



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Προσδιορισμός ατμοσφαιρικών ρύπων σε βιολογικά
υγρά**

**ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΚΑΤΣΕΛΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2018

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Προσδιορισμός ατμοσφαιρικών ρύπων σε βιολογικά υγρά

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΚΑΤΣΕΛΗ

A.M.: 11604

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Μπακέας Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μπακέας Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Οικονόμου Αναστάσιος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Κόκκινος Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 11/10/2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης έγινε ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού των Υδρόξυ Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων σε ορό αίματος με χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματογράφο μαζών. Επίσης, πραγματοποιήθηκε μελέτη πιθανής συσχέτισης των επιπέδων των Υδρόξυ Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων στο αίμα ασθενών με λευχαιμία, με ορισμένους βιοχημικούς δείκτες. Ακολούθησε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα σε υγιείς δότες.

Για τον λόγο αυτό, συλλέχθηκε ικανό πλήθος δειγμάτων αίματος ασθενών με λευχαιμία και παρεμφερή αιματολογικά νοσήματα, καθώς και αριθμός δειγμάτων αίματος υγιούς πληθυσμού.

Τα δείγματα προέρχονται από τον ευρύτερο ελλαδικό χώρο, κυρίως όμως από την Αττική. Ταυτόχρονα, συλλέχθηκαν δημογραφικά στοιχεία που αφορούν τον πληθυσμό του οποίου τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα, που θα μπορούσαν να βοηθήσουν την επεξεργασία των αποτελεσμάτων και την εξαγωγή συμπερασμάτων, όπως ηλικία, φύλο, τόπος διαμονής κλπ.

Στη συνέχεια, έγινε επεξεργασία των αποτελεσμάτων και μελέτη των διακυμάνσεων των συγκεντρώσεων της LDH, των λευκών αιμοσφαιρίων, των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των Υδρόξυ Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων για κάθε δείγμα.

Τέλος, έγινε μία προσπάθεια πιθανής συσχέτισης των περιβαλλοντικών παραγόντων, αλλά και της ηλικίας, του φύλου, του τόπου διαμονής και της συνήθειας του καπνίσματος με την εμφάνιση των αιματολογικών νοσημάτων.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ατμοσφαιρική ρύπανση και λευχαιμία.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Υδρόξυ Πολυκυκλικοί Υδρογονάνθρακες, Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες, Φασματογράφος Μαζών, Αιωρούμενα Σωματίδια, Λευχαιμία.

ABSTRACT

The current thesis presents the development and validation of a method for the determination of Hydroxy Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in blood serum, using gas chromatography mass spectrometry, as well as the attempt of correlating environmental factors with biochemical and other markers related to leukemia disease.

For this purpose, a sufficient number of blood samples, of patients with leukemia and related haematological diseases and a number of blood samples of healthy population were collected.

The samples originated from Greece, but mainly from Attica region. Also demographic data, such as age, sex, place of residence etc, were collected, which could help the processing of the results and conclusions.

The results obtained were appropriately treated, while the variations of LDH concentrations of white blood cells, red blood cells and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in each sample we also evaluated.

Finally, an attempt was made of potentially associating of environmental factors, as well as age, gender and smoking habit with hematologic diseases.

SUBJECT AREA: Atmospheric pollution, leukemia.

KEYWORDS: Hydroxy Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Organic Pollutants, Gas Chromatography, Mass Spectrometer, Particulates, Leukemia.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας και Περιβάλλοντος του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Μπακέα Ευάγγελο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Χημείας, για τη συνεργασία και τη βοήθεια που μου πρόσφερε από τη πρώτη στιγμή καθώς και για την καθοδήγηση και κατανόηση καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κουκουλάκη Κωνσταντίνο για τη συνεργασία, τη αμέριστη βοήθεια και καθοδήγηση που μου πρόσφερε σε κάθε στάδιο, από την αρχή μέχρι το τέλος.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	8
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	13
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	15
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	16
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	18
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	
ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΙΚΗ ΡΥΠΑΝΣΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ.....	19
1.1. Ορισμός της ατμοσφαιρικής ρύπανσης	19
1.2. Πηγές ατμοσφαιρικών ρύπων	20
1.3. Κατηγορίες ατμοσφαιρικών ρύπων.....	20
1.4. Μορφές ατμοσφαιρικών ρύπων.....	22
1.5. Επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία.....	25
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	
ΠΟΛΥΚΥΚΛΙΚΟΙ ΑΡΩΜΑΤΙΚΟΙ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ.....	27
2.1. Εισαγωγή.....	27
2.2. Χρήσεις των ΠΑΥ	28
2.3. Πηγές των ΠΑΥ	29
2.4. ΠΑΥ σε εσωτερικούς χώρους	31
2.5. Κατανομή των ΠΑΥ στο περιβάλλον	31
2.5.1. Απλό μοντέλο κατανομής των ΠΑΥ.....	31
2.5.2. Μοντέλο κατανομής και αποσύνθεσης των ΠΑΥ.....	34
2.5.3. Αντιδράσεις αποσύνθεσης των ΠΑΥ.....	35
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	
ΥΔΡΟΞΥ-ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΩΝ ΠΑΥ.....	37
3.1. Εισαγωγή.....	37
3.2. Παραγωγή ΟΗ - ΠΑΥ και άλλων παραγώγων στην ατμόσφαιρα	37

4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	
ΠΑΥ, ΟΗ-ΠΑΥ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ.....	40
4.1. Εισαγωγή.....	40
4.2. Τρόποι έκθεσης	40
4.3. Τοξικολογικές ιδιότητες των ΠΑΥ και των μεταβολιτών τους.....	41
4.4. Κατανομή των ΠΑΥ και των μεταβολιτών τους στον ανθρώπινο οργανισμό.....	44
4.5. Μεταβολισμός των ΠΑΥ στον ανθρώπινο οργανισμό.....	45
4.6. Επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία και καρκινογένεση.....	48
5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	
ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ.....	50
5.1. Εισαγωγή.....	50
5.2. Τύποι λευχαιμίας	50
5.3. Θεραπεία.....	54
6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	56
ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	
6.1. Εισαγωγή.....	56
6.2. Ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs)	56
6.3. Λευκά αιμοσφαίρια (WBCs).....	57
6.4. Γαλακτική αφυδρογονάση.....	58
7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.....	59
ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΟΥ ΥΔΡΟΞΥ-ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΩΝ ΠΑΥ	
7.1. Εισαγωγή.....	59
7.2. Αναλυτικές τεχνικές.....	59
7.3. Παραγωγοποίηση στην αέρια χρωματογραφία.....	60
8. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	
ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ.....	62
8.1. Εισαγωγή.....	62
8.2. Αιμοληψία.....	62
8.3. Επεξεργασία δειγμάτων.....	62
8.4. Συντήρηση Δειγμάτων	62
8.5. Προσδιορισμός LDH ορού αίματος.....	63
8.6. Προσδιορισμός λευκών αιμοσφαιρίων (WBCs) και ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs).....	63

8.6.1. Αρχές μεθόδου προσδιορισμού.....	63
8.7. Προσδιορισμός Υδρόξυ παραγώγων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων.....	64
8.7.1. Γενικά.....	64
8.7.2. Οργανολογία.....	66
8.7.3. Αντιδραστήρια.....	67
8.7.4. Αρχή της Μεθόδου.....	67
8.7.4.1. Σχολιασμός πορείας κατεργασίας.....	68
8.7.4.2. Αεριοχρωματογραφική Ανάλυση.....	68
8.7.5. Διασφάλιση ποιότητας χημικών δοκιμών.....	69
8.7.5.1. Γενικά.....	69
8.7.5.2. Ειδικότητα και γραμμικότητα.....	70
8.7.5.3. Επαναληψιμότητα των χρόνων ανάσχεσης	72
8.7.5.4. Αναπαραγωγιμότητα των χρόνων ανάσχεσης	73
8.7.5.5. Όρια Ανίχνευσης και Ποσοτικοποίησης.....	73
8.7.5.6. Σχολιασμός μεθόδου.....	74
9. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9	
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	75
9.1. Γενικά.....	75
9.2. Σύγκριση των αποτελεσμάτων ΟΗ-ΠΑΥ σε δείγματα ασθενών και υγιών ατόμων.....	75
9.3. Σύγκριση των αποτελεσμάτων ΟΗ-ΠΑΥ με τους μητρικούς ΠΑΥ.....	79
9.3.1. Σύγκριση 1-Ναφθόλη και 2-Ναφθόλη με το Ναφθαλένιο.....	82
9.3.2. Σύγκριση 1-ΟΗ-φαιναθρένιο, 2-ΟΗ-φαιναθρένιο, 3-ΟΗ φαιναθρένιο και 9-ΟΗ-Φαιναθρένιο με το φαιναθρένιο.....	83
9.3.3. Σύγκριση 1-ΟΗ-πυρένιο με το πυρένιο.....	83
9.4. Σύγκριση αποτελεσμάτων σε κατηγορίες	85
9.4.1. Σύγκριση αποτελεσμάτων ανά φύλο.....	85
9.4.2. Σύγκριση αποτελεσμάτων ανά είδος καπνιστή.....	88
9.4.3. Σύγκριση αποτελεσμάτων ανά τόπο κατοικίας.....	90
9.5. Μελέτη συσχετίσεων ΟΗ-ΠΑΥ με τις μητρικές ενώσεις.....	93
10. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10	
ΕΠΙΛΟΓΟΣ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	98

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ- ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	100
ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	102

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση των πηγών των ΠΑΥ.....	30
Σχήμα 2 : Σχηματική αναπαράσταση της κατανομής του ναφθαλενίου.....	32
Σχήμα 3: Σχηματική αναπαράσταση της κατανομής του φαιναθρενίου.....	33
Σχήμα 4: Σχηματική αναπαράσταση της κατανομής του πυρενίου.....	33
Σχήμα 5: Σχηματική αναπαράσταση της κατανομής και του ποσοστού αποσύνθεσης του ναφθαλενίου.....	34
Σχήμα 6: Σχηματική αναπαράσταση της κατανομής και του ποσοστού αποσύνθεσης του πυρενίου.....	35
Σχήμα 7: Η συχνότητα εμφάνισης των διαφόρων ειδών λευχαιμίας σε συνάρτηση με την ηλικία	54
Σχήμα 8: Καμπύλη αναφοράς για το 1-υδρόξυ- πυρένιο.....	71
Σχήμα 9: Καμπύλη αναφοράς για τη 2 – Ναφθόλη.....	71
Σχήμα 10: Καμπύλη αναφοράς για το 9-υδρόξυ-φαιναθρένιο.....	72
Σχήμα 11: Σύγκριση μέσης τιμής ΟΗ-ΠΑΥ ασθενείς και Υγιείς.....	77
Σχήμα 12: Σύγκριση μέσης τιμής ΟΗ-ΠΑΥ στον ορό ασθενών.....	78
Σχήμα 13: Σύγκριση μέσης τιμής ΟΗ-ΠΑΥ στον ορό υγιών ατόμων.....	78
Σχήμα 14: Σύγκριση μέσης τιμής μητρικών ΠΑΥ στον ορό υγιών και ασθενών.....	80
Σχήμα 15: Σύγκριση αθροίσματός μέσης τιμής μητρικών ΠΑΥ με το άθροισμα της μέσης τιμής των ΟΗ-ΠΑΥ, σε δείγματα ασθενών.....	81
Σχήμα 16: Σύγκριση αθροίσματός μέσης τιμής μητρικών ΠΑΥ με το άθροισμα της μέσης τιμής των ΟΗ-ΠΑΥ σε δείγματα υγιών ατόμων.....	81
Σχήμα 17: Σύγκριση μέσης τιμής 1-Ναφθόλης και 2-Ναφθόλης με τη μητρική ένωση.....	82
Σχήμα 18: Σύγκριση μέσης τιμής 1-ΟΗ-φαιναθρενίου 2-ΟΗ-φαιναθρενίου, 3-ΟΗ-φαιναθρενίου με τη μητρική ένωση.....	83
Σχήμα 19: Σύγκριση μέσης τιμής 1-ΟΗ-πυρενίου με τη μητρική ένωση.....	84

Σχήμα 20: Μέση τιμή συγκέντρωσης ασθενών ανά φύλο.....	86
Σχήμα 21: Μέση τιμή συγκέντρωσης υγιών ανά φύλο.....	87
Σχήμα 22: Μέση τιμή συγκέντρωσης ασθενών ανά είδος καπνιστή.....	89
Σχήμα 23: Μέση τιμή συγκέντρωσης υγιών ανά είδος καπνιστή.....	90
Σχήμα 24: Μέση τιμή συγκέντρωσης ασθενών ανά τόπο κατοικίας.....	92
Σχήμα 25: Μέση τιμή συγκέντρωσης Υγιών ανά τόπο κατοικίας.....	92

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Σύγκριση του μεγέθους των σωματιδίων P.M. _{2.5} και P.M. ₁₀ με τη διάμετρο μιας ανθρώπινης τρίχας και λεπτού κόκκου άμμου	24
Εικόνα 2: Μια υποθετική κατανομή ενός μείγματος σωματιδίων	25
Εικόνα 3: Δεκαέξι χαρακτηριστικοί Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες.....	28
Εικόνα 4: Προτεινόμενος μηχανισμός μέσω ρίζας υδροξυλίου για το ναφθαλένιο.....	38
Εικόνα 5: Προτεινόμενος μηχανισμός μέσω ρίζας NO ₃ για το ναφθαλένιο.....	38
Εικόνα 6: Διάγραμμα ποσοστού μετατροπής του ναφθαλενίου στα προϊόντα του με ρίζα OH.....	39
Εικόνα 7: Διάγραμμα ποσοστού μετατροπής του ναφθαλενίου στα προϊόντα του με ρίζα NO ₃	39
Εικόνα 8: Κύριο μεταβολικό μονοπάτι και δέσμευση του DNA από το B[a]P.....	46
Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση των μεταβολικών αντιδράσεων του ναφθαλενίου.....	49
Εικόνα 10: Απεικόνιση φυσιολογικού μυελού και μυελού με λευχαιμική διήθηση	52
Εικόνα 11: Οξεία μυελογενής λευχαιμία χωρίς ωρίμανση. Διάχυτη προσβολή του μυελού από βλάστες.....	53
Εικόνα 12: Οξεία μυελογενής λευχαιμία με ωρίμανση. Διάχυτη διήθηση του μυελού από βλάστες και άωρα κοκκιοκύτταρα.....	53
Εικόνα 13: Ο συντακτικός τύπος των μελετώμενων OH-ΠΑΥ.....	65
Εικόνα 14: Το χρωματογράφημα λευκού δείγματος σε υπέρθεση με το χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος.....	70

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Διεργασίες που προκαλούν ανθρωπογενή ρύπανση της ατμόσφαιρας.....	20
Πίνακας 2: Οι ατμοσφαιρικοί ρύποι και η γεωγραφική έκταση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων.....	21
Πίνακας 3: Οι υπολογιζόμενοι χρόνοι ζωής στην ατμόσφαιρα μερικών πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (ΠΑΥ).....	36
Πίνακας 4: Οι ομάδες κατάταξης των χημικών ουσιών κατά τον Διεθνή Οργανισμό για την Έρευνα του Καρκίνου (IARC).....	43
Πίνακας 5: Οι 16 ΠΑΥ όπως έχουν καταταχθεί ως καρκινογόνες ενώσεις από τον Διεθνή Οργανισμό για την Έρευνα του Καρκίνου (IARC).....	44
Πίνακας 6: Διαφορές οξείας και χρόνιας λευχαιμίας	51
Πίνακας 7: Σχετικές αναλογίες διαφόρων μορφών λευχαιμίας.....	53
Πίνακας 8: Φυσιολογικά επίπεδα LDH ορού.....	58
Πίνακας 9: Οι μελετώμενοι ΟΗ-ΠΑΥ.....	64
Πίνακας 10: Συνθήκες λειτουργίας αεριοχρωματογραφικού συστήματος για τον προσδιορισμό των ΟΗ-ΠΑΥ.....	69
Πίνακας 11: Μέση τιμή των χρόνων ανάσχεσης(tR), τυπική απόκλιση (SD) και σχετική τυπική απόκλιση (RSD%) του πρότυπου διαλυμάτος ΟΗ-ΠΑΥ συγκέντρωσης 25 ng mL ⁻¹ κατά τη διάρκεια μιας ημέρας	72
Πίνακας 12: Μέση τιμή των χρόνων ανάσχεσης(tR), τυπική απόκλιση (SD) και σχετική τυπική απόκλιση (RSD%) του πρότυπου διαλυμάτος ΟΗ-ΠΑΥ συγκέντρωσης σε χρονικό διάστημα δύο ημερών.....	72
Πίνακας 13: Όριο ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) για τους εφτά υπό προσδιορισμό ΟΗ-ΠΑΥ.....	73
Πίνακας 14: Μέση, μέγιστη και ελάχιστη των συγκεντρώσεων των ΟΗ-ΠΑΥ καθώς και το άθροισμα τους ,σε δείγματα ασθενών με οξεία λευχαιμία.....	76
Πίνακας 15: Μέση, μέγιστη και ελάχιστη των συγκεντρώσεων των ΟΗ-ΠΑΥ καθώς και το άθροισμα τους, σε δείγματα υγιών ατόμων.....	76

Πίνακας 16: Αποτελέσματα t test για το ΟΗ-Πυρένιο, το άθροισμα των ΟΗ-φαιναθρενίων, το άθροισμα των 1 και 2 Ναφθολών.....	77
Πίνακας 17: Μέση τιμή των συγκεντρώσεων των ΟΗ-ΠΑΥ και των μητρικών ενώσεων στα δείγματα ασθενών και υγιών ατόμων.....	79
Πίνακας 18: Αποτελέσματα t test για το Πυρένιο, το φαιναθρένιο, και το ναφθαλένιο.....	80
Πίνακας 19: Αποτελέσματα t test για το Πυρένιο, και το 1-ΟΗ-πυρένιο σε δείγματα υγιών και ασθενών.....	84
Πίνακας 20: Μέση τιμή συγκέντρωσης των ΠΑΥ, ΟΗ-ΠΑΥ, ανά φύλο για ασθενείς δότες.....	85
Πίνακας 21: Μέση τιμή συγκέντρωσης των ΠΑΥ, ΟΗ-ΠΑΥ, ανά φύλο για υγιείς δότες.....	86
Πίνακας 22: Μέση τιμή συγκέντρωσης των ΠΑΥ, ΟΗ-ΠΑΥ ανά είδος καπνιστή για ασθενείς δότες.....	88
Πίνακας 23: Μέση τιμή συγκέντρωσης των ΠΑΥ, ΟΗ-ΠΑΥ ανά είδος καπνιστή για υγιείς δότες.....	89
Πίνακας 24: Μέση τιμή συγκέντρωσης των ΠΑΥ, ΣΠΑΥ, ανά τόπο κατοικίας για ασθενείς.....	91
Πίνακας 25: Μέση τιμή συγκέντρωσης των ΠΑΥ, ΣΠΑΥ, ανά τόπο κατοικίας για ασθενείς.....	91
Πίνακας 26: Συσχετίσεις συνολικών αποτελεσμάτων.....	94
Πίνακας 27: Μελέτη των συσχετίσεων.....	95
Πίνακας 28: Μελέτη των συσχετίσεων στις αγροτικές περιοχές.....	96
Πίνακας 29: Μελέτη των συσχετίσεων στις αστικές περιοχές.....	96
Πίνακας 30: Μελέτη των συσχετίσεων στις βιομηχανικές περιοχές.....	96

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας και συγκεκριμένα στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Ανάλυσης και Ατμοσφαιρικής Χημείας του Ε.Κ.Π.Α. Οι κλασικές βιοχημικές και αιματολογικές αναλύσεις στα δείγματα που μελετήσαμε έγιναν στο βιοχημικό και αιματολογικό εργαστήριο του ΓΝΑ «ΛΑΪΚΟ» στα πλαίσια εξετάσεων ρουτίνας.

Σκοπός της εργασίας ήταν ο προσδιορισμός Παραγώγων των Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων στον ορό ασθενών με λευχαιμία, αλλά και υγιών ατόμων. Καθώς και η συσχέτιση των ευρημάτων με τη λευχαιμία και άλλα παρεμφερή αιματολογικά νοσήματα. Έγινε προσπάθεια συσχέτισης των επιπέδων των ΠΑΥ και των Υδρόξυ παραγώγων τους με παράγοντες όπως το φύλο, ο τόπος διαμονής και το κάπνισμα.

Ο λόγος για τον οποίο η εργασία αυτή παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι πως ο καρκίνος γενικότερα, αλλά και οι λευχαιμίες ειδικότερα, έχουν παρουσιάσει αλματώδη αύξηση τις τελευταίες δεκαετίες, ειδικά σε μικρότερες ηλικίες και ότι τα νεότερα δεδομένα οδηγούν στην υπόθεση ότι ο καρκίνος και οι λευχαιμίες πιθανόν να σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την ποιότητα του περιβάλλοντος και ιδιαίτερα του ατμοσφαιρικού αέρα.

Για τον λόγο αυτό, συλλέχθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών με λευχαιμία, αλλά και υγιούς πληθυσμού, για χρονικό διάστημα περίπου τεσσάρων μηνών, ώστε η εκτίμηση να είναι όσο το δυνατόν πιο ακριβής. Στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων, επεξεργασία των αποτελεσμάτων και έγινε προσπάθεια εκτίμησης και συσχέτισης των προαναφερθέντων παραγόντων στην εμφάνιση των αιματολογικών νοσημάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΙΚΗ ΡΥΠΑΝΣΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ

1.1 Ορισμός της ατμοσφαιρικής ρύπανσης

Η ρύπανση της ατμόσφαιρας αποτελεί ζήτημα που έχει απασχολήσει και απασχολεί το σύγχρονο κόσμο. Στην Ευρώπη, οι συγκεντρώσεις των ατμοσφαιρικών ρύπων εξακολουθούν να είναι πολύ υψηλές παρά τη σημαντική μείωση τους τις τελευταίες δεκαετίες. Σημαντικό ποσοστό του πληθυσμού της Ευρώπης ζει σε περιοχές, ιδίως στις πόλεις, όπου σημειώνονται υπερβάσεις που έχουν θεσπιστεί από πρότυπα ποιότητας του αέρα για ρύπους όπως το όζον, το διοξειδίου του αζώτου και τα αιωρούμενα σωματιδίων (PM) [1].

Αρκετοί ορισμοί έχουν διατυπωθεί για αυτήν, κάποιοι από τους οποίους παρατίθενται ενδεικτικά:

Ο Νόμος 1650/1986 (ΦΕΚ 160/Α/16-10-86) για την προστασία του περιβάλλοντος στην Ελλάδα, ορίζει ως ρύπανση την παρουσία στο περιβάλλον ρύπων, δηλαδή κάθε είδους ουσιών, θορύβου, ακτινοβολίας ή άλλων μορφών ενέργειας, σε ποσότητα, συγκέντρωση ή διάρκεια που μπορούν να προκαλέσουν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία, στους ζωντανούς οργανισμούς και στα οικοσυστήματα ή υλικές ζημιές και γενικά να καταστήσουν το περιβάλλον ακατάλληλο για τις επιθυμητές χρήσεις του. Ο ίδιος νόμος, ορίζει ως μόλυνση τη μορφή ρύπανσης που χαρακτηρίζεται από την παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στο περιβάλλον ή δεικτών που υποδηλώνουν την πιθανότητα παρουσίας τέτοιων μικροοργανισμών [2].

Ο Διεθνής Οργανισμός Υγείας (World Health Organization) αναφέρει ότι ατμοσφαιρική ρύπανση είναι η επιβάρυνση του εξωτερικού ή εσωτερικού περιβάλλοντος από οποιαδήποτε χημικό, φυσικό ή βιολογικό παράγοντα που τροποποιεί τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά της ατμόσφαιρας [3].

Ανάλογα ορίζεται και η ατμοσφαιρική ρύπανση από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Περιβάλλοντος (European Environment Agency): Η παρουσία μολυσματικών ή ρυπογόνων ουσιών στον αέρα σε συγκέντρωση που επηρεάζουν την ανθρώπινη υγεία και ευημερία ή προκαλούν άλλες περιβαλλοντικές επιπτώσεις [1].

1.2 Πηγές ατμοσφαιρικών ρύπων

Οι ατμοσφαιρικοί ρύποι διακρίνονται σε αυτούς που δημιουργούνται φυσικά και στους ανθρωπογενείς. Οι εκπομπές ορισμένων φυσικών ρύπων είναι μεγαλύτερες από αυτές των αντίστοιχων ανθρωπογενών με εξαίρεση τις αστικές και τις βιομηχανικές περιοχές, όπου συχνά υπερβαίνουν τα επιτρεπτά όρια, διότι οι εκπομπές από την ανθρώπινη δραστηριότητα είναι εντονότερες σε αυτές τις περιοχές.

Οι εκπομπές που δημιουργούνται από την ίδια τη φύση οφείλονται σε βιολογικές δραστηριότητες, ηφαίστεια, πυρκαγιές, γύρη, σπόρους φυτών, εξάτμιση της επιφάνειας των υδάτων κ.α.

Αντίθετα, οι ανθρωπογενείς ρύποι οφείλονται στη βιομηχανία, τη παραγωγή ενέργειας, τη θέρμανση, τη χρήση καυσίμων κ.α. Γενικά, παράγονται μέσα από τρεις διαδικασίες: της επιφανειακής τριβής, της εξάτμισης και της καύσης [4,1].

Πίνακας 1: Διεργασίες που προκαλούν ανθρωπογενή ρύπανση της ατμόσφαιρας [4].

Διεργασία	Σκοπός	Εκπομπές
Καύση	Θέρμανση, μεταφορές, παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας	Αιωρούμενα σωματίδια, καπνός, CO, SO ₂ , NO _x , υδρογονάνθρακες κ.α.
Εξάτμιση	Βιομηχανικές εφαρμογές	Αέριοι ρύποι (υδρογονάνθρακες, υδρόθειο, πτητικές οργανικές ενώσεις)
Τριβή	Βιομηχανικές εφαρμογές, αστικές δραστηριότητες	Αιωρούμενα σωματίδια

1.3 Κατηγορίες ατμοσφαιρικών ρύπων

Οι ατμοσφαιρικοί ρύποι εμφανίζονται ως αέριοι ή ως αιωρούμενα σωματίδια και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε:

- *Πρωτογενείς* που εκπέμπονται κατευθείαν από την πηγή στην ατμόσφαιρα. Π.χ. Διοξείδιο του άνθρακα (SO₂) και διοξείδιο του αζώτου (NO₂).

- *Δευτερογενείς* που δημιουργούνται στην ατμόσφαιρα λόγω των αντιδράσεων των πρωτογενών εκπομπών. Π.χ. όζον (O_3) και θειικό ανιόν (SO_4^{-2}).

Ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, τις επικρατούσες τοπικές και περιφερειακές μετεωρολογικές συνθήκες, οι πρωτογενείς ρύποι εναποτίθενται σε γειτονικές περιοχές από την πηγή ή μεταναστεύουν μερικά ή ακόμα και χιλιάδες χιλιόμετρα μακριά, με αποτέλεσμα τη μετατροπή τους σε δευτερογενείς. Κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με τη γεωγραφική έκταση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων.

Πίνακας 2: Οι ατμοσφαιρικοί ρύποι και η γεωγραφική έκταση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων [5].

Περιορισμένη τοπική έκταση	Τοπική έκταση	Περιφερειακή έκταση	Παγκόσμια έκταση
Αμμωνία, Χλώριο, Υδροχλωρικό οξύ, Αιθυλένιο, Διοξείδιο του αζώτου	Αερόλυμα μεγαλόμοριακων σωματιδίων, Υδροφθόριο, Διοξείδιο του θείου	Όξινη κατακρήμνιση, Αερόλυμα μικρόμοριακων σωματιδίων (π.χ. SO_4^{-2} , NH_4^+ , NO_3^- , οργανικές ενώσεις και βαρέα μέταλλα), Όζον, PAN	Διοξείδιο του άνθρακα, Αερόλυμα μικρομοριακών σωματιδίων, Υγρασία, Θερμοκρασία, UV-B ακτινοβολία, Άνεμος

Οι πηγές των ατμοσφαιρικών ρύπων μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως *στατικές (stationary)* ή *κινητές (mobile)* ανάλογα με τη φύση τους. Οι στατικές χωρίζονται σε πηγές *μοναδικού σημείου (single event point)* π.χ. τυχαία χημική διαρροή σε μια δεδομένη γεωγραφική τοποθεσία, *συνεχούς σημείου (continuous point)*, π.χ. μια καμινάδα σε μια δεδομένη γεωγραφική τοποθεσία που εκπέμπει αέριους ρύπους συνεχώς, *περιοχής (area)*, π.χ. μεγάλο αστικό κέντρο, *περιφερειακές (regional)*, π.χ. πολλά κοντινά αστικά κέντρα και *ηπειρωτικές (continental)*, π.χ. Ευρώπη. Οι κινητές πηγές μπορούν επίσης, να είναι *γραμμικές (line)*, π.χ. μια εθνική οδός [5].

1.4 Μορφές ατμοσφαιρικών ρύπων

Η ατμοσφαιρική ρύπανση των αστικών περιοχών προκαλείται από ένα πλήθος ρύπων, αέριων ή σωματιδιακών, οργανικών ή ανόργανων. Αναφέρονται ενδεικτικά κάποιοι από αυτούς:

Αέριοι ρύποι (π.χ. SO_x, NO_x, VOC_s)

- SO₂, διοξείδιο του θείου: αέριος ατμοσφαιρικός ρύπος με μικρό χρόνο ζωής που εκπέμπεται στην ατμόσφαιρα από φυσικές πηγές (π.χ. έκρηξη ηφαιστείων, οξείδωση του διμεθυλοθειαιθέρα (DMS) στην επιφάνεια των ωκεανών) αλλά και ανθρωπογενείς (π.χ. καύση ορυκτών καυσίμων και βιομηχανικές διεργασίες μετάλλων που περιέχουν θείο). Συμμετέχει καθοριστικά στο κύκλο του θείου, οξειδώνεται γρήγορα στην ατμόσφαιρα και παράγεται θειϊκό αερόλυμα που επηρεάζει το κλίμα και το περιβάλλον σε τοπικό, περιφερειακό και παγκόσμιο επίπεδο. Τα σωματίδια P.M._{2.5} αποτελούνται από αερόλυμα θειϊκών αλάτων [6].
- NO_x, οξείδια του αζώτου: αποτελούν μια από τις σημαντικότερες πηγές ατμοσφαιρικής ρύπανσης. Παράγονται κυρίως από καύσεις σε υψηλές θερμοκρασίες, μπορούν να προκαλέσουν όξινη βροχή και καταστροφή του όζοντος της στρατόσφαιρας [7].
- VOCs, πτητικές οργανικές ενώσεις: μεγάλη ομάδα οργανικών ενώσεων με υψηλή τάση ατμών και χαμηλά σημεία ζέσεως οι οποίες εκπέμπονται και να πάρουν μέρος σε αντιδράσεις στην ατμόσφαιρα, συμβάλλοντας στη δημιουργία του φωτοχημικού νέφους, στο σχηματισμό όζοντος (O₃) και δευτερογενούς οργανικού αερολύματος (SOA) στην τροπόσφαιρα [8].

Παραμένοντες οργανικοί ρύποι (POPs)

Οι παραμένοντες οργανικοί ρύποι (persistent organic pollutants, POPs) είναι μια μεγάλη ομάδα χημικών ενώσεων που έχουν παραχθεί σκόπιμα ή ακούσια και έχουν μεταφερθεί στο περιβάλλον [9].

Οι POPs έχουν τα εξής τέσσερα κοινά χαρακτηριστικά:

- Είναι εξαιρετικά ανθεκτικοί
- Μεταφέρονται μέσω του αέρα και του νερού
- Βιοσυσσωρεύονται στον λιπώδη ιστό
- Είναι τοξικοί, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις [10].

