



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού οργανικών ρύπων
της ομάδας των διοξινών σε βιολογικά δείγματα και
μελέτη της συσχέτισης της έκθεσης σε
περιβαλλοντικούς παράγοντες με τα βιοχημικά
χαρακτηριστικά**

**Κλεοπάτρα- Χρυσούλα Κεδίκογλου
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού οργανικών ρύπων της ομάδας των διοξινών σε βιολογικά δείγματα και μελέτη της συσχέτισης της έκθεσης σε περιβαλλοντικούς παράγοντες με τα βιοχημικά χαρακτηριστικά

A.M.: 001307

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Ευάγγελος Μπακέας , Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Ευάγγελος Μπακέας , Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ
Λεόντιος Λεοντιάδης, Ερευνητής Α, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος
Δανάη Κωστοπούλου, Ερευνήτρια Β, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ευάγγελος Μπακέας (Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ)

Εμμανουήλ Δασενάκης (Καθηγητής ΕΚΠΑ)

Αναστάσιος Οικονόμου (Καθηγητής ΕΚΠΑ)

Νικόλαος Καλογερόπουλος (Καθηγητής Χαροκοπείου
Πανεπιστημίου)

Χρήστος Κόκκινος (Επίκουρος Καθηγητής, ΕΚΠΑ)

Λεόντιος Λεοντιάδης (Ερευνητής Α, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»)

Δανάη Κωστοπούλου (Ερευνήτρια Β, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»)

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ : 07/05/2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επίδραση του περιβάλλοντος στην υγεία είναι ένα επιστημονικό πεδίο που προσελκύει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον διεθνώς, καθώς υπάρχουν επαρκείς ενδείξεις ότι πληθώρα χρόνιων ασθενειών προκαλείται από έναν περίπλοκο συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Ενώ το ανθρώπινο γονιδίωμα έχει αποκωδικοποιηθεί, για την μελέτη της επίδρασης του περιβάλλοντος στην υγεία υπάρχει ανάγκη ανάπτυξης εργαλείων που θα συμβάλλουν στην «ποσοτικοποίηση» του συνόλου των περιβαλλοντικών επιδράσεων. Ο όρος “exposome” αντιπροσωπεύει τη συνολική εκτίμηση της έκθεσης του ανθρώπου σε εσωτερικούς και εξωτερικούς παράγοντες από τη σύλληψη έως το θάνατό του. Βασικός πυλώνας της έρευνας πάνω στο “exposome” είναι η ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων για την εκτίμηση της συνολικής έκθεσης σε περιβαλλοντικούς ρύπους.

Οι ανθεκτικοί οργανικοί ρύποι (Persistent Organic Pollutants, POPs) είναι οργανικές ενώσεις πολύ σταθερές, τοξικές και ιδιαίτερα επιβλαβείς για τον άνθρωπο και το περιβάλλον οι οποίες διαθέτουν την ικανότητα να βιοσυσσωρεύονται στον οργανισμό των ανθρώπων και των ζώων. Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει σαν σκοπό την ανάπτυξη εργαλείων αναλυτικής χημείας για τη διερεύνηση των επιπτώσεων των POPs στην ανθρώπινη υγεία. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να εμφανίσουν τις τοξικές τους δράσεις ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξης των ppt. Συνεπώς είναι απαραίτητη η παρακολούθηση των επιπέδων των POPs για την προστασία του περιβάλλοντος και της ανθρώπινης υγείας. Η μελέτη επικεντρώθηκε στις ενώσεις της ομάδας των διοξινών και τις υπερφθοριωμένες ενώσεις. Ειδικότερα αναπτύχθηκαν εξειδικευμένες αναλυτικές μέθοδοι για τα τρόφιμα που εφαρμόστηκαν στην εκτίμηση της διατροφικής έκθεσης, η οποία αποτελεί την κύρια οδό «εξωτερικής» έκθεσης. Επιπλέον, αναπτύχθηκε αναλυτική μέθοδος για τον ορό αίματος με αυξημένη ευαισθησία, λόγω περιορισμένου όγκου δείγματος για τον προσδιορισμό των επιπέδων στον ανθρώπινο οργανισμό που αποτελεί την «εσωτερική» έκθεση. Τα εργαλεία αυτά μπορούν να χρησιμεύσουν στο εξής για

τη συστηματική παρακολούθηση αυτών των ρύπων στα τρόφιμα και στον γενικό πληθυσμό που είναι απαραίτητη για την προστασία της δημόσιας υγείας.

Η ανάπτυξη της μεθόδου για την ανάλυση των ενώσεων της ομάδας διοξινών στα τρόφιμα βασίστηκε στη χρήση νέου τύπου ενεργού άνθρακα σε συνδυασμό με άλλα χρωματογραφικά υλικά (silica και alumina). Τα κριτήρια ποιότητας που εξετάστηκαν κατά την ανάπτυξη της μεθόδου (ανάκτηση επισημασμένου προτύπου, ακρίβεια, αναπαραγωγιμότητα, ειδικότητα και τα όρια ποσοτικοποίησης) την καθιστούν αρκετά ευαίσθητη και εξειδικευμένη για την ανάλυση τροφίμων, ζωοτροφών και βιολογικών δειγμάτων και σε πλήρη συμφωνία με τις απαιτήσεις των σχετικών Ευρωπαϊκών Κανονισμών. Τα αποτελέσματα της μελέτης σε διεργαστηριακά δείγματα και σε δείγματα τροφίμων έδειξαν ότι ο νέος ενεργός άνθρακας έχει καλή ικανότητα διαχωρισμού των υπό μελέτη ενώσεων από το λίπος, ενώ διαχωρίζει επιτυχώς όλα τα ομοειδή με πολύ καλές ανακτήσεις. Συνεπώς αποτελεί αποτελεσματική μέθοδο για τον προσδιορισμό των ενώσεων της ομάδας των διοξινών (PCDDs, PCDFs και των non-ortho PCBs). Η μέθοδος για τα τρόφιμα, προσαρμόστηκε σε μικρότερη κλίμακα για να μπορεί να εφαρμοστεί στον περιορισμένο όγκο των δειγμάτων ορού (1 mL). Για το σκοπό αυτό έγινε χρήση μίας χρωματογραφικής στήλης η οποία περιέχει συνδυασμό δύο υλικών (silica και alumina). Με την ελάττωση των σταδίων, ελαχιστοποιήθηκε και η απώλεια του δείγματος κατά την προκατεργασία. Το συνολικό κόστος καθώς και ο χρόνος που απαιτείται για την ανάλυση, καθιστούν την παρούσα μέθοδο κατάλληλη για την εφαρμογή της σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε σε δείγματα ορού αίματος για τον προσδιορισμό των επιπέδων πολυχλωριωμένων διφαινυλίων (PCBs), τα οποία ανήκουν στην ομάδα των διοξινών, από εθελοντές που διαμένουν στην περιφέρεια Αττικής καθώς και στην περιοχή του Ασπρόπυργου. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων έδειξαν ότι τα δείγματα ορού των εθελοντών που κατοικούν στον Ασπρόπυργο παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα από εκείνα των εθελοντών που διαμένουν σε άλλες περιοχές της Αττικής. Οι αναλύσεις μεταβολομικής έδειξαν επίσης ότι τα πιο επιβαρυνμένα δείγματα ορού παρουσίασαν και αυξημένες συγκεντρώσεις σε μεταβολίτες που χαρακτηρίζονται

πιθανοί βιοδείκτες της έκθεσης σε PCBs. Στα δείγματα ορού των εθελοντών προσδιορίστηκαν επίσης τα επίπεδα υπερφθοριωμένων ενώσεων (PFASs) για τα οποία δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο πληθυσμών που μελετήθηκαν.

Στο πλαίσιο της διατριβής, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης των παραπάνω ενώσεων για το γενικό πληθυσμό της Ελλάδας. Μεγάλος αριθμός αντιπροσωπευτικών δειγμάτων από κατηγορίες τροφίμων που καταναλώνονται ευρέως στην Ελλάδα συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν κατά τα 14 χρόνια λειτουργίας του εργαστηρίου. Τα τελευταία δύο έτη οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής. Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού των συγκεντρώσεων των PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs συνδυάστηκαν με τα δεδομένα διαθεσιμότητας τροφίμων που συλλέχθηκαν σε έρευνα οικογενειακού προϋπολογισμού και βρίσκονται διαθέσιμα στο διαδίκτυο. Η κατηγορία τροφίμων με την υψηλότερη συνολική μέση συγκέντρωση είναι τα ψάρια/θαλασσινά και η ομάδα με τη χαμηλότερη μέση συγκέντρωση είναι τα φυτικά έλαια. Για τον γενικό ενήλικο πληθυσμό στην Ελλάδα, η μέση ημερήσια πρόσληψη σε PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs υπολογίστηκε $1.27 \text{ pg WHO-TEQ kg}^{-1}$ σωματικού βάρους, η οποία αντιστοιχεί σε εβδομαδιαία πρόσληψη $8.89 \text{ pg WHO-TEQ kg}^{-1}$ σωματικού βάρους. Η κατηγορία τροφίμων που συνεισφέρει τα μέγιστα στη συνολική διατροφική πρόσληψη σε PCDDs, PCDFs και PCBs είναι τα ψάρια/θαλασσινά. Η διατροφική έκθεση του γενικού πληθυσμού ενηλίκων στην Ελλάδα είναι κοντά στα κάτω όρια του εύρους τιμών ανεκτής ημερήσιας πρόσληψης ($\text{TDI } 1\text{-}4 \text{ pg WHO-TEQ kg}^{-1}$ σωματικού βάρους ημέρα^{-1}), όπως προτείνεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), ενώ είναι χαμηλότερη από το ανώτατο όριο εβδομαδιαίας πρόσληψης $\text{TWI } 14 \text{ pg WHO-TEQ kg}^{-1}$ σωματικού βάρους εβδομάδα^{-1} που προτάθηκε το 2001 από τη Scientific Committee on Food της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Πρόσφατα η Ευρωπαϊκή Αρχή για την ασφάλεια των τροφίμων (EFSA) δημοσίευσε νεότερη γνωμοδότηση με τίτλο: “Scientific opinion on the risk of animal and human health related to the presence of dioxins and dioxin-like PCBs in feed and food” στην οποία προτείνεται χαμηλότερο ανώτατο

όριο εβδομαδιαίας πρόσληψης (TWI) 2 pg WHO-TEQ kg⁻¹ σωματικού βάρους εβδομάδα⁻¹, με βάση νεότερα πειραματικά και επιδημιολογικά δεδομένα.

Όσον αφορά στα PFASs η εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη από τη διατροφή σε PFOA και PFOS του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας από τα προϊόντα τροφίμων είναι 0.48 και 0.90 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ αντίστοιχα, ενώ η πρόσληψη από το πόσιμο νερό είναι 0.006 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ για το PFOA και αμελητέα για το PFOS. Η εβδομαδιαία από τους στόματος πρόσληψη υπολογίστηκε 6.37 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους για το PFOS και 3.43 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους για το PFOA. Πρόσφατα προτάθηκαν τιμές TWI από την EFSA 13 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους⁻¹ για το PFOS και 6 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους εβδομάδα⁻¹ για το PFOA. Είναι φανερό ότι η έκθεση του ενήλικου πληθυσμού είναι σε χαμηλότερα επίπεδα από τις προτεινόμενες τιμές.

Λέξεις κλειδιά: Διατροφική έκθεση, βιοπαρακολούθηση, διοξίνες και παρόμοιες ενώσεις, υπερφθοριωμένες ενώσεις, exprosome

ABSTRACT

The impact of environment on human health is a scientific field very important for public health attracting interest from researchers worldwide, since there are adequate indications that the pathogenesis of major chronic conditions is caused by the combination of genetic and environmental factors. Despite the fact that the human genome has been decoded, analytical tools that will contribute to the “quantification” of the totality of environmental exposures need to be developed. “Exposome” represents the totality of internal and external human exposures from conception onwards. Exposome research requires the development of analytical methods for the determination of environmental exposures.

Persistent organic pollutants, POPs, are very stable, toxic and harmful compounds for humans and for the environment and tend to bioaccumulate in humans and in animal organisms. The aim of the present doctoral thesis is the development of analytical tools in order to examine the impact of POPs on human health. Recent studies have shown that the aforementioned compounds may present their deleterious effects even in very low concentrations (ppt). Consequently monitoring POPs levels is of major importance for the protection of public health and the environment. The present study focuses on dioxin and dioxin-like compounds as well as on perfluoralkylated substances. In particular, a specific analytical method for food analysis was developed and applied for the estimation of dietary exposure which forms the principal route of “external” exposure. Furthermore, a specific analytical method of high sensitivity, necessary due to the limited sample volume, was developed and applied to serum analysis to determine “internal” exposure to these compounds. In the context of the protection of public health, the analytical tools can be used for monitoring of these pollutants on a regular basis.

The applied analytical methodology for dioxin compounds in food was based on the use of an active carbon material in combination with other chromatographic materials (silica and alumina) for the specific separation of the compounds of interest. Quality criteria examined (% recovery, accuracy, reproducibility,

specificity, limit of quantification), proved the method sensitive and specific enough for food, feed and biological sample analysis. Furthermore the developed method is in accordance with the European Regulation requirements. Application of the method in interlaboratory trials samples as well as in real food samples showed that the new carbon material has high fat capacity and excellent efficiency for the separation of the congeners with good recovery values. Therefore, this method is suitable for the determination of dioxins and dioxin-like compounds (PCDDs, PCDFs and non-ortho PCBs). The above-mentioned analytical method developed for food analysis was adjusted in a lower scale to be applicable to the limited volume (1mL) of serum samples. For this purpose one chromatographic column with a combination of two materials (silica and alumina) was used. During sample preparation, the reduction of experimental steps led to lower sample losses. The total cost as well as the short time required render the method suitable for large sample population. This method was applied to serum samples for the determination of polychlorinated biphenyls (PCBs) which are compounds belonging to the dioxin group. The serum samples were collected from volunteers residing in various areas of the Prefecture of Athens, as well as from volunteers from Aspropyrgos. The results showed higher levels of PCBs in samples of Aspropyrgos inhabitants compared to the rest of the samples. Metabolomic analysis also showed that samples with higher PCB levels presented higher concentrations in metabolites which have been proposed as possible biomarkers of exposure to PCBs. Concerning perfluorinated substances (PFASs), which were also determined in serum samples, concentration levels were in the same range in both populations studied.

In the context of the doctoral thesis an estimation of the dietary intake in PCDDs, PCDFs and PCBs of the general population in Greece was attempted for the first time. Representative samples from various food categories were collected and analyzed during 15 years. For the time period 2016-2018, analyses of food products were carried out with the method developed in the present study. Occurrence data were combined with food availability data collected through household budget surveys presented by the Data Food Networking (DAFNE)

initiative, in order to assess the dietary exposure of the Greek population. The food group with the highest total mean upperbound WHO-TEQ concentration (PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs) was fish and seafood and the one with the lowest mean WHO-TEQ concentration was vegetable oil group. For adult Greek population the average daily intake in PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs is 1.27 pg WHO-TEQ kg⁻¹ body weight and the average weekly intake is 8.89 pg WHO-TEQ kg⁻¹ body weight. The main contributor to the total dietary intake is the fish and seafood group. Given the current toxicological data, the general background dietary exposure of the Greek population to these compounds is within the tolerable daily intake (TDI) range of 1-4 pg WHO-TEQ kg⁻¹ body weight day⁻¹ proposed by the WHO. However, recently the scientific panel of European Food Safety Authority (EFSA) suggested a tolerable weekly intake of 2 pg WHO-TEQ kg⁻¹ body weight, based on new experimental and epidemiological data.

Concerning perfluoroalkylated substances (PFASs), for the general Greek population the estimated average daily dietary intake in PFOA and PFOS, when applying the lowerbound concentrations of food samples is 0.48 and 0.90 ng kg⁻¹ body weight day⁻¹ respectively. Exposure due to tap water estimated for PFOA is 0.006 ng kg⁻¹ body weight day⁻¹ and negligible for PFOS. Oral weekly intake estimated is 6.37 ng kg⁻¹ body weight for PFOS and 3.43 ng kg⁻¹ body weight for PFOA. All estimated values are below the tolerable weekly intake values set by EFSA, 13 ng kg⁻¹ body weight week⁻¹ for PFOS and 6 ng kg⁻¹ body weight week⁻¹ for PFOA.

Keywords: Dietary exposure, biomonitoring, PCDD/Fs- PCBs, PFASs, exposome

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όσους συνεισέφεραν στην ολοκλήρωσή της.

Πρωτίστως ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Ευάγγελο Μπακέα για την ανάθεση της παρούσας εργασίας και τις πολύτιμες συμβουλές του κατά την εκπόνησή της.

Στην επιβλέπουσα Ερευνήτρια από το Εργαστήριο Φασματομετρίας Μάζας και Ανάλυσης Διοξινών Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», κ. Δανάη Κωστοπούλου, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για την ακούραστη καθοδήγηση, ουσιαστική συνδρομή και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε, χωρίς την οποία η εργασία αυτή δε θα ερχόταν σε πέρας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον επικεφαλής του Εργαστηρίου Φασματομετρίας Μάζας κ. Λεόντιο Λεοντιάδη για την εμπιστοσύνη που επέδειξε απέναντί μου, δίνοντάς μου την ευκαιρία να εργαστώ σε ένα άρτιο περιβάλλον εργαστηρίου, για τις κρίσιμες παρατηρήσεις και τον επιδέξιο τρόπο με τον οποίο επισήμανε λάθη ή παραλείψεις.

Νιώθω υποχρεωμένη έναντι του συνόλου του προσωπικού του εργαστηρίου, τον κ. Λεοντιάδη, την κ. Κωστοπούλου, την κ. Βασιλειάδου, αλλά και τις φίλες μου, την υποψήφια διδάκτωρα Νάντια Γρηγορίου και Ιωάννα Δασενάκη για την κατανόηση που επέδειξαν κατά το διάστημα εκπόνησης της διατριβής, αλλά και για το ευχάριστο κλίμα εργασίας που δημιούργησαν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της επταμελούς επιτροπής για τον χρόνο που αφιέρωσαν να μελετήσουν τη διατριβή μου, να παρευρεθούν στην υποστήριξή της και για τα εύστοχα σχόλιά τους.

Οφείλω να ευχαριστήσω το Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μηχανικής του Α.Π.Θ. με επικεφαλής τον κ. Σαρηγιάννη για την αποστολή δειγμάτων ορού και τη πραγματοποίηση μεταβολομικής ανάλυσης.

Ευχαριστώ θερμά την κ. Χαρά Ορφανίδου για την πολύτιμη βοήθειά της κατά τις αιμοληψίες που ήταν απαραίτητες για τη συλλογή δειγμάτων ορού.

Τέλος οφείλω απεριόριστη ευγνωμοσύνη στην οικογένειά μου, χωρίς την ανεκτίμητη υποστήριξη της οποίας, η εκπόνηση και συγγραφή της διατριβής θα είχαν παραμείνει μία ιδέα. Σε αυτήν αφιερώνω και την παρούσα εργασία, με την ελπίδα να αποτελεί μία ελάχιστη ανταμοιβή για όλα όσα έχει προσφέρει σε μένα μέχρι σήμερα.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	5
Πίνακας Περιεχομένων.....	13
Κατάλογος σχημάτων.....	19
Κατάλογος εικόνων.....	22
Κατάλογος πινάκων.....	23
Πρόλογος.....	26
Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ανθεκτικοί οργανικοί ρύποι (Persistent Organic Pollutants, POPs).....	29
1.1 Τρόπος εισαγωγής των POPs στο περιβάλλον	31
1.2 Οδοί έκθεσης του ανθρώπου στα POPs.....	33
1.3 Επιπτώσεις των POPs στην υγεία του ανθρώπου	34
1.3.1 Τα POPs ως ενδοκρινικοί διαταράκτες.....	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Διοξίνες και πολυχλωριωμένα διφαινύλια.....	37
2.1 Χημεία.....	37
2.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες	38
2.3 Πηγές και οδοί έκθεσης του ανθρώπου	39
2.4 Σχέση δομής και τοξικής δράσης.....	43
2.5 Έκφραση της τοξικότητας των ενώσεων της ομάδας των διοξινών ...	44
2.6 Μηχανισμός τοξικής δράσης.....	47
2.7 Περιστατικά οξείας έκθεσης	49
2.8 Επιδράσεις στα βιολογικά συστήματα	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Υπερφθοριωμένες ενώσεις.....	58

3.1	Χημεία, ιδιότητες και χρήσεις	58
3.2	Επιδράσεις στα βιολογικά συστήματα	60
3.3	Πιθανές οδοί έκθεσης	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Εκθεσείωμα- Exposome		64
4.1	Η έννοια του Exposome.....	64
4.2	Μέτρηση του exposome	70
4.3	Βιοδείκτες των PCDDs, PCDFs, PCBs, PFOS και PFOA.....	75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Προσδιορισμός των ενώσεων της ομάδας των διοξινών και των υπερφθοριωμένων ενώσεων.....		79
5.1	Ποσοτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των ενώσεων της ομάδας των διοξινών σε τρόφιμα	79
5.2	Ανάπτυξη μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό PCBs στον ορό αίματος.....	81
5.3	Ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων της οικογένειας των διοξινών με φασματομετρία μάζας.....	83
5.4	Ποσοτικός προσδιορισμός των υπερφθοριωμένων ενώσεων με φασματομετρία μάζας.....	84
5.5	Ισοτοπική αραίωση.....	85
5.6	Κριτήρια επικύρωσης αναλυτικής μεθόδου.....	86
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Σκοπιμότητα και στόχοι		89
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7		91
7.1	Συλλογή και συντήρηση δειγμάτων	91
7.1.1	Δείγματα τροφίμων.....	91
7.1.2	Δείγματα αίματος.....	92
7.2	Αντιδραστήρια	93

7.2.1	Πρότυπα διαλύματα.....	93
7.2.2	Λοιπά αντιδραστήρια και υλικά.....	98
7.3	Όργανα, συσκευές και υαλικά.....	100
7.3.1	Προσδιορισμός PCDDs, PCDFs, PCBs σε δείγματα τροφίμων και PCBs σε δείγματα αίματος.....	100
7.3.2	Προσδιορισμός PFASs σε δείγματα τροφίμων και αίματος.....	101
7.4	Πορεία εργασίας.....	102
7.4.1	Προσδιορισμός PCDDs, PCDFs και PCBs στα τρόφιμα.....	102
7.4.2	Προσδιορισμός PCBs στον ορό αίματος.....	107
7.4.3	Προσδιορισμός PFASs.....	108
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ		
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ανάπτυξη μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων της ομάδας των διοξινών σε τρόφιμα.....		
		112
8.1	Επικύρωση μεθόδου	115
8.1.1	Ειδικότητα μεθόδου.....	115
8.1.2	Όριο ποσοτικοποίησης (Limit of quantitation, LOQ).....	117
8.1.3	Ανάκτηση των επισημασμένων προτύπων.....	117
8.1.4	Ορθότητα και πιστότητα.....	118
8.2	Αποτελέσματα ανάλυσης PCDDs, PCDFs και PCBs σε δείγματα διεργαστηριακών δοκιμών	120
8.3	Προσδιορισμός PCDDs, PCDFs και PCBs σε δείγματα τροφίμων από προγράμματα εθνικού ελέγχου.....	121
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Επίπεδα πολυχλωριωμένων διφαινυλίων στο αίμα.....		
		125
9.1	Μεθοδολογία προσδιορισμού non-ortho, mono-ortho PCBs και indicator PCBs στον ορό αίματος.....	125
9.1.1	Ανάλυση δειγμάτων διεργαστηριακής δοκιμής.....	129

9.1.2	Δοκιμή ανάκτησης επισημασμένων και μη επισημασμένων προτύπων σε δείγμα ορού αίματος.....	130
9.2	Συγκεντρώσεις PCBs στα δείγματα ορού αίματος των 16 εθελοντών του προγράμματος HEALS	133
9.2.1	Σύγκριση των συγκεντρώσεων στα PCBs μεταξύ ανδρών και γυναικών	141
9.2.2	Προφίλ τιμών των ομοειδών ενώσεων PCBs σε ενδεικτικό δείγμα ορού αίματος.....	145
9.2.3	Σύγκριση των επιπέδων PCBs στον ορό αίματος των εθελοντών του HEALS με τα επίπεδα PCBs στον ορό εθελοντών της περιοχής του Ασπρόπυργου.....	146
9.3	Μετρήσεις μεταβολομικής.....	149
9.3.1	Συσχέτιση των συγκεντρώσεων PCBs στους ορούς με τη μεταβολομική ανάλυση.....	149
9.3.2	Σύγκριση των επιπέδων των μεταβολιτών για HP4 και HP6.....	155
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: Επίπεδα υπερφθοριωμένων ενώσεων στο αίμα		158
10.1	Μεθοδολογία προσδιορισμού PFASs στον ορό αίματος	158
10.2	Συγκεντρώσεις των PFASs στα δεκαέξι (16) δείγματα των εθελοντών του HEALS.....	158
10.2.1	Σύγκριση των συγκεντρώσεων των PFASs μεταξύ των φύλων (HPM και HPF).....	160
10.2.2	Συγκεντρώσεις των PFASs στα δείγματα του ορού αίματος από τους εθελοντές του Ασπρόπυργου.....	161
10.2.3	Σύγκριση των επιπέδων PFASs στον ορό αίματος των εθελοντών του HEALS και εθελοντών της περιοχής του Ασπρόπυργου.....	166
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11: Έκθεση του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας σε ενώσεις της ομάδας των διοξινών μέσω της διατροφής		169

11.1	Υπολογισμός της συνολικής ημερήσιας πρόσληψης σε PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs	169
11.2	Μέσες συγκεντρώσεις των PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs που προσδιορίστηκαν στα τρόφιμα από την Ελληνική αγορά	171
11.2.1	Προφίλ συγκεντρώσεων ομοειδών ενώσεων των PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs.....	182
11.3	Μέσες συγκεντρώσεις των indicator PCBs που προσδιορίστηκαν στα τρόφιμα από την Ελληνική αγορά.....	186
11.3.1	Διακύμανση συγκεντρώσεων ομοειδών ενώσεων των indicator PCBs.....	191
11.4	Επίπεδα συνολικής ημερήσιας πρόσληψης του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας σε PCDDs, PCDFs και PCBs	191
11.5	Συνεισφορά των ομάδων τροφίμων στο σύνολο της διατροφικής πρόσληψης PCDD/Fs, dioxin-like PCBs και indicator PCBs	196
11.6	Διακύμανση των επιπέδων PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs στα ψάρια/θαλασσινά και στο ελαιόλαδο κατά το χρονικό διάστημα 2002-2016.	198
11.7	Σύγκριση των επιπέδων έκθεσης του Ελληνικού πληθυσμού με αυτή άλλων χωρών για τα επίπεδα PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs.....	200
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12:	Έκθεση του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας σε υπερφθοριωμένες ενώσεις.....	204
12.1	Επίπεδα συγκεντρώσεων των PFASs σε Ελληνικά προϊόντα τροφίμων.....	204
12.2	Έκθεση του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας σε PFAAs μέσω της κατανάλωσης τροφίμων και πόσιμου νερού	208
12.3	Συνεισφορά των διαφορετικών ομάδων τροφίμων στη συνολική πρόσληψη των PFASs από του στόματος	212

12.4	Σύγκριση της έκθεσης του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας με άλλες χώρες.....	215
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ		
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13	218
13.1	Ανάπτυξη μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων της ομάδας των διοξινών σε τρόφιμα	218
13.2	Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό πολυχλωριωμένων διφαινυλίων στον ορό αίματος.....	219
13.3	Επίπεδα πολυχλωριωμένων διφαινυλίων και υπερφθοριωμένων ενώσεων στον ορό	220
13.4	Έκθεση του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας σε PCDDs, PCDFs και PCBs.....	221
13.5	Έκθεση του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας σε υπερφθοριωμένες ενώσεις.....	223
	Συντμήσεις- Αρκτικόλεξα- Ακρωνύμια.....	225
	Αναφορές.....	226

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Γενικοί μοριακοί τύποι των PCDDs, PCDFs και PCBs	37
Σχήμα 2: Γεγονότα που λαμβάνουν χώρα μετά την έκθεση σε διοξίνες	49
Σχήμα 3: Μοριακοί τύποι των PFOA και PFOS	58
Σχήμα 4: Παράγοντες κινδύνου που συμβάλουν στη θνησιμότητα από χρόνιες ασθένειες	68
Σχήμα 5: Πορεία εργασίας για την ανάλυση διοξινών στα τρόφιμα	114
Σχήμα 6: Α. Χρωματογράφημα PCDD/Fs (α) δείγμα τυφλού (β) δείγμα τυφλού με επισημασμένα πρότυπα, Β. Χρωματογράφημα non-ortho PCBs (α) δείγμα τυφλού (β) δείγμα τυφλού με επισημασμένα πρότυπα.	116
Σχήμα 7: Α. % Ανακτήσεις των PCDD/Fs επισημασμένων εσωτερικών προτύπων, Β. % Ανακτήσεις των dioxin-like PCBs επισημασμένων εσωτερικών προτύπων	118
Σχήμα 8: Χρωματογράφημα τυφλού δείγματος	127
Σχήμα 9: Χρωματογράφημα δείγματος ορού, εμβολιασμένου με γνωστές ποσότητες non-ortho, mono-ortho, και indicators PCBs.	128
Σχήμα 10: Συγκεντρώσεις WHO-TEQ non-ortho PCBs	142
Σχήμα 11: Συγκεντρώσεις WHO-TEQ mono-ortho PCBs	142
Σχήμα 12: Συγκεντρώσεις WHO-TEQ dioxin-like PCBs	143
Σχήμα 13: Συγκεντρώσεις των indicator PCBs	143
Σχήμα 14: Προφίλ των συγκεντρώσεων των non-ortho PCBs στο δείγμα HP7F	145
Σχήμα 15: Προφίλ των συγκεντρώσεων των mono-ortho και indicator PCBs στο δείγμα HP7F	145

Σχήμα 16: Σύγκριση των επιπέδων PCBs για τα δείγματα ορού των εθελοντών του HEALS και του Ασπροπύργου	148
Σχήμα 17: Μεταβολίτες μπεταΐνη, κρεατίνη και L-Ισολευκίνη	150
Σχήμα 18: Μεταβολίτες L-Τυροσίνη, L-Τρυπτοφάνη, φωσφατιδυλοχολίνη	151
Σχήμα 19: Μεταβολίτες ουρακίλη, λύσοφωσφατιδυλοχολίνη (16:1)	152
Σχήμα 20: Μεταβολίτες λύσοφωσφατιδυλοχολίνη (18:0), δεοξυχολικό οξύ συζευγμένο με γλυκίνη, υδρόξυπυρολίνη	153
Σχήμα 21: Μεταβολίτες και εμβαδά κορυφών των δειγμάτων HP4M και HP6M	156
Σχήμα 22: Μεταβολίτες και εμβαδά κορυφών των δειγμάτων HP4F και HP6F	156
Σχήμα 23: Μέσες συγκεντρώσεις των PFOS και PFOA στα δύο φύλα	161
Σχήμα 24: Συγκεντρώσεις των PFOS και PFOA στα δείγματα του HEALS	161
Σχήμα 25: % συμμετοχή PFOA και PFOS στη συνολική συγκέντρωση PFASs στα δείγματα HEALS (A) και Ασπροπύργου (B)	165
Σχήμα 26: Σύγκριση των επιπέδων PFASs στους δύο πληθυσμούς που μελετήθηκαν	167
Σχήμα 27: Προφίλ συγκεντρώσεων PCDDs και PCDFs για αντιπροσωπευτικό δείγμα γάλακτος	183
Σχήμα 28: Προφίλ συγκεντρώσεων dioxin-like PCBs για αντιπροσωπευτικό δείγμα γάλακτος	183
Σχήμα 29: Προφίλ συγκεντρώσεων indicator-PCBs για αντιπροσωπευτικό	184

δείγμα γάλακτος

Σχήμα 30: Προφίλ συγκεντρώσεων PCDDs και PCDFs για αντιπροσωπευτικό δείγμα της κατηγορίας ψάρια/θαλασσινά	184
Σχήμα 31: Προφίλ συγκεντρώσεων dioxin-like PCBs για αντιπροσωπευτικό δείγμα της κατηγορίας ψάρια/ θαλασσινά	185
Σχήμα 32: Προφίλ συγκεντρώσεων indicator PCBs για αντιπροσωπευτικό δείγμα της κατηγορίας ψάρια/θαλασσινά	185
Σχήμα 33: Συνεισφορά διατροφικών ομάδων στη συνολική πρόσληψη σε PCDD/Fs και dioxin-like PCBs	197
Σχήμα 34: Συνεισφορά διατροφικών ομάδων στη συνολική πρόσληψη σε indicator PCBs	198
Σχήμα 35: Διακύμανση στο χρόνο των μέσων συνολικών τιμών TEQ των PCDD/Fs και dioxin-like PCBs για τα ψάρια/θαλασσινά	199
Σχήμα 36: Διακύμανση στο χρόνο των μέσων συνολικών τιμών TEQ των PCDD/Fs και dioxin-like PCBs για το ελαιόλαδο	199
Σχήμα 37: Συγκεντρώσεις (U.B. και L.B.) των PFOA (A) και PFOS (B) σε δείγματα τροφίμων (ng g^{-1}) και πόσιμου νερού (ng L^{-1})	207
Σχήμα 38: % Συμμετοχή PFOA και PFOS στη συνολική συγκέντρωση PFASs στα προϊόντα τροφίμων και στο πόσιμο νερό	208
Σχήμα 39: % συνεισφορά των ομάδων τροφίμων στη συνολική διατροφική πρόσληψη σε PFOA (A) και PFOS (B), υπολογισμένη ως lowerbound	213

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Απελευθέρωση και διασπορά των POPs στο περιβάλλον	32
Εικόνα 2: “Φαινόμενο της ακρίδας” των POPs	33
Εικόνα 3: Έκλυση των POPs στην ατμόσφαιρα και εισαγωγή αυτών στη τροφική αλυσίδα	40
Εικόνα 4: Μηχανισμός δράσης του υποδοχέα AhR μετά την πρόσδεση AhR αγωνιστή (π.χ. TCDD)	48
Εικόνα 5: Δομή της πρωτεΐνης ARNT	49
Εικόνα 6: Φωτογραφία του Viktor Yushchenko πριν και μετά την εκδήλωση της χλωρακμής	52
Εικόνα 7: Η έννοια του exposome	65

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Αρχική λίστα των POPs της Συνθήκης της Στοκχόλμης	30
Πίνακας 2: Προσθήκες στη λίστα των POPs της Συνθήκης της Στοκχόλμης	31
Πίνακας 3: Παράγοντες τοξικής ισοδυναμίας (WHO TEF 1998 και WHO TEF 2005)	45
Πίνακας 4: Πιθανοί βιοδείκτες που έχουν προταθεί για τα PCDD/Fs και PFASs	78
Πίνακας 5: Διαλύματα βαθμονόμησης για τη μέτρηση των PFASs	98
Πίνακας 6: Πρόγραμμα έκλουσης για τα PFASs	110
Πίνακας 7: Ιοντικές μεταπτώσεις και ενέργειες διάσπασης των επισημασμένων και μη PFOS και PFOA	111
Πίνακας 8: Τεχνικά χαρακτηριστικά του ενεργού άνθρακα FU 4652	113
Πίνακας 9: Τιμές στόχοι, μέσες τιμές, SD, RSD και ορθότητα της μεθόδου για ανάλυση PCDD/Fs και dioxin-like PCBs πραγματοποιώντας έξι (6) μετρήσεις σε εμβολιασμένα δείγματα σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων.	119
Πίνακας 10: Συγκεντρώσεις PCDD/Fs και PCBs που μετρήθηκαν σε δείγματα διεργαστηριακών δοκιμών, τιμές στόχοι και z-scores	121
Πίνακας 11: Μέσες συγκεντρώσεις $\text{pg WHO-TEQ 2005 g}^{-1}$ νωπού βάρους	122
Πίνακας 12: Συγκεντρώσεις των PCBs διεργαστηριακών δειγμάτων, τιμές-στόχοι, αποδεκτό εύρος συγκεντρώσεων και αποκλίσεις (z-scores) των συγκεντρώσεων που μετρήθηκαν από τις τιμές στόχους	129
Πίνακας 13. Συγκεντρώσεις PCBs εμβολιασμένου και μη εμβολιασμένου ορού που προσδιορίστηκαν και τιμές ανάκτησης που υπολογίστηκαν	131

Πίνακας 14: Συγκεντρώσεις PCBs στον ορό αίματος των 16 εθελοντών	134
Πίνακας 15: Μέσες συγκεντρώσεις ομοειδών PCBs, εύρος συγκεντρώσεων, διάμεσος και τυπική απόκλιση τιμών στα δείγματα ορού που συλλέχθηκαν στο πλαίσιο του προγράμματος HEALS	135
Πίνακας 16: Συνολικές συγκεντρώσεις PCBs για κάθε εθελοντή του προγράμματος HEALS, διατροφικές συνήθειες και δείκτης μάζας σώματος	138
Πίνακας 17: Μέσες συγκεντρώσεις ομοειδών PCBs, εύρος συγκεντρώσεων, διάμεσος τιμή και τυπική απόκλιση τιμών στα δείγματα ορού των εθελοντών του Ασπρόπυργου	146
Πίνακας 18: Σύγκριση των συγκεντρώσεων PCBs για τα δείγματα ορού του HEALS και του Ασπρόπυργου	148
Πίνακας 19: Δείγματα επιβαρυμένα σε PCBs σε συνδυασμό με μεταβολίτες που βρέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις	155
Πίνακας 20: Συγκεντρώσεις των PFASs στα δείγματα των εθελοντών του HEALS, μέσες συγκεντρώσεις των PFOS και PFOA, εύρος συγκεντρώσεων και διάμεσος τιμή	159
Πίνακας 21: Συγκεντρώσεις των PFAAs στα δείγματα του Ασπρόπυργου, μέσες συγκεντρώσεις των PFOS και PFOA, εύρος συγκεντρώσεων και διάμεσος τιμή	162
Πίνακας 22: Συγκριτικός πίνακας για τα δείγματα HEALS και του Ασπρόπυργου	166
Πίνακας 23: Μέσες (upperbound) WHO-TEQ συγκεντρώσεις των PCDDs, PCDFs και dioxin- like PCBs ανά κατηγορία τροφίμων που αναλύθηκαν	173
Πίνακας 24: Μέσες (upperbound) συγκεντρώσεις και εύρος τιμών των ομοειδών των PCDD/Fs, dioxin-like PCBs καθώς και συνολικές WHO-TEQ	174

συγκεντρώσεις $\mu\text{g g}^{-1}$ λίπους στα προϊόντα τροφίμων

Πίνακας 25: Μέσες (upperbound) WHO-TEQ συγκεντρώσεις των indicator PCBs για τα προϊόντα τροφίμων που αναλύθηκαν	186
Πίνακας 26: Μέσες upperbound συγκεντρώσεις (ng g^{-1} λίπους) των ομοειδών indicator PCBs στα προϊόντα τροφίμων	188
Πίνακας 27: Υπολογισμός ημερήσιας πρόσληψης σε PCDDs, PCDFs και PCBs	191
Πίνακας 28: Συνοπτικός πίνακας της διατροφικής έκθεσης σε indicator PCBs για το χρονικό διάστημα 2002-2016	195
Πίνακας 29: Συνοπτικός πίνακας της διατροφικής έκθεσης σε PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs για Ευρωπαϊκές χώρες για το χρονικό διάστημα 2000-2016.	202
Πίνακας 30: Επίπεδα PFOS και PFOA σε προϊόντα τροφίμων (ng g^{-1}) και πόσιμο νερό (ng L^{-1})	206
Πίνακας 31: Εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη από του στόματος σε PFOA (A) και PFOS (B)	211
Πίνακας 32: Σύγκριση της υπολογισθείσας πρόσληψης και της προβλεπόμενης με τη χρήση φαρμακοκινητικού μοντέλου	215
Πίνακας 33: Μέση εκτιμώμενη διατροφική πρόσληψη σε PFOS και PFOA (ng kg^{-1} σωματικού βάρους ημέρα^{-1}) που έχει δημοσιευθεί για διάφορες χώρες	217

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή χρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό πρόγραμμα FP7-ENV-2013-two-stage HEALS-Health and Environment-wide Associations based on Large population Surveys με θέμα: “Μελέτη σε Ευρωπαϊκό επίπεδο: Αξιολόγηση ατομικής έκθεσης σε περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες και ρύπους καθώς και πρόβλεψη της επίπτωσης αυτών στην ανθρώπινη υγεία με τη χρήση μοντέλων.”

Το πειραματικό μέρος πραγματοποιήθηκε στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», στο εργαστήριο Φασματομετρίας Μάζας και Ανάλυσης Διοξινών με επικεφαλής τον Δρ. Λεόντιο Λεοντιάδη, υπό την επίβλεψη της Δρ. Κωστοπούλου Δανάης.

Αποτελέσματα της διατριβής έχουν δημοσιευθεί με στοιχεία δημοσίευσης:

- Kedikoglou K., Costopoulou D., Vassiliadou I., Bakeas E., Leondiadis L., An effective and low cost carbon based clean-up method for PCDD/Fs and PCBs analysis in food. Chemosphere. 2018, 206:531-538.
- Steckling N., Gotti A., Bose-O'Reilly S., Chapizanis D., Costopoulou D., De Vocht F., Garí M., Gimalt J.O., Heath E., Hiscock R., Jagodic M., Karakitsios S.P., Kedikoglou K., Kosjek T, Leondiadis L., Maggos T., Mazej D., Polańska K., Povey A., Rovira J., Schoierer J., Schuhmacher M., Špirić Z., Stajniko ., Stierum R., Tratnik J.S., Vassiliadou I., Annesi-Maesano I., Horvat M., Sarigiannis DA., Biomarkers of exposure in environment-wide association studies - Opportunities to decode the exposome using human biomonitoring data. Environ. Research. 2018 164:597-624.

Εργασία με τίτλο: “A low cost effective clean-up method for dioxin analysis.” Kedikoglou Kleopatra, Costopoulou Danae, Vassiliadou Irene, Leondiadis Leondios, παρουσιάστηκε στο 36ο Διεθνές συνέδριο για τους αλογονωμένους ανθεκτικούς οργανικούς ρύπους που έλαβε χώρα το 2016 στη Φλωρεντία με τη μορφή αναρτημένης ανακοίνωσης.

Επιπλέον, επιστημονικά άρθρα έχουν υποβληθεί για δημοσίευση στο περιοδικό Environmental Research:

- Kedikoglou K., Costopoulou D., Vassiliadou I., Bakeas E., Leondiadis L., Dioxin and PCB monitoring in Greek food products during the period 2002-2016 and preliminary assessment of general population exposure through the diet.
- Kedikoglou K., Costopoulou D., Vassiliadou I., Bakeas E., Leondiadis L., Preliminary assessment of general population exposure to PFASs through diet in Greece.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ανθεκτικοί οργανικοί ρύποι (Persistent Organic Pollutants, POPs)

Οι ανθεκτικοί οργανικοί ρύποι (Persistent Organic Pollutants, POPs) είναι αλογονωμένες οργανικές ενώσεις που η παραγωγή τους οφείλεται σε ανθρώπινη δραστηριότητα. Για να χαρακτηριστεί μια ένωση POP θα πρέπει να διαθέτει τα εξής τέσσερα χαρακτηριστικά:

- μεγάλη ανθεκτικότητα στη χημική και φωτο-διάσπαση (persistence)
- την ικανότητα να διασπείρεται σε μεγάλες αποστάσεις (transboundary)
- την τάση να συσσωρεύεται στο λιπώδη ιστό των ανθρώπων και των ζώων (bioaccumulation)
- να προκαλεί βλαβερές επιδράσεις στα βιολογικά συστήματα (toxicity)

Η ομάδα των POPs περιλαμβάνει ενώσεις που έχουν παραχθεί σκόπιμα όπως φυτοφάρμακα, χημικά για βιομηχανική χρήση ή χρήση σε καταναλωτικά αγαθά (μονωτικά υλικά, επιφανειοδραστικά, επιβραδυντικά φλόγας κλπ) καθώς και ενώσεις που αποτελούν παραπροϊόντα βιομηχανικών διεργασιών ή διεργασιών καύσης¹.

Η Συνθήκη της Στοκχόλμης και η αρχική «βρώμικη δωδεκάδα»

Δεδομένης της τοξικότητας των POPs και της ευρείας γεωγραφικής τους διασποράς ακόμα και σε μέρη του πλανήτη που δεν έχει γίνει ποτέ παραγωγή ή χρήση των POPs, το 1995 ξεκίνησε συζήτηση για εφαρμογή μίας διεθνούς Συνθήκης για την προστασία του περιβάλλοντος και της ανθρώπινης υγείας από τα POPs. Στο πλαίσιο της προσπάθειας για τον περιορισμό της ρύπανσης που οφείλεται στους POPs, το Συμβούλιο του Προγράμματος για το Περιβάλλον του Οργανισμού Ηνωμένων Εθνών (UNEP) προχώρησε στην ψήφιση το 2001 της «Συνθήκης της Στοκχόλμης», η οποία τέθηκε σε ισχύ το Μάιο του 2004. Η Συνθήκη αυτή αποσκοπεί στην προστασία της ανθρώπινης υγείας και του

περιβάλλοντος από τα POPs με την απαγόρευση ή τον περιορισμό της παγκόσμιας παραγωγής και χρήσης των συγκεκριμένων ουσιών. Τη Συνθήκη έχουν υπογράψει 152 χώρες ενώ την έχουν κυρώσει 182. Η Ελλάδα υπέγραψε τη Συνθήκη στις 23/05/2001, ενώ την έθεσε σε ισχύ την 01/08/2006 με τον νόμο Ν. 3447/2006, Φ.Ε.Κ.:52/Α/13.3.2006.

Βασική υποχρέωση των συμβαλλόμενων μερών είναι η λήψη των αναγκαίων νομικών και διοικητικών μέτρων για τον τερματισμό της παραγωγής και χρήσης των χημικών ουσιών του Παραρτήματος Α, ο περιορισμός της παραγωγής και χρήσης των χημικών του Παραρτήματος Β (DDT), καθώς και η ανάπτυξη και εφαρμογή σχεδίου δράσης σε εθνικό ή περιφερειακό επίπεδο για τη μείωση των μη σκόπιμων εκλύσεων από ανθρωπογενείς πηγές των χημικών του Παραρτήματος Γ (PCDDs, PCDFs, HCBs, PCBs).

Τη λίστα της Συνθήκης αποτελούσαν αρχικά δώδεκα επιλεγμένα POPs που περιλαμβάνουν φυτοφάρμακα, βιομηχανικά χημικά και παραπροϊόντα βιομηχανικών διεργασιών ή καύσεων^{1,2}, τα οποία αποκαλούνται “βρώμικη δωδεκάδα”, “dirty dozen” (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Αρχική λίστα των POPs της Συνθήκης της Στοκχόλμης

Φυτοφάρμακα	Aldrin, chlordane, DDT, dieldrin, endrin, heptachlor, hexachlorobenzene, mirex, toxaphene
Βιομηχανικά χημικά	Hexachlorobenzene, polychlorinated biphenyls (PCBs)
Παραπροϊόντα	Hexachlorobenzene, polychlorinated dibenzo- <i>p</i> -dioxins and polychlorinated dibenzofurans (PCDD/PCDF)

Στη συνέχεια, με την εξέλιξη της έρευνας πάνω στα POPs, νέες ενώσεις προστέθηκαν στη λίστα το 2010 (Πίνακας 2)

Πίνακας 2: Προσθήκες στη λίστα των POPs της Συνθήκης της Στοκχόλμης

Φυτοφάρμακα	Endosulfan, alpha hexachlorocyclohexane, beta hexachlorocyclohexane, chlordecone, lindane, technical endosulfan and its related isomers
Βιομηχανικά χημικά	Hexabromocyclododecane, hexachlorobutadiene, pentachlorophenol, polychlorinated naphthalenes, decabromodiphenyl ether, hexabromobiphenyl, hexabromocyclododecane, hexabromodiphenyl and heptabromodiphenyl ether, pentachlorobenzene, pentachlorophenol and its salts and esters, perfluorooctane sulfonic acid (PFOS), its salts and perfluorooctane sulfonyl fluoride (PFOSF), polychlorinated naphthalenes, short-chain chlorinated paraffins (SCCPs), tetrabromodiphenyl ether and pentabromodiphenyl ether
Παραπροϊόντα	Hexachlorobutadiene

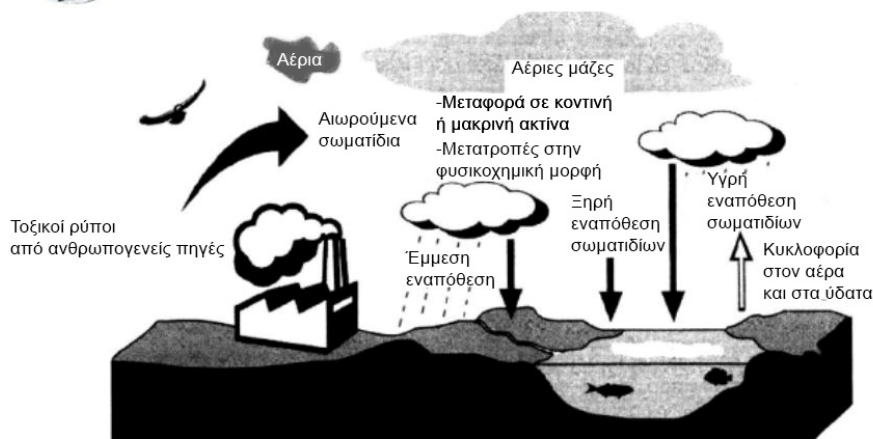
Πολλές ομάδες ερευνητών εργάζονται προς την κατεύθυνση της αξιολόγησης χημικών ενώσεων ώστε να προστεθούν στη λίστα των POPs. Τέτοιες ενώσεις είναι το υπερφθοροοκτανικό οξύ (perfluorooctanoic acid, PFOA) και το υπερφθοροεξανοσουλφονικό οξύ (perfluorohexane sulfonic acid, PFHxS). Οι ενώσεις αυτές δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμα ως POPs και αναφέρονται ως ανθεκτικές τοξικές ενώσεις (Persistent Toxic Substances)³.

1.1 Τρόπος εισαγωγής των POPs στο περιβάλλον

Όπως φαίνεται στην εικόνα 1, τα POPs μετά την απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον από τις πηγές εκπομπής (βιομηχανικές πηγές, διαδικασίες καύσης, αγροτικές δραστηριότητες) κυκλοφορούν στον αέρα, επικάθονται στο έδαφος και επιβαρύνουν τον υδροφόρο ορίζοντα και τελικά εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα.



Απελευθέρωση και διασπορά των POPs στο περιβάλλον



Τα POPs αφού απελευθερωθούν στο περιβάλλον, μπορούν να μεταφερθούν και να εναποτεθούν στο έδαφος ή στα ύδατα σε μεγάλη απόσταση από τις πηγές εκπομπής τους.

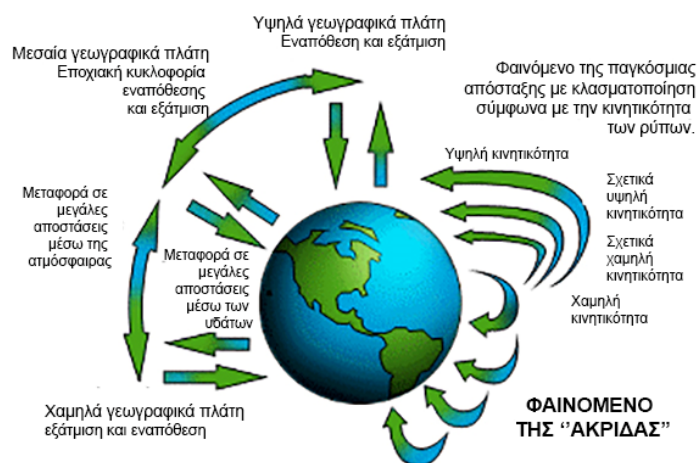
Συνθήκη της Στοκχόλμης για τα POPs



Εικόνα 1: Απελευθέρωση και διασπορά των POPs στο περιβάλλον

Η εξαιρετικά αργή βιοαποικοδόμηση των POPs, η διατήρησή τους επί μακρό χρονικό διάστημα στο περιβάλλον και η ικανότητά τους να μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις δημιουργεί παγκοσμίως εκτεταμένη ρύπανση. Πιο συγκεκριμένα έχουν την ικανότητα να προωθούνται στα ανώτερα στρώματα της ατμόσφαιρας στις θερμές περιοχές, να μεταφέρονται μέσω του αέρα, να συμπυκνώνονται και να επανακαθαρίζονται στο έδαφος στις ψυχρές περιοχές. Το φαινόμενο αυτό, γνωστό ως “global distillation effect” ή “grasshopper effect”, το οποίο απεικονίζεται στην εικόνα 2 έχει ως αποτέλεσμα την παγκόσμια διασπορά των ρύπων⁴ και την ανίχνευσή τους σε ιστούς και όργανα ζώων ακόμα και σε μέρη που δεν έχει γίνει ποτέ παραγωγή ή χρήση τους όπως στην περιοχή της Αρκτικής και της Ανταρκτικής ή σε πολύ ορεινές περιοχές με μεγάλο υψόμετρο^{5,6,7}. Λόγω του ότι παραμένουν στους ζωντανούς οργανισμούς για μεγάλο χρονικό διάστημα, καθώς τις χαρακτηρίζει ο μεγάλος χρόνος ημιζωής, αποτελούν βιοδείκτες ρύπανσης και διασυννοριακής μεταφοράς ρύπων ανά την υφήλιο.

ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΩΝ POPs ANA ΤΗΝ ΥΦΗΛΙΟ



Εικόνα 2: "Φαινόμενο της ακρίδας" των POPs

Ως λιπόφιλες ενώσεις έχουν την ιδιότητα να βιοσυσσωρεύονται στους λιπώδεις ιστούς των ζωντανών οργανισμών και κατά συνέπεια βρίσκονται σε ολοένα αυξανόμενη συγκέντρωση καθώς ανεβαίνουμε στην τροφική αλυσίδα, φαινόμενο που ονομάζεται βιομεγέθυνση⁸. Οι πιο υψηλές συγκεντρώσεις έχουν βρεθεί στον άνθρωπο ο οποίος βρίσκεται στο τέλος της τροφικής αλυσίδας και είναι αρκετές τάξεις μεγέθους υψηλότερες σε σύγκριση με αυτές που έχουν μετρηθεί στο ευρύτερο περιβάλλον⁹.

1.2 Οδοί έκθεσης του ανθρώπου στα POPs

Τα POPs εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της κατάποσης, της εισπνοής και της δερματικής επαφής. Επιπλέον, τα έμβρυα εκτίθενται προγεννητικά ήδη από τη σύλληψη μέσω του πλακούντα και του αίματος του ομφαλίου λώρου ενώ, το μητρικό γάλα αποτελεί τον βασικότερο παράγοντα έκθεσης στα POPs για τα θηλάζοντα βρέφη. Η έκθεση αυτή συμβάλει σημαντικά στο συνολικό σωματικό φορτίο όταν ο άνθρωπος φτάσει σε αναπαραγωγική ηλικία.

Κύρια πηγή έκθεσης του γενικού πληθυσμού σε POPs αποτελεί η διατροφή¹⁰. Πιο συγκεκριμένα πηγή υψηλής έκθεσης σε POPs αποτελούν τρόφιμα πλούσια σε ζωικά λιπαρά. Τα τρόφιμα με υψηλά επίπεδα POPs μπορεί να διαφέρουν από περιοχή σε περιοχή. Τα πιο επιβαρυνόμενα τρόφιμα είναι γενικά τα λιπαρά μέρη

των κρεάτων, τα πλήρη σε λιπαρά τυριά, το βούτυρο και τα λιπαρά ψάρια¹¹. Συνεπώς συστήνεται γενικά διατροφή χαμηλή σε λιπαρά που συνεπάγεται κατανάλωση άπαχου κρέατος και ομάδων τροφών όπως φρούτα, λαχανικά, όσπρια και δημητριακά ολικής άλεσης³.

1.3 Επιπτώσεις των POPs στην υγεία του ανθρώπου

Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για τις επιπτώσεις στην υγεία από τη μακροχρόνια έκθεση του ανθρώπου σε POPs είναι μεγάλο, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι αυξάνουν την πιθανότητα καρκινογένεσης, προβλημάτων αναπαραγωγής, ασθενειών του ενδοκρινικού και ανοσοποιητικού συστήματος, νευροαναπτυξιακών προβλημάτων αλλά και μαθησιακών δυσκολιών^{12,13}. Επιπλέον, έχουν την ιδιότητα να βιοσυσσωρεύονται στον λιπώδη ιστό καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου και αποτελούν πηγή χρόνιας εσωτερικής έκθεσης επειδή ελευθερώνονται συνεχώς από τον λιπώδη ιστό στην κυκλοφορία και στα ζωτικά όργανα με μεγάλη περιεκτικότητα σε λίπος¹⁴. Τα τελευταία χρόνια, την επιστημονική κοινότητα απασχολεί έντονα το θέμα της επίδρασης στην υγεία του ανθρώπου του «κοκτέιλ» των περιβαλλοντικών ρύπων με τα οποία έρχεται σε επαφή σε όλη τη διάρκεια της ζωής του. Σε αυτή τη συνολική και δια βίου έκθεση έχει πρόσφατα αποδοθεί ο όρος «exposome». Μέχρι πρότινος την έρευνα απασχολούσε το αντίκτυπο που έχει στην ανθρώπινη υγεία κάθε ρύπος μεμονωμένα. Συνεπεία αυτού, τα επιτρεπτά όρια έχουν διαμορφωθεί από τους αρμόδιους ευρωπαϊκούς φορείς, όπως η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) για κάθε ρύπο ξεχωριστά. Ωστόσο με αυτόν τον τρόπο δε λαμβάνονται υπόψη τα φαινόμενα συνέργειας που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των τοξικών ρύπων. Συνεπώς αξιολογώντας μεμονωμένα κάθε ρύπο πιθανά υποτιμάται η επίδραση του κινδύνου από το σύνολο των ρύπων στην ανθρώπινη υγεία¹⁵. Τα τελευταία δέκα χρόνια έχει ραγδαία ανάπτυξη ο τομέας της τοξικολογίας μίγμάτων, όπου λαμβάνουν χώρα δοκιμές με μίγματα πολλών ρύπων¹⁶. Ωστόσο λόγω των απεριόριστων χημικών ενώσεων και των άπειρων συνδυασμών που μπορούν να γίνουν είναι πρακτικά πολύ δύσκολο να πραγματοποιηθούν πειραματικές δοκιμές, παρά μόνο για πολύ περιορισμένο

αριθμό χημικών μιγμάτων¹⁷. Για αυτόν τον λόγο ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ.) θεωρεί τη συνέχιση της έρευνας πάνω στην αξιολόγηση του κινδύνου που προκύπτει από την συνδυασμένη έκθεση σε πολλαπλούς ρύπους μέσω όλων των σχετικών οδών¹⁸.

1.3.1 Τα POPs ως ενδοκρινικοί διαταράκτες

Μια από τις πιο σημαντικές δυσμενείς επιπτώσεις πολλών POPs στον ανθρώπινο οργανισμό είναι η ενδοκρινική διατάραξη. Ενδοκρινικός διαταράκτης έχει οριστεί ως ο παράγοντας που παρεμβαίνει στη σύνθεση, έκκριση, μεταφορά, πρόσδεση ή εξάλειψη των φυσικών ορμονών στο σώμα, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις διαδικασίες αναπαραγωγής, ανάπτυξης και/ή συμπεριφοράς και τη διατήρηση της ομοιόστασης¹⁹. Μιμούνται τις φυσικές ορμόνες, τροποποιώντας ή μπλοκάροντας τη λειτουργία τους, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται δυσμενείς επιπτώσεις στον οργανισμό. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων δρουν οι ενδοκρινικοί διαταράκτες έχουν περιγραφεί από τους επιστήμονες μετά από εκτεταμένες μελέτες σε ζώα ²⁰:

- Μπορούν να μιμηθούν εν μέρει ή εξ'ολοκλήρου τη δράση των φυσικών ορμονών στο σώμα όπως είναι τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα, οι ορμόνες του θυρεοειδούς και ενδεχομένως να προκαλέσουν υπερέκκριση.
- Δρουν ανταγωνιστικά μέσω πρόσδεσης στους υποδοχείς των ενδογενών ορμονών μέσα στο κύτταρο. Παραδείγματα χημικών ενώσεων που μπλοκάρουν ή ανταγωνίζονται τις ορμόνες είναι τα αντι-οιστρογόνα και τα αντι-ανδρογόνα.
- Παρεμβαίνουν ή μπλοκάρουν τις φυσικές ορμόνες ή τους υποδοχείς τους, τροποποιώντας για παράδειγμα τον μεταβολισμό τους στο ήπαρ.

Με αυτόν τον τρόπο εμπλέκονται στις μεταβολικές λειτουργίες, την αποθήκευση λίπους, την ανάπτυξη της οστικής μάζας και στο ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ επηρεάζουν ολόκληρη τη φυσιολογική λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος.

Η έκθεση σε ενδοκρινικούς διαταράκτες πραγματοποιείται μέσω της τροφής, της σκόνης, του νερού, καθώς και μέσω της εισπνοής αερίων και σωματιδίων που

βρίσκονται στον αέρα, ή απλώς μέσω της επαφής με το δέρμα, για παράδειγμα κατά την εφαρμογή προϊόντων προσωπικής φροντίδας²¹. Επιπλέον, πραγματοποιείται βιολογική μεταφορά μέσω του πλακούντα ή του μητρικού γάλακτος²².

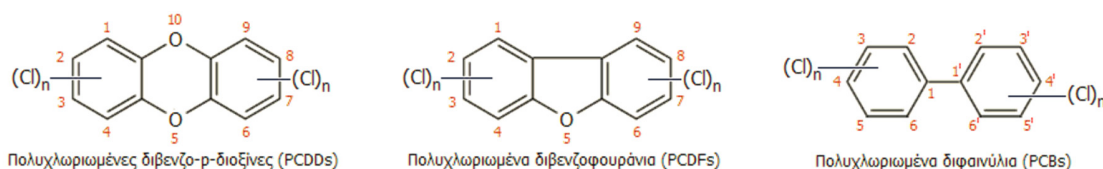
Μεγάλος αριθμός επιδημιολογικών και πειραματικών μελετών δείχνουν ότι η περιβαλλοντική έκθεση σε τοξικές ουσίες κατά την εμβρυϊκή περίοδο, αλλά και από τη νεογνική ηλικία μέχρι και την εφηβεία ευθύνονται για αναπαραγωγικές, ανοσοποιητικές, νευροαναπτυξιακές διαταραχές, αλλά και για ενδοκρινικές ανωμαλίες και ασθένειες συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου και της παχυσαρκίας²³. Ενίοτε, οι επιδράσεις ενός ενδοκρινικού διαταράκτη δεν γίνονται αντιληπτές παρά μόνο μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα από την έκθεση. Για παράδειγμα, η έκθεση των εμβρύων σε μια τέτοια ουσία μπορεί να έχει αρνητικές επιδράσεις στην υγεία τους όταν ενηλικιωθούν²⁴. Οι επιδράσεις αυτές μπορούν επίσης να κληρονομηθούν στις μελλοντικές γενιές. Πρόσφατη έρευνα κατέδειξε ότι οι ενδοκρινικοί διαταράκτες μπορούν να επηρεάσουν τα συστήματα που ελέγχουν την ανάπτυξη του σωματικού λίπους και την αύξηση του βάρους. Επιπλέον, τα αυξημένα ποσοστά νευροσυμπεριφορικών διαταραχών όπως η δυσλεξία, η νοητική υστέρηση, ο αυτισμός και η διαταραχή ελλειμματικής προσοχής και υπερκινητικότητας - ΔΕΠΥ (ADHD) έχουν συσχετισθεί με έκθεση σε ενδοκρινικούς διαταράκτες. Ένας μεγάλος αριθμός χρόνιων ασθενειών (καρδιαγγειακές παθήσεις, διαβήτης, καρκίνος κ.α) οφείλονται στην περίοδο της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν με το γενετικό υπόβαθρο, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ροπή προς μία πληθώρα διαταραχών και χρόνιων ασθενειών.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν δύο από τις πιο γνωστές ομάδες ενώσεων που έχουν χαρακτηριστεί ως POPs: οι διοξίνες και οι υπερφθοριωμένες ενώσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Διοξίνες και πολυχλωριωμένα διφαινύλια

2.1 Χημεία

Οι πολυχλωριωμένες διβενζο-πάρα-διοξίνες (PCDDs), τα πολυχλωριωμένα διβενζοφουράνια (PCDFs) και τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) είναι ανθεκτικοί οργανικοί ρύποι που αναφέρονται συνήθως ως «διοξίνες». Ο όρος διοξίνες δηλαδή είναι γενικός και περιλαμβάνει 17 ομοειδείς ενώσεις (congeners) PCDDs και PCDFs καθώς και 12 PCBs που έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα τοξικές και καρκινογόνες. Οι γενικοί μοριακοί τύποι των PCDDs, PCDFs και PCBs φαίνονται στο σχήμα 1.



Σχήμα 1: Γενικοί μοριακοί τύποι των PCDDs, PCDFs και PCBs

Οι PCDDs και PCDFs αποτελούν δύο ομάδες τρικυκλικών, επίπεδων, αρωματικών ενώσεων. Στις δύο αυτές ομάδες, τα άτομα υδρογόνου στις θέσεις 1-4 και 6-9 μπορούν να αντικατασταθούν από άτομα χλωρίου. Από τους πιθανούς συνδυασμούς προκύπτουν 210 διαφορετικές ενώσεις, 75 PCDDs και 135 PCDFs, οι οποίες διαφέρουν στη θέση (1-8) και στον αριθμό των ατόμων χλωρίου. Κάθε μία από τις 210 ενώσεις διοξινών και φουρανίων αναφέρεται ως ομοειδής (congener). Η τοξικότητα όλων αυτών των πολυχλωριωμένων αρωματικών ενώσεων εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των ατόμων χλωρίου στο μόριό τους. Οι διοξίνες και τα φουράνια που περιέχουν 1-3 άτομα χλωρίου, είναι άνευ τοξικολογικής σημασίας. Τα πιο τοξικά ομοειδή έχουν τέσσερα τουλάχιστον άτομα χλωρίου στις θέσεις 2,3,7 και 8, με πιο τοξική ένωση την 2,3,7,8-TCDD.

Λόγω της ομοιότητας στις χημικές ιδιότητες αλλά και της βιολογικής τους δράσης εξετάζονται και ορισμένα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) (σχ. 1) μαζί με τις διοξίνες. Υπάρχουν 209 ομοειδή PCBs, 12 από τα οποία έχουν την ίδια τοξική

δράση με τις διοξίνες και χαρακτηρίζονται ως παρόμοια με τις διοξίνες (dioxin-like PCBs):

Τα 209 διαφορετικά ομοειδή των PCBs ποικίλουν ως προς τον αριθμό και τις θέσεις των ατόμων χλωρίου. Όπως και στην περίπτωση των διοξινών ο όρος «ομοειδές» χρησιμοποιείται και για τις ενώσεις των PCBs. Το 1980 οι Ballschmiter και Zell πρότειναν ένα σύστημα αρίθμησης, τον «αριθμό BZ» για κάθε ένα από τα ομοειδή των PCBs, το οποίο αργότερα υιοθετήθηκε από την Διεθνή Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (International Union of Pure and Applied Chemistry-IUPAC). Οι ομοειδείς ενώσεις λαμβάνουν τους αριθμούς από PCB1 έως PCB209. Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι με την αρίθμηση αυτή καλύπτεται η χημική ταυτότητα της ένωσης και δεν ακολουθεί πιστά τους κανόνες που έχει ορίσει η IUPAC.

2.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Όσα PCDDs και PCDFs έχουν μελετηθεί, στη φυσική τους κατάσταση είναι άοσμες στερεές ή κρυσταλλικές ενώσεις ενώ τα PCBs έχουν υποκίτρινη παχύρρευστη μορφή. Οι δύο ομάδες ενώσεων έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες και συμπεριφορά στο περιβάλλον. Είναι λιπόφιλες, μη πολικές ενώσεις. Ο συντελεστής κατανομής (K_{ow}) οκτανόλης-νερού, ο πιο συχνά μετρούμενος δείκτης για τον προσδιορισμό λιποφιλίας μίας ένωσης είναι από τους πιο υψηλούς που έχουν αναφερθεί για οργανικούς περιβαλλοντικούς ρύπους. Ο $\log K_{ow}$ αυξάνεται με την προσθήκη ατόμων χλωρίου στα μόρια των ενώσεων αυτών και κυμαίνεται μεταξύ 6.8 για την 2,3,7,8-TCDD και 8.2 για την οκτάχλωρο-διβενζοδιοξίνη (OCDD). Αυτό σημαίνει ότι εμφανίζουν ισχυρή συγγένεια προς τα λίπη και τα έλαια. Οι ενώσεις αυτές είναι σχεδόν αδιάλυτες στο καθαρό νερό. Γίνονται πιο δυσδιάλυτες καθώς αυξάνεται ο αριθμός των χλωρίων στο μόριο και η διαλυτότητα κυμαίνεται από $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ για την OCDD έως και 20 ng L^{-1} για την 2,3,7,8-TCDD. Η πτητικότητα επίσης μειώνεται καθώς αυξάνονται τα άτομα χλωρίου στο μόριο των ενώσεων αυτών²⁵. Οι διοξίνες και τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια είναι γενικά πολύ σταθερές ενώσεις ακόμα και σε ισχυρά όξινα ή αλκαλικά περιβάλλοντα, ακόμα και με παρουσία αναγωγικών ή

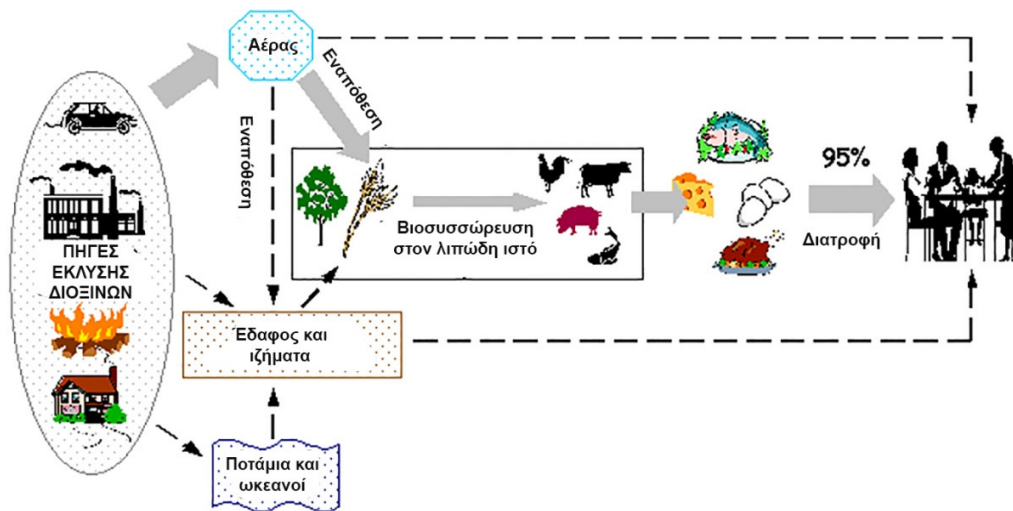
οξειδωτικών παραγόντων. Επίσης οι ενώσεις αυτές είναι σταθερές στη φωτοδιάσπαση, ενώ η διάσπασή τους επιταχύνεται από υπέρυθη ακτινοβολία. Παραμένουν σταθερές και σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες. Η θερμική αποσύνθεση της 2,3,7,8-TCDD ξεκινάει σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 750°C²⁶.

2.3 Πηγές και οδοί έκθεσης του ανθρώπου

Οι PCDDs και PCDFs δεν έχουν παραχθεί ποτέ σκοπίμως. Αποτελούν κυρίως παραπροϊόντα ανθρώπινων δραστηριοτήτων λόγω ατελούς καύσης οργανικών υλικών παρουσία χλωρίου²⁷. Ειδικότερα παράγονται από:

- Καύση αστικών αποβλήτων και ιατρικών αποβλήτων λόγω της παρουσίας προϊόντων PVC
- Καύση υλικών όπως κάρβουνο ή ξύλο επεξεργασμένο με πενταχλωροφαινόλη
- Πυρκαγιές και παράνομη καύση απορριμμάτων
- Βιομηχανικές διεργασίες όπως μεταλλουργία, παραγωγή κάποιων φυτοφαρμάκων, ζιζανιοκτόνων και παραγώγων πετρελαίου

Κατά τις θερμικές διεργασίες, μεταξύ 500°C και 800°C, σχηματίζονται οι PCDDs και PCDFs με πυρολυτική αναδιάταξη των πρόδρομων ουσιών (π.χ. χλωροφαινόλη ή χλωροβενζόλιο). Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες 200°C-400°C, οι PCDDs και PCDFs μπορούν επίσης να σχηματιστούν μέσω οξειδωσης των ήδη υπάρχοντων πολυκυκλικών ενώσεων και μετέπειτα χλωρίωση μέσω κατάλυσης, λόγω της παρουσίας χλωρίου σε υπερχλωριωμένες ενώσεις ή σε στοιχειακή μορφή²⁸. Στην εικόνα 3 παρατηρούμε τη «διαδρομή» των ενώσεων αυτών στο περιβάλλον μετά την έκλυσή τους από τις παραπάνω πηγές εκπομπής. Όπως ισχύει γενικά για τα POPs, κυκλοφορούν στον αέρα και στα ύδατα (κυρίως προσδεδεμένα σε μικροσωματίδια λόγω χαμηλής πτητικότητας και διαλυτότητας) και επικάθονται στο έδαφος από όπου περνούν στην τροφική αλυσίδα μέσω βιοσυσσώρευσης στο λιπώδη ιστό των ζώων.



Εικόνα 3: Έκλυση των POPs στην ατμόσφαιρα και εισαγωγή αυτών στη τροφική αλυσίδα

Η έκθεση του ανθρώπου οφείλεται κατά 95% περίπου στη διατροφή. Κατανάλωση ζωικών προϊόντων π.χ. κρέατος, ψαριών και γαλακτοκομικών προϊόντων υψηλών σε λιπαρά αποτελούν τη βασική πηγή έκθεσης^{29,30}. Εφόσον οι διοξίνες είναι λιπόφιλες και ανθεκτικές ενώσεις, ένας τρόπος να περιοριστεί η πρόσληψή τους θεωρείται η κατανάλωση τροφίμων χαμηλών σε λιπαρά³¹. Τα λαχανικά και τα φρούτα καθώς περιέχουν ελάχιστα λιπαρά συνήθως παρουσιάζουν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σε τέτοιες ενώσεις, για αυτόν τον λόγο οι άνθρωποι που ακολουθούν για μεγάλο διάστημα διατροφή πλούσια σε φρούτα και λαχανικά έχουν πολύ χαμηλότερο συνολικό φορτίο σε τέτοιες ενώσεις σε σχέση με τους ανθρώπους που βασίζουν τη διατροφή τους στα ζωικά προϊόντα³². Ο χρόνος ημιζωής των διοξινών υπολογίζεται στα 7-11 χρόνια, ωστόσο παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις από οργανισμό σε οργανισμό³³. Μελέτες κινητικής έχουν δείξει ότι ο χρόνος ημιζωής των διοξινών είναι εξαρτώμενος από τη δόση, δηλαδή αποβάλλονται πιο γρήγορα σε πιο υψηλές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, εξαρτάται από το ποσοστό λίπους, καθώς οργανισμοί με μεγάλο ποσοστό λιπώδους ιστού έχουν πιο αργή απέκκριση των συγκεκριμένων ενώσεων^{34,35}.

