

Phần A: GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dioxin gây ảnh hưởng bất lợi đến quá trình sinh sản và phát triển, gây rối loạn hệ thống miễn dịch và nội tiết. Ngay cả khi chỉ có hàm lượng rất nhỏ, dioxin cũng gây ảnh hưởng bất lợi cho sức khỏe con người. Nó tác động đến nhiều cơ quan, hệ cơ quan trong cơ thể gây ra những rối loạn bệnh lý phức tạp và đa dạng. Điều đó có thể làm giảm tuổi thọ ở những người bị phơi nhiễm cũng như con cái họ ở những thế hệ kế tiếp trong tương lai.

Trong cuộc chiến tranh tại Việt Nam giai đoạn 1961 đến 1972 quân đội Mỹ đã rải một lượng lớn các chất diệt cỏ có tạp nhiễm một lượng lớn dioxin trong thành phần xuống nhiều vùng rộng lớn ở miền Nam Việt Nam, nhằm mục đích phát quang để phá hủy nơi ẩn lấp của quân đội giải phóng chiến đấu ở miền Nam Việt Nam. Tác động của nó đã và vẫn đang gây nên những hậu quả nghiêm trọng đối với sức khỏe con người và môi trường sống ở Việt Nam, đặc biệt các bà mẹ và trẻ em tại các khu vực phơi nhiễm dioxin. Dioxin ảnh hưởng tới bào thai từ rất sớm qua nhau thai. Những trẻ nhỏ tiếp xúc với dioxin sẽ bị ảnh hưởng về phát triển thể chất và tâm thần.

2. MỤC TIÊU CỦA ĐỀ TÀI

Chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài “nghiên cứu sự thay đổi nồng độ hormon steroid trong nước bọt, sữa và huyết thanh trên những người sống tại vùng phơi nhiễm chất da cam/dioxin ở Việt Nam” với mục tiêu:

1. *Xác định nồng độ dioxin trong sữa của những người mẹ sống tại Phù Cát - Bình Định.*
2. *Xác định nồng độ hormon steroid trong nước bọt của mẹ và con, trong sữa và huyết thanh của người mẹ sống tại Phù Cát - Bình Định.*
3. *Tìm hiểu mối tương quan giữa nồng độ hormon steroid trong nước bọt, sữa và huyết thanh với nồng độ dioxin trong sữa của những người mẹ.*

3. TÍNH CẤP THIẾT VÀ Ý NGHĨA CỦA LUẬN ÁN

Dioxin được biết đến như là một yếu tố nguy cơ tác động bất lợi đến sức khỏe con người như bệnh ung thư, đái tháo đường và làm rối loạn nội tiết miễn dịch cũng như biến đổi các mức độ hormon. Trong nghiên cứu này chúng tôi xác định hàm lượng các thành phần của dioxin trong sữa mẹ, nồng độ hormon steroid nước bọt, trong sữa và trong huyết thanh của những người mẹ cho con bú và con của họ sống ở khu vực phơi nhiễm dioxin.

Kết quả cho thấy mức độ các thành phần dioxin trong sữa mẹ ở khu vực phơi nhiễm dioxin cao hơn khu vực đối chứng; nồng độ cortisol, cortison nước bọt, trong sữa và huyết thanh của người mẹ ở khu vực phơi nhiễm dioxin cao hơn nhóm chứng; nồng độ DHEA trong nước bọt của mẹ ở giai đoạn đầu cho con bú cao hơn nhóm chứng trong khi ở con lại thấp hơn so với nhóm chứng. Chúng tôi đã chỉ ra rằng có mối tương quan hình chữ U ngược giữa dioxin trong sữa và hormon cortisol và cortison trong nước bọt và trong sữa ở những người mẹ sinh con đầu lòng ở các khu vực nghiên cứu. Có tương quan thuận giữa dioxin trong sữa và hormon cortisol và cortison trong nước bọt và trong huyết thanh của mẹ sau 1 năm cho con bú. Có tương quan nghịch giữa dioxin trong sữa mẹ và hormon DHEA trong nước bọt của trẻ 3 tuổi. Phần lớn các nghiên cứu trước đây về dioxin đều liên quan đến tác động của TCDD đối với hệ sinh sản của phụ nữ đã được thu thập từ những người trưởng thành. Đây là nghiên cứu đầu tiên tìm ra rằng dioxin gây ra sự ức chế của việc tổng hợp DHEA trên trẻ em. Đây là một hướng nghiên cứu mới đã đưa ra những bằng chứng về ảnh hưởng của dioxin đối với sự phát triển của trẻ.

4. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Sau nhiều năm kết thúc chiến tranh nhưng lượng dioxin trong sữa những người mẹ ở khu vực phơi nhiễm dioxin vẫn còn cao gấp 3,5 lần so với khu vực đối chứng. Những tác động bất lợi của chất Da cam/dioxin tồn tại trong môi trường vẫn còn tiếp tục ảnh hưởng xấu đến sức khỏe những người dân sống tại khu vực phơi nhiễm cụ thể là sự thay đổi nồng độ hormon steroid của những người mẹ như tăng nồng độ hormon cortisol và DHEA ở người mẹ đang cho con bú; ở trẻ em 3 tuổi có sự giảm mạnh nồng độ hormon DHEA cũng như sự thay đổi nồng độ hormon cortisol và cortison trong nước bọt.

5. BỐ CỤC CỦA LUẬN ÁN

Ngoài đặt vấn đề và kết luận, khuyến nghị, luận án có 4 chương:

Chương 1. Tổng quan tài liệu	41 trang
Chương 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu	15 trang
Chương 3. Kết quả nghiên cứu	31 trang
Chương 4. Bàn luận	31 trang

Luận án có 25 bảng, 10 biểu đồ, 6 sơ đồ, 13 hình, 6 phụ lục và 196 tài liệu tham khảo (191 tài liệu tiếng Anh, 5 tài liệu tiếng Việt).

Phần B: NỘI DUNG LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Hormon steroid

1.1.1. Đại cương hormon steroid

Hormon steroid có nguồn gốc từ cholesterol và đặc trưng bởi nhân steroid, cấu trúc bao gồm ba vòng sáu cạnh và một vòng năm cạnh. Chúng được tổng hợp bởi một loạt các mô, nổi bật nhất là tuyến thượng thận và tuyến sinh dục. Tiền thân từ cholesterol được tổng hợp trong tế bào từ acetate, từ các thành phần este-cholesterol trong các giọt lipid của tế bào hoặc từ sự hấp thu của lipoprotein tỉ trọng thấp chứa cholesterol.

1.1.2. Tổng hợp hormon steroid

Các hormon steroid được tổng hợp từ cholesterol dưới sự tác động của enzym P₄₅₀ SCC hay CYP11 A trong ty lạp thể của tế bào, chuỗi bên của cholesterol sẽ được tách ra và tạo thành pregnenolon. Quá trình tổng hợp này chịu sự tác động của nhiều loại enzym đặc biệt là kích vỏ thượng thận ACTH.

1.1.3. Một số phương pháp định lượng hormon steroid

Phương pháp xét nghiệm miễn dịch đã được sử dụng rộng rãi trong phân tích do tính đơn giản và kinh tế, tuy vậy tính đặc hiệu và độ nhạy chưa cao để phân tích đồng thời nhiều loại steroid trong các mẫu sinh học.

Sắc ký lỏng kết hợp với khối phổ kép (LC-MS/MS) là một lựa chọn tốt cho định lượng các hormon steroid với các ưu điểm tránh được phản ứng chéo của kháng thể; phân tích nhiều steroid cùng một lúc; độ nhạy và độ chính xác cao.

1.2. Chất độc da cam/dioxin

Chất độc da cam là hóa chất diệt cỏ có tạp nhiễm một lượng lớn các thành phần dioxin đã được sử dụng rộng rãi với số lượng lớn hơn các chất khác. Chất độc da cam là một hợp chất gồm 2 thành phần 2,4 - D và 2,4,5 - T với tỷ lệ 50/50. Trong chiến tranh tại Việt Nam, giai đoạn 1961 đến 1972 quân đội Mỹ đã sử dụng một lượng lớn các chất hóa học và thuốc diệt cỏ khác nhau có tạp nhiễm dioxin như chất da cam, cho đến nay vẫn đang gây ra các vấn đề về sức khỏe cho người dân ở Việt Nam.

1.2.3. Các nguồn ô nhiễm

Dioxin là sản phẩm phụ không mong muốn của một số ngành công nghiệp hóa chất, chủ yếu là các lĩnh vực sản xuất công nghiệp các chất hữu cơ có chứa chất Clo. Ở Việt Nam, hiện nay nguồn dioxin được quan tâm là hậu quả của chiến tranh, một lượng lớn dioxin có trong thành phần của chất

diệt cỏ do quân đội Mỹ đã sử dụng trong chiến dịch Ranch Hand và chiến dịch Pacer Ivy từ năm 1961 đến 1972. Số lượng hóa chất đã sử dụng hiện vẫn còn tranh cãi. Sau khi kết thúc chiến tranh Bộ Quốc Phòng Mỹ đã cung cấp dữ liệu cho rằng tổng lượng chất hóa học đã được rải tại Việt Nam vào khoảng 72 triệu lít. Nhưng thống kê thực cho thấy lượng chất diệt cỏ đã được sử dụng khoảng 74 triệu lít. Trong đó chất da cam chiếm 61% lượng rải và 86% lượng hóa chất được rải bằng máy bay có cánh cố định C123.

1.2.4. Ảnh hưởng của dioxin đối với sức khỏe con người

Các nhóm chuyên gia của Tổ chức Y tế Thế giới đã khẳng định độc tính của dioxin và những hợp chất giống như dioxin ảnh hưởng đến đời sống sức khỏe con người sau khi xâm nhập vào cơ thể ngay cả khi tiếp xúc ở nồng độ cuối cùng cũng có thể đạt được mức độ nguy hiểm. Dioxin là căn nguyên hàng đầu gây nên những bất thường về sinh sản và phát triển, gây tổn hại hệ thống miễn dịch, ảnh hưởng đến nội tiết tố và gây ung thư. Ngay cả khi chỉ có hàm lượng rất nhỏ, dioxin cũng liên quan đến việc tàn phá sức khỏe con người một cách ghê gớm, có thể làm giảm tuổi thọ những người bị phơi nhiễm và cả con cái họ cùng những thế hệ kế tiếp trong tương lai.

Dioxin và các chất cùng nhóm là nguyên nhân gây ra nhiều trạng thái bệnh lý ở nhiều cơ quan, hệ thống trong cơ thể và gây ra những rối loạn bệnh lý phức tạp, đa dạng.

1.2.5. Một số phương pháp định lượng dioxin

*** Phân tích bằng phương pháp DR Calux**

DR CALUX (Dioxin Response Chemically Activated Luciferase gene Expression) là một kỹ thuật dùng tế bào cảm biến sinh học để định lượng dioxin và PCB trong mẫu phân tích. Với kỹ thuật DR CALUX, kết quả xác định được là tổng TEQ của tất cả các đồng đẳng dioxin và PCB. Khác với kỹ thuật GCMS, kỹ thuật DR CALUX không định lượng nồng độ từng đồng đẳng dioxin và PCB riêng rẽ.

*** Phân tích bằng phương pháp sắc ký khí khối phổ có độ phân giải cao**

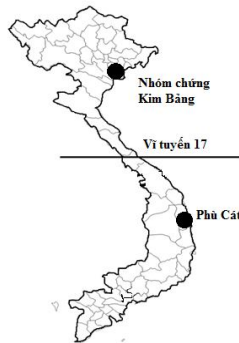
Phương pháp sắc ký khí khối phổ có độ phân giải cao dùng để phát hiện và định lượng các đồng phân 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (2,3,7,8-TCDF) và các dẫn xuất khác chứa nguyên tử clo ở vị trí penta, hexa, hepta và octa của dibenzo-p-dioxin (PCDDs) và dibenzofuran (PCDFs).

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Khu vực nghiên cứu

Nhóm chủ cứu là vùng phơi nhiễm chất da cam/dioxin hay được gọi là điểm nóng dioxin, tại sân bay quân sự Phù Cát tại huyện Phù Cát tỉnh Bình Định thuộc miền Nam Trung Bộ Việt Nam. Đây là nơi tập kết, lưu trữ và bị rò rỉ một lượng lớn hóa chất diệt cỏ có tạp nhiễm dioxin ra môi trường sống quanh trong thời kỳ chiến tranh giai đoạn 1961 đến 1972.

Vùng đối chứng - vùng không bị rải chất diệt cỏ trong chiến tranh, là các xã thuộc huyện Kim Bảng, tỉnh Hà Nam. Đây là các xã thuần nông không có các nhà máy sản xuất hóa chất hay các khu công nghiệp.



Hình 2.1. Địa điểm lấy mẫu nghiên cứu

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Các đối tượng nghiên cứu bao gồm 51 cặp mẹ và con ở khu vực phơi nhiễm dioxin, là khu dân cư đang sinh sống xung quanh sân bay quân sự Phù Cát. Các đối tượng ở khu vực đối chứng gồm 59 cặp mẹ và con thuộc các xã thuộc huyện Kim Bảng, là khu vực không phơi nhiễm dioxin. Những người mẹ cùng trong độ tuổi từ 20 đến 33 tuổi đều đang cho con bú với trẻ trong độ tuổi từ 4 đến 16 tuần tại thời điểm nghiên cứu.

Các mẫu sữa và mẫu nước bọt của những người mẹ tại 2 khu vực này được thu thập lần đầu tiên vào tháng 9 năm 2008 để định lượng dioxin và hormon. Tiếp theo, vào tháng 9 năm 2009 những người mẹ này lại tiếp tục được lấy mẫu nước bọt và huyết thanh để định lượng hormon. Đối với các trẻ em là con của những người mẹ ở hai khu vực này được lấy mẫu nước bọt để định lượng hormon vào tháng 9 năm 2011 khi những đứa trẻ được 3 tuổi.

2.2.1. Tiêu chuẩn lựa chọn

- + Những người mẹ đang cho con bú độ tuổi từ 20 đến 33.
- + Đã sinh sống tại các khu vực nghiên cứu được thời gian trên 5 năm.
- + Các trẻ em trong độ tuổi từ 4 đến 16 tuần tuổi, là con đẻ của những người mẹ tham gia nghiên cứu.

2.2.2. Tiêu chuẩn loại trừ

- + Đối với người mẹ: Không thuộc độ tuổi nghiên cứu, có các bệnh lý mạn tính, không tình nguyện tham gia nghiên cứu.
- + Đối với các trẻ em: Không thuộc nhóm tuổi nghiên cứu, có các bệnh lý gan, thận nặng.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu cắt ngang

2.4. Các quy trình và kỹ thuật nghiên cứu

2.4.1. Quy trình lấy mẫu

Để hạn chế những ảnh hưởng bởi nhịp sinh học của cơ thể đối với một số chỉ tiêu nghiên cứu, các mẫu nghiên cứu đều được thu thập vào cùng một thời gian từ 8:00 đến 10:00 giờ sáng.

các mẫu sữa do chính các bà mẹ vắt bằng tay vào cốc sạch có chia vạch. Mẫu nước bọt được thu thập do người mẹ tự súc miệng với 15 ml nước sạch, sau đó chuyển hỗn hợp trực tiếp này vào một ống nghiệm vô trùng có nắp đậy và dán nhãn. Mẫu máu được lấy 3ml từ tĩnh mạch quay tại. Mẫu nước bọt của trẻ em được các thành viên nhóm nghiên cứu thực hiện bằng việc sử dụng bông vô trùng.

tất cả các mẫu nghiên cứu được bảo quản và vận chuyển sang Nhật Bản và được bảo quản ở -70°C cho đến khi phân tích.

