

lek. med. Anetta Karwacka

specjalista ginekolog-położnik

„Wpływ narażenia na powszechnie występujące związki
środowiskowe zaburzające funkcję endokrynną na rezerwę
jajnikową”

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor:

dr hab. med. Joanna Jurewicz, prof. IMP

Kierownik Pracowni Środowiskowych Zagrożeń Reprodukcyjnych

Zakład Epidemiologii Środowiskowej

Instytut Medycyny Pracy w Łodzi

Łódź 2018

Serdecznie dziękuję

Mojej Promotor,

Pani Dr hab. med. Joannie Jurewicz,

za inspirację, wszechstronną pomoc, życzliwość, wiarę i wsparcie wniesioną w powstanie
tej pracy

mojemu mężowi za wiarę i wyrozumiałość

Spis treści

1.	Definicje i użyte skróty	6
2.	Wstęp	11
3.	Czynniki środowiskowe zaburzające funkcję endokrynną (EDCs), na rezerwa jajnikowa	15
3.1	Narażenie na czynniki środowiskowe zaburzające funkcję endokrynną	15
3.2	Dopuszczalna ekspozycja na wybrane EDCs	19
3.3	Rozwój gonady żeńskiej i ustanowienie rezerwy jajnikowej	23
3.4	Mechanizm działania wybranych związków środowiskowych zaburzających funkcję endokrynną na gonadę żeńską i rezerwę jajnikową kobiet	28
3.5	Stan wiedzy o wpływie wybranych czynników środowiskowych zaburzających funkcję endokrynną na potencjał rozrodczy kobiet i rezerwę jajnikową	38
4.	Sformułowanie problemu badawczego	44
5.	Cel pracy	47
6.	Materiał i metody	48
6.1	Badana populacja	48
6.1.1	Kryteria doboru kobiet do badania	48
6.2	Model badania epidemiologicznego	49
6.3	Metodyka pozyskiwania informacji o badanej populacji	49
6.3.1	Wywiad kwestionariuszowy	49
6.3.2	Ocena poziomu stresu	50
6.3.3	Ocena diety	51

6.3.4	Ocena aktywności fizycznej	52
6.3.5	Ocena środowiska pracy	52
6.3.6	Pomiary antropometryczne	53
6.4	Ocena rezerwy jajnikowej badanych kobiet	53
6.5	Ocena ekspozycji na wybrane czynniki środowiskowe	54
6.6	Analiza statystyczna	55
6.7	Realizacja badania	57
7.	Wyniki	59
7.1	Ogólna charakterystyka badanej populacji	59
7.2	Ocena rezerwy jajnikowej	62
7.3	Stężenia wybranych czynników środowiskowych zaburzających funkcję endokrynną	62
7.4	Korelacje pomiędzy badanymi czynnikami środowiskowymi	68
7.5	Ocena zależności między narażeniem na wybrane czynniki środowiskowe, a rezerwą jajnikową badanych kobiet	71
8.	Dyskusja	78
8.1	Ocena rezerwy jajnikowej badanych kobiet	78
8.2	Ocena narażenia na badane czynniki środowiskowe	83
8.3	Wyniki przeprowadzonych analiz	86
8.4	Ograniczenia zastosowanych metod badawczych	90
9.	Wnioski	95
10.	Piśmiennictwo	96
11.	Streszczenie	121
12.	Summary	135
13.	Załączniki	148

13.1	Informacje dla osób objętych badaniem	148
13.2	Formularz świadomej zgody	149
13.3	Ankieta: Wpływ czynników środowiskowych na płodność	150
13.4	Kwestionariusz do Subiektywnej Oceny Pracy	160
13.5	Kwestionariusz stresu Cohena	163
13.6	Ankieta żywieniowa	165
13.7	Kwestionariusz Aktywności Ruchowej	168

1. Definicje i użyte skróty

3-PBA – (z ang. *3-Phenoxybenzoic acid*), kwas 3 fenoksybenzoesowy

ADI – (z ang. *Admissible Daily Intakes*), dopuszczalna dzienna dawka

AFC – (z ang. *Antral Follicular Count*), liczba pęcherzyków antralnych

AHR – (z ang. *Aryl Hydro-carbon Receptor*), receptor arylowo-węglowodorowy

AMH – (z ang. *Anti-Müllerian Hormone*), hormon anty-Müllerowski

ANM – (z ang. *Age of Natural Menopause*), wiek naturalnej menopauzy

AR – (z ang. *Androgen Receptor*), receptor androgenowy

ART – (z ang. *Assisted Reproduction Technologies*), technologie wspomaganego rozrodu

ASRM – (z ang. *American Society for Reproductive Medicine*), Amerykańskie

Towarzystwo Medycyny Rozrodu

BAX – (z ang. *Proteine encoded by BAX gene*), białko kodowane przez gen BAX z

rodziny białek regulujących apoptozę

BMI – (z ang. *Body Mass Index*), index masy ciała

BP – (z ang. *Buthtylparaben*), butyl-paraben, paraben butylowy

BPA – (z ang. *Bisphenol A*), bisfenol A

CDCCA – (z ang. *cis-(Dichlorovinyl)dimethylcyclopropanecarboxylic Acid*), kwas cis (2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowy

CI – (z ang. *Confidence Interval*), przedział ufności

cis-DBCA – (z ang. *cis-(Dibromovinyl)dimethylcyclopropanecarboxylic Acid*), kwas cis (2,2-dibromowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowy

Coef – (z ang. *Coefficient*), współczynnik korelacji

CF – (z ang. *Confounding Factor*), czynnik zakłócający- zmienna, stanowiąca czynnik ryzyka danego efektu zdrowotnego, która nie może być uznana, jako jedyne ogniwo

pośrednie w procesie prowadzącym do wystąpienia tego efektu zdrowotnego i której rozkład w grupie obciążonej danym czynnikiem i w grupie odniesienia jest różny

Cr – (z ang. *Creatinine*), kreatynina

DBCA – (z ang. *(Dibromovinyl)dimethylcyclopropanecarboxylic Acid*), kwas cis-(2,2-dibromowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowy

DCCA – (z ang. *(Dichlorovinyl)dimethylcyclopropanecarboxylic Acid*), kwas (2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowy

Dmc1 - (z ang. *DNA Meiotic Recombinase 1*), gen kodujący rekombinazę meiotyczną

DNA 1

DNA – (z ang. *Deoxyribonucleic Acid*), kwas deoksyrybonukleinowy

E₂ – (z ang. *Estradiol*), estradiol

EDCs – (z ang. *Endocrine Disrupting Chemicals*), substancje zaburzające funkcję endokrynną

EFSA – (z ang. *European Food Safety Authority*), Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności

ELISA – (z ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), test immunoenzymatyczny

EP – (z ang. *Ethylparaben*), etyl-paraben, paraben etylowy

EPA – (z ang. *U.S. Environmental Protection Agency*), Agencja Ochrony Środowiska w Stanach Zjednoczonych

ER – (z ang. *Estrogen Receptor*), receptor estrogenowy

ER β – (z ang. *Estrogen Receptor- β*), jądrowy receptora estrogenowy beta

ER α – (z ang. *Estrogen Receptor- α*), jądrowy receptora estrogenowy alfa

ERR γ – (z ang. *Estrogen-Related Receptor γ*), receptor zależny od estrogenu gamma

ESHRE – (z ang. *European Society of Human Reproduction and Embryology*),

Europejskie Towarzystwo Medycyny Rozrodu i Embriologii

FDA – (z ang. *Food and Drug Administration*), Agencja Żywności i Leków

FFQ – (z ang. *Food Frequency Questionnaire*), kwestionariusz dotyczący częstości spożywania wybranych produktów

FIGO – (z ang. *International Federation of Gynecologists and Obstetricians*), Międzynarodowa Federacja Ginekologów i Położników

FSH – (z ang. *Follicle-Stimulating Hormone*), hormon folikulotropowy

GnRH – (z ang. *Gonadotropin-Releasing Hormone*), gonadoliberyna

GPR30 – (z ang. *G Protein-coupled Receptor 30*), receptor sprzężony z białkiem G 30

H1f00 – (z ang. *Oocyte-Specific Linker Histone H1*), histon H1 specyficzny dla oocyty

HLH – (z ang. *Basic Helix-Loop-Helix*), czynniki transkrypcyjne specyficzne dla komórek germinalnych

iBuP – (z ang. *Isobuthylparaben*), isobutyl-paraben, paraben izobutylový

ICSI – (z ang. *Intracytoplasmic Sperm Injection*), doplazmatyczne wstrzyknięcie plemnika

IUI – (z ang. *Intrauterine Insemination*), inseminacja wewnątrzmaciczna

IVF – (z ang. *In Vitro Fertilization*), zapłodnienie in vitro

KISS1 – (z ang. *Kisspeptin gene*), gen kodujący kisspeptynę

Lhx8 – (z ang. *official symbol of LIM homeobox 8*), oficjalny symbol dla rodziny białek LIM homeobox 8

LIM 8 – (z ang. *LIM homeobox 8*), rodzina białek, odpowiedzialnych za odwzorowywanie i różnicowanie różnych tkanek, specyficzny dla komórek germinalnych, kodujący czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za różnicowanie tkanek w tym foliculogenezę

LOD – (z ang. *Limit of Detection*), granica wykrywalności

MEPS – (z ang. *Micro-Extraction by Packed Syringe*), półautomatyczna mikroekstrakcja

MET – (z ang. *Metabolic Equivalent Task*), wydatek energetyczny

MCF-7 – (z ang. acronym of *Michigan Cancer Foundation-7*), linia komórkowa pochodząca od ludzkiego raka piersi

MP – (z ang. *Methylparaben*), metyl-paraben, paraben metylowy

mRNA – (z ang. *Messenger Ribonucleic Acid*), informacyjny kwas rybonukleinowy

MRSA – (z ang. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*), oporne na metycylinę *Staphylococcus aureus*

NGFs – (z ang. *Non-Growing Follicles*), nierosnące pęcherzyki

NOBOX – (z ang. *Newborn Ovary Homeobox Gene*), gen kodujący białka warunkujące oogenezę

OP – (z ang. *Organophosphate Pesticide*), pestycydy fosfoorganiczne

OR – (z ang. *Odds Ratio*), iloraz szans

OSHA – (z ang. *Occupational Safety and Health Administration*), Agencja Bezpieczeństwa i Higieny Pracy

PE – (z ang. *Pre-Eclampsia*), preeklampsja

PCB – (z ang. *Polychlorinated Biphenyl*), polichlorowane bifenylole

PCW – (z ang. *PVC, Polyvinyl Chloride*), polichlorek winylu, stosowany do wytwarzania tworzyw sztucznych

PGCs – (z ang. *Primordial Germ Cells*), pierwotne komórki płciowe

PIH – (z ang. *Pregnancy Induced Hypertension*), nadciśnienie indukowane ciążą

POI – (z ang. *Premature Ovarian Insufficiency*), przedwczesna niewydolność jajników

PP – (z ang. *Propylparaben*), propyl-paraben, paraben propylowy

PSS – (z ang. *Perceived Stress Scale*), skala odczuwanego stresu

Rec8 – (z ang. *Meiotic Recombination protein REC*), gen kodujący rekombinazę meiotyczną

RfD – (z ang. *Reference Doses*), dawki referencyjne przy ekspozycji

ROS – (*ang. Reactive Oxygen Species*), reaktywne formy tlenu

RyR – (*z ang. Ryanodine Receptor*), receptor rianodynowy

SCCS – (*z ang. European Scientific Committee on Consumer Safety*), Unijny Komitet Naukowy ds. Produktów Konsumenckich

Scp3 – (*z ang. the Meiotic Specific Synaptonemal Complex Protein SCP3*), specyficzny dla mejozy kompleks synaptonemalny 3

SD – (*z ang. Standard Deviation*), odchylenie standardowe

SERM – (*z ang. Selective Estrogen Receptor Modulator*), selektywny modulator receptora estrogenowego

SIS – (*z ang. Selected Ion Storage*), tryb przechowywania wybranego jonu

Sohl2 – (*z ang. Spermatogenesis and Oogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix 2*), gen kodujący specyficzne czynniki transkrypcyjne HLH odpowiedzialne za spermatogenezę i oogenezę

Stra8 – (*z ang. Stimulated By Retinoic Acid 8*), gen kodujący białko receptorowe dla kwasu retinowego, odpowiedzialnego za inicjację mejozy w spermatogenezie i oogenezie

SULT – (*z ang. Human Estrogen Sulfotransferase*), sulfotransferaza estrogenowa

TH – (*z ang. Thyroid Hormones*), hormony tarczycy

TCL – (*z ang. Triclosan*), triklosan

TDCCA – (*z ang. trans-(Dichlorovinyl)dimethylcyclopropanecarboxylic Acid*), kwas trans (2,2-dichlorowinylo) 2,2-dimetylocyclopropano karboksylowy

TDI – (*z ang. Tolerable Daily Intake*), dzienna dawka tolerowana

TFR – (*z ang. Total Fertility Rate*), średnia liczba urodzeń na kobietę

WHO – (*z ang. World Health Organization*), Światowa Organizacja Zdrowia

WHR – (*z ang. Waist to Hip Ratio*), stosunek biodra-talia

2. Wstęp

Całkowity wskaźnik płodności (total fertility rate (TFR) - średnia liczba urodzeń na kobietę) w krajach wysokorozwiniętych w XXI wieku stale się obniża. Dla Europy, pomiędzy rokiem 2010 a 2015, TFR wynosił 1,6, a dla Stanów Zjednoczonych Ameryki 1,85 (World Population Prospect by UN, 2017). W Polsce odnotowano spadek TFR pomiędzy rokiem 1960 a 2015 z poziomu 3,0 do 1,3 i jest on jednym z najniższych w Europie (The World Bank, 2017). Wg danych z GUS, w okresie od roku 1980 do 2013, poza spadkiem poziomu płodności odnotowano przemieszczanie się wzorca płodności w okresie rozrodczym w kierunku starszych grup wiekowych. Najwyższe natężenie płodności przesunęło się z grupy wieku 20–24 lata do grupy 25–29 lat (Rządowa Rada Ludnościowa, 2014). Wynika to z faktu opóźniania prokreacji dzięki powszechności dostępu metod kontroli urodzeń oraz ambicji zawodowych kobiet, pokoleniowej zmianie modelu rodziny, warunków socjoekonomicznych wpływających na decyzje o mniejszej liczbie potomstwa, ale również z faktu wzrostu odsetka par nieplodnych.

Nieplodność jest definiowana, jako brak ciąży pomimo regularnych stosunków płciowych (minimum 3 w tygodniu), utrzymywanych powyżej 12 miesięcy bez stosowania jakichkolwiek metod antykoncepcyjnych. Odsetek par nieplodnych w krajach rozwiniętych wzrósł ponad dwukrotnie w ostatnim półwieczu. Na początku XXI wieku nieplodność w krajach rozwiniętych dotyczyła 15% par (Fritz i Speroff, 2011), podczas gdy w latach 60 XX wieku było to 7–8% par. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) określa nieplodność, jako chorobę społeczną. Dramatyczny wzrost liczby małżeństw leczących się z powodu nieplodności spowodował, że zdrowie reprodukcyjne zwłaszcza wpływ na nie czynników środowiskowych, stał się ważną kwestią zdrowia publicznego. Na ten stan rzeczy ma wpływ wiele czynników, takich jak: coraz późniejszy wiek kobiet, w którym podejmują decyzję o prokreacji; wpływ czynników stylu życia, jak i coraz częściej

postulowany wpływ czynników środowiskowych, zwłaszcza powszechnie występujących związków chemicznych zaburzających funkcję endokrynną. Liczne badania wskazują, że narażenie na szeroko rozpowszechnione w środowisku substancje, zwane egzogennymi związkami endokrynnymi, inaczej substancjami zaburzającymi funkcjonowanie układu hormonalnego, określanymi po angielsku jako „Endocrine Disruptors” lub „Endocrine Disrupting Chemicals” (EDCs) negatywnie wpływa na zdrowie reprodukcyjne zwierząt i ludzi, oraz jest powiązane z niektórymi chorobami, w tym również z niepłodnością (Colborn i wsp., 1993). Amerykańskie Towarzystwo Medycyny Rozrodu (American Society for Reproductive Medicine), Światowa Organizacja Zdrowia, Międzynarodowa Federacja Ginekologów i Położników (International Federation of Gynecologists and Obstetricians – FIGO) oraz Międzynarodowe Towarzystwo Endokrynologiczne (The Endocrine Society) wydało oficjalną deklarację, że czynniki środowiskowe mogą negatywnie wpływać na zdrowie reprodukcyjne (Di Renzo i wsp., 2015; Gore i wsp., 2015). Polskie Towarzystwo Endokrynologiczne również wydało opinię na temat związków z grupy „endocrine disruptor chemicals” (EDCs), w opinii Autorów konieczne jest przeprowadzenie w Polsce badań epidemiologicznych pozwalających na ocenę związku pomiędzy ekspozycją na EDCs, a występowaniem zaburzeń czynności gruczołów wydzielania wewnętrznego (Rutkowska i wsp., 2015). Związki te, chociaż rzadko prowadzą do nieodwracalnej bezpłodności, mogą znacząco wydłużyć czas oczekiwania na ciążę (Matthews i Hamilton, 2009). Uptywający czas staje się kluczowy, gdy decyzje o prokreacji są odraczane.

W odróżnieniu od warunków społeczno-ekonomicznych, zależność pomiędzy powszechnie występującymi czynnikami środowiskowymi, a płodnością kobiet, jest stosunkowo mało poznana. Wynika to z faktu, że skutki działania takich czynników środowiskowych są trudno obserwowalne i możliwe do oszacowania wyłącznie za pomocą

badania posługujących się właściwymi biomarkerami narażenia. Większość z dostępnych danych literaturowych odnosi się do wpływu poszczególnych czynników środowiskowych na płodność mężczyzn, pomimo tego, że kobiety często są narażone na wyższe stężenie czynników środowiskowych, zwłaszcza parabenów z uwagi na częstsze stosowanie różnego rodzaju produktów kosmetycznych. Dodatkowo, ze względu na trudności w obiektywnej ocenie płodności kobiet niewiele jest badań analizujących ten temat.

Niewątpliwie markerami potencjału rozrodczego u kobiet jest wiek, rezerwa jajnikowa oraz funkcjonowanie układu podwzgórze-przysadka-jajnik. Do oceny rezerwy jajnikowej powszechnie stosuje się ocenę ultrasonograficzną liczby pęcherzyków antralnych AFC (ang. Antral Folicle Count) i badanie stężenia FSH (hormon folikulotropowy) oceniane w pierwszych dniach cyklu miesięczkowego (2-4 dzień cyklu), oraz pomiar stężenia AMH (hormon anty-Müllerowski). Badanie stężenia AMH jest bardziej czułym markerem rezerwy jajnikowej niż badanie FSH (Barbakadze i wsp., 2015). Baird i Steiner (2012) sugerują, że stężenie tego hormonu może być stosowane, jako niezależny wskaźnik oceny płodności kobiet w badaniach wpływu czynników środowiskowych.

Wzrost światowej aktywności przemysłowej doprowadził do zwiększenia ekspozycji ludzi na szeroką gamę nowoczesnych substancji chemicznych, takich jak: ftalany, parabeny, bisfenol A, triklosan i wiele innych. Związki te wobec masowej produkcji użytkowej znalazły się powszechnie w środowisku. Narażenie następuje poprzez kontakt z tymi związkami w pożywieniu, wodzie, powietrzu, poprzez kontakt z plastikami czy kosmetykami. Związki te występują w produktach codziennego użytku takich jak: plastikowe butelki, puszki z żywnością, detergenty, kosmetyki, zabawki, czy pestycydy. Badane związki chemiczne zalicza się do szerokiej grupy nazwanej w piśmiennictwie angielskim „Endocrine Disrupting Chemicals” (ECDs). Są to związki, które wykazują zdolność interakcji z układem hormonalnym zakłócając jego prawidłowe działanie,

prowadząc do zaburzenia syntezy, funkcji, przechowywania i/lub metabolizmu hormonów a także mogą mieć niekorzystny wpływ na płodność kobiet i mężczyzn (Colborn i wsp., 1993) oraz mogą odgrywać rolę w patogenezie niepłodności (Crain i wsp., 2008).

Większość dostępnych danych z literatury ocenia wpływ ekspozycji wybranych egzogennych związków endokrynnych w odniesieniu do wyników ciąży lub płodności mężczyzn. Ze względu na fakt, że płodność u kobiet jest trudna do oceny i może być potwierdzona jedynie przez uzyskanie ciąży, tylko kilka badań skupiło się na kwestii narażenia na czynniki środowiskowe i ich potencjalnego wpływu na płodność kobiet.

3. Czynniki środowiskowe zaburzające funkcję endokrynną (EDCs)

a rezerwa jajnikowa

3.1 Narażenie na czynniki środowiskowe zaburzające funkcję endokrynną

Związki z grupy EDCs takie jak: bisfenol A, triklosan, parabeny czy syntetyczne pyretroidy są coraz powszechniej stosowane w większości branż przemysłu przede wszystkim w przemyśle rolniczym, leśniczym, w hodowli zwierząt, przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym. Wykorzystywane są w produkcji i do pakowania żywności i napojów, występują w produktach codziennego użytku takich jak: kosmetyki, mydła, szampony, dezodoranty, pasty do zębów i inne produkty do pielęgnacji ciała, zabawki, leki i sprzęt medyczny, detergenty i środki owadobójcze i chwastobójcze. Narażenie następuje poprzez kontakt z tymi związkami w pożywieniu, wodzie, powietrzu, poprzez kontakt ze skórą i śluzówkami (Harte i wsp., 1991).

Narażenie na bisfenol A (BPA)

Bisfenol A (BPA) jest jednym z powszechnie wytwarzanych związków chemicznych na świecie. Globalna produkcja BPA w 2003 roku wyniosła 2 214 000 ton, przy oczekiwanym wzroście popytu o 6-10% rocznie (Burrige, 2003). Jest on stosowany do produkcji materiałów obecnych w wielu produktach konsumenckich: poliwęglanowe butelki z tworzyw sztucznych dla niemowląt, butelki do wody, żywice epoksydowe wykorzystywane do lakierowania wewnętrznych powierzchni pojemników oraz puszek na żywność i na napoje, rur wodociągowych. BPA jest obecny również w niektórych wypełniaczach i kompozytach dentystycznych (Brede i wsp., 2003). Powtarzająca się ekspozycja produktów zawierających BPA na światło i ciepło, kontakt z środkami czyszczącymi i starzenie się produktu może powodować zwiększenie przedostania się BPA

do napoi i do żywności (Howdeshell i wsp., 2003; Vandenberg i wsp., 2009). Bisfenol A obecny jest również w wodzie powierzchniowej (Klečka i wsp., 2009), w glebie, w wyniku nawadniania ściekami (Chen i wsp., 2011), w powietrzu, w wyniku spalania odpadów gospodarstw domowych i elektronicznych (Fu i Kawamura, 2010) oraz produkcji żywic (Rudel i wsp., 2001).

Ekspozycja na BPA może wystąpić drogą pokarmową, wdychanie i wchłanianie przez skórę. BPA wykryto w różnych płynach biologicznych, w tym w moczu, surowicy, ślinie (Calafat i wsp., 2005), płynie pęcherzykowym (Lenie i wsp., 2008), w mleku matki (Sun i wsp., 2004), krwi pępowinowej i w płynie owodniowym (Ikezuki i wsp., 2002).

Narażenie na triklosan

Triklosan (TCL) jest to aromatyczny organiczny związek chemiczny z grupy chlorowanych fenoli, stosowany, jako środek przeciwgrzybiczy i bakteriobójczy. Ma postać białego krystalicznego proszku o charakterystycznym, słabym zapachu fenolu. Triklosan jest powszechnie stosowany w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym. Wykorzystywany jest w produkcji past do zębów, mydła do rąk, mydła do ciała, żeli pod prysznic i dezodorantów. Jest ponadto skutecznie stosowany do zwalczania drobnoustrojów, takich jak oporne na metycylinę *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Brady i wsp., 1990; Cookson i wsp., 1991). Triklosan jest powszechnie stosowany do produkcji środków do prania i do mycia chirurgicznego rąk (Boyce i Pittet, 2002) oraz dezynfekcji skóry przed zabiegiem chirurgicznym celem eliminacji MRSA u nosicieli (Wilcox i wsp., 2003). Triklosan jest wykorzystywany również w produkcji stentów moczowodowych (Knudsen i wsp., 2005), szwów chirurgicznych (Justinger i wsp., 2009) oraz celem prewencji zakażenia przeszczepu (Cakmak i wsp., 2009).

Triklosan skutecznie zapobiega nadmiernemu rozwojowi bakterii na skórze ludzkiej, zmniejsza ryzyko infekcji, zapobiega przykremu zapachowi, chroni przed infekcjami po zabiegach dentystycznych. Dodatek triklosanu do produktów codziennego użytku, takich jak pasty do zębów, płyny do płukania ust, mydła, dezodoranty czy inne kosmetyki ma na celu zapewnienie działania antyseptycznego (Rodricks i wsp., 2010).

TCL może być wchłaniany drogą doustną, skórą i wziewną. Droga pokarmowa odgrywa jednak znaczącą rolę w przypadku ekspozycji na triklosan (Rodricks i wsp., 2010). Stężenia triklosanu wykryto we krwi, w mleku, moczu, tkance tłuszczowej i wątrobie (Allmyr i wsp., 2006; Calafat i wsp., 2008; Geens i wsp., 2012).

Narażenie na parabeny

Parabeny to estry (np. metylowy, etylowy, propylowy, butylowy, izobutyłowy i benzyłowy) kwasu p-hydroksybenzoesowego. Substancje te przyjmują postać drobnych bezbarwnych i bezzapachowych kryształków. Parabeny są grupą związków chemicznych o właściwościach przeciwbakteryjnych i konserwujących, powszechnie stosowanych w produktach do pielęgnacji ciała, farmaceutykach i żywności (Andersen, 2008; National Toxicology Program, 2008). Są obecne w balsamach do nawilżania ciała, kremach do twarzy, tuszach do makijażu, pomadkach do ust, mydłach do rąk, szamponach, odżywkach do włosów, dezodorantach i niektórych produktach spożywczych (Yazar i wsp., 2011; Witorsch i wsp., 2010; Wang i wsp., 2006). Ich powszechne użycie wynika z faktu, że związki te mają niską toksyczność i niewysokie koszty produkcji. Przeciwbakteryjna aktywność parabenów zwiększa się wraz z wydłużeniem łańcucha alkilowego (np. butyl-paraben (BP) > propyl-paraben (PP) > metyl-paraben (MP)) (Byford i wsp., 2002; Routledge i wsp., 1998; Vo i wsp., 2010).

Najczęściej stosowane w kosmetykach i żywności są metyl- i propyl-paraben ze względu na działanie synergistyczne tych związków (Andersen, 2008).

Ekspozycja na parabeny może wystąpić przez spożycie, wdychanie lub absorpcję przez skórę (Moos i wsp., 2015). Po wchłonięciu, parabeny nie gromadzą się w organizmie, ale są metabolizowane przez esterazę i w postaci skoniugowanej wydalone z moczem, żółcią i odchodami (Golden i wsp., 2005). Metabolity parabenów w moczu są wiarygodnymi biomarkerami ekspozycji (Ye i wsp., 2006).

Narażenie na syntetyczne pyretroidy

Najczęściej stosowanymi pyretroidami są allometryna, bifentryna, cyflutryna, lambda cyhalotryna, cypermetryna, deltametryna, permetryna, d-fenotryna, resmetryna i tetrametryna (Maund i wsp., 2001). Związki te, w konsekwencji wprowadzenia zakazu lub ograniczeń stosowania insektycydów hamujących cholinoestery, są powszechnie stosowane od ponad 20 lat w celu zwalczania owadów - szkodników w rolnictwie (Maund i wsp., 2001) i stały się coraz bardziej rozpowszechnione (Luo i Zhang, 2011; Feo i wsp., 2010). Pyretroidy zdominowały rynek środków owadobójczych, ze względu na wysoką skuteczność, szerokie spektrum działania, niską toksyczność zarówno u ssaków i ptaków oraz biodegradację (Pap i wsp., 1996).

Światowa Organizacja Zdrowia uznała, że rozpylanie syntetycznych pyretroidów samolotami celem kontroli zakażeń, jest bezpieczne. Pyretroidy, uznane, jako nieszkodliwe, są obecnie powszechnie stosowane w środowiskach miejskich (Amweg i wsp., 2005) do zwalczania owadów i szkodników na dużych przestrzeniach krajobrazowych miast.

Ponadto są stosowane w rolnictwie, leśnictwie, ogrodnictwie, zakładach opieki zdrowotnej, są czynnymi chemicznie składnikami wielu produktów stosowanych

do zwalczania owadów w gospodarstwach domowych (Feo i wsp., 2010). Znajdują się one w detergentach, szamponach, lekarstwach stosowanych w leczeniu świerzbu i wszawicy, ponadto permetryna jest powszechnie używana do impregnowania tkanin (np. dywany, koce, mundury), jako środek odstrasżający stawonogi.

Ich stężenia w produktach leczniczych i biobójczych są niejednokrotnie wyższe niż w środkach ochrony roślin. W Polsce dopuszczonych jest do obrotu kilkadziesiąt preparatów owadobójczych zawierających syntetyczne pyretroidy.

Narażenie środowiskowe populacji ogólnej wynika głównie ze spożywania pokarmów skażonych pyretroidami, inhalacji lub absorpcji przez skórę pyretroidów zawartych w środkach do zwalczania szkodników stosowanych w pomieszczeniach mieszkalnych, biurowych, zakładach opieki zdrowotnej, ogrodach, skwerach, parkach. Konsumpcja świeżych owoców i warzyw również wiąże się z wyższą ekspozycją (Fortes i wsp., 2013; Riederer i wsp., 2008). Są one powszechnie wykrywane w próbkach kurzu i powierzchni w gospodarstwach domowych, w których stosuje się pestycydy (Lu i wsp., 2013; Trunnelle i wsp., 2013). Do kontaktu z pyretroidami dochodzi podczas leczenia zwierząt domowych, kontaktu ze skażonymi ubraniami roboczymi, mundurami lub dywanami i innymi tekstyliami zaimpregnowanymi pyretroidami (Rossbach i wsp., 2010, 2014).

3.2 Dopuszczalna ekspozycja na wybrane EDCs

European Food Safety Authority (EFSA) w roku 2015 określiło, że ekspozycja środowiskowa na **BPA** nie niesie za sobą ryzyka w żadnej grupie wiekowej, pomimo istnienia alarmujących publikacji dotyczących niekorzystnego wpływu BPA na zdrowie. Jednocześnie ta sama organizacja zmniejszyła tzw. dzienną dawkę tolerowaną (Tolerable Daily Intake, TDI) z 50 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{m}\cdot\text{c}/\text{dzień}$ na 4 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{m}\cdot\text{c}/\text{dzień}$. Średnia dawka dopuszczalnej ekspozycji na BPA określona przez WHO dla dorosłych wynosi

0,01 do 0,04 $\mu\text{g}/\text{kg m.c}/\text{dzień}$ i jest wielokrotnie niższa niż określona przez EFSA (WHO, 2011). Agencja Żywności i Leków, FDA (ang. Food and Drug Administration) określiła szacunkowe ryzyko toksyczności dla człowieka na 5 $\text{mg}/\text{kg m.c}/\text{dzień}$, tzw. najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się działań ubocznych (FDA, 2012). Badania przeprowadzone in vivo na zwierzętach wykazały jednak efekt toksyczny przy ekspozycji na mniejsze dawki niż 5 $\text{mg}/\text{kg m.c}/\text{dzień}$. Biorąc pod uwagę te doniesienia, FDA w 2012 roku zakazało produkcji butelek dla niemowląt zawierających BPA, równocześnie określając pozostałe artykuły zawierające BPA, jako bezpieczne dla zdrowia. Natomiast EFSA, FDA, German Society for Toxicology, Health Canada and Japanese National Institute of Advanced Industrial Science and Technology nie widzą przeciwwskazań do stosowania BPA w materiałach mających kontakt z żywnością, pomimo wspomnianych wcześniej doniesieniach o toksyczności wśród zwierząt.

Triklosan został wymieniony w dyrektywie Europejskiej Wspólnoty Kosmetycznej z 1986 roku (European Community Cosmetics, dyrektywa 76/768/EWG) regulującej stosowanie triklosanu, jako środka konserwującego w produktach kosmetycznych. Dopuszczalne stężenie triklosanu w kosmetykach nie może przekraczać 0,3%. W roku 2010 Unijny Komitet Naukowy ds. Produktów Konsumenckich (SCCS) wydał opinię, że maksymalna koncentracja TCL w poszczególnych produktach takich jak w pasty do zębów, mydła do rąk, mydła do ciała, żele pod prysznic i dezodoranty wynosząca 0,3% jest z toksykologicznego punktu widzenia bezpieczna (SCCS, 2010).

W Europie triklosan nie jest dopuszczony do stosowania jako konserwant żywności (EFSA, 2004). Pomimo wprowadzenia tych ograniczeń, potwierdzono skażenie wody pitnej triklosanem (Kantiani i wsp., 2008). Ponadto, faktyczna zawartość TCL waha się od 0,1% do 1% w produktach do pielęgnacji ciała i może sięgać aż 1% w produktach stosowanych w lecznictwie, takich jak rękawiczki, płyny do mycia i dezynfekcji stosowane

w szpitalach, gdzie wymagana jest silna aktywność bakteriobójcza. Ze względu na jego popularne zastosowanie, wykryto pozostałości środowiskowe na poziomie mikrogramów na litr, co sugeruje rozległe skażenie ekosystemów wodnych i bioakumulację triklosanu w środowisku (Ahn i wsp., 2008).

Prawo UE uregulowało stosowanie **parabenów** w kosmetykach. Jeden lub kilka z nich może być obecne w danym produkcie, natomiast dopuszczalne maksymalne całkowite stężenie parabenów w produktach konsumpcyjnych nie powinno przekraczać 8 g parabenów/kg produktu kosmetycznego, przy stężeniu poszczególnych parabenów poniżej 4 g/kg produktu. Natomiast Unijny Komitet Naukowy ds. Bezpieczeństwa Produktów Konsumenckich (European Scientific Committee on Consumer Safety, SCCS) wydał opinię w 2011 (SCCS, 2011), że w przypadku parabenów o mniejszych cząsteczkach (metylo-parabenu i etylo-parabenu), ten limit jest uważany za bezpieczny, to już dla parabenów o dłuższych cząsteczkach (propyl-parabenu i butyl-parabenu) zaleca się obniżenie limitu do maksymalnej całkowitej koncentracji 1,9 g/ parabenów / kg produktu. Wynika to z faktu, że w oparciu o dane na zwierzętach, efekt estrogenny parabenów wzrasta wraz z długością łańcucha alkilowego. Pomimo postulatów sugerujących obniżenie dopuszczalnych stężeń parabenów, opierając się na badaniach przeprowadzonych na gryzoniach, gdzie rekomendowane wartości wynoszą 1000 mg/ kg m.c./dzień dla metyl-parabenu i etyl-parabenu, 10 mg/kg mc./dobę dla propyl-parabenu (Oishi, 2004) i 2 mg/kg m.c/ dobę dla butyl-parabenu (Fisher i wsp., 1999), SCCS uznaje te wartości za zbyt restrykcyjne, argumentując większą absorpcją parabenów przez skórę gryzoni niż ludzi, natomiast w przypadku innych, rzadziej używanych parabenów (izopropyl-parabenu, izobutyl-parabenu) dostępne są bardzo ograniczone dane i na ich podstawie nie można oszacować potencjalnego zagrożenia (SCCS, 2011).

Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Żywnienia i Rolnictwa oraz Światowa Organizacja Zdrowia (FAO/WHO, 2009) ustanowiły dopuszczalną dzienną dawkę w produktach żywnościowych (ADI) dla **pyretroidów** na poziomie 40, 20, 10, 20, 10, 20, 20, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dzień}$ dla cyflutryny, cyhalotryny, deltametryny, fenwaleratu, bifentryny, cypermetryny, cypermetryny i permethryny odpowiednio. Dostępne są również europejskie regulacje dotyczące ADI: 3, 5, 10, 20, 15 i 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dzień}$ dla cyflutryny, cyhalotryny, deltametryny, esfenwaleratu, bifentryny, cypermetryny odpowiednio (European Commission, 2009). Ostre i przewlekłe dawki referencyjne (RfD) ustalone przez Amerykańską Agencję Ochrony Środowiska (EPA) dla wszystkich populacji wynoszą 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dzień}$ dla permetyryn (US EPA, 2009). W przypadku cypermetryny, przy przewlekłej ekspozycji RfD wynosi 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c./dobę dla populacji ogólnej (w tym niemowląt i dzieci) i 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dzień}$ przy ostrej ekspozycji (US EPA, 2006). Należy zwrócić uwagę, że w dostępnych badaniach populacyjnych oceniających wpływ narażenia na pyretroidy, podawane stężenia były o rząd wielkości mniejsze niż obecnie dopuszczone (Claeys i wsp., 2008). Agencja Bezpieczeństwa i Higieny Pracy w Stanach Zjednoczonych (OSHA) ustaliła granicę 5 miligramów pyretroidów na metr sześcienny powietrza w miejscu pracy ($5 \text{ mg}/\text{m}^3$) przypadające na 8-godzinne zmiany przez 40 godzin tygodniowo.

W Niemczech Komisja ds. Biomonitoringu Człowieka ustaliła wartości referencyjne stężeń metabolitów pyretroidów w moczu dla populacji ogólnej bez względu na wiek. Dla kwasu cis (2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowego (CDCCA) wartość referencyjna wynosi 1 $\mu\text{g}/\text{l}$, a dla kwas trans-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowego (TDCCA) i kwasu 3 fenoksybenzoesowego (3-PBA) 2 $\mu\text{g}/\text{l}$ (Schulz i wsp., 2009). Badania populacyjne oceniające poziom narażenia na pyretroidy w Stanach Zjednoczonych (National Health and Nutrition Examination

(NHANES)) (CDC, 2014) wykazały wzrost około 1,5-2 razy ekspozycji na 3-PBA i TDCCA w latach 2007-2008 niż w okresach wcześniejszych (1999-2000 i 2001-2002). Potwierdza to znaczący wzrost ekspozycji środowiskowej na pyretroidy, równoległy do wzrostu wykorzystania pestycydów w ciągu ostatniej dekadzie w USA.

3.3 Rozwój gonady żeńskiej i ustanowienie rezerwy jajnikowej

Pierwotne komórki płciowe (PGCs- primordial germ cells), zwane zawiązkowymi komórkami zarodkowymi, pojawiają się w okresie embrionalnym bardzo wcześnie, bo już około 3-4 tygodnia ciąży. Różnicują się one z endodermy pęcherzyka żółtkowego. We wczesnym okresie rozwoju embrionalnego, w przybliżeniu około 5 tygodnia ciąży, parzyste gonady są częścią wyniosłości mezodermy pośredniej tworzącej listwę płciową. Składają się z pierwotnych komórek płciowych, wymieszanych z nabłonkiem otrzewnowym, z którego powstaną sznury płciowe i rdzeń, pochodzący z komórek mezenchymalnych. Pomędzy 4-5 tygodniem ciąży PGCs w liczbie 300-1000 rozpoczynają migrację przez dystalną część jelita pierwotnego, wnikając do listew płciowych. Liczba ich ulega zwielokrotnieniu poprzez mitozę. Ulegają podziałowi podczas samej migracji, ale także w samej listwie płciowej, by w 18 tygodniu ciąży osiągnąć przybliżoną liczbę 6-7 milionów. Ostatecznie PGCs (oogonia), w 11-12 tygodniu ciąży wchodzi w pierwszy podział redukcyjny DNA (mejozę), podczas którego powstają pierwotne oocyty. Ich dalszy rozwój zostaje zatrzymany na etapie profazy podczas pierwszego podziału mejotycznego. Równoległe, PGCs zostają otoczone przez komórki pochodzące ze sznurów płciowych i rozpoczyna się tworzenie pęcherzyków zawiązkowych, które wznoszą się do pęcherzyków przedantralnych. Na tym etapie dochodzi do atrezji oogonii i dużej części pęcherzyków zawiązkowych (Pepling Spradling, 2001). Do czasu porodu apoptozie ulegają praktycznie wszystkie oogonie, a liczba pęcherzyków zarodkowych zmniejsza się na tyle,

że u noworodka płci żeńskiej pozostaje ich wyłącznie w przybliżeniu 1-2 miliony. Rezerwa jajnikowa kobiet jest ustanowiona w okresie prenatalnym (Skinner, 2005), a liczba oocytów już od tej pory stale maleje (Vaskivuo i wsp., 2001). W okresie dojrzewania pozostanie około 300 000 oocytów w jajnikach, by wchodząc w okres menopauzalny ich liczba zmniejszyła się do poniżej 1000 (Faddy i wsp., 1992). Po osiągnięciu dojrzałości płciowej, w wyniku apoptozy, następuje stała utrata oocytów, dokonująca się na każdym etapie dojrzewania pęcherzyków (od związkowych do antralnych) oraz w wyniku samej owulacji.

