά όργανα γυναίκας	Βοηθά τη φυσιολογική γέννα

Εικόνα 2: Σημαντικές ορμόνες του ενδοκρινικού συστήματος, η θέση παραγωγής τους, τα όργανα-στόχοι και οι βασικές τους λειτουργίες.

Οι ορμόνες απελευθερώνονται από τους αδένες και ταξιδεύουν στο σώμα δρώντας ως χημικά μηνύματα, στη συνέχεια αλληλοεπιδρούν με κύτταρα που φέρουν στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό τους τους κατάλληλους υποδοχείς. Παρόλο που κάθε ορμόνη φτάνει σε όλα τα σημεία του σώματος, δεσμεύεται μόνο στον αντίστοιχο για εκείνη υποδοχέα και επομένως αντιδρούν στην παρουσία της μόνο τα κύτταρα εκείνα που διαθέτουν τους κατάλληλους υποδοχείς. Η δέσμευση της ορμόνης στον υποδοχέα θα μεταδώσει ένα μήνυμα στο κύτταρο το οποίο τελικά θα κατευθύνει την τελική απόκριση.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ένας αδένας μπορεί να εκκρίνει περισσότερες από μία ορμόνες καθώς και ότι μια ορμόνη μπορεί να παράγεται από περισσότερους του ενός τύπου ενδοκρινικών αδένων.

2. Ενδοκρινικοί διαταράκτες (endocrine disruptors)

Ορίζονται τα χημικά που έχουν δυνατότητα παρεμβολής στο ενδοκρινικό σύστημα και πιο συγκεκριμένα είναι εξωγενείς ουσίες ή μείγματα που μεταβάλλουν τη λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος και συνεπώς προκαλούν δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία ενός οργανισμού ή στους απογόνους του. Ο όρος χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Theo Colborn και Peter Thomas το 1992. Οι ουσίες αυτές ενδέχεται να έχουν δυσμενείς επιδράσεις στην υγεία όπως για παράδειγμα καρκίνο, διαταραχές της συμπεριφοράς και αναπαραγωγικές ανωμαλίες. Ενώ υπάρχουν πολλές ορμόνες και συστήματα ορμονών, οι περισσότερες μελέτες των ενδοκρινικών διαταρακτών επικεντρώθηκαν κυρίως σε χημικές ουσίες που αλληλεπιδρούν με τα συστήματα οιστρογόνων, ανδρογόνων και θυρεοειδικών ορμονών. Ωστόσο, ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών υποδεικνύει ότι οι περιβαλλοντικές χημικές ουσίες μπορούν να παρεμβαίνουν σε άλλα ενδοκρινικά συστήματα (Casals-Casas and Desvergne, 2011). Διάφορες φυσικές και συνθετικές ουσίες έχουν ταυτοποιηθεί ότι επάγουν οιστρογόνα ως απόκριση, συμπεριλαμβανομένων φαρμακευτικών προϊόντων, φυτοφαρμάκων, βιομηχανικών χημικών και βαρέων μετάλλων (Giesy *et al.*, 2002)

Εδώ και μια δεκαετία είναι γνωστή η σχέση μεταξύ του περιβάλλοντος και της υγείας. Είναι πλέον γνωστό ότι υπάρχουν ιδιαίτερα ευάλωτες περίοδοι κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής και της μεταγεννητικής ζωής, κατά τη διάρκεια των οποίων ενδοκρινικοί διατάρακτες έχουν ισχυρές και συχνά μη αναστρέψιμες επιδράσεις στην ανάπτυξη οργάνων, ενώ η έκθεση των ενηλίκων προκαλεί μικρότερη ή μηδενική επίδραση. Συνεπώς, η έκθεση σε χημικούς ρύπους κατά την μητρική, την εμβρυϊκή και την παιδική ηλικία παίζει μεγαλύτερο ρόλο στην αιτιολογία πολλών ενδοκρινικών παθήσεων και διαταραχών του

θυρεοειδούς, του ανοσοποιητικού, του πεπτικού, του καρδιαγγειακού, του αναπαραγωγικού και του μεταβολικού συστήματος.

Τις τελευταίες δεκαετίες ο όγκος των ενδείξεων σχετικά με τις ορμονικές επιδράσεις ορισμένων χημικών ουσιών είναι αυξημένος. Παρόλα αυτά το φαινόμενο των ενδοκρινικών διαταραχών δεν είναι καινούριο, καθώς ήδη από τη δεκαετία του 1930 ήταν γνωστό ότι ορισμένες χημικές ουσίες μπορούσαν να μιμηθούν τα οιστρογόνα. Το 1938 παρασκευάστηκε το DES (diethylstilbestrol), ένα φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε εκτενώς για τη θεραπεία εγκύων γυναικών από τη δεκαετία του 1940 μέχρι και τη δεκαετία του '70 για να αποφευχθούν αποβολές και άλλες επιπλοκές της εγκυμοσύνης (Bamigboye and Morris, 2003). Αρχικά δόθηκε σε γυναίκες με κηλίδες σε κίνδυνο, αλλά τελικά δόθηκε και σε γυναίκες με φυσιολογική εγκυμοσύνη ώστε να κάνουν τα μωρά "υγιέστερα".

Στη συνέχεια, το DES βρέθηκε αναποτελεσματικό στη μείωση των αποβολών. Το πιο σημαντικό, συνδέθηκε με μια σπάνια μορφή καρκίνου του κόλπου σε μικρό αριθμό (<0,1%) των κόρων που εκτέθηκαν σε αυτό κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής τους ζωής (Herbst *et al.*, 1971). Το DES αργότερα συσχετίστηκε με πιο συχνά καλοήγη αναπαραγωγικά προβλήματα σε ~ 90-95% των κοριτσιών που εκτέθηκαν σε DES (Bamigboye and Morris, 2003) και υπήρξαν επίσης επιδράσεις στην αναπνοή και στην αναπαραγωγική δυσλειτουργία, αποβολή, πρόωρο τοκετό, χαμηλό βάρος γέννησης, έκτοπη εγκυμοσύνη. Υπάρχουν επίσης επιδράσεις δεύτερης γενεάς (Newbold *et al.*, 1998, 2000) όπως αυξημένες ανωμαλίες της εμμήνου ρύσεως (Titus-Ernstoff *et al.*, 2006) και ενδεχομένως καρκίνο ωοθηκών (Blatt *et al.*, 2003). Οι προγεννητικώς εκτεθειμένοι γιοι υποφέρουν από μια ποικιλία προβλημάτων στην αναπαραγωγική οδό, συμπεριλαμβανομένων δυσμορφιών (ουρηθρικές ανωμαλίες, επιδιδυμικές κύστες και μη εξελισσόμενους όρχεις) και αυξημένη φλεγμονή των γεννητικών οργάνων (Herbst & Bern, 1981; Titus-Ernstoff *et al.*, 2010). Άλλες επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία καταγράφηκαν σε εργάτες που ασχολούνταν με το ράντισμα καλλιεργειών με DDT και οι οποίοι παρουσίασαν χαμηλές ποσότητες σπέρματος (Singer, 1949). Οι EDCs θεωρούνται υπαίτιοι για αναπαραγωγικές διαταραχές στον άνθρωπο και την άγρια ζωή (Hayes *et al.*, 2002).

Είναι γνωστό πως γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες (συμπεριλαμβανομένης της διατροφής, της ηλικίας, των σεξουαλικά μεταδιδόμενων ασθενειών και της πρόσβασης σε καλή υγειονομική περίθαλψη) διαδραματίζουν ρόλο στην αναπαραγωγική υγεία και συνεπώς μπορούν να συμβάλουν σε αναπαραγωγικές διαταραχές. Επιπλέον όμως οι επιπτώσεις των χημικών ουσιών που παρατηρούνται στην εκτεθειμένη άγρια πανίδα και στα εργαστηριακά ζώα, παρόμοιες με εκείνες που παρατηρούνται στους ανθρώπινους πληθυσμούς και στα άτομα που εκτέθηκαν σε DES, έχουν αναγκάσει την επιστημονική κοινότητα να εξετάσει κατά πόσον οι ενδοκρινικοί διαταράκτες θα μπορούσαν επίσης να προκαλέσουν μια αυξανόμενη ποικιλία προβλημάτων αναπαραγωγικής υγείας στις γυναίκες, συμπεριλαμβανομένης της αλλαγής της ανάπτυξης του μαστικού αδένα, των ακανόνιστων ή μακρύτερων κύκλων και της επιταχυνόμενης εφηβείας (Crain *et al.*, 2008; Woodruff *et al.*, 2008; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). Αυτές οι αλλαγές υποδεικνύουν μεγαλύτερο κίνδυνο για μεταγενέστερα προβλήματα υγείας, όπως ο καρκίνος του μαστού, οι μεταβολές στη γαλουχία και η μειωμένη γονιμότητα.

2.1 Ορισμοί EDCs

Έχουν προταθεί διάφοροι ορισμοί για τους ενδοκρινικούς διαταράκτες. Η Ευρωπαϊκή επιστημονική και ρυθμιστική κοινότητα κατά τη διάρκεια της διάσκεψης ‘Weybridge’ κατέληξε στον ακόλουθο ορισμό ενός ενδοκρινικού διαταράκτη:

‘Ενδοκρινικός διαταράκτης είναι μια εξωγενής ουσία η οποία προκαλεί δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία ενός άθικτου οργανισμού ή στους απογόνους του ως επακόλουθο των αλλαγών στην ενδοκρινική λειτουργία’

Τον Μάιο του 1997 η Αμερικάνικη Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος (EPA) συμφώνησε στον ακόλουθο λεπτομερή λειτουργικό ορισμό:

‘Ενδοκρινικός διαταράκτης είναι ένας εξωγενής παράγων ο οποίος επεμβαίνει στη σύνθεση, έκκριση, μεταβολισμό, δεσμευτική ικανότητα ή απέκκριση των

φυσικών ορμονών του σώματος, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ομοιόσταση, αναπαραγωγή και ανάπτυξη'

Ο ορισμός της EPA εκφράζει την ευρεία ποικιλία των μηχανισμών που πρόκειται απευθείας να εμπλακούν στη διαταραχή του ενδοκρινικού συστήματος. Επιπλέον ορισμοί προτείνονται από την Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) και από το International Programme on Chemical Safety (IPCS) αλλά στην ουσία είναι επαναδιατυπωμένες εκδόσεις των ορισμών που αναφέρθηκαν παραπάνω. Όπως για παράδειγμα ο εξής:

'Ενδοκρινικός διαταράκτης είναι μια εξωγενής χημική ουσία ή μίγμα που αλλοιώνει τη δομή ή τη λειτουργία(ες) του ενδοκρινικού συστήματος και προκαλεί ανεπιθύμητες επιδράσεις στο επίπεδο του οργανισμού, των απογόνων του ή υποπληθυσμών του, βάσει επιστημονικών αρχών, δεδομένων, αποδείξεων και της αρχής προφύλαξης'. (IUPAC Technical Report, 2003)

2.2 Προέλευση των ενδοκρινικών διαταρακτών

Οι ουσίες αυτές βρίσκονται σε πολλά από τα καθημερινά προϊόντα που χρησιμοποιούμε, όπως μερικά πλαστικά μπουκάλια, μεταλλικά δοχεία, απορρυπαντικά, τρόφιμα, παιχνίδια, καλλυντικά καθώς και φυτοφάρμακα. Οι άνθρωποι μπορεί να εκτίθενται σε ενδοκρινικούς διαταράκτες μέσω των τροφίμων, των ποτών που καταναλώνουν, των φαρμάκων, των καλλυντικών που χρησιμοποιούν καθώς και των φυτοφαρμάκων. Έτσι η έκθεση του οργανισμού στις ουσίες αυτές μπορεί να είναι μέσω της διατροφής, του αέρα, του δέρματος και του νερού αλλά και μέσω του πλακούντα κατά την εμβρυϊκή ζωή και μέσω του θηλασμού στα βρέφη. Σε κάθε περίπτωση τελικός αποδέκτης είναι το αίμα. Ενδεικτικά κάποιοι ενδοκρινικοί διαταράκτες είναι οι εξής:

- Βιομηχανικοί διαλύτες και λιπαντικά και τα υποπροϊόντα τους
 - ✓ Πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs)
 - ✓ Πολυβρωμιούχα διφαινύλια (PBBs)

- ✓ Διοξίνες
- Πλαστικά
- ✓ Διφαινόλη-A (BPA)
- Πλαστικοποιητές
- ✓ Φθαλικές ενώσεις (Phthalates)
- Γεωργικά φάρμακα
- ✓ Παρασιτοκτόνα (methoxychlor, DDT)
- ✓ Μυκητοκτόνα (vinclozolin)
- Φάρμακα
- ✓ Diethylstilbestrol (DES)
- Φυτοοιστρογόνα
- ✓ Ισοφλαβόνες
- ✓ Κουμαστρόλη
- Βαρέα μέταλλα
- ✓ Μόλυβδος
- ✓ Υδράργυρος κα

2.3 Μηχανισμοί δράσης ενδοκρινικών διαταρακτών

Όπως αναφέρθηκε οι αδένες του ενδοκρινικού συστήματος παράγουν μηνυματοφόρα μόρια τα οποία ταξιδεύουν μέσω του αίματος στα όργανα στόχους και μέσω της πρόσδεσής τους με τους αντίστοιχους υποδοχείς οδηγούν στις κατάλληλες αποκρίσεις των κυττάρων. Οι υποδοχείς έχουν υψηλή συγγένεια με τις φυσικές ορμόνες και έτσι απαιτούνται πολύ χαμηλές ποσότητες μιας ορμόνης για να επιτευχθεί μια συγκεκριμένη αντίδραση. Παρά την υψηλή συγγένεια των υποδοχέων με τις ορμόνες είναι δυνατόν να προσδεθούν και άλλες χημικές ενώσεις σε αυτούς. Αυτό σημαίνει ότι EDCs μπορούν να προκαλέσουν μια επίδραση και να καταλήξουν τελικά σε μια αντίδραση. Ορμονική διαταραχή παρουσιάζεται όταν οι ενδοκρινικοί διαταράκτες αλληλεπιδρούν με δέκτες των ορμονών, μεταβάλλοντας κατά αυτόν τον τρόπο τις μορφές των φυσικών αντιδράσεων του ενδοκρινικού συστήματος.

Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες μπορούν να δρουν είτε άμεσα είτε έμμεσα. Άμεσα δρουν σαν αγωνιστές ή ανταγωνιστές των φυσικών ορμονών και εμποδίζουν

τις ορμονικές δράσεις στα κύτταρα στόχο. Έμμεσα επηρεάζουν τη δυναμική των ορμονών στην κυκλοφορία, αλλάζουν το μεταβολισμό των ορμονών ή επηρεάζουν την ορμονική ρύθμιση. Οι γενικοί μηχανισμοί δράσης των ενδοκρινικών διαταρακτών μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

- ✓ Πρόσδεση και ενεργοποίηση του υποδοχέα, λόγω της ύπαρξης πολλών διαφορετικών οιστρογονικών υποδοχέων σε διάφορους ιστούς η ταυτόχρονη παρουσία διάφορων EDCs μπορεί να επιφέρει αθροιστικά ή και συνεργιστικά αποτελέσματα
- ✓ Πρόσδεση και μη ενεργοποίηση του υποδοχέα (αντι-ορμόνη), στην περίπτωση αυτή η φυσική ορμόνη δε μπορεί να δεσμευτεί στον υποδοχέα και να δράσει και ως εκ τούτου προκύπτει απενεργοποίηση του υποδοχέα. Για παράδειγμα οι διοξίνες και τα φουράνια μπορούν να δεσμευτούν στους υποδοχείς των οιστρογόνων και να εμποδίσουν τη δράση τους.
- ✓ Πρόσδεση και σε άλλους υποδοχείς, όπως η δέσμευση του ανδρογονικού υποδοχέα είτε με ενεργοποίηση είτε με απενεργοποίηση του.
- ✓ Τροποποίηση του αριθμού των ορμονικών υποδοχέων σε ένα κύτταρο. Ο αριθμός των ορμονικών υποδοχέων σε ένα κύτταρο ρυθμίζεται μέσω σύνθετων μηχανισμών. Η παρουσία κάποιας χημικής ένωσης μπορεί να μειώσει ή να αυξήσει αυτόν τον αριθμό με αποτέλεσμα την μεταβολή στην ένταση της απόκρισης του κυττάρου σε φυσικές ή συνθετικές ορμόνες.
- ✓ Τροποποίηση του μεταβολισμού των φυσικών ορμονών. Ορισμένα EDCs μπορούν να αυξήσουν την παραγωγή των οιστρογόνων ενώ κάποια άλλα επιταχύνουν τη δράση των ενζύμων που μεταβολίζουν τις ορμόνες.
- ✓ Τροποποίηση της παραγωγής των φυσικών ορμονών μέσω αποστολής διαφορετικών σημάτων σε άλλα ορμονικά συστήματα του οργανισμού

Μια σειρά από χαρακτηριστικά των EDCs έχουν αποδειχθεί ότι αποτελούν κλειδί για την πλήρη κατανόηση των μηχανισμών δράσης τους. Αρχικά η

ηλικία έκθεσης σε έναν ενδοκρινικό διαταράκτη έχει διαφορετικές συνέπειες με πιο ευάλωτες τις περιόδους ανάπτυξης ενός εμβρύου ή ενός βρέφους σε σχέση με έναν ενήλικα. Επίσης πιθανολογείται ότι υπάρχει μια χρονική υστέρηση μεταξύ έκθεσης και της εκδήλωσης κάποιας διαταραχής. Πιο συγκεκριμένα η αναπτυξιακή έκθεση μπορεί να μην έχει άμεσα εμφανείς συνέπειες, αλλά μπορούν να εκδηλωθούν στην ενήλικη ζωή. Ακόμη οι ενδοκρινικοί διαταράκτες είναι ικανοί να επηρεάσουν όχι μόνο το εκτεθειμένο σε αυτούς άτομο αλλά και τις επόμενες γενιές. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν πως ο μηχανισμός μετάδοσης μπορεί να μην οφείλεται σε μετάλλαξη της αλληλουχίας DNA, αλλά πιθανότατα μέσω τροποποιήσεων παραγόντων που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση, όπως η μεθυλίωση του DNA και η ακετυλίωση ιστονών (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

2.4 Επιδράσεις των ενδοκρινικών διαταρακτών στην αναπαραγωγική λειτουργία

Μεταξύ των ισχυρότερων συσχετίσεων μεταξύ των εκθέσεων EDCs και των αρνητικών αποτελεσμάτων είναι εκείνες για την αναπαραγωγική ανάπτυξη, τη φυσιολογία και την παθολογία. Ορισμένες κατηγορίες EDCs (DDT, BPA, φθαλικές ενώσεις, PCBs, και άλλοι) μπορούν να επηρεάσουν την αναπαραγωγική υγεία μιμούμενοι ή εμποδίζοντας τις επιδράσεις αρσενικών και θηλυκών ορμονών του φύλου. Οι χημικές ουσίες που προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές είναι όπως έχει αναφερθεί ουσίες στο περιβάλλον (αέρας, έδαφος ή νερό), πηγές τροφίμων, προϊόντα προσωπικής φροντίδας και κατασκευασμένα προϊόντα που παρεμβαίνουν στην κανονική λειτουργία του ενδοκρινούς συστήματος του σώματός ενός οργανισμού. Από τις εκατοντάδες χιλιάδες ανθρωπογενών χημικών, εκτιμάται ότι περίπου 1.000 ενδέχεται να έχουν ιδιότητες ενδοκρινικής δράσης.

Για να αποδειχθεί ότι μια ουσία προκαλεί επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία και κατ' επέκταση στην αναπαραγωγή απαιτούνται άμεσα αποδεικτικά στοιχεία, τα οποία προέρχονται από μελέτες στον ανθρώπινο οργανισμό. Η διεξαγωγή τέτοιων μελετών όμως παρουσιάζει ιδιαίτερες δυσκολίες. Από την άλλη πλευρά όμως η διεξαγωγή πειραμάτων σε πειραματικά ζώα είναι πολύ

πιο εύκολη. Συνεπώς, οι πειραματικές μελέτες σε ζώα συμβάλουν στην πρόβλεψη της τοξικότητας των διάφορων ουσιών στην υγεία του ανθρώπου. Χρήσιμες είναι επίσης οι πληροφορίες που προκύπτουν από την επίδραση των χημικών ουσιών στην άγρια ζωή παρατηρώντας αλλαγές και ανωμαλίες στους πληθυσμούς.

Οι φθαλικοί εστέρες, όπως το DEHP αποτελούν κύρια συστατικά των πλαστικών. Το DEHP λειτουργεί ως ενδοκρινικός διαταράκτης σε ποντίκια, προκαλώντας υπερπλασία των Leydig κυττάρων επηρεάζοντας τη φυσιολογία του συστήματος (Akingbemi *et al.*, 2001). Επίσης ο DBP μειώνει τη γονιμότητα στα κουνέλια (Higuchi *et al.*, 2003). Τα πτηνά που εκτίθενται σε DDT εμφανίζουν διαταραχές, όπως λέπτυνση στο κέλυφος του αυγού και μεταβολές στη γενετική τους ανάπτυξη. Αυτές οι διαταραχές οδηγούν σε μείωση του πληθυσμού των προσβαλλόμενων οργανισμών. Η παρουσία οργανοχλωριωμένων ενώσεων δεν είχε ως αποτέλεσμα μόνο τη θηλεοποίηση των εκτεθειμένων πτηνών αλλά και αλλαγές στο κέλυφος κάνοντας ή πολύ σκληρό ή πολύ μαλακό (Halldin *et al.*, 2003). Ενδοκρινικές διαταραχές έχουν παρατηρηθεί και σε ερπετά. Η παρουσία του DDT και του μεταβολίτη του DDE στους αλιγάτορες απεδείχθη ότι μειώνει το ρυθμό γονιμοποίησης των αυγών και αυξάνει τη θνησιμότητα των νεογνών (Vonier *et al.*, 1996).

Η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στην επιρροή των ουσιών αυτών και στην αναπαραγωγική υγεία του ανθρώπου. Τα τελευταία 40 χρόνια, αρκετές μελέτες έδειξαν μείωση της ποιότητας του σπέρματος (Centola *et al.*, 2016; Virtanen, Jørgensen and Toppari, 2017), που εκτιμήθηκε ως σημαντική μείωση του συνολικού αριθμού των σπερματοζωαρίων, της κινητικότητας, της βιωσιμότητας και του φυσιολογικού σχήματος, με αποτέλεσμα τη μείωση των πιθανοτήτων αναπαραγωγής (Carlsen *et al.*, 1992). Οι αιτίες αυτής της παρακμής εξακολουθούν να αποτελούν αντικείμενο έρευνας, αλλά έχει προταθεί ότι η έκθεση σε περιβαλλοντικές χημικές ουσίες, όπως οι EDCs, κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ανάπτυξης και της ενηλικίωσης, θα μπορούσε να αποτελέσει πιθανή αιτία ανδρικών αναπαραγωγικών διαταραχών (Nordkap *et al.*, 2012). Πράγματι, πρόσφατες μελέτες ανέφεραν αύξηση των υποσπαδίων και κρυπτορχιδισμού σε συνδυασμό με την έκθεση της μητέρας σε

περιβαλλοντικούς ρύπους (Gore *et al.*, 2015; Sifakis *et al.*, 2017). Επιπλέον, η γυναικεία γονιμότητα φαίνεται να επηρεάζεται από την έκθεση σε EDC όπως αναφέρεται σε επιδημιολογικές μελέτες σε ανθρώπους, σε ζωικά μοντέλα και σε πολλές *in vitro* μελέτες (Zhou, Gao and Flaws, 2017; Patiño-García *et al.*, 2018). Τα EDC παρεμβαίνουν στα επίπεδα των στεροειδών ορμονών και μεταβάλλουν τη λειτουργία και τη δομή των αναπαραγωγικών οργάνων. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί διαδραματίζουν επίσης βασικό ρόλο στην ανδρική και γυναικεία στειρότητα. Πράγματι, οι επαγόμενες από την EDC αναπαραγωγικές διαταραχές έχουν συσχετιστεί με επιγενετική τροποποίηση DNA (κυρίως με μεθυλίωση του DNA) και έχουν αποδειχθεί σε ζωικά μοντέλα σε πολλαπλές γενεές (Latchney, Fields and Susiarjo, 2018).

