



Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

Langtidseffekter af prænatal pesticideksponering

Bekæmpelsesmiddelforskning fra
Miljøstyrelsen nr. 140, 2012

Titel:

Langtidseffekter af prænatal
pesticideksponering

Forfattere:

Helle Raun Andersen¹, Christine Wohlfahrt-Veje², Fróði Debes¹,
Flemming Nielsen¹, Tina Kold Jensen¹, Philippe Grandjean¹ &
Katharina M. Main²

¹Miljømedicin, Institut for Sundhedstjenesteforskning, Syddansk
Universitet

²Afdeling for Vækst og Reproduktion, Rigshospitalet

Udgiver:

Miljøstyrelsen
Strandgade 29
1401 København K
www.mst.dk

År:

2012

ISBN nr.

978-87-92779-71-7

Ansvarsfraskrivelse:

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling. Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter. Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Må citeres med kildeangivelse.

Indhold

FORORD	5
SAMMENFATNING	7
BAGGRUND	7
FORMÅL	7
METODER	7
RESULTATER	8
KONKLUSIONER	10
SUMMARY	11
OBJECTIVES	11
METHODS	11
RESULTS	12
1 INTRODUKTION OG BAGGRUND	15
1.1 FORMÅL OG HYPOTESE	15
1.2 BAGGRUND	15
1.2.1 Etablering af undersøgelseskohorten og resultater fra tidligere undersøgelser	16
1.2.2 Andre undersøgelser	17
2 UNDERSØGELSESPOPULATION OG -METODER	19
2.1 REKRUTTERING AF FORSØGSPERSONER	19
2.1.1 Eksponeringsoplysninger	20
2.2 UNDERSØGELSESMETODER	22
2.2.1 Klinisk undersøgelse hos børnelæge	22
2.2.2 Neurofysiologisk undersøgelse	23
2.2.3 Neuropsykologisk undersøgelse	25
2.3 LABORATORIEANALYSER	28
2.3.1 Hormonanalyser i serum	28
2.3.2 Geno- og fænotype af paraoxonase 1 (PON1)	29
2.3.3 Pesticidmetabolitter i urin	30
2.3.4 Phthalatmetabolitter i urin	32
2.3.5 Etiske forhold	32
2.3.6 Dataanalyser	32
3 RESULTATER	39
3.1 OPGØRELSE AF DELTAGELSE I PROJEKTET	39
3.2 ERFARINGER MED BØRN SOM UNDERSØGELSESPOPULATION	40
3.3 BESKRIVELSE AF UNDERSØGELSESKOHORTEN	40
3.4 RESULTATER FRA DEN LÆGELIGE UNDERSØGELSE	42
3.4.1 Effekter på kønsudvikling	44
3.4.2 Effekter på vækst og kropssammensætning	46
3.5 RESULTATER FRA LABORATORIEANALYSER	51
3.5.1 Hormonmålinger	51
3.5.2 Pesticider i urin	54
3.5.3 Phthalatmålinger i urin	57
3.5.4 Geno- og fænotype af paraoxonase (PON1)	57
3.6 RESULTATER FRA DE NEUROFYSIOLOGISKE UNDERSØGELSER	69

3.6.1	<i>Blodtryk og hjerterate variabilitet</i>	69
3.6.2	<i>Evoked Potentials (EP)</i>	69
3.7	RESULTATER FRA DE NEUROPSYKOLOGISKE UNDERSØGELSER	70
3.7.1	<i>Motorisk funktion</i>	71
3.7.2	<i>Sproglig funktion</i>	74
3.7.3	<i>Samlet analyse af de psykometriske data (strukturel ligningsmodel)</i>	77
3.7.4	<i>Betydning af PON1 192 genotype på neurologisk funktion</i>	78
4	DISKUSSION	79
5	KONKLUSION	85
6	PERSPEKTIVERING	87
	REFERENCER	89

Forord

Projektet 'Langtidseffekter af prænatal pesticideksponering' er finansieret af Miljøstyrelsens program for Bekæmpelsesmiddelforskning. Projektet er udført i perioden 2007 til 2010 som et samarbejde mellem Miljømedicin, Institut for Sundhedstjenesteforskning på Syddansk Universitet og Afdeling for Vækst og Reproduktion på Rigshospitalet.

Vi er meget taknemmelige overfor de familier som har deltaget og uden hvis medvirken, undersøgelsen ikke kunne have været gennemført. Desuden vil vi gerne takke sekretær Mariann Bøllund samt personalet på Miljømedicin for yderst kompetent hjælp ved børneundersøgelser, prøvehåndtering og indtastning af data.

Endelig vil vi gerne takke medlemmer af følgegruppen "Sundhed og Pesticider" for kommentarer og forslag i projektperioden. En speciel tak til Christian Ritz fra Institut for Grundvidenskab og Miljø ved Københavns Universitet, Karin Sørig Hougaard fra Det Nationale Forskningscenter for Arbejdsmiljø, Gunnar Toft fra Arbejdsmedicinsk Klinik på Århus Sygehus, Anne Marie Vinggaard fra Fødevareinstituttet ved Danmarks Tekniske Universitet og Susanne Hougaard fra Miljøstyrelsen for grundig gennemlæsning og konstruktive forslag og kommentarer til udarbejdelse af denne rapport.

På projektgruppens vegne,
Helle Raun Andersen
November 2011

Sammenfatning

Baggrund

Både nervesystemet og det endokrine system er særligt sårbare overfor påvirkninger fra henholdsvis neurotoksiske og hormonforstyrrende stoffer, mens de udvikles i fostertilstanden og den tidlige barndom (Grandjean and Landrigan 2006; Nielsen et al. 2001). En betragtelig del af de pesticider, der anvendes i dag, har neurotoksiske og/eller hormonforstyrrende egenskaber i eksperimentelle undersøgelser (Andersen et al. 2002; Laier et al. 2006; Taxvig et al. 2007). Den højeste erhvervmæssige pesticideksponering antages at finde sted i væksthuse specielt i forbindelse med produktionen af potteplanter og afskårne blomster (Brouwer et al. 1992; Illing 1997). Kvinder, der bliver gravide, mens de er ansat i væksthusegartnerier, er derfor særligt sårbare. Derfor fraværsmeldes en stor del af de gravide kvinder indenfor gartnerfaget og andre omplaceres til opgaver med minimal pesticideksponering. Disse tiltag sker dog først, når kvinden har konstateret at hun er gravid. På det tidspunkt kan kvinderne være så langt henne i graviditeten, at en mulig påvirkning af fostrene allerede er sket.

For at undersøge denne problemstilling startede vi i 1997-2001 en undersøgelse, hvor gravide kvinder, der arbejdede i væksthusegartnerier, blev inkluderet i starten af deres graviditet. Der blev indhentet detaljerede oplysninger om arbejdsforhold og pesticideksponering. Børnene blev undersøgt første gang, da de var 3 måneder gamle. Ved denne undersøgelse havde drengebørn, hvis mødre havde været eksponeret for pesticider i starten af graviditeten, signifikant højere prævalens af kryptorkisme (7,7 %) end en stor gruppe jævnaldrene drenge i Københavnsområdet (1,9 %) undersøgt på præcist samme måde og af den samme læge. Desuden havde de eksponerede drenge lidt mindre kønsorganer samt små ændringer i serumkoncentrationer af kønshormoner i forhold til de drenge, hvis mødre arbejdede i gartnerier, men som ikke havde været eksponeret for pesticider i graviditeten [Andersen et al., 2008].

Formål

Formålet med dette projekt var at følge op på denne gruppe af børn for at undersøge, om moderens pesticideksponering i graviditeten kan forstyrre den endokrine og neuropsykologiske udvikling af børnene på længere sigt.

Metoder

Af de 203 børn, som blev undersøgt i 3 måneders alderen, deltog 135 børn også i denne undersøgelse. For at øge antallet af ikke-eksponerede børn, inkluderede vi yderligere 44 børn gennem venner og familie til de børn, som allerede var med. Samlet indgik der således 177 børn (83 piger og 94 drenge) i alderen 6-11 år i undersøgelsen. Mødrene til 112 af børnene havde været udsat for pesticider tidligt i graviditeten. Undersøgelsen fandt sted på

Afdeling for Miljømedicin på Syddansk Universitet. Børnene gennemgik et undersøgelsesprogram der omfattede:

1. Grundig klinisk lægeundersøgelse med særlig fokus på børnenes køns- og pubertetsudvikling og vækst (højde, vægt, hudfoldstykkelse mm) samt måling af blodtryk.
2. Neurofysiologisk undersøgelse, der omfattede måling af hjerterytme og nerveledningshastighed for nerveimpulser fra høre- og synsnerver i hjernen (evoked potentials (EP)).
3. Neuropsykologisk undersøgelse, hvor barnets kognitive funktioner indenfor en række områder (opmærksomhed, rumlig opfattelse, hukommelse, sprog, intelligens samt reaktionstid og motorisk hastighed) blev testet.

Desuden afgav børnene urin og blodprøver og familierne besvarede et detaljeret spørgeskema om familieforhold, livsstil og helbredsforhold.