2.4.2. Kỹ thuật định lượng dioxin trong sữa

Mẫu sữa được phân tích theo phương pháp đã được báo cáo trước đây của tác giả Tawara và Phạm Thế Tài. Sau khi đồng nhất các chất béo từ 10g sữa mẹ, tiếp tục cho thêm vào 40-80pg chất 17-13C12 đã được đánh dấu như là một chất nội chuẩn.

2.4.3. Kỹ thuật định lượng hormon steroid bằng kỹ thuật sắc ký lỏng khối phổ kép (LC-MS/MS).

*** Quy trình xử lý mẫu và phân tích hormon steroid trong huyết thanh.**

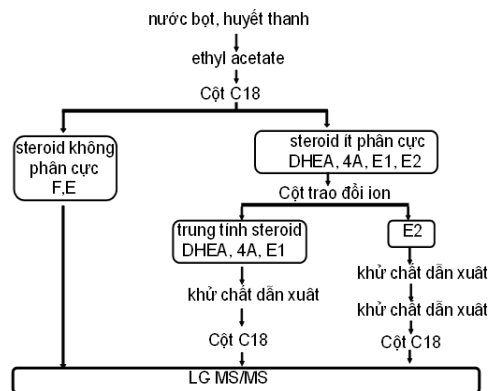
Sử dụng 200 μl huyết thanh kết hợp với 1,0ml nước tinh khiết và các chất nội chuẩn. Các mẫu được chiết xuất với 3ml ethyl acetate và một dung môi chất hữu cơ bay hơi. Sau khi làm khô bằng quá trình bay hơi, sản phẩm

này sẽ được tái hòa tan thành dung dịch bởi 50% methanol và nước sạch.

Tiếp theo sẽ sử dụng các cột lọc Bond Elut C18 để tách các thành phần phân cực và phần steroid ít phân cực bằng cách sử dụng dung môi acetonitrile. Cuối cùng LC-MS/MS được thực hiện định lượng các hormon.

* Quy trình xử lý mẫu và phân tích hormon steroid trong nước bọt và sữa

Với số lượng mẫu khoảng 1,0ml - 1,5ml được trộn với các chất nội chuẩn bao gồm cortisol-2H4 1ng, DHEA-2H4 100pg, T-2H4 100pg, progesteron-13C3 100pg, estron-13C3 100pg và estradiol-13C3 100pg/100 ml. Hỗn hợp này được chiết xuất và phân đoạn theo quy trình sử dụng giống như huyết thanh (hình 2.2).



Hình 2.2. Sơ đồ quy trình phân tích hormon trong huyết thanh và nước bọt

2.5. Ước tính lượng dioxin hấp thụ hàng ngày ở trẻ bú sữa mẹ (DDI)

Mức độ DDI được ước tính căn cứ và lượng mỡ trong sữa mẹ và nồng độ dioxin theo phương trình dưới đây:

$$DDI = 800 \times (\% \text{ hàm lượng chất béo trong sữa}/100) \times (\text{PCDD/PCDF TEQ trong sữa mẹ trong pg/g lipid})/(\text{trọng lượng trẻ sơ sinh theo kg}).$$

2.6. Xử lý số liệu nghiên cứu

Số liệu thu thập được mã hóa, nhập vào máy tính và xử lý theo chương trình SPSS 12.0, Microsoft Excel 2007.

2.7. Đạo đức nghiên cứu

- + Các trường hợp tham gia nghiên cứu đều tự nguyện và không ép buộc.
- + Ủy ban đạo đức y khoa của Đại học Kanazawa đã thông qua nghiên cứu này theo giấy phép y học số 89 năm 2008 và được sự đồng ý thông từ mỗi người tham gia.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm chung

3.1.1. Đặc điểm chung của mẹ

Bảng 3.1. Đặc điểm của những người mẹ ở khu vực nghiên cứu

Chỉ số	Nhóm	Kim Bảng			Phù Cát			p
		n	Trung bình	SD	n	Trung bình	SD	
Tuổi (năm)		59	25,8	2,9	51	27,3	3,8	<0,05
Chiều cao (cm)		59	152,2	5,0	51	152,0	5,3	>0,05
Cân nặng (kg)		59	48,4	4,9	51	48,4	6,7	>0,05
BMI (kg/m ²)		59	20,9	1,9	51	20,9	2,2	>0,05
Thời gian cư trú (năm)		59	21,6	5,6	51	22,7	4,1	>0,05

Độ tuổi trung bình của những người mẹ ở Phù Cát ở Kim Bảng.

Các chỉ số về chiều cao, cân nặng, BMI và thời gian cư trú tại khu vực nghiên cứu của người mẹ không có sự khác biệt giữa các khu vực.

3.1.2. Đặc điểm chung của con

Bảng 3.2. Đặc điểm của trẻ tại các thời điểm nghiên cứu

Thời điểm	Chỉ số	Kim Bảng			Phù Cát			p
		n	Trung bình	SD	n	Trung bình	SD	
Dưới 3 tháng tuổi	Tuổi (tuần)	19	9,4	1,6	29	9,0	1,9	>0,05
	Chiều cao (cm)	19	59,2	2,8	29	60,0	3,2	>0,05
	Cân nặng (g)	19	5372,6	661,5	29	5439,3	1018,9	>0,05
	Vòng đầu (cm)	19	39,0	1,3	29	39,1	1,6	>0,05
	Vòng ngực (cm)	19	39,8	1,9	29	39,4	2,8	>0,05
	DDI (TEQ pg/dl/ngày)	19	9,4	4,6	29	27,6	13,4	<0,001
3 đến 4 tháng tuổi	Tuổi (tuần)	40	15,3	3,5	22	14,3	2,5	>0,05
	Chiều cao (cm)	40	62,4	2,5	22	62,4	2,7	>0,05
	Cân nặng (g)	40	6327,3	832,5	22	6100,9	808,8	>0,05
	Vòng đầu (cm)	40	40,8	1,8	22	40,8	1,7	>0,05
	Vòng ngực (cm)	40	41,6	2,1	22	40,6	2,2	>0,05
	DDI (TEQ pg/dl/ngày)	40	7,5	3,1	22	25,1	14,6	<0,001

Ước lượng mức độ dioxin hấp thụ hàng ngày của trẻ ở Phù Cát cao hơn gấp 3 lần so với trẻ ở Kim Bảng tại thời điểm dưới 3 đến 4 tháng. là $7,5 \pm 3,1$ TEQ pg/dl. Khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

Không có sự khác biệt về các chỉ số về chiều cao, cân nặng, chu vi vòng đầu và chu vi vòng ngực của trẻ tại hai khu vực tại các thời điểm nghiên cứu.

3.2. Nồng độ dioxin trong sữa mẹ

Bảng 3.3. So sánh nồng độ các đồng phân dioxin trong sữa những người mẹ ở Kim Bảng và Phù Cát

TEQ đồng phân dioxin (pg/g lipid)	Kim Bảng				Phù Cát				PC/KB	p
	n	Trung bình	SD	Trung vị	n	Trung bình	SD	Trung vị		
2,3,7,8-TeCDD	59	0,458	0,344	0,337	51	1,455	0,709	1,266	3,8	***
1,2,3,7,8-PeCDD	59	1,300	0,572	1,211	51	4,241	1,736	4,022	3,3	***
1,2,3,4,7,8-HxCDD	59	0,064	0,025	0,063	51	0,198	0,081	0,178	2,8	***
1,2,3,6,7,8-HxCDD	59	0,140	0,064	0,129	51	0,686	0,305	0,625	4,9	***
1,2,3,7,8,9-HxCDD	59	0,061	0,027	0,058	51	0,261	0,110	0,227	3,9	***
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	59	0,026	0,019	0,023	51	0,135	0,061	0,128	5,5	***
OCDD	59	0,004	0,002	0,003	51	0,021	0,009	0,019	5,9	***
2,3,7,8-TeCDF	59	0,068	0,029	0,066	51	0,063	0,032	0,061	0,9	>0,05
1,2,3,7,8-PeCDF	59	0,014	0,007	0,013	51	0,058	0,033	0,051	4,0	***
2,3,4,7,8-PeCDF	59	0,921	0,339	0,867	51	1,777	0,607	1,710	2,0	***
1,2,3,4,7,8-HxCDF	59	0,193	0,072	0,184	51	1,447	0,784	1,289	7,0	***
1,2,3,6,7,8-HxCDF	59	0,166	0,065	0,161	51	0,850	0,416	0,769	4,8	***
1,2,3,7,8,9-HxCDF	59	0,014	0,007	0,012	51	0,037	0,027	0,027	2,2	***
2,3,4,6,7,8-HxCDF	59	0,056	0,030	0,050	51	0,147	0,061	0,133	2,7	***
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	59	0,017	0,023	0,013	51	0,164	0,116	0,135	10,8	***
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	59	0,002	0,001	0,002	51	0,017	0,012	0,013	8,4	***
OCDF	59	0,000	0,000	0,000	51	0,000	0,001	0,000	3,7	***
Total PCDDs	59	2,053	0,910	1,849	51	6,997	2,715	6,563	3,5	***
Total PCDFs	59	1,451	0,495	1,319	51	4,561	1,835	4,304	3,3	***
Total PCDDs+PCDFs	59	3,505	1,356	3,140	51	11,558	4,079	11,039	3,5	***

Mức độ đương lượng độc của các đồng phân dioxin trong sữa những người mẹ ở Phù Cát cao hơn ở Kim Bảng. Khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Không có sự khác biệt về mức độ đương lượng độc của 2,3,7,8-TeCDF trong sữa những người mẹ ở 2 khu vực.

Bảng 3.4. So sánh nồng độ các đồng phân dioxin trong sữa những người mẹ những người mẹ sinh con đầu lòng và con thứ

TEQ đồng phân dioxin (pg/g lipid)	Mẹ sinh con đầu lòng				Mẹ sinh con thứ				ĐL/T	P
	n	Trung bình	SD	Trung vị	n	Trung bình	SD	Trung vị		
2,3,7,8-TeCDD	37	1,203	0,813	1,052	73	0,777	0,656	0,559	1,5	**
1,2,3,7,8-PeCDD	37	3,499	2,338	2,810	73	2,240	1,539	1,855	1,6	**
1,2,3,4,7,8-HxCDD	37	0,155	0,111	0,105	73	0,112	0,071	0,096	1,4	*
1,2,3,6,7,8-HxCDD	37	0,510	0,421	0,324	73	0,334	0,286	0,212	1,5	*
1,2,3,7,8,9-HxCDD	37	0,194	0,152	0,132	73	0,134	0,107	0,093	1,4	*
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	37	0,093	0,083	0,055	73	0,068	0,060	0,040	1,4	>0,05
OCDD	37	0,013	0,011	0,010	73	0,011	0,010	0,006	1,2	>0,05
2,3,7,8-TeCDF	37	0,064	0,030	0,059	73	0,067	0,030	0,065	1,0	>0,05
1,2,3,7,8-PeCDF	37	0,035	0,033	0,022	73	0,034	0,031	0,023	1,0	>0,05
2,3,4,7,8-PeCDF	37	1,632	0,675	1,512	73	1,158	0,568	0,992	1,4	***
1,2,3,4,7,8-HxCDF	37	0,933	0,886	0,412	73	0,694	0,785	0,286	1,3	*
1,2,3,6,7,8-HxCDF	37	0,574	0,470	0,335	73	0,437	0,429	0,220	1,3	*
1,2,3,7,8,9-HxCDF	37	0,029	0,025	0,016	73	0,023	0,021	0,015	1,3	>0,05
2,3,4,6,7,8-HxCDF	37	0,111	0,075	0,087	73	0,092	0,060	0,076	1,2	>0,05
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	37	0,097	0,106	0,051	73	0,080	0,110	0,020	1,2	>0,05
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	37	0,010	0,012	0,004	73	0,008	0,010	0,003	1,3	>0,05
OCDF	37	0,000	0,000	0,000	73	0,000	0,000	0,000	1,0	>0,05
Total PCDDs	37	5,668	3,805	4,138	73	3,675	2,545	3,150	1,5	**
Total PCDFs	37	3,487	2,179	2,688	73	2,592	1,887	1,916	1,3	**
Total PCDDs + PCDFs	37	9,154	5,846	7,080	73	6,268	4,212	5,064	1,5	**

Bảng 3.4 cho thấy nồng độ đương lượng độc của tổng các đồng phân dioxin trong sữa những người mẹ sinh con đầu lòng cao hơn những người mẹ sinh con thứ. Khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.

3.3. Nồng độ hormon steroid trong nước bọt

3.3.1. Nồng độ hormon steroid trong nước bọt của mẹ

Bảng 3.5. So sánh nồng độ các hormon steroid trong nước bọt của những người mẹ ở Kim Bảng và Phù Cát

Khu vực Hormon	Kim Bảng			Phù Cát			p		
	n	Trung bình	SD	Trung vị	n	Trung bình		SD	Trung vị
Cortisol (ng/ml)	36	1,76	1,10	1,74	38	2,95	2,06	2,56	<0,01
Cortison (ng/ml)	36	9,76	5,17	9,54	38	14,59	6,37	13,03	<0,01
DHEA (pg/ml)	36	130,41	74,28	124,0	38	204,39	121,32	160,0	<0,01
A-dion (pg/ml)	36	45,09	20,76	43,75	38	43,82	17,59	42,0	>0,05
Estradiol (pg/ml)	17	0,14	0,08	0,13	38	0,15	0,16	0,12	>0,05

Nồng độ hormon cortisol, cortison và DHEA trong nước bọt của người mẹ ở Phù Cát cao hơn những người mẹ ở Kim Bảng ($p < 0,01$). Không có sự khác biệt giữa nồng độ hormon androstenedion và estradiol trong nước bọt của những người mẹ ở 2 khu vực.

Bảng 3.6. So sánh nồng độ các hormon steroid trong nước bọt những người mẹ sinh con đầu lòng sau sinh 4-16 tuần ở Kim Bảng và Phù Cát.

Khu vực Hormon	Kim Bảng			Phù Cát			p		
	n	Trung bình	SD	Trung vị	n	Trung Bình		SD	Trung vị
Cortisol (ng/ml)	9	1,68	1,44	1,67	18	3,08	2,79	2,34	>0,05
Cortison (ng/ml)	9	8,93	6,87	8,47	18	14,99	7,45	13,03	>0,05
DHEA (pg/ml)	9	100,9	90,8	75,9	18	187,3	99,9	154,3	<0,05
A-dion (pg/ml)	9	49,80	28,47	49,35	18	43,58	18,31	41,35	>0,05
Estradiol (pg/ml)	5	0,20	0,09	0,20	18	0,14	0,15	0,11	>0,05

Nồng độ hormon DHEA trong nước bọt của người mẹ sinh con đầu lòng ở Phù Cát cao hơn ở Kim Bảng ($p < 0,05$).

Không có sự khác biệt về nồng độ hormon cortisol, cortison, androstenedion và estradiol trong nước bọt của những người mẹ sinh con đầu lòng ở 2 khu vực.

Bảng 3.7. So sánh nồng độ các hormon steroid trong nước bọt những người mẹ sinh con thứ sau sinh 4-16 tuần ở Kim Bảng và Phù Cát

Khu vực Hormon	Kim Bảng				Phù Cát				p
	n	Trung bình	SD	Trung vị	n	Trung bình	SD	Trung vị	
Cortisol (ng/ml)	27	1,81	1,03	1,89	20	3,03	1,40	3,23	<0,01
Cortison (ng/ml)	27	10,09	4,77	10,30	20	14,64	5,41	15,24	<0,05
DHEA (pg/ml)	27	136,90	68,93	141,00	20	214,69	144,54	153,00	>0,05
A-dion (pg/ml)	27	42,64	17,82	37,90	20	45,91	17,58	47,90	>0,05
Estradiol (pg/ml)	12	0,12	0,06	0,12	20	0,17	0,18	0,12	>0,05

Nồng độ hormon cortisol và cortison trong nước bọt của người mẹ sinh con thứ ở Phù Cát cao hơn ở Kim Bảng ($p < 0,01$). Không có sự khác biệt giữa nồng độ hormon DHEA, androstenedion và estradiol trong nước bọt của những người mẹ sinh con thứ ở 2 khu vực.