Postępującemu zmniejszeniu liczby oocytów w całym życiu reprodukcyjnym towarzyszy również spadek jakości oocytów z wiekiem (Broekmans i wsp., 2007), co próbuje się tłumaczyć faktem, że oocyty obarczone aberracjami mają wolniejsze tempo eliminacji poprzez apoptozę, czego konsekwencją jest wzrost odsetka oocytów obarczonych aberracjami, zwłaszcza - trisomią chromosomu 21 (Hulten i wsp., 2010).

W jajniku kobiet w okresie rozrodczym najliczniejszą pulę pęcherzyków stanowią pęcherzyki związkowe i to one decydują o potencjale rozrodczym kobiety. Każdego dnia pewna ilość pęcherzyków związkowych jest rekrutowana do wzrostu. Ich liczba przeznaczona do wzrostu i dojrzewania będzie spadać z wiekiem. Zdecydowana większość pęcherzyków związkowych rozpoczynających wzrost ulega później atrezji, tylko nieliczne z nich osiągną stadium pęcherzyków pierwotnych, wtórnych i antralnych.

Zatrzymanie PGCs w profazie pierwszego podziału mejotycznego, apoptoza oogonii i pęcherzyków związkowych wyznacza początkowy limit dla rezerwy jajnika, gdyż wydaje się, że neo-oogeneza nie występuje poza okresem płodowym. W ostatnich latach koncepcja ta została zakwestionowana przez dowody mogące potwierdzać możliwy mechanizm oogenezy w okresie postnatalnym z komórek macierzystych linii płciowej

w jajniku lub szpiku kostnym (Zou i wsp., 2009). Koncepcja ta pozostaje jednak kontrowersyjna.

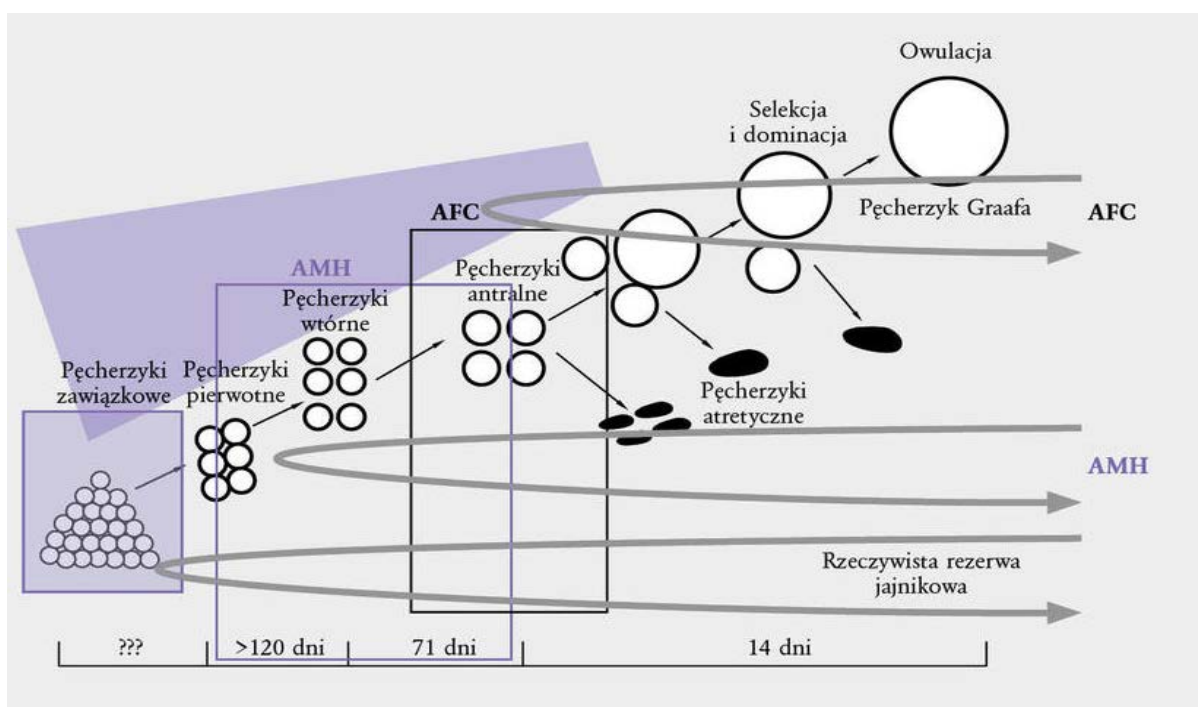
Etapy rozwoju do pęcherzyków antralnych jest gonadotropinowo niezależny. Dopiero pęcherzyk antralny ma receptory dla FSH. Rekrutacja pęcherzyków antralnych wraz z selekcją pęcherzyka dominującego, dojrzewanie pęcherzyka Graafa i owulacja jest fazą gonadotropinowo zależną. Dalsza rekrutacja pęcherzyka antralnego następuje w fazie lutealnej cyklu i uzależniona jest od funkcjonowania osi podwzgórze-przysadka-jajnik, w skrócie mówiąc od pulsacyjnego wydzielania GnRH i FSH, które to pulsy są warunkowane spadkiem w fazie lutealnej stężeń progesteronu, estradiolu i inhibiny B.

Rezerwa jajnikowa odzwierciedla przede wszystkim liczbę pierwotnych pęcherzyków w skład, których wchodzi pęcherzyki nierosnące (NGFs) oraz pęcherzyki rekrutowane do późniejszych etapów rozwoju (pierwotne, wtórne i antralne), które ostatecznie będą zdolne do owulacji.

W ostatnich latach wprowadzono pojęcie rezerwy jajnikowej, podstawowego parametru opisującego potencjał rozrodczy. Terminem tym określa się pulę pęcherzyków antralnych w jajniku. Rezerwa jajnikowa jest uwarunkowana przede wszystkim genetycznie i zmniejsza się z wiekiem. Niewątpliwie markerami potencjału rozrodczego u kobiet jest wiek, rezerwa jajnikowa oraz funkcjonowanie układu podwzgórze-przysadka-jajnik.

Do oceny klinicznej rezerwy jajnikowej w literaturze wykorzystuje się: pomiar liczby pęcherzyków antralnych AFC (antral follicle count), pomiar objętości jajnika, ocenę stężenia FSH w pierwszych dniach cyklu miesięczkowego (2-4 dzień cyklu), ocenę stężenia AMH, ocenę stężenia estradiolu w pierwszych dniach cyklu miesięczkowego (2-4 dzień cyklu) oraz ocenę stężenia inhibiny B.

Ryc. 1. Ocena rezerwy jajnikowej. (Rycina z *Wielkiej Interny*, tom 12, *Endokrynologia*, pod redakcją Wojciecha Zgliczyńskiego (*Wielka Interna*, 2011)).



Liczna pęcherzyków zawiązkowych odzwierciedla właściwą rezerwę jajnika, stężenie AMH liczbę pęcherzyków rozwijających się w fazie gonadotropowo zależnej, AFC – liczba pęcherzyków antralnych

Chociaż bezspornie wiek jest najczulszym wskaźnikiem predykcyjnym zarówno ilościowej jak i jakościowej rezerwy jajnikowej, występują duże znamienne osobniczo różnice czasu reprodukcyjnego kobiet (Broekmans, i wsp., 2006; te Velde i Pearson, 2002).

Pavlik i wsp., w dużym badaniu przekrojowym (przeprowadzonym wśród 13963 kobiet) wykazał, że objętość jajnika negatywnie koreluje z wiekiem (Pavlik i wsp., 2000). Obserwacje te potwierdziły się w kolejnych badaniach, wykazujące przewagę wykorzystania ultrasonografii trójwymiarowej do oceny objętości jajnika (Kupesic i wsp., 2003). Jednakże, praktyczne zastosowanie oceny objętości jajnika jako markera rezerwy jajnikowej pozostaje ograniczone z powodu małej czułości i specyficzności wyników (Hendriks i wsp., 2007).

Liczba pęcherzyków antralnych (AFC) dostarcza informacji na temat ilościowej rezerwy jajnikowej (Broekmans, i wsp., 2006). Ponieważ AFC spada z wiekiem (0,35–0,95 pęcherzyka antralnego/rok) (Ng i wsp., 2003; Scheffer i wsp., 1999), wynik ten dostarcza istotniejszych klinicznie informacji niż sama objętość jajników. Korelacja pomiędzy AFC a wiekiem reprodukcyjnym jest dobrze udokumentowana (Kupesic i wsp., 2003; Scheffer i wsp., 1999, 2003), a jej wartość prognostyczna lepsza niż ocena stężeń FSH czy wyniki testów stymulacyjnych (Kwee i wsp., 2007). Uważa się, że w jajnikach kobiet w wieku 25–40 lat obecnych jest około 20–150 pęcherzyków średnicy 0,05–2,00 mm, zbyt małych by były wiarygodnie ocenione w konwencjonalnych technikach obrazowych. Pomimo, że badanie ultrasonograficzne umożliwia obrazowanie pęcherzyków średnicy powyżej 2 mm, uważa się, że badanie dobrze koreluje z liczbą pęcherzyków zawiązkowych, a tym samym rezerwą jajnikową (Scheffer i wsp., 1999; Broekmans i wsp., 2004). AFC jest traktowany, jako jeden z najlepszych parametrów do oceny rezerwy jajnikowej (Rosen i wsp., 2012).

Hormon Anty-Müllerowski (AMH) jest wydzielany przez komórki ziarniste dojrzewających pęcherzyków (Visser i wsp., 2006; La Marca i Volpe, 2006) i koreluje z liczbą dojrzewających pęcherzyków - pierwotnych, wtórnych i antralnych (Broekmans i wsp., 2008). AMH podobnie jak i AFC spada z wiekiem (Wiweko i wsp., 2013). Badanie stężenia AMH jest bardziej czułym markerem rezerwy jajnikowej niż badanie FSH (Barbakadze i wsp., 2015; Wiweko i wsp., 2013) i może być ono wykorzystywane celem oceny szansy niepełnych pacjentów na urodzenie dziecka (Weenen i wsp., 2004). Ponadto Baird i Steiner (2012) sugerują, by stosować ocenę stężenia tego hormonu, jako niezależnego wskaźnika oceny płodności kobiet w badaniach oceniających wpływ czynników środowiskowych.

Bezspornym ograniczeniem wszystkich metod oceny rezerwy jajnikowej jest fakt, że nie dostarczają one informacji o liczbie potencjalnie prawidłowych pęcherzyków jajnikowych z kompetentnym oocytem.

3.4 Mechanizm działania wybranych związków środowiskowych zaburzających funkcję endokrynną na gonadę żeńską i rezerwę jajnikową kobiet

Funkcja rozrodcza zależy między innymi od funkcjonowania osi podwzgórze-przysadka-jajnik. Po dojrzewaniu płciowym, skoordynowane sprzężenia zwrotne osi podwzgórze-przysadka-jajnik kontroluje zdolność do owulacji i przygotowania narządu rodowego do ciąży. W podwzgórzu hormony steroidowe takie jak estradiol i progesteron, aktywują neurony kisspeptyny, które regulują wydzielanie gonadoliberyny (GnRH), neurohormonu wytwarzanego głównie w polu przedwzrostowym podwzgórza, stymulującego przedni płat przysadki do pulsacyjnego wydzielania hormonów gonadotropowych: hormonu folikulotropowego (FSH) i luteinizującego (LH), warunkujących prawidłowy przebieg folikulogenezy. Zwiększone stężenia steroidowych hormonów płciowych, poprzez sprzężenie zwrotne aktywują neurony kisspeptyny w podwzgórzu prowadząc do przedowulacyjnego wyrzutu LH.

Hormony steroidowe wywierają swoje działanie w tkankach docelowych łącząc się ze swoimi odpowiednimi receptorami błonowymi i jądrowymi. Każda zmiana dotycząca wydolności jajnika, stężenia steroidowych hormonów płciowych, gonadotropowych, gonadoliberyny, ale także aktywności neuronów kisspeptyny, poprzez wpływ na oś podwzgórze-przysadka-jajnik może niekorzystnie wpływać na płodność.

Mechanizm potencjalnego wpływu czynników środowiskowych z grupy zaburzających funkcję endokrynną (EDCs) na płodność kobiet wiąże się z ich

podobieństwem do naturalnych ligandów mających zdolność do wiązania do receptorów: estrogenowych (ER), aryłowowęglowodorowych (AHR) i androgenowych (AR). Receptory te wykazują swoistość do szerokiej gamy EDCs (Shanle i Xu, 2011) i stanowią miejsce uchwytu dla egzogennych hydrofobowych ligandów wpływają na gametogenezę. Związki te, mają wpływ zarówno na początkową rezerwę jajnikową ustalaną w czasie życia płodowego, jak i modulują rezerwę jajnikową w dorosłym życiu (Richardson i wsp., 2014). Wiele z tych związków wpływa na sygnalizację dla receptorów steroidowych, imitując efekt estrogeny jak i androgeny, wywierając efekt zarówno agonistyczny i antagonistyczny (Shanle i Xu, 2011). Prawdopodobny mechanizm działania EDCs wiąże się także z ich wpływem na syntezę hormonów steroidowych (Chedrese i Feyles, 2001), ich metabolizm (Diamanti-Kandarakis i wsp., 2009; Shanle i Xu, 2011) oraz funkcjonowanie układu podwzgórze-przysadka-jajnik (Patel i wsp., 2015).

Receptor estrogenowy (ER) stanowi "otwarte drzwi" dla szeregu substancji chemicznych powszechnie wstępujących w środowisku, umożliwiając im dostęp do wrażliwych mechanizmów kontrolnych modulujących gametogenezę, folikulogenezę i apoptozę, a tym samym rezerwę jajnikową u kobiet. Receptor aryłowowęglowodorowy (AHR), działając przez jeszcze niezidentyfikowany naturalny ligand, także reguluje gametogenezę i rezerwę jajnikową. Ekspozycja w macicy na związki środowiskowe zdolne do działania, jako ligandy AHR może zakłócać oogenezę, wpływając tym samym na początkową rezerwę oocytów u noworodka i późniejszą płodność (Mattison i wsp., 1989). Wydaje się, że aktywacja AHR powoduje indukcję BAX (białka, z rodziny białek przyspieszających apoptozę, działających poprzez zwiększenie przepuszczalności błony zewnętrznej mitochondriów), jako części grupy proapoptotycznych regulatorów śmierci komórki, czym można tłumaczyć promujący wpływ na apoptozę związków będących ligandami AHR (Pru i wsp., 2009).

Istnieje wiele współzależności pomiędzy systemami receptorów AHR i ER. Do współdziałania systemów receptorów ER i AHR może dochodzić, w co najmniej trzech mechanizmach (Shanle i Xu, 2011): 1) aktywacja AHR może prowadzić do indukcji enzymów cytochromu, P450, które zwiększają metabolizm estradiolu; 2) pobudzenie receptora AHR może upośledzić sygnalizację receptora ER przez wiązanie z promotorami docelowego genu ER; 3) aktywowane receptory AHR z kofaktorami mogą hamować potencjał transkrypcyjny. Istnieje znaczna ilość substancji chemicznych, które mogą aktywować AHR i ER np. BPA czy ftalany (Zhang i wsp., 2003).

W tkance jajnikowej obecne są również receptory androgenowe (AR) (Horie i wsp., 1992). Wydaje się, że większość związków środowiskowych zdolnych do interakcji z AR ma działanie antagonizujące wobec androgenów (Kruger i wsp., 2008). Ponadto, wpływ androgenów na tkankę jajnikową jest w dużej mierze uzależniony od konwersji androgenów do estrogenów poprzez wpływ na aktywność aromatazy (Smith i wsp., 2009).

Bisfenol A jest uważany za selektywny modulator receptora estrogenowego (ang. Selective Estrogen Receptor Modulator, SERM). Komórki jajnika są wrażliwym celem dla BPA, ze względu na jego działanie podobne do estrogenu. BPA wydaje się zarówno działać za pośrednictwem klasycznego receptora estrogenowego jądrowego alfa ($ER\alpha$) i beta ($ER\beta$) (Kuiper i wsp., 1998), jak i nieklasycznych receptorów błonowych dla estrogenów takich jak: receptor sprzężony z białkiem G 30 (GPR30) (Thomas i Dong, 2006), odpowiedzialny za niektóre szybkie efekty, jakie estradiol ma na komórki i receptor zależny od estrogenów gamma ($ERR\gamma$), będący jądrowym aktywatorem transkrypcji (Matsushima i wsp., 2007) i tym samym mogącym ingerować w folikulogenezę w jajniku (Markey i wsp., 2003; Newbold i wsp., 2009). Badania biochemiczne wykazały, że BPA poprzez wiązanie się z $ER\alpha$ może antagonizować działanie antyapoptotyczne estrogenów (Kuiper i wsp., 1998), co ma decydujące znaczenie

dla przeżycia komórek ziarnistych i żywotności oocytu (Palter i wsp., 2001). Natomiast, wiązanie się BPA z obydwoma receptorami dla estrogenów α i β może nasilać działanie estrogenne, sprzyjające apoptozie w jajniku (Xu i wsp., 2002). Uważa się, że BPA wykazuje pewne preferencyjne powinowactwo $ER\beta$ w porównaniu z $ER\alpha$ i że za pośrednictwem receptora $ER\beta$ BPA wpływa na zaburzenia mejozy w oocycie prowadzące do aneuploidii (Can i wsp., 2005), a także do zahamowania cyklu komórkowego (Eichenlaub-Ritter i wsp., 2008) i większej liczby nieprawidłowych komórek jajowych (Susiarjo i wsp., 2007). Istnieją również doniesienia o zależnym od dawki ekspozycji na BPA zmianach w dojrzewaniu oocytów w okresie mejozy i niekorzystnym wpływie na prawidłowe parowanie chromosomów w ludzkich oocytach (Machtinger i Orvieto, 2014).

Wyniki eksperymentalnych badań wskazują, że ekspozycja wewnątrzmaciczna płodów i noworodków szczurzych poddanych na niskie i wysokie dawki BPA powodowała zmiany morfologiczne i histologiczne w tkance jajnikowej (Adewale i wsp., 2009), mniejszą objętość jajników ze zmniejszoną liczbą komórek jajowych i ciałek żółtych (Delclos i wsp., 2014). Ekspozycja na BPA w badaniach przeprowadzonych na gryzoniach i na komórkowych ludzkich prowadziła do zahamowania rozpadu gniazd komórek zarodkowych, prowadząc do powstawania pęcherzyków z większą ilością oocytów (ang. Multi-Oocyte Follicles, MOFs) (Wang i wsp., 2014; Zhang i wsp., 2014; Zhang i wsp., 2012). Ekspozycja na BPA, poprzez hamowanie rozpadu gniazd komórek zarodkowych, przyczynia się do faktu, że wiele komórek jajowych pozostaje niewłączonych do pierwotnych pęcherzyków lub prowadzi do powstawania większej liczby MOFs w jajnikach, czego konsekwencją jest zmniejszenie liczby pęcherzyków pierwotnych w jajnikach. Natomiast obserwacje, że BPA występuje również w płynie owodniowym (Ikezuki i wsp., 2002) sugerują, że substancje zaburzające gospodarkę

hormonalną, takie jak BPA mogą wpłynąć na ustanowienie początkowej rezerwy jajnikowej.

Ponadto ekspozycja na BPA zwiększa apoptozę oocytów, wpływa na nieprawidłowe dojrzewanie oocytów (Zhang i wsp., 2012; Zhang i wsp., 2014), zmienia rozkład pęcherzyków w jajnikach poprzez zwiększenie rekrutacji pęcherzyków pierwotnych, przyspiesza rozwój pęcherzyków zawiązkowych do pierwotnych i zwiększa atrezię pęcherzyków antralnych (Wang i wsp., 2014; Rodriguez i wsp., 2010), przyspiesza proliferację komórek ziarnistych i tekalnych (Rivera i wsp., 2011) oraz prowadzi do nieadekwatnej odpowiedzi pęcherzyków wzrastających na FSH (Rivera i wsp., 2011).

Ekspozycja noworodków owiec i szczurów na BPA wiązała się z obniżeniem stężenia GnRH (Qiu i wsp., 2016; Wang i wsp., 2014). Wyniki eksperymentalnych badań przeprowadzonych na myszach wskazują, że ekspozycja na niskie dawki BPA w życiu płodowym prowadzi do zwiększonej proliferacji komórek gonadotropowych przysadki, ekspozycja na BPA niezależnie od dawki 0,5 i 50 mg/kg /dobę wiązała się ze zmniejszaniem się ilości receptorów dla GnRH i przy dawce 0,5 mg /kg /dobę BPA odnotowano także wyższe stężenia LH i FSH, przy czym przy dawce 50 mg/kg/dobę BPA poziomy LH i FSH były znacząco niższe w porównaniu z grupą kontrolną (Brannick i wsp., 2012). Ponadto przedłużona ekspozycja na BPA (25 i 50 mg/kg/dobę) w okresie prenatalnym i laktacji korelowała z wyższymi poziomami KISS1, GnRH i FSH w porównaniu z grupą kontrolną (Xi i wsp., 2011). Wyniki tych badań wskazują, że BPA może wpływać na funkcjonowanie przysadki mózgowej i tym samym na funkcjonowanie osi podwzgórze-przysadka-jajnik, ale efekt jest zależny od okresu życia, w którym nastąpiła ekspozycja i czasu jej trwania.

Niektóre odpowiedzi komórkowe są wywoływane przy stężeniach BPA, które są znacznie poniżej poziomów, które powinny wiązać się z klasycznymi receptorami

jądrowymi. Zaproponowano, że te bardziej czułe odpowiedzi komórkowe mogą być wyzwalane przez receptory dla estrogenów, inicjujące niegenomowe mechanizmy (Vandenberg i wsp., 2009). Analiza molekularna u gryzoni ujawniła, że ekspozycja na BPA zmniejsza ekspresję czynników kontrolujących folikulogenezę, takich jak: NOBOX i LIM 8 (*Lhx8*), specyficznych dla spermatogenezy i oogenezy czynników transkrypcyjnych basic helix-loop-helix 2 (*Sohlh2*) i stymulowanych przez kwas retinowy 8 (*Stra8*), czynników krytycznych dla inicjacji mejozy. Ponadto udowodniono, że BPA obniża ekspresję rekombinazy meiotycznej DNA 1 kodowanej przez gen *Dmc1*, rekombinazy meiotycznej kodowanej przez gen *Rec8*, specyficznego dla mejozy kompleksu synaptonemalnego 3 (*Scp3*) i specyficznych dla komórek germinalnych dimeryzujących czynników transkrypcyjnych współuczestniczących w gametogenezie nazywanych *Figla* (Zhang i wsp., 2012, Zhang i wsp., 2014). Ekspozycja na BPA hamuje metylację DNA wysp CpG obecnych w *Lhx8*, co dowodzi, że BPA może upośledzać prawidłowe procesy folikulogenezy (Zhang i wsp., 2014) i wydolność jajnika. Ekspozycja na wysokie dawki BPA zmniejszyła ekspresję *Figla* i wariantu histonu H1 specyficznego dla dojrzewającego oocytu (H1f00) oraz zwiększyła ekspresję genów dla hormonu anty-Müllerowskiego (AMH) (Li i wsp., 2014b). Zwiększona apoptoza pęcherzyków antralnych w jajniku obserwowana przy ekspozycji na BPA korelowała ze zwiększonymi poziomami apoptotycznej białkowej kaspazy-3 (Lee i wsp., 2013).

Badania te dowodzą, że narażenie na BPA może obniżać potencjał reprodukcyjny kobiet na wielu etapach. BPA może działać poprzez naśladowanie lub/i antagonizowanie działania estrogenu może mieć niekorzystny i bezpośredni wpływ na ustanowienie pierwotnej rezerwy jajnikowej, jakość oocytów, może modulować rezerwę w okresie postnatalnym i po osiągnięciu dojrzałości płciowej poprzez pośredni wpływ na oś przysadka-podwzgórze-jajnik oraz bezpośredni wpływ na oocyt zaburzając jego

dojrzewanie, zmieniając jego potencję do zapłodnienia i prawidłowego rozwoju zarodka oraz zmieniając receptywność endometrium na implantację zarodka. Efekt BPA na potencjał reprodukcyjny jest zależny od okresu życia, w którym nastąpiła ekspozycja i czasu jej trwania.

Triklosan wykazuje aktywność antagonistyczną w stosunku do receptora estrogenowego (ER) jak i receptora androgenowego (AR) (Ahn i wsp., 2008; Chen i wsp., 2007). Jego fenolowa struktura jest podobna do niesteroidowych związków o właściwościach estrogennych, takich jak dietylostilbestrol i bisfenol A. Co więcej, TCL jest strukturalnie podobny do koplanarnych ortopodstawionych polichlorowanych bifenyli (PCB) i uwrażliwia kanały wapniowe rianodynowe (RyR) obecne w różnych grupach mięśniowych i neuronach. Receptory RyR są czułym celem działania TCL i regulują uwalnianie Ca^{2+} , co sugeruje jego potencjalnie działanie neurotoksyczne (Ahn i wsp., 2008). Ponadto podobieństwo struktury TCL do hormonów tarczycy (TH) sugeruje, że narażenie na TCL może modulować działanie TH (Veldhoen i wsp., 2006).

Mechanizm potencjangeo wpływu triklosanu na rezerwę jajnikową nie jest do końca poznany. Badania eksperymentalne wykazują, że triklosan może wzmacniać efekt estrogenu na macicę, powodując hipertrofię tkanek u szczurów (Stoker i wsp., 2010). Podwyższone stężenia endogennego estradiolu wykryto po podskórnym wstrzyknięciu triklosanu u zapłodnionych samic myszy (Ahn i wsp., 2008). Wyższe dawki triklosanu mogą powodować również zaburzenia wewnątrzmacicznego wszczęcia blastocysty u tych myszy (Ahn i wsp., 2008). Badania *in vitro* także potwierdzają fakt, że triklosan ma właściwości estrogenowe i androgenowe, wpływając na interakcję między estradiolem i testosteronem z ich receptorami, działając zarówno jako agonista i antagonist receptorów dla estrogenów i androgenów (Ahn i wsp., 2008; Chen i wsp., 2007; Stoker i wsp., 2010).

W związku z tym można postawić hipotezę, że triklosan wykazuje potencjalnie szkodliwy wpływ na ludzkie jajniki, wpływając zarówno na endogenne ścieżki steroidogenezy jajników, jak i na produkcję estrogenów lub klirens wątrobowy hormonów płciowych. Ponadto triklosan może zaburzać interakcję między estrogenami a ich odpowiednimi receptorami, zakłócając tworzenie i rozwój pęcherzyków.

Mając na uwadze, że TCL jest strukturalnie podobny do BPA i może wywierać działanie antagonistyczne do receptorów AR i ER, reguluje funkcjonowanie kanałów wapniowych będących kofaktorami większości procesów metabolicznych i może modulować działanie hormonów tarczycy, hormonów płciowych, a tym samym wpływać na rezerwę jajnikową.

Parabeny są związkami zaburzającymi funkcjonowanie układu hormonalnego o działaniu estrogenym (Golden i wsp., 2005; Routledge i wsp., 1998; Soni i wsp., 2005). Ponadto wykazano, że parabeny wiążą się z receptorem dla estrogenów zarówno ER α i ER β (Soni i wsp., 2005).

Z przeglądu najbardziej aktualnych badań przeprowadzonych na gryzoniach i na ludziach *in vitro*, analizujących różne potencjalne mechanizmy działania hormonalnego ekspozycji na estry parabenów wynika, że parabeny mają zarówno wpływ estrogenowy, jaki antyandrogeny oraz mogą zaburzać homeostazę hormonów tarczycy (Taxvig i wsp., 2008). Mechanizm działania estrogenowego parabenów może wynikać z hamowania aktywności sulfotransferazy estrogenowej (SULT) w cytoplazmie komórek skóry i wątroby. Jest ona w różnym stopniu hamowana przez mikromolarne stężenia metyl-parabenu, etyl-parabenu, propyl-parabenu i butyl-parabenu. Siła działania i stopień hamowania SULT wzrasta wraz z długością łańcucha estrów parabenów (Prusakiewicz i wsp. 2007). Parabeny mają potencjał indukowania proliferacji w komórkach MCF-7 (linia komórkowa pochodząca od ludzkiego raka piersi), posiadającej receptory

dla estrogenów (Van Meeuwen i wsp., 2008). Ponadto w badaniach eksperymentalnych wykazano zdolność wszystkich parabenów do hamowania aktywności aromatazy in vitro, ale w stężeniach znacznie wyższych niż w wykrytych próbkach u ludzi. Nie wykazano natomiast związku między hamowaniem aromatazy a długością łańcucha parabenu (Van Meeuwen i wsp., 2008). Ponadto, także w badaniach eksperymentalnych udowodniono działanie antyandrogenowe parabenów, które może być tłumaczone hamującym wpływem metyl-parabenu, propyl-parabenu i butyl-parabenu na indukowaną przez testosteron aktywność transkrypcyjną (Chen i wsp., 2007). Na podstawie badań przeprowadzanych na szczurach postuluje się dodatkowo potencjalny wpływ parabenów na stężenia hormonów tarczycy. Wykazano możliwość działania butyl-parabenu, jako słabego agonisty i antagonisty receptora dla hormonów tarczycy w przysadce szczurów (Taxvig i wsp., 2008).

Wszystkie dotychczas przeprowadzone badania in vivo, próbujące analizować mechanizmy działania parabenów na oogenezę były przeprowadzone na gryzoniach. U samic poddanych ekspozycji na paraben, pomiędzy 7 a 21 dniem ciąży wykazano, że narażenie na BP spowodowało znaczące zmniejszenie się ekspresji mRNA dla receptora ER β w jajnikach płodów a ponadto efekt ten jest zależny od dawki (Taxvig i wsp., 2008).

Syntetyczne pyretroidy zaliczane są do insektycydów III generacji. Ich struktura chemiczna oparta jest na naturalnie występującej pyretrynie, która znajduje się w kwiatach *Chrysanthemum cineraraefolium*. Podstawowa struktura pyretroidów składa się z grupy kwasowej i alkoholowej, z wiązaniem estrowym. Związki te poddane były stopniowo chemicznym modyfikacjom celem zwiększenia ich zdolności owadobójczych i ograniczenia ich wrażliwości na powietrze i światło (Leggett i wsp., 2011).

Potencjalny mechanizm wpływu ekspozycji na syntetyczne pyretroidy na funkcje rozrodcze nie jest do końca poznany. Pyretroidy są to związki z grupy zaburzających

funkcję endokrynną (Liu i wsp., 2011a, 2011b; Kotil i You, 2015). Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że narażenie na pyretroidy może zakłócać funkcje jajników, takie jak rozwój pęcherzyków i synteza hormonów płciowych. Liu i wsp. (2011a, 2011b) wykazali, że bifentryna zmniejsza wydzielanie hormonu luteinizującego (LH) w szczurzych komórkach ziarnistych jajnika i może zakłócić ekspresję genów odpowiedzialnych za owulację (Liu i wsp., 2011a, 2011b). Ostatnie badania wykazały, że permetryna może wpływać degeneracyjnie na pęcherzyk jajnikowy szczura i ciało żółte, a efekt jest zależny od dawki (Kotil i You, 2015). Fenwalerat hamował wzrost pęcherzyków oraz steroidogenezę estradiolu i progesteronu (Fei i wsp., 2010; Chen i wsp., 2005). Ekspozycja na cypermetrynę poprzez wpływ na biosyntezę hormonów FSH i LH oddziaływała na wzrost pęcherzyków jajnikowych u szczura oraz promowała atrezję pęcherzyków jajnikowych (Molavi i wsp., 2014).

Badania na zwierzętach sugerują, również, że ekspozycja na pyretroidy wpływa na zaburzenia czynności funkcji jajników, która powoduje objawy podobne do przedwczesnej niewydolności jajnika (POI) u kobiet (Molavi i wsp., 2014).

Ponadto wykazano, że pyretroidy mogą indukować stres oksydacyjny poprzez tworzenie reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species (ROS)) w modelach eksperymentalnych (Giray i wsp., 2001; Kale i wsp., 1999). Niektóre dane sugerują również, że syntetyczne pyretroidy mają właściwości antyandrogenne poprzez antagonizowanie receptora androgenowego i mogą wpływać na zmiany w stężeniach hormonów tarczycy i hormonów płciowych (Han i wsp., 2008).

3.5 Stan wiedzy o wpływie wybranych czynników środowiskowych zaburzających funkcję endokrynną na potencjał rozrodczy kobiet i rezerwę jajnikową

Przyjmuje się, że niższa początkowa rezerwa jajnikowa ustalona w życiu płodowym może prowadzić do młodszego wieku ostatniej ciąży i wcześniejszego wieku wystąpienia naturalnej menopauzy (ANM). Analogicznie zakłada się, że czynniki prowadzące do przyspieszenia utraty rezerwy jajnikowej w okresie postnatalnym będą się także przyczyniać do skrócenia okresu reprodukcyjnego.

Na ustalenie początkowej rezerwy jajnikowej mają niewątpliwie wpływ czynniki genetyczne, natomiast narastające dowody wskazują, że czynniki środowiskowe mogą stanowić ważne determinanty rozwojowe wpływające na początkową rezerwę jajnikową jak i mogą modyfikować rezerwę jajnikową w dorosłym życiu (Richardson i wsp., 2014). Połączenie tych wczesnych i późniejszych ekspozycji na czynniki środowiskowe może potencjalnie prowadzić do szybszego obniżania się rezerwy jajnikowej, ograniczając płodność w późniejszych latach rozrodczych i przyspieszać czas wystąpienia naturalnej menopauzy (Richardson i wsp., 2014). Wśród czynników środowiskowych mogących mieć wpływ na obniżanie się rezerwy jajnikowej wymienia się między innymi związki chemiczne o potencjale zaburzającym funkcję endokrynną.

Do tej pory w literaturze światowej ukazały się pojedyncze badania oceniające zależność pomiędzy ekspozycją na wybrane czynniki środowiskowe z grupy ECDs w okresie rozrodczym i ich wpływie na rezerwę jajnikową.

Bisfenol A - rezerwa jajnikowa i potencjał rozrodczy kobiet

W przypadku ekspozycji na BPA do tej pory tylko dwa badania podejmują temat narażenia, a rezerwy jajnikowej. W badaniu przeprowadzonym w Stanach Zjednoczonych, wśród kobiet leczących się z powodu niepłodności stwierdzono istotnie statystyczną

zależność pomiędzy liczbą pęcherzyków antralnych (AFC) a narażeniem na działanie BPA (p dla trendu < 0,001) (Souter i wsp., 2013). Natomiast nie zaobserwowano związku między ekspozycją na BPA a stężeniem hormonu folikulotropowego (FSH) w trzecim dniu cyklu oraz objętością jajnika (OV) (Souter i wsp., 2013). Może wynikać to z faktu, że grupa pacjentek, u której oceniano OV i FSH była mniej liczna niż grupa pacjentek, u których oceniano AFC. Mniejsza liczba badanych mogła nie być wystarczająca do uzyskania znamiennej statystycznej wyniku. Autorzy sugerują zatem, że AFC wydaje się być najbardziej czułym wskaźnikiem rezerwy jajnikowej (Souter i wsp., 2013).

W badaniu przeprowadzonym w Chinach narażenie na BPA wpływało negatywnie na stężenie hormonu AMH i FSH wśród kobiet z klinik leczenia niepłodności (Zhou i wsp., 2017).

Inne przeprowadzone badania, dotyczące wpływu ekspozycji na BPA na potencjał rozrodczy kobiet, koncentrują się na zależności pomiędzy narażeniem a wynikami IVF (Bloom i wsp., 2011; Ehrlich i wsp., 2012a, 2012b; Fujimoto i wsp., 2011; Mínguez-Alarcón i wsp., 2016; Mok-Lin i wsp., 2010). Większość z tych badań przeprowadzono w Massachusetts General Hospital Fertility Center wśród kohorty par leczących się z powodu niepłodności (Ehrlich i wsp., 2012a, 2012b; Mínguez-Alarcón i wsp., 2016; Mok-Lin i wsp., 2010). W badaniu Mok-Lin i wsp. z 2010 roku wśród 84 kobiet zaobserwowano, że stężenie BPA w moczu wiązało się z mniejszą liczbą pobranych oocytów oraz obniżonym stężeniem estradiolu (Mok-Lin i wsp., 2010). Następnie Ehrlich i wsp. (2012a) odnotowali negatywny wpływ bisfenolu A na odsetek implantacji. W kolejnym badaniu z tej samej kohorty par leczących się z powodu niepłodności potwierdzono negatywny wpływ BPA na stężenie estradiolu, pulę i liczbę oocytów oraz odsetek prawidłowo zapłodnionych oocytów (Ehrlich i wsp., 2012b). Również Fujimoto i wsp. (2011) wykazali, że ekspozycja na BPA wpływa na obniżenie odsetka

prawidłowo zapłodnionych oocytów. Wyniki kolejnych badań potwierdzają negatywny wpływ bisfenolu A na stężenie estradiolu, mniejszą liczbę blastomerów w zarodku oraz obniżenie oceny jakości zarodka w związku z wyższym stopniem fragmentacji (Bloom i wsp., 2011).

Z drugiej strony w badaniu 256 kobiet uczęszczających do kliniki leczenia niepłodności nie stwierdzono zależności pomiędzy stężeniem BPA, a odsetkiem implantacji, odsetkiem ciąż klinicznych oraz urodzeń żywych (Mínguez-Alarcón i wsp., 2016).

Rozbieżność w wynikach prezentowanych badań wynika między innymi z doboru populacji badanej, a także możliwości nieuwzględnienia lub uwzględnienia różnych czynników zakłócających. Na różne rezultaty uzyskane w badaniach wpływa również ocena stężenia bisfenolu A w różnych płynach biologicznych: moczu lub surowicy.

Triklosan- rezerwa jajnikowa i potencjał rozrodczy kobiet

Związek między stężeniami TCL w moczu, a potencjałem rozrodczym badań Lange i wsp. (2015). W badaniu tym wykazano, że stężenia TCL w moczu było związane ze zmniejszoną ilością uzyskiwanych oocytów, ale pozostawało bez wpływu na inne wyniki kliniczne cykli IVF (odsetek implantacji, ciąż klinicznych lub żywych urodzeń). W badaniu przeprowadzonym w Chinach wśród pacjentów z klinik leczenia niepłodności zaobserwowano obniżony wskaźnik implantacji u osób, u których stężenie triklosanu było wyższe lub równe poziomowi mediany (0,045 $\mu\text{mol/mol Cr}$) (Hua i wsp., 2017).

W badaniu przeprowadzonym w Stanach Zjednoczonych wśród kobiet uczęszczających do kliniki leczenia niepłodności wykazano, że narażenie na triklosan wpływa negatywnie na liczbę pęcherzyków antralnych (Minguez-Alarcon i wsp., 2017).

Ze względu na to, że tylko trzy badania podejmują temat wpływu narażenia na triklosan na zdolności reprodukcyjne kobiet, konieczne jest przeprowadzenie badań epidemiologicznych posługujących się odpowiednimi biomarkerami narażenia wśród kobiet, zwłaszcza z populacji generalnej w przypadku badań rezerwy jajnikowej.

Parabeny- rezerwa jajnikowa i potencjał rozrodczy kobiet

W badaniu oceniającym wpływ narażenia na parabeny a rezerwę jajnikową zaobserwowano zmniejszenie liczby pęcherzyków antralnych (AFC) oraz wzrost stężenia FSH w 3-cim dniu cyklu wraz ze wzrostem stężenia propyl-parabenu (PP) moczu (Smith i wsp., 2013). Natomiast, nie wykazano zależności pomiędzy stężeniami metyl-parabenu (MP) i butyl-parabenu (BP) w moczu a stężeniem FSH w 3 dniu cyklu i liczbą pęcherzyków antralnych. Stężenie MP, PP i BP nie wpływało również na objętość jajników. Może to wynikać z faktu, że aktywność biologiczna i mechanizm działania parabenów różnią się pomiędzy sobą.