Alle oplysninger om moderens pesticideksponering, livsstil og helbred blev indhentet på det relevante eksponeringstidspunkt tidligt i graviditeten. Vurdering af mødrenes pesticideksponering som høj, middel eller lav/ingen fandt sted allerede inden børnene blev født.

Alle børnene blev undersøgt af den samme læge og psykolog med standardiserede, velafprøvede metoder og uden kendskab til moderens eksponeringsforhold under graviditeten.

Blodprøverne blev analyseret for kønshormoner og vækstfaktorer samt bestemmelse af PON1 genotype og paraoxonase aktivitet. Urinprøverne blev analyseret for pesticidmetabolitter og phthalater, for at vurdere børnenes nuværende eksponering for disse stofgrupper. Alle laboratorieanalyser blev udført blindet i forhold til barnets prænatale pesticideksponering med standardiserede analysemetoder.

Resultater

Resultater for gruppen af børn, hvis mødre var udsat for pesticider tidligt i graviditeten blev sammenlignet med resultater for gruppen af børn, hvis mødre ikke var erhvervmæssigt udsat for pesticider. Der er i data-analyserne justeret for faktorer, der kan have betydning for de undersøgte effekter. Generelt blev køn og alder inkluderet som kovariater og i de fleste analyser indgik desuden moderens rygning i graviditeten samt socialgruppe som relevante kovariater. De ikke-eksponerede børn havde en anden socialgruppefordeling end de eksponerede børn, hvilket primært skyldtes, at flere af de nyrekrutterede børn tilhørte socialgruppe 1 og 2. For at undersøge eventuel residualkonfounding på grund af dette, har vi endvidere undersøgt, om ændringer i relevante effektmål bevægede sig i samme retning, hvis vi inkluderede gruppen af 'nye' og 'gamle' kontrolbørn separat i dataanalyserne.

Effekter på køns- og pubertetsudvikling

For gruppen af piger, hvis mødre var pesticideksponerede i graviditeten havde 45 % begyndende brystudvikling mod 23 % af de ikke-eksponerede, selvom aldersfordelingen for de to grupper piger var ens. Den gennemsnitlige alder for brystudvikling for de eksponerede piger var 8,9 år mod 10,4 år for de ikke-eksponerede. Alderen for de ikke-eksponerede piger svarer til alderen for brystudvikling for jævnaldrene københavnske piger undersøgt i samme periode [Aksglaede et al., 2009]. Pubertetsudviklingen begyndte således 1-1½ år tidligere for eksponerede piger end ikke-eksponerede piger.

Koncentrationer af binyreandrogenerne androstendion og DHEAS var højere hos eksponerede piger, men forskellen var kun signifikant for androstendion. Der var ikke signifikante forskelle for de øvrige reproduktionshormoner mellem eksponerede og ikke-eksponerede piger.

Drenge går generelt senere i pubertet end piger og kun tre af drengene var kommet i pubertet. Undersøgelsen kan derfor ikke afgøre om pubertetsstart hos drengene var påvirket af mødrenes pesticideksponering. De eksponerede drenge havde, som i 3 måneders alderen, tendens til mindre kønsorganer. Der var en sammenhæng mellem målingerne ved den første undersøgelse og denne, så drenge med mindre kønsorganer ved 3 måneders alderen også havde mindre kønsorganer nu, selvom der i beregningerne blev taget hensyn til drengenes alder og nuværende vægt. Der var ikke signifikante forskelle i serumkoncentrationer af reproduktionshormoner mellem eksponerede og ueksponerede drenge.

Effekter på vækst og kropssammensætning

Gruppen af børn med pesticideksponerede mødre, havde lavere fødselsvægt men højere BMI z-score, abdominalomkreds og fedtprocent ved 6-11 års alderen og havde således opbygget mere kropsfedt fra fødslen til skolealderen. En tilsvarende effekt er set, både i denne og andre undersøgelser, af rygning i graviditeten. Resultater tyder på et samspil mellem rygning og pesticideksponering, idet gruppen af børn hvis mødre både havde været udsat for pesticider og røget i graviditeten, havde lavest vægt ved fødslen og mest kropsfedt ved skolealderen [Wohlfahrt-Veje et al., 2011].

Desuden fandt vi, at børn med en bestemt genotype var særligt sårbare. PON1-genet koder for enzymet paraoxonase. Dette enzym, som i serum er bundet til high-density-lipoprotein (HDL), inaktiverer nogle organofosfatsekticider og menes desuden at have en beskyttende funktion mod udvikling af hjertekarsygdomme [Mackness et al., 1998]. En almindelig polymorfi i dette gen, hvor glutamin (Q) er erstattet af arginin (R) i position 192, synes at påvirke begge de nævnte egenskaber. Vi fandt en sammenhæng mellem PON1 genotypen og effekter af prænatal pesticideksponering på risikofaktorer for senere udvikling af hjertekarsygdomme. Knap halvdelen af børnene (43%) havde et R-allel. Hos denne gruppe var der en signifikant positiv sammenhæng mellem niveauet af moderens pesticideksponering og børnenes BMI z-score, kropsfedtprocent, abdominalomkreds, blodtryk og serumkoncentration af vækstoffaktoren IGF-1 ved skolealderen.

Effekter på nervesystemet

Samlet sås der ingen signifikante effekter af prænatal pesticideksponering på børnene, men hvis de to køn blev analyseret separat var der for pigerne negativ effekt af eksponeringen på de fleste effektmål omend kun signifikant for sprogfunktion, langtidshukommelse og manuel motorisk hastighed. For drengene blev der ikke set negative effekter på resultater fra de neuropsykologiske test.

I en samlet analysemodel af de neuropsykologiske effektmål, fandt vi en overordnet negativ effekt af prænatal pesticideksponering på pigernes, men ikke drengenes, neuropsykologiske funktion. Mødrenes pesticideksponering tidligt i graviditeten synes således at have en negativ påvirkning af

nervesystemets udvikling, som var registrerbar hos pigerne, men ikke hos drengene, i 6-11 års alderen.

Konklusioner

Vi fandt en sammenhæng mellem erhvervsmæssig udsættelse for pesticider tidligt i graviditeten, inden kvinderne var blevet fraværsmeldt eller omplaceret, og børnenes vækst og udvikling senere i barndommen. Pigerne havde tidligere brystudvikling og drengene havde lidt mindre kønsorganer, hvis mødre havde været udsat for pesticider.

Endvidere havde gruppen af børn med pesticideksponerede mødre, lavere fødselsvægt men højere fedtindhold i kroppen ved 6-11 års alderen og de havde således opbygget mere kropsfedt fra fødslen til skolealderen. Denne sammenhæng var forstærket, hvis moderen havde røget i graviditeten. Børn med et R-allel i position 192 i PON1- genet synes særligt sårbare og for denne gruppe var der en signifikant positiv sammenhæng mellem niveauet af moderens pesticideksponering og børnenes kropsfedtindhold og blodtryk ved skolealderen.

Endelig synes mødrenes udsættelse for pesticider tidligt i graviditeten at have en negativ påvirkning af nervesystemets udvikling, som var registrerbar hos pigerne, men ikke hos drengene, i 6-11 års alderen.

Resultaterne peger på, at erhvervsmæssig udsættelse for moderne pesticider tidligt i graviditeten, kan medføre langtidseffekter på børnenes udvikling til trods for særlige forholdsregler, der skal beskytte gravide arbejdstagere. Selvom effekterne var relativt små, ved vi endnu ikke, om de kan have betydning for børnenes funktion og sygdomsrisiko senere i livet.

Summary

Background

Both the nervous system and the endocrine system are particularly vulnerable to impacts from neurotoxic compounds and endocrine disruptors during development in fetal life and early childhood (Grandjean and Landrigan 2006; Nielsen et al. 2001). A considerable part of the pesticides used today have neurotoxic and / or endocrine disrupting properties in experimental studies (Andersen et al. 2002; Laier et al. 2006; Taxvig et al. 2007). The highest occupational pesticide exposure is assumed to take place in greenhouses especially in the production of potted plants and cut flowers (Brouwer et al. 1992; Illing 1997). Women who become pregnant while they are employed in greenhouse horticultures are therefore particularly susceptible. Therefore a large proportion of pregnant women working in greenhouse horticultures are recommended to go on paid leave or to be replaced to work tasks with minimal pesticide exposure. However, these initiatives occur after the women have recognized pregnancy. At that time, the women might have been pregnant for so long that the fetuses have already been affected.

To investigate this item, we started a study in 1997-2001 in which pregnant women who worked in horticultural greenhouses, were included in the beginning of their pregnancy. Detailed information on working conditions and pesticide exposure were collected. The children were examined first time when they were 3 months old.

At that examination, boys whose mothers had been exposed to pesticides in early pregnancy, had significantly higher prevalence of cryptorchidism (7.7%) than a large group of boys of same age from the Copenhagen area (1.9%) examined in exactly the same way and by the same pediatrician. Additionally, the exposed boys had slightly smaller genitals and small changes in serum concentrations of sex hormones compared to boys whose mothers worked in horticulture, but had not been exposed to pesticides during pregnancy [Andersen et al., 2008].

Objectives

The aim of this project was to follow up this group of children to investigate if maternal pesticide exposure during pregnancy can disrupt the endocrine and neurological development of the children in the longer term.