Bảng 3.8. So sánh nồng độ hormon steroid trong nước bọt của những người mẹ ở Kim Bảng và Phù Cát sau 1 năm cho con bú.

Khu vực Hormon	Kim Bảng				Phù Cát				p
	n	Trung bình	SD	Trung vị	n	Trung bình	SD	Trung vị	
Cortisol (ng/ml)	58	1,41	1,01	1,10	50	2,48	1,58	1,97	<0,001
Cortison (ng/ml)	58	8,08	3,32	7,74	50	11,89	4,58	10,99	<0,001
DHEA (pg/ml)	58	148,83	67,19	133,75	49	170,30	86,44	154,70	>0,05
A-dion (pg/ml)	58	63,29	31,97	55,45	50	61,75	32,40	55,05	>0,05
Estradiol (pg/ml)	58	0,29	0,30	0,18	50	0,34	0,33	0,22	>0,05
Estron (pg/ml)	58	1,35	1,31	0,85	50	1,55	1,42	1,14	>0,05

Nồng độ trung bình của hormon cortisol và cortison trong nước bọt của người mẹ ở Phù Cát cao hơn ở Kim Bảng ($p < 0,001$). Nồng độ hormon DHEA, androstenedion, estradiol và estron trong nước bọt của những người mẹ sau một năm cho con bú ở Phù Cát và Kim Bảng là không có sự khác biệt mang nghĩa thống kê.

Bảng 3.9. So sánh nồng độ hormon steroid trong nước bọt người mẹ sinh con đầu lòng ở Kim Bảng và Phù Cát sau 1 năm cho con bú.

Khu vực Hormon	Kim Bảng				Phù Cát				p
	n	Trung bình	SD	Trung vị	n	Trung bình	SD	Trung vị	
Cortisol (ng/ml)	16	1,41	0,84	1,13	20	2,43	1,44	1,97	<0,05
Cortison (ng/ml)	16	8,36	3,25	8,42	20	12,38	4,11	11,59	<0,01
DHEA (pg/ml)	16	131,51	59,31	115,40	20	188,25	90,34	184,00	>0,05
A-dion (pg/ml)	16	71,62	51,31	52,95	20	65,75	38,01	57,65	>0,05
Estradiol (pg/ml)	16	0,31	0,25	0,27	20	0,40	0,41	0,26	>0,05
Estron (pg/ml)	16	1,56	1,70	0,94	20	1,83	1,92	1,12	>0,05

Nồng độ hormon cortisol và cortisone trong nước bọt ở người mẹ sinh con đầu lòng tại Phù Cát cao hơn những người mẹ sinh con đầu lòng ở Kim Bảng ($p < 0,05$). Không có sự khác biệt giữa nồng độ hormon DHEA, androstenedion estradiol và estron trong nước bọt của những người mẹ sinh con đầu lòng ở 2 khu vực.

Bảng 3.10. So sánh nồng độ hormon steroid trong nước bọt những người mẹ sinh con thứ ở Kim Bảng và Phù Cát sau 1 năm cho con bú.

Khu vực Hormon	Kim Bảng				Phù Cát				p
	n	Trung bình	SD	Trung vị	n	Trung bình	SD	Trung vị	
Cortisol (ng/ml)	42	1,41	1,07	1,10	30	2,51	1,69	1,97	<0,01
Cortison (ng/ml)	42	7,97	3,38	7,66	30	11,57	4,92	10,61	<0,01
DHEA (pg/ml)	42	155,42	69,48	140,90	29	157,92	82,96	144,10	>0,05
A-dion (pg/ml)	42	60,12	20,50	55,45	30	59,08	28,44	52,35	>0,05
Estradiol (pg/ml)	42	0,29	0,32	0,15	30	0,29	0,25	0,21	>0,05
Estron (pg/ml)	42	1,27	1,14	0,84	30	1,37	0,95	1,20	>0,05

Sau một năm cho con bú, nồng độ hormon cortisol và cortison trong nước bọt của người mẹ sinh con thứ ở Phù Cát cao hơn ở Kim Bảng ($p < 0,01$). Không có sự khác biệt giữa nồng độ hormon DHEA, androstenedion, estradiol và estron trong nước bọt của những người mẹ sinh con thứ ở hai khu vực.

3.3.2. Nồng độ hormon steroid trong nước bọt của trẻ tại thời điểm 3 tuổi

Bảng 3.11. So sánh nồng độ hormon steroid trong nước bọt của trẻ ở Kim Bảng và Phù Cát

Khu vực Hormon	Kim Bảng				Phù Cát				p
	n	Trung bình	SD	Trung vị	n	Trung bình	SD	Trung vị	
Cortisol (ng/ml)	59	3,33	1,94	2,95	51	3,86	2,88	2,86	>0,05
Cortison (ng/ml)	59	0,62	0,76	0,38	51	0,61	0,53	0,45	>0,05
DHEA (pg/ml)	57	83,30	48,83	73,00	50	45,30	28,58	37,50	<0,001

Nồng độ hormon DHEA trong nước bọt của trẻ ở Phù Cát thấp hơn ở Kim Bảng, khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Không có sự khác biệt giữa nồng độ hormon cortisol và cortison trong nước bọt của trẻ ở Phù Cát so với ở Kim Bảng.

3.4. Nồng độ hormon steroid trong sữa và huyết thanh của mẹ

3.4.1. Nồng độ hormon steroid trong sữa mẹ

Bảng 3.12. So sánh nồng độ hormon steroid trong sữa những người mẹ ở Kim Bảng và Phù Cát

Khu vực Hormon	Kim Bảng				Phù Cát				p
	n	Trung bình	SD	Trung vị	n	Trung bình	SD	Trung vị	
Cortisol (ng/ml)	35	1,92	1,61	1,52	35	3,36	2,24	3,31	<0,01
Cortison (ng/ml)	35	7,52	3,30	7,55	35	8,99	2,44	8,65	<0,05
A-dion (pg/ml)	35	246,69	142,36	209,40	34	218,66	133,71	190,50	>0,05
Estradiol (pg/ml)	35	0,12	0,15	0,07	34	0,11	0,16	0,07	>0,05

Nồng độ hormon cortisol và cortison trong sữa những người mẹ ở Phù Cát cao hơn những người mẹ ở Kim Bảng. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ hormon androstenedion và estradiol trong sữa những người mẹ ở 2 khu vực.

Bảng 3.13. So sánh nồng độ hormon steroid trong sữa những người mẹ sinh con đầu lòng ở Kim Bảng và Phù Cát

Khu vực Hormon	Kim Bảng				Phù Cát				P
	n	Trung bình	SD	Trung vị	n	Trung bình	SD	Trung vị	
Cortisol (ng/ml)	8	1,78	1,69	1,32	14	3,41	2,78	2,21	>0,05
Cortison (ng/ml)	8	6,41	4,76	6,44	14	8,38	2,53	8,15	>0,05
A-dion (pg/ml)	8	210,6	112,5	237,7	14	172,4	85,81	171,7	>0,05
Estradiol (pg/ml)	8	0,14	0,12	0,09	14	0,09	0,07	0,07	>0,05

Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ hormon cortisol, cortison, androstenedion và estradiol trong sữa những người mẹ sinh con đầu lòng ở Phù Cát so với ở Kim Bảng.

Bảng 3.14. So sánh nồng độ các hormon steroid trong sữa những người mẹ sinh con thứ ở Kim Bảng và Phù Cát

Khu vực Hormon	Kim Bảng				Phù Cát				P
	n	Trung bình	SD	Trung vị	n	Trung bình	SD	Trung vị	
Cortisol (ng/ml)	26	2,01	1,62	1,54	18	3,19	1,86	3,45	<0,05
Cortison (ng/ml)	26	7,95	2,77	7,77	18	9,25	2,34	9,48	>0,05
A-dion (pg/ml)	26	253,08	151,53	207,00	17	256,46	160,27	239,40	>0,05
Estradiol (pg/ml)	26	0,12	0,16	0,04	17	0,13	0,23	0,07	>0,05

Nồng độ hormon cortisol trong sữa những người mẹ sinh con thứ ở Phù Cát cao hơn so với ở Kim Bảng. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ hormon cortison, androstenedion và estradiol trong sữa những người mẹ sinh con thứ ở Phù Cát so với ở Kim Bảng.

3.4.2. Nồng độ hormon steroid trong huyết thanh của mẹ tại thời điểm sau một năm cho con bú

Bảng 3.15. So sánh nồng độ hormon steroid trong huyết thanh của mẹ ở Kim Bảng và Phù Cát

Khu vực Hormon	Kim Bảng				Phù Cát				P
	n	Trung bình	SD	Trung vị	n	Trung bình	SD	Trung vị	
Cortisol (ng/ml)	58	78,54	37,07	66,25	50	114,28	52,81	96,70	<0,001
Cortison (ng/ml)	58	22,35	6,92	21,95	50	27,57	6,30	27,55	<0,001
DHEA (pg/ml)	58	4805,32	2090,86	4446,35	50	5042,99	2614,83	4504,65	>0,05
A-dion (pg/ml)	58	1799,58	745,46	1649,80	50	1611,81	784,76	1463,65	>0,05
Estradiol (pg/ml)	58	39,78	49,93	21,90	50	34,39	36,05	19,35	>0,05
Estron (pg/ml)	58	39,92	36,72	26,20	50	29,89	25,09	21,55	>0,05

Sau một năm cho con bú, nồng độ hormon cortisol và cortison trong huyết thanh của người mẹ ở Phù Cát cao hơn so với những người mẹ ở Kim Bảng. Không có sự khác biệt giữa nồng độ các hormon steroid còn lại giữa 2 khu vực.

Bảng 3.16. So sánh nồng độ hormon steroid trong huyết thanh người mẹ sinh con đầu lòng ở Kim Bảng và Phù Cát

Khu vực Hormon	Kim Bảng				Phù Cát				P
	n	Trung bình	SD	Trung vị	n	Trung bình	SD	Trung vị	
Cortisol (ng/ml)	16	77,67	37,37	73,45	20	112,77	54,00	96,10	<0,05
Cortison (ng/ml)	16	21,78	5,65	21,95	20	29,93	5,73	29,15	<0,001
DHEA (pg/ml)	16	4670,28	2086,34	4507,10	20	5366,45	2641,46	4832,05	>0,05
A-dion (pg/ml)	16	2011,19	1127,11	1610,00	20	1720,26	845,61	1527,10	>0,05
Estradiol (pg/ml)	16	43,62	38,98	30,15	20	35,76	33,03	21,30	>0,05
Estron (pg/ml)	16	49,75	45,38	27,60	20	28,68	24,31	20,90	>0,05

Nồng độ trung bình của hormon cortisol và cortison trong huyết thanh của người mẹ sinh con đầu lòng ở Phù Cát cao hơn so với những người mẹ ở Kim Bảng. Khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

Không có sự khác biệt giữa nồng độ các hormon DHEA, androstenedion, estradiol và estron trong huyết thanh của người mẹ sinh con đầu lòng giữa 2 khu vực.

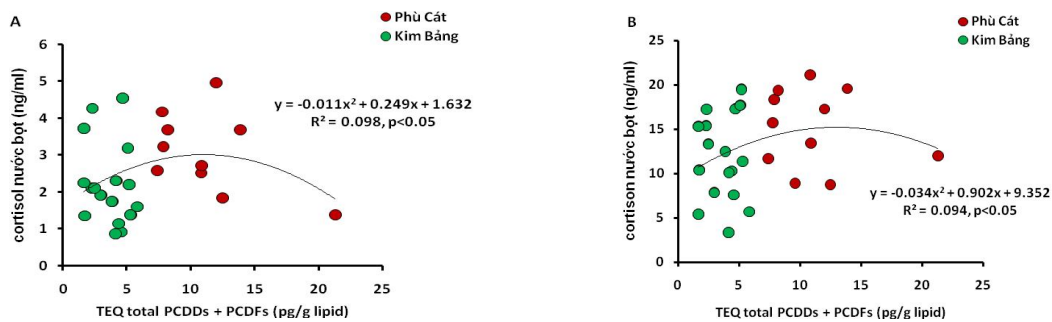
3.5. Tỷ lệ nồng độ hormon steroid trong nước bọt và huyết thanh của mẹ sau một năm cho con bú

Bảng 3.17. So sánh tỷ lệ nồng độ các hormon steroid trong nước bọt và huyết thanh của mẹ ở Kim Bảng và Phù Cát tại thời điểm sau một năm cho con bú

Khu vực Hormon	Kim Bảng		Phù Cát		p
	n	Tỷ lệ	n	Tỷ lệ	
Cortisol	58	1,71±0,66	50	2,26±0,94	<0,01
Cortison	58	35,8±10,3	50	45,2±16,8	<0,01
DHEA	58	3,25±1,12	49	4,08±2,84	>0,05
Androstenedion	58	3,48±0,57	50	4,41±2,43	<0,05
Estradiol	58	0,90±0,39	50	1,52±2,13	<0,05
Estron	58	3,66±1,91	50	6,94±6,78	<0,001

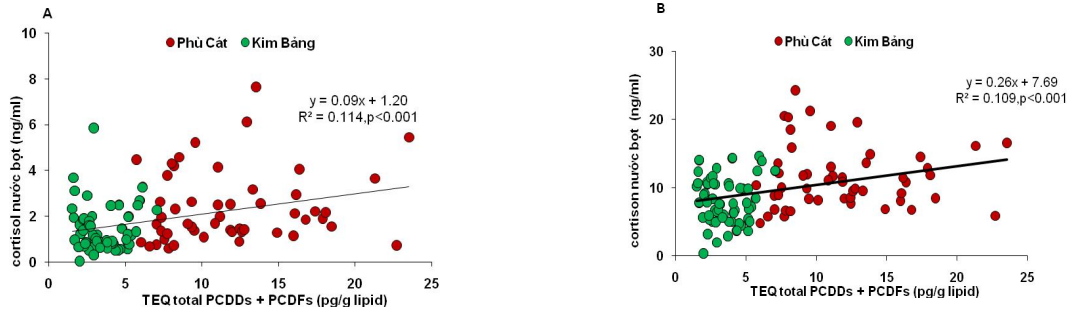
Tỷ lệ nồng độ hormon cortisol, cortisone, androstenedion, estradiol và estron trong nước bọt và trong huyết thanh của người mẹ ở Phù Cát cao hơn những người mẹ ở Kim Bảng. Không có sự khác biệt về tỷ lệ về nồng độ hormon DHEA trong nước bọt và huyết thanh của người mẹ giữa 2 khu vực.

3.6. Mối tương quan giữa nồng độ dioxin trong sữa với nồng độ hormon steroid



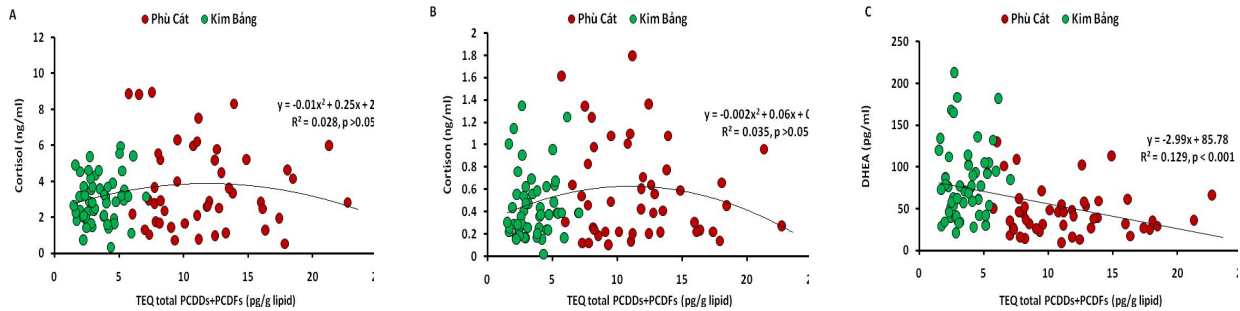
Biểu đồ 3.1. Tương quan giữa nồng độ dioxin trong sữa với nồng độ cortisol (A) và cortison (B) trong nước bọt của người mẹ sinh con đầu lòng sau 4-16 tuần

Có mối tương quan phi tuyến dạng hình chuông ($p < 0,05$) giữa nồng độ hormon cortisol (A) và cortison (B) trong nước bọt với nồng độ dioxin trong sữa của những người mẹ sinh con đầu lòng.