Τα έμβρυα εκτίθενται στις ενώσεις της ομάδας των διοξινών μέσω του πλακούντα και του αίματος του ομφαλίου λώρου^{36,37}, ενώ το μητρικό γάλα αποτελεί τον βασικότερο παράγοντα έκθεσης για τα θηλάζοντα βρέφη. Η έκθεση αυτή

συμβάλει σημαντικά στο συνολικό σωματικό φορτίο για το βρέφος, ενώ οι θηλάζουσες γυναίκες μειώνουν κατά πολύ τα επίπεδα του οργανισμού τους σε PCDDs, PCDFs και PCBs κατά την περίοδο του θηλασμού. Το γεγονός αυτό όμως έχει ως αποτέλεσμα για τα θηλάζοντα βρέφη να υπολογίζονται υψηλά επίπεδα διατροφικής έκθεσης σε διοξίνες, βάσει της συγκέντρωσης των ενώσεων αυτών στο μητρικό γάλα και της μεγάλης ποσότητας που καταναλώνουν σε σχέση με το σωματικό τους βάρος. Έχει εκτιμηθεί η διατροφική έκθεση σε διοξίνες και παρόμοιες ενώσεις σε βρέφη με αποκλειστικό θηλασμό στα 60.3-80.4 TEQ pg/kg σωματικού βάρους³⁸.

Ωστόσο, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.):

- Το μητρικό γάλα είναι η καλύτερη διατροφή για τα βρέφη καθώς προσφέρει πολυάριθμα διατροφικά και ψυχικά οφέλη που υπερτερούν των πιθανών βλαβών³⁹.
- Λαμβάνοντας υπόψη τη χρονική διάρκεια της περιόδου του θηλασμού σε σχέση με τη συνολική διάρκεια ζωής, η έκθεση μέσω του θηλασμού συμβάλλει ελάχιστα στη συνολική έκθεση καθ'όλη τη διάρκεια ζωής του ανθρώπου

Με βάση τα παραπάνω, η επίσημη σύσταση του Π.Ο.Υ. είναι:

- Λαμβάνοντας υπόψη τα βραχυπρόθεσμα και μακροπρόθεσμα οφέλη της υγείας τόσο για το παιδί, όσο και για τη μητέρα ο Π.Ο.Υ. συστήνει τον μητρικό θηλασμό σε όλες εκτός ακραίων περιστάσεων.
- Ιδιαίτερα για την Ελλάδα οι διοξίνες εμφανίζονται σε μικρότερες ποσότητες σε σύγκριση με βιομηχανικά ανεπτυγμένες χώρες. Συνεπώς είναι σημαντική η παροχή των κατάλληλων διατροφικών συμβουλών στη μητέρα ώστε να μειωθεί η έκθεσή της σε POPs και κατά συνέπεια να παραμείνουν χαμηλά και τα επίπεδα στο γάλα της.

Αντίθετα με τις διοξίνες, τα PCBs συντέθηκαν χημικά και χρησιμοποιήθηκαν σε πληθώρα εφαρμογών. Πρωτοσυντέθηκαν στην Γερμανία το 1881, αλλά η βιομηχανική τους παραγωγή ξεκίνησε μετά το 1930 στη Γερμανία, τη Ρωσία, την Αμερική και την Ιαπωνία. Μετά τον δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο η παραγωγή και

εμπορική χρήση των PCBs στη βιομηχανία έλαβε μεγάλες διαστάσεις κυρίως λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους: είναι πολύ σταθερές ενώσεις, δεν είναι εύφλεκτες, έχουν χαμηλή πτητικότητα και ηλεκτρική αγωγιμότητα, μονωτικές ιδιότητες, υψηλή αντίσταση στη διάβρωση από τα οξέα και την οξειδωση και χαμηλή διαλυτότητα στο νερό. Χρησιμοποιήθηκαν κυρίως στην ηλεκτρική βιομηχανία ως εναλλάκτες θερμότητας και ως διηλεκτρικά υγρά στους ηλεκτρικούς μετασχηματιστές και πυκνωτές. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν ως πρόσθετα σε χρώματα και πλαστικά. Εμπορικά μίγματα των PCBs έχουν διακινήθει στο παρελθόν με διάφορες ονομασίες ανάλογα με τη χώρα παραγωγής (π.χ. Aroclors, Clophens, Phenoclor, Kaneclors).

Δεδομένης της περιβαλλοντικής ρύπανσης από την εκτεταμένη χρήση των PCBs και της τοξικής τους δράσης πολλές χώρες είχαν απαγορέψει τη διακίνηση και χρήση τους από τη δεκαετία του 1970 ή του 1980. Ωστόσο λόγω της λιπόφιλης φύσης τους και της ιδιότητας να βιοσυσσωρεύονται στους οργανισμούς και το περιβάλλον ανιχνεύονται ακόμα και στις μέρες μας. Το 2001 με τη Συνθήκη της Στοκχόλμης τα PCBs καταχωρήθηκαν στα POPs και όλες οι χώρες που συμμετείχαν στη Συνθήκη συμφώνησαν να απαγορέψουν την παραγωγή και χρήση των PCBs. Ωστόσο ο ήδη υπάρχων εξοπλισμός που περιέχει ή είναι επιμολυσμένος με PCBs μπορεί να χρησιμοποιείται το πολύ μέχρι το 2025. Προκειμένου να παύσει η χρήση των PCBs τα μέλη της Συνθήκης της Στοκχόλμης που ανήκουν στις αναπτυσσόμενες χώρες και εκείνα που η οικονομία τους είναι σε μεταβατική φάση θα δεχθούν βοήθεια ώστε:

- Να ολοκληρωθεί η καταγραφή των εθνικών αποθεμάτων του εξοπλισμού που περιέχει PCBs.
- Να γίνει επιμόρφωση στους ιδιοκτήτες των εξοπλισμών με τις εν λόγω ενώσεις για την ορθή συντήρησή τους προκειμένου να αποφευχθεί περαιτέρω επιμόλυνση.
- Να πραγματοποιηθεί κατάλληλη αποθήκευση του προς απόσυρση εξοπλισμού και η διάθεση των λαδιών που είναι επιβαρυμένα με PCBs να γίνει με ασφαλές μέσο, σε ασφαλή τοποθεσία¹.

2.4 Σχέση δομής και τοξικής δράσης

Ο κύριος μηχανισμός τοξικής δράσης των PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs περιλαμβάνει την πρόσδεσή τους στον αρυλικό υδρογονανθρακικό υποδοχέα (aryl hydrocarbon receptor – AhR) στον οργανισμό. Η πρόσδεση στον υποδοχέα εξαρτάται από την ικανότητά τους να υιοθετούν επίπεδη διαμόρφωση παρόμοια με αυτή της 2,3,7,8-TCDD. Σε σχέση με τις διοξίνες και τα φουράνια, οι βενζολικοί δακτύλιοι των PCBs έχουν μεγαλύτερη ελευθερία να περιστρέφονται. Η προτιμητέα διαμόρφωση για όλα τα PCBs είναι η μη επίπεδη⁴⁰ και απαιτείται ενέργεια προκειμένου το μόριο να υιοθετήσει επίπεδη δομή. Για τα ομοειδή που δεν είναι υποκατεστημένα στη θέση *όρθο* (non-ortho PCBs), υπάρχει η ελάχιστη παρεμπόδιση περιστροφής μεταξύ των δύο βενζολικών δακτυλίων και η επίπεδη διαμόρφωση μπορεί να υιοθετηθεί με την ελάχιστη απαιτούμενη ενέργεια. Συνεπώς τα πιο τοξικά ομοειδή των PCBs είναι τα non-ortho γιατί έχουν μεγαλύτερη ικανότητα πρόσδεσης στον υποδοχέα AhR. Εισαγωγή έστω και ενός ατόμου χλωρίου στη θέση *όρθο* (mono-ortho PCBs) θα αυξήσει κατά πολύ την αναγκαία ενέργεια για ελεύθερη περιστροφή μεταξύ αυτού του δεσμού⁴¹, μειώνοντας έτσι την ικανότητα πρόσδεσης στον υποδοχέα και συνεπώς την τοξικότητα. Ομοειδή των PCBs που είναι δις υποκατεστημένα στις θέσεις *πάρα* και δις στις θέσεις *μέτα*, έχουν επίπεδη διαμόρφωση παρόμοια με την 2,3,7,8-TCDD.

Non-ortho ομοειδή είναι τα PCBs 77, 81, 126, 169 ενώ με ένα μόνο άτομο χλωρίου στη θέση *όρθο* (mono-ortho) είναι τα PCBs 105, 114, 118, 123, 156, 157, 167, 189, τα οποία όπως περιγράψαμε έχουν τοξικολογική δράση παρόμοια με αυτή των PCDDs και PCDFs, και γι' αυτό αναφέρονται ως παρόμοια με τις διοξίνες (dioxin-like PCBs ή d.l.-PCBs). Από τα υπόλοιπα 197 μη παρόμοια με τις διοξίνες ομοειδή (non dioxin-like PCBs), τα 6 θεωρούνται ενδεικτικά της συνολικής παρουσίας PCBs και είναι τα PCBs 28, 52, 101, 138, 153 και 180. Για το λόγο αυτό μελετώνται και στη βιβλιογραφία ονομάζονται marker PCBs ή indicator PCBs (ind.- PCBs). Δεν διαθέτουν ικανότητα σύνδεσης στον AhR υποδοχέα, όμως εμφανίζουν και αυτά τοξική δράση, μέσω διαφορετικών

μηχανισμών στο νευρικό και το αναπαραγωγικό σύστημα καθώς και καρκινογόνο δράση²⁶.

2.5 Έκφραση της τοξικότητας των ενώσεων της ομάδας των διοξινών

Η ομάδα των διοξινών περιέχει μεγάλο αριθμό ομοειδών ενώσεων οι οποίες παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό τοξικότητας. Ήταν απαραίτητο να βρεθεί κοινός τρόπος έκφρασης της συγκέντρωσης του συνόλου των ομοειδών που υπάρχουν σε ένα δείγμα, ο οποίος να αποδίδει τη συνολική τους τοξικότητα σε σχέση με την 2,3,7,8- TCDD. Η συγκέντρωση για το σύνολο των διοξινών και των παρόμοιων με αυτές ενώσεις σε ένα δείγμα αποδίδεται σε τοξικά ισοδύναμα World Health Organization Toxic Equivalents (WHO-TEQs). Για να υπολογιστεί το συνολικό WHO-TEQ σε κάθε ένα από τα 29 ομοειδή έχει αποδοθεί ένας παράγοντας τοξικής ισοδυναμίας (TEF). Στην πιο τοξική ένωση που είναι η 2,3,7,8-TCDD έχει αποδοθεί TEF=1, ενώ στα άλλα ομοειδή έχει αποδοθεί TEF ανάλογα με την τοξικότητα που εκτιμάται ότι έχουν σε σχέση με 2,3,7,8-TCDD^{42,43}. Οι συντελεστές TEF του Π.Ο.Υ. ορίστηκαν για πρώτη φορά το 1998 και επαναξιολογήθηκαν το 2005. Οι ισχύοντες και σήμερα TEF του 2005 παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Παράγοντες τοξικής ισοδυναμίας (WHO TEF 1998 και WHO TEF 2005)

ΟΜΟΕΙΔΕΙΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	WHO 1998 TEF	WHO 2005 TEF
Χλωριωμένες διβενζο-ρ-διοξίνες		
2,3,7,8-TCDD	1	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	0.01
OCDD	0.0001	0.0003
Χλωριωμένα διβενζοφουράνια		
2,3,7,8-TCDF	0.1	0.1
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	0.03
2,3,4,7,8-PeCDF	0.5	0.3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	0.1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	0.01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	0.01
OCDF	0.0001	0.0003
Non-ortho PCBs		
3,3',4,4'-tetraCB (PCB 77)	0.0001	0.0001
3,4,4',5-tetraCB (PCB 81)	0.0001	0.0003
3,3',4,4',5-pentaCB (PCB 126)	0.1	0.1
3,3',4,4',5,5'-hexaCB (PCB 169)	0.01	0.03
Mono-ortho PCBs		
2,3,3',4,4'-pentaCB (PCB 105)	0.0001	0.00003
2,3,4,4',5-pentaCB (PCB 114)	0.0005	0.00003
2,3',4,4',5-pentaCB (PCB 118)	0.0001	0.00003
2',3,4,4',5-pentaCB (PCB 123)	0.0001	0.00003
2,3,3',4,4',5-hexaCB (PCB 156)	0.0005	0.00003
2,3,3',4,4',5'-hexaCB (PCB 157)	0.0005	0.00003
2,3',4,4',5,5'-hexaCB (PCB 167)	0.00001	0.00003
2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB (PCB 189)	0.0001	0.00003

*Με εντονη γραμματοσειρά εμφανίζονται οι αλλαγές στις τιμές των TEF

Η συγκέντρωση κάθε ομοειδούς πολλαπλασιασμένη με το αντίστοιχο TEF δίνει το TEQ, ενώ το συνολικό TEQ προκύπτει από το άθροισμα όλων των ομοειδών και αποδίδει την συνολική τοξικότητα των 29 ομοειδών. Κατά τον υπολογισμό της συνολικής τοξικότητας οι ομοειδείς ενώσεις που βρίσκονται κάτω από το όριο ανίχνευσης μπορούν να συμπεριληφθούν στο άθροισμα είτε με την τιμή του ορίου ανίχνευσης (οπότε προκύπτει η ανώτερη συγκέντρωση- upperbound) είτε με την τιμή 0 (κατώτερη συγκέντρωση-lowerbound).

Πριν τον καθορισμό των TEF από τον Π.Ο.Υ., είχαν προηγηθεί άλλα σχήματα προσδιορισμού τοξικότητας από τον Οργανισμό Προστασίας Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών (U.S. EPA) και από το NATO.

Το τελευταίο σχήμα αναφέρεται κοινώς και ως International TEF (I-TEF).

Η Ευρωπαϊκή Ένωση από το 2001 έχει θεσπίσει ανώτατα όρια συγκέντρωσης για τις PCDDs και PCDFs αλλά και για το σύνολο των PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs (σε WHO-TEQ) και για τα indicator PCBs για τα τρόφιμα με τον Κανονισμό 466/2001. Από τότε έχουν γίνει τροποποιήσεις, εκ των οποίων η τελευταία είναι η ΕΕ 1259/2011¹⁶³.

Έχουν επίσης προταθεί όρια για την ανώτατη πρόσληψη μέσω της διατροφής σε PCDDs, PCDFs και PCBs σε ημερήσια βάση (tolerable daily intake, TDI 1-4 pg WHO-TEQ kg⁻¹ σωμ. βάρους) από τον Π.Ο.Υ.⁴⁴, σε εβδομαδιαία βάση (tolerable weekly intake, TWI 14 pg WHO-TEQ kg⁻¹ σωμ. βάρους) (Scientific Committee on Food, SCF, (45) και σε μηνιαία βάση (tolerable monthly intake, PTMI 70 pg WHO-TEQ kg⁻¹ σωμ. βάρους) (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives⁴⁶). Πολύ πρόσφατα η επιστημονική επιτροπή της EFSA (σημερινή ονομασία της SCF) αναθεώρησε σε 2 pg WHO-TEQ kg⁻¹ σωμ. βάρους εβδομ.⁻¹ την ανεκτή εβδομαδιαία πρόσληψη στις συγκεκριμένες ενώσεις⁴⁷.

Για τα indicator PCBs δεν έχουν οριστεί αντίστοιχα TEFs. Ωστόσο στη Συνθήκη της Στοκχόλμης για τα POPs προτείνεται ο προσδιορισμός των indicator PCBs (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 και PCB 180) καθότι τα

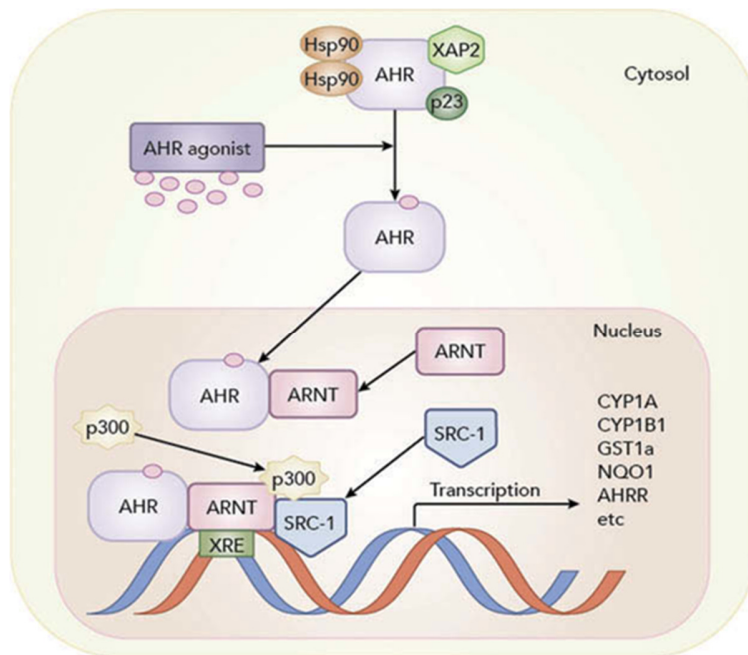
συγκεκριμένα έξι indicator PCBs βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο περιβάλλον, σε τρόφιμα και σε βιολογικά υγρά/ιστούς^{23,48}.

2.6 Μηχανισμός τοξικής δράσης

Ο AhR είναι μεταγραφικός παράγοντας που η ενεργοποίησή του εξαρτάται από τον προσδέτη και λαμβάνει μέρος σε μία ευρεία κλίμακα βιολογικών και τοξικολογικών διαδικασιών που συμβαίνουν ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε μία πληθώρα συνθετικών ή φυσικών ρύπων. Παρά το γεγονός ότι ο γενικός μηχανισμός δράσης του AhR έχει μελετηθεί λεπτομερώς και είναι ο κλασικός μηχανισμός πυρηνικού υποδοχέα, οι λεπτομέρειες για τα ακριβή μοριακά μονοπάτια που συντελούν στις βιοχημικές και τοξικολογικές επιδράσεις απαιτούν περαιτέρω μελέτη.

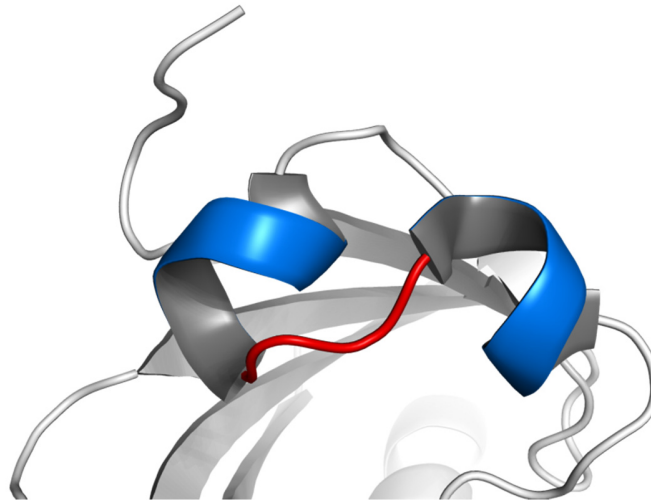
Είναι γνωστό ότι η τοξική δράση των διοξινών οφείλεται στην πρόσδεσή τους στον AhR και στη σηματοδότηση του εν λόγω υποδοχέα⁴⁹. Ο AhR ταυτοποιήθηκε πρώτη φορά σε ηπατικά κύτταρα ποντικού το 1976 από τους Poland et al. 1976⁵⁰ όπου παρατηρήθηκε ειδική πρόσδεση της ραδιο-επισημασμένης τετράχλωρο-διβενζοδιοξίνης (TCDD). Επόμενες μελέτες⁵⁰ με ³[H]-TCDD έδειξαν ότι ο AhR είναι ευρέως εκφρασμένος σε ιστούς θηλαστικών και η πρόσδεση στον AhR συνδέθηκε με μεγάλο φάσμα βιοχημικών και τοξικών αποκρίσεων που παρατηρήθηκαν στα πειραματόζωα και στα κύτταρα που εκτέθηκαν σε TCDD και άλλους αλογονωμένους αρωματικούς ρύπους που προσδένονται στον AhR. Η ενεργοποίηση του AhR έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μέσω μεταγραφής ή την καταστολή διάφορων γονιδίων^{51,52}.

Με την απουσία προσδέτη ο AhR βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα⁵³ με τη μορφή συμπλέγματος μαζί με συνοδούς πρωτεΐνες: δύο Hsp90s, μία μικρή πρωτεΐνη p23 και μία πρωτεΐνη τύπου ανοσοφιλίνης XAP2 (εικόνα 4).



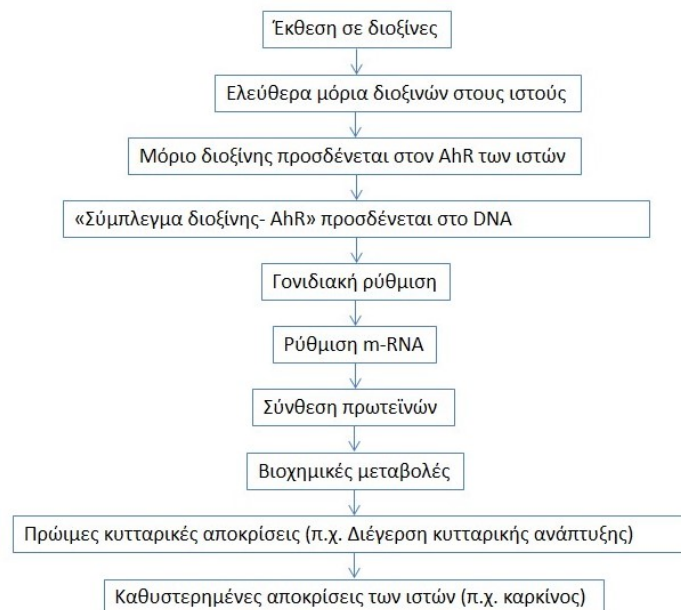
Εικόνα 4: Μηχανισμός δράσης του υποδοχέα AhR μετά την πρόσδεση AhR αγωνιστή (π.χ. TCDD)

Μόλις προσδένεται η TCDD, το σύμπλεγμα διαχωρίζεται και η AhR υπομονάδα του συμπλέγματος μετατοπίζεται στον πυρήνα και σχηματίζει ετεροδιμερές με το μόριο ARNT⁵⁴ για να δράσει τελικά σαν πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας προσδενόμενος στη περιοχή με αλληλουχία 5'-TNGCGGTG-3' του υποκινητή στο γονίδιο CYP1A1. Μεγάλο μέρος της κατανόησης του μηχανισμού της δράσης των διοξινών βασίζεται στην ανάλυση της επαγωγής συγκεκριμένων γονιδίων (π.χ. CYP1A1) από τις διοξίνες. Ο AhR και η πρωτεΐνη ARNT (εικόνα 5) είναι μέλη της ομάδας των βασικών παραγόντων μεταγραφής helix-loop-helix (bHLH). Ο όρος αυτός περιγράφει τη δομή των πρωτεϊνών αυτών, δύο έλικες ενωμένες με μία θηλιά.



Εικόνα 5: Δομή της πρωτεΐνης ARNT

Η αλληλουχία των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα μετά την έκθεση σε διοξίνες απεικονίζεται σχηματικά στο σχήμα 2.



Σχήμα 2: Γεγονότα που λαμβάνουν χώρα μετά την έκθεση σε διοξίνες

2.7 Περιστατικά οξείας έκθεσης

Η ιστορία της ανθρωπογενούς παραγωγής διοξινών και δηλητηρίασης από διοξίνες ξεκινάει σχεδόν 200 χρόνια πριν. Η αρχική απόδειξη ύπαρξης μορίων

διοξίνης προέρχεται από μία χημική μονάδα παραγωγής στο Lampertheim, στη Γερμανία η οποία παρήγαγε σόδα (soda ash) μέσω της διεργασίας LeBlanc (παραγωγή Na_2SO_4 από NaCl) από το 1827 έως το 1890. Μετά το 1890 η διεργασία αυτή αντικαταστάθηκε από ηλεκτρόλυση χλωραλκαλίου. Και οι δύο αυτές διεργασίες προκαλούν την παραγωγή διοξινών ως παραπροϊόντα. Το 1897 παρατηρήθηκε στους εργάτες της χημικής μονάδας επίμονη υπερκερατωσιακή ακμή με κύστεις. Ήταν η πρώτη φορά που χαρακτηρίστηκε η χλωρακμή⁵⁵. Πολλές δεκαετίες αργότερα, το 1980 η χημική μονάδα παραγωγής σόδας είχε μετατραπεί σε παιδική χαρά, στην οποία σε μεγάλη έκταση διαπιστώθηκε επιμόλυνση του εδάφους από διοξίνες.

Η εμπορική παραγωγή των PCBs ξεκίνησε το 1929. Χρησιμοποιήθηκαν ως ψυκτικά υγρά σε μετασχηματιστές, υδραυλικά υγρά, λιπαντικά και πλαστικοποιητές έως το 1978 όπου καταργήθηκαν. Το 1947 μία «άγνωστη» ασθένεια με κλινική εικόνα χλωρακμής που δυνητικά οδηγούσε και στο θάνατο, εμφανίστηκε σε βοοειδή στην Αμερική.

Το 1949 μία έκρηξη σε χημική μονάδα νιτρικών της Monsanto στη Δυτική Βιρτζίνια, είχε ως αποτέλεσμα την έκθεση των εργατών σε ζιζανιοκτόνο 2,4,5-τριχλωροφαινοξυακετικό οξύ (2,4,5-T) επιμολυσμένο από διοξίνες και την εμφάνιση χλωρακμής. Μελέτες παρακολούθησης στους εκτεθειμένους εργάτες έδειξαν αύξηση των περιστατικών καρκίνου ιδιαίτερα σε εκείνους που είχαν υποστεί υψηλή έκθεση.

Το 1957 σημειώθηκαν μαζικοί θάνατοι από άγνωστη αιτία σε κοτόπουλα πτηνοτροφικής μονάδας στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής συνοδευόμενοι από οίδημα. Αργότερα διαπιστώθηκε ότι τα κοτόπουλα είχαν καταναλώσει πτηνοτροφές επιμολυσμένες με ενώσεις της ομάδας των διοξινών⁵⁶.

Μεταξύ 1962 και 1970, ο Αμερικανικός στρατός προχώρησε σε επιχείρηση αποψίλωσης των δασών του Βιετνάμ για να καταστρέψει την κάλυψη των εχθρικών δυνάμεων και την αγροτική παραγωγή. Η κωδική ονομασία «Πορτοκαλί παράγοντας-Agent orange» χρησιμοποιήθηκε για το ζιζανιοκτόνο 2,4,5-T επιμολυσμένο με διοξίνες που ψεκάστηκε σε μεγάλες εκτάσεις για το

σκοπό αυτό. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στους Βετεράνους του αμερικανικού στρατού διαπιστώθηκαν αυξημένα ποσοστά διαβήτη και καρκίνων. Βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ “Agent Orange”, Hodgkin και non-Hodgkin λεμφώματος και χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (Institute of medicine, 2006).

Το 1968 στην Ιαπωνία μετά από επιβάρυνση ελαίου με PCBs, PCDDs και PCDFs σε εταιρεία παραγωγής λαδιών από τον φλοιό του ρυζιού, αφού το επιμολυσμένο λάδι καταναλώθηκε από ζώα και ανθρώπους, παρατηρήθηκε θάνατος μεγάλου αριθμού πουλερικών ενώ στους ανθρώπους εμφανίστηκαν δερματικές βλάβες, κόπωση και διαταραχές στην αναπαραγωγική και ανοσοποιητική λειτουργία. Αντίστοιχο περιστατικό συνέβη και στην Ταϊβάν το 1979.

Παρόμοιο περιστατικό συνέβη το 1971 στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής. Ολόκληρη πόλη εκτέθηκε σε υψηλά επίπεδα διοξινών, όταν επιβαρυμένα έλαια απλώθηκαν στους δρόμους του Times Beach του Missouri για τον έλεγχο και περιορισμό της σκόνης στους δρόμους. Την ίδια χρονιά η ένωση TCDD αναγνωρίστηκε ως τερατογόνος⁵⁷. Επιδημιολογική μελέτη σε αυτήν την περιοχή σε θηλάζουσες μητέρες στα τέλη του 1970 έδειξε ότι τα επίπεδα των PCBs στο μητρικό γάλα ήταν περίπου 5100 ppm, λόγω της μεγάλης κατανάλωσης ψαριών από το ποτάμι⁵⁸.

Το πιο γνωστό ατύχημα είναι αυτό του 1976 του Σεβέζο στην Ιταλία όταν μετά από έκρηξη σε χημική μονάδα παραγωγής 2,4,5-τριχλωροφαινόλης τα επίπεδα των συγκεντρώσεων στο περιβάλλον λόγω των διοξινών που απελευθερώθηκαν άγγιξαν τα 100 ppm. Στις επόμενες βδομάδες μετά το ατύχημα κάτοικοι της περιοχής εμφάνισαν χλωρακμή. Οι μελέτες που ακολούθησαν τα επόμενα χρόνια στον πληθυσμό που εκτέθηκε έδειξαν αυξημένα περιστατικά καρκίνου και διαβήτη καθώς και διαταραχές στην ενδοκρινική λειτουργία^{59,60}. Επιπλέον, χρόνια έκθεση σε διοξίνες σε δόση $0.01 \mu\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ είχε ως αποτέλεσμα αυξημένο κίνδυνο ηπατοκυτταρικού καρκινώματος και άλλων κυτταρικών καρκινωμάτων⁶¹.

Στο Βέλγιο το 1999, ένας πολύ μεγάλος αριθμός ζώων κατανάλωσε ζωοτροφές επιμολυσμένες με PCBs με αποτέλεσμα να αποσυρθούν από τις διεθνείς αγορές προϊόντα κρέατος, κυρίως πουλερικών, γαλακτοκομικά κ.α. από τα μολυσμένα ζώα. Σχεδόν δέκα χρόνια μετά, επαναλήφθηκε το ίδιο ατυχές περιστατικό όταν όλα τα χοιρινά Ιρλανδικής προέλευσης, αποσύρθηκαν διεθνώς από τα ράφια λόγω επιβάρυνσης των ζώων μετά από κατανάλωση επιμολυσμένων ζωοτροφών.

Εκτός από τα προαναφερθέντα ατυχήματα, υπάρχουν δύο περιστατικά σκόπιμης δηλητηρίασης με διοξίνες. Το 1997 στη Βιέννη, πέντε εργαζόμενοι γραμματειακής υποστήριξης σε ινστιτούτο υφασμάτων, δηλητηριάστηκαν με εξαιρετικά υψηλά επίπεδα διοξινών, ένας από τους οποίους ξεπέρασε και την πιο υψηλή συγκέντρωση που έχει μετρηθεί σε άνθρωπο (144 pg g^{-1} λίπους). Γνωστή από τον διεθνή τύπο είναι επίσης η δηλητηρίαση με διοξίνες του Viktor Yushchenko το 2004. Ο τότε υποψήφιος πρόεδρος της Ουκρανίας δηλητηριάστηκε με TCDD και δύο βδομάδες πριν τις προεδρικές εκλογές νοσηλεύτηκε με παγκρεατίτιδα και χλωρακμή, ενώ τα επίπεδα διοξινών στο αίμα του ήταν τρεις τάξεις μεγέθους μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα μέσα επίπεδα. Στην εικόνα 6 βλέπουμε φωτογραφίες πριν και μετά τη δηλητηρίαση, όπου είναι εμφανής η χλωρακμή.



Εικόνα 6: Φωτογραφία του Viktor Yushchenko πριν και μετά την εκδήλωση της χλωρακμής

Το τελευταίο γνωστό περιστατικό συνέβη το 2011 όταν έλαια για βιομηχανική χρήση, με υψηλή περιεκτικότητα σε PCBs, αναμίχθηκαν με λίπη που προορίζονται για παρασκευή ζωοτροφών από την εταιρεία «Harles und Jentzsch». Τις ζωοτροφές αυτές είχαν προμηθευτεί χιλιάδες αγροκτήματα με αποτέλεσμα να επιβαρυνθεί μεγάλος αριθμός αυγών και χοιρινών με τις ενώσεις αυτές.

2.8 Επιδράσεις στα βιολογικά συστήματα

Η μελέτη της τοξικής δράσης των ενώσεων της ομάδας των διοξινών είναι εξαιρετικά περίπλοκη καθώς επηρεάζουν πολλά συστήματα στον οργανισμό και τα αποτελέσματα έχουν μεγάλη διακύμανση αναλόγως του είδους, του τύπου κυττάρων και ιστών, της ηλικίας, του φύλου αλλά και της διάρκειας της έκθεσης και της δόσης. Οι επιδράσεις αυτές έχουν διερευνηθεί σε μελέτες σε πειραματόζωα καθώς και στον άνθρωπο είτε σε περιπτώσεις επαγγελματικής έκθεσης είτε μετά από περιστατικά όπως τα προαναφερθέντα (Vietnam-Agent Orange, Seveso, Taiwan-rice oil).

Οι κυριότερες τοξικές δράσεις που έχουν διαπιστωθεί για τις διοξίνες είναι:

- Χλωρακμή
- Ενδοκρινική τοξικότητα
- Αναπτυξιακή τοξικότητα
- Ανοσοτοξικότητα
- Νευροτοξικότητα
- Τοξικότητα στην αναπαραγωγή

Αναλυτικότερα, η έκθεση σε ενώσεις της ομάδας των διοξινών μπορεί να προκαλέσει χλωρακμή (όπως στην περίπτωση του προέδρου Yushchenko, απώλεια βάρους (waisting syndrome), ενδομητρίωση, διαταραχές στη λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος, ανοσοκαταστολή, σχηματισμό ενεργών ριζών οξυγόνου, νευροαναπτυξιακές διαταραχές, ενώ ευθύνονται για τη δημιουργία φλεγμονών και για καρκινογενέσεις^{26,62,63}.

Η θανατηφόρος δόση της 2,3,7,8-TCDD, της πιο τοξικής ένωσης της ομάδας των διοξινών, διαφέρει πολύ μεταξύ των διάφορων ειδών στα πειραματόζωα. Η οξεία δηλητηρίαση από διοξίνες μελετήθηκε από την ομάδα Stahl et al., το 1992 και τα αποτελέσματα έδειξαν απώλεια βάρους (waisting syndrome) των πειραματόζωων καθώς επίσης ότι το μεσοδιάστημα μεταξύ χορήγησης της δόσης και θανάτου ήταν το ίδιο για όλα τα ομοειδή της ομάδας των διοξινών ενώ δεν παρατηρήθηκε επιτάχυνση της ώρας θανάτου με αύξηση της δόσης. Ωστόσο διαπιστώθηκε ότι η θανατηφόρα δόση για κάθε πειραματόζωο είχε μεγάλη διακύμανση, ενδεικτικά 3000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ για τα Han Wistar ποντίκια και 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ για τα Long Evans ποντίκια σωματικού βάρους. Το 1990 η ομάδα Geyer et al., διαπίστωσε ότι η τοξικότητα των ενώσεων αυξάνεται γραμμικά σε σχέση με το ποσοστό λίπους σώματος.

Όσον αφορά στην ανθρώπινη έκθεση μετά από ατυχήματα ή σκόπιμη δηλητηρίαση δεν έχει αναφερθεί θάνατος μετά από οξεία έκθεση σε 2,3,7,8-TCDD ή μίγματα επιμολυσμένα με 2,3,7,8-TCDD²⁶. Κοινό κλινικό σύμπτωμα οξείας έκθεσης αποτελεί η εμφάνιση δερματικού εξανθήματος που εξελίσσεται σε χλωρακμή και άλλες δερματικές βλάβες⁶³. Σε μελέτη που έγινε στο Σεβέζο παρατηρήθηκαν περισσότερα περιστατικά στα παιδιά παρά στους ενήλικους και η εμφάνιση της χλωρακμής διαπιστώθηκε ότι σχετίζεται με τη δόση έκθεσης^{64,65}. Σε μελέτες⁶⁶ στους Αμερικανούς βετεράνους που συνεχίστηκαν για 20 χρόνια μετά την έκθεσή τους στον «πορτοκαλί παράγοντα» στον πόλεμο του Βιετνάμ καθώς και στους εργάτες που εκτέθηκαν κατά την έκρηξη σε χημική μονάδα εργοστασίου βρέθηκε ότι εκείνοι με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις διοξινών στον ορό είτε είχαν εμφανίσει διαβήτη (συγκέντρωση διοξινών στον ορό αίματος > 1500 pg g^{-1} λίπους) είτε είχαν μεγαλύτερη προδιάθεση (220 pg g^{-1} λίπους)^{67,68}.

Συσχέτιση μεταξύ ενδομητρίωσης και έκθεσης σε διοξίνες μελετήθηκε καταρχήν σε πειραματόζωα και κατόπιν σε πληθυσμούς που είχαν υποστεί οξεία έκθεση. Το 1993 η ομάδα Rier et al., διαπίστωσε θετική συσχέτιση μεταξύ ενδομητρίωσης και αυξανόμενης έκθεσης σε πιθήκους που τους είχε χορηγηθεί τροφή επιμολυσμένη με 2,3,7,8-TCDD σε συγκέντρωση 5-25 ppt για τέσσερα χρόνια.

Τα PCBs και ειδικότερα, οι υδροξυλιωμένοι μεταβολίτες τους που είναι επίσης βιολογικά ενεργοί έχουν στερεοχημική ομοιότητα με τη θυροξίνη (T4). Η αρνητική επίδραση της έκθεσης πειραματόζων στους ρύπους αυτούς σχετίζεται τα επίπεδα της περιφερειακής θυρεοειδικής ορμόνης⁶⁹. Οι διοξίνες και τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια προκαλούν μείωση των επιπέδων των θυρεοειδικών ορμονών και κυρίως της T4. Η επίδραση αυτή παρατηρήθηκε σε πολλά είδη πειραματοζών: ποντίκια και πηθίκους καθώς και πολικές αρκούδες⁷⁰, φώκιες⁷¹ και αετούς⁷² που βρίσκονται ελεύθερα στη φύση. Επίσης διαπιστώθηκε ότι έκθεση σε PCDDs, PCDFs και PCBs κατά την ενδομήτρια ζωή, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση έκκρισης θυρεοειδικής ορμόνης και στους απογόνους⁷³.

Η χρονική στιγμή και η διάρκεια της έκθεσης στις ενώσεις αυτές είναι υψίστης σημασίας, καθώς έκθεση κατά τη διάρκεια της κύησης έχει εμβρυοτοξικά αποτελέσματα. Σχετίζεται με χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης του εμβρύου (χαμηλό βάρος γέννησης και περιμέτρου κεφαλής), αλλαγές στη λειτουργία του νευρικού συστήματος, διαταραχές στο νοητικό επίπεδο και τη μνήμη καθώς και συμπεριφορικές διαταραχές⁶². Ειδικά η επίδραση στην νευροανάπτυξη των βρεφών έχει βρεθεί ότι σχετίζεται κυρίως με την έκθεση σε indicator PCBs των μητέρων τους κατά τη διάρκεια της κύησης⁷⁴.

Έκθεση σε PCBs κινητοποιεί τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό. Η βιομετατροπή όλων των ομοειδών PCBs ξεκινάει με τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450. Στα PCBs με υψηλό βαθμό χλωρίωσης η τοξική δράση λαμβάνει χώρα μέσω επαγωγής των ξеноβιοτικών ενζύμων μεταβολισμού, προαγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου, υπεροξειδωση λιπιδίων, οξειδωτικών και αλκυλιωτικών DNA adducts τα οποία δυνητικά προκαλούν γενετοξική επίδραση.

Τα PCBs έχουν επίσης ανοσοκατασταλτική δράση και συνδέονται με χρόνιες φλεγμονές, ενώ στοχεύουν και στο ενδοκρινικό σύστημα. Αναλόγως της στερεοχημείας τους οι μονοϋδροξυλιωμένοι μεταβολίτες των PCBs δρουν ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές των οιστρογόνων. Αυτή η διαταραχή μπορεί να

αποβεί επιζήμια στο αναπαραγωγικό σύστημα ή να έχει καρκινογόνες επιπτώσεις.

Επιδημιολογικές μελέτες^{75, 76} έχουν δείξει ότι έκθεση σε ενώσεις της ομάδας των διοξινών κατά τις κρίσιμες φάσεις της ανάπτυξης των όρχεων επηρεάζει αρνητικά τα χαρακτηριστικά του σπέρματος. Τα ευρήματα αυτά πιθανώς και να σχετίζονται με το γεγονός ότι σε πολλές χώρες που παρουσιάζουν μεγάλη βιομηχανική δραστηριότητα, ο νεανικός ανδρικός πληθυσμός παρουσιάζει χαμηλότερης ποιότητας σπέρμα.

Το 1987 ο Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC) χαρακτήρισε πιθανές καρκινογόνες ενώσεις για τον άνθρωπο (Group 2A) τα dioxin-like PCBs. Το 2013 επαναετιμήθηκε η καρκινογόνος δράση των dioxin-like PCBs, σε συνάντηση στην IARC με βάση τα νεότερα αποτελέσματα 70 ανεξάρτητων επιδημιολογικών μελετών και οι ενώσεις αυτές χαρακτηρίστηκαν πλέον καρκινογόνες για τον άνθρωπο και ανήκουν στο group 1, όπως και οι διοξίνες⁷⁷. Ενδεικτικά, στις μελέτες που εξετάστηκαν από τους ειδικούς του IARC, βρέθηκε γραμμική σχέση μεταξύ επαγγελματικής έκθεσης σε PCBs (εργάτες στην κατασκευή πυκνωτών και μετασχηματιστών ή συντηρητές εξοπλισμού ηλεκτρικής ενέργειας) και περιστατικών μελανώματος. Παρατηρήθηκαν επίσης αυξημένα ρίσκα για λέμφωμα non-Hodgkin και καρκίνο του μαστού.

Η καρκινογόνος δράση των PCBs έχει αξιολογηθεί ξεχωριστά για ορισμένα ομοειδή σε μελέτες με πειραματόζωα. Συγκεκριμένα για τα PCB 118 και 126 και ορισμένα εμπορικά προϊόντα με μεγάλη περιεκτικότητα σε χλώριο, η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε ότι σχετίζονται με καρκινογένεσεις σε πειραματόζωα^{78,79} και ειδικότερα με καλοήθεις και κακοήθεις όγκους στο ήπαρ, στον πνεύμονα και στο βλεννογόνο του στόματος. Η μελέτη του PCB 153⁸⁰ και εμπορικών μιγμάτων ομοειδών χαμηλής περιεκτικότητας σε χλώριο έδειξαν περιορισμένες ενδείξεις καρκινογόνου δράσης σε μοντέλα με πειραματόζωα.

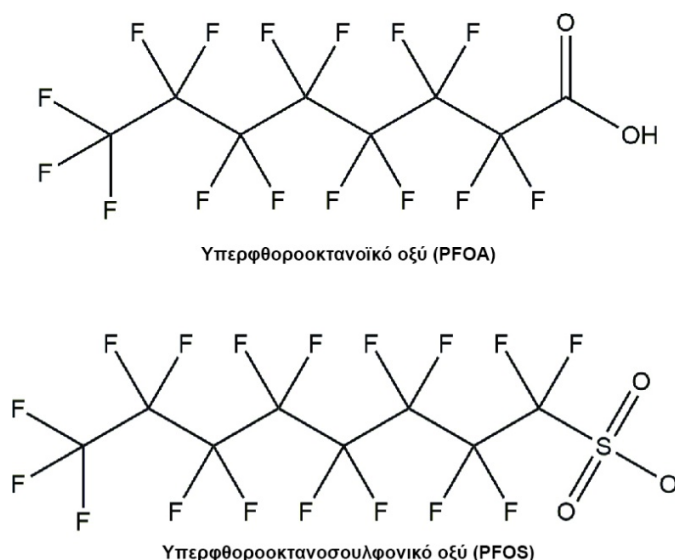
Ο Αμερικανικός Οργανισμός για την Προστασία του Περιβάλλοντος (U.S. EPA) δεν έχει θέσει ανώτατο όριο ανθρώπινης έκθεσης όσον αφορά στην καρκινογόνο

δράση των διοξινών, καθώς θεωρείται ότι ζημιά σε ένα και μόνο κύτταρο μπορεί να είναι αρκετή για την πρόκληση καρκίνου⁸¹.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Υπερφθοριωμένες ενώσεις

3.1 Χημεία, ιδιότητες και χρήσεις

Οι υπερφθοριωμένες αλκυλιωμένες ενώσεις (PFASs) είναι ενώσεις που αποτελούνται από μία υδρόφοβη ανθρακική αλυσίδα με μήκος συνήθως από C4 έως C16 στην οποία όλα τα άτομα υδρογόνου έχουν αντικατασταθεί από άτομα φθορίου και μία υδρόφιλη χαρακτηριστική ομάδα, η οποία μπορεί να είναι καρβοξυλική, σουλφονική, αμίδιο ή σουλφοναμίδιο. Ο δεσμός C-F είναι εξαιρετικά σταθερός και αντέχει σε υψηλές θερμοκρασίες μέχρι 300 °C, στην επίδραση ισχυρών οξέων, βάσεων, οξειδοαναγωγικών αντιδραστηρίων και οργανικών διαλυτών, ενώ τους προσδίδει αρκετά χαμηλή επιφανειακή τάση⁸². Τα PFASs δε βιοδιασπώνται και συσσωρεύονται στο περιβάλλον και στη τροφική αλυσίδα, ενώ έχουν χαρακτηριστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση ως ανθεκτικές-βιοσυσσωρευόμενες-τοξικές ενώσεις, PBT (Persistent- bio-accumulative-toxic) και κάποια από αυτά έχουν χαρακτηριστεί ως POPs. Το σουλφονικό υπερφθοροοκτάνιο (PFOS) και το υπερφθοροοκτανοϊκό οξύ (PFOA) αποτελούν τις πιο μελετημένες ενώσεις των PFASs, καθότι εξαιτίας των πολλών χρήσεών τους, στις οποίες θα αναφερθούμε παρακάτω, έχουν παραχθεί στο παρελθόν σε μεγάλες ποσότητες. Οι μοριακές δομές τους φαίνονται στο σχήμα 3.



Σχήμα 3: Μοριακοί τύποι των PFOA και PFOS

Το PFOS σε κανονικές συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας είναι λευκή σκόνη, με μοριακό βάρος $500.13 \text{ g mol}^{-1}$ και η διαλυτότητά του στο νερό είναι 570 mg L^{-1} (24-25 °C). Συνήθως χρησιμοποιείται σε μορφή αλάτων (K, Na, NH_4^+) ή ενσωματωμένο σε μεγαλύτερα πολυμερή.

Το PFOA σε φυσιολογικές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης είναι ένα λευκό κηρώδες στερεό ή λευκή σκόνη με μοριακό βάρος 414 g mol^{-1} και διαλυτότητα σε νερό 9.5 g L^{-1} (25 °C).

Όπως και τα υπόλοιπα PFASs εμφανίζουν υψηλή θερμική, χημική και βιολογική ανθεκτικότητα, ενώ είναι μη εύφλεκτα και διαθέτουν επιφανειοδραστικές ιδιότητες. Πρόκειται επίσης για αμφίφιλα μόρια, με την υδρόφιλη φύση τους να υπερτερεί της υδρόφοβης. Για το λόγο αυτό, δεν βιοσυσσωρεύονται στο λιπώδη ιστό όπως οι διοξίνες, αλλά τείνουν να συσσωρεύονται στο αίμα, στο σπλήνα και στους νεφρούς, κυρίως δεσμευμένα σε πρωτεΐνες^{83,84,85,86}.

Οι ιδιότητες των PFASs τις καθιστούν ιδανικές για χρήση σε πληθώρα βιομηχανικών και καταναλωτικών εφαρμογών. Τα PFASs χρησιμοποιούνται ευρέως σε προϊόντα όπως υφάσματα και χαλιά λόγω των επιφανειοδραστικών ιδιοτήτων για να προσδώσουν αδιαβροχοποίηση και αντίσταση σε λεκέδες, σε υλικά συσκευασίας, σε αφρώδη υλικά σε καθαριστικά, σε καλλυντικά, αφρούς πυροσβεστήρων, σε ηλεκτρικά κυκλώματα και στη κατασκευή πυκνωτών, καλωδίων και ημιαγωγών. Το PFOA αποτελεί επίσης την πρώτη ύλη για τη σύνθεση φθοριωμένων πολυμερών με πιο γνωστό το Teflon, που χρησιμοποιείται ως αντικολλητική επίστρωση σε μαγειρικά σκεύη⁸⁷. Οι αντικολλητικές ιδιότητες του Teflon, οφείλονται στη δομή του πολυμερούς, που αποτελείται από έλικα με τα άτομα φθορίου στην επιφάνεια και του άνθρακα στο εσωτερικό του ελικοειδούς σκελετού. Η επιφάνεια είναι εξαιρετικά αδρανής και λεία με αποτέλεσμα τα υλικά να ρέουν χωρίς να μπορούν να διεισδύσουν σε αυτήν και να επηρεάσουν την υφή της.

3.2 Επιδράσεις στα βιολογικά συστήματα

Ο χρόνος ημιζωής των PFOS και PFOA στον ανθρώπινο ορό είναι μεγάλος, 5 και 3.5 χρόνια αντίστοιχα⁸⁸ στα όργανα δε πιθανώς μεγαλύτερος⁸⁹. Λόγω των μεγάλων χρόνων ημιζωής των ενώσεων αυτών καθώς επίσης και της ιδιότητάς τους να μη βιοδιασπώνται και να βιοσυσσωρεύονται στη τροφική αλυσίδα, οι πιθανές τοξικές επιπτώσεις τους στον άνθρωπο είναι αντικείμενο μελέτης.

Σε αντίθεση με τις ενώσεις των διοξινών, τα PFOS και PFOA όπως αναφέραμε παραπάνω είναι ασθενώς λιπόφιλα, διαλυτά στο νερό και συσσωρεύονται στο ήπαρ, τα νεφρά και τη χοληδόχο κύστη και συνδέονται με τις πρωτεΐνες του αίματος⁸⁷. Ανιχνεύονται σχεδόν σε όλα τα οικοσυστήματα στον κόσμο. Πιο συγκεκριμένα, έχουν ανιχνευτεί σε πτηνά, πολικές αρκούδες, θαλάσσια θηλαστικά, ψάρια, στον υδροφόρο ορίζοντα, στον ατμοσφαιρικό αέρα και στα τρόφιμα. Μελέτες βιοπαρακολούθησης επιβεβαιώνουν την ευρεία έκθεση των ανθρώπων σε όλο τον κόσμο, καθώς έχουν ανιχνευτεί σε ορό αίματος και στο μητρικό γάλα ακόμα και σε ανθρώπους που δεν έχουν υποστεί έκθεση λόγω επαγγελματικής δραστηριότητας^{90,91}.

Η οξεία τοξικότητα των PFASs θεωρείται περιορισμένη βάση των μελετών με μοντέλα πειραματόζωων στις οποίες παρατηρήθηκε ηπατοτοξικότητα σε χρόνια έκθεση, ανάπτυξη όγκων στο ήπαρ, στον μαζικό αδένα και στα κύτταρα Leydig. Επίσης σημειώθηκαν μεταβολές στον μεταβολισμό των λιπιδίων, στα επίπεδα της γλυκόζης, της ουρίας και τον μεταβολισμό του ουρικού οξέος⁸⁷.

Σε μελέτες με πειραματόζωα οι ενώσεις PFASs συνδέονται επίσης με καρκίνο της χοληδόχου κύστης, καρκίνο του ήπατος, αναπτυξιακή και αναπαραγωγική τοξικότητα (συμπεριλαμβανομένης και θνησιμότητας στα νεογνά), ανοσοτοξικότητα, νευροτοξικότητα, επιδράσεις στο ενδοκρινικό σύστημα και γενετοξικότητα. Όσον αφορά στην εμβρυϊκή έκθεση, αυξημένα επίπεδα συνδέονται με χαμηλότερες μετρήσεις στις παραμέτρους ανάπτυξης στα νεογνά.

Ωστόσο οι διαθέσιμες πληροφορίες είναι περιορισμένες και αντιφατικές και παρά το γεγονός ότι μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι τα PFASs εκδηλώνουν τοξικότητα^{92,93,94} η επιστημονική ομάδα σχετικά με τους ρύπους στην τροφική

αλυσίδα της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων στη γνωμοδότηση⁹⁰ που δημοσιεύτηκε το 2008 αναφέρει ότι «δεν υπάρχουν πιθανές δυσμενείς επιπτώσεις των PFOS και PFOA στο γενικό πληθυσμό, ωστόσο δεν είναι σαφείς οι αναπτυξιακές επιπτώσεις». Η αναφορά αυτή βασίστηκε σε τοξικολογικές μελέτες για την ανάπτυξη σε πειραματόζωα όπου παρατηρήθηκε χαμηλό βάρος γέννησης, αυξημένη θνησιμότητα των νεογνών και μειωμένη ανάπτυξη μετά τη γέννηση αλλά και από επιδημιολογικές μελέτες στον γενικό πληθυσμό και στον πληθυσμό που εκτίθεται στα PFASs λόγω επαγγέλματος^{94,95}. Βάσει της αναφοράς της EFSA, η Ευρωπαϊκή Ένωση πρότεινε την παρακολούθηση των υπερφθοριωμένων ενώσεων PFOS και PFOA αλλά και των πρόδρομων ενώσεων τους εάν αυτό είναι δυνατό όπως των PFOSA (perfluorooctane sulphonamide), NEtFOSE (N-ethyl perfluorooctane sulfonamidoethanol) και 8:2 fluorotelomer alcohol στα προϊόντα τροφίμων για το 2010 και 2011 (Οδηγία 2010/161/EC). Επίσης προτάθηκαν από την Ευρωπαϊκή αρχή για την ασφάλεια των τροφίμων οι τιμές 150 ng kg⁻¹ body weight για το PFOS και 1500 ng kg⁻¹ body weight για το PFOA ως ανεκτή ημερήσια πρόσληψη (TDI).

Νεότερη γνωμοδότηση της EFSA⁹⁶ που δημοσιεύτηκε το 2018 με βάση νέες επιδημιολογικές μελέτες αναφέρει αύξηση των επιπέδων ολικής χοληστερόλης στον ορό των ενηλίκων και μειωμένη ανοσολογική απόκριση μετά από εμβολιασμό στα παιδιά ως συνέπεια της έκθεσης σε PFOS και PFOA ενώ προτείνει για πρώτη φορά ανώτατο όριο εβδομαδιαίας πρόσληψης μέσω της διατροφής 13 ng kg b.w.⁻¹ για το PFOS και 6 ng kg b.w.⁻¹ για το PFOA.

Το 2017 ο Διεθνής Οργανισμός για την Έρευνα του Καρκίνου κατέταξε το PFOA στην ομάδα 2B (πιθανώς καρκινογόνο για τον άνθρωπο). Ο Αμερικανικός Οργανισμός Προστασίας του Περιβάλλοντος (US EPA) έχει ταξινομήσει τα PFOS και PFOA ως πιθανώς καρκινογόνες ενώσεις. Πολλοί διεθνείς οργανισμοί έχουν συστήσει τη μείωση της παραγωγής και χρήσης των PFASs. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή, το 2008 απαγόρευσε την εμπορία και τη χρήση του PFOS με την οδηγία 2006/122/EC. Το 2000 η εταιρεία 3M σταμάτησε την παραγωγή PFOS.

Το παράδειγμα της 3M ακολούθησαν και άλλες βιομηχανίες και σταμάτησαν την παραγωγή PFOS.

Επιπλέον, το PFOS, τα άλατά του και το PFOS-F (perfluorooctane sulfonyl fluoride) έχουν προστεθεί στη λίστα των POPs της Συνθήκης της Στοκχόλμης σε τροπολογία τον Μάιο του 2009, η οποία συμπεριέλαβε στην ομάδα των POPs εννέα χημικές ενώσεις. Σύμφωνα με την τροπολογία, το PFOS έχει την ικανότητα να μεταφέρεται σε μεγάλες αποστάσεις και πληρεί τα κριτήρια τοξικότητας της Συνθήκης της Στοκχόλμης: <http://chm.pops.int/Programmes/NewPOPs/The9newPOPs/tabid/672/language/en-US/Default.aspx>. Τα PFOA, όπως και το PFOS είναι χημικά πολύ σταθερή ένωση, ωστόσο λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής δεν έχει χαρακτηριστεί ως POP.

3.3 Πιθανές οδοί έκθεσης

Οι πηγές έκθεσης στα PFASs περιλαμβάνουν τα τρόφιμα, το πόσιμο νερό, τα υλικά συσκευασίας τροφίμων⁹⁷ και τη σκόνη⁹⁸. Ωστόσο η μεγαλύτερη συνεισφορά στην ανθρώπινη έκθεση σε PFASs οφείλεται στη διατροφή και το νερό⁹⁹. Συνεπώς με τη χρήση δεδομένων των επιπέδων των συγκεντρώσεων των PFASs σε προϊόντα τροφίμων ευρείας κατανάλωσης σε συνδυασμό με δεδομένα κατανάλωσης των τροφίμων μπορεί να εκτιμηθεί η έκθεση του πληθυσμού στις ενώσεις αυτές μέσω της διατροφής. Άλλα PFASs όπως π.χ. οι φθοριωμένες αλκοόλες (FTOH) που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή φθοριωμένων πολυμερών, διασπώνται και απελευθερώνουν PFOS και PFOA με αποτέλεσμα να συνεισφέρουν στη συνολική πρόσληψη¹⁰⁰. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι τα PFASs μεταφέρονται από τη μητέρα στο έμβρυο μέσω του πλακούντα¹⁰¹ και στα νεογνά μέσω του θηλασμού^{102, 103}. Στα βρέφη λόγω της χαμηλής μάζας σώματος και της αυξημένης δραστηριότητας “hand-to-mouth” η επιβάρυνση σε PFASs είναι μεγαλύτερη από τους ενήλικους¹⁰⁴. Επιπλέον μελέτες πρέπει να πραγματοποιηθούν για την έκθεση μέσω του δέρματος κατά την επαφή με προϊόντα που περιέχουν PFASs, αλλά και για την έκθεση του ανθρώπου μέσω της εισπνοής αέρα στην οικία του.

Η μέση συγκέντρωση του PFOA στο αίμα για τον Ευρωπαϊκό πληθυσμό είναι 4-20 $\mu\text{g L}^{-1}$ ενώ για το PFOS είναι 4-55 $\mu\text{g L}^{-1}$. Μεταξύ των δύο PFASs, το PFOS εντοπίζεται συνήθως σε μεγαλύτερη συγκέντρωση συγκριτικά με το PFOA. Επιπλέον, κατά τη σύγκριση των δύο φύλων, τα επίπεδα των ρύπων αυτών είναι υψηλότερα στους άντρες καθώς στις γυναίκες που βρίσκονται σε προ-εμμηνοπαυσιακή ηλικία πραγματοποιούνται βιοχημικοί μηχανισμοί κάθαρσης⁹¹.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Εκθεσείωμα- Exposome

4.1 Η έννοια του Exposome

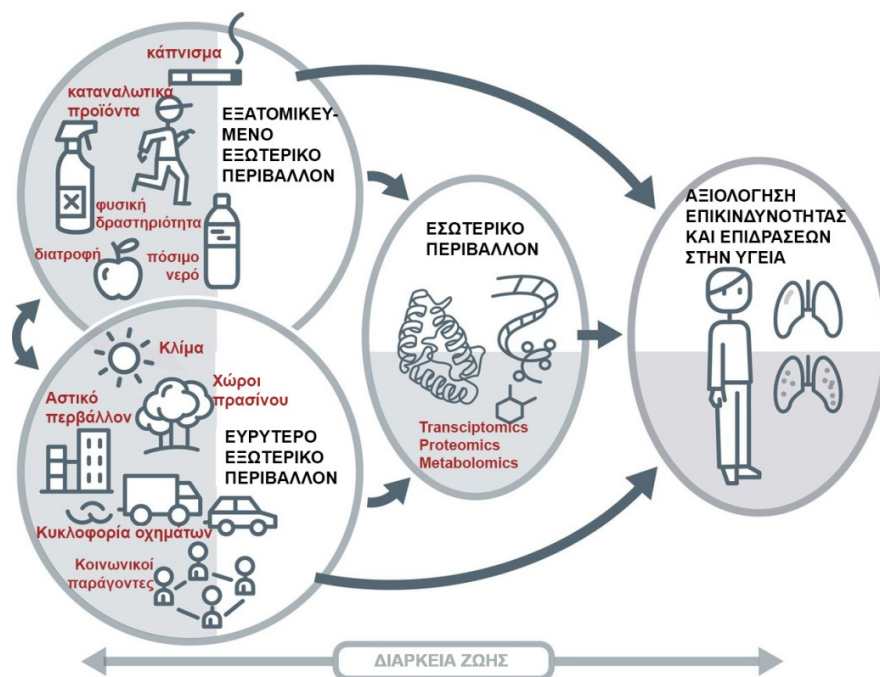
Η θνησιμότητα παγκοσμίως σε μεγάλο ποσοστό οφείλεται σε χρόνιες ασθένειες¹⁰⁵, κυρίως στις καρδιαγγειακές ασθένειες (29%), στον καρκίνο (15%) και σε ασθένειες του αναπνευστικού (7%)¹⁰⁵. Τις τελευταίες δεκαετίες τα μεταβολικά νοσήματα, οι νευροαναπτυξιακές και νευροεκφυλιστικές νόσοι, οι αλλεργίες και τα αυτοάνοσα νοσήματα έχουν εμφανώς αυξηθεί¹⁰⁶. Ωστόσο οι δυνατότητες της ιατρικής κοινότητας να προλαμβάνει την ανάπτυξη των νόσων αυτών, να ανταποκρίνεται με την κατάλληλη αγωγή αλλά και να εξάγει συμπεράσματα για τη διασύνδεση των ασθενειών αυτών με άλλες παθογένειες παραμένει περιορισμένη. Έχει βρεθεί ότι η αιτιολογία των χρόνιων ασθενειών δε συνδέεται με γενετικούς παράγοντες αποκλειστικά, αλλά οφείλεται σε έναν περίπλοκο συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Επομένως υπάρχει ανάγκη ανάπτυξης βελτιωμένων εργαλείων που θα συμβάλουν στην «ποσοτικοποίηση» του συνόλου των περιβαλλοντικών επιδράσεων.

Παρά το γεγονός ότι οι γενετιστές χρησιμοποιούν τον όρο «περιβάλλον» για να τονίσουν τους «μη γενετικούς» παράγοντες, για την πλειοψηφία των επιστημόνων και για τον γενικό πληθυσμό η έννοια «περιβάλλον» είναι συνυφασμένη αποκλειστικά με την περιβαλλοντική ρύπανση. Με την προσέγγιση αυτή αντιπροσωπεύεται μόνο μία κατηγορία έκθεσης, η οφειλόμενη στους εξωτερικούς ρύπους, ενώ παραλείπονται οι εσωτερικοί παράγοντες όπως π.χ. η φυσική διαδικασία της γήρανσης, οι φλεγμονές, το οξειδωτικό στρες, οι προϋπάρχουσες ασθένειες, ο τρόπος ζωής και πολλά άλλα καθώς και το αποτέλεσμα που επιφέρει ο συνδυασμός όλων αυτών.

Ο όρος «exposome», εκθεσείωμα, είναι πολύ πρόσφατος όρος, καθώς μόλις το 2005 ο Wild¹⁰⁷ τον εισήγαγε για να περιγράψει το σύνολο της περιβαλλοντικής έκθεσης, συμπληρωματικής ως προς το σύνολο του γονιδιώματος του ανθρώπου, από την σύλληψη έως τον θάνατό του. Ο όρος αυτός αντιπροσωπεύει την αθροιστική εκτίμηση της έκθεσης καθόλη τη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου σε εσωτερικούς παράγοντες (ενώσεις που παράγονται από

το ίδιο το σώμα από φλεγμονές, οξειδωτικό στρες, οξειδωση των λιπιδίων, προϊόντα του μεταβολισμού και μικροβίωμα)¹⁰⁸ και εξωτερικούς παράγοντες, λόγω της διατροφής, του τρόπου ζωής, των κοινωνικο-οικονομικών συνθηκών, της συμπεριφοράς, των περιβαλλοντικών ρύπων¹⁰⁹ (αέρα, νερού, τροφίμων, αιωρούμενων σωματιδίων, σκόνης) κ.α.

Πιο αναλυτικά, το exposome (εικόνα 7) περιλαμβάνει τρεις αλληλοεπικαλυπτόμενους τομείς:



Εικόνα 7: Η έννοια του exposome

1. Το ευρύτερο εξωτερικό περιβάλλον, π.χ. στρεσογόνο περιβάλλον, αγροτικό ή αστικό περιβάλλον διαμονής, κλιματικοί, κοινωνικο-οικονομικοί, ψυχολογικοί παράγοντες, εκπαίδευση και συμπεριφορά ατόμου. Περιλαμβάνει τη δυναμική αλληλεπίδραση με τον περίγυρο και την επίδραση των διαπροσωπικών σχέσεων στη δημιουργία ή όχι φυσικού και συναισθηματικού στρες.
2. Το εξατομικευμένο εξωτερικό περιβάλλον: Η έκθεση σε συγκεκριμένους περιβαλλοντικούς ρύπους όπως ο καπνός του τσιγάρου, ρύποι που σχετίζονται με τη διατροφή και την επαγγελματική ενασχόληση,

ακτινοβολία, διαμονή σε επιβαρυμένο με χημικούς ρύπους περιβάλλον, ηχορύπανση, η φυσική δραστηριότητα κ.α.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα για τη συνεισφορά του εξωτερικού περιβάλλοντος αποτελεί η μελέτη της παθολογίας του άσθματος, που απαιτεί ακριβή και παράλληλη μέτρηση πολλών παραμέτρων που σχετίζονται με το περιβάλλον εσωτερικών χώρων (αέριοι ρύποι, κατοικίδια, μούχλα, σκόνη), το εξωτερικό περιβάλλον (ρύπανση περιβαλλοντικού αέρα, χώροι πρασίνου, αστικό περιβάλλον) καθώς και μελέτη του τρόπου ζωής.

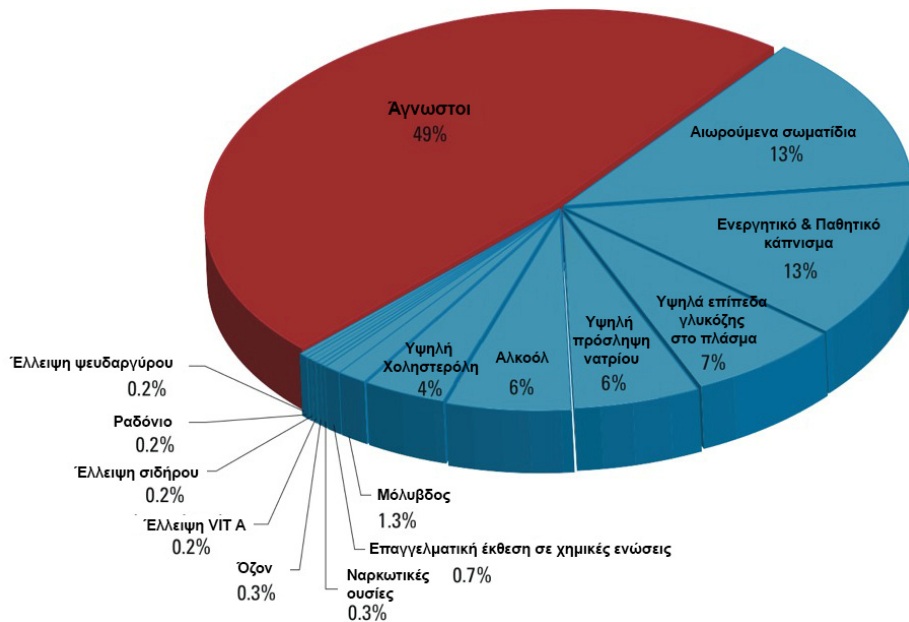
3. Εσωτερικό περιβάλλον: μεταβολικές οδοί π.χ. της γλυκόλυσης, γλυκονεογένεσης, οξειδωτικής αναπνοής, συμμετοχή των κυτοχρωμάτων p450 στην αποτοξίνωση του οργανισμού, ενδογενείς ορμόνες, φλεγμονές, φυσική γήρανση, οξειδωτικό stress κ.α. Ακόμα και το σύνολο των μικροβίων (microbiome) του οργανισμού παίζει σπουδαίο ρόλο στις ενδογενείς διεργασίες. Το μικροβίωμα το οποίο βρίσκεται στα όρια του εξωτερικού περιβάλλοντος με τις οδούς εισόδου του οργανισμού όπως είναι το δέρμα, οι αεραγωγοί κ.α. συνεισφέρει δυναμικά σε πολλαπλές βασικές λειτουργίες του οργανισμού σε υγιή κατάσταση (μεταβολισμός θρεπτικών συστατικών, ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος) ή παθολογικές καταστάσεις στις οποίες αλλαγή διατροφής ή λήψη φαρμακευτικής αγωγής μπορεί να αλλάξει άρδην την αρχιτεκτονική του μικροβιώματος^{110,111}.

Η έρευνα πάνω στο exposome είναι μία πολλά υποσχόμενη, διεπιστημονική προσέγγιση σε κάθε έκθεση που δεν είναι γενετική. Αφορά στη συνολική μέτρηση των περιβαλλοντικών επιρροών, βιολογικών αποκρίσεων και βιοχημικών αντιδράσεων του οργανισμού που είναι υπεύθυνες για τη βιωσιμότητα-διατήρηση της ζωής και των αποκρίσεων στις περιβαλλοντικές πιέσεις, συμπεριλαμβανομένων και των επιγενετικών τροποποιήσεων και μεταλλάξεων, που λαμβάνουν χώρα σε όλη τη διάρκεια της ζωής ήδη από τη σύλληψη¹¹⁰. Η περιβαλλοντική έκθεση παραδείγματος χάρη σε γενοτοξικούς ρύπους μπορεί να

προκαλέσει μόνιμες γενετικές αλλαγές μέσω μεταλλαξιγένεσης και να έχει μόνιμη επίδραση στην γονιδιακή έκφραση μέσω επιγενετικών μηχανισμών, οι οποίοι παίζουν κεντρικό ρόλο στην διαφοροποίηση και ανάπτυξη επιδρώντας στη λειτουργία του γονιδιώματος πριν τη γέννηση και σε ολόκληρη τη διάρκεια της ζωής.

Το exposome είναι ένα εργαλείο κατανόησης της κατάστασης της υγείας. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει την καταλυτική επίδραση του περιβάλλοντος στην υγεία. Παρόλα αυτά μεγάλο μέρος των παραγόντων στους οποίους οφείλονται οι χρόνιες ασθένειες που σχετίζονται με την περιβαλλοντική έκθεση παραμένουν άγνωστοι¹⁰⁸. Ακόμα όμως και για τους παράγοντες που είναι γνωστοί, υπάρχουν κενά στην επιστημονική γνώση όσον αφορά στην αλληλεπίδραση που έχει η συνδυασμένη δράση του συνόλου των εκθέσεων και το αντίκτυπό τους στην ανθρώπινη υγεία¹¹². Επιπλέον, πρέπει να προσδιοριστούν τα μέτρα που πρέπει να προτείνουν οι επιστήμονες για να μειωθεί ο κίνδυνος ανάπτυξης ασθενειών που συνδέεται με τις γνωστές και άγνωστες, εσωτερικές και εξωτερικές εκθέσεις που έχουν επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Στο σχήμα 4 παρουσιάζονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας οι παράγοντες κινδύνου (αιωρούμενα σωματίδια, ενεργητικό και παθητικό κάπνισμα, κατανάλωση αλκοόλ, διατροφή κ.α.) που συνεισφέρουν στη θνησιμότητα από χρόνιες^{113,114} ασθένειες. Εκτιμάται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ότι 49% (σχήμα 4) των παραγόντων κινδύνου παραμένουν άγνωστοι, παρά την αποκωδικοποίηση της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος το 2001 που έδωσε το έναυσμα στους επιστήμονες να ασχοληθούν διεξοδικά με το σύνολο του γονιδιώματος και συνεπεία αυτού και με τα παρελκόμενά του (genome→transcriptome→proteome→metabolome). Η «χαρτογράφηση» των άγνωστων παραγόντων κινδύνου απαιτεί την εκτενή μελέτη του exposome. Τα τελευταία χρόνια έχουν κάνει την εμφάνισή τους Ευρωπαϊκά και Αμερικανικά προγράμματα (Helix, Exposomics, HEALS και Hercules) που αποσκοπούν στην ενδεδειγμένη μελέτη του exposome και τον τρόπο που επηρεάζει την υγεία του ανθρώπου μέσω έρευνας σε μεγάλα τμήματα του πληθυσμού. Με εργαλείο τις πληροφορίες από μελέτες συσχέτισης του περιβάλλοντος με την υγεία σε ευρύ

τμήμα του πληθυσμού, το exposome θα μας παρέχει πιο εμπειριστατωμένες πληροφορίες από το σύνολο του γονιδιώματος αφού το πρώτο ενσωματώνει όλες τις εξωτερικές συνισταμένες σε συνδυασμό με τις γενετικές πληροφορίες¹¹⁵.