Kolejne badania koncentrują się na ocenie narażenia na parabeny i wyniku procedury IVF (wskaźnik zapłodnień, jakość zarodków, wskaźnik implantacji i żywych urodzeń) (Dodge i wsp., 2015; Mínguez-Alarcón i wsp., 2016; Sabatini i wsp., 2011) . Wykazano związek pomiędzy niższą, jakością zarodków ocenianych w trzeciej dobie (Sabatini i wsp., 2011) przy narażeniu na metyl-paraben i propyl-paraben. W badaniu przeprowadzonym przez Dodge i wsp. (2015) ekspozycja na metyl-paraben wiązała się z obniżeniem wskaźnika żywych urodzeń (OR=0,19; 95%CI: 0,04-0,82). Nie znaleziono istotnej statystycznie zależności w przypadku wskaźnika implantacji. Dodge i wsp. (2015), wykazał również, że stężenie metyl-parabenu u partnera wiązało się ze spadkiem żywych urodzeń po IUI (inseminacja wewnątrzmaciczna), podczas gdy nie potwierdzono istotnej korelacji pomiędzy stężeniami parabenów u partnerów,

a wskaźnikiem implantacji w procedurze IVF. Jednym możliwym wyjaśnieniem jest zasadniczo inny stopień inwazyjności tych procedur.

Z drugiej strony w badaniu Mínguez-Alarcón i wsp., 2016 nie potwierdzono wpływu metyl-parabenu, propyl-parabenu i butyl-parabenu na wynik procedur IVF (ilość dojrzałych oocytów, odsetek zapłodnień i zarodków wysokiej jakości). Można to tłumaczyć niższymi wykrywalnymi stężeniami parabenów w moczu i możliwością błędnego oszacowania narażenia na parabeny, opartego na pomiarze stężenia w pojedynczej, losowo pobranej próbce moczu, zważywszy na fakt, że parabeny są substancjami chemicznymi o krótkim okresie półtrwania.

Syntetyczne pyretroidy- rezerwa jajnikowa i potencjał rozrodczy kobiet

Badania dotyczące wpływu ekspozycji na syntetyczne pyretroidy odnoszą się głównie do wpływu na płodność mężczyzn. Obserwowano obniżenie, jakości nasienia (ruchliwości, liczby plemników, morfologii (zwiększenie odsetka plemników z nieprawidłową morfologią)) (Ji i wsp., 2011; Jurewicz i wsp., 2015).

Badania wśród kobiet dotyczą głównie wyniku ciąży (poród przedwczesny, mała masa urodzeniowa) (Zhang i wsp., 2013; Mytton i wsp., 2007) i rozwoju neurobehavioralnego dzieci (Shelton i wsp., 2014; Xue i wsp., 2013).

Liczne badania na zwierzętach sugerują również, że ekspozycja na pyretroidy wpływa na zaburzenia czynności funkcji jajników, która powoduje objawy podobne do przedwczesnej niewydolności jajnika (POI) u kobiet (Molavi i wsp., 2014). Natomiast są tylko dwa badania epidemiologiczne dotyczące narażenia na syntetyczne pyretroidy i jej wpływu na potencjał rozrodczy kobiet. Withworth i wsp., (2015) zaobserwowali, że ekspozycja na te związki obniżała stężenie AMH (Withworth i wsp., 2015). Z kolei w badaniu przeprowadzonym w Chinach, wraz ze wzrostem stężenia jednego

z metabolitów syntetycznych pyretroidów 3-PBA wzrastało ryzyko przedwczesnej niewydolności jajników (Li i wsp., 2018).

Z uwagi jednak na alarmujące wyniki badań na zwierzętach wykazujące negatywny wpływ ekspozycji na pyretroidy na płodność u samic (Marettova i wsp., 2017) i nieliczne badania epidemiologiczne konieczne wydaje się kontynuowanie badań w tym kierunku.

4. Sformułowanie problemu badawczego

Światowa Organizacja Zdrowia określa niepłodność jako chorobę społeczną. Nie jest ona rzadkim zjawiskiem, dotyczy, bowiem 15-20% par. Powszechnie przyjęto definicję niepłodności, jako brak ciąży pomimo regularnych stosunków płciowych (minimum 3 w tygodniu), utrzymywanych powyżej 12 miesięcy bez stosowania jakichkolwiek metod antykoncepcyjnych. Na ten stan rzeczy ma wpływ wiele czynników, takich jak wiek kobiety w chwili decyzji o prokreacji, wpływ czynników stylu życia czy coraz powszechniej postulowany wpływ czynników środowiskowych, zwłaszcza występujących powszechnie związków chemicznych zaburzających funkcję endokrynną. Dramatyczny wzrost liczby małżeństw leczących się z powodu niepłodności spowodował, że zdrowie reprodukcyjne, a zwłaszcza wpływ na nie czynników środowiskowych stał się ważną kwestią zdrowia publicznego.

Rozwój ekonomiczny społeczeństwa oraz ambicje zawodowe kobiet stanowią istotne czynniki, opóźniające decyzje o prokreacji. Z drugiej strony czynniki środowiskowe, zaburzające funkcję endokrynną rzadko prowadzą do nieodwracalnej niepłodności, lecz mogą znacznie wydłużyć czas oczekiwania na ciążę. Czas ten staje się coraz bardziej cenny w sytuacji, gdy decyzje o prokreacji podejmowane są coraz później. W odróżnieniu, od warunków społeczno-ekonomicznych, wpływ powszechnie występujących czynników środowiskowych na płodność, zwłaszcza kobiet, jest stosunkowo mało poznany. Wynika to z faktu, że skutki działania takich czynników środowiskowych są trudno obserwowalne i możliwe do ustalenia tylko za pomocą badań posługujących się właściwymi biomarkerami narażenia.

W badaniach na zwierzętach wykazano, że czynniki środowiskowe mogą negatywnie wpływać na płodność (Gore i wsp., 2015), natomiast badania na ludziach

stanowią swego rodzaju wyzwanie ze względu na nieodłączne ograniczenia badań epidemiologicznych (Gore i wsp., 2015). Większość z dostępnych danych literaturowych odnosi się do wpływu poszczególnych czynników na płodność mężczyzn, pomimo tego, że kobiety często są narażone na wyższe stężenie czynników środowiskowych takich jak przede wszystkim parabeny, z uwagi na częstsze stosowanie produktów do pielęgnacji ciała czy innych produktów kosmetycznych. Dodatkowo, ze względu na trudności w obiektywnej ocenie płodności kobiet niewiele badań podejmuje się tego tematu.

W badaniu przeprowadzonym wśród kobiet zgłaszających się do klinik leczenia niepłodności z powodu niepłodności partnerskiej zaobserwowano, że parabeny wpływały na zmniejszenie rezerwy jajnikowej oraz obniżenie stężenia FSH (Smith i wsp., 2013). Z kolei, narażenie na bisfenol A zmniejszało liczbę pęcherzyków antralnych oraz stężenie estradiolu (Souter i wsp., 2013; Mok-Lin i wsp., 2010). Również narażenie na triklosan wpływało negatywnie na liczbę pęcherzyków antralnych (Mingez-Alarcon i wsp., 2017). Inne badania prowadzone wśród kobiet dotyczyły oceny wyników technik wspomaganego rozrodu w aspekcie ekspozycji na czynniki środowiskowe, w tym również triklosan (Lange i wsp., 2015). Natomiast są tylko dwa badania epidemiologiczne dotyczące narażenia na syntetyczne pyretroidy i jej wpływu na potencjał rozrodczy kobiet. Withworth i wsp. (2015) zaobserwowali, że ekspozycja na te związki korelowała z niższymi stężeniami AMH (Withworth i wsp., 2015). Z kolei w badaniu przeprowadzonym w Chinach, wraz ze wzrostem stężenia jednego z metabolitów syntetycznych pyretroidów 3-PBA wzrastało ryzyko przedwczesnej niewydolności jajników (Li i wsp., 2018).

Istotna zatem wydaje się odpowiedź na pytanie, czy rzeczywiście narażenie na powszechnie występujące związki środowiskowe z grupy zaburzających funkcję endokrynną może wpływać na rezerwę jajnikową kobiet, a tym samym modyfikować płodność kobiety.

Hipoteza badawcza zakłada, że badane, rozpowszechnione w środowisku substancje mogą wpływać na rezerwę jajnikową kobiet ze względu na to, że są to związki o potencjalnym wpływie modulującym układ endokryny (ang. Endocrine Disrupting Chemicals). Zatem poprzez modyfikowanie siły oddziaływania poszczególnych hormonów mogą negatywnie wpływać na zdrowie reprodukcyjne, w tym na rezerwę jajnikową.

5. Cel pracy

Celem ogólnym pracy jest ocena wpływu ekspozycji środowiskowej na badane związki chemiczne zaburzające funkcje endokrynne na rezerwę jajnikową kobiet.

Cele szczegółowe dotyczą:

- 1). Oceny płodności kobiet poprzez badanie rezerwy jajnikowej:
 - a). liczby pęcherzyków antralnych (AFC) (ang. Antral Follicle Count);
 - b). stężenia AMH (ang. Anti-Müllerian Hormone);
 - b). stężenia hormonów: FSH (ang. Follicle-Stimulating Hormone), estradiol
- 2). Oceny narażenia na nietrwałe czynniki środowiskowe - ocena stężenia w moczu (dwukrotnie)
 - a). parabenów - (metylowego, etylowego, propylowego, butylowego, izobutylowego);
 - b). pyretroidów - wybranych metabolitów pyretroidów (cis-DCCA (kwas cis-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksylowy) (CDCCA), trans-DCCA (kwas trans-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksylowy) (TDCCA), cis-DBCA (kwas cis-(2,2-dibromowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksylowy), 3-PBA (kwas 3-fenoksybenzoesowy));
 - c). bisfenolu A;
 - d). triklosanu
- 3). Oceny czynników związanych ze stylem życia (palenie, spożywanie alkoholu, aktywność fizyczna, dieta, stres) i narażeń w pracy zawodowej, które zostaną uwzględnione w analizie, jako potencjalne czynniki zakłócające.

6. Materiał i Metody

6.1 Badana populacja

6.1.1 Kryteria doboru kobiet do badania

Przyjęto, że objęte badaniem kobiety powinny mieć poniżej 40 lat i zgłosić się do kliniki leczenia niepłodności w celach diagnostycznych z powodu niepłodności pary, czyli brak ciąży pomimo regularnych stosunków płciowych (minimum 3 w tygodniu), utrzymywanych powyżej 12 m-cy bez stosowania jakichkolwiek metod antykoncepcyjnych w okresie od grudnia 2014 do czerwca 2016 roku.

Do badania kwalifikowano wyłącznie kobiety regularnie miesiączkujące, u których potwierdzono cykle owulacyjne, nieposiadające współistniejących chorób przewlekłych o znaczeniu klinicznym, mogących obniżyć rezerwę jajnikową (np. niewydolność kory nadnerczy, nieprawidłowy kariotyp, zespół łamliwego chromosomu X). Kryterium wykluczające stanowiły: trzy poronienia w wywiadzie, powyżej trzech przeprowadzonych procedur zapłodnienia pozaustrojowego, samoistna przedwczesna niewydolność jajników, przebyte leczenie chirurgiczne w obrębie jajników, chemioterapii lub radioterapii miednicy mniejszej (czyli stany mogące prowadzić do jatrogennej obniżenia rezerwy jajnikowej), obecność torbieli w jajnikach w tym endometrianych (z wyłączeniem torbieli funkcjonalnych) oraz stany przebiegające z brakiem cykli owulacyjnych takie jak zespół policystycznych jajników, przedwczesne wygaśnięcie czynności jajników, hipogonadyzm hipogonadotropowy, hiperprolactynemia z uwagi na to, że te choroby mogą być przyczyną skrajnie niskiej lub wysokiej rezerwy jajnikowej.

Kobiety, które zgodziły się na udział w badaniu po zapoznaniu się z protokołem badania i podpisaniu zgody na udział w badaniu zostały poproszone o wypełnienie kwestionariusza. Badaniem objętych zostało 511 kobiet w wieku 24-39 lat.

6.2 Model badania epidemiologicznego

Przedmiotem analizy była zależność pomiędzy narażeniem na powszechnie występujące czynniki środowiskowe z grupy zaburzających funkcję endokrynną (bisfenol A, parabeny, triklosan, syntetyczne pyretroidy) na rezerwę jajnikową kobiet.

Dla analizy tych zależności przyjęto model badania przekrojowego. Analiza obejmowała kobiety, które zgłosiły się do kliniki leczenia niepłodności w celach diagnostycznych z powodu niepłodności pary, (czyli brak ciąży pomimo regularnych stosunków płciowych (minimum 3 w tygodniu), utrzymywanych powyżej 12 miesięcy bez stosowania jakichkolwiek metod antykoncepcyjnych. W analizie kontrolowano następujące potencjalne czynniki zakłócające: wiek, palenie tytoniu, BMI.

6.3 Metodyka pozyskiwania informacji o badanej populacji

6.3.1 Wywiad kwestionariuszowy

Informacje odnośnie badanych kobiet uzyskano na podstawie kwestionariusza. Wywiad obejmował dane dotyczące cech społeczno-demograficznych, stylu życia (palenie, spożywanie alkoholu, diety (na podstawie kwestionariusza na temat częstości spożywania wybranych produktów - Food Frequency Questionnaire), aktywności fizycznej (na podstawie kwestionariusza Seven Day Physical Activity Recall, dotyczącego aktywności fizycznej w ostatnich 7 dniach, pozwalającego wyliczyć wydatek energetyczny [Metabolic Equivalent Task- MET]), stresu (kwestionariusz Cohena - stres życiowy, kwestionariusz do Subiektywnej Oceny Pracy - stres zawodowy), chorób występujących w przeszłości i innych narażeń występujących w środowisku zamieszkania lub pracy (kwestionariusz narażeń i pracy zawodowej przygotowany w Instytucie Medycyny Pracy w Łodzi).

Na podstawie pomiarów antropometrycznych został obliczony wskaźnik masy ciała BMI (ang. Body Mass Index) oraz stosunek obwodu talii do obwodu bioder WHR (ang. Waist to Hip Ratio).

6.3.2 Ocena poziomu stresu

Ocena stresu zawodowego:

Ocena poziomu stresu zawodowego została wykonana za pomocą Kwestionariusza do Subiektywnej Oceny Pracy (Dudek i wsp., 2004). Służy on do oceny subiektywnej percepcji pracy i przeznaczony jest do pomiaru indywidualnego poczucia stresu zawodowego pracowników. Metoda ta pozwala na ocenę, czy sytuacja stresująca ma miejsce, oraz na ogólną ocenę poczucia stresu. Kwestionariusz składa się z 55 pozycji opisujących różne cechy pracy. Przy każdej z nich znajdują się cyfry od 1 do 5, które określają stopień, w jakim dana cecha jest uciążliwa, irytująca i stresująca dla osoby oceniającej. Cyfra „1” oznacza, że dana cecha w ogóle nie występuje na danym stanowisku, a „5” to najwyższy stopień jej uciążliwości. Wskaźnik poziomu poczucia stresu jest sumą ocen (punktów) zakreślonych przez badanego pracownika. Im jest ona wyższa, tym większe jest poczucie stresu badanej osoby.

Ocena stresu życiowego:

Stres życiowy oceniano za pomocą Skali Odczuwanego Stresu (PSS - Perceived Stress Scale) (Cohen i wsp., 1983). PSS służy do badania osób dorosłych, zdrowych i chorych. Zawiera 10 pytań dotyczących różnych subiektywnych odczuć związanych z problemami i zdarzeniami osobistymi, zachowaniami i sposobami radzenia sobie. Służy do oceny natężenia stresu związanego z własną sytuacją życiową na przestrzeni ostatniego miesiąca. W rezultacie skala mierzy tylko obecny (nie chroniczny) poziom postrzeganego stresu.

Pytania są zaprojektowane w ten sposób, aby respondenci oszacowali jak nieprzewidywalne, niekontrolowane i przeciążone jest ich życie. Ponadto, pytania mają charakter ogólny, a zatem są stosunkowo wolne treści, które byłyby specyficzne dla danej grupy społecznej.

Odpowiadając na każde z pytań wskazuje się jak często badana osoba odczuwała, czy myślała w określony sposób (Cohen i wsp., 1983). Opcje odpowiedzi dla każdego uczucia lub myśli to: nigdy, prawie nigdy, czasami, dość często, bardzo często. Wyniki stanowią sumę w punktach z każdego pytania. Im wyższa ocena tym wyższy poziom ich globalnego (życiowego) stresu.

6.3.3 Ocena diety

Dieta została oceniona przy użyciu kwestionariusza dotyczącego częstości spożywania wybranych produktów FFQ - Food Frequency Questionnaire (Rimm i wsp., 1992). Kwestionariusz FFQ uważany jest za trafne narzędzie pomiarowe, które może być źródłem rzetelnych informacji o częstotliwości i ilości zwyczajowo spożywanej żywności (Rimm i wsp., 1992). Zasadnicza część kwestionariusza FFQ zawiera pytania dotyczące zwyczajowej częstotliwości spożywania produktów w ciągu ostatnich 12 miesięcy. Częstotliwość spożywania produktów jest określana przez respondentów poprzez swobodne wskazanie zwyczajowej częstotliwości spożywania w ciągu dnia, tygodnia, miesiąca i roku. Respondenci mieli do wyboru 6 kategorii częstotliwości spożycia żywności: (1) nigdy lub prawie nigdy, (2) 1-3 razy w tygodniu, (3) 4-6 razy w tygodniu, (4) codziennie, (5) 1-3 razy w miesiącu, (6) rzadziej niż raz w miesiącu.

6.3.4 Ocena aktywności fizycznej

Aktywność fizyczna została oszacowana na podstawie kwestionariusza Seven Day Physical Activity Recall. Narzędzie koncentruje się na zebraniu danych o częstotliwości, intensywności oraz czasie trwania zarówno aktywności fizycznej związanej z wykonywaniem zawodu jak i pozazawodowej w okresie 7 dni poprzedzających badanie (Garfield i wsp., 2012). Umożliwia obliczenie całkowitego wydatku energetycznego w ciągu doby czy tygodnia. Pozwala zgromadzić informacje dotyczące aktywności ruchowej o małej (1,5 METs (ang. Metabolic Equivalent Task (wydatek energetyczny))/h), umiarkowanej (4 METs/h), dużej (6 METs/h) i bardzo dużej (10 METs/h) intensywności (Zuazagoitia i wsp., 2014). Uwzględnia wydatek energetyczny związany ze snem (1 METs/h). Dzięki temu możliwe jest szacowanie całkowitego wydatku energetycznego w ciągu doby czy tygodni (kcal/kg/dzień, kcal/kg/tydzień), również w odniesieniu do masy ciała badanych (kcal/dzień, kcal/tydzień) (Zuazagoitia i wsp., 2014).

6.3.5 Ocena środowiska pracy

Praca zawodowa została oceniona na podstawie Kwestionariusza narażeń i pracy zawodowej przygotowanego w Instytucie Medycyny Pracy w Łodzi. Kwestionariusz zawierał nazwę stanowiska, zadania wykonywane w pracy, pozycję ciała podczas pracy i czas jej utrzymywania, dźwiganie ciężkich przedmiotów. Narzędzie zawierało również informacje o narażeniu zawodowym na czynniki chemiczne (rozpuszczalniki, pestycydy, metale ciężkie, barwniki, farby, lakiery i PCW), substancje biologiczne (krew, mocz), i czynniki fizyczne (promieniowanie jonizujące, promieniowanie X, ekspozycja do pól elektromagnetycznych, hałasu, wysokiej temperatury i drgania mechaniczne).

6.3.6 Pomiary antropometryczne

W celu oceny występowania otyłości u badanych kobiet wykonane były następujące pomiary: 1) waga ciała z dokładnością do 0,1 kg – przy wykorzystaniu elektronicznej wagi osobowej SECA (model 8801321009, SECA UK Ltd; Birmingham, UK); 2) wzrost, z dokładnością do 1 mm – przy wykorzystaniu stadiometru (Leicester Height Measure, SECA UK Ltd), 3) obwód pasa i bioder, z dokładnością do 1 mm – przy wykorzystaniu taśmy mierniczej.

6.4 Ocena rezerwy jajnikowej badanych kobiet

Rezerwa jajnikowa została oceniona za pomocą badania:

1. liczby pęcherzyków antralnych (AFC) (ang. Antral Follicle Count);
2. stężenia hormonu AMH (ang. Anti-Müllerian Hormone);
3. stężenia hormonu FSH (ang. Follicle-Stimulating Hormone) (na początku cyklu (2-4 dzień cyklu));
4. stężenia estradiolu (na początku cyklu (2-4 dzień cyklu)).

Koncentracja AMH w surowicy krwi oznaczana była metodą mikroimmunoenzymatyczną (ELISA) z wykorzystaniem komercyjnych zestawów wg. instrukcji producenta (The AMH Gen II ELISA kit i The Inhibin B Gen II ELISA kit; Beckman Coulter, Inc., USA). Koncentracja FSH i estradiolu w surowicy krwi zostały oznaczone metodą chemiluminescencyjną z wykorzystaniem komercyjnych zestawów dla systemu VITROS Eci wg. instrukcji producenta (Ortho-Clinical Diagnostics Johnson & Johnson, UK).

Badanie ilości pęcherzyków antralnych było przeprowadzone zgodnie z rekomendacjami (Broekmans i wsp., 2010). Badania były przeprowadzone wyłącznie przez certyfikowanych lekarzy w zakresie badań USG w ginekologii, przeszkolonych

w zakresie oceny AFC. Wszystkie badania były przeprowadzone na początku fazy folikularnej, pomiędzy 2-4 dniem cyklu. Wykonywanie oceny liczby pęcherzyków antralnych we wczesnej fazie folikularnej jest rekomendowane celem zmniejszenia fluktuacji AFC w cyklu wynikającej z obecności torbieli czy też ciała żółtego. Do oceny uwzględniane były pęcherzyki o wymiarach od 2 do 10 mm.

6.5 Ocena ekspozycji na wybrane czynniki środowiskowe

W próbkach moczu oznaczane były nietrwałe zanieczyszczenia organiczne takie jak: metabolity pyretroidów (CDCCA, TDCCA (kwas cis- i trans-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowy), cis-DBCA (kwas cis-(2,2-dibromowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowy), 3-PBA (kwas 3-fenoksybenzoesowy)), całkowite stężenie parabenów (suma stężeń wolnych metabolitów oraz połączeń z kwasem glukuronowym parabenów: metylowego, etylowego, propylowego, butylowego i izobutylowego), bisfenol A oraz triklosan. Izolacja analitów z matrycy przeprowadzona była z zastosowaniem półautomatycznej mikroekstrakcji do fazy stałej (Micro-Extraction by Packed Syringe - MEPS), ekstrakty zostały poddane derywatywacji i analizie z użyciem chromatografii gazowej z tandemową spektrometrią mas (GC-MS/MS).

Metody analityczne były poddawane wewnętrznej kontroli jakości (zastosowanie materiałów odniesienia) oraz kontroli zewnątrz laboratoryjnej poprzez udział w międzynarodowych programach kontroli jakości (G-EQUAS -The German External Quality Assessment Scheme For Analyses in Biological Materials).

6.6 Analiza statystyczna

W zaplanowanych analizach wpływu badanych czynników środowiskowych na rezerwę jajnikową kobiet zgodnie z przyjętymi celami badawczymi uwzględnionych zostało szereg czynników zakłócających. Czynniki te zostały wyłonione na podstawie piśmiennictwa oraz analiz na podstawie badania. Analiza statystyczna została wykonana przy użyciu pakietu statystycznego R (ver.3) (R Core Team, 2016). Przyjęto poziom istotności statystycznej $p=0,05$.

Ustalono, że wymagana minimalna wielkość próby przy poziomie istotności 0,05, moc dla wybranej hipotezy alternatywnej 0,8 oraz $OR=2$ wynosi 385. W przypadku zmiennych ciągłych wymagana wielkość próby może być mniejsza.

Pierwszym etapem analizy była identyfikacja czynników zakłócających. Kolejny etap obejmował regresję liniową lub logistyczną. Ostateczny model wieloczynnikowy uwzględniał czynniki zakłócające oraz wszystkie istotne czynniki w modelu jednoczynnikowym na poziomie istotności 0,1. Czynniki potencjalnie wpływające na parametry rezerwy jajnikowej uwzględnione przy modelowaniu związku badanych narażeń z rezerwą jajnikową przy pomocy regresji liniowej: wiek pacjentki, BMI, palenie tytoniu (tak/nie).

Wartości liczbowe stężeń badanych czynników środowiskowych poniżej granicy oznaczalności ($<LOD$) zastąpiono wartościami $LOD/2$ (Meeker i wsp., 2011). Dla wszystkich (tj. włączając osoby z wartościami $LOD/2$ dla próbek poniżej LOD) próbek narażeń oraz oddzielnie dla podzbioru próbek o wartościach oznaczalnych ($>LOD$) wyznaczono statystyki opisowe: średnie arytmetyczne, odchylenia standardowe, średnie geometryczne, mediany itd. Stężenie badanych czynników środowiskowych zostało przedstawione, jako wartości z przeliczeniem na ciężar właściwy moczu (stosunek gęstości obiektu do substancji odniesienia) i bez przeliczenia na ciężar właściwy moczu wg. wzoru:

stężenie znormalizowane = stężenie oznaczone*(1.015-1) / (oznaczona gęstość właściwa moczu -1) (Meeker i wsp., 2011).

Na podstawie tak określonych pomiarów określano dyskretne percentyle narażenia. Powtarzalność pomiarów narażeń weryfikowano przez wykonanie dodatkowego (powtórnego) pomiaru a następnie wyznaczono współczynniki korelacji Spearmana między pierwszym i powtórny pomiar stężenia. Ze względu na nieregularność i asymetrię rozkładów pomiarów narażeń zmienne opisujące narażenia wykorzystano w modelach regresji w postaci zdyskretyzowanej (skategoryzowanej).

Czynniki środowiskowe takie jak: trzy metabolity syntetycznych pyretroidów: CDCCA, TDCCA, DBCA oraz paraben izobutyłowy zostały podzielone na dwie grupy: <LOD i ≥LOD ze względu na to, że oznaczenia w ponad 60% prób były poniżej granicy wykrywalności (LOD).

Z kolei czynniki środowiskowe takie jak: metyl-paraben, etyl-paraben, propyl-paraben, butyl-paraben, triklosan, bisfenol A i 3-PBA zostały podzielone na cztery grupy, ze względu na wielkość narażenia: ≤25 percentyla, (25-50] percentyl, (50-75] percentyl, >75 percentyla. Dodatkowo narażenie było również przedstawione, jako zmienna ciągła.

Zmienne wynikowe, określające rezerwę jajnikową użyto w postaci dychotomicznej skategoryzowanej na dwa poziomy: poziom poniżej mediany i powyżej mediany oraz alternatywnie w postaci zlogarytmowanej. Dla zmiennych wynikowych w postaci dychotomicznej stosowano model regresji logistycznej, a dla zmiennych zlogarytmowanych zwykły model regresji liniowej.

Następnie obliczono parametry poszczególnych modeli regresji, w których zmienną zależną były zmienne określające stan rezerwy jajnikowej, a zmiennymi objaśniającymi były skategoryzowane stężenia narażeń oraz (dodatkowo, jako zmienne również wpływające na stan rezerwy jajnikowej) wyżej wspomniane czynniki zakłócające.

Miarą potencjalnego wpływu narażenia i rezerwy jajnikowej był współczynnik regresji beta dla zmiennej objaśniającej będącej miarą narażenia. Współczynnik regresji dla zmiennej narażenia otrzymany w modelu zawierającym zarówno zmienną narażenia jak i zmienne zakłócające nazywany jest - zgodnie z przyjętą terminologią epidemiologiczną - współczynnikiem skorygowanym wg. w/w czynników zakłócających, a współczynnik z modelu zawierającego tylko zmienną narażenia – współczynnikiem surowym.

Wyznaczono w ten sposób współczynniki zależności poszczególnych miar rezerwy jajnikowej od poszczególnych narażeń.

6.7 Realizacja badania

Badaniem objęto 511 kobiet w wieku od 24-39 lat rekrutowanych w klinice leczenia niepłodności i zgłaszających się do tego ośrodka w celach diagnostycznych z powodu niepłodności pary, czyli braku osiągnięcia ciąży pomimo regularnych stosunków płciowych t.j. minimum 3 razy w tygodni utrzymywanych powyżej 12 miesięcy bez stosowania jakichkolwiek metod antykoncepcyjnych. Osoby, które wyraziły chęć na udział w badaniu po zapoznaniu się z protokołem badania i podpisaniu zgody na udział w badaniu zostały poproszone o wypełnienie kwestionariusza. Informacje uzyskane na podstawie wywiadu zostały uwzględnione w analizie, jako potencjalne czynniki zakłócające.

Każda z badanych kobiet została poddana badaniu lekarskiemu. Na podstawie pomiarów antropometrycznych został obliczony wskaźnik masy ciała BMI (ang. Body Mass Index) oraz stosunek obwodu talii do obwodu bioder WHR (ang. Waist to Hip Ratio).

Od badanych osób został pobrany materiał biologiczny: krew i mocz. Mocz został pobrany dwukrotnie (w odstępie 3 do 6 miesięcy) w celu weryfikacji narażenia na nietrwałe związki środowiskowe.

Ocena stanu klinicznego oraz rezerwa jajnikowa zrekrutowanych pacjentek została przeprowadzona w klinice leczenia niepłodności lub placówkach współpracujących. Badanie przedmiotowe i podmiotowe oraz ultrasonograficzne narządu rodno były przeprowadzone według jednolitych standardów przez lekarzy specjalistów z dziedziny położnictwa i ginekologii, certyfikowanych w zakresie badań ultrasonograficznych w ginekologii.

Wszystkie badania kwestionariuszowe, badanie lekarskie, pobrania moczu były przeprowadzone podczas pierwszej kwalifikacyjnej do metod wspomaganego rozrodu. Od rekrutowanych pacjentek w odstępie od trzech do sześciu miesięcy ponownie został pobrany mocz celem weryfikacji narażenia na czynniki środowiskowe. Podczas kolejnej wizyty pomiędzy 2-4 dniem cyklu przeprowadzono pobrania krwi oraz USG transwaginalne narządu rodno wykonywane w celu oceny AFC.

Oznaczenia czynników środowiskowych zostały przeprowadzone metodą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas w Katedrze Toksykologii, Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku.

Na badanie uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej działającej przy Instytucie Medycyny Pracy w Łodzi- Uchwała nr 23/2014 z dnia 04.11.2014.

7. Wyniki

7.1 Ogólna charakterystyka badanej populacji

Badaniem objęto 511 pacjentek kliniki leczenia niepłodności, które wyraziły zgodę na udział w badaniu. Charakterystyka badanych kobiet przedstawiona jest w Tabeli 1. Większość z badanych kobiet miało wykształcenie wyższe (75%) i średnie (21%). Osoby z wykształceniem zawodowym stanowiły około 4% badanych. Średnia wieku badanych osób wynosiła 33 lata. W związku małżeńskim pozostawało 93% badanych kobiet. Aktywnych zawodowo było 92% badanych kobiet, bez pracy pozostawało tylko 8% osób. Analizując okres starań o ciążę badanych par zgłaszających się do kliniki, stwierdzono, że czas trwania niepłodności w większości przypadków wynosił 3–5 lat (29,55%) i >5 lat (35,23%). Przebyte w przeszłości choroby dotyczyły niewielkiej liczby badanych kobiet i pozostawały bez związku z niepłodnością partnerską. Tylko 15% badanych deklarowało przebycie lub leczenie przewlekłe z powodu jednej z chorób wymienionych w kwestionariuszu (nadciśnienie tętnicze, wady serca, choroby nerek, nowotwory, cukrzyca, choroby tarczycy, choroby skórne, alergie). U badanych kobiet wymagających leczenia z powodu podanych chorób przewlekłych, choroba była wyrównana i nie stanowiła przeciwwskazania do ciąży. Większość z badanych kobiet miało prawidłową wagę ciała (59%; BMI 18,5-24,9 kg/m²) i nie paliło papierosów (92,17%), 30% badanych miało nadwagę (BMI 25-29,9 kg/m²). Badane kobiety były aktywne fizycznie. Uprawianie jakiegokolwiek formy aktywności fizycznej deklarowało 68% badanych. 81% kobiet spożywało kawę, najczęściej codziennie (70,67%). Większość badanych kobiet spożywało czerwone wino (około 61%), piwo (54%) i białe wino najczęściej 1-3 razy w miesiącu (47%). Spożycie alkoholi wysokoprocentowych

deklarowało 36% badanych kobiet, najczęściej rzadziej niż 1 w miesiącu (41%). Suma punktów z Kwestionariusza do Subiektywnej Oceny Pracy wynosiła średnio $94,4 \pm 25,0$ co odpowiada średniemu poziomowi stresu zawodowego (Dudek i wsp., 2004). Natomiast suma punktów z Kwestionariusza Cohena wynosiła $22,1 \pm 5,8$ i był to średni poziom stresu wynikającego z codziennego życia.

Tabela 1. Charakterystyka badanej populacji

Zmienna	N (%)	Średnia ± SD
Wykształcenie		
Podstawowe	0	
Zasadnicze	18 (3,52%)	
Średnie	108 (21,14%)	
Wyższe	385 (75,34%)	
Wiek [lata]		33,30 ± 3,69
24-30	121 (23,68%)	
31-39	390 (76,32%)	
BMI [kg/m²]		23,18 ± 3,80
<18,5	29 (5,68%)	
18,5-24,9	301 (58,90%)	
25-29,9	154 (30,14%)	
30-40	27 (5,28%)	
Stan cywilny		
Mężatka	477 (93,35%)	
Panna	25 (4,89%)	
Rozwódka	9 (1,76%)	
Palenie papierosów		
Nie	471 (92,17%)	
Tak	40 (7,83%)	
Czas trwania niepłodności (lata)		
1-2	39 (7,63%)	
2-3	141 (27,59%)	
3-5	151 (29,55%)	
>5	180 (35,23%)	
Praca zawodowa		
Nie	42 (8,22%)	
Tak	469 (91,78%)	
Aktywność fizyczna		
Nie	162 (31,70%)	
Tak	349 (68,30%)	
Przebyte choroby		
Cukrzyca	3 (0,59%)	
Wady serca	8 (1,57%)	
Nadciśnienie tętnicze	11 (2,15%)	
Choroby nerek	7 (1,37%)	
Nowotwory	6 (1,17%)	
Inne choroby (m in. ch. tarczycy, ch. skóry, alergie)	42 (8,23%)	
Spożycie kawy		
Nie	95 (18,59%)	
Tak	416 (81,41%)	
Spożycie alkoholu		
Piwo	276 (54,01%)	
Białe wino	241 (47,16%)	
Czerwone wino	310 (60,67%)	
Alkohole wysokoprocentowe	182 (35,62%)	
Stres zawodowy (Kwestionariusz do subiektywnej oceny pracy)		94,9±25,0
Suma punktów		
Stres związany z codziennym życiem (Kwestionariusz Cohena)		22,1±5,9
Suma punktów		

N –liczba; SD - odchylenie standardowe

7.2 Ocena rezerwy jajnikowej

Liczba pęcherzyków antralnych u badanych kobiet wynosiła $12,73 \pm 8,94$ i była w granicach normy. AFC <4 pęcherzyków jest związane ze znacznym zmniejszeniem szansy na ciążę oraz z tym, że odpowiedź jajników na stymulację owulacji będzie nieprawidłowa (Radwan i Wołczyński, 2011). Stężenie AMH wynosiło $1,17 \pm 1,46$ ng/ml i było nieznacznie wyższe niż norma. W przypadku FSH i estradiolu średnie stężenie wynosiło $6,38 \pm 2,18$ mIU/ml i $93,74 \pm 16,63$ odpowiednio i mieściło się w granicach norm dla tych hormonów (Tabela 2).

Tabela 2. Parametry oceny rezerwy jajnikowej badanych kobiet

Parametry	A Średnia \pm SD	G Średnia \pm SD	Min	Q25	Median	Q75	Q95	Max
AFC (n)	$12,73 \pm 8,94$	$12,25 \pm 1,73$	1	8	11	20	30	40
AMH (ng/ml)	$1,17 \pm 1,46$	$1,21 \pm 1,4$	0,02	0,9	1,3	2,9	9,36	18
FSH (IU/l)	$6,38 \pm 2,18$	$6,00 \pm 1,43$	0,9	4,86	6,14	7,51	10,48	13,5
E2 (pg/ml)	$93,74 \pm 16,63$	$91,33 \pm 12,89$	75	83	95	120	180	200

A Średnia- średnia arytmetyczna; G Średnia- średnia geometryczna; SD- odchylenie standardowe; Min-wartość minimalna; Max-wartość maksymalna; Q25-25 perentyl; Q75-75 percentyl, Q95-95 percentyl; AMH-hormon anty-Müllerowski; AFC- liczba pęcherzyków antralnych; FSH-hormon folikulotropowy; E2-estradiol.

7.3 Stężenie wybranych czynników środowiskowych zaburzających funkcję endokrynną

Wyniki przeprowadzonego badania wykazały, że osoby uczestniczące w badaniu były środowiskowo ekspozowane na badane czynniki środowiskowe zaburzające funkcję endokrynną: parabeny, syntetyczne pyretroidy, bisfenol A i triklosan (Tabela 3). Średnie geometryczne stężenie parabenów w moczu badanych osób w pierwszej próbie wynosiło: butylowego $4,70 \pm 2,96$ ng/ml, etylowego $11,2 \pm 7,0$ ng/ml, metylowego $92,68 \pm 4,28$ ng/ml,

propylowego $16,20 \pm 6,33$ ng/ml, a izobutyłowego $3,16 \pm 2,55$ ng/ml i było podobne do poziomu parabenów w innych badaniach wśród kobiet zarówno uczęszczających do kliniki leczenia niepłodności w celach diagnostycznych jak i u kobiet z populacji generalnej.

W przypadku metabolitów syntetycznych pyretroidów średnia geometryczna \pm SD wynosiły: CDCCA $0,22 \pm 2,40$ ng/ml TDCCA $0,50 \pm 2,62$ ng/ml, DBCA $0,26 \pm 2,42$ ng/ml, 3-PBA $0,31 \pm 2,60$ ng/ml. Średnie stężenie triklosanu i bisfenolu A wynosiło odpowiednio: $2,78 \pm 7,17$ ng/ml, $1,38 \pm 2,34$ ng/ml (Tabela 3).

Średnie stężenie parabenów w moczu skorygowane ciężarem właściwym moczu badanych osób w pierwszej próbie wynosiło: butylowego $5,02 \pm 3,05$ ng/ml, etylowego $12,90 \pm 7,04$ ng/ml, metylowego $107,93 \pm 4,39$ ng/ml, propylowego $18,67 \pm 6,25$ ng/ml a izobutyłowego $2,80 \pm 2,68$ ng/ml. W przypadku metabolitów syntetycznych pyretroidów średnia geometryczna \pm SD wynosiły: CDCCA $0,20 \pm 2,78$ ng/ml TDCCA $0,45 \pm 2,95$ ng/ml, DBCA $0,22 \pm 2,78$ ng/ml, 3-PBA $0,31 \pm 2,71$ ng/ml. Średnie stężenie triklosanu i bisfenolu A wynosiło odpowiednio: $3,04 \pm 7,14$ ng/ml, $1,60 \pm 2,15$ ng/ml (Tabela 3).