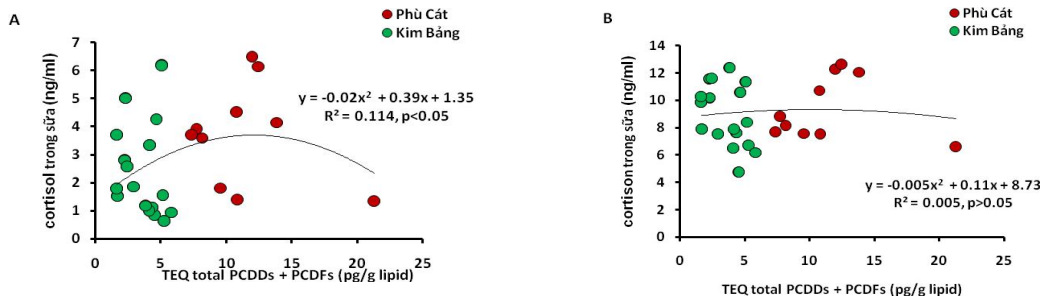
Biểu đồ 3.2. Tương quan giữa nồng độ dioxin trong sữa với nồng độ cortisol (A) và cortison (B) trong nước bọt của mẹ sau 1 năm cho con bú

Có mối tương quan tuyến tính thuận ($p < 0,01$) giữa nồng độ hormon cortisol (A) và cortison (B) trong nước bọt với nồng độ dioxin trong sữa của những người mẹ sau một năm cho con bú.



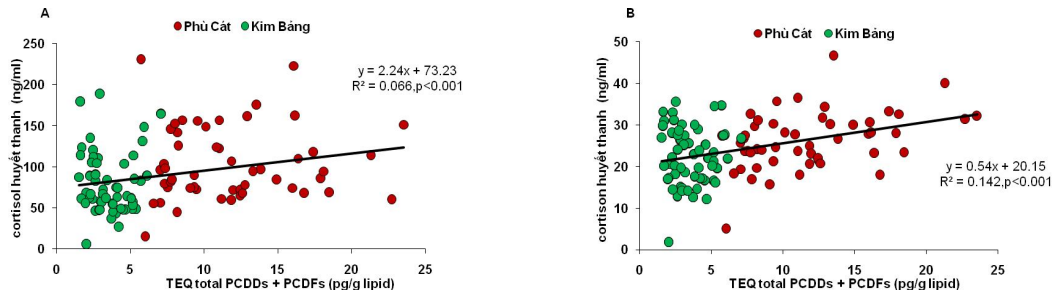
Biểu đồ 3.3. Tương quan giữa nồng độ dioxin trong sữa mẹ với nồng độ cortisol (A), cortison (B) và DHEA (C) trong nước bọt của trẻ 3 tuổi.

Có mối tương quan tuyến tính nghịch ($r^2 = 0,129$ và $p < 0,001$) giữa nồng độ hormon DHEA trong nước bọt của con với mức độ dioxin trong sữa mẹ. Mối tương quan phi tuyến giữa nồng độ dioxin trong sữa mẹ với nồng độ hormon cortisol (A) với $r^2 = 0,028$; $p > 0,05$ hoặc cortison (B) với $r^2 = 0,035$; $p > 0,05$ trong nước bọt của trẻ 3 tuổi.



Biểu đồ 3.4. Tương quan giữa nồng độ dioxin với nồng độ cortisol (A) và cortison (B) trong sữa mẹ.

Có mối tương quan phi tuyến dạng hình chuông hình chuông giữa nồng độ hormon cortisol (A) ($r^2 = 0,114$) và cortison ($r^2 = 0,005$) trong sữa với mức độ dioxin trong sữa những người mẹ sinh con đầu lòng.



Biểu đồ 3.5. Tương quan giữa nồng độ dioxin trong sữa mẹ với nồng độ cortisol (A) và cortison (B) trong huyết thanh của mẹ.

Có mối tương quan tuyến tính thuận giữa nồng độ dioxin trong sữa với nồng độ hormon cortisol (A) và cortison (B) huyết thanh của mẹ sau một năm cho con bú

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm chung

4.1.1. Đặc điểm của khu vực nghiên cứu

Khu vực chủ cứu là các khu dân cư sống ở xung quanh khu vực sân bay quân sự Phù Cát thuộc tỉnh Bình Định, là một trong ba điểm nóng dioxin ở Việt Nam. Trong giai đoạn 1961 – 1972, sân bay quân sự Phù Cát là nơi tập kết và lưu trữ một lượng lớn các hóa chất diệt cỏ mà đặc biệt là chất da cam trong đó có tạp nhiễm một lượng lớn các thành phần dioxin. Các hóa chất này đã bị đổ tràn và rò rỉ vào môi trường xung quanh, bên cạnh đó là các hoạt động tẩy rửa kho bãi, phun rửa máy bay và các phương tiện khác sau khi đã thực hiện xong các phi vụ phun rải hóa chất.

Khu vực đối chứng là một địa bàn thuần nông, dân cư ổn định, không có các khu công nghiệp hóa học để có thể gây ô nhiễm môi trường tại khu vực này. Đặc biệt đây là khu vực hoàn toàn không bị phun rải và các hoạt động tẩy rửa chất diệt cỏ trong thời kỳ chiến tranh

4.1.2. Đặc điểm của đối tượng nghiên cứu

Độ tuổi trung bình của những người mẹ ở khu vực Phù Cát và Kim Bảng đều ở độ tuổi thuận lợi cho việc sinh con và nuôi con bằng sữa mẹ. Không có sự khác biệt về các chỉ số về chiều cao, cân nặng và BMI của những người mẹ ở hai khu vực nghiên cứu.

Thời gian cư trú tại khu vực nghiên cứu của những người mẹ tại khu vực nghiên cứu đều trên 20 năm. Theo tác giả Schechter và cộng sự với thời gian trên 5 năm là thời gian đủ để đánh giá nguy cơ phơi nhiễm với dioxin có trong thực phẩm và môi trường.

Đối với trẻ em thì các chỉ số về chiều cao, chỉ số cân nặng, chu vi vòng đầu và chu vi vòng ngực là không có sự khác biệt. Trong khi mức độ dioxin hấp thụ hàng ngày qua sữa mẹ của trẻ ở Phù Cát cao hơn gấp 3 lần so với trẻ ở khu vực Kim Bảng. Những kết quả này của chúng tôi cũng phù hợp với tác giả Huệ N.T và cộng sự khi nghiên cứu về những ảnh hưởng của dioxin đối với trẻ em ở khu vực Đà Nẵng.

4.2. Nồng độ dioxin trong sữa mẹ

Sau hơn 40 năm kể từ khi cuộc chiến tranh hóa học ở Việt Nam kết thúc nồng độ dioxin trong sữa những người mẹ sống ở khu vực xung quanh sân bay Phù Cát vẫn còn cao hơn so với khu vực đối chứng Kim Bảng nhiều lần. Cụ thể là, nồng độ trung bình của hầu hết các đồng phân dioxin trong sữa những người mẹ ở Phù Cát cao hơn những người mẹ ở Kim Bảng. Nồng độ trung bình của tổng đương lượng dioxin TEQ PCDDs+PCDFs trong sữa người mẹ ở Phù Cát là 11,558 pg/g lipid cao gấp 3,5 lần những người mẹ ở Kim Bảng với 3,505 pg/g lipid. Nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu tương tự ở Seveso sau 30 năm kể từ khi vụ tai nạn nhà máy hóa chất xảy ra làm phát tán một lượng dioxin vào khu vực dân cư xung quanh. Nghiên cứu này chỉ ra nồng độ dioxin trong huyết thanh của những phụ nữ trong khu vực bị phơi nhiễm dioxin cao gấp 5 lần so với một khu vực đối chứng.

4.3. Nồng độ hormon steroid trong nước bọt

4.3.1. Nồng độ hormon steroid trong nước bọt của mẹ

Nồng độ hormon steroid trong nước bọt phản ánh mức độ lưu hành của hormon steroid ở dạng tự do trong cơ thể và tỷ lệ thuận với nồng độ hormon steroid trong huyết thanh. Kết nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra rằng, nồng độ hormon cortisol và cortison trong nước bọt của người mẹ ở khu vực Phù Cát cao hơn ở khu vực Kim Bảng. Đặc biệt là tồn tại mô hình liều phản ứng giữa mức độ dioxin và hormon thể hiện rõ hơn thông qua mối tương quan hình chuông giữa dioxin và hormon cortisol hay cortison ở những người mẹ sinh con đầu lòng ở giai đoạn đầu cho con bú. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu thực nghiệm cho thấy nồng độ corticosteron huyết thanh ở chuột giảm thấp hoặc tăng cao khi tiếp xúc với dioxin ở các liều khác nhau.

Bên cạnh đó, nồng độ hormon DHEA trong nước bọt của người mẹ ở Phù Cát trong giai đoạn đầu cho con bú, đặc biệt là những người mẹ sinh con đầu lòng ở Phù Cát cao hơn so với người mẹ ở Kim Bảng trong khi với mức độ thấp hơn của dioxin ở những người mẹ sinh con thứ lại không

tăng hormon này. Điều đó chứng tỏ ở mức độ cao dioxin sẽ kích thích lớp lưới của vỏ thượng thận tăng bài tiết hormon DHEA. Do tuyến thượng thận là nơi tích lũy một lượng lớn dioxin và PCBs do đặc tính ưa lipid của dioxin trong cơ thể nên mức độ và tỷ lệ của hormon DHEA tổng hợp trong tuyến thượng thận được quy định bởi nồng độ hormon kích vỏ thượng thận ACTH do tác động của dioxin.

Trong khi đó không có sự khác nhau giữa nồng độ hormon androstenedion hay estradiol và estron trong nước bọt của người mẹ ở Phù Cát so với những người mẹ ở Kim Bảng. Nhóm các hormon này ở người trưởng thành chủ yếu được tổng hợp ở buồng trứng đối với nữ giới và ở tinh hoàn đối với nam giới, còn lại một phần được tổng hợp ở vỏ thượng thận. Do đặc điểm như vậy nên sự thay đổi nồng độ các hormon này chính là sự phản ánh những tác động của dioxin đối với những cơ quan tổng hợp. Các kết quả khác nhau này đã làm nổi bật sự phức tạp bởi các hiệu ứng của dioxin đối với hệ thống nội tiết, đặc biệt là khi hiệu ứng tác động này lại phụ thuộc vào mức độ dioxin và thời gian tác động.

4.3.2. Nồng độ hormon steroid trong nước bọt của con

Tại thời điểm trẻ 3 tuổi thì gánh nặng dioxin trong cơ thể trẻ ở Phù Cát lớn hơn nhiều lần so với trẻ ở Kim Bảng do việc tiếp nhận một lượng dioxin trong sữa mẹ cao gấp 3 lần ước tính tại thời điểm 3 đến 4 tháng đầu, ngoài ra trẻ còn liên tục tiếp nhận một lượng dioxin có trong môi trường sống và chế độ ăn hàng ngày. Mức độ cao của nồng độ dioxin trong cơ thể trẻ sẽ tác động đối với tuyến vỏ thượng thận bài tiết hormon cortisol và cortison như một đáp ứng liều hình chữ U ngược.

Hormon DHEA ở trẻ chỉ được tổng hợp tại lớp lưới của vỏ thượng thận trong khi ở những người mẹ thì hormon này còn được tổng hợp ở buồng trứng. Với nồng độ dioxin cao sẽ gây ức chế hoạt động của enzym CYP17 lyase trên cả 2 chức năng hydroxyl hóa (17 lyase) và phân cắt (20 lyase), ở liều thấp hơn lại kích thích sự hoạt động của những enzym này trong quá trình tổng hợp androgen vỏ thượng thận. Do những đặc điểm như vậy dẫn đến làm giảm nồng độ hormon DHEA ở trẻ em.

4.4. Nồng độ hormon steroid trong sữa và huyết thanh của mẹ

4.4.1. Nồng độ hormon steroid trong sữa mẹ tại thời điểm con từ 4 đến 16 tuần tuổi nồng độ hormon cortisol trong sữa những người mẹ ở Phù Cát cao hơn ở Kim Bảng, những người mẹ này bao gồm cả những người sinh con đầu lòng và sinh con thứ hoặc nhóm chỉ gồm những người mẹ sinh con thứ. Trong khi đó lại không có sự khác biệt giữa nồng độ hormon cortisol

trong sữa ở nhóm những người mẹ sinh con đầu lòng giữa 2 khu vực, mặc dù mức độ trung bình của dioxin trong sữa những người mẹ sinh con đầu lòng cao hơn người mẹ sinh con thứ.

4.4.2. Nồng độ hormon steroid trong huyết thanh của mẹ tại thời điểm sau một năm cho con bú

Tương tự như nồng độ hormon steroid trong nước bọt, sau một năm cho con bú nồng độ hormon cortisol và cortison trong huyết thanh những người mẹ ở Phù Cát cao hơn những người mẹ ở Kim Bảng đối với nhóm gồm tổng số những người mẹ tham gia nghiên cứu và nhóm chỉ gồm những người mẹ sinh con đầu lòng. Trong khi đó ở nhóm những người mẹ sinh con thứ lại không có sự khác biệt giữa nồng độ hormon cortison trong huyết thanh của người mẹ giữa 2 khu vực.

Lúc này một lượng đáng kể dioxin đã được đào thải khỏi cơ thể người mẹ thông qua việc cho con bú, dẫn đến giảm bớt gánh nặng của dioxin đối với tuyến vỏ thượng thận và khi đó ở mức độ dioxin thấp hơn sẽ kích thích tuyến vỏ thượng thận tăng bài tiết hormon cortisol và cortison.

Những phát hiện này cho thấy dioxin có thể trực tiếp ảnh hưởng đến tuyến thượng thận thông qua vai trò của thụ thể ACTH trên bề mặt tế bào vỏ thượng thận dẫn đến thay đổi mức độ tổng hợp các hormon steroid.

4.5. Tỷ lệ nồng độ hormon steroid trong nước bọt và huyết thanh của người mẹ sau một năm cho con bú

Tỷ lệ của mỗi loại hormon steroid trong nước bọt và trong huyết thanh của người mẹ ở khu vực điểm nóng dioxin Phù Cát đều cao hơn ở Kim Bảng. Những tỷ lệ này cao hơn có thể liên quan đến bất kỳ một trong những tác động phức tạp của phơi nhiễm dioxin về sự gián đoạn nội tiết. Nói cách khác, dioxin có thể có ảnh hưởng đến liên kết của protein với các steroid, có thể ảnh hưởng đến các protein liên kết ái lực cao như corticoid globulin (CBG) và hormon giới tính ràng buộc globulin (SHBG) và cũng có thể ảnh hưởng đến sự cân bằng tự nhiên của sự lưu thông hormon.

4.6. Mối liên quan giữa nồng độ dioxin trong sữa với nồng độ hormon steroid

Mối liên quan giữa nồng độ dioxin trong sữa với nồng độ hormon steroid của mẹ và con phản ánh sự tác động phức tạp của mô hình đáp ứng liều giữa dioxin đối với hormon steroid.