Σχήμα 4: Παράγοντες κινδύνου που συμβάλουν στη θνησιμότητα από χρόνιες ασθένειες

Εν αντιθέσει με τη «στατική» φύση του συνόλου του γονιδιώματος, το exposome είναι «δυναμικό». Μπορεί να τροποποιηθεί σε βάθος χρόνου, αναλόγως του εσωτερικού και εξωτερικού περιβάλλοντος. Επιπλέον, η έκθεση δεν έχει την ίδια επίδραση κατά τη διάρκεια των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων που διανύει ο άνθρωπος. Το “παράθυρο” έκθεσης είναι καθοριστικής σημασίας για τις ενδεχόμενες επιδράσεις στην υγεία του. Η μέτρηση του exposome σε μία δεδομένη χρονική στιγμή δεν είναι επαρκής για να μελετηθεί το σύνολο των επιδράσεων του περιβάλλοντος στην υγεία. Ένας άνθρωπος κατά τη διάρκεια της ζωής του μπορεί να έχει σταδιακές αλλαγές στο προφίλ του exposome ή ακόμα και δραματικές ανά διαστήματα στα διάφορα στάδια της ζωής του, όπως για παράδειγμα κατά την αλλαγή εργασιακού χώρου, λήψης φαρμακευτικής αγωγής κ.α. Γενικώς δραματικές αλλαγές στο προφίλ του exposome συμβαίνουν όταν πραγματοποιείται απότομη μετάβαση από ένα περιβάλλον σε άλλο (π.χ. κατά την γέννηση ή λόγω μετανάστευσης), ακόμα και με διατάραξη του εσωτερικού περιβάλλοντος (π.χ. ορμονικές διαταραχές). Θεωρητικά για να

έχουμε πλήρη εικόνα του exposome ενός ατόμου, θα πρέπει να αρχίσουν οι μετρήσεις ήδη κατά τη «σύλληψή» του όπου θα παρακολουθείται σε πολλά επίπεδα (εξωτερικό και εσωτερικό περιβάλλον) η μητέρα του (διατροφικές συνήθειες, περιβάλλον εργασίας και διαμονής, επίπεδα ορμονών, προϋπάρχουσες ασθένειες κ.α) και μετά την γέννησή του θα πρέπει να υφίσταται μόνιμη παρακολούθηση (εξωτερικό και εσωτερικό περιβάλλον) το άτομο του οποίου μελετάται το προφίλ. Όπως εύκολα αντιλαμβάνεται κανείς είναι εξαιρετικά περίπλοκο για να πραγματοποιηθεί σε πρακτική βάση. Αυτό που θα μπορούσε να γίνει σε πρακτικό επίπεδο είναι να μελετηθούν τα στάδια ανάπτυξης σε διαφορετικές ηλικιακές ομάδες ανθρώπων που συμμετέχουν σε μεγάλης έκτασης μελέτες πληθυσμών. Το ενδιαφέρον εστιάζεται κυρίως στη μελέτη του exposome στις ευαίσθητες περιόδους της ενδομήτριας ανάπτυξης αλλά και στην πρώιμη βρεφική ηλικία, όπου η επίδραση του περιβάλλοντος επιφέρει μόνιμες επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία (π.χ. αναπνευστικό σύστημα και αλλεργίες). Συνεπώς ο προσδιορισμός του exposome στα πρώτα αυτά στάδια της ανάπτυξης ίσως ρίξει φως σε φλέγοντα θέματα που απασχολούν εδώ και δεκαετίες τους ειδικούς υγείας¹¹¹.

Προφανώς η μελέτη του exposome παρουσιάζει μεγάλες προκλήσεις στην ανάπτυξη και εφαρμογή του από την θεωρία στην πράξη, έως ότου να αποτελέσει εργαλείο για επιδημιολογικές μελέτες. Σε αυτές περιλαμβάνονται:

1. Ακριβής και αξιόπιστη μέτρηση ρύπων του εξωτερικού περιβάλλοντος. Η συμπεριφορά του «κοκτέιλ» των ρύπων είναι άγνωστη. Ο τρόπος δράσης του μίγματος των ρύπων (δρουν προσθετικά, συνεργιστικά ή ανταγωνιστικά) επιδέχεται μελέτης.
2. Η χρονική διάρκεια της έκθεσης στους βλαπτικούς παράγοντες.
3. Η μέτρηση του εσωτερικού περιβάλλοντος που προκύπτει από την βιολογική απόκριση του οργανισμού (π.χ. μεταβολίτες).
4. Κατάλληλη επιλογή του χρονικού παραθύρου της μελέτης του exposome λόγω της δυναμικής του. Πολλές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου έχουν τις ρίζες τους στην ενδομήτρια ζωή ή στις προηγούμενες γενιές. Πρέπει λοιπόν να μελετηθούν και να καθοριστούν τα χρονικά διαστήματα

της ζωής του ανθρώπου που είναι κρίσιμα για την έκθεσή του σε ξενοβιοτικούς παράγοντες.

5. Αξιολόγηση του κοινωνικού περιβάλλοντος, του τρόπου ζωής και συμπεριφοράς του ατόμου μέσω ειδικά κατασκευασμένων ερωτηματολογίων.

Η επίδραση του περιβάλλοντος στην υγεία είναι πολυπαραγοντικό θέμα. Η επιτυχής εφαρμογή του exposome αποσκοπεί στην ανατροπή των μέχρι πρότινος δεδομένων «ένας παράγοντας κινδύνου-μία επίπτωση». Καθ' όλα τα στάδια της ζωής του, ο άνθρωπος έρχεται σε διαρκή επαφή με «κοκτέιλ» ρύπων μέσω του εξωτερικού και εσωτερικού περιβάλλοντος. Πρόσφατες τοξικολογικές μελέτες δείχνουν ότι η έκθεση ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις ρύπων (όπως π.χ. οι ενδοκρινικοί διαταράκτες) μπορεί να έχουν επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου¹¹⁵. Βασικός σκοπός της μελέτης του exposome είναι να βρεθεί η σύνδεση μεταξύ του γενικού περιβάλλοντος με τους μέχρι σήμερα αγνώστους παράγοντες ρίσκου που είναι υπεύθυνοι για την «έξαρση» των χρόνιων ασθενειών.

4.2 Μέτρηση του exposome

Η μελέτη του exposome πραγματοποιείται με τη συνεργασία επιστημόνων από διάφορα πεδία, όπως και στην περίπτωση του Ευρωπαϊκού προγράμματος HEALS (Health and Environment-wide Associations based on Large population Surveys), FP7-ENV-2013-two-stage. Συγκεκριμένα απαιτείται η συνεργασία αναλυτικών χημικών, μοριακών βιολόγων, τοξικολόγων, βιοτεχνολόγων, ειδικών στη βιοπληροφορική και βιοστατιστική, επιδημιολόγων, κοινωνιολόγων και ειδικών στην κλινική έρευνα. Προς την επίτευξη μίας αρμονικής συνεργασίας όλων αυτών των ειδικοτήτων πρέπει να βρεθεί κοινός κώδικας συνεννόησης, νέα εργαλεία, μέθοδοι και πρωτοποριακή τεχνολογία, ηλεκτρονικές πλατφόρμες και υπολογιστικά μοντέλα που θα χρησιμοποιούνται από τους εμπλεκόμενους επιστήμονες προκειμένου να αποτυπωθεί η πολυπλοκότητα των πολλαπλών εκθέσεων και οι επιπτώσεις τους στην υγεία. Η μελέτη του exposome επωφελείται από την ανάπτυξη τεχνολογιών όπως είναι οι αισθητήρες μέτρησης

της κινητικής δραστηριότητας ή των αισθητήρων μέτρησης περιβαλλοντικών ρύπων. Επιπρόσθετα γίνεται χρήση ειδικά διαμορφωμένων ερωτηματολογίων για πιο αναλυτικές πληροφορίες σε ατομικό επίπεδο αλλά και για παρακολούθηση της κατάστασής του, σαν εναλλακτική, μη επεμβατική μέθοδος όπου κρίνεται εφικτό.

Μεγάλη πρόκληση για την έρευνα του exosome αποτελεί η ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων αρκετά ευαίσθητων για τη μέτρηση βιοδεικτών (χημικών ρύπων ή προϊόντων βιοχημικής απόκρισης) σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξεως των pg στο πλαίσιο της βιοπαρακολούθησης (Human Biomonitoring, HBM). Πιο αναλυτικά οι βιοδείκτες αντικατοπτρίζουν το φορτίο του οργανισμού σε συγκεκριμένο τοξικό ρύπο ανεξαρτήτως πηγών έκθεσης του οργανισμού και λαμβάνοντας υπόψη την μεταβλητότητα στη συμπεριφορά του ρύπου στον μεταβολισμό και την απέκκρισή του ανά οργανισμό. Οι βιοδείκτες διαχωρίζονται σε τρεις τύπους βάσει της ιδιότητας που προσδιορίζουν, συγκεκριμένα κατατάσσονται σε:

- Βιοδείκτες έκθεσης: Πραγματοποιείται ταυτοποίηση και προσδιορισμός χημικών υπολειμμάτων σε ιστούς ή βιολογικά υγρά, μεταβολίτες ξеноβιοτικών ή φυσιολογικών διεργασιών που είναι αποτελέσματα της έκθεσης. Παρέχουν πληροφορίες για την συνολική έκθεση του ατόμου από όλες τις πηγές.
- Βιοδείκτες επίδρασης: Δείκτης για τις μετρήσιμες μεταβολές που υφίσταται ένας οργανισμός μέσω της έκθεσης. Μπορούν να ποσοτικοποιηθούν και είναι μέτρο της μεταβολής βιοχημικής, φυσιολογικής, συμπεριφορικής φύσεως κ.α. Η μεταβολή αυτή συνδέεται και με την επίδραση στην κατάσταση της υγείας.
- Βιοδείκτες ευαισθησίας: Δείκτες φυσικών χαρακτηριστικών ενός οργανισμού που τον καθιστούν πιο ευάλωτο σε σχέση με άλλους στις επιδράσεις που έχει η έκθεση του οργανισμού αυτού σε έναν συγκεκριμένο χημικό ρύπο. Χρησιμοποιούνται για να διαχωριστούν υποομάδες από πληθυσμό, οι οποίες εμφανίζουν μεγαλύτερο ρίσκο σε μία

έκθεση από ότι άλλες υποομάδες του πληθυσμού. Οι δείκτες αυτοί είναι πολύ χρήσιμοι για την λήψη προληπτικών μέτρων.

Ένας αποτελεσματικός βιοδείκτης θα πρέπει να εντοπίζεται στον οργανισμό, εφόσον αυτός έχει εκτεθεί στον ρύπο και να αξιολογείται εάν η έκθεση του οργανισμού στον ρύπο αυτό ενέχει αυξημένο κίνδυνο ασθένειας για τον οργανισμό.

Στην επιλογή του κατάλληλου βιολογικού υποστρώματος (υγρά, ιστοί, τρίχες, οστά, δόντια κ.α.) πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η αλληλεπίδραση του αναλύτη με το υπόστρωμα αλλά και η κινητική συμπεριφορά του βιοδείκτη. Διαφορετικά υποστρώματα αντανakλούν διαφορετικά χρονικά διαστήματα της έκθεσης στους ρύπους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο μόλυβδος, ο οποίος τις πρώτες 35 μέρες που εισέρχεται στον οργανισμό εντοπίζεται στο αίμα, για έναν χρόνο ανιχνεύεται στους μαλακούς ιστούς και κατόπιν για 20 χρόνια βρίσκεται στα οστά. Για αυτόν τον λόγο η επιλογή κατάλληλου συνδυασμού βιολογικού υποστρώματος και χημικού ρύπου (βιοδείκτη) προς μέτρηση εξαρτάται κυρίως από τις κινητικές ιδιότητες της ένωσης. Κατά γενικό κανόνα στις πολύ σταθερές ενώσεις όπως είναι και αυτές της ομάδας των διοξινών και των υπερφθοριωμένων ενώσεων που μελετώνται στη παρούσα διατριβή, ως βιοδείκτη έκθεσης θεωρούμε τις συγκεντρώσεις των αρχικών ενώσεων (όχι των μεταβολιτών τους) οι οποίες μετρώνται στο αίμα, τον ορό ή τα ούρα. Στην περίπτωση των χημικών ενώσεων με γρήγορο μεταβολισμό και σύντομο χρόνο ημίσειας ζωής όπως είναι η περίπτωση των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων, πολυαρωματικών υδρογονανθράκων, διφαινόλης Α, φθαλικών εστέρων κ.α. επιλέγονται ως βιοδείκτες ένας και παραπάνω μεταβολίτες και προσδιορίζονται στα ούρα.

Κατά γενικό κανόνα, σε ενώσεις με χρόνο ημίσειας ζωής λιγότερο από 2 h, η βιοπαρακολούθηση δεν καθίσταται εφικτή. Στην περίπτωση που ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι της τάξης 2-10 h, το δείγμα που συλλέχθηκε στο τέλος της μέρας αντικατοπτρίζει την έκθεση κατά τη διάρκεια της ημέρας, ενώ για ενώσεις με χρόνο ημίσειας ζωής 10-100 h, το βέλτιστο χρονικό διάστημα δειγματοληψίας

είναι στο τέλος της εβδομάδας και το αποτέλεσμα της μέτρησης αντικατοπτρίζει την έκθεση κατά τη διάρκεια των τελευταίων ημερών. Για τις χημικές ενώσεις με μεγάλους χρόνους ημίσειας ζωής είναι κοινώς αποδεκτό από την επιστημονική κοινότητα, ότι οι βιοδείκτες έκθεσης υπερτερούν ξεκάθαρα σε σταθερότητα και απαιτείται περιορισμένος αριθμός μετρήσεων για τον χαρακτηρισμό της έκθεσης¹¹⁶. Η επικύρωση των βιοδεικτών είναι υψίστης σημασίας και αφορά στο αναλυτικό αλλά και στο επιδημιολογικό μέρος της έρευνας. Η χρήση μη επικυρωμένων βιοδεικτών μπορεί να οδηγήσει σε μη έγκυρες γενικεύσεις και λανθασμένη εκτίμηση του ρίσκου.

Βιοπαρακολούθηση (Human Biomonitoring, HBM) ορίζεται ως ο προσδιορισμός του ρύπου, των μεταβολιτών του ή των προϊόντων αντίδρασης του (βιοδείκτες) σε βιολογικά υγρά ή στους ιστούς για την αξιολόγηση της έκθεσης ενός οργανισμού σε έναν χημικό ρύπο¹¹⁷. Για τον λόγο αυτό, το HBM είναι σημαντικό εργαλείο στα χέρια των αρμόδιων φορέων για την προστασία της υγείας και του περιβάλλοντος, καθώς παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επικίνδυνων ξеноβιοτικών ρύπων που έχουν ταυτοποιηθεί και συσχετίζονται με επιβλαβείς συνέπειες για την ανθρώπινη υγεία. Για την προστασία της ανθρώπινης υγείας απαιτείται επίσης και η μέτρηση χημικών ρύπων στο περιβάλλον (αέρα, χώμα, νερό). Η βιοπαρακολούθηση αποτελεί καθιερωμένη προσέγγιση για την αξιολόγηση του εσωτερικού σωματικού φορτίου σε τοξικούς ρύπους. Στο πλαίσιο του exposome απαιτείται χρήση τεχνολογίας αιχμής, υψηλής διαχωριστικής ικανότητας φασματογράφος μάζας, ο οποίος λόγω της υψηλής ευαισθησίας έχει την ικανότητα να ποσοτικοποιεί τις ενώσεις ενδιαφέροντος ακόμα και σε περιορισμένου όγκου δείγματα όπως είναι τα βιολογικά και χωρίς ιδιαίτερη προκατεργασία δείγματος λόγω της υψηλής διαχωριστικής του ικανότητας.

Στην πράξη υπάρχουν πολλές δυσκολίες στην προσπάθεια να συσχετιστεί η έκθεση με το αποτέλεσμα. Παραδείγματος χάρη στις καρδιαγγειακές ασθένειες υπάρχουν πολλές αιτίες για την εμφραξη των αρτηριών. Επιπλέον πρόκληση είναι ότι σημαντικές σχέσεις αιτίας-αποτελέσματος δεν μπορούν πάντα να επιβεβαιωθούν πειραματικά. Παραδείγματος χάρη, για τη μελέτη της έκθεσης

μέσω του θηλασμού, δεν είναι ηθικό να στερήσουμε σημαντική ποσότητα μητρικού γάλακτος από ένα βρέφος. Επιπλέον, ένας οργανισμός είναι ένα διαρκώς μεταβαλλόμενο σύστημα: από την εγρήγορση στην ηρεμία, από την ασθένεια στην ανάρρωση, από τη νεότητα στο γήρας. Στην προσπάθεια της μέτρησης της συνολικής έκθεσης στις μεταβολές που υφίσταται ένας οργανισμός, τα πράγματα γίνονται ακόμα πιο περίπλοκα. Αυτή η πολυπλοκότητα και οι περιορισμοί των υπάρχοντων εργαλείων μελέτης προετοίμασαν το έδαφος για καινοτόμες εφαρμογές, οι οποίες θα ανταπεξέρχονται στις σύγχρονες επιστημονικές απαιτήσεις.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ραγδαία πρόοδος των εφαρμογών “omics”. Με την υψηλής απόδοσης αναλυτική τεχνική, αναλύονται ομάδες βιολογικών μορίων. Εφόσον οι αναλύσεις αυτές εφαρμόζονται σε βιολογικά υγρά μεγάλων πληθυσμών που συμμετέχουν στις μελέτες, είναι χρήσιμες για την επικύρωση των βιοδεικτών και κατόπιν της συσχέτισής τους με τις ασθένειες που μελετώνται. Ακολούθως μέσω των βιοδεικτών αξιολογούνται στοχευμένες εκθέσεις σε ρύπους στις επιδημιολογικές μελέτες. Η τεχνολογία “omics” εφαρμόζεται για τη «μέτρηση» του εσωτερικού περιβάλλοντος του exposome και αφορά στη μελέτη των προϊόντων μεταβολικών οδών (metabolomics), του μεταβολισμού των λιπιδίων (lipidomics), των πρωτεϊνών (proteomics), το προφίλ της γενετικής έκφρασης των γονιδίων (transcriptomics, epigenomics). Ωστόσο στους περιορισμούς των “omics” συμπεριλαμβάνονται η περιβαλλοντική έκθεση στους θορύβους, στη θερμοκρασία, στο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο κ.α. καθώς δεν υπάρχει άμεση συσχέτιση αυτών με μεταβολίτες, πρωτεΐνες κ.α.

Σημαντική πρόκληση στην σύνδεση του exposome με την υγεία αποτελεί η δημιουργία οικονομικών εργαλείων για την ταυτόχρονη παρακολούθηση και ερμηνεία των πολλαπλών εκθέσεων κατά τη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου και για την πρόβλεψη και διαχείριση των επιδράσεων της έκθεσης στην υγεία του.

4.3 Βιοδείκτες των PCDDs, PCDFs, PCBs, PFOS και PFOA

Οι διοξίνες είναι τοξικές ενώσεις, εξαιρετικά ανθεκτικές και συσσωρεύονται στην τροφική αλυσίδα. Η επιστημονική κοινότητα έχει προειδοποιήσει πολλές φορές για την επικινδυνότητα για την υγεία ακόμα και μετά από έκθεση σε μικρές συγκεντρώσεις^{115,118,119}.

Κοινό χαρακτηριστικό της οξείας δηλητηρίασης σε διοξίνες, από περιστατικά που έχουν γίνει γνωστά (Seveso, Neratovice, Vietnam, Vienna, Yushchenko) είναι η εμφάνιση χλωρακμής. Η βλάβη αυτή του δέρματος έχει το ρόλο του «οπτικού» βιοδείκτη. Είναι σημαντικό να αναπτυχθούν βιοδείκτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαπίστωση μίας τέτοιας δηλητηρίασης, πριν τα σημάδια της κλινικής εικόνας του ασθενούς. Η μεταβολομική αποτελεί εργαλείο για τέτοιου τύπου μελέτες καθώς αναπαριστά σε μοριακό επίπεδο, επίπεδο ιστών ή οργάνου ή ολόκληρου οργανισμού τις μεταβολές μετά από βιολογικές διεργασίες. Μπορεί να συνδέεται με τις φυσιολογικές οδούς των μεταβολικών διεργασιών, με αντίδραση σε παθολογική κατάσταση, περιβαλλοντική ή αναπτυξιακή διατάραξη¹²⁰. Λόγω της ιδιότητας της συγκεκριμένης αναλυτικής τεχνικής να παρακολουθούνται οι ενδογενείς μεταβολές σε επίπεδο μεταβολιτών και αλλαγές που οφείλονται σε ξеноβιοτικές ενώσεις και στα προϊόντα βιομετατροπής τους, η μεταβολομική είναι ιδανική για την αποτύπωση βιοχημικών φαινοτύπων που σχετίζονται με τοξικότητα¹²¹.

Οι μελέτες μεταβολομικής για την αξιολόγηση της τοξικότητας των διοξινών που βασίζονται σε κυτταρικές σειρές ή μοντέλα με πειραματόζωα δεν είναι πολλές. Τα περισσότερα αποτελέσματα αφορούν σε τροποποιήσεις των αμινοξέων και του μεταβολισμού των λιπιδίων συμπεριλαμβανομένων των λιπαρών οξέων και των χολικών οξέων^{122,123,124,125}. Μελέτες έχουν δείξει θετική συσχέτιση των επιπέδων των διοξινών με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στο αίμα, ακόμα και σε πληθυσμούς που δεν έχουν υποστεί οξεία έκθεση στις ενώσεις αυτές¹²⁶. Σε μελέτη μεταβολομικής σε ούρα¹²⁷, η έκθεση σε PCBs, PCDDs και PCDFs επηρέασε το επίπεδο μιτοχονδριακού ενεργειακού μεταβολισμού στο ήπαρ. Τα επίπεδα της γλυκόζης στα ούρα ήταν σημαντικά ανεβασμένα, γεγονός που

υποδεικνύει ότι ο ρυθμός της γλυκόλυσης και γλυκονεογένεσης αυξήθηκε λόγω της μείωσης του μεταβολισμού των λιπιδίων στα πειραματόζωα. Επίσης τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος στα ούρα βρέθηκαν μειωμένα, γεγονός που ενισχύει τον ισχυρισμό για αύξηση του ρυθμού γλυκόλυσης. Οι σημαντικότεροι μηχανισμοί ηπατοτοξικότητας των PCDDs, PCDFs και PCBs δείχνουν να είναι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και ο μη φυσιολογικός μεταβολισμός των λιπαρών οξέων. Τα ευρήματα της ιστολογικής εξέτασης επιβεβαιώνουν τους παραπάνω ισχυρισμούς.

Στη μεταβολομική ανάλυση του ορού η διατροφική έκθεση σε διοξίνες συσχετίστηκε με τροποποιημένα επίπεδα φωσφατιδυλχολίνης (PC) γλυκερολφωσφοχολίνης (GPC) και λυζοφωσφατιδυλχολίνης (LPC). Ο τελευταίος μεταβολίτης είναι πρόδρομος για τις δύο πρώτες ενώσεις, PC και GPC. Είναι ενδογενείς ενώσεις που συνδέονται με τη έκκριση χολικού οξέως και την ομοιόσταση της χολίνης. Επιπλέον, είναι σημαντικές ενώσεις των βιομεμβρανών των κυττάρων και προστατεύουν τα κύτταρα και τα υπόλοιπα οργάνια από το οξειδωτικό στρες και την λιποτοξικότητα¹²⁸. Προηγούμενες μελέτες των ιδίων αναφέρουν ότι έκθεση σε διοξίνες προκαλεί την έμμεση διακοπή της έκκρισης χολικού οξέως μέσω της αύξησης των επιπέδων tauro-β-muricholate (ΤβΜCA) και δεοξυχολικού οξέως (DCA). Σε άλλη μελέτη μεταβολομικής¹²⁹ ανιχνεύτηκαν τα αμινοξέα, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, τρυπτοφάνη μαζί με τα φωσφολιπίδια λυζοφωσφατιδυλχολίνη (LPC) (LysoPC(16:0)), (LysoPC(16:1)) (LysoPC(18:0)).

Στη μελέτη των Wang et al., 2017¹³⁰, παρουσιάζονται οι βιοδείκτες που σχετίζονται με την έκθεση σε υπερφθοριωμένες ενώσεις, πιο αναλυτικά: Αραχιδονικό οξύ (AA), δεοξααραβινοεξονικό οξύ (DAHA), υδροξυβουτυρικό οξύ (HBA), υποξανθίνη, ξανθίνη, οξογλουταρικό οξύ (OGA), πυρογλουταμικό οξύ (PCA), d- γλουκουρονο-6,3-λακτόνη (DG63L), τετραυδροβιοπτερίνη (BH4) και α-καρβοξυαιθυλδροξυχρωμανόλη (α-CEHC). Οι μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν εμπλέκονται σε βιολογικές οδούς αποτοξίνωσης από ρύπους, αντιοξειδωτικά και προαγωγής νιτρικού οξειδίου. Δεδομένων των βιολογικών λειτουργιών που εμπλέκονται οι βιοδείκτες, τα PFASs συνεισφέρουν στην αύξηση του ρίσκου για

τα μεταβολικά σύνδρομα συμπεριλαμβανομένων του διαβήτη και καρδιαγγειακών ασθενειών.

Η βιοπαρακολούθηση (HBM) παρέχει ένα σημαντικό εργαλείο για την κατανόηση της έκτασης της ανθρώπινης έκθεσης από όλες τις πιθανές πηγές. Όπως προαναφέρθηκε, στην περίπτωση των ρύπων της ομάδας των διοξινών και των υπερφθοριωμένων ενώσεων, εκτός από τις αλλαγές που επιφέρουν στις μεταβολικές οδούς, λόγω της χημικής τους σταθερότητας, βιοσυσσώρευσης και μεγάλου χρόνου ημίσειας ζωής, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες οι ίδιες οι ενώσεις (PCDDs, PCDFs, PCBs, PFOS και PFOA).

Στο πλαίσιο του προγράμματος HEALS συγκεντρώθηκε από τη βιβλιογραφία μεγάλο φάσμα δεδομένων περιβαλλοντικών ρύπων και δεικτών που συνδέονται με την έκθεση σε ξеноβιοτικούς παράγοντες. Παρατίθενται επίσης οι αντίστοιχες τιμές αναφοράς, τιμές έκθεσης και ισοδυνάμων βιοπαρακολούθησης¹. Τα συγκεντρωτικά αυτά δεδομένα βασίζονται σε ευρείες μελέτες συσχέτισμού περιβάλλοντος και υγείας και είναι ύψιστης σημασίας για την αποκωδικοποίηση του exposome. Η μελέτη ανασκόπησης προέκυψε μετά από συνεργασία, στο πλαίσιο του προγράμματος HEALS, πανεπιστημιακών ιδρυμάτων και ερευνητικών κέντρων από τις εξής χώρες: Γερμανία, Αυστρία, Ελλάδα, Ηνωμένο Βασίλειο, Ισπανία, Σλοβενία, Πολωνία, Κροατία, Ολλανδία και Γαλλία. Οι πίνακες που παρουσιάζονται περιλαμβάνουν και δεδομένα για τις ενώσεις της ομάδας των διοξινών και τις υπερφθοριωμένες ενώσεις και δημοσιεύτηκαν στο επιστημονικό περιοδικό *Environmental Research* το 2018 με τον τίτλο: “Biomarkers of exposure in environment-wide association studies- Opportunities to decode the exposome using human biomonitoring data”. Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται συνοπτικά οι ενώσεις ενδιαφέροντος, οι πιθανοί βιοδείκτες και τα βιολογικά δείγματα στα οποία ανιχνεύονται.

¹ Αποτελεί μία προκαταρκτική μέθοδο παρακολούθησης για την αξιολόγηση του ενδεχόμενου ρίσκου της έκθεσης σε περιβαλλοντικούς ρύπους χρησιμοποιώντας δεδομένα όπως δόσεις αναφοράς (RfD), συγκεντρώσεις αναφοράς (RfC), ελάχιστο επίπεδο ρίσκου (MRL) και δεδομένα ανεκτής ημερήσιας πρόσληψης (TDI), τα οποία έχουν καθοριστεί λαμβάνοντας υπόψη τη διαθέσιμη γνώση των τοξικολογικών ιδιοτήτων του ρύπου.

Πίνακας 4: Πιθανοί βιοδείκτες που έχουν προταθεί για τα PCDD/Fs και PFASs

Ενώσεις	Πιθανοί βιοδείκτες	Βιολογικά δείγματα	Αναφορές
TCDDs	Επίπεδα στεροϊδών μεταβολιτών Προφίλ χολικών οξέων	Ούρα	118
PCDD/Fs και dioxin-like PCBs	Επαγωγή του CYP1A1	Περιφερειακό αίμα, λεμφοκύτταρα	131, 132, 133
PFASs	Επίπεδα Οιστραδιόλης Ολική χοληστερόλη Ασπαρτική αμινο-τρανσφεράση (AST) Β-λιποπρωτεΐνες Λιπαρά οξέα στο ήπαρ	Ορός αίματος	87 134

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Προσδιορισμός των ενώσεων της ομάδας των διοξινών και των υπερφθοριωμένων ενώσεων

5.1 Ποσοτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των ενώσεων της ομάδας των διοξινών σε τρόφιμα

Με στόχο την προστασία της ανθρώπινης υγείας, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει υιοθετήσει επίσημη στρατηγική για τον έλεγχο των τροφίμων και των ζωοτροφών, η οποία περιλαμβάνει και την ανάπτυξη αναλυτικών πρωτοκόλλων¹³⁵ για τον προσδιορισμό PCDDs, PCDFs και PCBs και την θέσπιση ανώτατων επιτρεπτών ορίων συγκέντρωσης για τις ενώσεις αυτές στα τρόφιμα.

Οι απαιτήσεις που πρέπει να πληρούν οι αναλυτικές μέθοδοι περιγράφονται στους κανονισμούς 589/2014 και 709/2014 οι οποίοι προβλέπουν μεθόδους ανίχνευσης και επιβεβαίωσης ύποπτων δειγμάτων¹³⁶. Ωστόσο η ανάπτυξη των αναλυτικών μεθόδων δυσχεραίνεται καθώς οι PCDDs, PCDFs και PCBs θεωρούνται επικίνδυνες για την ανθρώπινη υγεία ήδη σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, τόσο χαμηλές της τάξης μεγέθους του $\mu\text{g g}^{-1}$ δείγματος. Για τον λόγο αυτό για την ανάλυση των ενώσεων αυτών απαιτούνται τεχνικές με υψηλή ευαισθησία. Επιπλέον, συνοδεύονται από παρεμποδίζουσες ενώσεις^{137,138} όπως είναι τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα (OCPs) και οι πολυβρωμιωμένοι διφαινύλ-αιθέρες (PBDEs) σε συγκεντρώσεις κάποιας τάξης μεγέθους μεγαλύτερες από τους αναλύτες στόχους. Για τα βιολογικά δείγματα όπως είναι το αίμα και το μητρικό γάλα, απαιτείται ακόμα υψηλότερη ευαισθησία καθώς η ανάλυση πραγματοποιείται σε δείγματα πολύ μικρού όγκου και παρουσία πολλών παρεμποδίζουσων ενώσεων.

Ο ακριβής ποσοτικός προσδιορισμός των PCDDs, PCDFs και PCBs απαιτεί τον πρότερο διαχωρισμό των αναλυτών από τις παρεμποδίζουσες ενώσεις. Αυτό επιτυγχάνεται για την ανάλυση τροφίμων και ζωοτροφών με τον συνδυασμό απομόνωσης του λίπους ή του λιπόφιλου κλάσματος του δείγματος και χρήσης χρωματογραφικών στηλών με προσροφητικά υλικά όπως είναι ο ενεργός

άνθρακας, το οξειδίο του πυριτίου (silica), το οξειδίο του αργιλίου (alumina) και το πυριτικό μαγνήσιο (florisil). Το κρίσιμο στάδιο του διαχωρισμού των PCDDs, PCDFs και PCBs πραγματοποιείται από υλικά ενεργού άνθρακα, τα οποία έχουν ισχυρή συγγένεια προς τις επίπεδες αρωματικές ενώσεις όπως είναι τα τοξικά ομοειδή των PCDDs, PCDFs και PCBs. Οι πιο ισχυρά κατακρατούμενοι αναλύτες από τη στήλη ενεργού άνθρακα εκλούνται με τεχνικές back-flushing ή εκλούνται με πολύ μεγάλες ποσότητες διαλυτών κατάλληλων για την συγκεκριμένη ανάλυση.

Διάφοροι τύποι ενεργού άνθρακα έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς: Amoco PX-21¹³⁹, Carbosphere¹⁴⁰ και Carborack C¹⁴¹. Άλλα εμπορικά υλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά την προετοιμασία δείγματος για αυτήν την ανάλυση είναι το Carborack B¹⁴², διαθέσιμο σε κολώνες για εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) καθώς και ένα υλικό πορώδους γραφίτικού άνθρακα (porous graphitic carbon, PGC), 2-(1-pyrenyl) ethyldimethylsilylated (PYE) που εφαρμόζεται σε HPLC κολώνες¹⁴³. Μία συγκριτική μελέτη όλων των προαναφερθέντων υλικών¹⁴⁴, αναφέρει ότι όλα διαχωρίζουν τις PCDDs και PCDFs από τα PCBs ικανοποιητικά, ωστόσο σε μερικές περιπτώσεις παρουσιάζουν δυσκολίες στο να διαχωρίσουν κάποια ομοειδή PCBs ή έχουν χαμηλές ανακτήσεις στα πολύ-υποκατεστημένα χλωροφαινύλια.

Δεδομένης της περίπλοκης και χρονοβόρας φύσης της ανάλυσης των ενώσεων της ομάδας των διοξινών έχουν αναπτυχθεί και αυτοματοποιημένες μέθοδοι προκατεργασίας δείγματος που χρησιμοποιούν συνδυασμό από κολώνες silica, alumina και άνθρακα σε εξειδικευμένη οργανολογία, με τη χρήση κατάλληλων διαλυτών. Το πρώτο εμπορικά διαθέσιμο αυτόματο σύστημα είναι το Powerprep system της Fluid Management Systems, Inc. Το αυτοματοποιημένο αυτό σύστημα προετοιμασίας δείγματος βρήκε εφαρμογή αρχικά το 1992 από την ομάδα Turner et al.¹⁴⁵, και από τότε έχει αναβαθμιστεί ώστε να μπορεί να πραγματοποιεί προκατεργασία δείγματος σε δείγματα με περιεκτικότητα λίπους έως και 5 g σε λιγότερο από δύο ώρες. Παρόλα αυτά το υψηλό κόστος αγοράς της συσκευής και των αναλώσιμων και ο μεγάλος όγκος διαλυτών που απαιτείται την καθιστά μια όχι τόσο οικονομικά συμφέρουσα μέθοδο και σίγουρα μη φιλική

προς το περιβάλλον. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ένα νέο αυτοματοποιημένο σύστημα προετοιμασίας δείγματος από τις εταιρείες Schimadzu και Miura το οποίο απαιτεί χρήση μικρότερου όγκου διαλυτών, είναι σχεδιασμένο έτσι ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση των δειγμάτων ενώ δίνει τελικό κλάσμα με μικρό όγκο. Οι διαθέσιμες αυτόματες μέθοδοι έχουν υψηλό κόστος αγοράς για τη συσκευή και τις αναλώσιμες κολώνες και απαιτούν μεγαλύτερες ποσότητες διαλυτών σε σχέση με τις μη αυτοματοποιημένες. Για τον λόγο αυτό, ακόμα και σήμερα οι μη αυτοματοποιημένες μέθοδοι προετοιμασίας δείγματος αποτελούν μια ελκυστική τακτική προκατεργασίας δείγματος.

Το υλικό ενεργού άνθρακα (Carbosphere) που χρησιμοποιείτο ήδη από την ίδρυση του εργαστηρίου ΕΦΑΜΑΔ, έπαψε να είναι εμπορικά διαθέσιμο. Με την συγκεκριμένη μέθοδο η οποία αρχικά αναπτύχθηκε από τον Liem et al. το 1990¹⁴⁶, πραγματοποιείτο αποτελεσματικός διαχωρισμός των επίπεδων PCDDs, PCDFs και των non-ortho PCBs με υψηλή αναπαραγωγιμότητα, καλές ανακτήσεις και με χρήση μικρότερων όγκων διαλυτών σε σχέση με άλλες μεθόδους. Επιπλέον, μπορούσε να επεξεργαστεί μεγάλη ποσότητα λίπους, ιδιότητα πολύ σημαντική για τρόφιμα με μεγάλο ποσοστό λίπους και συγκεντρώσεις αναλύτη της τάξεως του $\mu\text{g g}^{-1}$. Στα αρνητικά του συγκεκριμένου υλικού ήταν το κόστος του και το γεγονός ότι μετά από κάθε χρήση του απαιτούνταν έκπλυση με μεθανόλη και τολουόλιο για διάστημα 6 εβδομάδων πριν την επαναχρησιμοποίησή του. Η διαδικασία αυτή ήταν απαραίτητη λόγω υψηλού κόστους του υλικού, είχε όμως σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία αυξημένου σήματος υποβάθρου.

Στο πλαίσιο του διδακτορικού μελετήθηκε και αξιολογήθηκε ένα εναλλακτικό υλικό ενεργού άνθρακα, το FU 4652, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό των PCDDs, PCDFs από τα non-ortho PCBs.

5.2 Ανάπτυξη μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό των PCBs στον ορό αίματος

Το αίμα αποτελεί το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα για τον προσδιορισμό βιοδεικτών, καθώς αποτελεί το συνδεδετικό μέσο μεταξύ όλων των

ιστών του οργανισμού^{114,147}. Λόγω του γεγονότος ότι μεταφέρει χημικές ενώσεις από και προς τους ιστούς, αποτελεί δεξαμενή όλων των ενδογενών και εξωγενών χημικών ουσιών που περιλαμβάνει ο οργανισμός στο δεδομένο χρονικό διάστημα¹⁴⁸. Συνεπώς το “blood exosome” αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την παρακολούθηση των συνεργιστικών βιολογικών φαινομένων που λαμβάνουν χώρα λόγω της παράλληλης έκθεσης του οργανισμού σε περιβαλλοντικούς ρύπους και γενικότερα στα ερεθίσματα που τον περιβάλλουν¹⁴⁹. Ωστόσο ο επεμβατικός χαρακτήρας της διαδικασίας που απαιτείται για τη λήψη του αίματος, καθώς επίσης η ειδική συναίνεση που είναι απαραίτητη από τη μεριά των εθελοντών αλλά και των εθνικών επιτροπών βιοηθικής αντίστοιχα, δυσκολεύουν πολύ τη διάθεσή του για ερευνητικούς σκοπούς. Επιπλέον, ο όγκος του δείγματος είναι εκ των προτέρων περιορισμένος και ειδικότερα στις ηλικιακές ομάδες βρεφών και νηπίων, γεγονός που δυσκολεύει τη χρήση του ως μέσο βιοπαρακολούθησης.

Στο αίμα υπάρχει η δυνατότητα μελέτης βιοδεικτών επίδρασης (αποτελέσματος), εκτός από τους βιοδείκτες έκθεσης. Συνδυάζοντας τα δεδομένα των βιοδεικτών έκθεσης και αποτελέσματος μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για τη συσχέτιση της δόσης με την έκθεση και την επίδραση στην ανθρώπινη υγεία.

Η χρήση του αίματος σαν υπόστρωμα για την μέτρηση των βιοδεικτών ενδείκνυται για ρύπους με μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής¹⁵⁰ όπως είναι τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια και οι υπερφθοριωμένες ενώσεις που μελετώνται στη παρούσα διατριβή.

Λόγω της μικρής περιεκτικότητας του αίματος σε λίπος, οι συγκεντρώσεις των PCBs είναι χαμηλές και η ανάπτυξη μεθοδολογίας αποτελεί πρόκληση για την αναλυτική χημεία. Συνήθης πρακτική για την ανάλυση PCBs σε ορό αίματος λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας του αίματος σε λίπος είναι η αιμοληψία μεγάλου όγκου αίματος: 50-300 mL¹⁵¹, 70 mL¹⁵² και 10 mL¹⁵³. Ωστόσο λόγω της δυσκολίας ανεύρεσης εθελοντών που θα παρέχουν τόσο μεγάλο όγκο δείγματος κρίνεται σκόπιμη η ελαχιστοποίηση του δείγματος, χωρίς ωστόσο η ανάλυση να στερηθεί ευαισθησίας και ακρίβειας στον προσδιορισμό των περιβαλλοντικών

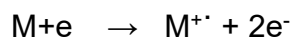
αυτών ρύπων. Έχουν αναπτυχθεί πλέον μέθοδοι στη διεθνή βιβλιογραφία με χρήση όγκου ορού/ πλάσματος αίματος από 2 mL¹⁵⁴ έως 500 μL³⁷ και 50 μL^{155,156}.

5.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων της οικογένειας των διοξινών με φασματομετρία μάζας

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων της ομάδας των διοξινών πραγματοποιείται με τη μέθοδο της ισοτοπικής αραίωσης με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (HRGC-HRMS).

Οι φασματογράφοι μάζας υψηλής διαχωριστικής ικανότητας αποτελούνται από:

- Σύστημα εισαγωγής δείγματος. Στην περίπτωση των διοξινών χρησιμοποιείται για το σκοπό αυτό ο αέριος χρωματογράφος.
- Πηγή ιονισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI), στην οποία τα ιόντα σχηματίζονται με βομβαρδισμό των μορίων με ηλεκτρόνια. Τα ηλεκτρόνια εκπέμπονται από θερμαινόμενο νήμα W και επιταχύνονται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου έτσι ώστε να δημιουργηθεί δέσμη. Με την πρόσκρουσή τους τα ηλεκτρόνια μεταφέρουν στα προς ανάλυση μόρια μέρος της κινητικής τους ενέργειας, η οποία οδηγεί σε ιονισμό, ενώ η περίσσεια ενέργειας προκαλεί στα μόρια μερική θραύση:



$M^{+\cdot} \rightarrow$ μοριακά ιόντα+ιοντικά θραύσματα+ουδέτερα θραύσματα

Ο συνδυασμός θραυσμάτων δίνει συγκεκριμένο φάσμα μάζας που είναι χαρακτηριστικό για κάθε ένωση.

- Αναλυτή μαζών διπλής εστίασης για τον διαχωρισμό των ιόντων σύμφωνα με τον λόγο μάζας/φορτίο. Ο αναλυτής αυτός επιτυγχάνει διαχωριστική ικανότητα >10000 με το συνδυασμό μαγνητικού και ηλεκτροστατικού αναλυτή. Τα ιόντα εισέρχονται αρχικά σε μαγνητικό πεδίο όπου κινούνται σε κυκλική τροχιά με ακτίνα ανάλογη με το λόγο m/z του ιόντος. Μετά το μαγνητικό αναλυτή ο ηλεκτροστατικός αναλυτής χρησιμοποιείται σαν φίλτρο επιτρέποντας τη διέλευση ορισμένων μόνο ιόντων τα οποία έχουν

συγκεκριμένη κινητική ενέργεια, αυξάνοντας έτσι τη διαχωριστική ικανότητα του οργάνου.

- Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή σαν ανιχνευτή ιόντων, ο οποίος παράγει στην έξοδο του ηλεκτρικό σήμα ανάλογο του αριθμού ιόντων που δέχεται στην είσοδό του και του φορτίου τους. Ο τύπος αυτός ανιχνευτή επιτυγχάνει πολλαπλασιασμό της δέσμης των ηλεκτρονίων άρα και ενίσχυση του σήματος.

5.4 Ποσοτικός προσδιορισμός των υπερφθοριωμένων ενώσεων με φασματομετρία μάζας

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των υπερφθοριωμένων ενώσεων πραγματοποιείται με τη μέθοδο της ισοτοπικής αραίωσης με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας σε σειρά (LC/MS-MS).

Στην περίπτωση αυτή, ο φασματογράφος μάζας αποτελείται από:

- Υγρή χρωματογραφία σαν σύστημα εισαγωγής δείγματος.
- Πηγή ιονισμού με την τεχνική του ηλεκτροψεκασμού (ESI). Το διάλυμα του δείγματος που εκλούεται από τη στήλη του χρωματογράφου, ψεκάζεται μέσα από τριχοειδή βελόνα σε περιβάλλον υψηλού δυναμικού όπου διασπείρεται σε πολύ μικρές φορτισμένες σταγόνες, ο διαλύτης εξατμίζεται και φορτίζονται τα μόρια του αναλύτη.
- Τριπλό τετράπολο ως αναλυτή μάζας. Στη διάταξη αυτή, μετά τη δημιουργία τους από την πηγή ιόντων ESI, τα ιόντα επιταχύνονται και οδηγούνται στο πρώτο τετραπολικό φίλτρο όπου διαχωρίζονται και επιλέγεται μόνο ένα ιόν το οποίο εισέρχεται στο δεύτερο τετράπολο όπου συγκρούεται με περίσσεια αδρανούς αερίου και διασπάται παράγοντας θυγατρικά ιόντα. Αυτά εισέρχονται στο τρίτο τετράπολο όπου διαχωρίζονται και καταγράφονται.
- Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή σαν ανιχνευτή ιόντων.

5.5 Ισοτοπική αραίωση

Η ισοτοπική αραίωση αποτελεί την πλέον ειδική, ευαίσθητη και με υψηλή ακρίβεια μέθοδο για τον ποσοτικό προσδιορισμό μιας ένωσης ακόμα και σε ίχνη της τάξεως των ppt. Χρησιμοποιείται περίπου 60 χρόνια στην χημική ανάλυση. Αναπτύχθηκε το 1954 από τον Mark Inghram ως εργαλείο για την ανάλυση ουσιών σε ίχνη και βασίζεται στη μέθοδο προσθήκης εσωτερικού προτύπου. Πριν την έναρξη της ανάλυσης απαιτείται η προσθήκη σε κάθε άγνωστο δείγμα αλλά και στο τυφλό δείγμα γνωστής ποσότητας ισοτοπικώς επισημασμένου διαλύματος εσωτερικού προτύπου (working solution), ανάλογο του αναλύτη. Στο πρότυπο αυτό έχουν ενσωματωθεί ένα ή περισσότερα άτομα ^{13}C ή ^2H . Θεωρούμε ότι κατά τη διάρκεια της ανάλυσης τα επισημασμένα μόρια συμπεριφέρονται κατά τον ίδιο τρόπο με τα μη επισημασμένα. Στο τέλος της ανάλυσης προστίθεται επίσης ένα επισημασμένο πρότυπο (injection standard) με μία ένωση της ομάδας που μελετάται, η οποία όμως δεν υπάρχει στο προς ανάλυση δείγμα. Τα σχετικά πρότυπα (working solution, calibration solution και injection solution) χρησιμοποιούνται ως οδηγοί για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό των ενώσεων ενδιαφέροντος. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιείται με μέτρηση του λόγου σήματος αναλύτη προς το σήμα του επισημασμένου προτύπου, ο οποίος αντιστοιχεί στο λόγο των συγκεντρώσεων. Στο πειραματικό μέρος, στην παράγραφο κρίσιμα αντιδραστήρια πραγματοποιείται εκτεταμένη αναφορά των επισημασμένων και μη πρότυπων διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση των ενώσεων της οικογένειας των διοξινών αλλά και για την ανάλυση των υπερφθοριωμένων ενώσεων.

Συνοπτικά, η συγκέντρωση των προς ανάλυση ενώσεων υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο¹³⁷:

$$C(\text{ng/mL}) = \frac{A \times C_{\text{επ.}}}{A_{\text{επ.}} \times RR}$$

Όπου A: Συνολικό εμβαδό κορυφών των προσδιοριζόμενων ενώσεων

$A_{\text{επ.}}$: Συνολικό εμβαδό κορυφών των επισημασμένων ενώσεων

$C_{\text{επ.}}$: Συγκέντρωση των επισημασμένων ενώσεων

RR: Σχετική απόκριση των επισημασμένων ως προς τις μη επισημασμένες ενώσεις.

Επιπλέον, με τον προσδιορισμό της ανακτώμενης ποσότητας των επισημασμένων προτύπων (working solution) διαπιστώνεται αν υπήρξαν απώλειες κατά την επεξεργασία του δείγματος.

Η ανάκτηση του επισημασμένου προτύπου υπολογίζεται λαμβάνοντας υπόψη τη τελική συγκέντρωση του επισημασμένου με ^{13}C προτύπου διαλύματος (working solution), αφού έχει υποστεί την ίδια επεξεργασία με τα δείγματα εξ' αρχής της ανάλυσης και τη συγκέντρωση του επισημασμένου με ^{13}C πρότυπου διαλύματος (injection standard) η οποία είναι γνωστή και προστίθεται στο τέλος της ανάλυσης. Ο μαθηματικός τύπος από τον οποίο υπολογίζεται η ανάκτηση της επισημασμένης ένωσης είναι ο παρακάτω:

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{C_{\text{measured}}}{C_{\text{spiked}}} \times 100$$

Όπου: C_{measured} : Συγκέντρωση που προσδιορίστηκε

C_{spiked} : Συγκέντρωση που προστέθηκε

Η ανάκτηση πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 60-120 % σύμφωνα με τους ισχύοντες κανονισμούς της Ε.Ε.

5.6 Κριτήρια επικύρωσης αναλυτικής μεθόδου

Σύμφωνα με την οδηγία της EURACHEM "The fitness for purpose of analytical methods- A laboratory guide to method validation and related topics"¹⁵⁷ και την Ευρωπαϊκή οδηγία 657/2002¹⁵⁸, για την αξιολόγηση μίας αναλυτικής μεθόδου εξετάζονται συγκεκριμένες παράμετροι. Η ειδικότητα, ορθότητα, η πιστότητα, η γραμμικότητα, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, η εκλεκτικότητα και η ανθεκτικότητα είναι οι παράμετροι εκείνοι που πρέπει να υπολογιστούν ώστε να ελεγχθεί η αξιοπιστία της μεθόδου. Επιγραμματικά:

A. Ειδικότητα (Specificity)

Η ειδικότητα εξασφαλίζει ότι το λαμβανόμενο σήμα προέρχεται από την προς ανάλυση ένωση χωρίς επίδραση από άλλα συστατικά του δείγματος, τα οποία δεν πρέπει να παράγουν αναλυτικό σήμα.

B. Ακρίβεια (Accuracy)

Η ακρίβεια εκφράζει την ορθότητα και την πιστότητα της μεθόδου ανάλυσης

Η ορθότητα (trueness) ορίζεται ως η εγγύτητα μεταξύ της τιμής που προσδιορίζεται και της αληθούς τιμής. Μπορεί να προσδιοριστεί από πιστοποιημένα πρότυπα υλικά αναφοράς (CRM, Certified Reference Material) ή με τον υπολογισμό της ανάκτησης επισημασμένων πρότυπων διαλυμάτων για κάθε αναλύτη σε γνωστή συγκέντρωση.

Η πιστότητα (precision) περιλαμβάνει την επαναληψιμότητα (διαδοχικές μετρήσεις από τον ίδιο αναλυτή με ίδιες συνθήκες και αντιδραστήρια μέσα στην ίδια μέρα) και την αναπαραγωγιμότητα (μετρήσεις διαφορετικών ημερών που γίνονται υπό διαφορετικές συνθήκες, π.χ. αναλυτής, αντιδραστήρια, περιβαλλοντικές συνθήκες).

Γ. Ευαισθησία (Sensitivity)

Ευαισθησία είναι η ικανότητα της μεθόδου αφενός να διαθέτει αξιοπιστία και αφετέρου να μπορεί να διακρίνει μικρές μεταβολές στην ποσότητα του συστατικού που προσδιορίζεται. Μέτρα της ευαισθησίας είναι οι τιμές LOD και LOQ.

Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (LOD, LOQ)

Ως όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση η οποία μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με αποδεκτή ακρίβεια, ενώ ως όριο ανίχνευσης (LOD), η ποσότητα που μπορεί να ανιχνευτεί, χωρίς όμως να μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με αποδεκτή ακρίβεια.

Δ. Γραμμικότητα (Linearity)

Η γραμμικότητα αναφέρεται στη γραμμική αναλογία της συγκέντρωσης του προσδιοριζόμενου συστατικού με το αναλυτικό σήμα που λαμβάνεται από το όργανο. Στατιστική παράμετρος με την οποία ελέγχεται η γραμμικότητα είναι ο «Συντελεστής Γραμμικής Παλινδρόμησης» (R^2), ο οποίος πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 0,99.

Ε. Ανάκτηση (Recovery)

Για τον προσδιορισμό των ενώσεων-στόχων, στις περισσότερες περιπτώσεις, απαιτείται να εφαρμοστεί κάποια προκαταρκτική επεξεργασία του δείγματος για την απομόνωση του αναλύτη από το υπόστρωμα. Η εκατοστιαία ανάκτηση ορίζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης που προσδιορίζεται προς την πραγματική συγκέντρωση επί εκατό και πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 60-120 % σύμφωνα με τους ισχύοντες κανονισμούς της Ε.Ε. για τον προσδιορισμό των ενώσεων της ομάδας των διοξινών.

ΣΤ. Εύρος (Range)

Εύρος είναι το διάστημα από την κατώτερη έως την ανώτερη τιμή που προσδιορίζεται με ακρίβεια.

Ζ. Αβεβαιότητα

Η αβεβαιότητα (uncertainty) ορίζεται ως η παράμετρος που συνδέεται με το αποτέλεσμα μιας μέτρησης και χαρακτηρίζει τη διασπορά των τιμών γύρω από την αληθή τιμή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Σκοπιμότητα και στόχοι

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει σαν σκοπό την ανάπτυξη εργαλείων αναλυτικής χημείας, απαραίτητων για τη μελέτη του exosome. Οι τεχνικές που αναπτύχθηκαν εφαρμόστηκαν σε δείγματα τροφίμων και ορού για την διερεύνηση των επιπτώσεων των ανθεκτικών οργανικών ρύπων στην υγεία του ανθρώπου. Ειδικότερα αναπτύχθηκαν εξειδικευμένες αναλυτικές μέθοδοι που εφαρμόστηκαν για την εκτίμηση της διατροφικής έκθεσης, η οποία αποτελεί την κύρια οδό έκθεσης, αλλά και μέθοδοι με αυξημένη ευαισθησία για τον προσδιορισμό των επιπέδων στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα εργαλεία αυτά μπορούν να χρησιμεύσουν στο εξής για τη συνεχή παρακολούθηση των επιπέδων ανθεκτικών οργανικών ρύπων στον γενικό πληθυσμό που είναι απαραίτητη για τη προστασία της δημόσιας υγείας, και για την συσχέτιση της έκθεσης με την κατάσταση της υγείας.

Η μελέτη επικεντρώθηκε στους ανθεκτικούς οργανικούς ρύπους της ομάδας των διοξινών και των υπερφθοριωμένων ενώσεων.

Συγκεκριμένα για την επίτευξη των στόχων πραγματοποιήθηκαν:

- Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου με νέο τύπο ενεργού άνθρακα για τον προσδιορισμό διοξινών και πολυχλωριωμένων διαφαινυλίων στα τρόφιμα. Η μέθοδος αφού αξιολογήθηκε, εφαρμόστηκε στα δείγματα τροφίμων που συλλέχθηκαν στο πλαίσιο των εθνικών προγραμμάτων ελέγχου ασφάλειας και ποιότητας των τροφίμων.
- Τα αναλυτικά αποτελέσματα του προηγούμενου σταδίου σε συνδυασμό με ήδη υπάρχοντα αποτελέσματα της τελευταίας δεκαετίας και με στοιχεία από τη βάση δεδομένων κατανάλωσης τροφίμων DAFNE-ANEMOS χρησιμοποιήθηκαν ώστε να εκτιμηθεί η ημερήσια κατά κεφαλήν πρόσληψη και να αξιολογηθεί η έκθεση σε διοξίνες και πολυχλωριωμένα διφαινύλια. Έγινε επίσης υπολογισμός % συμμετοχής κάθε διατροφικής ομάδας στην συνολική πρόσληψη.

- Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό πολυχλωριωμένων διφαινυλίων με την κατάλληλη ευαισθησία για μικρό όγκο ορού. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα στον ορό σε επιλεγμένο πληθυσμό εθελοντών.
- Πραγματοποιήθηκε επίσης σύγκριση των συγκεντρώσεων του παραπάνω πληθυσμού με πληθυσμό που κατοικεί σε περιοχή που θεωρείται περιβαλλοντικά επιβαρυμένη, για να εκτιμηθεί ο ρόλος του περιβάλλοντος στη συγκέντρωση των ενώσεων στον ορό.
- Όσον αφορά στις υπερφθοριωμένες ενώσεις έγινε εκτίμηση της διατροφικής έκθεσης του γενικού πληθυσμού και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα στον ορό του επιλεγμένου πληθυσμού εθελοντών και πληθυσμού που κατοικεί σε περιοχή που θεωρείται περιβαλλοντικά επιβαρυμένη.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

7.1 Συλλογή και συντήρηση δειγμάτων

7.1.1 Δείγματα τροφίμων

Τα δείγματα τροφίμων συλλέχθηκαν από τον Ενιαίο Φορέα Ελέγχου Τροφίμων (ΕΦΕΤ) στο πλαίσιο του προγράμματος εθνικών ελέγχων για την ασφάλεια των τροφίμων. Οι δειγματοληψίες σχεδιάστηκαν για να καλύψουν ευρύ φάσμα από τις περιφέρειες της Ελλάδας. Πραγματοποιήθηκαν από τις εξής περιφέρειες: Αττικής, Κεντρικής Μακεδονίας, Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης, Θεσσαλίας, Ηπείρου, Βορείου Αιγαίου, Πελοποννήσου και Κρήτης. Πληροφορίες για τον αριθμό των δειγμάτων που συλλέχθηκαν δίνονται στους πίνακες.

PCDDs, PCDFs, PCBs

Αναλύθηκαν τρόφιμα που περιλαμβάνονται στη μεσογειακή διατροφή και ειδικότερα οι κατηγορίες που περιέχουν λίπος: μοσχάρι, κοτόπουλο, αρνί και κατσίκι, ψάρια και θαλασσινά ελεύθερης αλιείας και ιχθυοκαλλιέργειας, γάλα αγελαδινό και αιγοπρόβειο και γαλακτοκομικά προϊόντα, συκώτι, ζωϊκά λίπη, φυτικά έλαια, ελαιόλαδο και αυγά. Κάθε δείγμα αναλύθηκε ξεχωριστά. Συνολικά αναλύθηκαν 1213 προϊόντα. Πριν την ανάλυση τα τρόφιμα διατηρήθηκαν στους -20°C.

Φρούτα και λαχανικά δε περιελήφθησαν στη μελέτη, καθότι περιέχουν ελάχιστο ή καθόλου λίπος, συνεπώς δεν αναμένεται να είναι επιβαρυνμένα σε λιποδιαλυτούς ρύπους. Για το λόγο αυτό, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει όρια για τις PCDDs, PCDFs και PCBs με τον κανονισμό 1259/2011¹⁶³ μόνο σε κατηγορίες τροφίμων που περιέχουν λίπος (ζωϊκά προϊόντα και φυτικά έλαια) και όχι στα φρούτα και τα λαχανικά.

Τα δείγματα αναφοράς για την επικύρωση της μεθόδου παρασκευάστηκαν με προσθήκη γνωστής ποσότητας σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων για τις 17

ενώσεις PCDDs, PCDFs (0.5 και 1.0 pg g⁻¹), τα 4 non-ortho PCBs (12.5 και 25 pg g⁻¹) και τα 8 mono-ortho PCBs σε παρθένο ελαιόλαδο.

Τα δείγματα διεργαστηριακών δοκιμών τροφίμων προέρχονταν από το Νορβηγικό Ινστιτούτο Δημόσιας Υγείας και το Ευρωπαϊκό Δίκτυο Εργαστηρίων Αναφοράς (EURL).

PFASs

Αναλύθηκαν οι εξής κατηγορίες τροφίμων: μοσχάρι, κοτόπουλο, πρόβειο κρέας, ψάρια (ελεύθερα και ιχθυοκαλλιέργειας), γάλα (αγελαδινό και αιγοπρόβειο), αυγά, λαχανικά (καρότα, πατάτες, πιπεριές, αγγούρια, πράσινα φασόλια, πατζάρια, σέλινο, κρεμμύδια, πράσα και μαρούλια) και φρούτα. Αναλύθηκαν συνολικά 204 δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν από τον ΕΦΕΤ και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο όπου διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι την ανάλυσή τους. Στην περίπτωση των PFASs φρούτα και λαχανικά περιλαμβάνονται στη μελέτη, επειδή τα PFASs είναι αμφίφιλα μόρια και ανιχνεύονται και σε αυτές τις κατηγορίες τροφίμων. Η μελέτη αυτή περιλαμβάνει επίσης και την ανάλυση PFASs σε πόσιμο νερό για μία πιο ολοκληρωμένη εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης σε PFASs του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας.

7.1.2 Δείγματα αίματος

16 δείγματα αίματος συλλέχθηκαν στο πλαίσιο του προγράμματος HEALS. Η αιμοληψία πραγματοποιήθηκε από επαγγελματία νοσηλεύτρια στις οικίες των εθελοντών οι οποίες βρίσκονται εντός Αττικής. Τα δείγματα εντός μίας ώρας είχαν μεταφερθεί στο εργαστήριο όπου αφού κωδικοποιήθηκαν πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του ορού από το ολικό αίμα. Τα δείγματα ορού διατηρήθηκαν στους καταψύκτες του εργαστηρίου σε θερμοκρασία - 80°C.

57 δείγματα αίματος προήλθαν από εθελοντές που κατοικούν στον Ασπρόπυργο Αττικής, συλλέχθηκαν και εστάλησαν από το Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μηχανικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Αφού κωδικοποιήθηκαν και διαχωρίστηκε ο ορός από το ολικό αίμα, διατηρήθηκαν

στους καταψύκτες του εργαστηρίου όπου και φυλάσσονται σε θερμοκρασία - 80°C.

Η επικύρωση της μεθόδου έγινε με τη προσθήκη σε δείγμα ορού γνωστής συγκέντρωσης μη επισημασμένων προτύπων:

- Non-ortho PCBs 5 pg mL⁻¹
- Mono-ortho PCBs 50 pg mL⁻¹
- Indicator PCBs 50 pg mL⁻¹

Τα δείγματα διεργαστηρικών δοκιμών ορού που αναλύθηκαν για την επικύρωση της μεθόδου προέρχονταν από το Κέντρο Τοξικολογίας του Καναδά.

7.2 Αντιδραστήρια

7.2.1 Πρότυπα διαλύματα

Τα παρακάτω αντιδραστήρια με κατάλληλες αραιώσεις χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των εξής διαλυμάτων: εσωτερικού προτύπου (working solution), προτύπου έγχυσης (injection solution) και προτύπου βαθμονόμησης (calibration solution).

PCDDs- PCDFs

1. ¹³C₁₂-2,3,7,8-τετραχλωρο-διβενζο-π-διοξίνη 50 μg mL⁻¹
2. ¹³C₁₂-1,2,3,7,8-πενταχλωρο-διβενζο-π-διοξίνη 50 μg mL⁻¹
3. ¹³C₁₂-1,2,3,6,7,8-εξαχλωρο-διβενζο-π-διοξίνη 50 μg mL⁻¹
4. ¹³C₁₂-1,2,3,4,7,8-εξαχλωρο-διβενζο-π-διοξίνη 50 μg mL⁻¹
5. ¹³C₁₂-1,2,3,7,8,9-εξαχλωρο-διβενζο-π-διοξίνη 50 μg mL⁻¹
6. ¹³C₁₂-1,2,3,4,6,7,8-επταχλωρο-διβενζο-π-διοξίνη 50 μg mL⁻¹
7. ¹³C₁₂-οκταχλωρο-διβενζο-π-διοξίνη 50 μg mL⁻¹
8. ¹³C₁₂-2,3,7,8-τετραχλωροδιβενζοφουράνιο 50 μg mL⁻¹
9. ¹³C₁₂-2,3,4,7,8-πενταχλωροδιβενζοφουράνιο 50 μg mL⁻¹
10. ¹³C₁₂-1,2,3,7,8-πενταχλωροδιβενζοφουράνιο 50 μg mL⁻¹
11. ¹³C₁₂-1,2,3,4,7,8-εξαχλωροδιβενζοφουράνιο 50 μg mL⁻¹
12. ¹³C₁₂-1,2,3,7,8,9-εξαχλωροδιβενζοφουράνιο 50 μg mL⁻¹

13. $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,4,6,7,8-εξαχλωροδιβενζοφουράνιο 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$
14. $^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,6,7,8-εξαχλωροδιβενζοφουράνιο 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$
15. $^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,7,8,9-επταχλωροδιβενζοφουράνιο 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$
16. $^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,6,7,8-επταχλωροδιβενζοφουράνιο 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$
17. Διάλυμα από τα 17 παρακάτω συμπαράγωγα σε συγκέντρωση 10 ng mL^{-1} για κάθε ένα:
 - $^{12}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8- τετραχλωρο-διβενζο-π-διοξίνη
 - $^{12}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8- πενταχλωρο-διβενζο-π-διοξίνη
 - $^{12}\text{C}_{12}$ -1,2,3,6,7,8- εξαχλωρο-διβενζο-π-διοξίνη
 - $^{12}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,7,8- εξαχλωρο-διβενζο-π-διοξίνη
 - $^{12}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8,9- εξαχλωρο-διβενζο-π-διοξίνη
 - $^{12}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,6,7,8- επταχλωρο-διβενζο-π-διοξίνη
 - $^{12}\text{C}_{12}$ - οκταχλωρο-διβενζο-π-διοξίνη
 - $^{12}\text{C}_{12}$ - 2,3,7,8- τετραχλωροδιβενζοφουράνιο
 - $^{12}\text{C}_{12}$ -2,3,4,7,8- πενταχλωροδιβενζοφουράνιο
 - $^{12}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8- πενταχλωροδιβενζοφουράνιο
 - $^{12}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,7,8- εξαχλωροδιβενζοφουράνιο
 - $^{12}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8,9- εξαχλωροδιβενζοφουράνιο
 - $^{12}\text{C}_{12}$ -2,3,4,6,7,8- εξαχλωροδιβενζοφουράνιο
 - $^{12}\text{C}_{12}$ -1,2,3,6,7,8- εξαχλωροδιβενζοφουράνιο
 - $^{12}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,7,8,9- επταχλωροδιβενζοφουράνιο
 - $^{12}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4,6,7,8- επταχλωροδιβενζοφουράνιο
 - $^{12}\text{C}_{12}$ -οκταχλωροδιβενζοφουράνιο
18. $^{13}\text{C}_6$ -1,2,3,4- τετραχλωρο-διβενζο-π-διοξίνη 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$

non-ortho PCBs

19. $^{13}\text{C}_{12}$ -3,3',4,4'-τετραχλωροδιφαινύλιο 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$
20. $^{13}\text{C}_{12}$ -3,4,4',5- τετραχλωροδιφαινύλιο 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$
21. $^{13}\text{C}_{12}$ -3,3',4,4',5-πενταχλωροδιφαινύλιο 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$
22. $^{13}\text{C}_{12}$ -3,3',4,4',5,5'-εξαχλωροδιφαινύλιο 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$
23. 3,3',4,4'-τετραχλωροδιφαινύλιο PCB77

24. 3,4,4',5- τετραχλωροδифαινύλιο PCB81

25. 3,3',4,4',5-πενταχλωροδифαινύλιο PCB126

26. 3,3',4,4',5,5'-εξαχλωροδифαινύλιο PCB169

mono-ortho PCBs

27. $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,3',4,4'-πενταχλωροδифαινύλιο 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$

28. $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,4,4',5-πενταχλωροδифαινύλιο 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$

29. $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3',4,4',5-πενταχλωροδифαινύλιο 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$

30. $^{13}\text{C}_{12}$ -2',3,4,4',5- πενταχλωροδифαινύλιο 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$

31. $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,3',4,4',5-εξαχλωροδифαινύλιο 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$

32. $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,3',4,4',5-εξαχλωροδифαινύλιο 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$

33. $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3',4,4',5,5'-εξαχλωροδифαινύλιο 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$

34. $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,3',4,4',5,5'-επταχλωροδифαινύλιο 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$

35. 2,3,3',4,4'-πενταχλωροδифαινύλιο PCB 105

36. 2,3,4,4',5-πενταχλωροδифαινύλιο PCB 114

37. 2,3',4,4',5-πενταχλωροδифαινύλιο PCB 118

38. 2',3,4,4',5- πενταχλωροδифαινύλιο PCB 123

39. 2,3,3',4,4',5-εξαχλωροδифαινύλιο PCB 156

40. 2,3,3',4,4',5- εξαχλωροδифαινύλιο PCB 157

41. 2,3',4,4',5,5'- εξαχλωροδифαινύλιο PCB 167

42. 2,3,3',4,4',5,5'-επταχλωροδифαινύλιο PCB 189

43. $^{13}\text{C}_{12}$ -3,3',5,5'-τετραχλωροδифαινύλιο 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$

indicator PCBs

44. 2,4,4'-τριχλωροδифαινύλιο PCB 28

45. 2,2',5,5'-τετραχλωροδифαινύλιο PCB 52

46. 2,2',4,5,5'-πενταχλωροδифαινύλιο PCB 101

47. 2,2',3,4,4',5'-εξαχλωροδифαινύλιο PCB 138

48. 2,2',4,4',5,5'- εξαχλωροδифαινύλιο PCB 153

49. 2,2',3,4,4',5,5'-επταχλωροδифαινύλιο PCB 180

50. $^{13}\text{C}_{12}$ -2,2',5,5'-τετραχλωροδифαινύλιο 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$

51. $^{13}\text{C}_{12}$ -2,2',4,5,5'-πενταχλωροδифαινύλιο 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$

A) Παρασκευή διαλύματος εσωτερικού προτύπου PCDD/Fs (working solution):

Κατάλληλες ποσότητες από τα κρίσιμα αντιδραστήρια 1-16 αναμιγνύονται και αραιώνονται σε τολουόλιο σε τελική συγκέντρωση για κάθε ομοειδές τα 0.1 ng mL^{-1} .

B) Παρασκευή προτύπου διαλύματος έγχυσης PCDD/Fs (injection solution):

Κατάλληλη ποσότητα από το αντιδραστήριο 18 αραιώνεται σε εννεάνιο σε τελική συγκέντρωση 2 ng mL^{-1} .

Γ) Παρασκευή διαλύματος βαθμονόμησης PCDD/Fs (calibration solution):

Κατάλληλη ποσότητα από το αντιδραστήριο 17 αραιώνεται σε τολουόλιο σε τελική συγκέντρωση 0.1 ng mL^{-1} .

Δ) Παρασκευή διαλύματος εσωτερικού προτύπου non-ortho PCBs (working solution):

Κατάλληλες ποσότητες από τα κρίσιμα αντιδραστήρια 19-22 αναμιγνύονται και αραιώνονται σε τολουόλιο σε τελική συγκέντρωση για κάθε ομοειδές τα 0.1 ng mL^{-1} .

E) Παρασκευή προτύπου διαλύματος έγχυσης non-ortho PCBs (injection solution):

Κατάλληλη ποσότητα από το αντιδραστήριο 43 αραιώνεται σε εννεάνιο σε τελική συγκέντρωση 2 ng mL^{-1} .

ΣΤ) Παρασκευή διαλύματος βαθμονόμησης non-ortho PCBs (calibration solution):

Κατάλληλη ποσότητα από τα αντιδραστήρια 23-26 ζυγίζονται, διαλύονται και αναμιγνύονται σε τολουόλιο σε τελική συγκέντρωση 1 ng mL^{-1} για την ανάλυση του ορού αίματος και 0.1 ng mL^{-1} για την ανάλυση των τροφίμων.

Z) Παρασκευή διαλύματος εσωτερικού προτύπου mono-ortho PCBs (working solution):

Κατάλληλες ποσότητες από τα κρίσιμα αντιδραστήρια 27-34 αναμιγνύονται και αραιώνονται σε τολουόλιο σε τελική συγκέντρωση για κάθε ομοειδές τα 10 ng mL⁻¹.

Η) Παρασκευή διαλύματος βαθμονόμησης mono-ortho PCBs (calibration solution):

Κατάλληλη ποσότητα από τα αντιδραστήρια 35-42 ζυγίζονται, διαλύονται και αναμιγνύονται σε τολουόλιο σε τελική συγκέντρωση 10 ng mL⁻¹ για κάθε ομοειδές.

Θ) Παρασκευή διαλύματος εσωτερικού προτύπου indicator PCBs (working solution):

Κατάλληλες ποσότητες από τα κρίσιμα αντιδραστήρια 50 και 51 αναμιγνύονται και αραιώνονται σε τολουόλιο σε τελική συγκέντρωση για κάθε ομοειδές τα 10 ng mL⁻¹.

Ι) Παρασκευή διαλύματος βαθμονόμησης indicator PCBs (calibration solution):

Κατάλληλη ποσότητα από τα αντιδραστήρια 44-49 ζυγίζονται, διαλύονται και αναμιγνύονται σε τολουόλιο σε τελική συγκέντρωση 10 ng mL⁻¹ για κάθε ομοειδές.

Κ) Παρασκευή διαλύματος προτύπου έγχυσης mono-ortho και indicator PCBs (injection solution):

Κατάλληλη ποσότητα από το αντιδραστήριο 43 αραιώνεται σε εννεάνιο σε τελική συγκέντρωση 20 ng mL⁻¹.

Λ) Παρασκευή διαλύματος εσωτερικού προτύπου non-ortho, mono-ortho, indicator PCBs (working solution):

Κατάλληλες ποσότητες από τα κρίσιμα αντιδραστήρια 19-22, αναμιγνύονται και αραιώνονται με τολουόλιο σε τελική συγκέντρωση 10 ng mL⁻¹ για κάθε ένα από τα ομοειδή. Το διάλυμα που προκύπτει αναμιγνύεται σε ίσους όγκους μαζί με τα διαλύματα Ζ και Θ.

PFASs

1. PFOS
2. PFOA
3. $^{13}\text{C}_4$ -PFOS
4. $^{13}\text{C}_4$ -PFOA

Τα πυκνά διαλύματα (stock solutions) PFOS, PFOA και $^{13}\text{C}_4$ -PFOS, $^{13}\text{C}_4$ -PFOA παρασκευάζονται σε συγκεντρώσεις των $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ σε μεθανόλη και αποθηκεύονται στους 4°C .

Τα PFOS, PFOA και $^{13}\text{C}_4$ -PFOS, $^{13}\text{C}_4$ -PFOA εσωτερικά πρότυπα διαλύματα, (working solutions) χρησιμοποιούνται για εμβολιασμό (spiking) και για τη παρασκευή των διαλυμάτων βαθμονόμησης (calibration solutions). Παρασκευάζονται από τα stock solutions με αραιώση έως $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Τα διαλύματα βαθμονόμησης (πίνακας 5) παρασκευάζονται με ανάμειξη κατάλληλων ποσοτήτων από τα working solutions PFOS, PFOA και $^{13}\text{C}_4$ -PFOS και $^{13}\text{C}_4$ -PFOA, εξάτμιση μέχρι ξηρού και διάλυση σε $200 \mu\text{L}$ μεθανόλης- 5 mM οξικού αμμωνίου (20:80, v/v), ώστε να προκύψει διάλυμα με τις παρακάτω τελικές συγκεντρώσεις για κάθε αντιδραστήριο.

Πίνακας 5: Διαλύματα βαθμονόμησης για τη μέτρηση των PFASs

	Διάλυμα 0	Διάλυμα 1	Διάλυμα 5	Διάλυμα 10	Διάλυμα 20
$^{13}\text{C}_4$ -PFOS $^{13}\text{C}_4$ -PFOA	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL
PFOS	0 μL	10 μL	50 μL	100 μL	200 μL
PFOA	0 μL	10 μL	50 μL	100 μL	200 μL

Το διάλυμα ελέγχου απόκρισης του οργάνου είναι το Std 10.