Tabela 3. Stężenie związków środowiskowych, zaburzających funkcję endokrynną (badanie I)

Stężenie (ng/ml)	Miary statystyczne									
	A Średnia±SD	G Średnia±SD	LOD	Q25	Mediana	Q75	Q95	Max	N	>LOD (%)
CDCCA	0,48±1,39	0,22±2,40	0,1	0,13	0,16	0,28	1,54	15,30	511	32,75
TDCCA	1,21±3,59	0,50±2,62	0,1	0,26	0,36	0,65	3,47	30,85	511	34,90
DBCA	0,50±1,23	0,26±2,42	0,1	0,14	0,20	0,34	2,16	11,10	511	19,41
3-PBA	0,72±2,33	0,31±2,60	0,1	0,16	0,25	0,48	2,28	29,50	511	66,47
MP	198,91±224,37	92,68±4,28	0,5	37,69	119,74	280,89	688,12	1260,36	511	93,92
EP	57,21±112,02	11,28±7,00	0,5	2,00	9,52	56,42	258,96	785,72	511	84,31
PP	97,80±430,61	16,20±6,33	0,5	4,06	15,54	59,21	371,12	7193,09	511	84,11
BP	10,13±20,22	4,70±2,96	1,0	1,99	3,95	8,60	40,89	202,43	511	64,12
iBuP	5,19±6,53	3,16±2,55	1,0	1,35	2,47	6,07	19,06	34,95	511	10,60
TCL	45,75±169,50	2,78±7,17	0,3	0,67	1,58	6,06	283,20	1677,68	511	82,75
BPA	2,25±4,77	1,38±2,34	0,2	0,78	1,29	2,27	5,96	68,63	511	96,67
SG adjusted (korygowane ciężarem właściwym moczu) (ng/ml)										
CDCCA	0,47±1,26	0,20±2,78	0,1	0,10	0,15	0,32	1,86	12,08	511	32,75
TDCCA	1,15±3,15	0,45±2,95	0,1	0,21	0,35	0,78	4,43	26,84	511	34,90
DBCA	0,49±1,04	0,22±2,78	0,1	0,12	0,18	0,35	2,70	7,93	511	19,41
3-PBA	0,70±2,12	0,31±2,71	0,1	0,15	0,24	0,50	2,30	24,01	511	66,47
MP	232,97±287,21	107,93±4,39	0,5	43,1	145,76	316,12	731,34	2922,30	511	93,92
EP	62,64±121,45	12,90±7,04	0,5	2,37	13,10	62,76	264,13	42,43	511	84,31
PP	98,94±382,95	18,67±6,25	0,5	4,56	18,49	72,70	359,68	5394,81	511	84,11
BP	10,90±21,58	5,02±3,05	1,0	2,27	4,29	9,73	37,21	197,77	511	64,12
iBuP	4,61±5,54	2,80±2,68	1,0	1,24	2,53	4,86	15,38	30,92	511	10,60
TCL	38,72±166,72	3,04±7,14	0,3	0,80	1,72	6,63	322,77	1900,92	511	82,75
BPA	2,39±4,63	1,60±2,15	0,2	0,95	1,52	2,42	6,85	79,19	511	96,67

A Średnia- średnia arytmetyczna; G Średnia- średnia geometryczna; Q25- 25 kwartyli; Q75-75 kwartyli; Q95-95 kwartyli; LOD (limit of detection) -granica wykrywalności, CDCCA- kwas *cis*-(2,2-dichlorowinylo) -2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksylowy, TDCCA- kwas *trans*-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksylowy; DBCA - kwas *cis*-(2,2-dibromowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksylowy; 3-PBA-kwas 3-fenoksybenzoesowy; MP-metyl-paraben; EP-etyl-paraben; PP-propyl-paraben; BP-butyl-paraben; iBuP-izobutyl- paraben; TCL – triklosan; BPA – bisfenol

W drugiej próbce moczu stężenia badanych związków (średnia geometryczna \pm SD) wynosiły w przypadku metabolitów syntetycznych pyretroidów: CDCCA $0,23\pm 0,30$ ng/ml, TDCCA $0,27\pm 0,33$ ng/ml, DBCA $0,30\pm 0,90$ ng/ml, 3-PBA $0,25\pm 0,33$ ng/ml. Stężenie parabenów (średnia geometryczna \pm SD) wynosiło: butylowego $3,99\pm 9,90$ ng/ml, etylowego $5,71\pm 44,97$ ng/ml, metylowego $49,13\pm 105,39$ ng/ml, propylowego $9,14\pm 38,58$ ng/ml. Paraben izobutyłowy nie został wykryty w drugiej próbce moczu. Stężenie triklosanu i bisfenolu A w drugiej próbce moczu wynosiło odpowiednio $1,67\pm 30,34$ ng/ml i $1,27\pm 1,71$ ng/ml (Tabela 4).

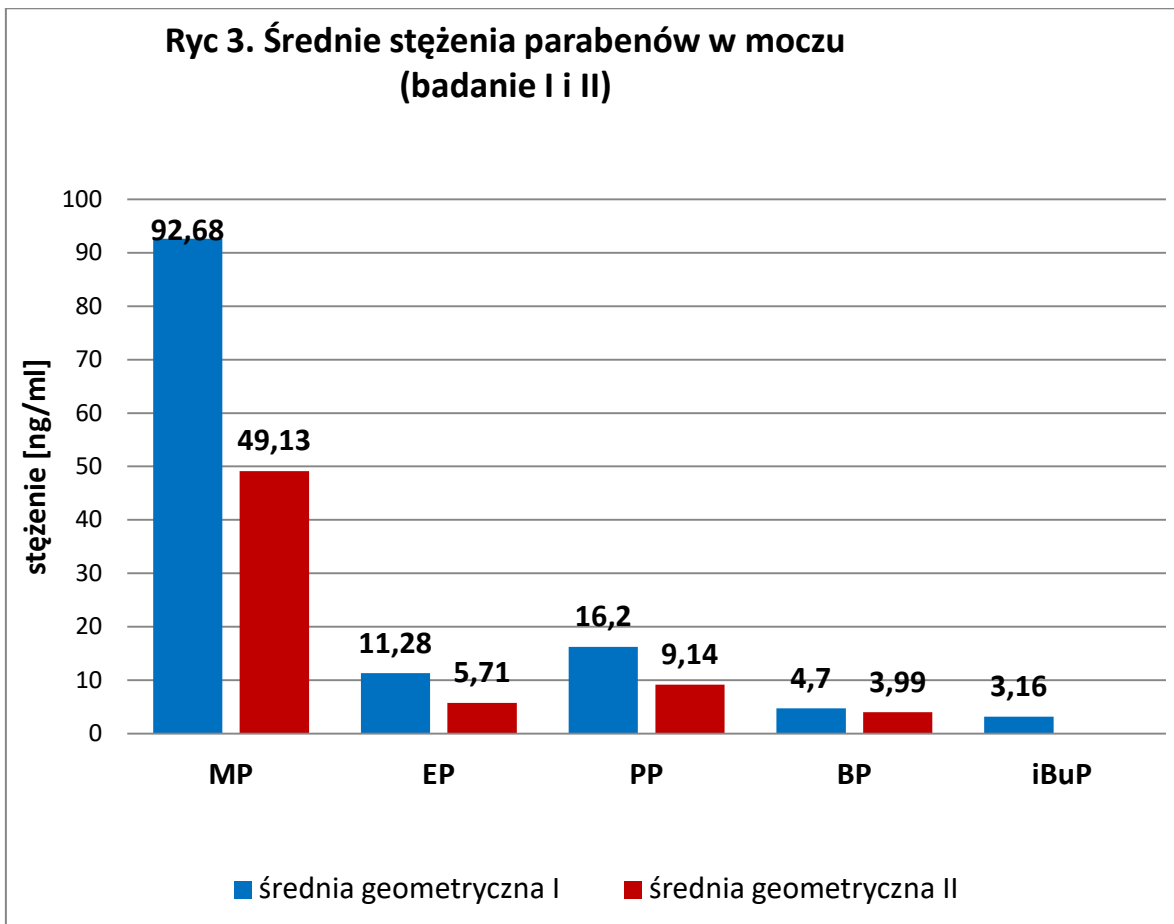
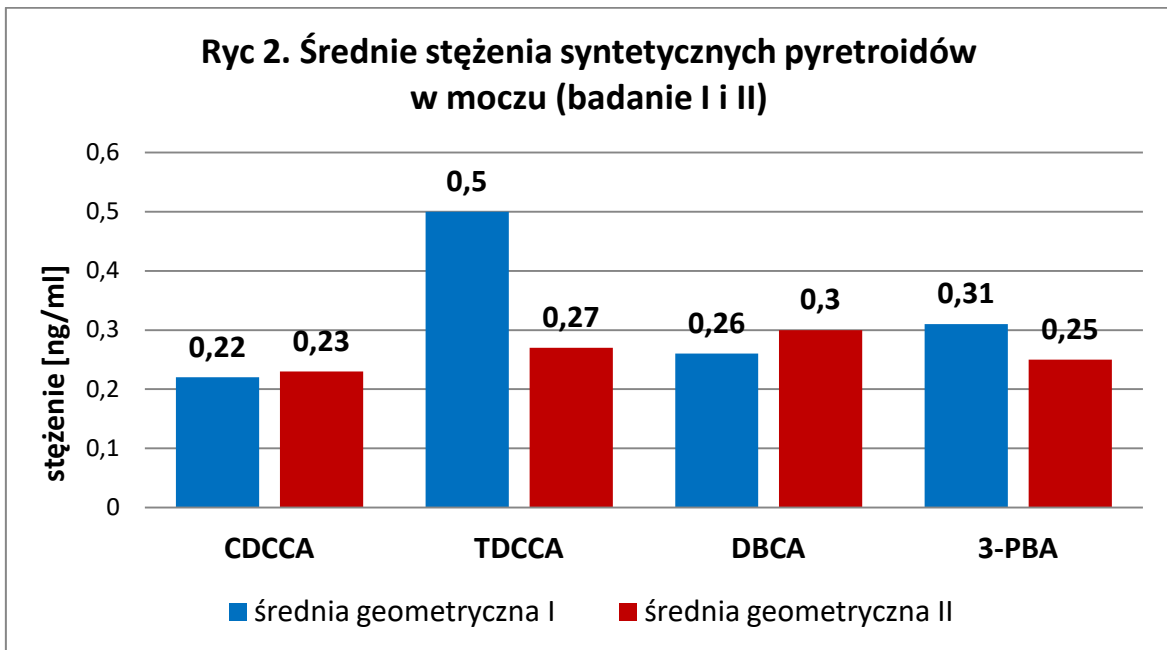
W drugiej próbce moczu średnie stężenia badanych związków (średnia geometryczna \pm SD) skorygowane ciężarem właściwym moczu u badanych osób w wynosiły w przypadku metabolitów syntetycznych pyretroidów: CDCCA $0,22\pm 0,49$ ng/ml, TDCCA $0,25\pm 0,39$ ng/ml, DBCA $0,32\pm 0,79$ ng/ml, 3-PBA $0,27\pm 0,51$ ng/ml. Średnie stężenia parabenów (średnia geometryczna \pm SD) wynosiło: butylowego $4,74\pm 7,73$ ng/ml, etylowego $7,85\pm 8,85$ ng/ml, metylowego $67,18\pm 125,60$ ng/ml, propylowego $46,49\pm 52,13$ ng/ml. Stężenie triklosanu i bisfenolu A w drugiej próbce moczu wynosiło odpowiednio $5,14\pm 12,37$ ng/ml i $1,72\pm 2,28$ ng/ml (Tabela 4).

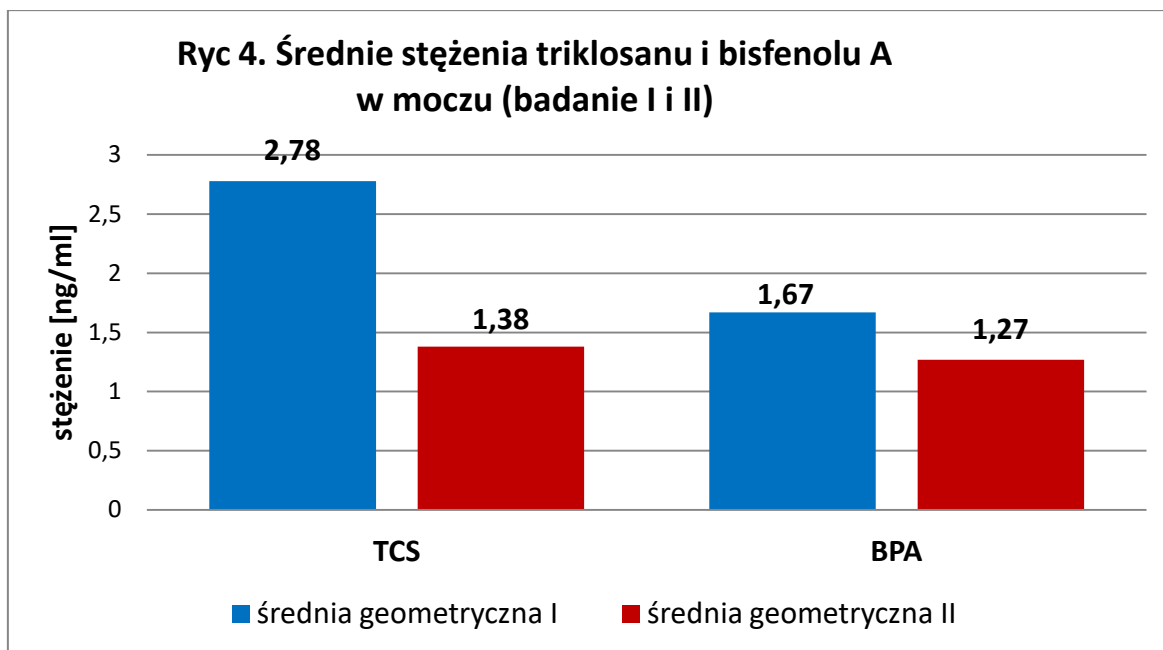
Porównanie średnich stężeń wybranych związków środowiskowych w pierwszym i drugim badaniu moczu przedstawia rycina 2, 3 i 4.

Tabela 4. Stężenie związków środowiskowych, zaburzających funkcję endokrynną (badanie II)

Stężenie (ng/ml)	Miary statystyczne									
	A Średnia±SD	G Średnia±SD	LOD	Q25	Mediana	Q75	Q95	Max	N	>LOD (%)
CDCCA	0,35±0,42	0,23±0,30	0,1	0,13	0,15	0,35	0,44	1,65	120	25
TDCCA	0,41±0,55	0,27±0,33	0,1	0,14	0,21	0,43	0,55	3,15	120	49,17
DBCA	0,76±1,16	0,30±0,90	0,1	0,13	0,20	0,46	0,52	7,24	120	27,5
3-PBA	0,40±0,59	0,25±0,33	0,1	0,14	0,22	0,34	0,43	3,32	120	61,67
MP	116,62±154,42	49,13±105,39	0,5	19,08	61,22	154,14	216,85	993,87	120	90,83
EP	33,91±71,06	5,71±44,97	0,5	1,19	3,51	24,09	37,21	391,51	120	71,67
PP	32,91±71,06	9,14±38,58	0,5	2,44	9,86	25,65	42,11	504,93	120	70
BP	9,44±30,90	3,99±9,90	1,0	1,90	3,43	7,76	9,21	235,34	120	47,5
TCL	19,31±64,59	1,67±30,34	0,3	0,41	0,76	3,35	7,29	396,13	120	53,33
BPA	2,11±3,41	1,27±1,71	0,2	0,62	1,08	2,33	4,56	27,39	120	53,33
SG adjusted (korygowane ciężarem właściwym moczu) (ng/ml)										
CDCCA	0,46±0,70	0,22±0,49	0,1	0,09	0,16	0,38	0,54	2,75	120	25
TDCCA	0,45±0,83	0,25±0,39	0,1	0,13	0,23	0,41	0,52	5,90	120	49,17
DBCA	0,69±1,71	0,32±0,79	0,1	0,12	0,21	0,44	0,56	10,93	120	27,5
3-PBA	0,53±1,08	0,27±0,51	0,1	0,14	0,22	0,41	0,61	7,12	120	61,67
MP	149,84±207,56	67,18±125,60	0,5	24,20	91,16	204,18	312,78	1715,13	120	90,83
EP	38,45±77,20	7,85±8,85	0,5	1,58	4,73	37,71	42,15	534,96	120	71,67
PP	39,75±82,17	46,49±52,13	0,5	3,46	11,49	10,02	17,21	470,18	120	70
BP	8,95±17,41	4,74±7,73	1,0	2,23	4,37	9,51	11,22	126,08	120	47,5
TCL	30,27±129,13	5,14±12,37	0,3	0,42	0,99	4,13	7,21	990,33	120	53,33
BPA	2,93±5,37	1,72±2,28	0,2	1,09	1,58	2,65	3,78	41,24	120	53,33

A Średnia- średnia arytmetyczna; G Średnia- średnia geometryczna; Q25- 25 kwartyli; Q75-75 kwartyli; Q95-95 kwartyli; LOD (limit of detection) -granica wykrywalności CDCCA- kwas *cis*- (2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksylowy, TDCCA- kwas *trans*-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksylowy; DBCA - kwas *cis*-(2,2-dibromowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksylowy; 3-PBA- kwas 3-fenoksybenzoesowy; MP-metyl-paraben; EP-etyl-paraben; PP-propyl-paraben; BP-butyl-paraben; TCL – triklosan; BPA – bisfenol A





7.4 Korelacje pomiędzy badanymi czynnikami środowiskowymi

Tabela 5 przedstawia korelacje Spearmana pomiędzy badanymi czynnikami środowiskowymi w pierwszym badaniu (pierwsza próbka moczu). Poniżej przekątnej przedstawione są współczynniki korelacji, natomiast powyżej przekątnej przedstawione są istotności statystyczne korelacji (p). W pierwszej próbce moczu badane związki silnie ze sobą korelowały. Istotnie statystyczną korelację zaobserwowano między metabolitami syntetycznych pyretroidów: CDCCA, TDCCA, DBCA, 3-PBA ($p < 0,001$). Bisfenol A (BPA) i butyl-paraben (BP) istotnie statystycznie korelowały ze wszystkimi badanymi związkami. Triklosan korelował istotnie statystycznie ze wszystkimi badanymi związkami, oprócz propyl-parabenu (PP) ($p = 0,28$). Etyl-paraben (EP), metyl-paraben (MP), propyl-paraben (PP), izobutyl-paraben (iBuP) korelowały ze wszystkimi badanymi związkami oprócz niektórych z badanych metabolitów syntetycznych pyretroidów.

Tabela 5. Korelacje pomiędzy badanymi czynnikami środowiskowymi (badanie I)

	CDCCA	TDCCA	DBCA	3-PBA	MP	EP	PP	iBuP	BP	TCL	BPA
CDCCA	1	<0,001	<0,001	<0,001	0,43	0,09	0,34	0,06	<0,001	<0,001	<0,001
TDCCA	0,77	1	<0,001	<0,001	0,12	0,005	0,33	0,08	<0,001	<0,001	<0,001
DBCA	0,26	0,18	1	<0,001	0,01	0,14	0,005	0,04	<0,001	0,007	<0,001
3-PBA	0,70	0,68	0,38	1	<0,001	0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001
MP	0,03	0,07	0,11	0,19	1	<0,001	<0,001	0,002	<0,001	<0,001	<0,001
EP	0,08	0,12	0,07	0,14	0,55	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001
PP	0,04	0,04	0,12	0,18	0,64	0,41	1	<0,001	<0,001	0,28	0,002
iBuP	0,08	0,08	0,09	0,14	0,13	0,17	0,16	1	<0,001	<0,001	0,04
BP	0,25	0,19	0,18	0,35	0,30	0,28	0,28	0,34	1	<0,001	<0,001
TCL	0,19	0,16	0,12	0,23	0,18	0,15	0,19	0,05	0,22	1	<0,001
BPA	0,24	0,23	0,25	0,34	0,18	0,14	0,14	0,09	0,27	0,27	1

Pod przekątną współczynniki korelacji; powyżej przekątnej wartości (*p*); CDCCA- kwas *cis*- (2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowy, TDCCA- kwas *trans*-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowy; DBCA - kwas *cis*-(2,2-dibromowinylo)-2,2- dimetylocyklopropano-1-karboksyłowy; 3-PBA- kwas 3-fenoksybenzoesowy; MP-metyl-paraben; EP-etyl-paraben; PP-propyl-paraben; BP-butyl-paraben; iBuP-izobutyl-paraben; TCL – triklosan; BPA – bisfenol A.

Tabela 6 przedstawia korelacje pomiędzy badanymi czynnikami środowiskowymi w badaniu II (druga próbka moczu). Ze względu na to, że drugie badanie moczu przeprowadzono wśród mniejsza liczby kobiet (N=120) korelacje między badanymi związkami wyglądały inaczej niż w badaniu I. W mniejszej liczbie przypadków badane związki były ze sobą skorelowane. Trzy z metabolitów syntetycznych pyretroidów (CDCCA, TDCCA i 3-PBA) korelowały ze sobą na poziomie istotności $p < 0,001$. Metabolit DBCA nie korelował w sposób istotny z CDCCA i TDCCA, natomiast

korelował z 3-PBA. Wynikało to z faktu, że było on wykryty jedynie w 30% badanych próbek.

3-PBA istotnie korelował z MP, PP, BP, TCL i BPA. Badane parabeny (EP, PP, MP, BP) również korelowały ze sobą, a nie odnotowano istotnie statystycznej korelacji między EP i BP oraz PP i BP. Nie zaobserwowano również korelacji pomiędzy MP i EP a bisfenolem A i pomiędzy wszystkimi badanymi parabenami a triklosanem.

Tabela 6. Korelacje pomiędzy badanymi czynnikami środowiskowymi (II badanie)

	CDCCA	TDCCA	DBCA	3-PBA	MP	EP	PP	BP	TCL	BPA
CDCCA	1	<0,001	0,14	<0,001	0,80	0,59	0,41	0,54	0,05	0,02
TDCCA	0,73	1	0,12	<0,001	0,07	0,36	0,02	0,20	0,002	0,01
DBCA	0,14	0,15	1	<0,001	0,08	0,54	0,15	0,17	0,49	0,06
3-PBA	0,51	0,56	0,49	1	0,003	0,71	0,007	0,02	0,03	0,002
MP	0,02	0,17	0,16	0,28	1	<0,001	<0,001	0,004	0,12	0,06
EP	0,05	0,09	0,06	0,03	0,44	1	<0,001	0,09	0,62	0,22
PP	0,08	0,19	0,13	0,25	0,49	0,37	1	0,17	0,13	0,003
BP	0,06	0,12	0,13	0,23	0,26	0,16	0,13	1	0,37	0,008
TCL	0,18	0,28	0,07	0,20	0,15	-0,05	0,14	0,08	1	0,008
BPA	0,23	0,24	0,17	0,27	0,17	0,11	0,27	0,25	0,24	1

Pod przekątną współczynniki korelacji; powyżej przekątnej wartości p ; CDCCA- kwas *cis*-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksylowy, TDCCA- kwas *trans*-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksylowy; DBCA - kwas *cis*-(2,2-dibromowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksylowy; 3-PBA- kwas 3-fenoksybenzoesowy; MP-metyl-paraben; EP-etyl-paraben; PP-propyl-paraben; BP-butyl-paraben; TCL – triklosan; BPA – bisfenol A

Stężenia parabenów (MP, EP, PP) i triklosanu korelowały ze sobą w dwóch próbkach moczu. Natomiast w przypadku bisfenolu A, metabolitów syntetycznych pyretroidów i butyl-parabenu stężenia w I i II próbie różniły się (Tabela 7). Wynika to z tego, że parabeny i triklosan występują w produktach kosmetycznych, które używamy przez cały czas. Natomiast pyretroidy występują w preparatach, które stosujemy sezonowo (spray na komary, nawozy dla roślin). Jeśli chodzi o butyl-paraben to brak korelacji może

wynikać z faktu, że był on wykryty jedynie w 47% badanych prób w drugim badaniu i 64% w badaniu pierwszym.

Analizując stężenia bisfenolu A, to mimo powszechnego jego użycia, w większości dostępnych danych również, wykazano zmienność w uzyskiwanych wynikach pomiędzy dwoma próbkami moczu pobieranymi u tej samej osoby (Meeker i wsp., 2011). Może to wynikać z faktu, że bisfenol A uwalniany jest przy podgrzaniu produktu oraz większej konsumpcji napoi w okresie letnim.

Tabela 7. Korelacje pomiędzy stężeniami badanych czynników środowiskowych w dwóch próbach moczu

Badane czynniki	coef	p
B1 CDCCA ~ B2 CDCCA	0,09	0,33
B1 TDCCA ~ B2 TDCCA	0,16	0,10
B1 DBCA ~ B2 DBCA	-0,01	0,96
B1 3-PBA ~ B2 3-PBA	0,15	0,12
B1 MP ~ B2 MP	0,31	0,001
B1 EP ~ B2 EP	0,32	<0,001
B1 PP ~ B2 PP	0,39	<0,001
B1 iBuP ~ B2 iBuP	Brak wykrywalności w drugiej próbce	
B1 BP ~ B2 BP	0,08	0,39
B1 TCL ~ B2 TCL	0,28	0,002
B1 BPA ~ B2 BPA	0,03	0,75

B1-badanie pierwsze; B2-badanie drugie, coef- współczynnik korelacji; CDCCA- kwas *cis*- (2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksylowy, TDCCA- kwas *trans*-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksylowy; DBCA - kwas *cis*-(2,2-dibromowinylo)-2,2- dimetylocyklopropano-1-karboksylowy; 3-PBA-kwas 3-fenoksybenzoesowy; MP-metyl-paraben; EP-etyl-paraben; PP-propyl-paraben; BP-butyl-paraben; iBuP-izobutyl-paraben; TCL – triklosan; BPA – bisfenol A.

7.5 Ocena zależności między narażeniem na wybrane czynniki środowiskowe a rezerwą jajnikową badanych kobiet

Narażenie jako zmienna ciągła-modele jedno i wieloczynnikowe

Gdy analizowano zmienne narażenia, jako zmienne ciągłe wykazano, że stężenie parabenu propylowego i butylowego wpływało na obniżenie liczby pęcherzyków

antralnych ($p=0,028$ i $p=0,04$ odpowiednio). Również narażenie na bisfenol A wpływało negatywnie na liczbę pęcherzyków antralnych ($p=0,03$). Nie wykazano związku między narażeniem na inne badane parabeny (etylowy, metylowy, izbutylowy), triklosan i syntetyczne pyretroidy a liczbą pęcherzyków antralnych (Tabela 8). Stężenie bisfenolu A w moczu obniżało również stężenie hormonu AMH ($p=0,02$). Narażenie na propyl-paraben wpływało pozytywnie na stężenie FSH ($p=0,03$) i negatywnie na stężenie estradiolu ($p=0,048$). Również etyl-paraben obniżał stężenie estradiolu ($p=0,01$) (Tabela 8).

Stężenie badanych metabolitów syntetycznych pyretroidów (CDCCA, TDCCA, DBCA, 3-PBA) nie wpływało w sposób istotny statystycznie na stężenie żadnego z badanych hormonów (AMH, FSH, estradiol). Również narażenie na metyl-paraben, izobutyl-paraben i triklosan nie wiązało się istotnie ze stężeniem badanych hormonów (Tabela 8).

Przy kontroli potencjalnych czynników zakłócających (wiek, BMI i palenie), narażenie na propyl-paraben i bisfenol A zmniejszało liczbę pęcherzyków antralnych ($p=0,04$ i $p=0,03$ odpowiednio) (Tabela 9). Analizując stężenie badanych hormonów to ekspozycja na bisfenol A wpływała negatywnie na stężenie AMH ($p=0,02$) a ekspozycja na propylparaben zwiększała stężenie FSH ($p=0,028$) i wpływała na obniżenie stężenia estradiolu ($p=0,04$) (Tabela 9). Nie wykazano związku między narażeniem na inne badane parabeny (metylowy, etylowy, butylowy i izbutylowy), triklosan i syntetyczne pyretroidy a liczbą pęcherzyków antralnych i stężeniem badanych hormonów (Tabela 9).

Tabela 8. Zależność pomiędzy narażeniem na badane czynniki środowiskowe a rezerwą jajnikową – zmienna ciągła-
model jednoczynnikowy

	AFC			AMH			FSH			E2		
	coef	95%CI	p	coef	95%CI	p	coef	95%CI	p	coef	95%CI	p
CDCCA	-0,02	-0,08;0,04	0,48	-0,04	-0,13;0,06	0,41	-0,01	-0,05;0,03	0,68	-0,05	-0,11;0,02	0,17
TDCCA	-0,03	-0,1;0,02	0,22	-0,06	-0,15;0,03	0,17	-0,004	-0,04;0,03	0,83	-0,03	-0,09;0,03	0,30
DBCA	-0,02	-0,08;0,04	0,46	-0,02	-0,11;0,08	0,73	-0,01	-0,05;0,03	0,03	0,01	-0,06;0,07	0,85
3-PBA	-0,02	-0,07;0,04	0,57	-0,05	-0,13;0,03	0,20	-0,01	-0,04;0,02	0,51	-0,02	-0,08;0,04	0,51
MP	-0,01	-0,04;0,02	0,42	-0,03	-0,08;0,01	0,16	-0,002	-0,02;0,02	0,82	-0,01	-0,04;0,03	0,72
EP	-0,01	-0,05;0,03	0,72	-0,02	-0,06;0,01	0,20	0,004	-0,01;0,02	0,62	-0,03	-0,07;-0,01	0,01
PP	-0,04	-0,15;-0,02	0,028	-0,02	-0,05;0,02	0,43	0,01	0,06;0,12	0,03	-0,03	-0,05;0	0,048
iBuP	-0,02	-0,09;0,05	0,61	-0,05	-0,15;0,06	0,38	-0,01	-0,05;0,04	0,76	-0,04	-0,11;0,04	0,31
BP	-0,02	-0,13;-0,01	0,04	-0,06	-0,12;0,01	0,09	-0,01	-0,04;0,02	0,52	0,01	-0,04;0,05	0,99
TCL	-0,003	-0,03;0,02	0,85	-0,01	-0,05;0,03	0,58	0,004	-0,01;0,02	0,63	-0,01	-0,04;0,02	0,38
BPA	-0,05	-0,08;-0,01	0,03	-0,02	-0,12;-0,02	0,02	0,01	-0,04;0,05	0,09	0,09	0,02;1,17	0,11

AMH- hormon anti-Müllerowski; AFC- liczba pęcherzyków antralnych; FSH-hormon folikulotropowy; E2-estradiol; coef- współczynnik korelacji, CI- przedział ufności; CDCCA- kwas *cis*- (2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowy, TDCCA- kwas *trans*-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowy; DBCA - kwas *cis*-(2,2-dibromowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowy; 3-PBA- kwas 3-fenoksybenzoesowy; MP-metyl-paraben; EP-etyl-paraben; PP-propyl-paraben; BP-butyl-paraben; iBuP-izobutyl-paraben; TCL – triklosan; BPA – bisfenol A

Tabela 9. Zależność pomiędzy narażeniem na badane czynniki środowiskowe a rezerwą jajnikową- zmienna ciągła-
model wieloczynnikowy

	AFC			AMH			FSH			E2		
	coef	95%CI	p	coef	95%CI	p	coef	95%CI	p	coef	95%CI	p
CDCCA	-0,004	-0,06;0,06	0,89	-0,02	-0,11;0,08	0,76	-0,02	-0,06;0,02	0,30	-0,03	-0,09;0,04	0,46
TDCCA	-0,01	-0,07;0,04	0,66	-0,03	-0,12;0,06	0,54	-0,02	-0,05;0,02	0,38	-0,01	-0,07;0,05	0,77
DBCA	-0,02	-0,08;0,05	0,63	-0,01	-0,11;0,09	0,85	-0,02	-0,06;0,02	0,26	0,003	-0,07;0,07	0,94
3-PBA	-0,01	-0,06;0,04	0,63	-0,04	-0,12;0,04	0,33	-0,02	-0,06;0,01	0,23	-0,004	-0,06;0,05	0,90
MP	-0,02	-0,06;0,01	0,14	-0,05	-0,10;0,001	0,06	-0,01	-0,03;0,01	0,51	-0,01	-0,05;0,02	0,52
EP	-0,004	-0,03;0,02	0,77	-0,03	-0,07;0,02	0,22	0,002	-0,02;0,02	0,81	-0,03	-0,06;0,05	0,09
PP	-0,02	-0,13;-0,01	0,04	-0,03	-0,07;0,02	0,22	0,03	0,02;0,12	0,028	-0,03	-0,06;-0,001	0,04
iBuP	0,02	-0,05;0,09	0,61	-0,003	-0,11;0,10	0,95	-0,02	-0,07;0,02	0,31	-0,02	-0,10;0,06	0,62
BP	0,004	-0,04;0,05	0,84	-0,05	-0,12;0,01	0,11	-0,01	-0,04;0,02	0,49	0,005	-0,04;0,05	0,83
TCL	-0,01	-0,03;0,02	0,60	-0,02	-0,06;0,03	0,42	0,003	-0,02;0,02	0,77	-0,01	-0,04;0,02	0,56
BPA	-0,04	-0,13;-0,01	0,03	-0,01	-0,11;-0,03	0,02	-0,004	-0,05;0,04	0,87	0,06	-0,02;0,13	0,14

Model korygowany o wiek, BMI, palenie.

AMH- hormon anti-Müllerowski; AFC- liczba pęcherzyków antralnych; FSH-hormon folikulotropowy; E2-estradiol; coef- współczynnik korelacji, CI- przedział ufności; CDCCA- kwas *cis*- (2,2 dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksylowy, TDCCA- kwas *trans*-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksylowy; DBCA - kwas *cis*-(2,2-dibromowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksylowy; 3-PBA- kwas 3-fenoksybenzoesowy; MP-metyl-paraben; EP-etyl-paraben; PP-propyl-paraben; BP-butyl-paraben; iBuP-izobutyl-paraben; TCL – triklosan; BPA – bisfenol A

Narażenie jako zmienna kategoryjna-modele jedno i wieloczynnikowe

Wykazano, że stężenie parabenu propylowego w moczu w drugim i trzecim percentylu ((25-50] i (50-75] percentyl) wpływało na zmniejszenie liczby pęcherzyków antralnych ($p=0,03$ i $p=0,03$ odpowiednio) (Tabela 10). Również stężenie bisfenolu A i parabenu butylowego w trzecim i czwartym kwartylu ((50-75] i >75 percentyl) obniżało liczbę pęcherzyków antralnych ($p=0,04$, $p=0,04$ i $p=0,028$, $p=0,03$ odpowiednio). Stężenie bisfenolu A w czwartym kwartylu wpływało negatywnie na stężenie AMH ($p=0,04$), a stężenie propyl-parabenu w drugim i trzecim kwartylu zwiększało stężenie FSH ($p=0,03$ i $p=0,04$ odpowiednio) (Tabela 10). W przypadku estradiolu, zaobserwowano obniżenie stężenia tego hormonu w drugim i trzecim kwartylu narażenia na etyl-paraben ($p=0,031$ i $p=0,026$) oraz w drugim kwartylu narażenia w przypadku propyl-parabenu ($p=0,049$). Nie wykazano związku między narażeniem na inne badane parabeny (metylowy, butylowy i izobutylowy), triklosan i syntetyczne pyretroidy w drugim, trzecim i czwartym kwartylu narażenia a liczbą pęcherzyków antralnych i stężeniem badanych hormonów (Tabela 10).

Kiedy kontrolowano model o potencjalne czynniki zakłócające: wiek, palenie i BMI, narażenie na paraben propylowy w trzecim kwartylu ((50-75] percentyl) wpływał na zmniejszenie liczby pęcherzyków antralnych ($p=0,048$), obniżenie stężenia estradiolu ($p=0,03$) oraz zwiększał stężenie FSH ($p=0,026$) (Tabela 11). Również ekspozycja na bisfenol A w czwartym kwartylu (>75 percentyl) zmniejszała liczbę pęcherzyków antralnych ($p=0,028$) i zmniejszała stężenie AMH ($p=0,03$) (Tabela 11).

Nie wykazano istotnie statystycznej zależności pomiędzy narażeniem na parabeny: metylowy, etylowy, butylowy, izobutylowy, triklosan i badane metabolity syntetycznych pyretroidów (CDCCA, TDCCA, DBCA i 3-PBA) a badanymi parametrami rezerwy jajnikowej: liczbą pęcherzyków antralnych, stężeniami hormonów: AMH, FSH, estradiol (Tabela 11).

Tabela 10. Zależność pomiędzy narażeniem na badane czynniki środowiskowe a rezerwą jajnikową- zmienna kategoryalna- model jednoczynnikowy

	Kategorie	AFC			AMH			FSH			E2		
		coef	95%CI	p	coef	95%CI	p	coef	95%CI	p	coef	95%CI	p
CDCCA	>LOD	0,04	-0,07;0,15	0,49	0,04	-0,14;0,22	0,64	0,02	-0,07;0,08	0,96	-0,06	-0,18;0,07	0,39
TDCCA	>LOD	0,01	-0,11;0,11	0,96	-0,07	-0,24;0,11	0,46	0,02	-0,05;0,10	0,52	-0,07	-0,20;0,05	0,25
DBCA	>LOD	0,08	-0,06;0,21	0,27	0,12	-0,09;0,33	0,26	-0,03	-0,12;0,05	0,46	0,08	-0,07;0,23	0,30
3-PBA	Q2	-0,09	-0,24;0,07	0,26	-0,06	-0,30;0,18	0,61	-0,06	-0,16;0,04	0,27	-0,07	-0,24;0,11	0,45
	Q3	-0,07	-0,21;0,08	0,38	-0,03	-0,26;0,20	0,80	-0,06	-0,15;0,04	0,24	0,08	-0,08;0,25	0,31
	Q4	-0,03	-0,17;0,12	0,73	-0,15	-0,38;0,08	0,19	-0,02	-0,11;0,08	0,73	-0,05	-0,21;0,11	0,54
MP	Q2	0,07	-0,09;0,22	0,40	0,20	-0,04;0,44	0,10	-0,06	-0,16;0,04	0,24	0,07	-0,10;0,24	0,39
	Q3	-0,06	-0,22;0,09	0,42	-0,06	-0,30;0,18	0,63	-0,01	-0,11;0,09	0,83	-0,05	-0,22;0,12	0,58
	Q4	-0,04	-0,20;0,11	0,58	-0,13	-0,36;0,11	0,30	0,02	-0,08;0,12	0,74	-0,04	-0,21;0,13	0,63
EP	Q2	-0,07	-0,22;0,08	0,35	-0,17	-0,41;0,07	0,17	0,03	-0,07;0,13	0,5	-0,19	-0,35;-0,02	0,031
	Q3	-0,04	-0,19;0,12	0,65	0,02	-0,22;0,25	0,87	-0,02	-0,12;0,08	0,69	-0,19	-0,36;-0,02	0,026
	Q4	-0,08	-0,23;0,08	0,32	-0,18	-0,42;0,06	0,13	0,03	-0,07;0,13	0,55	-0,03	-0,20;0,13	0,69
PP	Q2	-0,02	-0,17;-0,01	0,03	0,03	-0,22;0,27	0,83	0,01	0,09;0,12	0,03	-0,17	-0,34;-0,01	0,049
	Q3	-0,02	-0,18;-0,01	0,03	0,01	-0,23;0,25	0,94	0,06	0,04;0,16	0,04	-0,10	-0,27;0,07	0,24
	Q4	0,01	-0,14;0,17	0,87	0,02	-0,24;0,24	0,99	0,02	-0,08;0,12	0,66	-0,12	-0,28;0,05	0,17
iBuP	>LOD	0,09	-0,08;0,26	0,29	0,03	-0,24;0,30	0,81	0,01	-0,11;0,11	0,99	-0,10	-0,29;0,10	0,33
BP	Q2	-0,05	-0,20;0,10	0,51	-0,02	-0,26;0,21	0,85	0,01	-0,09;0,11	0,82	-0,01	-0,18;0,16	0,93
	Q3	-0,04	-0,11;-0,01	0,028	0,01	-0,23;0,25	0,93	-0,06	-0,15;0,04	0,27	-0,06	-0,23;0,11	0,46
	Q4	-0,02	-0,17;-0,12	0,03	-0,19	-0,43;0,05	0,12	0,02	-0,08;0,12	0,68	0,12	-0,05;0,29	0,15
TCL	Q2	-0,09	-0,24;0,06	0,25	-0,04	-0,28;0,19	0,72	-0,03	-0,12;0,07	0,62	-0,11	-0,28;0,06	0,20
	Q3	0,03	-0,13;0,18	0,73	-0,03	-0,27;0,22	0,84	-0,03	-0,13;0,07	0,60	-0,08	-0,25;0,10	0,38
	Q4	-0,03	-0,18;0,12	0,69	-0,08	-0,32;0,17	0,53	0,04	-0,07;0,13	0,49	-0,09	-0,21;0,10	0,33
BPA	Q2	0,05	-0,10;0,1	0,51	-0,02	-0,11;0,36	0,31	-0,01	-0,10;0,10	0,93	-0,06	-0,23;0,11	0,47
	Q3	-0,05	-0,10;-0,1	0,04	-0,07	-0,17;0,40	0,16	0,02	-0,08;0,12	0,68	0,11	-0,06;0,27	0,20
	Q4	-0,02	-0,13;-0,01	0,04	-0,02	-0,11;-0,01	0,04	-0,01	-0,10;0,09	0,94	0,04	-0,13;0,21	0,62

Grupy odniesienia: 1. w przypadku kategorii >LOD to wartości <LOD; 2. w przypadku kategorii Q2, Q3, Q4 to wartości Q1 Q1≤ 25 percentyl; Q2- (25-50] percentyl; Q3-(50-75] percentyl; Q4->75 percentyl, AMH- hormon anti-Müllerowski; AFC- liczba pęcherzyków antralnych; FSH-hormon folikulotropowy; E2-estradiol; coef- współczynnik korelacji, CI- przedział ufności; CDCCA- kwas *cis*- (2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowy, TDCCA- kwas *trans*-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowy; DBCA - kwas *cis*-(2,2-dibromowinylo)-2,2- dimetylocyklopropano-1-karboksyłowy; 3-PBA- kwas 3-fenoksybenzoesowy; MP-metyl-paraben; EP-etyl-paraben; PP-propyl-paraben; BP-butyl-paraben; iBuP-izobutyl-paraben; TCL – triklosan; BPA – bisfenol A.