Methods

Out of the 203 children, who were examined at 3 months of age, 135 children, participated in this follow-up study. To increase the number of non-exposed children, we included 44 additional children through friends and family to the children who were already participating. In total, 177 children (83 girls and 94 boys) aged 6-11 years were included in this study. The mothers of 112 of children had been exposed to pesticides in early pregnancy. The study took place at the Department of Environmental Medicine at the

University of Southern Denmark. The children underwent an examination program that included:

1. Thorough clinical examination with special focus on sexual and pubertal development and growth (height, weight, skin fold thickness) and measurement of blood pressure.
2. Neurophysiology examination that included measurement of heart rate and nerve conduction velocity of nerve impulses from the auditory and optic nerves in the brain (evoked potentials (EP)).
3. Neuropsychological examinations in which cognitive functions (attention, visuospatial perception, memory, language, intelligence and reaction time and motor speed) of the child were tested.

Besides, morning spot urine and blood samples were collected from the children and the families answered a detailed questionnaire about social and familial conditions, lifestyle and health.

All information on maternal pesticide exposure, lifestyle and health were obtained at the relevant time of exposure in early pregnancy. Assessment of maternal pesticide exposure as high, medium or low / none took place before the children were born.

All the children were examined by the same pediatrician and psychologist using standardized methods and without knowledge of maternal exposure conditions during pregnancy.

Blood samples were analyzed for sex hormones and growth factors, and determination of PON1 genotype and paraoxonase activity. Urine samples were analyzed for pesticide metabolites and phthalates, to assess the current exposure of the children to these compounds. All laboratory assays were performed with standardized methods of analysis and blinded for information on prenatal pesticide exposure.

Results

The results for the group of children whose mothers were exposed to pesticides in early pregnancy were compared to the results for the group of children whose mothers were not occupationally exposed to pesticides. In the data-analysis, the results were adjusted for factors that may influence the studied effects. In general, age and sex were included as covariates and in most analysis also maternal smoking in pregnancy and social class were included as relevant covariates. The non-exposed children had a different social class distribution than the unexposed children, largely because several of the newly recruited children belonged to social class 1 and 2. To investigate possible residual confounding because of this, we also examined whether changes in the relevant outcome was moving in the same direction if we included the group of 'new' and 'old' control children separately in the data analysis.

Effects on sexual and pubertal development.

For the group of girls whose mothers were exposed to pesticides during pregnancy, 45% had breast development compared to 23% of the non-exposed, although the age distribution of the two groups of girls were similar. The mean age for breast development of the exposed girls was 8.9 years

against 10.4 years for the unexposed. The mean age of the non-exposed girls corresponded to the mean age of breast development for Copenhagen girls at the same age examined in the same period [Aksglaede et al., 2009]. Hence, puberty development started 1-1 ½ years earlier for exposed girls than unexposed girls.

Concentrations of the adrenal androgens, androstenedione and DHEAS, were higher in exposed girls but the difference was only significant for androstenedione. There were no significant differences for the other reproductive hormones between exposed and unexposed girls.

Boys are generally older when they start puberty than girls and only three of the boys were pubertal. Therefore, this study cannot determine whether the onset of puberty in boys was influenced by maternal pesticide exposure. The exposed boys had, like at 3 months of age, a tendency to smaller genitals. There was a correlation between the measurements, so boys with smaller genitals at 3 months of age also had smaller genitals now, even after adjusting for age and current body weight. There were no significant differences in serum concentrations of reproductive hormones between exposed and unexposed boys.

Effects on growth and body composition

The group of children with pesticide-exposed mothers had lower birth weights, but higher BMI z-score, abdominal circumference and body fat percentage at 6-11 years of age. Thus, they had built up more body fat from birth to school age. A similar effect is seen, both in this and other studies, of smoking in pregnancy. The results indicate an interaction between smoking and pesticide exposure as the group of children whose mothers had been exposed to pesticides and also smoked in pregnancy had lower weight at birth and more body fat at school age [Wohlfahrt-Veje et al., 2011].

Furthermore, we found that children with a particular genotype were particularly vulnerable. The PON1 gene codes for the enzyme paraoxonase. This enzyme, which in serum is associated to high-density lipoprotein (HDL), inactivates some organophosphate insecticides, and it also seem to have a protective function against the development of cardiovascular diseases [Mackness et al., 1998]. A common polymorphism in this gene, where glutamine (Q) is replaced by arginine (R) at position 192, appears to affect both of these properties. We found a correlation between the PON1 genotype and effects of prenatal pesticide exposure on risk factors for later development of cardiovascular disease. Nearly half of the children (43%) had an R allele. In this group of children, there was a significant positive correlation between the level of maternal pesticide exposure and BMI z-score, body fat percentage, abdominal circumference, blood pressure, and serum concentration of growth factor IGF-1 at school age.

Effects on the nervous system

Overall, there were no significant effects of prenatal pesticide exposure on children, but if the genders were analyzed separately, negative effects of exposure were seen for the girls in most endpoints, although only significant for language function, long-term memory and manual motor speed. For the boys no negative effects on the results from the neuropsychological tests were observed.

In a combined analysis model of the neuropsychological endpoints, we found an overall negative effect of prenatal pesticide exposure on neuropsychological

function in girls but not in boys. Maternal pesticide exposure in early pregnancy seems to have a negative effect on neurodevelopment, which was detectable among girls but not among boys in the 6-11 years of age.

Conclusions

We found an association between occupational exposure to pesticides in early pregnancy, before the women left the workplace or were replaced, and growth and development of the children later in childhood. The girls had earlier breast development and boys had slightly smaller genitals if their mothers had been exposed to pesticides.

Furthermore, the group of children with pesticide-exposed mothers, had lower birth weight but higher body fat content at 6-11 years of age and thus had built up more body fat from birth to school age. This correlation was exacerbated if the mother had smoked during pregnancy. Children with an R-allele at position 192 of the PON1 gene seems particularly vulnerable and for this group of children, a significant positive correlation between the level of maternal pesticide exposure and body fat content and blood pressure at school age was seen.

Finally, maternal exposure to pesticides in early pregnancy, seem to have a negative effect on neurodevelopment, which was detectable among girls, but not among boys, at 6-11 years of age.

The results indicate that occupational exposure to modern pesticides in early pregnancy may cause long-term effects on children's development in spite of special precautions to protect pregnant workers. Although the effects were relatively small, we do not yet know whether they could influence the function and disease risk later in life.

1 Introduktion og baggrund

Dette projekt er en opfølgning på en undersøgelse af 203 børn, hvis mødre arbejdede i væksthusegartnerier under deres graviditet. Mødrene blev inkluderet i starten af deres graviditet og der blev indhentet detaljerede informationer om arbejdsforhold og pesticideksponering under graviditeten. Børnene blev undersøgt første gang da de var 3 måneder gamle. Mødrene blev indrullet i undersøgelsen i perioden fra 1997 til 2001 og børnene var ved starten af dette projekt mellem 6 og 11 år gamle. At følge op på denne gruppe af børn giver en unik mulighed for at undersøge, om prænatal pesticideksponering kan forstyrre den endokrine og neurologiske udvikling og medføre langtidseffekter hos børnene.

1.1 Formål og hypotese

Formålet med projektet var således at belyse, om prænatal eksponering for pesticider medfører langtidseffekter på den endokrine og neurologiske udvikling hos børn, og om disse effekter kan adskilles fra effekter forårsaget af børnenes aktuelle eksponering for pesticider via kosten.

Vi ønskede derfor at:

- Undersøge hormonproduktion, kønsudvikling og vækst hos 6-11 årige børn som havde været prænatalt eksponeret for pesticider og sammenligne med børn som ikke havde været prænatalt pesticideksponeret.
- Undersøge neurologisk funktion hos de 6-11 årige børn som havde været prænatalt eksponeret for pesticider og sammenligne med børn som ikke havde været prænatalt pesticideksponeret.
- Undersøge børnenes nuværende pesticideksponering og betydningen af denne for de ovennævnte parametre.
- Undersøge betydningen af forskellige kovariater, så som genetisk sårbarhed og helbredstilstand for de undersøgte parametre.

Hypotesen er at prænatal pesticideksponering kan forstyrre virkningen af reproduktionshormoner og påvirke børns reproduktive og neurologiske udvikling på lang sigt.

1.2 Baggrund

Det er veldokumenteret, at både nervesystemet og det endokrine system er særligt sårbare overfor påvirkninger fra henholdsvis neurotoksiske og hormonforstyrrende stoffer, mens de udvikles i fostertilstanden og den tidlige barndom [Nielsen et al., 2001; Grandjean and Landrigan P. J., 2006]. En betragtelig del af de pesticider, der anvendes i dag, har neurotoksisk og/eller hormonforstyrrende virkning i celleforsøg og/eller i forsøgsdyr [Andersen et al., 2002; Laier et al., 2006; Taxvig et al., 2007]. Den højeste erhvervsmæssige pesticideksponering antages at finde sted i væksthuse specielt i forbindelse med produktionen af potteplanter og afskårne blomster [Brouwer et al., 1992; Illing, 1997]. I Danmark er ca. 2500 kvinder, mange i den fertile alder, ansat i gartnerier. Kvinder, der bliver gravide, mens de er ansat i

væksthusgartnerier, må derfor antages at have øget risiko for, at deres børns udvikling påvirkes af pesticider. I Danmark har alle gravide kvinder ret til betalt orlov, hvis det skønnes, at deres arbejde udgør en risiko for graviditetsforløbet. Derfor fraværsmeldes en stor del af de gravide kvinder indenfor gartnerfaget. Fraværsmeldingen kan dog først ske, når kvinden har konstateret og meddelt, at hun er gravid. På det tidspunkt kan kvinderne være så langt henne i graviditeten, at en mulig påvirkning af fostrene allerede er sket.