7.2.2 Λοιπά αντιδραστήρια και υλικά

PCDDs, PCDFs και PCBs

Ενεργός άνθρακας FU4652

Οξαλικό νάτριο καθαρότητας: for analysis

Μεθανόλη 99.9% και 99% (for analysis and residue analysis)

Διαιθυλαιθέρας 99% (for analysis and residue analysis)

Πετρελαϊκός αιθέρας καθαρότητας: for analysis

Διχλωρομεθάνιο 99.5% (for residue analysis)

Εξάνιο 99.0% (for analysis and residue analysis)

Εννεάνιο 95%

Τολουόλιο 99.8% (for analysis and residue analysis)

Ακετόνη καθαρότητας: for analysis

Θειικό οξύ 95-97%

Οξειδίο του αργιλίου, βασικό, activity super I, καθαρότητας: for dioxin analysis

Γέλη πυριτίας (0.015-0.040 mm) (Silica gel 60) για στήλη χρωματογραφίας

Θειικό νάτριο, άνυδρο, κόκκοι, αποξηραμένο για 48 h στους 500°C, το οποίο αποθηκεύεται σε ξηραντήρα, καθαρότητας: for analysis

Βαμβάκι, εκχυλισμένο για 48 h σε συσκευή soxhlet με πετρελαϊκό αιθέρα: ακετόνη

Υαλοβάμβακας, εκχυλισμένος για 48 h σε συσκευή soxhlet με πετρελαϊκό αιθέρα: ακετόνη

Σωλήνες falcon 50 mL και 15 MI

PFASs

Μεθανόλη 99.9% (for analysis)

Ακετονιτρίλιο 99.9% (for analysis)

Υπερκαθαρό νερό

Άμμος (for analysis)

Στήλες C18 εκχύλισης στερεάς φάσης (500 mg/ 5 mL)

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PB) 0.05M, pH: 7.8 (0.28g KH_2PO_4 + 3.265g Na_2HPO_4 σε 500 mL H_2O)

Οξικό αμμώνιο 5 mM, pH: 6.86 (0.389g 1L H_2O)

7.3 Όργανα, συσκευές και γυαλικά

7.3.1 Προσδιορισμός PCDDs, PCDFs, PCBs σε δείγματα τροφίμων και PCBs σε δείγματα αίματος

Αέριος χρωματογράφος εξοπλισμένος με στήλη J&W DB-5MS 60 m-0.25 mm-0.1 μm συνδεδεμένος με φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (GC-HRMS) ThermoFinnigan GC-MS DFS (MAT 95XP)

Φυγόκεντρος Hettich Universal 32R

Ζυγός A&D GF-1200 (0.5-120 g/0.01g)

Φούρνος Thermolyne, τύπος 30400 (204-982°C)

Φούρνος Memmert, τύπος UF-400 (έως 400°C)

Φούρνος Memmert, τύπος UF-500 (έως 500°C)

Περιστροφικός συμπυκνωτής, Buchi Rotavapor R-200 με υδατόλουτρο

Ισοθερμικός μανδύας 6 θέσεων Electrothermal EME 60100/CEB

Ισοθερμικός μανδύας Isopad G2/100 mL

Συσκευή εξάτμισης Techne

Συσκευή αλέσεως κρέατος Kenwood

Συσκευή άλεσης τροφίμων, Warring blender

Πιπέτα Hamilton 300 μL

Πιπέτα Gilson 100 μL

Αναδευτήρας τύπου Vortex

Διαχωριστικές χοάνες των 2 L με πώμα από Teflon

Ογκομετρικός κύλινδρος των 250 mL

Φιάλες σφαιρικές των 100 mL

Φιάλες σφαιρικές των 500 mL με εσμύρισμα, που προσαρμόζονται σε περιστροφικό συμπυκνωτή

Φιάλες σφαιρικές των 100 mL με εσμύρισμα, που προσαρμόζονται σε περιστροφικό συμπυκνωτή

Σπειροειδείς ψυκτήρες με εσμυρισμένα άκρα

Γυάλινες στήλες χρωματογραφίας

Σωλήνας για εκχύλιση Soxhlet με αντιρροή, με γυάλινο φίλτρο στο κάτω μέρος

Γυάλινα χωνιά διαμέτρου 15 cm

Ποτήρι ζέσεως 500 mL

Γυάλινοι σωλήνες χωρητικότητας 5 mL κατάλληλοι για τις υποδοχές της συσκευής Techne

Φιαλίδια από σκούρο γυαλί με πώματα κατάλληλα για δειγματολήπτη GC-MS, Alltech

Επαναληπτική αυτόματη πιπέτα Brand 1 mL

Ξηραντήρας

7.3.2 Προσδιορισμός PFASs σε δείγματα τροφίμων και αίματος

Συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) Finnigan Surveyor MS Plus (Thermo) εξοπλισμένη με στήλη HyPurity Advance C₁₈ 5 μm, 50 mm × 2.1 mm i.d (Thermo) συνδεδεμένη με φασματογράφο μάζας συστοιχίας τριών τετραπόλων (LC-MS/MS triple quadrupole) Finnigan TSQ QUANTUM ULTRA (Thermo).

Ζυγός A&D (1 mg-210 g/ 0.01 g)

Ζυγός A&D GF-1200 (0.5-120 g/ 0.01g)

Συσκευή υπερκαθαρού νερού Barnstead

Φυγόκεντρος Hettich Universal 32R

Περιστροφικός συμπυκνωτής, Buchi Rotavapor R-200

Πιπέτα Hamilton 300 μL

Πιπέτα Gilson 100 μL

Αναδευτήρας τύπου Vortex

Σύστημα εκχύλισης υψηλής πίεσης, Accelerated solvent extractor (ASE) Dionex ASE 300

Ποτήρι ζέσεως 50 mL

Σφαιρικές φιάλες 50 mL

Σφαιρικές φιάλες 100 mL

Φιαλίδια 1,5 mL κατάλληλα για LC-MS

Ενθέματα 100 μL

7.4 Πορεία εργασίας

7.4.1 Προσδιορισμός PCDDs, PCDFs και PCBs στα τρόφιμα

7.4.1.1 Εκχύλιση του λίπους σε υγρά δείγματα τροφίμων

Ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα δείγματος ώστε να απομονωθούν 5-10 g λίπους. Το δείγμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη των 2 L. Συνήθεις ποσότητες είναι π.χ. 200 g από αγελαδινό γάλα, 100 g από πρόβειο γάλα, 50 g γιαουρτιού. Στο δείγμα προστίθενται διαλύματα εσωτερικών προτύπων (working solution) PCDDs, PCDFs και non-ortho PCBs. Το μίγμα αναδεύεται για λίγα δευτερόλεπτα, προστίθεται οξαλικό νάτριο σε ποσότητα 1 g ανά 100 g δείγματος και ανακινείται για 20 sec. Στη συνέχεια στο δείγμα προστίθενται ίσοι όγκοι από τους παρακάτω διαλύτες:

- I. Μεθανόλη (30 sec ανάδευση)
- II. Διαιθυλαιθέρα (30 sec ανάδευση)

III. Πετρελαϊκό αιθέρα (1 min ανάδευση)

Μετά τον πλήρη διαχωρισμό της οργανικής και υδατικής στοιβάδας, για τον οποίο απαιτούνται 2 h, η υδατική φάση απομακρύνεται και απορρίπτεται. Αν ο διαχωρισμός των φάσεων δεν είναι ικανοποιητικός, προστίθενται 10-15 mL NaCl 0.9%. Η οργανική φάση συλλέγεται σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη που στο επάνω μέρος της έχει τοποθετηθεί χωνί με 100 g άνυδρου Na_2SO_4 . Η διαχωριστική χοάνη ξεπλένεται με 70 mL πετρελαϊκού αιθέρα και το έκπλυμα προστίθεται στο εκχύλισμα. Η σφαιρική φιάλη προσαρμόζεται σε περιστροφικό συμπυκνωτή και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 30 °C. Στη συνέχεια η σφαιρική μεταφέρεται στο φούρνο για 2 h στους 105 °C, προκειμένου να απομακρυνθούν πλήρως τα υπολείμματα διαλύτη και υγρασίας. Κατόπιν η σφαιρική ψύχεται και ζυγίζεται και πάλι ώστε να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα σε λίπος των τροφίμων. Οι ενώσεις PCDDs, PCDFs και PCBs είναι λιπόφιλες και ο ορθός προσδιορισμός της περιεκτικότητας του τροφίμου σε λίπος καθίσταται κρίσιμος για το επόμενο στάδιο της ανάλυσης που είναι ο προσδιορισμός των PCDDs, PCDFs και PCBs.

7.4.1.2 Εκχύλιση του λίπους σε στερεά δείγματα τροφίμων

Αφού ομογενοποιηθούν σε συσκευή άλεσης τροφίμων τα δείγματα ζυγίζονται οι εξής ποσότητες:

60 g κοτόπουλο, 100 g μοσχάρι, 100 g συκώτι, 30 g τυρί, 10 g βούτυρο, 30 g κρόκος αυγού, 80 g ψαριού. Προστίθεται στο δείγμα 200-300 g άνυδρο θειϊκό νάτριο (ανάλογα με την υγρασία του δείγματος) και ομογενοποιούνται σε γουδί. Στο σωλήνα εκχύλισης soxhlet (πάνω από το γυάλινο φίλτρο), τοποθετείται διαδοχικά ένα κομμάτι βαμβάκι, το δείγμα αναμεμιγμένο με το θειϊκό νάτριο και ένα επιπλέον κομμάτι βαμβάκι. Τέλος προστίθενται τα διαλύματα εσωτερικών προτύπων (working solution) PCDDs, PCDFs και non-ortho PCBs.

Ο σωλήνας τοποθετείται σε διάταξη αντιρροής (reflux) πάνω από προζυγισμένη σφαιρική φιάλη των 500 mL που περιέχει 250 mL διχλωρομεθάνιο για την εκχύλιση του λίπους και τίθεται σε αντιρροή όλη τη νύχτα. Αν το εκχύλισμα περιέχει θειϊκό νάτριο, διηθείται μέσα από χωνί με βαμβάκι (εκχυλισμένο για 48 h

σε συσκευή soxhlet με πετρελαϊκό αιθέρα: ακετόνη). Αν περιέχει υγρασία, στο χωνί προστίθεται μία ποσότητα θειϊκού νατρίου επάνω από το βαμβάκι. Ο διαλύτης εξατμίζεται στους 30°C στον περιστροφικό συμπυκνωτή και στη συνέχεια η σφαιρική φιάλη τοποθετείται στον φούρνο στους 105°C για 2h. Στη συνέχεια η φιάλη αφήνεται να κρυώσει και ζυγίζεται για να υπολογιστεί το ποσοστό του λίπους του τροφίμου.

7.4.1.3 Καθαρισμός εκχυλισμάτων

Καθαρισμός με ενεργό άνθρακα

Ετοιμάζεται η στήλη ενεργού άνθρακα: Τοποθετείται ένα κομμάτι υαλοβάμβακα στη βάση της γυάλινης στήλης, προστίθενται 2 g ενεργού άνθρακα FU4652 και άλλο ένα κομμάτι υαλοβάμβακα (εκχυλισμένος για 48 h σε συσκευή soxhlet με πετρελαϊκό αιθέρα: ακετόνη). Το εκχυλισμένο λίπος διαλύεται σε 50 mL διχλωρομεθανίου (από τα δείγματα των ελαίων ζυγίζονται 9-10 g και διαλύονται και αυτά σε 50 mL διχλωρομεθανίου). Το εκχύλισμα προστίθεται ποσοτικά στη στήλη ενεργού άνθρακα. Η σφαιρική φιάλη και τα τοιχώματα του σωλήνα εκπλένονται 2 φορές με 10 mL διχλωρομεθανίου. Η στήλη τοποθετείται σε διάταξη αντιρροής που διαθέτει σφαιρική φιάλη όπου βρίσκονται 45 mL διχλωρομεθανίου περίπου. Η αντιρροή συνεχίζεται για 2 h πάνω σε ισοθερμικό μανδύα. Το κλάσμα διχλωρομεθανίου που συλλέγεται απορρίπτεται. Στη συνέχεια η στήλη εκπλένεται με 20 mL τολουολίου και το έκπλυμα απορρίπτεται. Σε καθαρή σφαιρική φιάλη των 100 mL προστίθενται περίπου 40 mL τολουολίου και τίθεται σε αντιρροή η στήλη άνθρακα για 2 h στο θερμικό μανδύα. Το κλάσμα τολουολίου που συλλέγεται περιέχει τα non-ortho PCBs. Στη συνέχεια αναστρέφεται η στήλη άνθρακα στη διάταξη αντιρροής. Σε καθαρή σφαιρική φιάλη των 100 mL τοποθετούνται περίπου 50 mL τολουολίου και η στήλη τίθεται σε αντιρροή στο θερμικό μανδύα όλη τη νύχτα (16h). Το προκύπτον εκχύλισμα τολουολίου περιέχει τις ενώσεις PCDDs και PCDFs. Σε όλα τα κλάσματα τολουολίου προστίθενται περίπου 100 μ L εννεάνιο και εξατμίζονται μέχρι να απομείνει μόνο το εννεάνιο στον περιστροφικό συμπυκνωτή στους 45 °C

περίπου. Το ξηρό υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε 5 mL εξανίου. Τα εκχυλίσματα υφίστανται περαιτέρω καθαρισμό με υδροξείδιο του αργιλίου.

Καθαρισμός του κλάσματος non-ortho PCBs

Για τον διαχωρισμό των non-ortho PCBs απαραίτητη είναι η παρασκευή στήλης οξειδίου του αργιλίου/γέλης πυριτίας η οποία παρασκευάζεται ως εξής: Ποσότητα 5 g οξειδίου του αργιλίου τοποθετείται στον φούρνο στους 200 °C για 24 h τουλάχιστον και αφήνεται να ψυχθεί στον ξηραντήρα. Στο κάτω μέρος της στήλης τοποθετείται μικρό κομμάτι υαλοβάμβακα. Πάνω από αυτό προστίθενται διαδοχικά 0.5 g 44% H₂SO₄-γέλης πυριτίας και 5 g οξειδίου του αργιλίου.

Το εκχύλισμα διαλυμένο σε εξάνιο προστίθεται στη στήλη με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur. Η στήλη εκπλένεται δύο φορές με 2 mL εξανίου. Το εκχύλισμα εκλούεται με 50 mL μίγματος εξανίου:διχλωρομεθανίου (50:50 v/v). Το έκλουσμα συμπυκνώνεται στον περιστροφικό συμπυκνωτή σε θερμοκρασία 30 °C περίπου ως τα 2 mL και στη συνέχεια με πιπέτα Pasteur μεταφέρεται σε γυάλινο σωλήνα και ξηραίνεται στη συσκευή Techne στους 100 °C με τη βοήθεια ασθενούς ρεύματος αζώτου μέχρι ξηρού. Μετά την ξήρανση στο γυάλινο σωλήνα προστίθενται 50 µL non-ortho PCBs injection solution και μεταφέρεται σε κατάλληλο φιαλίδιο (injection vial) για την ανάλυση GC-MS.

Καθαρισμός του κλάσματος PCDDs, PCDFs

Για τον διαχωρισμό των PCDDs, PCDFs είναι απαραίτητη η παρασκευή στήλης οξειδίου του αργιλίου/γέλης πυριτίας και παρασκευάζεται κατά τον ίδιο τρόπο με αυτήν για τον διαχωρισμό για τα επίπεδα PCBs.

Το εκχύλισμα αφού διαλυθεί σε εξάνιο προστίθεται με πιπέτα Pasteur στη στήλη. Η στήλη εκπλένεται 2 φορές με 2.5 mL εξάνιο και 20 mL μίγματος εξανίου: διχλωρομεθανίου 93:7 v/v. Το έκπλυμα απορρίπτεται. Τα PCDDs, PCDFs εκλούνται με 50 mL μίγματος εξανίου: διχλωρομεθανίου (60:40 v/v). Το έκλουσμα, χωρίς το κλάσμα έκπλυσης συμπυκνώνεται στον περιστροφικό συμπυκνωτή σε θερμοκρασία 30 °C περίπου ως τα 2 mL και στη συνέχεια με πιπέτα Pasteur μεταφέρεται σε γυάλινο σωλήνα και ξηραίνεται στη συσκευή

Techne στους 100 °C με τη βοήθεια ενός ασθενούς ρεύματος αζώτου μέχρι ξηρού. Μετά την ξήρανση στο γυάλινο σωλήνα προστίθενται 50 µL PCDDs, PCDFs διαλύματος προτύπου έγχυσης (injection standard) και μεταφέρεται σε κατάλληλο φιαλίδιο για την ανάλυση GC-MS.

Απομόνωση mono-ortho PCBs και indicator PCBs

Μετά την απομόνωση του λίπους από τα δείγματα τροφίμων, ποσότητα 0.5 g λίπους διαχωρίζεται για τον προσδιορισμό mono-ortho PCBs και indicator PCBs. Τοποθετούνται σε σφαιρικές φιάλες των 50 mL και προστίθενται διάλυμα εσωτερικού προτύπου mono-ortho PCBs working solution και indicator PCBs working solution. Στη συνέχεια ακολουθεί ο καθαρισμός του λίπους με στήλη γέλης πυριτίας-44 % H₂SO₄ η οποία ετοιμάζεται ως εξής: Ένα κομμάτι υαλοβάμβακα τοποθετείται στο κάτω μέρος της στήλης και προστίθενται 10 g γέλης πυριτίας-44% H₂SO₄. Το εκχυλισμένο λίπος διαλύεται σε περίπου 5 mL εξάνιο και προστίθεται στη στήλη με πιπέτα Pasteur. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με 2mL εξάνιο και η στήλη εκλούεται με 100 mL εξάνιο. Το έκλουσμα συλλέγεται σε σφαιρικές φιάλες των 250 mL και στο τέλος συμπυκνώνεται στον περιστροφικό συμπυκνωτή στους 30 °C.

Για τον καθαρισμό των mono-ortho PCBs και indicator PCBs παρασκευάζεται στήλη οξειδίου του αργιλίου/γέλης πυριτίας ομοίως με την παράγραφο (*Διαχωρισμός των κλασμάτων επίπεδων PCBs*) και το συμπύκνωμα από το περιστροφικό συμπυκνωτή εισέρχεται με πιπέτα Pasteur στη στήλη. Η στήλη εκπλένεται δύο φορές με περίπου 2.5 mL εξανίου. Το εκχύλισμα εκλούεται με 50 mL μίγματος εξανίου:διχλωρομεθανίου 50:50 v/v. Το έκλουσμα συμπυκνώνεται στον περιστροφικό συμπυκνωτή στους 30 °C έως 2 mL και στη συνέχεια με πιπέτα Pasteur μεταφέρεται σε γυάλινο σωλήνα και ξηραίνεται στη συσκευή Techne στους 100 °C με τη βοήθεια ασθενούς ρεύματος αζώτου. Μετά την ξήρανση στο γυάλινο σωλήνα προστίθενται 50 µL mono-ortho και indicator PCBs injection solution και μεταφέρεται στο κατάλληλο φιαλίδιο για μέτρηση στο HRGC-HRMS.

7.4.2 Προσδιορισμός PCBs στον ορό αίματος

Σε σωλήνα falcon των 15 mL τοποθετείται 1 mL ορού και με αυτόματη πιπέτα προστίθενται διάλυμα εσωτερικού προτύπου non-ortho, mono-ortho και indicator PCBs working solution. Προστίθενται κατά σειρά:

- I. 1 mL Μεθανόλη (ανάδευση για 1 min)
- II. 1 mL Διαιθυλαιθέρας (ανάδευση για 1 min)
- III. 1 mL Πετρελαϊκός αιθέρας (ανάδευση για 1 min)

Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 5 min και παραλαμβάνεται η ανώτερη στοιβάδα με πιπέτα Pasteur σε προζυγισμένο γυάλινο σωλήνα. Ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου και ο γυάλινος σωλήνας τοποθετείται στον φούρνο στους 105 °C για 30 min για να απομακρυνθούν υπολείματα διαλύτη και υγρασίας. Στη συνέχεια ζυγίζεται εκ νέου ο γυάλινος σωλήνας για να προσδιοριστεί το ποσοστό λίπους του ορού.

Το λίπος διαλύεται σε 2 mL εξάνιο. Σε γυάλινη στήλη τοποθετείται αρχικά υαλοβάμβακας και στη συνέχεια 1 g γέλης πυριτίας-44 % H₂SO₄, 1 g οξειδίου του αργιλίου και 0,5 g Na₂SO₄ και ακολουθεί η προσθήκη του δείγματος στην στήλη. Στη συνέχεια η στήλη εκπλένεται 2 φορές με 1 mL εξάνιο, τα PCBs εκκλύονται με 10 mL εξάνιο:διχλωρομεθάνιο 50:50 και το έκλουσμα παραλαμβάνεται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL. Εξατμίζεται μέχρι 1-2 mL και μεταφέρεται σε γυάλινο σωλήνα και ξηραίνεται με ρεύμα αζώτου. Προστίθενται 50 μL non-ortho PCBs injection solution και μεταφέρεται στο κατάλληλο φιαλίδιο για μέτρηση στο HRGC-HRMS.

Μέτρηση δειγμάτων τροφίμων και ορού στο HRGC-HRMS

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των PCDDs, PCDFs και PCBs πραγματοποιείται με αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματογράφο μάζας υψηλής διαχωριστικής ικανότητας με πηγή ιονισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (HRGC-HRMS,EI) με τη μέθοδο πολλαπλής ανίχνευσης ιόντων (MID). Ο αέριος χρωματογράφος είναι τύπου Trace 1310 της εταιρείας ThermoFinnigan, εξοπλισμένος με αυτόματο δειγματολήπτη TriPlus RSH συζευγμένος με αναλυτή μάζας διπλής εστίασης DFS mass spectrometer με διαχωριστική ισχύ 10000. Ο

ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ισοτοπικής αραίωσης. Για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων ισοδύναμης τοξικότητας (TEQ) χρησιμοποιήθηκαν οι συντελεστές τοξικής ισοδυναμίας (TEF) WHO-2005¹⁵⁹. Το όριο ανίχνευσης για κάθε ομοειδές προσδιορίστηκε από δύο διαφορετικά ιόντα βάσει του λόγου 3:1 (σήμα:θόρυβο) για το λιγότερο ευαίσθητο σήμα.

Το όργανο ρυθμίζεται να έχει διαχωριστική ικανότητα τουλάχιστον 10000 και ένταση σήματος της κορυφής 317 ή 414 τουλάχιστον 1000000 μV με τη βοήθεια 2 μL πρότυπης ουσίας FC 5311.

Για κάθε σειρά ανάλυσης (PCDDs, PCDFs, non-ortho PCBs, mono-ortho και indicator PCBs) τοποθετούμε στον αυτόματο δειγματολήπτη τα φιαλίδια με την ακόλουθη σειρά: 2 πρότυπα διαλύματα, 2 τυφλά καθαρού διαλύτη, 5 άγνωστα δείγματα, 2 πρότυπα διαλύματα, 2 τυφλά δείγματα, 5 άγνωστα δείγματα, 2 πρότυπα διαλύματα, 1 τυφλό δείγμα.

Μετά το τέλος της ανάλυσης γίνεται επεξεργασία των χρωματογραφημάτων και ελέγχονται τα κριτήρια ποιότητας που αφορούν τον διαχωρισμό των ομοειδών 1,2,3,4,7,8-HxCDF και 1,2,3,6,7,8-HxCDF (<25% από κορυφή σε κορυφή) και τον έλεγχο ανάκτησης των μεμονωμένων εσωτερικών προτύπων (60-120%) όπως περιγράφονται στην μέθοδο EPA 1613¹³⁷, 1668¹³⁸.

7.4.3 Προσδιορισμός PFASs

Για την εκχύλιση και απομόνωση των PFASs, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του εργαστηρίου ΕΦΑΜΑΔ για την προετοιμασία των δειγμάτων.

7.4.3.1 Εκχύλιση τροφίμων

5 g ομογενοποιημένου δείγματος μεταφέρονται σε ποτήρι ζέσεως των 50 mL και προστίθενται 200 μL από το διάλυμα εσωτερικών προτύπων (working solution) ¹³C₄-PFOS και ¹³C₄-PFOA. Ύστερα από 30 min αναμιγνύουμε το δείγμα με 25 g άμμου.

Το δείγμα τοποθετείται σε κατάλληλου μεγέθους δοχείο (34 mL) και μεταφέρεται στη συσκευή εκχύλισης υψηλής πίεσης (ASE). Ως διαλύτης χρησιμοποιείται νερό

και εκτελούνται 3 κύκλοι εκχύλισης για το κάθε δείγμα. Η εκχύλιση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 110 °C για 7 min και πίεση 1500 psi.

7.4.3.2 Εκχύλιση αίματος

Σε σωλήνα falcon 50 mL ζυγίζεται 1 mL δείγματος αίματος και προστίθενται 200 μL διάλυμα εσωτερικών προτύπων (working solution) $^{13}\text{C}_4$ -PFOS και $^{13}\text{C}_4$ -PFOA. Προστίθενται 20 mL ακετονιτρίλιο και αναδεύονται σε αναδευτήρα vortex για 1 min περίπου. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 4000 rpm στους 25 °C για 5 min περίπου. Η ανώτερη στοιβάδα μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL. Εξατμίζεται μέχρι ξηρού ο διαλύτης στον περιστροφικό συμπυκνωτή στους 30 °C και το υπόλειμμα διαλύεται σε 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS) 0.05M, pH: 7.8

7.4.3.3 Καθαρισμός με εκχύλιση στερεάς φάσης

Το διάλυμα μεταφέρεται σε στήλη C_{18} SPE που έχει ενεργοποιηθεί με 2.5 mL μεθανόλης και 5 mL νερού. Ακολουθεί έκπλυση της στήλης C_{18} SPE με 5 mL νερού, ξήρανση υπό κενό και τέλος έκλουση με 5 mL μεθανόλης. Ο διαλύτης εξατμίζεται μέχρι ξηρού στον περιστροφικό συμπυκνωτή στους 35 °C και το υπόλειμμα διαλύεται σε 200 μL μεθανόλης- 5mM οξικού αμμωνίου (20:80, v/v) και μεταφέρεται σε κατάλληλο φιαλίδιο για τη μέτρηση σε LC-MS/MS.

Τα διαλύματα βαθμονόμησης παρασκευάζονται σύμφωνα με τον Πίνακα 5.

Προσδιορισμός με τη χρήση LC-MS/MS

Πριν την έναρξη της ανάλυσης γίνεται έλεγχος της βαθμονόμησης του οργάνου, βάσει των προδιαγραφών του κατασκευαστή. Σε περίπτωση που απαιτείται επαναβαθμονόμηση του οργάνου γίνεται με χρήση της πρότυπης ουσίας Polytyrosine βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή.

Για κάθε σειρά ανάλυσης τοποθετούνται στον αυτόματο δειγματολήπτη τα φιαλίδια με την ακόλουθη σειρά: Διάλυμα 0, διάλυμα 1, διάλυμα 5, διάλυμα 10, διάλυμα 20 (Πίνακας 6), τυφλό καθαρού διαλύτη, διάλυμα 10, τυφλό δείγμα, άγνωστα δείγματα και προγραμματίζουμε τον αυτόματο δειγματολήπτη ώστε να εισάγει τα δείγματα με αυτή τη σειρά. Ο μέγιστος αριθμός δειγμάτων που

περιλαμβάνονται σε κάθε σειρά είναι 15. Η ανάλυση γίνεται βάσει του παρακάτω προγράμματος έκλουσης: Ο διαλύτης Α είναι διάλυμα μεθανόλης-5 mM οξικού αμμωνίου (20:80, v/v), ο Β μεθανόλη και ο D ισοπροπανόλη. Η θερμοκρασία της στήλης είναι 26 °C.

Πίνακας 6: Πρόγραμμα έκλουσης για τα PFASs

Χρόνος (min)	Ροή (μL min ⁻¹)	Διαλύτης Α%	Διαλύτης Β%	Διαλύτης D%
5	250	80%		20%
3	250		50%	50%
2	250		50%	50%

Η συσκευή LC είναι συζευγμένη με φασματογράφο μάζας με αναλυτή ένα τριπλό τετράπολο (TSQ QUANTUM ULTRA, Thermo) και εξοπλισμένο με πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού, Ion MAX-S thermoelectrospray source. Η θερμοκρασία της πηγής διατηρείται στους 350 °C και η τάση της πηγής στα 3500 V. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της σάρωσης πολλαπλών αντιδράσεων (MRM) που ανιχνεύει δύο ιοντικές μεταπτώσεις (πρόδρομο ιόν/θυγατρικό ιόν) για κάθε αναλύτη.

Οι ιοντικές μεταπτώσεις και οι αντίστοιχες ενέργειες διάσπασης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 7: Ιοντικές μεταπτώσεις και ενέργειες διάσπασης των επισημασμένων και μη PFOS και PFOA

	Ιοντικές μεταπτώσεις (m/z)	Ενέργειες διάσπασης (eV)
PFOA	413 → 219	40
	413 → 369	30
¹³ C ₄ -PFOA	417 → 168.9	30
	417 → 372	30
PFOS	498.9 → 80	57
	498.9 → 98.9	41
¹³ C ₄ -PFOS	502.9 → 80	57
	502.9 → 98.9	41

Η επιβεβαίωση της ταυτότητας του αναλύτη βασίστηκε πέραν του χρόνου κατακράτησης και στην σχετική απόκριση της δεύτερης μετάπτωσης σε σχέση με την πρώτη. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του αναλύτη πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ισοτοπικής αραίωσης, συνυπολογίζοντας το εμβαδό των δύο θυγατρικών ιόντων. Το όριο ανίχνευσης για το PFOS και το PFOA προσδιορίστηκε ως η χαμηλότερη συγκέντρωση για την οποία διαπιστώνεται αποδεκτός λόγος σήμα:θόρυβο (5:1). Πιο συγκεκριμένα, το LOD υπολογίστηκε στα 0.15 ng mL⁻¹ και για τις δύο ενώσεις.

Οι μέθοδοι ανάλυσης των ενώσεων της ομάδας των διοξινών και των υπερφθοριωμένων ενώσεων είναι διαπιστευμένες κατά ISO 17025 από το ΕΣΥΔ (Αρ. Πιστοποιητικών 321).

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Ανάπτυξη μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων της ομάδας των διοξινών σε τρόφιμα

Αρχικός στόχος ήταν η αντικατάσταση του ενεργού άνθρακα τύπου Carbosphere που χρησιμοποιείτο επί 16 χρόνια για την ανάλυση σε δείγματα ρουτίνας (τρόφιμα, ζωοτροφές, περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα) του εργαστηρίου. Έτσι λοιπόν κρίθηκε αναγκαία η αναζήτηση νέου προσροφητικού υλικού η οποία θα συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της Carbosphere και θα έχει όσο το δυνατόν λιγότερα από τα μειονεκτήματα της (υψηλό κόστος, ανάγκη έκπλυσης του υλικού μετά από κάθε χρήση). Ενώ έχουν δοκιμαστεί και άλλα προσροφητικά υλικά, όπως Carborack και Celite, αποδείχτηκαν ανεπαρκή ως προς την ικανότητά τους να διαχωρίζουν τις διοξίνες από το λίπος. Επιπλέον, το νέο υλικό έπρεπε να είναι αρκετά οικονομικό ώστε να μπορεί να ενσωματωθεί στις αναλύσεις ρουτίνας του εργαστηρίου χωρίς την ανάγκη καθαρισμού του υλικού μετά από κάθε χρήση η οποία εκτός από χρονοβόρα (6 βδομάδες έκπλυση με μίγμα μεθανόλης-τολουολίου) μετά από μακροχρόνια επαναλαμβανόμενη χρήση οδήγησε σε υψηλό σήμα υποβάθρου στα χρωματογραφήματα δειγμάτων το οποίο κατέστησε δύσκολο τον ακριβή προσδιορισμό των ενώσεων στόχων, ειδικότερα των ομοειδών με πέντε ή περισσότερους υποκαταστάτες χλωρίου. Εκτός από το κόστος και την ικανότητα διαχωρισμού των ενώσεων της ομάδας των διοξινών από το λίπος των τροφίμων, σημαντική ιδιότητα του ενεργού άνθρακα, ως προσροφητικού υλικού στην ανάλυση των ενώσεων αυτών είναι και η ικανότητα διαχωρισμού των επίπεδων από τις μη επίπεδες ενώσεις. Συνεπώς η εκλεκτικότητα και ειδικότητα του υλικού παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάγκη για λιγότερα στάδια χρωματογραφικού καθαρισμού που απαιτούνται για τον διαχωρισμό των ενώσεων που παρεμποδίζουν, όπως είναι οι αρωματικές ενώσεις, οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα, ortho-PCBs, οι πολυχλωριωμένοι διφαινύλ-αιθέρες κ.ο.κ.

Το υλικό που εξετάστηκε είναι ενεργός άνθρακας από γραφίτη, με μέγεθος κόκκων 600 μm με την εμπορική ονομασία Schunk FU 4652. Αναπτύχθηκε αρχικά για να χρησιμοποιηθεί στα αεροπλάνα τύπου Boeing για τον καθαρισμό των απαερίων του κινητήρα από τους ρύπους. Στον πίνακα 8 παρουσιάζονται τα τεχνικά χαρακτηριστικά του υλικού αυτού όπως δίνονται από τον κατασκευαστή. Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, το υλικό αυτό χαρακτηρίζεται από το σφαιρικό σχήμα όλων των κόκκων, οι οποίοι κατηγοριοποιούνται ανά μέγεθος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ιδανική πυκνότητα στοίβαξης των σφαιριδίων και την ιδανική ροή των διαλυτών ανάμεσα από τα σωματίδια.

Πίνακας 8: Τεχνικά χαρακτηριστικά του ενεργού άνθρακα FU 4652

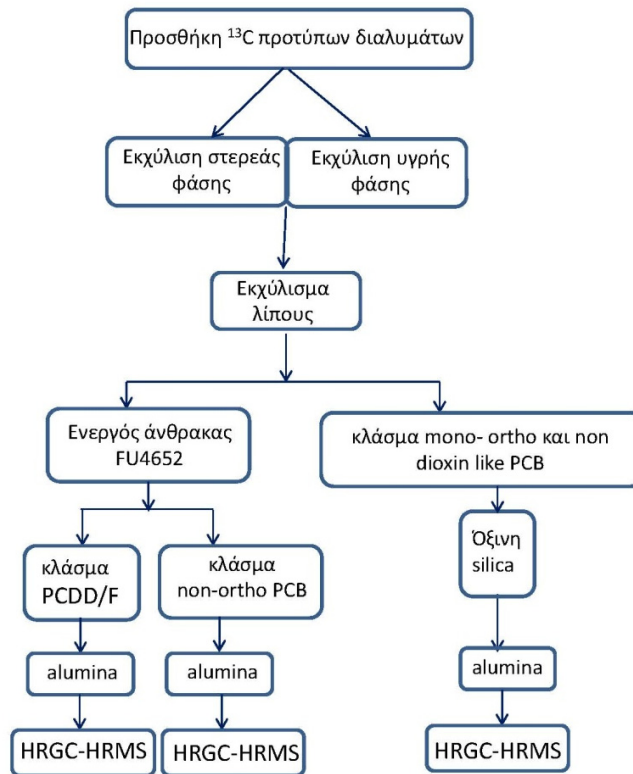
Φαινόμενη πυκνότητα (g/cm ³)	0,4
Πτητικές ενώσεις (%)	3
Περιεκτικότητα σε θείο (%)	1,5
Ειδική επιφάνεια (m ² /g)	1400
Τέφρα (%)	0,5
Μέσο μέγεθος σφαιριδίων (μm)	600

Λόγω της αντοχής στην συμπίεση και του σχήματός τους, ολόκληρη η επιφάνεια των σφαιριδίων είναι διαθέσιμη στους διαλύτες και τους αναλύτες.

Η μέθοδος επικυρώθηκε σύμφωνα με τα αναλυτικά κριτήρια που έχουν θεσπιστεί από την ευρωπαϊκή νομοθεσία 589/2014¹⁶⁰ και 709/2014¹⁶¹. Τα δείγματα αναφοράς που αναλύθηκαν για την αξιολόγηση του νέου υλικού ενεργού άνθρακα ήταν δείγματα ελαιόλαδου, «εμβολιασμένα» (spiked) με PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης. Η νέα μέθοδος αξιολογήθηκε επιπλέον και σε δείγματα τροφίμων από διεργαστηριακές δοκιμές παρελθόντων ετών από διεθνείς επίσημους φορείς (FAPAS, EURL, Folkehelse κ.ο.κ). Επιπλέον, με τη νέα μέθοδο αναλύθηκαν δείγματα ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας από το εθνικό ετήσιο σχέδιο ελέγχων για την ασφάλεια και την ποιότητα των τροφίμων που διεξήγαγε ο ΕΦΕΤ κατά το χρονικό διάστημα 2016-

2017. Αφού επικυρώθηκε η μέθοδος, εφαρμόζεται πλέον στις αναλύσεις των δειγμάτων του εργαστηρίου.

Αναλυτικότερα, το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη και περιγράφεται αναλυτικά στο πειραματικό μέρος φαίνεται στο σχήμα 5.



Σχήμα 5: Πορεία εργασίας για την ανάλυση διοξινών στα τρόφιμα

Μετά την εκχύλιση του λίπους, η στήλη του ενεργού άνθρακα χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση του λίπους και τον διαχωρισμό των επιπέδων (PCDDs, PCDFs) από τα μη επίπεδα non-ortho PCBs.

Προκειμένου να δοκιμαστεί η ικανότητα της στήλης άνθρακα να κατακρατά το λίπος, 10 g λίπους διαλυμένα σε τολουόλιο προστέθηκαν σε στήλη πληρωμένη με άνθρακα FU 4652. Ολόκληρη η ποσότητα του λίπους εκλούστηκε από την στήλη με τη χρήση διαλυτών, όπως αναφέρεται στη παράγραφο προετοιμασία δείγματος. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει τη χαμηλή συγγένεια του FU 4652 ενεργού άνθρακα για τα λιπίδια, η οποία είναι αναγκαία δεδομένου ότι είναι

απαραίτητη η πλήρης απομάκρυνση του λίπους πριν τα τελικά στάδια του χρωματογραφικού καθαρισμού. Η προετοιμασία δείγματος για τα μη επίπεδα μόρια mono-ortho και των 6 non-dioxin-like PCBs πραγματοποιήθηκε από χρωματογραφικές στήλες acid silica/alumina χωρίς τη χρήση στήλης ενεργού άνθρακα (Costopoulou et al. 2006).

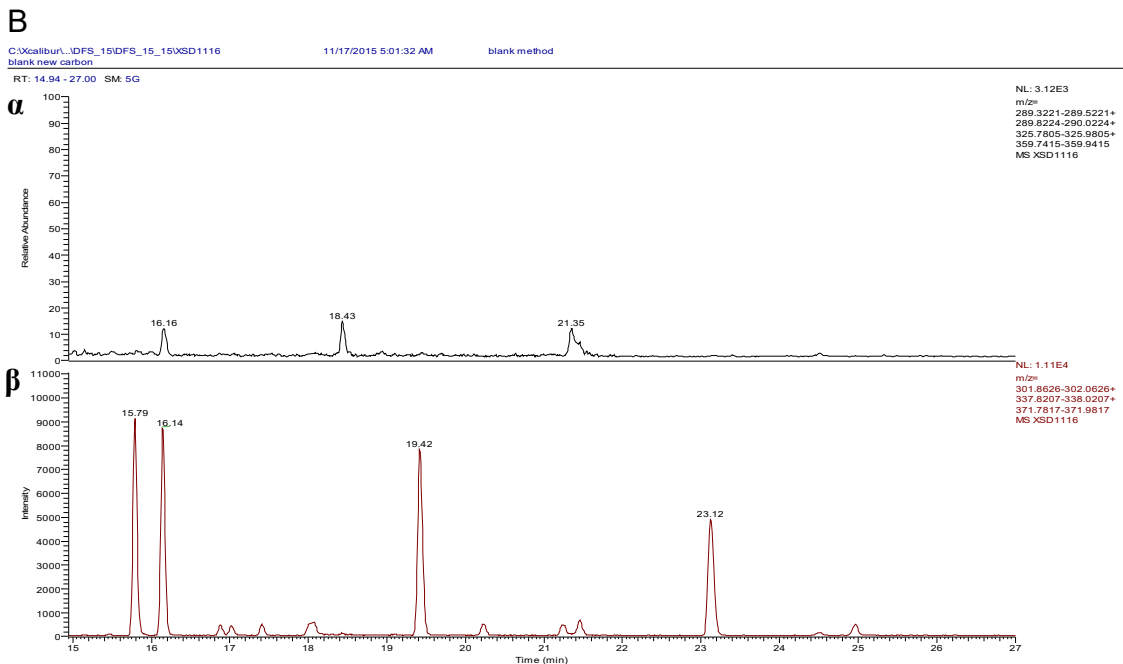
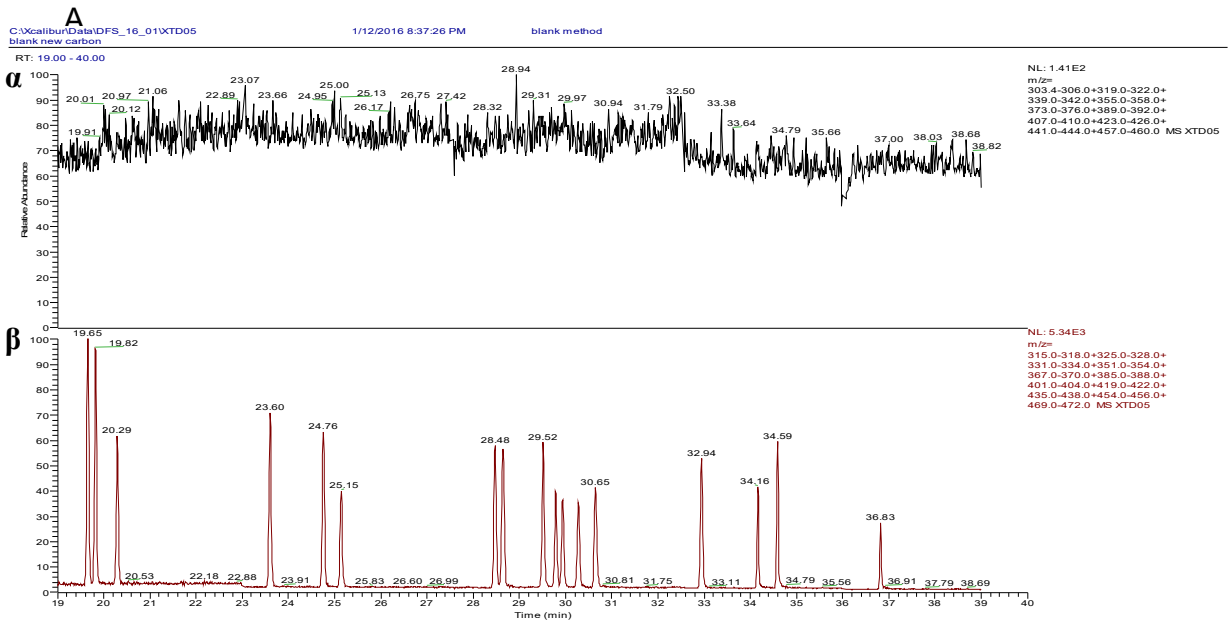
8.1 Επικύρωση μεθόδου

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε για τον ενεργό άνθρακα FU 4652 επικυρώθηκε ως προς τα παρακάτω κριτήρια σύμφωνα με τις απαιτήσεις των Ευρωπαϊκών κανονισμών και τον οδηγό της Eurachem: “The Fitness for Purpose of Analytical Methods “

8.1.1 Ειδικότητα μεθόδου

Προκειμένου να διαπιστώσουμε ότι η μέθοδος που αναπτύχθηκε ικανοποιεί τα αναλυτικά κριτήρια που ορίζονται από τους ευρωπαϊκούς κανονισμούς EU 589/2014 και 644/2017 για την ανάλυση των διοξινών, εξετάστηκε η ειδικότητα της μεθόδου. Εξετάστηκαν οι σχετικοί χρόνοι κατακράτησης και η αναλογία σε m/z της αφθονίας των ιόντων για όλες τις υπό μελέτη- ομοειδείς ενώσεις για να διαπιστωθεί ότι βρίσκονται σε συμφωνία με όσα περιγράφονται στις μεθόδους^{137,138} U.S. EPA 1613 του 1994 και U.S. EPA 1668 του 2010. Πραγματοποιήθηκε επίσης ανάλυση τυφλού δείγματος (Blank sample), δηλαδή εκτελέστηκε η πορεία εργασίας όπως περιγράφεται στο πειραματικό μέρος, παραλείποντας το δείγμα, προκειμένου να προσδιοριστούν τα επίπεδα υποβάθρου των κλασμάτων που συλλέγονται από τον άνθρακα FU 4652. Τα χρωματογραφήματα του τυφλού δείγματος παρουσιάζονται στο σχήμα 6:

Όπως φαίνεται από τα χρωματογραφήματα τα επίπεδα υποβάθρου είναι πολύ χαμηλά.



**Σχήμα 6: Α. Χρωματογράφημα PCDD/Fs (α) δείγμα τυφλού (β) δείγμα τυφλού με
επισημασμένα πρότυπα (0.1 ng mL⁻¹) Β. Χρωματογράφημα non-ortho PCBs (α) δείγμα
τυφλού (β) δείγμα τυφλού με επισημασμένα πρότυπα (0.1 ng mL⁻¹)**

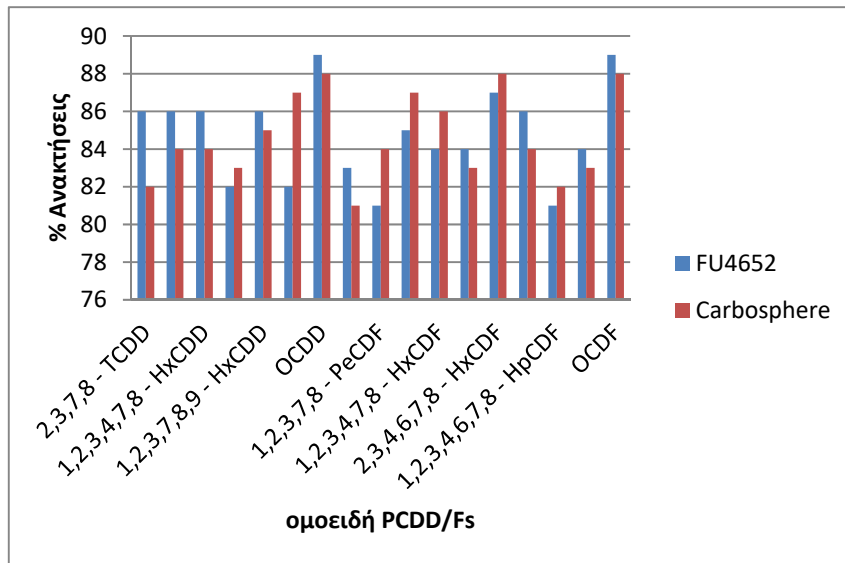
8.1.2 Όριο ποσοτικοποίησης (Limit of quantitation, LOQ)

Στην ανάλυση των διοξινών το LOQ είναι ταυτόσημο με το LOD, λόγω της πολύ υψηλής ευαισθησίας του οργάνου. Για κάθε ομοειδές το LOQ προσδιορίστηκε ως η συγκέντρωση η οποία προκαλεί απόκριση στο όργανο από δύο διαφορετικά ιόντα με αναλογία 3:1 σήματος προς θόρυβο για το λιγότερο ευαίσθητο σήμα (Κανονισμός 644¹⁶²). Το LOQ προσδιορίστηκε στο 0.10 µg g⁻¹ για τις τετρα-, πεντα-, εξα- και επτα-, χλωριωμένες PCDDs, PCDFs και non-ortho PCBs. Το LOQ για τις οκτα- χλωριωμένες PCDDs, PCDFs είναι στο 0.15 µg g⁻¹ και 2.0 µg g⁻¹ για τα mono-ortho και 6 indicator PCBs.

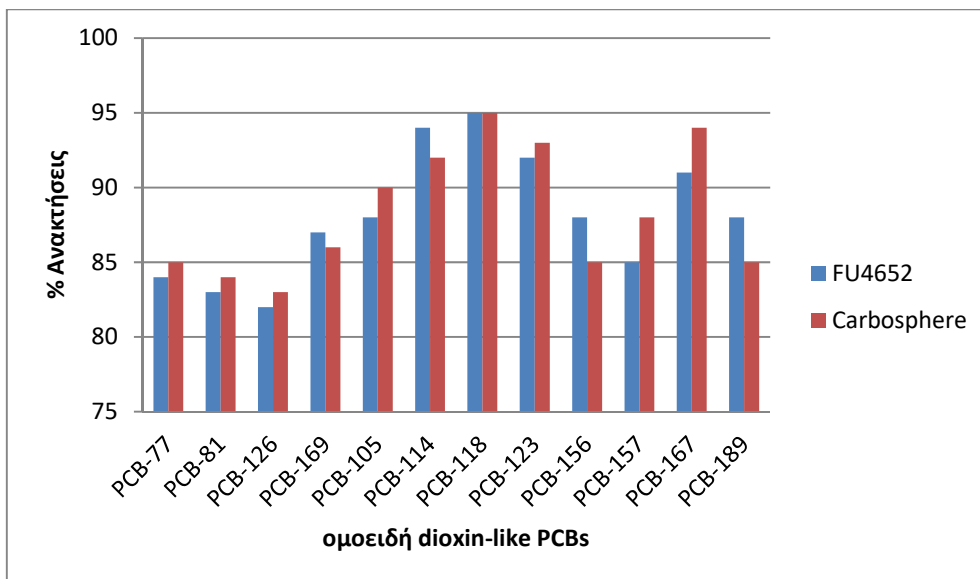
8.1.3 Ανάκτηση των επισημασμένων προτύπων

Η ανάκτηση των επισημασμένων εσωτερικών προτύπων για τις PCDDs, PCDFs και τα dioxin-like PCBs, υπολογίστηκε ως μέση τιμή των ανακτήσεων για κάθε ομοειδές διεξάγοντας τις εξής δοκιμές: Έξι αναλύσεις δείγματος ελαιολάδου εμβολιασμένου με 100 µg για κάθε επισημασμένο ομοειδές από τις PCDDs, PCDFs και τα non-ortho PCBs και 1000 µg για κάθε επισημασμένο mono-ortho PCB. Ιδιαίτερα για τα non-ortho PCBs, προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι ανακτήσεις, δοκιμάστηκαν τρεις χρόνοι κατά την εκχύλιση σε αντιρροή: 1, 1.5 και 2 h. Τα βέλτιστα αποτελέσματα αποκτήθηκαν στις 2 h και ήταν μεταξύ 81 και 98 % για όλα τα ομοειδή. Οι τιμές αυτές ανάκτησης ικανοποιούν πλήρως τα αναλυτικά κριτήρια των Ευρωπαϊκών κανονισμών^{160,162} 589/2014 και 644/2017 που προβλέπουν ανακτήσεις 60-120%. Τα αποτελέσματα των ανακτήσεων παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα 7:

A.



B.



Σχήμα 7 : A. % Ανακτήσεις των PCDD/Fs επισημασμένων εσωτερικών προτύπων

B. % Ανακτήσεις των dioxin-like PCBs επισημασμένων εσωτερικών προτύπων

8.1.4 Ορθότητα και πιστότητα

Η ακρίβεια της μεθόδου για τις PCDDs, PCDFs και τα dioxin-like PCBs αξιολογήθηκε με την ανάλυση δείγματος παρθένου ελαιολάδου εμβολιασμένο σε

δύο συγκεντρώσεις: 0.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ και 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ για τις PCDDs, PCDFs, 12.5 και 25 $\mu\text{g g}^{-1}$ για τα non-ortho PCBs και 500 και 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ για τα mono-ortho PCBs. Οι συγκεντρώσεις αυτές αντιστοιχούν στις WHO-TEQ συγκεντρώσεις των 1.69 και 3.38 για τις PCDDs, PCDFs, 1.38 και 2.75 για τα non-ortho PCBs και 0.955 και 1.91 $\mu\text{g g}^{-1}$ για τα mono-ortho PCBs. Εφαρμόστηκαν οι συντελεστές τοξικότητας¹⁵⁹ WHO-2005 TEFs. Μη εμβολιασμένο ελαιόλαδο αναλύθηκε επίσης και δεν βρέθηκε να περιέχει PCDDs, PCDFs και PCBs.

Η ορθότητα και η πιστότητα (RSD) υπολογίστηκαν για τις PCDDs, PCDFs και τα dioxin-like PCBs και παρουσιάζονται στον πίνακα 9. Η ανάλυση επαναλήφθηκε έξι φορές σε όλες τις συγκεντρώσεις, για να διαπιστωθεί η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα της μεθόδου. Η ορθότητα βρέθηκε να κυμαίνεται από 97% έως 102% όπως υπολογίστηκε από το ποσοστό της διαφοράς μεταξύ των μέσων τιμών WHO-TEQ που προσδιορίστηκαν και αυτών που χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό του ελαιολάδου με PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs στα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων που προαναφέρθηκαν. Ο Ευρωπαϊκός κανονισμός¹⁶⁰ 589/2014 απαιτεί RSD < 15% και οι τιμές της ορθότητας μεταξύ -20% έως +20%. Η πιστότητα (RSD) και η ορθότητα που υπολογίστηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη είναι εντός των απαιτούμενων προδιαγραφών.

Πίνακας 9: Τιμές στόχοι, μέσες τιμές, SD, RSD και ορθότητα της μεθόδου για ανάλυση PCDD/Fs και dioxin-like PCBs πραγματοποιώντας έξι (6) μετρήσεις σε εμβολιασμένα δείγματα σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων

$\mu\text{g WHO-TEQ g}^{-1}$	Τιμές στόχοι	Μέσες συγκεντ.	SD	%RSD	%Ορθότητα
PCDD/Fs	1.69	1.65	0.03	1.56	-2.37
	3.38	3.44	0.12	3.60	1.77
non-ortho PCBs	1.38	1.36	0.09	6.31	-1.45
	2.75	2.67	0.11	4.30	2.91
mono-ortho PCBs	0.95	0.93	0.09	9.47	-2.10
	1.91	1.85	0.11	5.76	-3.14

8.2 Αποτελέσματα ανάλυσης PCDDs, PCDFs και PCBs σε δείγματα διεργαστηριακών δοκιμών

Η αξιοπιστία της μεθόδου που αναπτύχθηκε ελέγχθηκε επίσης μέσω διεργαστηριακών δοκιμών με γνωστές τιμές στόχους (consensus values) από τους διοργανωτές. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 10. Τα κριτήρια για επιτυχή συμμετοχή στις διεργαστηριακές δοκιμές βασίζονται στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων για το σύνολο WHO-TEQ PCDD/Fs, WHO-TEQ PCBs και το σύνολο των 6 indicator PCBs. Τα κριτήρια εφαρμόζονται για το άθροισμα των συγκεντρώσεων, σε εύρος 0.5-4 φορές του επιπέδου ενδιαφέροντος (ανώτατο επίπεδο ή οριακό επίπεδο δράσης). Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, υπολογίζονται τα z-scores σύμφωνα με τα Διεθνώς Εναρμονισμένα Πρωτόκολλα για την επάρκεια στις δοκιμές των εργαστηρίων αναλυτικής χημείας (IUPAC Technical Report, 2006). Πιο συγκεκριμένα ο υπολογισμός του z-score γίνεται ως εξής:

$$z = (x - x_a) / \sigma_p$$

x_a : τιμή στόχος, που δίνεται από τον διοργανωτή

x : συγκέντρωση που υπολογίστηκε από τη μέθοδο που εφαρμόστηκε

σ_p : τυπική απόκλιση

Η τιμή της τυπικής απόκλισης είναι καθορισμένη στο 10% για τα PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs και στο 15% για το άθροισμα των έξι indicator PCBs.

Πίνακας 10: Συγκεντρώσεις PCDD/Fs και PCBs που μετρήθηκαν σε δείγματα διεργαστηριακών δοκιμών, τιμές στόχοι και z-scores

	% λίπος	PCDD/Fs pg WHO-TEQ g ⁻¹			dioxin-like PCBs pg WHO-TEQ g ⁻¹			indicator PCBs ng g ⁻¹		
		Συγκ.	Τιμή στόχος	z-score	Συγκ.	Τιμή στόχος	z-score	Συγκ.	Τιμή στόχος	z-score
Πρόβειο συκώτι ¹	6.34	0.98	0.93	0.54	0.45	0.55	-1.82	3.9	3.0	1.93
Σολωμός ¹	11.99	16.85	18.00	-0.64	27.96	30.5	-0.83	287.1	277.2	0.24
Ιχθυέλαιο ¹	100.00	5.32	5.40	-0.15	4.09	5.07	-1.93	54.2	56.3	-0.25
Φιλέτο γλώσσας ²	18.42	3.84	3.68	0.43	36.76	38.6	-0.48	205	220	-0.45
Ιχθυέλαιο ¹	100.00	1.70	1.65	0.30	8.40	8.60	-0.23	98.6	101.0	-0.16
Ελαιόλαδο ¹	100.00	0.51	0.44	1.59	0.27	0.30	-1.00	16.2	17.4	-0.46
Φοινικέλαιο ¹	100.00	0.76	0.64	1.88	0.61	0.63	-0.32	29.4	29.9	-0.11
Πρόβειο κρέας ¹	23.22	0.14	0.12	1.67	0.20	0.18	1.11	2.69	2.12	1.79
Συκώτι μπακαλιάρου ²	74.65	2.06	2.00	0.30	8.60	10.55	-1.85	75.3	64.1	1.17
Ρέγγα ²	18.07	0.79	0.77	0.26	0.73	0.87	-1.61	8.37	8.7	-0.23
Ζωικό λίπος ¹	100.00	1.21	1.18	0.25	0.95	1.15	-1.74	30.7	34.3	-0.70

¹ αποτελέσματα εκφρασμένα ανά γραμμ. λίπους, ² αποτελέσματα εκφρασμένα ανά γραμμ. νωπού βάρους

8.3 Προσδιορισμός PCDDs, PCDFs και PCBs σε δείγματα τροφίμων από προγράμματα εθνικού ελέγχου

Με την μέθοδο που αναπτύχθηκε αναλύθηκαν δείγματα ψαριών ιχθυοτροφείου συλλεγμένα από τον ΕΦΕΤ στο πλαίσιο των εθνικών προγραμμάτων ελέγχου 2016-2017 ή απεσταλμένα από μεγάλες ελληνικές μονάδες ιχθυοτροφείων. Το είδος αυτό επιλέχθηκε γιατί παρουσιάζει μεγάλο εύρος τιμών στη περιεκτικότητα λίπους. Η πορεία εργασίας ήταν η γνωστή: εκχύλιση του λίπους, προετοιμασία

δείγματος και ανάλυση σε HRGC-HRMS. Τα δείγματα συλλέχθηκαν σύμφωνα με τους Ευρωπαϊκούς κανονισμούς^{160,162} 589/2014 και 644/2017. Οι τιμές ανάκτησης των επισημασμένων προτύπων ήταν ικανοποιητικές, μέσα στα όρια 80-110%. Μέση περιεκτικότητα σε λίπος των δειγμάτων ήταν 13.90% (εύρος: 1.23%-32.68%). Μέσες WHO-TEQ ανώτερες συγκεντρώσεις (για τα ομοειδή που βρέθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης, χρησιμοποιήθηκε στο άθροισμα η τιμή του LOD) που προσδιορίστηκαν σε 30 δείγματα ήταν για τα PCDD/Fs 0.16 $\mu\text{g g}^{-1}$ νωπού βάρους (εύρος: 0.03-0.46 $\mu\text{g g}^{-1}$ νωπού βάρους) και για το άθροισμα PCDDs, PCDFs και PCBs 0.59 $\mu\text{g g}^{-1}$ νωπού βάρους (εύρος: 0.11-1.37 $\mu\text{g g}^{-1}$ νωπού βάρους).

Τα τοξικά ισοδύναμα (TEQ) υπολογίστηκαν με τους ισχύοντες συντελεστές τοξικής ισοδυναμίας TEF 2005 που έχουν καθοριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Όλες οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν στα 30 δείγματα ήταν χαμηλότερες από τα ανώτατα όρια που έχει θεσπίσει η Ευρωπαϊκή Ένωση με τον κανονισμό¹⁶³ 1259/2011 (EU maximum levels 3.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ νωπού βάρους για τις PCDD/Fs και 6.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ νωπού βάρους για PCDD/Fs και PCBs) και παρουσιάζονται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11: Μέσες συγκεντρώσεις $\mu\text{g WHO-TEQ 2005 g}^{-1}$ νωπού βάρους

Αριθμός δειγμάτων	% λίπος	PCDD/Fs	PCBs	PCDD/F,PCB
30	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)
	13.90 (1.23-32.68)	0.16 (0.03-0.46)	0.43(0.08-0.91)	0.59 (0.11-1.37)

Όπως εύκολα διακρίνεται στον πίνακα, στο συνολικό TEQ είναι φανερό ότι η μέγιστη συνεισφορά προέρχεται από τα ομοειδή των PCBs. Το εύρημα αυτό αναφέρεται και στη μελέτη της ομάδας Fernandes et al. 2009. Το γεγονός αυτό ίσως οφείλεται στο ότι τα ομοειδή των dioxin-like PCBs παρουσιάζουν μεγαλύτερη βιοσυσσώρευση στους ιστούς των ψαριών^{164,165} σε σχέση με τις ενώσεις PCDDs, PCDFs.

Στην παρούσα μελέτη, παρουσιάστηκε και αξιολογήθηκε ένας νέος τύπος ενεργού άνθρακα (FU 4652) ως προς την καταλληλότητά του για την

προετοιμασία δείγματος για χαμηλού κόστους ανάλυση διοξινών σε υποστρώματα με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος, όπως είναι τα τρόφιμα, οι ζωοτροφές ή κάποια βιολογικά δείγματα.

Στη μέθοδο που ανέπτυξε αρχικά η ομάδα Liem et al. το 1990¹⁴⁰, άνθρακας τύπου Carbosphere υιοθετήθηκε στην ανάλυση διοξινών λόγω της ικανότητάς του να διαχωρίζει επιτυχώς τις επίπεδες ενώσεις από τις μη επίπεδες και παράλληλα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αναλύσεις τροφίμων με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος¹⁶⁶, εφόσον μπορεί να διαχωρίσει τις ενώσεις που μελετάμε από ποσότητα λίπους 10 g ή και περισσότερο.

Ο ενεργός άνθρακας τύπου Carbosphere είχε πολύ υψηλό κόστος αγοράς που καθιστούσε απαραίτητη την αναγέννησή του μετά από κάθε ανάλυση. Η διαδικασία αυτή απαιτούσε σημαντική ποσότητα διαλυτών (μεθανόλης και τολουολίου) και χρονικό διάστημα έξι εβδομάδων. Επιπλέον, η Carbosphere έπαψε να είναι εμπορικά διαθέσιμη.

Άλλοι τύποι ενεργού άνθρακα που έχουν χρησιμοποιηθεί, όπως Amoco PX-21¹³⁹, Carborack C¹⁴¹ και πορώδης γραφίτικός άνθρακας (porous graphitic carbon, PGC), 2-(1-pyrenyl) ethyldimethylsilylated (PYE)¹⁴³, διαχωρίζουν τις PCDDs και PCDFs από τα PCBs ικανοποιητικά, ωστόσο σε μερικές περιπτώσεις παρουσιάζουν δυσκολίες στο να διαχωρίσουν κάποια ομοειδή PCBs ή έχουν χαμηλές ανακτήσεις στα πολύ-υποκατεστημένα χλωροφαινύλια¹⁴⁴.

Ο άνθρακας FU 4652 που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη της μεθόδου στην παρούσα εργασία διαχωρίζει τα ομοειδή που μελετώνται με ικανοποιητικές τιμές ανάκτησης. Επιπλέον, έχει πολύ χαμηλότερο κόστος και δεν απαιτεί αναγέννηση. Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται η δημιουργία σήματος υποβάθρου μετά από παρατεταμένη επαναλαμβανόμενη χρήση.

Αυτοματοποιημένες μέθοδοι προκατεργασίας δείγματος που έχουν αναπτυχθεί έχουν υψηλό κόστος αγοράς τόσο για τη συσκευή όσο και για τις αναλώσιμες κολώνες και απαιτούν μεγαλύτερες ποσότητες διαλυτών σε σχέση με τις μη αυτοματοποιημένες. Για τον λόγο αυτό, ακόμα και σήμερα οι μη

αυτοματοποιημένες μέθοδοι προετοιμασίας δείγματος εξακολουθούν να εφαρμόζονται και υπάρχει ενδιαφέρον για τη συνεχή βελτίωσή τους.

Εφόσον ο ενεργός άνθρακας FU 4652 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση δειγμάτων με περιεκτικότητα σε λίπος μεγαλύτερη των 10 g, η μέθοδος αυτή μπορεί να συνδυαστεί και με οργανολογία GC-MS/MS που είναι λιγότερο ευαίσθητη από το HRGC-HRMS. Οι φασματογράφοι με τριπλό τετράπολο αφενός είναι πιο οικονομικοί αφετέρου είναι πιο εύκολοι στη χρήση. Η χρήση τους όμως πρέπει να συνδυάζεται με μέθοδο προετοιμασίας δείγματος που περιλαμβάνει την επεξεργασία αρκετής ποσότητας λίπους όπως είναι η παρούσα μέθοδος, έτσι ώστε να αντισταθμιστεί η μειωμένη ευαισθησία της μεθόδου GC-MS/MS σε σχέση με την μέθοδο HRGC-HRMS.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε και περιγράφηκε παραπάνω εφαρμόζεται πλέον σε όλα τα δείγματα τροφίμων που αναλύει το ΕΦΑΜΑΔ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Επίπεδα πολυχλωριωμένων διφαινυλίων στο αίμα

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής μελετήθηκαν τα επίπεδα non-ortho, mono-ortho PCBs και indicator PCBs σε 16 εθελοντές που διαμένουν σε διάφορες περιοχές της Αττικής, από τους οποίους συλλέχθηκαν πληροφορίες και για τη διατροφή τους προκειμένου οι διατροφικές συνήθειες να συσχετιστούν με τα επίπεδα στον ορό. Τα επίπεδα που προσδιορίστηκαν στα δείγματα αυτά συσχετίστηκαν και με τα αποτελέσματα μεταβολομικής ανάλυσης.

Αναλύθηκαν επίσης δείγματα 54 εθελοντών που διαμένουν στην περιοχή του Ασπρόπυργου. Η περιοχή αυτή παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς βρίσκεται κοντά στον κύριο ΧΥΤΑ της Αττικής και θεωρείται περιβαλλοντικά επιβαρυνόμενη.

9.1 Μεθοδολογία προσδιορισμού non-ortho, mono-ortho PCBs και indicator PCBs στον ορό αίματος

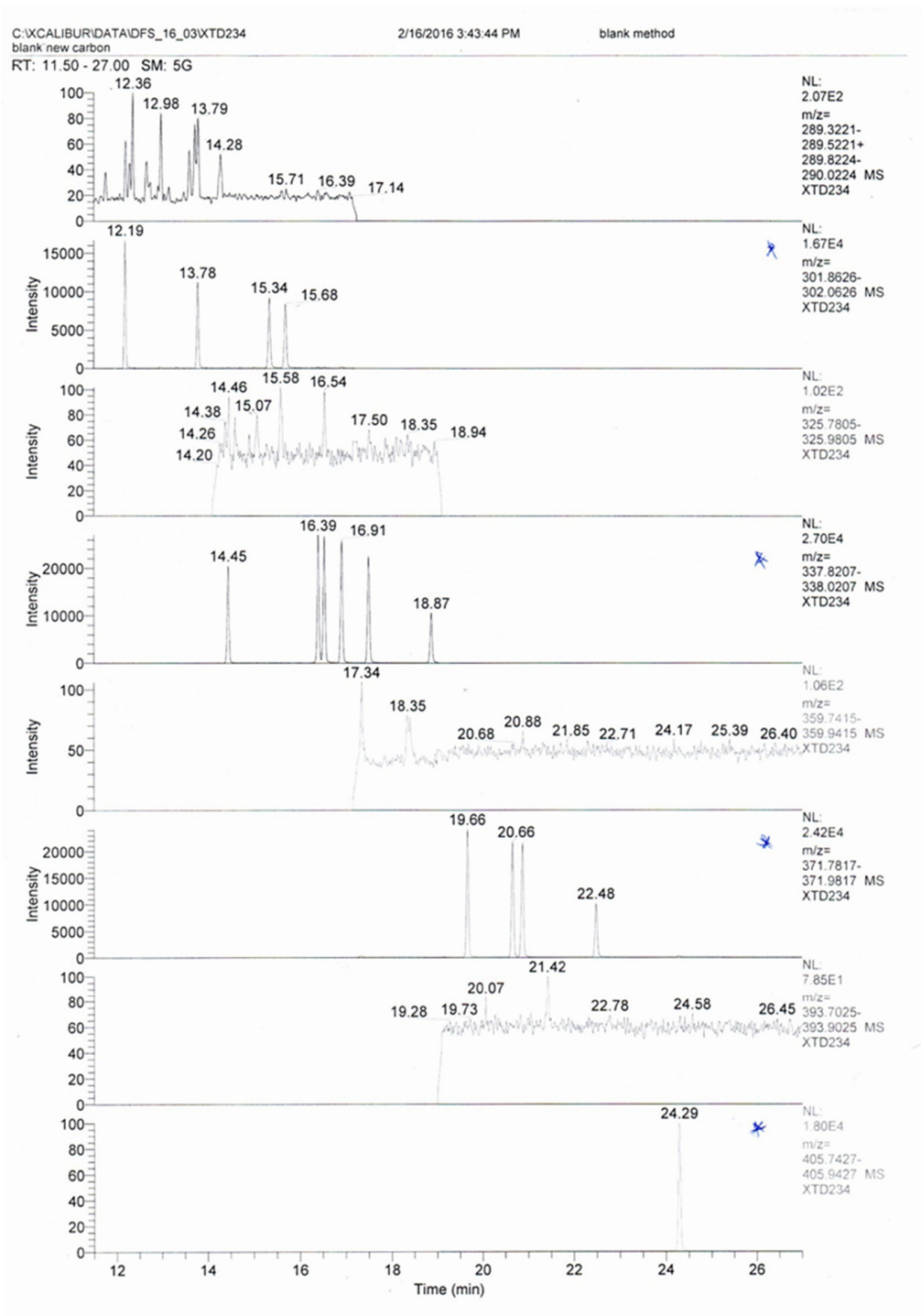
Για την ανάλυση των δειγμάτων ορού, η μέθοδος ανάλυσης PCBs που εφαρμόζεται στα τρόφιμα προσαρμόστηκε σε μικρότερη κλίμακα έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι απώλειες κατά τη διαδικασία της ανάλυσης και να επιτύχουμε την ευαισθησία που είναι απαραίτητη για τον πολύ περιορισμένο όγκο των δειγμάτων ορού. Για να διερευνηθεί η αξιοπιστία της μεθόδου σε μικρή κλίμακα αναλύθηκαν δείγματα ορού διεργαστηριακής δοκιμής με γνωστή τιμή στόχο, ενώ έγιναν δοκιμές ανάκτησης σε δείγμα ορού εμβολιασμένο με γνωστές ποσότητες των υπό μελέτη ενώσεων και σε μη εμβολιασμένο δείγμα.

Αναλυτικά τα στάδια της μεθόδου περιγράφονται στο πειραματικό μέρος. Αρχικά έγινε εκχύλιση υγρού-υγρού¹⁶⁷ με οργανικούς διαλύτες, μεθανόλη για τη μετουσίωση (καταβύθιση) των πρωτεϊνών¹⁵⁶ και συνδυασμό διαιθυλ-αιθέρα και πετρελαϊκού αιθέρα για το διαχωρισμό του λίπους που περιέχει τις υπό μελέτη ενώσεις, ενώ στη συνέχεια για την απομόνωση των PCBs από το λίπος χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφική στήλη με συνδυασμό όξινης silica και alumina^{168,169}. Ο μικρός όγκος δείγματος απαιτεί μικρή ποσότητα χρωματογραφικών υλικών, οπότε χρησιμοποιήθηκε μία στήλη με συνδυασμό των

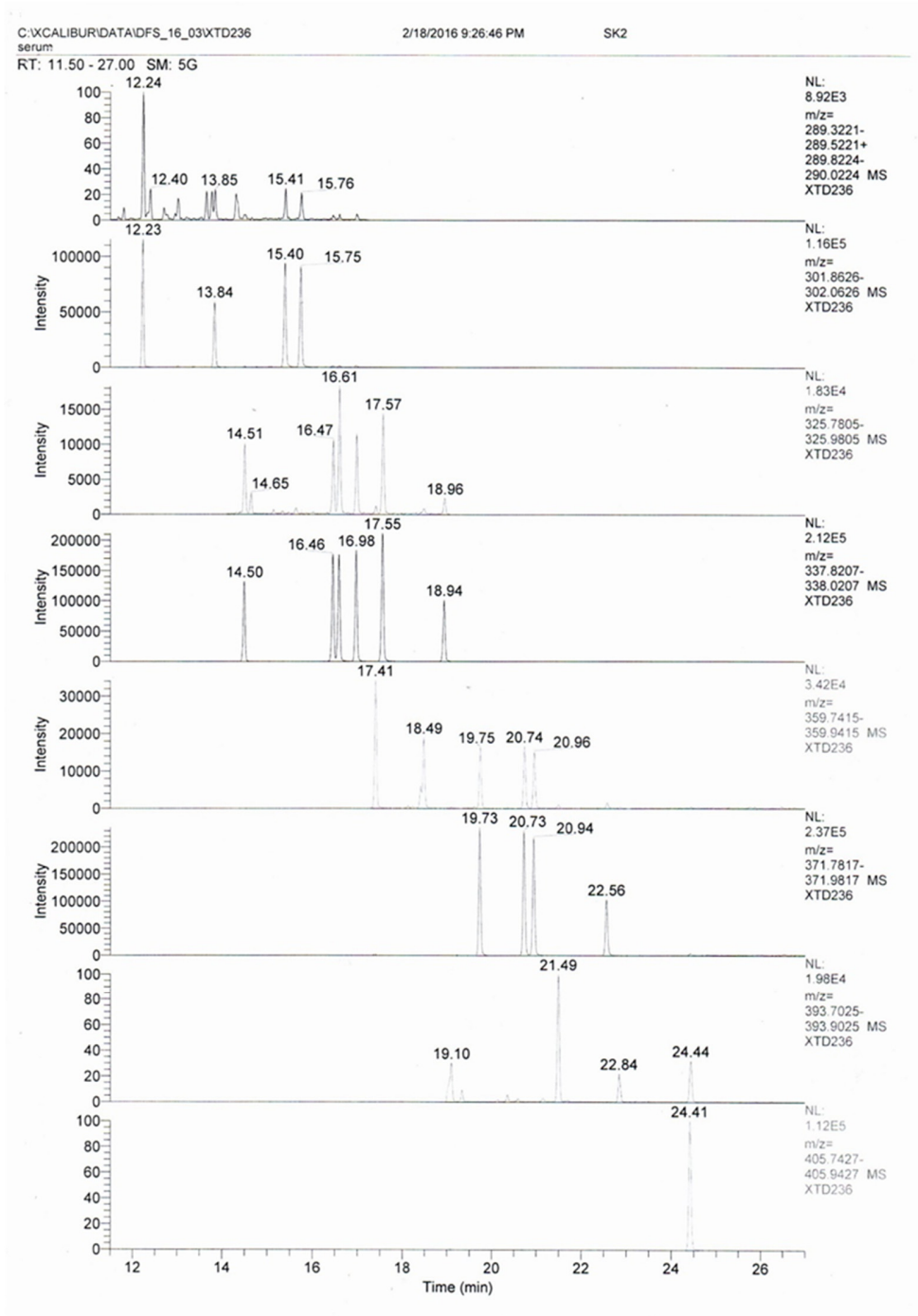
δύο υλικών ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι απώλειες που οφείλονται σε διαδοχικά στάδια κατά την προκατεργασία δείγματος. Επιπλέον, η μικρή ποσότητα λίπους που περιέχεται σε 1 mL ορού καθιστά μη αναγκαία τη χρήση ενεργού άνθρακα για το διαχωρισμό του λίπους, περιορίζοντας τα στάδια και το χρόνο που απαιτείται για την εκτέλεση της ανάλυσης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ομοειδών ενώσεων των PCBs πραγματοποιείται με HRGC-HRMS όπως και στα τρόφιμα.