Tabela 11. Zależność pomiędzy narażeniem na badane czynniki środowiskowe a rezerwą jajnikową- zmienna kategoryjalna- model wieloczynnikowy

	Kategorie	AFC			AMH			FSH			E2		
		coef	95%CI	p	coef	95%CI	p	coef	95%CI	p	coef	95%CI	p
CDCCA	>LOD	0,03	-0,08;0,14	0,61	0,03	-0,16;0,21	0,77	-0,01	-0,08;0,07	0,88	-0,03	-0,15;0,10	0,70
TDCCA	>LOD	0,03	-0,09;0,14	0,66	-0,04	-0,22;0,14	0,66	0,01	-0,07;0,08	0,86	-0,03	-0,15;0,10	0,64
DBCA	>LOD	0,04	-0,09;0,18	0,52	0,08	-0,14;0,29	0,48	-0,05	-0,14;0,04	0,25	0,04	-0,11;0,19	0,58
3-PBA	Q2	-0,06	-0,21;0,10	0,47	0,01	-0,24;0,25	0,96	-0,02	-0,13;0,09	0,74	-0,07	-0,30;0,12	0,46
	Q3	-0,03	-0,17;0,13	0,76	-0,01	-0,25;0,23	0,96	-0,09	-0,20;0,01	0,08	-0,02	-0,19;0,16	0,85
	Q4	-0,02	-0,17;0,13	0,81	-0,11	-0,35;0,13	0,36	-0,11	-0,29;0,07	0,22	0,14	-0,02;0,31	0,09
MP	Q2	0,03	-0,13;0,18	0,72	0,15	-0,09;0,40	0,22	0,05	-0,05;0,15	0,34	0,03	-0,15;0,20	0,76
	Q3	-0,11	-0,27;0,04	0,16	-0,11	-0,36;0,13	0,37	-0,08	-0,19;0,03	0,14	0,05	-0,12;0,23	0,55
	Q4	-0,05	-0,21;0,11	0,54	-0,16	-0,41;0,09	0,20	-0,04	-0,14;0,07	0,50	-0,08	-0,25;0,10	0,39
EP	Q2	-0,01	-0,17;0,15	0,95	-0,15	-0,41;0,10	0,24	-0,09	-0,20;0,02	0,12	0,04	-0,14;0,22	0,66
	Q3	0,03	-0,13;0,18	0,76	0,02	-0,23;0,26	0,91	0,01	-0,09;0,12	0,79	-0,01	-0,24;0,11	0,45
	Q4	-0,02	-0,18;0,14	0,83	-0,18	-0,43;0,07	0,16	-0,05	-0,15;0,06	0,39	-0,14	-0,32;0,04	0,12
PP	Q2	-0,06	-0,22;0,10	0,44	-0,09	-0,35;0,16	0,49	0,02	-0,08;0,13	0,69	-0,12	-0,29;0,05	0,18
	Q3	-0,01	-0,20;0,15	0,048	-0,01	-0,3;0,25	0,96	0,05	0,03;0,18	0,026	-0,11	-0,20;-0,01	0,03
	Q4	-0,03	-0,18;0,13	0,75	-0,08	-0,33;0,17	0,54	0,02	-0,08;0,13	0,67	-0,13	-0,31;0,04	0,13
iBuP	>LOD	0,1	-0,07;0,27	0,24	0,03	-0,24;0,30	0,84	-0,01	-0,11;0,10	0,96	-0,13	-0,31;0,04	0,14
BP	Q2	-0,04	-0,19;0,12	0,64	-0,02	-0,26;0,22	0,87	-0,03	-0,13;0,07	0,58	-0,13	-0,30;0,04	0,14
	Q3	0,07	-0,08;0,22	0,35	0,02	-0,23;0,26	0,89	-0,09	-0,19;0,01	0,08	0,05	-0,12;0,22	0,56
	Q4	0,01	-0,14;0,16	0,89	-0,20	-0,45;0,04	0,11	-0,01	-0,11;0,10	0,90	-0,08	-0,25;0,09	0,37
TCL	Q2	-0,07	-0,22;0,09	0,40	-0,01	-0,25;0,24	0,97	-0,05	-0,15;0,06	0,37	-0,05	-0,22;0,13	0,59
	Q3	0,02	-0,14;0,18	0,79	-0,06	-0,31;0,19	0,64	-0,04	-0,14;0,07	0,51	-0,09	-0,26;0,09	0,34
	Q4	-0,05	-0,20;0,11	0,55	-0,10	-0,34;0,15	0,46	0,03	-0,08;0,13	0,64	-0,03	-0,20;0,14	0,74
BPA	Q2	0,04	-0,11;0,19	0,62	-0,01	-0,13;0,36	0,35	-0,05	-0,15;0,06	0,37	-0,05	-0,22;0,11	0,53
	Q3	0,06	-0,09;0,21	0,46	-0,06	-0,08;0,40	0,19	-0,01	-0,11;0,09	0,82	0,13	-0,04;0,30	0,13
	Q4	-0,09	-0,26;-0,02	0,028	-0,20	-0,33;-0,01	0,03	-0,01	-0,12;0,09	0,80	0,01	-0,17;0,17	0,98

Model korygowany o wiek, BMI, palenie. Grupy odniesienia: 1. w przypadku kategorii >LOD to wartości <LOD; 2. w przypadku kategorii Q2, Q3, Q4 to wartości Q1 Q1≤25 percentyl; Q2- (25-50] percentyl; Q3- (50-75] percentyl; Q4->75 percentyl; AMH- hormon anti-Müllerowski; AFC- liczba pęcherzyków antralnych; FSH-hormon folikulotropowy; E2-estradiol; coef- współczynnik korelacji, CI- przedział ufności; CDCCA- kwas *cis*- (2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksylowy, TDCCA- kwas *trans*-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksylowy; DBCA - kwas *cis*-(2,2-dibromowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksylowy; 3-PBA- kwas 3-fenoksybenzoesowy; MP-metyl-paraben; EP-etyl-paraben; PP-propyl-paraben; BP-butyl-paraben; iBuP-izobutyl-paraben; TCL – triklosan; BPA – bisfenol A

8. Dyskusja

Zasadniczym pytaniem, jakie stawiano planując badanie, zbierając materiał i przeprowadzając analizy było czy związki powszechnie występujące w środowisku z grupy zaburzających funkcje endokrynną, w piśmiennictwie angielskim „Endocrine Disrupting Chemicals” (ECDs) mogą wpływać na rezerwę jajnikową kobiet, będącą jednym z predyktorów ich płodności. Liczne dane literaturowe wskazują, zdolność interakcji tych związków z układem hormonalnym zakłócając jego prawidłowe działanie, prowadząc do zaburzenia syntezy, funkcji, przechowywania i / lub metabolizmu hormonów i mogą mieć niekorzystny wpływ na płodność kobiet i mężczyzn oraz mogą odgrywać rolę w patogenezie niepłodności.

Odpowiedź na pytanie dotyczące wpływu narażenia na powszechnie występujące związki środowiskowe zaburzające funkcję endokrynną na rezerwę jajnikową była możliwa dzięki przeprowadzeniu oceny narażenia na badane związki środowiskowe w materiale biologicznym (potwierdzenie rzeczywistego narażenia na badane czynniki środowiskowe) wśród kobiet uczęszczających do kliniki leczenia niepłodności z powodu niepłodności pary.

8.1 Ocena rezerwy jajnikowej badanych kobiet

Rezerwa jajnikowa została oceniona za pomocą badania powszechnie stosowanych markerów rezerwy jajnikowej: badania liczby pęcherzyków antralnych (AFC) (ang. Antral Follicle Count), stężenia AMH, stężenia FSH i stężenia estradiolu (oznaczanych jednocześnie pomiędzy 2-4 dzień cyklu).

Pęcherzyki antralne, są to pęcherzyki w jajnikach o średnicy 2 – 10 mm, które są gotowe do wzrostu. Wzrost i dojrzewanie pęcherzyków antralnych jest gonadotropinozależne, pozostaje pod wpływem gonadotropin produkowanych

w przysadce mózgowej lub egzogennych gonadotropin podawanych w trakcie leczenia. Podczas wzrostu pęcherzyki antralne stają się pęcherzykami dominującymi, a w nich dojrzewają komórki jajowe. Rezerwa jajnikowa jest niewątpliwie uwarunkowana genetycznie, zmniejsza się z wiekiem i jest zależna od funkcjonowania układu podwzórce-przysadka-jajnik. Badania naukowe wykazały, że AFC poniżej czterech pęcherzyków u kobiet par nieplodnych jest związane ze znamionym obniżeniem szansy na ciążę oraz z tym, że odpowiedź jajników na stymulację owulacji będzie niesatysfakcjonująca (Radwan i Wołczyński, 2011). AFC jest traktowany, jako jeden z najlepszych parametrów oceny rezerwy jajnikowej (Rosen i wsp., 2012) i znalazł powszechnie zastosowanie w indywidualizacji protokołów stymulacyjnych (La Marca i wsp., 2013).

Równie dobrym parametrem, celem precyzyjnej oceny rezerwy jajnikowej, jest AMH (hormon anty-Müllerowski), zwany inaczej substancją hamującą rozwój przewodów Müllera (ang. Müllerian-Inhibiting Substance, MIH). Jest to dimeryczna glikoproteina należąca do grupy transformujących czynników wzrostu (Weenen i wsp., 2004) . Występuje on zarówno u kobiet jak i u mężczyzn, ale odgrywa odmienną rolę u każdej z płci. Hormon ten odgrywa znaczącą rolę w rozwoju narządów rozrodczych u obu płci w okresie embrionalnym. U kobiet znamioną obecność AMH stwierdza się dopiero po okresie dojrzewania płciowego. Jego rola polega prawdopodobnie na regulacji folikulogenezy, głównie w mechanizmie hamowania pierwotnej rekrutacji pęcherzyków i zmniejszaniu wrażliwości małych pęcherzyków antralnych na aktywność hormonu folikulotropowego (FSH). Jest produkowany w komórkach ziarnistych dojrzewających pęcherzyków jajnikowych antralnych i preantralnych w fazie gonadotropinoniezależnej, a jego stężenie ściśle koreluje z ilością pęcherzyków wzrastających (La Marca i wsp., 2005).

Do tej pory głównym klinicznym zastosowaniem oznaczania AMH u kobiet, była ocena rezerwy jajników w diagnostyce niepłodności celem oszacowania szans na ciążę, przedwczesnej niewydolności jajników (POI, z ang. Premature Ovarian Insufficiency) i hipogonadyzmie hipogonadotropowym. POI definiuje się, jako utratę czynności jajników (zakończenie funkcji rozrodczej i hormonalnej z powodu wyczerpania się pęcherzyków jajnikowych) przed 40 rokiem życia. POI występuje u 1/100 kobiet przed 40 rokiem życia i u 1/1000 kobiet przed 30 rokiem życia. Jest związany z pewnymi aberracjami chromosomowymi, zespołem łamliwego chromosomu X, galaktozemią i zaburzeniami receptora FSH. Jednak etiologia najczęściej pozostaje nieznana. Na podstawie badania przeprowadzonego w Holandii, AMH jest uważany za bardzo przydatny marker kliniczny, potwierdzający rozpoznanie POI u kobiet z podwyższonym stężeniem FSH (Knauff i wsp., 2009). AMH wydaje się być dobrym wskaźnikiem oceny rezerwy jajników również w grupie kobiet z rozpoznaniem jatrogennej niewydolności jajników, związanej z ekspozycją na chemioterapię, radioterapię w rejonie miednicy lub procedurę operacyjną obejmującą jajniki. Ponadto AMH wydzielany wyłącznie u kobiet przez komórki ziarniste pęcherzyków jajnikowych jest stosowany jako marker nowotworów pochodzących z tych komórek (Karkanaki i wsp., 2011). AMH jest bardzo czułym i specyficznym markerem nowotworów pochodzących z komórek ziarnistych (folliculoma) korelującym z rozmiarem guza, przy czym w tych przypadkach stężenia AMH mogą być znacznie podwyższone: średni poziom wynosi 190 ng / ml (w zakresie od 2 do 1124 ng/ml), a wzrost stężenia AMH może poprzedzać klinicznie jawny nowotwór nawet o 16 miesięcy (Karkanaki i wsp., 2011), co daje dodatkową możliwość wykorzystania AMH, jako markera do oceny ryzyka nawrotu folliculoma u kobiet, które przeszły owariektomię. Jest to szczególnie istotne, gdyż jest to nowotwór

charakteryzujący się ryzykiem nawrotu choroby nawet po 10-20 latach po resekcji guza pierwotnego (Karkanaki i wsp., 2011).

Stosunkowo stabilny poziom AMH w różnych fazach cyklu miesięczkowego powoduje, iż AMH stanowi unikalny parametr endokrynologiczny, oceniający wydolność żeńskiej gonady (La Marca i wsp., 2005). Ponadto oznaczenie AMH może służyć u par nieplodnych, jako jeden z parametrów do próby oszacowania szans na urodzenie dziecka (Weenen i wsp., 2004). Należy jednak pamiętać, że AMH, jako parametr rezerwy jajnikowej dostarcza wyłącznie informacji o puli pęcherzyków jajnikowych, jaką dysponuje kobieta w okresie prokreacyjnym, niestety nie mówi o jakości i ilości oocytów. Te ostatnie dwa parametry negatywnie korelują przede wszystkim z wiekiem. Ocena stężenia AMH jest przede wszystkim obecnie powszechnie wykorzystywana do indywidualizacji protokołów stymulacyjnych (ustalenia początkowej dawki gonadotropin) (Tobler i wsp., 2015).

Stężenie FSH cechuje się dużą zmiennością, wynikającą przede wszystkim ze sprzężenia zwrotnego zależnego od stężenia estradiolu, ale również z pulsacyjnego charakteru wyrzutów, warunkowanych przez GnRH, a podlegającym regulacji poprzez stężenia nie tylko estradiolu, ale także innych hormonów takich jak leptyna, kisleptyna, tyreotropina, prolaktyna czy kortyzol. Poziom FSH, ze względu na duże fluktuacje w okresie prokreacyjnym u kobiet, jest trudny do jednoznacznej interpretacji. Niemniej jednak stężenie FSH jest często nadal wykorzystywane do oceny rezerwy jajnikowej. Wysokie stężenia FSH negatywnie korelują z odpowiedzią jajników na stymulację, liczbą prawidłowych komórek jajowych i szansą na ciążę (Macura i Śliwa, 2014). Mimo, że już stężenia FSH powyżej 10 IU/l może sugerować obniżoną rezerwę jajników, nie musi to zostać potwierdzone w kolejnych cyklach, z drugiej strony, u kobiet z obniżoną już rezerwą jajnikową, można się spotkać z prawidłowymi stężeniami FSH.

W obecnych czasach praktyczne zastosowanie kliniczne FSH ogranicza się do wykluczenia hipogonadyzmu hypogonadotropowego, przedwczesnej niewydolności jajników (POI), menopauzy, ale też bywa stosowany w bieżących cyklach celem decyzji odnośnie włączenia stymulacji hormonalnej, zwłaszcza u kobiet z obniżoną rezerwą jajnikową. W związku z powyższym, stężenia FSH oznaczane celem oceny rezerwy jajnikowej u kobiet w okresie prokreacyjnym powinno być uzupełnione o ocenę AFC i oznaczenie stężenia AMH. Powszechnie uważa się, że u kobiet planujących ciążę, stężenie FSH powyżej 15 mIU/ml jest nieprawidłowe i może świadczyć o obniżonej rezerwie jajnikowej. Należy jednak mieć na uwadze, że już stężenie FSH powyżej 10 mIU/ml może sugerować ograniczoną szansę na ciążę, a przy stężeniach FSH > 25mIU/ml szanse na ciążę są bardzo mało prawdopodobne.

Kolejnym parametrem rezerwy jajnikowej jest estradiol. Oznaczenie stężenia estradiolu rozpatrywane łącznie ze stężeniem FSH służy do oceny funkcjonowania osi podwzgórze-przysadka-jajnik oraz może być pomocne w różnicowaniu wtórnej od pierwotnej niewydolności jajników, fizjologicznie towarzyszącej przekwitaniu. Znamienne podwyższone stężenia estradiolu i niskie stężenia FSH mogą być stwierdzone w przypadku guzów feminizujących jajnika, a fizjologicznie występują w okresie ciąży (Radwan i Wołczyński, 2011). W praktyce oznaczenia estradiolu są powszechnie wykorzystywane celem monitorowania leczenia gonadotropinami w protokołach stymulacyjnych.

W celu wyeliminowania nieprawidłowości w oznaczeniach stężeń hormonów, wszystkie badania hormonalne wykonane były w jednym laboratorium, dysponującym tym samym sprzętem przez cały czas trwania badania. Natomiast badanie ultrasonograficzne wykonywane celem oceny ilości pęcherzyków antralnych było przeprowadzone przez lekarzy specjalistów ginekologii i położnictwa, certyfikowanych w zakresie badań

ultrasonograficznych w ginekologii, przeszkolonych w zakresie oceny AFC zgodnie z rekomendacjami (Broekmans i wsp., 2010).

Z punktu widzenia praktyki medycznej, ocena rezerwy jajnikowej u kobiet, borykających się z niepłodnością, jest istotnym czynnikiem ułatwiającym podejmowanie dalszych decyzji diagnostycznych i terapeutycznych. Na podstawie AFC i AMH można oszacować szanse na uzyskanie ciąży. Wykazanie obecności w warstwie korowej jajników antralnych pęcherzyków jajnikowych jest podstawowym parametrem pozwalającym ocenić szanse na uzyskanie własnego potomstwa (Macura i Śliwa, 2014).

8.2 Ocena narażenia na badane czynniki środowiskowe

Badane substancje są grupą związków endokrynnie czynnych klasyfikowanych, jako nietrwałe, głównie ze względu na swoją szybką biodegradację w środowisku i szybki metabolizm w organizmie. Do takich EDCs należą bisfenol A, parabeny, triklosan oraz syntetyczne pyretroidy. Badane związki oznaczane były w moczu metodą chromatografii gazowej z tandemową spektrometrią mas. Obecnie jest to jedna z rekomendowanych i powszechnie stosowanych metod do oceny narażenia na związki endokrynnie czynne. Ze względu na to, że są to związki nietrwałe, często ich jednokrotne oznaczenie w moczu może nie odzwierciedlać rzeczywistego narażenia.

Niewątpliwym atutem prezentowanego badania jest ocena narażenia na analizowane związki dwukrotnie, w odstępie od trzech do sześciu miesięcy. W badaniu stężenia parabenów (MP, EP, PP) i triklosanu korelowały ze sobą w dwóch próbkach moczu. Natomiast w przypadku bisfenolu A, metabolitów syntetycznych pyretroidów i butyl-parabenu stężenia w I i II próbie różniły się. Jest to zgodne z wcześniej prowadzonymi badaniami, gdzie stężenia parabenów w powtórnych próbkach moczu, pobranych od tej samej osoby, były podobne (Meeker i wsp., 2011), podczas gdy stężenia

BPA i syntetycznych pyretroidów wykazywały na istotne różnice pomiędzy kolejnymi próbkami moczu (Meeker i wsp., 2005). Ponadto parabeny i triklosan występują w produktach kosmetycznych, które używamy przez cały czas. Natomiast pyretroidy występują w preparatach, które stosujemy sezonowo (spray na komary, środki ochrony roślin). Analizując narażenie na butyl-paraben, to brak korelacji, może wynikać z faktu, że był on wykryty jedynie w 64% badanych prób w badaniu pierwszym i 47% w drugim badaniu.

Wyniki przeprowadzonego badania wykazały, że osoby uczestniczące w badaniu były środowiskowo ekspozowane na badane czynniki środowiskowe zaburzające funkcję endokrynną: parabeny, syntetyczne pyretroidy, bisfenol A i triklosan. Najczęściej wykrywanym związkiem w moczu badanych kobiet był bisfenol A. Około 97% kobiet miało wykrywalne stężenie tego związku w moczu. Również u większości badanych kobiet wykryto: metyl-paraben (>LOD około 94% prób), etyl-paraben (84%), propyl-paraben (84%), triklosan (83%), 3-PBA (66%) i butyl-paraben (64%). Pozostałe badane związki wykryto w mniej niż połowie badanych prób: TDCCA (35%), CDCCA (33%), DBCA (19%) i izobutyl-paraben (11%).

Średnie geometryczne stężenie parabenów w moczu badanych osób w pierwszej próbie wynosiły dla butyl-parabenu $4,70 \pm 20,22$ ng/ml, etyl-parabenu $11,2 \pm 112,0$ ng/ml, metyl-parabenu $92,68 \pm 224,4$ ng/ml, propyl-parabenu $16,20 \pm 430,6$ ng/ml i dla izobutyl-parabenu $3,16 \pm 6,53$ ng/ml. Średnie stężenie triklosanu i bisfenolu A wynosiło odpowiednio: $2,78 \pm 169,50$ ng/ml i $1,37 \pm 4,77$ ng/ml.

Stężenie parabenów etylowego i butylowego było wyższe niż w badaniu przeprowadzonym w populacji generalnej kobiet w Stanach Zjednoczonych - National Health and Nutrition Examination Survey 2017, gdzie średnie stężenie butyl-parabenu i etyl-parabenu wynosiło odpowiednio 0,90 ng/ml, 3,84 ng/ml (CDC, 2017). Natomiast

stężenie metyl-parabenu oraz triklosanu było niższe w moim badaniu niż w badaniu przeprowadzonym w USA, gdzie średnie stężenie metyl-parabenu i triklosanu wynosiło odpowiednio 104 ng/ml i 10,6 ng/ml (CDC, 2017). W przypadku ekspozycji na bisfenol A i paraben propylowy stężenia były podobne: 1,37 ng/ml w Polsce i 1,39 ng/ml w USA i 16,20 ng/ml w Polsce i 16,53 ng/ml w USA odpowiednio (CDC, 2017). Paraben izbutylowy nie był oznaczany w badaniu National Health and Nutrition Examination Survey 2017. Z kolei w badaniu przeprowadzonym w Kanadzie wśród mieszkańców terenów miejskich stężenie tego związku było niższe (mediana 0,22 mg/ml) (Genuis i wsp., 2013) niż w badaniu w Polsce (mediana 2,47 ng/ml). Różnica w poziomach narażenia mogła wynikać z faktu dużo mniejszej badanej liczby osób w badaniu kanadyjskim (11 osób).

W przypadku metabolitów syntetycznych pyretroidów mediana, 75 percentyl i 95 percentyl było podobne w przypadku 3-PBA w Polsce (0,25 ng/ml, 0,48 ng/ml, 2,28 ng/ml odpowiednio) i w badaniu National Health and Nutrition Examination Survey 2017 (0,25 ng/ml, 0,74 ng/ml, 2,30 ng/ml odpowiednio). Natomiast stężenie CDCCA, TDCCA i DBCA było nieznacznie wyższe w Polsce (75 percentyl wynosił: 0,28 ng/ml, 0,65 ng/ml, 0,34 ng/ml odpowiednio) niż w USA (75 percentyl wynosił: 0,18 ng/ml, 0,56 ng/ml, <LOD odpowiednio).

Biomarkery ekspozycji są obecnie powszechnie wykorzystywane w epidemiologii środowiskowej w celu szacowania indywidualnego narażenia ze względu na fakt, że mogą uwzględniać wszystkie źródła i drogi narażenia. Badanie metabolitów związków środowiskowych w moczu jest korzystne, ze względu na łatwość pobierania materiału biologicznego, duże objętości próbek i stosunkowo niskie limity stężeń analizowanych substancji. Ograniczeniem jest niewątpliwie fakt, że związki te należą do grupy nietrwałych substancji organicznych, które są szybko metabolizowane i wydalane

z organizmu. Zatem często jedna próbka moczu nie odpowie na pytanie dotyczące narażenia na związki o dłuższym okresie ekspozycji. Dlatego też w celu przewyciężenia tego ograniczenia, próbki moczu były pobierane dwukrotnie, aby oszacować narażenie wynikające ze stylu życia. Większość badanych związków znajduje się w produktach codziennego użytku takich jak produkty do higieny osobistej, produkty spożywcze, leki, detergenty i środki ochrony osobistej, które są stosowane powszechnie i codziennie. Nie zmieniamy często naszych przyzwyczajzeń, a co za tym idzie, dwie próby moczu są wystarczające, aby ocenić ekspozycję ciągłą przy narażeniu na niskie stężenia tych związków.

8.3 Wyniki przeprowadzonych analiz

Ekspozycja na bisfenol A, a rezerwa jajnikowa

Narażenie na bisfenol A wpływało negatywnie na liczbę pęcherzyków antralnych ($p=0,03$) oraz zmniejszało stężenie hormonu AMH ($p=0,02$).

W badaniu przeprowadzonym w Stanach Zjednoczonych, wśród kobiet leczących się z powodu niepłodności, stwierdzono istotnie statystyczną zależność pomiędzy liczbą pęcherzyków antralnych (AFC), a narażeniem na działanie BPA (dla ekspozycji na BPA w pierwszym, drugim i trzecim kwartylu; p dla trendu $<0,001$) (Souter i wsp., 2013). Nie zaobserwowano związku pomiędzy narażeniem na BPA a stężeniem FSH (Souter i wsp., 2013). Wyniki te są zgodne z obserwacjami uzyskanymi w prezentowanym badaniu, gdzie ekspozycja na BPA (w czwartym kwartylu narażenia) wpływała na obniżenie liczby pęcherzyków antralnych i nie wpływała na stężenie FSH i estradiolu. Autorzy sugerują, zatem, że AFC wydaje się być najbardziej czułym wskaźnikiem rezerwy jajnikowej (Souter i wsp., 2013). Z kolei, w badaniu przeprowadzonym w Chinach, narażenie na BPA wpływało negatywnie na stężenie hormonu AMH i FSH wśród kobiet z

klinik leczenia niepłodności (Zhou i wsp., 2017). Jednak zależności te nie były istotne statystycznie. Analizując wyniki badania uzyskane w Chinach, dotyczące wpływu narażenia na BPA na stężenia AMH, to wyniki w przedstawionym badaniu są zbieżne i wykazują negatywny wpływ narażenia na BPA na stężenie AMH, natomiast w przypadku FSH są rozbieżne. Jednak wyniki badania przeprowadzonego w Chinach nie były istotne statystycznie. Dodatkowo badanie przeprowadzono na mniejszej grupie kobiet (n=268), u których przyczyną niepłodności był zespół policystycznych jajników. Natomiast w prezentowanym badaniu kobiety z zespołem policystycznych jajników były wykluczone z badania.

Nie wykazano wpływu BPA na stężenie estradiolu. W badaniu Mok-Lin i wsp. (2010), przeprowadzonym na grupie 84 kobiet zaobserwowano, że stężenie BPA w moczu wiązało się ze zmniejszonym stężeniem estradiolu (Mok-Lin i wsp., 2010).

Rozbieżność w wynikach prezentowanych badań może zależeć od doboru populacji badanej, a także może być skutkiem nieuwzględnienia lub uwzględnienia różnych czynników zakłócających.

Ekspozycja na triklosan, a rezerwa jajnikowa

W przedstawionym badaniu nie wykazano istotnie statystycznej zależności pomiędzy narażeniem na triklosan a badanymi parametrami rezerwy jajnikowej, liczbą pęcherzyków antralnych, stężeniami hormonów: AMH, FSH i estradiolu. Jedyne, jak do tej pory, badanie oceniające wpływ narażenia na triklosan na parametry rezerwy jajnikowej, przeprowadzono w Stanach Zjednoczonych wśród kobiet uczęszczających do kliniki leczenia niepłodności. W badaniu tym wykazano, że ekspozycja na triklosan wpływa negatywnie na liczbę pęcherzyków antralnych (Minguez-Alarcon i wsp., 2017). Jednak mniejsza, niż w prezentowanym badaniu grupa kobiet (n=109) oraz inna metoda

oznaczania triklosanu w moczu (chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas) może wpływać na inne rezultaty przedstawionych badań.

Ekspozycja na parabeny, a rezerwa jajnikowa

Przy kontroli potencjalnych czynników zakłócających, narażenie na propyl-paraben zmniejszało liczbę pęcherzyków antralnych ($p=0,04$), zwiększało stężenie FSH ($p=0,028$) i wpływało na obniżenie stężenia estradiolu ($p=0,04$). Nie wykazano związku między narażeniem na inne badane parabeny (metylowy, etylowy, butylowy i izbutylowy), a liczbą pęcherzyków antralnych i stężeniem badanych hormonów.

W badaniu, przeprowadzonym w Stanach Zjednoczonych wśród kobiet uczęszczających do klinik leczenia niepłodności, oceniającym wpływ narażenia na parabeny na rezerwę jajnikową, zaobserwowano również zmniejszenie liczby pęcherzyków antralnych (AFC) w przypadku ekspozycji na propyl-paraben (dla ekspozycji w drugim i trzecim kwartylu) (Smith i wsp., 2013). Wyniki te są zgodne z obserwacjami uzyskanymi w prezentowanym badaniu, gdzie narażenie na propyl-paraben (dla ekspozycji w trzecim kwartylu) wpływało na zmniejszenie liczby pęcherzyków antralnych. Smith i wsp. (2013) wykazali również wzrost stężenia FSH w 3-cim dniu cyklu wraz ze wzrostem stężenia propyl-parabenu (PP) w moczu dla ekspozycji w trzecim kwartylu (Smith i wsp., 2013). Ekspozycja na PP w trzecim kwartylu wpływała pozytywnie na FSH. Natomiast, nie wykazano zależności pomiędzy stężeniami metyl-parabenu (MP) i butyl-parabenu (BP) w moczu a stężeniem FSH oznaczanego w 3-cim dniu cyklu i liczbą pęcherzyków antralnych (Smith i wsp., 2013). Stężenie MP, PP i BP nie wpływało również na objętość jajników (Smith i wsp., 2013). Może to wynikać z faktu, że aktywność biologiczna i mechanizm działania parabenów różnią się pomiędzy sobą. Również

w prezentowanym badaniu zaobserwowano wzrost stężenia FSH przy narażeniu na propylparaben w drugim i trzecim kwartylu.

W moim badaniu propylparaben wpływał również na obniżenie stężenia estradiolu. Do tej pory nie opublikowano badań oceniających związek pomiędzy narażeniem na parabeny a stężeniem estradiolu. Jednak ze względu na to, że są to związki z grupy substancji zaburzających funkcję endokrynną, tego typu zależność jest możliwa, ale wymaga potwierdzenia w dalszych badaniach.

Związek PP z obniżeniem rezerwy jajnikowej jest zgodny z danymi dotyczącymi zwierząt, gdzie wykazano jego aktywność estrogeną parabenów. Wpływ na potencjał reprodukcyjny w przypadku PP jest większy w porównaniu z MP (Routledge i wsp. 1998; Vo i wsp., 2010). Chociaż dane dotyczące zwierząt dowodzą, że BP wywiera silniejsze działanie estrogenne niż PP lub MP, to w prezentowanym badaniu BP był rzadziej wykrywany, a kiedy został wykryty, stężenie jego w moczu było znamienne niższe niż stężenia PP czy MP. Fakt ten może stanowić wyjaśnienie braku zależności pomiędzy narażeniem na BP a markerami rezerwy jajnikowej. Możliwe jest również, że aktywność biologiczna i mechanizm działania poszczególnych parabenów różnią się pomiędzy sobą.

Ekspozycja na syntetyczne pyretroidy, a rezerwa jajnikowa

Również w przypadku narażenia na syntetyczne pyretroidy nie wykazano ich wpływu na badane parametry rezerwy jajnikowej. Opublikowane badania oceniające wpływ ekspozycji na syntetyczne pyretroidy, odnoszą się głównie do wpływu na płodność mężczyzn.

Badania przeprowadzone wśród kobiet dotyczą głównie wyników położniczych (poród przedwczesny, mała masa urodzeniowa (Zhang i wsp., 2013; Mytton i wsp., 2007) i rozwoju neurobehawioralnego dzieci (Shelton i wsp., 2014; Xue i wsp., 2013).

Liczne badania na zwierzętach sugerują również, że ekspozycja na pyretroidy wpływa na zaburzenia czynności funkcji jajników, która powoduje objawy podobne do przedwczesnej niewydolności jajnika (POI) u kobiet (Molavi i wsp., 2014). Natomiast są tylko dwa badania epidemiologiczne dotyczące narażenia na syntetyczne pyretroidy i jej wpływu na potencjał rozrodczy kobiet. Withworth i wsp., 2015 zaobserwowali, że ekspozycja na te związki obniżała stężenie AMH (Withworth i wsp., 2015), a w badaniu przeprowadzonym w Chinach, wraz ze wzrostem stężenia jednego z metabolitów syntetycznych pyretroidów 3-PBA wzrastało ryzyko przedwczesnej niewydolności jajników (Li i wsp., 2018).

Z uwagi jednak na alarmujące wyniki badań na zwierzętach, wykazujące negatywny wpływ ekspozycji na pyretroidy na płodność u samic (Marettova i wsp., 2017) i nieliczne badania epidemiologiczne, konieczne wydaje się kontynuowanie badań w tym kierunku w różnych populacjach kobiet.

8.4 Ograniczenia zastosowanych metod badawczych

Ograniczenia metody oceny rezerwy jajnikowej

Oznaczenie AFC i AMH, choć są bezspornie najbardziej czułymi markery rezerwy jajnikowej podlegają ograniczeniom. Powtarzalność badań AFC niewątpliwie jest zależne od doświadczenia osoby wykonującej badanie i przestrzegania zasad pomiaru oraz rozdzielczości aparatów USG. Należy jednak pamiętać, że AFC też podlega fluktuacjom, a stężenie AMH również może podlegać wahaniom korelującymi z AFC (Depmann i wsp., 2006). Mimo, że AMH jest uważany za hormon stabilny, wykazujący niską zmienność w kolejnych cyklach, gdyż jest markerem niecyklicznej aktywności jajników, to według badań oceniających fluktuację AMH u kobiet w okresie prokreacyjnym, obserwowano niższe stężenia AMH podczas bardzo wczesnej fazy

lutealnej, bezpośrednio po owulacji u młodych kobiet z relatywnie wysokimi stężeniami AMH, czyli z tzw. „młodymi jajnikami” (Ledger, 2010).

Oznaczenia stężenia FSH, pomimo, że wykonywane wyłącznie w bardzo wczesnej fazie folikularnej (pomiędzy 2-4 dniem cyklu) obarczone są dużymi wahaniami pomiędzy cyklami. Jest to spowodowane pulsacyjnym charakterem wyrzutów FSH. Jego poziom jest zależny od funkcji podwzgórza, które z kolei podlega złożonym regulacjom modulującym wydzielanie GnRH zależnych nie tylko od estrogenów w układzie sprzężeń zwrotnych ujemnych, ale też od poziomu leptyny, kisspeptyny, TSH, PRL, kortyzolu i opioidów.

Wiarygodna ocena markerów rezerwy jajnikowej jest niezwykle istotna w szacowaniu szans na ciążę, poród i powinna służyć podjęciu decyzji klinicznych dotyczących leczenia niepłodności i prowadzenia ciąży.

Inne ograniczenia i ich kontrola w badaniu

Przedstawione badanie ma pewne ograniczenia. Po pierwsze, ekspozycja na nietrwałe związki środowiskowe jest trudna ze względu na szybki metabolizm badanych związków. Problem ten został wyeliminowany, gdyż pobrane były dwie próbki moczu od jednej osoby w odstępie trzech do sześciu miesięcy.

Kolejne ograniczenie wynika z braku danych z okresu prenatalnego (między innymi narażenia na EDCs i ekspozycji na inne niekorzystne czynniki) oraz z faktu, że oogeneza jest złożonym procesem, którego początki sięgają życia płodowego. Ponadto krytyczne okresy dla ekspozycji mogą być wielokrotne, co sprawia, że ocena zmian ilości i jakości oocytów wynikających z takich ekspozycji stanowi poważne wyzwanie epidemiologiczne.

W okresie prokreacyjnym, w celu stworzenia środowiska endokrynnego sprzyjającego przeżyciu i wzrostowi oocytu wymagana jest złożona dwukierunkowa sygnalizacja między różnymi miejscami strategicznymi (obejmującymi jajnik, przysadkę i podwzgórze) oraz między komórką jajową i jej podtrzymującą linią komórek ziarnistych. Przewlekła ekspozycja na powszechnie występujące czynniki środowiskowe w niskich lub wysokich dawkach może zakłócać dowolne z tych istotnych interakcji i może zmieniać sygnalizację pomiędzy oocytami a komórkami ziarnistymi, ostatecznie popychając oocyt na szlak apoptozy.

Kolejnym ograniczeniem jest niewątpliwie ocena rezerwy jajnikowej wśród kobiet z kliniki leczenia niepłodności. Mimo, że osoby kwalifikowane do badania nie były obciążone czynnikami wpływającymi na obniżenie rezerwy jajnikowej, wyników nie można uogólnić na kobiety z populacji generalnej. Dodatkowo, trudno by było znaleźć grupę kobiet z populacji ogólnej, które miałyby oznaczoną rezerwę jajnikową, gdyż nie jest to badanie przesiewowe zalecane w tej grupie kobiet.

Przeprowadzone badanie epidemiologiczne jest pierwszą w Polsce analizą oceniającą wpływ narażenia na związki endokrynnie czynne (bisfenol A, triklosan, parabeny, syntetyczne pyretroidy) na rezerwę jajnikową, będącą swoistego rodzaju „wskaźnikiem wieku płodnego” u kobiet. Przewagą badania, nad dotychczas opublikowanymi pracami, jest proponowana, po raz pierwszy, ocena narażenia na wiele czynników środowiskowych, zrekrutowanie znacząco większej grupy badanej, uwzględnienie czynników zakłócających oraz dwukrotny pomiar ekspozycji pomiar ekspozycji w odstępie czasowym (co w przypadku związków, które mają krótki okres połowicznego rozkładu ma ogromne znaczenie).

Badanie przeprowadzono w jednym ośrodku, z różnorodną populacją pacjentów, a wszystkie próbki moczu zebrano i przetworzono w oparciu o jeden protokół przed

określeniem parametrów rezerwy jajnikowej. Badanie dotyczyło względnie dużej populacji kobiet. Wszystkie oznaczenia czynników środowiskowych i pomiary stężeń badanych hormonów były wykonywane przez to samo laboratorium, przy użyciu tej samej metodyki. Badanie ilości pęcherzyków antralnych było przeprowadzone zgodnie z rekomendacjami (Broekmans *wsp.*, 2010). W celu zminimalizowania zmienności "między operatorami", badania były przeprowadzone wyłącznie przez lekarzy pracujących w tym samym ośrodku, certyfikowanych w zakresie badań USG w ginekologii i przeszkolonych w zakresie oceny AFC zgodnie z tymi samymi wytycznymi.

Do tej pory w literaturze światowej ukazały się pojedyncze badania dotyczące wybranych czynników środowiskowych i ich wpływu na rezerwę jajnikową kobiet (Souter *i wsp.*, 2013; Zhou *i wsp.*, 2017; Mok-Lin *i wsp.*, 2010; Ehrich *i wsp.*, 2012a, 2012b; Bloom *i wsp.*, 2011; Minguez-Alarcon *i wsp.*, 2017; Smith *i wsp.*, 2013). Zatem, prezentowane badanie będzie stanowiło istotny wkład w stan wiedzy dotyczącej wpływu powszechnie występujących czynników środowiskowych na rezerwę jajnikową kobiet.

Obecnie wiele kobiet odracza lub świadomie podejmuje późne decyzje o prokreacji, wiele kobiet zmagają się z przedwczesnym obniżaniem się rezerwy jajnikowej i z problemem niepłodności, dlatego tak ważna jest tematyka prezentowanego badania.

Czynniki zakłócające

W badaniu uwzględniono następujące czynniki zakłócające mogące mieć wpływ na rezerwę jajnikową: wiek, palenie tytoniu, BMI.

W informacjach pozyskanych drogą wywiadu kwestionariuszowego istnieje możliwość wystąpienia „błędu pamięci” (Recall Bias). Mimo, że kobiety z niepłodnością wydają się bardziej wiarygodnie podawać zdarzenia z przeszłości, mogące mieć

ich zdaniem związek z płodnością, to większość pytań zawartych w kwestionariuszach i ankietach nie kojarzy się bezpośrednio z niepłodnością. Mając to na uwadze, należy się spodziewać istotnego wpływu „błędu pamięci” na wynik badania.