1.2.1 Etablering af undersøgelseskohorten og resultater fra tidligere undersøgelser

I 1996- 2001 blev 288 gravide kvinder, som arbejdede i væksthusgartnerier på Fyn, inkluderet i undersøgelsen: "Bekæmpelsesmidlers østrogene virkning". Der blev indhentet detaljerede oplysninger om deres arbejdsfunktioner og deres udsættelse for pesticider ved at interviewe både kvinderne selv og deres arbejdsgiver. Der blev desuden taget blodprøver på kvinderne. På baggrund af disse oplysninger blev kvinderne grupperet som pesticideksponerede (middel eller høj) og ikke-pesticideksponerede (kontroller). Kvinderne blev inkluderet i undersøgelsen gennem Arbejds- og Miljømedicinsk Klinik på Odense Universitetshospital hvortil kvinderne var henvist for at få vurderet deres arbejdsmiljø. Kvinder som var eksponeret for pesticider blev enten omplaceret til områder i gartneriet med ingen eller minimal pesticidanvendelse. Hvis dette ikke var muligt blev kvinderne fraværsmeldt. Grupperingen af kvinderne som pesticideksponeret eller ej vedrører således deres eksponeringssituation tidligt i graviditeten, indtil kvinderne blev inkluderet i undersøgelsen, hvilket gennemsnitligt var i graviditetsuge 10.

Kvinderne fik i graviditetsuge 24 tilsendt et spørgeskema om graviditetens forløb og der blev indhentet udskrivningsbrev (epikrise) fra hospitalet efter fødslen. I alt blev 203 børn (113 drenge og 90 piger) undersøgt, da de var 3 måneder gamle. De drengebørn, hvis mødre havde været eksponeret for pesticider i starten af graviditeten, havde signifikant højere prævalens af kryptorkisme (7,7 %) end drenge fra en (ueksponeret) kontrolgruppe i Københavnsområdet (1,9 %) og drenge fra en finsk kohorte (1 %) [Boisen et al., 2004]. Den samme læge undersøgte børnene i de to danske undersøgelser og de samme standardiserede undersøgelsesmetoder blev anvendt. Der var ikke signifikant forskel på prævalensen mellem de eksponerede og ueksponerede drenge indenfor gartnerkohorten, hvilket sandsynligvis skyldes det lave antal ueksponerede drenge (N=22). De 7 tilfælde af kryptorkisme, der blev fundet i gartnerkohorten, var alle hos drenge, hvis mødre havde været pesticideksponeret [Andersen et al., 2008]. Gruppen af drenge, hvis mødre havde været udsat for pesticider, havde endvidere lidt kortere penislængde, lidt mindre testisvolumen, lavere serumkoncentrationer af testosteron og inhibin B og højere serumkoncentrationer af FSH (follikelstimulerende hormon) og LH (luteiniserende hormon) i forhold til gruppen af drenge, hvis mødre ikke havde været eksponeret for pesticider under deres arbejde i væksthuse [Andersen et al., 2008]. Når resultaterne blev analyseret separat, var det kun forskellen i penislængde, som var signifikant (P=0.04). Alle de nævnte forskelle bevægede sig imidlertid i den retning, man ville forvente ved en nedsat testikelfunktion hos de prænatale eksponerede drenge og en samlet multivariat-analyse var signifikant (p=0.01) og viste dermed, at det ikke var særligt sandsynligt at dette var tilfældigt.

Analyse af blodprøver fra mødrene, afgivet i starten af graviditeten, viste en signifikant øget xeno-østrogen aktivitet hos de mødre, som var

pesticideksponerede i forhold til ikke-eksponerede, hvilket tyder på, at kvinderne udsættes for pesticider med østrogen virkning, når de arbejder i væksthuse [Andersen et al., 2007].

1.2.2 Andre undersøgelser

Den højere prævalens af kryptorkisme blandt drenge af pesticideksponerede mødre er i overensstemmelse med tidligere studier, der har vist en øget prævalens af kryptorkisme hos sønner af kvinder, der har været udsat for pesticider erhvervsmæssigt eller ved at bo i områder, hvor pesticider anvendes [Weidner et al., 1998; Garcia-Rodriguez et al., 1996; Kristensen et al., 1997]. Derudover har man fundet sammenhæng mellem koncentrationen af persistente pesticider i brystmælk og kryptorkisme hos drengebørnene [Damgaard et al., 2006].

Da reproduktionssystemet videreudvikles op i gennem barndommen kan det formodes at tidlige forstyrrelser i udviklingen kan medføre mere vedvarende ændringer i den endokrine udvikling. Der er stor aldersmæssig variation i hvornår puberteten indtræder. Det er kendt, at faktorer som etnicitet, ernæring, genetik og miljø spiller en rolle, men den store variation er ellers forholdsvist uforklaret. Overordnet set er puberteten reguleret af hypofysen, som op- og nedregulerer de overordnede kønshormoner LH og FSH. LH og FSH stimulerer kønsorganernes udvikling og produktion af henholdsvis testosteron og østrogen. Udviklingen er tidsmæssigt forskudt for de to køn, således at piger går tidligere i pubertet end drenge. Tidligt påbegyndt pubertet kan have sundhedsmæssige effekter. Udover at påvirke den senere højdevækt ved man nu også, at det kan have betydning for risikoen for sygdomme som testikelkræft, brystkræft, metabolisk syndrom og polycystisk ovarie syndrom i voksenalderen [Golub et al., 2008].

Amerikanske og europæiske undersøgelser har vist en klar tendens mod tidligere pubertetsstart for piger [Euling et al., 2008; Juul et al., 2006]. En del af forklaringen på den tidligere pubertetsstart, ligger måske i den øgede forekomst af fedme blandt børn. Meget tyder dog på, at øget kalorieindtag og fysisk inaktivitet ikke alene kan forklare ændringerne. Et nyt studie af danske skolebørn [Aksglaede et al., 2009] viste således, at begyndende brystudvikling (oftest første kliniske tegn på pubertet hos piger) nu ses et år tidligere i forhold til en 15 år gammel sammenlignelig undersøgelse, og at disse forskelle ikke kan forklares af ændret BMI. I en enkelt undersøgelse har man fundet tidligere brystudvikling hos piger i 8-10 års alderen i landbrugsområder, hvor der er anvendt pesticider [Guillette et al., 2006]. Endvidere er flere hormonforstyrende stoffer som phthalater, bisphenol A, polyklorerede bisphenoler, bromerede flammehæmmere og visse pesticider er på baggrund af humane og dyreeksperimentelle studier mistænkt for at spille en rolle i forhold til tidlig pubertetsudvikling og muligvis fedme - specielt hvis eksponeringen finder sted i fostertilværelsen [Buck Louis et al., 2008; Heindel and vom Saal F. S., 2009]. En del af forklaringen er muligvis, at disse stoffer kan påvirke den intrauterine vækst [Sagiv et al., 2007; Whyatt et al., 2004a], da den føtale vækst formentligt har betydning for senere vækst og udvikling af fedme. Såkaldt "catch up vækst" hos børn med lav fødselsvægt er således fundet at være en væsentlig prædikator for senere vægt [Ong, 2010] og måske også for alder ved pubertetsstart [Dunger et al., 2006].

I forsøgsdyr har man set øget vægt hos afkommet ved eksponering for lave doser af organofosfatsekticidet, chlorpyrifos i drægtighedsperioden mens højere doser medførte nedsat vækst [Lassiter and Brimijoin S., 2008].

Eksposering af nyfødte rotter for lave doser af et andet organofosfat, parathion, medførte ændringer i lipidmetabolismen i de voksne dyr [Lassiter et al., 2010] og hunnerne var mere følsomme end hannerne [Lassiter et al., 2008]. Pesticideksponering af kvinder under graviditet er i nogle studier fundet associeret til nedsat fødselsvægt [Dabrowski et al., 2003; Hanke et al., 2003; Levario-Carrillo et al., 2004; Whyatt et al., 2004a]. For børnene som indgik i 3-månedrsundersøgelsen, fandt vi en tendens til lavere fødselsvægt for gruppen af prænatale eksponerede børn end for de ikke-eksponerede men forskellen var ikke signifikant [Andersen et al., 2008; Andersen et al., 2008].