Προκειμένου να πιστοποιήσουμε ότι η μέθοδος σε μικρή κλίμακα που αναπτύχθηκε πληρεί τα αναλυτικά κριτήρια που απαιτούνται για να θεωρηθεί αξιόπιστη, ελέγχθηκε αρχικά η ειδικότητα της μεθόδου. Οι σχετικοί χρόνοι κατακράτησης και ο λόγος του εμβαδού m/z για κάθε ομοειδές PCB προσδιορίστηκαν και βρέθηκε σε συμφωνία με τις μεθόδους^{137,138} EPA 1613 του 1994 και 1668 του 2010. Πραγματοποιήθηκε επίσης ανάλυση τυφλού δείγματος προκειμένου να προσδιοριστεί το επίπεδο «θορύβου».

Στα σχήματα 8 και 9 παρουσιάζονται χρωματογραφήματα τυφλού δείγματος και δείγματος ορού εμβολιασμένου με γνωστές ποσότητες PCBs.



Σχήμα 8: Χρωματογράφημα τυφλού δείγματος (η συγκέντρωση του επισημασμένου προτύπου διαλύματος n.o., m.o. και indicator PCBs είναι 1 ng mL⁻¹)



Σχήμα 9: Χρωματογράφημα δείγματος ορού, εμβολιασμένου με γνωστές συγκεντρώσεις non-ortho PCBs ($5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), mono-ortho PCBs ($50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), και indicator PCBs ($50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$)

Προκειμένου να ελεγχθεί η ορθότητα της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε ανάλυση δειγμάτων διεργαστηριακής δοκιμής καθώς και δοκιμές ανάκτησης.

9.1.1 Ανάλυση δειγμάτων διεργαστηριακής δοκιμής

Για την περαιτέρω αξιολόγηση της μεθόδου, αυτή εφαρμόστηκε σε δείγματα ορού διεργαστηριακών δοκιμών στις οποίες συμμετέχει το ΕΦΑΜΑΔ. Στις δοκιμές αυτές η απόκλιση της τιμής που προσδιορίζεται από την τιμή στόχο (consensus values) υπολογίζεται ως z- score όπως περιγράφηκε παραπάνω στη μέθοδο για τα τρόφιμα. Ο προσδιορισμός θεωρείται επιτυχής όταν το z- score κυμαίνεται μεταξύ -2 και +2. Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν και οι αντίστοιχες τιμές στόχοι, το αποδεκτό εύρος τιμών και τα z- scores που υπολογίστηκαν για δύο δείγματα διεργαστηριακής δοκιμής. Στον πίνακα 12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τα ομοειδή για τα οποία ο διοργανωτής έχει ορίσει τιμή-στόχο. Τα αποτελέσματα του υπολογισμού του z- score δείχνουν ότι σε όλες τις περιπτώσεις τα αποτελέσματα που λάβαμε βρίσκονται εντός των αποδεκτών ορίων που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Πίνακας 12: Συγκεντρώσεις των PCBs διεργαστηριακών δειγμάτων, τιμές-στόχοι, αποδεκτό εύρος συγκεντρώσεων και αποκλίσεις (z-scores) των συγκεντρώσεων που μετρήθηκαν από τις τιμές στόχους

Δείγμα 1 Ομοειδή	Συγκέντρωση ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Τιμή στόχος ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Αποδεκτό εύρος ($\mu\text{g L}^{-1}$)	z-score
PCB105	0.205	0.218	0.165-0.271	-0.49
PCB118	0.585	0.634	0.458-0.810	-0.56
PCB138	1.76	1.55	1.04-2.06	0.81
PCB153	1.40	1.35	0.961-1.74	0.24
PCB180	0.847	0.867	0.612-1.12	-0.16

Δείγμα 2 Ομοειδή	Συγκέντρωση (μg L ⁻¹)	Τιμή στόχος (μg L ⁻¹)	Αποδεκτό εύρος (μg L ⁻¹)	z-score
PCB105	0.115	0.140	0.102-0.178	-1.32
PCB118	0.340	0.322	0.231-0.413	0.40
PCB138	0.867	0.910	0.609-1.21	-0.29
PCB153	0.966	0.924	0.655-1.19	0.31
PCB180	0.574	0.603	0.426-0.780	-0.33

9.1.2 Δοκιμή ανάκτησης επισημασμένων προτύπων και εμβολιασμένων ποσοτήτων σε δείγμα ορού αίματος

Αναλύθηκε έξι φορές πραγματικό δείγμα ορού εμβολιασμένο με γνωστές ποσότητες των υπό μελέτη ενώσεων καθώς και μη εμβολιασμένο και υπολογίστηκαν οι τιμές ανάκτησης τόσο των επισημασμένων προτύπων όσο και των ποσοτήτων εμβολιασμού στο δείγμα. Η συγκέντρωση εμβολιασμού ήταν για τα non-ortho PCBs 5 μg mL⁻¹ και για τα mono-ortho και indicator PCBs 50 μg mL⁻¹. Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα, οι τιμές ανάκτησης του επισημασμένου προτύπου κυμαίνονται μεταξύ 82-118 % και εκείνες των ποσοτήτων εμβολιασμού μεταξύ 83-110% για κάθε ομοειδές PCB, οι οποίες θεωρούνται ικανοποιητικές. Για την ορθότητα που προσδιορίζεται από τις τιμές ανάκτησης των εμβολιασμένων δειγμάτων υπολογίστηκε αβεβαιότητα 3%.

Σε προηγούμενη μελέτη του ΕΦΑΜΑΔ, η μέθοδος ανάλυσης δειγμάτων ορού¹⁵¹ απαιτούσε 10 mL δείγματος. Στην παρούσα μελέτη, στόχος ήταν η μέθοδος να μπορεί να εφαρμοστεί με ικανοποιητικά αποτελέσματα σε μικρό όγκο δείγματος ορού (1 mL) και να περιοριστεί ο χρόνος που απαιτείται για τη διεξαγωγή της ώστε να είναι κατάλληλη για μελέτη μεγάλου αριθμού δειγμάτων, κάτι που είναι απαραίτητο στη μελέτη του “exposome”, δεδομένου ότι τα επίπεδα στον ορό αντιπροσωπεύουν την «εσωτερική» έκθεση. Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω από την αξιολόγηση της μεθόδου, δείχνουν ότι η μέθοδος είναι κατάλληλη για αυτό το σκοπό.

Πίνακας 13: Μέσες συγκεντρώσεις PCBs εμβολιασμένου και μη εμβολιασμένου ορού που προσδιορίστηκαν και τιμές ανάκτησης που υπολογίστηκαν

Ομοειδή PCBs	Μέση συγκ. μη εμβολιασμένου δείγματος* (pg mL ⁻¹)	Μέση συγκ. εμβολιασμένου δείγματος* (pg mL ⁻¹)	Διαφορά μέσω των συγκεντρώσεων (pg mL ⁻¹)	% ανάκτηση ** επισημασμένων προτύπων	% ανάκτηση ** εμβολισθείσας ποσότητας
non-ortho					
PCB 77	0.16	5.41	5.25	114 ± 11.4	105 ± 6.3
PCB 81	0.14	5.55	5.41	118 ± 11.6	108 ± 6.48
PCB 126	1.54	6.06	4.52	107 ± 11.8	90 ± 5.40
PCB 169	0.10	4.61	4.51	102 ± 14.6	90 ± 5.40
mono-ortho					
PCB 105	5.05	58.6	53.5	111 ± 9.88	107 ± 6.42
PCB 114	0.70	53.3	54.0	98 ± 8.87	108 ± 6.48
PCB 118	22.1	77.1	55.0	98 ± 9.20	110 ± 6.60
PCB 123	1.67	54.7	53.0	97 ± 8.75	106 ± 6.36
PCB 156	11.7	65.2	53.5	110 ± 11.9	107 ± 6.42
PCB 157	1.60	55.7	54.1	108 ± 11.4	108 ± 6.48

PCB 167	4.74	59.2	54.5	110 ± 11.9	109 ± 6.54
PCB 189	3.44	56.4	53.0	82 ± 11.0	106 ± 6.36
Indicator					
PCB 28	77.9	132	54.0	112 ± 12.3	108 ± 6.48
PCB 52	5.04	60.0	55.0	112 ± 12.3	110 ± 6.60
PCB 101	4.71	56.2	51.5	99 ± 8.66	103 ± 6.18
PCB 138	65.9	119	53.5	110 ± 11.9	107 ± 6.42
PCB 153	126	170	41.5	110 ± 11.9	83 ± 4.98
PCB 180	81.0	135	54.5	82 ± 11.0	109 ± 6.54

*Η αβεβαιότητα της μεθόδου είναι 5%

**Η διακύμανση έχει υπολογιστεί με βάση τη διευρυμένη αβεβαιότητα της ανάκτησης (επίπεδα εμπιστοσύνης 95%)

9.2 Συγκεντρώσεις PCBs στα δείγματα ορού αίματος των 16 εθελοντών του προγράμματος HEALS

Στον πίνακα 14 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις WHO-TEQ των non-ortho PCBs και mono-ortho PCBs, οι συνολικές συγκεντρώσεις WHO-TEQ των dioxin-like PCBs και οι συγκεντρώσεις των indicator PCBs για κάθε συμμετέχοντα. Στον κωδικό δείγματος ο αριθμός αντιστοιχεί στον αριθμό οικίας των εθελοντών ενώ το αρχικό M ή F δηλώνει αν το δείγμα ανήκει σε άνδρα ή γυναίκα αντίστοιχα.

Όπως φαίνεται στον πίνακα, για τα dioxin-like PCBs το δείγμα με την υψηλότερη συνολική συγκέντρωση είναι το HP6M ($0.031 \text{ pg WHO-TEQ mL}^{-1}$), ενώ το δείγμα με τη χαμηλότερη συγκέντρωση είναι το HP3F με $0.014 \text{ pg WHO-TEQ mL}^{-1}$. Όσον αφορά στα indicator PCBs, τη μεγαλύτερη συγκέντρωση παρουσιάζει το HP1F (0.62 ng mL^{-1}), τη χαμηλότερη συγκέντρωση έχει το HP5F με 0.09 ng mL^{-1} . Το δείγμα HP1F εμφανίζει την υψηλότερη συγκέντρωση WHO-TEQ mono-ortho PCBs ενώ το HP2F έχει τη χαμηλότερη, $0.0004 \text{ pg mL}^{-1}$.

Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι υπάρχει συνέπεια μεταξύ των τιμών των συγκεντρώσεων των dioxin-like PCBs και των indicator PCBs. Στα δείγματα που οι τιμές ήταν σχετικά υψηλές ή πιο χαμηλές στη μία κατηγορία PCBs ήταν αντίστοιχα υψηλές ή χαμηλές και στην άλλη κατηγορία.

Πίνακας 14: Συγκεντρώσεις WHO-TEQ PCBs στον ορό αίματος των 16 εθελοντών

Δείγματα	Συγκέντρωση WHO-TEQ n.o PCBs pg/mL	Συγκέντρωση WHO-TEQ m.o PCBs pg/mL	Συνολική συγκέντρωση WHO- TEQ Dioxin-like PCBs pg/mL	Συγκέντρωση indicator PCBs ng/mL
HP1M	0.014	0.0006	0.015	0.21
HP1F	0.020	0.0050	0.025	0.62
HP2M	0.014	0.0012	0.015	0.41
HP2F	0.014	0.0004	0.015	0.13
HP3M	0.015	0.0011	0.016	0.29
HP3F	0.013	0.0007	0.014	0.20
HP4M	0.014	0.0011	0.015	0.37
HP4F	0.020	0.0017	0.021	0.44
HP5F	0.014	0.0004	0.014	0.09
HP6M	0.029	0.0019	0.031	0.37
HP6F	0.028	0.0018	0.030	0.45
HP7M	0.019	0.0017	0.020	0.44
HP7F	0.013	0.0007	0.014	0.18
HP8F	0.018	0.0007	0.019	0.15
HP9M	0.013	0.0011	0.014	0.22
HP9F	0.013	0.0009	0.014	0.21

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικά για κάθε ένα ομοειδές dioxin-like PCB και indicator PCB οι μέσες συγκεντρώσεις (upperbound), το εύρος των συγκεντρώσεων, η διάμεσος τιμή και η τυπική απόκλιση καθώς και η συνολική WHO-TEQ συγκέντρωση για κάθε κατηγορία.

Πίνακας 15: Μέσες συγκεντρώσεις ομοειδών PCBs, εύρος συγκεντρώσεων, διάμεσος και τυπική απόκλιση τιμών στα δείγματα ορού που συλλέχθηκαν στο πλαίσιο του προγράμματος HEALS

	Average	Min	Max	Median	SD
non-ortho PCBs					
PCB 77	0.18	<LOQ*	0.39	0.16	0.077
PCB 81	0.11	<LOQ	0.15	0.10	0.014
PCB 126	0.13	<LOQ	0.25	0.10	0.043
PCB 169	0.14	<LOQ	0.26	0.12	0.043
Συγκέντρωση n.o. PCBs (pg mL ⁻¹)	0.55	0.40	0.78	0.56	0.099
Συγκέντρωση n.o. PCBs (pg WHO-TEQ mL ⁻¹)	0.017	0.013	0.029	0.014	0.0049
Συγκέντρωση n.o. PCBs (pg WHO-TEQ g ⁻¹ λίπους)	3.02	1.02	6.68	2.78	1.82
mono-ortho PCBs					
PCB 105	3.90	1.05	16.1	2.76	3.43
PCB 114	0.91	0.13	6.66	0.50	1.51
PCB 118	18.7	5.35	56.9	15.3	12.5
PCB 123	0.89	0.23	2.47	0.79	0.58
PCB 156	11.7	2.79	56.4	7.07	12.3
PCB 157	2.27	0.46	12.9	1.42	2.85
PCB 167	4.08	1.55	11.8	3.36	2.60
PCB 189	1.23	0.31	2.34	0.97	0.63
Συγκέντρωση m.o. PCBs (pg mL ⁻¹)	43.7	13.1	165	36.5	35.2
Συγκέντρωση m.o. PCBs (pg WHO-TEQ mL ⁻¹)	0.0013	0.0004	0.0050	0.0011	0.0011
Συγκέντρωση m.o. PCBs (pg WHO-TEQ g ⁻¹ λίπους)	0.26	0.038	1.65	0.16	0.37
Dioxin-like PCBs (pg WHO-TEQ mL⁻¹)	0.018				
Dioxin-like PCBs (pg WHO-TEQ g⁻¹ λίπους)	3.28				
indicator PCBs					
PCB 28	28.4	15.6	80.0	23.9	15.0
PCB 52	2.69	1.60	4.21	2.54	0.83
PCB 101	2.43	1.33	6.05	2.18	1.06
PCB 138	75.6	16.6	162	59.8	39.1

PCB 153	112	37.5	242	91.3	57.1
PCB 180	82.7	28.0	140	72.8	39.6
Indicator PCBs (ng mL⁻¹)	0.30				
Indicator PCBs (ng g⁻¹ λίπους)	54.2				
% περιεκτικότητα σε λίπος	0.80	0.29	1.64	0.72	0.48

*LOQ= 0.1 pg mL⁻¹ ορού

Η μέση συγκέντρωση των dioxin-like PCBs είναι 0.018 pg WHO-TEQ mL⁻¹ (ή 3.28 pg WHO-TEQ g⁻¹ λίπους) με εύρος συγκεντρώσεων από 0.01 pg WHO-TEQ mL⁻¹ (1.02 pg WHO-TEQ g⁻¹ λίπους) έως 0.03 pg WHO-TEQ mL⁻¹ (6.69 pg WHO-TEQ g⁻¹ λίπους), ενώ η μέση συγκέντρωση των indicator PCBs 0.30 ng mL⁻¹ (ή 54.2 ng g⁻¹ λίπους) με εύρος συγκεντρώσεων από 0.09 ng mL⁻¹ (8.92 ng g⁻¹ λίπους) με 0.62 ng mL⁻¹ (207 ng g⁻¹ λίπους).

Σε προγενέστερη μελέτη¹⁵¹ του ΕΦΑΜΑΔ είχαν προσδιοριστεί τα επίπεδα dioxin-like PCBs στον ορό 127 εθελοντών από την Αθήνα και την Κοζάνη. Η μέθοδος που είχε εφαρμοστεί απαιτούσε 10 mL ορού για τη διεξαγωγή της δοκιμής. Η μέση συγκέντρωση dioxin-like PCBs στα δείγματα ορού που μελετήθηκαν ήταν 2.86 pg WHO-TEQ g⁻¹ λίπους. Είναι φανερό ότι τα επίπεδα dioxin-like PCBs παραμένουν στα ίδια, χαμηλά επίπεδα με τη προηγούμενη μελέτη. Σε σχέση με χώρες όπως η Νέα Ζηλανδία (6.42 pg WHO-TEQ g⁻¹ λίπους) και η Αυστραλία (5.22 pg WHO-TEQ g⁻¹ λίπους) στην Ελλάδα τα επίπεδα κυμαίνονται σε χαμηλότερες τιμές και είναι αντίστοιχα με αυτά στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (3.3 pg WHO-TEQ g λίπους⁻¹), τη Φιλανδία (3.09 pg WHO-TEQ g⁻¹ λίπους) και τη Γερμανία (1.81 pg WHO-TEQ g⁻¹ λίπους)¹⁵¹.

Σε πρόσφατη μελέτη¹⁷⁰ στη Γερμανία, προσδιορίστηκαν επίπεδα συνολικού WHO-TEQ dioxin-like PCBs 4.4 pg g⁻¹ λίπους. Η μέση τιμή συγκέντρωσης για τα non-ortho PCBs ήταν 3.4 pg WHO-TEQ g⁻¹ λίπους ενώ για τα mono-ortho PCBs 0.6 pg WHO-TEQ g⁻¹ λίπους. Τα επίπεδα αυτά είναι παρεμφερή με αυτά που προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη τόσο ως προς τη συνολική συγκέντρωση dioxin-like PCBs (4.4 pg WHO-TEQ g⁻¹ λίπους) όσο και ως προς τις επιμέρους

συγκεντρώσεις των non-ortho (3.4 pg WHO-TEQ g⁻¹ λίπους) και mono-ortho PCBs (0.6 pg WHO-TEQ g⁻¹ λίπους).

Όσον αφορά στα indicator PCBs, τα επίπεδα που προσδιορίστηκαν στη παρούσα μελέτη είναι σε παρεμφερή επίπεδα με αυτά του Καναδά (43.7 ng g⁻¹ λίπους), των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (44.1 ng g⁻¹ λίπους) της Ισπανίας (54.4 ng g⁻¹ λίπους) και της Γερμανίας (0.283 ng mL⁻¹). Τα επίπεδα των indicator PCBs που προσδιορίστηκαν είναι χαμηλότερα από αυτά που έχουν βρεθεί στην Τυνησία (113 ng g⁻¹ λίπους), τη Γαλλία (274 ng g⁻¹ λίπους) την Ιταλία (155 ng g⁻¹ λίπους) και την Ιαπωνία (140 ng g⁻¹ λίπους)¹⁵³.

Δεδομένου ότι η διατροφή¹⁰ θεωρείται η κύρια πηγή πρόσληψης των ενώσεων της ομάδας των διοξινών, ζητήθηκε από τους εθελοντές που συμμετείχαν στη μελέτη να συμπληρώσουν ερωτηματολόγιο πάνω στις διατροφικές τους συνήθειες. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα επίπεδα PCBs που προσδιορίστηκαν στο αίμα κάθε συμμετέχοντα, οι διατροφικές τους συνήθειες, καθώς και ο δείκτης μάζας σώματος κάθε εθελοντή, δεδομένου ότι σε κάποιες μελέτες έχει παρατηρηθεί συσχέτιση του με τα επίπεδα των PCBs¹⁷¹.

Οι κωδικοί των εθελοντών εμφανίζονται κατά αύξουσα σειρά συνολικής συγκέντρωσης WHO-TEQ των dioxin-like PCBs, τα οποία παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον από πλευράς τοξικότητας.

Πίνακας 16: Συνολικές συγκεντρώσεις PCBs για κάθε εθελοντή του προγράμματος HEALS, διατροφικές συνήθειες και δείκτης μάζας σώματος

Κωδικός εθελοντή	Συνολ. Συγκεντρ. WHO-TEQ Dioxin-like PCBs pg mL ⁻¹	Άθροισμα indicator PCBs ng mL ⁻¹	Δηλωθείσα συγκέντρωση (μερίδες/εβδομάδα)					Δείκτης μάζας σώματος
			Κρέας	Γαλακτοκομικά και αυγά	Ψάρια	Φρούτα και λαχανικά	Λίπη έλαια	
HP3F	0.0137	0.20	2	3	-	7	7	21.5
HP7F	0.0138	0.18	2	4	1	7	7	30.4
HP9F	0.0140	0.21	3	4	2	7	7	26.9
HP5F	0.0141	0.09	3	2	1	7	7	24.9
HP9M	0.0142	0.22	4	4	1	7	7	31.2
HP1M	0.0147	0.21	6	-	-	-	-	35
HP2F	0.0147	0.13	3	6	1	7	-	22.5
HP2M	0.0154	0.41	3	5	1	7	5	22.7
HP4M	0.0154	0.37	5	7	1	7	7	28.7
HP3M	0.0159	0.29	4	5	1	3	7	25.5

HP8F	0.0188	0.15	1	7	1	6	7	23.8
HP7M	0.0202	0.44	2	6	1	7	7	29.4
HP4F	0.0214	0.44	5	-	1	3	7	21.3
HP1F	0.0250	0.62	4	6	1	6	7	30.5
HP6F	0.0297	0.45	6	7	1	7	7	19.3
HP6M	0.0308	0.37	7	7	-	7	7	30.2



Υπέρβαροι



Παχύσαρκοι

Παρόλο που ο αριθμός εθελοντών είναι περιορισμένος και τα δεδομένα διατροφής που συλλέχθηκαν αφορούν μερίδες και όχι ποσότητες, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι οι εθελοντές που εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα PCBs στο αίμα τους καταναλώνουν γενικά περισσότερες μερίδες κρέατος και γαλακτοκομικών/αυγών. Υψηλή κατανάλωση σε όλες σχεδόν τις διατροφικές ομάδες παρουσιάζεται για το δείγμα HP6M, στο οποίο προσδιορίστηκε η υψηλότερη συνολική συγκέντρωση dioxin-like PCBs, 0.031 pg WHO-TEQ mL⁻¹. Το δείγμα HP1F έχει την υψηλότερη συγκέντρωση mono-ortho PCBs, 0.050 pg WHO-TEQ mL⁻¹ και συγκέντρωση indicator PCBs, 0.62 ng mL⁻¹. Οι διατροφικές ομάδες των προϊόντων κρέατος, των γαλακτοκομικών, των αυγών, τα ζωικά λίπη και τα ψάρια συνεισφέρουν σε μεγάλο βαθμό στην πρόσληψη σε PCDDs, PCDFs και PCBs λόγω της υψηλής τους περιεκτικότητας σε λίπος όπου έχουν τη τάση να συσσωρεύονται οι ενώσεις αυτές. Όσον αφορά στην κατανάλωση ψαριών, για την οποία οι μελέτες διεθνώς δείχνουν ότι έχει σημαντική συνεισφορά στη συνολική διατροφική πρόσληψη, δεν υπάρχει διαφοροποίηση στην κατανάλωση σε αυτόν τον πληθυσμό καθότι σχεδόν όλοι οι εθελοντές έχουν δηλώσει μία μερίδα ανά εβδομάδα.

Το χαμηλότερο σε συγκέντρωση δείγμα σε dioxin-like PCBs είναι το HP3F και σε indicator PCBs το HP5F. Όπως φαίνεται στον πίνακα οι εθελοντές αυτοί ανέφεραν από μέτρια έως καθόλου κατανάλωση στις ομάδες τροφίμων που συνεισφέρουν στην πρόσληψη των PCBs.

Όσον αφορά στη σχέση των επιπέδων PCBs στον ορό με το δείκτη μάζας σώματος, δεν παρατηρήθηκε θετική ή αρνητική σχέση με συσχέτιση Pearson, όμως το δείγμα εθελοντών είναι περιορισμένο για εξαγωγή συμπερασμάτων.

Τα δεδομένα διατροφής που συλλέχθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη δεν δίνουν πληροφορίες για την ακριβή ποσότητα καθότι η ατομική μερίδα κατανάλωσης μπορεί να διαφέρει από άτομο σε άτομο, αποτελούν όμως μια ένδειξη για τη σχέση διατροφής και επιπέδων στο αίμα. Επίσης δεν παρέχουν πληροφορίες για το αν έχει χρησιμοποιηθεί φυτικό ή ζωικό λίπος στην παρασκευή των γευμάτων.

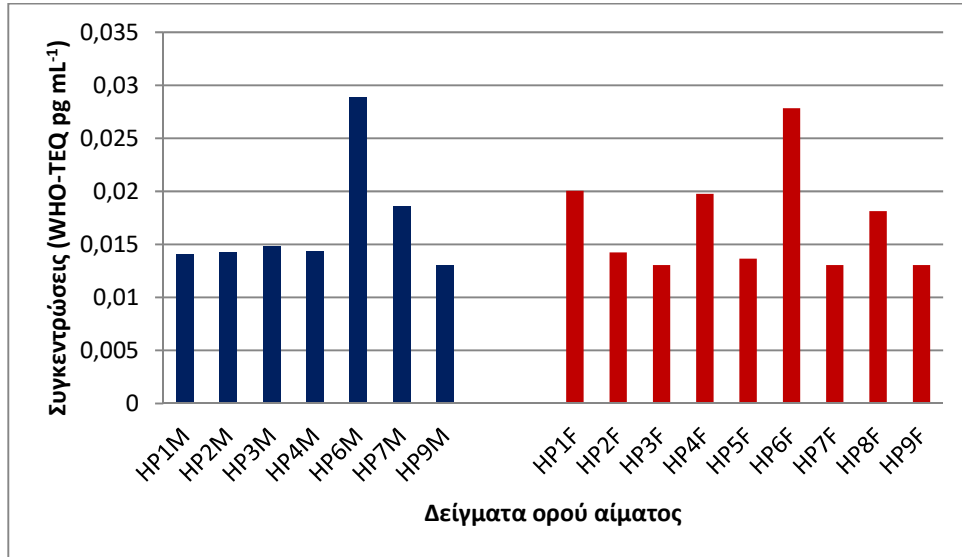
Το ζωϊκό λίπος, λόγω της ιδιότητας των ενώσεων της ομάδας των διοξινών να βιοσυσσωρεύονται στο λιπώδη ιστό των ζώων, είναι πιθανόν έχει αυξημένη συνεισφορά στη συνολική πρόσληψη όταν χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή των γευμάτων. Μία βελτιωμένη προσέγγιση της μελέτης για το προσεχές μέλλον θα περιλάμβανε συλλογή αίματος με παράλληλη συλλογή πραγματικών δειγμάτων ημερήσιας διατροφής έτσι ώστε η μέτρηση των PCBs να γίνεται σε δείγμα πανομοιότυπο με το γέυμα που καταναλώνουν οι εθελοντές στους οποίους θα γίνει και η αιμοληψία. Η μελέτη αυτή θα παρέχει εγκυρότερες πληροφορίες για την πρόσληψη μέσω της διατροφής των ρύπων σε ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

Στο πλαίσιο του προγράμματος HEALS πραγματοποιήθηκε από άλλη ομάδα που συμμετείχε στο πρόγραμμα, μελέτη της ποιότητας του αέρα στις οικίες των 16 εθελοντών του προγράμματος. Η μελέτη αυτή περιελάμβανε τη μέτρηση των εξής ρύπων: PM_{2.5} (αιωρούμενα σωματίδια <2.5 μm), PM₁₀ (αιωρούμενα σωματίδια <10 μm), TVOCs (συνολικές πτητικές οργανικές ενώσεις), CO και ΣΡΑΗs (σύνολο των πολυαρωματικών υδρογονανθράκων). Για να διερευνηθεί αν υπάρχει σχέση μεταξύ της ποιότητας του αέρα και των επιπέδων dioxin-like PCBs και indicator PCBs στον ορό υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης Pearson, από την τιμή του οποίου διαπιστώθηκε όπως ήταν αναμενόμενο, ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των παραπάνω ρύπων στον αέρα με τα επίπεδα των PCBs στο αίμα των εθελοντών. Το εύρημα αυτό ενισχύει το συμπέρασμα ότι κύρια οδός έκθεσης του ανθρώπου στις ενώσεις της ομάδας των διοξινών αποτελεί η διατροφή.

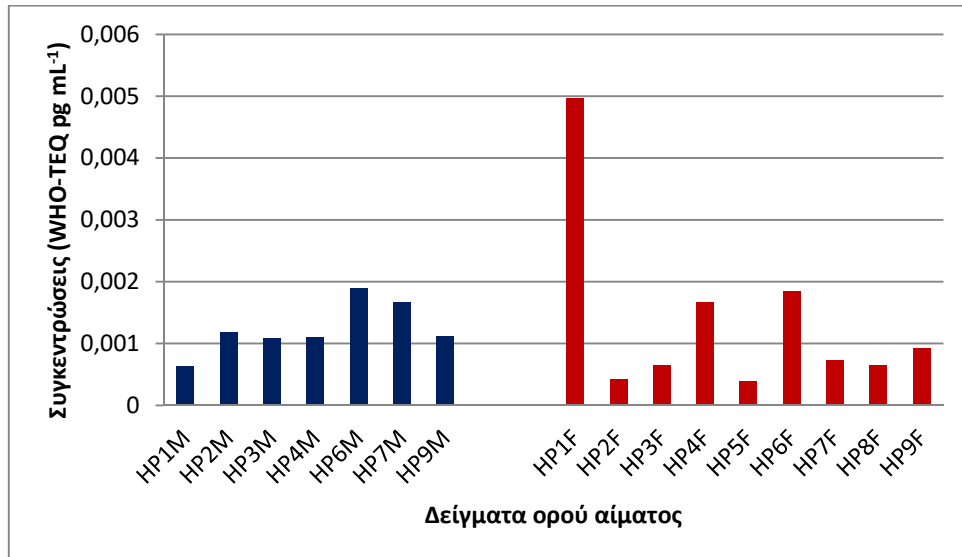
9.2.1 Σύγκριση των συγκεντρώσεων στα PCBs μεταξύ ανδρών και γυναικών

Στα σχήματα 10-13 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των non-ortho PCBs (pg WHO-TEQ mL⁻¹), mono-ortho PCBs (pg WHO-TEQ mL⁻¹), συνολική συγκέντρωση dioxin-like PCBs (pg WHO-TEQ mL⁻¹) και οι συγκεντρώσεις των

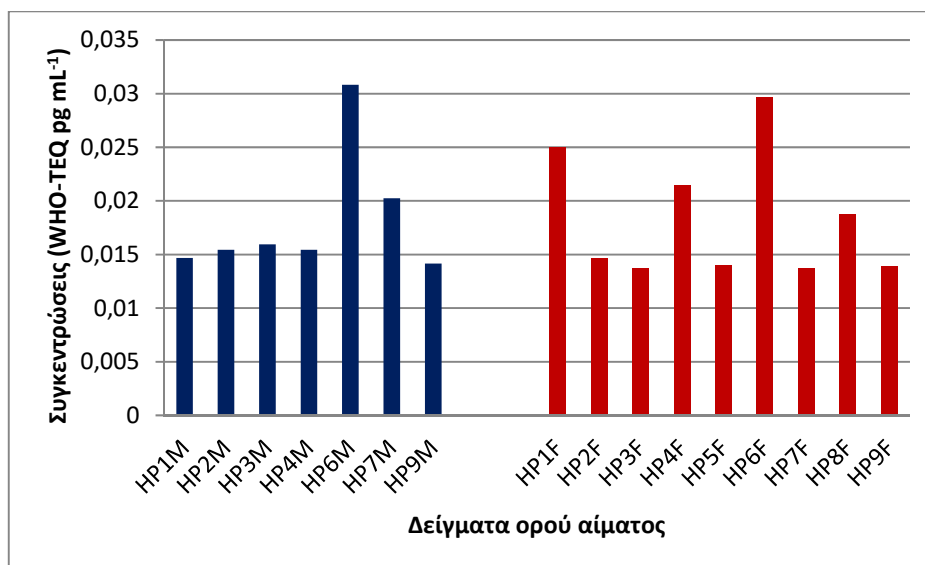
indicator PCBs (ng mL^{-1}) ξεχωριστά για τους άνδρες και τις γυναίκες που συμμετείχαν στη μελέτη.



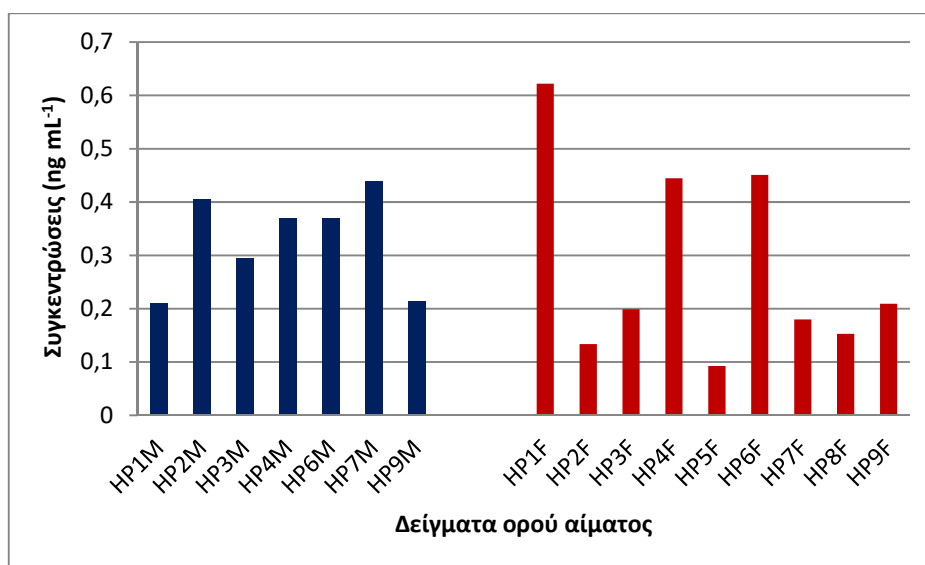
Σχήμα 10: Συγκεντρώσεις WHO-TEQ non-ortho PCBs στα δείγματα ορού αίματος από τους εθελοντές του προγράμματος HEALS



Σχήμα 11: Συγκεντρώσεις WHO-TEQ mono-ortho PCBs στα δείγματα ορού αίματος από τους εθελοντές του προγράμματος HEALS



Σχήμα 12: Συγκεντρώσεις WHO-TEQ dioxin-like PCBs στα δείγματα ορού αίματος από τους εθελοντές του προγράμματος HEALS

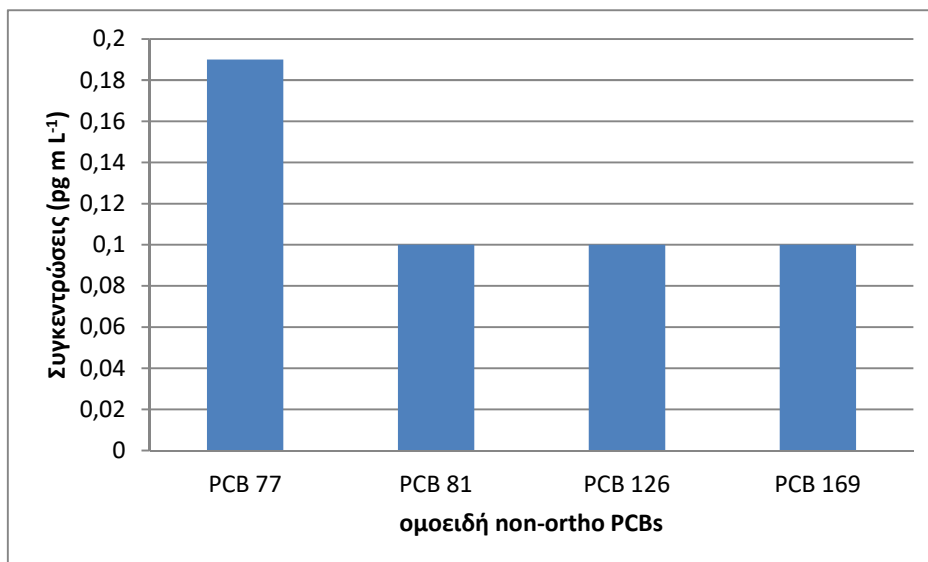


Σχήμα 13: Συγκεντρώσεις των indicator PCBs στα δείγματα ορού αίματος από τους εθελοντές του προγράμματος HEALS

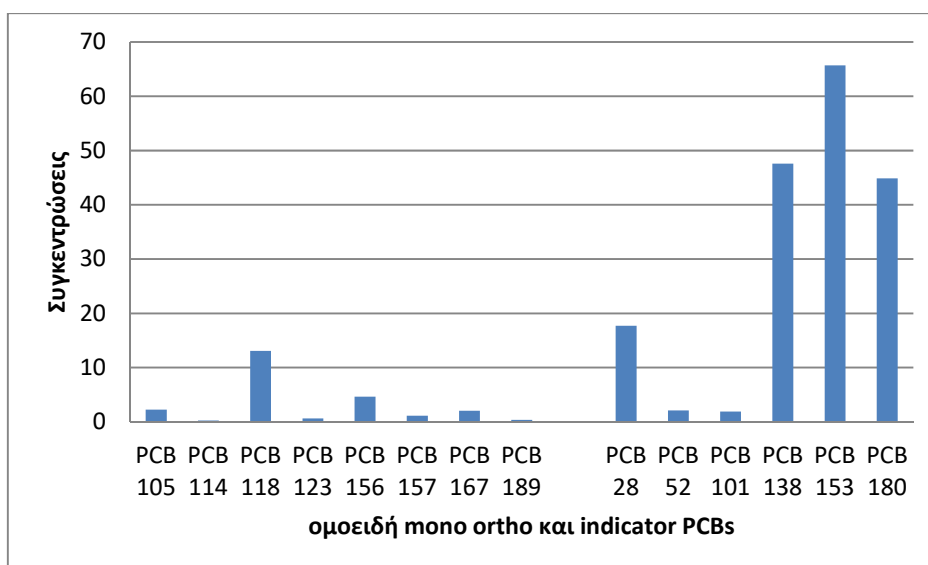
Από τη σύγκριση των μέσων τιμών ανδρών και γυναικών με το στατιστικό κριτήριο t-test σε όλες τις περιπτώσεις υπολογίστηκε $p \geq 0.5$, συνεπώς δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών των δύο ομάδων.

Οι τιμές των συγκεντρώσεων non-ortho PCBs (σχ.10) κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα για όλα τα δείγματα εκτός από τα δείγματα HP6M και HP6F που παρουσιάζουν αυξημένες σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Δεδομένου ότι τα δείγματα ανήκουν σε ανδρόγυνο, οι διατροφικές συνήθειες της οικογένειας ή η προέλευση των τροφίμων που καταναλώνουν πιθανόν ευθύνονται για τις αυξημένες τιμές. Η τιμή της συγκέντρωσης είναι 0.029 pg WHO-TEQ mL⁻¹ για το HP6M και 0.028 pg WHO-TEQ mL⁻¹ για το HP6F. Όσον αφορά τα mono-ortho PCBs (σχ. 11), η υψηλότερη συγκέντρωση προσδιορίστηκε στο HP1F 0.050 pg WHO-TEQ mL⁻¹. Τα υπόλοιπα δείγματα κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα με τη συγκέντρωση του HP5F να είναι η μικρότερη, σχεδόν μηδενική. Για τα συνολικά dioxin-like PCBs (σχ. 12) υψηλότερη συγκέντρωση και στα δύο φύλα παρουσιάζει το HP6 και ακολουθεί το HP1F στο οποίο τη συνολική συγκέντρωση σε dioxin-like PCBs σημαντικό μέρος οφείλεται στα mono-ortho ομοειδή. Στη συνολική συγκέντρωση των indicator PCBs σε αντίθεση με το HP1F που όπως έχουμε αναφέρει είναι το πιο υψηλό από όλα τα υπόλοιπα και τα HP6 και HP4 που είναι υψηλά και στα δύο φύλα, σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζονται λίγο πιο αυξημένες οι τιμές στα δείγματα των ανδρών. Ωστόσο δεν είναι στατιστικά σημαντικές οι διαφορές στους δύο πληθυσμούς ανδρών και γυναικών καθώς με το στατιστικό κριτήριο t-test υπολογίστηκε το $p=0.42$.

9.2.2 Προφίλ τιμών των ομοειδών ενώσεων PCBs σε ενδεικτικό δείγμα ορού αίματος



Σχήμα 14: Προφίλ των συγκεντρώσεων των non-ortho PCBs στο δείγμα HP7F



Σχήμα 15: Προφίλ των συγκεντρώσεων των mono-ortho και indicator PCBs στο δείγμα HP7F

Το προφίλ συγκεντρώσεων των ομοειδών PCBs δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές στα δείγματα της μελέτης. Στα σχήματα 14-15 παρουσιάζεται ένα ενδεικτικό προφίλ, στο οποίο όπως φαίνεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από

τα non-ortho PCBs βρίσκεται το PCB 77, από τα indicator PCBs τα PCB 28, PCB 138, PCB 153 και PCB 180, ενώ από τα mono-ortho PCBs υψηλότερη συγκέντρωση προσδιορίστηκε για το PCB 118, γεγονός που έρχεται σε πλήρη συμφωνία με τη διεθνή βιβλιογραφία^{170,152}.

9.2.3 Σύγκριση των επιπέδων PCBs στον ορό του αίματος των εθελοντών του HEALS με τα επίπεδα PCBs στον ορό εθελοντών της περιοχής του Ασπρόπυργου

Εκτός από τα 16 δείγματα ορού που συλλέχθηκαν στο πλαίσιο του προγράμματος HEALS, συλλέχθηκαν 54 δείγματα από εθελοντές που διαμένουν στον Ασπρόπυργο. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των μέσων συγκεντρώσεων (upperbound) αναλυτικά για κάθε ομοειδές PCB, το εύρος των τιμών τους, η διάμεση τιμή και η τυπική απόκλιση παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 17: Μέσες συγκεντρώσεις ομοειδών PCBs, εύρος συγκεντρώσεων, διάμεσος τιμή και τυπική απόκλιση τιμών στα δείγματα ορού των εθελοντών του Ασπρόπυργου

	Average	Min	Max	Median	SD
non-ortho PCBs					
PCB 77	0.67	<LOQ*	4.88	0.35	0.96
PCB 81	0.60	<LOQ	3.72	0.23	0.87
PCB 126	0.64	<LOQ	6.87	0.32	1.01
PCB 169	0.65	<LOQ	4.44	0.49	0.77
Συγκέντρωση n.o.-PCBs (pg mL ⁻¹)	2.55	0.40	11.2	1.73	2.55
Συγκέντρωση n.o.-PCBs (pg WHO-TEQ mL ⁻¹)	0.08	0.01	0.72	0.05	0.11
Συγκέντρωση n.o.-PCBs (pg WHO-TEQ g ⁻¹ λίπους)	49.6	1.29	513	17.9	94.2
mono-ortho PCBs					
PCB 105	30.0	0.42	206	2.46	51.4
PCB 114	3.17	<LOQ	35.9	0.45	6.48
PCB 118	93.5	2.16	673	10.9	157
PCB 123	6.29	<LOQ	34.2	0.64	10.4

PCB 156	26.1	<LOQ	263	6.92	45.6
PCB 157	6.19	0.12	70.5	1.34	11.0
PCB 167	10.2	0.30	99.7	2.00	18.4
PCB 189	3.14	<LOQ	39.0	0.96	6.34
Συγκέντρωση m.o.-PCBs (pg mL ⁻¹)	179	5.18	1421	28.0	296
Συγκέντρωση m.o.-PCBs (pg WHO-TEQ mL ⁻¹)	0.01	0.00	0.04	0.00	0.01
Συγκέντρωση m.o.-PCBs (pg WHO-TEQ g ⁻¹ λίπους)	2.65	0.02	23.7	0.38	5.23
Dioxin-like PCBs (pg WHO-TEQ mL⁻¹)	0.090				
Dioxin-like PCBs (pg WHO-TEQ g⁻¹ λίπους)	52.2				
Indicator PCBs					
PCB28	34.2	6.50	98.2	31.7	16.57
PCB52	8.29	2.68	23.3	6.81	4.07
PCB101	7.67	2.17	21.0	6.87	4.23
PCB138	181	7.32	885	53.3	225
PCB153	261	13.05	1035	96.8	297
PCB180	151	7.08	628	78.3	164
Indicator PCBs (ng mL⁻¹)	0.64				
Indicator PCBs (ng g⁻¹ λίπους)	302				
% περιεκτικότητα σε λίπος	0.49	0.02	1.78	0.30	0.43

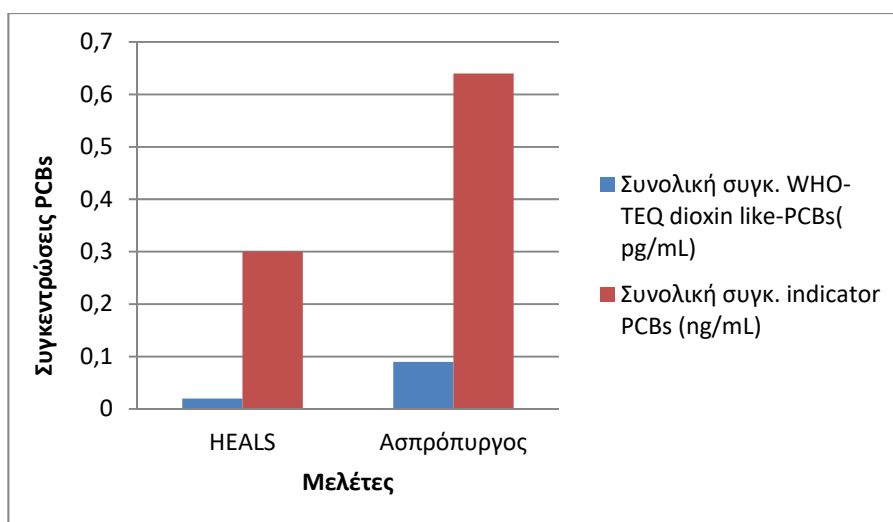
*LOQ= 0.1 pg mL⁻¹ ορού

Η μέση τιμή των dioxin-like PCBs είναι 0.09 pg WHO-TEQ mL⁻¹ (52.2 pg WHO-TEQ g λίπους⁻¹) με εύρος τιμών από 0.01 pg WHO-TEQ mL⁻¹ (1.31 pg WHO-TEQ g λίπους⁻¹) έως 0.76 pg WHO-TEQ mL⁻¹ (537 pg WHO-TEQ g λίπους⁻¹), ενώ για τα indicator PCBs είναι 0.64 ng mL⁻¹ (302 ng g λίπους⁻¹) με εύρος τιμών 0.065 ng mL⁻¹ (8.79 ng g λίπους⁻¹) έως 2.32 ng mL⁻¹ (1955 ng g λίπους⁻¹). Στον συγκριτικό πίνακα 18 και το σχήμα 16 παρουσιάζονται οι μέσες συγκεντρώσεις για τα PCBs για τους εθελοντές του HEALS και της περιοχής του Ασπρόπυργου. Οι οροί των εθελοντών του Ασπρόπυργου είναι φανερό ότι είναι πιο επιβαρυνμένοι από τα δείγματα ορών που συλλέχθηκαν από τους εθελοντές του HEALS που διαμένουν σε άλλες περιοχές της Αττικής. Η περιοχή αυτή θεωρείται

περιβαλλοντικά επιβαρυσμένη^{232,233} καθώς βρίσκεται κοντά στον κύριο ΧΥΤΑ της Αττικής σε χώρους του οποίου έχουν απορριφθεί και παλαιοί μετασχηματιστές, ενώ στην ευρύτερη περιοχή λειτουργούν αρκετές βιομηχανικές μονάδες. Πιθανόν στη διατροφή των κατοίκων της περιοχής περιλαμβάνονται προϊόντα τοπικής παραγωγής, στην κατανάλωση των οποίων οφείλονται τα αυξημένα επίπεδα.

Πίνακας 18: Σύγκριση των συγκεντρώσεων PCBs για τα δείγματα ορού του HEALS και του Ασπρόπυργου

	HEALS	Ασπρόπυργος
Μέση συνολική συγκ. των dioxin like-PCBs (pg WHO-TEQ mL ⁻¹)	0.018	0.09
Μέση συνολική συγκ. των indicator PCBs (ng mL ⁻¹)	0.30	0.64



Σχήμα 16: Σύγκριση των επιπέδων PCBs για τα δείγματα ορού των εθελοντών του HEALS και του Ασπρόπυργου

9.3 Μετρήσεις μεταβολομικής

9.3.1 Συσχέτιση των συγκεντρώσεων PCBs στους ορούς με τη μεταβολομική ανάλυση

Σε 15 δείγματα ορού από αυτά που συλλέχθηκαν στο πλαίσιο του HEALS (εκτός του HP5F γιατί το δείγμα ήταν πολύ χαμηλό σε όγκο) πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις μεταβολομικής, στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μηχανικής του ΑΠΘ.

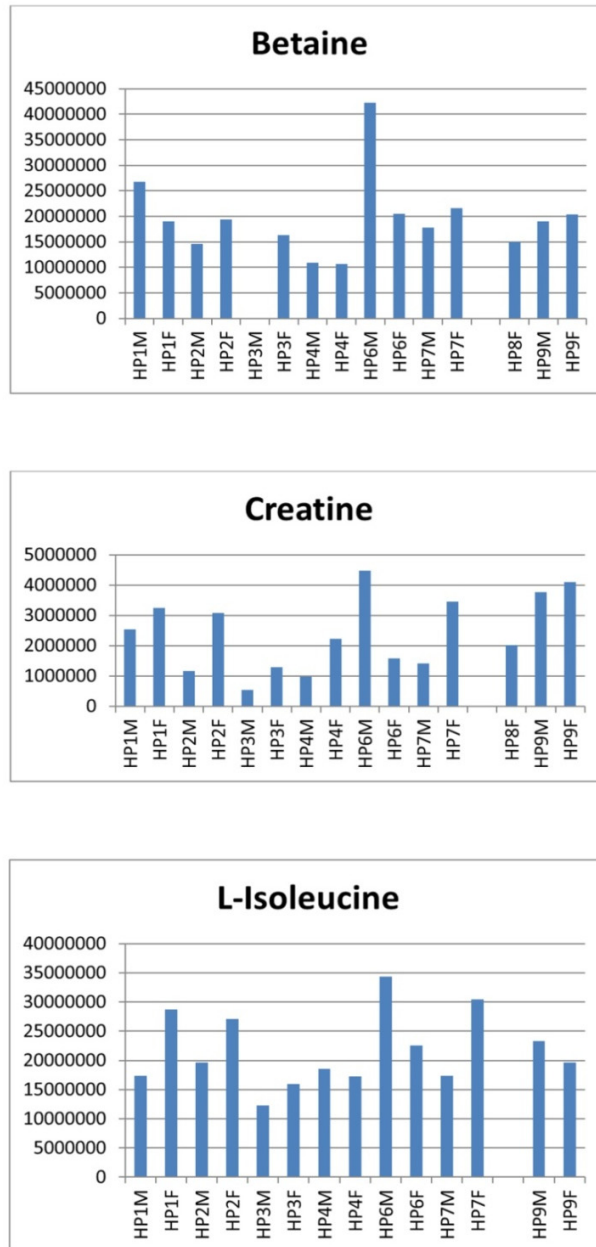
Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία^{122,123,124,125} η έκθεση σε περιβαλλοντικούς ρύπους της ομάδας των διοξινών επιφέρει τροποποιήσεις στα αμινοξέα και στο μεταβολισμό των λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένων των λιπαρών και χολικών οξέων. Μελέτες in vivo έχουν δείξει ότι οι οργανοαλογονωμένες ενώσεις όπως της ομάδας των διοξινών και οι πολυβρωμιωμένοι διφαινυλαιθέρες (PBDEs) αλλάζουν το προφίλ των ενώσεων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των λιπιδίων^{172,173}. Στο μεταβολικό προφίλ ορού εμβρύων σημειώθηκαν μεταβολές στην ουμπικινόνη, στη βιοσύνθεση τερπενοϊδούς-κινόνης και στον μεταβολισμό των αμινοξέων (μπεταΐνη, υδροξυπρολίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη). Τα συγκεκριμένα μονοπάτια έχουν συνδεθεί με την σύνθεση των λιπιδίων¹⁷⁴ και τη μιτοχονδριακή μεταφορά ηλεκτρονίων¹⁷⁵.

Οι βιοδείκτες που έχει βρεθεί ότι επηρεάζονται από την έκθεση σε ενώσεις της ομάδας των διοξινών σύμφωνα με τη βιβλιογραφία που αναφέρθηκε παραπάνω είναι οι εξής^{118,128,176}

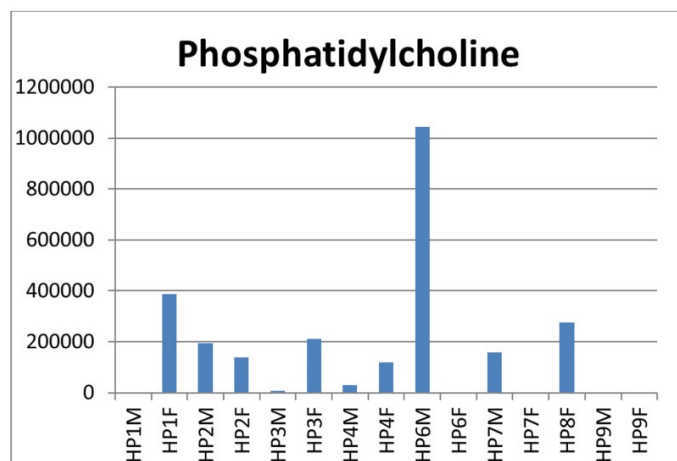
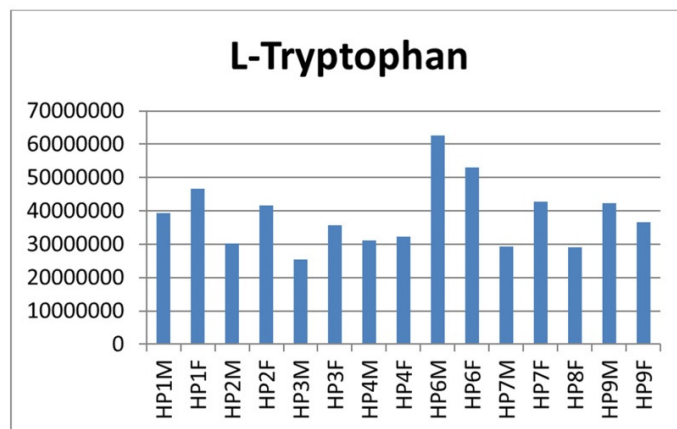
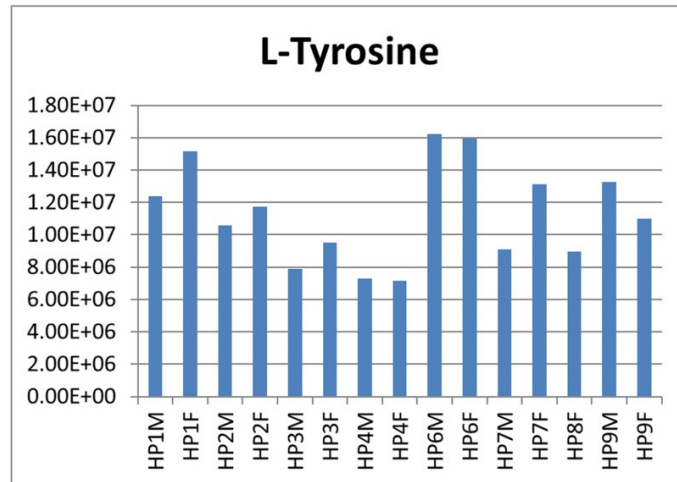
Υδροξυπρολίνη, υποξανθίνη, μπεταΐνη, κρεατίνη, τυροσίνη, ουρακίλη, φαινυλαλανίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, τρυπτοφάνη, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LysoPC) LysoPC(16:1), LysoPC(18:2) και LysoPC(20:4), συζευγμένη γλυκίνη, φωσφατιδυλοχολίνη (PC), νορεπινεφρίνη, ερυθρονικό οξύ, δεοξυχολικό οξύ (DCA) κ.α.

Από τους παραπάνω μεταβολίτες, αυτοί που διαπιστώθηκε ότι παρουσιάζουν συσχέτιση με τα επίπεδα PCBs στα δείγματα ορού που αναλύθηκαν παρατίθενται στα σχήματα 17-20. Ο κάθετος άξονας αντιστοιχεί στο μετρούμενο

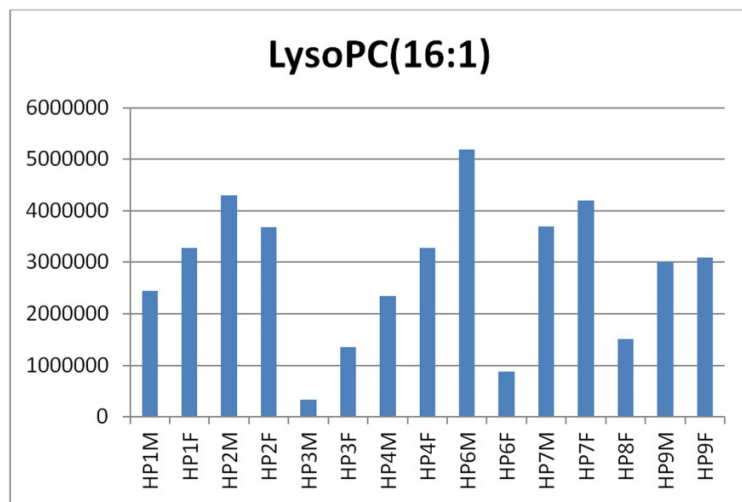
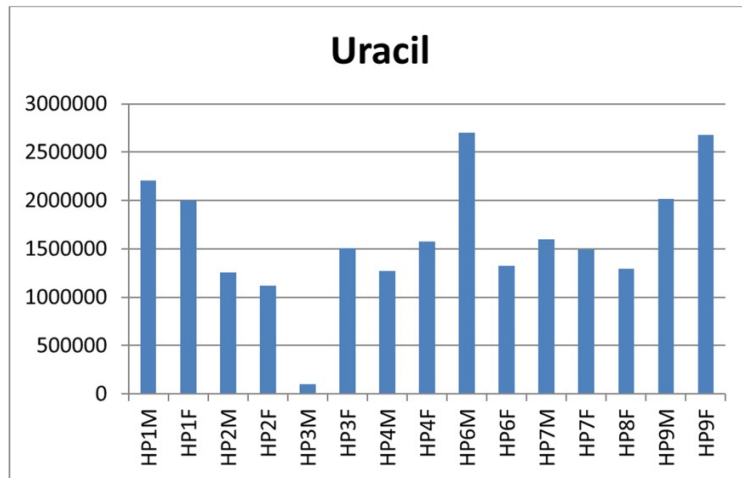
εμβαδό των κορυφών των μεταβολιτών που ανιχνεύτηκαν με τον φασματογράφο μάζας ThermoFisher Scientific, model LTQ Orbitrap Discovery MS με διακριτική ικανότητα 30,000.



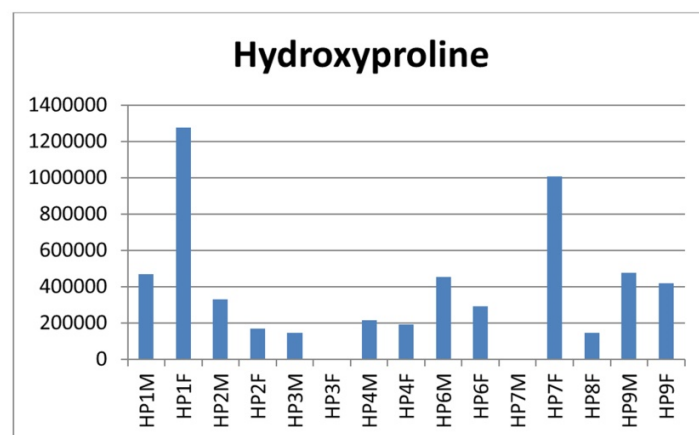
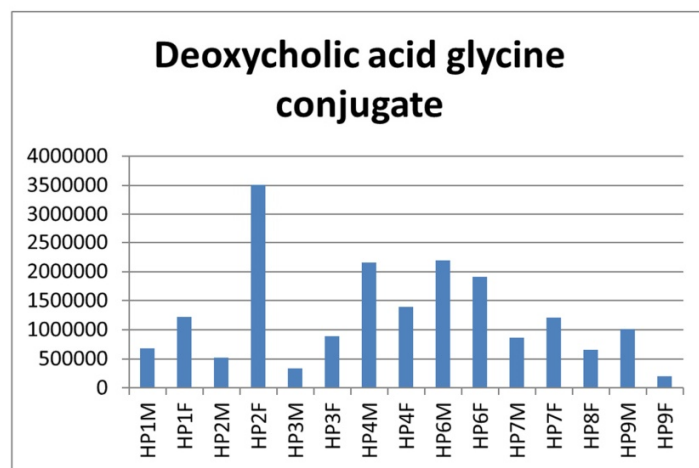
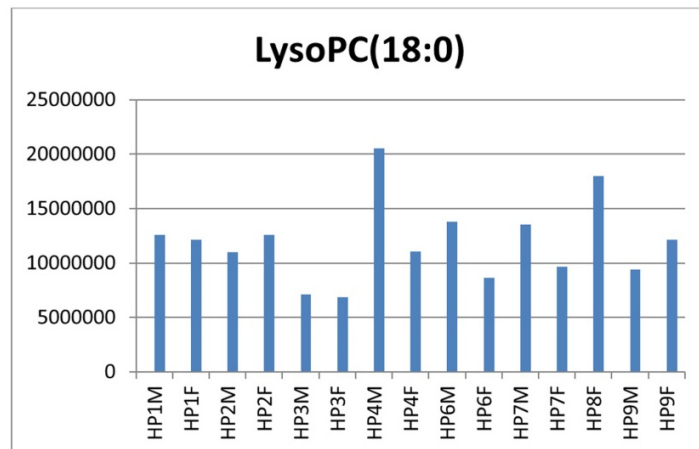
Σχήμα 17: Μεταβολίτες μπεταΐνη, κρεατίνη και L-Ισολευκίνη, συναρτήσεσι των εμβαδών των κορυφών τους



Σχήμα 18: Μεταβολίτες L-Τυροσίνη, L-Τρυπτοφάνη, φωσφατιδυλοχολίνη συναρτήσεσι των εμβαδών των κορυφών τους



Σχήμα 19: Μεταβολίτες ουρακίλη, λύσσοφωσφατιδυλοχολίνη (16:1) συναρτήσεϊ των εμβαδών των κορυφών τους



Σχήμα 20: Μεταβολίτες λύσοφωσφατιδυλοχολίνη (18:0), δεοξυχολικό οξύ συζευγμένο με γλυκίνη, υδρόξυπρολίνη συναρτήσεϊ των εμβαδών των κορυφών τους

Από τα διαγράμματα είναι φανερό ότι το δείγμα HP6M, εμφανίζει τις υψηλότερες συγκεντρώσεις στους περισσότερους μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν (Σχ. 17-19) δηλ. στους:

Μπεταΐνη, κρεατίνη, L-Ισολευκίνη, L-Τυροσίνη, L-Τρυπτοφάνη, φωσφατιδυλοχολίνη, ουρακίλη, λυζοφωσφατιδυλοχολίνη(16:1)

Όσον αφορά στα αμινοξέα L-Ισολευκίνη, L-Τυροσίνη, L-Τρυπτοφάνη, η συγκέντρωσή τους ήταν αυξημένη και στο HP6F.

Επιπλέον, το δείγμα HP1F παρουσιάζει και αυτό αυξημένες συγκεντρώσεις στους παραπάνω οκτώ μεταβολίτες και επιπλέον στον μεταβολίτη υδροξυπρωλίνη.

Οι μεταβολίτες δεοξυχολικό οξύ συζευγμένο με γλυκίνη, λυζοφωσφατιδιλχολίνη (18:0) και υδροξυπρωλίνη ανιχνεύθηκαν σε αρκετά χαμηλότερες συγκεντρώσεις στα HP6M και HP1F (σχήμα 20).

Στα σχήματα 17-19 παρατηρείται ότι για τους μεταβολίτες που εμφανίζουν μέγιστη συγκέντρωση στο HP6M, παρατηρείται μειωμένη συγκέντρωση στο HP3F. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι το HP6M και HP1F εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε non-ortho και indicator PCBs αντίστοιχα. Το HP1F είχε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις και στα mono-ortho PCBs. Αντιθέτως στο HP3F ανιχνεύθηκε η ελάχιστη συγκέντρωση dioxin-like PCBs.

Οι μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν είναι κυρίως αμινοξέα και μεταβολίτες που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων¹¹⁸.

Ωστόσο λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να διαπιστωθεί, εάν οι μεταβολίτες που βρέθηκαν σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα επιβαρυμένα με PCBs δείγματα μπορούν να αποτελέσουν βιοδείκτες για την παρακολούθηση των ρύπων αυτών.

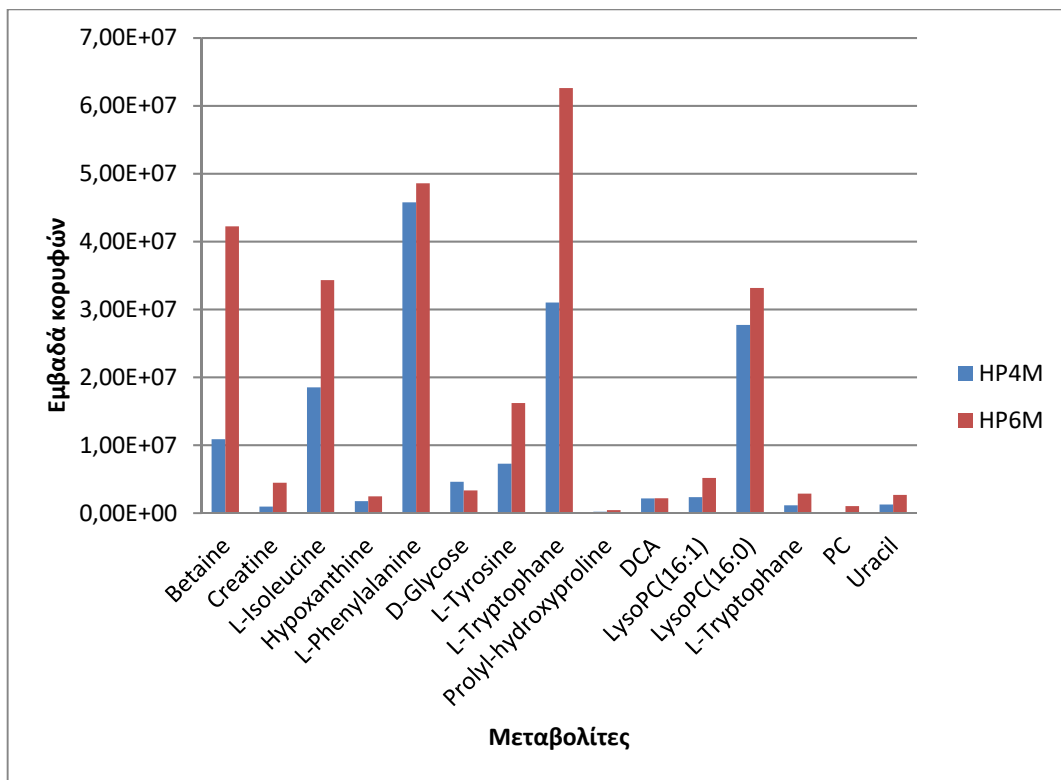
Στον παρακάτω συγκεντρωτικό πίνακα παρουσιάζονται τα δείγματα με τις πιο υψηλές συγκεντρώσεις PCBs σε συνδυασμό με τους μεταβολίτες που βρέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Πίνακας 19: Δείγματα επιβαρυμένα σε PCBs σε συνδυασμό με μεταβολίτες που βρέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις

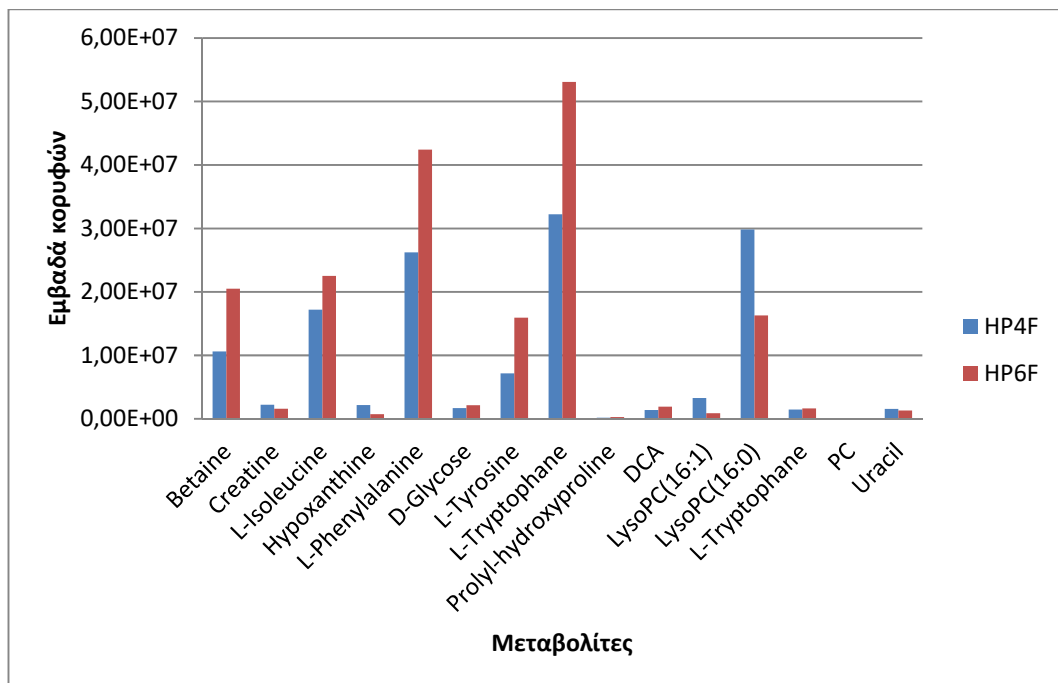
Μεταβολίτες (πιθανοί βιοδείκτες για την έκθεση σε PCBs)	Δείγματα με αυξημένες συγκεντρώσεις σε PCBs και μεταβολίτες
Betaine	HP1F, HP6M
Creatine	HP1F, HP6M
L-Isoleucine	HP1F, HP6M, HP6F
L-Tyrocine	HP1F, HP6M, HP6F
L-Tryptophan	HP1F, HP6M, HP6F
Phosphatidylcholine	HP1F, HP6M
Uracile	HP1F, HP6M
LysoPC (16:1)	HP1F, HP6M
Hydroxyproline	HP1F

9.3.2 Σύγκριση των επιπέδων των μεταβολιτών για HP4 και HP6

Για τη σύγκριση των επιπέδων των μεταβολιτών, επιλέχθηκε ένα ζευγάρι δειγμάτων με υψηλές συγκεντρώσεις σε PCBs (HP6) και ένα δείγμα με συγκέντρωση κοντά στο μέσο όρο (HP4). Η σύγκριση έγινε ανά φύλο και παρουσιάζεται στα σχήματα 21-22. Ο οριζόντιος άξονας είναι το εμβαδό των κορυφών (peak areas) κάθε μεταβολίτη, που είναι ανάλογο της συγκέντρωσής του, ενώ στον κάθετο παρατίθενται οι μεταβολίτες.



Σχήμα 21: Μεταβολίτες και εμβαδά κορυφών των δειγμάτων HP4M και HP6M



Σχήμα 22: Μεταβολίτες και εμβαδά κορυφών των δειγμάτων HP4F και HP6F

Από τα παραπάνω σχήματα το HP6 δείχνει να εμφανίζει υψηλότερες συγκεντρώσεις σε όλους τους μεταβολίτες σε σχέση με το HP4 εκτός από την λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (16:0), στη σύγκριση των εθελοντών θηλυκού γένους. Ωστόσο πρέπει να είμαστε επιφυλακτικοί ως προς οποιαδήποτε σύγκριση καθώς ο μικρός αριθμός των δειγμάτων αποτελεί μεν ένδειξη ότι πιθανόν οι παραπάνω μεταβολίτες να αποτελούν και βιοδείκτες έκθεσης σε ενώσεις της ομάδας των διοξινών, απαιτείται όμως περαιτέρω μελέτη για να τεκμηριωθεί σαφής συσχέτιση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: Επίπεδα υπερφθοριωμένων ενώσεων στο αίμα

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής μελετήθηκαν τα επίπεδα PFOA και PFOS στο αίμα των εθελοντών της μελέτης. Οι δυο αυτές υπερφθοριωμένες ενώσεις παρουσιάζουν ενδιαφέρον καθότι έχουν παραχθεί στο παρελθόν σε μεγάλες ποσότητες, με αποτέλεσμα να ανιχνεύονται πλέον σε όλο τον κόσμο στο περιβάλλον, τα τρόφιμα και τον ορό ενώ τοξικολογικές μελέτες σε ζώα καθώς και μελέτες σε πληθυσμούς που έχουν υποστεί επαγγελματική έκθεση έχουν δείξει πλήθος επιβλαβών επιδράσεων στην υγεία^{87,93,96}.