Ở những người mẹ sinh con đầu lòng trong giai đoạn đầu cho con bú, do hàm lượng dioxin trong cơ thể mẹ còn cao nên sự tác động của dioxin đến tổng hợp hormon steroid vỏ thượng thận có mối tương quan hình chuông

thể hiện một mô hình liều phản ứng giữa dioxin và hormon vỏ thượng thận. Tại thời điểm sau một năm cho con bú khi mức độ dioxin trong cơ thể đã giảm đáng kể do đào thải qua sữa thì sự tác động là dạng kích thích tổng hợp thể hiện qua mối tương quan tuyến tính thuận giữa mức độ dioxin trong sữa với hormon cortisol và cortison.

Đối với trẻ em 3 tuổi là con của những người mẹ này cũng thể hiện mô hình đáp ứng liều giữa nồng độ dioxin trong sữa mẹ với nồng độ hormon cortisol và hormon cortison trong nước bọt của trẻ. Trong khi đó, tương quan giữa hormon DHEA ở trẻ với nồng độ dioxin trong sữa mẹ là tương quan tuyến tính nghịch đây là sự phản ánh mức độ cao dioxin động trực tiếp đến tuyến thượng thận gây ức chế bài tiết ACTH và gây giảm bài tiết DHEA.

KẾT LUẬN

1. Nồng độ dioxin trong sữa của những người mẹ sống tại Phù Cát - Bình Định

Nồng độ dioxin trong sữa những người mẹ ở Phù Cát là $11,558 \pm 4,079$ pg/g lipid cao hơn gấp 3,5 lần so với những người mẹ ở Kim Bảng. Các đồng phân dioxin trong sữa mẹ ở Phù Cát đều cao hơn ở Kim Bảng với $p < 0,001$.

Nồng độ dioxin trong sữa những người mẹ sinh con đầu lòng là $9,154 \pm 5,846$ pg/g lipid cao hơn những người mẹ sinh con thứ khoảng 1,5 lần với $p < 0,01$.

2. Nồng độ hormon steroid trong nước bọt của mẹ và con, trong sữa và huyết thanh của người mẹ sống tại Phù Cát - Bình Định

2.1. Nồng độ hormone steroid trong nước bọt của mẹ

Tại thời điểm sau 4 đến 16 tuần cho con bú: Nồng độ hormon cortisol, cortison và DHEA trong nước bọt của những người mẹ ở Phù Cát cao hơn so với ở Kim Bảng ($p < 0,01$).

Sau một năm cho con bú: Nồng độ hormon cortisol và cortison trong nước bọt của những người mẹ ở Phù Cát cao hơn những người mẹ ở Kim Bảng ($p < 0,01$).

2.2. Nồng độ hormon steroid trong nước bọt của con

Nồng độ hormon DHEA trong nước bọt của trẻ 3 tuổi ở Phù Cát là $45,30 \pm 28,58$ pg/ml thấp hơn trẻ ở Kim Bảng với nồng độ DHEA trung bình là $83,30 \pm 48,83$ pg/ml. Khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

Không có sự biệt về nồng độ các hormon cortisol và cortison trong nước bọt của trẻ em 3 tuổi ở 2 khu vực.

2.3. Nồng độ hormon steroid trong sữa mẹ

Nồng độ hormon cortisol và cortison trong sữa của những người mẹ ở Phù Cát cao hơn so với những người mẹ ở Kim Bảng.

Không có sự khác biệt về nồng độ các hormon androstenedion và estradiol trong sữa của những người mẹ ở 2 khu vực.

2.4. Nồng độ hormon steroid trong huyết thanh của mẹ

Nồng độ hormon cortisol và cortison trong huyết thanh của những người mẹ sau một năm cho con bú ở Phù Cát cao hơn những người mẹ ở Kim Bảng. Khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

Không có sự khác biệt về nồng độ các hormon DHEA, androstenedion, estradiol và estron trong huyết thanh của những người mẹ ở 2 khu vực.

3. Tương quan giữa nồng độ hormon steroid trong nước bọt, sữa và huyết thanh với nồng độ dioxin trong sữa của những người mẹ.

Tại thời điểm từ 4 đến 16 tuần cho con bú, có mối tương quan phi tuyến dạng hình chuông giữa dioxin trong sữa với hormon cortisol và cortison trong nước bọt ; với nồng độ hormon cortisol trong sữa của những người mẹ sinh con đầu lòng.

Sau một năm cho con bú có sự tương quan tuyến tính thuận giữa nồng độ dioxin trong sữa với nồng độ hormon cortisol và cortison trong nước bọt và huyết thanh của mẹ.

Có mối tương quan tuyến tính nghịch giữa nồng độ hormon DHEA trong nước bọt của trẻ 3 tuổi với hàm lượng dioxin trong sữa của người mẹ với $r^2 = 0,129$ và $p < 0,001$.

Có sự tương thuận khá chặt chẽ mang ý nghĩa thống kê giữa nồng độ các hormon steroid trong nước bọt với nồng độ hormon trong sữa và huyết thanh.

KIẾN NGHỊ

Đề tài cần được nghiên cứu thêm để tiếp tục theo dõi và đánh giá tình trạng rối loạn nội tiết cụ thể là nhóm hormon vỏ thượng và sinh dục gây ra bởi dioxin ở những người dân sống tại vùng ô nhiễm, đặc biệt là trẻ em.

BACKGROUND

Dioxin is known as risk factor of various kinds of adverse health effects including cancer, diabetes mellitus and cardiovascular disease. Hormone

levels are also known to be altered by low-dose exposure to TCDD, and foetal death can occur after high- dose exposure. The use of Chemical Warfare in Vietnam ended nearly 45 years ago (1961-1972), but dioxin levels remain elevated inside some former U.S. military air bases, known as hot-spots. Such dioxin exposure is threatening the health of residents living around these areas. We have studied lactating mothers and infants from a dioxin hot-spot area as Phu Cat that was exposed to chemical herbicides during the Vietnam War. The aim of this study is to quantitate dioxin level in breast milk and steroid hormones concentration and also to elucidate the association of dioxin exposure with steroid hormone levels in the saliva, breast milk and serum of women and their infants.

OBJECTIVES

The study “**Research the alteration of steroid hormone concentrations in saliva, milk and serum on those living in exposed areas to Agent Orange/dioxin in Vietnam**” was carried out with the following objectives:

1. Determining the dioxin levels in maternal breast milk in Phu Cat, Binh Dinh.
2. Determining the steroid hormone levels in saliva, breast milk and serum of lactating mothers in Phu Cat, Binh Dinh.
3. Finding the correlation between the steroid hormone levels in saliva, breast milk and serum with dioxin levels in breast milk of lactating mothers.

URGENT NATURE OF THE STUDY

Dioxin is known as a risk factor of various kinds of adverse health effects including cancer, diabetes mellitus and also disorders endocrine immune. Hormone levels are also known to be altered by low-dose exposure to TCDD, and foetal death can occur after high- dose exposure. The aim of this study was to determined the dioxin levels in maternal breast milk and the steroid hormone levels in saliva, breast milk and serum of lactating mothers and their infants who living in dioxin hot-spot.

These results have shown the levels of 17 dioxin isomer in maternal breast milk were higher in hot-spots than in control area; the cortisol and cortisone levels in saliva, breast milk and serum were found to be significantly higher in the dioxin hot-spot than in the control area. The

salivary DHEA level after birth from 4 to 16 weeks was significantly higher in the dioxin hot-spot than in the control area while in children this hormone is lower than the control area. We have already shown that found the inverted U-shaped relationship between dioxins in breast milk and cortisol or cortisone in saliva and also in breast milk.

There were significant and positive correlations between hormone cortisol or cortisone in saliva or serum and breast milk dioxin levels after breastfeeding one year. There was significant and negative correlations between salivary DHEA in infant 3 years of age and breast milk dioxin levels. Most previous studies on effect of dioxin levels are related to the impact of dioxin on reproductive system which were collected from adults. This is the first study found that dioxin causes inhibition of the synthesis DHEA on infant.

NEW CONTRIBUTIONS FROM THE THESIS

Although 45 years have passed after the end of the chemical war with code name Operation Ranch Hand, the amount of dioxin residues are still high in the soil of environment and body fluid of living people in hot-spot. Dioxin levels in breast milk were 3 - 4 times higher in Phu Cat than those in an control area as Kim Bang. These studies suggest that the dioxin burden in humans continues in the long term after environmental exposure as the alteration of steroid hormone concentrations as increased cortisol, cortisone and DHEA concentrations in lactating mothers; decreased DHEA concentration in salivary infants 3 years of age.

THESIS OUTLINE

This thesis covers 120 pages, including: preamble (2 pages), the overview (36 pages), materials and method (14 pages), results (30 pages), discussion (27 pages), conclusion (4 page), petition (1 page). It consists of 25 tables, 10 charts, 6 diagram, 13 figures and 196 references (5 in Vietnamese and 191 in English).

Chapter 1. Overview	41 page
Chapter 2. Materials and method	14 page
Chapter 3. Results	31 page
Chapter 4. Discussion	31 page

Chapter 1: OVERVIEW

Dioxin is one of the most toxic chemical substances known and is a persistent environmental contaminant. Dioxins are unwanted by-products of industrial and combustion processes.

During the Vietnam war (1961–1971), the US Air Force sprayed over 80 million litres of chemical herbicides on southern battlefields for general defoliation and crop destruction as part of program known as Operation Ranch Hand. This chemical herbicide comprised a 50/50 mixture of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T). Unfortunately, the 2,4,5-T component of Agent Orange was contaminated with highly toxic 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin . TCDD has been termed the most toxic man-made chemical on the planet. There are also species-specific differences in dioxin half-life in animals and humans. Thus, whereas Kreuzer et al. have estimated that the half-life of dioxin in human adults is 7–11 years, this value is strongly age-related, with the half-life in children being significantly shorter than in adults. The chemical plant explosion at Seveso in 1976 resulted in exposure of the surrounding population to some of the highest TCDD levels ever seen in the human population. A subsequent long-term cohort study has demonstrated that individual serum TCDD levels are positively correlated with the incidence of all female cancers more than 30 years after this exposure. A similar study by Mocarelli in men has suggested that TCDD exposure in infancy reduces sperm concentration and motility up to 22 years later.

Although the war in Vietnam ended more than 45 years ago, dioxin hot spots have been found in and around three former US airbases, including Bien Hoa, Da Nang and Phu Cat. As such, TCDD continues to adversely affect human health and the environment as a persistent organic pollutant. In addition to direct exposure from the soil, indirect exposure occurs as a result of the apparent food-chain transfer of dioxin from contaminated soil to fish, ducks, animals and, finally, humans.

As such, studies on dioxin and dioxin isomer levels in lactating mothers are mainly carried out using breast milk. Maternal milk samples have previously been found to contain high concentrations of these compounds and thus have been used to monitor dioxin exposure in human. Numerous

studies on dioxin-related adverse human health effects have shown TCDD to be a risk factor for cancer, diabetes mellitus, cardiovascular disease, immunosuppression, progressive weight loss, neurotoxic effects and adverse reproductive effects.

Some of the adverse effects associated with dioxin exposure may be considerably mediated by alterations in endocrine function. As such, the association of serum dioxin levels with total testosterone, corticoids, adrenocorticotrophic hormone (ACTH), luteinizing hormone (LH) and thyroxin have been widely examined in animals, although the results of these studies often differ under different conditions. In this respect, Li and Wang have demonstrated that the biosynthesis of androgen, cortisol and aldosterone is altered by the effect of dioxin-like PCB126 in human adrenocortical H295R cells.

Typical physiological levels of endogenous hormones in serum are extremely low, and the levels of free form hormones that actually cause an effect in the cell are even lower (about 1-2% of total serum hormone levels). Furthermore, the concentration of active hormones will vary based on the age and physiological status of the individual. Dioxins have effects at low dose that are not predicted by effects at higher dose as hormone levels are known to be altered by low-dose exposure to this chemical. Vandenberg has reviewed two major concepts in this respect, namely low dose effects and dose-response curves in endocrine disrupting chemicals (EDCs).

There have been a few scientific studies concerning the effect of dioxin exposure on human sex steroid hormones in Seveso residents and chemical industry workers. However, there have been few reports regarding alterations of adrenal hormone, cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) levels in residents of a dioxin-exposed area.

The purpose of this study was to further clarify the relationship between dioxin exposure and steroid hormone levels in saliva, breast milk and the serum of Vietnamese mothers by using a larger number of subjects residing in a dioxin hot spot and a non-exposed area. A further aim was to compare salivary steroid hormone levels with serum steroid hormone levels determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis.

Chapter 2: MATERIALS AND METHODS

Study area

- Agent Orange/dioxin hot-spot
- Agent Orange/Dioxin hot-spot: The hot-spot area selected was Phu Cat Airbase, where chemical herbicides were stored and the aircraft used to spray Agent Orange/Dioxin during the Vietnam war washed. This site is located in Phu Cat district, Binh Dinh province, and is one of the three dioxin hot spots in south Vietnam. The study subjects were chosen from the population that had been living in and around Phu Cat airbase after the war. Records show that 17,000 drums of Agent Orange, 9000 drums of Agent White and 2900 drums of Agent Blue were stored there.
- Control area

The comparison site is a control area in the Kim Bang district, located in Ha Nam province in North Vietnam. This site was not exposed to chemical defoliants during the war. Both hot-spots and the control area are rural and have not been affected by industrial pollution.

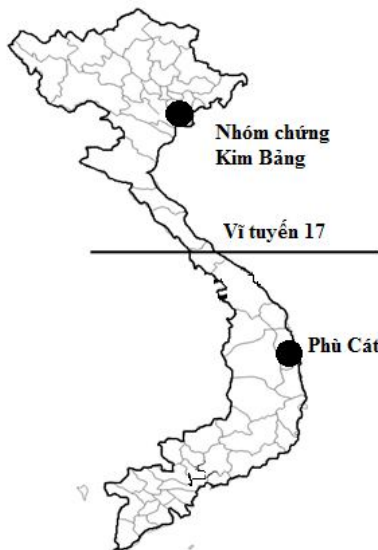


Figure 2.1. The map of study area

Population

The study subjects consisted of 51 lactating women from the hot-spot area and 59 from the non-exposed area. All mothers were aged between 20 and 33 years with children aged between 4 and 16 weeks at the time of the study. A sample of breast milk was collected from lactating women in September 2008 and serum and saliva samples were collected from the same subjects one year later (August). All blood, breast milk and salivary samples were collected in the morning (between 8.00 and 10.00 AM). The

temperature in both areas was around 30-34⁰C at this time. After local government officials and medical staff had explained the purpose of this study to 110 lactating females (51 from the hot-spot area and 59 from the non-exposed area), all agreed to participate in the study. A sample of about 20 mL of breast milk was collected from all participants. Saliva samples (2–3 mL) were self-collected with support from medical staff. These samples were collected by rinsing the mouth with water then transferring the resulting mixture directly into a 15-mL bakelite test tube. Medical staff used a 10-mL syringe to extract about 10 mL of venous blood from lactating women and the serum was separated from this blood sample by centrifugation (7000rpm x 10 minutes). The saliva and serum samples obtained were conserved in chemically cleaned cooling containers and frozen in dry ice over several days. All samples were then transported to Japan and were stored at -70⁰C until analysis.

Mothers were asked to provide information concerning their family, age, family income and residence period. The lactating mother's body mass index was determined and compared between the two areas.

Newborn growth parameters, height, weight, and head and chest circumference, were measured at hot-spot and control areas.

Analysis of dioxin in breast milk

Breast milk samples were analyzed following a previously reported method (Tai et al., 2011; Tawara et al., 2011). After the extraction of fat from 10 g of breast milk, 40–80 pg of 17 ¹³C₁₂ labeled PCDD/PCDF congeners were added as an internal standard.