Udviklingen af det endokrine system og nervesystemet er tæt forbundne. Hormoner som fx. FSH og LH som dannes i hjernen har afgørende betydning for reproduktionssystemets udvikling og tilsvarende har kønshormoner dannet i kønsorganer og binyrer betydning for udviklingen af nervesystemet og betydning for kønsforskelle på neurologisk funktion og adfærd [Li et al., 2008]. Endvidere har thyroideahormoner stor betydning for udviklingen af nervesystemet i fostertilstanden [Miller et al., 2009]. Der er derfor grund til at mistænke at hormonforstyrrende pesticider kan have effekter på børnenes neurologiske udvikling.

Hæmning af acetylcholinesterase (AChE) er en klassisk markør for eksposering for organofosfater og karbamater. Eftersom østrogenniveauet påvirker enzymaktiviteten af AChE [Robertson, 1967], er denne biomarkør dog ikke brugbar hos gravide kvinder. Ikke-gravide kvindelige gartneriarbejdere, som havde håndteret pesticidbehandlede planter uden at bruge handsker havde signifikant nedsat AChE aktivitet [Nielsen and Andersen H. R., 2002]. Disse kvinder arbejdede i de samme væksthushaverier som mødre til de børn der indgår i denne undersøgelse og eksposeringen er derfor sammenlignelig.

Enzymet paraoxonase er involveret i nedbrydning og inaktivering af neurotoksiske organofosfater og forskellige andre kemikalier [Costa et al., 2003; Draganov and La Du B. N., 2004]. Indtil videre er det, os bekendt, ikke undersøgt om paraoxonase nedbryder andre pesticider end organofosfater. Polymorfier i genet (PON1), som koder for paraoxonase, kan påvirke enzymets aktivitet og dermed individets sårbarhed overfor toksiciteten af organofosfater [Berkowitz et al., 2004; Costa et al., 1999; Costa et al., 2003], og børn med ændringer i PON1-genet kan derfor antages at være mere sårbare overfor den toksiske virkning af i hvert fald denne gruppe pesticider.

2 Undersøgelsespopulation og -metoder

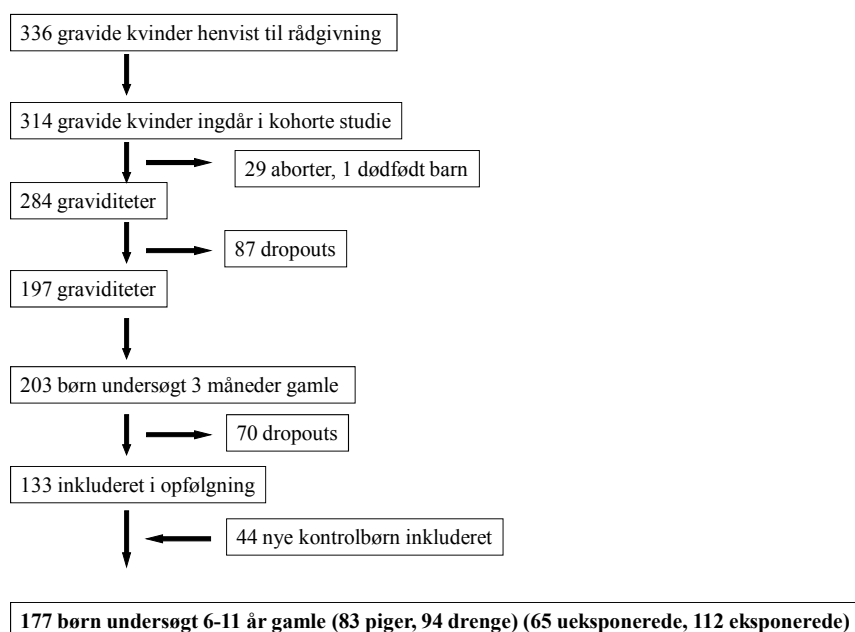
2.1 Rekruttering af forsøgspersoner

Projektet er en opfølgingsundersøgelse af en gruppe på 203 børn, hvis mødre arbejdede i væksthushavestue under graviditeten. Mødrene blev inkluderet i undersøgelsen i perioden 1997 til 2001 igennem Arbejds- og Miljømedicinsk klinik på Odense Universitetshospital, hvortil de var henvist for at få vurderet deres arbejdsforhold under graviditeten. De var typisk i starten af deres graviditet (graviditetsuge 4 til 10) og ved inklusion i undersøgelsen blev de interviewet om deres arbejdsforhold, herunder kontakt med sprøjtemidler og behandlede planter. Disse oplysninger blev suppleret ved telefonisk kontakt med arbejdsgiveren. Børnene blev undersøgt, da de var 3 måneder gamle [Andersen et al., 2008]. Ved denne opfølgingsundersøgelse var børnene 6-11 år gamle. Af de 203 børn var 113 drenge og 90 piger, heraf blev 168 børn (91 drenge og 77 piger) kategoriseret som prænatale eksponerede og 35 børn (22 drenge og 13 piger) som ikke eksponerede (kontroller). Mødrene var meget motiverede for at deltage i den første undersøgelse og vi forventede derfor en høj deltagelsesprocent. På grund af det lave antal kontroller, blev det planlagt at forsøge at supplere kontrolgruppen svarende til antallet af afbud, således at et samlet antal børn på 200 børn ville indgå i undersøgelsen. Rekruttering af disse nye kontroller foregik ved at udlevere invitationer til de familier, som indgik i undersøgelsen til at videregive til familie, venner og bekendte med børn i den aktuelle aldersgruppe, hvis mødre ikke havde arbejdet i væksthuse, hvor der blev anvendt pesticider, under graviditeten.

Der blev via personregistret indhentet opdaterede adresser på børnene i den oprindelige gruppe og udsendt informationsmateriale med mulighed for skriftligt at tilkendegive om familien ønskede at deltage eller ikke, samt mulighed for at kontakte os telefonisk for yderligere oplysninger. De familier som indsendte bekræftelse på at de ønskede at deltage blev kontaktet telefonisk og tidspunkt for undersøgelsen blev aftalt. Familier som ikke havde svaret indenfor 2 uger blev kontaktet telefonisk og spurgt om de ville deltage og i bekræftende fald blev tidspunktet aftalt. Efterfølgende blev en skriftlig bekræftelse på aftalen, kørselsvejledning, parkeringsbillet, urinprøveglas samt spørgeskema sendt til familien. Formålet med spørgeskemaet var at få oplysninger om faktorer, der kan påvirke udfaldet af de parametre, der undersøges, og derved virke som konfoundere. Der blev spurgt til barnets udvikling, trivsel og helbred, familieforhold og livsstil herunder kostvaner og fritidsbrug af bekæmpelsesmidler samt familiens socioøkonomiske forhold.

For at rekruttere nye kontrolbørn, begyndte vi per 8. november 2007 at uddele kontrol-invitationer til de familier, som kom til undersøgelsen. I de første uger af januar ringede vi desuden til de familier, som havde været til undersøgelse inden 8. november og spurgte, om de ville hjælpe ved at dele invitationer ud. I bekræftende fald blev der udsendt et aftalt antal invitationer til dem. De nye kontrolfamilier som indsendte bekræftelse på at de ville deltage blev ligeledes kontaktet telefonisk for at aftale tidspunkt for

undersøgelse og de fik efterfølgende, som de andre familier, fremsendt bekræftelse på aftalen, kørselsvejledning, parkeringsbillet, urinprøveglass og spørgeskema samt et lille supplerende spørgeskema om moderens arbejdsforhold, sygdomme, rygning og alkoholvaner under graviditeten. Ved denne procedure blev i alt 44 nye kontrolbørn inkluderet i undersøgelsen (21 drenge og 23 piger). Samlet har 177 børn gennemført undersøgelsen (Figur 2.1).



Figur 2.1 Flowskema over de mødre og børn som indgår i undersøgelsen og dem som af forskellige årsager ikke indgår.

2.1.1 Eksponeringsoplysninger

Børnenes prænatale pesticideksponering er kategoriseret ud fra oplysninger indhentet gennem et struktureret interview med mødrene når de blev inkluderet i undersøgelsen. Dette skete typisk mellem graviditetsuge 4 og 10. Der er således tale om et prospektivt studie, hvor eksponeringsoplysningerne er indhentet på det relevante tidspunkt under graviditeten og således også inden børnene blev undersøgt.

Oplysningerne omfattede den gennemsnitlige ugentlige arbejdstid, en beskrivelse af jobfunktioner og gennemsnitlige ugentlige tidsforbrug for hver arbejdsfunktion, personlige håndtering af pesticider (f.eks. udlægning og blanding), re-entry intervaller (tid fra udbringning af pesticider til der arbejdes i drivhuse, hvor pesticider er anvendt), procedure for håndtering af pesticidbehandlede plantekulturer og brugen af personlige værnemidler. Kvinderne blev også spurgt om, hvilken type af pesticidprodukter, der blev anvendt og hvor hyppigt i de relevante arbejdsområder og i drivhuset som helhed. Oplysningerne om brugen af pesticider blev suppleret med oplysninger fra arbejdsgiverne indhentet ved telefonisk kontakt.