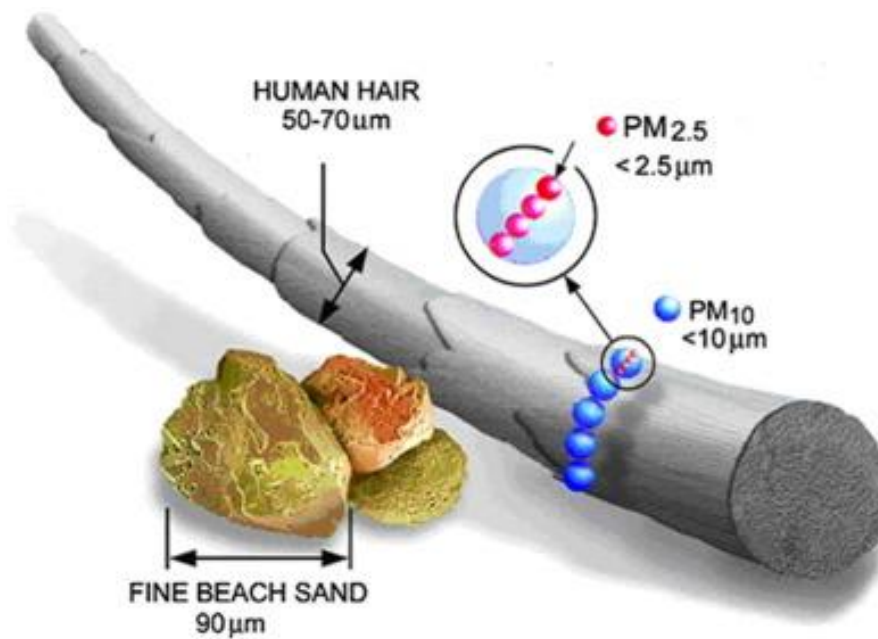
Στη Σύνοδο της Στοκχόλμης (SC) το Μάιο του 2001 οι POPs θεσμοθετήθηκαν νομικά και τα όρια τέθηκαν σε ισχύ το 2004. Πρόκειται για μία παγκόσμια σύμβαση υπό την αιγίδα του περιβαλλοντικού προγράμματος των ηνωμένων εθνών (United Nations Environment Programme, UNEP) με τη συμμετοχή 182 χωρών που έχει ως στόχο την προστασία της ανθρώπινης υγείας και του περιβάλλοντος από τους παραμένοντες οργανικούς ρύπους [11]. Αναφέρονται 28 ενώσεις ή ομάδες ενώσεων. Η αρχική λίστα περιλάμβανε δώδεκα ομάδες χημικών ενώσεων, τη λεγόμενη «βρώμική δωδεκάδα» (dirty dozen) η οποία αποτελείται από εννιά οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα, πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs), πολύχλωριωμένες διβενζο-*p*-διοξίνες, γνωστές απλά και ως διοξίνες (PCDDs) και πολυχλωριωμένα διβενζοφουράνια, που συχνά αναφέρονται ως «φουράνια» (PCDFs). Το 2009 προστέθηκαν εννέα παρασιτοκτόνα, επιβραδυντές φλόγας και επιφανειοδραστικές ουσίες. Σήμερα έχουν προστεθεί 16 νέοι. Στην πραγματικότητα, στην βιομηχανία χρησιμοποιούνται περισσότερες από 100.000 επικίνδυνες χημικές ουσίες, πολλές από τις οποίες είναι ανθεκτικές, τοξικές, βιοσυσσωρεύσιμες και ανιχνεύονται σε πολλά περιβαλλοντικά υποστρώματα [12].

Αιωρούμενη σωματιδιακή ύλη (Practicate Matter, PM)

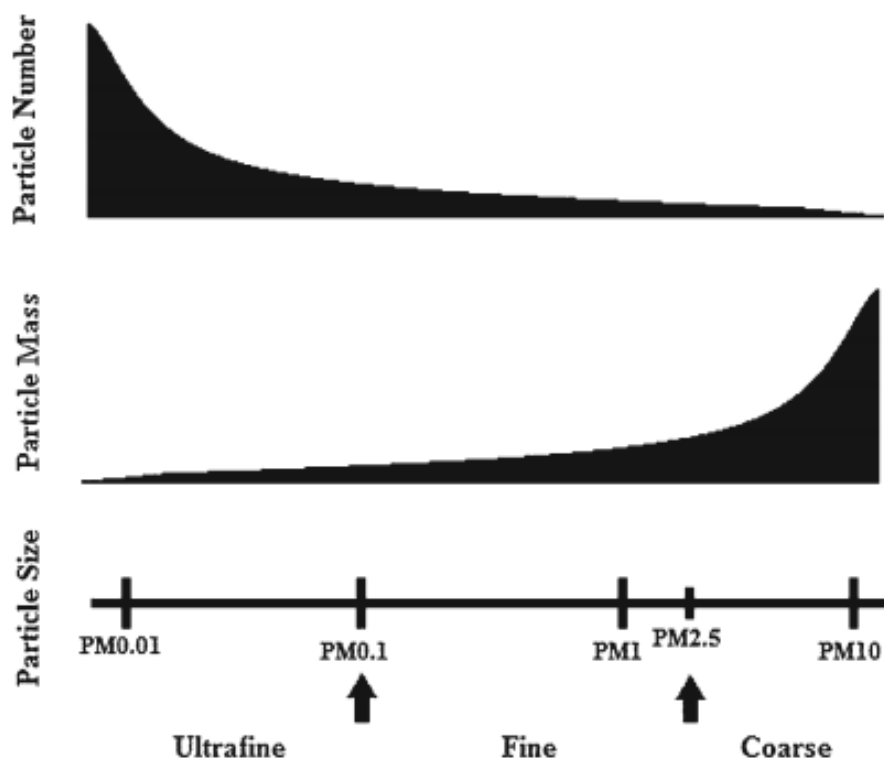
Τα αιωρούμενα σωματίδια (PM) είναι ένα σύνθετο μείγμα πολύ μικρών σωματιδίων και υγρών σταγονιδίων που αποτελούνται από οξέα, οργανικές ενώσεις (π.χ. PAHs), μέταλλα, στερεά σωματίδια, σκόνη, αλλά και βιολογικές ενώσεις.

Τα PM περιγράφονται από την «αεροδυναμική ισοδύναμη διάμετρο» (aerodynamic equivalent diameter, AED). Τα σωματίδια με την ίδια AED τείνουν να έχουν την ίδια ταχύτητα καθίζησης. Τα σωματίδια παραδοσιακά κατηγοριοποιούνται σε κλάσματα AED βάσει του τρόπου με τον οποίο δημιουργούνται και την εναπόθεση τους στον ανθρώπινο αεραγωγό. Σωματίδια με διάμετρο μεγαλύτερη από 10 μm (PM_{10}) έχουν σχετικά μικρό χρόνο ημιζώης, ενώ φιλτράρονται σε μεγάλο βαθμό από τη μύτη και τον ανώτερο αεραγωγό. Τα σωματίδια με διάμετρο 2.5 - 10 μm ($\text{PM}_{2.5-10}$) καλούνται «χονδρόκοκκα- coarse», μικρότερα από 2,5 μm ($\text{PM}_{2.5}$) «λεπτόκοκκα-fine» και

μικρότερα από $0,1\ \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{0.1}$) «υπερλεπτά-ultrafine». Είναι πολύ σημαντικό να κατανοήσουμε ότι τα PM_{10} περιέχουν τόσο $\text{PM}_{0.1}$, $\text{PM}_{0.1-2.5}$ και $\text{PM}_{2.5-10}$ σωματίδια. Σε ένα μικτό περιβαλλοντικό δείγμα, ο αριθμός και η συνολική επιφάνεια των σωματιδίων αυξάνονται σημαντικά καθώς μειώνεται η διάμετρος τους. Ωστόσο, η συνολική σωματιδιακή μάζα μειώνεται [13].



Εικόνα 1: Σύγκριση του μεγέθους των σωματιδίων P.M.2.5 και P.M.10 με τη διάμετρο μιας ανθρώπινης τρίχας ($\approx 70\ \mu\text{m}$) και λεπτού κόκκου άμμου ($\approx 90\ \mu\text{m}$) [14].



Εικόνα 2: Μια υποθετική κατανομή ενός μείγματος σωματιδίων [13].

1.5 Επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία

Οι επιπτώσεις της ατμοσφαιρικής ρύπανσης στην ανθρώπινη υγεία οφείλονται τόσο στο εσωτερικό όσο και στο εξωτερικό περιβάλλον. Προκαλείται μεγάλη ανησυχία εξαιτίας του υψηλού κίνδυνου έκθεσης, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Τα αιωρούμενα σωματίδια ευθύνονται για διάφορα προβλήματα υγείας, μεταξύ των οποίων είναι μη θανατηφόρα καρδιακά εμφράγματα και καρδιακές αρρυθμίες, άσθμα, μειωμένη πνευμονική λειτουργία, ακόμα και πρόωρος θάνατος από αναπνευστικά ή καρδιακά νοσήματα. Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη συσχέτιση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης με καρδιακές ασθένειες και αναπνευστικά προβλήματα.

Παράλληλα έχει βρεθεί ότι η ατμοσφαιρική ρύπανση είναι υπεύθυνη για πολλές μορφές καρκίνου. Ήδη από το 1775, έγινε η πρώτη ανακάλυψη από τον Percival Pott ότι τα προϊόντα καύσης ευθύνονται για την εκδήλωση καρκίνου σε καπνοδοκαθαριστές. Στις αρχές του 1970 δημιουργήθηκε ο Διεθνής

Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC), ο οποίος πραγματοποίησε ερευνητικές μελέτες για τον προσδιορισμό και την αξιολόγηση της επικινδυνότητας καρκινογόνων ενώσεων.

Την δεκαετία του 1990 ξεκίνησαν μελέτες για την συσχέτιση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης με προβλήματα γονιμότητας και παιδικής θνησιμότητας. Οι πρώτες ενδείξεις ήταν επιστημονικά στοιχεία που συνηγορούσαν ότι το παθητικό κάπνισμα οδηγούσε σε έκθεση του εμβρύου στον καπνό του τσιγάρου μέσω του πλακούντα [13,14,15].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

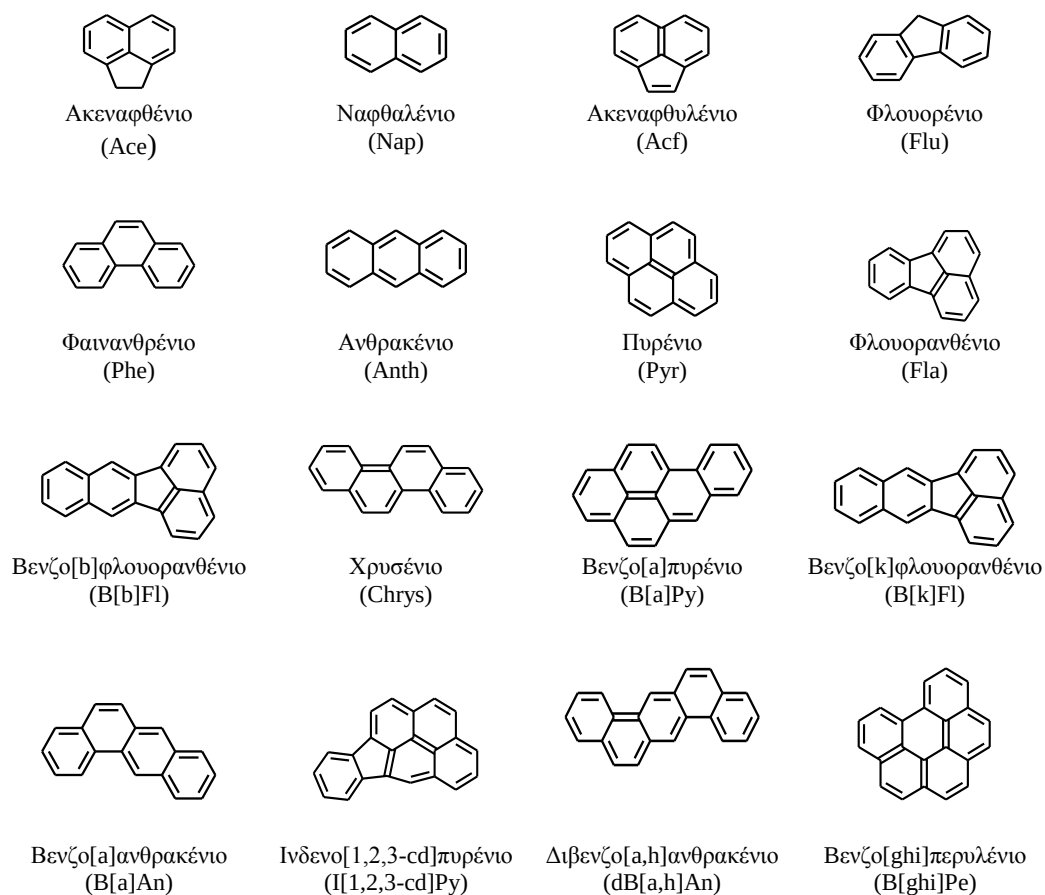
ΠΟΛΥΚΥΚΛΙΚΟΙ ΑΡΩΜΑΤΙΚΟΙ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ

2.1 Εισαγωγή

Ο όρος πολυκυκλικοί ή πολυπυρηνικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ) αναφέρεται σε οργανικές ενώσεις αποτελούμενες από αρωματικούς δακτυλίους των πέντε ή έξι τόμων άνθρακα. Προκαλούν ανησυχία λόγω της αποδεδειγμένης επίδρασης τους στην ανθρώπινη υγεία (καρκινογένεση, τερατογένεση, γονιδιοτοξικότητα) και της ταυτόχρονα αυξημένης παρουσίας τους στο περιβάλλον.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες και η τοξικότητα τους καθορίζονται από το μέγεθος και το σχήμα τους. Οι ΠΑΥ με το μικρότερο μοριακό βάρος (< 3 δακτύλιοι), αποδεδειγμένα δεν είναι καρκινογενείς και βρίσκονται σε αέρια φάση. Αντίθετα, οι ΠΑΥ με μεγαλύτερο μοριακό βάρος είναι πιο σταθεροί και τοξικοί ενώ περιέχονται στα αιωρούμενα σωματίδια. Έχουν χαμηλή πτητικότητα, η οποία μειώνεται καθώς το μοριακό βάρος αυξάνεται.

Η υπηρεσία προστασίας του περιβάλλοντος των ΗΠΑ (U.S Environmental Protection Agency, EPA) έχει χαρακτηρίσει 16 από αυτούς ως ρύπους άμεσης προτεραιότητας (priority compounds), οι οποίοι παρουσιάζονται αναλυτικά στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 3). Κάποια νίτρο - και υδρόξυ - παράγωγα έχουν χαρακτηριστεί επίσης ρύποι άμεσης προτεραιότητας, ενώ μερικοί από τους υδρόξυ - ΠΑΥ μπορούν να είναι πιο τοξικοί από τους αρχικούς καθώς προσδένονται στο DNA προκαλώντας γενετικές μεταλλάξεις ενώ σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκινικών όγκων [16,17,18,19].



Εικόνα 3: Δεκαέξι χαρακτηριστικοί Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες [20].

2.2 Χρήσεις των ΠΑΥ

Σε γενικές γραμμές οι ΠΑΥ δεν συντίθενται για βιομηχανικούς σκοπούς, παρ'όλα αυτά υπάρχουν κάποιες περιορισμένες χρήσεις τους στην βιομηχανία. Χρησιμοποιούνται για την παραγωγή φαρμακευτικών, γεωργικών και φωτογραφικών προϊόντων, καθώς επίσης θερμοσκληρυνόμενων πλαστικών, λιπαντικών υλικών κ.α.

Ενδεικτικά αναφέρονται:

- Ακεναφθένιο: παραγωγή χρωστικών, βαφών, πλαστικών, φυτοφαρμάκων και φαρμακευτικών προϊόντων.
- Ανθρακένιο: αραιωτικό για συντηρητικά ξύλου, παραγωγή βαφών και χρωστικών ουσιών.

- Φλουορανθένιο: παραγωγή βαφών, γεωργικών και φαρμακευτικών προϊόντων.
- Φλουορένιο: παρασκευή φαρμακευτικών προϊόντων, χρωστικών, βαφών, παρασιτοκτόνων και θερμοσκληρυνόμενων πλαστικών.
- Φαινανθρένιο: παραγωγή ρητινών και παρασιτοκτόνων.
- Πυρένιο: παραγωγή χρωστικών.

Άλλοι ΠΑΥ περιέχονται στην ασφαλτο, ως πρόσθετο στην πίσσα. Τέλος, ορισμένοι ΠΑΥ χρησιμοποιούνται στον τομέα των ηλεκτρονικών και των υγρών κρυστάλλων [21].

2.3 Πηγές των ΠΑΥ

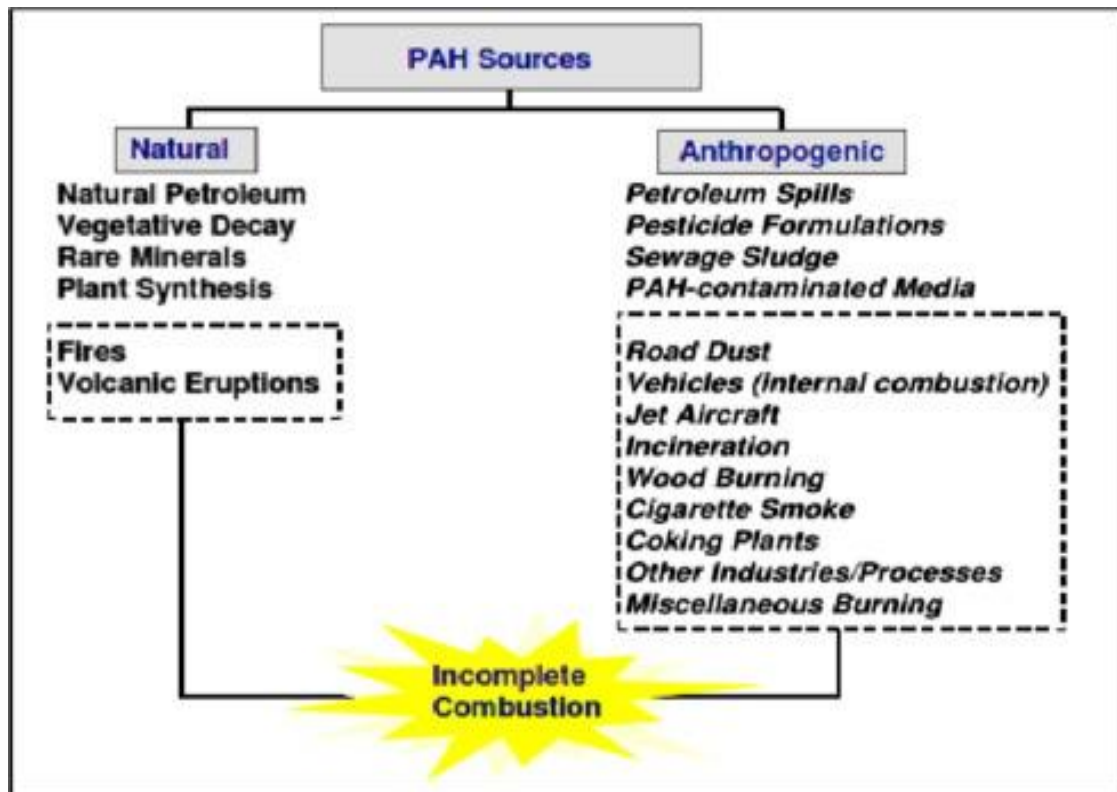
Η κύρια πηγή των ΠΑΥ είναι η ατελής καύση οργανικών υλών όπως ο άνθρακας, το πετρέλαιο και το ξύλο. Ανάλογα με τον τρόπο σχηματισμού τους διακρίνονται σε πυρογενείς, πετρογενείς και βιολογικούς.

Οι πυρογενείς σχηματίζονται με τη διεργασία της πυρόλυσης δηλαδή όταν εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες με χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου ή απουσία οξυγόνου. Η εξαντλητική διύληση άνθρακα σε οπτάνθρακα και λιθανθρακόπισσα ή η θερμική πυρόλυση υπολειμμάτων πετρελαίου σε ελαφρύτερους υδρογονάνθρακες είναι πυρολυτικές διεργασίες. Άλλες ακούσιες διεργασίες συμβαίνουν κατά την ατελή καύση πετρελαίου θέρμανσης ή κίνησης και ξύλου τόσο στις δασικές πυρκαγιές όσο και στα τζάκια. Οι θερμοκρασίες στις οποίες λαμβάνουν χώρα πυρογενείς διεργασίες κυμαίνονται από 350 °C έως περίπου 1200 °C.

Οι ΠΑΥ που σχηματίζονται κατά την ωρίμανση του αργού πετρελαίου και άλλες παρόμοιες διεργασίες ονομάζονται πετρογενείς. Η ρύπανση που προκαλείται από τους πετρογενείς ΠΑΥ είναι συχνή λόγω της μεταφοράς, της αποθήκευσης και της εκτεταμένης χρήσης του αργού πετρελαίου και των προϊόντων του (πετρελαιοκηλίδες και διαρροές δεξαμενών αποθήκευσης).

Παράλληλα, υπάρχουν ενδείξεις ότι ΠΑΥ μπορούν να παραχθούν και βιολογικά, πιθανώς από ορισμένα φυτά και βακτήρια ή κατά την αποδόμηση της φυτικής ύλης.

Αξίζει να αναφερθεί ότι η ατελής καύση, είτε αυτή συμβαίνει φυσικά είτε ανθρωπογενώς, είναι ο σημαντικότερος λόγος για την απελευθέρωση των ΠΑΥ στο περιβάλλον (Σχήμα 1) [21].



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση των πηγών των ΠΑΥ [21].

Φυσικές πηγές των ΠΑΥ.

Παραδείγματα φυσικών πηγών είναι:

- Πυρκαγιές (δασικών εκτάσεων και θαμνωδών περιοχών)
- Εκρήξεις ηφαιστείων
- Βακτηριακή σύνθεση
- Φυσική πηγή πετρελαίου
- Διάβρωση ιζηματογενών πετρωμάτων
- Αποσύνθεση πετρωμάτων φυτικής προέλευσης.

Ανθρωπογενείς πηγές των ΠΑΥ.

Οι ανθρωπογενείς πηγές των ΠΑΥ είναι:

- Μεγάλες σημειακές πηγές στις οποίες λαμβάνει χώρα ατελής καύση, όπως αποτεφρωτήρες και ορισμένες βιομηχανικές μονάδες
- Μικρότερες σημειακές, όπως οι σόμπες και τα τζάκια
- Κινητές πηγές, όπως τα αυτοκίνητα, τα αεροσκάφη, το τσιγάρο και τα κεριά

Άλλες ανθρωπογενείς πηγές είναι οι διαρροές προϊόντων πετρελαίου, η λυματολάσπη και τα απόβλητα πίσσας [21].

2.4 ΠΑΥ σε εσωτερικούς χώρους

Οι συγκεντρώσεις των ΠΑΥ που περιέχονται σε εσωτερικούς χώρους επηρεάζουν άμεσα την ανθρώπινη υγεία αφού τον μεγαλύτερο χρόνο της ζωής μας (πάνω από το 90%) βρισκόμαστε σε αυτούς. Οι ΠΑΥ εσωτερικού χώρου προέρχονται από εσωτερικές αλλά και από εξωτερικές πηγές. Οι εσωτερικές πηγές είναι κυρίως το μαγείρεμα, το κάπνισμα, το θυμίαμα και η χρήση αρωματικών κεριών [22,23]. Πλέον η παραγωγή των προϊόντων καύσης στα νοικοκυριά δεν αναφέρεται ως εσωτερική ατμοσφαιρική ρύπανση (IAP, Indoor Air Pollution) αλλά εισάγεται ο όρος «ατμοσφαιρική ρύπανση των νοικοκυριών» (HAP, Household Air Pollution). Μάλιστα, έχει τεκμηριωθεί ότι ευθύνεται για ένα πλήθος ασθενειών και πρόωρων θανάτων [24].

2.5 Κατανομή των ΠΑΥ στο περιβάλλον

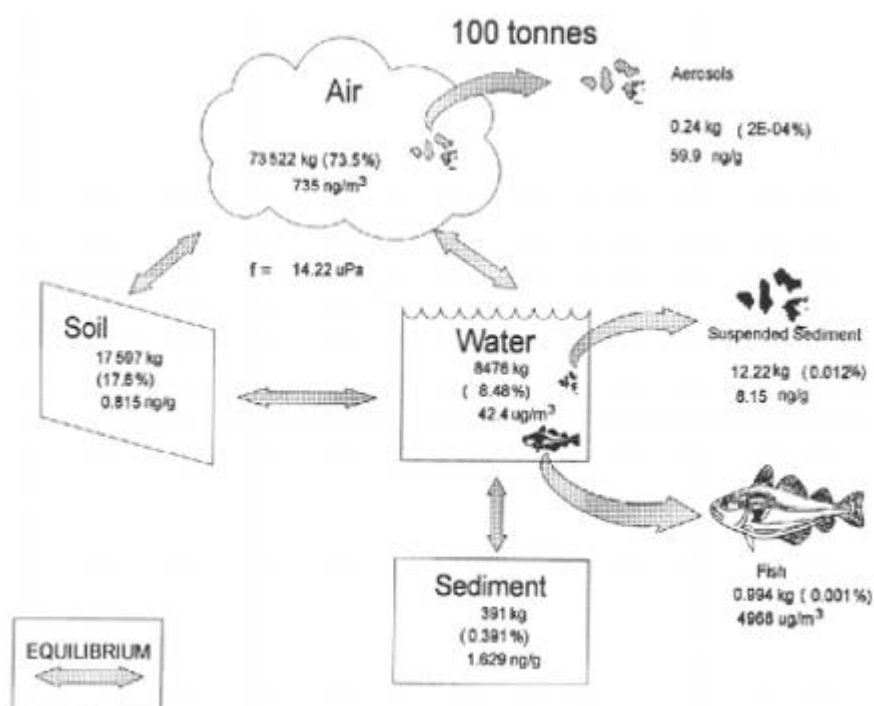
Το περιβάλλον είναι ένα πολύπλοκο σύστημα, καθώς οι ιδιότητες και ο ρυθμός των διαδικασιών που επιτελούνται σε αυτό είναι δύσκολο να μελετηθούν επαρκώς. Η χημική σύσταση της ατμόσφαιρας διαφοροποιείται τόσο χρονικά όσο και χωρικά. Οι μαζικές κινήσεις του αέρα, του νερού και των αιωρούμενων σωματιδίων είναι ακανόνιστες, οπότε είναι δύσκολο να περιγράψουν χρησιμοποιώντας μαθηματικό φορμαλισμό. Μια πρώτη προσπάθεια έγινε από τους Baughman και Lassiter, η οποία οδήγησε στην δημιουργία του μοντέλου “Unit Words” (Neely, Mackay, Paterson) [25].

2.5.1 Απλό μοντέλο κατανομής των ΠΑΥ

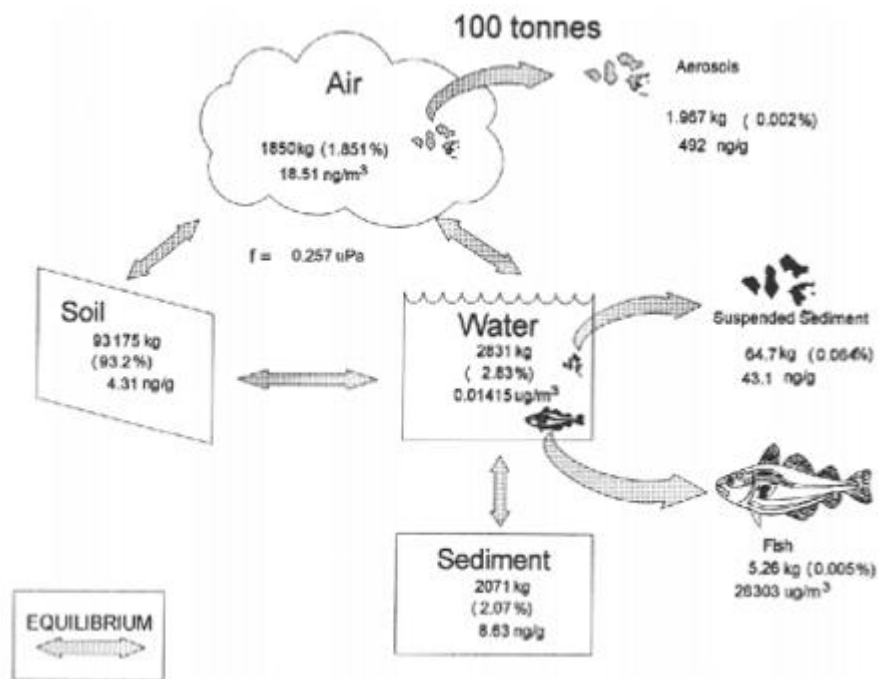
Χρησιμοποιώντας στο συγκεκριμένο μοντέλο επτά διαφορετικές φάσεις: αέρα, αερόλυμα, νερό, έδαφος, ίζημα, αιωρούμενα σωματίδια και έμβια όντα,

κατανεμημένες σε τέσσερα διαφορετικά μέσα: ατμόσφαιρα, υδάτινο περιβάλλον, έδαφος, ιζήματα και διαθέσιμα στοιχεία για τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ΠΑΥ υπολογίστηκε η κατανομή συγκεκριμένων ΠΑΥ στις επτά αυτές φάσεις. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αυτών των υπολογισμών για το ναφθαλένιο, φαιναθρένιο και το πυρένιο (σχήμα 2-3-4), τα υδρόξυ-παράγωγα των οποίων αποτέλεσαν το αντικείμενο έρευνας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Παρατηρούμε ότι καθώς αυξάνεται το ατομικό βάρος και ο αριθμός των αρωματικών δακτυλίων, οι ΠΑΥ μεταφέρονται από τον ατμοσφαιρικό αέρα και το υδάτινο περιβάλλον σε πιο οργανικό υπόβαθρο στο έδαφος και τα ιζήματα.

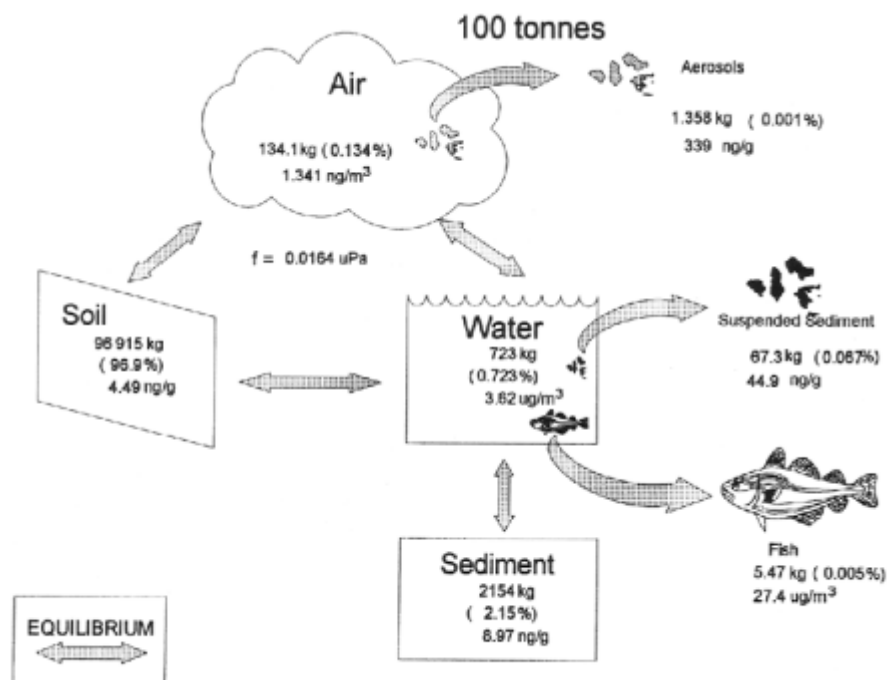
Στο συγκεκριμένο μοντέλο δεν έχουν ληφθεί υπόψιν οι αντιδράσεις μετασχηματισμού και ο μεταβολισμός των ΠΑΥ. Η συγκέντρωση αναμένεται να είναι χαμηλότερη σε όλες τις φάσεις καθώς είναι μικρός ο χρόνος ημιζωής τους και ο ρυθμός μεταφοράς τους μεταξύ των φάσεων χαμηλός [25].



Σχήμα 2: Σχηματική αναπαράσταση της κατανομής του ναφθαλενίου [25].



Σχήμα 3: Σχηματική αναπαράσταση της κατανομής του φαιναθρενίου [25].

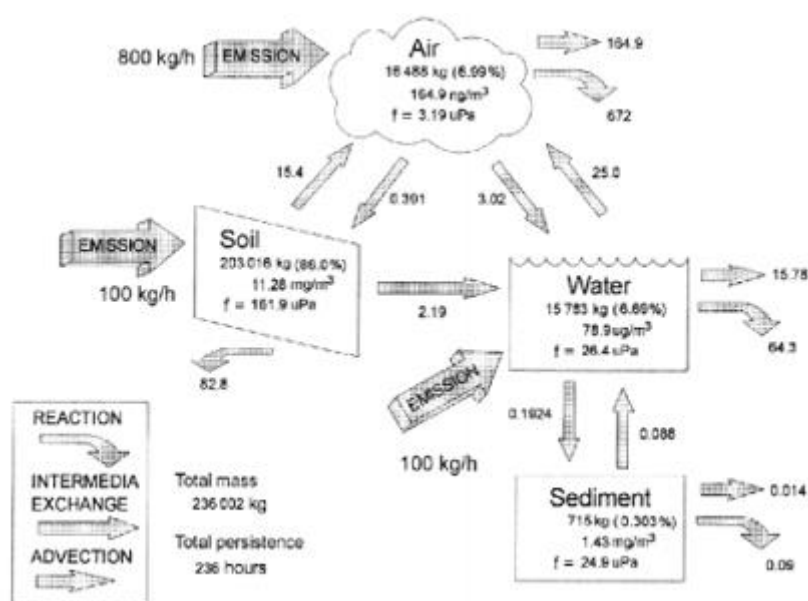


Σχήμα 4: Σχηματική αναπαράσταση της κατανομής του πυρενίου [25].