Ο αυξημένος επιπολασμός των ορμονοξαρτώμενων καρκίνων (π.χ. μαστού, προστάτη), η μειωμένη γονιμότητα, η πρόωμη εφηβεία, ο μειωμένος αριθμός σπερματοζωαρίων και οι γεννητικές δυσπλασίες (Crain *et al.*, 2008) οφείλονται τουλάχιστον εν μέρει στην αυξημένη χημική αφθονία και έκθεση σε ενδοκρινικούς διαταράκτες. Η αύξηση της πρόωμης εφηβείας στα κορίτσια, ενώ συμβάλουν πολλοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της διατροφής, του στρες και της εθνικότητας, μπορεί εν μέρει να οφείλεται σε έκθεση σε οιστρογόνα EDCs (Mouritsen *et al.*, 2010; Biro, 2013). Τέτοιες οιστρογονικές ενώσεις συσχετίζονται επίσης με ινομύματα της μήτρας, δυσλειτουργία των ωοθηκών και υπογονιμότητα σε ανθρώπους και σε ζωικά μοντέλα (Newbold, 2008; Jefferson, Patisaul and Williams, 2012). Η BPA συνδέεται με τη μειωμένη ποιότητα των ωαρίων και άλλες πτυχές της βιωσιμότητας αυτών σε ασθενείς που επιδιώκουν θεραπεία γονιμότητας (Machtiger *et al.*, 2013; Souter *et al.*, 2013) καθώς και με προβλήματα στη μειωτική άτρακτο. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η έκθεση σε BPA σε γυναίκες ασθενείς μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα ωοκυττάρων κατά τη διάρκεια της εξωσωματικής γονιμοποίησης (Fujimoto *et al.*, 2011), αποτελέσματα που είναι στενά παράλληλα με αυτά που παρατηρούνται σε ζωικά μοντέλα (Uzumcu, Zama and Oruc, 2012). Το θυλάκιο των ωοθηκών είναι ένα πολύ εύθραυστο μικροπεριβάλλον, όπου οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ορμονών, αυξητικών παραγόντων, ωοκυττάρου και των σωματικών κυττάρων που το περιβάλλουν είναι απαραίτητα για τη δημιουργία ενός πλήρως ικανού ωοκυττάρου. Η

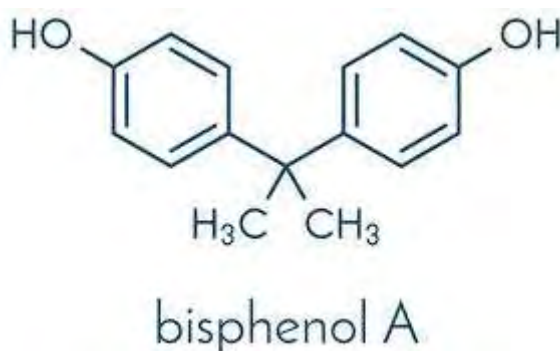
συγκέντρωση από EDCs στο θυλακοειδές μικροπεριβάλλον συσχετίστηκε με μειωμένη γονιμοποίηση και κατά συνέπεια με μικρότερη πιθανότητα να αναπτυχθεί ένα ωκύτταρο σε ένα υψηλής ποιότητας έμβρυο (Petro *et al.*, 2012). Οι γυναίκες της Δανίας ηλικίας κάτω των 40 ετών που ασχολούνται με τη βιομηχανία πλαστικών είχαν περισσότερες πιθανότητες να ζητήσουν βοήθεια γονιμότητας σε σχέση με μη εκτεθειμένες γυναίκες της ίδιας ηλικίας (Hougaard *et al.*, 2009). Στους άντρες, ο αριθμός των σπερματοζωαρίων μειώθηκε κατά 50% τον τελευταίο μισό αιώνα σε ορισμένες περιοχές (Swan *et al.*, 2003). Πολλές χημικές ουσίες, κυρίως φθαλικές ενώσεις, συνδέονται με μια ποικιλία ανεπιθύμητων ενεργειών στην αρσενική ουρογεννητική οδό, συμπεριλαμβανομένου του κρυπτορχιδισμού, της υποσπαδίας, της νόσου του προστάτη και του καρκίνου των όρχεων (Skakkebaek, Rajpert-De Meyts and Main, 2001). Η έκθεση σε παρασιτοκτόνα συσχετίστηκε με ελαττωμένη ποιότητα σπέρματος (Meeker *et al.*, 2004).

Παρόλα αυτά οι επιπτώσεις των EDCs στην ανθρώπινη γονιμότητα παραμένουν ασαφείς, όπως αποδεικνύεται από τα ασυνήθιστα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών. Ο χρόνος και η δόση των EDCs μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικούς φαινότυπους, επομένως, η διερεύνηση του κρίσιμου παραθύρου έκθεσης φαίνεται να είναι απαραίτητη για να κατανοηθούν τα διαφορετικά αποτελέσματά τους. Επιπλέον, ο ανθρώπινος πληθυσμός εκτίθεται σε ένα μείγμα EDCs, καθιστώντας δύσχερή τη μελέτη της επίδρασης ενός μόνο EDC στη γονιμότητα και οδηγεί στην αύξηση της μεταβλητότητας των αποτελεσμάτων. Οι περισσότερες μελέτες έχουν διερευνήσει την επίδραση φυτοφαρμάκων, βιομηχανικών χημικών ουσιών και συναφών ουσιών (φθαλικές ενώσεις, BPA, PCB), διοξίνης και διβενζοφουρανίων στην υπογονιμότητα που προκαλείται από EDC.

3.Η δισφαινόλη Α (Bisphenol A, BPA)

Η BPA είναι μια συνθετική φαινόλη που χρησιμοποιείται εκτεταμένα στην κατασκευή πολυανθρακικών πλαστικών και εποξειδικών ρητινών. Αρχικά αναφέρθηκε από τον Ρώσο χημικό Aleksandr Dianin το 1891 (**Εικόνα 3**) και συντέθηκε μέσω της συμπύκνωσης ακετόνης με δύο ισοδύναμα φαινόλης

από τον Zincke το 1905. Η BPA είναι μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες συνθετικές ενώσεις του πλανήτη με ετήσια παραγωγή περίπου 5 εκατομμυρίων τόνων στις Ηνωμένες Πολιτείες. Η δισφαινόλη Α (BPA), 2,2-δισ (4-υδροξυφαινυλ) προπάνιο, έχει την ικανότητα να μιμείται οιστρογόνες ορμόνες με σχετικές βιολογικές αποκρίσεις, αποτελεί λοιπόν ένα ξενοοιστρογόνο.



Εικόνα 3: Δισφαινόλη Α, μοριακός τύπος: C₁₅H₁₆O₂, γραμμομοριακή μάζα είναι 228,29 g / mol.

Το BPA χρησιμοποιείται στην παραγωγή μιας ποικιλίας πολυμερών όπως πολυανθρακικών πλαστικών ή εποξειδικών ρητινών, στην παραγωγή θερμικού χαρτιού κλπ. και επομένως χρησιμοποιείται στην κατασκευή μιας ποικιλίας καταναλωτικών προϊόντων. Επί του παρόντος, η BPA ανιχνεύεται σε διάφορα είδη όπως χαρτί θερμικού εκτυπωτή, ηλεκτρονικό εξοπλισμό, σωλήνες νερού, εξοπλισμό αθλητικής ασφάλειας, ιατρικές συσκευές, κουζινικά σκεύη, πλαστικά δοχεία, στην επένδυση κονσερβών που χρησιμοποιούνται για τρόφιμα και ποτά (Geens *et al.*, 2012). Ωστόσο, η BPA ανιχνεύεται επίσης στα λύματα, το πόσιμο νερό, τον αέρα και στη σκόνη (Vandenberg *et al.*, 2007).

Μια ανησυχητική επίδραση της BPA είναι ότι απορροφάται από τα δοχεία τροφίμων και ποτών, τα οποία παράγονται με τη χρήση BPA και διεισδύει στο περιεχόμενο τους (Munguía-López *et al.*, 2005). Έτσι λοιπόν η περιβαλλοντική έκθεση του ανθρώπου σε αυτόν τον ενδοκρινικό διαταράκτη, κυρίως μέσω της στοματικής πρόσληψης, θεωρείται γενικευμένο φαινόμενο, ιδιαίτερα στις ανεπτυγμένες χώρες, δεδομένου μάλιστα ότι η ανάλυση δειγμάτων ιστών και υγρών αποκάλυψε την παρουσία BPA στην πλειονότητα

των ατόμων που αναλύθηκαν (Geens *et al.*, 2012). Έχουν διεξαχθεί διεξοδικές έρευνες σχετικά με τις επιπτώσεις αυτού του χημικού ενδοκρινικού διαταράκτη (EDC) τόσο στα ζώα όσο και στους ανθρώπους (Rochester, 2013). Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των παγκόσμιων μελετών, το 2011, η ευρωπαϊκή νομοθεσία κατάργησε τη χρήση της BPA στην παρασκευή μπουκαλιών μωρών και το 2012 η Ευρωπαϊκή αρχή για την ασφάλεια των τροφίμων (EFSA) αποφάσισε να προβεί σε νέα εκτίμηση κινδύνου για την BPA, πράγμα που οδήγησε σε προσωρινή μείωση της καθορισμένης ανεκτής ημερήσιας πρόσληψης (TDI) (από 0,05 mg / kg έως 4 μg / kg σωματικού βάρους / ημέρα).

Αν και η BPA οιστρογονική δραστηριότητα έχει από καιρό αναγνωριστεί, έχει θεωρηθεί ένα ασθενές οιστρογόνο λόγω της συγγένειας δέσμεισής του με τους κλασικούς υποδοχείς οιστρογόνου α και β (ERα και ERβ) η οποία είναι 10,000- και 1000-φορές χαμηλότερη από εκείνη της ενδογενούς οιστραδιόλης οιστρογόνου (E2) για ERα και ERβ, αντίστοιχα (Routledge *et al.*, 2000). Ωστόσο, ξεχωριστές μελέτες έχουν δείξει ότι η BPA μπορεί στην πραγματικότητα να προάγει οιστρογονικά αποτελέσματα παρόμοια ή και ισχυρότερα από την E2.

Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες αναλυτικές τεχνικές για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων BPA σε βιολογικά δείγματα. Ορισμένες από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό είναι η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS), ενζυμική ανοσοπροσοροφητική δοκιμή (ELISA), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) κα.

4.Χρωματογραφία

Ο όρος χρωματογραφία (chromatography) περιλαμβάνει πλήθος αναλυτικών τεχνικών που εφαρμόζονται κοινώς στον διαχωρισμό των συστατικών μιγμάτων ουσιών. Οι χρωματογραφικές τεχνικές διαχωρισμού εφαρμόζονται ευρύτατα για τη διαπίστωση της παρουσίας ή μη συστατικών σε μίγματα τα οποία περιέχουν ένα περιορισμένο αριθμό άλλων ουσιών/προσμίξεων, γνωστής, ως επί το πλείστον, ταυτότητας. Η επιβεβαίωση της ταυτότητας των συστατικών του μίγματος προαπαιτεί τον χρωματογραφικό διαχωρισμό αυτών

με σκοπό την απομόνωσή τους. Ακολουθεί ανάλυση των απομονωμένων συστατικών με χημικές ή φασματοσκοπικές τεχνικές.