For hver kvinde blev det samlede pesticideksponeringsniveau kategoriseret (uafhængigt af to toksikologer) i tre grupper: ingen/lav (kontrol), middel og høj som tidligere beskrevet [Andersen et al., 2007]. Kort fortalt, blev kvinder, der havde direkte kontakt med pesticider ved at udbringe, blande eller dyppe

stiklinger i pesticider vurderet som høj eller middel eksponeret afhængigt af den nøjagtige fremgangsmåde, varigheden af processen, og brugen af personlige værnemidler. For re-entry aktiviteter, blev eksponeringen vurderet som høj, hvis pesticider blev brugt hyppigt (mere end en gang om ugen) i arbejdsområdet og kvinden rapporterede ofte at håndtere de behandlede planter uden brug af handsker og at have haft arbejdsfunktioner med intensiv plante kontakt. Eksponeringen blev bedømt som ingen/ lav, hvis pesticider ikke var blevet anvendt i arbejdsområdet og kvinden ikke havde håndteret planter, der var blevet behandlet med pesticider inden for de sidste tre måneder. Eksponeringssituationer mellem disse to yderpunkter blev vurderet som middel, fx hvis pesticider blev anvendt i arbejdsområdet, men mere sjældent kombineret med intensiv kontakt til behandlede planter, eller hvis pesticider blev brugt ofte, men kvinderne ikke havde kontakt med plantekulturen inden for 24 timer efter behandlingen (Tabel 2.1). Typen og antallet af pesticider blev ikke taget i betragtning ved vurderingen. Vurderingen foregik inden børnene blev født og undersøgt og dermed total blindet i forhold til undersøgelsesresultaterne.

Tabel 2.1 Kategorisering af mødrenes pesticideksponering da de blev inkluderet i undersøgelsen tidligt i graviditeten

Arbejdsfunktion	Lavt eksponerede	Middel eksponerede	Højt eksponerede
Arbejde med pesticider	Ingen	Sjældent udvanding, dypning af stiklinger i pesticider med beskyttelses udstyr	Blanding og sprøjtning med pesticider eller ofte udvanding og/eller dypning af stiklinger i pesticider uden beskyttelsesudstyr
Re-entry aktiviteter	Ingen pesticider brugt i arbejdsområdet og ingen plantekontakt inden for de sidste 3 måneder	Pesticider benyttet i arbejdsområdet >1 gang/uge og intensiv plantekontakt med beskyttelsesudstyr eller mindre plante kontakt uden beskyttelsesudstyr eller <1 gang per uge og intensiv plantekontakt med eller uden beskyttelsesudstyr.	Pesticider benyttet i arbejdsområdet >1 gang/uge og intensiv plantekontakt uden beskyttelsesudstyr

For alle kvinder, udgjorde re-entry aktiviteter (såsom at flytte eller pakke pottplanter eller nipper stiklinger) de vigtigste arbejdsfunktioner. Ca. 20% af kvinderne rapporterede at have været direkte involveret i anvendelsen af pesticider, primært ved at udvande fungicider eller vækstreguleringsmidler. Kun få (6%) af kvinderne havde udbragt insekticider. De fleste kvinder, der blev kategoriseret som ikke eksponerede, arbejdede med tomat-, agurk- og kaktus-produktion, hvor kemisk skadedyrsbekæmpelse var blevet erstattet med biologisk skadedyrsbekæmpelse eller i separate væksthuse med anden planteproduktion, hvor pesticider aldrig eller meget sjældent (højest 1 gang om måneden) blev benyttet. Derudover havde nogle kvinder ikke været på arbejde i væksthuse af andre årsager som f.eks. skolegang eller forældreorlov.

Til trods for den grundige eksponeringsvurdering, var der ikke forskel på xeno-østrogen aktivitet i serum mellem gruppen af kvinder kategoriseret som middel eksponeret og gruppen kategoriseret som højt eksponeret [Andersen et al., 2007]. Ligeledes var der ikke forskel på de to eksponeringsgrupper med hensyn til de effekter der blev set hos drengebørnene ved 3. måneders undersøgelsen, hvorfor de to eksponerede grupper blev slået sammen til en gruppe kategoriseret som pesticideksponeret [Andersen et al., 2008]. En mulig forklaring kan være at forskellen på den reelle eksponering mellem grupperne kategoriseret som henholdsvis middel og høj er lille, fordi kvindernes adfærd kan spille ind, således at kvinder med mest kontakt til pesticider og nybehandlede planter er mere opmærksomme og påpasselige med hensyn til korrekt brug af værnemidler og hyppigere håndvask.

I denne undersøgelse sammenlignes resultaterne primært mellem børn kategoriseret som prænatal pesticideksponeret versus ueksponeret men det undersøges desuden om der tegn på en dosisrelateret effekt.

2.2 Undersøgelsesmetoder

Den samlede undersøgelse pr. barn tog ca. 3 timer og fandt sted på Afdeling for Miljømedicin på Syddansk Universitet på hverdage mellem kl. 12 og 19 og på lørdage mellem kl. 9 og 19. Ved ankomsten blev forældre og børn mundtligt informeret om undersøgelsesforløbet. Forældrene afgav herefter skriftligt samtykke på børnenes vegne og kvitterede for et vederlag som børnene modtog for at deltage. Kun børn hvis forældre afgav skriftligt samtykke indgik i undersøgelsen. Den medbragte urinprøve blev afleveret, og der blev sat bedøvelsesplaster (Emla) på børnenes albuebøjninger med henblik på at minimere ubehaget ved senere blodprøvetagning. Herefter blev børnene undersøgt ved tre forskellige undersøgelsesstationer af 45-60 minutters varighed, som beskrevet nedenfor.

Forældrene til de nye kontrolbørn blev endvidere bedt om at underskrive en tilladelse til at indhente epikriser fra fødslen for at kunne få oplysninger om fødselsvægt og -længde og andre forhold omkring fødslen. Tilsvarende oplysninger blev indhentet for de andre børn i forbindelse med 3 måneders alderen.

Endelig blev nogle familier spurgt om vi måtte fotografere børnene under undersøgelsesforløbet og anvende billederne i forbindelse med præsentation af resultaterne. Hvis familien indvilligede, underskrev forældrene en tilladelse.

2.2.1 Klinisk undersøgelse hos børnelæge

Undersøgelsen af børnene fulgte det vedhæftede undersøgelseskema (bilag C) og omfattede måling af højde, vægt, hovedomfang, fedtfoldstykkelser og blodtryk. Desuden blev der udført neurologisk undersøgelse af perifere reflekser og koordination samt vurdering af syn og hørelse. Pubertetsstadiet blev bestemt som beskrevet af Marshall og Tanner [Marshall and Tanner J. M., 1969] ved observation af aksil- og kønsbehåring (PH1: ingen kønsbehåring, PH2-PH5: stigende mængde af kønsbehåring) og observation og palpation af brystudvikling (for at undgå misklassifikation af fedtdepoter/pseudomammae) (B1: ingen palpabelt brystvæv, B2-B5: stigende brystvævsudvikling; B2 repræsenterer begyndende dannelse af brystvæv). For drengene blev længden af penis målt og placeringen af testiklerne bestemt. Testikelvolumen blev målt ved ultralydsscanning. Efter den kliniske

undersøgelse blev besvarelsen af spørgeskemaet kort gennemgået. Herefter blev der udtaget en venøs ikke-fastende blodprøve (3 x 10 ml), hvis barnet tillod dette. Afslutningsvis fik barnet lov til at vælge en lille gave.

2.2.2 Neurofysiologisk undersøgelse

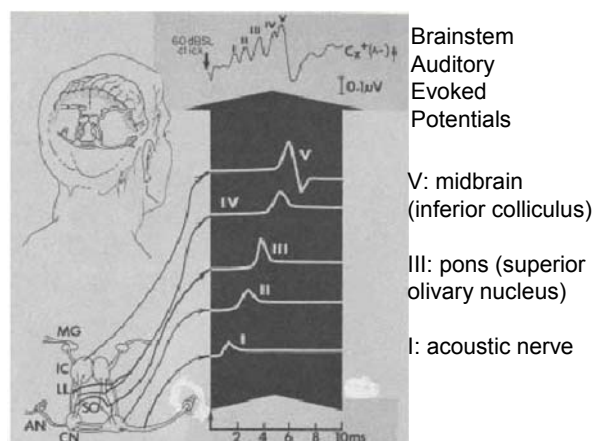
De neurofysiologiske undersøgelser omfattede

1. Evoked potentials (EP) efter visuelle og auditive stimuli. Evoked potentials er elektriske potentialer som måles fra det centrale nervesystem efter en specifik stimulering af et sanseorgan. Forskellige sanseindtryk har forskellige modtagerområder i hjernen og ved at placere elektroder på hovedet over de pågældende områder kan nerveledningshastigheden måles. I denne undersøgelse blev anvendt 'visual evoked potential' (VEP), hvor barnets øjne stimuleres ved at skulle følge en lysprik på en skakbrætsternet computerskærm (Figur 2.2) samt 'brainstem auditiv evoked potential' (BAEP) (Figur 2.3 og Figur 2.4), hvor barnets hørelse stimuleres af kliklyde ved 20 Hz og 40 Hz. EP detekteres via elektroderne som tilsluttes en elektromyograf med et højt signal-til-støj forhold (Nihon Kohden Neuropack μ compact EP system MEB-9104) og responset gemmes direkte på en tilsluttet computer. Der er udført dobbeltmålinger på både VEK og BAEP.