9. WNIOSKI

1. Wyniki przeprowadzonego badania wykazały, że osoby uczestniczące w badaniu były środowiskowo ekspozowane na badane czynniki środowiskowe zaburzające funkcję endokrynną: parabeny, syntetyczne pyretroidy, bisfenol A i triklosan, na co wskazują pomiary narażenia za pomocą metod monitoringu biologicznego.
2. Narażenie na parabeny i bisfenol A wpływało negatywnie na parametry rezerwy jajnikowej. Narażenie na propyl-paraben i bisfenol A zmniejszało liczbę pęcherzyków antralnych. Ekspozycja na bisfenol A wpływała negatywnie na stężenie AMH, ekspozycja na propyl-paraben zwiększała stężenie FSH i obniżała stężenia estradiolu.
3. Nie wykazano związku między narażeniem na inne parabeny (metylowy, etylowy, butylowy i izobutylowy), triklosan i syntetyczne pyretroidy, a liczbą pęcherzyków antralnych i stężeniem badanych hormonów.
4. Kobiety w wieku rozrodczym powinny być wszechstronnie informowane za pomocą przekazów medialnych o wpływie powszechnie występujących czynników środowiskowych zaburzających funkcję endokrynną zwłaszcza bisfenolu A i propyl-parabenu na rezerwę jajnikową.
5. Kobiety planujące ciążę oraz ciężarne powinny otrzymać informacje od prowadzących ich lekarzy o zasadności ograniczenia kontaktu z tymi substancjami oraz wykaz produktów, w jakich mogą się one zawierać.

10. Piśmiennictwo

1. Adewale, H.B., Jefferson, W.N., Newbold, R.R., Patisaul H.B. Neonatal bisphenol A exposure alters rat reproductive development and ovarian morphology without impairing activation of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Biol Reprod.* 2009; 81:690-9.
2. Ahn, K. C., Zhao, B. , Chen, J., Cherednichenko, G., Sanmarti, E., Denison, M.S., et al. In vitro biologic activities of the antimicrobials triclocarban, its analogs, and triclosan in bioassay screens: receptor-based bioassay screens. *Environ Health Perspect.* 2008 Sep; 116(9): 1203–10.
3. Allmyr, M., Adolfsson-Erici, M., McLachlan, M.S., Sandborgh-Englund, G. Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products. *Sci Total Environ.* 2006; 372:87–93.
4. Amweg, E.L., Weston, D. P., Ureda, N.M. Use and toxicity of pyrethroid pesticides in the Central Valley, California, USA. *Environ Toxicol Chem.* 2005; 24: 966-72.
5. Andersen, F. A.. Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, buthylparaben, isobuthylparaben and benzylparaben as used in cosmetic products. *Int J Toxicol.* 2008; 27, S1–S82.
6. Baird, D.D., Steiner, A.Z. Anti-Mullerian hormone: a potential new tool in epidemiologic studies of female fecundability. *Am J Epidemiol.* 2012; 175(4): 245-9.
7. Barbakadze, L., Kristesashvili, J., Khonelidze, N., Tsagareishvili, G. The Correlations of anti-mullerian hormone, follicle-stimulating hormone and antral follicle count in different age groups of infertile women. *Int J Fertil Steril.* 2015; 8(4): 393–8.
8. Bloom, M.S., Kim, D., Vom Saal, F.S., Taylor, J.A., Cheng, G., Lamb, J.D., et al. Bisphenol A exposure reduces the estradiol response to gonadotropin stimulation during in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2011; 96, 672-7.

9. Boyce, J.M., Pittet, D. Guideline for hand hygiene in health-care settings: recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2002; 23:S3–40.
10. Brady, L.M., Thomson, M. , Palmer, M.A. , Harkness, J.L . Successful control of endemic MRSA in a cardiothoracic surgical unit. *J Med Aust.* 1990; 52(5):240-5.
11. Brannick, K.E., Craig, Z.R., Himes, A.D., Peretz, J.R., Wang, W., Flaws, J.A. Prenatal exposure to low doses of bisphenol A increases pituitary proliferation and gonadotroph number in female mice offspring at birth. *Biol Reprod.* 2012; 87-92.
12. Brede, C., Fjeldal, P., Skjevraak, I., Herikstad, H. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit Contam J.* 2003; 20: 684-9.
13. Broekmans, F., Visser, J., Laven, J., Broer, S., Themmen, A., Fauser, B. Anti-Mullerian hormone and ovarian dysfunction. *Trends Endocrinol Metab.* 2008; 19: 340–7.
14. Broekmans, F.J., de Ziegler, D., Howles, C.M., Gougeon, A., Trew, G., Olivennes, F. The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. *Fertil Steril.* 2010; 94(3):1044-51.
15. Broekmans, F.J., Faddy, M.J., Scheffer, G., te Velde, E.R. Antral follicle counts are related to age at natural fertility loss and age at menopause. *Menopause.* 2004; 11: 607–14.
16. Broekmans, F.J., Knauff, E.A.H., Velde, E.R.T, Macklon, N.S., Fauser, B.C. Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends Endocrinol Metab.* 2007; 18:58–65.

17. Broekmans, F.J., Kwee, J., Hendriks, D.J., Mol, B.W., Lambalk, C.B. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod.* 2006; 12:685–718.
18. Burridge, E. Bisphenol A: product profile. *Eur Chem News.* 2003; 17; 14–20.
19. Byford, J. R., Shaw, L. E., Drew, M. G., Pope, G. S., Sauer, M. J., Darbre, P. D. Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002; 80: 49–60.
20. Cakmak, A, Cirpanli, Y., Bilensoy, E., Yorganci, K., Calis, S., Saribas, Z. et al. Antibacterial activity of triclosan chitosan coated graft on hernia graft infection model. *Int J Pharm.* 2009; 381: 214-9.
21. Calafat, A. M., Kuklennyik, Z., Reidy, J. A., Caudill, S. P., Ekong, J., Needham, L. L. Urinary concentrations of bisphenol-A and 4-nonyl phenol in a human reference population. *Environ Health Perspect.* 2005; 113: 391–5.
22. Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L-Y., Reidy J.A., Larry, L. Needham. Urinary Concentrations of triclosan in the U.S. Population: 2003–2004. *Environ Health Perspect.* 2008; 116(3): 303–7.
23. Can, A., Semiz, O., Cinar, O. Bisphenol-A induces cell cycle delay and alters centrosome and spindle microtubular organization in oocytes during meiosis. *Mol Hum Reprod,* 2005; 11:389–96.
24. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Fourth national report on human exposure to environmental chemicals (NHANES). Updated Tables, August, 2014. United States Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. 2014.

25. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Fourth national report on human exposure to environmental chemicals (NHANES). Updated Tables, January, 2017. United States Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. 2017.
26. Chedrese, P.J., Feyles, E. The diverse mechanism of action of dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) and methoxychlor in ovarian cells in vitro. *Reprod Toxicol.* 2001; 15:693-8.
27. Chen, F., Ying, G.G., Kong, L.X., Wang, L., Zhao, J.L., Zhou, L.J., et al. a. Distribution and accumulation of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals in wastewater irrigated soils in Hebei, China. *Environ Pollut.* 2011; 159:1490–8.
28. Chen, J., Ahn, K.C., Gee, N.A., Gee, S.J., Hammock, B.D., Lasley, B.L. Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007; 221(3):278-84.
29. Chen, J.F., Chen, H.Y., Liu, R., He, J., Song, L., Bian, Q., et al. Effects of fenvalerate on steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Reprod. Toxicol.* 2005; 18:108–6.
30. Claeys, W.L., De Voghel, S., Schmit, J.F., Vromman, V., Pussemier, L. Exposure assessment of the Belgian population to pesticide residues through fruit and vegetable consumption. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2008; 25: 851–63.
31. Cohen, S., Kamarck, T., Mermelstein, R. A global measure of perceived stress. *J Health Social Behav.* 1983; 24:385–96.
32. Colborn, T., Saal, F.S.V., Soto, A.M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect.* 1993; 101(5): 378-84.

33. Cookson, B.D., Farrelly, H., Stapleton, P., Garvey, R.P., Price, M.R. Transferable resistance to triclosan in MRSA. *Lancet*. 1991; 337(8756):1548-9.
34. Crain, A.D, Janssen S, Edwards T, Heindel J, Ho, S.M., Hunt, P., et al. Female reproductive disorders: the roles of endocrine disrupting compounds and developmental timing. *Fertil Steril*. 2008; 90(4): 911–40.
35. Delclos, K.B., Camacho, L., Lewis, S.M., Vanlandingham, M.M., Latendresse, J.R.,Olson, G.R. Toxicity evaluation of bisphenol A administered by gavage to Sprague Dawley rats from gestation day 6 through postnatal day 90. *Toxicol Sci*. 2014; 139:174–97.
36. Depmann, M., van Disseldorp, J., Broer, S.L., Eijkemans, M.J., Laven, J.S., Visser. J.A., et al. Fluctuations in anti-Müllerian hormone levels throughout the menstrual cycle parallel fluctuations in the antral follicle count: a cohort study. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2016; 95:820-8.
37. Di Renzo, G.C., Conry, J.A., Blake, J., DeFrancesco, M.S., DeNicola, N., Martin, J.N. Jr, et al. Giudice LC. International Federation of Gynecology and Obstetrics opinion on reproductive health impacts of exposure to toxic environmental chemicals. *Int J Gynecol Obstet*. 2015; 131:219-25.
38. Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., et al. Overview of EDC effects on human health: Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*. 2009; 30:293–342.
39. Dodge, L.E., Williams, P.L., Williams, M.A., Missmer, S.A., Toth, T.L., et al. Paternal urinary concentrations of parabens and other phenols in relation to reproductive outcomes among couples from a fertility clinic. *Environ Health Perspect*. 2015; 123:665-71.

40. Dudek, B., Waszkowska, M., Merez. D., Hanke, W. Ochrona zdrowia pracowników przed skutkami stresu zawodowego. Instytut Medycyny Pracy, Łódź. 2004.
41. EFSA. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to a 3rd list of substances for food contact materials. EFSA J. 2004.
42. EFSA. Scientific opinion on bisphenol A. 2015.
http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factsheetbp_a150121.pdf
43. Ehrlich, S., Williams, P.L., Missmer, S.A., Flaws, J.A., Berry, K.F., Calafat, A.M., et al. Urinary bisphenol A concentrations and implantation failure among women undergoing in vitro fertilization. Environ Health Perspect. 2012a; 7:978-83.
44. Ehrlich, S., Williams, P.L., Missmer, S.A., Flaws, J.A., Ye, X., Calafat, A.M., et al. Urinary bisphenol A concentrations and early reproductive health outcomes among women undergoing IVF. Hum Reprod. 2012b; 27:3583-92.
45. Eichenlaub-Ritter, U., Vogt, E., Cukurcam, S., Sun, F.Y., Pacchierotti, F., Parry, J. Exposure of mouse oocytes to bisphenol A causes meiotic arrest but not aneuploidy. Mutat Res-Gen Tox En. 2008; 651:82-92.
46. European Commission. DG Health and Consumers. EU pesticides database, Active substances. Status under Reg. (EC) No 1107/2009.
http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=activesubstance.selection_.
47. Faddy, M.J., Gosden, R.G., Gougeon, A., Richardson, S.J., Nelson, J.F. Accelerated disappearance of ovarian follicles in midlife—implications for forecasting menopause. Hum Reprod. 1992; 7:1342-6.

48. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). Inventory of IPCS and other WHO pesticide evaluations and summary of toxicological evaluations performed by the joint meeting on pesticide residues (JMPR) through 2009. Tenth Edition. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2009. www.who.int/ipcs/publications/jmpr/en.
49. FDA. Bisphenol A (BPA): Use in food contact application. US Food and Drug Administration, 2012. <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm064437.htm>
50. Fei, J., Qu, J.H., Ding, X.L., Xue, K., Lu, C.C., Chen, J.F., et al. Fenvalerate inhibits the growth of primary cultured rat preantral ovarian follicles. *Toxicol.* 2010; 267:1–6.
51. Feo, M.L., Eljarrat, E., Barcelo, D. Determination of pyrethroid insecticides in environmental samples. *Trends Analyt Chem.* 2010; 29:692-705.
52. Fisher, J.S., Turner, K.J., Brown, D., Sharpe, R.M. Effect of neonatal exposure to estrogenic compounds on development of the excurrent ducts of the rat testis through puberty to adulthood" *Environ. Health Perspect.* 1999; 107: 397-405.
53. Fortes C., Mastroeni S., Pilla, M.A., Antonelli, G., Lunghini, L., Aprea C. The relation between dietary habits and urinary levels of 3-phenoxybenzoic acid, a pyrethroid metabolite. *Food Chem. Toxicol.* 2013; 52:91–6.
54. Fritz, M.A., Speroff, L. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility.* 8th ed. Lippincott Wilkins and Williams. 2011.
55. Fu, P., Kawamura, K. Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere. *Environ Pollut.* 2010; 158:3138–43.

56. Fujimoto, V. Y., Kim, D., vom Saal F. S., Frederick, S., Lamb, J. D., Taylor, J. A., et al. Serum unconjugated bisphenol A concentrations in women may adversely influence oocyte quality during in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2011; 95:1816-8.
57. Garfield, B.E., Canavan, J.L., Smith, C.J., Ingram, K.A., Fowler, R.P., Clark, A.L., et al. Stanford Seven-Day Physical Activity Recall questionnaire in COPD. *Eur Respir J*. 2012; 40:356-62.
58. Geens, T., Neels, H., Covaci, A. Distribution of bisphenol-A, triclosan and n-nonylphenol in human adipose tissue, liver and brain. *Chemosphere*. 2012; 87: 796-802.
59. Genuis, S.J., Birkholz, D., Curtis, L., Sandau, C. Paraben Levels in an Urban Community of Western Canada. *ISRN Toxicol*. 2013; 2013: 8.
60. Giray, B., Gürbay, A., Hincal, F. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. *Toxicol Lett*. 2001; 118:139–46.
61. Golden, R., Gandy, J., Vollmer, G. A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health. *Crit Rev Toxicol*. 2005; 35: 435-58.
62. Gore, A.C., Chappell, V.A., Fenton, S.E., Flaws, J.A., Nadal, A., Prins, G.S., et al. The Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocr Rev*. 2015; 36: E1-150.
63. Han, Y., Xia, Y., Han, J., Zhou J, Wang S, Zhu, P., et al. The relationship of 3-PBA pyrethroids metabolite and male reproductive hormones among non-occupational exposure males. *Chemosphere*. 2008; 72:785–90.
64. Harte, J., Holdren, C., Schneider, R., Shirley C. *Toxics A to Z: A Guide to Everyday Pollution Hazards*. University of California Press. 1991.

65. Hendriks, D.J., Kwee, J., Mol, B.W., te Velde, E.R., Broekmans, F.J. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. *Fertil Steril.* 2007; 87:764–75.
66. Horie, K., Takakura, K., Fujiwara, H., Suginami, H., Liao, S., Mori, T. Immunohistochemical localization of androgen receptor in the human ovary throughout the menstrual-cycle in relation to estrogen and progesterone-receptor expression. *Hum Reprod.* 1992; 7:184–90.
67. Howdeshell, K. L., Peterman, P. H., Judy, B. M., Taylor, J. A., Orazio, C. E., Ruhlen, R. L., et al. Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environ Health Perspect.* 2003; 111:1180–7.
68. Hua, R., Zhou, Y., Wu, B., Huang, Z., Zhu, Y., Song, Y., et al. Urinary triclosan concentrations and early outcomes of in vitro fertilization - embryo transfer. *Reproduction.* 2017; 153:319-25.
69. Hulten, M.A., Patel, S., Jonasson, J., Iwarsson, E. On the origin of the maternal age effect in trisomy 21 Down syndrome: the oocyte mosaicism selection model. *Reproduction.* 2010; 139:1–9.
70. Ikezuki, Y., Tsutsumi, O., Takai, Y., Kamei, Y., Taketani, Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod.* 2002; 17: 2839–41.
71. Ji, G., Xia, Y., Gu, A., Shi, X., Long, Y., Song, L., et al. Effects of non-occupational environmental exposure to pyrethroids on semen quality and sperm DNA integrity in Chinese men. *Reprod Toxicol.* 2011; 31(2):171-6.

72. Jurewicz, J., Radwan, M., Wielgomas, B., Sobala, W., Piskunowicz, M., Radwan, P., et al. The effect of environmental exposure to pyrethroids and DNA damage in human sperm. *Syst Biol Reprod Med.* 2015; 61:37-43.
73. Justinger, C., Moussavian, M.R., Schlueter, C., Kopp, B., Kollmar, O., Schilling, M.K. Antibiotic coating of abdominal closure sutures and wound infection. *Surgery,* 2009; 145: 330-4.
74. Kale, M., Rathore, N., John, S., Bhatnagar, D. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicol Lett.* 1999; 105:197–205.
75. Kantiani, L., Farré, M., Asperger, D., Rubio, F., González, S., Alda, M.J.L., et al. Triclosan and methyl-triclosan monitoring study in the northeast of Spain using a magnetic particle enzyme immunoassay and confirmatory analysis by gas chromatography–mass spectrometry. *J Hydrol.* 2008; 361:1-9.
76. Karkanaki, A, Vosnakis, C., Panidis D. The clinical significance of anti-mullerian hormone evaluation in gynecological endocrinology. *Hormones.* 2011; 19:95–103.
77. Klečka, G. M., Staples, C. A., Clark, K. E., van der Hoeven, N., Thomas, D.E., Hentges, S. G. Exposure Analysis of Bisphenol A in Surface Water Systems in North America and Europe. *Environ. Sci. Technol.* 2009; 43:6145–50.
78. Knauff, E.A., Eijkemans, M.J., Lambalk, C.B., ten Kate-Booij M.,J., Hoek, A., Beerendonk, C.C., et al. Dutch Premature Ovarian Failure Consortium. Anti-Müllerian hormone, inhibin B, and antral follicle count in young women with ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94:786–92.
79. Knudsen, B.E., Chew, B.H., Denstedt, J.D. Drug-eluting biomaterials in urology: the time is ripe. *BJU Int.* 2005; 95:726–7.

80. Kotil, T., Yon, N.D. The effects of permethrin on rat ovarian tissue morphology. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2015; 67:279–85.
81. Kruger, T., Long, M., Bonefeld-Jorgensen, E.C. Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. *Toxicol.* 2008; 246:112–23.
82. Kuiper, G. J. M., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P.T., et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinol.* 1998; 139: 4252-63.
83. Kupesic, S., Kurjak, A., Bjelos, D., Vujisic, S. Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. *Fertil Steril.* 2003; 79:190–7.
84. Kwee, J., Elting, M.E., Schats, R., McDonnell, J., Lambalk, C.B. Ovarian volume and antral follicle count for the prediction of low and hyper responders with in vitro fertilization. *Reprod Biol Endocrinol.* 2007; 5:9.
85. La Marca A., Giulini S., Orvieto R., De Leo V., Volpe A. Anti-Müllerian hormone concentrations in maternal serum during pregnancy. *Hum Reprod.* 2005; 20:1569-72.
86. La Marca, A., Grisendi, V., Giulini, S., Argento, C., Tirelli, A., Dondi, G., et al. Individualization of the FSH starting dose in IVF/ICSI cycles using the antral follicle count. *J Ovarian Res.* 2013; 6: 11.
87. La Marca, A., Volpe, A. Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clin Endocrinol.* 2006; 64:603–10.
88. Lange, A., Carignan, C.C., Minguez-Alarcon. L., Williams, P., Calafat, A.M., Toth, T.L., et al. Triclosan exposure and treatment outcomes in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2015; 104: e86.

89. Ledger, W.L. Clinical utility of measurement of anti-mullerian hormone in reproductive endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95:5144–54.
90. Lee, S.G., Kim, J.Y., Chung, J.Y., Kim, Y.J., Park, J.E., Oh, S., et al. Bisphenol A exposure during adulthood causes augmentation of follicular atresia and luteal regression by decreasing 17beta-estradiol synthesis via downregulation of aromatase in rat ovary. *Environ Health Perspect.* 2013; 121:663–9.
91. Leggett. M., Leland, J., Kellar, K., Epp B. Formulation of microbial biocontrol agents - an industrial perspective. *Can. J. Plant Pathol.* 2011; 33,101–7.
92. Lenie, S., Cortvrindt, R., Eichenlaub- Ritter, U., Smitz J. Continuous exposure to bisphenol A during in vitro follicular development induces meiotic abnormalities. *Mutat Res.* 2008; 651:71–81.
93. Li, C., Cao, M., Ma, L., Ye, X., Song, Y., Pan, W., et al. Pyrethroid Pesticide Exposure and Risk of Primary Ovarian Insufficiency in Chinese Women. *Environ Sci Technol.* 2018; 52:3240-8.
94. Li,Y., Zhang, W., Liu, J., Wang, W., Li, H., Zhu, J., et al. Prepubertal bisphenol A exposure interferes with ovarian follicle development and its relevant gene expression. *Reprod Toxicol.* 2014b; 44:33–40.
95. Liu, J., Yang, Y., Yang, Y., Zhang, Y., Liu, W. Disrupting effects of bifenthrin on ovulatory gene expression and prostaglandin synthesis in rat ovarian granulosa cells. *Toxicol.* 2011a; 282:47–55.
96. Liu, J., Yang, Y., Zhuang, S., Yang, Y., Li, F., Liu, W. Enantioselective endocrine-disrupting effects of bifenthrin on hormone synthesis in rat ovarian cells. *Toxicology* 2011b, 290:42–9.

97. Lu, C., Adamkiewicz, G., Attfield, K.R., Spengler, J.D., Tao, L., Kapp, M., et al. Household pesticide contamination from indoor pest control applications in urban low-income public housing dwellings: a community-based participatory research. *Environ. Sci. Technol.* 2013; 47: 2018–25.
98. Luo, Y., Zhang, M. Environmental modeling and exposure assessment of sediment-associated pyrethroids in an agricultural watershed. *PLoS ONE.* 2011; 6:e15794.
99. Machtinger, R., Orvieto, R. Bisphenol A, oocyte maturation, implantation, and IVF outcome: review of animal and human data. *Reprod BioMed Online.* 2014; 29: 404-10.
100. Macur, B., Śliwa, L. Parametry rezerwy jajnikowej i ich przydatność w określaniu aktualnej i przyszłej płodności kobiety. *Przegl Lek.* 2017; 71: 707-10.
101. Marettova, E., Marett, M., Legáth, J. Effect of pyrethroids on female genital system. *Review. Anim Reprod Sci.* 2017; 184:132-8.
102. Markey, C. M., Coombs, M. A., Sonnenschein, C., Soto, A. M. Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs. *Evol Dev.* 2003; 5: 67-75.
103. Matsushima, A., Kakuta, Y., Teramoto, T., Koshihara, T., Liu, X., Okada, H., et al. Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERR γ . *J Biochem.* 2007; 142: 517–24.
104. Matthews, T.J, Hamilton, B.E. Delayed childbearing: more women are having their first child later in life. *NCHS Data Brief.* 2009; 21:1-8.
105. Mattison, D.R., Plowchalk, D.R., Meadows, M.J., Miller, M.M., Malek, A., London, S. The effect of smoking on oogenesis, fertilization, and implantation. *Semin Reprod Endocrinol.* 1989; 7:291–304.

106. Maund, S. J., Travis, K.Z., Hendley, P., Giddings, J.M., Solomon, K. R. Probabilistic risk assessment of cotton pyrethroids: V. Combining landscape-level exposures and ecotoxicological effects data to characterize risks. *Environ Toxicol Chem.* 2001; 20:687-92.
107. Meeker, J.D., Barr, D.B., Ryan, L., Herrick, R.F., Bennett, D.H., Bravo, R., et al. Temporal variability of urinary levels of non - persistent insecticides in adult men. *J Expo Anal Environ Epidemiol.* 2005; 15:271–81.
108. Meeker, J.D., Yang, T., Ye, X., Calafat, A.M., Hauser, R. Urinary concentrations of parabens and serum hormone levels, semen quality parameters, and sperm DNA damage. *Environ Health Perspect.* 2011; 119:252–7.
109. Mínguez-Alarcón, L., Chiu, Y. H., Messerlian, C., Williams, P. L., Sabatini M. E., Toth T. L., et al. EARTH Study Team.. Urinary paraben concentrations and in vitro fertilization outcomes among women from a fertility clinic. *Fertil Steril.* 2016; 105: 714-21.
110. Mínguez-Alarcón, L., Christou, G., Messerlian, C., Williams, P.L., Carignan, C.C., Souter, I., et al. EARTH Study Team. Urinary triclosan concentrations and diminished ovarian reserve among women undergoing treatment in a fertility clinic. *Fertil Steril.* 2017; 108:312-9.
111. Mok-Lin, E., Ehrlich, S., Williams, P.L., Petrozza, J., Wright, D.L., Calafat, A.M., et al. Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF. *Int J Androl.* 2010; 33:385-93.
112. Molavi, M., Razi, M., Malekinejad, H., Amniattalab, A., Rezaie, H. Vitamin E improved cypermethrin-induced damages in the ovary of rats; evidence for angiogenesis and p53 involvement. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2014; 110:27–35.

113. Moos, R.K., Angerer, J., Dierkes, G., Bruning, T., Koch, H.M. Metabolism and elimination of methyl, iso- and n-butyl paraben in human urine after single oral dosage. *Arch Toxicol.* 2015; 90:2699–709.
114. Mytton, O.T., McGready, R., Lee, S.J., Roberts, C.H., Ashley, E.A., Carrara, V.I., et al. Safety of benzyl benzoate lotion and permethrin in pregnancy: a retrospective matched cohort study. *BJOG.* 2007; 114:582–7.
115. National Toxicology Program. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol-A. NTP Brief on Bisphenol-A. US Department of Health and Human Services. 2008.
<http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/ohat/bisphenol/bisphenol.pdf>
116. Newbold, R. R., Jefferson, W. N., Padilla-Banks, E. Prenatal exposure to bisphenol A at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life. *Environ Health Perspect.* 2009; 117:879–85.
117. Ng, E.H, Yeung, W.S., Fong, D.Y., Ho, P.C. Effects of age on hormonal and ultrasound markers of ovarian reserve in Chinese women with proven fertility. *Hum Reprod.* 2003; 18:2169–74.
118. Oishi S. Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of *p*-hydroxybenzoic acid in rats. *Food Chem Toxicol.* 2004; 42:1845–9.
119. Palter, S.F., Tavares, A.B., Hourvitz, A., Veldhuis, J.D., Adashi, E.Y. Are estrogens of import to primate/human ovarian folliculogenesis? *Endocr Rev.* 2001; 22:389-424.
120. Pap, L., Bajomi, D., Szekely, I. The pyrethroids, an overview. *International Pest. Council.* 1996; 38:15-9.
121. Patel, S., Zhou, C., Rattan, S., Flaws, J.A. Effects of endocrine-disrupting chemicals on the ovary. *Bio Reprod.* 2015; 93:20.

122. Pavlik, E.J., DePriest, P.D., Gallion, H.H, Ueland, F.R., Reedy, M.B., Kryscio, R.J., et al. Ovarian volume related to age. *Gynecol Oncol.* 2000; 77:410–2.
123. Pepling, M.E., Spradling, A.C. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev Biol.* 2001; 234:339–51.
124. Pru, J.K., Kaneko-Tarui, T., Jurisicova, A., Kashiwagi, A., Selesniemi, K., Tilly, J.L. Induction of Proapoptotic Gene Expression and Recruitment of p53 Herald Ovarian Follicle Loss Caused by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Reprod Sci.* 2009; 16:347–56.
125. Prusakiewicz, J.J., Harville, H.M., Zhang, Y., Ackermann, C., Voorman, R.L. Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: possible link to paraben estrogenic effects. *Toxicol.* 2007; 232:248-56.
126. Qiu, W., Zhao, Y., Yang, M., Farajzadeh, M., Pan, C., Wayne, N.L. Actions of bisphenol a and bisphenol s on the reproductive neuroendocrine system during early development in zebrafish. *Endocrinol.* 2016; 157:636-47.
127. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Version 3. 2016
<https://www.R-project.org/>.
128. Radwan J., Wołczyński S. Niepłodność i rozród wspomagany. *Termedia.* 2011; 51.
129. Richardson, M.C., Guo, M., Fauser, B.C., Macklon, N.S. Environmental and developmental origins of ovarian reserve. *Hum Reprod Update.* 2014; 20; 353-69.
130. Riederer, A.M., Bartell, S.M., Barr, D.B., Ryan, P.B. Diet and nondiet predictors of urinary 3-phenoxybenzoic acid in NHANES 1999–2002. *Environ Health Perspect.* 2008; 116: 1015–22.

131. Rimm, E. B., Giovannucci, E. L., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Litin, L. B., Willett, W. C. Reproducibility and validity of an expanded self-administered semiquantitative food frequency questionnaire among male health professionals. *Am Journal Epidemiol.* 1992; 135, 1114-26.
132. Rivera, O.E., Varayoud, J., Rodriguez, H.A., Santamaria, C.G., Bosquiazzo, V.L., Osti, M., et al. Neonatal exposure to xenoestrogens impairs the ovarian response to gonadotropin treatment in lambs. *Reprod.* 2015; 149:645–55.
133. Rodricks, J.V., Swenberg, J.A., Borzelleca, J.F., Maronpot, R.R., Shipp, A.M. Triclosan: a critical review of the experimental data and development of margins of safety for consumer products. *Crit Rev Toxicol.* 2010; 40:422-84.
134. Rodriguez, H.A., Santambrosio, N., Santamaria, C.G., Munoz-de-Toro, M., Luque, E.H. Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary. *Reprod Toxicol.* 2010; 30:550–7.
135. Rosen, M.P., Johnstone, E., McCulloch, C.E., Schuh-Huerta, S.M., Sternfeld, B., Reijo-Pera, R.A., et al. A characterization of the relationship of ovarian reserve markers with age. *Fertil Steril.* 2012; 97:238–43.
136. Rossbach, B., Appel, K.E., Mross, K.G., Letzel, S. Uptake of permethrin from impregnated clothing. *Toxicol Lett.* 2010; 192:50–5.
137. Rossbach, B., Niemietz, A., Kegel, P., Letzel, S. Uptake and elimination of permethrin related to the use of permethrin treated clothing for forestry workers. *Toxicol Lett.* 2014; 231:147–53.
138. Routledge, E. J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J., Sumpter, J. P. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol App Pharmacol.* 1998; 153:12–9.

139. Rudel, R.A., Brody, J.G., Spengler, J.D., Vallarino, J., Geno, P.W., Sun, G., et al. Identification of selected hormonally active agents and animal mammary carcinogens in commercial and residential air and dust samples. *J Air Waste Manage Assoc.* 2001; 51:499–513.
140. Rutkowska, A., Rachoń, D., Milewicz, A., Ruchała, M., Bolanowski, M., Jędrzejuk, D., et al. Polish Society of Endocrinology position statement on endocrine disrupting chemicals (EDCs). *Endokryn Pol.* 2015; 66: 276-85.
141. Rządowa Rada Ludnościowa. Sytuacja Demograficzna Polski. Raport 2013-2014. 2014.
https://bip.stat.gov.pl/files/gfx/bip/pl/defaultstronaopisowa/461/1/1/raport_rrl_2013-2014.pdf
142. Sabatini, M. E., Smith K.W., Ford, J., Ehrlich, S. R., Toth, T. L., Hauser, R. Urinary paraben concentrations and in vitro fertilization (IVF) outcomes. *Fertil Steril.* 2011; 96:154.
143. SCCS “Opinion on parabens”, 22 March 2011.
144. SCCS “Opinion on triclosan”, 22 June 2010.
145. Scheffer, G.J., Broekmans, F.J., Dorland, M., Habbema, J.D., Looman, C.W., te Velde, E.R. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril.* 1999; 72:845–51.
146. Scheffer, G.J., Broekmans, F.J., Looman, C.W., Blankenstein, M., Fauser, B.C., de Jong, F.H., et al. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Hum Reprod.* 2003; 18:700–6.

147. Schulz, C., Angerer, J., Ewers, U., Heudorf, U., Wilhelm, M. Revised and new reference values for environmental pollutants in urine or blood of children in Germany derived from the German environmental survey on children 2003–2006 (GerES IV). *Int J Hyg Environ Health*. 2009; 212: 637-47.
148. Shanle, E.K., Xu, W. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: identification and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol*. 2011; 24:6–19.
149. Shelton, J.F., Geraghty, E.M., Tancredi, D.J., Delwiche, L.D., Schmidt, R.J., Ritz, B., et al. Neurodevelopmental disorders and prenatal residential proximity to agricultural pesticides: the CHARGE study. *Environ Health Perspect*. 2014; 122:1103–9.
150. Skinner, M.K. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update*, 2005; 11:461–71.
151. Smith, K.W., Souter, I., Dimitriadis, I., Ehrlich, S., Williams, P.L., Paige, W. L., et al. Urinary paraben concentrations and ovarian aging among women from a fertility center., *Environ Health Perspect*. 2013; 121:1299–305.
152. Smith, P., Steckler, T.L., Veiga-Lopez, A., Padmanabhan, V. Developmental programming: differential effects of prenatal testosterone and dihydrotestosterone on follicular recruitment, depletion of follicular reserve, and ovarian morphology in sheep. *Biol Reprod*. 2009; 80:726–36.
153. Soni, M.G., Carabin, I.G., Burdock, G.A. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem Toxicol*. 2005; 43: 985–1015.

154. Souter, I., Smith, K.W., Williams, P.L., Ehrlich, S., Hauser, R. Association of urinary phthalate (UrP) metabolite concentrations with ovarian response and early in-vitro fertilization (IVF) outcomes. Paper presented at the meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). 2013.
<https://www.eshre.eu/~media/sitecore-files/Annual-meeting/.../Press.../Souter.pdf>
155. Stoker, T.E., Gibson, E.K., Zorrilla, L.M. Triclosan exposure modulates estrogen-dependent responses in the female Wistar rats. *Toxicol Sci.* 2010; 117:45-53.
156. Sun, Y., Irie, M., Kishikawa, N., Wada, M., Kuroda, N., Nakashima, K. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column switching and fluorescence detection. *Biomed Chromatogr.* 2004; 18:501–7.
157. Susiarjo, M., Hassold, T.J., Freeman, E., Hunt, P.A. Bisphenol a exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse. *Plos Genet.* 2007; 3:e5.
158. Taxvig, C., Vinggaard, A.M., Hass, U., Axelstad, M., Boberg, J., Hansen, P.R., et al. Do parabens have the ability to interfere with steroidogenesis? *Toxicol Sci.* 2008; 106:206-13.
159. te Velde, E.R., Pearson, P.L. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update.* 2002; 8:141–54.
160. The World Bank, 2017. <https://data.worldbank.org/indicator/SP.DYN.TFRT.IN/>
161. Thomas, P., Dong, J. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006; 102:175–9.
162. Tobler, K.J., Shoham, G., Christianson, M.S., Zhao, Y., Leong, M., Shoham, Z. Use of anti-mullerian hormone for testing ovarian reserve: a survey of 796 infertility clinics worldwide. *J Assist Reprod Genet.* 2015; 32(10): 1441–8.

163. Trunnelle, K.J., Bennett, D.H., Tancredi, D.J., Gee, S.J., Stoecklin-Marois, M.T., Hennessy-Burt, T.E., et al. Pyrethroids in housedust from the home of farm worker families in the MICASA study. *Environ. Int.* 2013; 61:57–63.
164. United Nations Department of Economic and Social Affairs / Population Division. 2017; <https://www.un.org/development/desa/publications/world-population-prospects-the-2017-revision.html>
165. US EPA (United States Environmental Protection Agency). Reregistration Eligibility Decision for Cypermethrine. June 2006.
http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDs/cypermethrin_red.pdf.
166. US EPA (United States Environmental Protection Agency). Reregistration Eligibility Decision (RED) for permethrin. May 2009.
<http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDs/permethrin-red-revised-may2009.pdf>.
167. Van Meeuwen, J.A., van Son, O., Piersma, A.H., de Jong, P.C., van den Berg, M. Aromatase inhibiting and combined estrogenic effects of parabens and estrogenic effects of other additives in cosmetics. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008; 230: 372-82.
168. Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Sonnenschein, C., Rubin, B.S., Soto, A.M. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev.* 2009; 30:75–95.
169. Vaskivuo, T.E., Anttonen, M., Herva, R., Billig, H., Dorland, M., te Velde, E.R., et al. Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: Apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:3421–9.

170. Veldhoen, N., Skirrow, R.C., Osachoff, H., Wigmore, H., Clapson, D.J., Gunderson, M.P., et al. The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquat Toxicol.* 2006; 80:217–27.
171. Visser, J.A., de Jong, F.H., Laven, J.S., Themmen, A.P. Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reprod.* 2006; 131:1–9.
172. Vo, T.T., Yoo, Y.M., Choi, K.C., Jeung, E.B. Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a post-natal female rat model. *Reprod Toxicol.* 2010; 29:306–16.
173. Wang, L., Zhang, X., Wang, Y., Wang, W. Simultaneous determination of preservatives in soft drinks, yogurts and sauces by a novel solid-phase extraction element and thermal desorption-gas chromatography. *Anal Chim Acta.* 2006; 577:62–7.
174. Wang, W., Hafner, K.S., Flaws, J.A. In utero bisphenol A exposure disrupts germ cell nest breakdown and reduces fertility with age in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014; 276:157–64.
175. Weenen C., Laven J.S., Von Bergh A.R., Cranfield M., Groome N.P., Visser J.A., et al. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod.* 2004; 10:77-83.
176. Whitworth, K.W., Baird, D.D., Steiner, A. Z., Bornman, R.M.S., Travlos, G. S., Wilson, R.E., et al. Anti-Mullerian hormone and lifestyle, reproductive, and environmental factors among women in rural South Africa. *Epidemiol.* 2015; 26: 429– 35.

177. WHO. Toxicological and health aspects of bisphenol A: report of joint FAO/WHO expert meeting and report of stakeholder meeting on bisphenol A, November 1-5, 2010, Ottawa, Canada. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, Geneva Switzerland. 2011. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44624/97892141564274_eng.pdf;jsessionid=F9C17B7CFF399C1CF0DB0AD8361459BF?sequence=1
178. Wielka Interna. Endokrynologia. Medical Tribune. 2011; vol.12:539.
179. Wilcox, M.H., Hall, J., Pike, R., Templeton, P.A., Fawley, W.N., Parnell. P., et al. Use of perioperative mupirocin to prevent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) orthopaedic surgical site infections. *J Hosp Infect.* 2003; 54: 196–201.
180. Witorsch, R.J., Thomas, J.A. Personal care products and endocrine disruption: a critical review of the literature. *Crit Rev Toxicol.* 2010; 40:1–30.
181. Wiweko, B., Mustikaning Pitha Prawesti, D., Hestiantoro, A., Sumapraja, K., Natadisastra, M., Baziad, A. Chronological age vs biological age: an age-related normogram for antral follicle count, FSH and anti-Mullerian hormone. *J Assist Reprod Genet.* 2013; 30: 1563–7.
182. World Population Prospects. Key Findings and Advance Tables. 2017. https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/Files/WPP2017_KeyFindings.pdf
183. Xi, W., Lee, C.K., Yeung, W.S., Giesy, J.P., Wong, M.H., Zhang, X., et al. Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1 mice. *Reprod Toxicol.* 2011; 31: 409–17.

184. Xu J., Osuga Y., Yano T., Morita Y., Tang X., Fujiwara T., et al. Biphenol A induces apoptosis and G2-to-M arrest of ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 292:456-62.
185. Xue, J., Zartarian, V., Tornero-Velez, R., Tulse, N.S. EPA's SHEDS-multimedia model: children's cumulative pyrethroid exposure estimates and evaluation against NHANES biomarker data. *Environ Int.* 2014; 73:304-11.
186. Xue, Z., Li, X., Su, Q., Xu, L., Zhang, P., Kong, Z., et al. Effect of synthetic pyrethroid pesticide exposure during pregnancy on the growth and development of infants. *Asia Pac. J. Public Health.* 2013; 25: S72-9.
187. Yazar, K., Johnsson, S., Lind, M.L., Boman, A., Lide'n, C. Preservatives and fragrances in selected consumer-available cosmetics and detergents. *Contact Dermat.* 2011; 64:265-72.
188. Ye, X., Bishop, A.M., Reidy, J.A., Needham, L.L., Calafat, A.M. Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans. *Environ Health Perspect.* 2006; 114:1843-6.
189. Zhang, H.Q., Zhang, X.F., Zhang, L.J., Chao, H.H., Pan, B., Feng, Y.M., et al. Fetal exposure to bisphenol A affects the primordial follicle formation by inhibiting the meiotic progression of oocytes. *Mol Biol Rep.* 2012; 39:5651-7.
190. Zhang, J., Hisada, A., Yoshinaga, J., Shiraishi, H., Shimodaira, K., Okai, T., et al. Exposure to pyrethroids insecticides and serum levels of thyroid-related measures in pregnant women. *Environ Res.* 2013; 127:16-21.
191. Zhang, J., Yoshinaga, J., Hisada, A., Shiraishi, H., Shimodaira, K., Okai, T., et al. Prenatal pyrethroid insecticide exposure and thyroid hormone levels and birth sizes of neonates. *Sci. Total Environ.* 2014; 488-489:275-9.