Κάθε χρωματογραφική τεχνική περιλαμβάνει μία κινητή φάση (mobile phase), η οποία ρέει μεταφέροντας τις διαχωριζόμενες ουσίες – συστατικά ενός μίγματος- μέσω μίας στατικής φάσης (static phase). Η κινητή φάση αποτελείται από ένα διαλύτη ή σύστημα διαλυτών, ενώ η στατική φάση από πορώδες στερεό υλικό ή από υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα. Ο διαχωρισμός των συστατικών στη χρωματογραφία βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης του κάθε συστατικού με τις δύο φάσεις, ο οποίος καθορίζεται από την φυσικοχημική συγγένεια του συστατικού με την κάθε φάση. Κάθε μόριο μίας ουσίας κατά τη μετανάστευσή του μέσω της στήλης μετακινείται πάρα πολλές φορές μεταξύ της κινητής φάσης (όπου διαλύεται) και της στατικής φάσης (όπου προσροφάται ή κατανέμεται ή δεσμεύεται λόγω αγγιστείας κ.τ.λ.) και αντίστροφα.

4.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)

Η χρωματογραφία HPLC (High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography – Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης ή Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης) αποτελεί σημαντικά εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση δεν ρέει υπό την επίδραση της βαρύτητας, αλλά με τη βοήθεια αντλίας. Αυτό επιταχύνει την ανάλυση και επιτρέπει τη χρήση χρωματογραφικών στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης. Η χρήση μικρού μεγέθους σωματιδίων υλικού πλήρωσης αυξάνει το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης, που είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης. Κατά συνέπεια, βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων και μειώνεται σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό.

Ανάλογα με τη σχέση της πολικότητας μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας προσρόφησης υψηλής πίεσης: HPLC κανονικής φάσης και HPLC αντίστροφης φάσης. Στη HPLC αντίστροφης φάσης (reversed phase HPLC ή RPHPLC) ο διαχωρισμός

οφείλεται στην προσρόφηση υδρόφοβων μορίων σε υδρόφοβη στατική φάση, υπό την ροή κινητής φάσης αυξημένης πολικότητας. Η στατική φάση αποτελείται από οξειδίο πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες, όπως αλκύλια (ακετύλιο, δεκαοκτύλιο, οκτύλιο), φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες κ.α., οι οποίες προσδίδουν στη στατική φάση ιδιαίτερα άπολο χαρακτήρα. Η κινητή φάση αποτελείται από μείγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, κ.ά.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή με νερό. Η έκλουση των προσροφημένων μορίων από τη χρωματογραφική στήλη επιτυγχάνεται με τη μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης κατά την αύξηση του περιεχόμενου σε αυτή ποσοστού του οργανικού διαλύτη. Η μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης ελαττώνει την υδρόφοβη αλληλεπίδραση μεταξύ των προσροφημένων μορίων και της στατικής φάσης: είναι προφανές ότι όσο πιο άπολο είναι ένα διαχωριζόμενο μόριο, τόσο περισσότερο χρόνο θα αλληλεπιδράσει με την άπολη στατική φάση και τόσο υψηλότερη θα είναι η συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση, που θα απαιτείται για να επιτευχθεί η αποδέσμευσή του. Ως αποτέλεσμα επιτυγχάνεται η εκλεκτική έκλουση των άπολων μορίων από τη χρωματογραφική στήλη. Είναι προφανές ότι με αντιστροφή της πολικότητας της κινητής και της στατικής φάσης, αντιστρέφεται και η σειρά έκλουσης των τριών συστατικών του μίγματος

4.2 Οργανολογία HPLC

Μία βασική εργαστηριακή διάταξη υγρής χρωματογραφίας περιλαμβάνει τα παρακάτω επιμέρους μέρη:

- Περιέκτες διαλυτών: Οι διαλύτες που θα αποτελέσουν την κινητή φάση βρίσκονται αποθηκευμένοι σε ειδικές φιάλες. Η κινητή φάση είναι απαραίτητη για τη μεταφορά των δειγμάτων μέσα από το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας.
- Απαερωτής κενού: Ο απαερωτής εξασφαλίζει την απαέρωση της κινητής φάσης, ώστε να είναι εφικτός ο έλεγχος της πίεσης στη χρωματογραφική στήλη.

□ Αντλία (pump): Η αντλία εξασφαλίζει τη συνεχή άντληση και προώθηση της κινητής φάσης διαμέσου του συνόλου του συστήματος, από τους περιέκτες των διαλυτών μέχρι το δοχείο συλλογής των αποβλήτων του συστήματος, υπό ρυθμιζόμενη υψηλή πίεση και ροή.

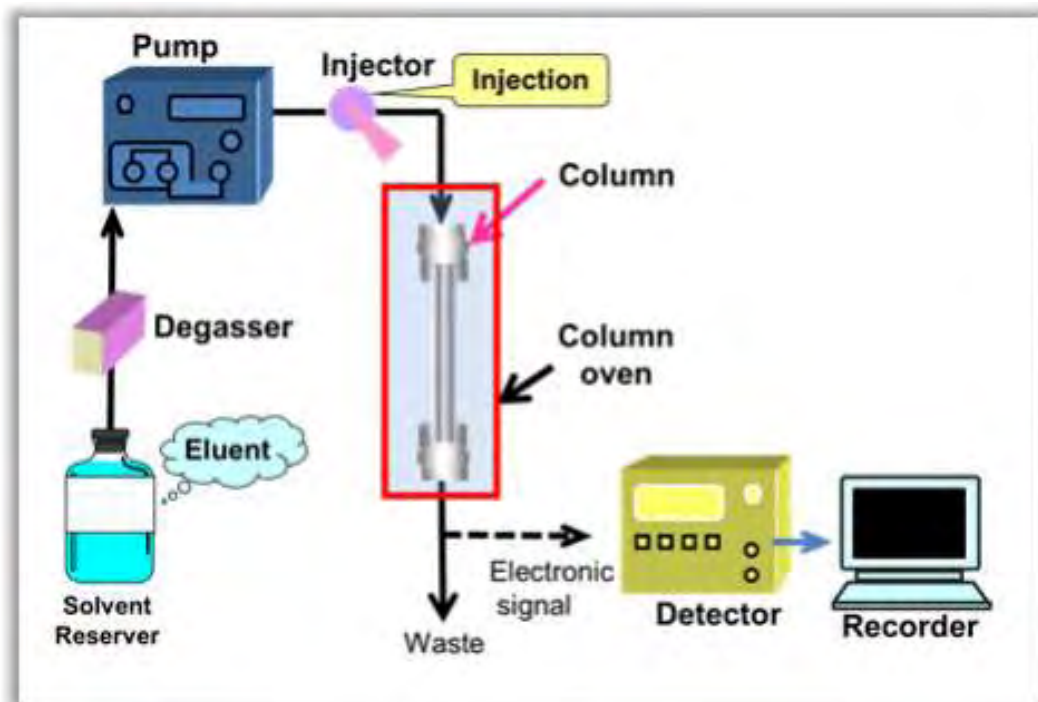
□ Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injection system/ injector valve): περιλαμβάνει βρόγχο σταθερού όγκου ή αυτόματο σύστημα εισαγωγής, μεταβλητού (προεπιλεγμένου) όγκου έγχυσης. Βρίσκεται πριν τη χρωματογραφική στήλη και επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος στη ροή της κινητής φάσης.

□ Χρωματογραφική στήλη (column): στη στήλη επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του μίγματος στα συστατικά του. Εφόσον ο διαχωρισμός καθορίζεται και από τη θερμοκρασία, η στήλη εμπεριέχεται σε θερμοστατούμενο κλίβανο (column oven).

□ Ανιχνευτής (detector): Η ανίχνευση των ουσιών που εξέρχονται της στήλης γίνεται συνεχώς, κυρίως με φασματομετρία UV/Vis, όπου το παραγόμενο από τον ανιχνευτή φως προσπίπτει σε κυψελίδα συνεχούς ροής από χαλαζία και μετρείται η απορρόφηση του φωτός.

□ Καταγραφικό: Το μετρούμενο σήμα που καταγράφεται συνεχώς κατά τη διάρκεια μιας ανάλυσης στέλνεται στη συνέχεια σε κάποιον υπολογιστή που παράγει το χρωματογράφημα της ανάλυσης.

□ Δεξαμενή αποβλήτων: Είναι η δεξαμενή όπου συλλέγεται η κινητή φάση μαζί με τα περιεχόμενα συστατικά του δείγματος. Όταν είναι επιθυμητή η συλλογή κλασμάτων της κινητής φάσης, (όπως στην προπαρασκευαστική HPLC), χρησιμοποιείται αυτόματος κλασματοσυλλέκτης (fraction collector).



Εικόνα 4: Διάταξη υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης.

Οι ανιχνευτές που κυρίως χρησιμοποιούνται στην HPLC είναι οι παρακάτω:

1. Ανιχνευτής δείκτη διαθλάσεως (RI): Ανιχνευτής γενικής χρήσεως ο οποίος βασίζεται στη μέτρηση της διαφοράς του δείκτη διάθλασης, μεταξύ της καθαρής κινητής φάσης και αυτής που περιέχει την ουσία. Μειονέκτημα: Έχει μεγάλη ευαισθησία στη θερμοκρασία για τον λόγο αυτό θερμοστατείται με μεγάλη ακρίβεια ($\pm 0,001^{\circ}\text{C}$) για να μην υπάρχει σφάλμα στην μέτρηση του σήματος
2. Ανιχνευτές υπεριώδους ορατού(UV-VIS): Είναι ευαίσθητος στην περιοχή 10-6 έως 10-10 g/mL για αρκετές ενώσεις. Μετράει την απορρόφηση των ουσιών του μίγματος που βγαίνουν από την στήλη. Μπορεί να είναι είτε σταθερού είτε μεταβαλλόμενου μήκους κύματος
3. Ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD): Διέρχεται πολυχρωματική ακτινοβολία από την κυψελίδα του ανιχνευτή. Η προκύπτουσα ακτινοβολία στη συνέχεια αναλύεται και προσπίπτει σε σειρά φωτοδίοδων. Κάθε μία φωτοδίοδος δέχεται μία διαφορετική δέσμη με μικρό εύρος μήκους κύματος. Όλη η σειρά των δίοδων «σαρώνεται» πολλές φορές

το δευτερόλεπτο από έναν μικροεπεξεργαστή και το προκύπτον φάσμα προβάλλεται σε οθόνη και ταυτόχρονα αποθηκεύεται στη μνήμη ηλεκτρονικού υπολογιστή για μετέπειτα εκτύπωση σε καταγραφικό. Ο υπολογιστής επιτρέπει την ταυτοποίηση της ουσίας συγκρίνοντας το φάσμα της με τα φάσματα που διαθέτει σε ειδικά αρχεία βιβλιοθήκη. Η ανίχνευση μπορεί να γίνει σε ένα ή περισσότερα μήκη κύματος ταυτόχρονα. Η καθαρότητα μιας χρωματογραφικής κορυφής, δηλαδή το κατά πόσον πρόκειται για μία ουσία ή όχι, μπορεί να ελεγχθεί από τους λόγους των απορροφήσεων σε επιλεγμένα μήκη κύματος (πχ. 254nm και 280nm).

4. Ανιχνευτές φθορισμού: Φθορισμός είναι η ιδιότητα ορισμένων ουσιών όταν απορροφούν UV ακτινοβολία, αυτομάτως να εκπέμπουν ακτινοβολία. Οι ανιχνευτές φθορισμού είναι 2 με 3 τάξεις μεγέθους πιο ευαίσθητοι από τους ανιχνευτές UV, ενώ παρουσιάζουν μεγάλη εκλεκτικότητα, αφού οι περισσότερες ουσίες δε φθορίζουν. Κατάλληλες για ανίχνευση με φθορισμό είναι ουσίες που εκπέμπουν σημαντικό ποσοστό της ακτινοβολίας που έχουν απορροφήσει. Οι φυσικά φθορίζουσες ουσίες είναι λίγες και είναι αυτές με συζυγή κυκλική δομή, όπως οι πολυπυρηνικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες. Ουσίες που δε φθορίζουν μπορούν να ανιχνευθούν με φθορισμό αφού πρώτα μετατραπούν με κατάλληλη αντίδραση σε φθορίζον παράγωγο.

5. Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές: Μετράνε είτε την αγωγιμότητα της κινητής φάσης (ανιχνευτές αγωγιμότητας) είτε το ρεύμα που σχετίζεται με τη οξειδωση ή την αναγωγή του δείγματος (αμπερομετρικοί ή κουλομετρικοί ανιχνευτές). Οι ανιχνευτές αγωγιμότητας βρίσκουν εφαρμογή στην ανίχνευση των ιόντων μετά από διαχωρισμό με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων.

6. Φασματογράφος μάζας (MS): Η φασματομετρία μάζας είναι μία ευαίσθητη τεχνική για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό χημικών ενώσεων. Βασίζεται στον διαχωρισμό των μαζών φορτισμένων σωματιδίων (κυρίως κατιόντων) με την βοήθεια κατάλληλης διάταξης (μαγνητική, τετραπόλου, χρόνου πτήσης) και την εύρεση της αντιστοιχίας των μαζών των λαμβανομένων ιόντων με την δομή της πρόδρομης ένωσης.

Η γραφική παράσταση του μετρούμενου από τον ανιχνευτή μεγέθους προς το χρόνο μετά την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη, καλείται χρωματογράφημα (chromatograph). Ο χρόνος κατακράτησης (retention time) t_R , είναι ο χρόνος που απαιτείται, ώστε μία συγκεκριμένη ουσία να «ταξιδέψει» διαμέσου της στήλης από την είσοδο αυτής μέχρι τον ανιχνευτή. Η εκκίνηση μέτρησης του χρόνου κατακράτησης γίνεται την στιγμή που το δείγμα εισάγεται με ένεση στη στήλη. Το χρονικό διάστημα μετά την ένεση και μέχρι το μέγιστο της κορυφής έκλουσης μίας ουσίας ονομάζεται χρόνος κατακράτησης. Ο χρόνος κατακράτησης αποτελεί χαρακτηριστική σταθερά μιας ουσίας, υπό αυστηρά καθορισμένες πειραματικές συνθήκες. Έτσι, για μία συγκεκριμένη ουσία ο χρόνος κατακράτησης καθορίζεται από την πίεση που ασκείται στη στήλη (η οποία με τη σειρά της καθορίζει την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης), την φύση της στατικής φάσης (υλικό πληρώσεως και μέγεθος σωματιδίων αυτού), την ακριβή σύσταση της κινητής φάσης (διότι η σύσταση καθορίζει το συντελεστή κατανομής μεταξύ κινητής και στατικής φάσης), τη θερμοκρασία της στήλης (καθότι ο συντελεστής κατανομής εξαρτάται από τη θερμοκρασία του διαχωρισμού). Σε μία χρωματογραφική ανάλυση οι παράμετροι ταχύτητα ροής κινητής φάσης, υλικό πληρώσεως και μέγεθος σωματιδίων στήλης, διαστάσεις στήλης, θερμοκρασία στήλης πρέπει να ορίζονται επακριβώς, προκειμένου μία χρωματογραφική ανάλυση να είναι επαναλήψιμη.

Ο ποιοτικός προσδιορισμός γνωστής ουσίας που διαχωρίζεται με HPLC γίνεται με βάση τον κοινό χρόνο ανάσχεσης και τη κοινή συμμετρία της κορυφής αυτής στο δείγμα και πρότυπο, που αναλύονται υπό τις ίδιες συνθήκες. Η ταυτοποίηση μπορεί να επιβεβαιωθεί με διατήρηση της σύμπτωσης των χρόνων ανάσχεσης και της συμμετρίας των κορυφών, είτε σε παράλληλη ανάλυση δείγματος και προτύπου υπό άλλες χρωματογραφικές συνθήκες, είτε υπό τον εμβολισμό του δείγματος με πρότυπο. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης μιας αναλυόμενης ουσίας σε μία χρωματογραφική ανάλυση, γίνεται βάσει του εμβαδού της επιφάνειας της χρωματογραφικής κορυφής της ουσίας. Αυτό είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της ουσίας. Ο ποσοτικός προσδιορισμός είναι δυνατός μετά την κατασκευή κατάλληλης καμπύλης αναφοράς, χρησιμοποιώντας πρότυπα της ουσίας διαφορετικής συγκέντρωσης.

Συνοψίζοντας λοιπόν ο χρόνος ανάσχεσης t_R αποτελεί το κριτήριο ταυτοποίησης των ουσιών που αναλύονται χρωματογραφικά. Για σταθερές παραμέτρους ανάλυσης (υλικό πλήρωσης και διαστάσεις στήλης, ταχύτητα ροής κινητής φάσης, θερμοκρασία και σύσταση του συστήματος έκλουσης) ο χρόνος ανάσχεσης είναι σταθερός και χαρακτηρίζει την εκλουόμενη ουσία. Το εμβαδόν της χρωματογραφικής κορυφής της αναλυόμενης ουσίας ή το μέγιστο ύψος αυτής χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της, διότι αυτά είναι ανάλογα της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας. Τα δείγματα που αναλύονται με HPLC πρέπει να βρίσκονται αποκλειστικά σε υγρή μορφή. Συνήθης προκατεργασία αυτών αποτελούν η αραίωση και η διήθηση. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του αναλύτη στα δείγματα γίνεται με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς που κατασκευάζεται ενίοντας πρότυπα διαλύματα της καθαρής ουσίας. Αν είναι δυνατόν, τα πρότυπα παρασκευάζονται στο ίδιο μητρικό υλικό με τα δείγματα.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όπως αναφέρθηκε οι χημικές ουσίες που προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές επηρεάζουν τις εσωτερικές ενδοκρινικές λειτουργίες στον άνθρωπο και έτσι έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια αναλυτικές μέθοδοι για την ανίχνευσή τους. Συγκεκριμένα, η ποσοτικοποίηση των EDCs σε ανθρώπινα βιολογικά υγρά είναι απαραίτητη για την άμεση ενημέρωση σχετικά με τον κίνδυνο για την υγεία που συνδέεται με την έκθεση σε αυτές τις ενώσεις. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) εφαρμόστηκε συχνά στη μέτρηση σχετικά πολικών EDCs, όπως για παράδειγμα στη δισφαινόλης Α, σε ανθρώπινα βιολογικά δείγματα. Για την ανίχνευση των EDCs με HPLC, χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι ανίχνευσης όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, ο φθορισμός, η ηλεκτροχημική ανίχνευση και η φασματομετρία μάζας. Αυτές οι μέθοδοι ανίχνευσης επιλέγονται κατάλληλα λαμβάνοντας υπόψη την ευαισθησία και την εκλεκτικότητά τους και τα χαρακτηριστικά των αναλυόμενων ουσιών. Πρόσφατα, η χρήση της διπλής φασματομετρίας μάζας έχει αυξηθεί λόγω της εξαιρετικής εξειδίκευσής της (Kishikawa, Ohyama and Kuroda, 2006). Στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος του τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, «Βιολογία της Αναπαραγωγής – Βιοδείκτες στη Μαιευτική και Γυναικολογία –

Περιγεννητική Ιατρική» η συγκεκριμένη μελέτη ως επιμέρους στόχους έχει τους εξείς:

- Να αναπτυχθεί και να επικυρωθεί η κατάλληλη αναλυτική μεθοδολογία HPLC με τη χρήση του καταλληλότερου ανιχνευτή
- Να εκτιμηθεί η ευαισθησία της μεθόδου
- Να εκτιμηθεί η ύπαρξη δισφαινόλης A σε ωοθυλακικά υγρά και πλάσματα σπέρματος ατόμων που υποβλήθηκαν σε θεραπεία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής στη Πανεπιστημιακή Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας
- Να αξιολογηθεί η συσχέτιση των αποτελεσμάτων με την ποιότητα των γαμετών.

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

1.Δείγματα

Για την επίτευξη της παρούσας μη επεμβατικής κλινικής έρευνας συλλέχθηκαν 11 δείγματα πλάσματος σπέρματος και 25 δείγματα ωοθυλακικού υγρού. Τα δείγματα αυτά συλλέχθηκαν από ζευγάρια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής στη Πανεπιστημιακή Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Χρησιμοποιήθηκε μια ελάχιστη ποσότητα από υλικό το οποίο στην καθημερινή πράξη αποβάλλεται και δε χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη. Οι γυναίκες ασθενείς υποβλήθηκαν σε κατάλληλα ελεγχόμενα πρωτόκολλα διέγερσης των ωοθηκών. Μετά την ωοληψία έγινε η συλλογή του σπέρματος και τελικά ακολούθησε συλλογή των δειγμάτων και αποθήκευση τους σε κατάψυξη.

2.Συλλογή-εκτίμηση ωαρίων και λήψη-κατάψυξη ωοθυλακικού υγρού

Το ωοθυλακικό υγρό συλλέγεται στο εργαστήριο εμβρυολογίας μετά την ωοληψία, τοποθετείται σε falcon και γίνεται φυγοκέντρηση σε μέγιστες στροφές για πέντε λεπτά. Στη συνέχεια συλλέγεται το υπερκείμενο και αποθηκεύεται σε erppendorf στους - 20 °C.

3.Συλλογή-εκτίμηση σπερματοζωαρίων και λήψη-κατάψυξη σπερματικού πλάσματος

Διεξάγεται ανάλυση και αξιολόγηση του δείγματος σπέρματος. Το δείγμα συλλέγεται σε ειδικά διαμορφωμένη, διακριτική αίθουσα συλλογής σπέρματος κοντά στο εργαστήριο ύστερα από δυο έως πέντε μέρες αποχής.

Το σπέρμα συλλέγεται σε μιας χρήσης δοχείο σπέρματος, αποστειρωμένο και δοκιμασμένο για έλλειψη σπερματοτοξικότητας. Μόλις ληφθεί το δείγμα, αφήνεται να ρευστοποιηθεί. Αφού το δείγμα ρευστοποιηθεί ακολουθεί η ανάλυση του που πραγματοποιείται σύμφωνα με τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) του 2010. Ο όγκος, ο χρόνος ρευστοποίησης, η εμφάνιση και το ιξώδες του σπέρματος μετριοούνται. Η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων ανά ml μετράται σε θάλαμο Makler χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο Olympus και υπολογίζεται ο συνολικός αριθμός των σπερματοζωαρίων. Η κινητικότητα (%) των σπερματοζωαρίων υπολογίζεται και κατηγοριοποιείται ως a: ταχύ προωθητικό, b: αργό προωθητικό, c: επίτοπος, d: ακινησία. Καταμετρείται το ποσοστό των ομαλών σπερματοζωαρίων στο δείγμα. Οι φυσιολογικές τιμές των παραμέτρων του σπέρματος είναι αυτές που πρότεινε ο ΠΟΥ και φαίνονται στον **Πίνακα 1**.

Πίνακας 1: Φυσιολογικές τιμές των επιμέρους παραμέτρων του σπέρματος σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.

Παράμετροι	Κατώτερα φυσιολογικά όρια
Όγκος σπέρματος (mL)	>1,5
Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων (/mL)	>15.000.000
Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων	>39.000.000
Συνολική κινητικότητα	>40%
Προωθητική κινητικότητα	>32%
Ζωτικότητα	>58%
Μορφολογία	>4%

σπερματοζωαρίων	
pH	≥7,2
Λευκοκύτταρα	<1,0

Ελάχιστη ποσότητα δείγματος σπέρματος (~200λ) φυγοκεντρείται σε 2000 στροφές (rpm) για τρία λεπτά και το υπερκείμενο αποθηκεύεται σε Eppendorf στους -20 °C.

4.Αντιδραστήρια για εκχύλιση και HPLC-FL

- Ακετονιτρίλιο, CHROMASOLV, for HPLC, gradient grade, >99.9%, Sigma-Aldrich
- Φορμικό οξύ, 98-100% puriss p.a, Reag. ACS/ Ph.Eur. /USP, Riedel de Haen
- Νερό υπερκάθαρο, Milli-Q Water Purification system Millipore
- Bisphenol A, (CAS no: 80057, Lot no: BCBW7911), Sigma-Aldrich

5.Οργανολογία HPLC-UV / FL

Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το σύστημα HPLC/MS-MS, Agilent 6430. Το σύστημα περιλαμβάνει:

- απαερωτή (degasser model G4225A)
- αντλία χρωματογραφίας (binary pump model G1312B)
- αυτόματο δειγματολήπτη (autosampler model G1329b)
- στατική φάση (thermostated column compartment model G1316A)
- ανιχνευτή UV (diode array detector model G4212B)
- ανιχνευτή φθορισμού (FLD model: G1321A) και
- διάταξη ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας (Agilent triple quadrupole mass spectrometer model G6430).

Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των λογισμικών ελέγχου και επεξεργασίας Agilent MassHunter QQQ Control Console και Qualitative and Quantitative Data Analysis.

6. Συνθήκες της HPLC-UV/FL

Για την επιλογή του κατάλληλου συστήματος ανίχνευσης, οι ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- UV με μήκη κύματος: α) 227 nm, στο οποίο παρουσιάζει το μέγιστο της απορρόφησης η BPA και β) 275 nm.
- Φθορισμού.

Στα πλαίσια της βελτίωσης του χρωματογραφικού διαχωρισμού βασικός στόχος ήταν η επίτευξη της μεγαλύτερης δυνατής ευαισθησίας, έτσι εγκαταλείφθηκε η αρχική ιδέα χρήσης του UV ανιχνευτή, καθώς η ένταση του σήματος ήταν περιορισμένη στις μικρότερες συγκεντρώσεις της BPA. Για το λόγο αυτό, επιλέχτηκε ο φθορισμομετρικός ανιχνευτής που έδωσε πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα και χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στη βιβλιογραφία. Σε αυτή την περίπτωση δοκιμάστηκαν διάφορα μήκη κύματος διέγερσης (excitation wavelength) και εκπομπής (emission wavelength): α) μονό μήκος κύματος διέγερσης=230 nm με μήκος κύματος εκπομπής= 313 nm, β) μονό μήκος κύματος διέγερσης =275 nm με μήκος κύματος εκπομπής = 313 nm, γ) διπλό μήκος κύματος διέγερσης =275 nm και 230 nm με μήκος κύματος εκπομπής =313 nm, και δ) διπλό μήκος κύματος διέγερσης =275 nm και 230 nm με μήκος κύματος εκπομπής =306 nm. Τα βέλτιστα επίπεδα ευαισθησίας επιτεύχθηκαν με τον συνδυασμό του μονού μήκους κύματος διέγερσης στα 230 nm με μήκος κύματος εκπομπής στα 313 nm.

Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων στην χρωματογραφία υψηλής πίεσης είναι πρωταρχικής σημασίας για την επίτευξη όσο το δυνατόν μεγαλύτερης έντασης κορυφών με στόχο την αύξηση της ευαισθησίας. Οι παράμετροι που επιλέχθηκαν να δοκιμαστούν ήταν: α) η ταχύτητα ροής και β) οι όγκοι του ισοκρατικού εκλουστικού συστήματος ακετονιτρίλιο (0.1% μυρμηγκικό οξύ) : νερό (0.1% μυρμηγκικό οξύ) και γ) ο όγκος έγχυσης. Οι τελικές συνθήκες με τις οποίες επιτεύχθηκαν οξείες κορυφές με καλή συμμετρία σε μικρούς χρόνους ανάλυσης ήταν μίγμα διαλύτη 50:50 (v/v) ακετονιτρίλιου (0.1% μυρμηγκικό οξύ) : νερού (0.1% μυρμηγκικό οξύ), ταχύτητα ροής 0.5 ml/min και όγκος έγχυσης 5 μ L. Τέλος, για την καλύτερη σταθερότητα του χρωματογραφικού αποτελέσματος και την αποφυγή σφαλμάτων επιλέχθηκε ο χώρος της στήλης να έχει σταθερή θερμοκρασία στους 30°C.

Οι τελικές συνθήκες της HPLC-FL φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 2.

Πίνακας 2: Τελικές συνθήκες της HPLC-FL.

Στήλη	FluoroSep-RP Phenyl 5μ 60 Å 25cm x 4.0mm Cat# 154211-FSP Serial# 19104-14-83-51554 ES Industries
Θερμοκρασία στήλης	30°C
Κινητή φάση	A= Νερό με 0.1% μυρμηγκικό οξύ B= Ακετονιτρίλιο με 0.1% μυρμηγκικό οξύ
Ταχύτητα ροής	0.5 ml/min
Ισοκρατικό σύστημα έκλουσης	50% A: 50% B
Όγκος έγχυσης	5 μ L
Χρόνος τερματισμού	3 min
Ανιχνευτής φθορισμού	Mono Excitation wavelength= 230 nm Emission wavelength= 313 nm
Ανιχνευτής UV	227 nm, 275 nm

7.Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Αρχικά, παρασκευάστηκε το πυκνό πρότυπο διάλυμα της BPA σε συγκέντρωση 940 μ g/mL. Για το σκοπό αυτό, ζυγίστηκαν και διαλυτοποιήθηκαν 9.4 mg BPA σε ογκομετρικό κύλινδρο των 10 mL με την προσθήκη ακετονιτριλίου και ισχυρή ανάδευση (vortex) για 1 min. Η διατήρηση του διαλύματος εργασίας (stock) έγινε στους -20°C.

Από το stock διάλυμα παρασκευάστηκε με αραιώση το διάλυμα με συγκέντρωση 50 μ g/mL και από αυτό προέκυψε με υποδιπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις η σειρά των προτύπων διαλυμάτων με συγκεντρώσεις από 25 μ g/mL έως $9.5 \cdot 10^{-5}$ μ g/mL.

8.Απομόνωση της BPA σε δείγματα πλάσματος σπέρματος και ωοθυλακικού υγρού

Συνολικά 36 δείγματα σπέρματος και ωοθυλακικού υγρού εκτιμήθηκαν. Τα δείγματα φέρονται σε eppendorfs του 1 mL με αντίστοιχο κωδικό και αποθηκεύονται σε θερμοκρασία -20°C μέχρι την ανάλυσή τους. Για την

εκχύλιση της BPA, η διαδικασία περιλαμβάνει ύστερα από απόψυξη τη μεταφορά 100 μL από το υπό εξέταση δείγμα σε errendorf του 1 mL και προσθήκη τριπλάσιου όγκου (300 μL) ακετονιτριλίου. Ακολουθεί ανάδευση των δειγμάτων για 1 min, παραμονή τους σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 1800 rpm για 15 min. Τα υπερκείμενα φιλτράρονται με τη χρήση φίλτρου 0.2 μM και μεταφέρονται σε HPLC φιαλίδια των 2 mL, ώστε να ακολουθήσει ο ποσοτικός προσδιορισμός της BPA με HPLC-FL.

9.Επεξεργασία αποτελεσμάτων

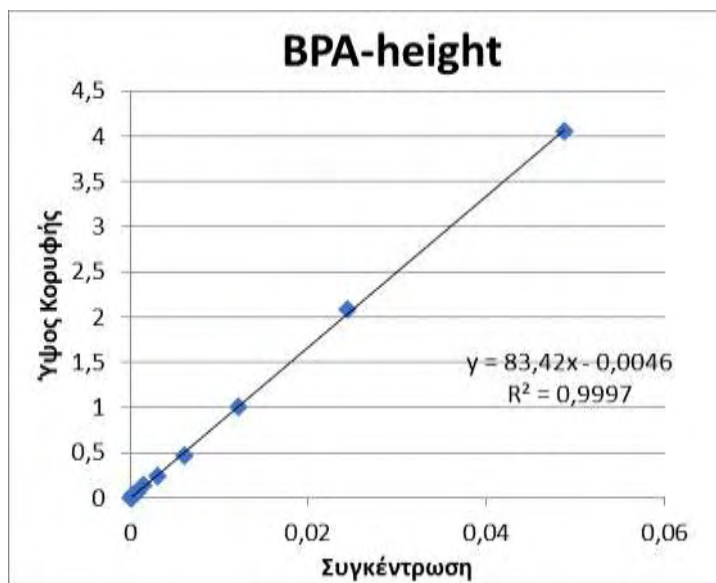
Όπως αναφέρθηκε, κάνουμε εγχύσεις από το κάθε πρότυπο διάλυμα καθώς και από τα δείγματα. Σημειώνουμε τους χρόνους ανάσχεσης (tR), για κάθε συγκέντρωση πρότυπης ουσίας. Ταυτοποιούμε τη δισφαινόλη A συγκρίνοντας τον χρόνο ανάσχεσης της δισφαινόλης A των προτύπων με τους χρόνους ανάσχεσης των χρωματογραφικών κορυφών στο χρωματογράφημα των δειγμάτων. Ολοκληρώνουμε τις αντίστοιχες κορυφές, σημειώνουμε το μέγιστο ύψος και κατασκευάζουμε καμπύλη αναφοράς. Στον Πίνακα 3 σημειώνονται οι τιμές ύψους των χρωματογραφικών κορυφών της δισφαινόλης A που λήφθηκαν κατά τη χρωματογραφική ανάλυση των προτύπων της, καθώς και ο χρόνος ανάκτησης σύμφωνα με τις παραπάνω συνθήκες.

Πίνακας 3: Οι τιμές του ύψους και ο χρόνος ανάκτησης των χρωματογραφικών κορυφών της δισφαινόλης A όπως προέκυψαν κατά τη χρωματογραφική ανάλυση των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης.

Συγκέντρωση BPA ($\mu\text{g/ml}$)	Ύψος	Χρόνος Ανάκτησης
1.5625	116.6	1.166
0.78125	60.78	1.166
0.390625	30.97	1.166
0.1953125	15.65	1.166
0.09765625	7.89	1.166
0.048828125	4.05	1.166
0.024414063	2.08	1.166

0.012207031	1.01	1.166
0.006103516	0.47	1.166
0.003051758	0.24	1.166
0.001525879	0.14	1.166
0.000762939	0.06	1.166
0.00038147	0.04	1.166
0.000190735	0.002	1.166
9.53674E-05	0.001	1.159

Από τις τιμές του πίνακα κατασκευάστηκε η παρακάτω πρότυπη καμπύλη.



Εικόνα 4: Πρότυπη καμπύλη διαφαινόλης A

Με βάση την καμπύλη αναφοράς, υπολογίζεται η συγκέντρωση διαφαινόλης A του «άγνωστου» δείγματος.

10. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση για την συσχέτιση της ποσότητας διαφαινόλης A (BPA) στα δείγματα έγινε με χρήση του Microsoft Office Excel.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στους Πίνακες 4 και 5 που ακολουθούν φαίνονται τα χαρακτηριστικά των γυναικών και των αντρών, που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη. Στα χαρακτηριστικά των γυναικών εντάσσονται η ηλικία, ο δείκτης μάζας σώματος, ο αριθμός των ωαρίων που ελήφθησαν, τα ποσοστά γονιμοποίησης, ο αριθμός των εμβρύων καθώς και η ποσότητα δισφαινόλης Α που ανιχνεύθηκε στο ωοθυλακικό υγρό. Στα χαρακτηριστικά των αντρών συμπεριλαμβάνονται η ηλικία, ο δείκτης μάζας σώματος, ο όγκος του σπέρματος που συλλέχθηκε, η συγκέντρωση καθώς και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων.

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά των γυναικών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	MEAN±SD
Ηλικία	37,83±1,02
BMI	24,79±1,28
Αριθμός ωαρίων	5,12±0,61
Ποσοστό γονιμοποίησης	43,20±5,90
Αριθμός εμβρύων	1,11±0,30
BPA (ng/ml)	29.65±5,81

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά των αντρών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Το PRM% αφορά το ποσοστό της προοδευτικής κίνησης των σπερματοζωαρίων (a+b), το NPM το ποσοστό της μη προοδευτικής κίνησης (c) και το IM το ποσοστό της πλήρους ακινησίας (d).