Forsinkelse i EP er indikator for nedsat nerveledningshastighed, som kan opstå ved neurotoksiske påvirkninger. Disse målinger synes at være uafhængig af socioøkonomiske forhold og motivation og kan derfor betragtes som objektive mål. På grund af apparatnedbrud blev der kun optaget brugbare EPs for 93 af børnene.



Figur 2.2. Undersøgelsessituation af Visual Evoked Potential (VEP), hvor barnets øjne stimuleres ved at skulle følge en lysprik på en skakbrætsternet computerskærm og de opståede elektriske nerveledningspotentialer måles via de påsatte elektroder.



Figur 2.3. Koncept i måling af brainstem auditory evoked potentials (BAEP). En klik-lyd inducerer respons i flere nerver i hjernestammens auditoriske strukturer som reflekteres i det sammensatte respons indikeret øverst til højre.



Figur 2.4. Undersøgelsessituation af Brainstem Auditiv Evoked Potential (BAEP), hvor barnets hørelse stimuleres af kliklyde ved 20 Hz og 40 Hz og de opståede elektriske nervedningspotentialer måles via de påsatte elektroder.

2. Hjerterate (puls) variabilitet blev målt i 5 minutter ved hjælp af en trådløs Polar S810 hjerterate monitor med infrarød dataoverførsel til en computer (Figur 2.5). Denne måling indgår som indikator for påvirkning af det autonome nervesystem. Efter at barnet havde ligget stille i mindst 5 minutter blev der målt 300 intervaller mellem hjerteslag (R-R intervaller) og de 100 konsekutive R-R intervaller med mindst standard deviation (SD) blev anvendt til beregning af hjerterate variationen (CV_{RR}). CV_{RR} er forholdet mellem SD og gennemsnittet for de 100 R-R intervaller i % ($CV_{RR} = SD * 100 / \text{gennemsnit af R-R intervallerne}$). På grund af tekniske vanskeligheder med monitoren på fire af undersøgelsesdagene blev der kun opnået målinger for 128 af de 177 børn.



Figur 2.5. Undersøgelsessituation af måling af hjerterate variabilitet (puls).

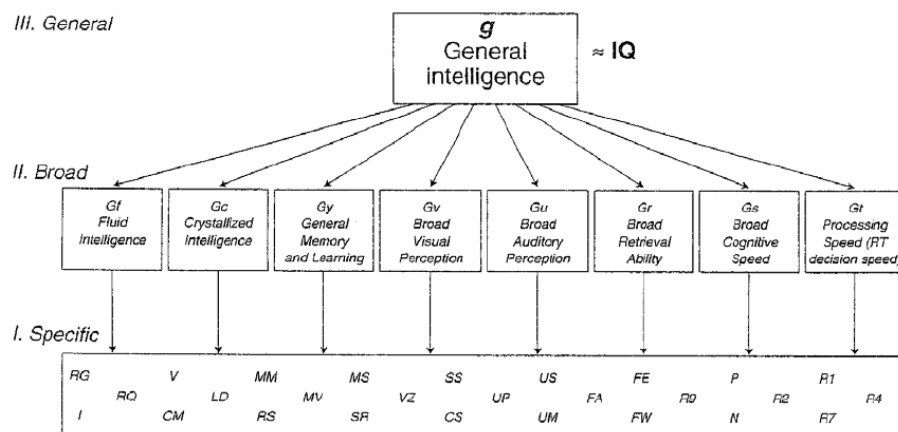
3. Måling af simpel reaktionstid blev målt ved at barnet trykkede på en sensorknap, først med foretrukne og dernæst med ikke-foretrukne hånd, så hurtigt som muligt når barnet hører en bip-lyd (Figur 2.6).



Figur 2.6. Undersøgelsessituation af reaktionstidsmåling. Barnet trykker på en sensorknap hurtigst muligt efter at barnet hører en bip-lyd.

2.2.3 Neuropsykologisk undersøgelse

Børnene blev testet med forskellige opgaver indenfor opmærksomhed, visuospatial opfattelse, hukommelse, sprog og intelligens. De anvendte testmetoder er valgt ud fra teorier om den menneskelige mentale evnes hierarkiske struktur i faktoranalytiske studier (Figur 2.7). Testene måler på fire af de brede gruppefaktorer (Gf, Gv, Gsm og Gs), som er kendt fra faktoranalytiske studier af normalpopulationer og som stort set er overlappende med funktioner, som også kendt fra neuropsykologien ud fra studier af hjerneskader. Hertil kommer en ren psykomotorisk hastighedstest (Fingertapping), som ikke kræver nogen løbende mental forarbejdning, men som er meget nyttige ved undersøgelse af hjerneskader inden for neuropsykologi.



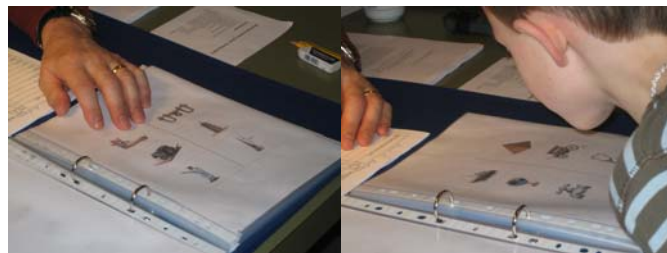
Figur 2.7 Hierarkisk model af menneskets mentale evner (adapteret fra Carroll, 1993, p.626).

De valgte testmetoder er tilpasset aldersgruppen og har været anvendt til testning af børnene i den ecuadorianske undersøgelse omtalt tidligere [Grandjean et al., 2006] samt i undersøgelser på Færøerne af methylkviksølv's indvirkning på børns neurologiske udvikling [Grandjean et al., 1997; Grandjean, 2007; Weihe et al., 2002]. Følgende tests indgik i den anførte rækkefølge:

1. WJ III Verbal Comprehension - Picture Vocabulary (a.m. BNT)
2. Stanford-Binet Copying
3. Stanford-Binet Copying, Immediate recall
4. Conners' CPT
5. Standford-Binet Memory for sentences
6. Finger Tapping
7. WISC-R, Digit Span (F & B)
8. Raven Coloured Progressive Matrices (A & B)
9. WJ III Verbal Comprehension - Synonyms
10. WJ III Verbal Comprehension - Antonyms
11. WJ III Verbal Comprehension - Verbal Analogies
12. WJ III Picture Vocabulary (a.m. BNT), Recall

WJ III (Woodcock-Johnson III) Verbal Comprehension består af 4 delprøver, som tilsammen udgør et mål for verbale evner (tests 1, 9, 10 og 11).

WJ III Picture Vocabulary (test 1). Barnet vises tegninger af forskellige objekter af stigende sværhedsgrad (fx sko og baby i den lette kategori til pagode og åreprese i den sværeste kategori (Figur 2.8). Testen administreres i overensstemmelse med Boston Naming Test, hvilket vil sige, at der gives en stimulerende lyd (stimulus cue), hvis barnet ikke ved hvad et objekt forestiller og første lyd (fonemisk cue), hvis barnet ikke kan finde det rigtige ord. Hvis barnet herefter ikke kan svare med navnet gives løsningen af undersøger, hvorefter der spørges, om navnet er et ord, som barnet kender.



Figur 2.8. Undersøgelsessituation af WJ III Picture Vocabulary testen, hvor barnet skal benævne objekter af stigende sværhedsgrad.

Til Picture Vocabulary (test 1) var tilføjet en hukommelsesbetingelse (test 12), hvor barnet efter ca. 55 min. blev spurgt, hvor mange af billederne det kunne huske. Der var ikke krav om korrekt benævnelse.

S-B Copying står for Copying testen fra Stanford-Binet IV. Det er en visual-spatial test, hvor barnet skal kopiere (aftegne) figurer af stigende kompleksitet (test 2). Denne test blev tilføjet en umiddelbar hukommelsesbetingelse (test 3), hvor barnet ud fra hukommelsen skulle tegne så mange som muligt af de just kopierede figurer.



Figur 2.9. Undersøgelsessituation af Copying testen fra Stanford-Binet IV, hvor barnet skal kopiere figurer af stigende kompleksitet.

Conners' CPT står for Conner's Continuous Performance Test (test 4). Barnets opmærksomhed og koncentrationsevne blev testet i et computerprogram, hvor barnet skulle aktivere en tast hver gang det så et bogstav på skærmen undtagen hvis bogstavet var et X (selektiv attention og selektiv inhibition). Testen blev udført i 14 minutter (Figur 2.10).

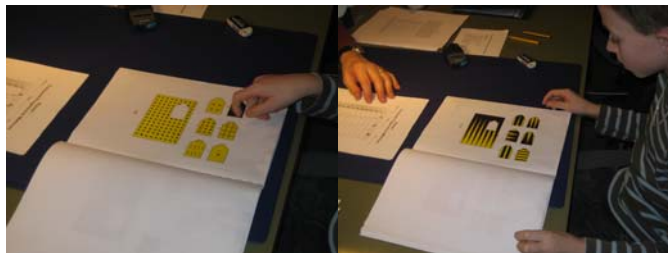


Figur 2.10. Undersøgelsessituation af Conners' CPT testen, hvor barnet skal reagere på bogstaver der vises på skærmen.