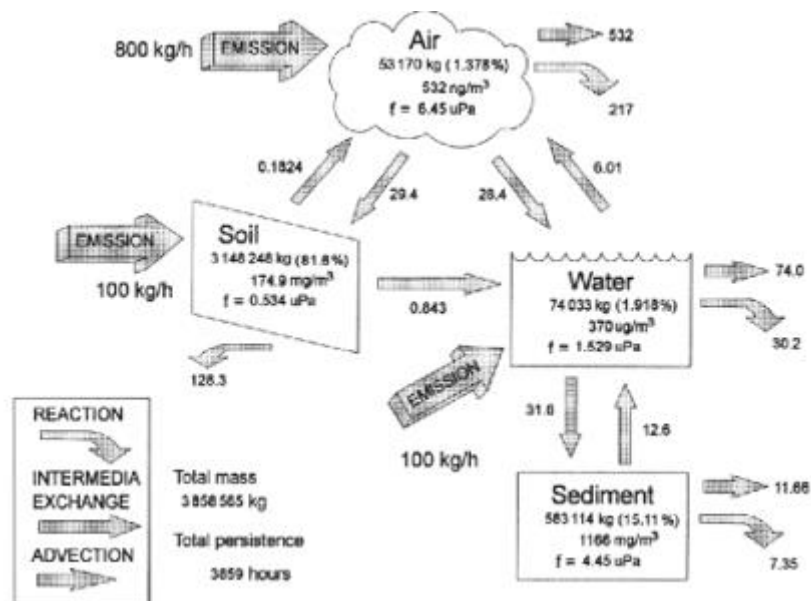
2.5.2 Μοντέλο κατανομής και αποσύνθεσης των ΠΑΥ

Εισάγοντας τις αντιδράσεις και τον ρυθμό μεταφοράς εξάγεται το ακόλουθο μοντέλο. Οι αντιδράσεις αποσύνθεσης που λαμβάνουν χώρα μπορεί να είναι διαφόρων τύπων: αβιοτικές οξειδώσεις από ρίζες -OH και άλλων ενεργών οξειδωτικών ουσιών όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το όζον (O_3), φωτολυτικές αντιδράσεις, βιοδιάσπαση και αντιδράσεις μεταβολισμού από την χλωρίδα και την πανίδα [25].

Σε γενικές γραμμές, οι ΠΑΥ με μικρό μοριακό βάρος, δύο αρωματικών δακτυλίων έχουν χρόνο ημιζωής μερικών μερών στην ατμόσφαιρα, εβδομάδων στο υδάτινο περιβάλλον, μηνών στο έδαφος και περίπου ενός χρόνου στα ιζήματα. Οι ΠΑΥ με τρεις ή τέσσερις αρωματικούς δακτυλίους έχουν περίπου διπλάσιο χρόνο ημιζωής ενώ οι μεγαλύτερου μοριακού βάρους παραμένουν για περισσότερο χρονικό διάστημα. Στα Σχήματα 5 - 6 φαίνεται το ποσοστό αποσύνθεσης του ναφθαλενίου και του πυρενίου.



Σχήμα 5: Σχηματική αναπαράσταση της κατανομής και του ποσοστού αποσύνθεσης του ναφθαλενίου. (80% στον αέρα, 10% στο νερό και 10% στο έδαφος) [25].



Σχήμα 6: Σχηματική αναπαράσταση της κατανομής και του ποσοστού αποσύνθεσης του πυρενίου. (80% στον αέρα, 10% στο νερό και 10% στο έδαφος) [25].

2.5.3 Αντιδράσεις αποσύνθεσης των ΠΑΥ

Οι χημικές αντιδράσεις αποσύνθεσης που πραγματοποιούνται στους ΠΑΥ που βρίσκονται σε αέρια φάση είναι:

- φωτολυτικές
- με ρίζες υδροξυλίου, κατά την διάρκεια της ημέρας
- με όζον (O_3)
- με νιτρικές ρίζες (NO_3), κατά τη διάρκεια της νύχτας
- με οξέα (HNO_3 ή H_2SO_4 , που σχηματίζονται από την εκπομπή NO_x και SO_x).

Ο χρόνος ημιζωής ενός ΠΑΥ οφειλόμενος σε μια αντίδραση π.χ. με ρίζα $\cdot OH$ υπολογίζεται από την σχέση:

$$\tau = (k_{OH}[\cdot OH])^{-1}$$

όπου η συγκέντρωση της ρίζας $\cdot OH$ επηρεάζεται από πλήθος παραγόντων όπως η ώρα, η εποχή και το γεωγραφικό πλάτος [26].

Οι αντιδράσεις αυτές έχουν προσομοιωθεί σε πειραματικές μελέτες για κάποιους και έχει υπολογιστεί ο χρόνος ζωής τους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3: Οι υπολογιζόμενοι χρόνοι ζωής στην ατμόσφαιρα μερικών πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (ΠΑΥ) που οφείλονται σε αντιδράσεις στην αέρια φάση με ρίζες υδροξυλίου (OH), νιτρικές (NO₃) και όζον (O₃) για υποθετικές θερινές καιρικές συνθήκες σε ρυπασμένη και μη ρυπασμένη ατμόσφαιρα [27].

PAH	Lifetime due to gas-phase reaction with					
	OH ^a		NO ₃ ^b		O ₃ ^c	
	Clean air	Polluted air	Clean air	Polluted air	Clean air	Polluted air
Naphthalene	5.7 h ^d	2.3 h	14 years	2.6 days	>80 days	^e
1-Methylnaphthalene	3.4 h ^d	1.3 h	7 years	1.3 days	>125 days	^e
2-Methylnaphthalene	2.8 h ^d	1.1 h	5 years	11 h	>40 days	^e
1-Ethylnaphthalene	4.1 h ^d	1.7 h	5 years	1.0 years	^f	^e
2-Ethylnaphthalene	3.4 h ^d	1.4 h	7 years	1.2 years	^f	^e
Dimethylnaphthalenes	1.8–2.4 h ^d	40–60 min	0.2	0.5	>40 days	^e
			–4 years ^g	–9 h ^g		
Acenaphthylene	1.1 h ^h	30 min	6 min	0.6 min	2.5 h ^h	20 min
Acenaphthene	1.8 h ^h	40 min	1.4 h	8 min	>30 days	^e
Biphenyl	1.6 days	7.8 h	>800 years	>160 days	>80 days	^e
Fluorene	9.9 h	4.0 h	1.2 days	1.4 h	>80 days	^e
Phenanthrene	7.7 h	3.1 h	4.3 h	30 min	41 days	^e

Παρατηρούμε ότι οι αντιδράσεις που συμβαίνουν λόγω ρίζων OH και NO₃ είναι καθοριστικές για την αποσύνθεση των ΠΑΥ. Ακόμη, αν η ατμόσφαιρα είναι επιβαρυμένη από άλλους ατμοσφαιρικούς ρύπους ο χρόνος ζωής των ΠΑΥ μειώνεται [27].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

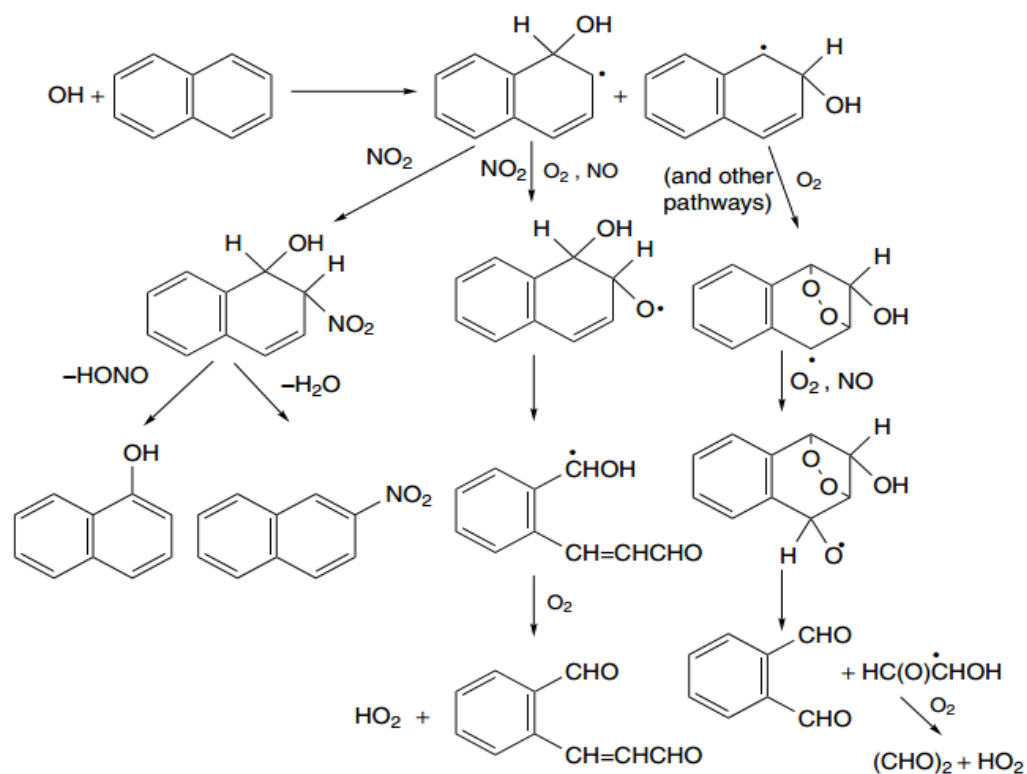
ΥΔΡΟΞΥ - ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΩΝ ΠΑΥ

3.1 Εισαγωγή

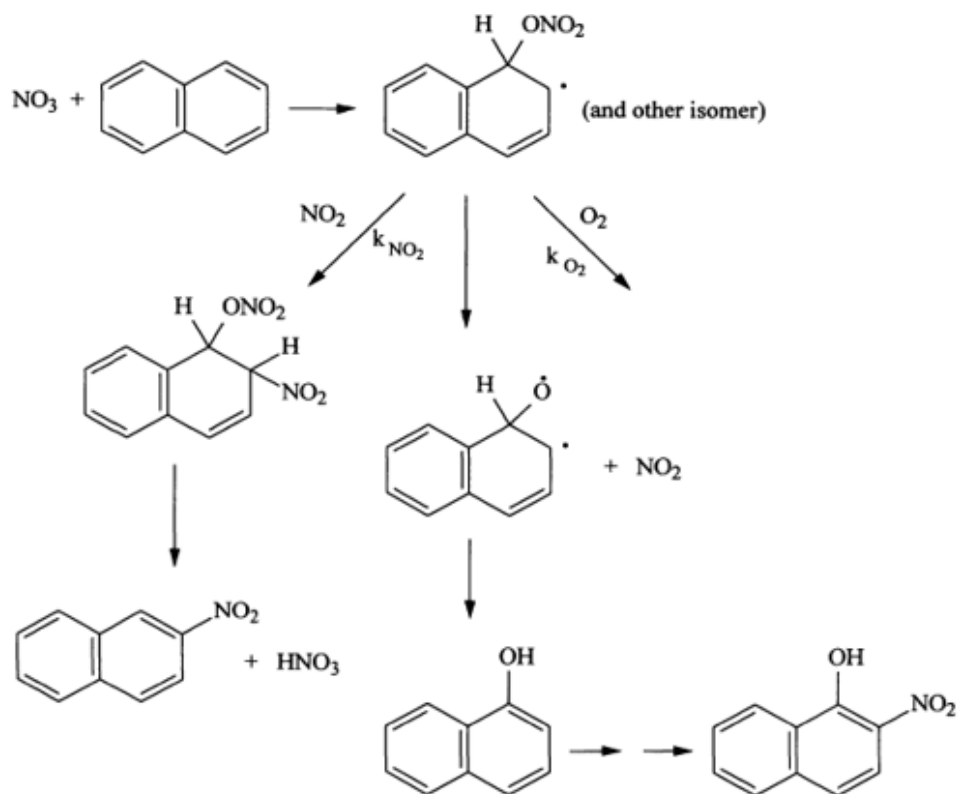
Τα υδροξυλιωμένα παράγωγα των ΠΑΥ (ΟΗ-ΠΑΥ) παράγονται από αντιδράσεις φωτο-οξειδωσης ή αντιδράσεις μεταβολισμού των μητρικών ΠΑΥ. Είναι ενώσεις που πρόσφατα έχουν χαρακτηριστεί ως ρύποι και εμφανίζονται είτε ως πρωτογενείς είτε ως δευτερογενείς. Στον ατμοσφαιρικό αέρα οι ΟΗ - ΠΑΥ είναι λιγότερο πτητικοί από τους μητρικούς με αποτέλεσμα να βρίσκονται περισσότερο στα αιωρούμενα σωματίδια. Μερικοί από αυτούς έχουν αποδειχτεί περισσότερο τοξικοί από τους μητρικούς. Χρησιμοποιούνται ευρέως ως βιοδείκτες της έκθεσης του ανθρώπου στους ΠΑΥ [28].

3.2 Παραγωγή ΟΗ - ΠΑΥ και άλλων παραγώγων στην ατμόσφαιρα

Οι ΠΑΥ είναι πτητικές ενώσεις που μεταφέρονται σε μεγάλη απόσταση από την πηγή και παίρνουν μέρος σε αντιδράσεις παράγοντας ένα πλήθος προϊόντων, κάποια από τα οποία είναι πιο τοξικά από τους αρχικούς [29]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα καρκινογόνα νίτρο- και υδρόξυ-παράγωγα. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 4) αναφέρεται ένας προτεινόμενος μηχανισμός μέσω ριζών υδροξυλίου σχηματισμού ΟΗ-ΠΑΥ και νίτρο-ΠΑΥ για το ναφθαλένιο, τον απλούστερο και τον εκτενέστερα μελετημένο ΠΑΥ. Ανάλογος μηχανισμός ακολουθείται και με τη ρίζα NO_3 (εικόνα 5). Η αντίδραση του ναφθαλενίου με προσθήκη ρίζας NO_3 στον αρωματικό δακτύλιο έχει ως στάδιο έναρξης το σχηματισμό του προϊόντος προσθήκης, το οποίο στη συνέχεια αποσυντίθεται ξανά προς τα αντιδρώντα και αντιδρά με NO_2 ή αντιδρά μονομοριακά. Για το ναφθαλένιο έχουν παρατηρηθεί μόνο τα προϊόντα που δεν καταστρέφεται ο αρωματικός δακτύλιος. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα νιτροναφθαλένια και τα υδροξυνιτροναφθαλένια [27].

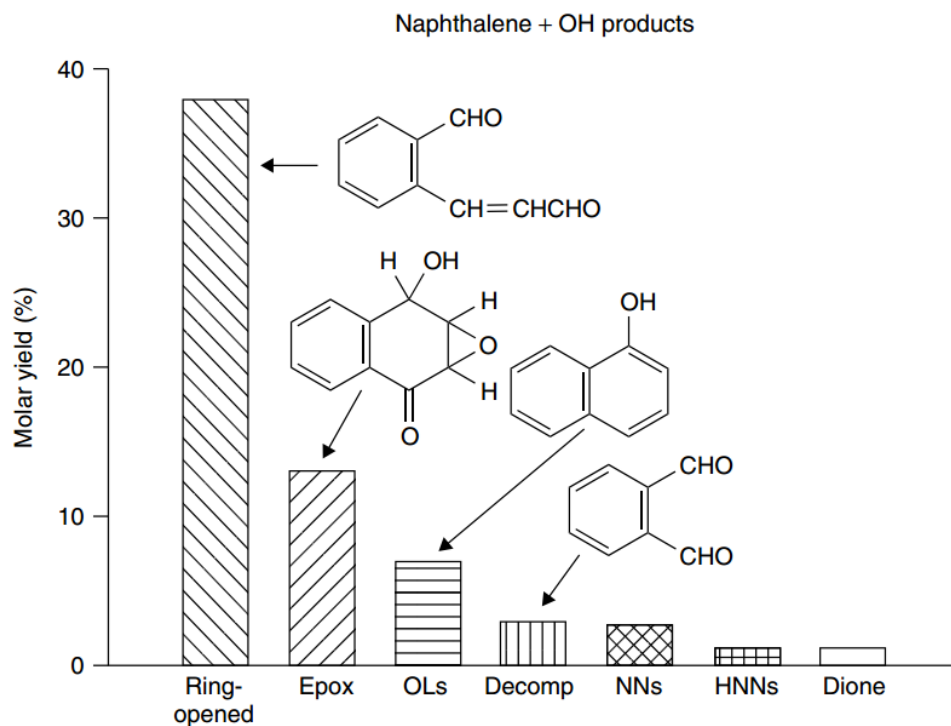


Εικόνα 4: Προτεινόμενος μηχανισμός παραγωγών μέσω ρίζας υδροξυλίου για το ναφθαλένιο [27].

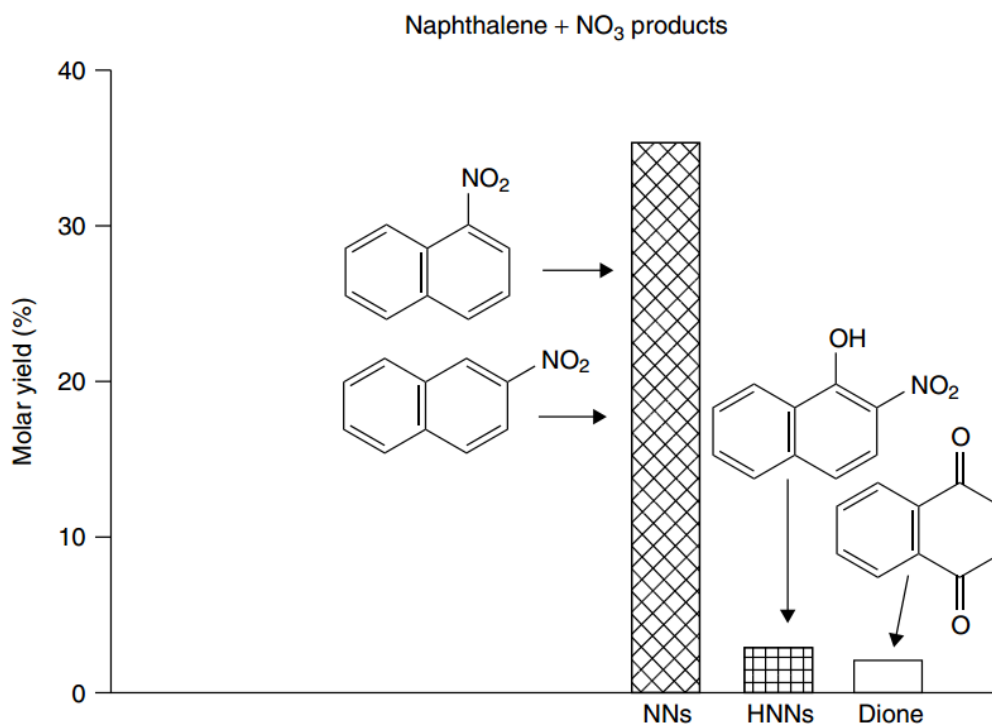


Εικόνα 5: Προτεινόμενος μηχανισμός παραγωγών μέσω ρίζας NO_3 για το ναφθαλένιο [26].

Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 6, 7) παρουσιάζεται το ποσοστό μετατροπής του ναφθαλενίου στα προϊόντα μέσω των δύο μηχανισμών αντιδράσεων.



Εικόνα 6: Διάγραμμα ποσοστού μετατροπής του ναφθαλενίου στα προϊόντα του με ρίζα OH [27].



Εικόνα 7: Διάγραμμα ποσοστού μετατροπής του ναφθαλενίου στα προϊόντα του με ρίζα NO₃ [27].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΠΑΥ, ΟΗ-ΠΑΥ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ

4.1 Εισαγωγή

Οι ΠΑΥ μεταβολίζονται από τα κυτοχρώματα P450 τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα. Οι κύριοι μεταβολίτες τους είναι οι μονοϋδροξυ-ΠΑΥ και οι διϋδροδιόλες. Ο σκοπός του μεταβολισμού τους είναι να αυξηθεί η πολικότητα τους, για να μετατραπούν σε υδρόφιλες ενώσεις ώστε να γίνει η απέκκριση τους από τον οργανισμό, στην πραγματικότητα όμως μπορεί να παραχθούν ενώσεις που είναι τοξικότερες από τις αρχικές [30]. Οι μικρότερου μοριακού βάρους ΟΗ - ΠΑΥ αποβάλλονται από τον οργανισμό μέσω του ουροποιητικού συστήματος. Αυτός είναι και ο λόγος που οι ΟΗ-ΠΑΥ χρησιμοποιούνται κυρίως ως βιοδείκτες έκθεσης του ανθρώπου στους καρκινογενείς ΠΑΥ. Οι ΟΗ-ΠΑΥ είναι πιο επικίνδυνοι από τους αρχικούς καθώς δημιουργούν ενώσεις προσθήκης με το DNA [30].

4.2 Τρόποι έκθεσης

Τρεις είναι οι κύριοι τρόποι απορρόφησης των ΠΑΥ και των μεταβολιτών τους στον ανθρώπινο οργανισμό: μέσω της αναπνευστικής οδού, από εισπνοή αερολυμάτων ή σωματιδίων (τόσο σε εξωτερικούς όσο και σε εσωτερικούς χώρους), μέσω της δερματικής επαφής και του πεπτικού συστήματος [16].

Πολλοί από τους ΠΑΥ που περιέχονται στο καπνό του τσιγάρου είναι πιθανώς καρκινογενείς ενώσεις. Για τους μη καπνιστές η σημαντικότερη έκθεση πραγματοποιείται μέσω της διατροφής (η επεξεργασία και το μαγείρεμα του φαγητού σε υψηλές θερμοκρασίες ευθύνεται για την παραγωγή ΠΑΥ). Κάποιες καλλιέργειες όπως είναι το σιτάρι, η σίκαλη και οι φακές, συνθέτουν ή απορροφούν τους ΠΑΥ από το νερό, την ατμόσφαιρα και το έδαφος. Η απορρόφηση των ΠΑΥ από την διατροφή καθορίζεται από το μέγεθος, τη λιποφιλικότητα και την υδατοδιαλυτότητα των μορίων. Πειράματα που έχουν γίνει σε ποντίκια δείχνουν πως η βιοδιαθεσιμότητα ενός ΠΑΥ από το φαγητό είναι 20 - 50 % και αυξάνεται όσο αυξάνεται η λιποφιλικότητα των υπολοίπων συστατικών. Παράλληλα, υπάρχουν ενδείξεις πως οι ΠΑΥ μεγαλύτερου μεγέθους δεν απορροφούνται από το πεπτικό σύστημα.

Οι ΠΑΥ και οι μεταβολίτες τους βιοσυσσωρεύονται στα ζώα που είναι ψηλότερα στην τροφική αλυσίδα. Αυτός είναι και ο λόγος που ο σημαντικότερος τρόπος έκθεσης του ανθρώπου στους ΠΑΥ, αλλά και στους μεταβολίτες τους, είναι η διατροφή. Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι ΠΑΥ με αριθμό μεγαλύτερο των 5 δακτυλίων, μεταφέρονται στον άνθρωπο ως προϊόντα μεταβολισμού.

Πρόσφατες έρευνες σχετικά με την έκθεση σε βενζο(α)πυρένιο σε μη καπνιστές στις αναπτυσσόμενες χώρες έδειξαν ότι το εύρος και το μέγεθος της διατροφικής έκθεσης (0,5 έως 320 ng ανά ημέρα) είναι γενικά μεγαλύτερο συγκριτικά της έκθεσης λόγω εισπνοής (0,15 έως 26 ng ανά ημέρα). Σε ορισμένες περιπτώσεις όπου ο εσωτερικός αέρας περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις σε ΠΑΥ, ο αέρας μπορεί να είναι πηγή υψηλής σημασίας. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου η βιομάζα χρησιμοποιείται γενικά για το μαγείρεμα σε σπίτια χωρίς καπνοδόχο ή με ανεπαρκή εξαερισμό, η συνεισφορά της εισπνοής στην έκθεση σε βενζο(α)πυρένιο μπορεί να είναι της τάξης των 138 - 3320 ng ανά ημέρα και επομένως γίνεται ο κύριος παράγοντας συνεισφοράς στην καθημερινή δόση εισαγωγής [31].

Έκθεση σε ΠΑΥ συμβαίνει και στο χώρο εργασίας ανθρώπων που αναπνέουν καυσαέρια (μηχανικοί, οδηγοί αυτοκινήτων) ή όσων εργάζονται στα ορυχεία, την επεξεργασία μετάλλων ή τη διύλιση του πετρελαίου. Οι τρόποι έκθεσης και στους επαγγελματικούς χώρους είναι η κατάποση, η εισπνοή και η δερματική επαφή [27].

4.3 Τοξικολογικές ιδιότητες των ΠΑΥ και των μεταβολιτών τους

Η δημιουργία ενώσεων προσθήκης του DNA με τους ηλεκτρονιόφιλους μεταβολίτες των ΠΑΥ ευθύνεται για την καρκινογένεση. Βέβαια, η ανίχνευση ενώσεων προσθήκης σε έναν ιστό αποτελεί μόνο μια μικρή ένδειξη που σχετίζεται με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου. Έρευνες που έχουν διεξαχθεί με το βενζο[α]πυρένιο κατέληξαν στο ότι κρίσιμος παράγοντας καρκινογένεσης είναι και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός.

Πολλοί διεθνείς οργανισμοί, όπως η EPA και ο IARC, προσπάθησαν να συσχετίσουν τους ΠΑΥ με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου.

Η προσέγγιση του EPA βασίζεται στη δόση αναφοράς (Benchmark Doses, BMDs) και στο περιθώριο έκθεσης (Margin-Of-Exposure, MOE). Η δόση

αναφοράς (BMD) υπολογίζεται μέσω μαθηματικού μοντέλου που συνδυάζει πειραματικά δεδομένα με την μετρούμενη δόση η οποία προκαλεί χαμηλή, αλλά ανιχνεύσιμη απόκριση. Το MOE ορίζεται ως ο λόγος της μη παρατηρούμενης αρνητικής επίπτωσης (ή του ορίου εμπιστοσύνης της δόσης αναφοράς, BMDL) προς την θεωρητική, προβλεπόμενη ή υπολογιζόμενη δόση ή συγκέντρωση, που προκαλεί αρνητικές επιπτώσεις.

Η EPA για την αξιολόγηση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου χρησιμοποιεί τον σχετικό συντελεστή ισχύος (Relative Potency Factor, RPF), υπολογίζει δηλαδή τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου ενός ΠΑΥ συσχετίζοντας το με την τοξικότητα του βένζο[α]πυρενίου. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από *in vivo* και *in vitro* δοκιμές και συσχετίζουν έναν συγκεκριμένο ΠΑΥ με την εμφάνιση καρκίνου, προέκυψαν από πειράματα όπου ο ΠΑΥ αναλύθηκε συγχρόνως με το βένζο[α]πυρενίο. Με τον τρόπο αυτό, αξιολόγησαν τα δεδομένα για 74 ΠΑΥ και κατέληξαν στα RPFs για 27 ΠΑΥ βασισμένα σε δοκιμές που μελετούσαν την ανάπτυξη όγκου [24].

Η σημαντικότερη μελέτη και καταγραφή των καρκινογόνων και μεταλλαξογόνων ουσιών έχει επιτευχθεί από το 1975 μέχρι σήμερα από τον Διεθνή Οργανισμό για την Έρευνα του Καρκίνου (IARC - International Agency for Research on Cancer) του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι ομάδες κατάταξης, ενώ στον Πίνακα 4 οι ΠΑΥ ως καρκινογόνες ενώσεις. Κάποια νίτρο-παράγωγα βρίσκονται στη λίστα του IARC, ενώ τα υδρόξυ-παράγωγα δεν έχουν μελετηθεί εκτενέστερα [28].

Πίνακας 4: Οι ομάδες κατάταξης των χημικών ουσιών κατά τον Διεθνή Οργανισμό για την Έρευνα του Καρκίνου (IARC) [33].

Ομάδα	Χαρακτηριστικό Ομάδας	Μαρτυρίες- Πειραματικά δεδομένα
1	Η ουσία, μίγμα κλπ είναι καρκινογόνος στον άνθρωπο	Επαρκείς ερευνητικές μαρτυρίες από επιδημιολογικές έρευνες και σε πειραματόζωα για την ικανότητα καρκινογένεσης
2A	Η ουσία, μίγμα κλπ είναι πιθανώς καρκινογόνος στον άνθρωπο	Περιορισμένη μαρτυρία για την ικανότητα καρκινογένεσης στον άνθρωπο από επιδημιολογικές έρευνες επαρκή μαρτυρία από πειράματα σε πειραματόζωα
2B	Η ουσία, μίγμα κλπ είναι ενδεχόμενα καρκινογόνος στον άνθρωπο	Περιορισμένη μαρτυρία για ικανότητα καρκινογένεσης στον άνθρωπο και λιγότερη από επαρκής μαρτυρία από πειράματα σε πειραματόζωα
3	Η ουσία, μίγμα κλπ δε μπορεί να ταξινομηθεί ως προς την ικανότητα καρκινογένεσης	Ανεπαρκής μαρτυρία για καρκινογόνο δράση, περιορισμένες ενδείξεις σε πειραματόζωα, εάν υπάρχουν ενδείξεις σε πειραματόζωα, ο μηχανισμός δράσης δε λειτουργεί στον άνθρωπο
4	Η ουσία, μίγμα κλπ πιθανώς δεν είναι καρκινογόνος	Πειραματικά δεδομένα δείχνουν απουσία ικανότητας καρκινογένεσης

Πίνακας 5: Οι 16 ΠΑΥ όπως έχουν καταταχθεί ως καρκινογόνες ενώσεις από τον Διεθνή Οργανισμό για την Έρευνα του Καρκίνου (IARC) [34].

Ένωση	Ομάδα	Έτος Δημοσιοποίησης
Ακεναφθένιο	3	2010
Ναφθαλένιο	2B	2002
Ακεναφθυλένιο	-	-
Φλουορένιο	3	2010
Φαινανθρένιο	3	2010
Ανθρακένιο	3	2010
Πυρένιο	3	2010
Φλουορανθένιο	3	2010
Βενζο(b,k)φλουορανθένιο	2B	2010
Χρυσένιο	2B	2010
Βενζο(α)πυρένιο	1	2012
Βενζο(α)ανθρακένιο	2B	2010
Ινδενο(1,2,3-cd)πυρένιο	2B	2010
Διβενζο(a,h)ανθρακένιο	2A	2010
Βενζο(ghi)περυλένιο	3	2010

4.4 Κατανομή των ΠΑΥ και των μεταβολιτών τους στον ανθρώπινο οργανισμό

Ο βαθμός κατανομής των ΠΑΥ στους ιστούς επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει σε πειραματόζωα καταλήγουν στα εξής συμπεράσματα:

- Οι ΠΑΥ, και κυρίως οι μεταβολίτες τους, ανιχνεύονται στα περισσότερα όργανα.
- Τα όργανα που είναι πλούσια σε λιπώδη ιστό δρουν ως αποθήκες και οι ΠΑΥ απελευθερώνονται αργά.
- Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις εντοπίζονται στο γαστρεντερικό σύστημα, ανεξάρτητα από τον τρόπο έκθεσης.
- Συνήθως αποθηκεύονται στα νεφρά, το ήπαρ και το λίπος, ενώ μικρότερη ποσότητα αποθηκεύεται στη σπλήνα, τα επινεφρίδια και τις ωοθήκες.

Περιορισμένες αναλύσεις έχουν γίνει σε βιολογικά δείγματα ανθρώπων. Οι Graf και Schrmair (1975) μελετώντας δείγματα υγείων ανθρώπων ανέφεραν μέσες τιμές βενζο [α] πυρενίου 0,32 μg / 100 g ξηρού ιστού στο ήπαρ, σπλήνα, νεφρό, καρδιά, σκελετικό μυ και 0,20 μg / 100 g ξηρού ιστού στον πνεύμονα. Μια άλλη ερευνά έγινε σε ένα μικρό αριθμό 24 γυναικών σε δείγματα μητρικού γάλακτος, πλακούντα και ομφάλιου λώρου για επιλεγμένους ΠΑΥ. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βενζο[α]πυρενίου, διβενζο[α,η]ανθρακένιου και χρυσενίου βρέθηκαν στο γάλα και τον ομφάλιο λώρο. Συνεπώς, η έκθεση της μητέρας στους ΠΑΥ επηρεάζει τόσο το έμβρυο όσο και το βρέφος (Madhavan και Naidu, 1995) [24].

Οι μεταβολίτες των ΠΑΥ μπορούν να συνδεθούν ομοιοπολικά με πρωτεΐνες και νουκλεϊικά οξέα ενώ το ποσοστό του κύκλου εργασιών των παραγώγων τους ορίζει τον χρόνο ημιζωής τους στους ιστούς [29].

Το τελευταίο στάδιο είναι η απέκκριση τους από τον οργανισμό. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ΠΑΥ και των μεταβολιτών τους αποβάλλεται με τα ούρα, τη χολή και τα κόπρανα. Ένα μικρότερο ποσοστό αποβάλλεται με τον ιδρώτα, το σάλιο, τα δάκρυα ή το μητρικό γάλα [24].