10.1 Μεθοδολογία προσδιορισμού PFASs στον ορό

Για την ανάλυση των δειγμάτων ορού, εφαρμόστηκε η μέθοδος που είχε αναπτυχθεί από το ΕΦΑΜΑΔ σε προγενέστερη μελέτη¹⁷⁷ και περιγράφεται αναλυτικά στο πειραματικό μέρος.

10.2 Συγκεντρώσεις των PFASs στα δεκαέξι (16) δείγματα των εθελοντών του HEALS

Από τους ορούς των εθελοντών του HEALS που αναλύθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης το 75% βρέθηκαν να περιέχουν PFOA πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης, ενώ PFOS ανιχνεύτηκε και ποσοτικοποιήθηκε στο 100% των δειγμάτων. Σε όσα δείγματα το PFOA δεν ανιχνεύτηκε, για τον υπολογισμό των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) στην τιμή της συγκέντρωσης το οποίο και για τις δύο ενώσεις είναι 0.50 ng mL⁻¹.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν.

Πίνακας 20: Συγκεντρώσεις των PFASs στα δείγματα των εθελοντών του HEALS, μέσες συγκεντρώσεις των PFOS και PFOA, εύρος συγκεντρώσεων και διάμεσος τιμή

	PFOA (ng/mL)	PFOS (ng/mL)
HP1M	<LOQ*	3.54
HP1F	1.09	3.84
HP2M	1.14	6.96
HP2F	<LOQ	2.74
HP3M	1.45	6.58
HP3F	<LOQ	1.50
HP4M	2.55	11.9
HP4F	1.07	6.81
HP5F	<LOQ	1.38
HP6M	2.42	9.32
HP6F	0.69	2.73
HP7M	1.46	7.95
HP7F	0.73	2.21
HP8F	2.02	2.30
HP9M	2.02	5.90
HP9F	0.74	4.00

PFOA			
Mean	Min	Max	Median
1.21	0.69	2.55	1.08

PFOS			
Mean	Min	Max	Median
4.98	1.38	11.9	3.92

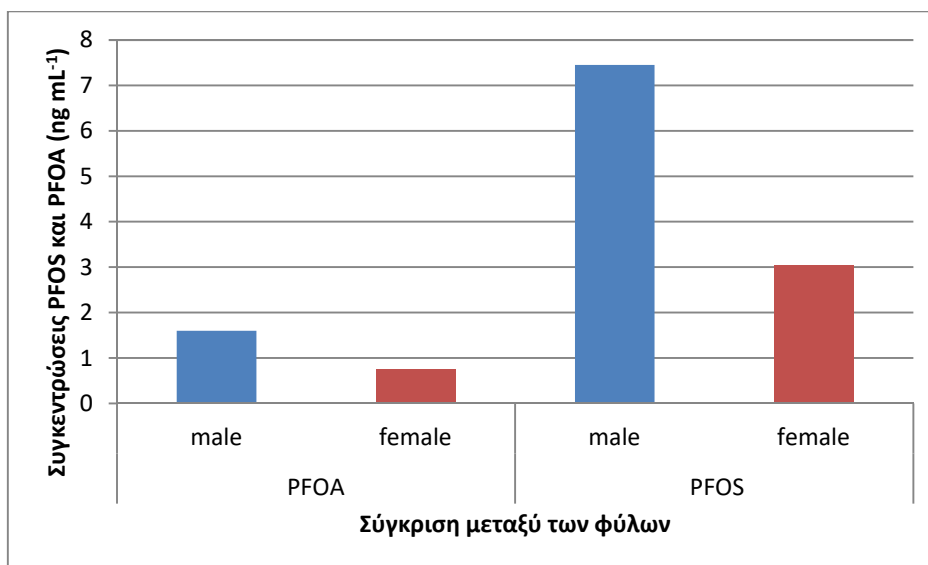
*LOQ=0.50 ng mL⁻¹

Στα δείγματα των εθελοντών του HEALS την πιο ψηλή τιμή συγκέντρωσης (πίνακας 20) εμφάνισε το HP4M με συγκέντρωση PFOS 11.9 ng mL⁻¹ και PFOA 2.55 ng mL⁻¹, ενώ ακολουθεί το HP6M με PFOS 9.32 ng mL⁻¹ και PFOA 2.42 ng mL⁻¹. Η πιο χαμηλή συγκέντρωση σε PFOA μετρήθηκε 0.69 ng mL⁻¹ στο HP6F και για PFOS το 1.38 ng mL⁻¹ στο HP5F.

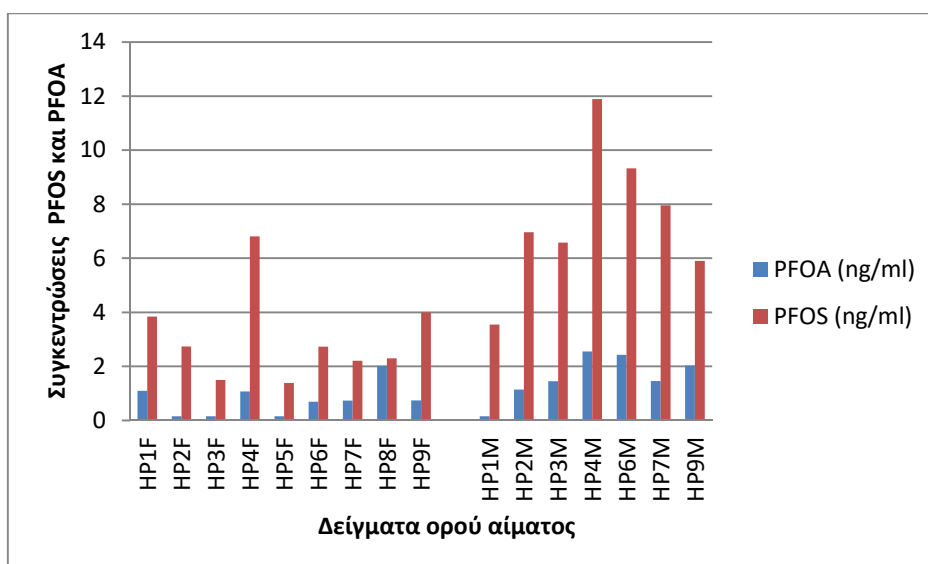
Για να διερευνηθεί αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ποιότητας του αέρα στις οικίες των εθελοντών και των επιπέδων PFOS και PFOA στον ορό, υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης Pearson, από την τιμή του οποίου διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων PM_{2.5}, PM₁₀, TVOCs, CO και ΣΡΑΗs στον αέρα με τα επίπεδα των PFOS και PFOA στο αίμα των εθελοντών. Το εύρημα αυτό ενισχύει το συμπέρασμα ότι στη διατροφή οφείλεται το μεγαλύτερο μέρος της έκθεσης του ανθρώπου στις υπερφθοριωμένες ενώσεις.

10.2.1 Σύγκριση των συγκεντρώσεων των PFAAs μεταξύ των φύλων (HPM και HPF)

Για τα δείγματα των εθελοντών του HEALS για τα οποία έχουμε ορό και από τα δύο φύλα (σχήματα 23-24), παρατηρείται ότι τα δείγματα ανδρών είναι πιο επιβαρυσμένα κυρίως σε PFOS (μέση συγκέντρωση PFOS 7.45 και PFOA 1.65 ng mL⁻¹) σε σχέση με τα δείγματα γυναικών (μέση συγκέντρωση PFOS 3.06 και PFOA 0.87 ng mL⁻¹). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί σε βιοχημικές διεργασίες κάθαρσης από PFOS και PFOA στις γυναίκες που είναι σε ηλικίες προ-εμμηνόπαυσης^{91,93,178} όπως ήταν και η περίπτωση των εθελοντριών του HEALS.



Σχήμα 23: Μέσες συγκεντρώσεις των PFOS και PFOA στα δύο φύλα



Σχήμα 24: Συγκεντρώσεις των PFOS και PFOA στα δείγματα του HEALS

10.2.2 Συγκεντρώσεις των PFASs στα δείγματα του ορού αίματος από τους εθελοντές του Ασπρόπυργου

Από τους ορούς των εθελοντών του Ασπρόπυργου στο 67% των δειγμάτων οι συγκεντρώσεις του PFOA ήταν πάνω από το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης ενώ για το PFOS το 98% των δειγμάτων ήταν πάνω από το

όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Για όσα δείγματα PFOS και PFOA δεν ανιχνεύτηκαν, χρησιμοποιήθηκε το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) στην τιμή της συγκέντρωσης το οποίο και για τις δύο ενώσεις είναι 0.50 ng mL⁻¹. Στις τιμές min του πίνακα 21 περιλαμβάνονται οι τιμές που είναι πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης.

Πίνακας 21: Συγκεντρώσεις των PFAAs στα δείγματα του Ασπροπύργου, μέσες συγκεντρώσεις των PFOS και PFOA, εύρος συγκεντρώσεων και διάμεσος τιμή

	PFOA (ng/ml)	PFOS (ng/ml)
AS1	<LOQ*	<LOQ
AS2	<LOQ	1.82
AS3	0.56	1.29
AS4	1.28	1.41
AS5	0.98	1.22
AS6	<LOQ	0.83
AS7	<LOQ	6.22
AS8	1.27	2.66
AS9	0.74	5.76
AS10	0.63	2.02
AS11	2.11	1.5
AS12	0.86	1.64
AS13	1.18	0.98
AS14	1.02	2.53
AS15	1.19	2.57
AS16	0.95	3.39
AS17	1.48	2.43
AS18	<LOQ	2.79
AS19	0.98	3.82
AS20	0.59	1.55
AS21	<LOQ	1.18
AS22	1.57	4.67
AS23	1.23	6.36

AS24	0.73	1.59
AS25	0.98	5.73
AS26	0.58	2.58
AS27	1.16	8.3
AS28	1.29	3.42
AS29	<LOQ	2.17
AS30	1.06	7.18
AS31	<LOQ	1.13
AS32	<LOQ	1.13
AS33	0.72	1.41
AS34	1.13	2.55
AS35	0.74	1.91
AS36	<LOQ	2.19
AS37	0.61	3.16
AS38	<LOQ	1.45
AS39	<LOQ	1.92
AS40	<LOQ	2.22
AS41	0.56	6.04
AS42	<LOQ	1.11
AS43	<LOQ	1.68
AS44	0.99	1.95
AS45	0.67	3.12
AS46	<LOQ	1.92
AS47	<LOQ	1.59
AS48	1.07	3.21
AS49	0.72	4.32
AS50	<LOQ	2.11
AS51	3.1	3.23
AS52	0.58	3.16
AS53	1.06	2.88
AS54	1.66	3.71
AS55	1.46	5.57

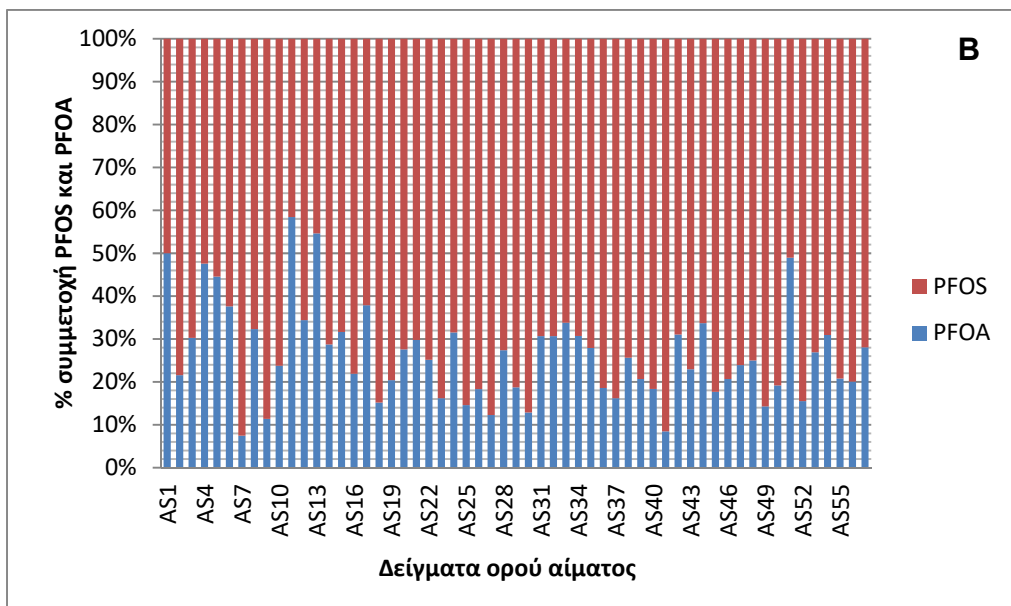
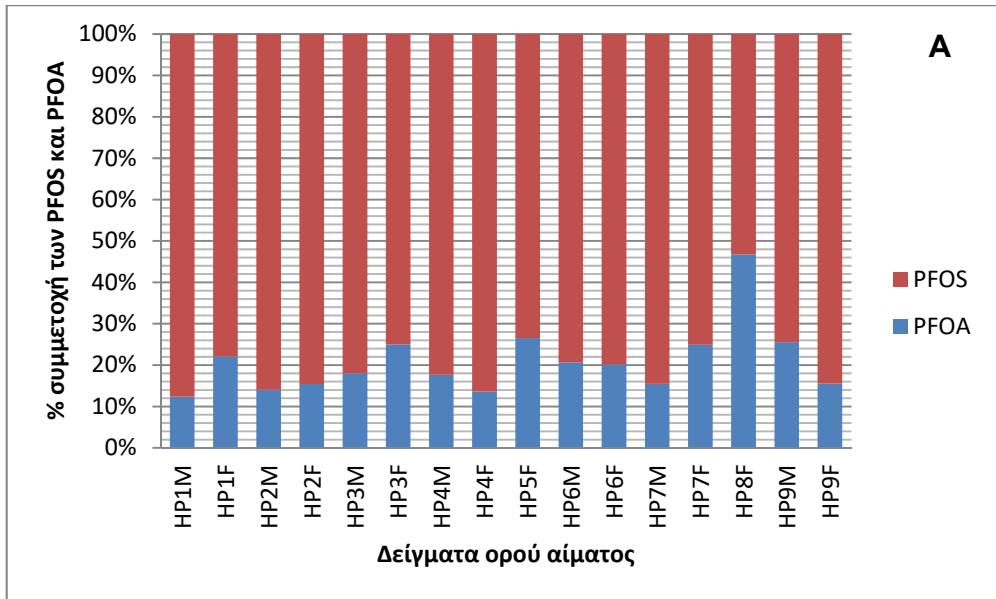
AS56	<LOQ	1.99
AS57	0.64	1.64

Mean PFOA	Min	Max	Median
0.87	0.56	3.10	0.72

Mean PFOS	Min	Max	Median
2.78	0.83	8.30	2.19

*LOQ=0.50 ng mL⁻¹

Στα δείγματα των εθελοντών του Ασπρόπυργου η πιο υψηλή συγκέντρωση σε PFOS ήταν 8.3 ng mL⁻¹ στο δείγμα AS27, ακολούθησε το AS30 με PFOS 7.18 ng mL⁻¹ και το AS23 με PFOS 6.36 ng mL⁻¹. Η ελάχιστη συγκέντρωση παρουσιάζεται στο AS6 με 0.83 ng mL⁻¹. Για το PFOA, η ψηλότερη συγκέντρωση παρουσιάζεται στο AS51 με 3.10 ng mL⁻¹, ακολουθεί το AS11 με 2.11 και το AS54 με 1.66 ng mL⁻¹. Η ελάχιστη συγκέντρωση παρουσιάζεται στο AS3 με 0.56 ng mL⁻¹. Κοινό χαρακτηριστικό στα δείγματα των εθελοντών του HEALS και του Ασπρόπυργου είναι ότι το PFOS προσδιορίστηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από το PFOA (Σχήμα 25). Υψηλότερες συγκεντρώσεις PFOS σε σχέση με το PFOA αναφέρονται στις περισσότερες σχετικές μελέτες στον ορό που έχουν δημοσιευτεί. Όπως έχει διαπιστωθεί, το PFOS βιοσυσσωρεύεται περισσότερο από το PFOA, ενώ ο χρόνος ημιζωής του PFOS είναι 5 χρόνια ενώ του PFOA 3.5 χρόνια στον ορό του αίματος⁹³.



Σχήμα 25: % συμμετοχή PFOA και PFOS στη συνολική συγκέντρωση PFASs στα δείγματα HEALS (A) και Ασπροπύργου (B)

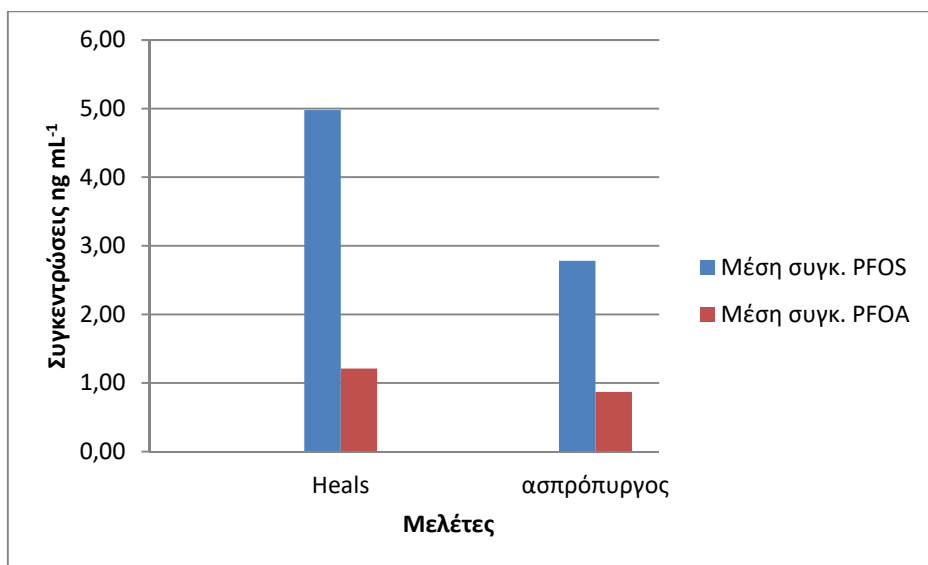
10.2.3 Σύγκριση των επιπέδων PFASs στον ορό αίματος των εθελοντών του HEALS και εθελοντών της περιοχής του Ασπρόπυργου

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού PFOS και PFOA των 16 ορών αίματος από τους εθελοντές του HEALS και των 57 ορών από τους εθελοντές του Ασπρόπυργου παρατίθενται αναλυτικά στον παρακάτω συγκριτικό πίνακα:

Πίνακας 22: Συγκριτικός πίνακας για τα δείγματα HEALS και του Ασπρόπυργου

	Εθελοντές Heals (n=16)	Εθελοντές Ασπρόπυργου (n= 57)
PFOS (ng mL⁻¹)		
Mean	4.98	2.78
Min	1.38	0.83
Max	11.9	8.30
Median	3.92	2.19
PFOA (ng mL⁻¹)		
Mean	1.21	0.87
Min	0.69	0.56
Max	2.55	3.10
Median	1.29	0.99

Από τον πίνακα 22 και σχήμα 26 φαίνεται ότι ενώ τα επίπεδα PFOA δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφορά στους δύο πληθυσμούς, κάτι που επιβεβαιώθηκε και με t-test, τα επίπεδα PFOS εμφανίζονται αυξημένα στον ορό των δειγμάτων του εθελοντών του HEALS.



Σχήμα 26: Σύγκριση των επιπέδων PFASs στους δύο πληθυσμούς που μελετήθηκαν

Τα PFASs ανήκουν στους χημικούς ρύπους που η χρήση τους είναι συνυφασμένη με το βιοτικό επίπεδο. Λόγω των χημικών τους ιδιοτήτων γνωρίζουν μεγάλη γκάμα εφαρμογών. Χρησιμοποιούνται ευρέως σε αντικολλητικές επιφάνειες μαγειρικών σκευών, σε υλικά συσκευασίας τροφίμων, για αδιαβροχοποίηση υφασμάτων που χρησιμοποιούνται για προϊόντα ένδυσης, έπιπλα και χαλιά καθώς και σαν υλικό πυρόσβεσης. Έχουν επίσης την ιδιότητα να μειώνουν τις τριβές και για αυτόν τον λόγο χρησιμοποιούνται στην αεροναυπηγική, στην κατασκευή αυτοκινήτων, στην κατασκευή κτιρίων καθώς και σε ηλεκτρονικά είδη. Ειδικότερα το PFOS έχει στο παρελθόν χρησιμοποιηθεί σαν επιφανειοδραστικό και σε προϊόντα καθαρισμού και καλλυντικά.

Η χρήση πολλών από τα παραπάνω προϊόντα σχετίζεται με το κοινωνικοοικονομικό επίπεδο. Όσο υψηλότερο είναι, τόσο η πρόσβαση σε αυτά είναι περισσότερο εφικτή. Συνεπώς το βιοτικό επίπεδο παίζει καθοριστικό ρόλο στην έκθεση των ανθρώπων στους ρύπους αυτούς γεγονός που ίσως εξηγεί τα ελάχιστα μειωμένα επίπεδα PFASs στους εθελοντές του Ασπρόπυργου σε σχέση με τους υπόλοιπους εθελοντές.

Τα PFASs αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα για τους λόγους που επιβάλλεται να λαμβάνονται υπόψη στην έννοια του exposome εκτός από το σύνολο της περιβαλλοντικής έκθεσης σε εξωτερικούς και εσωτερικούς ρύπους από τη σύλληψη έως το θάνατο¹⁰⁷ και η επίδραση του τρόπου ζωής, συμπεριφοράς, σχέσης με το «κοινωνικό περιβάλλον» και το κοινωνικο-οικονομικό επίπεδο και επίπεδο εκπαίδευσης¹¹⁰.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11: Έκθεση του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας σε ενώσεις της ομάδας των διοξινών μέσω της διατροφής

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να συγκεντρωθούν αντιπροσωπευτικά δεδομένα για τη συγκέντρωση PCDDs, PCDFs και PCBs στα τρόφιμα, ώστε να εκτιμηθεί η διατροφική έκθεση και να υπολογιστεί η συνεισφορά των διάφορων ομάδων τροφίμων στην συνολική έκθεση. Επιπλέον, η εκτιμώμενη διατροφική έκθεση στην Ελλάδα να συγκριθεί με αυτή άλλων Ευρωπαϊκών χωρών.

11.1 Υπολογισμός της συνολικής ημερήσιας πρόσληψης σε PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs

Η συγκέντρωση των υπό μελέτη ενώσεων στα τρόφιμα υπολογίστηκε σε τοξικά ισοδύναμα (TEQ) βάσει των εν ισχύ παραγόντων τοξικής ισοδυναμίας (TEF). Για τον υπολογισμό της διατροφικής πρόσληψης σε PCDDs, PCDFs και PCBs, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων για τη διαθεσιμότητα των τροφίμων ανά οικογένεια. Τα στοιχεία αυτά περιλαμβάνονται στα αποτελέσματα της μελέτης DAFNE-ANEMOS. Η μελέτη αυτή κατά τη διάρκεια του 2012 συνέλεξε δεδομένα από 3572 οικογένειες. Για συνεχές χρονικό διάστημα 14 ημερών, ζητήθηκε από κάθε οικογένεια να τηρεί σε ημερήσια βάση ημερολόγιο με τα προϊόντα τροφίμων που προμηθεύεται. Τα δεδομένα διαθεσιμότητας των τροφίμων βρίσκονται στο διαδίκτυο στη διεύθυνση:

<http://www.hhf->

[greece.gr/DafnesoftWebV2/Data/Single?Country=GR&Year=2012&Method=4&Tree=Levels](http://www.hhf-greece.gr/DafnesoftWebV2/Data/Single?Country=GR&Year=2012&Method=4&Tree=Levels)

Εφαρμόστηκαν όπου ήταν απαραίτητο συντελεστές για τη μεταροπή των mL για το γάλα ή το λάδι σε g. Για τον υπολογισμό της διατροφικής έκθεσης, χρησιμοποιήθηκαν οι ανώτερες συγκεντρώσεις (upperbound) των PCDDs, PCDFs και PCBs, δηλαδή για τα ομοειδή που δεν ήταν ανιχνεύσιμα, η συγκέντρωσή τους θεωρήθηκε ίση με το LOQ. Οι τιμές αυτές αποτελούν την πιο

υψηλή πιθανή συγκέντρωση του ρύπου. Σύμφωνα με την EFSA, όταν μελετάται η έκθεση του ανθρώπου σε τοξικούς ρύπους είναι προτιμότερο να εξετάζεται το «χειρότερο σενάριο», αυτό της μέγιστης δυνατής έκθεσης που προκύπτει από τα αναλυτικά δεδομένα. Εξάλλου σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό κανονισμό¹⁶³ 1259/2011, ο οποίος ορίζει τα ανώτατα όρια για τις διοξίνες και τις παρόμοιες ενώσεις στα τρόφιμα, τα αναλυτικά αποτελέσματα επιβάλλεται να εκφράζονται ως πιο υψηλή πιθανή συγκέντρωση.

Η ημερήσια πρόσληψη ενός ρύπου υπολογίζεται από τον πολλαπλασιασμό της μέσης συγκέντρωσης PCDDs, PCDFs, PCBs που μετρήθηκε με την τιμή της διαθεσιμότητας του τροφίμου (ελλείπει επίσημων συστηματικών δεδομένων για την κατανάλωση των τροφίμων) με βάση την εξίσωση:

Ημερήσια πρόσληψη (pg WHO-TEQ kg⁻¹ σωμα. βάρους ημέρα⁻¹) =

Μέση συγκέντρωση (pg WHO-TEQ g⁻¹ νωπού βάρους) × **Διαθεσιμότητα τροφίμων** (g kg⁻¹ σωμα. βάρους ημέρα⁻¹)

Για το 2012, για τον ενήλικο πληθυσμό στην Ελλάδα, οι μέσες τιμές διαθεσιμότητας για κάθε τύπο τροφίμου παρουσιάζονται στον πίνακα 27:

Το μέσο βάρος ενήλικα που χρησιμοποιήθηκε στους υπολογισμούς^{179,180} είναι αυτό που προτείνεται στη σύσταση της EFSA και είναι τα 70 kg.

Οι μελέτες της εκτίμησης της διατροφικής έκθεσης απαιτούν αξιόπιστα δεδομένα για την κατανάλωση των τροφίμων και ακριβή υπολογισμό της συγκέντρωσης των υπό μελέτη ρύπων. Όσον αφορά στο δεύτερο σκέλος υπάρχουν επαρκή αναλυτικά δεδομένα, αφού το ΕΦΑΜΑΔ είναι το εργαστήριο αναφοράς για τις αναλύσεις PCDDs, PCDFs και PCBs και διεξάγει το ετήσιο εθνικό πρόγραμμα ελέγχου διοξινών στα τρόφιμα από το 2002. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν από το 2014 και μετά αναλύθηκαν με την μέθοδο ανάλυσης που αναπτύχθηκε και περιγράφηκε στη προηγούμενη ενότητα, η οποία πλέον χρησιμοποιείται από το εργαστήριο συστηματικά για την ανάλυση των τροφίμων. Δυστυχώς μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν συστηματικά δεδομένα για την κατανάλωση τροφίμων για τον Ελληνικό πληθυσμό. Για τον λόγο αυτό όπως αναφέραμε και παραπάνω για

τους υπολογισμούς έγινε χρήση των δεδομένων διαθεσιμότητας των τροφίμων από την διαθέσιμη στο διαδίκτυο βάση δεδομένων της μελέτης DAFNE-ANEMOS. Απουσία δεδομένων κατανάλωσης έχουν χρησιμοποιηθεί και σε άλλες αντίστοιχες δημοσιευμένες μελέτες δεδομένα διαθεσιμότητας τροφίμων¹⁸¹. Η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη ως μία πρώτη αξιολόγηση της διατροφικής έκθεσης του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας σε PCDDs, PCDFs και PCBs η οποία παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τη δημόσια υγεία. Παρά τους περιορισμούς που ενέχει η χρήση τέτοιου τύπου βάσης δεδομένων σε σύγκριση με πιο εξατομικευμένες έρευνες για την κατανάλωση τροφίμων, είναι ένα οικονομικά ανεκτό εναλλακτικό εργαλείο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της διατροφικής έκθεσης σε ρύπους, ελλείψει δεδομένων κατανάλωσης¹⁸².

11.2 Μέσες συγκεντρώσεις των PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs που προσδιορίστηκαν στα τρόφιμα από την Ελληνική αγορά

Κατά τη διάρκεια των 14 χρόνων λειτουργίας του ΕΦΑΜΑΔ, 1213 προϊόντα τροφίμων από την ελληνική αγορά αναλύθηκαν για PCDDs, PCDFs και PCBs, στο πλαίσιο των εθνικών ελέγχων για την ασφάλεια και την ποιότητα των τροφίμων. Στις κατηγορίες των προϊόντων περιλαμβάνονται αυτά που καταναλώνονται κυρίως στο πλαίσιο της Μεσογειακής διατροφής ενώ περιλαμβάνονται και στην Ευρωπαϊκή νομοθεσία¹⁶³ για τα ανώτατα όρια των επιπέδων των διοξινών στα τρόφιμα. Πιο συγκεκριμένα, μοσχάρι, χοιρινό, πουλερικά, αρνί, συκώτι, αυγά, ψάρι και θαλασσινά, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, ζωϊκό λίπος, ελαιόλαδο και φυτικά έλαια συλλέχθηκαν από την Ελληνική αγορά. Στη μελέτη δεν περιλαμβάνονται φρούτα και λαχανικά καθότι οι ενώσεις της ομάδας των διοξινών είναι λιποδιαλυτές και τα φρούτα και τα λαχανικά δε περιέχουν λίπος. Για το λόγο αυτό εξάλλου δεν έχει οριστεί ανώτατο όριο από την Ευρωπαϊκή Ένωση για τα είδη αυτά. Στον πίνακα 23 παρουσιάζονται αναλυτικά αποτελέσματα υπολογισμού των μέσων συγκεντρώσεων των PCDDs, PCDFs και dioxin-like-PCBs για τις παραπάνω

κατηγορίες τροφίμων, υπολογισμένα ως ανώτατες (upperbound) WHO-TEQ συγκεντρώσεις. Για το σύνολο των PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs οι συγκεντρώσεις στον πίνακα 23 εκφράζονται σε pg WHO-TEQ ανά γραμμάριο λίπους (g^{-1} fat) και σε pg WHO-TEQ ανά γραμμάριο νωπού βάρους (g^{-1} wet weight).

Η κατηγορία τροφίμων με την υψηλότερη μέση συγκέντρωση ήταν τα ψάρια και θαλασσινά με συγκέντρωση 9.68 pg WHO-TEQ g^{-1} λίπους (0.71 pg WHO-TEQ g^{-1} νωπού βάρους) και μέγιστη συγκέντρωση 21.40 pg WHO-TEQ g^{-1} λίπους (4.74 pg WHO-TEQ g^{-1} νωπού βάρους), ενώ ακολούθησε το συκώτι με μέση συγκέντρωση 3.31 και μέγιστη 7.05 pg WHO-TEQ g^{-1} λίπους. Η πιο χαμηλή μέση WHO-TEQ συγκέντρωση παρατηρήθηκε στην ομάδα φυτικά έλαια, με 0.35 pg WHO-TEQ g^{-1} λίπους. Η μέγιστη συγκέντρωση στο συγκεκριμένο είδος μετρήθηκε στα 0.57 pg WHO-TEQ g^{-1} λίπους. Δεδομένων των συγκεντρώσεων των μελετούμενων ρύπων στον πίνακα 23, είναι φανερό ότι σε όλα ανεξαιρέτως τα δείγματα, τα επίπεδα των συγκεντρώσεων είναι πολύ χαμηλότερα από τα μέγιστα επίπεδα που ορίζει η Ευρωπαϊκή ένωση¹⁶³ (Commission Regulation 1259/2011) και είναι χαμηλότερα σε σύγκριση με άλλες Ευρωπαϊκές χώρες, όπως θα δούμε αναλυτικότερα παρακάτω.

Πίνακας 23: Μέσες WHO-TEQ συγκεντρώσεις των PCDDs, PCDFs και dioxin- like PCBs ανά κατηγορία τροφίμων που αναλύθηκαν

Ομάδες τροφίμων	Περιεκτικ. σε λίπος (%)	PCDD/Fs (pg WHO-TEQ/g λίπους)	Dioxin- like PCBs (pg WHO-TEQ/g λίπους)	PCDD/Fs και PCBs (pg WHO-TEQ/g λίπους)	PCDD/Fs και PCBs (pg WHO-TEQ/g νωπού βάρους)
Γάλα (n=274)	5.96	0.39	0.24	0.62	0.04
Τυρί (n=132)	26.41	0.42	0.32	0.72	0.19
Γαλακτ. προϊόντα (n=63)	4.37	0.45	0.27	0.62	0.03
Βούτυρο (n=21)	90.83	0.50	0.34	0.83	0.76
Μοσχάρι (n=62)	10.34	0.42	0.25	0.67	0.06
Αρνί (n=68)	18.43	0.48	0.32	0.81	0.11
Χοιρινό (n=102)	18.35	0.35	0.05	0.39	0.07
Πουλερικά (n=57)	8.42	0.41	0.15	0.56	0.04
Συκώτι (n=19)	4.74	2.34	0.96	3.31	0.16
Ψάρια/ θαλασσινά (n=191)	9.77	2.22	7.61	9.68	0.71
Ελαιόλαδο (n=66)	100	0.34	0.06	0.39	0.39
Φυτικά έλαια (n=82)	99.12	0.33	0.04	0.35	0.35
Αυγά (n=76)	31.94	0.39	0.14	0.53	0.16

Στον πίνακα 24 παρουσιάζονται αναλυτικά οι μέσες (upperbound) συγκεντρώσεις, το εύρος τιμών για κάθε ομοειδές για τα προϊόντα ζωικής προέλευσης και για τα φυτικά έλαια καθώς επίσης η συνολική TEQ συγκέντρωση.

Πίνακας 24: Μέσες συγκεντρώσεις και εύρος τιμών των ομοειδών των PCDD/Fs, dioxin-like PCBs καθώς και συνολικές συγκεντρώσεις (pg WHO-TEQ g⁻¹ λίπους) στις κατηγορίες τροφίμων

	Μοσχάρι (n=62) %Λίπος:mean=10.34, median=7.65	Πουλερικά (n=57) %Λίπος: mean=8.42 median= 5.51	Χοιρινό (n=102) %Λίπος:mean=18.35 median=16.33	Αρνί (n=68) %Λίπος:mean=18.43 median=14.34	Συκώτι (n=19) % Λίπος: mean=4.74 median=4.61
	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)
2,3,7,8 - TCDD	0.10 (0.08-0.17)	0.10 (0.03-0.15)	0.10 (0.10-0.11)	0.10 (0.04-0.24)	0.10 (0.07-0.15)
1,2,3,7,8 - PeCDD	0.11 (0.08-0.29)	0.11 (0.06-0.3)	0.10 (0.10-0.19)	0.15 (0.06-1.84)	0.13 (0.08-0.30)
1,2,3,4,7,8 - HxCDD	0.16 (0.10-1.33)	0.16 (0.08-0.51)	0.12 (0.10-0.48)	0.18 (0.06-1.67)	0.65 (0.10-2.44)
1,2,3,6,7,8 - HxCDD	0.18 (0.10-1.20)	0.15 (0.07-0.43)	0.11 (0.10-0.29)	0.22(0.08-2.51)	0.45 (0.10-1.84)
1,2,3,7,8,9 - HxCDD	0.22 (0.08-2.30)	0.21 (0.08-1.86)	0.12 (0.10-0.71)	0.17 (0.10-1.01)	0.41 (0.10-1.60)
1,2,3,4,6,7,8 - HpCDD	1.11 (0.10-12.5)	0.40 (0.10-2.09)	0.40 (0.10-4.49)	1.21 (0.08-18.8)	13.95 (0.10-91.8)
OCDD	3.71 (0.15-21.5)	5.30 (0.22-26.1)	4.34 (0.15-31.1)	5.66 (0.15-72.7)	94.82 (1.64-947)
2,3,7,8 - TCDF	0.11 (0.08-0.42)	0.23 (0.03-3.66)	0.11 (0.10-0.32)	0.16 (0.04-1.77)	0.23 (0.05-2.13)
1,2,3,7,8 - PeCDF	0.13 (0.08-1.35)	0.15 (0.03-1.15)	0.12 (0.10-0.85)	0.15 (0.05-2.63)	0.12 (0.06-0.37)
2,3,4,7,8 - PeCDF	0.14 (0.08-0.55)	0.17 (0.03-2.39)	0.12 (0.10-0.70)	0.23(0.04-1.95)	3.51 (0.66-8.36)
1,2,3,4,7,8 - HxCDF	0.17 (0.10-1.00)	0.16 (0.06-0.87)	0.12 (0.10-0.57)	0.18 (0.06-0.67)	2.51 (0.10-5.00)
1,2,3,6,7,8 - HxCDF	0.17 (0.08-0.84)	0.13 (0.06-0.75)	0.11 (0.10-0.36)	0.15 (0.08-0.42)	2.29 (0.03-4.80)
2,3,4,6,7,8 - HxCDF	0.18 (0.10-1.38)	0.14 (0.08-0.89)	0.12 (0.10-0.46)	0.17 (0.07-1.19)	1.63 (0.10-4.41)

1,2,3,7,8,9 - HxCDF	0.18 (0.01-2.10)	0.19 (0.10-2.55)	0.12 (0.10-0.53)	0.13 (0.06-0.57)	0.19 (0.10-1.06)
1,2,3,4,6,7,8 - HpCDF	0.55 (0.10-7.89)	0.47 (0.04-6.36)	0.56(0.10-10.2)	0.58 (0.04-4.49)	4.16 (0.10-9.66)
1,2,3,4,7,8,9 - HpCDF	0.29 (0.07-5.49)	0.20 (0.03-1.11)	0.16 (0.10-1.88)	0.18 (0.07-1.88)	0.32 (0.10-1.74)
OCDF	1.36 (0.15-11.8)	1.51 (0.06-7.16)	1.45 (0.15-12.1)	1.03 (0.06-4.16)	2.42 (0.15-13.1)
Non-ortho PCBs					
PCB 77	3.95 (0.18-58.2)	8.93 (0.13-78.6)	1.31 (0.10-9.36)	4.98 (0.15-64.6)	7.99 (0.79-108)
PCB 81	0.69 (0.10-19.6)	0.70 (0.10-7.51)	0.15 (0.10-1.22)	0.53 (0.10-3.86)	0.65 (0.08-3.10)
PCB 126	2.14 (0.10-8.07)	1.18 (0.10-7.75)	0.33 (0.10-2.34)	2.49 (0.29-8.90)	8.89 (0.06-27.8)
PCB 169	0.74 (0.10-5.17)	0.61 (0.10-7.43)	0.47 (0.10-9.91)	2.07 (0.10-23.0)	1.94 (0.06-10.9)
Mono-ortho PCBs					
PCB 105	67.62 (4.32-468)	103.11 (8.17-1921)	35.95 (2.00-1024)	110.14 (10.6-941)	90.3 (18.4-296)
PCB 114	7.88 (2.00-175)	6.73 (2.00-142)	4.31 (2.00-64.9)	7.00 (2.00-45.2)	4.20 (2.00-15.2)
PCB 118	295(19.6-1607)	294 (26.8-4750)	105 (2.00-1133)	254 (36.1-2875)	318 (52.6-1509)
PCB 123	202 (2.00-900)	82.9 (4.36-562)	49.4 (2.00-1497)	53.0 (2.63-429)	72.1 (6.13-170)
PCB 156	51.2 (2.81-254)	50.8 (2.00-668)	23.4 (2.00-250)	54.0 (2.55-274)	40.4 (7.05-150)
PCB 157	13.8 (2.00-112)	38.4 (2.00-706)	12.7 (2.00-250)	20.5 (2.00-88.8)	23.6 (2.57-92.9)
PCB 167	22.5 (2.00-98.4)	25.1 (2.00-223)	22.3 (2.00-181)	19.8 (2.13-456)	30.9 (2.08-98.6)
PCB 189	5.43 (2.00-23.5)	5.32 (2.00-52.0)	2.91 (2.00-17.1)	8.03 (2.00-86.6)	5.40 (2.00-29.8)

Συγκ. TEQ PCDD/F	0.42 (0.32-1.19)	0.41 (0.18-1.53)	0.35 (0.32-0.60)	0.48 (0.21-2.40)	2.34 (1.02-4.22)
Συγκ. TEQ PCDD/F (median)	0.34	0.35	0.32	0.36	2.45
Συγκ. TEQ PCB	0.25 (0.02-0.87)	0.15 (0.02-0.90)	0.05 (0.01-0.44)	0.32 (0.04-1.61)	0.96 (0.01-2.83)
Συγκ. TEQ PCB (median)	0.18	0.09	0.03	0.24	0.99
Συνολ. Συγκ. TEQ	0.67 (0.33-1.85)	0.56 (0.33-2.12)	0.39 (0.32-0.83)	0.81 (0.36-2.99)	3.31 (1.12-7.05)
Συνολ. Συγκ. TEQ (median)	0.53	0.43	0.36	0.62	3.25

	Αυγά (n=76) %Λίπος : mean=31.94 median=32.83	Γάλα (n=274) %Λίπος : mean=5.96 median=5.01	Τυρί (n=132) %Λίπος : mean=26.41 median=26.52	Γαλακτ. προϊόντα (n=63) %Λίπος : mean=4.37 median=3.47
	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)
2,3,7,8 - TCDD	0.10 (0.07-0.18)	0.10 (0.07-0.36)	0.10 (0.08-0.20)	0.10 (0.01-0.12)
1,2,3,7,8 - PeCDD	0.11 (0.08-0.48)	0.11 (0.10-0.69)	0.12 (0.10-0.44)	0.12 (0.01-0.28)
1,2,3,4,7,8 - HxCDD	0.13 (0.07-1.14)	0.13 (0.10-1.34)	0.13 (0.06-0.66)	0.23 (0.01-1.43)
1,2,3,6,7,8 - HxCDD	0.13 (0.06-0.49)	0.15 (0.10-2.21)	0.16 (0.10-1.21)	0.22 (0.01-0.72)

1,2,3,7,8,9 - HxCDD	0.13 (0.07-0.48)	0.14 (0.10-3.24)	0.12 (0.10-0.58)	0.27 (0.01-2.43)
1,2,3,4,6,7,8 - HpCDD	0.56 (0.06-4.60)	0.61 (0.10-6.18)	0.45 (0.10-5.38)	0.78 (0.01-4.47)
OCDD	4.78 (0.15-25.7)	2.65 (0.15-142)	3.37(0.15-33.2)	4.35 (0.02-36.0)
2,3,7,8 - TCDF	0.21 (0.05-2.02)	0.12 (0.08-0.93)	0.15 (0.07-3.31)	0.12 (0.01-0.33)
1,2,3,7,8 - PeCDF	0.13 (0.05-1.20)	0.11 (0.08-1.52)	0.11 (0.07-0.49)	0.12 (0.01-0.35)
2,3,4,7,8 - PeCDF	0.15 (0.07-1.31)	0.17 (0.07-2.48)	0.24 (0.10-1.32)	0.15 (0.01-0.38)
1,2,3,4,7,8 - HxCDF	0.14 (0.06-0.66)	0.15 (0.06-1.68)	0.16 (0.10-1.30)	0.16 (0.01-0.57)
1,2,3,6,7,8 - HxCDF	0.12 (0.05-0.25)	0.14 (0.06-1.86)	0.15 (0.10-0.99)	0.18 (0.01-0.69)
2,3,4,6,7,8 - HxCDF	0.15 (0.07-1.09)	0.13 (0.08-1.69)	0.15 (0.10-1.49)	0.21 (0.01-1.40)
1,2,3,7,8,9 - HxCDF	0.16 (0.10-2.18)	0.13 (0.09-1.36)	0.13 (0.10-0.86)	0.22 (0.01-1.32)
1,2,3,4,6,7,8 - HpCDF	0.48 (0.03-5.07)	0.35 (0.08-5.26)	0.35 (0.10-7.07)	0.45 (0.01-4.68)
1,2,3,4,7,8,9 - HpCDF	0.19 (0.05-1.21)	0.14 (0.10-1.51)	0.16 (0.09-1.34)	0.39 (0.03-5.23)
OCDF	1.99 (0.13-14.0)	0.91 (0.10-10.0)	0.93 (0.11-8.56)	2.19 (0.04-9.19)
Non-ortho PCBs				
PCB 77	8.94 (0.16-107)	3.06 (0.10-49.0)	4.59 (0.09-138)	6.83 (0.92-64.5)
PCB 81	1.17 (0.10-32.0)	0.34 (0.09-4.29)	0.58 (0.08-7.64)	0.63 (0.10-3.99)
PCB 126	1.07 (0.10-22.9)	2.09 (0.17-17.4)	2.74 (0.06-30.1)	2.32 (0.22-6.70)
PCB 169	0.69 (0.10-6.19)	0.63 (0.10-9.27)	0.89 (0.10-8.91)	0.71 (0.10-3.25)

Mono-ortho PCBs				
PCB 105	71.2 (2.00-1559)	77.8 (2.17-3325)	141 (8.15-2419)	98.1 (12.32-408)
PCB 114	8.82 (2.00-301)	5.87 (2.00-256)	9.92 (2.00-149)	6.46 (2.00-38.8)
PCB 118	186 (3.37- 4467)	222 (6.87-8222)	430 (17.19-6590)	322 (54.95-1500)
PCB 123	61.0 (2.00-759)	59.8 (2.00-1580)	124.2 (2.00-1188)	67.2 (2.00-774)
PCB 156	25.6 (2.00-508)	33.0 (2.00-1195)	62.0 (4.22-731)	42.5 (8.48-161)
PCB 157	13.0 (2.00-135)	7.97 (2.00-228)	13.6 (2.00-177)	7.39 (2.00-39.0)
PCB 167	15.9 (2.00-324)	13.9 (2.00-386)	33.7 (2.65-480)	21.6 (4.54-81.4)
PCB 189	3.80 (2.00-42.6)	3.46 (1.76-34.6)	5.95 (2.00-65.3)	4.30 (2.00-13.7)
Συγκ. TEQ PCDD/F	0.39 (0.24-1.42)	0.39 (0.32-1.76)	0.42 (0.32-1.61)	0.45 (0.03-0.83)
Συγκ. TEQ PCDD/F (median)	0.34	0.35	0.36	0.37
Συγκ. TEQ PCB	0.14 (0.02-2.68)	0.24 (0.02-1.92)	0.32 (0.01-3.53)	0.27 (0.04-0.72)
Συγκ. TEQ PCB (median)	0.05	0.21	0.23	0.24
Συνολ. Συγκ. TEQ	0.53 (0.33-3.46)	0.62(0.32-3.09)	0.72 (0.32-4.52)	0.62 (0.17-1.20)
Συνολ. Συγκ. TEQ (median)	0.40	0.58	0.59	0.55

	Βούτυρο (n=21) %Λίπος: mean=90.83 median=96.46	Φυτικά έλαια (n=82) %Λίπος: mean=99.12 median=100	Ελαιόλαδο (n=76) %Λίπος: mean=31.94 median=32.83	Ψάρια/θαλασσινά (n=191) %Λίπος: mean=9.77 median=9.36
	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)
2,3,7,8 - TCDD	0.11 (0.06-0.24)	0.10 (0.06-0.17)	0.10 (0.06-0.20)	0.27 (0.10-3.86)
1,2,3,7,8 - PeCDD	0.13 (0.07-0.71)	0.10 (0.10-0.14)	0.11 (0.07-0.43)	0.46 (0.10-6.85)
1,2,3,4,7,8 - HxCDD	0.14 (0.10-0.36)	0.12 (0.10-0.34)	0.11 (0.06-0.31)	0.24 (0.10-5.74)
1,2,3,6,7,8 - HxCDD	0.22 (0.09-2.21)	0.12 (0.10-0.33)	0.12 (0.06-0.66)	0.25 (0.10-3.52)
1,2,3,7,8,9 - HxCDD	0.19 (0.10-0.96)	0.13 (0.10-0.37)	0.13 (0.06-1.45)	0.22 (0.08-4.65)
1,2,3,4,6,7,8 - HpCDD	1.19 (0.10-8.82)	0.34 (0.10-6.19)	0.26 (0.10-1.52)	1.11 (0.10-59.5)
OCDD	1.86 (0.15-8.74)	7.29 (0.15-248)	2.51 (0.15-34.5)	8.15 (0.15-255)
2,3,7,8 - TCDF	0.12 (0.05-0.42)	0.10 (0.06-0.15)	0.11 (0.10-0.68)	4.94 (0.10-55.2)
1,2,3,7,8 - PeCDF	0.12 (0.05-0.32)	0.10 (0.10-0.31)	0.10 (0.07-0.12)	0.79 (0.10-5.73)
2,3,4,7,8 - PeCDF	0.28 (0.10-0.85)	0.10 (0.08-0.12)	0.11 (0.06-0.21)	2.62 (0.10-30.2)
1,2,3,4,7,8 - HxCDF	0.27 (0.09-1.13)	0.11 (0.10-0.23)	0.10 (0.06-0.22)	0.24 (0.10-4.40)
1,2,3,6,7,8 - HxCDF	0.21 (0.10-0.68)	0.11 (0.10-0.19)	0.11 (0.06-0.57)	0.21 (0.09-1.88)
2,3,4,6,7,8 - HxCDF	0.24 (0.10-0.94)	0.11 (0.10-0.23)	0.12 (0.06-0.64)	0.25 (0.08-2.81)
1,2,3,7,8,9 - HxCDF	0.14 (0.10-0.38)	0.12 (0.10-0.35)	0.11 (0.06-0.29)	0.19 (0.10-2.72)
1,2,3,4,6,7,8 - HpCDF	0.67 (0.10-1.84)	0.17 (0.08-0.65)	0.15 (0.06-0.62)	0.56 (0.10-18.5)

1,2,3,4,7,8,9 - HpCDF	0.11 (0.09-0.23)	0.18 (0.10-1.23)	0.13 (0.08-0.45)	0.34 (0.10-9.13)
OCDF	0.19 (0.15-0.40)	1.55 (0.11-16.8)	0.97 (0.15-10.5)	1.92 (0.15-16.7)
Non-ortho PCBs				
PCB 77	1.86 (0.33-10.6)	1.64 (0.29-12.7)	2.30 (0.42-17.9)	188 (4.31-1200)
PCB 81	0.43 (0.10-2.68)	0.29 (0.10-2.24)	0.23 (0.10-3.69)	9.34 (0.10-150)
PCB 126	2.94 (0.13-8.49)	0.25 (0.06-1.26)	0.36 (0.08-3.08)	65.0 (2.66-614)
PCB 169	1.40 (0.28-5.03)	0.17 (0.06-1.21)	0.15 (0.07-1.39)	17.3 (0.41-177)
Mono-ortho PCBs				
PCB 105	104 (15.5-225)	50.8 (2.00-969)	125 (2.00-2417)	4077 (59.0-25134)
PCB 114	7.44 (2.00-15.1)	4.01 (2.00-54.2)	93.0 (2.00-2504)	206 (2.00-1691)
PCB 118	357 (50.5-724)	66.2 (2.76-469)	170 (3.71-2473)	10841 (160-68591)
PCB 123	57.6 (2.00-298)	37.6 (2.00-693)	124 (2.00-2390)	2239 (24.5-42815)
PCB 156	60.8 (11.5-132)	27.8 (2.00-536)	121 (2.00-3278)	1670 (16.1-15083)
PCB 157	9.00 (2.69-16.3)	25.3 (2.00-536)	14.8 (2.00-525)	453 (3.49-9244)
PCB 167	27.4 (3.58-64.8)	17.4 (2.00-349)	11.6 (2.00-307)	1315 (10.9-12245)
PCB 189	6.60 (2.00-9.64)	23.35 (2.00-544)	4.90 (2.00-73.2)	195 (2.00-2235)
Συγκ. TEQ PCDD/F	0.50 (0.27-1.16)	0.33 (0.30-0.50)	0.34 (0.22-0.69)	0.16 (0.00-1.15)*
Συγκ. TEQ PCDD/F (median)	0.43	0.32	0.32	0.12*

Συγκ. TEQ PCB	0.34 (0.03-0.68)	0.04 (0.01-0.14)	0.06 (0.01-0.40)	0.52 (0.00-3.60)
Συγκ. TEQ PCB (median)	0.36	0.02	0.03	0.40*
Συνολ. Συγκ. TEQ	0.83 (0.32-1.51)	0.35 (0.32-0.57)	0.39 (0.24-0.87)	0.71 (0.01-4.74)*
Συνολ. Συγκ. TEQ (median)	0.83	0.33	0.35	0.56*

* Συγκεντρώσεις σε $\mu\text{g g}^{-1}$ νωπού βάρους

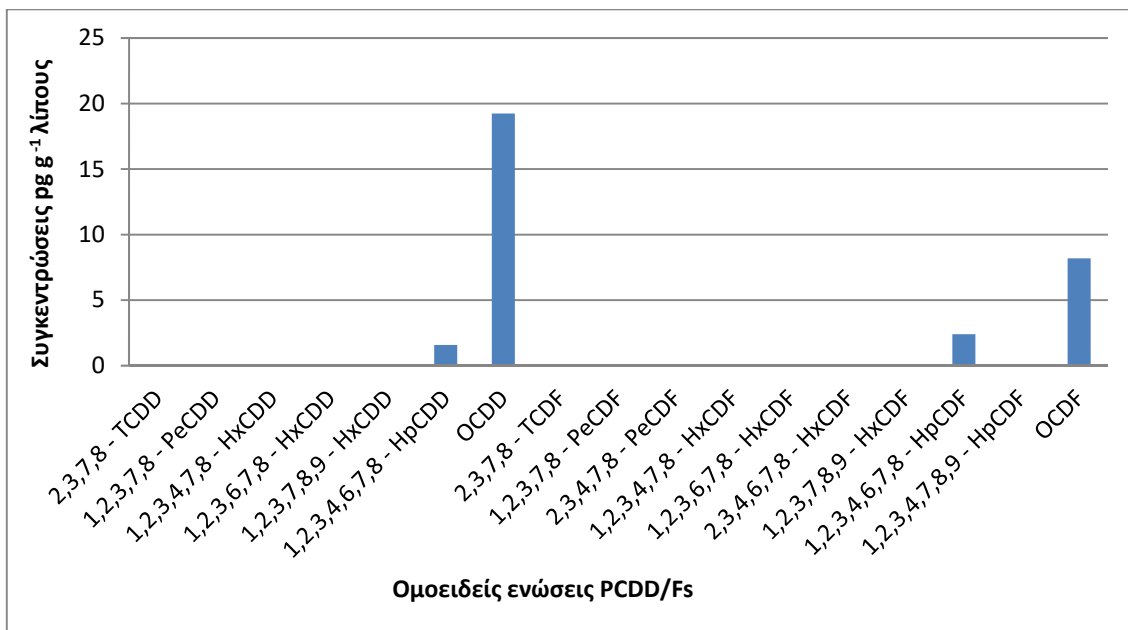
Όπως φαίνεται στους πίνακες 23 και 24 τα επίπεδα των PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs στα προϊόντα τροφίμων είναι χαμηλά σχετικά, γεγονός αναμενόμενο, γιατί η Ελλάδα δεν είναι βιομηχανικά πολύ ανεπτυγμένη χώρα και δεν εφαρμόζει την αποτέφρωση ως συστηματική μέθοδο διαχείρισης απορριμάτων. Κύρια πηγή έκλυσης διοξινίων αποτελούν οι τυχαίες ή παράνομες καύσεις στερεών αποβλήτων σε εξωτερικούς χώρους, οι πυρκαγιές σε χώρους υγειονομικής ταφής απορριμάτων, οι πυρκαγιές σε αγροτικές ή βιομηχανικές περιοχές καθώς και η λειτουργία βιομηχανικών μονάδων, ιδιαίτερα αυτών που λαμβάνουν χώρα διεργασίες υψηλών θερμοκρασιών π.χ. τσιμεντοβιομηχανίες (ή μεταλλουργίες)²⁶. Υψηλά επίπεδα, που ξεπερνούν τα Ευρωπαϊκά όρια σε δείγματα τροφίμων ζωϊκής προέλευσης έχουν αναφερθεί μετά από τέτοια περιστατικά¹⁸³. Τα συγκεκριμένα προϊόντα δεσμεύτηκαν και καταστράφηκαν από τις εθνικές αρχές προκειμένου να αποφευχθεί η έκθεση του πληθυσμού.

11.2.1 Προφίλ συγκεντρώσεων ομοειδών ενώσεων των PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs

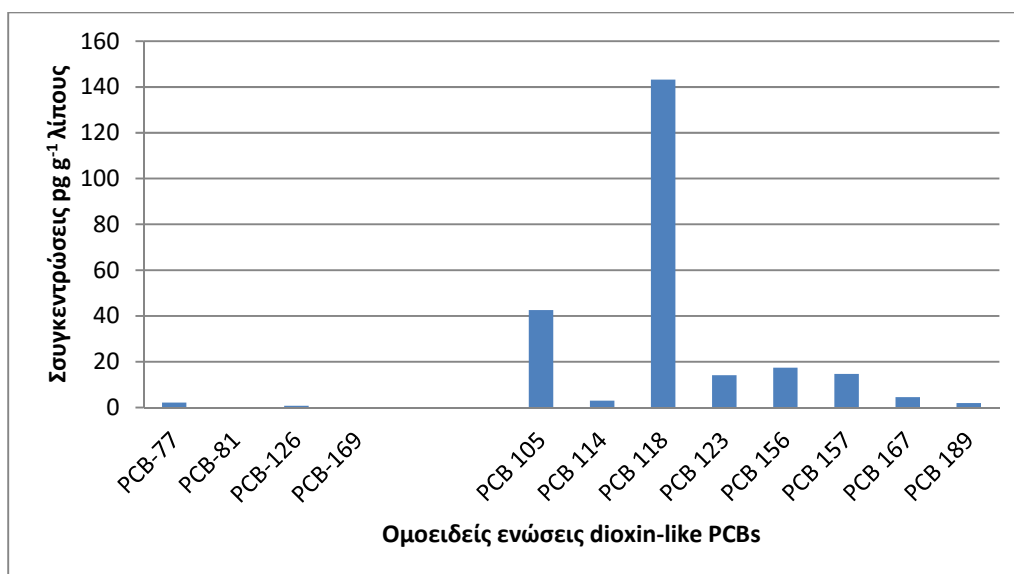
Η κατανομή των συγκεντρώσεων των ομοειδών PCDDs, PCDFs και PCBs μελετήθηκε στις διάφορες κατηγορίες τροφίμων. Τα σχήματα 27-31 αναπαριστούν ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα από δύο ομάδες τροφίμων: γάλα και ψάρια/θαλασσινά.

Για τα δείγματα γάλακτος, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD/F, OCDD και OCDF είναι οι πιο επικρατείς ομοειδείς ενώσεις. Για την κατηγορία ψάρια/θαλασσινά, τα ομοειδή σε μεγαλύτερη αφθονία είναι: 2,3,7,8-TCDF, 1,2,3,7,8-PeCDF, 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD, OCDD και OCDF.

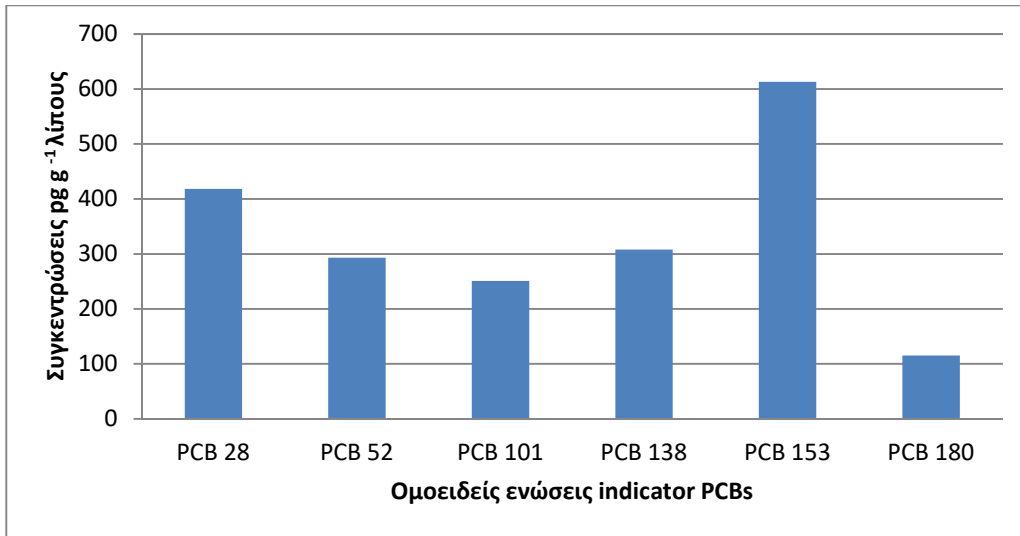
Όσον αφορά στα dioxin-like PCBs, έχουν κοινό προφίλ σε όλες τις κατηγορίες τροφίμων. Στα σχήματα 28 και 31, τα PCB 105 και PCB 118 διακρίνονται ως τα κυρίαρχα dioxin-like PCBs.



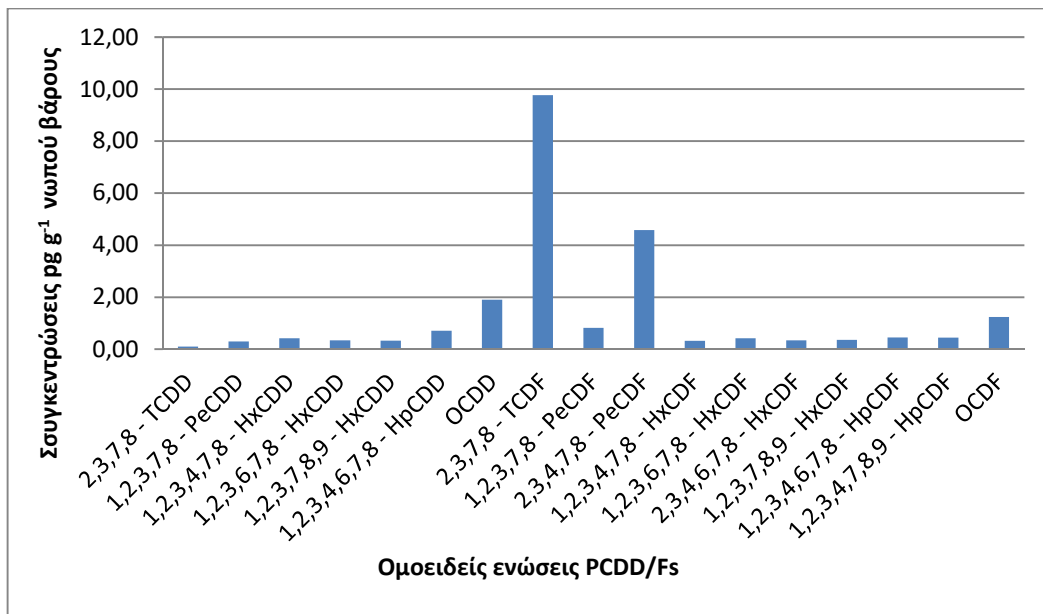
Σχήμα 27: Προφίλ συγκεντρώσεων PCDDs και PCDFs για αντιπροσωπευτικό δείγμα γάλακτος



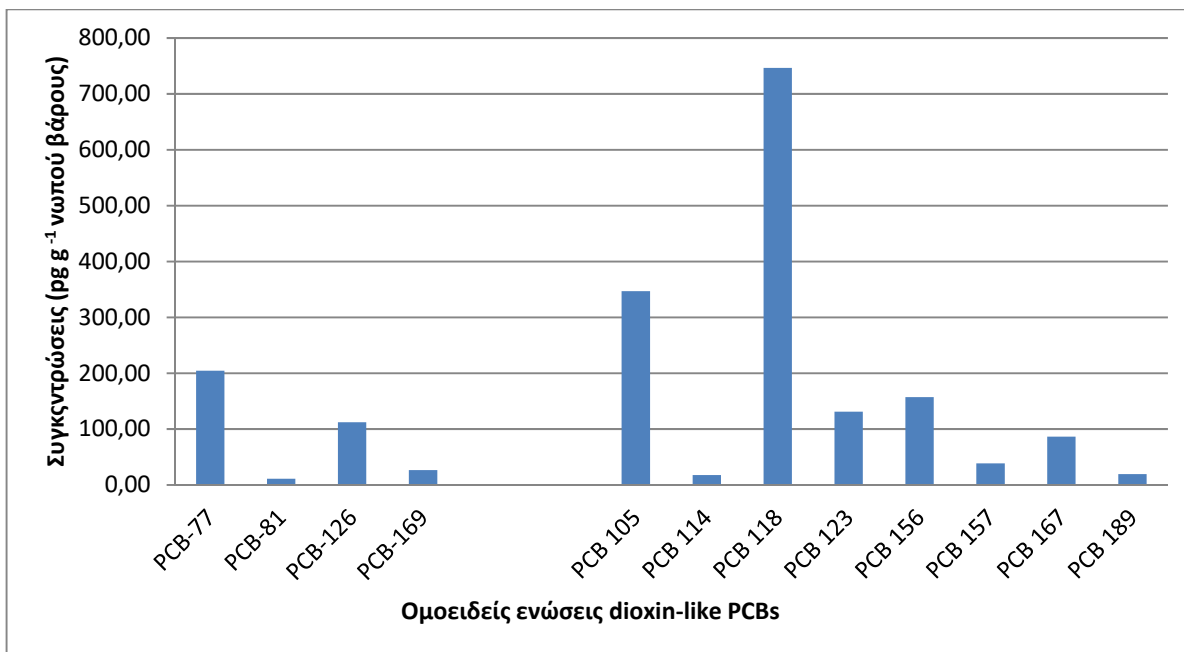
Σχήμα 28: Προφίλ συγκεντρώσεων dioxin-like PCBs για αντιπροσωπευτικό δείγμα γάλακτος



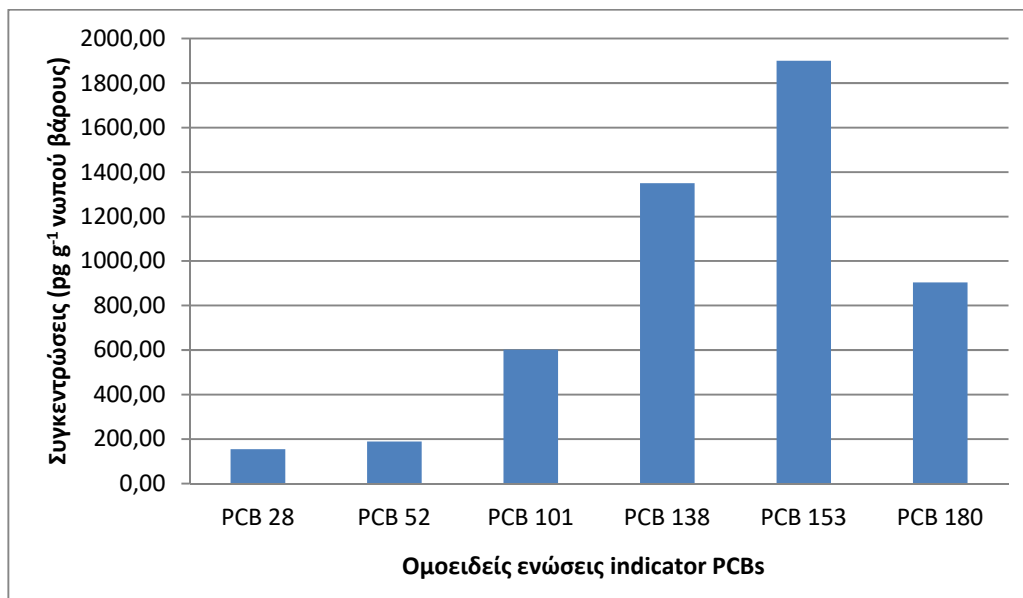
Σχήμα 29: Προφίλ συγκεντρώσεων indicator-PCBs για αντιπροσωπευτικό δείγμα γάλακτος



Σχήμα 30: Προφίλ συγκεντρώσεων PCDDs και PCDFs για αντιπροσωπευτικό δείγμα της κατηγορίας ψάρια/θαλασσινά



Σχήμα 31: Προφίλ συγκεντρώσεων dioxin-like PCBs για αντιπροσωπευτικό δείγμα της κατηγορίας ψάρια/ θαλασσινά



Σχήμα 32: Προφίλ συγκεντρώσεων indicator PCBs για αντιπροσωπευτικό δείγμα της κατηγορίας ψάρια/θαλασσινά

11.3 Μέσες συγκεντρώσεις των indicator PCBs που προσδιορίστηκαν στα τρόφιμα από την Ελληνική αγορά

Τα αναλυτικά αποτελέσματα ανά κατηγορία τροφίμων για το άθροισμα των 6 indicator PCBs (PCB 28, 52, 101, 138, 153 και 180), παρουσιάζονται στον πίνακα 25 και εκφράζονται σε ng g^{-1} λίπους και σε ng g^{-1} νωπού βάρους. Με φθίνουσα σειρά, οι συγκεντρώσεις των indicator PCBs στις διάφορες κατηγορίες τροφίμων έχουν ως εξής:

Ψάρια/θαλασσινά (5.25 ng g^{-1} νωπού βάρους), συκώτι (5.21 ng g^{-1} λίπους), αρνί (3.94 ng g^{-1} λίπους), πουλερικά (2.96 ng g^{-1} λίπους), τυρί (2.72 ng g^{-1} λίπους), ελαιόλαδο (2.55 ng g^{-1} λίπους), μοσχάρι (2.48 ng g^{-1} λίπους), φυτικά έλαια (2.37 ng g^{-1} λίπους) και χοιρινό (1.86 ng g^{-1} λίπους). Η χαμηλότερη συγκέντρωση σημειώθηκε στα αυγά (1.56 ng g^{-1} λίπους).

Πίνακας 25: Μέσες WHO-TEQ συγκεντρώσεις των indicator PCBs για τα προϊόντα τροφίμων που αναλύθηκαν

Ομάδες Τροφίμων	Περιεκτικότητα σε λίπος (%)	Indicator PCBs (ng/g λίπους)	Indicator PCBs (ng/g νωπού βάρους)
Γάλα (n=274)	5.96	2.14	0.21
Τυρί (n=132)	26.41	2.72	0.55
Γαλακτ. προϊόντα (n=63)	4.37	-	-
Βούτυρο (n=21)	90.83	-	-
Μοσχάρι (n=62)	10.34	2.48	0.20
Αρνί (n=68)	18.43	3.94	1.56
Χοιρινό (n=102)	18.35	1.86	0.27
Πουλερικά (n=57)	8.42	2.96	0.22
Συκώτι (n=19)	4.74	5.21	0.25
Ψάρια/θαλασσινά (n=191)	9.77	86.77	5.25
Ελαιόλαδο (n=66)	100	2.55	2.55
Φυτικά έλαια (n=82)	99.12	2.37	2.37
Αυγά (n=76)	31.94	1.56	0.51

Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχουν αναλυτικά δεδομένα για τα indicator PCBs για την ομάδα του γάλακτος του βουτύρου.

Στον πίνακα 26 παρουσιάζονται αναλυτικά οι μέσες (upperbound) συγκεντρώσεις, το εύρος τιμών για τα προϊόντα ζωϊκής προέλευσης και για τα φυτικά έλαια για κάθε ομοειδές των indicator PCBs καθώς επίσης και οι συνολικές συγκεντρώσεις τους.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 26, τα επίπεδα των indicator PCBs είναι σχετικά χαμηλά. Το γεγονός αυτό σχετίζεται πιθανώς με το ότι δε χρησιμοποιήθηκαν ευρέως μετασχηματιστές με PCBs λόγω του υψηλού κόστους.

Πίνακας 26: Μέσες συγκεντρώσεις (ng g⁻¹ λίπους) των ομοειδών indicator PCBs στα προϊόντα τροφίμων

	Μοσχάρι (n=62) %Λίπος: mean=10.34, median=7.65	Πουλερικά (n=57) %Λίπος: mean=8.42 median= 5.51	Χοιρινό (n=102) %Λίπος: mean=18.35 median=16.33	Πρόβειο (n=68) %Λίπος: mean=18.43 median=14.34	Συκώτι (n=19) %Λίπος: mean=4.74 median=4.61
Ind. PCBs	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)
PCB 28	0.16 (0.03-0.77)	0.43 (0.00-2.38)	0.19 (0.02-1.38)	0.87 (0.03-29.0)	0.23 (0.08-0.79)
PCB 52	0.22 (0.01-1.00)	0.43 (0.02-2.17)	0.25 (0.01-2.31)	0.46 (0.01-8.64)	0.24 (0.02-0.74)
PCB 101	0.26 (0.02-1.20)	0.39 (0.01-1.50)	0.27 (0.02-3.98)	0.44 (0.03-4.97)	0.22 (0.03-0.59)
PCB 138	0.67 (0.14-2.31)	0.57 (0.00-2.75)	0.48 (0.01-9.02)	0.58 (0.08-10.4)	1.53 (0.03-3.58)
PCB 153	0.79 (0.08-2.46)	0.85 (0.00-3.63)	0.56 (0.00-12.3)	1.23 (0.09-18.5)	2.10 (0.00-5.06)
PCB 180	0.40 (0.05-1.53)	0.31 (0.00-1.60)	0.13 (0.00-2.00)	0.36 (0.00-2.69)	0.90 (0.13-2.00)
Συγκ. indicator PCBs	2.48 (0.34-6.92)	2.96 (0.37-10.3)	1.86 (0.16-30.3)	3.94 (0.45-39.0)	5.21 (0.80-10.8)
Συγκ. indicator PCBs (median)	1.98	2.30	1.04	2.03	3.49

	Αυγά (n=76)	Γάλα (n=274)	Τυρί (n=132)
	%Λίπος: mean=31.94 median=32.83	%Λίπος: mean=5.96 median=5.01	%Λίπος: mean=26.41 median=26.52
Indicator PCBs	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)
PCB 28	0.44 (0.01-3.58)	0.55(0.00-13.8)	0.49 (0.10-5.32)
PCB 52	0.19 (0.01-1.58)	0.34 (0.00-3.28)	0.28 (0.01-4.33)
PCB 101	0.16 (0.01-0.62)	0.21 (0.00-2.03)	0.47 (0.02-11.1)
PCB 138	0.25 (0.01-0.68)	0.34 (0.01-2.52)	0.61 (0.04-12.4)
PCB 153	0.35 (0.00-1.29)	0.51 (0.00-2.64)	0.60 (0.03-5.18)
PCB 180	0.16 (0.00-0.71)	0.20 (0.00-1.53)	0.26 (0.03-2.76)
Συγκ. Indicator PCBs	1.56 (0.06-6.43)	2.14 (0.04-25.3)	2.72 (0.32-4.64)
Συγκ. Indicator PCBs (median)	1.16	1.51	1.78

	Φυτικά έλαια (n=82)	Ελαιόλαδο (n=76)	Ψάρια/θαλασσινά (n=191)
	%Λίπος: mean=99.12 median=100	%Λίπος: mean=31.94 median=32.83	% Λίπος: mean=9.77 median=9.36
Indicator PCBs	Mean (min-max)	Mean (min-max)	Mean (min-max)
PCB 28	0.34 (0.00-5.28)	0.30 (0.01-2.22)	3.47 (0.15-21.1)
PCB 52	0.99 (0.01-18.2)	0.23 (0.01-3.30)	4.12 (0.07-15.2)
PCB 101	0.23 (0.01-1.70)	0.41 (0.01-6.14)	9.96 (0.15-45.4)
PCB 138	0.20 (0.02-0.88)	0.61 (0.00-18.3)	26.0 (0.45-218)
PCB 153	0.53 (0.00-6.54)	0.71 (0.01-18.4)	31.0 (0.00-227)
PCB 180	0.08 (0.00-0.48)	0.25 (0.00-4.38)	12.2 (0.03-122)
Συγκ. indicator PCBs	2.37 (0.08-33.1)	2.55 (0.08-7.55)	5.25 (0.04-26.0)*
Συγκ. indicator PCBs (median)	1.04	0.84	4.50*

* Συγκεντρώσεις σε ng g⁻¹ νωπού βάρους

11.3.1 Προφίλ συγκεντρώσεων ομοειδών ενώσεων των indicator PCBs

Στα σχήματα 29 και 32, παρουσιάζεται η κατανομή των ομοειδών των indicator PCBs από δύο αντιπροσωπευτικά δείγματα: ένα της κατηγορίας ψάρια/θαλασσινά και ένα δείγμα γάλακτος. Στην πρώτη ομάδα, σε υψηλότερα επίπεδα βρίσκονται τα PCB 138 και PCB 153, ενώ στη δεύτερη τα PCB 28 και PCB 153.