A series of purification steps, involving alkali digestion and chromatography on a multi-layer silica gel column and an active carbon-dispersed silica gel column, was carried out to separate and collect the PCDDs/PCDFs. The final sample extract was dried under nitrogen steam and then re-dissolved by adding 20 ml of nonane containing 40 pg of ¹³C₁₂-1,2,3,4-TCDD and ¹³C₁₂-1,2,7,8-TCDF as external standards. Finally, dioxin/furan/fractions were determined using high resolution mass spectrometry (MS station-JMS-700, JEOL, Tokyo, Japan) equipped with gas chromatography (HP-6980, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA).

The dioxin analysis was carried out in the selected ion monitoring mode at a resolution of 10,000, and values obtained were converted to toxic equivalents (TEQ) using the World Health Organization toxicity equivalency factors (Van den Berg et al., 1998; Van den Berg et al., 2006).

Quality control and quality assurance were ensured following the guidelines described in the Japanese Industrial Standard (JIS). Eligibilities for the analysis of dioxin were certified using the natural reference powder milk CRM607 provided by the European Commission.

The recovery rate was typically in the range of 60–95%, and the detection limits were determined at a signal-to-noise ratio (S/N) of 3 on a lipid basis. Values for congener concentrations below the detection limits were set to 50% of the detection limits.

Analysis of serum steroids by LC-MS/MS

Human serum (200 μ L) was mixed with purified water to a volume of 1.0 mL and then mixed with cortisol- $^2\text{H}_4$ 1 ng, DHEA- $^2\text{H}_4$ 100 pg, T- $^2\text{H}_4$ 100 pg, progesterone- $^{13}\text{C}_3$ 100 pg, estrone- $^{13}\text{C}_3$ 100 pg and estradiol- $^{13}\text{C}_3$ 100 pg /100 μ L as Internal standard (IS). Samples were extracted with 3 mL ethyl acetate and the organic layer evaporated. Once dry, it was reconstituted in 50% methanol and applied to the Bond Elut C18 cartridge (Varian, CA, USA) to separate the polar fraction (cortisol and cortisone) from the less polar steroid fraction using acetonitrile solution. After elution of the less polar fraction with 80% acetonitrile solution, the organic layer was evaporated and the residue dried at 40°C for 1 h. Anhydrous picolinic acid reagent A (27,28) was added to the dried samples and resulting mixture allowed to stand at room temperature for 30 minutes. The reaction was quenched by addition of 1 mL of 1% acetic acid and then applied onto an InterSept pharm cartridge (GL Science, Tokyo, Japan) to remove excess reagents. The picolinoyl steroid derivatives, androstenedione and progesterone were then eluted with 80% acetonitrile and the solvent evaporated. Dried samples were reconstituted in 50% acetonitrile (100 μ L), and 2 μ L aliquot of solution applied to a Cadenza CD-C18 column (Imtakt, Kyoto, Japan). LC-MS/MS was carried out using the gradient elution technique with acetonitrile (A) and 0.1% formic acid (B) as mobile phase solvents. The column was used at 40°C with a flow rate of 0.4 mL/min. Cortisol and cortisone fractions were directly assayed by LC-MS/MS as described by Matsui et al

Analysis of salivary steroids by LC-MS/MS

The analytical procedure for steroids in saliva is shown in Fig 1. Human saliva (1.0 - 1.5 mL) was mixed with IS (cortisol- $^2\text{H}_4$ 1 ng, DHEA-

$^2\text{H}_4$ 100 pg, T- $^2\text{H}_4$ 100 pg, progesterone- $^{13}\text{C}_3$ 100 pg, estrone- $^{13}\text{C}_3$ 100 pg and estradiol- $^{13}\text{C}_3$ 100 pg /100 μL). The resulting mixture was extracted and fractionated according to the procedure used for serum. The constituted samples were then applied to a Bond Elut C18 cartridge to separate the polar (cortisol and cortisone) and non-polar steroid fractions using 80% acetonitrile solution (3 mL). The polar and non-polar organic phases were evaporated to dryness. The non-polar fraction was applied to an ion cartridge column (OASIS MAX, 3g, waters, Massachusetts, USA) prewashed with methanol (3 mL), 0.1 M NaOH (1 mL) and water (3 mL), successively. The non-polar fraction was separated into an estrogen fraction (estrone and estradiol) with methanol and a neutral fraction with 1% formic acid-methanol. The organic phase for both fractions was evaporated to dryness. After derivatisation of the estrogen fraction with 2% pentafluorobenzyl bromide-acetonitrile (100 μL) and 5% KOH-ethanol solution (50 μL) at 53 $^{\circ}\text{C}$, the derivatives obtained were furthermore separated into the estrone and estradiol derivatives on an Intersept SI cartridge column using 15-50% ethyl acetate-hexane. The estrone-3-pentafluorobenzyl fraction was converted to the estrone-3-pentafluorobenzyl-17-hydorazino-2-methylpyridinium derivative, whereas the estradiol-3-pentafluorobenzyl fraction was converted into estradiol-3-pentafluorobenzyl-17-O-2-pyridinium ether using reagent B. Both derivatives were purified on a Bond Elut C18 cartridge column to remove excess reagent. The estrone and estradiol derivatives were mixed with 100 μL of 1% formic acid/methanol/acetonitrile (20:1:1) and a 20 μL aliquot of this solution was applied to an Xterra CD-C18 column at 40 $^{\circ}\text{C}$, eluting with a mobile phase gradient of 1% formic acid in acetonitrile.

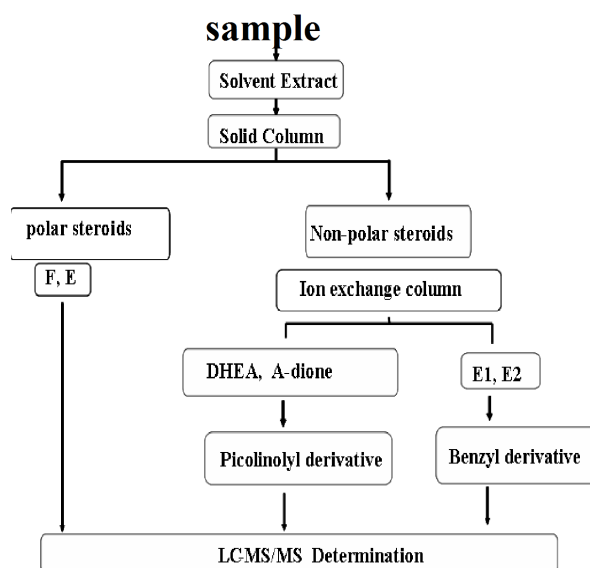


Fig. 2.2 Analytical method of salivary or serum steroid hormones
Estimation of the daily dioxin intake in infants from breast milk (DDI)

The daily dioxin intake was estimated following the previous publications with the assumption that the infant (0–24 weeks) consumes 800 ml of milk per day and the weight of infant at this period. The intake value was calculated by the equation below: $DDI = 800 \times (\% \text{ fat of milk}/100) \times (\text{PCDDs/PCDFs TEQ pg/g lipid})/(\text{Kg})$

Statistical analysis

All the statistical analyses were carried out using the SPSS 12.0 Software and Microsoft Excel 2007.

Statistical comparisons of the mean differences between two areas were performed using Student's t-test or the Mann – Whitney test for categorical variables.

Ethics

- + All case study participants were volunteer and not coerced.
- + The Medical Ethics Committee of Kanazawa University approved this study. The permission number was Health 89, in 2008.

CHAPTER 3. RESULTS

Comparison of study subject characteristics between the Kim Bang and Phu Cat areas

Table 3.1. Characteristics of lactating mothers in Kim Bang and Phu Cat areas

Index	Group	Kim Bang			Phu Cat			p
		n	Mean	SD	n	Mean	SD	
Age (years)		59	25,8	2,9	51	27,3	3,8	<0,05
Weight (kg)		59	152,2	5,0	51	152,0	5,3	>0,05
Height (cm)		59	48,4	4,9	51	48,4	6,7	>0,05
BMI (kg/m ²)		59	20,9	1,9	51	20,9	2,2	>0,05
Residence period (years)		59	21,6	5,6	51	22,7	4,1	>0,05

Table 3.1, which presents the characteristics of lactating women from the two study areas (n=110), shows the age, weight, height and BMI. These values do not differ significantly between the two areas. Likewise, the residence period are similar for both areas.

Table 3.2. Comparisons of the body size of infants and the DDI in the 3 age groups from Kim Bang and Phu Cat areas

Period	Index	Kim Bang			Phu Cat			p
		n	Mean	SD	n	Mean	SD	
Under 3 months	Age (weeks)	19	9,4	1,6	29	9,0	1,9	>0,05
	Height (cm)	19	59,2	2,8	29	60,0	3,2	>0,05
	Weight (g)	19	5372,6	661,5	29	5439,3	1018,9	>0,05
	Head (cm)	19	39,0	1,3	29	39,1	1,6	>0,05
	Chest (cm)	19	39,8	1,9	29	39,4	2,8	>0,05
	DDI (TEQ pg/dl)	19	9,4	4,6	29	27,6	13,4	<0,001
3 to 4 months	Age (weeks)	40	15,3	3,5	22	14,3	2,5	>0,05
	Height (cm)	40	62,4	2,5	22	62,4	2,7	>0,05
	Weight (g)	40	6327,3	832,5	22	6100,9	808,8	>0,05
	Head (cm)	40	40,8	1,8	22	40,8	1,7	>0,05
	Chest (cm)	40	41,6	2,1	22	40,6	2,2	>0,05
	DDI (TEQ pg/dl)	40	7,5	3,1	22	25,1	14,6	<0,001

Table 3.2 shows the comparison of body size of infants of three age groups and the daily dioxin intake from breast milk (DDI). DDI in hot-spot Phu Cat areas were over 3-fold greater than in the Kim Bang area at under 3 to 4 months of age.

However, there were no significant differences in the growth parameter means (height, weight, head and chest) between both area.

Comparisons of dioxin isomers level in maternal breast milk.

Table 3.3. Dioxin isomer levels of maternal breast milk in Kim Bang and Phu Cat areas

TEQ isomers dioxin (pg/g lipid)	Kim Bang				Phu Cat				PC/ KB	P
	n	Mea n	SD	Medi an	n	Mea n	SD	Medi an		
2,3,7,8-TeCDD	59	0,458	0,344	0,337	51	1,455	0,709	1,266	3,8	***
1,2,3,7,8-PeCDD	59	1,300	0,572	1,211	51	4,241	1,736	4,022	3,3	***
1,2,3,4,7,8-HxCDD	59	0,064	0,025	0,063	51	0,198	0,081	0,178	2,8	***
1,2,3,6,7,8-HxCDD	59	0,140	0,064	0,129	51	0,686	0,305	0,625	4,9	***
1,2,3,7,8,9-HxCDD	59	0,061	0,027	0,058	51	0,261	0,110	0,227	3,9	***
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	59	0,026	0,019	0,023	51	0,135	0,061	0,128	5,5	***
OCDD	59	0,004	0,002	0,003	51	0,021	0,009	0,019	5,9	***
2,3,7,8-TeCDF	59	0,068	0,029	0,066	51	0,063	0,032	0,061	0,9	>0,05
1,2,3,7,8-PeCDF	59	0,014	0,007	0,013	51	0,058	0,033	0,051	4,0	***
2,3,4,7,8-PeCDF	59	0,921	0,339	0,867	51	1,777	0,607	1,710	2,0	***
1,2,3,4,7,8-HxCDF	59	0,193	0,072	0,184	51	1,447	0,784	1,289	7,0	***
1,2,3,6,7,8-HxCDF	59	0,166	0,065	0,161	51	0,850	0,416	0,769	4,8	***
1,2,3,7,8,9-HxCDF	59	0,014	0,007	0,012	51	0,037	0,027	0,027	2,2	***
2,3,4,6,7,8-HxCDF	59	0,056	0,030	0,050	51	0,147	0,061	0,133	2,7	***
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	59	0,017	0,023	0,013	51	0,164	0,116	0,135	10,8	***
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	59	0,002	0,001	0,002	51	0,017	0,012	0,013	8,4	***
OCDF	59	0,000	0,000	0,000	51	0,000	0,001	0,000	3,7	***
Total PCDDs	59	2,053	0,910	1,849	51	6,997	2,715	6,563	3,5	***
Total PCDFs	59	1,451	0,495	1,319	51	4,561	1,835	4,304	3,3	***
Total PCDDs + PCDFs	59	3,505	1,356	3,140	51	11,55 8	4,079	11,03 9	3,5	***

The toxic equivalent dioxin isomer levels in the milk of lactating mothers in Phu Cat and Kim Bang area are shown in table 3.4. The levels of 17 dioxin isomers were higher in Phu Cat than in Kim Bang area ($p < 0,001$) excepting the level of 2,3,7,8-TeCDF. The total toxic equivalent PCDDs/PCDFs levels were higher in Phu Cat than in Kim Bang.

Table 3.4. Dioxin isomer levels between primipara and multipara in Kim Bang and Phu Cat areas

TEQ isomers dioxin (pg/g lipid)	Primipara				Multipara				P/M	p
	n	Mean	SD	Median	n	Mean	SD	Median		
2,3,7,8-TeCDD	37	1,203	0,813	1,052	73	0,777	0,656	0,559	1,5	**
1,2,3,7,8-PeCDD	37	3,499	2,338	2,810	73	2,240	1,539	1,855	1,6	**
1,2,3,4,7,8-HxCDD	37	0,155	0,111	0,105	73	0,112	0,071	0,096	1,4	*
1,2,3,6,7,8-HxCDD	37	0,510	0,421	0,324	73	0,334	0,286	0,212	1,5	*
1,2,3,7,8,9-HxCDD	37	0,194	0,152	0,132	73	0,134	0,107	0,093	1,4	*
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	37	0,093	0,083	0,055	73	0,068	0,060	0,040	1,4	>0,05
OCDD	37	0,013	0,011	0,010	73	0,011	0,010	0,006	1,2	>0,05
2,3,7,8-TeCDF	37	0,064	0,030	0,059	73	0,067	0,030	0,065	1,0	>0,05
1,2,3,7,8-PeCDF	37	0,035	0,033	0,022	73	0,034	0,031	0,023	1,0	>0,05
2,3,4,7,8-PeCDF	37	1,632	0,675	1,512	73	1,158	0,568	0,992	1,4	***
1,2,3,4,7,8-HxCDF	37	0,933	0,886	0,412	73	0,694	0,785	0,286	1,3	*
1,2,3,6,7,8-HxCDF	37	0,574	0,470	0,335	73	0,437	0,429	0,220	1,3	*
1,2,3,7,8,9-HxCDF	37	0,029	0,025	0,016	73	0,023	0,021	0,015	1,3	>0,05
2,3,4,6,7,8-HxCDF	37	0,111	0,075	0,087	73	0,092	0,060	0,076	1,2	>0,05
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	37	0,097	0,106	0,051	73	0,080	0,110	0,020	1,2	>0,05
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	37	0,010	0,012	0,004	73	0,008	0,010	0,003	1,3	>0,05
OCDF	37	0,000	0,000	0,000	73	0,000	0,000	0,000	1,0	>0,05
Total PCDDs	37	5,668	3,805	4,138	73	3,675	2,545	3,150	1,5	**
Total PCDFs	37	3,487	2,179	2,688	73	2,592	1,887	1,916	1,3	**
Total PCDDs + PCDFs	37	9,154	5,846	7,080	73	6,268	4,212	5,064	1,5	**

Table 3.4 shows the dioxin levels of toxic equivalent PCDDs, PCDFs and total PCDDs/PCDFs in the breast milk of primipara and multipara. The dioxin isomers including 2,3,7,8-TeCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD, 1,2,3,4,7,8-HxCDD, 1,2,3,6,7,8-HxCDD, 1,2,3,7,8,9-HxCDD, 2,3,7,8-TeCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF and 1,2,3,6,7,8-HxCDF in primiparas were significantly higher than those in multiparas. The other compounds showed a relatively high trend.