192. Zhang, S., Qin, C.H., Safe, S.H. Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: Effects of structure and cell context. *Environ Health Perspect.* 2003; 111:1877–82.
193. Zhou, W., Fang, F., Zhu, W., Chen, Z-J., Du, Y., Zhang, J. Bisphenol A and Ovarian Reserve among Infertile Women with Polycystic Ovarian Syndrome. *Int J Environ Res Public Health.* 2017; 14:18.
194. Zou, K., Yuan, Z., Yang, Z.J., Luo, H.C., Sun, K.J., Zhou, L., et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol.* 2009; 11:631–6.
195. Zuazagoitia A. Montoya I. , Grandes G, Arietaleanizbeascoa M., Arce V., Martinez V. Reliability and validity of the 7-day Physical Activity Recall interview in a Spanish population. *European J Sport Science.* 2014; 14: 361-8.

11. Streszczenie

Wpływ narażenia na powszechnie występujące związki środowiskowe zaburzające funkcję endokrynną na rezerwę jajnikową.

Wstęp

Na początku XXI wieku niepłodność w krajach rozwiniętych dotyczyła 15% par (Fritz i Speroff, 2011), podczas gdy w latach 60 XX wieku było to 7–8% par. Światowa Organizacja Zdrowia określa niepłodność jako chorobę społeczną. Powszechnie przyjęto definicję niepłodności jako brak ciąży pomimo regularnych stosunków płciowych (minimum 3 w tygodniu), utrzymywanych powyżej 12 miesięcy bez stosowania jakichkolwiek metod antykoncepcyjnych. Na ten stan rzeczy ma wpływ wiele czynników takich jak coraz późniejszy wiek kobiet, w którym podejmują decyzję o prokreacji, wpływ czynników stylu życia jak i coraz powszechniej postulowany wpływ czynników środowiskowych, zwłaszcza związków chemicznych zaburzających funkcję endokrynną. Dramatyczny wzrost liczby małżeństw leczących się z powodu niepłodności spowodował, że zdrowie reprodukcyjne zwłaszcza wpływ na nie czynników środowiskowych stał się ważną kwestią zdrowia publicznego. Liczne badania wskazują, że narażenie na szeroko rozpowszechnione w środowisku substancje, zwane egzogennymi związkami endokrynnymi inaczej substancjami zaburzającymi funkcjonowanie układu hormonalnego, określanymi po angielsku, jako „Endocrine Disruptors” lub „Endocrine Disrupting Chemicals” (EDCs) negatywnie wpływa na zdrowie reprodukcyjne zwierząt i ludzi oraz jest powiązane z niektórymi chorobami, w tym również z niepłodnością (Colborn i wsp., 1993).

Wzrost światowej aktywności przemysłowej doprowadził do zwiększenia ekspozycji ludzi na szeroką gamę nowoczesnych substancji chemicznych, takich jak ftalany, parabeny, bisfenol A, triklosan i wiele innych. Związki te wobec masowej produkcji użytkowej znalazły się powszechnie w środowisku. Narażenie następuje poprzez kontakt z tymi związkami w pożywieniu, wodzie, powietrzu, poprzez kontakt z plastikami czy kosmetykami. Związki te występują w produktach codziennego użytku takich jak: plastikowe butelki, puszki z żywnością, detergenty, kosmetyki, zabawki, czy pestycydy. Są to związki, które wykazują zdolność interakcji z układem hormonalnym zakłócając jego prawidłowe działanie, prowadząc do zaburzenia syntezy, funkcji, przechowywania i / lub metabolizmu hormonów i mogą mieć niekorzystny wpływ na płodność kobiet i mężczyzn (Colborn i wsp., 1993) oraz odgrywać rolę w patogenezie niepłodności (Crain i wsp., 2008).

Mechanizm potencjalnego wpływu czynników środowiskowych z grupy zaburzających funkcję endokrynną (EDCs) na płodność kobiet wiąże się z ich podobieństwem do naturalnych ligandów mających zdolność do wiązania receptorów: węglowodorów arylowych (AHR) i receptorów estrogenowych (ER), które biorą udział w modulacji rezerwy jajnikowej. Związki te mają wpływ zarówno na początkową rezerwę jajnikową ustalaną w czasie życia płodowego, jak i modulują rezerwę jajnikową w dorosłym życiu (Richardson i wsp., 2014).

Cel

Celem badania była ocena wpływu ekspozycji środowiskowej na powszechnie występujące związki chemiczne zaburzające funkcję endokrynną (ang. Endocrine Disrupting Chemicals) (parabeny, bisfenol A, triklosan, syntetyczne pyretroidy) na rezerwę jajnikową.

Cele szczegółowe dotyczyły:

1). Oceny rezerwy jajnikowej kobiet poprzez badanie:

- a) liczby pęcherzyków astralnych (AFC) (z ang. Antral Follicle Count)
- b) stężenia AMH (z ang. Anti-Müllerian Hormone)
- c) stężenia hormonów: FSH (z ang. Follicle-Stimulating Hormone) i estradiolu mierzone pomiędzy 2-4 dniami cyklu

2). Oceny narażenia na nietrwałe czynniki środowiskowe- ocena stężenia w moczu (dwukrotne oznaczenie)

- a). parabenów - (metylowego, etylowego, propylowego, butylowego, izobutylowego);
- b). pyretroidów - wybranych metabolitów pyretroidów (cis-DCCA (kwas cis-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowego) (CDCCA), trans-DCCA (kwas trans-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowego) (TDCCA), cis-DBCA (kwas cis-(2,2-dibromowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowego), 3-PBA (kwas 3-fenoksybenzoesowego));
- c). bisfenolu A;
- d). triklosanu.

3). Oceny czynników związanych ze stylem życia (palenie, spożywanie alkoholu, otyłość, aktywność fizyczna, dieta, stres) i narażeń w pracy zawodowej, które zostaną uwzględnione w analizie, jako potencjalne czynniki zakłócające.

Metodyka

Badana populacja

Aby zrealizować przyjęte cele badawcze badaniem objęto 511 kobiet w wieku od 24-39 lat. Badaniem zostały objęte kobiety zgłaszające się do kliniki leczenia niepłodności w celu diagnostyki i leczenia niepłodności partnerskiej, czyli braku ciąży pomimo regularnych stosunków płciowych (minimum 3 w tygodniu), utrzymywanych powyżej 12 miesięcy bez stosowania jakichkolwiek metod antykoncepcyjnych) w okresie od grudnia 2014 do czerwca 2016 roku. Do badania kwalifikowano wyłącznie kobiety regularnie miesiączkujące, u których potwierdzono cykle owulacyjne, nieposiadające współistniejących chorób przewlekłych o znaczeniu klinicznym mogące obniżać rezerwę jajnikową (np. niewydolność kory nadnerczy, nieprawidłowy kariotyp, zespół łamliwego chromosomu X). Kryterium wykluczające stanowiły: trzy poronienia w wywiadzie, powyżej trzech przeprowadzonych procedur zapłodnienia pozaustrojowego, samoistna przedwczesna niewydolność jajników, przebyte leczenie chirurgiczne w obrębie jajników, chemioterapii lub radioterapii miednicy mniejszej (czyli stany mogące prowadzić do jatrogennej obniżenia rezerwy jajnikowej), obecność torbieli w jajnikach, w tym endometrianych (w wyłączeniu torbieli funkcjonalnych) oraz stany przebiegające z brakiem cykli owulacyjnych takie jak zespół policystycznych jajników, przedwczesna niewydolność jajników, hipogonadyzm hipogonadotropowy, hiperprolactynemia. Kobiety, które zgodziły się na udział w badaniu, po zapoznaniu się z protokołem badania i podpisaniu zgody na udział w badaniu, zostały poproszone o wypełnienie kwestionariusza.

Informacje uzyskane na podstawie wywiadu zostały uwzględnione w analizie, jako potencjalne czynniki zakłócające.

Na badanie uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej działającej przy Instytucie Medycyny Pracy w Łodzi- Uchwała nr 23/2014 z dnia 04.11.2014.

Dane uzyskane na podstawie kwestionariusza

Wywiad obejmował dane dotyczące cech społeczno-demograficznych, stylu życia: palenia, spożywania alkoholu, diety (na podstawie kwestionariusza na temat częstości spożywania wybranych produktów - Food Frequency Questionnaire), aktywności fizycznej (na podstawie kwestionariusza Seven Day Physical Activity Recall dotyczącego aktywności fizycznej w ostatnich 7 dniach pozwalającego wyliczyć wydatek energetyczny (Metabolic Equivalent Task - MET)), stresu (kwestionariusz Cohena - stres życiowy, kwestionariusz do Subiektywnej Oceny Pracy - stres zawodowy)), chorób występujących w przeszłości i innych narażeń występujących w środowisku zamieszkania lub pracy (kwestionariusz narażeń i pracy zawodowej przygotowany w Instytucie Medycyny Pracy w Łodzi).

Na podstawie pomiarów antropometrycznych został obliczony wskaźnik masy ciała BMI (ang. Body Mass Index) oraz stosunek obwodu talii do obwodu bioder WHR (z ang. Waist to Hip Ratio).

Pomiary antropometryczne

W celu oceny występowania otyłości u badanych kobiet wykonane zostały następujące pomiary: 1) waga ciała z dokładnością do 0,1 kg – przy wykorzystaniu elektronicznej wagi osobowej SECA (model 8801321009, SECA UK Ltd; Birmingham, UK); 2) wzrost, z dokładnością do 1 mm – przy wykorzystaniu stadiometru (Leicester Height Measure, SECA UK Ltd), 3) obwód pasa i bioder, z dokładnością do 1 mm – przy wykorzystaniu taśmy mierniczej.

Od badanych osób został pobrany materiał biologiczny: krew i mocz. Mocz został pobrany dwukrotnie (w odstępie 3 do 6 miesięcy) w celu weryfikacji narażenia na nietrwałe związki środowiskowe.

Ocena rezerwy jajnikowej

Rezerwa jajnikowa została oceniona za pomocą badania:

- 1). liczby pęcherzyków antralnych (AFC) (z ang. Antral Follicle Count),
- 2). stężenia hormonów:
 - a). AMH (z ang. Anti-Müllerian Hormone);
 - b). FSH (z ang. Follicle-Stimulating Hormone) (oznaczony pomiędzy 2 a 4 dniem cyklu);
 - c). Estradiol (oznaczony pomiędzy 2 a 4 dniem cyklu).

Badanie ilości pęcherzyków antralnych było przeprowadzone zgodnie z rekomendacjami (Broekmans i wsp., 2010). Badania były przeprowadzone wyłącznie przez certyfikowanych lekarzy w zakresie badań USG w ginekologii, przeszkolonych w zakresie oceny AFC. Wszystkie badania były przeprowadzone na początku fazy folikularnej, pomiędzy 2-4 dniem cyklu. Wykonywanie oceny liczby pęcherzyków antralnych we wczesnej fazie folikularnej jest rekomendowane celem zmniejszenia fluktuacji AFC w cyklu wynikającej z obecności torbieli czy też ciała żółtego. Do oceny uwzględniane były pęcherzyki o wymiarach od 2 do 10 mm.

Koncentracja AMH w surowicy krwi była oznaczana metodą mikroimmunoenzymatyczną (ELISA) z wykorzystaniem komercyjnych zestawów wg. instrukcji producenta (The AMH Gen II ELISA kit i The Inhibin B Gen II ELISA kit; Beckman Coulter, Inc., USA).

Stężenie FSH, estadiolu w surowicy krwi były oznaczone metodą chemiluminescencyjną z wykorzystaniem komercyjnych zestawów dla systemu VITROS Eci wg. instrukcji producenta (Ortho-Clinical Diagnostics Johnson & Johnson, UK).

Ocena rezerwy jajnikowej oraz stężenia hormonów u kobiet, czyli część kliniczna badań oraz ocena stanu klinicznego zrekrutowanych pacjentek została przeprowadzona w klinice leczenia niepłodności.

Ocena ekspozycji na czynniki środowiskowe

W próbkach moczu dwukrotnie oznaczane były nietrwałe zanieczyszczenia organiczne takie jak:

- 1). metabolity syntetycznych pyretroidów (cis-DCCA (kwas cis-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowego) (CDCCA), trans-DCCA (kwasu trans-(2,2-dichlorowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowego) (TDCCA), cis-DBCA (kwas cis-(2,2-dibromowinylo)-2,2-dimetylocyklopropano-1-karboksyłowego) (DBCA), 3-PBA (kwas 3-fenoksybenzoesowego));
- 2). całkowite stężenie parabenów (suma stężeń wolnych metabolitów oraz połączeń z kwasem glukuronowym parabenów: metyloвого (MP), etyloвого (EP), propyloвого (PP), butyloвого (BP) i izobutyloвого (iBuP));
- 3). bisfenolu A (BPA);
- 4). triklosan (TCL).

Izolacja analitów z matrycy przeprowadzona została z zastosowaniem półautomatycznej mikroekstrakcji do fazy stałej (Micro-Extraction by Packed Syringe -

MEPS), ekstrakty zostały poddane derywatywacji i analizie z użyciem chromatografii gazowej z tandemową spektrometrią mas (GC-MS/MS).

Metody analityczne zostały poddane wewnętrznej kontroli, jakości (zastosowanie materiałów odniesienia) oraz kontroli zewnątrz laboratoryjnej poprzez udział w międzynarodowych programach kontroli jakości (G-EQUAS -The German External Quality Assessment Scheme For Analyses in Biological Materials).

Czynniki środowiskowe zostały oznaczone w Katedrze Toksykologii, Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku.

Czynniki zakłócające i analiza statystyczna

W analizach wpływu badanych czynników środowiskowych na parametry rezerwy jajnikowej kobiet zgodnie z przyjętymi celami badawczymi uwzględniono szereg czynników zakłócających. Czynniki te zostały wyłonione na podstawie piśmiennictwa oraz analiz na podstawie badania. Analiza statystyczna została wykonana przy użyciu pakietu statystycznego R. Pierwszym etapem analizy była identyfikacja czynników zakłócających. Kolejny etap obejmował regresję liniową lub logistyczną. Ostateczny model wieloczynnikowy uwzględniał czynniki zakłócające oraz wszystkie istotne czynniki w modelu jednoczynnikowym na poziomie istotności 0,1. Narażenie przedstawione zostało, jako zmienna ciągła jak również w odpowiednich podgrupach, charakteryzujących kwartyłe narażenia.

Wyniki:

Badana populacja

Badaniem objęto 511 pacjentek kliniki leczenia niepłodności, które wyraziły zgodę na udział w badaniu. Większość z badanych kobiet miało wykształcenie wyższe (75%)

i średnie (21%). Osoby z wykształceniem zawodowym stanowiły około 4% badanych. Średnia wieku badanych osób wynosiła 33 lata. 93% badanych kobiet stanowiły mężatki. Aktywnych zawodowo było 92% badanych kobiet bez pracy pozostawało tylko 8% osób. Analizując okres niepłodności badanych par zgłaszających się do kliniki, stwierdzono, że czas trwania niepłodności w większości przypadków wynosił 3–5 lat (29,55%) i >5 lat (35,23%). Przebyte w przeszłości choroby dotyczyły niewielkiej liczby badanych kobiet i nie miały związku z niepłodnością partnerską. Tylko 15% badanych deklarowało jedną z chorób wymienionych w kwestionariuszu (cukrzyca, nadciśnienie, wady serca, padaczka). Większość z badanych kobiet miało prawidłową wagę ciała (59%; BMI 18,5-24,9 kg/m²) i nie paliło papierosów (92,17%). Badane kobiety były aktywne fizycznie. Uprawianie jakiegokolwiek formy aktywności fizycznej deklarowało 68% badanych. 81% badanych kobiet spożywało kawę, najczęściej codziennie (70,67%). 30% badanych miało nadwagę (BMI 25-29,9 kg/m²). Suma punktów z Kwestionariusza do Subiektywnej Oceny Pracy wynosiła średnio 94,4±25,0 co odpowiada średniemu poziomowi stresu zawodowego (Dudek i wsp., 2004). Natomiast suma punktów z Kwestionariusza Cohena wynosiła 22,1±5,8 i był to średni poziom stresu wynikającego z codziennego życia.

Ocena rezerwy jajnikowej

Liczba pęcherzyków antralnych u badanych kobiet wynosiła 12,73±8,94 i była w granicach normy, gdyż <4 pęcherzyków jest związane ze znacznym zmniejszeniem szansy na ciążę oraz z tym, że odpowiedź jajników na stymulację owulacji będzie nieprawidłowa (Radwan i Wołczyński, 2011). Stężenie AMH wynosiło 1,17±1,46 ng/ml i było nieznacznie wyższe niż norma. W przypadku FSH i estradiolu średnie stężenie wynosiło 6,38±2,18 mIU/ml i 93,74±16,63 odpowiednio i mieściło się w granicach norm dla tych hormonów.

Stężenie wybranych czynników środowiskowych

Wyniki przeprowadzonego badania wykazały, że osoby uczestniczące w badaniu były środowiskowo ekspozowane na badane czynniki środowiskowe zaburzające funkcję endokrynną: paraben, syntetyczne pyretroidy, bisfenol A i triklosan. Średnie stężenie parabenów w moczu badanych osób w pierwszej próbie wynosiło: butylowego $4,70 \pm 2,96$ ng/ml, etylowego $11,2 \pm 7,0$ ng/ml, metylowego $92,68 \pm 4,28$ ng/ml, propylowego $16,20 \pm 6,33$ ng/ml a izobutylowego $3,16 \pm 2,55$ ng/ml i było podobne do poziomu parabenów w innych badaniach przeprowadzonych wśród kobiet zarówno uczęszczających do kliniki leczenia niepłodności w celach diagnostycznych jak i u kobiet z populacji generalnej. W przypadku metabolitów syntetycznych pyretroidów średnia geometryczna \pm SD wynosiły: CDCCA $0,22 \pm 2,40$ ng/ml TDCCA $0,50 \pm 2,62$ ng/ml, DBCA $0,26 \pm 2,42$ ng/ml, 3-PBA $0,31 \pm 2,60$ ng/ml. Średnie stężenie triklosanu i bisfenolu A wynosiło odpowiednio: $2,78 \pm 7,17$ ng/ml, $1,38 \pm 2,34$ ng/ml.

W drugiej próbie moczu stężenia badanych związków (średnia geometryczna \pm SD) wynosiły w przypadku metabolitów syntetycznych pyretroidów: CDCCA $0,23 \pm 0,30$ ng/ml TDCCA $0,27 \pm 0,33$ ng/ml, DBCA $0,30 \pm 0,90$ ng/ml, 3-PBA $0,25 \pm 0,33$ ng/ml. Stężenie parabenów (średnia geometryczna \pm SD) wynosiło: butylowego $3,99 \pm 9,90$ ng/ml, etylowego $5,71 \pm 44,97$ ng/ml, metylowego $49,13 \pm 105,39$ ng/ml, propylowego $9,14 \pm 38,58$ ng/ml. Paraben iBuP nie został wykryty w drugiej próbie moczu. Stężenie triklosanu i bisfenolu A w drugiej próbie moczu wynosiło odpowiednio $1,67 \pm 30,34$ ng/ml i $1,27 \pm 1,71$ ng/ml.

Korelacje pomiędzy badanymi czynnikami środowiskowymi

W pierwszej próbie moczu badane związki silnie ze sobą korelowały. Istotnie statystyczną korelację zaobserwowano między metabolitami syntetycznych pyretroidów:

CDCCA, TDCCA, DBCA, 3-PBA ($p < 0,001$). Bisfenol A (BPA) i butyl-paraben (BP) istotnie statystycznie korelowały ze wszystkimi badanymi związkami. Triklosan korelował istotnie statystycznie korelował ze wszystkimi badanymi związkami, oprócz propyl-parabenu (PP) ($p = 0,28$). Etyl-paraben (EP), metyl-paraben (MP), propyl-paraben (PP), izobutyl-paraben (iBuP) korelowały ze wszystkimi badanymi związkami oprócz niektórych z badanych metabolitów syntetycznych pyretroidów.

Ze względu na to, że drugie badanie moczu przeprowadzono wśród mniejsza liczby kobiet ($N = 120$) korelacje między badanymi związkami wyglądały inaczej niż w badaniu I. W mniejszej liczbie przypadków badane związki były ze sobą skorelowane. Trzy z metabolitów syntetycznych pyretroidów (CDCCA, TDCCA i 3-PBA) korelowały ze sobą na poziomie istotności $p < 0,001$. Metabolit DBCA nie korelował w sposób istotny z CDCCA i TDCCA, natomiast korelował z 3-PBA. Wynikało to z faktu, że był on wykryty jedynie w 30% badanych próbek.

3-PBA istotnie korelował z MP, PP, BP, TCL i BPA. Badane parabeny (EP, PP, MP, BP) również korelowały ze sobą, a nie odnotowano istotnie statystycznej korelacji między EP i BP oraz PP i BP. Nie zaobserwowano również korelacji pomiędzy MP i EP a bisfenolem A i pomiędzy wszystkimi badanymi parabenami a triklosanem.

Stężenia parabenów (MP, EP, PP) i triklosanu korelowały ze sobą w dwóch próbkach moczu. Natomiast w przypadku bisfenolu A, metabolitów syntetycznych pyretroidów i butyl parabenu stężenia w I i II próbie różniły się.

Ocena zależności między narażeniem na wybrane czynniki środowiskowe, a rezerwą jajnikową badanych kobiet

Gdy analizowano zmienne narażenia, jako zmienne ciągłe wykazano, że stężenie parabenu propylowego i butylowego wpływało na obniżenie liczby pęcherzyków

antralnych ($p=0,028$ i $p=0,04$ odpowiednio). Również narażenie na bisfenol A wpływało negatywnie na liczbę pęcherzyków antralnych ($p=0,03$). Nie wykazano związku między narażeniem na inne badane parabeny (etylowy, metylowy, izbutylowy), triklosan i syntetyczne pyretroidy a liczbą pęcherzyków antralnych. Stężenie bisfenolu A w moczu obniżało stężenie hormonu AMH ($p=0,02$). Narażenie na propyl-paraben wpływało pozytywnie na stężenie hormonu FSH ($p=0,03$) i negatywnie na stężenie estradiolu ($p=0,048$). Również etyl paraben obniżał stężenie estradiolu ($p=0,01$).

Stężenie badanych metabolitów syntetycznych pyretroidów (CDCCA, TDCCA, DBCA, 3-PBA) nie wpływało w sposób istotny statystycznie na stężenie żadnego z badanych hormonów (AMH, FSH, estradiol). Również narażenie na metyl, butyl, izobutyl-paraben i triklosan nie wiązało się istotnie ze stężeniem badanych hormonów.

Przy kontroli potencjalnych czynników zakłócających (wiek, BMI i palenie) narażenie na propyl-paraben i bisfenol A zmniejszało liczbę pęcherzyków antralnych ($p=0,04$ i $p=0,03$ odpowiednio). Analizując stężenie badanych hormonów to ekspozycja na bisfenol A wpływała negatywnie na stężenie AMH ($p=0,02$), ekspozycja na propyl-paraben zwiększała stężenie FSH ($p=0,028$) i wpływała na obniżenie stężenia estradiolu ($p=0,04$). Nie wykazano związku między narażeniem na inne badane parabeny (metylowy, etylowy, butylowy i izbutylowy), triklosan i syntetyczne pyretroidy a liczbą pęcherzyków antralnych i stężeniem badanych hormonów.

Wykazano, że stężenie parabenu propylowego w moczu w drugim i trzecim percentylu ((25-50] i (50-75] percentyl) wpływało na zmniejszenie liczby pęcherzyków antralnych ($p=0,03$ i $p=0,03$ odpowiednio). Również stężenie bisfenolu A i parabenu butylowego w trzecim i czwartym kwartylu ((50-75] i >75 percentyl) zmniejszało liczbę pęcherzyków antralnych ($p=0,04$, $p=0,04$ i $p=0,028$, $p=0,03$ odpowiednio). Stężenie bisfenolu A w czwartym kwartylu wpływało negatywnie na stężenie AMH ($p=0,04$),

a stężenie propyl-parabenu w drugim i trzecim percentylu zwiększało stężenie FSH ($p=0,03$ i $p=0,04$ odpowiednio). W przypadku estradiolu zaobserwowano obniżenie stężenia tego hormonu w drugim i trzecim percentylu narażenia w przypadku parabenu etylowego ($p=0,031$ i $p=0,026$) oraz w drugim kwartylu narażenia w przypadku parabenu propylowego ($p=0,049$). Nie wykazano związku między narażeniem na inne badane parabeny (metylowy, butylowy i izobutylowy), triklosan i syntetyczne pyretroidy w drugim, trzecim i czwartym kwartylu narażenia a liczbą pęcherzyków antralnych i stężeniem badanych hormonów.

Kiedy kontrolowano model o potencjalne czynniki zakłócające: wiek, palenie, BMI narażenie na paraben propylowy w trzecim kwartylu ((50-75] percentyl) wpływał na zmniejszenie liczby pęcherzyków antralnych ($p=0,048$) i obniżenie stężenia estradiolu ($p=0,03$) oraz zwiększał stężenie FSH ($p=0,026$). Również ekspozycja na bisfenol A w czwartym kwartylu (>75 percentyl) zmniejszała liczbę pęcherzyków antralnych ($p=0,028$) i zmniejszała stężenie AMH ($p=0,03$).

Nie wykazano istotnie statystycznej zależności pomiędzy narażeniem na parabeny (metylowy, etylowy, butylowy, izobutylowy), triklosan i badane metabolity syntetycznych pyretroidów (CDCCA, TDCCA, DBCA i 3-PBA) a badanymi parametrami rezerwy jajnikowej: liczbą pęcherzyków antralnych, stężeniami hormonów: AMH, FSH, estradiol.

Wnioski

1. Wyniki przeprowadzonego badania wykazały, że osoby uczestniczące w badaniu były środowiskowo ekspozowane na badane czynniki środowiskowe zaburzające funkcję endokrynną: parabeny, syntetyczne pyretroidy, bisfenol A i triklosan na co wskazują pomiary narażenia za pomocą metod monitoringu biologicznego.
2. Narażenie na parabeny i bisfenol A wpływało negatywnie na parametry rezerwy jajnikowej. Narażenie na propyl-paraben i bisfenol A zmniejszało liczbę pęcherzyków antralnych. Analizując stężenie badanych hormonów to ekspozycja na bisfenol A wpływała negatywnie na stężenie AMH, ekspozycja na propyl-paraben zwiększała stężenie FSH i obniżała stężenia estradiolu.
3. Nie wykazano związku między narażeniem na inne parabeny (metylowy, etylowy, butylowy i izobutylowy), triklosan i syntetyczne pyretroidy a liczbą pęcherzyków antralnych i stężeniem badanych hormonów.
4. Kobiety w wieku rozrodczym powinny być wszechstronnie informowane za pomocą przekazów medialnych o wpływie powszechnie występujących czynników środowiskowych zwłaszcza zaburzających funkcję endokrynną na rezerwę jajnikową zwłaszcza bisfenolu A i propyl-parabenu.
5. Kobiety planujące ciążę oraz ciężarne powinny otrzymać informacje od prowadzących ich lekarzy o zasadności ograniczenia kontaktu z tymi substancjami oraz wykaz produktów, w jakich mogą się one zawierać.

12. SUMMARY

Exposure to environmental endocrine disrupting chemicals and female ovarian reserve.

Introduction

At the beginning of the 21st century in many developed countries the number of couples seeking for infertility treatment has increased dramatically, approximately 15% of couples in the United States and other developed countries are infertile (Fritzi and Speroff, 2011), while in the 1960s it concerned 7-8% of couples. The World Health Organization defines infertility as a social disease. The definition of infertility was widely accepted as a lack of pregnancy despite regular sexual intercourse (minimum 3 during the week), maintained for over 12 months without using any contraceptive methods. This is influenced by many factors, such as the impact of lifestyle and late decision about procreation, but also increasingly often postulated impact of environmental factors such as exposure to modern civilization threats such as environmental endocrine disrupting chemicals (EDCs). The dramatic increase of the number of infertile couples caused that reproductive health, especially the impact of EDCs, became an important public health issue. Numerous studies indicate that the exposure to environmental contaminants called endocrine disruptors (EDCs) is widespread and may negatively affect animal and human reproductive health. Exposure to EDCs has been linked to several diseases including infertility (Colborn et al., 1993).

Increased global industrial activity has exposed humans to a wide variety of modern chemical substances like: phthalates, parabens, bisphenol A, triclosan and many more. These compounds due to mass production are commonly found in the environment.

Exposure occurs through contact with these compounds in food, water, air, through contact with plastics or cosmetics. Those chemicals are found in a variety of products used daily like: plastic bottles, food cans, detergents, cosmetics, toys or pesticides. These compounds belong to a broad group called "Endocrine Disrupting Chemicals" (EDCs) in the English literature. They are compounds that have the ability to interact with the endocrine system disrupting its normal function, leading to impaired synthesis, function, storage and / or metabolism of hormones and can have an adverse effect on female and male fertility (Colborn et al., 1993) and play a role in the pathogenesis of infertility (Crain et al., 2008; Mendola et al., 2008).

The potential mechanism of the influence of endocrine disrupting chemicals (EDCs) on female fertility is related to their similarity to natural ligands that have the ability to bind to receptors: aryl hydrocarbons (AHR) and estrogen receptors (ER) that are involved in modulation of ovarian reserve. These compounds affect both the initial ovarian reserve established during fetal life and modulate ovarian reserve in adult life (Richardson et al., 2014).

Objective

The aim of the study is to assess the impact of environmental exposure to endocrine disrupting chemicals (parabens, bisphenol A, triclosan, synthetic pyrethroids) on ovarian reserve.

The specific objectives relate to:

- 1). Evaluation of female ovarian reserve by testing:
 - a). the number of antral follicles (AFC-antral follicle count) evaluated in accordance with recommendations (Broekmans et al., 2010);
 - b). concentration of AMH (Anti-Müllerian Hormone);

- c). hormone concentrations: FSH (Follicle Stimulating Hormone) and estradiol measured between 2-4 days of the cycle.
- 2). Assessment of exposure to environmental factors - assessment in urine (performed two times)
- a). parabens - (methyl, ethyl, propyl, buthyl, isobuthyl)
 - b). pyrethroids - selected pyrethroid metabolites (cis-DCCA (cis- (2,2-dichlorovinyl) -2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylic acid) (CDCCA), trans-DCCA (trans- (2,2-dichlorovinyl) -2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylic acid) (TDCCA), cis-DBCA (cis- (2,2-dibromovinyl) -2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylic), 3-PBA (3-phenoxybenzoic acid));
 - c). bisphenol A;
 - d). triclosan.
- 3). Assessment of lifestyle related factors (smoking, alcohol consumption, obesity, physical activity, diet, stress) and occupational exposure, which will be taken into account in the analysis as potential confounding factors.

Materials and Methods

Study population

To complete the adopted research goals, 511 women aged 24-39 were included in the study. The study involved women who attended to the infertility treatment clinic for the diagnosis and treatment of infertility (ie. the absence of pregnancy despite regular sexual intercourse (minimum 3 per week), maintained over 12 months without using any contraceptive methods) from December 2014 to June 2016 year. Only women with regular and ovulatory menstrual cycles were qualified for the research. Women who had

in the past three miscarriages, over three performed in vitro fertilization cycles, were excluded from the study. Exclusion criteria were conditions that may lead to iatrogenic or spontaneous reduction of ovarian reserve, such as previous surgical treatment of the ovaries, chemotherapy or pelvic radiotherapy, the presence of cysts in the ovaries including endometrial (excluding functional cysts), chronic diseases that could reduce ovarian reserve (e.g., adrenocortical insufficiency, abnormal karyotype, fragile X syndrome) and conditions leading to anovulatory cycles such as: polycystic ovary syndrome, premature ovarian insufficiency, hypogonadotropic hypogonadism, hyperprolactinemia. Women who agreed to participate in the study and signed the informed consent to participate in the study were asked to complete the questionnaire. Information obtained from the interview was included in the analysis as potential confounding factors.

The study obtained the consent of the Bioethics Committee operating at the Institute of Occupational Medicine in Lodz - Resolution No. 23/2014 of 04/11/2014.

Data obtained from the questionnaire

The interview included data on socio-demographic characteristics, lifestyle: smoking, alcohol consumption, diet (based on a questionnaire on the frequency of consumption of selected products - Food Frequency Questionnaire), physical activity (based on the Seven Day Physical Activity Recall questionnaire on physical activity in recent years 7 days to calculate energy expenditure (Metabolic Equivalent Task-MET)), stress (Cohen's stress questionnaire, questionnaire for Subjective Work Characteristics Questionnaire - occupational stress)), past diseases and other exposures occurring in the environment of residence or work (the questionnaire of exposures and professional work prepared at the Institute of Occupational Medicine in Łódź).

Based on anthropometric measurements, the Body Mass Index (BMI) and Waist-to-Hip Ratio (WHR) were calculated.

Anthropometric measurements

In order to assess the occurrence of obesity in the examined women, the following measurements were made: 1) body weight with an accuracy of 0.1 kg - using SECA electronic personal weight (model 8801321009, SECA UK Ltd, Birmingham, UK); 2) height, with an accuracy of 1 mm - using the stadiometer (Leicester Height Measure, SECA UK Ltd), 3) waist and hip circumference, with an accuracy of 1 mm – using a measuring tape.

Biological material was collected from the study subjects: blood and urine. Urine was collected twice (from 3 to 6 months apart) to verify the exposure to nonpersistent environmental compounds.

Ovarian reserve assessment

Ovarian reserve was evaluated using:

- 1). the number of antral follicles (AFC - Antral Follicle Count),
- 2). hormone concentration:
 - a). AMH (Anti-Müllerian Hormone);
 - b). FSH (Follicle-Stimulating Hormone) (performed between day 2 and day 4 of the cycle);
 - c). Estradiol (performed between day 2 and day 4 of the cycle).

The study of the amount of antral follicles was carried out in accordance with the recommendations (Broekmans et al. 2010). The tests were carried out

only by certified doctors in the field of ultrasound examination in gynecology, trained in the assessment of AFC. All studies were performed at the beginning of follicular phase, between 2-4 days of the cycle. Performing the assessment of the number of antral follicles in the early follicular phase is recommended to reduce AFC fluctuation in the cycle resulting from the presence of a cyst or a corpus luteum. Follicles with dimensions of 2 to 10 mm were considered for the assessment.

Concentration of AMH in serum was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recommended by manufacturer commercial kits (The AMH Gen II ELISA kit and The Inhibin B Gen II ELISA kit; Beckman Coulter, Inc., USA).

The concentrations of FSH and estradiol in the blood serum were evaluated by chemiluminescence immunoassay using commercial sets for the VITROS Eci system according to manufacturer's instructions (Ortho-Clinical Diagnostics Johnson & Johnson, UK).

Clinical part of the study (evaluation of ovarian reserve and performance of hormone levels tests) and the assessment of the clinical status of the recruited patients were carried out in the infertility treatment clinic or in cooperating units.

Evaluation of exposure to environmental factors

Two urine samples were used to evaluate environmental chemicals concentration such as:

- 1). metabolites of synthetic pyrethroids: cis-DCCA (cis- (2,2-dichlorovinyl) -2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylic acid (CDCCA), trans-DCCA (trans- (2,2-dichlorovinyl) -2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylic acid (TDCCA), cis-DBCA (cis- (2,2-dibromovinyl) -2, 2-dimethylcyclopropane-1-carboxylic acid) (DBCA), 3-PBA (3-phenoxybenzoic acid));

- 2). total concentration of parabens metabolites (sum of free and combined with glucuronic acid parabens: methyl (MP), ethyl (EP), propyl (PP) and buthyl (BP) and isobuthyl (iBuP) parabens);
- 3). bisphenol A (BPA);
- 4). triclosan (TCL).

Isolation of the analytes from the matrix was carried out using semi-automatic micro-extraction to the solid phase (Micro-Extraction by Packed Syringe - MEPS), the extracts were converted into a derivatives and analysed using gas chromatography with tandem mass spectrometry (GC-MS / MS).

Analytical methods have been subjected to internal quality control (use of reference materials) and external laboratory control through participation in international quality control programs (G-EQUAS-The German External Quality Assessment Scheme for Analyzes in Biological Materials).

Environmental factors have been identified in the Department of Toxicology, Medical University of Gdansk.

Confounding factors and statistical analysis

In the analysis of the impact of the selected environmental compounds on the parameters of the ovarian reserve of women in accordance with the adopted research objectives, a number of confounding factors were taken into account. These factors were selected based on the literature and analyzes based on the study. The statistical analysis was performed using the statistical package R. The first stage of the analysis was the identification of interfering factors. The next stage included linear or logistic regression. The final multifactor model included confounding factors and all relevant factors in a one-

factor model at the significance level of 0.1. Exposure is presented as a continuous variable as well as in the relevant subgroups that characterize exposure quartiles.

Results

Study population

In the study 511 patients of the infertility treatment clinic were recruited and agreed to participate in the study. Most of the recruited women had higher education (75%) and secondary education (21%). People with vocational education accounted for around 4% of the respondents. The average age of the surveyed women was 33 years, 93% of them were married, 92% were professionally active, only 8% reported to be unemployed. Analyzing the infertility period of the examined couples referring to the clinic, it was found that the duration of infertility was in most of the cases 3-5 years (29.55%) and above 5 years (35.23%). 81% of the surveyed women consumed coffee, most often every day (70.67%). History illness concerned a small number of women surveyed and were not related to partner infertility. Only 15% of respondents declared one of the diseases mentioned in the questionnaire (diabetes, hypertension, heart defects, epilepsy). Only 15% of respondents declared one of the diseases mentioned in the questionnaire (diabetes, hypertension, heart defects, epilepsy). Most of the examined women had normal body weight (59%, BMI 18.5-24.9 kg / m²) and were no cigarette smokers (92.17%). The examined women were physically active, 68% of respondents declared some kind of physical activity. 81% of the surveyed women consumed coffee, most often every day (70.67%). Occupational stress measured by the Subjective Work Characteristics Questionnaire was moderate (mean= 95). The level of life stress as measured by the Perceived Stress Scale was also medium - 22 points.

Evaluation of the ovarian reserve

The number of antral follicles in the examined women was 12.73 ± 8.94 and it was within the normal range, because <4 follicles is associated with a significant reduction in the chance of pregnancy and that ovarian response to ovulation stimulation will be not satisfactory (Radwan and Wołczyński, 2011). The concentration of AMH was 1.17 ± 1.46 ng / ml and was slightly higher than the norm range. In the case of FSH and estradiol the mean concentration was 6.38 ± 2.18 mIU /ml and 93.74 ± 16.63 respectively and within the norms for these hormones.

The concentration of selected environmental chemicals

The results of the study showed that participants of the study were exposed to the environmental factors that interfere with the endocrine function: parabens, synthetic pyrethroids, bisphenol A and triclosan. The mean concentration of parabens in the urine of the subjects in the first sample was: buthyl 4.70 ± 2.96 ng / ml, ethyl 11.2 ± 7.0 ng / ml, methyl 92.68 ± 4.28 ng / ml, propyl 16.20 ± 6.33 ng / ml and isobuthyl 3.16 ± 2.55 ng / ml and was similar to the level of parabens in other studies among both women attending the infertility treatment clinic for diagnostic purposes as well as women from the general population. In the case of synthetic pyrethroid metabolites, the geometric mean \pm SD was: CDCCA 0.22 ± 2.40 ng / ml TDCCA 0.50 ± 2.62 ng / ml, DBCA 0.26 ± 2.42 ng / ml, 3-PBA 0.31 ± 2.60 ng / ml. The mean concentration of triclosan and bisphenol A was 2.78 ± 7.17 ng / ml, 1.38 ± 2.34 ng / ml, respectively.

In the second urine sample, the concentrations of the tested compounds (geometric mean \pm SD) in the case of synthetic metabolites of pyrethroids were: CDCCA 0.23 ± 0.30 ng / ml, TDCCA 0.27 ± 0.33 ng / ml, DBCA $0.30 \pm 0, 90$ ng / ml, 3-PBA 0.25 ± 0.33 ng / ml. The concentration of parabens (geometric mean \pm SD) were:

buthylparaben 3.99 ± 9.90 ng / ml, ethylparaben 5.71 ± 44.97 ng / ml, methylparaben 49.13 ± 105.39 ng / ml, propylparaben 9.14 ± 38.58 ng / ml. IBuP paraben was not detected in the second urine sample. The concentration of triclosan and bisphenol A in the second urine sample was 1.67 ± 30.34 ng / ml and 1.27 ± 1.71 ng / ml, respectively.