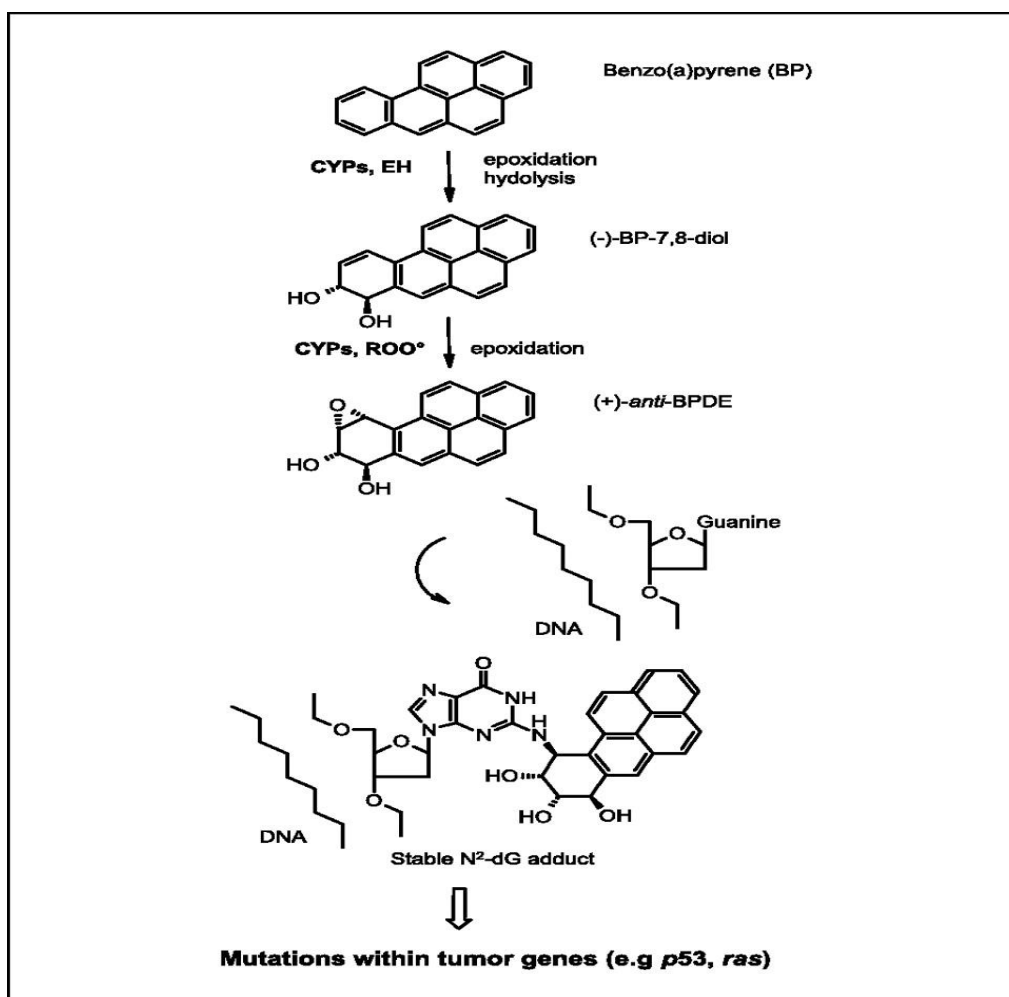
4.5 Μεταβολισμός των ΠΑΥ στον ανθρώπινο οργανισμό

Έχει αποδειχτεί ότι οι ΠΑΥ προκαλούν κυτταρικές μεταλλάξεις μόνο μετά από μεταβολική ενεργοποίηση από τα ένζυμα που μεταβολίζουν τα φάρμακα. Τέτοια ένζυμα είναι το κυτόχρωμα P450 (P450 ή CYP) και υδρολάσες που παράγουν καρκινογόνα ηλεκτρονιόφιλα. Στις περισσότερες περιπτώσεις η οξειδωση των ΠΑΥ από ένζυμα P450 είναι καθοριστικό βήμα για την ενεργοποίηση της μεταβολικής πορείας. Τα εποξειδικά ενδιάμεσα που προκύπτουν είναι συνήθως πιο δραστικά από την αρχική ένωση, ενώ απαιτείται περαιτέρω μεταβολισμός για να προκληθεί καρκίνος. Εύκολα μπορούν να υδρολυθούν από υδρολάσες σε εποξειδία διόλης, στα οποία οι ομάδες υδροξυλίου βρίσκονται σε γειτονικές θέσεις και οξειδώνονται εκ νέου σε δραστικά εποξειδία διόλης τα οποία αλληλεπιδρούν με το DNA προκαλώντας κυτταρικές μεταλλάξεις [32].

Συνήθως, η έκθεση του ανθρώπου δεν γίνεται μόνο σε ένα ΠΑΥ. Κατανοώντας λοιπόν, τις διαφορές που τυχόν συμβαίνουν σε ένα μείγμα ΠΑΥ εκτιμάμε

ορθότερα τα προβλήματα που μπορεί να προκληθούν. Είναι αναγκαίο να μελετηθεί για κάθε ΠΑΥ ξεχωριστά, αλλά και συνδυαστικά, ο μεταβολισμός και η τοξικότητα του, ώστε να προσδιοριστεί η επίδραση τους.

Έχουν διεξαχθεί έρευνες που συγκρίνουν τον μεταβολισμό του φαιναθρενίου (PHE), φλουρανθρενίου (FLA) και βενζο[α]πυρενίου σε μείγμα που περιέχει και τις τρεις ενώσεις αλλά και μεμονωμένα προσδιορίζοντας τη μείωση της συγκέντρωσης του αρχικού ΠΑΥ. Παρατηρήθηκε ότι διέφερε ο μεταβολισμός τους όταν το πείραμα διεξάγονταν σε μείγμα των ενώσεων αυτών. Ο ανταγωνισμός των ενζύμων ήταν καθοριστικής σημασίας, η δομή των ΠΑΥ επηρέαζε τον μεταβολισμό τους αλλά και την τοξικότητα τους. Η συγκέντρωση ενός ΠΑΥ μειωνόταν γρηγορότερα όταν αυτός προσδιοριζόταν μόνος του, ενώ καθυστερούσε ο μεταβολισμός τους σε μίγμα που περιείχε και τις τρεις ενώσεις [33]. Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται το κύριο μεταβολικό μονοπάτι και η δέσμευση του DNA από το βενζο(α)πυρένιο.



Εικόνα 8: Κύριο μεταβολικό μονοπάτι και δέσμευση του DNA από το B[a]P [36].

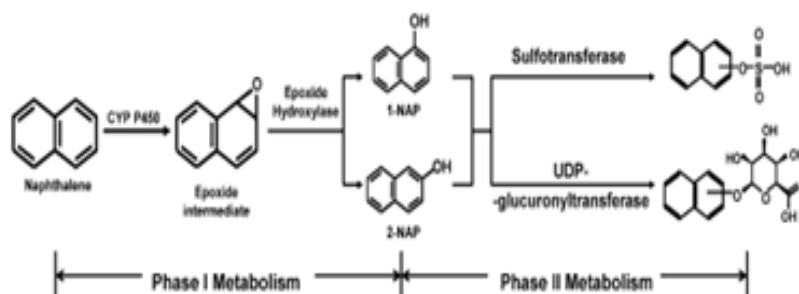
Στο πρώτο στάδιο, το βενζο(α)πυρένιο, μέσω της δράσης των ισοενζύμων CYP1A1 και CYP1B1 και της υποξειδικής υδρολάσης, μετατρέπεται κατά κύριο λόγο στην βενζο(α)πυρένο-7R,8R-trans-διυδροδιόλη. Η τελευταία ένωση, υπόκειται ξανά σε οξείδωση υπό την επίδραση των ίδιων οξειδωτικών ενζύμων παρέχοντας την ισχυρά μεταλλαξογόνο ένωση (+)βενζο(α)πυρενο-7,8-διυδροδιο-9,10-εποξειδίο (BPDE), μια δραστική ηλεκτρονιόφιλη ένωση [37,38]. Η παραπάνω εποξειδική ένωση μπορεί να διεισδύσει στα κύτταρα και να σχηματίσει συζεύγματα με το μόριο του DNA ή ακόμα και σταθερές ενώσεις προσθήκης με τη γουανίνη στη N2 θέση της. Πρέπει να σημειωθεί ότι η παραπάνω ένωση BPDE δεν αποτελεί το μοναδικό προϊόν οξείδωσης του βενζο(α)πυρενίου, αλλά κατά την πορεία παράγονται και άλλες ανάλογες ενώσεις οξυγονούχες, όπως και άλλα διαστερομερή της ένωσης BPDE. Οι μεταλλάξεις που δημιουργούνται από το BPDE είναι του τύπου μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης (*frameshift mutation*), που γενικά οφείλονται σε προσθήκη (*insertion*) ή διαγραφή (*deletion*) αριθμού αζωτούχων βάσεων μη πολλαπλασίου του τρία, γεγονός που οδηγεί σε σύνθεση τελείως διαφορετικής πρωτεΐνης. Υπάρχουν ενδείξεις ότι το εποξειδικό παράγωγο του βενζο(α)πυρενίου στοχεύει το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53*. Το γονίδιο αυτό είναι παράγοντας μεταγραφής, που ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο και λειτουργεί με αυτό τον τρόπο ως κατασταλτικός παράγοντας ανάπτυξης κακοήθων όγκων (*tumor suppressor*) [36,39,40,41].

Αποβολή των ΠΑΥ από τον ανθρώπινο οργανισμό.

Μόλις οι ΠΑΥ εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό ξεκινούν άμεσα μεταβολικές διαδικασίες, στη φάση I οι ΠΑΥ οξειδώνονται από το ηπατικό κυτόχρωμα P450 σχηματίζοντας δραστικά εποξειδικά ενδιάμεσα, τα οποία ανάγονται ή υδρολύονται στα ύδροξυ - παράγωγα (OH - ΠΑΥ). Στη φάση II, οι OH-ΠΑΥ προσδένονται στο γλυκουρονικό ή στοθειϊκό οξύ ώστε να αυξηθεί η υδατοδιαλυτότητα του (Εικόνα 9).

Ανάλογα με το μοριακό τους βάρος απεκκρίνονται ή με τα ούρα (ΠΑΥ 2-3 δακτυλίων) είτε με τα κόπρανα (ΠΑΥ 4 δακτυλίων ή μεγαλύτεροι). Αυτή η βιολογική διαδικασία οδηγεί στον σχηματισμό πολλών μεταβολιτών, μεταξύ των

οποίων είναι εποξειδία διϋδροδυόλες, μονο- υδροξυ- υποκατεστημένους ή πολύ-υδροξυ-υποκατεστημένους ΠΑΥ. Οι ΟΗ-ΠΑΥ που απεκκρίνονται από τον οργανισμό χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες για την έκθεση του ανθρώπου στους μητρικούς [42].



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση των μεταβολικών αντιδράσεων του υδρόξυναφθαλενίου. Τα προϊόντα σύζευξης τόσο με το γλυκουρονικό όσο και με το θειίκο οξύ προκύπτουν από την ίδια μητρική ένωση [43].

4.6 Επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία και καρκινογένεση

Οι επιδράσεις που έχουν οι ΠΑΥ στον άνθρωπο εξαρτώνται από τη χρονική διάρκεια, τον τρόπο έκθεσης, τη συγκέντρωση και την τοξικότητα τους. Τα προβλήματα υγείας που μπορεί να προϋπάρχουν, καθώς και η ηλικία, καθορίζουν επίσης την επίδραση που έχουν οι ΠΑΥ στον ανθρώπινο οργανισμό.

Οξείες επιδράσεις των ΠΑΥ είναι ερεθισμός των οφθαλμών, ναυτία, έμετος, διάρροια, σύγχυση, δερματικές αλλεργικές αντιδράσεις, ερεθισμός και φλεγμονή του δέρματος. Η μακροχρόνια έκθεση μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ανοσολογική λειτουργία, νεφρική και ηπατική βλάβη, καταρράκτη και προβλήματα του αναπνευστικού συστήματος.

Πολλοί ΠΑΥ έχουν χαρακτηριστεί ως καρκινογενείς ενώσεις από τον EPA και τον IARC με κυριότερο το βενζο(α)πυρένιο. Οι μητρικοί ΠΑΥ μπορεί να έχουν τοξικές συνέπειες, όμως, το σημαντικότερο πρόβλημα το δημιουργούν κάποιοι μεταβολίτες ΠΑΥ, όπως είναι οι ΟΗ-ΠΑΥ, τα εποξειδία και οι διϋδροδιόλες, καθώς προσδένονται στις κυτταρικές πρωτεΐνες και το DNA. Αυτές οι βιοχημικές διαταραχές μπορεί να προκαλέσουν μεταλλάξεις, δυσπλασίες, όγκους και καρκίνο.

Επίσης, η ανοσοκαταστολή που προκαλούν μπορεί να εμπλέκεται στους μηχανισμούς με τους οποίους επάγουν τον καρκίνο. Λίγες έρευνες συσχέτισαν τους ΠΑΥ με την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Η αυξημένη έκκριση κυτταροκινών από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να οδηγήσει σε φλεγμονές. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες αυτό μπορεί να προκαλέσει ανάπτυξη όγκου, αλλεργίες ή αυτοάνοσες ασθένειες. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι και η τοξικότητα που προκαλούν οι ΠΑΥ στο ανοσοποιητικό σύστημα οφείλεται κυρίως στους δραστικούς εποξειδικούς μεταβολίτες τους.

Ομοίως, οι περισσότεροι μητρικοί ΠΑΥ δεν είναι γονιδιοτοξικοί, ο μεταβολισμός τους όμως σε εποξείδια διόλης προκαλεί γονιδιοτοξικότητα, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην καρκινογένεση.

Τέλος, ευθύνονται και για τερατογενέσεις. Αναλύσεις αίματος του ομφάλιου λώρου νεογνών που έχουν εκτεθεί σε ΠΑΥ δείχνουν μεταλλάξεις του DNA που συνδέονται με ανάπτυξη καρκίνου [44].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

5.1 Εισαγωγή

Ο όρος «λευχαιμία» που χρησιμοποιείται στη βιβλιογραφία (από τις ελληνικές λέξεις «λευκός» και «αίμα») δεν αφορά σε μια συγκεκριμένη νοσολογική οντότητα αλλά μάλλον σε μια ομάδα αιματολογικών νοσημάτων με διαφορετικό βιολογικό υπόβαθρο, κλινικές εκδηλώσεις, πρόγνωση αλλά και ανταπόκριση στη θεραπευτική αγωγή. Στο σύνολό τους η ομάδα νόσων που περιγράφονται με τον όρο «λευχαιμία» λόγω της συνήθους συμμετοχής των κυττάρων της λευκής σειράς του αίματος, προέρχονται από μια κακοήγη εξαλλαγή κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος [45].

Η λευχαιμία αποτελεί αιματολογική νεοπλασία που οφείλεται στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κυττάρων τις μυελικής ή της λεμφικής σειράς στον μυελό των οστών, στο αίμα και τα διάφορα όργανα και την συνεπαγόμενη απώθηση/κατάλυση της φυσιολογική αιμοποίησης [46].

5.2 Τύποι λευχαιμίας

Ανάλογα με τον τύπο του προγονικού κυττάρου στο οποίο έλαβε χώρα η κακοήθης εξαλλαγή, και από το οποίο συνεπώς προέρχεται ο κλώνος κακοήθων κυττάρων, αναπτύσσονται διαφορετικοί τύποι λευχαιμιών των οποίων τα κλινικά χαρακτηριστικά ποικίλουν με τη φύση και λειτουργία των κυτταρικών σειρών που επηρεάζονται.

Με βάση την κυτταρική σειρά από την οποία προέρχεται ο κλώνος των νεοπλασματικών κυττάρων, οι λευχαιμίες μπορούν να διακριθούν σε δύο βασικούς τύπους [45]:

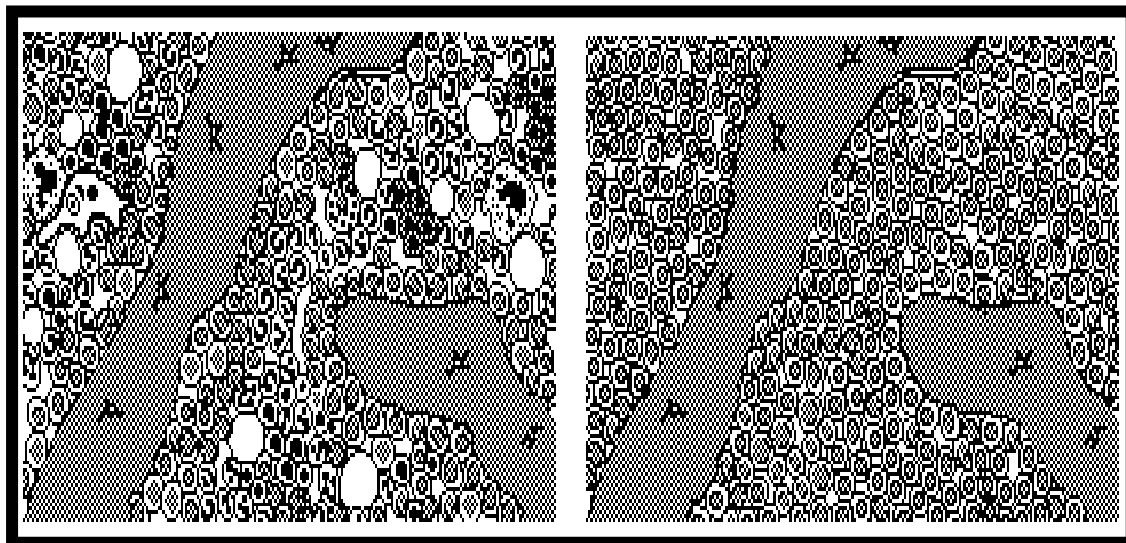
- Μυελογενείς λευχαιμίες όπου η κακοήθης εξαλλαγή λαμβάνει χώρα σε κύτταρα του μυελού των οστών (μυελοειδής σειρά) από όπου φυσιολογικά παράγονται οι πρόδρομες μορφές των ερυθρών αιμοσφαιρίων, των αιμοπεταλίων και κάποιων κατηγοριών των λευκών αιμοσφαιρίων.
- Λεμφοβλαστικές λευχαιμίες όπου ο κλώνος των κακοήθων κυττάρων προέρχεται από πρόδρομες μορφές των λεμφοκυττάρων.

Με βάση την κλινική εκδήλωση της νόσου και την ταχύτητα εξέλιξης η λευχαιμία διακρίνεται σε:

- Οξείες λευχαιμίες που προκαλούνται από την ταχεία αύξηση του κακοήθους κυτταρικού κλώνου και τη συσσώρευση των νεοπλασματικών κυττάρων στο μυελό, με συνέπεια την παρεμπόδιση της φυσιολογικής διαδικασίας παραγωγής των έμμορφων συστατικών του αίματος, και τη διασπορά των κακοήθων κυττάρων σε άλλα όργανα του σώματος εκτός αιμοποιητικού ιστού.
- Χρόνιες λευχαιμίες που χαρακτηρίζονται από τη δημιουργία ενός κλώνου νεοπλασματικών κυττάρων που διατηρούν σε κάποιο βαθμό χαρακτηριστικά των κυτταρικών σειρών προς τις οποίες προορίζονταν να διαφοροποιηθούν, που αναπτύσσονται σε βάρος των φυσιολογικών κυτταρικών σειρών του αίματος χωρίς όμως να εκτελούν τις αντίστοιχες λειτουργίες που αφορούν τη μεταφορά οξυγόνου, την άμυνα απέναντι σε παθογόνα και την πήξη του αίματος.

Πίνακας 6: Διαφορές οξείας και χρόνιας λευχαιμίας [47].

Οξεία	Χρόνια
βλάστες (άωρα κύτταρα)	ώριμα κύτταρα
ταχύς πολ/σμός κυττάρων	βραδύτερος πολ/σμός κυττάρων
ταχεία θανατηφόρος εξέλιξη νόσου (<6 μήνες χωρίς θεραπεία)	ηπιότερη εξέλιξη νόσου (2-6 χρόνια χωρίς θεραπεία)
ειδικό σύστημα ταξινόμησης	επικαλυπτόμενη ταξινόμηση

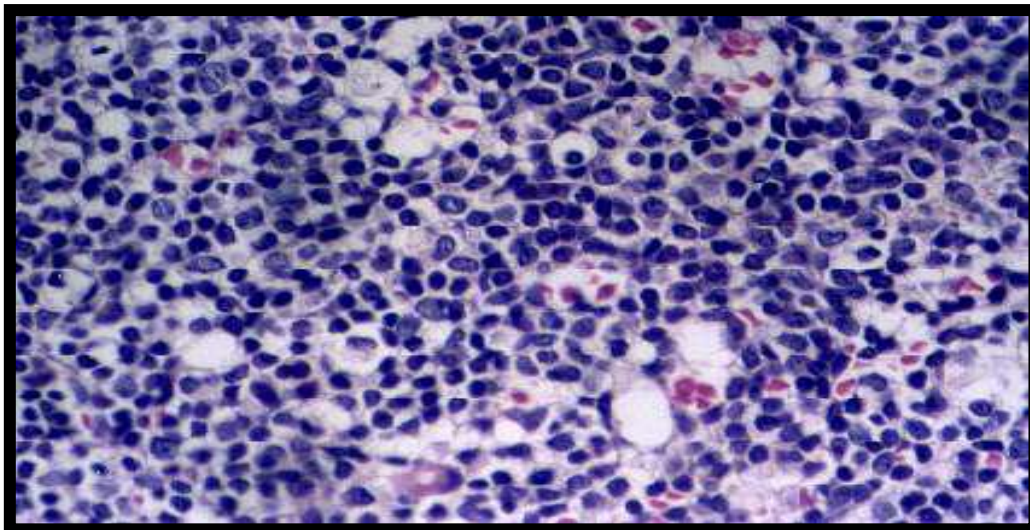


Εικόνα 10: Απεικόνιση φυσιολογικού μυελού (αριστερά) και μυελού με λευχαιμική διήθηση (δεξιά) [47].

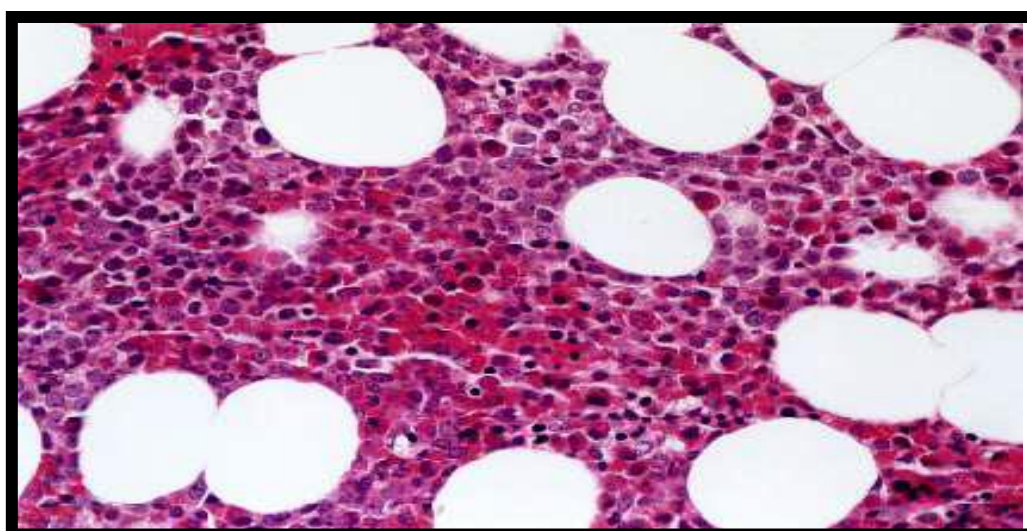
Συνεπώς διακρίνονται σε τέσσερις τύπους:

- Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία - ΟΛΛ (*Acute Lymphoblastic Leukemia - ALL*), αποτελεί το 4-10% των λευχαιμιών και προσβάλλει κυρίως παιδιά (συχνότερη εμφάνιση στην ηλικία των 4 ετών)
- Χρόνια Λεμφοβλαστική Λευχαιμία - ΧΛΛ (*Chronic Lymphoblastic Leukemia - CLL*) αποτελεί το 30% των λευχαιμιών η συχνότητα της αυξάνεται σε μεγαλύτερες ηλικίες, στην παιδική ηλικία συναντάται σπάνια.
- Χρόνια Μυελοειδής Λευχαιμία - ΧΜΛ (*Chronic Myeloid Leukemia - CML*), προσβάλλει κυρίως άτομα ηλικίας 30-50 ετών, αποτελεί το 15% των λευχαιμιών.
- Οξεία Μυελοειδής Λευχαιμία - ΟΜΛ (*Acute Myeloid Leukemia - AML*), προσβάλλει κυρίως ενήλικες, ηλικίας 15-39 ετών. Συνιστά το συχνότερο τύπο λευχαιμίας στους ενήλικες (70-80%) και μόνο το 20 % των λευχαιμιών της παιδικής ηλικίας (<15 ετών). Οι άντρες προσβάλλονται συχνότερα από τις γυναίκες. Οι επιπτώσεις της αυξάνουν με την ηλικία. Παρατηρείται αύξηση των περιστατικών οξείας μυελογενούς λευχαιμίας σε περιοχές με μεγάλη ατμοσφαιρική ρύπανση, βιομηχανικές και αστικές περιοχές. Στις εικόνες 16-17 φαίνονται δύο παραδείγματα οξείας μυελογενούς λευχαιμίας με ωρίμανση και χωρίς [48].

Οι λευχαιμίες αποτελούν το 10% περίπου των κακοήθων νεοπλασμάτων.



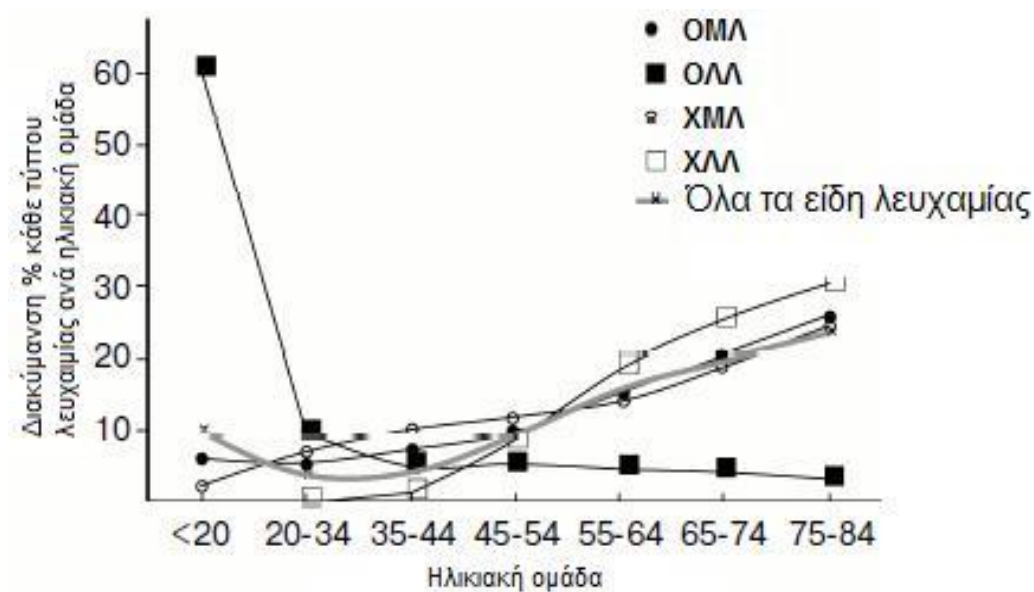
Εικόνα 11: Οξεία μυελογενής λευχαιμία χωρίς ωρίμανση. Διάχυτη προσβολή του μυελού από βλάστες (Αιματοξυλίνη-Ηωσίνη, Χ400) [47].



Εικόνα 12: Οξεία μυελογενής λευχαιμία με ωρίμανση. Διάχυτη διήθηση του μυελού από βλάστες και άωρα κοκκιοκύτταρα (Αιματοξυλίνη-Ηωσίνη, Χ200) [47].

Πίνακας 7: Σχετικές αναλογίες διαφόρων μορφών λευχαιμίας.

Οξεία	
Μυελογενής	~45%
Λεμφογενής	~10%
Χρόνια	
Μυελογενής	~15%
Λεμφογενής	~30%



Σχήμα 7: Η συχνότητα εμφάνισης των διαφόρων ειδών λευχαιμίας σε συνάρτηση με την ηλικία [49]

Άλλες μορφές λευχαιμίας και αιματολογικές ασθένειες

- Οξεία Προμυελοκυτταρική Λευχαιμία- Acute Promyelocytic Leukemia
- Τριχωτή Κυτταρική Λευχαιμία-Hairy cell leukemia (HCL)
- Ataxia Telangiectasia (AT)
- Ασθένεια Χότσκιν-Hodgkin Disease(HD)
- Ασθένεια Non-Hodgkin Λέμφωμα-Non-Hodgkin Lymphoma (NHL)
- Μυέλωμα-Myeloma (MS)
- Μυελοδυσπλασία-Myelodysplasia(MDS) [50].

5.3 Θεραπεία

Τέσσερις είναι οι θεραπείες που εφαρμόζονται, μόνες τους ή σε συνδυασμό:

- **Χημειοθεραπεία:** που είναι συνδυασμός φαρμάκων. Τα φάρμακα αυτά χορηγούνται κυρίως ενδοφλέβια δια μέσου ειδικών κεντρικών φλεβικών καθετήρων, ή σπανιότερα από το στόμα. Η χημειοθεραπεία καταστρέφει τα αιμοποιητικά κύτταρα, υγιή και καρκινικά. Σημαντικό μέρος της θεραπείας της λευχαιμίας αποτελεί η προφύλαξη του Κεντρικού Νευρικού συστήματος η οποία περιλαμβάνει την χορήγηση ειδικών φαρμάκων (ενδοραχιαία

έγχυση). Οι χημειοθεραπείες γίνονται εντός νοσοκομείου ή στο σπίτι ανάλογα με τη χημειοθεραπεία.

- **Μεταμόσχευση μυελού των οστών:** Υπάρχουν δύο είδη μεταμόσχευσης, η αλλογενής και η αυτόλογη. Η αλλογενής μεταμόσχευσή γίνεται με το μυελό κάποιου συμβατού δότη, που συνήθως είναι ένα από τα μέλη της οικογένειας, εφόσον υπάρχει συμβατότητα. Σε περιπτώσεις που πρέπει να γίνει αλλογενής μεταμόσχευση και δεν υπάρχει συμβατότητα με τα μέλη της οικογένειας, τότε αναζητείται συμβατός δότης μέσω διεθνούς τράπεζας δοτών μυελού. Η αυτόλογη μεταμόσχευση, γίνεται με τον μυελό του ίδιου του ασθενούς αφού πρώτα καθαρίσει από τους βλάστες μετά από δυνατές χημειοθεραπείες.
- **Ραδιοθεραπεία:** που συνήθως είναι ολική, αλλά όχι πάντα, γίνεται πριν τη μεταμόσχευση με σκοπό να καταστρέψει όλα τα κύτταρα, φυσιολογικά και καρκινικά για να προετοιμάσει τον οργανισμό να δεχθεί το μυελό.
- **Μεταμόσχευση περιφερικών αρχέγονων κυττάρων:** Είναι μία μέθοδος, που εφαρμόζεται τα τελευταία χρόνια με μεγάλη επιτυχία. Τα αρχέγονα κύτταρα που βρίσκονται στο μυελό, με τη χορήγηση ενός φαρμάκου βγαίνουν από το μυελό και πηγαίνουν στο περιφερικό αίμα, μέσα στο κυκλοφοριακό σύστημα. Μαζεύονται με ειδικό μηχάνημα και μεταμοσχεύονται στον ασθενή, μετά από ειδική θεραπεία. Το πλεονέκτημα που έχει η μεταμόσχευση των περιφερικών αρχέγονων κυττάρων σε σύγκριση με τη μεταμόσχευση του μυελού των οστών είναι ότι στη πρώτη ο νέος μυελός, λειτουργεί άμεσα, με αποτέλεσμα να υπάρχει γρηγορότερη ανάρρωση [51].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

6.1 Εισαγωγή

Οι βιοχημικές παράμετροι που προσδιορίστηκαν είναι: τα λευκά αιμοσφαίρια (WBCs), τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs) καθώς και το ένζυμο της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH).

6.2 Ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs)

Στα ανώτερα θηλαστικά και τον άνθρωπο η μεταφορά του οξυγόνου επιτελείται με την αιμοσφαιρίνη που κυκλοφορεί στα αγγεία μέσα σε ειδικά κύτταρα, τα ερυθροκύτταρα. Τα ερυθροκύτταρα έχουν χαρακτηριστικό σχήμα αμφίκιου δίσκου με διάμετρο 7 - 8 μm και είναι απύρνηνα. Τα μικρά αυτά κύτταρα έχουν τεράστια σημασία για τον άνθρωπο γιατί, με την αιμοσφαιρίνη που περιέχουν εξασφαλίζουν την άμεση και τέλεια πρόσληψη οξυγόνου στους πνεύμονες και την κανονική, και απόλυτα ελεγχόμενη απόδοσή του στους ιστούς [52].

Αυξημένες τιμές τους μπορεί να οφείλονται σε [53]:

- Πρωτοπαθή ερυθροκυττάρωση (μυελοϋπερπλαστική διαταραχή).
- Δευτεροπαθή ερυθροκυττάρωση που μπορεί να οφείλεται σε νεφρική νόσο, καρδιαγγειακά νοσήματα, πνευμονική νόσο, μεγάλο υψόμετρο, κάπνισμα κ.α.
- Σχετική ερυθροκυττάρωση (μείωση όγκου του πλάσματος), που μπορεί να οφείλεται σε αφυδάτωση (έμετος ή διάρροια), άγχος, κατάχρηση διουρητικών κ.α.

Μειωμένος αριθμός ερυθροκυττάρων παρατηρείται σε περιπτώσεις όπως:

- Αναιμία
- Νόσο HODGKIN και άλλα λεμφώματα
- Πολλαπλό μυέλωμα, μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα
- Λευχαιμία
- Ερυθρηματώδη λύκο
- Ρευματικό πυρετό κ.α.