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	ΜΕΑΝ±SD
Ηλικία	39,7±1,30
BMI	28,46±1,47
Όγκος (mL)	3,78±0,36
Συγκέντρωση (10⁶/mL)	38,73±8,13
PRM% (a+b)	49,18±7,15
NPM% (c)	15,27±2,74
IM% (d)	35,55±6,98

Από το χρωματογράφημα για κάθε δείγμα (**Εικόνα 5**) που προέκυψε από την Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης με ανιχνευτή φθορισμού (HPLC-FLD) καθώς και τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης υπολογίστηκε η συγκέντρωση της δισφαινόλης Α στα δείγματα. Στο μεγαλύτερο ποσοστό των ωοθυλακικών υγρών ανιχνεύθηκε BPA ενώ σε ένα μικρότερο ποσοστό όχι. Αξίζει να σημειωθεί πως σε κανένα από τα δείγματα του πλάσματος σπέρματος δεν ανιχνεύτηκε δισφαινόλη Α.



Εικόνα 5: Απεικόνιση χρωματογραφημάτων από τα δείγματα ωοθηλακικού υγρού τα οποία έδωσαν υψηλά επίπεδα BPA. Ο χρόνος ανάκτησης είναι στα 1.224 min.

Με βάση τα δεδομένα αυτά έγινε στατιστική ανάλυση για την διερεύνηση της συσχέτισης της δυσφαινόλης Α με την ηλικία της γυναίκας, το δείκτη μάζας σώματος, τον αριθμό των ωαρίων και των εμβρύων καθώς και τα ποσοστά γονιμοποίησης. Από τη στατιστική ανάλυση που διεξήχθη δεν φαίνεται να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της ποσότητας της δυσφαινόλης Α στο ωοθυλακικό υγρό και των επιμέρους παραμέτρων (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης μεταξύ της δισφαινόλης Α και των επιμέρους παραμέτρων.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	R	p value
Ηλικία	0.0686	0.744558
BMI	0.0324	0.07563
Αριθμός ωαρίων	0.3617	0.069491
Ποσοστό γονιμοποίησης	-0.3696	0.361445
Αριθμός εμβρύων	0.1906	0.87781

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η δισφαινόλη Α (BPA) όπως έχει ήδη αναφερθεί έχει χρησιμοποιηθεί από τη δεκαετία του 1950, σε συσκευασίες τροφίμων, βιομηχανικά υλικά, προϊόντα προσωπικής υγιεινής κα. Ο καθένας εκτίθεται σε BPA μέσω του δέρματος, της εισπνοής και του πεπτικού συστήματος. Η BPA διαταράσσει τα ενδοκρινικά μονοπάτια, επειδή έχει ασθενείς οιστρογονικές, αντιανδρογονικές και αντιθυρεοειδικές δράσεις. Παρά το γρήγορο μεταβολισμό, η BPA μπορεί να συσσωρευτεί σε διαφορετικούς ιστούς. Πολλοί ερευνητές απέδειξαν τον αντίκτυπο της BPA στην ανθρώπινη ανάπτυξη, το μεταβολισμό και τέλος στο αναπαραγωγικό σύστημα. Υπάρχουν ολοένα και περισσότερες ενδείξεις ότι η BPA έχει αντίκτυπο στην ανθρώπινη γονιμότητα και είναι υπεύθυνη για αναπαραγωγικές παθολογίες.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας υποθέσαμε ότι η παρουσία δισφαινόλης Α στο θυλακικό μικροπεριβάλλον καθώς και στο σπέρμα μπορεί να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη και τη λειτουργία των γαμετών. Ως εκ τούτου, στοχεύσαμε πρώτον να προσδιορίσουμε τις συγκεντρώσεις BPA στο ωθυλακικό υγρό των γυναικών και το πλάσμα του σπέρματος των αντρών που υποβλήθηκαν σε διαδικασία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART). Συνεπώς, αυτές οι συγκεντρώσεις συσχετίστηκαν με το προφίλ του ασθενούς και τα χαρακτηριστικά ART. Συγκεκριμένα συνολικά συλλέχθηκαν 25 δείγματα ωθυλακικού υγρού και 11 δείγματα πλάσματος σπέρματος. Η εκτίμηση της δισφαινόλης Α στα δείγματα έγινε με χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης και ανιχνευτή φθορισμού (HPLC-FLD).

Από τα δείγματα που συλλέχθηκαν συνολικά ανιχνεύθηκε με HPLC-FLD δισφαινόλη Α στο μεγαλύτερο ποσοστό των ωθυλακικών υγρών ενώ σε ένα μικρό ποσοστό αυτών δεν ανιχνεύτηκε η ουσία. Σε κανένα από τα δείγματα του πλάσματος σπέρματος δεν έγινε ανίχνευση δισφαινόλης Α. Ένας πιθανός λόγος είναι η ευαισθησία της μεθόδου. Η μικρότερη συγκέντρωση standard που ήταν εφικτό να ανιχνεύσουμε με τον fluorescence detector στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες ήταν τα 0.0953 ng/mL. Η ανίχνευση φθορισμού είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μη-βασισμένη σε φασματογράφο μάζας

μέθοδος για τον προσδιορισμό της BPA τόσο σε τρόφιμα όσο και σε βιολογικά δείγματα. Το φθοροφόρο στο μόριο BPA είναι αρκετά ισχυρό. Τα όρια ανίχνευσης των μεθόδων HPLC-φθορισμού για τη BPA ποικίλουν ανάλογα με τη σύσταση των δειγμάτων και τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους εκχύλισης. Λόγω λοιπόν των πολύπλοκων συστάσεων των βιολογικών δειγμάτων, χωρίς φασματογράφο μάζας ως ανιχνευτή είναι πιθανό να δημιουργηθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα ή ψευδώς αρνητικά, επομένως η επιβεβαίωση με τη μέθοδο MS είναι απαραίτητη. Ωστόσο, μεταξύ όλων των αποτελεσμάτων που δημιουργήθηκαν με μεθόδους LC-φθορισμού, μόνο λίγοι ερευνητές επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα με LC-MS ή GC-MS (Cao, 2012). Από τη στατιστική ανάλυση που έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel για τη διερεύνηση της επίδρασης της δισφαινόλης A στον αριθμό των εμβρύων, των ωαρίων καθώς και το ποσοστό γονιμοποίησης δεν προέκυψε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Ένας πιθανός λόγος για τα αποτελέσματα αυτά αφενός είναι ο μικρός αριθμός των δειγμάτων που δεν επιτρέπει να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα και αφετέρου η ευαισθησία της μεθόδου, καθώς μπορεί να προέκυψαν πολλά ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα στα δείγματα. Όπως ήδη αναφέρθηκε ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα των μεθοδολογιών χρωματογραφίας που δεν βασίζονται σε ανιχνευτή φασματογράφου μάζας είναι η έλλειψη εμπιστοσύνης στην αναγνώριση αιχμής και συνεπώς η δυνατότητα αναφοράς εσφαλμένων θετικών ή λανθασμένων αποτελεσμάτων.

Όπως όμως έχει ήδη αναφερθεί η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στους ενδοκρινικούς διαταράκτες και τις επιδράσεις τους στην ανθρώπινη υγεία. Στα πλαίσια αυτής της επιστημονικής κινητοποίησης έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ενδοκρινικοί διαταράκτες οι οποίοι έχουν αρνητική επίδραση στο αναπαραγωγικό σύστημα του ανθρώπου, ένας από τους διαταράκτες αυτούς είναι η δισφαινόλη A. Η BPA σύμφωνα με τη βιβλιογραφία φαίνεται να επηρεάζει την ωρίμανση του ωαρίου (Santangeli *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2017). Οι υπογόνιμες γυναίκες έχουν υψηλότερα επίπεδα BPA στον ορό σε σύγκριση με τις γόνιμες γυναίκες. Στις γυναίκες που υποβάλλονται σε θεραπεία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, υψηλότερο επίπεδο BPA στα ούρα έχει αρνητική συσχέτιση με την ωρίμανση των

ωοκυττάρων και τις μέγιστες συγκεντρώσεις οιστραδιόλης (Mok-Lin *et al.*, 2010). Επίσης έχει αναφερθεί ότι σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε ICSI, υψηλότερη συγκέντρωση BPA στον ορό συνδέθηκε με μειωμένη πιθανότητα ώριμων ωοκυττάρων (Fujimoto *et al.*, 2011). Παρόλα αυτά δεν αναφέρουν όλες οι επιδημιολογικές μελέτες μια συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης του BPA και των αποτελεσμάτων γονιμότητας. Ο Buck Louis και οι συνεργάτες του δεν βρήκαν συσχέτισμό μεταξύ των συνολικών συγκεντρώσεων BPA στο ουροποιητικό και της εξασθένησης της γονιμότητας σε υγιείς γυναίκες (Buck Louis *et al.*, 2014). Ωστόσο αξίζει να αναφερθεί ότι όλες αυτές οι μελέτες δεν έλαβαν υπόψη τους πιθανούς τροποποιητικούς παράγοντες, όπως η συνύπαρξη με άλλα χημικά.

Σχετικά με την αρνητική επίδραση της δισφαινόλης στην αναπαραγωγική υγεία του άντρα υπάρχουν επίσης πολλά επιστημονικά δεδομένα. Δεν αμφισβητείται μάλιστα ότι η BPA διαταράσσει τη σπερματογένεση (Lassen *et al.*, 2014). Μεταξύ των ζευγαριών που χρειάζονται θεραπεία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, στο 98% των ασθενών βρέθηκε BPA στα δείγματα ούρων και το επίπεδό τους συσχετίστηκε αρνητικά με τον αριθμό και την κινητικότητα του σπέρματος (Meeker *et al.*, 2011). Η έκθεση σε BPA σχετίζεται επίσης με τη μείωση της δραστηριότητας του αντιοξειδωτικού συστήματος, με αποτέλεσμα το οξειδωτικό στρες, την πιο κοινή αιτία βλάβης του σπέρματος (Wang *et al.*, 2014). Ωστόσο, πρέπει να τονίσουμε ότι η έκθεση στο BPA δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας που διαταράσσει την παραγωγή σπέρματος. Ακόμα, υπάρχουν μερικές παρατηρήσεις που αποφέρουν αντίθετα αποτελέσματα όπως ο Meeker με τους συνεργάτες οι οποίοι εξέτασαν τη συσχέτιση των συγκεντρώσεων BPA ούρων με παραμέτρους σπέρματος και βλάβες DNA σε αρσενικούς συντρόφους υπογόνιμων ζευγαριών και ανέφεραν ότι «οι συγκεντρώσεις BPA στα ούρα σχετίζονταν αρνητικά με τη συγκέντρωση του σπέρματος, τη φυσιολογική μορφολογία και τη βλάβη του DNA του σπέρματος» (Meeker, Calafat and Hauser, 2010).

Όπως είναι λοιπόν φανερό τα επιστημονικά δεδομένα είναι πολλά και αντικρουόμενα. Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες και η επίδραση τους στην αναπαραγωγική υγεία είναι ένα θέμα που απασχολεί και θα απασχολεί την επιστημονική κοινότητα. Πιο συγκεκριμένα η δισφαινόλη A θα πρέπει να

ερευνηθεί περισσότερο καθώς βρίσκεται σε καθημερινή βάση κοντά στον ανθρώπινο οργανισμό. Η μέθοδος η οποία μπορεί να δώσει τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα για την ανίχνευση της είναι η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης με φασματογράφο μάζας ως ανιχνευτή λόγω της υψηλής ευαισθησίας της μεθόδου και της ακρίβειας των αποτελεσμάτων. Είναι αδιαμφισβήτητα ένας τομέας που μένει να δοθούν μελλοντικά απαντήσεις σε πολλά ερωτήματα που απασχολούν την επιστημονική κοινότητα και γνώμη.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ART	Assisted Reproductive Technology	Τεχνολογία Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής
BPA	Bisphenol-A	Δισφαινόλη- A
DBP	Dibutyl phthalate	Φθαλικός διβουτυλεστέρας
DDT	p,p'-Dichloro-diphenyl-trichloroethane	π, π'-διχλωρο-διφαινυλοτριχλωροαιθάνιο
DEHP	Bis(2-ethylhexyl)phthalate	Φθαλικός δι-(2-αιθυλοεξυλο)εστέρας
DES	Diethylstilbestrol	Διαιθυλοστιλβεστρόλη
E2	Estradiol	Οιστραδιόλη
EDCs	Endocrine-disrupting chemicals	Χημικά προϊόντα που προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές
Eα	Estrogen receptor alpha	Υποδοχέας οιστρογόνου άλφα
Eβ	Estrogen receptor beta	Υποδοχέας οιστρογόνου βήτα
GC-MS	Gas chromatography–mass spectrometry	Αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας
HPLC	High-performance liquid chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης
HPLC-FLD	High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης με ανίχνευση φθορισμού
LC-MS	Liquid chromatography–mass spectrometry	Υγρή Χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας

PBBs	Polybrominated biphenyls	Πολυβρωμιωμένα διφαινύλια
PCBs	Polychlorinated biphenyls	Πολυχλωριωμένα διφαινύλια
TDI	Tolerable daily intake	Ανεκτή Ημερήσια Πρόσληψη
UV/Vis	Ultraviolet– visible spectroscopy	Υπεριώδης ορατή φασματοσκοπία
ΠΟΥ	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Akingbemi, B. T. *et al.* (2001) *Modulation of Rat Leydig Cell Steroidogenic Function by Di(2-Ethylhexyl)Phthalate 1*, *BIOLOGY OF REPRODUCTION*.