Comparisons of steroid hormone concentrations in saliva

Comparisons of steroid hormone concentrations in saliva of mother

Table 3.5. Steroid hormone concentrations in saliva of lactating mothers after 4-16 weeks of birth in Kim Bang and Phu Cat areas

Area	Kim Bang				Phu Cat				p
	n	Mean	SD	Median	n	Mean	SD	Median	
Cortisol (ng/ml)	36	1,76	1,10	1,74	38	2,95	2,06	2,56	<0,01
Cortisone (ng/ml)	36	9,76	5,17	9,54	38	14,59	6,37	13,03	<0,01
DHEA (pg/ml)	36	130,41	74,28	124,0	38	204,39	121,32	160,0	<0,01
A-dione (pg/ml)	36	45,09	20,76	43,75	38	43,82	17,59	42,0	>0,05
Estradiol (pg/ml)	17	0,14	0,08	0,13	38	0,15	0,16	0,12	>0,05

Table 3.5 shows the salivary concentrations of the five steroid hormones studied for the two areas including cortisol, cortisone, DHEA, A-dione and estradiol. Cortisol, cortisone and DHEA concentrations can be seen to be significantly higher in lactating mothers from Phu Cat area than in those from Kim Bang area ($p < 0,01$). There were no significant differences in saliva A-dione and estradiol levels.

Table 3.6. Steroid hormone concentrations in saliva of primiparas after 4-16 weeks of birth in Kim Bang and Phu Cat areas

Area	Kim Bang				Phu Cat				p
	n	Mean	SD	Median	n	Mean	SD	Median	
Cortisol (ng/ml)	9	1,68	1,44	1,67	18	3,08	2,79	2,34	>0,05
Cortisone (ng/ml)	9	8,93	6,87	8,47	18	14,99	7,45	13,03	>0,05
DHEA (pg/ml)	9	100,9	90,8	75,9	18	187,3	99,9	154,3	<0,05
A-dione (pg/ml)	9	49,80	28,47	49,35	18	43,58	18,31	41,35	>0,05
Estradiol (pg/ml)	5	0,20	0,09	0,20	18	0,14	0,15	0,11	>0,05

Table 3.6 shows the salivary concentrations of five steroid hormones (cortisol, cortisone, DHEA, A-dione and estradiol) for primipara study subjects from the both areas. DHEA concentrations was significantly higher in primipara in Phu Cat than in Kim Bang area ($p < 0,05$). There were no significant differences between the two areas for any of the other salivary hormones.

Table 3.7. Steroid hormone concentrations in saliva of multiparas after 4-16 weeks of birth in Kim Bang and Phu Cat areas

Area	Kim Bang				Phu Cat				p
	n	Mean	SD	Median	n	Mean	SD	Median	
Cortisol (ng/ml)	27	1,81	1,03	1,89	20	3,03	1,40	3,23	<0,01
Cortisone (ng/ml)	27	10,09	4,77	10,30	20	14,64	5,41	15,24	<0,05
DHEA (pg/ml)	27	136,90	68,93	141,00	20	214,69	144,54	153,00	>0,05
A-dione (pg/ml)	27	42,64	17,82	37,90	20	45,91	17,58	47,90	>0,05
Estradiol (pg/ml)	12	0,12	0,06	0,12	20	0,17	0,18	0,12	>0,05

Table 3.7 shows the five steroid hormones concentrations in saliva for multiparas in the Kim Bang and Phu Cat areas. Salivary cortisol and cortisone concentrations were found to be significantly higher in women from Phu Cat than those from Kim Bang area. There were no significant differences between the two areas for any of the other salivary hormones.

Table 3.8. Steroid hormone concentrations in saliva of lactating mothers after 1 year of breastfeeding in Kim Bang and Phu Cat areas

Area	Kim Bang				Phu Cat				p
	n	Mean	SD	Median	n	Mean	SD	Median	
Cortisol (ng/ml)	58	1,41	1,01	1,10	50	2,48	1,58	1,97	<0,001
Cortison (ng/ml)	58	8,08	3,32	7,74	50	11,89	4,58	10,99	<0,001
DHEA (pg/ml)	58	148,83	67,19	133,75	49	170,30	86,44	154,70	>0,05
A-dione (pg/ml)	58	63,29	31,97	55,45	50	61,75	32,40	55,05	>0,05
Estradiol (pg/ml)	58	0,29	0,30	0,18	50	0,34	0,33	0,22	>0,05
Estron (pg/ml)	58	1,35	1,31	0,85	50	1,55	1,42	1,14	>0,05

Table 3.8 shows the salivary concentrations of six steroid hormones (cortisol, cortisone, DHEA, A-dione, estrone, and estradiol) for all study subjects (n=110) from Phu Cat and Kim Bang areas. Salivary cortisol and cortisone concentrations were found to be significantly higher in women from the dioxin hot-spot area than those from the non-exposed area (p<0,001). There were no significant differences between the two areas for any of the other salivary hormones.

Table 3.9. Comparisons of steroid hormone concentrations in saliva of primiparas after 1 year of breastfeeding in Kim Bang and Phu Cat areas.

Area	Kim Bang				Phu Cat				p
	n	Mean	SD	Median	n	Mean	SD	Median	
Cortisol (ng/ml)	16	1,41	0,84	1,13	20	2,43	1,44	1,97	<0,05
Cortison (ng/ml)	16	8,36	3,25	8,42	20	12,38	4,11	11,59	<0,01
DHEA (pg/ml)	16	131,51	59,31	115,40	20	188,25	90,34	184,00	>0,05
A-dione (pg/ml)	16	71,62	51,31	52,95	20	65,75	38,01	57,65	>0,05
Estradiol (pg/ml)	16	0,31	0,25	0,27	20	0,40	0,41	0,26	>0,05
Estron (pg/ml)	16	1,56	1,70	0,94	20	1,83	1,92	1,12	>0,05

Table 3.9 shows the steroid hormones concentrations in saliva for multiparas after 1 year of breastfeeding. Salivary cortisol and cortisone concentrations were found to be significantly higher in women from Phu Cat than those from Kim Bang area. There were no significant differences between the two areas for any of the other salivary hormones.

Table 3.10. Comparisons of steroid hormone concentrations in saliva of multiparas after 1 year of breastfeeding in Kim Bang and Phu Cat areas

Hormone	Area	Kim Bang			Phu Cat				p
	n	Mean	SD	Median	n	Mean	SD	Median	
Cortisol (ng/ml)	42	1,41	1,07	1,10	30	2,51	1,69	1,97	<0,01
Cortison (ng/ml)	42	7,97	3,38	7,66	30	11,57	4,92	10,61	<0,01
DHEA (pg/ml)	42	155,42	69,48	140,90	29	157,92	82,96	144,10	>0,05
A-dione (pg/ml)	42	60,12	20,50	55,45	30	59,08	28,44	52,35	>0,05
Estradiol (pg/ml)	42	0,29	0,32	0,15	30	0,29	0,25	0,21	>0,05
Estron (pg/ml)	42	1,27	1,14	0,84	30	1,37	0,95	1,20	>0,05

Table 3.10 shows the steroid hormones concentrations in saliva for multiparas after 1 year of breastfeeding. Salivary cortisol and cortisone concentrations were found to be significantly higher in women from Phu Cat than those from Kim Bang area. There were no significant differences between the two areas for any of the other salivary hormones.

Comparisons of steroid hormone concentrations in saliva of infant

Table 3.11. Steroid hormone concentrations in saliva of infants in the Kim Bang and Phu Cat areas

Hormone	Area	Kim Bang			Phu Cat				p
	n	Mean	SD	Median	n	Mean	SD	Median	
Cortisol (ng/ml)	59	3,33	1,94	2,95	51	3,86	2,88	2,86	>0,05
Cortison (ng/ml)	59	0,62	0,76	0,38	51	0,61	0,53	0,45	>0,05
DHEA (pg/ml)	57	83,30	48,83	73,00	50	45,30	28,58	37,50	<0,001

Table 3.12 shows the steroid hormones concentrations in saliva for all infants in the Kim Bang and Phu Cat areas. Salivary DHEA concentration was found to be significantly lower in infant from Phu Cat than in Kim Bang area. There were no significant differences between the two areas for cortisol and cortisone salivary hormones.

Comparisons of steroid hormone concentrations in maternal breast milk

Table 3.12. Comparisons of steroid hormone concentrations in breast milk of mother in Kim Bang and Phu Cat

Hormone	Area	Kim Bang			Phu Cat				P
	n	Mean	SD	Median	n	Mean	SD	Median	
Cortisol (ng/ml)	35	1,92	1,61	1,52	35	3,36	2,24	3,31	<0,01
Cortison (ng/ml)	35	7,52	3,30	7,55	35	8,99	2,44	8,65	<0,05
A-dione (pg/ml)	35	246,69	142,36	209,40	34	218,66	133,71	190,50	>0,05
Estradiol (pg/ml)	35	0,12	0,15	0,07	34	0,11	0,16	0,07	>0,05

Table 3.12 shows the steroid hormone concentrations in breast milk for all mothers in two areas including cortisol, cortisone, A-dione and estradiol. Cortisol and cortisone concentrations can be seen to be significantly higher in lactating mothers from Phu Cat area than in those from Kim Bang area. There were no significant differences for A-dione and estradiol concentrations in breast milk.

Table 3.13. Comparisons of steroid hormone concentrations in breast milk of primiparas in Kim Bang and Phu Cat areas

Hormone	Area	Kim Bang			Phu Cat				P
	n	Mean	SD	Median	n	Mean	SD	Median	
Cortisol (ng/ml)	8	1,78	1,69	1,32	14	3,41	2,78	2,21	>0,05
Cortison (ng/ml)	8	6,41	4,76	6,44	14	8,38	2,53	8,15	>0,05
A-dione (pg/ml)	8	210,6	112,5	237,7	14	172,4	85,81	171,7	>0,05
Estradiol (pg/ml)	8	0,14	0,12	0,09	14	0,09	0,07	0,07	>0,05

Table 3.13 shows the steroid hormone concentrations in breast milk primiparas in two areas. There were no significant differences for any of all hormones concentrations in breast milk.

Table 3.14. Comparisons of steroid hormone concentrations in breast milk of multiparas in Kim Bang and Phu Cat areas

Hormone	Area	Kim Bang			Phu Cat				P
	n	Mean	SD	Median	n	Mean	SD	Median	
Cortisol (ng/ml)	26	2,01	1,62	1,54	18	3,19	1,86	3,45	<0,05
Cortison (ng/ml)	26	7,95	2,77	7,77	18	9,25	2,34	9,48	>0,05
A-dione (pg/ml)	26	253,08	151,53	207,00	17	256,46	160,27	239,40	>0,05
Estradiol (pg/ml)	26	0,12	0,16	0,04	17	0,13	0,23	0,07	>0,05

Table 3.14 shows the steroid hormone concentrations in breast milk multiparas in two areas. Cortisol concentration was higher significant in Phu Cat than in Kim Bang area. There were no significant differences for any of other hormones concentrations in breast milk.

Comparisons of steroid hormone concentrations in serum of mother

Table 3.15. Comparisons of steroid hormone concentrations in serum of mother in Kim Bang and Phu Cat

Hormone	Area	Kim Bang			Phu Cat				p
	n	Mean	SD	Median	n	Mean	SD	Median	
Cortisol (ng/ml)	58	78,54	37,07	66,25	50	114,28	52,81	96,70	<0,001
Cortison (ng/ml)	58	22,35	6,92	21,95	50	27,57	6,30	27,55	<0,001
DHEA (pg/ml)	58	4805,32	2090,86	4446,35	50	5042,99	2614,83	4504,65	>0,05
A-dione (pg/ml)	58	1799,58	745,46	1649,80	50	1611,81	784,76	1463,65	>0,05
Estradiol (pg/ml)	58	39,78	49,93	21,90	50	34,39	36,05	19,35	>0,05
Estron (pg/ml)	58	39,92	36,72	26,20	50	29,89	25,09	21,55	>0,05

Table 3.15 shows the serum levels of the six steroid hormones studied for the two areas. Cortisol and cortisone concentrations were significantly higher in Phu Cat than those in Kim Bang ($p < 0,001$). There were no significant differences in serum DHEA, A-dione, estrone, and estradiol concentrations.

Table 3.16. Comparisons of steroid hormone concentrations in serum of primiparas in Kim Bang and Phu Cat

Hormone	Area	Kim Bang			Phu Cat				p
	n	Mean	SD	Median	n	Mean	SD	Median	
Cortisol (ng/ml)	16	77,67	37,37	73,45	20	112,77	54,00	96,10	<0,05
Cortison (ng/ml)	16	21,78	5,65	21,95	20	29,93	5,73	29,15	<0,001
DHEA (pg/ml)	16	4670,28	2086,34	4507,10	20	5366,45	2641,46	4832,05	>0,05
A-dione (pg/ml)	16	2011,19	1127,11	1610,00	20	1720,26	845,61	1527,10	>0,05
Estradiol (pg/ml)	16	43,62	38,98	30,15	20	35,76	33,03	21,30	>0,05
Estron (pg/ml)	16	49,75	45,38	27,60	20	28,68	24,31	20,90	>0,05

Table 3.16 shows the steroid hormones concentrations in serum for primiparas. Serum cortisol and cortisone concentrations were significantly higher in primiparas from Phu Cat than those from Kim Bang area. There were no significant differences between the two areas for any of the other serum hormones.

The ratios of salivary hormone and serum hormone concentrations of lactating mothers after 1 year of breastfeeding

Table 3.17. The ratios of salivary hormone and serum hormone concentrations in Kim Bang and Phu Cat

Hormone	Area	Kim Bang		Phu Cat		p
		n	Ratio	n	Ratio	
Cortisol		58	1,71±0,66	50	2,26±0,94	<0,01
Cortison		58	35,8±10,3	50	45,2±16,8	<0,01
DHEA		58	3,25±1,12	49	4,08±2,84	>0,05
A-dion		58	3,48±0,57	50	4,41±2,43	<0,05
Estradiol		58	0,90±0,39	50	1,52±2,13	<0,05
Estron		58	3,66±1,91	50	6,94±6,78	<0,001

Table 3.17 shows the ratio of salivary to serum steroid hormone concentrations. These ratios are significantly higher in Phu Cat than those in Kim Bang area.

Correlation between dioxin level in breast milk and steroid hormones concentration.

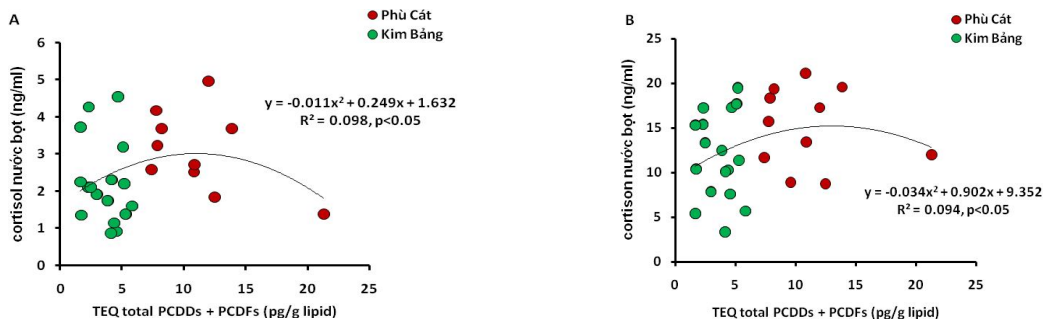


Fig. 3.1. The correlation between cortisol (A), cortisone (B) concentration in saliva and dioxin level in breast milk of primiparas after 4-16 weeks of birth.