6.3 Λευκά αιμοσφαίρια (WBCs)

Τα λευκά αιμοσφαίρια μεταφέρονται με το αίμα από τον μυελό των οστών στις κύριες θέσεις λειτουργίας τους, είναι εμπύρνηνα κύτταρα και βοηθούν στην προστασία του οργανισμού έναντι των λοιμώξεων. Υπάρχουν 5 τύποι λευκοκυττάρων, τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα, τα βασεόφιλα, τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα [54].

Τα φυσιολογικά επίπεδα των λευκών αιμοσφαιρίων στο αίμα είναι: 4,5-11,0 Κ μL^{-1} .

Αυξημένες τιμές τους μπορεί να οφείλονται σε [53]:

- Λοιμώξεις που προκαλούνται συνήθως από μικρόβια, ιούς, μύκητες ή παράσιτα.
- Φλεγμονές ή φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα ή οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου.
- Λευχαιμία ή μυελουπερπλαστικά σύνδρομα.
- Νεκρωτικές καταστάσεις (τραύμα, εγκαύματα ή καρδιακή προσβολή).
- Αλλεργικές αντιδράσεις (αλλεργίες, άσθμα).
- Έντονη άσκηση.
- Σωματική ή συναισθηματική καταπόνηση (stress).

Χαμηλός αριθμός λευκοκυττάρων (λευκοπενία) μπορεί να οφείλεται σε:

- Βλάβη του μυελού των οστών (πχ από τοξίνη, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, χρήση ναρκωτικών ουσιών).
- Διαταραχές κατά τις οποίες ο μυελός των οστών δεν παράγει επαρκή ποσότητα λευκών αιμοσφαιρίων (μυелоδυσπλαστικό σύνδρομο, έλλειψη βιταμίνης B12 ή φυλλικού οξέος).
- Λέμφωμα ή μεταστάσεις κάποιου καρκίνου στον μυελό των οστών.
- Αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ο ερυθηματώδης λύκος, στα οποία ο οργανισμός επιτίθεται και καταστρέφει τα δικά του λευκά αιμοσφαίρια.
- Σήψη.
- Ασθένειες του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως το AIDS, που καταστρέφουν τα T λεμφοκύτταρα.

6.4 Γαλακτική αφυδρογονάση

Η γαλακτική αφυδρογονάση, ή γαλακτική δεϋδρογενάση (Lactate Dehydrogenase - LDH) είναι ένα ενδοκυττάριο ένζυμο που καταλύει την αντιστρεπτή μετατροπή του γαλακτικού οξέος σε πυροσταφυλικό οξύ στον κύκλο της γλυκόλυσης [55].



Είναι γνωστά πέντε ισοένζυμα της LDH και αναφέρονται σαν LDH-1, LDH-2, LDH-3, LDH-4 και LDH-5.

Αυξημένα επίπεδα LDH στον ορό έχουν παρατηρηθεί σε ποικιλία παθολογικών καταστάσεων:

- Έμφραγμα του μυοκαρδίου
- Πνευμονική εμβολή
- Καρδιακή ανεπάρκεια
- Ηπατικά νοσήματα
- Δρεπανοκυτταρική αναιμία
- Κακήθες νεόπλασμα (καρκίνοι- λευχαιμίες)
- Νοσήματα σκελετικών μυών κ.α.

Μειωμένα ή μειούμενα επίπεδα LDH σχετίζονται με καλή ανταπόκριση στη θεραπεία του καρκίνου ή της λευχαιμίας [69]. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα φυσιολογικά επίπεδα LDH ορού στους 37°C[57].

Πίνακας 8: Φυσιολογικά επίπεδα LDH ορού- Κατά IFCC, μετρημένα σε θερμοκρασία 37 °C [57].

	Συγκέντρωση LDH
Γυναίκες	135-214 U L ⁻¹ (2.25-3.55 μkat L ⁻¹)
Άνδρες	135-225 U L ⁻¹ (2.25-3.75 μkat L ⁻¹)
Παιδιά (2-15 ετών)	120-300 U L ⁻¹ (2.00-5.00 μkat L ⁻¹)
Νεογνά (4-20 ημερών)	225-600 U L ⁻¹ (3.75-10.00 μkat L ⁻¹)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΗ-ΠΑΥ

7.1 Εισαγωγή

Οι περισσότερες μέθοδοι προσδιορισμού των ΟΗ-ΠΑΥ σε βιολογικά δείγματα έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση τους σε δείγμα ούρων, ώστε να γίνει συσχέτιση της ανθρώπινης έκθεσης σε ΠΑΥ [58].

7.2 Αναλυτικές τεχνικές

Οι αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού που έχουν αναπτυχθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ΟΗ-ΠΑΥ και έχει αποδειχτεί ότι παρέχουν αποτελέσματα υψηλής ευαισθησίας, πραγματοποιούνται με χρήση των ακόλουθων τεχνικών ανάλυσης:

- Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, με ανιχνευτή φθορισμού (HPLC - FLD).
- Αέρια χρωματογραφία (GC) συζευγμένη με φασματόμετρο μάζας (MS).
- Αέρια χρωματογραφία (GC) συζευγμένη με φασματόμετρο μάζας υψηλής διαχωριστικής ικανότητας ((HR)MS).
- Αέρια χρωματογραφία με συζευγμένη φασματομετρία μαζών (MS/MS).
- Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με MS/MS.

Οι παραπάνω τεχνικές μπορεί να περιλαμβάνουν στάδιο παραγωγοποίησης ή όχι. Τόσο η αέρια χρωματογραφία όσο και η υγρή χρωματογραφία, έχουν μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα που θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν για την επιλογή της τεχνικής που θα χρησιμοποιηθεί. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν τεχνικές αέριας χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό των ΟΗ-ΠΑΥ απαιτούν ένα επιπλέον στάδιο, το στάδιο της παραγωγοποίησης των αναλυτών. Αλλά, οι λόγοι που χρησιμοποιείται ευρέως η αέρια χρωματογραφία είναι η υψηλότερη ευαισθησία σε σχέση με τη υγρή χρωματογραφία και η μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα της τεχνικής, καθώς επιτυγχάνεται ικανοποιητικός διαχωρισμός των ισομερών που παράγονται ως προϊόντα μεταβολισμού. Η HPLC-FLD είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρύτατα για τον προσδιορισμό ΟΗ-ΠΑΥ σε δείγματα ούρων κυρίως, ενώ το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της είναι η υψηλή ευαισθησία του ανιχνευτή φθορισμού που

επιτυγχάνεται λόγω της φύσης του αναλύτη (αποτελείται από αρωματικούς δακτυλίους). Τα μειονεκτήματα της LC έναντι της GC είναι η χαμηλή διαχωριστική ικανότητα και χαμηλή ευαισθησία της [42].

7.3 Παραγωγοποίηση στην αέρια χρωματογραφία

Τα υδρόξυ-παράγωγα συμπεριλαμβάνουν στη δομή τους το -OH που είναι πολική ομάδα, παρεμποδίζοντας την ομαλή χρωματογραφική συμπεριφορά τους σε μεθόδους αέριας χρωματογραφίας· δηλαδή κατακρατούνται στη στήλη με αποτέλεσμα να δημιουργούνται προβλήματα επαναληψιμότητας. Για τον σκοπό αυτό, εφαρμόζεται η τεχνική της παραγωγοποίησης (derivatization), σύμφωνα με την οποία το προσδιοριζόμενο μόριο μετασχηματίζεται με την βοήθεια κατάλληλου αντιδραστηρίου σε περισσότερο πτητικό παράγωγο με βελτιωμένες χρωματογραφικές ιδιότητες. Στην αέρια χρωματογραφία η παραγωγοποίηση χημικών ενώσεων για την ανάλυση τους με GC/MS είναι η αλκυλίωση, η ακυλίωση και η σιλιλίωση ή σιλανοποίηση.

Στην **αλκυλίωση** λαμβάνει χώρα η αντικατάσταση ενός ενεργού υδρογόνου από μια αλειφατική ομάδα ή από μια αλειφατική - αρωματική (π.χ. βενζύλιο) ομάδα.

Τα παράγωγα της **σιλανοποίησης** είναι ίσως τα πιο ευρέως γνωστά παράγωγα για GC/MS εφαρμογές και σχηματίζονται με την αντικατάσταση των δραστικών υδρογόνων των οξέων, αλκοολών, θειολών, αμίνων αμιδίων, ενολικών κετονών και αλδεϋδών με τριμεθυλοσιλιλο- (TMS-) ομάδες. Τα αντιδραστήρια για την σιλανοποίηση των ενώσεων, καθώς και τα τριμεθυλοσιλιλο- (TMS-) παράγωγα, υδrolύονται πολύ εύκολα και συνεπώς θα πρέπει να προστατεύονται από την υγρασία. Τα τριμεθυλοσιλιλο- (TMS-) παράγωγα παρουσιάζουν θερμική και χημική σταθερότητα, αλλά υψηλή πτητικότητα, χαρακτηριστικά που συμβάλουν στην εξαιρετική χρωματογραφική συμπεριφορά τους. Επιπλέον, τα εν λόγω αντιδραστήρια δεν πρέπει να εγχέονται σε τριχοειδή στήλη, στην οποία η στατική φάση περιέχει δραστικά υδρογόνα ως χαρακτηριστικές ομάδες, γιατί έχουν την ικανότητα να παραγωγοποιούν σχεδόν όλα τα δραστικά υδρογόνα. Τα TMS- αμίδια, όπως το N- μεθυλο-N-τριμεθυλοσιλυλο-τριφθορο ακεταμίδιο (MSTFA) και το N,O, δις

(τριμεθυλοσιλυλο) ακεταμίδιο (BSTFA) αποτελούν τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια σιλιανοποίησης.

Ακυλίωση είναι ο μετασχηματισμός των χημικών ενώσεων που περιέχουν δραστικά υδρογόνα (π.χ. -OH, -SH και -NH) σε εστέρες, θειοεστέρες και αμίδια, αντίστοιχα. Μια σημαντική εφαρμογή είναι η εισαγωγή μιας υπερφθοροακυλοομάδας σε ένα μόριο μιας ουσίας, για να βελτιώσει την ανίχνευση της από τον ανιχνευτή δέσμευσης ηλεκτρονίων (Electron Capture Detector) [59].

Τα μονουδρόξυ παράγωγα των ΠΑΥ έχουν αναλυθεί αποτελεσματικά με GC-MS σε EI μετά από παραγωγοποίηση με N₂O, δις (τριμεθυλοσιλυλο) ακεταμίδιο (BSTFA) ή με πενταφθοροβενζυλίωση με PFBBr [60,61,62].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

8.1 Εισαγωγή

Στο κεφάλαιο αυτό θα γίνει αναφορά στις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της LDH, των ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων και των υδροξυ πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων.

8.2 Αιμοληψία

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε από ειδικευμένο προσωπικό στο ΤΜΗΜΑ ΑΙΜΟΛΗΨΙΩΝ του ΓΝΑ ΛΑΪΚΟ, στους νοσηλευόμενους ασθενείς στην ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ του νοσοκομείου.

Η διαδικασία συλλογής των δειγμάτων ξεκίνησε στις 4-8-2016 και ολοκληρώθηκε στις 23-11-2016.

Για την αιμοληψία χρησιμοποιήθηκαν σύριγγες των 10 ή 20 mL. Το ολικό αίμα μοιράστηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες:

- των 7ml (SARSTEDT) για τον προσδιορισμό της LDH και των υπόλοιπων βιοχημικών δεικτών στο βιοχημικό εργαστήριο.
- των 4ml (VACUTEST) με αντιπηκτικό EDTA, για τον προσδιορισμό των ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων στο αιματολογικό εργαστήριο.

Στη συνέχεια ακολούθησε η συμπλήρωση ερωτηματολογίων από τους ασθενείς για τη συλλογή των απαραίτητων δημογραφικών στοιχείων. Συνοπτικά, τα στοιχεία αυτά παρουσιάζονται σε πίνακες στο κεφάλαιο 9.

8.3 Επεξεργασία δειγμάτων

Στο βιοχημικό εργαστήριο τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν, 30 min μετά τη λήψη, για 10 min στις 4500 στροφές min^{-1} , για τον διαχωρισμό του ορού από τα έμμορφα συστατικά. Κατόπιν ακολούθησε η ανάλυση του ορού σε αυτόματο βιοχημικό αναλυτή. Στο αιματολογικό εργαστήριο η ανάλυση έγινε άμεσα σε αυτόματο αιματολογικό αναλυτή, χωρίς προκατεργασία.

8.4 Συντήρηση Δειγμάτων

Μετά τη διαδικασία της ανάλυσης τα δείγματα συντηρήθηκαν σε καταψύκτη βαθιάς κατάψυξης στους $-67\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 15-20 ημέρες, πριν τη μεταφορά τους στο

εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ, για την ανάλυση των υδρόξυ πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων.

8.5 Προσδιορισμός LDH ορού αίματος.

Το ένζυμο γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) εμφανίζεται σε μεγάλη ποικιλία ιστών και κυρίως στην καρδιά, στο ήπαρ, στους μύες και στους νεφρούς. Η LDH του ορού μπορεί να διαχωριστεί σε πέντε διαφορετικά ισοένζυμα, με βάση την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα. Κάθε ισοένζυμο είναι ένα τετραμερές που αποτελείται από δύο διαφορετικές υπομονάδες. Αυτές οι δύο υπομονάδες έχουν χαρακτηριστεί ως «υπομονάδα καρδιάς» και «υπομονάδα μυών», με βάση τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες τους. Η μέτρηση της LDH ορού έγινε σε αυτόματο αναλυτή cobas 8000 (υπομονάδα c 701) της εταιρείας ROCHE DIAGNOSTICS.

8.6 Προσδιορισμός λευκών αιμοσφαιρίων(WBCs) και ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs)

Η μέτρηση των λευκών και ερυθρών αιμοσφαιρίων έγινε σε αυτόματο αναλυτή XE-5000 της εταιρείας SYSMEX CORPORATION.

8.6.1 Αρχές μεθόδου προσδιορισμού

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση αίματος σύμφωνα με τη μέθοδο ανίχνευσης RF/DC, τη μέθοδο Hydro Dynamic Focusing (Υδροδυναμική εστίαση), τη μέθοδο κυτταρομετρίας ροής (με χρήση laser ημιαγωγού) και με τη μέθοδο αιμοσφαιρίνης SLS.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ RF/DC

Ανιχνεύει το μέγεθος των κυττάρων αίματος από μεταβολές στην αντίσταση συνεχούς ρεύματος και την πυκνότητα του εσωτερικού των κυττάρων από μεταβολές στην αντίσταση ραδιοσυχνοτήτων.

ΥΔΡΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ (ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ DC)

Βελτιώνει την ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μέτρησης, επειδή τα κύτταρα του αίματος διέρχονται γραμμικά μέσω της οπής. Επίσης αποτρέπεται η παραγωγή πλασματικών παλμών (παρεμβολές). Επίσης η μέθοδος βελτιώνει την ακρίβεια και την επαναληψιμότητα της μέτρησης, ελαχιστοποιώντας το σφάλμα σύμπτωσης.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ LASER ΗΜΙΑΓΩΓΟΥ

Χρησιμοποιείται για την ανάλυση των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών των κυττάρων και άλλων βιολογικών σωματιδίων, καθώς αυτά διέρχονται διαμέσου υπερβολικά στενών και ευαίσθητων ζωνών ανίχνευσης.

Η μέθοδος κυτταρομετρίας ροής φθορισμού χρησιμοποιεί την εκπομπή φωτός από χρωματισμένες πρωτεΐνες (RNA & DNA), προκειμένου να διαχωρίσει τους πληθυσμούς κυττάρων μέσω προγράμματος ανάλυσης νεφελογραμμάτων.

8.7 Προσδιορισμός Υδροξυ παραγώγων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων.

8.7.1 Γενικά

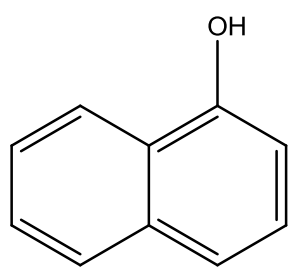
Η μέθοδος χωρίζεται στις: α) δειγματοληψία και β) ανάλυση στο εργαστήριο.

Οι μελετώμενες ενώσεις εκχυλίζονται χρησιμοποιώντας κάποιον οργανικό διαλύτη. Το οργανικό εκχύλισμα καθαρίζεται μέσω στήλης χρωματογραφίας και στη συνέχεια συμπυκνώνεται.

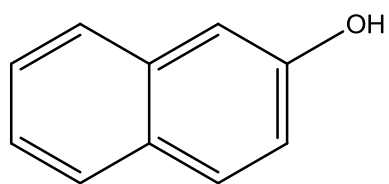
Το τελικό δείγμα εγχέεται στον αεριοχρωματογράφο συζευγμένο με φασματόμετρο μαζών (GC/MS), οπότε οι ΟΗ-ΠΑΥ ανιχνεύονται μέσω φασματομέτρου μάζας και ο ιοντισμός των ενώσεων αυτών γίνεται με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electron Impact, EI). Οι αναλύτες ταυτοποιούνται μέσω των χρόνων ανάσχεσης και των κυρίων ιόντων τους και ποσοτικοποιούνται μέσω των εμβαδών τους. Στον Πίνακα 9 παρουσιάζονται οι ενώσεις που μελετήθηκαν και στην Εικόνα 13 ο συντακτικός τους τύπος.

Πίνακας 9: Οι μελετώμενοι ΟΗ- ΠΑΥ και τα κύρια ιόντα.

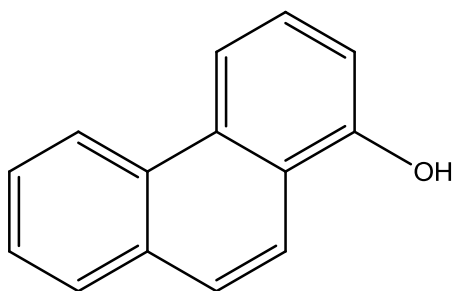
Α/Α	ΟΗ-ΠΑΥ	Συντ.	Κύρια Ιόντα
1	1-Ναφθόλη	1-Napthol	185,0-201,1- 216,1
2	2-Ναφθόλη	2-Napthol	185,0-201,1- 216,1
3	1-υδρόξυ Φαιναθρένιο	1-OH-Phe	235,0- 251,1- 266,1
4	2-υδρόξυ Φαιναθρένιο	2-OH-Phe	235,0- 251,1- 266,1
5	3-υδρόξυ Φαιναθρένιο	3-OH-Phe	235,0- 251,1- 266,1
6	9-υδρόξυ Φαιναθρένιο	9-OH-Phe	235,0- 251,1- 266,1
7	1-υδρόξυ Πυρένιο	1-OH-Pyr	275,1- 290,1- 291,1



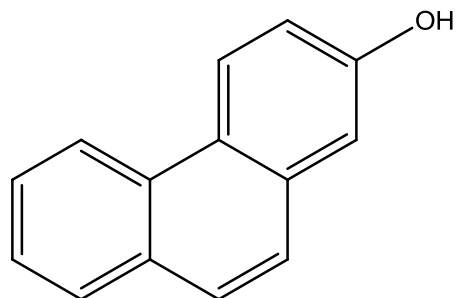
1-Naphthol



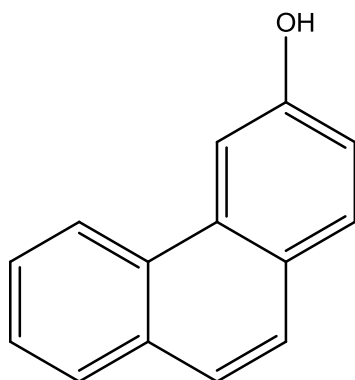
2-Naphthol



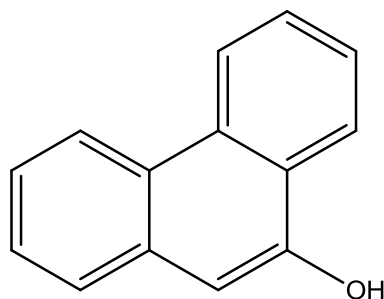
1-Hydroxyphenanthrene



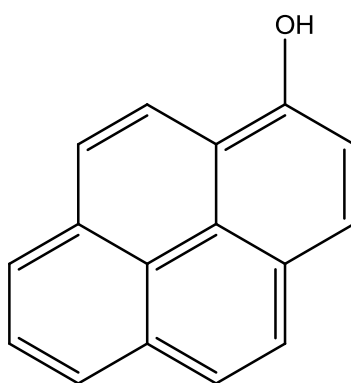
2-Hydroxyphenanthrene



3-Hydroxyphenanthrene



9-Hydroxyphenanthrene



1-hydroxypyrene

Εικόνα 13: Ο συντακτικός τύπος των μελετώμενων ΟΗ-ΠΑΥ.

8.7.2 Οργανολογία

Κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα όργανα και εξοπλισμός:

Για την κατεργασία και ανάλυση των δειγμάτων:

- Ποτήρια ζέσεως των 100mL (Glass A).
- Λουτρό υπερήχων (Elma, Ultrasonic LC 130 H, 35 kHz).
- Εργαστηριακός Ζυγός (κλειστός) τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. (Galaxy, Ohaus). Ο ζυγός διακριβώνεται ετήσια με πρότυπα βάρη στην περιοχή ζύγισης 110g-0.1mg.
- Περιστροφικός εξατμιστήρας (Buchi).
- Αναλυτικός εξατμιστήρας με έξι ακροφύσια και ρυθμιστή της ροής αζώτου (Supelco).
- Στήλες καθαρισμού μήκους 20 cm, εσωτερικής διαμέτρου 7 mm και υποδοχέα χωρητικότητας 50 mL (Supelco).
- Υάλινα φιαλίδια με septa και βιδωτό πώμα των 1,8 mL (Agilent) κατάλληλο για τον αυτόματο δειγματολήπτη του χρωματογραφικού συστήματος.
- Υάλινα φιαλίδια με καπάκι των 15 mL (Supelco).
- Υάλινες σύριγγες των 10, 100 και 500 μ L (Hamilton).
- Πυριαντήριο για την ενεργοποίηση του υλικού πλήρωσης (silica gel) των χρωματογραφικών στηλών (Mettler, Germany) και παραγωγοποίηση των δειγμάτων.
- Αεροχρωματογραφικό σύστημα της Agilent 6890N GC με τριχοειδή στήλη HP-5, 30 μέτρων, συζευγμένο με φασματόμετρο μάζας GC/MSD σειράς 5975B με πηγή ιοντισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (Electron Ionization mode, EI) για τον προσδιορισμό των ΟΗ-ΠΑΥ. Διαθέτει και αυτόματο δειγματολήπτη με 8 θέσεις δειγμάτων της Agilent 7683B.
- Πιπέτες 5 mL και 1 mL (Eppendorf).
- Φιαλίδια των 15 mL (Falcon).
- Φυγοκεντρικοί σωλήνες με πάτο (Starsted).
- Ψαλίδι.
- Σπάτουλα.
- Λαβίδα.

8.7.3 Αντιδραστήρια

Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν :

- Πρότυπο διάλυμα 7 υδρόξυ πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων συγκέντρωσης 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Supelco).
- BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, για GC παραγωγοποίηση 99,0% (Fluka).

Διαλύτες:

- Ακετόνη, αναλυτικής καθαρότητας $\geq 99,5\%$ (G.T. Baker).
- Διχλωρομεθάνιο, καθαρότητας GC $\geq 99,8\%$ (Carlo Erba Reagents).
- Εξάνιο, καθαρότητας GC $\geq 99\%$ (Macron Fine Chemicals).
- Μεθανόλη, καθαρότητας HPLC (Macron Fine Chemicals).

Προσροφητικά – Πληρωτικά υλικά:

- Οξειδίο του πυριτίου (SiO_2) (silica gel 60) (Sigma Aldrich).
- Άνυδρο θειικό νάτριο, καθαρότητας $> 99,5\%$ (Panreac).
- Υαλοβάμβακας, (Supelco).

8.7.4 Αρχή της Μεθόδου

Τα δείγματα ορού (1 mL) εισάγονται σε φιαλίδια των 30 mL, προστίθενται 10 μL μίγματος εσωτερικού προτύπου (φαινανθρένιο-d10 και περυλένιο-d12) και εκχυλίζονται τρεις φορές σε λουτρό υπερήχων με 10 mL διχλωρομεθάνιο κάθε φορά. Το εκχύλισμα μεταφέρεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα, συμπυκνώνεται έως 4 mL, γίνεται αλλαγή διαλύτη σε εξάνιο και ακολουθεί τελική συμπύκνωση περίπου στα 2 - 3 mL.

Μετά τη συμπύκνωση ακολουθεί ο καθαρισμός του δείγματος μέσω της χρωματογραφικής στήλης, η οποία είναι πακεταρισμένη με 1g ενεργοποιημένου οξειδίου του πυριτίου και 1g άνυδρου θειικού νατρίου. Πριν τη χρήση, το οξειδίο του πυριτίου ξηραίνεται σε φούρνο στους 180 °C για 24 h.

Αρχικά, ενεργοποιείται η στήλη με την προσθήκη 10 mL εξανίου. Το έκλουσμα αυτό απορρίπτεται. Όταν η επιφάνεια του εξανίου προσεγγίζει την επιφάνεια του θειικού νατρίου τότε εισάγεται στη στήλη το δείγμα. Η σειρά έκλουσης έχει ως εξής: αρχικά διέρχονται από τη στήλη 10 mL εξανίου και 10 mL μίγματος

διχλωμεθανίου – εξανίου (60:40), τα έκλουσματα που παραλαμβάνονται χρησιμοποιηθήκαν για την ανάλυση άλλων προσδιοριζόμενων οργανικών ρύπων. Κατόπιν διαβιβάζονται 30 mL μεθανόλης και το έκλουσμα μεταφέρεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα, συμπυκνώνεται έως 2 - 3 mL και στη συνέχεια αυτό συμπυκνώνεται με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού. Στο δείγμα προστίθεται 250 µL BSTFA και θερμαίνεται στο πυριαντήριο σε θερμοκρασία 70 °C για 3 ώρες. Μετά την παραγωγοποίηση το δείγμα είναι έτοιμο για αεριοχρωματογραφικό προσδιορισμό.

8.7.4.1 Σχολιασμός πορείας κατεργασίας

Η εκχύλιση των ΠΑΥ γίνεται με λουτρό υπερήχων αντί της συσκευής Soxhlet, διότι η μέθοδος αυτή μειώνει κατά πολύ τη χρονική διάρκεια εκχύλισης και συνάμα δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Επιπλέον η συμπύκνωση λαμβάνει χώρα με σκοπό την αύξηση της προσυγκέντρωσης λόγω χαμηλών συγκεντρώσεων στα δείγματα.

Στη συνέχεια το οξείδιο του πυριτίου (silica) χρησιμοποιείται ως προσροφητικό υλικό ενώ το άνυδρο θειικό νάτριο για την απορρόφηση της υγρασίας.

Γενικά, κατά τη διάρκεια όλης της προκατεργασίας του δείγματος, καλό είναι να αποφεύγεται όσο γίνεται, η έκθεση των ΠΑΥ στο φως. Έτσι κάθε φορά που χρησιμοποιείται κάποια συσκευή ή κάποιο φιαλίδιο πρέπει να αποκλείεται το φως με φύλλα αλουμινίου.

Με την πορεία αυτή της κατεργασίας των δειγμάτων επιτυγχάνουμε την απομόνωση των ΠΑΥ.

Το μεθανολικό κλάσμα των δειγμάτων παραγωγοποιείται με BSTFA για να μετατραπούν οι πολικοί ΟΗ-ΠΑΥ σε λιγότερο πολικές ενώσεις, με αυτό το τρόπο επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός των ενώσεων και προστασία της χρωματογραφικής στήλης.

Η θερμοκρασία που επιτυγχάνεται η παραγωγοποίηση των ΟΗ-ΠΑΥ πρέπει να είναι σταθερή στους 70 °C.

8.7.4.2 Αεριοχρωματογραφική Ανάλυση.

Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με το αεριοχρωματογραφικό σύστημα 6890N της Agilent. Η χρωματογραφική στήλη είναι HP-5MS [(5%-

Phenyl)-methylpolysiloxane], μη πολική, ενώ ο προσδιορισμός των υδρόξυ πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων έγινε με φασματόμετρο μαζών 5975B της ίδιας εταιρείας. Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται οι συνθήκες λειτουργίας του αεριοχρωματογραφικού συστήματος καθώς και του φασματομέτρου μάζας για τον προσδιορισμό των ΟΗ- ΠΑΥ.

Πίνακας 10: Συνθήκες λειτουργίας αεριοχρωματογραφικού συστήματος για τον προσδιορισμό των ΟΗ- ΠΑΥ.

Χρωματογραφική στήλη:	HP-5MS
Θερμοκρασία εισαγωγέα:	280 °C
Θερμοκρασιακό πρόγραμμα:	Αρχική θερμοκρασία: 65°C για 1,00 min , Ramp 15 °C/min
	Τελική θερμοκρασία: 320 °C για 3,00 min
Φέρον αέριο:	Ήλιο, με ροή 1,8 ml/min
Όγκος δείγματος που ενίεται:	1,0 μl
Ανιχνευτής:	Φασματόμετρο Μάζας
Πηγή ιοντισμού:	EI (Electron Ionization)
Θερμοκρασία πηγής ιοντισμού MS:	230 °C

Συγκεκριμένα για τον προσδιορισμό των ΟΗ-ΠΑΥ χρησιμοποιείται αεριοχρωματογραφικό σύστημα συζευγμένο με φασματόμετρο μαζών, όπου ο ιοντισμός των διαχωριζόμενων ενώσεων γίνεται με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (EI, Electron Impact ionization).

8.7.5 Διασφάλιση ποιότητας χημικών δοκιμών

8.7.5.1 Γενικά

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι μετρήσεις μιας φυσικής ή χημικής ποσότητας υπόκεινται σε σφάλματα, τα οποία προσδίδουν στο αποτέλεσμα μια αβεβαιότητα. Αυτή η αβεβαιότητα μπορεί να εκτιμηθεί, να ελαχιστοποιηθεί, αλλά ποτέ δεν μπορεί να αρθεί. Συνεπώς για τη διασφάλιση της ποιότητας και την αξιολόγηση της ακολουθούμενης αναλυτικής μεθόδου, απαιτείται η διεξαγωγή σχετικών πειραμάτων.

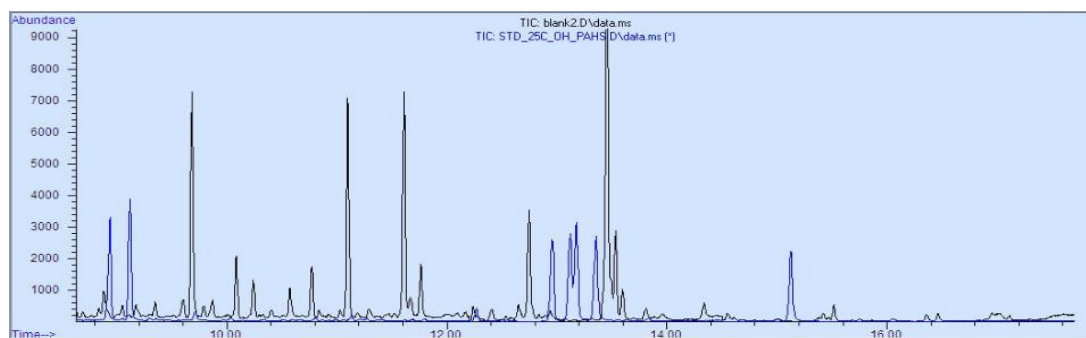
Η διασφάλιση της ποιότητας των χημικών μετρήσεων αφορά τη διασφάλιση ποιότητας όλων των σταδίων της πορείας προσδιορισμού.

Τα χαρακτηριστικά που θα εξεταστούν και θα παρουσιαστούν στη συνέχεια του κεφαλαίου είναι τα εξής:

- η ειδικότητα
- η γραμμικότητα
- η ακρίβεια
- η πιστότητα (επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα)
- το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των ΠΑΥ με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο

8.7.5.2 Ειδικότητα και Γραμμικότητα

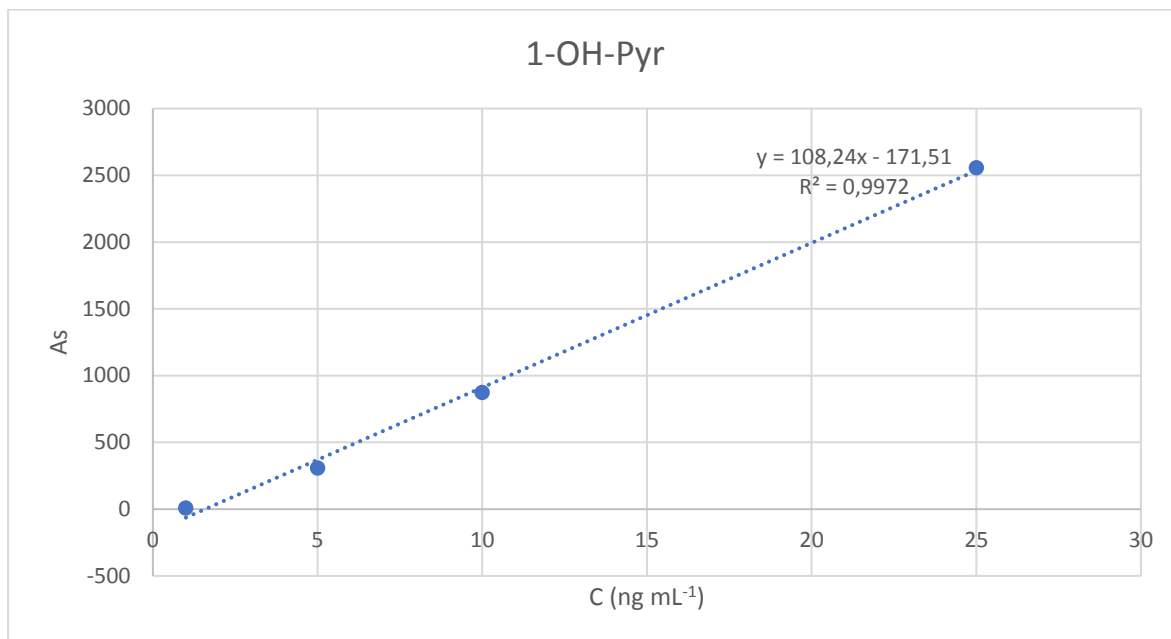
Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές για πιθανές παρεμποδίσεις κατά τον προσδιορισμό των 7 ΟΗ-ΠΑΥ. Ακόμη, το χρωματογράφημα του λευκού δείγματος (blank sample)(Εικόνα 14), έδειξε ότι η μήτρα δεν προκαλεί παρεμποδίσεις στους αναλύτες. Έτσι κρίνεται ικανοποιητική η ειδικότητα της μεθόδου.