Bamigboye, A. A. and Morris, J. (2003) 'Oestrogen supplementation, mainly diethylstilbestrol, for preventing miscarriages and other adverse pregnancy outcomes', *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Wiley. doi: 10.1002/14651858.cd004353.

Biro, F. (2013) 'Early puberty tied to obesity', *Pediatric Annals*, p. 479. doi: 10.1542/peds.2012-3773.

Blatt, J. *et al.* (2003) *Clinical and Laboratory Observations Ovarian Carcinoma in an Adolescent With Transgenerational Exposure to Diethylstilbestrol*.

Buck Louis, G. M. *et al.* (2014) 'Urinary bisphenol A, phthalates, and couple fecundity: The Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment (LIFE) Study', *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc., 101(5), pp. 1359–1366. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.01.022.

Cao, X. L. (2012) 'A review recent development on analytical methods for determination of bisphenol a in food and biological samples', *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, pp. 2795–2829. doi: 10.1080/10826076.2012.720325.

Carlsen, E. *et al.* (no date) *Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years*.

Casals-Casas, C. and Desvergne, B. (2011) 'Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption', *Annual Review of Physiology*. Annual Reviews, 73(1), pp. 135–162. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142200.

Centola, G. M. *et al.* (2016) 'Decline in sperm count and motility in young adult men from 2003 to 2013: Observations from a U.S. sperm bank', *Andrology*. Blackwell Publishing Ltd, 4(2), pp. 270–276. doi: 10.1111/andr.12149.

Coticchio, G. *et al.* (2004) 'What criteria for the definition of oocyte quality?', in *Annals of the New York Academy of Sciences*. New York Academy of Sciences, pp. 132–144. doi: 10.1196/annals.1335.016.

Crain, D. A. *et al.* (2008) 'Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing', *Fertility and Sterility*, 90(4), pp. 911–940. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.08.067.

Diamanti-Kandarakis, E. *et al.* (2009) 'Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement', *Endocrine Reviews*, pp. 293–342. doi: 10.1210/er.2009-0002.

Fujimoto, V. Y. *et al.* (2011) 'Serum unconjugated bisphenol A concentrations in women may adversely influence oocyte quality during in vitro fertilization', *Fertility and Sterility*, 95(5), pp. 1816–1819. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.11.008.

Geens, T. *et al.* (2012) 'A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A', *Food and Chemical Toxicology*, pp. 3725–3740. doi: 10.1016/j.fct.2012.07.059.

Giesy, J. P. *et al.* (no date) *Keynote papers Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples*. Available at: www.elsevier.com/locate/marpolbul.

Gore, A. C. *et al.* (2015) 'EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals', *Endocrine Reviews*, 36(6), pp. E1–E150. doi: 10.1210/er.2015-1010.

Halldin, K. *et al.* (2003) 'Reproductive impairment in Japanese quail (*Coturnix japonica*) after in ovo exposure to o,p'-DDT', *Archives of Toxicology*. Springer Verlag, 77(2), pp. 116–122. doi: 10.1007/s00204-002-0417-8.

'hayes2002' (no date).

'herbst1971' (no date).

Higuchi, T. T. *et al.* (2003) 'Effects of dibutyl phthalate in male rabbits following in utero, adolescent, or postpubertal exposure', *Toxicological Sciences*, 72(2), pp. 301–313. doi: 10.1093/toxsci/kfg036.

Hougaard, K. S. *et al.* (2009) 'Increased incidence of infertility treatment among women working in the plastics industry', *Reproductive Toxicology*, 27(2), pp. 186–189. doi: 10.1016/j.reprotox.2009.01.003.

- Jefferson, W. N., Patisaul, H. B. and Williams, C. J. (2012) 'Reproductive consequences of developmental phytoestrogen exposure', *Reproduction*, pp. 247–260. doi: 10.1530/REP-11-0369.
- Kishikawa, N., Ohyama, K. and Kuroda, N. (2006) *Human Biomonitoring of Endocrine Disrupting Chemicals by HPLC Methods, Current Analytical Chemistry*.
- Lassen, T. H. *et al.* (2014) 'Urinary bisphenol a levels in young men: Association with reproductive hormones and semen quality', *Environmental Health Perspectives*. Public Health Services, US Dept of Health and Human Services, 122(5), pp. 478–484. doi: 10.1289/ehp.1307309.
- Latchney, S. E., Fields, A. M. and Susiarjo, M. (2018) 'Linking inter-individual variability to endocrine disruptors: insights for epigenetic inheritance', *Mammalian Genome*. Springer New York LLC, 29(1–2), pp. 141–152. doi: 10.1007/s00335-017-9729-0.
- Machtinger, R. *et al.* (2013) 'Bisphenol-A and human oocyte maturation in vitro', *Human Reproduction*. Oxford University Press, 28(10), pp. 2735–2745. doi: 10.1093/humrep/det312.
- Meeker, J. D. *et al.* (2004) 'The relationship of urinary metabolites of carbaryl/naphthalene and chlorpyrifos with human semen quality', *Environmental Health Perspectives*, 112(17), pp. 1665–1670. doi: 10.1289/ehp.7234.
- Meeker, J. D. *et al.* (2011) 'Urinary concentrations of parabens and serum hormone levels, semen quality parameters, and sperm DNA damage', *Environmental Health Perspectives*, 119(2), pp. 252–257. doi: 10.1289/ehp.1002238.
- Meeker, J. D., Calafat, A. M. and Hauser, R. (2010) 'Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic', *Environmental Science and Technology*, 44(4), pp. 1458–1463. doi: 10.1021/es9028292.
- Mok-Lin, E. *et al.* (2010) 'Urinary bisphenol A concentrations and ovarian

response among women undergoing IVF', *International Journal of Andrology*, 33(2), pp. 385–393. doi: 10.1111/j.1365-2605.2009.01014.x.

Mouritsen, A. *et al.* (2010) 'Hypothesis: Exposure to endocrine-disrupting chemicals may interfere with timing of puberty', in *International Journal of Andrology*, pp. 346–359. doi: 10.1111/j.1365-2605.2010.01051.x.

Munguía-López, E. M. *et al.* (2005) 'Migration of bisphenol A (BPA) from can coatings into a fatty-food simulant and tuna fish', *Food Additives and Contaminants*, 22(9), pp. 892–898. doi: 10.1080/02652030500163674.

Newbold, R. R. *et al.* (1998) *Increased tumors but uncompromised fertility in the female descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol, Carcinogenesis*.

Newbold, R. R. *et al.* (2000) *Proliferative lesions and reproductive tract tumors in male descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol malignant changes in the developmentally DES-exposed, Carcinogenesis*.

Newbold, R. R. (2008) 'Prenatal exposure to diethylstilbestrol (DES)', *Fertility and Sterility*. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.01.062.

Nordkap, L. *et al.* (2012) 'Regional differences and temporal trends in male reproductive health disorders: Semen quality may be a sensitive marker of environmental exposures', *Molecular and Cellular Endocrinology*, pp. 221–230. doi: 10.1016/j.mce.2011.05.048.

Patiño-García, D. *et al.* (2018) 'Reproductive alterations in chronically exposed female mice to environmentally relevant doses of a mixture of phthalates and alkylphenols', *Endocrinology*. Oxford University Press, 159(2), pp. 1050–1061. doi: 10.1210/en.2017-00614.

Petro, E. M. L. *et al.* (2012) 'Endocrine-disrupting chemicals in human follicular fluid impair in vitro oocyte developmental competence', *Human Reproduction*. Oxford University Press, 27(4), pp. 1025–1033. doi: 10.1093/humrep/der448.

Rochester, J. R. (2013) 'Bisphenol A and human health: A review of the literature', *Reproductive Toxicology*, pp. 132–155. doi:

10.1016/j.reprotox.2013.08.008.

Routledge, E. J. *et al.* (2000) 'Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) α and ER β ', *Journal of Biological Chemistry*, 275(46), pp. 35986–35993. doi: 10.1074/jbc.M006777200.

Santangeli, S. *et al.* (2017) 'Effects of BPA on female reproductive function: The involvement of epigenetic mechanism', *General and Comparative Endocrinology*. Academic Press Inc., 245, pp. 122–126. doi: 10.1016/j.ygcen.2016.08.010.

Sifakis, S. *et al.* (2017) 'Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems', *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Elsevier B.V., pp. 56–70. doi: 10.1016/j.etap.2017.02.024.

Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E. and Main, K. M. (2001) *Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects*, *Human Reproduction*.

Souter, I. *et al.* (2013) 'The association of bisphenol-A urinary concentrations with antral follicle counts and other measures of ovarian reserve in women undergoing infertility treatments', *Reproductive Toxicology*, 42, pp. 224–231. doi: 10.1016/j.reprotox.2013.09.008.

Swan, S. H. *et al.* (2003) 'Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males.', *Environmental Health Perspectives*, 111(4), pp. 414–420. doi: 10.1289/ehp.5927.

Titus-Ernstoff, L. *et al.* (2006) 'Menstrual and reproductive characteristics of women whose mothers were exposed in utero to diethylstilbestrol (DES)', *International Journal of Epidemiology*, 35(4), pp. 862–868. doi: 10.1093/ije/dyl106.

Uzumcu, M., Zama, A. M. and Oruc, E. (2012) 'Epigenetic mechanisms in the actions of endocrine-disrupting chemicals: Gonadal effects and role in female reproduction', *Reproduction in Domestic Animals*, 47(SUPPL.4), pp. 338–347.

doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02096.x.

Vandenberg, L. N. *et al.* (no date) *HUMAN EXPOSURE TO BISPHENOL A (BPA) Running Title: Human exposure to BPA.*

Virtanen, H. E., Jørgensen, N. and Toppari, J. (2017) 'Semen quality in the 21st century', *Nature Reviews Urology*. Nature Publishing Group, pp. 120–130. doi: 10.1038/nrurol.2016.261.

Wang, P. *et al.* (2014) 'Mitochondrion-mediated apoptosis is involved in reproductive damage caused by BPA in male rats', *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Elsevier, 38(3), pp. 1025–1033. doi: 10.1016/j.etap.2014.10.018.

Woodruff, T. J. *et al.* (2008) 'Proceedings of the Summit on Environmental Challenges to Reproductive Health and Fertility: executive summary', *Fertility and Sterility*, 89(2), pp. 281–300. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.10.002.

Zhou, C., Gao, L. and Flaws, J. A. (2017) 'Prenatal exposure to an environmentally relevant phthalate mixture disrupts reproduction in F1 female mice', *Toxicology and Applied Pharmacology*. Academic Press Inc., 318, pp. 49–57. doi: 10.1016/j.taap.2017.01.010.

Zhou, W. *et al.* (2017) 'Bisphenol A and Ovarian reserve among infertile women with polycystic Ovarian syndrome', *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI AG, 14(1). doi: 10.3390/ijerph14010018.