11.4 Επίπεδα συνολικής ημερήσιας πρόσληψης του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας σε PCDDs, PCDFs και PCBs

Η εκτιμώμενη μέση διατροφική έκθεση σε PCDDs, PCDFs, dioxin-like PCBs και indicator PCBs παρουσιάζεται στον πίνακα 27.

Πίνακας 27: Υπολογισμός ημερήσιας πρόσληψης σε PCDDs, PCDFs και PCBs

Ομάδα τροφίμων	Ημερήσια κατά κεφαλήν μέση διαθεσιμότητα (g/kg σωμα. βάρους/ημέρα)	PCDD/Fs και PCBs (pg WHO-TEQ/g νωπού βάρους)*	Ind. - PCBs (ng/g νωπού βάρους)	Ημερήσια πρόσληψη σε PCDD/Fs και PCBs (pg/kg σωμα. βάρους/ημέρα)	Ημερήσια πρόσληψη σε Ind.- PCBs (ng/kg σωμα. βάρους/ημέρα)
Γάλα	2.66	0.04	0.21	0.11	0.56
Τυρί	0.74	0.19	0.55	0.14	0.41
Γαλακτ. προϊόντα	0.44	0.03		0.01	
Βούτυρα	0.01	0.76		0.01	
Ελαιόλαδο	0.96	0.39	2.55	0.37	2.44
Φυτικά έλαια	0.26	0.34	2.37	0.09	0.61
Μοσχάρι	0.66	0.06	0.20	0.04	0.13
Αρνί	0.27	0.11	1.56	0.03	0.42
Χοιρινό	0.41	0.07	0.27	0.03	0.11
Πουλερικά	0.60	0.04	0.22	0.02	0.13
Συκώτι	0.02	0.16	0.25	0.003	0.004
Ψάρια/ θαλασσινά	0.57	0.71	5.25	0.41	3.00
Αυγά	0.07	0.16	0.51	0.01	0.03

Συνολική ημερήσια πρόσληψη	1.27 (pg WHO-TEQ/kg σωματ. βάρους)	7.85 (ng/kg σωματ. βάρους)
Συνολική εβδομαδιαία πρόσληψη	8.89 (pg WHO-TEQ/kg σωματ. βάρους)	54.95 (ng/kg σωματ. βάρους)

*Σύνολο των μέσων upperbound συγκεντρώσεων που μετρήθηκαν

Για τον ενήλικο πληθυσμό της Ελλάδας, η μέση ημερήσια πρόσληψη σε PCDD/Fs και dioxin-like PCBs είναι **1.27** pg WHO-TEQ ανά κιλό σωματικού βάρους (kg^{-1} body weight), ενώ η μέση ημερήσια πρόσληψη σε indicator PCBs υπολογίστηκε στο **7.85** ng ανά κιλό σωματικού βάρους. Για τις PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs, τα επίπεδα έκθεσης είναι στο χαμηλό άκρο του εύρους τιμών ανεκτής ημερήσιας πρόσληψης (TDI) που προτείνεται από τον Π.Ο.Υ.⁴⁴ το οποίο είναι 1-4 pg WHO-TEQ kg^{-1} σωματικού βάρους και κάτω από τις τιμές της εβδομαδιαίας ή μηνιαίας πρόσληψης που έχουν προταθεί από άλλους φορείς.

Πρόσφατα η επιστημονική επιτροπή της EFSA πρότεινε τα 2 pg WHO-TEQ kg^{-1} σωματικού βάρους εβδομ.⁻¹, ως το ανεκτό εβδομαδιαίο όριο για τη διατροφική πρόσληψη σε PCDD/Fs και dioxin-like PCBs. Η σημαντική μείωση του ορίου πρόσληψης βασίστηκε σε νεότερα δεδομένα επιδημιολογικών μελετών. Πιο συγκεκριμένα, η αξιολόγηση του κινδύνου στον άνθρωπο βασίστηκε στις επιδράσεις που παρατηρήθηκαν στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του σπέρματος μετά από έκθεση των αγοριών σε PCDD/Fs κατά την προγεννητική περίοδο, καθώς επίσης και σε μεταγενέστερα στάδια.

Κατόπιν συλλογής μεγάλου όγκου δεδομένων για συγκεντρώσεις των ενώσεων αυτών σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων και δεδομένων κατανάλωσης από πληθώρα Ευρωπαϊκών χωρών, η μέση διατροφική πρόσληψη για όλες τις ηλικιακές ομάδες κυμαίνεται από 2.1 έως 10.5 pg TEQ kg^{-1} σωματικού βάρους εβδομ.⁻¹, ενώ η διατροφική έκθεση για τον πιο επιβαρυσμένο πληθυσμό (P95) κυμαίνεται από 5.3 έως 30.4 pg TEQ kg^{-1} σωματικού βάρους εβδομ.⁻¹. Αξιοσημείωτη είναι η

υπέρβαση του ορίου εβδομαδιαίας πρόσληψης (TWI) σε διοξίνες και παρόμοιες ενώσεις σε όλες τις χώρες που περιλαμβάνονται στη μελέτη της EFSA⁴⁷. Υπέρβαση του προτεινόμενου εβδομαδιαίου ορίου παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη, όπως φαίνεται στον πίνακα 27. Προκειμένου να γίνει πιο αξιόπιστη η αξιολόγηση της επικινδυνότητας για την υγεία τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων και να ελαττωθούν οι πηγές αβεβαιότητας στην εκτίμηση της έκθεσης, στη γνωμοδότηση της EFSA προτείνονται:

- Επαναξιολόγηση των συντελεστών τοξικής ισοδυναμίας για κάθε ομοειδές ξεχωριστά, η οποία πρέπει να λάβει υπόψιν νέα in vivo και in vitro δεδομένα, ειδικά για το PCB 126.
- Περαιτέρω βελτίωση των τοξικοκινητικών μοντέλων που χρησιμοποιούνται στις σχετικές μελέτες.
- Συνέχιση των αναλύσεων και της συλλογής δεδομένων για τα επίπεδα στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές, συμπεριλαμβάνοντας ενδεχομένως και προϊόντα φυτικής προέλευσης.
- Επανεξέταση της σχέσης ωφέλους και επικινδυνότητας για την υγεία από την κατανάλωση ψαριών λαμβάνοντας υπόψη τα επίπεδα διοξινών και παρόμοιων ενώσεων.

Το 2005, η EFSA υπολόγισε για τον πληθυσμό της Ευρώπης, ότι η διατροφική έκθεση στο σύνολο των 6 indicator PCBs κυμαίνεται στα 15 ng ανά kg σωματ. βάρους ανά ημέρα για ενήλικες με μέση κατανάλωση κρέατος^{179,184} με εύρος 4.3-25.7 ng kg⁻¹ σωματ. βάρους ημέρα⁻¹. Ωστόσο δεν έχει θεσπιστεί ανώτατο όριο ημερήσιας πρόσληψης από κάποιον επιστημονικό φορέα για την προστασία της υγείας από τα indicator PCBs¹⁸⁴. Για τον ενήλικο γενικό πληθυσμό της Ελλάδας υπολογίστηκαν χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης από τον αντίστοιχο στην Ευρώπη (7.85 ng kg⁻¹ σωματ. βάρους ημέρα⁻¹). Συγκριτικά με τη Δημοκρατία της Σλοβακίας (17.0 ng kg⁻¹ σωματ. βάρους ημέρα⁻¹) η έκθεση του Ελληνικού πληθυσμού είναι αρκετά χαμηλότερη και συγκρίσιμη με τα επίπεδα έκθεσης που έχουν υπολογιστεί για τον πληθυσμό του Βελγίου (6.05 ng kg⁻¹ σωματ. βάρους ημέρα⁻¹),

της Γαλλίας (7.70 ng kg^{-1} σωμ. βάρους ημέρα⁻¹) και της Ιταλίας (10.9 ng kg^{-1} σωμ. βάρους ημέρα⁻¹) (Πίνακας 28).

Πίνακας 28: Συνοπτικός πίνακας της διατροφικής έκθεσης σε indicator PCBs για το χρονικό διάστημα 2002-2016

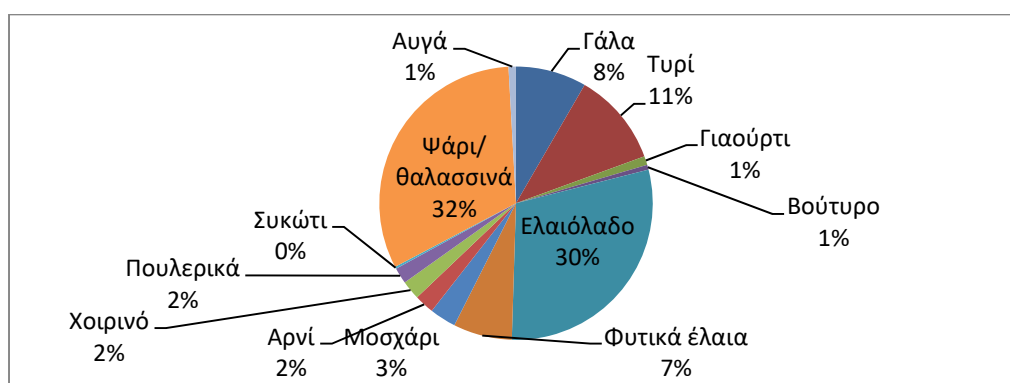
Χώρα	Χρονικό διάστημα συλλογής δεδομένων	Επίπεδα συγκέντρωσης	Μέθοδος μελέτης	Μέση συγκέντρωση ηg kg ⁻¹ σωμ. βάρους ημέρα ⁻¹	% συνεισφορά στην διατροφική πρόσληψη	Αναφορές
Βέλγιο	2008	UB	Προϊόντα τροφίμων συλλέχθηκαν από τα πέντε δημοφιλέστερα σούπερ μάρκετ	Γεν. πληθυσμός: 6.05	Γαλακτοκομικά και ψάρια/ θαλασσινά	(185)
Γαλλία	2002-2006		Εθνικά προγράμματα ελέγχου	Γυναίκες: 7.60 Ενήλικες: 7.70 Παιδιά: 12.90	Ψάρια/ θαλασσινά, κρέας και γαλακτοκομικά προϊόντα	(186)
Ιταλία		UB	Εθνικά προγράμματα ελέγχου	Νήπια: 24.6 Παιδιά: 16.1 Ενήλικες: 10.9	Ψάρια/ θαλασσινά και γαλακτοκομικά προϊόντα	(187)
Δημοκρατία της Σλοβακίας			Εθνικά προγράμματα ελέγχου	Γεν. πληθυσμός: 17.00 (median)		(188)
Ευρώπη			Εθνικά προγράμματα ελέγχου	Γεν. πληθυσμός: 15.00		(189)
Ελλάδα	2002-2016	UB	Εθνικά προγράμματα ελέγχου	7.85	ψάρια/θαλασσινά, ελαιόλαδο και φυτικά έλαια	Παρούσα μελέτη

Η βάση δεδομένων DAFNE-ANEMOS παρέχει επίσης τιμές μέσης διαθεσιμότητας τροφίμων για τους πληθυσμούς που διαμένουν σε αγροτικές, ημι-αστικές και αστικές περιοχές. Η ημερήσια πρόσληψη σε PCDD/Fs και dioxin-like PCBs σε μονάδες pg WHO-TEQ kg⁻¹ σωμα. βάρους που υπολογίστηκε για αυτές τις υποομάδες είναι η εξής: 1.46 για τους κατοίκους των αγροτικών περιοχών, 1.31 για τους κατοίκους των ημι-αστικών περιοχών και 1.26 για τις αστικές περιοχές. Για τα indicator PCBs η ημερήσια πρόσληψη σε ng kg⁻¹ σωμα. βάρους εκτιμήθηκε στα: 9.25 για τις αγροτικές περιοχές, 8.25 για τις ημι-αστικές περιοχές και 7.67 για τις αστικές. Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις μέσες τιμές των τριών πληθυσμών με το κριτήριο ANOVA. Η ανεπαίσθητη αύξηση της μέσης τιμής στις αγροτικές περιοχές, πιθανώς να οφείλεται στην υψηλότερη κατανάλωση ελαιόλαδου, το οποίο συνεισφέρει σημαντικά στην συνολική πρόσληψη όπως φαίνεται παρακάτω. Εάν στο μέλλον, αναπτυχθεί αναλυτική βάση δεδομένων κατανάλωσης τροφίμων ή πραγματοποιηθεί μελέτη “duplicate diet”, μία πιο λεπτομερής μελέτη για τα επίπεδα έκθεσης ανά περιοχή θα είχε εξαιρετικό ενδιαφέρον. Υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στον πληθυσμό της Ελλάδας, ο οποίος κατανέμεται σε ηπειρωτικές, και παράκτιες περιοχές καθώς και σε 200 περίπου νησιά. Οι τοπικές διαφορές αποτυπώνονται και στις διατροφικές συνήθειες (π.χ. περισσότερη κατανάλωση ψαριού στις νησιωτικές και παράκτιες περιοχές, έμφαση στην κατανάλωση κρέατος στις κτηνοτροφικές περιοχές και κατανάλωση τοπικών, χειροποίητων προϊόντων ή συσκευασμένων τροφίμων) οι οποίες με τη σειρά τους ενδεχομένως αποτυπώνονται και στο προφίλ της έκθεσης. Οι πληροφορίες αυτές είναι ιδιαίτερης σημασίας για τους φορείς δημόσιας υγείας που σχεδιάζουν πολιτικές προστασίας της υγείας σε τοπικό επίπεδο.

11.5 Συνεισφορά των ομάδων τροφίμων στο σύνολο της διατροφικής πρόσληψης PCDD/Fs, dioxin-like PCBs και indicator PCBs

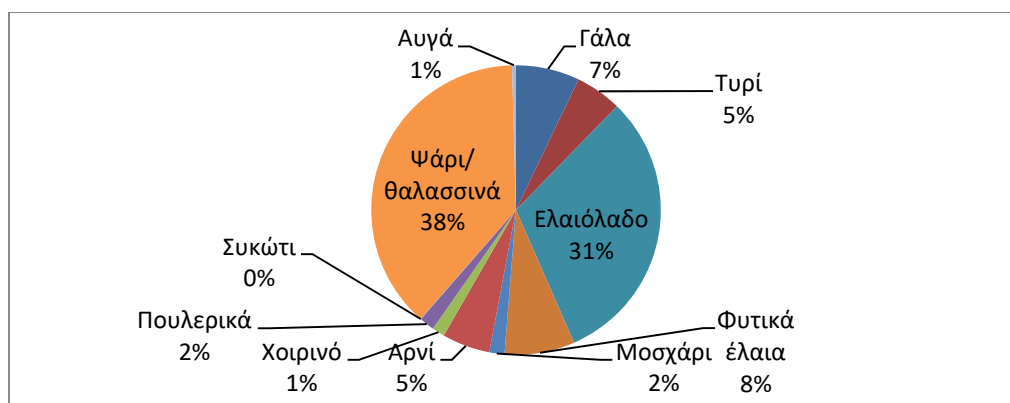
Λεπτομερής ανάλυση της συνεισφοράς των ομάδων τροφίμων στη συνολική πρόσληψη των PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs, έδειξε ότι οι ομάδες που

συνεισφέρουν τα μέγιστα με ελαττούμενη σειρά είναι: ψάρια/θαλασσινά (31.89%), ελαιόλαδο (29.34 %), τυρί (11.09 %), γάλα (8.35 %) και φυτικά έλαια (6.87 %). Για την κατηγορία του κρέατος: μοσχάρι (3.10 %), αρνί (2.35 %), χοιρινό (2.28 %) και πουλερικά (1.89 %). Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έρχονται σε συμφωνία με την πρόσφατη γνωμοδότηση της EFSA⁴⁷, στην οποία αναφέρεται ότι τα λιπαρά ψάρια συνεισφέρουν τα μέγιστα στην διατροφική πρόσληψη σε διοξίνες και παρόμοιες ενώσεις. Οι κατηγορίες τροφίμων του γάλακτος, βουτύρου, συκωτιού και αυγών παρουσιάζουν συμμετοχή 1% ή και λιγότερο στη συνολική πρόσληψη PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs. Παρά το γεγονός ότι η μέση τιμή των συγκεντρώσεων στα δείγματα συκωτιού είναι υψηλή (3.31 pg WHO-TEQ g⁻¹ λίπους), συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες κρέατος (μοσχάρι, αρνί, χοιρινό και κοτόπουλο), η αντίστοιχη διατροφική έκθεση είναι χαμηλή λόγω της χαμηλής κατανάλωσης (0.02 g kg⁻¹ σωμα. βάρους ημέρα⁻¹). Αντίθετα το ελαιόλαδο έχει χαμηλές μέσες συγκεντρώσεις στους συγκεκριμένους ρύπους (0.39 pg WHO-TEQ g⁻¹ λίπους), ωστόσο καταναλώνεται σε μεγάλες ποσότητες από τον Ελληνικό πληθυσμό. Για αυτόν το λόγο η ημερήσια πρόσληψη σε PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs είναι 0.37 pg WHO-TEQ (Πίνακας 27) και υπολογίστηκε ότι αποτελεί το 30% της συνολικής διατροφικής έκθεσης σε PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs. Τα ποσοστά που συνεισφέρει κάθε κατηγορία τροφίμων στη διατροφική πρόσληψη σε PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs παρουσιάζονται στο σχήμα 33.



Σχήμα 33: Συνεισφορά διατροφικών ομάδων στη συνολική πρόσληψη σε PCDD/Fs και dioxin-like PCBs

Όσον αφορά στη διατροφική έκθεση του πληθυσμού στο σύνολο των 6 indicator PCBs, συνεισφέρει τα μέγιστα στην μέση έκθεση η κατηγορία ψάρια/θαλασσινά (38.20 %) και ακολουθεί η κατηγορία ελαιόλαδο (31.08 %), τα φυτικά έλαια (7.76 %), το γάλα (7.11 %), το αρνί (5.39 %) και το τυρί (5.20 %). Οι υπόλοιπες κατηγορίες κρέατος (μοσχάρι, χοιρινό και πουλερικά), συνεισφέρουν ελάχιστα με ποσοστό 1.42-1.68 % και ακολουθούν τα αυγά και το συκώτι (σχήμα 34).

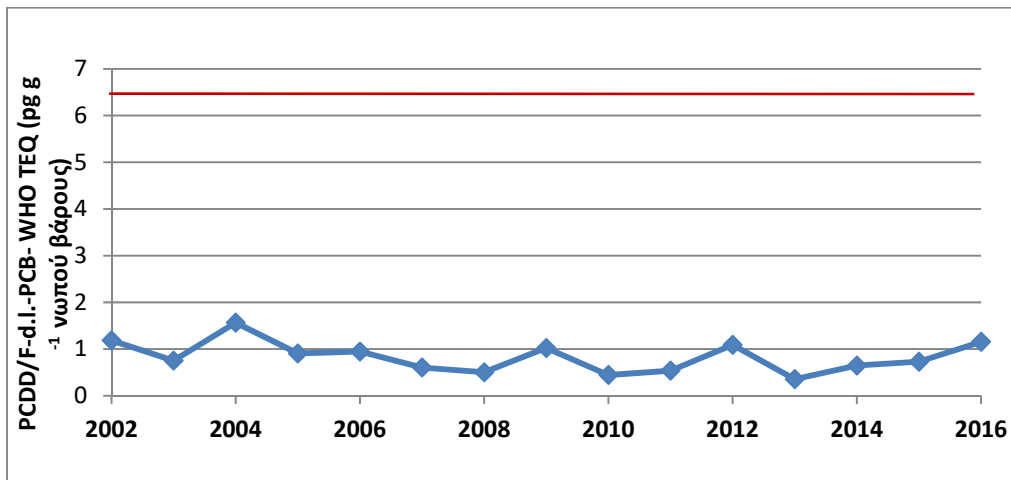


Σχήμα 34: Συνεισφορά διατροφικών ομάδων στη συνολική πρόσληψη σε indicator PCBs

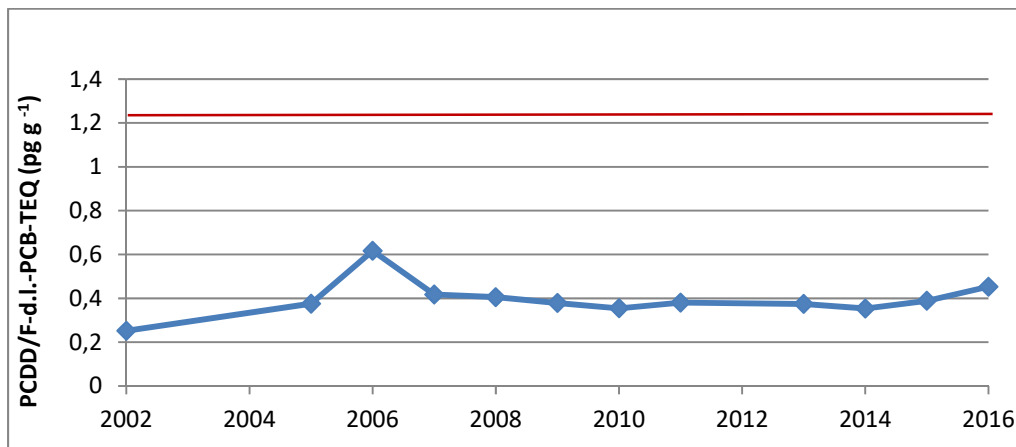
11.6 Διακύμανση των επιπέδων PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs στα ψάρια/θαλασσινά και στο ελαιόλαδο κατά το χρονικό διάστημα 2002-2016

Μελετήθηκε η διακύμανση στο χρόνο των μέσων συνολικών τιμών TEQ των PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs για τα ψάρια/θαλασσινά και το ελαιόλαδο. Οι δύο συγκεκριμένες κατηγορίες επιλέχθηκαν γιατί παρουσιάζουν μέγιστη συνεισφορά στη διατροφική πρόσληψη σε PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs. Πρόσφατες μελέτες¹⁷⁹ δείχνουν μείωση στην έκθεση του Ευρωπαϊκού πληθυσμού σε διοξίνες κατά τα τελευταία χρόνια 179. Δυστυχώς το πλήθος δειγμάτων ανά χρόνο δεν είναι επαρκές για όλες τις κατηγορίες τροφίμων ώστε να αντληθούν σαφή συμπεράσματα για τη διακύμανση της έκθεσης του πληθυσμού της Ελλάδας στο χρόνο. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 35 για την ομάδα ψάρια/θαλασσινά και στο σχήμα 36 για το ελαιόλαδο. Η έντονη γραμμή και στα δύο σχήματα υποδεικνύει το ανώτατο επιτρεπόμενο όριο που

έχει θεσπίσει η Ευρωπαϊκή ένωση. Όσον αφορά στην ομάδα ψάρια/θαλασσινά, οι χαμηλές ή υψηλές τιμές πιθανώς σχετίζονται με περιορισμένο αριθμό δειγμάτων στα χρονικά διαστήματα που μελετήθηκαν. Όμως δεν υπάρχει ξεκάθαρη «τάση» αύξησης ή μείωσης για το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώθηκε και με την εφαρμογή του κριτηρίου συσχέτισης pearson. Όσον αφορά στα αποτελέσματα για την ομάδα ελαιόλαδου, παρά τα γενικά χαμηλά επίπεδα



Σχήμα 35: Διακύμανση στο χρόνο των μέσων συνολικών τιμών TEQ των PCDD/Fs και dioxin-like PCBs για τα ψάρια/θαλασσινά



Σχήμα 36: Διακύμανση στο χρόνο των μέσων συνολικών τιμών TEQ των PCDD/Fs και dioxin-like PCBs για το ελαιόλαδο

που προσδιορίστηκαν, και το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε διακύμανση στο χρόνο (επιβεβαιώθηκε και με συσχέτιση Pearson), μία μικρή αύξηση παρατηρείται στη μέση τιμή των δειγμάτων που συλλέχθηκαν στη διάρκεια του 2006. Το γεγονός αυτό ίσως αποδίδεται σε μία σειρά από μεγάλης έκτασης πυρκαγιές που ξέσπασαν τη χρονιά αυτή σε πολλές περιοχές σε όλη την Ελλάδα η οποία είχε αντίκτυπο στους ελαιώνες στις γεωργικές περιοχές. Αναλυτική μελέτη για τις συνέπειες των πυρκαγιών αυτών στην επιβάρυνση του ελαιολάδου έχει πραγματοποιηθεί από το ΕΦΑΜΑΔ και τα αποτελέσματα έχουν δημοσιευθεί¹⁷⁷. Παρόλα αυτά οι μέσες τιμές των συνολικών συγκεντρώσεων των ρύπων αυτών παραμένουν για όλο το διάστημα πολύ χαμηλότερες σε σχέση με τα ανώτατα ευρωπαϊκά όρια (0.62 pg WHO-TEQ g⁻¹ λίπους vs 1.25 pg WHO-TEQ g⁻¹ λίπους). Δεν έχει καθοριστεί όριο δράσης για το ελαιόλαδο στο σχετικό Ευρωπαϊκό Κανονισμό, εντούτοις το εύρημα που αναφέρθηκε παραπάνω για το 2006 ενισχύει το συμπέρασμα ότι κύριες πηγές PCDDs, PCDFs και PCBs στην Ελλάδα αποτελούν αφενώς η ανεξέλεκτη καύση στερεών απορριμάτων σε ανοιχτούς χώρους και αφετέρου οι πυρκαγιές σε χώρους υγειονομικής ταφής απορριμάτων, δάση, αγροτικές και βιομηχανικές περιοχές¹⁹⁰.

11.7 Σύγκριση των επιπέδων έκθεσης του Ελληνικού πληθυσμού με αυτή άλλων χωρών για τα επίπεδα PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs

Η σύγκριση της διατροφικής έκθεσης μεταξύ διαφορετικών χωρών πρέπει να εξετάζεται με προσοχή εξαιτίας των μεγάλων διαφορών στη μεθοδολογία που ακολουθείται σε κάθε μελέτη. Οι διαφορές έγκεινται στην επιλογή συμμετεχόντων με μεγάλο εύρος ηλικιών, στις ποικιλίες των ομάδων τροφίμων, στη δειγματοληψία τροφίμων, στις αναλυτικές τεχνικές, στα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των ρύπων, στις διαφορετικές μεθόδους έρευνας για τη συλλογή δεδομένων κατανάλωσης τροφίμων και στις ποικίλες διατροφικές συνήθειες κάθε λαού. Επιπροσθέτως η χρήση των δύο TEF 1998 και TEF 2005, καθώς επίσης η χρήση ελάχιστων, μεσαίων ή ανώτατων συγκεντρώσεων καθιστά μη εφικτή την άμεση σύγκριση. Στον ανακεφαλαιωτικό και ενημερωμένο

πρόσφατα πίνακα 29 παρουσιάζεται η διατροφική πρόσληψη σε PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs για πληθώρα Ευρωπαϊκών χωρών μεταξύ 2000-2016.

Πίνακας 29: Συνοπτικός πίνακας της διατροφικής έκθεσης σε PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs για Ευρωπαϊκές χώρες για το χρονικό διάστημα 2000-2016

Χώρα	Χρονικό διάστημα συλλογής δεδομένων	Επίπεδα αναφοράς	Μέθοδος μελέτης	Μέση πρόσληψη (pg TEQ/kg σωματ. βάρους/ημέρα)	Μέγιστη συνεισφορά στη διατροφική πρόσληψη	Αναφορές
Αυστρία	2005-2011	UB	Αντιπροσωπευτική, τυχαία δειγματοληψία από πηγές λιανικού εμπορίου στην Αυστρία	Παιδιά:0.77 Γυναίκες:0.75 Άνδρες:0.61	Γαλακτοκομικά προϊόντα και προϊόντα κρέατος	(191)
Γαλλία	2006-2010		TDS	Παιδιά, Έφηβοι: 0.89 Ενήλικες.: 0.57	Ψάρια και θαλασσινά και γαλακτοκομικά προϊόντα	(192)
Γερμανία	2000-2010	UB	Ημερολόγιο διατροφής	Έφηβοι, Ενήλικες: 2.11	Γαλακτοκομικά προϊόντα και προϊόντα κρέατος	(196)
Ελλάδα	2002-2016	UB	Δεδομένα διαθεσιμότητας τροφίμων	Ενήλικες: 1.27	Ψάρια και θαλασσινά, φυτικά έλαια και γαλακτοκομικά	Παρούσα μελέτη
Ισπανία (Βαλένσια)	2006-2008	UB	Δείγματα τροφίμων από την περιοχή της Βαλένσια, συλλεγμένα κατά τύχη	Παιδιά: 4.58 Ενήλικες: 2,86	Ψάρια και θαλασσινά και γαλακτοκομικά προϊόντα	(193)
Ισπανία (Καταλονία)	2008	UB	Ανάλυση προϊόντων τροφίμων με μεγάλη κατανάλωση	Παιδιά, Έφηβοι, Ενήλικες, Ηλικιωμένοι: 0.60	Ψάρια και θαλασσινά και γαλακτοκομικά προϊόντα	(194)
Ηνωμένο Βασίλειο	2011-2012	UB	TDS, DD	Ενήλικες Ηλικιωμένοι: 0.52	Ψάρια και θαλασσινά, προϊόντα κρεατος και γαλακτοκομικά προϊόντα.	(195)

Ο πίνακας αυτός είναι συμπληρωματικός σε πίνακα που είχε παρουσιάσει η ομάδα Tlustos et al. το 2014¹⁸⁴ στο πλαίσιο Ιρλανδικής μελέτης. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σχετικά με τη διατροφική πρόσληψη σε διοξίνες και παρόμοιες ενώσεις κυμαίνονται σε παρόμοια αν όχι χαμηλότερα επίπεδα με αυτά της Γερμανίας¹⁹⁶ και της Ισπανίας¹⁹³. Για τις ενώσεις indicator PCBs όπως φαίνεται στον πίνακα 28 η διατροφική έκθεση του Ελληνικού πληθυσμού είναι συγκρίσιμη με την Ιταλική μελέτη¹⁸⁷. Για τους πληθυσμούς της Γαλλίας¹⁹², της Ισπανίας^{193,194} της Δανίας¹⁹⁷, της Φιλανδίας¹⁹⁸, της Σουηδίας¹⁹⁹ και της Ελλάδας (παρούσα μελέτη) η ομάδα τροφίμων που συνεισφέρει τα μέγιστα στη πρόσληψη PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs είναι τα ψάρια/θαλασσινά. Ακολουθούν τα γαλακτοκομικά προϊόντα για όλες τις προαναφερθείσες χώρες εκτός της Ελλάδας, όπου το ελαιόλαδο κατέχει τη δεύτερη θέση. Για την Ολλανδία²⁰⁰, Βέλγιο²⁰¹ και Γερμανία¹⁹⁵, πρωτεύοντα ρόλο στην διατροφική έκθεση στους ρύπους αυτούς παίζει η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων ενώ ακολουθεί η κατηγορία «κρέατα». Η έκθεση του γενικού ενήλικου πληθυσμού στην Ελλάδα σε PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs ανέρχεται σε 1.27 pg TEQ kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹. Είναι συγκρίσιμη, αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα, με την τιμή που έχει αναφερθεί για τη Γερμανία και Ισπανία. Ωστόσο στην Ισπανική μελέτη η συλλογή δειγμάτων διήρκησε δύο χρόνια, ενώ στην περίπτωση της Ελλάδας τα δεδομένα των συγκεντρώσεων για τους ρύπους εκτείνονται σε διάστημα 15 χρόνων.

Τα ανωτέρω αποτελέσματα που αφορούν στην έκθεση σε PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs και τη σύγκριση με τις άλλες χώρες οφείλονται ίσως στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της Μεσογειακής διατροφής, που ακολουθεί ο γενικός πληθυσμός της Ελλάδας. Το συγκεκριμένο διατροφικό προφίλ χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση τροφίμων φυτικής προέλευσης: φρούτα, λαχανικά, ψωμί, δημητριακά, πατάτες, φασόλια. Το ελαιόλαδο είναι βασική πηγή ακόρεστων λιπαρών. Τα ζωϊκά προϊόντα όπως, κρέας, πουλερικά και ψάρια καταναλώνονται σε μέτριες ποσότητες²⁰². Το μοτίβο αυτό έχει αναγνωριστεί παγκοσμίως ότι συμβάλει σε έναν υγιεινό τρόπο ζωής και αποτελεί βιώσιμο μοντέλο διατροφής: Επιφέρει χαμηλή επίπτωση στο περιβάλλον, ενισχύει τη

βιοποικιλότητα, έχει υψηλή κοινωνικοπολιτιστική αξία και ενισχύει την τοπική οικονομία²⁰³. Παρά το γεγονός ότι η Μεσογειακή διατροφή είχε εν μέρει εγκαταληφθεί από τη νέα γενιά κυρίως, τα τελευταία χρόνια, η Ελληνική οικογένεια την υιοθετεί εκ νέου στο πλαίσιο ενός υγιεινού τρόπου ζωής, χαμηλού σε κόστος και φιλικού προς το περιβάλλον. Επιπροσθέτως, τα τελευταία χρόνια υπάρχει στροφή του καταναλωτικού κοινού προς την κατανάλωση ψαριών αντί για κρέας κάποιες φορές την εβδομάδα, λόγω της καρδιοπροστατευτικής δράσης των λιπαρών των ψαριών που έχει διαπιστωθεί σε πολλές μελέτες.

Ο συνδυασμός της κατανάλωσης ψαριού σε αντίστοιχους ρυθμούς με το κρέας και η σχετικά υψηλή περιεκτικότητα των ψαριών σε PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs, καθιστούν την κατηγορία ψάρια/θαλασσινά ως κυρίαρχη στη συνεισφορά στη διατροφική πρόσληψη των εν λόγω ρύπων στην Ελλάδα. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με αντίστοιχα ευρήματα άλλων χωρών, καθώς επίσης και με την πρόσφατη γνωμοδότηση της EFSA για τα νέα προτεινόμενα όρια εβδομαδιαίας διατροφικής πρόσληψης σε διοξίνες και παρόμοιες ενώσεις, στην οποία αναφέρεται ότι στις περισσότερες ηλικιακές ομάδες τα ψάρια/θαλασσινά συνεισφέρουν κατά 56% στη διατροφική πρόσληψη σε διοξίνες⁴⁷. Αντιθέτως η συνεισφορά του ελαιόλαδου στη διατροφική έκθεση του γενικού πληθυσμού δεν αποτελεί σύνηθες εύρημα στις διεθνείς μελέτες. Ωστόσο για τον Ελλαδικό χώρο, αυτό δεν αποτελεί έκπληξη καθώς το ελαιόλαδο αποτελεί τη βασική λιπαρή ουσία που χρησιμοποιούν τα Ελληνικά νοικοκυριά είτε ωμή ή σαν βασικό συστατικό στη μαγειρική. Παρόμοιες συγκεντρώσεις των ρύπων αυτών έχουν μετρηθεί σε ελαιόλαδο και σε άλλα φυτικά έλαια στην Ελλάδα. Λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά, μονοακόρεστα λιπαρά και λιποδιαλυτές βιταμίνες που περιέχονται στο ελαιόλαδο, αυτό αποτελεί τη βέλτιστη επιλογή ως βασική λιπαρή ουσία της ημερήσιας διατροφής.

Παρά τα σχετικά χαμηλά επίπεδα των τροφίμων σε συγκεντρώσεις PCDDs, PCDFs, PCBs σε σχέση με τα ανώτατα όρια που έχει θεσπίσει η Ε.Ε., η αξιολόγηση της διατροφικής έκθεσης σε ρύπους της οικογένειας των διοξινών είναι εξαιρετικά σημαντική για τη δημόσια υγεία. Πρόσφατη μελέτη ανέδειξε ότι πολλοί χημικοί ρύποι εκδηλώνουν την τοξικότητά τους ακόμα και σε πολύ

χαμηλές δόσεις, χαμηλότερες από αυτές που συνήθως χρησιμοποιούνται για τις μελέτες τοξικότητας. Επιπλέον, οι ενδοκρινικοί διαταράκτες, η ομάδα των οποίων περιλαμβάνει και τις διοξίνες, δύναται να εμφανίσουν μη μονότονη συνάρτηση μεταξύ δόσης και απόκκρισης^{204,205,206,207}. Επιπρόσθετα η προσέγγιση πολλών ειδικών σχετικά με την καρκινογόνο δράση των ενώσεων αυτών είναι ότι στην πραγματικότητα δεν υπάρχει όριο ασφαλούς έκθεσης όπως σε άλλες τοξικές δράσεις, καθώς βλάβη ακόμα και σε ένα μόνο κύτταρο μπορεί να είναι καθοριστική ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία σχηματισμού καρκινικού όγκου⁸¹. Όλα τα παραπάνω συνηγορούν στη συνεχή παρακολούθηση των POPs στα τρόφιμα ακόμα και αν τα επίπεδά τους είναι χαμηλά. Στο κλασικό παράδειγμα τοξικολογίας αναφέρεται ότι η δόση κάνει το δηλητήριο. Σύμφωνα με τους White και Birnbaum, 2009²⁰⁸ στην περίπτωση των διοξινών αλλά και πολλών άλλων ενώσεων που μελετώνται στη σύγχρονη τοξικολογία, έχει αναγνωριστεί ότι είναι η διάρκεια και η χρονική στιγμή της έκθεσης σε συνδυασμό με την δόση που καθορίζουν το αποτέλεσμα στο άτομο που εκτίθεται. Ειδικά η χρονική στιγμή της έκθεσης είναι βαρύνουσας σημασίας κατά τα κρίσιμα στάδια της ανάπτυξης στην εμβρυϊκή, βρεφική και παιδική ηλικία. Όσον αφορά λοιπόν στην προστασία της δημόσιας υγείας από τους τοξικούς ρύπους, θα πρέπει να είμαστε σε επαγρύπνηση παρά τη συμμόρφωση με τα θεσμοθετημένα όρια της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Εξάλλου, τα όρια έχουν τεθεί λαμβάνοντας υπόψη τα επίπεδα ρύπων κάτω από τα οποία βρίσκεται το 90-95% του πληθυσμού δειγμάτων τροφίμων και ζωοτροφών (που παράγονται σύμφωνα με καλές πρακτικές στη γεωργία), με βάση τα αποτελέσματα^{209,210} σχετικών αναλύσεων που έχουν δοθεί από τα κράτη-μέλη. Προκειμένου δηλαδή να αποφευχθεί η οικονομική ζημία που θα προκαλούσε η εκτενής καταστροφή παρτίδων προϊόντων που υπερβαίνουν τα όρια, η πολιτική της Ευρωπαϊκής Ένωσης επιτάσσει τη λογική «αυστηρό αλλά εφικτό». Συνεπώς επιβάλλεται να πραγματοποιείται η εκτίμηση και η αξιολόγηση του ρίσκου της συνολικής διατροφικής έκθεσης του γενικού πληθυσμού²⁰⁰.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12: Έκθεση του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας σε υπερφθοριωμένες ενώσεις

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι επίσης μία αρχική αξιολόγηση της διατροφικής έκθεσης του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας στα PFASs. Για τα δεδομένα των συγκεντρώσεων των ρύπων αυτών, αναλύθηκαν στο διάστημα 2010-2016, 118 δείγματα τροφίμων διαφόρων κατηγοριών στο πλαίσιο διερευνητικών προγραμμάτων ελέγχου. Τα αποτελέσματα αυτά συνδυάστηκαν με ήδη δημοσιευμένα αποτελέσματα από 43 δείγματα πόσιμου νερού²¹¹ και 76 δειγμάτων αυγών²¹² (45 οικιακής παραγωγής και 31 από το εμπόριο). Λόγω έλλειψης δεδομένων κατανάλωσης, χρησιμοποιήθηκαν και πάλι δεδομένα διαθεσιμότητας τροφίμων από τη βάση δεδομένων DAFNE-ANEMOS.

12.1 Επίπεδα συγκεντρώσεων των PFASs σε Ελληνικά προϊόντα τροφίμων

Τα είδη τροφίμων που αναλύθηκαν για PFOS και PFOA περιλαμβάνουν: Μοσχάρι, χοιρινό, πρόβειο κρέας, κοτόπουλο, αυγά, γάλα, ψάρια, λαχανικά και φρούτα. Στον πίνακα 30 παρουσιάζονται αναλυτικά αποτελέσματα των PFOS και PFOA για τα παραπάνω είδη, υπολογισμένα σε upperbound (για όλες τις συγκεντρώσεις που βρίσκονται κάτω από το LOQ χρησιμοποιήθηκε το $LOQ=0.5 \text{ ng g}^{-1}$ ή ng L^{-1} για τον υπολογισμό του μέσου όρου των συγκεντρώσεων των PFASs στα τρόφιμα) ή lowerbound (οι συγκεντρώσεις που βρίσκονται κάτω από το LOQ, θεωρήθηκαν ίσες με το 0). Τα δεδομένα αυτά και για τα δύο PFASs είναι εκφρασμένα σε ng g^{-1} προϊόντος για τις ομάδες μοσχάρι, χοιρινό, πρόβειο, κοτόπουλο, αυγά, γάλα, ψάρια, λαχανικά και φρούτα και σε ng L^{-1} για το νερό. Το ποσοστό των τροφίμων στο οποίο η συγκέντρωση PFOA ήταν πάνω από το LOD (0.15 ng g^{-1} ή ng L^{-1}) ήταν 10%, ενώ για το PFOS 28%. Πιο συγκεκριμένα, PFOA ανιχνεύτηκε σε 5 δείγματα μοσχαριού, 1 δείγμα χοιρινού, 3 δείγματα κοτόπουλου, 1 δείγμα πρόβειου κρέατος, 2 δείγματα γάλακτος, 1 δείγμα αυγού, 4 δείγματα ψαριών και 12 δείγματα λαχανικών ενώ PFOS ανιχνεύτηκε σε 5 δείγματα μοσχαριού, 2 δείγματα χοιρινού, 4 δείγματα κοτόπουλου, 4 δείγματα πρόβειο κρέατος, 9 δείγματα γάλακτος, 37 δείγματα αυγών, 74 δείγματα ψαριών

και 11 δείγματα λαχανικών. PFASs δεν ανιχνεύτηκαν σε κανένα δείγμα φρούτων. Για τα PFOA οι συγκεντρώσεις κυμαίνονταν από 0.20-6.19 ng g⁻¹ προϊόντος. Η ομάδα τροφίμων με την πιο υψηλή μέση upperbound και μέγιστη τιμή συγκέντρωσης είναι τα ψάρια με 1.01 και 6.19 ng g⁻¹ προϊόντος αντίστοιχα ενώ η ομάδα του κοτόπουλου έρχεται δεύτερη με 0.56 και 1.00 ng g⁻¹ προϊόντος αντίστοιχα. Η χαμηλότερη μέση upperbound συγκέντρωση εντοπίζεται στο μοσχάρι κρέας, στο πρόβειο κρέας, στο χοιρινό κρέας και στα αυγά με μέση συγκέντρωση 0.50 ng g⁻¹ προϊόντος. Για το πόσιμο νερό οι τιμές υπολογίστηκαν 0.62 και 3.63 ng L⁻¹ (Πίνακας 30 και σχήμα 37A).

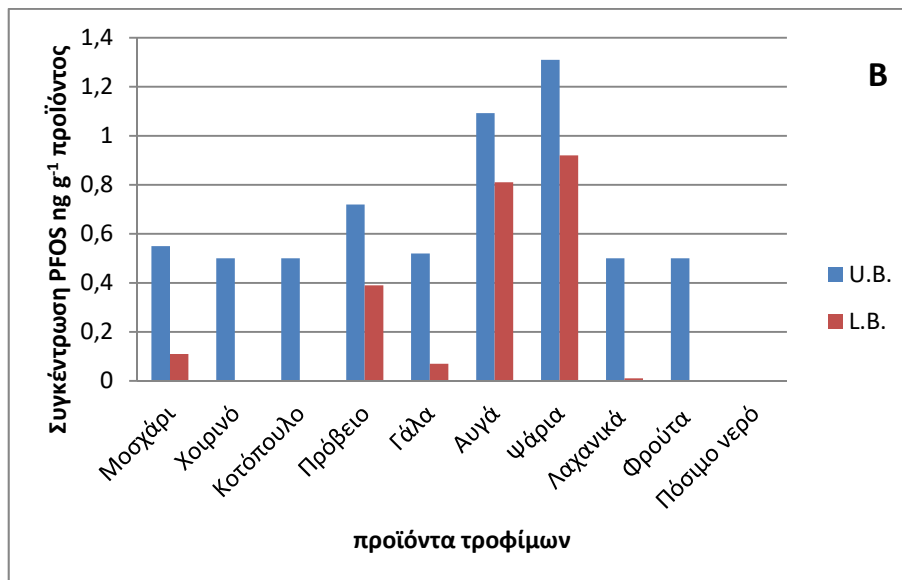
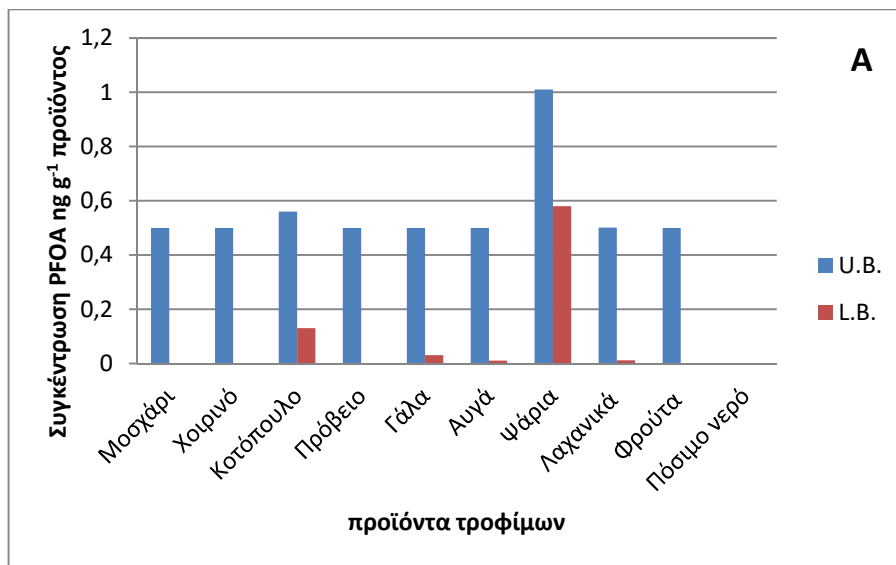
Η συγκέντρωση του PFOS (Πίνακας 30 και σχήμα 37B) κυμαίνεται μεταξύ 0.17 και 8.90 g⁻¹ προϊόντος. Η πιο υψηλή μέση upperbound συγκέντρωση του PFOS προσδιορίστηκε στα ψάρια με 1.31 ng g⁻¹ προϊόντος, ακολούθως στα αυγά με 1.09 ng g⁻¹ προϊόντος, στο πρόβειο κρέας (0.72 ng g⁻¹ προϊόντος) και τέλος στο μοσχάρι κρέας (0.55 ng g⁻¹ προϊόντος). Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκαν υψηλότερα επίπεδα PFOS έναντι PFOA σε δείγματα τροφίμων, κυρίως ζωικής προέλευσης, γεγονός το οποίο οφείλεται στην ιδιότητα του PFOS να βιοσυσσωρεύεται περισσότερο σε σχέση με το PFOA (σχήμα 38), όπως διαπιστώθηκε και σε αντίστοιχες δημοσιευμένες μελέτες^{213,214,215}. Όπως επίσης και σε άλλες μελέτες, δεν ισχύει το ίδιο για το πόσιμο νερό, όπου το PFOA βρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα²¹³. Γενικά οι συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν κυμαίνονται στο ίδιο εύρος ή χαμηλότερα από τις αντίστοιχες μελέτες του Καναδά²¹⁶, της Νορβηγίας²¹³, της Ολλανδίας²¹⁷, του Βελγίου²¹⁴, της Ισπανίας²¹⁸, του Ηνωμένου Βασιλείου²¹⁹ και των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής²²⁰.

Πίνακας 30: Επίπεδα PFOS και PFOA σε προϊόντα τροφίμων (ng g⁻¹) και πόσιμο νερό (ng L⁻¹)

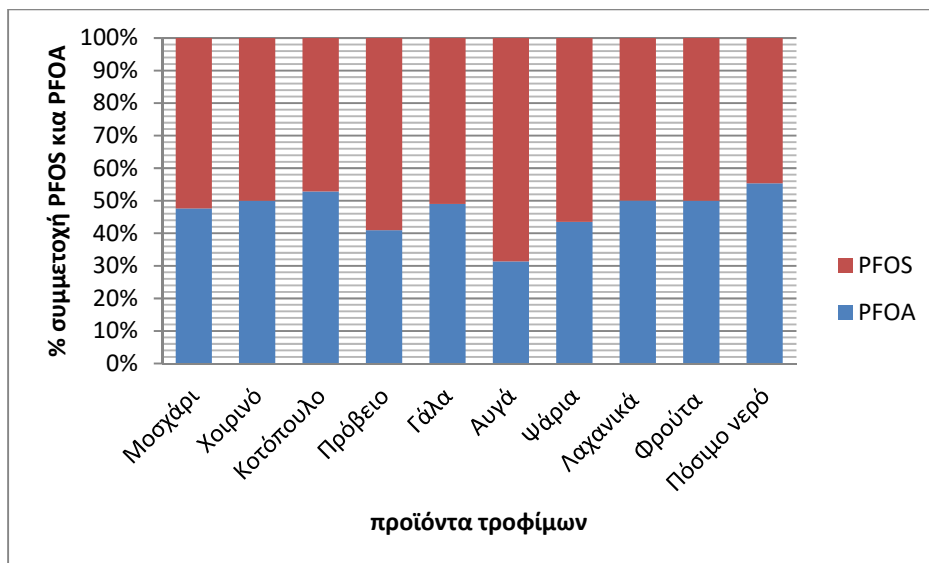
Τρόφιμα	Αρ. δειγμ.	PFOA (ng g ⁻¹)			PFOS (ng g ⁻¹)		
		min-max	Μέση συγκ. L.B.	Μέση συγκ. U.B.	min-max	Μέση συγκ. L.B.	Μέση συγκ. U.B.
Μοσχάρι	8	<LOQ*	<LOQ	0.50	<LOQ-0.90	0.11	0.55
Χοιρινό	5	<LOQ	<LOQ	0.50	<LOQ	<LOQ	0.50
Κοτόπουλο	8	<LOQ-1.00	0.13	0.56	<LOQ	<LOQ	0.50
Πρόβειο	9	<LOQ	<LOQ	0.50	<LOQ-1.74	0.39	0.72
Γάλα	21	<LOQ-0.57	0.03	0.50	<LOQ-0.73	0.07	0.52
Αυγά	76	<LOQ-0.50	0.01	0.50	<LOQ-8.90	0.81	1.09
Ψάρι	14	<LOQ-6.19	0.58	1.01	<LOQ-5.80	0.92	1.31
Λαχανικά	47	<LOQ-0.54	0.01	0.50	<LOQ-0.51	0.01	0.50
Φρούτα	6	<LOQ	<LOQ	0.50	<LOQ	<LOQ	0.50
Νερό**	43	<LOQ-3.63	0.18	0.62	<LOQ	<LOQ	0.50

*LOQ=0.50 ng g⁻¹

**ng L⁻¹



Σχήμα 37: Συγκεντρώσεις (ng g⁻¹) (U.B. και L.B.) των PFOA (A) και PFOS (B) σε δείγματα τροφίμων και πόσιμου νερού



Σχήμα 38: % Συμμετοχή PFOA και PFOS στη συνολική συγκέντρωση PFASs στα προϊόντα τροφίμων και στο πόσιμο νερό

12.2 Έκθεση του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας σε PFAAs μέσω της κατανάλωσης τροφίμων και πόσιμου νερού

Στην περίπτωση τοξικών ρύπων όπως είναι οι διοξίνες, η Ευρωπαϊκή Ένωση απαιτεί τα αναλυτικά αποτελέσματα να είναι εκφρασμένα σαν upperbound συγκεντρώσεις, και η ίδια προσέγγιση εφαρμόζεται και για την εκτίμηση της έκθεσης του ανθρώπου. Για την εκτίμηση της διατροφικής έκθεσης του γενικού πληθυσμού σε PFAAs, για τα δείγματα που ήταν κάτω από το LOQ χρησιμοποιήθηκαν οι upperbound και lowerbound συγκεντρώσεις. Σημαντικό ποσοστό δειγμάτων με μη ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις βρέθηκε σε όλες τις κατηγορίες τροφίμων. Αντίστοιχες μελέτες για την εκτίμηση της ημερήσιας πρόσληψης σε PFAAs είτε χρησιμοποιούν τις upperbound συγκεντρώσεις²²¹, είτε τις lowerbound²¹⁶ είτε και τις δύο^{222,218}. Στην παρούσα μελέτη, εκτός από τις lowerbound τιμές συγκεντρώσεων, παρουσιάζονται επίσης η εκτίμηση της έκθεσης σε PFASs βάσει των upperbound συγκεντρώσεων, καθώς στη μελέτη της ανθρώπινης έκθεσης σε επικίνδυνους ρύπους είναι σημαντικό να εξετάζονται και τα πιο δυσμενή σενάρια. Η εκτιμώμενη μέση έκθεση δια στόματος σε PFAAs παρουσιάζεται στον πίνακα 31. Ελλείπει δεδομένων κατανάλωσης τροφίμων για

τον γενικό πληθυσμό της Ελλάδας, για την εκτίμηση της ημερήσιας πρόσληψης σε PFAAs έγινε χρήση των δεδομένων για την διαθεσιμότητα των τροφίμων σε επίπεδο "νοικοκυριού"¹⁸². Η διατροφική πρόσληψη σε PFAAs υπολογίστηκε πολλαπλασιάζοντας την συγκέντρωση για κάθε έναν ρύπο χωριστά επί το διαθέσιμο ποσό κάθε τροφίμου ημερησίως διαιρώντας το διά τα 70 kg που είναι το μέσο βάρος για τον ενήλικο πληθυσμό. Η πρόσληψη από την κατανάλωση πόσιμου νερού υπολογίστηκε θεωρώντας ημερήσια κατανάλωση 2 L νερού.

Για τον γενικό πληθυσμό της Ελλάδας η εκτιμώμενη μέση ημερήσια διατροφική πρόσληψη σε PFOA και PFOS λαμβάνοντας υπόψη τις upperbound συγκεντρώσεις στα δείγματα τροφίμων είναι: 6.50 και 6.80 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ αντίστοιχα. Λαμβάνοντας υπόψη τις lowerbound συγκεντρώσεις, η διατροφική πρόσληψη υπολογίζεται για το PFOA στα 0.48 και για το PFOS 0.90 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ αντίστοιχα. Εφόσον η έκθεση σε PFASs οφείλεται κυρίως στην από του στόματος οδό²²³ (διατροφή και πόσιμο νερό) είναι απαραίτητο να εκτιμηθεί και η έκθεση στα PFASs λόγω του πόσιμου νερού. Η έκθεση λόγω της κατανάλωσης νερού εκτιμάται για το PFOA στα 0.02 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ και για το PFOS 0.016 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ (upperbound υπολογισμός). Λαμβάνοντας υπόψη τις lowerbound τιμές μέσου όρου, υπολογίστηκε έκθεση 0.006 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ για το PFOA ενώ για το PFOS η πρόσληψη είναι αμελητέα.

Η συνδυασμένη έκθεση από διατροφή και κατανάλωση πόσιμου νερού εκτιμάται για τα PFOA στα 6.53 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ (upperbound) και 0.49 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ (lowerbound) και για τα PFOS 6.81 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ (upperbound) και 0.91 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ (lowerbound). Η αρμόδια επιστημονική επιτροπή της EFSA είχε θεσπίσει αρχικά την ανεκτή ημερήσια πρόσληψη (tolerable daily intake, TDI) για τα PFOA και PFOS στα 1500 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ και 150 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ αντίστοιχα (EFSA, 2008). Συγκρίνοντας την ολική πρόσληψη σε PFOA και PFOS με τις τιμές TDI είναι φανερό ότι η έκθεση του ενήλικου πληθυσμού είναι σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα από τις προταθείσες τιμές. Έχουν επίσης προταθεί δόσεις αναφοράς (oral reference dose- RfDs) για

τα PFOA και PFOS με βάση μελέτες καρκινογένεσης μετά από χρόνια έκθεση σε πειραματόζωα, 333 ng kg^{-1} σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ και 25 ng kg^{-1} σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ για τα PFOA και PFOS αντίστοιχα²²⁴. Η τιμή που υπολογίστηκε είναι επίσης πολύ χαμηλότερη από αυτές τις τιμές. Ωστόσο πρόσφατη επιστημονική γνωμοδότηση της EFSA⁹⁶, επαναξιολογεί τα ανεκτά εβδομαδιαία όρια πρόσληψης, TWI των PFOS και PFOA σε 13 και 6 ng kg^{-1} σωματικού βάρους εβδομ.⁻¹ αντίστοιχα. Η μείωση των ορίων βασίστηκε σε νεότερα επιδημιολογικά δεδομένα. Για το PFOS και PFOA η αύξηση στην ολική χοληστερόλη ορού στους ενήλικες και η μείωση στην ανοσολογική απόκριση μετά από εμβολιασμό των παιδιών για το PFOS αποτέλεσαν τις κρίσιμες επιδράσεις των ρύπων αυτών στην υγεία του ανθρώπου. Επιπλέον, και για τα δύο PFASs, στην επαναξιολόγηση του TWI ελήφθησαν υπόψη το χαμηλό βάρος γέννησης νεογνών καθώς και τα υψηλά επίπεδα του ενζύμου αλανίνη αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (ALT) για το PFOA⁹⁶.

Η επιστημονική επιτροπή της EFSA, στη πρόσφατη γνωμοδότησή της αναφέρει ότι οι lowerbound υπολογισμοί στην εκτίμηση της έκθεσης του πληθυσμού οδηγούν σε αποτελέσματα που βρίσκονται πιο κοντά στην αληθή έκθεση. Το συμπέρασμα αυτό βασίστηκε σε δύο διαπιστώσεις:

- Στις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με αναλυτικές μεθόδους υψηλής ευαισθησίας, (στις οποίες ελαχιστοποιούνται τα δείγματα με μη ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις) προσδιορίστηκαν επίπεδα συγκεντρώσεων στα τρόφιμα που προσεγγίζουν το μέσο όρο των lowerbound υπολογισμών.
- Η εκτίμηση της διατροφικής έκθεσης που προκύπτει από την εφαρμογή μοντέλων με βάση τα επίπεδα στον ορό συμπίπτει με το lowerbound υπολογισμό της διατροφικής έκθεσης με βάση τα επίπεδα στα τρόφιμα.

Λαμβάνοντας υπόψη τις lowerbound τιμές από του στόματος πρόσληψης σε PFOS και PFOA, ο Ελληνικός πληθυσμός βρίσκεται σε επίπεδα χαμηλότερα (6.37 και 3.43 ng kg^{-1} σωματικού βάρους εβδομ.⁻¹ για το PFOS και PFOA

αντίστοιχα) από τα νέα προτεινόμενα εβδομαδιαία όρια πρόσληψης (13 και 6 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους εβδομ.⁻¹ για το PFOS και PFOA αντίστοιχα).

Αξιόπιστη εκτίμηση της έκθεσης του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας απαιτεί περαιτέρω μελέτη. Ειδικότερα για την πρόσληψη των PFASs μία μελέτη Total Diet Study (TDS) θα ήταν πιο αντιπροσωπευτική για την εκτίμηση της διατροφικής έκθεσης, καθώς τα υλικά συσκευασίας^{223,225}, η διαδικασία μαγειρέματος^{223,226} και η κατανάλωση επεξεργασμένων προϊόντων συμβάλουν καθοριστικά στα επίπεδα στα τρόφιμα και συνεπώς στην συνολική πρόσληψη των ρύπων αυτών. Επιπλέον, για μεγαλύτερη ακρίβεια στον υπολογισμό της διατροφικής πρόσληψης των PFASs δεν είναι μόνο η πρόσληψη των PFASs που είναι σημαντική αλλά και η πρόσληψη πρόδρομων ενώσεων οι οποίες δυνητικά μεταβολίζονται σε PFASs και πρέπει επίσης να εξετάζονται²²¹.

Πίνακας 31: Εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη από του στόματος σε PFOA (A) και PFOS (B)

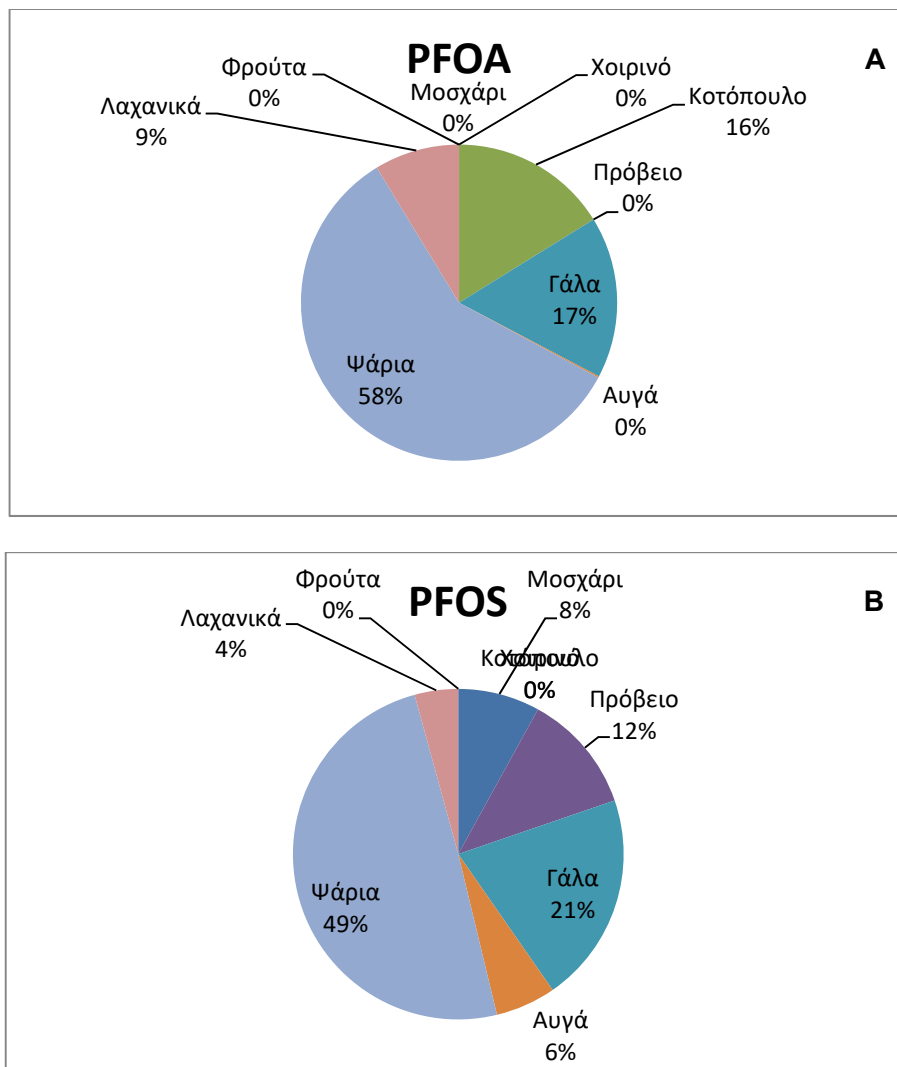
(A) PFOA			
Τρόφιμα	Ημερήσια μέση διαθεσιμότητα (g/kg/ημέρα)	Ημερήσια πρόσληψη L.B. (ng/kg/ ημέρα)	Ημερήσια πρόσληψη U.B. (ng/kg/ ημέρα)
Μοσχάρι	0.657	-	0.33
Χοιρινό	0.414	-	0.21
Κοτόπουλο	0.600	0.08	0.34
Πρόβειο	0.271	-	0.14
Γάλα	2.657	0.08	1.33
Αυγά	0.066	-	0.03
Ψάρι	0.486	0.28	0.49
Λαχανικά	3.500	0.04	1.75
Φρούτα	3.771	-	1.89
Πόσιμο νερό	32.143	0.01	0.02
Συνολική ημερήσια πρόσληψη		0.49	6.53

(B) PFOS			
Τρόφιμα	Ημερήσια μέση διαθεσιμότητα (g/kg/ημέρα)	Ημερήσια πρόσληψη L.B. (ng/kg/ ημέρα)	Ημερήσια πρόσληψη U.B. (ng/kg/ ημέρα)
Μοσχάρι	0.657	0.07	0.36
Χοιρινό	0.414	-	0.21
Κοτόπουλο	0.600	-	0.30
Πρόβειο	0.271	0.11	0.19
Γάλα	2.657	0.19	1.38
Αυγά	0.066	0.05	0.07
Ψάρι	0.486	0.45	0.64
Λαχανικά	3.500	0.04	1.75
Φρούτα	3.771	-	1.89
Πόσιμο νερό	32.143	-	0.02
Συνολική ημερήσια πρόσληψη		0.91	6.81

12.3 Συνεισφορά των διαφορετικών ομάδων τροφίμων στην συνολική πρόσληψη των PFASs από του στόματος

Λεπτομερής ανάλυση της συνεισφοράς των διαφορετικών ομάδων τροφίμων στη συνολική πρόσληψη των PFASs από του στόματος, λαμβάνοντας υπόψη τις lowerbound συγκεντρώσεις⁹⁶ δείχνει ότι αυτό που συνεισφέρει τα μέγιστα για το PFOS είναι η κατανάλωση ψαριού με 49.5% και για το PFOA το πόσιμο νερό με 92.31%. Η συνεισφορά στη πρόσληψη PFOA των 9 ομάδων τροφίμων παρουσιάζεται στο σχ. 39A: ψάρια (58%), γάλα (17%), κοτόπουλο (16%) και λαχανικά (9%) συνεισφέρουν κυρίως, ενώ τα αυγά, τα φρούτα και τα υπόλοιπα είδη κρεάτων έχουν αμελητέα συνεισφορά. Όσον αφορά στο PFOS, τα ψάρια (49%), το γάλα (21%), το πρόβειο κρέας (12%), το μοσχαρίσιο κρέας (8%), τα αυγά (6%) και τα λαχανικά (4%) συνεισφέρουν κυρίως, ενώ τα φρούτα, το χοιρινό κρέας και το κοτόπουλο έχουν αμελητέα συνεισφορά. Τα ποσοστά συνεισφοράς της κάθε ομάδας τροφίμων φαίνονται στο σχ. 39B. Υψηλή κατανάλωση σε ψάρια,

γαλακτοκομικά προϊόντα και λαχανικά είναι συνήθης στη Μεσογειακή διατροφή. Τα ευρήματα της μελέτης, είναι σε συμφωνία με την επικαιροποιημένη γνωμοδότηση της EFSA στην οποία αναφέρεται ότι η κατηγορία ψάρια και θαλασσινά συνεισφέρουν τα μέγιστα (86%) στη διατροφική πρόσληψη των ενηλίκων σε PFASs ^{96,227}. Ωστόσο, οι εκτιμώμενες συνεισφορές των διαφόρων ομάδων στη συνολική πρόσληψη πρέπει να αντιμετωπίζονται με κριτικό πνεύμα καθώς σε όλες τις κατηγορίες σημαντικό ποσοστό των δειγμάτων είναι κάτω από τα όρια του LOD. Ειδικότερα για τα φρούτα, πολύ περιορισμένος αριθμός δειγμάτων αναλύθηκε και όλες οι συγκεντρώσεις ήταν κάτω του LOD.



Σχήμα 39: % συνεισφορά των ομάδων τροφίμων στη συνολική διατροφική πρόσληψη σε PFOA (A) και PFOS(B), υπολογισμένη ως lowerbound

12.4 Σύγκριση της διατροφικής πρόσληψης που υπολογίστηκε από τα επίπεδα στα τρόφιμα και αυτής που προκύπτει από την εφαρμογή φαρμακοκινητικού μοντέλου βάσει δεδομένων βιοπαρακολούθησης.

Φαρμακοκινητικά μοντέλα (PK) μπορούν να εφαρμοστούν έτσι ώστε, βάσει των συγκεντρώσεων των PFOS και PFOA στον ορό, να προβλεφθεί η ημερήσια πρόσληψη που αντικατοπτρίζει όλες τις πιθανές οδούς έκθεσης⁹⁶. Φαρμακοκινητικό μονοδιαμερισματικό μοντέλο σταθεροποιημένης κατάστασης^{96,99,228,229,230} εφαρμόστηκε για να γίνει η εκτίμηση της συνολικής ημερήσιας πρόσληψης από τα επίπεδα των PFOS και PFOA στον ορό αίματος του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας που προσδιορίστηκαν σε προηγούμενη μελέτη⁹¹. Τα επίπεδα της πρόσληψης που προσδιορίστηκαν από το φαρμακοκινητικό μοντέλο συγκρίθηκαν με εκείνα που υπολογίστηκαν από τα δεδομένα των lowerbound συγκεντρώσεων των PFOS και PFOA στα τρόφιμα και το πόσιμο νερό και παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη ενότητα. Η πρόσληψη υπολογίστηκε βάσει της μαθηματικής εξίσωσης που ακολουθεί:

$$DP=CP \times kP \times Vd$$

Όπου DP είναι η ημερήσια προσλαμβανόμενη δόση σε $ng\ kg^{-1}$ σωματικού βάρους $ημέρα^{-1}$, CP είναι η συγκέντρωση PFOS και PFOA στον ορό (διάμεσος τιμή) σε $ng\ mL^{-1}$, kP είναι ο ρυθμός απομάκρυνσης για κινητική πρώτης τάξης ανά ημέρα με μονάδες $ημέρα^{-1}$ και αντιστοιχεί στο $0.693/T_{1/2}$ και Vd είναι ο όγκος κατανομής σε $mL\ kg^{-1}$ σωματικού βάρους. Οι τιμές του όγκου κατανομής και χρόνου ημίσειας ζωής που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της πρόσληψης είναι αυτές που προτείνονται από την EFSA στην πρόσφατη γνωμοδότησή της⁹⁶: χρόνος ημίσειας ζωής τα 2.3 χρόνια (839.5 ημέρες) για το PFOA και 5.4 χρόνια (1971 ημέρες) για το PFOS και $300\ mL\ kg^{-1}$ όγκος κατανομής. Οι διάμεσες συγκεντρώσεις στον ορό⁹¹ είναι για το PFOA $1.94\ ng\ mL^{-1}$ και για το PFOS $9.21\ ng\ mL^{-1}$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 32. Παρά τον περιορισμένο αριθμό δειγμάτων τροφίμων που αναλύθηκαν στη μελέτη, οι τιμές της πρόσληψης που υπολογίστηκαν μέσω του μοντέλου είναι σε συμφωνία με εκείνες που προσδιορίστηκαν από τα δεδομένα των

συγκεντρώσεων των ενώσεων αυτών στα τρόφιμα τόσο για το PFOS (0.48 vs 0.49 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹) όσο και για το PFOA (0.97 vs 0.91 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹).

Η υψηλότερη τιμή που υπολογίστηκε μέσω των επιπέδων του PFOS στον ορό με βάση το φαρμακοκινητικό μοντέλο πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη δεν έχει συνυπολογιστεί η έκθεση από άλλες οδούς όπως η εισπνοή αέρα και σκόνης ή η απορρόφηση μέσω του δέρματος. Η συμφωνία μεταξύ των προβλεπόμενων τιμών από το μοντέλο και εκείνων που υπολογίστηκαν από τις μέσες lowerbound συγκεντρώσεις των PFOS και PFOA στα τρόφιμα συνάδει με το συμπέρασμα ότι η διατροφή αποτελεί την κύρια οδό έκθεσης και ευθύνεται για το 91% στην περίπτωση του PFOS και για το 99% στην περίπτωση του PFOA, της συνολικής πρόσληψης²²³. Επιπλέον, όπως διαπιστώθηκε και από την EFSA⁹⁶ η εφαρμογή lowerbound συγκεντρώσεων στην εκτίμηση της διατροφικής έκθεσης οδηγεί σε αποτελέσματα που βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά που λαμβάνονται βάσει των επιπέδων στον ορό του αίματος, άρα αντιπροσωπεύει ακριβέστερα την αληθή έκθεση.

Πίνακας 32: Σύγκριση της υπολογισθείσας πρόσληψης και της προβλεπόμενης με τη χρήση φαρμακοκινητικού μοντέλου

Ένωση	Πρόσληψη υπολογιζόμενη βάσει επιπέδων στα τρόφιμα (ng/kg σωμ. βάρους/ημέρα)	Πρόσληψη εκτιμώμενη βάσει φαρμακοκινητικού μοντέλου (ng/kg σωμ. βάρους/ημέρα)
PFOA	0.49	0.48
PFOS	0.91	0.97

12.5 Σύγκριση της έκθεσης του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας με άλλες χώρες

Η σύγκριση της διατροφικής έκθεσης μεταξύ χωρών πρέπει να εξετάζεται με μεγάλη προσοχή. Διαφορές στη μεθοδολογία των μελετών (δειγματοληψία και ανάλυση των τροφίμων, ποσοστό των συγκεντρώσεων που βρίσκεται κάτω του LOD και χειρισμός των δειγμάτων αυτών στους υπολογισμούς, επιλογή των

ομάδων τροφίμων και μεθοδολογία συλλογής των δεδομένων κατανάλωσης τροφίμων) καθιστούν την άμεση σύγκριση μεταξύ των χωρών αβέβαιη και σε πολλές περιπτώσεις ανέφικτη. Επιπλέον παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη στη συνολική πρόσληψη σε PFASs είναι τα υλικά συσκευασίας και η διαδικασία μαγειρέματος ή η επεξεργασία των τροφίμων.