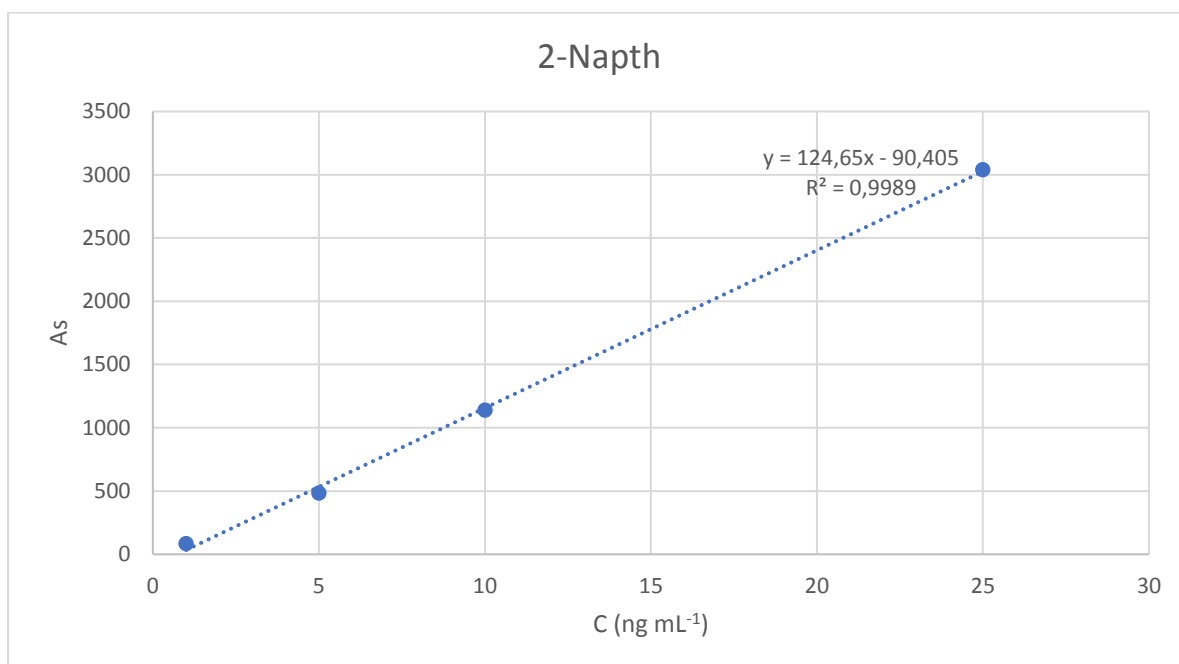
Εικόνα 14: Το χρωματογράφημα λευκού δείγματος σε υπέρθεση με το χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος

Η αναλυτική μέθοδος πρέπει να είναι γραμμική σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων που εφαρμόζεται. Ο προσδιορισμός της καμπύλης αναφοράς για καθέναν από τους 7 ΟΗ-ΠΑΥ πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 1, 5, 10, 25 ng mL⁻¹. Τα πρότυπα διαλύματα είχαν όλα υποστεί παραγωγοποίηση, δηλαδή είχε προστεθεί BSTFA και είχαν παραμείνει στο πυριαντήριο στους 70°C για τρεις ώρες. Μετά το στάδιο της παραγωγοποίησης τα πρότυπα διαλύματα εισάγονται στον αέριο χρωματογράφο. Για κάθε πρότυπο διάλυμα του μίγματος των ενώσεων ελήφθησαν τρία (3) χρωματογραφήματα. Οι καμπύλες αναφοράς των ΟΗ - ΠΑΥ κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο εξωτερικού προτύπου. Από τα

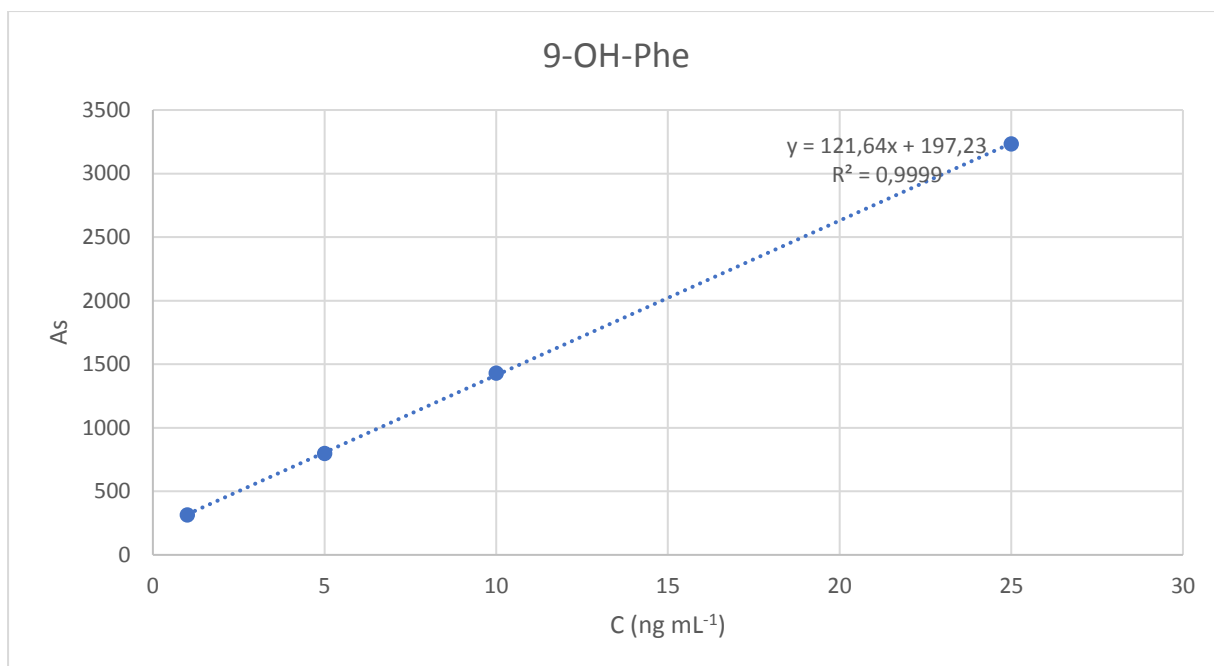
αποτελέσματα προκύπτει πως όλες οι εξισώσεις των καμπύλων βαθμονόμησης, έχουν συντελεστές συσχέτισης (r) πολύ κοντά στο 1. Αυτό υποδηλώνει την πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ της κάθε μετρούμενης παραμέτρου και της συγκέντρωσης του κάθε αναλύτη των ΠΑΥ στο πρότυπο διάλυμα. Στη συνέχεια, στα σχήματα 8,9,10 παρουσιάζονται ενδεικτικά οι καμπύλες αναφοράς για τη 2-Ναφθόλη, 9-υδρόξυ-φαιναθρένιο, 1-υδρόξυ-πυρένιο.



Σχήμα 8: Καμπύλη αναφοράς για το 1-υδρόξυ-πυρένιο.



Σχήμα 9: Καμπύλη αναφοράς για τη 2-Ναφθόλη.



Σχήμα 10: Καμπύλη αναφοράς για το 9-υδροξυ-φαιναθρένιο.

Όπως φαίνεται στα σχήματα παραπάνω οι καμπύλες αναφοράς έχουν συντελεστές συσχέτισης (r) πολύ κοντά στο 1 άρα η γραμμικότητα κρίνεται ικανοποιητική.

8.7.5.3 Επαναληψιμότητα των χρόνων ανάσχεσης των ΟΗ-ΠΑΥ

Για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα των χρόνων ανάσχεσης χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 25 ng mL^{-1} των 7 ΟΗ-ΠΑΥ. Τα πειράματα έγιναν σε μία μέρα (11/7/2018). Η μέση τιμή των χρόνων ανάσχεσης, οι τυπική απόκλιση και η σχετική τυπική απόκλιση φαίνονται στον Πίνακα 11. Είναι εμφανές οι χρόνοι ανάσχεσης παραμένουν σταθεροί.

Πίνακας 11: Μέση τιμή των χρόνων ανάσχεσης (t_R), τυπική απόκλιση (SD) και σχετική τυπική απόκλιση (RSD%) του πρότυπου διαλύματος ΟΗ-ΠΑΥ συγκέντρωσης 25 ng mL^{-1} κατά τη διάρκεια μιας ημέρας (11/7/2018) (N=6).

	Μέση τιμή χρόνων ανάσχεσης, t_R	SD	RSD%
1NAPTHOL	8,937	$8,94 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-2}$
2NAPTHOL	9,117	$1,41 \times 10^{-3}$	$1,55 \times 10^{-2}$
1-OHPHE	12,959	$1,41 \times 10^{-3}$	$1,09 \times 10^{-2}$
2-OHPHE	13,118	$1,41 \times 10^{-3}$	$1,08 \times 10^{-2}$
3-OHPHE	13,174	$1,90 \times 10^{-3}$	$1,44 \times 10^{-2}$
9-OHPHE	13,355	$2,28 \times 10^{-3}$	$1,71 \times 10^{-2}$
1-OHPYR	15,128	$1,79 \times 10^{-3}$	$1,18 \times 10^{-2}$

8.7.5.4 Αναπαραγωγιμότητα των χρόνων ανάσχεσης των ΟΗ-ΠΑΥ

Για τον έλεγχο της αναπαραγωγιμότητας των χρόνων ανάσχεσης χρησιμοποιήθηκαν συνολικά έξι (6) πρότυπα διαλύματα στις ίδιες συγκεντρώσεις. Αναλύθηκαν τρία (3) δείγματα την πρώτη μέρα και τρία (3) δείγματα την δεύτερη μέρα. Εξετάζοντας με αυτόν τον τρόπο την διακύμανση των χρόνων ανάσχεσης σε διαφορετικό χρονικό διάστημα. Στον Πίνακα 12 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα.

Πίνακας 12: Μέση τιμή των χρόνων ανάσχεσης (t_R), τυπική απόκλιση (SD) και σχετική τυπική απόκλιση (RSD%) του πρότυπου διαλύματος ΟΗ-ΠΑΥ συγκέντρωσης σε χρονικό διάστημα δύο ημερών (11/7/2018 και 23/7/2018) (N=6).

	Μέση τιμή χρόνων ανάσχεσης, t_R	SD	RSD%
1NAPTHOL	8,938	$2,28 \times 10^{-3}$	$2,55 \times 10^{-2}$
2NAPTHOL	9,118	$1,41 \times 10^{-3}$	$1,55 \times 10^{-2}$
1-OHPHE	12,959	$2,61 \times 10^{-3}$	$2,01 \times 10^{-2}$
2-OHPHE	13,117	$2,83 \times 10^{-3}$	$2,16 \times 10^{-2}$
3-OHPHE	13,174	$3,52 \times 10^{-3}$	$2,67 \times 10^{-2}$
9-OHPHE	13,354	$4,05 \times 10^{-3}$	$3,03 \times 10^{-2}$
1-OHPYR	15,128	$2,90 \times 10^{-3}$	$1,92 \times 10^{-2}$

8.7.5.5 Όρια Ανίχνευσης και Ποσοτικοποίησης

Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου, υπολογίστηκαν από την εξαπλή ανάλυση λευκών δειγμάτων, δηλαδή μη ασθενών από περιοχές με χαμηλό υπόβαθρο ρύπανσης. Από την συγκεντρώσεις που υπολογίστηκαν από την καμπύλη αναφοράς υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση των τριών τιμών για κάθε ένωση. Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε πολλαπλασιάζοντας την τυπική απόκλιση με 3,3 και το όριο ποσοτικοποίησης υπολογίστηκε πολλαπλασιάζοντας το επί 10. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 13.

Πίνακας 13: Όριο ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) για τους επτά υπό προσδιορισμό ΟΗ-ΠΑΥ.

LOD-LOQ μεθόδου (ng mL ⁻¹)		
ΕΝΩΣΗ	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)
1NAPTHOL	0,07	0,21
2NAPTHOL	0,05	0,16
1-OHPHE	0,07	0,21
2-OHPHE	0,04	0,13
3-OHPHE	0,10	0,29
9-OHPHE	0,04	0,13
1-OHPYR	0,06	0,19

8.7.5.6 Σχολιασμός μεθόδου

Τα συμπεράσματα που εξάγονται κατά την επικύρωση της μεθόδου προσδιορισμού των ΟΗ-ΠΑΥ, δηλαδή για τον έλεγχο της γραμμικότητας, της ειδικότητας και πιστότητας, την εύρεση των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης είναι:

- α. Κατά τον έλεγχο της πιστότητας παρατηρήθηκε ότι η επαναληψιμότητα καθώς η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου σε συγκέντρωση 25 ng mL⁻¹ είναι μέσα στα επιτρεπόμενα όρια (RSD = ± 15%).
- β. Κατά τον έλεγχο της γραμμικότητας διαπιστώθηκε ότι υπάρχει πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ της κάθε μετρούμενης παραμέτρου και της συγκέντρωσης του κάθε αναλύτη των ΠΑΥ στο πρότυπο διάλυμα και αυτό είναι εμφανές από τον συντελεστή συσχέτισης, διότι είναι πολύ κοντά στο 1. Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι οι καμπύλες αναφοράς διέρχονται από την αρχή των αξόνων. Συνεπώς, δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα.
- γ. Κατά τον έλεγχο της ειδικότητας αναλύθηκε λευκό δείγμα και διαπιστώθηκε ότι η μήτρα δεν προκαλεί παρεμποδίσσεις στην ανάλυση των ΟΗ-ΠΑΥ.
- δ. Βρέθηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.

Η μέθοδος κρίνεται κατάλληλη για τον προσδιορισμό των ΟΗ-ΠΑΥ που προσδιορίστηκαν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

9.1 Γενικά

Η μέθοδος προσδιορισμού των ΟΗ-ΠΑΥ, ΠΑΥ αλλά και των βιοχημικών παραμέτρων σε αίμα τόσο ασθενών όσο και υγιών ατόμων εφαρμόσθηκε συνολικά σε 94 δείγματα. Από αυτά τα 45 αφορούσαν δείγματα υγιών αιμοδοτών ενώ τα 49 ήταν δείγματα ατόμων που έπασχαν από οξεία λευχαιμία.

Για να εξεταστεί αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων κάθε αναλύτη για ασθενείς και υγιείς δότες, χρησιμοποιήθηκε η στατιστική δοκιμή t test. Η συγκεκριμένη δοκιμή χρησιμοποιήθηκε αφού ελέγχθηκε με F test αν οι διακυμάνσεις των εξεταζόμενων συνόλων διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους (για στάθμη εμπιστοσύνης 95%). Οι τιμές p -value που βρέθηκαν κάτω από 0,05 υποδεικνύουν πως υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων, (απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση, H_0). Αντίθετα στις περιπτώσεις που το p -value βρέθηκε μεγαλύτερο του 0,05 δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά (απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση, H_0).

Ο σχολιασμός κάθε διαγράμματος βασίστηκε σε αντίστοιχα $test$ που έγιναν για όλες τις κατηγοριοποιήσεις.

9.2 Σύγκριση των αποτελεσμάτων ΟΗ-ΠΑΥ σε δείγματα ασθενών και υγιών

Τα συνολικά αποτελέσματα για των ΟΗ-ΠΑΥ των δειγμάτων ασθενών με οξεία λευχαιμία και υγιών ατόμων παρατίθενται στους Πίνακες 14 και 15:

Πίνακας 14: Μέση, μέγιστη και ελάχιστη των συγκεντρώσεων των ΟΗ-ΠΑΥ καθώς και το άθροισμα τους, σε δείγματα ασθενών με οξεία λευχαιμία.

Ασθενείς (n=49)			
ΟΗ-ΠΑΥ	Μέση τιμή, $\bar{x}$, ng mL⁻¹	X_{max}, ng mL⁻¹	X_{mean}, ng mL⁻¹
1NARTHOL	0,03	0,03	0,03
2NARTHOL	2,36	50,9	0,03
1-ΟΗΡΗΕ	11,3	140	0,03
2-ΟΗΡΗΕ	0,42	16,1	0,02
3-ΟΗΡΗΕ	0,51	11,7	0,05
9-ΟΗΡΗΕ	0,81	6,06	0,02
1-ΟΗΡΥΡ	5,29	31,0	0,03
ΣΟΗ-ΠΑΥς	23,1	163	0,28
Σ1 και 2 NARTHOL	2,39	50,9	0,06
Σ1,2,3,9-ΟΗΡΗΕ	13,1	140	0,13

Πίνακας 15: Μέση, μέγιστη και ελάχιστη των συγκεντρώσεων των ΟΗ-ΠΑΥ καθώς και το άθροισμα τους, σε δείγματα υγιών ατόμων.

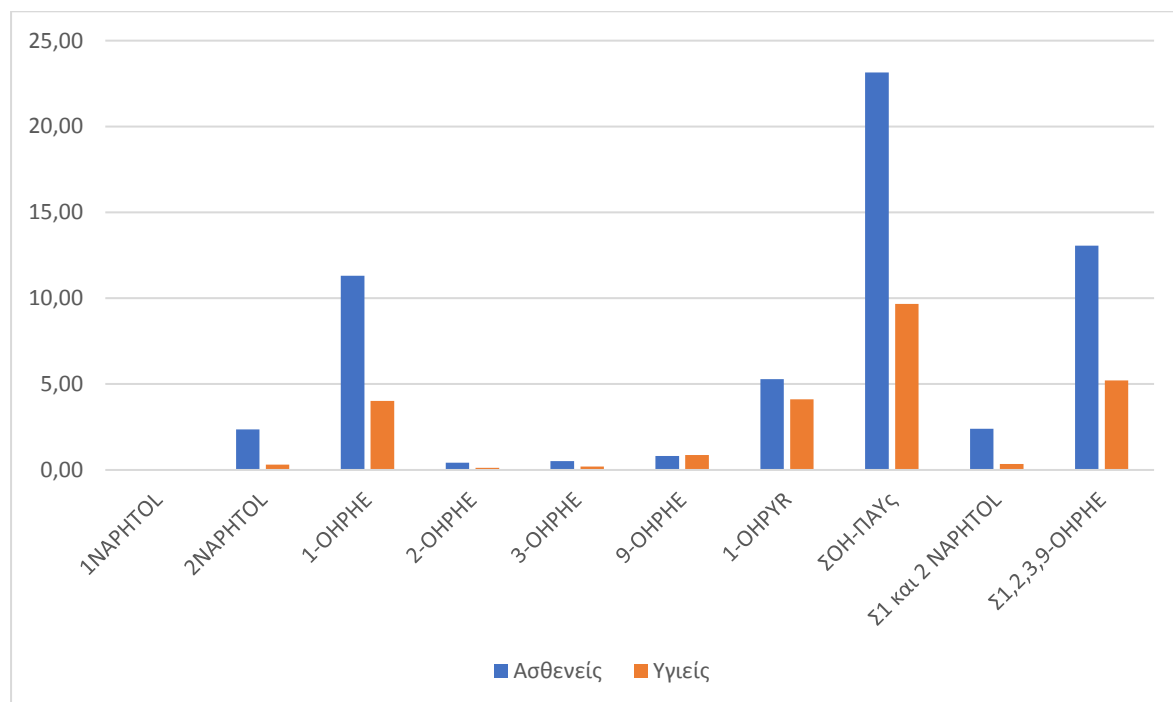
Υγιείς (n=45)			
ΟΗ-ΠΑΥ	Μέση τιμή, $\bar{x}$, ng mL⁻¹	X_{max}, ng mL⁻¹	X_{mean}, ng mL⁻¹
1NARTHOL	0,03	0,03	0,03
2NARTHOL	0,31	12,8	0,03
1-ΟΗΡΗΕ	4,01	36,7	0,03
2-ΟΗΡΗΕ	0,12	3,28	0,02
3-ΟΗΡΗΕ	0,21	7,11	0,05
9-ΟΗΡΗΕ	0,87	9,79	0,02
1-ΟΗΡΥΡ	4,11	61,6	0,03
ΣΟΗ-ΠΑΥς	9,67	79,2	0,22
Σ1 και 2 NARTHOL	0,35	12,9	0,06
Σ1,2,3,9-ΟΗΡΗΕ	5,21	36,8	0,13

Για να εξεταστεί αν υπήρχε σημαντική διαφορά ανάμεσα στη μέση τιμή των δύο ομάδων δειγμάτων διενεργήθηκε t-test για τη μέση τιμή του αθροίσματος των ΟΗ-ΠΑΥ, αλλά και για την μέση τιμή του αθροίσματος των ενώσεων που έχουν ίδιο μοριακό τύπο. Επομένως έγινε t test για το 1-ΟΗ-Πυρένιο, το άθροισμά των ΟΗ-φαιναθρενίων και το άθροισμα των 1 και 2 Ναφθολών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 16: Αποτελέσματα t test για το 1-ΟΗ-Πυρένιο, το άθροισμά των ΟΗ-φαιναθρενίων, το άθροισμα των 1 και 2 Ναφθολών και το συνολικό άθροισμα των ενώσεων.

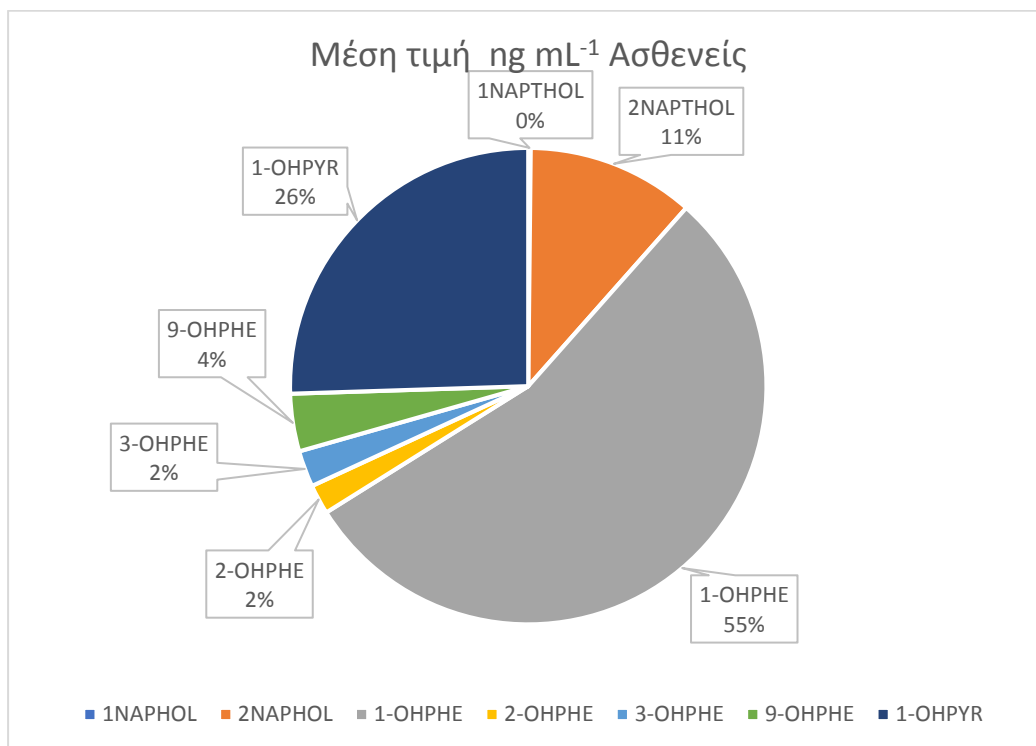
	F Test	t test	
		p-value	Συμπέρασμα
1-ΟΗΡΥΡ	Ανάλογες Διακυμάνσεις	0,246	Δεν απορρίπτεται η Ho
Σ1,2,3,9-ΟΗΡΗΕ	Άνισες Διακυμάνσεις	0,028	Απορρίπτεται η Ho
Σ1 και 2 ΝΑΡΤΗΟΛ	Άνισες Διακυμάνσεις	0,049	Απορρίπτεται η Ho
ΣΟΗ-ΠΑΥς	Άνισες Διακυμάνσεις	0,012	Απορρίπτεται η Ho

Παρατηρούμε ότι υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά για το συνολικό άθροισμα των ενώσεων, το άθροισμα των υδρόξυ φαιναθρενίων και το άθροισμα των ναφθολών. Αυτή η διαφορά δεν παρατηρείται στο άθροισμα του 1-ΟΗ-πυρενίου. Στο Σχήμα 11 φαίνεται η σύγκριση των αποτελεσμάτων για τις δύο ομάδες δειγμάτων.

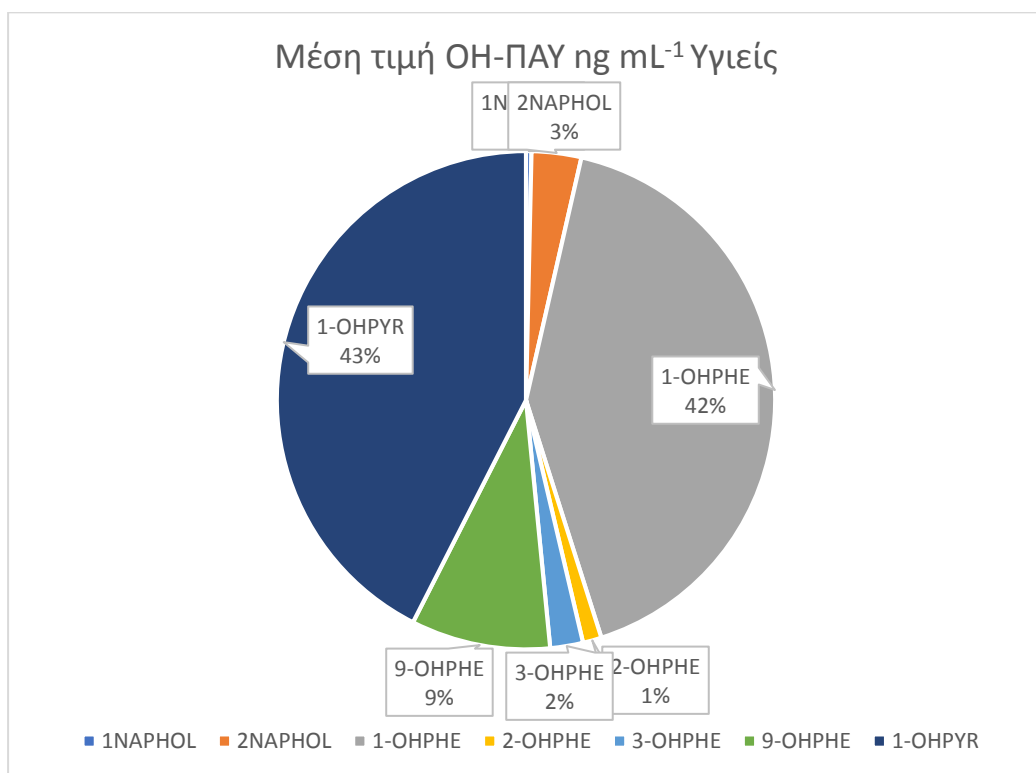


Σχήμα 11: Σύγκριση μέσης τιμής ΟΗ-ΠΑΥ ασθενείς και υγιείς.

Στα παρακάτω σχήματα (Σχήμα 12-13) παρουσιάζονται συγκριτικά η μέση τιμή των συγκεντρώσεων των ΟΗ-ΠΑΥ τόσο σε δείγματα ασθενών όσο και σε δείγματα υγιών ατόμων.



Σχήμα 12: Σύγκριση μέσης τιμής ΟΗ-ΠΑΥ στον ορό ασθενών.



Σχήμα 13: Σύγκριση μέσης τιμής ΟΗ-ΠΑΥ στον ορό υγιών ατόμων.

παρατηρούμε ότι και στις δύο ομάδες δειγμάτων οι ενώσεις που ανιχνεύονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι το 1-OH-φαιναθρένιο και το 1-OH-πυρένιο. Το 9-OH-φαιναθρένιο και η 2-ναφθόλη βρισκόταν σε μικρότερες συγκεντρώσεις.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι συγκεντρώσεις των 2-OH-φαιναθρενίου και 3-OH-φαιναθρενίου ήταν σε μικρότερες συγκεντρώσεις ενώ η 1-ναφθόλη ήταν και στις δύο περιπτώσεις κάτω από το LOD.

9.3 Σύγκριση των αποτελεσμάτων ΟΗ-ΠΑΥ με τους μητρικούς ΠΑΥ

Προκειμένου να γίνει εκτενέστερη μελέτη της επίδρασης των ΟΗ-ΠΑΥ χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από προηγούμενη διπλωματική εργασία ειδίκευσης. Συγκεκριμένα έγινε σύγκριση των ενώσεων που προσδιορίστηκαν με τους μητρικούς ΠΑΥ. Η μέση τιμή των ενώσεων που μελετήθηκαν καθώς και το άθροισμά τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 17 για τους ασθενείς και υγιείς αντίστοιχα.

Πίνακας 17: Μέση τιμή των συγκεντρώσεων των ΟΗ-ΠΑΥ και των μητρικών ενώσεων στα δείγματα ασθενών και υγιών ατόμων.

	Ασθενείς (n=49)	Υγιείς (n=44)
ΟΗ-ΠΑΥ	Μέση τιμή, $\bar{x}$, ng mL⁻¹	Μέση τιμή, $\bar{x}$, ng mL⁻¹
naphthalene	11,2	10,5
phenanthrene	69,8	53,9
pyrene	5,37	4,76
ΣΠΑΥ	86,4	69,3

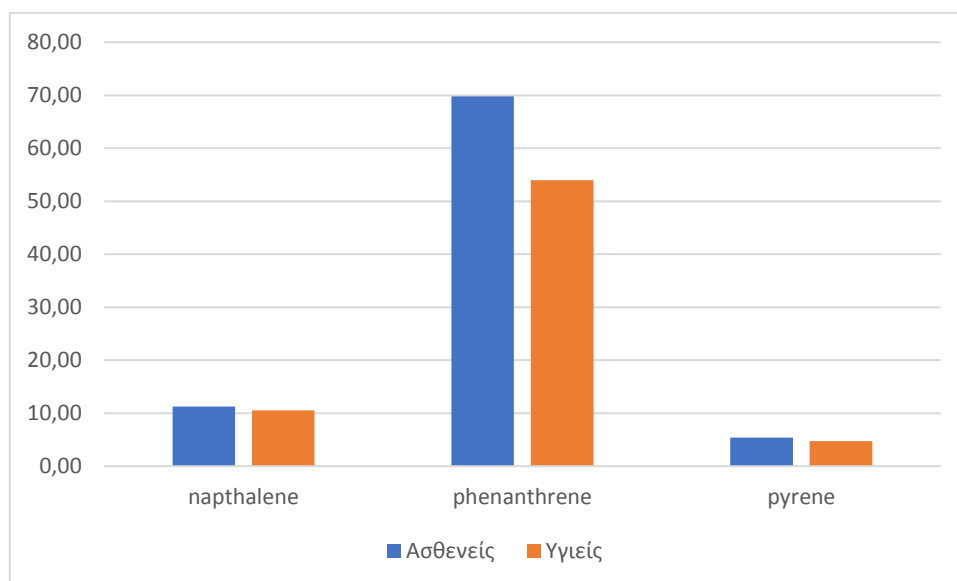
Για να συγκριθούν οι μέσες τιμές έγινε t test. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 18.

Πίνακας 18: Αποτελέσματα t test για το Πυρένιο, το φαιναθρένιο, και το ναφθαλένιο.