Fig. 3.1 shows the correlation between salivary cortisol (A) or cortisone (B) and breast milk dioxin levels ($p < 0,05$). These correlations are expressed by way of a nonlinear as dose-response curve as inverse U-shape between cortisol or cortisone and dioxin levels.

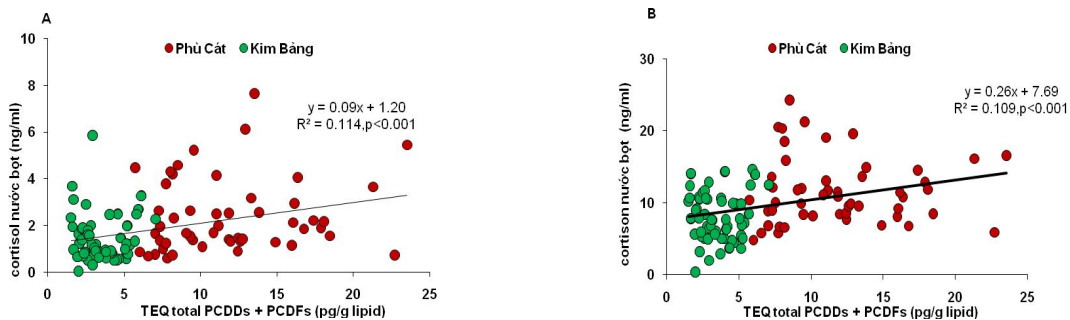


Fig. 3.2. The correlation between cortisol (A), cortisone (B) concentration in saliva and dioxin level in breast milk of lactating mothers after 1 year of breastfeeding.

Fig. 3.2 shows the correlation between salivary cortisol (A) or cortisone (B) and dioxin levels in Phu Cat and Kim Bang area. Significant and positive correlations between salivary cortisol or cortisone and breast milk dioxin levels can be seen ($p < 0,001$).

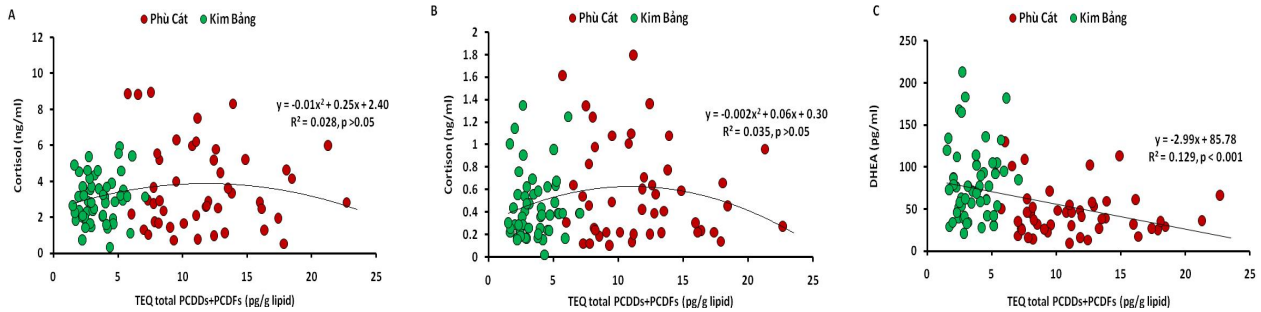


Fig. 3.3. The correlation between cortisol (A), cortisone (B) and DHEA (C) concentration in saliva of infant 3 years and dioxin level in breast milk.

The fig 3.3 shown the correlations of nonlinear as dose–response curve as inverse U-shape between salivary cortisol or cortisone and breast milk dioxin levels can be seen in infant 3 years. There was significant negative correlation between the salivary DHEA and dioxin levels in maternal breast milk ($p < 0,001$).

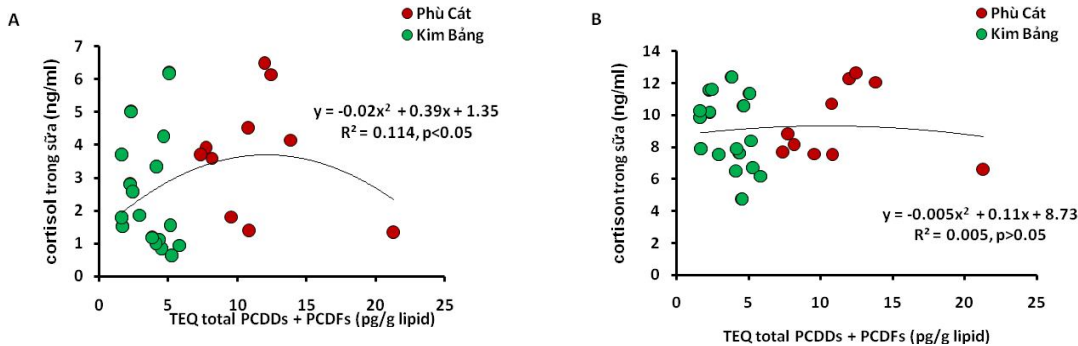


Fig. 3.4. The correlation between dioxin level and cortisol (A), cortisone (B) concentration in breast milk.

These correlation is expressed by way of a nonlinear as dose–response curve as inverse U-shape between cortisol and dioxin levels in breast milk.

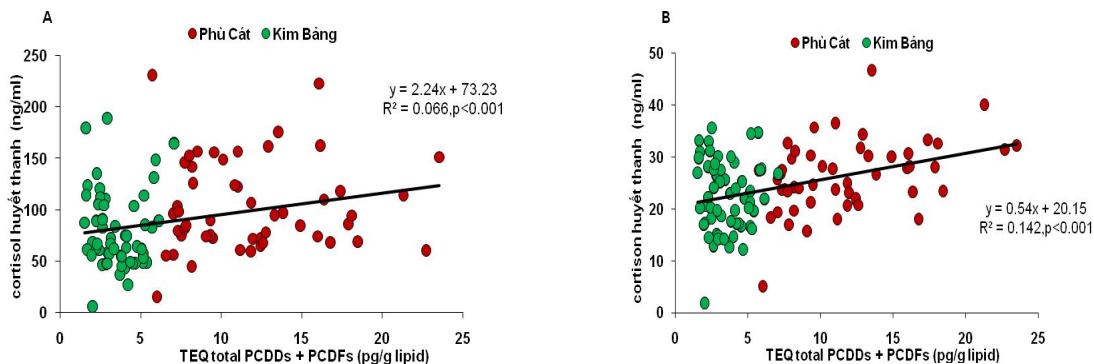


Fig. 3.5. The correlation between cortisol (A), cortisone (B) concentration in serum and dioxin level in breast milk.

Fig. 3.5 shows the correlation between serum cortisol (A) or cortisone (B) and breast milk dioxin levels ($p < 0,001$). These correlations are expressed by way of a linear equation as $y = Ax + B$, where x is the dioxin levels in maternal breast milk and y the steroid hormone levels

Chapter 4: DISCUSSION

Characteristics of study area and population

The study region in this investigation (Phu Cat) is one of three major dioxin hot-spot areas in Vietnam. Indeed, according to Dwernychuk (8,46), the concentration of TCDD recorded at Phu Cat is 194 pg/g in sediment, and the Hatfield Consultancy (47) has reported that the maximum TCDD level of 236,000 pg/g TCDD in soil taken from the vicinity of Phu Cat is much higher than the internationally recognized standard of 1000 pg/g TCDD in soil. Dioxin is a persistent environmental toxin that accumulates in fish, poultry, animals and humans because of its lipophilic nature (34). Dioxin accumulates in adipose tissue and its half-life in adult humans is about 7-11 years (4,35).

We have demonstrated in this study that dioxin levels in maternal breast milk are three- to fivefold higher in the hot-spot area than in the non-exposed area despite the fact that more than 40 years have passed since the end of war (Table 5). This result is consistent with our previous study (20). As similar study in Seveso estimated that the TCDD concentration in females was fivefold higher in the exposed area than in a control area after 30 years (6). These studies suggest that the dioxin burden in humans continues in the long term after environmental exposure.

These values do not differ significantly between the two areas for the characteristics of lactating women from the two study areas as age, weight, height and BMI. Likewise, the family income and residence period are similar for both areas.

There were no significant differences in the mean of growth parameters (height, weight, head and chest) between hot-spot and control area. Likewise the level of daily dioxin intake was around 3-fold higher than in control area at less than 3-4 months. Children in hot-spot remain to be exposed by breastfeeding from their mothers having high dioxin level.

Hue's study in hot-spot Da Nang also showed the average DDI level is higher than in control area.

Dioxin level in breast milk

We have demonstrated in this study that dioxin levels in maternal breast milk are three- to five fold higher in hot-spot Phu Cat than in the control Kim Bang area despite the fact that more than 45 years have passed since the end of war. As similar study in Seveso estimated that the TCDD concentration in females was five fold higher in the exposed area than in a control area after 30 years. These studies suggest that the dioxin burden in humans continues in the long term after environmental exposure.

Steroid hormone level in saliva and serum

Salivary cortisol and cortisone levels were found to be significantly higher in the dioxin hot-spot Phu Cat than in Kim Bang area. Furthermore, serum cortisol and cortisone levels were also significantly higher in the dioxin hot-spot. We have recently reported a similar study of salivary steroid hormone levels in primiparae in a dioxin hot-spot area. Our present study of all lactating women (first, second or third child), which included a larger number of subjects, revealed significantly higher serum and salivary cortisol and cortisone levels in lactating women from the dioxin hot-spot area.

Both salivary and serum cortisol levels have been investigated in the same subjects to elucidate the association with dioxin concentration. Salivary cortisol levels are more strongly correlated with dioxin levels than serum cortisol. A similar result was obtained for cortisone.

It is likely that salivary cortisol or cortisone concentrations better reflect the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans than total serum hormone concentration.

DHEA is synthesized only in the adrenal cortex of infant while it synthesis in the adrenal cortex and ovary from lactating mother. With high concentrations of dioxin causes inhibition of the enzyme CYP17 processing lyase activity on the 2 functions hydroxylation (17 lyase) and cleavage (20 lyase), at lower doses to stimulate the activity of these enzymes in androgen biosynthesis adrenal cortex. That due to reduced DHEA levels in children of 3 years.

Ratio of salivary steroid hormone and serum steroid hormones We also determined the ratios of free to protein-bound hormones from salivary

and serum hormone concentrations. The ratio of each salivary to serum hormone concentration, there was not significantly higher in the dioxin hot-spot than in the non-exposed area for DHEA. These higher ratios may be related to any one of the numerous effects of dioxin exposure on endocrine disruption. In other words, dioxin may have an effect on steroid binding proteins, SHBG and CBG, and may influence the natural balance of hormone circulation.

Studies examining the effects of low-dose TCDD exposure on thyroid function have shown that a mixture of PCBs, PCDDs and PCDFs reduces thyroxine levels in rat. It should be noted that low doses of this chemical also affect immune function

Relationship of dioxin in maternal breast milk and steroid hormone

The dose-response analyses with dioxin and hormone levels show a linear relationship in the dioxin level range 2-25 pg/g lipid. The adrenal gland is a major accumulation site for lipophilic dioxins and PCBs in the body. Three types of steroid hormones (cortisol, aldosterone and DHEA) are synthesized in the adrenal gland and their levels, and therefore ratios, are regulated by ACTH. In our study, the concentrations of cortisol and cortisone in both serum and saliva were found to be significantly higher in the hot-spot than those in the non-exposed area, whereas the DHEA level varied less between the two areas. From these findings, we suggest that dioxin may directly affect the adrenal gland by enhancing the activity of enzymes that convert pregnenolone into cortisol or cortisone, thus resulting in higher levels of both these corticoids whilst leaving DHEA levels relatively unchanged. This hypothesis is supported by the molecular experimental findings of Li and Wang, who reported that dioxin-like PCB126 stimulates cortisol synthesis by inducing 11β -hydroxylase, 21-hydroxylase and 17α -hydroxylase activity, which is based on the CYP11B1, CYP21B and CYP17 pathways necessary for cortisol biosynthesis, respectively. In contrast, dioxin appears not to affect 17,20-lyase activity in the CYP17 pathway, thus resulting in essentially unchanged DHEA levels for the two areas.

Bestervelt has reported that TCDD may increase ACTH concentrations by increasing the rate of transcription of pro-opiomelanocortin gene and/or rat pituitary culture at a concentration of 10^{-17} - 10^{-9} M. Maximal secretion of ACTH occurred at a TCDD dose of

between 10^{-11} - 10^{-15} M, whereas it was decreased at low and high dose of TCDD except of maximal range, thus meaning that the dose response curve is an inverted U-shape. In light of these findings, dioxin may directly affect the adrenal gland rather than the pituitary. TCDD therefore clearly affects ACTH secretion. On primiparae in a dioxin hot-spot area, which also showed increased salivary cortisol and cortisone level, also gave an inverted U-shape for the TEQ dioxin levels. The current study in 110 lactating mothers also showed increased cortisol and cortisone levels in serum and saliva. However, the dose-response model between steroid hormone levels and dioxin could be fit by a straight line in the form $Y = aX+b$ rather than a non-linear inverted U-shaped curve. This result appears to show that the dose response of dioxin to corticoid synthesis in these lactating women occurs by stimulating dose-response.

CONCLUSION

1. The dioxin in breast milk of lactating mothers in Phu Cat, Binh Dinh

The breast milk dioxin level was $11,558 \pm 4,079$ in Phu Cat pg/g lipid. that was 3,5 times higher than in Kim Bang. The most isomers of dioxin in breast milk were significant higher in Phu Cat than in Kim Bang ($p < 0,001$).

The breast milk dioxin level in primipara was $9,154 \pm 5,846$ pg /g lipid, that was significant 1,5 times higher than in multipara.

2. The steroid hormones concentration

2.1. The steroid hormones concentration in saliva in lactating mother

The cortisol and cortisone concentrations in saliva were significant higher in Phu Cat than in Kim Bang, ($p < 0,01$).

The DHEA concentration in saliva was significant higher in Phu Cat than in Kim Bang after 4 to 16 weeks of breastfeeding, ($p < 0,01$).

2.2. The steroid hormones concentration in saliva in infant

The mean of DHEA concentration in saliva of infant 3 years in Phu Cat was $45,30 \pm 28,58$ pg/ml, that was lower significantly than in Kim Bang.

There were no significant differences between the two areas for cortisol and cortisone salivary hormones.

2.3. The steroid hormones concentration in breast milk

The cortisol and cortisone levels in breast milk were found to be significantly higher in lactating mother from Phu Cat than those from Kim Bang ($p < 0,001$).

There were no significant differences on androstenedione and estradiol in breast milk between the two areas.

2.4. The steroid hormones concentration in serum

Serum cortisol and cortisone levels were found to be significantly higher in women from Phu Cat than those from Kim Bang ($p < 0,001$).

There were no significant differences on DHEA, androstenedione, estrone and estradiol in serum between the both areas.

3. Relationship of dioxin in maternal breast milk and steroid hormone

Significant and an inverted U-shape correlations between breast milk dioxin levels and salivary cortisol ($r^2 = 0,098$; $p < 0,05$) or cortisone ($r^2 = 0,094$; $p < 0,05$) or breast milk cortisol ($r^2 = 0,114$; $p < 0,05$) can be seen in primiparas after 4 to 16 weeks of breastfeeding.

There were positive correlation between breast milk dioxin level and cortisol or cortisone in saliva and serum of lactating mothers after 1 years of breastfeeding.

There were negative correlation between breast milk dioxin level and salivary DHEA of infant 3 years of age ($r^2 = 0,129$ và $p < 0,001$).

There were strongly correlation between salivary steroid hormone concentrations with those in breast milk or serum.

PETITION

Further research should continue to evaluate endocrine disorder by dioxin in people living in dioxin hot-spot, especially on children.