Δημοσιευμένες μελέτες στην αξιολόγηση της διατροφικής έκθεσης σε διάφορες χώρες παγκοσμίως έχουν παρουσιαστεί σε άρθρα ανασκόπησης από τους Domingo J.L. το 2012²³¹, Cornelis et al. το 2012²¹⁴ (Πίνακας 33) και πολύ πρόσφατα από τους Domingo και Nadal το 2017²²⁷. Η έκθεση από του στόματος του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας που υπολογίστηκε σαν lowerbound τιμή για το PFOA (0.488 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹) και το PFOS (0.903 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹) είναι συγκρίσιμη με την έκθεση που έχει υπολογιστεί για τον Καναδά (1.1 και 1.8 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹) και την Ισπανία (1 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ για τα PFOS). Για τη Γερμανία, το Βέλγιο, το Ηνωμένο Βασίλειο, την Ιταλία, την Ολλανδία, τη Σουηδία εκτιμήθηκε πιο υψηλή διατροφική πρόσληψη σε PFOS²¹⁴. Σε πρόσφατες μελέτες που δημοσιεύτηκαν την περίοδο 2011-2016 και ανασκοπήθηκαν από τους Domingo και Nadal το 2017²²⁷, 0.3 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ για το PFOS και 0.2 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ για το PFOA υπολογίστηκαν σε μελέτη στην Ολλανδία, 1.84 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ για PFOS και 5.05 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ για PFOA στην Ισπανία, 0.66 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ για PFOS και 0.74 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ για PFOA στη Γαλλία, 1.00 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ για PFOS και 0.69 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ για PFOA στη Σουηδία, 0.10-2.51 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ για PFOS και 0.13-0.38 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ για PFOA στην Κίνα, 0.47-3.03 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ για PFOS και 0.17-1.68 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ για PFOA στη Νότια Κορέα.

Πίνακας 33: Μέση εκτιμώμενη διατροφική πρόσληψη σε PFOS και PFOA (ng kg^{-1} σωματικού βάρους ημέρα⁻¹) που έχει δημοσιευθεί για διάφορες χώρες

Γενικός πληθυσμός	PFOS	PFOA	Αναφορές
Φλαμανδία, Βέλγιο	24.2	6.10	(214)
Ηνωμένο Βασίλειο	10-100	1-70	(222)
Γερμανία	1.8	3.9	(228)
Καναδάς (προϊόντα ζωικής προέλευσης)	1.8	1.1	(216)
Ισπανία (Καταλονία)	1	-	(218)
Ιταλία (ψάρια και θαλασσινά, πόσιμο νερό)	58	2.09	(90)
Ολλανδία (ψάρια και θαλασσινά, πόσιμο νερό)	57	2.06	(90)
Σουηδία (ψάρια και θαλασσινά, πόσιμο νερό)	45.1	1.69	(90)
Ηνωμένο Βασίλειο (ψάρια και θαλασσινά, πόσιμο νερό)	49.3	1.82	(90)
Πληθυσμός από δυτικές χώρες	18.6	2.64	(229)
Ελλάδα (9 κατηγορίες τροφίμων και πόσιμο νερό)	0.91	0.488	Παρούσα μελέτη

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13

Για τη διερεύνηση της σχέσης της έκθεσης σε περιβαλλοντικούς ρύπους με τις διαταραχές στον οργανισμό που οδηγούν στην εκδήλωση ασθενειών, αναλυτικά δεδομένα για τα επίπεδα των χημικών ρύπων στα τρόφιμα πρέπει να συνδυαστούν με δεδομένα για τα επίπεδα στο περιβάλλον και με δεδομένα σχετικά με την «εσωτερική έκθεση» (επίπεδα στο αίμα κ.τ.λ.). Αυτά αποτελούν τους βασικούς πυλώνες στη μελέτη του exposome για τη συσχέτιση της περιβαλλοντικής έκθεσης με την κατάσταση της υγείας. Στο πλαίσιο αυτό στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκαν αναλυτικά εργαλεία και μελετήθηκαν οι ενώσεις της ομάδας των διοξινών και οι υπερφθοριωμένες ενώσεις ως προς τα επίπεδα στα τρόφιμα, τη συνολική διατροφική έκθεση και τα επίπεδα στον ορό.

13.1 Ανάπτυξη μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων της ομάδας των διοξινών σε τρόφιμα

Τα αποτελέσματα της μελέτης σε διεργαστηριακά δείγματα και σε δείγματα ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας δείχνουν ότι ο νέος τύπος ενεργού άνθρακα FU4652 που μελετήθηκε έχει καλή ικανότητα διαχωρισμού των υπό μελέτη ενώσεων από το λίπος, ενώ διαχωρίζει επιτυχώς όλα τα ομοειδή με πολύ καλές ανακτήσεις. Συνεπώς ο ενεργός άνθρακα FU 4652 αποτελεί αποτελεσματικό υλικό για τον διαχωρισμό των PCDDs, PCDFs και των non-ortho PCBs. Τα κριτήρια ποιότητας που εξετάστηκαν κατά την ανάπτυξη της μεθόδου (ανάκτηση επισημασμένου προτύπου, ακρίβεια, αναπαραγωγιμότητα, ειδίκευση και όρια ποσοτικοποίησης) την καθιστούν επαρκώς ευαίσθητη και εξειδικευμένη για την ανάλυση τροφίμων, ζωοτροφών και βιολογικών δειγμάτων και σε πλήρη συμφωνία με τις απαιτήσεις ποιότητας των σχετικών Ευρωπαϊκών κανονισμών.

Το κόστος του νέου υλικού είναι ιδιαίτερα χαμηλό, ενώ το συνολικό κόστος της μεθόδου είναι περίπου 25% πιο χαμηλό σε σχέση με το κόστος αυτοματοποιημένων μεθόδων προετοιμασίας δείγματος. Επιπλέον, η ποσότητα λίπους που μπορεί να εφαρμοστεί στην στήλη ενεργού άνθρακα FU 4652 είναι

μεγάλη (περίπου 10 g), ώστε αυτή η μέθοδος προετοιμασίας δείγματος να μπορεί να συνδυαστεί και με λιγότερο ευαίσθητη οργανολογία από αυτήν του HRGC-HRMS, όπως η GC-MS/MS, η οποία όμως έχει πολύ χαμηλότερο κόστος απόκτησης.

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται πλέον συστηματικά στο ΕΦΑΜΑΔ για την ανάλυση δειγμάτων τροφίμων.

13.2 Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό πολυχλωριωμένων διφαινυλίων στον ορό αίματος

Η μέθοδος για τα τρόφιμα που περιγράφεται στη προηγούμενη μελέτη, προσαρμόστηκε σε μικρότερη κλίμακα για να μπορεί να εφαρμοστεί στον περιορισμένο όγκο των δειγμάτων ορού (1 mL). Για το σκοπό αυτό έγινε χρήση μίας μόνο χρωματογραφικής στήλης η οποία περιέχει συνδυασμό δύο υλικών (όξινη silica και alumina). Στήλη ενεργού άνθρακα δεν χρησιμοποιήθηκε, καθώς η πολύ μικρή ποσότητα λιπιδίων που περιέχεται σε 1 mL ορού μπορεί να διαχωριστεί με την όξινη silica. Με την ελάττωση των σταδίων, ελαχιστοποιείται και η απώλεια του δείγματος κατά την προκατεργασία. Αυτό φαίνεται και στην υψηλή τιμή της ανάκτησης του προτύπου διαλύματος (82-118%) στην ανάλυση των ορών αίματος, αλλά και στην ανάκτηση της εμβολιασμένης ποσότητας (83-110%) στα δείγματα ορού. Για την επικύρωση της μεθόδου πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις σε διεργαστηριακά δείγματα με γνωστές τιμές στόχους. Τα παραπάνω ευρήματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα κριτήρια που έχουν θεσπιστεί σχετικά με τις αναλυτικές τεχνικές σε βιολογικά δείγματα.

Το συνολικό κόστος καθώς και ο χρόνος που απαιτείται για την ανάλυση, καθιστούν την παρούσα μέθοδο κατάλληλη για την εφαρμογή της σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Αυτό απαιτείται τόσο για τη συστηματική παρακολούθηση των επιπέδων PCBs στο γενικό πληθυσμό, όσο και για τη διερεύνηση της συσχέτισης των επιπέδων στο αίμα με συγκεκριμένες ασθένειες. Τα επίπεδα στο αίμα αντιπροσωπεύουν την «εσωτερική έκθεση» του ανθρώπου σε τοξικούς ρύπους, συνεπώς αναλυτικά εργαλεία για τον προσδιορισμό τους είναι απαραίτητα για τη μελέτη του exposome.

13.3 Επίπεδα πολυχλωριωμένων διφαινυλίων και υπερφθοριωμένων ενώσεων στον ορό

Στη μελέτη αυτή αναλύθηκαν δείγματα ορού αίματος για τον προσδιορισμό των επιπέδων πολυχλωριωμένων διφαινυλίων και υπερφθοριωμένων ενώσεων που συλλέχθηκαν στο πλαίσιο του προγράμματος HEALS, από εθελοντές που διαμένουν στην περιφέρεια Αττικής και από εθελοντές από την περιοχή του Ασπρόπυργου. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων έδειξαν ότι τα δείγματα ορού των εθελοντών που κατοικούν στον Ασπρόπυργο παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα PCBs από εκείνα των εθελοντών που διαμένουν σε άλλες περιοχές της Αττικής, όπως είναι αναμενόμενο, δεδομένου ότι η περιοχή του Ασπρόπυργου θεωρείται περιβαλλοντικά επιβαρυνόμενη.

Όσον αφορά στη σύγκριση των επιπέδων ανδρών και γυναικών, με χρήση του στατιστικού κριτηρίου t-test για τις μέσες τιμές των συγκεντρώσεων PCBs μεταξύ ανδρών και γυναικών των εθελοντών του HEALS διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο φύλων.

Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι στα δείγματα με υψηλές συγκεντρώσεις dioxin-like PCBs παρατηρήθηκαν και υψηλές τιμές στα indicator PCBs, ενώ η ίδια αντιστοιχία διαπιστώθηκε και για τις χαμηλές συγκεντρώσεις των PCBs, εύρημα που βρίσκεται σε συμφωνία με τη διαπίστωση ότι τα επίπεδα των indicator PCBs είναι αντιπροσωπευτικά της συνολικής επιβάρυνσης ενός δείγματος σε PCBs.

Οι αναλύσεις μεταβολομικής έδειξαν ότι τα δείγματα ορών των εθελοντών του προγράμματος HEALS που ήταν επιβαρυνμένα σε PCBs, παρουσίασαν και αυξημένες συγκεντρώσεις σε μεταβολίτες που έχουν προταθεί ως πιθανοί βιοδείκτες της έκθεσης σε οργανικούς ρύπους γενικά. Ωστόσο λόγω του περιορισμένου αριθμού δειγμάτων απαιτείται περαιτέρω μελέτη για τη σαφή συσχέτιση των μεταβολιτών με την έκθεση σε PCBs.

Αντιθέτως για τις υπερφθοριωμένες ενώσεις τα επίπεδα συγκεντρώσεων βρέθηκαν υψηλότερα στους ορούς των εθελοντών άλλων περιοχών της Αττικής σε σχέση με αυτά των δειγμάτων του Ασπρόπυργου. Τα PFASs λόγω των χημικών τους ιδιοτήτων γνωρίζουν ευρεία γκάμα εφαρμογών και ανήκουν στην

κατηγορία των χημικών ρύπων στους οποίους η έκθεση του ανθρώπου είναι συνυφασμένη με το βιοτικό επίπεδο μέσω των προϊόντων που χρησιμοποιεί στη διατροφή και την καθημερινότητα του (συσκευασμένα τρόφιμα, επεξεργασμένα υφάσματα κλπ). Το γεγονός αυτό ίσως να εξηγεί τα μειωμένα επίπεδα PFASs στους εθελοντές του Ασπροπύργου.

Στα δείγματα ορού των εθελοντών της Αττικής, παρατηρείται ότι τα δείγματα ανδρών είναι πιο επιβαρυσμένα σε σχέση με αυτά των γυναικών. Το γεγονός αυτό ίσως οφείλεται σε βιοχημικές διεργασίες κάθαρσης από PFOS και PFOA στις γυναίκες που είναι σε ηλικίες προ-εμμηνόπαυσης.

Σε σύγκριση των συγκεντρώσεων των PFASs στον ορό αίματος των εθελοντών του HEALS με προγενέστερη μελέτη του ΕΦΑΜΑΔ για τα PFASs, τα επίπεδα των PFOA είναι παρόμοια στις δύο μελέτες και στα δύο φύλα, ενώ στα επίπεδα των PFOS παρατηρείται μείωση και στα δύο φύλα, σε διάστημα έξι χρόνων. Ενδεχομένως η μείωση αυτή οφείλεται στη σταδιακή κατάργηση της βιομηχανικής παραγωγής και συνεπώς στη μείωση της χρήσης των ενώσεων αυτών.

13.4 Έκθεση του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας σε PCDDs, PCDFs και PCBs

Η διατροφική έκθεση σε PCDDs, PCDFs και PCBs βρίσκεται στο επίκεντρο του παγκοσμίου επιστημονικού ενδιαφέροντος εξαιτίας των κινδύνων για την υγεία με τους οποίους συνδέεται. Στη παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης των ενώσεων αυτών για το γενικό πληθυσμό της Ελλάδας. Μεγάλος αριθμός αντιπροσωπευτικών δειγμάτων από κατηγορίες τροφίμων που καταναλώνονται ευρέως στην Ελλάδα συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν κατά τα 16 χρόνια λειτουργίας του εργαστηρίου. Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού των συγκεντρώσεων των PCDDs, PCDFs και PCBs συνδυάστηκαν με τα δεδομένα διαθεσιμότητας τροφίμων που συλλέχθηκαν σε έρευνα οικογενειακού προϋπολογισμού και βρίσκονται διαθέσιμα στο διαδίκτυο. Με βάση τα ευρήματα της μελέτης, η κατηγορία τροφίμων με την υψηλότερη συνολική μέση συγκέντρωση PCDDs, PCDFs και

dioxin-like PCBs που υπολογίστηκε είναι τα ψάρια/θαλασσινά και η ομάδα με τη χαμηλότερη μέση συγκέντρωση είναι τα φυτικά έλαια. Τα πιο υψηλά επίπεδα indicator PCBs βρέθηκαν επίσης στην ομάδα ψάρια/θαλασσινά, ενώ η χαμηλότερη μέση συγκέντρωση παρουσιάστηκε στα αυγά.

Για τον γενικό ενήλικο πληθυσμό στην Ελλάδα, η μέση ημερήσια πρόσληψη σε PCDDs, PCDFs και dioxin-like PCBs που υπολογίστηκε είναι 1.27 pg WHO-TEQ kg⁻¹ σωματικού βάρους, ενώ για τα indicator PCBs η μέση ημερήσια πρόσληψη ανέρχεται στα 7.85 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους. Η κατηγορία τροφίμων που συνεισφέρει τα μέγιστα στη συνολική διατροφική πρόσληψη σε PCDDs, PCDFs και PCBs είναι τα ψάρια/θαλασσινά⁴⁷.

Η διατροφική έκθεση του γενικού πληθυσμού ενηλίκων στην Ελλάδα είναι στα κάτω όρια της ημερήσιας ανεκτής πρόσληψης (TDI 1-4 pg WHO-TEQ kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹) που προτείνεται από τον Π.Ο.Υ, ενώ βρίσκεται κάτω από το ανώτατο όριο εβδομαδιαίας πρόσληψης TWI 14 pg WHO-TEQ kg⁻¹ σωματικού βάρους εβδομ.⁻¹ που προτάθηκε από τη Scientific Committee on Food της Ευρωπαϊκής Ένωσης⁹⁰ το 2008. Για τον πληθυσμό της Ελλάδας δεν αναμένονται υψηλά επίπεδα έκθεσης λόγω της μη εκτεταμένης βιομηχανικής δραστηριότητας. Επιπρόσθετα η αποτέφρωση απορριμμάτων η οποία αποτελεί σημαντική πηγή εκπομπής διοξινών δεν έχει εφαρμοστεί στην Ελλάδα σαν συστηματική μέθοδος διαχείρισης απορριμμάτων. Η επιστημονική ομάδα της EFSA για τους ρύπους στα τρόφιμα, αναθεώρησε πρόσφατα⁴⁷, το ανώτατο εβδομαδιαίο όριο πρόσληψης των ενώσεων της ομάδας των διοξινών στα 2 pg WHO-TEQ ανά κιλό σωματικού βάρους. Η εκ νέου αξιολόγηση του κινδύνου βασίστηκε σε δύο επιδημιολογικές μελέτες στις οποίες διαπιστώθηκε επίδραση στην ποιότητα του σπέρματος, σαν συνέπεια της προ- και μεταγεννητικής έκθεσης σε ενώσεις της ομάδας των διοξινών^{75,76}.

Από τα νέα δεδομένα της EFSA προκύπτει ότι η μέση διατροφική πρόσληψη σε διοξίνες και παρόμοιες ενώσεις στην Ευρώπη κυμαίνεται από 2.1 σε 10.5 pg WHO-TEQ kg⁻¹ σωματικού βάρους εβδομ.⁻¹, γεγονός που αποδεικνύει ότι το

προτεινόμενο εβδομαδιαίο όριο πρόσληψης στις ενώσεις αυτές ξεπερνάται σε όλες σχεδόν τις χώρες.

Τα νέα μειωμένα εβδομαδιαία όρια πρόσληψης από την EFSA ενισχύουν την αναγκαιότητα συνεχούς προσδιορισμού των ενώσεων της ομάδας των διοξινών στα τρόφιμα. Ωστόσο, ελλείπει συστηματικών δεδομένων κατανάλωσης τροφίμων για τον γενικό πληθυσμό της Ελλάδας θα πρέπει να είμαστε επιφυλακτικοί στις συγκρίσεις με τα νεότερα προτεινόμενα όρια.

13.5 Έκθεση του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας σε υπερφθοριωμένες ενώσεις

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν επίσης μία προκαταρκτική εκτίμηση της έκθεσης του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας σε υπερφθοριωμένες ενώσεις, με βάση τα δεδομένα της ανάλυσης των συγκεντρώσεων των PFOS και PFOA στα τρόφιμα και στο πόσιμο νερό στην Ελλάδα. Η από του στόματος πρόσληψη σε PFOS και PFOA που υπολογίστηκε για το γενικό πληθυσμό είναι χαμηλότερη από τις τιμές ανεκτής ημερήσιας πρόσληψης (TDI) που έχει ορίσει η EFSA και τις προβλεπόμενες δόσεις αναφοράς (RfDs) που προτείνονται σε δημοσιευμένη μελέτη. Η εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη σε PFOA και PFOS του γενικού πληθυσμού της Ελλάδας από την κατανάλωση τροφίμων, λαμβάνοντας υπόψη τις lowerbound συγκεντρώσεις των ενώσεων αυτών στα τρόφιμα, όπως προτείνεται από την EFSA⁹⁶ είναι 0.482 και 0.903 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους αντίστοιχα, ενώ η πρόσληψη από το πόσιμο νερό είναι 0.006 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους ημέρα⁻¹ για το PFOA ενώ είναι αμεληταία για το PFOS. Παρά τα σχετικά χαμηλά επίπεδα των PFASs στα δείγματα και τη χαμηλή ημερήσια πρόσληψη που έχει υπολογιστεί στη παρούσα μελέτη, είναι σημαντικό για τη δημόσια υγεία να παρακολουθείται και να αξιολογείται η έκθεση στις ενώσεις αυτές.

Πρόσφατα η επιστημονική επιτροπή της EFSA για τους ρύπους στα τρόφιμα πρότεινε νέα εβδομαδιαία όρια για τη πρόσληψη σε PFOS και PFOA τα 13 και 6 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους εβδομ.⁻¹ και αναφέρει τον lowerbound υπολογισμό των επιπέδων ως εκείνον που προσεγγίζει καλύτερα τα πραγματικά επίπεδα έκθεσης του πληθυσμού⁹⁶. Η μείωση στα προτεινόμενα όρια της πρόσληψης στις

ενώσεις PFOS και PFOA προήλθε από νεότερα δεδομένα σε επιδημιολογικές μελέτες στον άνθρωπο που αφορούν κυρίως στην αύξηση της ολικής χοληστερόλης στον ορό του αίματος.

Σύμφωνα με την πρόσφατη γνωμοδότηση της επιστημονικής επιτροπής της EFSA, για το PFOS η μέση διατροφική έκθεση (lowerbound) στην Ευρώπη κυμαίνεται μεταξύ 1.26 και 20.86 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους εβδομ.⁻¹ και ο πληθυσμός που εμφανίζει υψηλή έκθεση στις ενώσεις αυτές κυμαίνεται από 3.5 έως 165.9 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους εβδομ.⁻¹. Για το PFOA η μέση (lowerbound) διατροφική έκθεση είναι μεταξύ 1.47 και 18.27 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους εβδομ.⁻¹ ενώ τα επίπεδα του επιβαρυσμένου σε έκθεση πληθυσμού βρίσκονται μεταξύ 3.43 και 37.59 ng kg⁻¹ σωματικού βάρους εβδομ.⁻¹. Συνεπώς παρατηρείται υπέρβαση των ορίων πρόσληψης των PFOS και PFOA σε μεγάλο μέρος του πληθυσμού της Ευρώπης.

Όσον αφορά γενικότερα τους ανθεκτικούς οργανικούς ρύπους, ακόμα και χαμηλά επίπεδα έκθεσης είναι σημαντικά για την δημόσια υγεία και πρέπει να προσδιορίζονται και να αξιολογούνται καθότι πολλοί χημικοί ρύποι μπορούν να εμφανίσουν τοξικές δράσεις ακόμα και σε χαμηλά επίπεδα, ιδιαίτερα σε περιόδους της ζωής του ανθρώπου κρίσιμες για την ανάπτυξη, όπως είναι η εμβρυϊκή, βρεφική και παιδική ηλικία. Επίσης τελευταία μελετάται η συνδυασμένη δράση των χημικών ρύπων, η οποία μπορεί να είναι ισχυρότερη και να έχει σοβαρότερες συνέπειες στην υγεία του ανθρώπου από αυτές που έχουν διαπιστωθεί για κάθε ρύπο μεμονωμένα. Τα αποτελέσματα της μελέτης της έκθεσης του ανθρώπου σε τοξικούς ρύπους όπως οι διοξίνες και οι υπερφθοριωμένες ενώσεις είναι απαραίτητο εργαλείο έτσι ώστε η θεωρητική έννοια του exposome να εξελιχθεί σε εφαρμοσμένη επιδημιολογική έρευνα και να οδηγήσει σε συμπεράσματα και στρατηγικές για την προστασία της δημόσιας υγείας.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

POPs	Persistent Organic Pollutants
WHO	World Health Organization
PCDDs	Polychlorinated Dibenzodioxins
PCDFs	Polychlorinated Dibenzofurans
TCDD	Tetrachloro Dibenzodioxin
OCDD	Octachloro Dibenzodioxin
PCBs	Polychlorinated Biphenyls
IARC	International Agency for Research on Cancer
TEF	Toxic Equivalent Factors
TEQ	Toxic Equivalency
AHR	Aryl Hydrocarbon Receptor
PFASs	Perfluoroalkylated Substances
PFOS	Perfluorooctane Sulfonate
PFOA	Perfluorooctanoic Acid
UNEP	United Nations Environment Programme
PM _{2.5}	Particulate matter (<2.5)
PM ₁₀	Particulate matter (<10)
TVOCs	Total Volatile Organic Compounds
PAHs	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
EPA	Environmental Protection Agency
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
EFSA	European Food Safety Authority
TDS	Total Diet Study
DD	Duplicate Diet

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Secretariat of the Stockholm Convention. Stockholm Convention on POPs. What are POPs? The 12 initial POPs under the Stockholm Convention. 2008b [cited 2017 Dec 16]. Available from: <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/tabid/673/Default.aspx>
2. WHO 1995. A review of Selected Persistent Organic Pollutants. World Health Organization, Geneva, Switzerland (http://who.int/ipcs/assessment/en/pocs_95_39_2004_05_13.pdf).
3. WHO 2010. Persistent Organic Pollutants: Impact on Child Health (http://www.who.int/ceh/publications/persistent_organic_pollutant/en/).
4. Simonich S.L., Hites R.A., 1995. Global distribution of persistent organochlorine compounds. *Science*. 269(5232):1851-4.
5. Wania F., Mackay D., 1993. Global fractionation and cold condensation of low volatility organochlorine compounds in polar regions. *Ambio*. p. 10–8.
6. AMAP Assessment Report: Arctic Pollution Issues. 1998.
7. Grimalt J.O., Fernandez P., Vilanova R.M., 2001. Trapping of organochlorine compounds in high mountain lakes. *Scientific World Journal*. 1:609–11.
8. Papadopoulos A., Vassiliadou I., Costopoulou D., Papanicolaou C., Leondiadis L., 2004. Levels of dioxins and dioxin-like PCBs in food samples on the Greek market. *Chemosphere*, 57, 413-419.
9. Lee D.H., Porta M., Jacobs Jr. D.R. and Vandenberg L.N., 2014. Chlorinated Persistent Organic Pollutants, Obesity and Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews*. 35: 557-601.
10. Liem, A.K., Furst, P., Rappe, C., 2000. Exposure of populations to dioxins and related compounds. *Food Additives and Contaminants* 17, 241–259.
11. Thundiyil J.G., Solomon G.M., Miller M.D., 2007. Trans-generational exposures: persistent chemical pollutants in the environment and breast milk. *Pediatric Clinics of North America*, 54: 81–101.

12. Aneck-Hahn N.H. et al., 2007. Impaired semen quality associated with environmental DDT exposure in young men living in a malaria area in the Limpopo Province, South Africa. *Journal of Andrology*, 28(3):423-34.
13. Bhatia R. et al., 2005. Organochlorine pesticides and male genital anomalies in the child health and development studies. *Environmental Health Perspectives*, 113: 220-224.
14. Lee D.H., Lee I.K., Song K., Steffes M., Toscano W., Baker B.A., Jacobs D.R. Jr., 2006. A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: results from the National Health and Examination Survey 1999-2002. *Diabetes Care*. 29(7):1638-44.
15. Borg D., Lund B.O., Lindquist N.G., Håkansson H., 2013. Cumulative health risk assessment of 17 perfluoroalkylated and polyfluoroalkylated substances (PFASs) in the Swedish population. *Environ. Int.* 59:112-23.
16. Kortenkamp A., Backhaus, T., Faust, M., 2009. State of the Art Report on Mixture Toxicity - Final Report, 391 pp.
17. Hernández F. and Tsatsakis A.M. 2017. Human exposure to chemical mixtures: Challenges for the integration of toxicology with epidemiology data in risk assessment *Food and Chemical Toxicology. Food and Chemical Toxicology*, 103: 188-193.
18. WHO, 2009. Assessment of combined exposures to multiple chemicals. <http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/aggregate/en/>
19. Kavlock R.J., Daston G.P., DeRosa C., Fenner-Crisp P., Gray L.E., Kaattari S., Lucier G., Luster M., Mac M.J., Maczka C., Miller R., Moore J., Rolland R., Scott G., Sheehan D.M., Sinks T., Tilson H.A., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* 4:715-40
20. NIEHS, 2010. Endocrine Disruptors https://www.niehs.nih.gov/health/materials/endocrine_disruptors_508.pdf

21. Polyzos, S.A., Kountouras, J., Deretzi, G., Zavos, C., Mantzoros, C.S., 2012. The emerging role of endocrine disruptors in pathogenesis of insulin resistant: a conceptimplicating nonalcoholic fatty liver disease. *Curr. Mol. Med.* 12 (1), 68–82.
22. Kabir E.R., Rahman M.S., Rahman I., 2015. Review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40: 241–258.
23. UNEP and WHO, 2013. United Nations Environment Programme and the World Health Organization, 2013. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals-2012, Available at: <http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/>
24. Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., et al., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocr. Rev.* 30 (4), 293–342.
25. Holmes D.A., Harrison B.K. and Dolfig J., (1993). Estimation of Gibbs free energies of formation for polychlorinated biphenyls. *Environ. Sci. Technol.*, 27, 725-731.
26. Liem A.K.D. and Theelen R.M.C., 1997. Academic dissertation, Dioxins: Chemical analysis, exposure and risk assessment. Universiteit Utrecht, Research Instituut voor Toxicologie, National Institute of Public Health and the Environment.
27. Fiedler H., 1994. Sources of PCDD/PCDF and impact on the environment. *Organohalogen Compounds*, 20, 229-236.
28. Stanmore B.R., 2004. The formation of dioxins in combustion systems. *Combustion and Flame*. 136(3): 398-4.
29. Startin J.R., Rose M., Wright C., Parker I. and Gilbert J., 1990. Surveillance of British foods for PCDDs and PCDFs. *Chemosphere*, 20, 793-798.

30. EPA, 2004. Exposure and human health reassessment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds: National Academy of Sciences (NAS) <http://www.epa.gov/ncea/pdfs/dioxin/nas-review/>
31. Schecter, A., Fuerst, P., et al., 2001b. Dioxin, dibenzofuran and coplanar PCB levels in high and low fat American ice cream and yogurt. *Organohalogen Compd.* 51, 376–379.
32. Schecter, A., Papke, O., 1998. Comparison of blood dioxin, dibenzofuran and coplanar PCB levels in strict vegetarians (vegans) and the general United States population. *Organohalogen Compd.* 38, 179–182.
33. Pirkle, J.L., Wolfe, W.H., et al., 1989. Estimates of the half-life of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Vietnam veterans of Operation Ranch. *Hand. J. Toxicol. Environ. Health* 27, 165–171.
34. Aylward, L.L., Brunet, R.C., et al., 2005. Concentration-dependent TCDD elimination kinetics in humans: toxicokinetic modeling for moderately to highly exposed adults from Seveso, Italy, and Vienna, Austria, and impact on dose estimates for the NIOSH cohort. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 15, 51–65.
35. Emond, C., Michalek, J.E., Birnbaum, L.S., DeVito, M.J., 2005. Comparison of the use of a physiologically based pharmacokinetic model and a classical pharmacokinetic model for dioxin exposure assessments. *Environ. Health Perspect.* 113 (12), 1666–1674.
36. ATSDR 1998. Toxicological profile for chlorinated dibenzo-p-dioxins. Agency Tox. Substances Disease Registry, US.
37. Grumetto, L., Ortosecco, G., Russo, G., Guida, M., Ferranti, P., Nasi, A., Barbato, F., 2015. Dioxin-like PCB levels in maternal and umbilical cord sera of people living near dump sites in southern Italy: a pilot study of biomonitoring. *Environ Monit Assess.* 187(3):88.
38. Costopoulou, D., Vassiliadou, I., Leondiadis, L., 2013. Infant dietary exposure to dioxins and dioxin-like compounds in Greece. *Food Chem Toxicol.* 59:316-24.

39. Pronczuk J., Moy G., Vallenias C., 2004. Breast milk: an optimal food. *Environ Health Perspect.* 112(13):A722-3.
40. McKinney J.D., Singh P., 1981. Structure-activity relationships in halogenated biphenyls: Unifying hypothesis for structural specificity. *Chem. Biol. Interactions.* 33,271-283.
41. De Voogt, P. and De Wit C., 1992. Evaluation of intercalibration exercise on three non-ortho and two mono-ortho chlorinated biphenyls in three herring oils samples. Joint report Department of Environmental and Toxicological Chemistry, University of Amsterdam and Institute of Applied Environmental Research, Stockholm University, Solna, July 1992.
42. Pohjanvirta R., Tuomisto J., 1994. Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models. *Pharmacol. Rev.*, 46, pp. 483-549.
43. Van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld A.T., Brunstrom B., Cook P. , Feeley M., Giesy J.P., Hanberg A., Hasegawa R., Kennedy S.W., Kubiak T., Larsen J.C., van Leeuwen F.X., Liem A.K., Nolt C., Peterson R.E., Poellinger L., Safe S., Schrenk D., Tillitt D., Tysklind M., Younes M., Waern F., Zacharewski T., 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.*, 106 pp. 775-792
44. WHO, 1998. Consultation on assessment of the health risk of dioxins; re-evaluation of the tolerable daily intake (TDI). *Food Addit. Contam.* 17 (4), 223-240.
45. SCF, Scientific Committee on Food, 2001. Opinion of the SCF on the risk assessment of dioxins and dioxin-like PCBs in food. In: Update Based on New Scientific Information Available since the Adoption of the SCF Opinion of 22nd November 2000. European Commission, Brussels.
46. JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2002. Safety evaluation of certain food additives and contaminants: polychlorinated dibenzodioxins, polychlorinated dibenzofurans and coplanar polychlorinated biphenyls. Available from: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v48je20>.
47. EFSA 2018, Risk for animal and human health related to the presence of dioxins and dioxin-like PCBs in food and feed. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain, EFSA journal.

48. WHO 2016, Non-dioxin-like polychlorinated biphenyls. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246225/9789241661713-eng.pdf;jsessionid=12BFB587FBCA9C64848159AE105A8230?sequence=1>
49. Bradfield, C.A. and Poland, A., 1988. A competitive binding assay for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related ligands for the Ah-receptor. *Mol. Pharmacol.*, 34, 682-688.
50. Poland A. and Knutsen, J.C., 1982. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: Examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 22, 517-554.
51. Nebert D.W., Roe A.L., Dieter M.Z., Solis W.A., Yang Y., Dalton T.P., 2000. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 59(1):65-85.
52. Puga A., Barnes S.J., Dalton T.P., Chang C., Knudsen E.S., Maier M.A., 2000. Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest. *J. Biol Chem.* 275(4):2943–2950.
53. Petrulis J.R., Bunce N.J., 2000. Competitive behavior in the interactive toxicology of halogenated aromatic compounds. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14(2):73-81.
54. Hankinson O., 1994. The role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in aryl hydrocarbon receptor action. *Trends Endocrinol. Metab.* 5:240–244.
55. Taylor J.S., 1979. Environmental chloracne: update and overview. *Ann N. Y Acad Sci.*;320:295–307.
56. Firestone D., 1973. Etiology of chick edema disease. *Environ. Health Perspect.* ;5:59–66.

57. Courtney K.D., Moore J.A., 1971. Teratology studies with 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 20(3):396–403.
58. Wickizer T.M., Brilliant L.B., Copeland R., Tilden R., 1981. Polychlorinated biphenyl contamination of nursing mothers' milk in Michigan. *Am. J. Public Health.* 71(2):132–137.
59. Bertazzi P.A., Consonni D., Bachetti S., Rubagotti M., Baccarelli A., Zocchetti C., Pesatori A.C., 2001. Health effects of dioxin exposure: a 20-year mortality study. *Am. J. Epidemiol.* 153(11):1031–44.
60. Mocarelli P., Gerthoux P.M., Patterson D.G., Jr., Milani S., Limonta G., Bertona M., Signorini S., Tramacere P., Colombo L., Crespi C., Brambilla P., Sarto C., Carreri V., Sampson E.J., Turner W.E., Needham L.L. 2008. Dioxin exposure, from infancy through puberty, produces endocrine disruption and affects human semen quality. *Environ. Health Perspect.* 116(1):70–7.
61. Kociba R.J., Keyes D.G., Beyer J.E., Carreon R.M., Wade C.E., Dittenber D.A., Kalnins R.P., Frauson L.E., Park C.N., Barnard S.D., Hummel R.A., Humiston C.G., 1978. Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 46(2):279–303.
62. Mandal P.K., 2005. Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J. Comp. Physiol. B.* 175: 221-230.
63. Schecter A., Birnbaum L., Ryan J.J., Constable J. D., 2006. Dioxins: An overview. *Environmental Research.* 101, 419-428.
64. Bond G.G., McLaren E.A., Lipps T.E. and Cook R.R., 1990. Effect of reclassification chloracne cases. *J. Occup. Med.*, 32, 423.
65. Mocarelli P., Needham L.L., Marocchi A., Petterson D.G., Brambilla P., Gerthoux P.M., Meazza L. and Carreri V., 1991. Serum concentrations of 2,3,7,8-TCDD and test results from selected residents of Seveso, Italy. *J. Toxicol. Environ. Health*, 32, 357-366.

66. Henriksen G.L., Ketchum N.S., Michalek J.E., Swaby J.A., 1997. Serum dioxin and diabetes mellitus in veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiology* 8:252-258.
67. Calvert G., Sweeney M., Deddens J., Wall D.K., 1999. An evaluation of diabetes mellitus, serum glucose, and thyroid function among US workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzop-dioxin. *Occup. Environ. Med.* 56:270–6.
68. Steenland K., Calvert G., Ketchum N., Michalek J., 2001. Dioxin and diabetes mellitus: an analysis of the combined NIOSH and Ranch Hand data. *Occup. Environ. Med.* 58(10): 641–648.
69. Gauger K.J., Kato Y., Haraguchi K., Lehmler H.J., Robertson L.W., Bansal R., Zoeller R.T., 2004. Polychlorinated biphenyls (PCBs) exert thyroid hormone-like effects in the fetal rat brain but do not bind to thyroid hormone receptors. *Environ. Health. Perspect.* 112:516–523.
70. Skaare J.U., Bernhoft A., Wiig Ø, Norum KR, Haug E, Eide DM, et al. Relationship between plasma levels of organochlorines, retinol and thyroid hormones from polar bears (*Ursus maritimus*) at Svalbard. *J Toxicol Environ Health A.* 2001;62:227–241.
71. Chiba I., Sakakibara A., Goto Y., Isono T., Yamamoto Y., Iwata H., Tanabe S. Shimazaki K., Akahori F., Kazusaka A., 2001. Negative correlation between plasma thyroid hormone levels and chlorinated hydrocarbon levels accumulated in seals from the coast of Hokkaido, Japan. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:1092–1097.
72. Cesh L.S., Williams T.D., Garcelon D.K., Elliott J.E., 2008. Patterns and trends of chlorinated hydrocarbons in nestling bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*) plasma in British Columbia and southern California. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55:496–502.
73. Crofton K.M., 2004. Developmental disruption of thyroid hormone: correlations with hearing dysfunction in rats. *Risk. Anal.* 24(6):1665–1671.
74. Schantz S.L., Widholm J.J., Rice D.C. 2003, Effects of PCB exposure on neuropsychological function in children. *Environ, Health Perspect.* 111(3):357-576.

75. Mocarelli P., Gerthoux P.M., Needham L.L., Patterson D.G. Jr., Limonta G., Falbo R., Signorini S., Bertona M., Crespi C., Sarto C., Scott P.K., Turner W.E., Brambilla P., 2011. Perinatal exposure to low doses of dioxin can permanently impair human semen quality. *Environ. Health Perspect.* 119(5):713-8.
76. Mínguez-Alarcón L., Sergeev O., Burns J.S., Williams P.L., Lee M.M., Korrick S.A., Smigulina L., Revich B., Hauser R., 2017. A Longitudinal Study of Peripubertal Serum Organochlorine Concentrations and Semen Parameters in Young Men: The Russian Children's Study. *Environ. Health. Perspect.* 125(3):460-466.
77. Lauby-Secretan B., Loomis D., Grosse Y., El Ghissassi F., Bouvard V., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Baan R., Mattock H., Straif K., 2013. WHO International Agency for Research on Cancer. Carcinogenicity of polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls. *Lancet. Oncol.* 14(4):287-8.
78. National Toxicology Program. NTP toxicology and carcinogenesis studies of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) (CAS No. 57465-28-8) in female Harlan Sprague- Dawley rats (Gavage studies). *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.* 2006; 520: 4-246.
79. National Toxicology Program. NTP toxicology and carcinogenesis studies of 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 118) (CAS No. 31508-00-6) in female Harlan Sprague- Dawley rats (Gavage studies). *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.* 2010; 559: 1-174.
80. National Toxicology Program. NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) (CAS No. 35065-27-1) in female Harlan Sprague-Dawley rats (Gavage studies). *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.* 2006; 529: 4-168.
81. Schiavon M., Torretta V., Rada E. C., Ragazzi M., 2016. State of the art and advances in the impact assessment of dioxins and dioxin-like compounds. *Environmental Monitoring and Assessment.* 188:57.
82. Kissa E. (2001). *Fluorinated surfactants and repellents.* New York, Marcel Dekker.

83. EFSA 2008, Perfluorooctane sulfonate (PFOS), Perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts, Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain, EFSA journal.
84. Luebker D., Hansen K.J., Bass N.M., Butenhoff J.L., Seacat A.M., 2002. Interactions of fluorochemicals with rat liver fatty acid-binding protein, *Toxicology*, vol. 176, pp.175-185.
85. Jones P.D., Hu W., De Coen W., Newsted J.L., Giesy J.P., 2003. Binding of perfluorinated fatty acids to serum proteins. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 22, pp. 2639-2649.
86. Vanden Heuvel J.P., Kuslikis B.I., Van Rafelghem M.J., Peterson R.E., 1991a. Tissue distribution, metabolism and elimination of perfluorooctanoic acid in male and female rats. *Journal of Biochemical Toxicology* vol. 6, pp. 83-92.
87. Stahl T., Mattern D., Brunn H., 2011. Toxicology of perfluorinated compounds. *Environmental Sciences Europe*. 23:38.
88. Olsen G., Burris J., Ehresman D., Froehlich J., Seacat A., Butenhoff J., Zobel L., 2007. Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environ. Health Perspect.*, 115, pp. 1298-1305.
89. Joensen U.N., Bossi R., Leffers H., Jensen A.A., Skakkebaek N.E., Jorgensen N., 2009. Do Perfluoroalkyl Compounds Impair Human Semen Quality? *Environ. Health Perspect.* 117, 923-927.
90. EFSA 2008. Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *EFSA J.* 653: 1–22.
91. Vassiliadou I., Costopoulou D, Ferderigou A, Leondiadis L., 2010. Levels of perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in blood samples from different groups of adults living in Greece. *Chemosphere*. 80(10):1199-206.

92. Lau C., 2003. Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. II: postnatal evaluation. *Toxicol. Sci.*; 74,:382– 392.
93. Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A., Seed, J., 2007. Perfluoroalkyl acids : a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol. Sci.* 99(2), 366-394.
94. Olsen G.W., Butenhoff J.L., Zobel L.R., 2009. Perfluoroalkyl chemicals and human fetal development: an epidemiologic review with clinical and toxicological perspectives. *Reprod. Toxicol.*, 27, pp. 212-230.
95. Lin C.Y., Chen P.C., Lin Y.C., Lin L.Y., 2009. Association among serum perfluoroalkyl chemicals, glucose homeostasis and metabolic syndrome in adolescents and adults. *Diabetes Care*, 32, pp. 702-708.
96. EFSA 2018, Risk to human health related to the presence of perfluorooctane sulfonic acid and perfluorooctanoic acid in food. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain, EFSA journal.
97. Zafeiraki E., Costopoulou D., Vassiliadou I., Bakeas E., Leondiadis L., 2014. Determination of perfluorinated compounds (PFCs) in various foodstuff packaging materials used in the Greek market. *Chemosphere*. 94: 169-176.
98. D'Hollander W., de Voogt P., De Coen W., Bervoets L., 2010. Perfluorinated Substances in Human Food and Other Sources of Human Exposure. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 208, 179-215.
99. Haug, L.S., Huber, S., Becher, G., Thomsen, C., 2011. Characterization of human exposure pathways to perfluorinated compounds: comparing exposure estimates with biomarkers of exposure. *Environ. Int.* 37, 687-693.
100. Olsen G. W., Huang H.-Y., Helzlsouer K.J., Hansen K. J., Butenhoff J. L., and Mandel J.H., 2005. Historical Comparison of Perfluorooctanesulfonate, Perfluorooctanoate, and Other Fluorochemicals in Human Blood. *Environ. Health Perspect.* 113(5): 539–545.

101. Midasch O., Drexler H., Hart N., Beckmann M.W., Angerer J., 2007. Transplacental exposure of neonates to perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate: a pilot study. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 80, pp. 643-648.
102. Tao L., Ma J., Kunisue T., Libelo E.L., Tanabe S., Kannan K., 2008. Perfluorinated compounds in human breast milk from several Asian countries, and in infant formula and dairy milk from the United States. *Environ. Sci. Technol.*, 42, pp. 8597-8602.
103. Voelkel W., Genzel-Boroviczeny O., Demmelmair H., Gebauer C., Koletzko B., Twardella D., Raab U., Fromme H., 2008. Perfluorooctane sulphonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in human breast milk: results of a pilot study. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 211, pp. 440-446.
104. Hölzer J., Midasch O., Rauchfuss K., Kraft M., Reupert R., Angerer J., Kleeschulte P., Marschall N., and Wilhelm M., 2008. Biomonitoring of Perfluorinated Compounds in Children and Adults Exposed to Perfluorooctanoate-Contaminated Drinking Water. *Environ Health Perspect.* 116(5): 651–657.
105. Rappaport S. M., Barupal D. K., Wishart D., Vineis P., and Scalbert A., 2014. The Blood Exposome and Its Role in Discovering Causes of Disease. *Environ Health Perspect.* 122(8): 769–774.
106. Barouki R., Audouze K., Coumoul X., Demenais F., Gauguier D., 2018. Integration of the human exposome with the human genome to advance medicine, *Biochimie.* 152:155-158.
107. Wild C.P., 2005. Complementing the genome with an "exposome": the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14(8):1847-50.
108. Rappaport S.M., Smith M.T., 2010. Epidemiology. Environment and disease risks. *Science.* 330(6003):460-1.

109. Escher B.I., Hackermüller J., Polte T. et al., 2017. From the exposome to mechanistic understanding of chemical-induced adverse effects. *Environ. Int.* 99:97-106.
110. Miller G.W. and Jones D.P., 2014. The nature of nurture: refining the definition of the exposome. *Toxicol. Sci.*, 137(1):1-2.
111. Vrijheid M., 2014. The exposome: a new paradigm to study the impact of environment on health. *Thorax.* 69(9):876-8.
112. Borg D., Lund B.O., Lindquist N.G., Håkansson H., 2013. Cumulative health risk assessment of 17 perfluoroalkylated and polyfluoroalkylated substances (PFASs) in the Swedish population. *Environ Int.*, 59:112-23.
113. Lim S.S., Vos T., Flaxman A.D., 2012. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 380(9859):2224-60.
114. Rappaport S.M., Barupal D.K., Wishart D., Vineis P., Scalbert A., 2014. The blood exposome and its role in discovering causes of disease. *Environ. Health Perspect.* 122(8):769-74.
115. Miller M.F. and Birnbaum L.S., Environmental exposures, endocrine disrupting chemicals, and new approaches to the science of risk assessment. *Dioxin 2014: 34th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants.*
116. HSE. The Workplace (Health, Safety and Welfare) Regulations 1992. London: Health and Safety Executive; 1992.
117. CDC. Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Atlanta, Georgia: Centers for Disease Control and Prevention; 2005.
118. Jeanneret F., Boccard J., Badoud F., 2014. Human urinary biomarkers of dioxin exposure: analysis by metabolomics and biologically driven data dimensionality reduction. *Toxicol. Lett.* 230(2):234-43.

119. Nøstbakken O.J., Maage A., 2015. Reply to the comments to our paper "Contaminant levels in Norwegian farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in the 13-year period from 1999 to 2011". *Environ Int.* 80:100-1.
120. Nicholson J.K., Lindon J.C., 2008. Systemsbiology–metabonomics. *Nature* 455, 1054–1056.
121. Lindon, J.C., Nicholson, J.K., Holmes, E., et al., 2003. Contemporary issues in toxicology– the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project. *Toxicology and Applied Pharmacology* 187, 137–146.
122. Forgacs A.L., Kent M.N., Makley M.K., Mets B., DelRaso N., Jahns G.L., Burgoon L.D., Zacharewski T.R., Reo N.V., 2012. Comparative metabolomics and genomic analyses of TCDD-elicited metabolic disruption in mouse and rat liver. *Toxicological Sciences* 125, 41–55.
123. Lin S., Yang Z., Liu H., Cai Z., 2011a. Metabolomic analysis of liver and skeletal muscle tissues in C57BL/6J and DBA/2J mice exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Molecular Bio Systems* 7, 1956–1965.
124. Lin S.H., Yang Z., Shen Y., Cai Z.W., 2011b. LC/MS- based non- targeted metabolomics for the investigation of general toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in C57BL/6J and DBA/2J mice. *International Journal of Mass Spectrometry* 301, 29–36.
125. Ruiz-Aracama A., Peijnenburg A., Kleinjans J., Jennen, D., van Delft, J., Hell-frisch, C., Lommen A., 2011. An untargeted multi-technique metabolomics approach to studying intracellular metabolites of Hep G2 cells exposed to 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *BMC Genomics*, 12, 251.
126. Arisawa K., Takeda H., Mikasa H., 2005. Background exposure to PCDDs/PCDFs/PCBs and its potential health effects: a review of epidemiologic studies. *J. Med. Invest.* 52(1-2):10-21.
127. Lu C., Wang Y., Sheng Z., Liu G., Fu Z., Zhao J., Zhao J., Yan X., Zhu B., Peng S., 2010. NMR-based metabonomic analysis of the hepatotoxicity induced by combined exposure to PCBs and TCDD in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 248(3):178-84.

128. Zhang L., Hatzakis E., Nichols R.G., Hao R., Correll J., Smith P.B., Chiaro C.R., Perdew G.H., Patterson A.D., 2015. Metabolomics Reveals that Aryl Hydrocarbon Receptor Activation by Environmental Chemicals Induces Systemic Metabolic Dysfunction in Mice. *Environ. Sci. Technol.* 49(13):8067-77.
129. O'Kane A.A., Chevallier O.P., Graham S.F., Elliott C.T., Mooney M.H., 2013. Metabolomic profiling of in vivo plasma responses to dioxin-associated dietary contaminant exposure in rats: implications for identification of sources of animal and human exposure. *Environ. Sci. Technol.* 47(10):5409-18.
130. Wang X., Liu L., Zhang W., Zhang J., Du X., Huang Q., Tian M., Shen H., 2017. Serum metabolome biomarkers associate low-level environmental perfluorinated compound exposure with oxidative /nitrosative stress in humans. *Environ. Pollut.* 229:168-176.
131. Olaf Pöpke, Dieter Schrenk and Peter Fürst, Chapter 3C: Biomarkers of Exposure: Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Polychlorinated Dibenzofuranes, Pages 261 – 287, *Biomarkers and Human Biomonitoring: Volume 1*, Editors: Lisbeth Knudsen, Domenico Franco Merlo.
132. Van Duursen, M., 2010. CYP1A1 induction in Lymphocytes from mice and humans: A biomarker of Dioxin exposure? *Organohalogen Compd.* 72, 1038–1041.
133. Saurat J.H., Kaya G., Saxer-Sekulic N., Pardo B., Becker M., Fontao L., Mottu F., Carraux P., Pham X.C., Barde C., Fontao F., Zennegg M., Schmid P., Schaad O., Descombes P., Sorg O., 2012. The cutaneous lesions of dioxin exposure: lessons from the poisoning of Victor Yushchenko. *Toxicol. Sci.* 125(1):310-7.
134. US EPA 2014, Emerging Contaminants Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Perfluorooctanoic Acid (PFOA).
135. Hoogenboom L.A.P., Traag W.A. , Fernandes A., Rose M., 2014. European developments following incidents with dioxins and PCBs in the food and feed chain. *Food Control.* 50:670 – 683.

136. Malisch R. and Kotz A., 2014. Dioxins and PCBs in feed and food-review from European perspective. *Sci Total Environ.* 491-492:2-10.
137. US EPA, United States Environmental Protection Agency Method 1613. 1994. Tetra- through Octa-chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS. US Environmental Protection Agency: Washington, DC.
138. US EPA, United States Environmental Protection Agency Method 1668. 2010. Chlorinated Biphenyl Congeners in Water, Soil, Sediment, and Tissue by HRGC/HRMS. US Environmental Protection Agency: Washington, DC.
139. Krokos F., Creaser C.S., Wright C., Startin J.R., 1997. Congener-specific method for the determination of ortho and non-ortho polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans in foods by carbon-column fractionation and gas chromatography-isotope dilution mass spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.* 357:732-742.
140. Liem A.K.D., De Jong A.P.J.M., Marshman J.A., Den Boer A.C., Groenemeijer G.S., Den Hartog R.S., De Korte G.A.L., Hoogerbrugge R., Kootstra P.R., Van 't Klooster H.A. 1990. A rapid clean up procedure for the analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in milk samples. *Chemosphere.* 20:843-850.
141. De Jong A.P.J.M., Liem A.K.D., Den Bore A.C., Van Der Heeft E., Marsman J.A., Van De Werken G. Wegman R.C.C., 1989. Analysis of polychlorinated dibenzofurans and dibenzo-p-dioxins in human milk by tandem hybrid mass spectrometry. *Chemosphere.* 19:59-66.
142. Molina L., Cabes M., Díaz-Ferrero J., Colla M., Martí R., Broto-Puig F., Comellas L., Rodríguez-Larena M.C., 2000. Separation of non-ortho polychlorinated biphenyl congeners on pre-packed carbon tubes. Application to analysis in sewage sludge and soil samples. *Chemosphere.* 40:921-927.
143. Martínez-Cored M., Pujadas E., Díaz-Ferrero J., Coll M., Martí R., Broto-Puig F., Comellas L., Rodríguez-Larena M.C., 1999. Fractionation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and

planar polychlorinated biphenyls by high performance liquid chromatography on a pyrenyl-silica column. *Fresenius J Anal Chem.* 364:576-583.

144. Concejero M., Ramos L., Jiménez B., Gómara B., Abad E., Rivera J., González M.J. 2001. Suitability of several carbon sorbents for the fractionation of various sub-groups of toxic polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. *J Chromatogr A.* 917:227-237.
145. Turner W.E., Isaacs S.G., Patterson D.G. Jr. 1992. An automated sample cleanup apparatus used in the procedure for measuring polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and ortho-unsubstituted (planar) biphenyls in human serum and adipose tissue. *Chemosphere.* 25:805-810.
146. Liem A.K.D., De Jong A.P.J.M., Marshman J.A., Den Boer A.C., Groenemeijer G.S., Den Hartog R.S., De Korte G.A.L., Hoogerbrugge R., Kootstra P.R., Van 't Klooster H.A. 1990. A rapid clean up procedure for the analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in milk samples. *Chemosphere.* 20:843-850.
147. Paustenbach D., Galbraith D., 2006. Biomonitoring and biomarkers: exposure assessment will never be the same. *Environ. Health Perspect.* 114(8):1143-9.
148. Nicholson J.K., Holmes E., Kinross J.M., Darzi A.W., Takats Z., Lindon J.C., 2012b. Metabolic phenotyping in clinical and surgical environments. *Nature.*; 491:384–392.
149. Rappaport S.M., 2012. Discovering environmental causes of disease. 66(2):99-102. *J Epidemiol Community Health.*
150. Polkowska Ż., Kozłowska K., Namieśnik J. and Przyjazny A., 2004. Biological Fluids as a Source of Information on the Exposure of Man to Environmental Chemical Agents. *Critical Reviews in Analytical Chemistry.* 34: 105-119.

151. Costopoulou D., Vassiliadou I., Papadopoulos A., Makropoulos V., Leondiadis L., 2006. Levels of dioxins, furans and PCBs in human serum and milk of people living in Greece. *Chemosphere*. 65(9):1462-9.
152. Zubero M.B., Eguiraun E., Aurrekoetxea J.J., Lertxundi A., Abad E., Parera J., Goñi-Irigoyen F., Ibarluzea J., 2017. Changes in serum dioxin and PCB levels in residents around a municipal waste incinerator in Bilbao, Spain.
153. Harmouche-Karaki M., Matta J., Helou K., Mahfouz Y., Fakhoury-Sayegh N, Narbonne J.F., 2017. Serum concentrations of selected organochlorine pesticides in a Lebanese population and their associations to sociodemographic, anthropometric and dietary factors: ENASB study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25(15):14350-14360.
154. Artacho-Cordón F., Belhassen H., Arrebola J.P., Ghali R., Amira D., Jiménez-Díaz I., Pérez-Lobato R., Boussem H., Hedili A., Olea N., 2015. Serum levels of persistent organic pollutants and predictors of exposure in Tunisian women. *Sci. Total Environ.* 511:530-4.
155. Lu D., Wang D., Ip H. S.S., Barley F., Ramage R., She J., 2012. Measurements of polybrominated diphenylethers and polychlorinated Biphenyls in a single drop of blood. *J.Chromatogr. B* 891–892,36–43.
156. Covaci A. and Schepens P., 2001. Simplified method for determination of organochlorine pollutants in human serum by solid-phase disk extraction and gas chromatography. *Chemosphere*. 43(4-7):439-47.
157. Eurachem, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics: Second edition (2014)*.
158. Commission Directive 2002/657/EC of 12 August 2002 concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
159. Van den Berg M., Birnbaum L.S., Denison M., De Vito M., Farland W., Feeley M., Fiedler H., Hakansson H., Hanberg A., Haws L., Rose M., Safe S., Schrenk D., Tohyama C., Tritscher A., Tuomisto J., Tysklind M., Walker N., Peterson R.E., 2006. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol. Sci.* 93(2):223-41.

160. [EC] European Commission. Commission Regulation (EU) No 589/2014 of 2 June 2014 laying down methods of sampling and analysis for the control of levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in certain foodstuffs and repealing Regulation (EU) No 252/2012. Official J. Eur. Union, L 164/18 (2014).
161. [EC] European Commission. Commission Regulation (EU) No 709/2014 of 20 June 2014 amending Regulation (EC) No 152/2009 as regards the determination of the levels of dioxins and polychlorinated biphenyls. Official J. Eur. Union, L 188/1 (2014).
162. [EC] European Commission. Commission Regulation (EU) 644/2017 of 5 April 2017 laying down methods of sampling and analysis for the control of levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in certain foodstuffs and repealing Regulation (EU) No 589/2014.
163. EC. (2011a). Commission Regulation (EU) No 1259/2011 of 2 December 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non dioxin-like PCBs in foodstuffs. Off. J. Eur. Union. L 320, 18-23.
164. Isosaari P., Kiviranta H., Lie O., Lundebye A.K., Ritchie G., Vartiainen T., 2004. Accumulation and distribution of polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and polychlorinated biphenyl congeners in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Environ. Toxicol. Chem.* 23(7):1672-9.
165. Berntssen M.H.G., Lundebye A.K., Torstensen B.E., 2005. Reducing the levels of dioxins and dioxin-like PCBs in farmed Atlantic salmon by substitution of fish oil with vegetable oil in the feed. *Aquac. Nutr.*, 11 (3), pp. 219-231.
166. Papadopoulou A., Vassiliadou I., Costopoulou D., Papanicolaou C., Leondiadis L., 2004. Levels of dioxins and dioxin-like PCBs in food samples on the Greek market. *Chemosphere*, 57, pp. 413-419.
167. AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 1990. *Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists*, 15th ed. AOAC, Arlington, VA, Method 970.52.

168. Guvenius D.M., Aronsson A., Ekman-Ordeberg G., Bergman A., Norén K., 2003. Human prenatal and postnatal exposure to polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, polychlorobiphenylols, and pentachlorophenol. *Environ. Health Perspect.* 111(9):1235-41.
169. Apostoli P., Magoni M., Bergonzi R., Carasi S., Indelicato A., Scarcella C., Donato F., 2005. Assessment of reference values for polychlorinated biphenyl concentration in human blood. *Chemosphere.* 61(3):413-21.
170. Fromme H., Albrecht M., Appel M., Hilger B., Völkel W., Liebl B., Roscher E., 2015. PCBs, PCDD/Fs, and PBDEs in blood samples of a rural population in South Germany. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 218(1):41-6.
171. Demond A., Franzblau A., Garabrant D., Jiang X., Adriaens P., Chen Q., Gillespie B., Hao W., Hong B., Jolliet O., Lepkowski J., 2012. Human exposure from dioxins in soil. *Environ. Sci. Technol.* 46(3):1296-302.
172. Eguchi A., Miyaso H., Mori C., 2016. The effects of early postnatal exposure to a low dose of decabromodiphenyl ether (BDE-209) on serum metabolites in male mice. *J. Toxicol. Sci.*, 41, pp. 667-675.
173. Shi X., Wahlang B., Wei X., Yin X., Falkner K.C., Prough R.A., Kim S.H., Mueller E.G., McClain C.J., Cave M., Zhang X., 2012. Metabolomic analysis of the effects of polychlorinated biphenyls in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Proteome Res.*, 11, pp. 3805-3815.
174. Amelio I., Cutruzzola F., Antonov A., Agostini M., Melino G., 2014. Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem. Sci.*, 39, pp. 191-198.
175. Aguilaniu H., Durieux J., Dillin A., 2005. Metabolism, ubiquinone synthesis, and longevity. *Genes Dev.*, 19, pp. 2399-2406.
176. Eguchi A., Enomoto T., Suzuki N., Okuno M., Mori C., 2017. Development of simple analytical methods of polychlorinated biphenyls (PCBs) in human serum by gas chromatography negative ion chemical ionization quadrupole mass spectrometry. *Acta Chromatogr.*
177. Costopoulou D., Vassiliadou I., Chrysafidis D., Bergele K., Tzavara E., Tzamtzis V., Leondiadis L., 2010. Determination of PCDD/F, dioxin-like

PCB and PAH levels in olive and olive oil samples from areas affected by the fires in summer 2007 in Greece. *Chemosphere*. 79(3):285-91.

178. Harada K., Saito T., Inoue K., Yoshinaga T., Watanabe T., Sasaki S., et al., 2004. The influence of time, sex and geographic factors on levels of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanate in human serum over the last 25 years. *J. Occup. Health*, 46, pp. 141-147.
179. EFSA (2012). Update of the monitoring of levels of dioxins and PCBs in food and feed. *EFSA journal*, 10(2832), 1-82.
180. Walpole S.C., Prieto-Merino D., Edwards P., Cleland J., Gretchen S., Roberts I., 2012. The weight of nations: an estimation of adult human biomass. *BMC Public Health*. 12:439.
181. Antonijevic B., Jankovic S., Curcic M., Durgo K., Stokic E., Srdic B., Tomic-Nagic D., 2011. Risk characterization for mercury, dichlorodiphenyltrichloroethane and polychlorinated biphenyls associated with fish consumption in Serbia. *Food Chem. Toxicol.* 49 (10), 2586-2593.
182. Lagiou P., Trichopoulou A., and the DAFNE contributors, 2001. The DAFNE initiative: the methodology for assessing dietary patterns across Europe using household budget survey data. *Public Health Nutrition* 4(5B):1135-1141.
183. Vassiliadou I., Papadopoulos A., Costopoulou D., Vasiliadou S., Christoforou S., Leondiadis L., 2009. Dioxin contamination after an accidental fire in the municipal landfill of Tagarades, Thessaloniki, Greece. *Chemosphere*, 74, pp. 879-884.
184. Tlustos C., Anderson W., Flynn A., Pratt I., 2014. Exposure of the adult population resident in Ireland to dioxins and PCBs from the diet. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 31(6):1100-13.
185. Cimenci O., Vandevijvere S., Gosciny S., Van Den Bergh M.A., Hanot V., Vinkx C., Bolle F., Van Loco J., 2013. Dietary exposure of the Belgian adult population to non-dioxin-like PCBs. *Food Chem. Toxicol.* 59:670-9.

186. Arnich N., Tard A., Leblanc J.C., Le Bizec B., Narbonne J.F., Maximilien R., 2009. Dietary intake of non-dioxin-like PCBs (NDL-PCBs) in France, impact of maximum levels in some foodstuffs. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 54(3):287-93.
187. Fattore E., Fanelli R., Turrini A., di Domenico A., 2006. Current dietary exposure to polychlorodibenzofurans, and dioxin-like polychlorobiphenyls in Italy. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 915-921.
188. Salgovicová D., Pavlovicová D., 2007. Exposure of the population of the Slovak Republic to dietary polychlorinated biphenyls. *Food Chem Toxicol.* 45(9):1641-9.
189. EFSA, 2005. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the presence of non dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and food, *EFSA J.* 284, 1–137.
190. Martens D., Balta-Brouma K., Brotsack R., Michalke B., Schramel P., Klimm C., Henkelmann B., Oxyinos K., Schramm K.W., Diamadopoulos E., Kettrup A., 1998. Chemical impact of uncontrolled solid waste combustion to the vicinity of the Kouroupitos ravine, Crete, Greece. *Chemosphere*, 36 pp. 2855-2866.
191. Rauscher-Gabernig E., Mischek D., Moche W., Prean M., 2013. Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo Risk Assess. Dietary intake of dioxins, furans and dioxin-like PCBs in Austria. 30(10):1770-9.
192. Sirot V., Tard A., Venisseau A., Brosseaud A., Marchand P., Le Bizec B., Leblanc, J.C., 2012. Dietary exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls of French population: results of the second French Total Diet Study. *Chemosphere.* 88, 492-500.
193. Marin S., Villalba P., Diaz-Ferrero J., Font G., Yusa V., 2011. Congener profile, occurrence and estimated dietary intake of dioxins and dioxin-like PCBs in foods marketed in the Region of Valencia (Spain). *Chemosphere* 82, 1253-1261.

194. Perello G., Gomez-Catalan J., Castell V., Llobet J.M., Domingo J.L., 2012. Assessment of the temporal trend of the dietary exposure to PCDD/Fs and PCBs in Catalonia, over Spain: health risks. *Food Chem. Toxicol.* 50, 399-408.
195. Bramwell L., Mortimer D., Rose M., Fernandes A., Harrad S., Pless-Mulloli T. 2016. UK dietary exposure to PCDD/Fs, PCBs, PBDD/Fs, PBBs and PBDEs: comparison of results from 24-h duplicate diets and total diet studies. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo Risk Assess.* 34(1):65-77.
196. Schwarz M.A., Lindtner O., Blume K., Heinmeyer G., Schneider K., 2013. Dioxin and dl-PCB exposure from food: the German LExUKon project. *Food Addit. Contam.: Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 31, 688-702.
197. Cederberg T., Sorensen S., Lund K.H., Friis-Wandall S., 2010. Danish monitoring of dioxins and PCB in food and feed during the years 2000-2009- Levels time trend and human exposure. *Organohalogen Comp.* 72, 952-955.
198. Kiviranta H., Ovaskainen M.L., Vartiainen T., 2004. Market basket study on dietary intake of PCDD/Fs, PCBs and PBDEs in Finland. *Environ. Int.* 30:923-932.
199. Tornkvist A., Glynn A., Aune M., Darnerud P.O., Ankarberg, E.H., 2011. PCDD/F, PCB, PBDE, HBCD, and chlorinated pesticides in a Swedish market basket from 2005-levels and dietary intake estimations. *Chemosphere.* 83,193-199.
200. De Mul A., Bakker M.I., Zeilmaker M.Z., Traag W.A., Leeuwen S.P., Hoogenboom R.L., Boon P.E., Klaveren J.D., 2008. Dietary exposure to dioxins and dioxin-like PCBs in The Netherlands anno 2004. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 51, 278-287.
201. Windal I., Vandevijvere S., Maleki M., Gosciny S., Vinkx C., Focant J.F., Eppe G., Hanot V., Van J., 2010. Dietary intake of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs of the Belgian population. *Chemosphere.* 79,334-340.

202. Willett W.C., Sacks F., Trichopoulou A., Drescher G., Ferro-Luzzi A., Helsing E., Trichopoulos D., 1995. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am. J. Clin. Nutr.* 61(6 Suppl), 1402S-1406S.
203. Dernini S., Berry E.M., Serra-Majem L., La Vecchia C., Capone R., Medina F.X., Aranceta-Bartrina J., Belahsen R., Burlingame B., Calabrese G., Corella D., Donini L.M., Lairon D., Meybeck A., Pekcan A.G., Piscopo S., Yngve A., Trichopoulou A., 2016. Med Diet 4.0: the Mediterranean diet with four sustainable benefits. *Public Health Nutrition.* 20(7), 1322-1330.
204. Nostbakken O., Hove H., Duinker A., Lundebye A., Berntssen M., Hannisdal R., et al., 2015. Contaminant levels in Norwegian farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in the 13-year period from 1999 to 2011. *Environ. Int.* 74, 274-280.
205. Vandenberg L.N., Colborn T., Hayes T.B., Heindel J.J., Jacobs D.R. Jr., Lee, D.H., Shioda T., Soto A.M., Vom Saal F.S., Welshons W.V., Zoeller R.T., Myers J.P., 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr. Rev.* 33(3), 378-455.
206. Vandenberg L.N., Colborn T., Hayes T.B., Heindel J.J., Jacobs D.R. Jr., Lee D.H., Shioda T., Soto A.M., Vom Saal F.S., Welshons W.V., Zoeller R.T., Myers J.P., 2013. Regulatory decisions on endocrine- disrupting chemicals should be based on the principles of endocrinology. *Reprod. Toxicol.* 38, 1-15.
207. WHO (World Health Organisation), 2013. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals- 2012. WHO and UNEP.
208. White S.S., Birnbaum L.S., 2009. An Overview of the Effects of Dioxins and Dioxin-like compounds on Vertebrates, as Documented in Human and Ecological Epidemiology. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 27(4), 197-211.
209. Adamse P., Schoss S., Theelen R.M. Hoogenboom R.L.A.P., 2017. Levels of dioxins and dioxin-like PCBs in food of animal origin in the Netherlands during the period 2001–2011. *Food Addit. Contam: Part A*, 34, 78-92.

210. Hoogenboom R., Traag W., Fernandes A., Rose M., 2015. European developments following incidents with dioxins and PCBs in the food and feed chain. *Food Control*. 50, 670-683.
211. Zafeiraki E., Costopoulou D., Vassiliadou I., Leondiadis L., Dassenakis E., Traag W., Hoogenboom R.L.A.P., van Leeuwen S.P.J., 2015. Determination of Perfluoroalkylated Substances (PFASs) in Drinking Water from the Netherlands and Greece. *Food. Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk. Assess.* 32(12), 2048-2057.
212. Zafeiraki E, Costopoulou D, Vassiliadou I, Leondiadis L, Dassenakis E, Hoogenboom RL, van Leeuwen SP., 2016. Perfluoroalkylated substances (PFASs) in home and commercially produced chicken eggs from the Netherlands and Greece. *Chemosphere*. 144:2106-2112.
213. Haug L.S., Salihovic S., Ericson Jogsten I., Thomsen C., van Bavel B., Lindström G., Becher G., 2010. Levels in food and beverages and daily intake of perfluorinated compounds in Norway. *Chemosphere* 80, 1137-1143.
214. Cornelis C., D' Hollander W., Roosens L., Covaci A., Smolders R., Van Den Heuvel R., Govarts E., Van Campenhout K., Reynders H., Bervoets L. 2012. First assessment of population exposure to perfluorinated compounds in Flanders, Belgium. *Chemosphere* 86:308-314.
215. Guerranti C., Perra G., Corsolini S., Focardi S.E., 2013. Pilot study on levels of perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in selected foodstuffs and human milk from Italy. *Food Chemistry* 140: 197-203.
216. Tittlemier S.A., Pepper K., Seymour C., Moisey J., Bronson R., Cao X.-L. and Dabeka R.W. Dietary exposure of Canadians to perfluorinated carboxylates and perfluorooctane sulfonate via consumption of meat, fish, fast foods, and food items prepared in their packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007) 3203-3210.
217. Noorlander C.W., Van Leeuwen S.P.J., Te Biesebeek J.D., Mengelers M.J.B., Zeilmaker M.J. *J. Agric Food Chem.* 2011. Levels of perfluorinated

compounds in food and dietary intake of PFOS and PFOA in the Netherlands. 59:7496–7505.

218. Ericson I., Martí-Cid R., Nadal M., van Bavel B., Lindström G. and Domingo G.L., 2008. Human exposure to perfluorinated chemicals through the diet: intake of perfluorinated compounds in foods from the Catalan (Spain) market. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 1787-1794.
219. Clarke D.B., Bailey V.A., Routledge A., Lloyd A.S., Hird S., Mortimer D.N., Gem M. 2010. Dietary intake estimate for perfluorooctanesulphonic acid (PFOS) and other perfluorocompounds (PFCs) in UK retail foods following determination using standard addition LC-MS/MS. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk. Assess.* 27(4):530-45.
220. Schechter A., Colacino J., Haffner D., Patel K., Opel M., Pöpke O., Birnbaum L., 2010. Perfluorinated compounds, polychlorinated biphenyls, and organochlorine pesticide contamination in composite food samples from Dallas, Texas, USA. *Environ Health Perspect.* 118(6):796-802.
221. D'Hollander W., Herzke D., Huber S., Hajslova J., Pulkrabova J., Brambilla G., De Filippis S.P., Bervoets, de Voogt P, 2015. Occurrence of perfluorinated alkylated substances in cereals, salt, sweets and fruit items collected in four European countries. *Chemosphere.* 129:179-85. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3736-3741.
222. Food Standards Agency, 2009. Survey of Fluorinated Chemicals in Food, Food Survey Information Sheet No. 05/09, available at: <http://food.gov.uk/multimedia/pdfs/fsis0509.pdf>
223. Fromme H., Tittlemier S.A., Volkel W., Wilhelm M., Twardella D. Perfluorinated compounds- Exposure assessment for the general population in western countries. 2009. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 212:239-270.
224. Gulkowska A., Jiang Q., So M. K., Taniyasu S., Lam P.K., Yamasita N., 2006. Persistent perfluorinated acids in seafood collected from two cities of China. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3736-3741.
225. Zafeiraki E., Costopoulou D., Vassiliadou I., Bakeas E., Leondiadis L., 2014. Determination of perfluorinated compounds (PFCs) in various foodstuff packaging materials used in the Greek market. *Chemosphere.* 94:169-76.

226. Vassiliadou I., Costopoulou D., Kalogeropoulos N., Karavoltsos S., Sakellari A., Zafeiraki E., Dassenakis M., Leondiadis L, 2015. Levels of perfluorinated compounds in raw and cooked Mediterranean finfish and shellfish. *Chemosph.* 127:117-126.
227. Domingo J.L., Nadal M., 2017. Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs) in Food and Human Dietary Intake: A Review of the Recent Scientific Literature. *J. Agric. Food Chem.* Jan 25;65(3):533-543.ere. 127:117-126.
228. Fromme H., Midasch O., Twardella D., Angerer J., Boehmer S., Liebl B., 2007. Occurrence of perfluorinated substances in an adult German population in southern Bavaria. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 80(4):313-9.
229. Vestergren R., Cousins I.T., 2009. Tracking the pathways of human exposure to perfluorocarboxylates. *Environ. Sci. Technol.* 43, 5565-5575.
230. Egeghy P.P., Lorber M., 2011. An assessment of the exposure of Americans to perfluorooctane sulfonate: a comparison of estimated intake with values inferred from NHANES data. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 21(2):150-68.
231. Domingo J.L., 2012. Health risks of dietary exposure to perfluorinated compounds. *Environ. Int.* 40, 187-195.
232. Mavrakis A., Lykoudis S., Christides A., Dasaklis S., Tasopoulos A., Theoharatos G., Kyvelou S., Verouti E., 2008. Air Quality levels in a closed industrialized basin (Thriassion plain, Greece). *Fresenius Environmental Bulletin*, vol.17 n.4 443-454.
233. Ochsenkuhn K.M., Lyberopoulou T., Koumariou G., Ochsenkuhn-Petropoulou M., 2008. *Microchimica Acta.* 160:485-492.