	F Test	t test	
		p-value	Συμπέρασμα
naphthalene	Άνισες Διακυμάνσεις	0,251	Δεν απορρίπτεται η H_0
phenanthrene	Ανάλογες Διακυμάνσεις	0,002	Απορρίπτεται η H_0
pyrene	Άνισες Διακυμάνσεις	0,048	Δεν απορρίπτεται η H_0

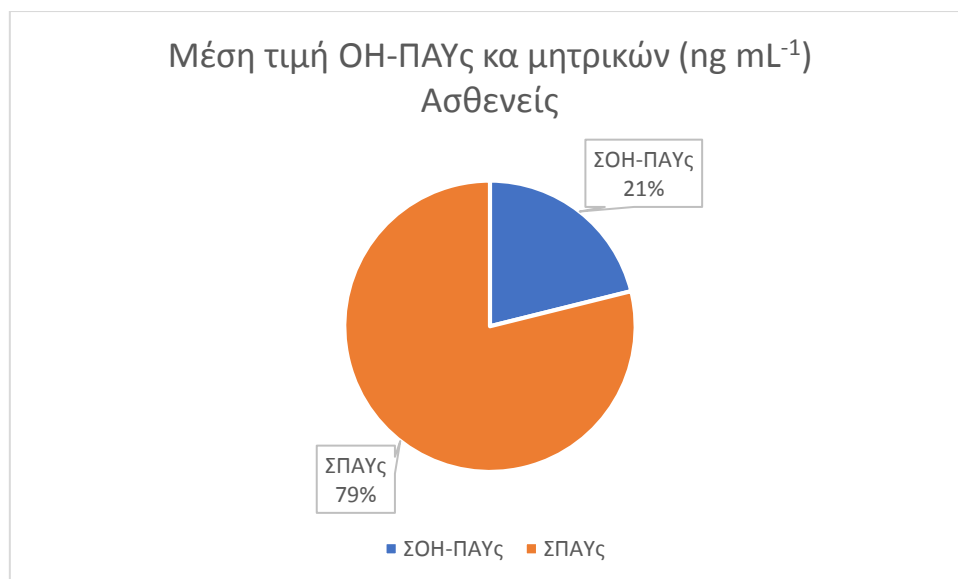
Συμπεραίνουμε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά της μέσης τιμής για το φαιναθρένιο αλλά όχι για το πυρένιο και το ναφθαλένιο.

Η σύγκριση της μέσης τιμής των ενώσεων παρουσιάζεται σε ραβδόγραμμα στο Σχήμα 14.

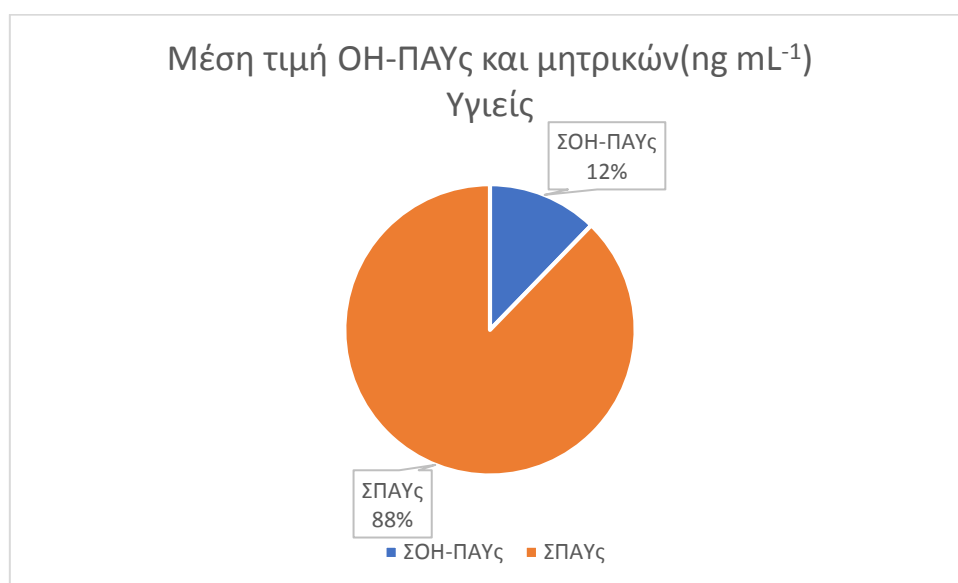


Σχήμα 14: Σύγκριση μέσης τιμής μητρικών ΠΑΥ στον ορό υγιών και ασθενών.

Στα παρακάτω σχήματα (Σχήμα 15-16) γίνεται σύγκριση του αθροίσματος της μέσης τιμής των πρόδρομων ενώσεων με το άθροισμα της μέσης τιμής των μεταβολιτών τους για υγιείς και ασθενείς.



Σχήμα 15: Σύγκριση αθροίσματός μέσης τιμής μητρικών ΠΑΥ με το άθροισμα της μέσης τιμής των ΟΗ - ΠΑΥ, σε δείγματα ασθενών.



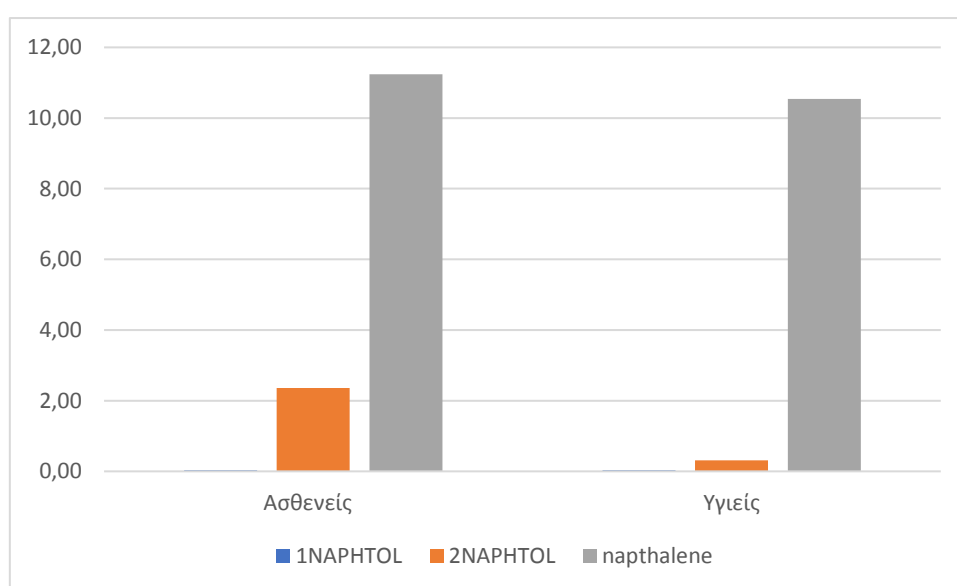
Σχήμα 16: Σύγκριση αθροίσματός μέσης τιμής μητρικών ΠΑΥ με το άθροισμα της μέσης τιμής των ΟΗ - ΠΑΥ σε δείγματα υγιών ατόμων.

Τα συμπεράσματα που μπορούν να εξαχθούν από τα παραπάνω σχήματα είναι ότι το άθροισμα των μητρικών ενώσεων απαντάται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και στις δύο ομάδες δειγμάτων και ότι το άθροισμα των ΟΗ-ΠΑΥ καταλαμβάνει μεγαλύτερο ποσοστό στα δείγματα των ασθενών με οξεία

λευχαιμία. Στα επόμενα υποκεφάλαια θα παρουσιαστεί εκτενέστερα σύγκριση των μητρικών ενώσεων με τους μεταβολίτες που αναλύθηκαν.

9.3.1 Σύγκριση 1-Ναφθόλη και 2-Ναφθόλη με το Ναφθαλένιο

Το ναφθαλένιο ανιχνεύεται σε υψηλές συγκεντρώσεις και στις δύο ομάδες δειγμάτων, η 1-Ναφθόλη και η 2-Ναφθόλη όμως σε αρκετές περιπτώσεις ήταν κάτω από το LOD. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται στα διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια που μπορεί να ακολουθήσει η μητρική ένωση. Η σύγκριση φαίνεται καλύτερα στο Σχήμα 17

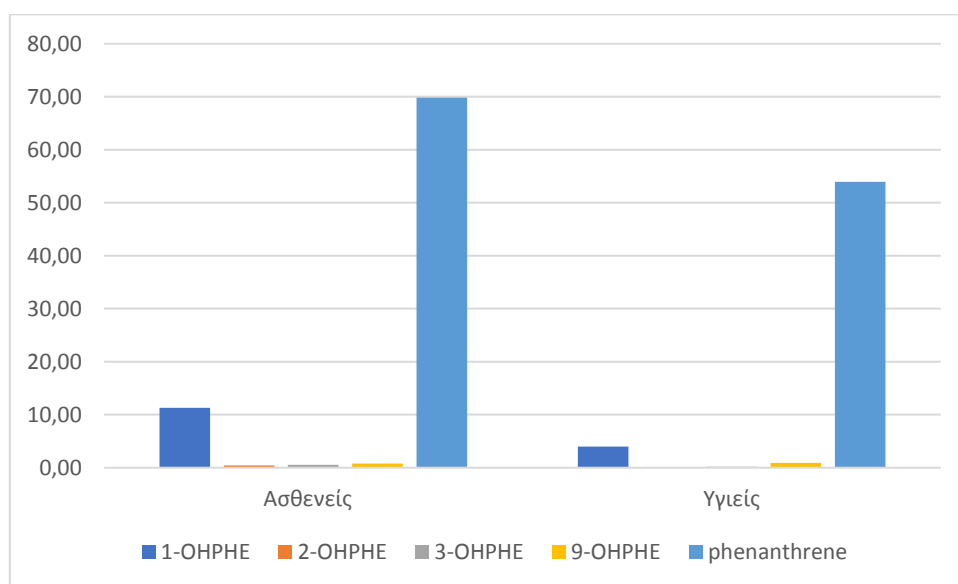


Σχήμα 17: Σύγκριση μέσης τιμής 1-Ναφθόλης και 2-Ναφθόλης με τη μητρική ένωση.

Όπως φαίνεται η 1-Ναφθόλη ήταν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και στις δύο ομάδες δειγμάτων. Αντίθετα παρατηρήθηκε διαφορά στη 2-Ναφθόλη. Αξίζει μάλιστα να σημειωθεί ότι οι δύο μεγαλύτερες τιμές που βρέθηκαν ($50,9$ και $28,6 \text{ ng mL}^{-1}$) αφορούσαν γυναίκες που έπασχαν από οξεία λευχαιμία ηλικίας 44 και 47 ετών αντίστοιχα και ήταν και οι δύο καπνίστριες ενώ οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων ΟΗ-ΠΑΥ ήταν κάτω ή πολύ κοντά στο LOD. Στους άντρες δεν παρατηρήθηκε αυτό το φαινόμενο καθώς οι συγκεντρώσεις της 2-ναφθόλης ήταν σε χαμηλότερες τιμές και ανάλογες με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις.

9.3.2 Σύγκριση 1-OH-φαιναθρένιο, 2-OH-φαιναθρένιο, 3-OH-φαιναθρένιο, 9-OH-φαιναθρένιο με το φαιναθρένιο

Στο Σχήμα 18 περιγράφεται σχηματικά η σύγκριση της μέσης τιμής των OH-φαιναθρενίων με την μητρική ένωση και για τις δύο ομάδες δειγμάτων



Σχήμα 18: Σύγκριση μέσης τιμής 1-OH-φαιναθρενίου 2-OH-φαιναθρενίου, 3-OH-φαιναθρενίου με τη μητρική ένωση.

Οι ενώσεις που εμφανίζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι το 1-OH-φαιναθρένιο. Μάλιστα στους άντρες ανιχνευθήκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις οι υψηλότερες τιμές οφείλονται πιθανώς σε αυξημένη παραγωγή του 1-OH-φαιναθρενίου από το πρόδρομο μέσω της επιλογής των κατάλληλων μεταβολικών μονοπατιών.

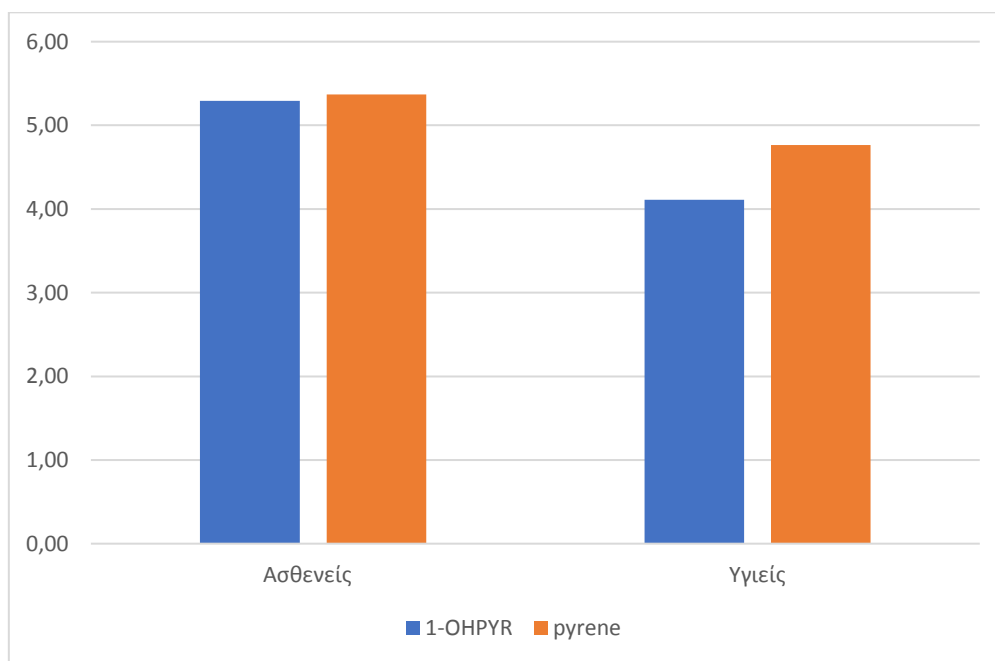
9.3.3 Σύγκριση 1-OH-πυρένιο με το πυρένιο

Όπως έχει αναφερθεί δεν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και για το 1-OH-Πυρένιο αλλά και για την μητρική ένωση. Στον Πίνακα 19 φαίνονται τα t test για τις δύο ενώσεις σε δείγματα υγείων και ασθενών.

Πίνακας 19: Αποτελέσματα t test για το Πυρένιο, και το 1-OH-πυρένιο σε δειγμάτα υγιών και ασθενών.

	F Test	t test	
		p-value	Συμπέρασμα
Ασθενείς 1-OH-πυρένιο και πυρένιο	Ανάλογες Διακυμάνσεις	0,332	Δεν απορρίπτεται η H_0
Υγιείς 1-OH-πυρένιο και πυρένιο	Ανάλογες Διακυμάνσεις	0,468	Δεν απορρίπτεται η H_0

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ενώσεων και στις 2 ομάδες δειγμάτων. Η σύγκριση φαίνεται καλύτερα στο Σχήμα 19.



Σχήμα 19: Σύγκριση μέσης τιμής 1-OH-πυρενίου με τη μητρική ένωση.

Η διαφορά της μέσης τιμής του πυρενίου αλλά και του μεταβολίτη του μεταξύ των δύο ομάδων δειγμάτων είναι μικρότερη από 1 ng mL⁻¹. Το γεγονός αυτό είναι αξιοπερίεργο καθώς η μέση τιμή της μητρικής ένωσης και η μέση τιμή του Υδρόξυ μεταβολίτη ήταν σε παραπλήσιες τιμές. Για να εξαχθούν ασφαλέστερα συμπεράσματα απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων.

9.4 Σύγκριση αποτελεσμάτων σε κατηγορίες

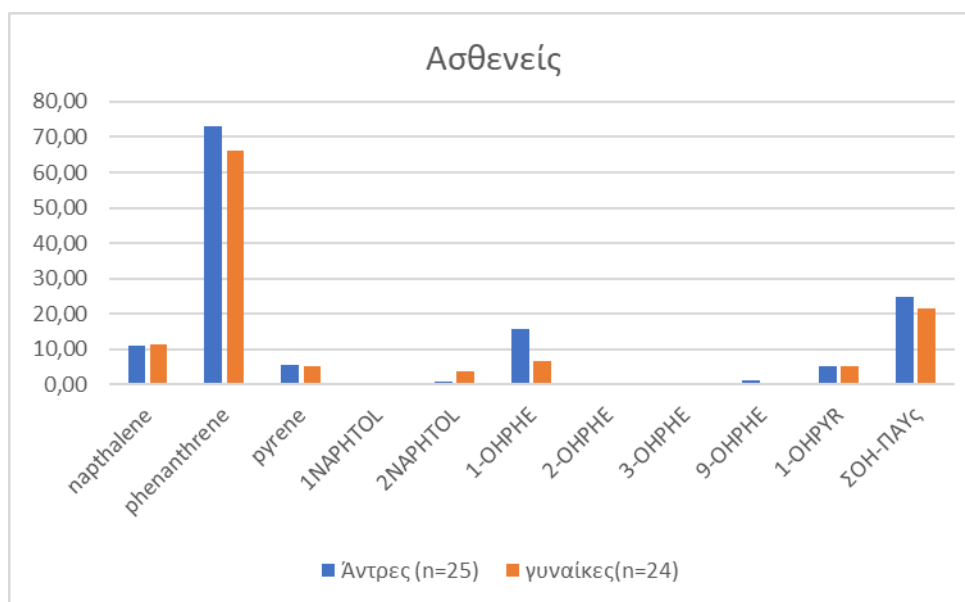
Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται κατηγοριοποίηση των αποτελεσμάτων ανάλογα με τα δημογραφικά δεδομένα που πάρθηκαν κατόπιν συμπλήρωσης ερωτηματολογίου από τους δότες. Οι κατηγορίες που δημιουργήθηκαν ήταν σύμφωνα με το φύλο, τις συνήθειες καπνίσματος και τον τόπο διαμονής.

9.4.1 Σύγκριση αποτελεσμάτων ανά φύλο

Εξετάστηκε η διαφοροποίηση των συγκεντρώσεων ανάλογα με το φύλο σε ασθενείς και σε υγιείς δότες. Από το σύνολο των δειγμάτων τόσο των ασθενών όσο και των υγιών υπήρχαν σχεδόν σε ίση αναλογία άνδρες και γυναίκες. Στους Πίνακες 20 και 21 και στα Σχήματα 20 και 21 φαίνεται αυτή η διαφοροποίηση.

Πίνακας 20: Μέση τιμή συγκέντρωσης των ΠΑΥ, ΟΗ-ΠΑΥ, ανά φύλο για ασθενείς δότες.

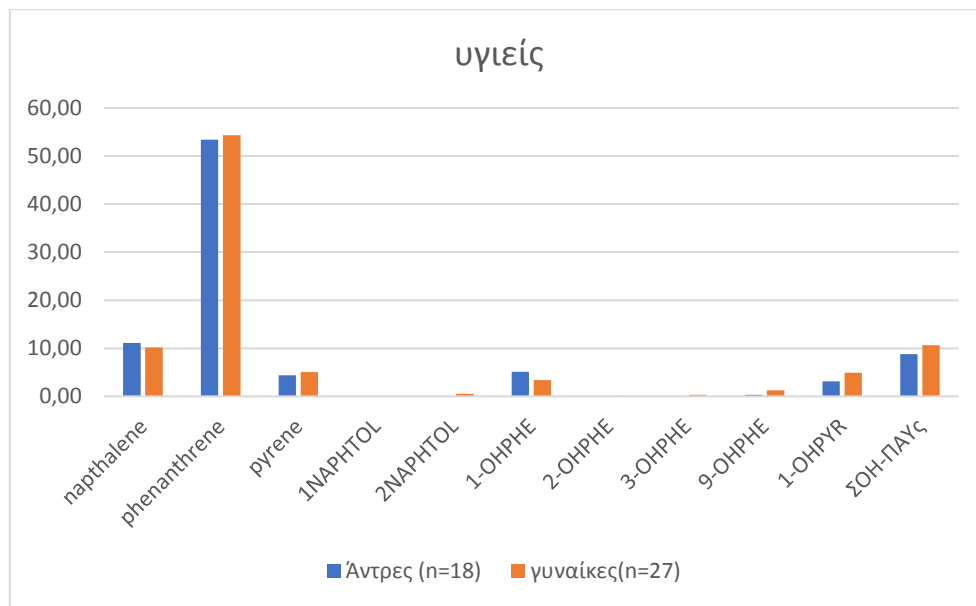
	Ασθενείς	
Ένωση	Άντρες (n=25)	Γυναίκες (n=24)
naphthalene	11,2	11,3
phenanthrene	73,2	66,2
pyrene	5,59	5,14
1NAPTHOL	0,03	0,03
2NAPTHOL	0,91	3,87
1-OHPHE	15,8	6,60
2-OHPHE	0,16	0,69
3-OHPHE	0,49	0,53
9-OHPHE	1,07	0,54
1-OHPYR	5,29	5,29
ΣΟΗ-ΠΑΥς	24,8	21,5



Σχήμα 20: Μέση τιμή συγκέντρωσης ασθενών ανά φύλο.

Πίνακας 21: Μέση τιμή συγκέντρωσης των ΠΑΥ, ΟΗ-ΠΑΥ, ανά φύλο για υγιείς δότες.

Ένωση	Υγιείς	
	Άντρες (n=18)	Γυναίκες (n=27)
naphthalene	11,1	10,2
phenanthrene	53,4	54,3
pyrene	4,36	5,04
1NAPHTOL	0,03	0,03
2NAPHTOL	0,03	0,52
1-OHPHE	5,12	3,40
2-OHPHE	0,08	0,15
3-OHPHE	0,05	0,32
9-OHPHE	0,34	1,27
1-OHPYR	3,14	4,94
ΣΟΗ-ΠΑΥ	8,79	10,7



Σχήμα 21: Μέση τιμή συγκέντρωσης υγιών ανά φύλο.

Από τα παραπάνω σχήματα είναι εμφανές ότι στους ασθενείς, το άθροισμα των συγκεντρώσεων των ΟΗ-ΠΑΥ στους άνδρες είναι μεγαλύτερο από τις γυναίκες. Ενώ στους υγιείς στις γυναίκες είναι μεγαλύτερο.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μέση τιμή της συγκέντρωσης του φαιναθρενίου καθώς είναι σε υψηλότερες τιμές στους άνδρες από ότι στις γυναίκες στα δείγματα των ασθενών, το αντίθετο όμως συμβαίνει στα δείγματα των υγιών. Παρατηρώντας στα Σχήματα 20-21 τα προϊόντα μεταβολισμού, φαίνεται ότι το 1-ΟΗ-φαιναθρένιο είναι σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στους άνδρες και στις δύο ομάδες δειγμάτων, με τη διαφορά αυτή να είναι συγκριτικά μεγαλύτερη στους ασθενείς.

Αξιοσημείωτο είναι ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις του ναφθαλενίου και στις δύο ομάδες δειγμάτων. Αλλά η 2-ναφθόλη είναι σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις γυναίκες έναντι των ανδρών και στις 2 ομάδες δειγμάτων.

Για το πυρένιο και το 1-ΟΗ-πυρένιο δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα, καθώς η μέση τιμή της συγκέντρωσης της μητρικής ένωσης και του μεταβολίτη βρίσκονταν σε παραπλήσιες συγκεντρώσεις.

9.4.2 Σύγκριση αποτελεσμάτων ανά είδος καπνιστή

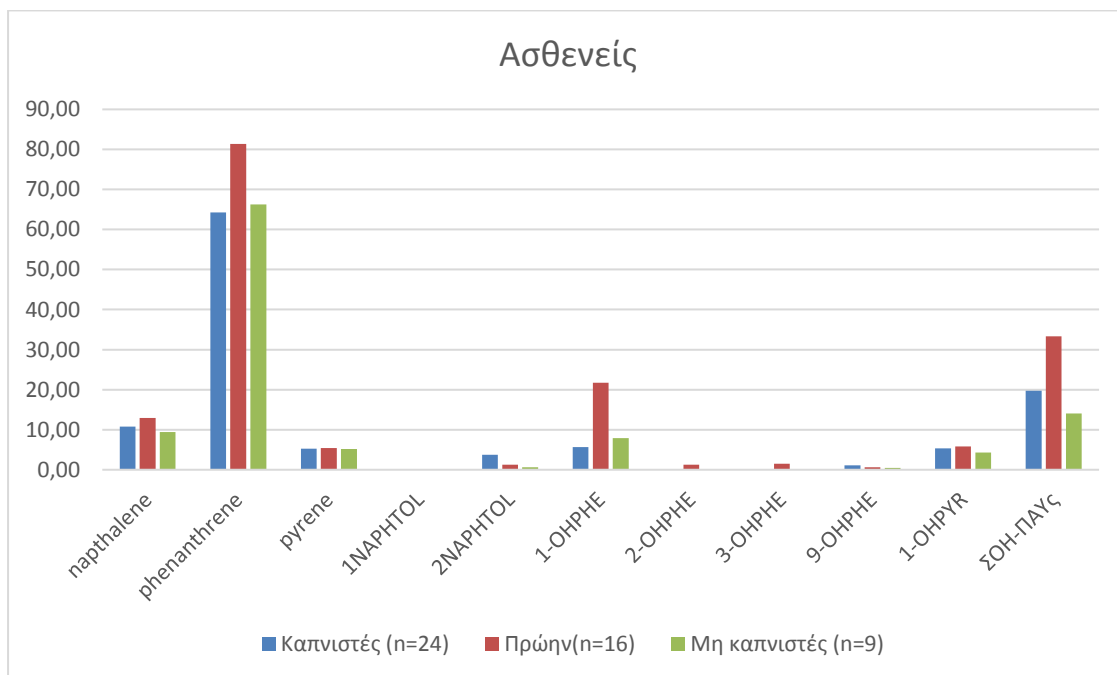
Κατηγοριοποίηση των δειγμάτων έγινε, επίσης βάσει του είδους των καπνιστών. Έτσι, έχουμε τους καπνιστές, τους μη καπνιστές και τους πρώην καπνιστές. Και τα τρία είδη εξετάστηκαν τόσο στους ασθενείς δότες όσο και στους υγιείς. Στους πίνακες 22 και 23 και στα σχήματα 22 και 23 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων για τις τρεις κατηγορίες τόσο για τους ασθενείς όσο και για τους υγιείς δότες.

Πίνακας 22: Μέση τιμή συγκέντρωσης των ΠΑΥ, ΟΗ-ΠΑΥ ανά είδος καπνιστή για ασθενείς δότες.

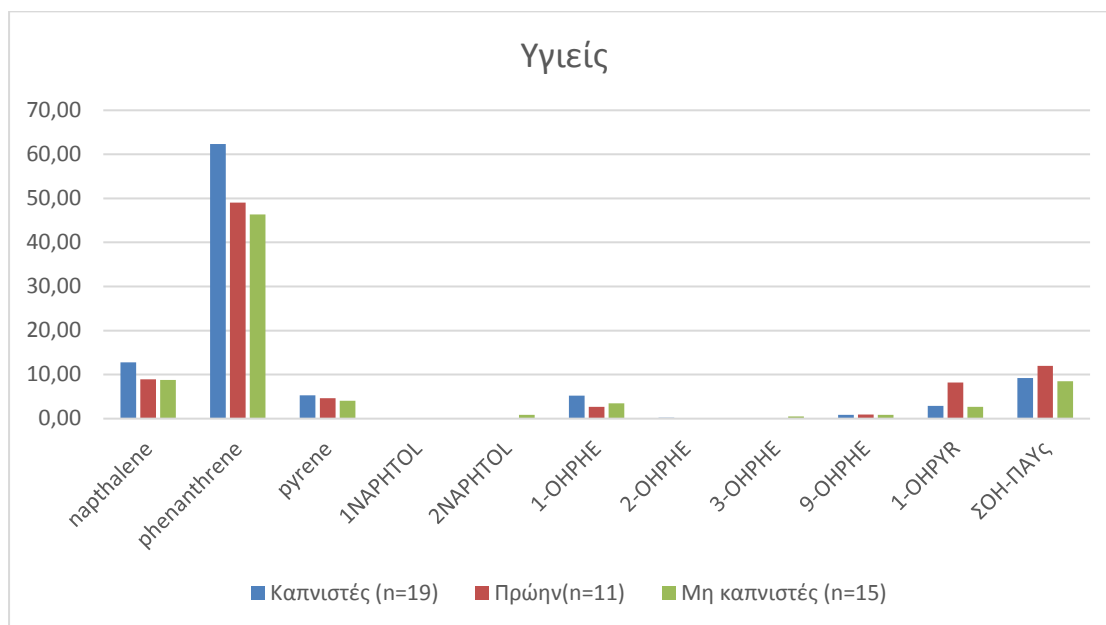
Ασθενείς			
Ένωση	Καπνιστές (n=24)	Πρώην(n=16)	Μη καπνιστές (n=9)
naphthalene	10,8	12,9	9,40
phenanthrene	64,3	81,3	66,2
pyrene	5,29	5,43	5,14
1NAPTHOL	0,03	0,03	0,03
2NAPTHOL	3,75	1,24	0,63
1-ΟΗΡΗΕ	5,69	21,7	7,87
2-ΟΗΡΗΕ	0,02	1,24	0,02
3-ΟΗΡΗΕ	0,05	1,47	0,05
9-ΟΗΡΗΕ	1,09	0,59	0,46
1-ΟΗΡΥΡ	5,32	5,79	4,31
ΣΟΗ-ΠΑΥ	19,7	33,4	14,1

Πίνακας 23: Μέση τιμή συγκέντρωσης των ΠΑΥ, ΟΗ-ΠΑΥ ανά είδος καπνιστή για υγιείς δότες

Υγιείς			
Ένωση	Καπνιστές (n=19)	Πρώην(n=11)	Μη καπνιστές (n=15)
naphthalene	12,81	8,90	8,77
phenanthrene	62,3	49,1	46,4
pyrene	5,32	4,66	4,10
1NAPHTOL	0,03	0,03	0,03
2NAPHTOL	0,03	0,03	0,88
1-ΟΗΡΗΕ	5,22	2,65	3,49
2-ΟΗΡΗΕ	0,19	0,12	0,02
3-ΟΗΡΗΕ	0,05	0,05	0,52
9-ΟΗΡΗΕ	0,86	0,92	0,85
1-ΟΗΡΥΡ	2,87	8,19	2,69
ΣΟΗ-ΠΑΥ	9,25	11,9	8,49



Σχήμα 22: Μέση τιμή συγκέντρωσης ασθενών ανά είδος καπνιστή



Σχήμα 23: Μέση τιμή συγκέντρωσης υγιών ανά είδος καπνιστή

Γνωρίζοντας πως το κάπνισμα είναι μία συνήθεια με βλαβερές συνέπειες για τον οργανισμό και εκτός των άλλων ουσιών περιλαμβάνει και ΠΑΥ, είναι λογικό οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των ΠΑΥ των ΟΗ-ΠΑΥ αλλά και του αθροίσματός τους να είναι σε νυν ή πρώην καπνιστές και σε δείγματα ασθενών και σε δείγματα υγιών δοτών.

9.4.3 Σύγκριση αποτελεσμάτων ανά τόπο κατοικίας

Στο κεφάλαιο αυτό πραγματοποιήθηκε ταξινόμηση των αποτελεσμάτων με βάση των διαφορετικών περιοχών διαμονής που συμμετείχαν στην έρευνα. Έτσι έγινε γεωγραφική κατανομή των περιοχών σε βιομηχανικές, αστικές και αγροτικές. Στους Πίνακες 24 και 25 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των ενώσεων και των βιοχημικών δεικτών για κάθε περιοχή τόσο για ασθενείς όσο και για υγιείς δότες

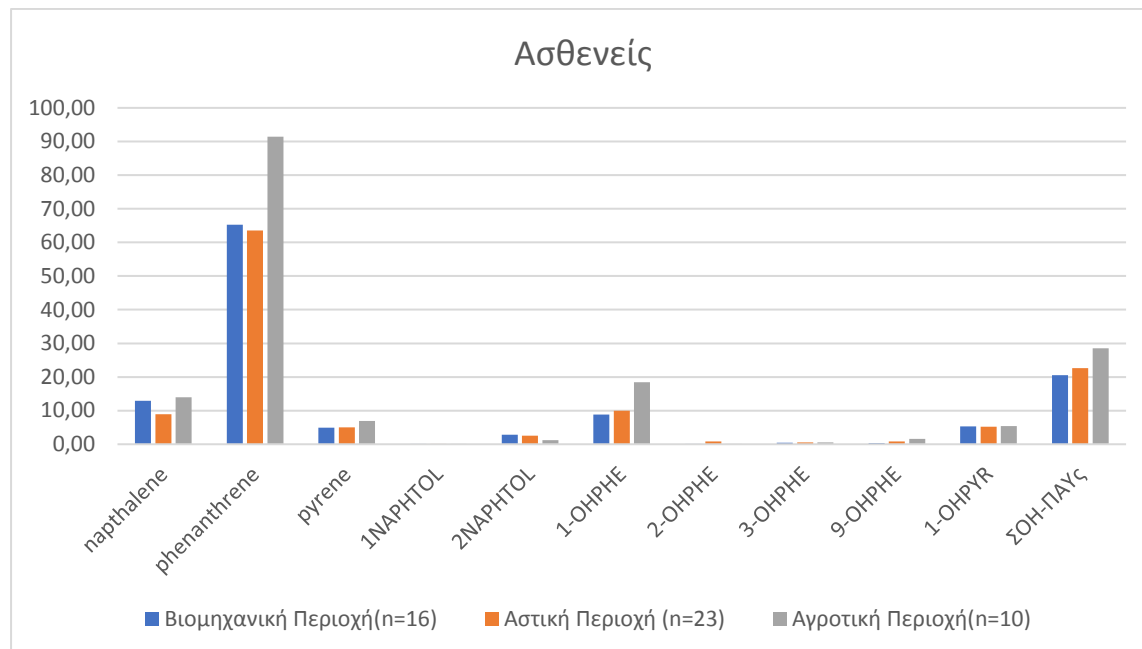
Πίνακας 24: Μέση τιμή συγκέντρωσης των ΠΑΥ, ΣΠΑΥ, ανά τόπο κατοικίας για ασθενείς.