Correlations between the studied environmental chemicals

In the first urine sample, the tested chemicals strongly correlated with each other. A statistically significant correlation was observed between the synthetic pyrethroid metabolites: CDCCA, TDCCA, DBCA, 3-PBA ($p < 0.001$). Bisphenol A (BPA) and buthylparaben (BP) significantly statistically correlated with all tested compounds. Triclosan correlated significantly statistically correlated with all tested compounds, except propylparaben (PP) ($p = 0.28$). Ethylparaben (EP), methylparaben (MP), propylparaben (PP), isobuthylparaben (iBuP) correlated with all tested compounds except some of the synthetic pyrethroid metabolites.

Due to the fact that the second urine test was conducted among a smaller number of women ($N = 120$), the correlations between the tested compounds looked different than in the first analysis. The tested compounds were correlated in a smaller number of cases. Three of the synthetic pyrethroid metabolites (CDCCA, TDCCA and 3-PBA) correlated with each other at the significance level of $p < 0.001$. In contrast, the DBCA metabolite did not significantly correlate with CDCCA and TDCCA, but correlated with 3-PBA. This was due to the fact that it was only detected in 30% of the samples tested. 3-PBA significantly correlated with MP, PP, BP, TCL and BPA. The studied parabens (EP, PP, MP, BP) also correlated with each other, and no statistically significant correlation was found between EP and BP and PP and BP. Additionally no correlations were observed between MP and BP and BPA and all evaluated parabens and triclosan.

The concentrations of parabens (MP, EP, PP) and triclosan correlated with each other in two urine samples. However, in the case of bisphenol A, synthetic metabolites of pyrethroids and buthyl paraben the concentrations in the I and II samples were different.

The association between exposure to selected environmental chemicals and ovarian reserve

When the exposure variable were analyzed as continuous variables, it was shown that the concentration of propyl and buthylparaben resulted in a decrease in the number of antral follicles ($p=0.028$ and $p=0.04$ respectively). Also, exposure to bisphenol A had a negative effect on the number of antral follicles ($p=0.03$). There was no relationship between exposure to other parabens tested (ethylparaben, methylparaben, isobuthylparaben), triclosan and synthetic pyrethroids and the number of antral follicles. The concentration of bisphenol A in the urine correlated with the decreased concentration of the AMH ($p=0.02$). Exposure to propylparaben correlated positively with the concentration of FSH ($p=0.03$) and negatively with estradiol ($p=0.048$). Also, ethylparaben reduced the estradiol concentration ($p=0.01$).

The concentration of the synthetic pyrethroid metabolites (CDCCA, TDCCA, DBCA, 3-PBA) did not significantly influence the concentration of any of the hormones tested (AMH, FSH, estradiol). Also, exposure to methylparaben, buthylparaben, isobuthylparaben and triclosan was not significantly related to the concentration of hormones tested.

When the model was controlled for potential confounders (age, BMI and smoking) exposure to propylparaben and bisphenol A decreased the antral follicles count ($p=0.04$ and $p=0.03$ respectively). Regarding the concentration of tested hormones, exposure to bisphenol A had a negative effect on the concentration of AMH ($p=0.02$), exposure

to propylparaben increased FSH ($p=0.028$) and decreased the estradiol concentration ($p=0.04$). There was no relationship between exposure to other parabens tested (methylparaben, ethylparaben, buthylparaben and isobuthylparaben), triclosan and synthetic pyrethroids, and the antral follicles count of and the concentration of hormones tested.

It was observed that the concentration of propylparaben in the urine in the second and third percentile ((25-50] and (50-75] percentile) decreased the number of antral follicles ($p = 0.03$ and $p = 0.03$ respectively). Also the concentration of bisphenol A and buthylparaben in the third and fourth quartiles ((50-75] and > 75 th percentile) decreased the antral follicles count ($p=0.04$, $p=0.04$ and $p=0.028$, $p=0.03$ respectively). Concentration of bisphenol A in the fourth quartile negatively affected the concentration of AMH ($p=0.04$) and the concentration of propylparaben in the second and third quartiles increased the FSH concentration ($p=0.03$ and $p=0.04$ respectively).

In the case of estradiol, there was a decrease in the concentration of this hormone in the second and third quartiles of ethylparaben exposure ($p=0.031$ and $p=0.026$) and in the second quartile of propylparaben exposure ($p=0.049$). There was no relationship between the antral follicles count and the concentration of analyzed hormones and exposure to other tested parabens (methyl, butyl and isobutyl), triclosan or synthetic pyrethroids in the second, third or fourth quartile of exposure.

When the model was adjusted for potential confounding factors such as age, smoking, BMI, exposure to propylparaben in the third quartile ((50-75] percentile) resulted in the reduction of the antral follicles count ($p=0.048$), decreased estradiol concentration ($p=0.03$) and increased FSH concentration ($p=0.026$). Also exposure to bisphenol A in the fourth quartile (> 75 th percentile) decreased the number of antral follicles ($p = 0.028$) and decreased the AMH concentration ($p = 0.03$).

There was no statistically significant relationship between the exposure to parabens: methyl, ethyl, butyl, isobutyl, triclosan and tested synthetic pyrethroid metabolites (CDCCA, TDCCA, DBCA and 3-PBA) and the analysed parameters of ovarian reserve: antral follicles count and hormone concentrations: AMH, FSH, estradiol.

Conclusions

1. The results of the study showed that women participating in the study were environmentally exposed to the examined endocrine disrupting chemicals: parabens, synthetic pyrethroids, bisphenol A and triclosan confirmed by the results of exposure measurements using biological monitoring methods.
2. Exposure to parabens and bisphenol A negatively influenced ovarian reserve parameters. Exposure to propylparaben and bisphenol A reduced the number of antral follicles. Regarding the concentration of tested hormones, bisphenol A exposure negatively affected AMH concentration, propylparaben exposure increased FSH concentration and decreased estradiol concentrations.
3. There was no relationship between exposure to other paraben (methyl, ethyl, buthyl and isobuthyl), triclosan or synthetic pyrethroids and the antral follicles count and the concentration of hormones tested.
4. Women in reproductive age should be comprehensively informed through the mass media about the influence of exposure to common environmental chemicals, especially those disrupting endocrine functions and the ovarian reserve, particularly bisphenol A and propylparaben.
5. Women planning pregnancy and pregnant should receive information from their physicians about justified contact restrictions with these chemicals and information in which products contain them.

13. Załączniki

Instytut Medycyny Pracy w Łodzi

Informacje dla osób objętych badaniem „Wpływ stresu i czynników środowiskowych na płodność”

Szanowna Pani,

Jest Pani w trakcie leczenia metodą pozaustrojowego zapłodnienia (IVF). Pomimo tego, że jest to najskuteczniejsza procedura leczenia niepłodności średnia szansa na ciążę to około 30% w przeliczeniu na pobranie komórek jajowych. Największy wpływ na wynik leczenia ma jakość komórek rozrodczych (komórek jajowych i plemników). We wcześniejszych badaniach prowadzonych przez nasz zespół wykryliśmy zależności między innymi pomiędzy stylem życia, narażeniem na czynniki środowiskowe, stresem a jakością nasienia.

Nieodłączną częścią leczenia metodą IVF jest szczegółowa analiza komórek jajowych oraz zarodków. Daje to nam możliwość porównania tych danych z wynikami analiz oceniających Pani narażenie na szkodliwe czynniki środowiskowe oraz na stres. Czynniki te ocenimy z próbki pobranego moczu, niewielkiej ilości krwi oraz ankiety.

Uciążliwości dla Pani będą niewielkie. Nie będzie konieczna żadna dodatkowa interwencja medyczna ani dodatkowy czas spędzony u nas. Uciążliwości te polegają na:

- pozostawieniu w Gamecie próbki moczu,
- przekazania około 1-1.5 ml krwi (podczas rutynowego pobrania na badania hormonalne),
- wypełnieniu ankiety (około 20 min) podczas rutynowej wizyty. Ankietę będzie Pani mogła wypełnić na dowolnej wizycie (np. pomiędzy oddaniem krwi a wizytą lekarską oceniającą wyniki stymulacji owulacji),
- ewentualnego kontaktu telefonicznego przez członka naszego zespołu (kontakt telefoniczny jest często standardową procedurą podczas i ewentualnie po zakończeniu leczenia)

Wszystkie uzyskane dane są poufne z zachowaniem zasad określonych w ustawie o ochronie danych osobowych tj. nie będą nikomu udostępniane, posłużą jedynie do anonimowych analiz zbiorczych. Raport z badania, będzie miał charakter publikacji naukowej niepozwalającej na identyfikację osób biorących udział w badaniu. Niestety w związku z tym nie będziemy mogli przedstawić Pani własnego wyniku badania. Mamy nadzieję, że uzyskane wyniki analiz pozwolą na poprawę wyników leczenia niepłodności w przyszłości.

Dziękujemy i życzymy powodzenia

Instytut Medycyny Pracy w Łodzi

Imię i Nazwisko Nr nadany badanej osobie

Formularz świadomej zgody

Wyrażam dobrowolną chęć uczestnictwa w badaniach medycznych prowadzonych przez Szpital Gameta oraz Instytut Medycyny Pracy w Łodzi w ramach projektu oceniającego wpływ czynników środowiskowych na płodność.

Oświadczam, że zostałam poinformowana o celu, znaczeniu i zakresie prowadzonych badań. Wiadomo mi, że w proponowanym projekcie zostanie zachowana anonimowość oraz poufność wszystkich danych, dostęp do nich będą miały jedynie osoby prowadzące badanie. Zostałam poinformowana, że w każdej chwili mogę cofnąć zgodę na udział w badaniu bez podania przyczyny, jednakże po ich zakończeniu zezwalam na zbiorcze publikowanie uzyskanych wyników, bez ujawniania moich danych personalnych.

Wyrażam zgodę na udział w badaniu w zakresie:

- przeprowadzenia wywiadu**
- pobrania próbki moczu**
- pobrania próbki krwi**
- kontaktu telefonicznego**

Wyrażam zgodę na przetwarzanie moich danych osobowych dla potrzeb w/w. badania zgodnie z Ustawą o Ochronie Danych Osobowych (Dz. U. Nr 123, poz. 883 z późn. zm.) . Składając poniżej swój podpis stwierdzam, że zapoznałam się z formularzem, rozumiem jego treść i wyrażam zgodę na udział w badaniu.

data

Imię i Nazwisko Uczestnika

podpis

data

Imię i Nazwisko Osoby Prowadzącej Badanie

podpis

Wpływ czynników środowiskowych na płodność
2014

--	--	--	--	--	--	--

Ankieta

Dane poufne - wyłącznie do celów badawczych

Łódź 2014

Poniższa ankieta została zaprojektowana wspólnie z Pracownią Środowiskowych Zagrożeń Reprodukcyjne Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi – jednostką naukową wyspecjalizowaną w prowadzeniu badań nad wpływem szkodliwych czynników środowiskowych na płodność.

Prosimy Panią o wypełnienie ankiety. Odpowiedzi, które Pani udzieli są niezbędne do realizacji naszego badania: „Wpływ czynników środowiskowych na płodność”.

Ankieta składa się z kilku części. Odpowiedzi będą analizowane wspólnie z wynikami badań laboratoryjnych i embriologicznych. Dzięki temu uda nam się udzielić odpowiedzi na pytania o wpływ na płodność:

- czynników środowiskowych (np. miejsca zamieszkania - ekspozycja na ołów, kadm i policykliczne węglowodory aromatyczne),
- stylu życia (np. diety, spożycia alkoholu, palenia czynnego i biernego),
- poziomu stresu,
- pracy zawodowej,
- indywidualnej wrażliwości na narażenie i działanie czynników zewnętrznych.

Dziękujemy bardzo za szczegółowe wypełnienie ankiety.

- a). Podstawowa
- b). Gimnazjum
- c). Zasadnicza zawodowa
- d). Średnia
- e). Policealna
- f). Wyższa (licencjat)
- g). Wyższa magisterska
- h). Inna

10. Czas trwania niepłodności

- a). 1 – 2 lat
- b). 2 – 3 lata
- c). 3 – 5 lat
- d). > 5 lat

11. Sytuacja zawodowa

Uczennica lub studentka	TAK	NIE
Pracuję zawodowo	TAK	NIE
Nie pracuję zawodowo	TAK	NIE
Bezrobotna (poszukująca pracy)	TAK	NIE
Rencistka	TAK	NIE
Inna / jaka?		

12. Pani masa ciałakg

13. Jaki jest Pani wzrost? cm

14. Czy chorowała Pani lub choruje na następujące choroby?

Przebyte choroby	Odpowiedzi	
	TAK	NIE
Cukrzyca		
Nadciśnienie tętnicze		
Wady serca		
Choroby nerek przebiegające z białkomoczem		
Padaczka		
Nowotwory		
Ostre lub przewlekłe choroby zakaźne (np. WZW – żółtaczkę typu B lub C) jakie?.....		
Inne		

15. Proszę określić sposób ogrzewania mieszkania

- a). Miejskie
- b). Olejowe

- c). Gazowe
 - d). Węglowe
 - e). Inne jakie?.....
16. Proszę określić rodzaj kuchni stosowanej do przygotowywania posiłków
- a). Węglowa
 - b). Gazowa
 - c). Elektryczna
17. Czy w Pani domu w czasie ostatnich 3 lat był przeprowadzany remont (wymiana mebli, wykładzin podłogowych na nowe)?
- a) TAK b) NIE
- Jeżeli tak to kiedy?
- Nowe wyposażenie (wykładziny, meble, inne jakie?).....
18. Czy w ostatnich trzech latach miała Pani styczność z farbami lub rozpuszczalnikami np.
- w związku z malowaniem mieszkania?
- a) TAK b) NIE
- jakimi?..... kto wykonywał malowanie.....
19. Jak Pani ocenia sytuację materialną gospodarstwa domowego, w którym Pani żyje?
- a). Pieniądzy wystarcza swobodnie na bieżące wydatki i można sporo odłożyć
 - b). Pieniądzy wystarcza na bieżące wydatki, ale niewiele można odłożyć
 - c). Pieniądzy z trudem wystarcza na bieżące wydatki, a o ich odłożeniu nie ma mowy
 - d). Pieniądzy nie wystarcza nawet na bieżące wydatki
20. Czy często spożywa Pani żywność zakupioną w supermarkecie w postaci
- a). półproduktów lub produktów pakowanych próżniowo
 - b). gotowych produktów lub półproduktów pakowanych w folię
 - c). mrożonek
 - d). gotowych produktów pakowanych w puszki

- e). nie spożywam
21. Czy często kupuje Pani napoje w plastikowych butelkach (soki, woda mineralna, mleko)?
- a). TAK ile?..... b). NIE
22. Czy często kupuje Pani napoje w puszkach (napoje gazowane, piwo)
- a). TAK ile?..... b). NIE
23. Czy jest Pani wegetarianką lub stosuje inną specjalną dietę?
- a). TAKjaką? b). NIE
24. Czy pije Pani kawę?
- a). NIE piję b). TAK Piję
- Ilość kawy tygodniowo.....dziennie;
25. Czy pije Pani napoje energetyzujące (np. Red Bull, Tiger, Monster itp.)
- a). TAK jeśli TAK to ile?..... b). NIE
26. Czy kiedykolwiek paliła Pani papierosy?
- a). NIE (przejdź do pyt. 28)
- b). TAK liczba wypalanych papierosówdziennie
27. Czy obecnie pali Pani papierosy?
- a). TAK Liczba wypalanych papierosów w ciągu dnia.....
- b). NIE Kiedy zaprzestała Pani palenia.....
28. Czy Pani mąż (*partner*) pali papierosy?
- a). NIE b). TAK
29. Czy zdarzało się, że przebywała Pani w pomieszczeniu, w którym ktoś palił papierosy?
- a). NIE b). TAK

<i>(Proszę w poniższej tabeli opisać ile osób paliło w Pani obecności i przez ile godzin dziennie)</i> Narażenie na dym tytoniowy	Liczba osób palących w Pani obecności	Liczba godzin dziennie
W domu		
W pracy		
Inna sytuacja.....		

30. Czy jest Pani aktywna fizycznie (np. gimnastykuje się, spaceruje, jeździ na rowerze, pływa)

a). NIE (przejdź do pyt. 32) b). TAK

Rodzaj aktywności fizycznej

31. Czas poświęcony na aktywność fizyczną (liczba godzin tygodniowo łącznie na wszystkie formy aktywności fizycznej wymienione w pyt. 30)

.....

32. Czy Pani pracuje zawodowo

a) TAK

b) NIE (przejdź do pyt. 39)

33. Na czym polega Pani praca? Na jakim stanowisku Pani pracuje ? (proszę opisać wykonywane czynności)

.....

34. Jaki jest wymiar czasu pracy?

dziennygodz. b) tygodniowygodz.

35. W jakim systemie zmianowym Pani pracuje?

a). Zawsze w dzień

b). Zawsze w nocy

c). Praca zmianowa bez nocnej zmiany

d). Praca zmianowa z nocną zmianą

e). Inny – jaki?

36. Proszę określić, jaką pozycję ciała Pani utrzymywała lub utrzymuje podczas pracy i jak długo podczas dnia pracy? (proszę podać czas z dokładnością do ½ godziny, jeżeli Pani nie pracowała w takiej pozycji proszę wpisać „0”; uwaga - suma czasu przebywania w wyróżnionych pozycjach - to ogólny czas pracy, wpisać w ostatnią kolumnę)

Jak długo w ciągu dnia pracy przyjmuje Pani następujące pozycje				Razem: ogólny czas pracy
Siedząca	W kucki, na kolanach, w przysiadzie	Stojąca	Chodzenie	

37. Czy podczas pracy korzysta lub korzystała Pani z monitora ekranowego, komputera?

- a). Czasami (nie codziennie)
- b). Często (codziennie, lecz mniej niż 50% czasu pracy)
- c). Bardzo często (ponad 50% czasu pracy)
- d). Prawie przez cały czas pracy
- e). Nie

38. Czy podczas pracy, którą Pani wykonuje lub wykonywała ma/miała Pani kontakt z następującymi substancjami?

Czynniki	Odpowiedzi	
	TAK	NIE
gazy stosowane do narkozy		
rozpuszczalniki		
substancje dezynfekcyjne		
promieniowanie jonizujące		
promienie X		
pole elektromagnetyczne (urządzenia i maszyny zasilane prądem elektrycznym, telefon komórkowy, kuchenka mikrofalowa, lampa kvarcowa) - proszę podać źródła ekspozycji)		
leki przeciwnowotworowe		
środki ochrony roślin		
nawozy sztuczne		
metale ciężkie (rtęć, ołów, kadm)		
barwniki, farby, lakiery		
substancje biologiczne (krew, mocz)		
PCV (produkcja, sprzedaż, układanie wykładzin podłogowych, PCV, lub inne)		
Wysokie temperatury		
Wibracje		
Hałas		
gazy stosowane do narkozy		
rozpuszczalniki		
substancje dezynfekcyjne		
promieniowanie jonizujące		
promienie X		
pole elektromagnetyczne (urządzenia i maszyny zasilane prądem elektrycznym, telefon komórkowy, kuchenka mikrofalowa, lampa		

<i>kvarcowa)</i> <i>- proszę podać źródła ekspozycji)</i>		
leki przeciwnowotworowe		
środki ochrony roślin		
nawozy sztuczne		
metale ciężkie (rtęć, ołów, kadm)		
barwniki, farby, lakiery		
substancje biologiczne (krew, mocz)		
PCV (produkcja, sprzedaż, układanie wykładzin podłogowych, PCV, lub inne)		
Wysokie temperatury		
Wibracje		
Hałas		
Podnoszenie lub przenoszenie ciężarów do 5 kg		
Podnoszenie lub przenoszenie ciężarów > 5 kg		

39. Czy używa Pani telefonu komórkowego?

a). TAK

b). NIE (przejdź do pyt. 44)

40. Ile przeciętnie czasu dziennie poświęca Pani na rozmowy przez telefon komórkowy?

..... czas w minutach

41. Gdzie nosi Pani telefon komórkowy?

.....

42. Ile czasu przeciętnie w ciągu dnia nosi Pan telefon komórkowy przy sobie

.....

43. Od jak dawna używa Pani telefonu komórkowego? (lata)

44. Czy prowadzi Pani samochód?

a). TAK

b). NIE

45. Ile czasu dziennie prowadzi Pani samochód?

..... minut dziennie

46. Czy w mieszkaniu stale przebywają zwierzęta domowe (kot, pies)?

a). TAK jakie? b). NIE

47. Czy w ciągu ostatniego roku stosowano środki owadobójcze (przeciw pchłom, kleszczom typu obroża, płyn, spray) u zwierząt domowych?

a). TAK jakie? b). NIE

48. Czy w pomieszczeniach mieszkalnych w ciągu ostatnich 6 miesięcy stosowano środki owadobójcze (przeciw komarom, muchom, karaluchom, molom) lub preparaty do zwalczania roztoczy?

a). TAK jakie? b). NIE

Proszę jeszcze raz sprawdzić, czy na wszystkie pytania udzielono odpowiedzi.

Dane o osobie zbierającej wywiad

Imię i nazwisko	Telefon

Serdecznie dziękujemy Pani za udział w badaniu

KWESTIONARIUSZ DO SUBIEKTYWNEJ OCENY PRACY

--	--	--	--	--	--	--	--

.....

imię i nazwisko

Poniżej znajdują się opisy wymagań i cech pracy, które mogą być mniej lub bardziej typowe dla Pani stanowiska pracy. Proszę je przeczytać i po zastanowieniu odpowiedzieć, czy dana cecha występuje na Pani stanowisku. Jeśli tak, proszę ocenić, w jakim stopniu cecha ta przeszkadza w pracy, denerwuje, stanowi źródło irytacji i stresu. Odpowiedzi proszę udzielać obrysowując kółkiem odpowiednią cyfrę obok opisu zgodnie z przedstawionymi poniżej możliwościami. W przypadku pomyłki lub chęci zmiany odpowiedzi, proszę przekreślić kółko na krzyż i zakreślić nowe.

Kategorie odpowiedzi:

- 1 - cecha nie występuje, nie dotyczy mojego stanowiska pracy;
- 2 - cecha występuje, ale mi nie przeszkadza i nie denerwuje;
- 3 - czasami mnie to irytuje lub przeszkadza;
- 4 - dość często mnie to irytuje lub przeszkadza;
- 5 - irytuje mnie to cały czas w pracy, a nawet denerwuję się z tego powodu w domu.

1 - Moja praca wymaga czujności, tj. gotowości do szybkiego reagowania na ważny sygnał, który mógł pojawić się w każdym momencie.	1 2 3 4 5
2 - Moja praca polega na ciągłym powtarzaniu tych samych prostych czynności, wymagających jednak pewnej koncentracji uwagi.	1 2 3 4 5
3 - W pracy wykonuję złożone zadania umysłowe, wymagające zbierania informacji, rozpoznawania problemów i znajdowania sposobów ich rozwiązywania.	1 2 3 4 5
4 - Moja praca wymaga dużego wysiłku fizycznego związanego z dźwiganiem lub przenoszeniem ciężarów.	1 2 3 4 5
5 - Pracując na moim stanowisku nie mam informacji o tym, czy to co robię, wykonuję dobrze czy źle.	1 2 3 4 5
6 - W mojej pracy muszę przerzucać się z jednej czynności na drugą, a każda z nich wymaga pewnej koncentracji uwagi.	1 2 3 4 5
7 - Zdarza się, że po przyjsciu do pracy jestem zaskakiwany przez przełożonych zadaniami, jakie mi zlecają.	1 2 3 4 5
8 - Moja praca wykonywana jest w narzuconym rytmie, niezależnym ode mnie.	1 2 3 4 5
9 - Do mojej pracy muszę przychodzić i wychodzić z niej o dokładnie określonej godzinie.	1 2 3 4 5
10 - W pracy wymagany jest ode mnie pośpiechu.	1 2 3 4 5
11 - W mojej pracy wymaga się wykonywania zadań w nieprzekraczalnych terminach i zarazem istnieją poważne przeszkody uniemożliwiające dotrzymanie tych terminów.	1 2 3 4 5

12 - Na moim stanowisku praca wykonywana była zrywami; są okresy, w których nie ma nic do roboty, a później trzeba nadrabiać stracony czas.	1 2 3 4 5
13 - Przerwy w pracy na odpoczynek i jedzenie są dokładnie wyznaczone.	1 2 3 4 5
14 - Na moim stanowisku muszę godzić wiele sprzecznych interesów i oczekiwań przełożonych, podwładnych i współpracowników.	1 2 3 4 5
15 - Na moim stanowisku w ciągu ostatnich paru lat wiele zmieniło się w warunkach i sposobie wykonywania pracy.	1 2 3 4 5
16 - Moja nieobecność, nawet jednodniowa, powoduje zakłócenia w pracy instytucji.	1 2 3 4 5
17 - W mojej pracy otrzymuję zadania wymagające ode mnie rywalizowania z innymi.	1 2 3 4 5
18 - Dość często zdarza się, że swoją pracę muszę wykonywać w samotności, bez możliwości kontaktowania się z innymi ludźmi.	1 2 3 4 5
19 - Na moim stanowisku praca wymaga ode mnie różnych form współpracy z innymi pracownikami lub klientami, takich jak uzgadnianie opinii, celów i osiągnięcie ugody.	1 2 3 4 5
20 - Udzielanie pomocy innym osobom jest moim podstawowym obowiązkiem i poświęcam mu sporo czasu.	1 2 3 4 5
21 - Na moim stanowisku pracy dochodzi do konfliktów, zadrażnień i kłótni z pacjentami, petentami i innymi ludźmi spoza przedsiębiorstwa.	1 2 3 4 5
22 - Moje stanowisko wiąże się z niskim prestiżem i uznaniem społecznym.	1 2 3 4 5
23 - Popełnione błędy lub zaniedbania w pracy na moim stanowisku mogą spowodować utratę zdrowia innych ludzi, a nawet zagrozić ich życiu.	1 2 3 4 5
24 - Moja praca związana jest z odpowiedzialnością materialną i finansową.	1 2 3 4 5
25 - Bardzo łatwo na moim stanowisku popełnić błąd, za który grożą mi surowe konsekwencje.	1 2 3 4 5
26 - W mojej pracy występuje zagrożenie zdrowia z powodu narażenia na szkodliwe czynniki lub z powodu wypadku.	1 2 3 4 5
27 - To, jak mam wykonywać swoją pracę jest w szczegółach ustalane przez mojego przełożonego.	1 2 3 4 5
28 - W mojej pracy dość często dokonuję wyborów, które prowadzą do przeżywania przeze mnie silnych konfliktów wewnętrznych.	1 2 3 4 5
29 - Na moim stanowisku mogę oczekiwać, że będę wzywany do wykonywania swoich obowiązków o każdej porze doby.	1 2 3 4 5
30 - Pracuję na trzy zmiany lub w ruchu ciągłym, lub tylko w nocy.	1 2 3 4 5
31 - Zdarza się, że muszę zabierać pracę do domu z różnych powodów.	1 2 3 4 5
32 - Na moim stanowisku występują złe fizyczne warunki pracy: - zbyt duży hałas - nieodpowiednia temperatura - złe oświetlenie - ciasnota	1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5

33 - Na moim stanowisku występują wymienione niżej warunki, które u większości ludzi wywołują wstręt lub inne nieprzyjemne odczucia: - brud - wilgoć - odór	1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5
34 - Mam poczucie, że w swojej pracy nie wykorzystuję swoich możliwości, zdolności i kwalifikacji.	1 2 3 4 5
35 - Z powodu awansowania musiałem i jeszcze muszę włożyć sporo wysiłku w to, aby sprostać wymaganiom pracy.	1 2 3 4 5
36 - Zdarza się, że po powrocie do domu nie mogę przestać myśleć o sprawach związanych z pracą.	1 2 3 4 5
37 - Ilość obowiązków i zadań nałożonych na mnie w pracy jest tak duża, że ledwie sobie z nimi radzę.	1 2 3 4 5
38 - Wykonanie niektórych zadań sprawia mi spore trudności.	1 2 3 4 5
39 - Mam poczucie, że w pracy moi zwierzchnicy nie traktują mnie sprawiedliwie.	1 2 3 4 5
40 - Miałem poczucie, że to co robię w mojej pracy nie ma większego sensu i tak naprawdę nikomu to nie jest potrzebne.	1 2 3 4 5
41 - Co najmniej od roku istnieje w mojej instytucji sytuacja, w której mam poczucie, że mogę być zwolniony.	1 2 3 4 5
42 - Pracuję w godzinach nadliczbowych.	1 2 3 4 5
43 - Mam poczucie, że moja praca zawodowa odbija się ujemnie na moim życiu rodzinnym.	1 2 3 4 5
44 - Jeśli występują w mojej pracy jakiejkolwiek trudności lub kłopoty, nie mogę liczyć na skuteczną pomoc moich przełożonych.	1 2 3 4 5
45 - Jeśli występują w mojej pracy jakiejkolwiek trudności lub kłopoty, nie mogę liczyć na skuteczną pomoc moich kolegów.	1 2 3 4 5
46 - Zdarza mi się wracać do domu z poczuciem nie wykonania zadania.	1 2 3 4 5
47 - Tempo, w jakim pracuję nie jest dostosowane do moich potrzeb, temperamentu i upodobań.	1 2 3 4 5
48 - Mam poczucie, że jestem w pracy niedoceniany.	1 2 3 4 5
49 - W pracy muszę wykonywać swoje zadania, pomimo braku odpowiednich środków materialnych (narzędzi, surowców, pieniędzy itp.).	1 2 3 4 5
50 - Zdarza się, że mam w pracy poczucie niepewności z różnych powodów, np. braku potrzebnych informacji czy wyraźnie określonego celu.	1 2 3 4 5

KWESTIONARIUSZ S. COHENA

.....
imię i nazwisko

--	--	--	--	--	--	--	--

INSTRUKCJA

Pytania tego kwestionariusza dotyczą Pani myśli i odczuć. Odpowiadając na każde z pytań proszę wskazać, jak często odczuwała czy myślała Pani w określony sposób w ostatnim miesiącu.

Chociaż niektóre z pytań są do siebie podobne, to ze względu na występujące między nimi różnice, należy każde z nich traktować jako odrębne. Proszę udzielać odpowiedzi na każde z pytań dosyć szybko, to znaczy proszę nie usiłować przypomnieć sobie, ile razy odczuwała czy myślała Pani w określony sposób, ale należy raczej udzielać odpowiedzi w oparciu o szybko dokonane oszacowanie. Dla każdego z pytań jest do wyboru pięć możliwych odpowiedzi. **Wybraną odpowiedź należy zaznaczyć kółkiem.**

1. Jak często w ostatnim miesiącu wytrącały cię z równowagi jakieś niespodziewane zdarzenia?

0	1	2	3	4
nigdy	prawie nigdy	czasami	dość często	bardzo często

2. Jak często w ostatnim miesiącu czułaś, że nie potrafisz kontrolować przebiegu ważnych dla ciebie spraw?

0	1	2	3	4
nigdy	prawie nigdy	czasami	dość często	bardzo często

3. Jak często w ostatnim miesiącu czułaś się zdenerwowana i zestresowana?

0	1	2	3	4
nigdy	prawie nigdy	czasami	dość często	bardzo często

4. Jak często w ostatnim miesiącu zdołałaś uporać się z denerwującymi kłopotami dnia codziennego?

0	1	2	3	4
nigdy	prawie nigdy	czasami	dość często	bardzo często

5. Jak często w ostatnim miesiącu miałaś przeświadczenie, że poradzisz sobie z ważnymi zmianami, które pojawiły się w twoim życiu?

0	1	2	3	4
nigdy	prawie nigdy	czasami	dość często	bardzo często

6. Jak często w ostatnim miesiącu byłaś pewna, że jesteś w stanie sam pokierować własnymi sprawami?

0	1	2	3	4
nigdy	prawie nigdy	czasami	dość często	bardzo często

7. Jak często w ostatnim miesiącu czułaś, że sprawy układają się po twojej myśli?
- | | | | | |
|-------|--------------|---------|-------------|---------------|
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| nigdy | prawie nigdy | czasami | dość często | bardzo często |
8. Jak często w ostatnim miesiącu stwierdzałaś, że nie mogłaś uporać się ze wszystkim, co miałaś do zrobienia?
- | | | | | |
|-------|--------------|---------|-------------|---------------|
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| nigdy | prawie nigdy | czasami | dość często | bardzo często |
9. Jak często w ostatnim miesiącu udało ci się kontrolować stany swojego podenerwowania?
- | | | | | |
|-------|--------------|---------|-------------|---------------|
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| nigdy | prawie nigdy | czasami | dość często | bardzo często |
10. Jak często w ostatnim miesiącu miałeś poczucie panowania nad sytuacją?
- | | | | | |
|-------|--------------|---------|-------------|---------------|
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| nigdy | prawie nigdy | czasami | dość często | bardzo często |
11. Jak często w ostatnim miesiącu złościły cię sprawy, na które nie miałaś wpływu?
- | | | | | |
|-------|--------------|---------|-------------|---------------|
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| nigdy | prawie nigdy | czasami | dość często | bardzo często |
12. Jak często w ostatnim miesiącu zdarzyło ci się myśleć o rzeczach, które jeszcze musisz wykonać?
- | | | | | |
|-------|--------------|---------|-------------|---------------|
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| nigdy | prawie nigdy | czasami | dość często | bardzo często |
13. Jak często w ostatnim miesiącu byłeś w stanie decydować o tym, na co przeznaczyć swój czas?
- | | | | | |
|-------|--------------|---------|-------------|---------------|
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| nigdy | prawie nigdy | czasami | dość często | bardzo często |
14. Jak często w ostatnim miesiącu czułaś, że trudności tak się spiętrzyły, że nie zdołasz im podołać?
- | | | | | |
|-------|--------------|---------|-------------|---------------|
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| nigdy | prawie nigdy | czasami | dość często | bardzo często |

Ankieta żywieniowa

--	--	--	--	--	--	--

Imię i nazwisko.....

Produkt	Ile razy w ostatnim tygodniu/miesiącu spożywała Pani wymienione niżej produkty					
	A	B	C	D	E	F
	Nie spożywałam	1-3razy w tygodniu	4-6 razy w tygodniu	Codziennie	1-3 razy w miesiącu	Rzadziej niż 1 raz w miesiącu
PRODUKTY ZBOŻOWE						
Pieczywo jasne <i>(np. chleb, bulki, bagietka)</i>						
Pieczywo ciemne <i>(np. razowe, żytnie, graham)</i>						
Pieczywo cukiernicze <i>(np. chałka, drożdżówki)</i>						
Kasze <i>(np. jęczmienna, gryczana)</i>						
Ryż, makaron						
Płatki śniadaniowe						
MLEKO I PRZETWORY MLECZNE						
Mleko						
Jogurt, kefir, maślanka						
Ser biały, twaróg						
Ser żółty						
Masło						
Margaryna						
MIĘSO, DRÓB, JAJA						
Mięso: wołowina, wieprzowina, cielęcina						
Drób						
Wątróbka						
Inne podroby jakie.....						
Jaja						
Wędliny						
RYBY I OWOCE MORZA						
Dorsz						
Pstrąg						
Śledź						
Makreła						
Tuńczyk						
Karp						
Panga						
Morszczuk						
Mintaj						

Produkt	Ile razy w ostatnim tygodniu/miesiącu spożywała Pani wymienione niżej produkty					
	A	B	C	D	E	F
	Nie spożywałam	1-3razy w tygodniu	4-6 razy w tygodniu	Codziennie	1-3 razy w miesiącu	Rzadziej niż 1 raz w miesiącu
Ryby wędzone						
Owoce morza						
Inne jakie.....						
OWOCE, WARZYWA (surowe i/lub gotowane), GRZYBY						
Jabłka						
Gruszki						
Śliwki						
Truskawki, maliny						
Wiśnie, czereśnie						
Mandarynki, pomarańcze, grejpfruty, kiwi						
Brzoskwinie, morele						
Banany						
Inne						
Marchew, pietruszka						
Buraki						
Sałata						
Pomidor						
Ogórek						
Papryka						
Rzodkiewka						
Cebula, czosnek						
Kalafior, brokuły, kapusta,						
Koper, pietruszka –nać,						
Ziemniaki						
Rośliny strączkowe (np. soja, fasola, groch)						
Grzyby						
Inne						
PESTKI, ORZECHY, SŁODYCZE						
Pestki, orzechy						
Czekolada						
Cukierki, ciasto, herbatniki						
NAPOJE						
Herbata czarna						
Herbata zielona, czerwona						
Kawa						
Kakao, kawa zbożowa						
sok owocowy jaki.....						
sok warzywny jaki.....						

Produkt	Ile razy w ostatnim tygodniu/miesiącu spożywała Pani wymienione niżej produkty					
	A	B	C	D	E	F
	Nie spożywałam	1-3razy w tygodniu	4-6 razy w tygodniu	Codziennie	1-3 razy w miesiącu	Rzadziej niż 1 raz w miesiącu
Piwo						
Wino białe						
Wino czerwone						
Alkohole wysokoprocentowe jakie.....						
Jak często stosuje Pani następujące sposoby przyrządzania potraw?						
gotowanie						
smażenie						
pieczenie						
grillowanie						

Kwestionariusz Aktywności Ruchowej Seven Day Physical Activity Recall

Prosimy o uważne przeczytanie poniższych pytań i jak najdokładniejsze odpowiedzi. Na końcu kwestionariusza podane (na odwrocie) są przykłady aktywności ruchowej o umiarkowanej, dużej i bardzo dużej intensywności. Aktywności o niskiej intensywności (praca siedząca, oglądanie telewizji) zostanie obliczona automatycznie na podstawie Pana odpowiedzi dotyczącej liczby godzin snu oraz aktywności ruchowej o umiarkowanej, dużej i bardzo dużej intensywności.

Kwestionariusz dotyczy 7 ostatnich dni.

1. Przeciętnie, ile godzin spałeś każdej nocy w ciągu 5 ostatnich powszednich dni tygodnia (poniedziałek-piątek) (z dokładnością do 0,5 godziny?)
Przeciętnie godzin
2. Przeciętnie, ile godzin spałeś każdej nocy w ostatnią sobotę i niedzielę?
Przeciętnie godzin
3. Wysiłki o umiarkowanej intensywności łącznie w ciągu ostatnich 5 powszednich dni tygodnia (z dokładnością do 0,5 godziny?)
Przeciętnie godzin
4. Wysiłki o umiarkowanej intensywności łącznie w ciągu ostatniej soboty i niedzieli (z dokładnością do 0,5 godziny?)
Przeciętnie godzin
5. Wysiłki o dużej intensywności łącznie w ciągu ostatnich 5 powszednich dni tygodnia (z dokładnością do 0,5 godziny?)
Przeciętnie godzin
6. Wysiłki o dużej intensywności łącznie w ciągu ostatniej soboty i niedzieli (z dokładnością do 0,5 godziny?)
Przeciętnie godzin
7. Wysiłki o bardzo dużej intensywności łącznie w ciągu ostatnich 5 powszednich dni tygodnia (z dokładnością do 0,5 godziny?)
Przeciętnie godzin
8. Wysiłki o bardzo dużej intensywności łącznie w ciągu ostatniej soboty i niedzieli (z dokładnością do 0,5 godziny?)
Przeciętnie godzin
9. W porównaniu z aktywnością ruchową w ciągu ostatnich 3 miesięcy, ostatni tydzień charakteryzował się
 - a. Większą aktywnością ruchową
 - b. Podobną aktywnością ruchową
 - c. Mniejszą aktywnością ruchową

10. W przypadku aktywności ruchowej, którą trudno jest zakwalifikować wyszczególnij poniżej:

Rodzaj aktywności (krótki opis)	Dni powszednie (godziny)	Weekend (godziny)
.....
.....
.....
.....
.....

Przykłady aktywności ruchowej:

O umiarkowanej intensywności:

Praca zawodowa: marsz, dostarczanie korespondencji, malowanie wewnątrz, podnoszenie i przenoszenie lekkich przedmiotów (np. praca ekspedienta)

Prace domowe: wycieranie kurzu i podłogi, mycie okien, grabienie trawnika, zmywanie naczyń, nakrywanie do stołu

Aktywność sportowa (rzeczywisty czas ruchu): siatkówka, tenis stołowy, intensywny spacer (ok. 4,86 km/godz), golf, gimnastyka

O dużej intensywności:

Praca zawodowa: prace ciesielskie i stolarskie, prace budowlane

Prace domowe: szorowanie podłóg

Aktywność sportowa (rzeczywisty czas ruchu): tenis (parami), taniec, spokojny jogging (trucht)

O bardzo dużej intensywności:

Praca zawodowa: kopanie, przenoszenie ciężkich ładunków

Aktywność sportowa (rzeczywisty czas ruchu): tenis (singiel), intensywne bieganie, pływanie, piłka nożna, koszykówka