Ασθενείς			
Ένωση	Βιομηχανική Περιοχή (n=16)	Αστική Περιοχή (n=23)	Αγροτική Περιοχή (n=10)
napthalene	12,9	8,88	13,9
phenanthrene	65,2	63,6	91,4
pyrene	4,95	5,00	6,88
1NAPTHOL	0,03	0,03	0,03
2NAPTHOL	2,79	2,56	1,22
1-ΟΗΡΗΕ	8,78	9,99	18,4
2-ΟΗΡΗΕ	0,02	0,87	0,02
3-ΟΗΡΗΕ	0,44	0,56	0,53
9-ΟΗΡΗΕ	0,34	0,80	1,60
1-ΟΗΡΥΡ	5,26	5,25	5,44
ΣΟΗ-ΠΑΥ	20,5	22,6	28,5

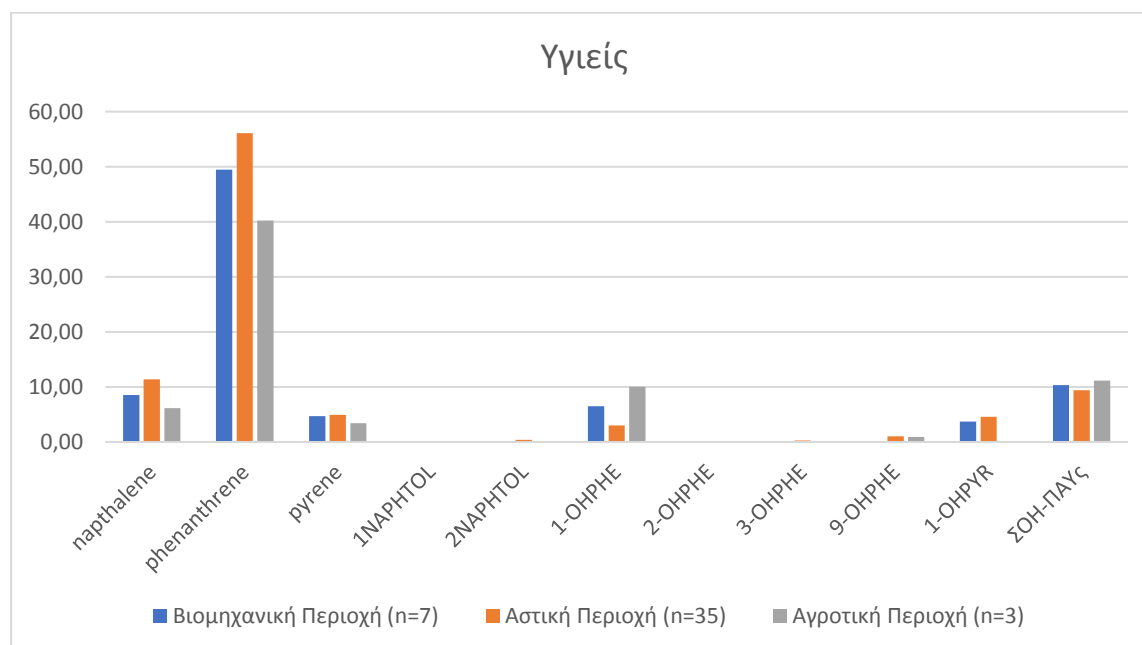
Πίνακας 25: Μέση τιμή συγκέντρωσης των ΠΑΥ, ΣΠΑΥ, ανά τόπο κατοικίας για υγιείς.

Υγιείς			
Ένωση	Βιομηχανική Περιοχή (n=7)	Αστική Περιοχή (n=35)	Αγροτική Περιοχή (n=3)
napthalene	8,52	11,35	6,14
phenanthrene	49,4	56,1	40,2
pyrene	4,67	4,90	3,42
1NAPTHOL	0,03	0,03	0,03
2NAPTHOL	0,03	0,39	0,03
1-ΟΗΡΗΕ	6,48	3,01	10,1
2-ΟΗΡΗΕ	0,02	0,14	0,02
3-ΟΗΡΗΕ	0,05	0,25	0,05
9-ΟΗΡΗΕ	0,02	1,04	0,93
1-ΟΗΡΥΡ	3,67	4,55	0,03
ΣΟΗ-ΠΑΥ	10,3	9,4	11,1

Στα Σχήματα 24 και 25 παρουσιάζονται η μέση τιμή των συγκεντρώσεων των ενώσεων σε σχέση με τον τόπο κατοικίας κάθε εξεταζόμενου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται και σχολιάζονται παρακάτω.



Σχήμα 24: Μέση τιμή συγκέντρωσης ασθενών ανά τόπο κατοικίας,



Σχήμα 25: Μέση τιμή συγκέντρωσης Υγιών ανά τόπο κατοικίας

Από τα παραπάνω σχήματα γίνεται εμφανές ότι οι συγκεντρώσεις των ΠΑΥ είναι υψηλότερες σε δότες που κατοικούν σε επιβαρυμένες από βιομηχανίες περιοχές του Ελλαδικού χώρου, αλλά και σε αστικές περιοχές. Οι Υδρόξυ μεταβολίτες ήταν υψηλότεροι στις αγροτικές περιοχές. Το γεγονός αυτό αν και περίεργο πιθανότητα δικαιολογείται αν λάβουμε υπόψιν ότι οι ΠΑΥ είναι αρκετά πτητικές ενώσεις και καθώς μεταναστεύουν σε περιοχές μακρύτερα από την πηγή υφίστανται αντιδράσεις παραγωγοποίησης.

9.5 Μελέτη συσχετίσεων ΟΗ-ΠΑΥ με τις μητρικές ενώσεις

Κατόπιν στατιστικής επεξεργασίας, μελετήθηκαν πιθανές συσχετίσεις των υδρόξυ παραγώγων των Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων τόσο μεταξύ τους όσο και με τις μητρικές ενώσεις για τις οποίες είχαν συλλεχθεί δεδομένα.

Η μελέτη των συσχετίσεων πραγματοποιήθηκε μόνο στα δείγματα ασθενών με οξεία λευχαιμία, ενώ δεν μελετήθηκε η 1-Ναφθόλη καθώς στα περισσότερα δείγματα η συγκέντρωση ήταν κάτω από το LOD. Η μελέτη παρουσιάζεται στον Πίνακα 26

Πίνακας 26: Συσχετίσεις συνολικών αποτελεσμάτων.

	NAPHTHALENE	PHENANTHRENE	PYRENE	NAPOH2	PHEOH1	PHEOH2	PHEOH3	PHEOH9	PYROH	SUMOHPAHS	SUMNAP	SUMPHE
NAPHTHALENE	1,00											
PHENANTHRENE	0,32	1,00										
PYRENE	0,10	0,68	1,00									
NAPOH2	0,19	0,08	0,01	1,00								
PHEOH1	0,07	0,65	0,36	-0,06	1,00							
PHEOH2	-0,17	-0,09	-0,17	-0,05	-0,05	1,00						
PHEOH3	-0,03	-0,06	-0,18	-0,05	-0,02	0,81	1,00					
PHEOH9	0,12	0,23	0,17	0,14	0,07	-0,02	-0,01	1,00				
PYROH	0,20	0,30	0,16	-0,10	0,27	-0,06	-0,06	0,16	1,00			
SUMOHPAHS	0,20	0,61	0,30	0,50	0,79	0,05	0,08	0,22	0,38	1,00		
SUMNAP	0,19	0,08	0,01	1,00	-0,06	-0,05	-0,05	0,14	-0,10	0,50	1,00	
SUMPHE	0,06	0,64	0,34	-0,05	0,98	0,12	0,15	0,13	0,27	0,81	-0,05	1,00

Παρατηρούμε ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση:

- Του φαιναθρενίου και του πυρενίου, πιθανότατά έχουν κοινή πηγή προέλευσης.
- Του φαιναθρενίου και του αθροίσματος των υδρόξυ φαιναθρενίων, ενώ με το 1-OH-φαιναθρένιο είναι ισχυρότερη.
- Του 1-OH-φαιναθρενίου με το άθροισμα των OH-ΠΑΥ.

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια κατηγοριοποίησης των συσχετίσεων ανάλογα με το είδος των δειγμάτων όπως έχει γίνει και στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων παραπάνω.

Έτσι, στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 26) φαίνονται οι συσχετισμοί όσον αφορά στους ασθενείς δότες με χρήση της στατιστικής ανάλυσης PCA (Principal Component Analysis). Για την πραγματοποίηση της, χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics 23.

Πίνακας 27: Μελέτη των συσχετίσεων.

	Component			
	1	2	3	4
NAPHTHALENE	0,02	0,17	-0,09	0,69
PHENANTHRENE	0,76	0,03	-0,13	0,40
PYRENE	0,52	-0,06	-0,30	0,28
NAPOH2	0,01	0,99	-0,03	0,08
PHEOH1	0,97	-0,05	-0,01	-0,03
PHEOH2	0,00	-0,03	0,93	-0,06
PHEOH3	0,01	-0,02	0,94	0,02
PHEOH9	0,06	0,11	0,05	0,62
PYROH	0,31	-0,20	-0,02	0,56
SUMOHPAHS	0,82	0,48	0,11	0,18
SUMNAP	0,01	0,99	-0,03	0,08
SUMPHE	0,96	-0,04	0,17	0,01

Ακόμα παρατηρείται ακόμα πως:

- το φαιναθρένιο και το πυρένιο επηρεάζουν άμεσα το άθροισμα των ΟΗ-ΠΑΥ.
- Η 2-ναφθόλη επηρεάζεται από το ναφθαλένιο.
- Οι ισομερείς ενώσεις 2-ΟΗ-φαιναθρένιο και 3-ΟΗ-φαιναθρένιο έχουν επίσης συσχέτιση με πιθανή κοινή προέλευση τους
- Δεν παρατηρείται καμία συσχέτιση για το 9-ΟΗ-φαιναθρένιο και το 1-ΟΗ-πυρένιο.

Ακολούθησε μελέτη των συσχετίσεων των δειγμάτων ανάλογα με τον τόπο κατοικίας του δότη. Συγκεκριμένα, οι συσχετίσεις των αναλυτών για δότες που κατοικούν σε αγροτικές αστικές και βιομηχανικές περιοχές παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 27-28-29).

Πίνακας 28: Μελέτη των συσχετίσεων στις αγροτικές περιοχές.

	Component		
	1	2	3
NAPTHALENE	-0,089	-0,145	0,812
PHENANTHRENE	0,961	0,112	0,013
PYRENE	0,739	-0,046	-0,487
NAPOH2	0,199	0,947	-0,024
PHEOH1	0,832	0,455	0,058
PHEOH3	-0,336	0,577	0,553
PHEOH9	-0,312	-0,108	-0,537
PYROH	0,682	-0,263	0,038
SUMOHPAHS	0,878	0,439	0,053
SUMNAP	0,199	0,947	-0,024
SUMPHE	0,817	0,477	0,053

Πίνακας 29: Μελέτη των συσχετίσεων στις αστικές περιοχές

	Component			
	1	2	3	4
NAPTHALENE	0,185	0,466	-0,158	0,569
PHENANTHRENE	0,811	0,209	-0,202	-0,122
PYRENE	0,393	0,088	-0,470	-0,410
NAPOH2	-0,013	0,987	-0,036	-0,081
PHEOH1	0,887	-0,181	-0,062	0,248
PHEOH2	0,057	-0,015	0,959	-0,088
PHEOH3	0,003	-0,003	0,953	-0,144
PHEOH9	0,700	0,353	-0,031	0,151
PYROH	0,242	-0,157	-0,130	0,853
SUMOHPAHS	0,599	0,715	0,124	0,252
SUMNAP	-0,013	0,987	-0,036	-0,081
SUMPHE	0,897	-0,135	0,297	0,201

Πίνακας 30: Μελέτη των συσχετίσεων στις βιομηχανικές περιοχές

	Component			
	1	2	3	4
NAPTHALENE	0,082	0,030	0,103	0,965
PHENANTHRENE	0,830	0,069	-0,118	0,419
PYRENE	0,701	0,027	-0,131	0,023
NAPOH2	-0,089	0,986	-0,076	0,025
PHEOH1	0,860	-0,066	0,308	-0,060
PHEOH3	0,232	-0,055	0,823	-0,098
PHEOH9	-0,028	-0,125	0,859	0,049
PYROH	0,003	0,194	0,725	0,164
SUMOHPAHS	0,455	0,759	0,435	0,025
SUMNAP	-0,089	0,986	-0,076	0,025
SUMPHE	0,823	-0,077	0,454	-0,064

Καταλήγουμε στα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Στις αγροτικές περιοχές (Πίνακας 26) τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με τα συνολικά.
- Στις αστικές (Πίνακας 27), παρατηρείται μια ακόμα συσχέτιση του 9-OH-φαιναθρένιου με το 1-OH-φαιναθρένιο, το άθροισμα των OH-ΠΑΥ και του φαιναθρένιου, ενώ το άθροισμα των OH-ΠΑΥ φαίνεται να επηρεάζεται και από τη συγκέντρωση της 2-ναφθόλης
- Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι στις βιομηχανικές περιοχές (Πίνακας 28) υπάρχει συσχέτιση του 9-OH-φαιναθρενίου με το 3-OH-φαιναθρένιο και το 1-OH-πυρένιο κάτι το οποίο είναι λογικό αν αναλογιστεί κανείς τις ανθρωπογενούς φύσεως πηγές των συγκεκριμένων ενώσεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

ΕΠΙΛΟΓΟΣ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία διπλώματος ειδίκευσης είχε σαν σκοπό την ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού Υδρόξυ Παραγώγων των Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγματα ορού αίματος από ασθενείς με οξεία λευχαιμία και υγιείς δότες ενώ έγινε ταυτόχρονη μελέτη των συγκεντρώσεων και των πρόδρομων ΠΑΥ. Οι δότες ήταν από τον ευρύτερο Ελλαδικό χώρο και τα δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με τον τόπο διαμονής, το φύλο και το είδος καπνιστή.

Στους ασθενείς με οξεία λευχαιμία οι Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες, αλλά και τα προϊόντα μεταβολισμού τους ήταν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Επιπλέον, το άθροισμα των Υδρόξυ παραγώγων καταλάμβανε μεγαλύτερο ποσοστό στα δείγματα των ασθενών με οξεία λευχαιμία, συγκριτικά με τους υγιείς δότες.

Όπως ήταν αναμενόμενο τα Υδρόξυ παράγωγα ήταν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με τη μητρική ένωση και στις δύο ομάδες δειγμάτων ενώ η μελέτη των συσχετίσεων έδειξε πως τα υδρόξυ παράγωγα επηρεάζονται από τις συγκεντρώσεις των πρόδρομων ενώσεων, γεγονός που συνάδει με τη βιβλιογραφική ανασκόπηση. Τα Υδρόξυ παράγωγα είναι προϊόντα μεταβολισμού των μητρικών ενώσεων, και χρησιμοποιούνται ευρέως ως δείκτες έκθεσης των ΠΑΥ.

Γνωρίζοντας πως το κάπνισμα είναι πηγή των ΠΑΥ είναι λογικό σε δείγματα νυν και πρώην καπνιστών οι συγκεντρώσεις τους να ήταν αυξημένες. Τα προϊόντα μεταβολισμού ακολουθούσαν ανάλογη τάση.

Τα Υδρόξυ παράγωγα του Ναφθαλενίου και το Ναφθαλένιο ήταν οι ενώσεις που βρέθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Η 1-Ναφθόλη ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης, ενώ η 2-Ναφθόλη πιθανώς είναι το κύριο μεταβολικό προϊόν. Επιπλέον, η 2-Ναφθόλη βρέθηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις γυναίκες και στις δύο ομάδες ενώσεων.

Το 1-OH-Φαιναθρενίο είναι το υδρόξυ παράγωγο που βρίσκεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, έναντι των υπόλοιπων υδρόξυ παραγώγων του Φαιναθρενίου. Από την μελέτη των συσχετίσεων φαίνεται να υπάρχει ισχυρή συσχέτιση του 1-OH-Φαιναθρενίου με την μητρική ένωση. Τόσο το Φαιναθρενίο όσο και το κύριο μεταβολικό προϊόν ήταν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε δείγματα ανδρών.

Αξίζει να τονιστεί πως τα υπόλοιπα Υδρόξυ παράγωγα του Φαιναθρενίου δεν φαίνεται να έχουν κάποια συσχέτιση με την μητρική ένωση. Αλλά οι ισομερείς ενώσεις 2-OH-Φαιναθρενίο και 3-OH-Φαιναθρενίο πιθανώς σχετίζονται μεταξύ τους στο σύνολο των δειγμάτων. Μελετώντας τον τόπο διαμονής των δοτών παρατηρούμε ότι υπάρχει και συσχέτιση του 9-OH-Φαιναθρενίου με τις υπόλοιπες ισομερείς ενώσεις σε κατοίκους αστικών και βιομηχανικών περιοχών.

Τα αποτελέσματα προσφέρονται για περαιτέρω διερεύνηση και στατιστική ανάλυση. Για να τεκμηριωθούν τα συμπεράσματα απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

PM	Particulate Matter
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
%RSD	(%) Relative Standard Deviation
IARC	International Agency for Research on Cancer
EPA	Environmental Protection Agency
GC- MS	Gas Chromatography- Mass Spectrometry
VOCs	Volatile Organic Compounds
TSP	Total Suspended Particulates
EI	Electron Impact Ionization
WHO	World Health Organisation
LDH	Lactate Dehydrogonase
WBCs	White Blood Cells
RBCs	Red Blood Cells
LOD	Limit of detection
SD	Standard Deviation
LOQ	Limit of Quantification
ANT	Anthracene
PHE	Phenanthrene
BaA	Benzo[a]anthracene
NAP	Napthalene
AC	Acenapthene
ACL	Acenapthylene
FL	Fluoranthene
BFA	Benzo[b,k]fluoranthene
CHR	Chrysene
FLT	Fluoranthene
PYR	Pyrene
IPY	Indeno[1,2,3 cd]pyrene
BPE	Benzo[ghi]perylene
BAP	Benzo[a]pyrene

1-Naph	1-Ναφθόλη
2-Naph	2-Ναφθόλη
1-OH-Phe	1-υδροξύ Φαιναθρένιο
2-OH-Phe	2-υδροξύ Φαιναθρένιο
3-OH-Phe	3-υδροξύ Φαιναθρένιο
9-OH-Phe	9-υδροξύ Φαιναθρένιο
1-OH-Pyr	1-υδροξύ Πυρένιο
ΟΛΛ	Οξεία λεμφογενής λευχαιμία
ΟΜΛ	Οξεία μυελογενής λευχαιμία
ΧΛΛ	Χρόνια λεμφογενής λευχαιμία
ΧΜΛ	Χρόνια μυελογενής λευχαιμία

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. <https://www.eea.europa.eu/help/glossary/eea-glossary/air-pollution>
2. Νόμος 1650/1986 (ΦΕΚ 160/Α/16-10-86).
3. http://www.who.int/topics/air_pollution/en/
4. Κ. φυτιανός , Κ. Σαμαρά Κωνσταντίνου , Χημεία Περιβάλλοντος (1 εκδ.), University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 2009.
5. Sagar V. Krupa Air pollution, people and plants. Minnesota: the American Phytopathological society, 1997.
6. Shailesh K. Kharol, Chris A. McLinden, Christopher E. Sioris , Mark W. Shephard , Vitali Fioletov, Aaron van Donkelaar, Sajeev Philip , and Randall V. Martin. OMI satellite observations of decadal changes in ground-level sulfur dioxide over North America. Atmospheric Chemistry and Physics, Volume 17, pages 5921–5929, 2017.
7. Chun-Lang Yeh, NO_x Pollution Analysis for a Sulfur Recovery Unit Thermal Reactor, IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, Volume 282, Article number 012020, 2017.
8. Amit Kumar, Deepak Singh, Krishan Kumar, Braj Bihari Singh, Vinod Kumar Jain, Distribution of VOCs in urban and rural atmospheres of subtropical India: Temporal variation, source attribution, ratios, OFP and risk assessment, Science of the Total Environment, Volume 613–614, pages 492–501, 2018.
9. Weiguang Xu, Xian Wang, Zongwei Cai, Analytical chemistry of the persistent organic pollutants identified in the Stockholm Convention: A review. Analytica Chimica Acta, Volume 790, pages 1–13, 2013.
10. Hubert Po-on Tang, Recent development in analysis of persistent organic pollutants under the Stockholm Convention, Trends in Analytical Chemistry, Volume 45, Pages 48-66, 2013.
11. <http://www.pops.int>
12. David Megson, Eric J. Reiner, Karl J. Jobst, Frank L. Dorman, Mathew Robson, Jean-François Focant, A review of the determination of persistent organic pollutants for environmental forensics investigations, Analytica Chimica Acta, Volume 941, pages 10-25, 2016.
13. Jonathan O. Anderson, Josef G. Thundiyil, Andrew Stolbach, Clearing the Air: A Review of the Effects of Particulate

- Matter Air Pollution on Human Health, American College of Medical Toxicology, Volume 8, pages 166-177, 2012.
14. Ki-Hyun Kim, Ehsanul Kabir, Shamin Kabir, A review on the human health impact of airborne particulate matter, *Environment International* Volume 74, pages 136–143, 2015.
 15. Joellen Lewtas, Air pollution combustion emissions: Characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects, *science direct, Mutation Research* 636, pages 95–133, 2007.
 16. Iria Yebra-Pimentel, Ricardo Fernández-González, Elena Martínez-Carballo & Jesús Simal-Gándara, A Critical review about the Health Risk Assessment of PAHs and Their Metabolites in Foods, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Volume 55, pages 1383–1405, 2015.
 17. Nguyen-Duy Dat, Moo Been Chang, Review on characteristics of PAHs in atmosphere, anthropogenic sources and control technologies, *Science of the Total Environment*, Volume 608, pages 682-693, 2017.
 18. Benjamin A. Musa Bandowe, Hannah Meusel, Nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons (nitro-PAHs) in the environment – A review, *Science of the Total Environment*, Volume 581 –582, pages 237 –257, 2017.
 19. Oleksii Motorykin, Lisandra Santiago-Delgado, Diana Rohlman, Jill E. Schrlau, Barbara Harper, Stuart Harris, Anna Harding, Molly L. Kile, Staci L. Massey Simonich, Metabolism and excretion rates of parent and hydroxy-PAHs in urine collected after consumption of traditionally smoked salmon for Native American volunteers, *Science of the Total Environment*, Volume 514, pages 170-177, 2015.
 20. WHO/ICPS, Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons, *Environmental Health Criteria* 202, Geneva, 1998.
 21. Hussein I. Abdel-Shafy, Mona S.M. Mansour, A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation, *Egyptian Journal of Petroleum*, Volume 25, pages 107-123, 2016.
 22. B. Han, Z. Bai, Y. Liu, Y. You, J. Xu, J. Zhou, J. Zhang, C. Niu, N. Zhang, F. He, X. Ding, Characterizations, relationship, and potential sources of

- outdoor and indoor particulate matter bound polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a community of Tianjin, Northern China, *Indoor Air*, Volume 25, pages 320–328, 2015.
23. Shanshan Shi, Contributions of indoor and outdoor sources to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons indoors, *Building and Environment* Volume 131, pages 154–162, 2018.
24. Wei Du, Xinyue Li, Yuanchen Chen, Guofeng Shen, Household air pollution and personal exposure to air pollutant in rural China – A review, *Environmental Pollution*, Volume 237, pages 625-638, 2018.
25. Donald Mackay, Daryl Calcott, Partitioning and Physical Chemical Properties of PAHs, PAHs and Related Compounds, *The handbook of Environmental Chemistry*, 1st edition, Volume 3, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1998.
26. Janet Arey, Atmospheric Reactions of PAHs Including Formation of Nitroarenes, PAHs and Related Compounds, *The handbook of Environmental Chemistry*, 1st edition, Volume 3, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1998.
27. Janet Arey, Roger Atkinson, Photochemical Reactions of PAHs in the Atmosphere PAHs: An Ecotoxicological Perspective, John Wiley & Sons, Ltd., 2003.
28. Linke Ge, Guangshui Na, Chang-Er Chen, Jun Li, Maowei Ju, Ying Wang, Kai Li, Peng Zhang, Ziwei Yao, Aqueous photochemical degradation of hydroxylated PAHs: Kinetics, pathways, and multivariate effects of main water constituents, *Science of the Total Environment*, volume 547, pages 166-172, 2016.
29. Ana Isabel Barrado, Susana García, Enrique Barrado, Rosa María Pérez, PM_{2.5}-bound PAHs and hydroxy-PAHs in atmospheric aerosol samples: Correlations with season and with physical and chemical factors, *Atmospheric Environment*, Volume 49, pages 224-232, 2012.
30. Leticia Rey-Salgueiro, Elena Martínez-Carballo, Mercedes Sonia García-Falcón, Carmen González-Barreiro, Jesús Simal-Gándara, Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in infant foods, *Food Chemistry*, Volume 115, Issue 3, Pages 814-819, 2009.

31. Anderson K.E, Kadlubar F.F, Kulldorff M., Harnack L., Gross M., Lang , P., Barber C., Rothman N. and Sinha R. Dietary intake of heterocyclic amines and benzo[a] pyrene: associations with pancreatic cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, Volume 14, Issue 9, Pages, 2261–2265, 2005.
32. Anderson K.E, Kadlubar F.F, Kulldorff M., Harnack L., Gross M., Lang , P., Barber C., Rothman N. and Sinha R. Dietary intake of heterocyclic amines and benzo[a] pyrene: associations with pancreatic cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, vol. 1.
33. <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>
34. WHO, WHO guidelines for indoor air quality: selected pollutants, Denmark Copenhagen, 2010.
35. Ki-Hyun Kim, Shamin Ara Jahan, Ehsanul Kabir, Richard J.C. Brown, A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects, *Environment International*, Volume 60, Pages 71-80, 2013.
36. Alexandrov K., Rojas M. and Rolando Ch., "DNA Damage by Benzo(a)pyrene in Human Cells is Increased by Cigarette Smoke and Decreased by a Filter Containing Rosemary Extract, which Lowers Free Radicals", *Cancer Research*, vol. 66, no. 24, Pages 11938-11945, 2006.
37. Guengerich F.P., The 1992 Bernard B. Brodie Award Lecture. Bioactivation and detoxication of toxic and carcinogenic chemicals. *Drug Metabolism & Disposition*, vol. 21, no. 1, 1993, pp. 1–6.
38. Thakker D.R., Yagi H., Levin W., Wood A. W., Conney A. H. and Jerina D.M., Polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolic activation to ultimate carcinogens. In: Anders M.W., ed. *Bioactivation of Foreign Compounds*. Academic Press, New York, 1985, pp 177-24.
39. Palackal N.T., Lee S-H., Harvey R.G., Blair I.A. and Penning T.M., Activation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiol proximate carcinogens by human aldo-keto reductase (AKR1C) enzymes and their functional overexpression in human lung carcinoma (A549) cells. *The Journal of Biological Chemistry*, vol 277, no.27, 2002, pp. 24799–24808.

40. Jiang H., Gelhaus S.L., Mangal D., Harvey R.G., Blair I.A., Penning T.M., Metabolism of Benzo[a]pyrene in Human Bronchoalveolar H358 Cells Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *Chemical Research in Toxicology*, vol. 20,no. 9, 2007, pp. 1331-134.
41. Baird W.M., Hooven L., Mahaderan B., Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action, *Environmental and Molecular Mutagenesis* vol. 45, no. 2-3, 2005, pp. 106-114.
42. Darina Lankova, Katerina Urbancova, Radim J. Sram, Jana Hajslova, Jana Pulkrabova, A novel strategy for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon monohydroxylated metabolites in urine using ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem*, Volume 408, Pages 2515-2525, 2016.
43. Zheng Li, Lovisa C. Romanoff, Debra A. Trinidad, Nasira Hussain, Richard S. Jones, Erin N. Porter, Donald G. Patterson, Andreas Sjödin, Measurement of Urinary Monohydroxy Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Automated Liquid-Liquid Extraction and Gas Chromatography/Isotope Dilution High-Resolution Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, Volume 78, Issue 16, Pages 5744-5751, 2006.
44. Wolff R.K., Bond J.A., Sun J.D., Henderson R.F., Harkema J.R., Griffith W.C., Mauderly J.L. and McClellan R.O. Effects of adsorption of benzo[a]pyrene onto carbon black particles on levels of DNA adducts in lungs of rats exposed by inhalation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol 97, no 2, 1989, pp. 289–299.
45. Πολυχρονάκης, Ι. Μ. Μελέτη επαγγελματικών παραγόντων κινδύνου για την πρόκληση λευχαιμίας. Διδακτορική Διατριβή, ΕΚΠΑ, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, 2014.
46. Kumar V, Contran R and Robbins S., *Basic Pathology* 6th ed., Philadelphia, WB Saunders Co., 1997, pp. 373-376.
47. <http://medlabgr.blogspot.com/2015/02/leucocytes-wbc.html>
48. Χατζηγιάννης Στέφανος, Μαυρικάκης Μύρωνας, Μουντοκαλάκης Θεόδωρος, Αναστασίου Μαρία, Παγκάλης Γεράσιμος, Παπαδογιάννης Δημήτριος, Χαλεβελάκης Γεώργιος, 2002, *Παθολογία II*, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Αθήνα, Ελλάδα.

49. Horner M.J., Ries L.A.G., Krapcho M., Neyman N., Aminou R., Howlader N., Alterkruse S.F., Feuer E.J., Huang L., Mariotto A., Miller B.A., Lewis D.R., Eisner M.P., Stinchcomb D.G., and Edwards B.K., SEER Cancer Statistics Review (1975-2006), National Cancer Institute, Bethesda, 2008.
50. Harris N.L., Jaffe E.S., Diebold J., Muller-Hermelink H.K., Vardiman J., Lister T.A. and Bloomfield C.D., The World Health Organization Classification of Hematological Malignancies Report of the clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, Nov.1997. Modern Pathology, vol. 13, no. 2., 2000, pp. 193-20772.
51. Νακοπούλου Λ., Ανοσοϊστοχημεία, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 1999, pp. 82-97.
52. Λουκόπουλος, Δ. και Πολίτου, Μ. Μαθήματα Αιματολογίας, Κλινική Αιματολογία, Αιμόσταση, Μετάγγιση Αίματος. Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράμματα και Βοηθήματα. Αθήνα, 2015, σελ. 11 -25, 178.
53. Hall J.E. and Guyton A. C., Textbook of Medical Physiology, Elsevier Saunders, 11th Edition, 2006, Chapter 32, pp.419-436.
54. Ζαρογιάννης, Σ. Γ. Αίμα-Ερυθρά & Λευκά Αιμοσφαίρια. Εργαστήριο Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Ακαδημαϊκό Έτος 2016.
55. Τσουφάκης Γ., Γαλακτική Οξέωση, Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής, vol. 18, no. 5, 2001, pp. 451-456.
56. Tietz NW, Fundamentals of Clinical Chemistry, 4th ed., WB Saunders., 1992.
57. Schumann G., Bonora R., Ceriotti F., Clerc-Renaud P., Féraud G., Ferrero C.A., Franck P. F. H., Gella F-J., Hoelzel W., Jørgensen P.J., Kanno T., Kessner A., Klauke R., Kristiansen N., Lessinger J-M., Linsinger T.P.J, Misaki H., Panteghini M., Pauwels J., Schiele F., Schimmel H.G., Vialle A., Weidemann G. and Siekmann L., IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37°C. Part 3. Standard Operating Procedure (SOP) for the Measurement of Catalytic Concentration of

- Lactate Dehydrogenase, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, vol. 40, no. 6, 2002, pp. 643-648.
58. Dianne L. Poster, Michele M. Schantz, Lane C. Sander, Stephen A. Wise, Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods, Analytical and Bioanalytical Chemistry, October 2006, Volume 386, Issue 4, pp 859–881.
59. Μαγνησάλη Παρασκευή, Ανάπτυξη μεθοδολογίας αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρία μάζας (GC-MS) για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό στεροειδών ορμονών στον ορό: εφαρμογή στην διάγνωση ενδοκρινοπαθειών, Διδακτορική διατριβή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ). Σχολή Επιστημών Υγείας. Τμήμα Ιατρικής. Τομέας Μορφολειτουργικός. Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, 2009.
60. M.T. Galceran, E. Moyano, J.M. Poza, Pentafluorobenzyl derivatives for the gas chromatographic determination of hydroxy-polycyclic aromatic hydrocarbons in urban aerosols, Journal of Chromatography A, Volume 710, Issue 1, Pages 139-147, 1995.
61. Bernd R. T. Simoneit, Xinhui Bi, Daniel R. Oros, Patricia M. Medeiros, Guoying Sheng, Jiamo Fu, Phenols and Hydroxy-PAHs (Arylphenols) as Tracers for Coal Smoke Particulate Matter: Source Tests and Ambient Aerosol Assessments, Environmental Science & Technology, Volume Issue 21, Pages 7294–7302, 2007.
62. Laura Campo, Federica Rossella, Silvia Fustinoni, Development of a gas chromatography/mass spectrometry method to quantify several urinary monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in occupationally exposed subjects, Volume 875, Issue 2, Pages 531-540, 2008.