S-B Memory for sentences (test 5) står for Stanford-Binet IV sætningsgengivelse. Undersøgeren siger sætninger af stigende kompleksitet, som barnet skal gentage.

WISC-R, Digit Span (F & B) (test 7) står for talspændevideprøven (forfra + bagfra) fra Wechler Intelligence Test for Children Revised. Undersøgeren siger talrækker af stigende længde som barnet skal gentage forfra og bagfra.

Raven Coloured Progressive Matrices (A & B) (test 8) er en non-verbal test af generel intelligens, hvor barnets evne til at registrere det organisatoriske princip (rumligt, designmæssigt og numerisk) i et visuelt materiale testes (Figur 2.11).



Figur 2.11. Undersøgelsessituation af Raven Coloured Progressive Matrices testen, hvor barnet skal gennemskue det organisatoriske princip i forskellige typer figurer.

Finger tapping (test 6) er en manuel psykomotorisk hastighedstest, hvor barnet med pegefingern trykker en lille plade ned. Hvert tryk registreres automatisk (Figur 2.12). Der tappes i 15 sekunder med foretrukne hånd og efterfølgende 15 sekunder med ikke foretrukne hånd. Dette gentages to gange. Første gang med hver hånd betragtes som øvelse og indgår ikke i beregningen.

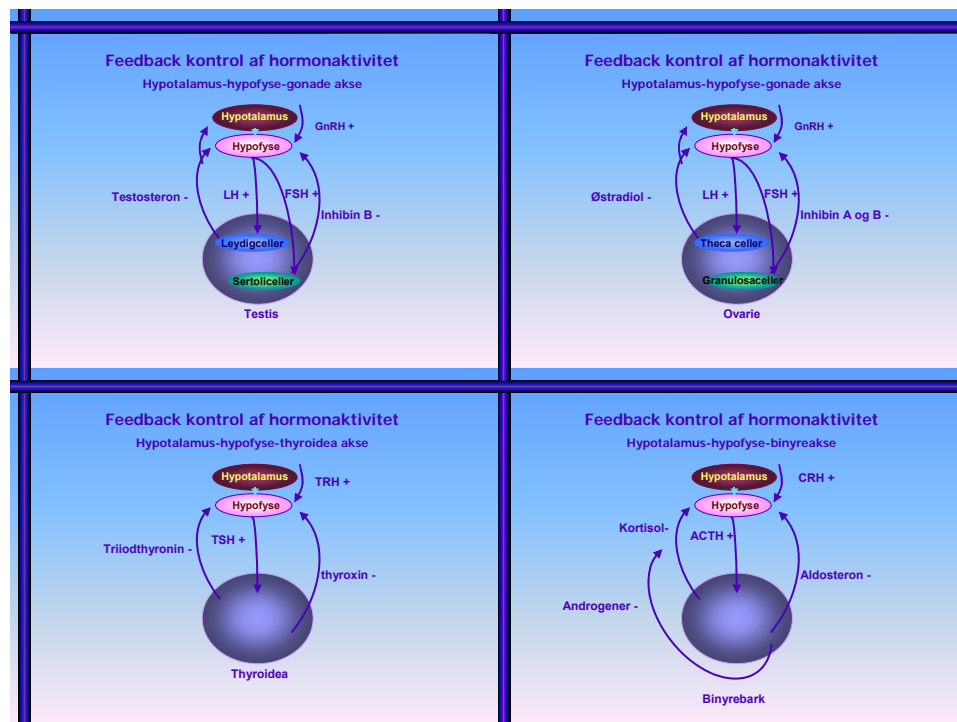


Figur 2.12. Undersøgelsessituation af Finger tapping testen, hvor det registreres hvor mange gange på 15 sekunder barnet kan trykke pladen ned.

2.3 Laboratorieanalyser

2.3.1 Hormonanalyser i serum

Måling af hormoner i serum omfatter en screening af alle endokrine akser da disse er gensidigt reguleret under opvækst og pubertal udvikling. Hormonsyntesen i gonaderne og binyrerne reguleres overvejende af de samme enzymatiske trin og vil derfor sandsynligvis begge kunne påvirkes af hormonforstyrrende stoffer. Derfor har vi valgt at inkludere androgener syntetiseret i binyrerne som mål for binyrernes funktion. Hvert hormonsystem har sin egen feed-back regulering i forhold til hypofyse og hypothalamus (Figur 2.13). Derfor kan forholdet mellem perifert og centralt producerede hormoner ofte give bedre biologiske informationer om ændringer i den homeostatiske balance end absolutte værdier af de enkelte hormoner.



Figur 2.13. Feed-back kontrol mellem hypothalamus, hypofyse og henholdsvis gonader (dreng og pige), gl. thyroidea og binyrer.

Gonadeaksen blev undersøgt ved måling af luteiniserende hormon (LH) follikelstimulerende hormon (FSH), inhibin B (og inhibin A i piger), testosteron, østradiol, sexhormon binding globulin (SHBG) og prolaktin. Thyroideaaksen blev undersøgt ved måling af thyroidea stimulerende hormon (TSH), thyroxin (T4), frit T4, og triiodthyronin (T3). Fra binyreaksen blev

målt testosteron, frit testosteron, SHBG, dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), androseindion, dihydrotestosteron. Da vækst og pubertal udvikling er tæt relateret, er vækstfaktorerne insulin like growth factor-1 (IGF -1) og insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) også inkluderet. Disse faktorer er desuden, ligesom thyroid hormoner, involveret i reguleringen af SHBG. De målte hormoner samt analysemetoderne fremgår af Tabel 2.2.

Tabel 2.2. Hormonanalyser i serum

Afd. Vækst og Reproduktion Rigshospitalet	Metode (detektionsgrænse)
LH ^{1,2}	IFMA (0.05 IU/L)
FSH ^{1,2}	IFMA (0.05 IU/L)
SHBG ^{1,2}	IFMA (0.23 nmol/L)
Testosteron ^{1,2}	RIA (0.23 nmol/L)
Østradiol ^{1,2}	RIA (18 pmol/L)
Inhibin A ^{1,2}	ELISA (17 pg/mL)
Inhibin B ^{1,2}	ELISA (20 pg/mL)
IGF-I ³	RIA (21 ng/mL)
IGFBP-3 ³	RIA (300 ng/mL)
Klinisk Biokemisk Afdeling Rigshospitalet	
TSH ⁴	ECLIA (0.01mIU/L)
Total thyroxin ⁴	ECLIA (8.0 nmol/L)
Fri thyroxin ⁴	ECLIA (0.5 pmol/L)
Total trijodthyronin ⁴	ECLIA (0.5 nmol/L)
Prolaktin ⁴	IFMA (5 mIU/L)
Statens Seruminstitut	
Androgenstatus ⁵ (=testosteron, dihydrotestosteron, androstendion, SHBG, dehydroepiandrosteronsulfate)	RIA (efter æterekstraktion og HPLC)

ECLIA = elektrochemiluminescence-immunoassay, ELISA= enzyme-linked immunosorbent assay, HPLC= high pressure liquid chromatography, IFMA = immunofluorometrisk assay, RIA= radioimmunoassay. Alle metoder er etableret og anvendes rutinemæssigt på Rigshospitalet.

¹: Main KM et al, J Clin Endocrinol Metab 2006; 91(7): 2732-2737; ²: Chellakooty M et al, J Clin Endocrinol Metab 2003; 88(8): 3515-3520; ³: Chellakooty M et al, J Clin Endocrinol Metab 2006; 91(3): 820-826; ⁴: Main et al, Horm Res 2006; 65(1): 1-5; ⁵: Johannesen TH et al, J Clin Endocrinol Metab 2005; 90(4): 2076-2080

2.3.2 Geno- og fænotype af paraoxonase 1 (PON1)

Enzymaktiviteten af paraoxonase i serum blev bestemt spektrofotometrisk med paraoxon som substrat [Mackness et al., 1991; Dalgard et al., 2007] på Afdeling for Miljømedicin, Syddansk Universitet. Serum (25 µl pr prøve) blev blandet med 0,5 ml Tris buffer (100 mmol/l, pH 8.0) som indeholdt 2 mmol/l CaCl₂ og 5.5 mmol/l paraoxon (O,O-diethyl-O-p-nitrophenylphosphate, Sigma Chemical Co). Dannelsen af p-nitrophenyl blev målt kontinuert i 3 minutter ved 405 nm og 25°C på et spektrofotometer (Perkin Elmer, Lambda 11).

Genotypning af PON1 blev udført på afd. for Klinisk Biokemi og Klinisk Genetik, OUH. DNA blev isoleret fra buffy coats fra blod prøverne og PON1 genotype for C-107T (rs705379), M55L (rs854560) og Q192R (rs662) polymorfierne blev bestemt med et Taqman baseret allel diskriminerings assay ved brug af ABI Prism 7700 Sequence Detection System som tidligere beskrevet [Christiansen et al., 2004]. Det lykkedes at bestemme PON1 genotypen for 141 børn.

2.3.3 Pesticidmetabolitter i urin

Måling af pesticider og nedbrydningsprodukter er udført for at estimere børnenes pesticideksponering på undersøgelsestidspunktet. De pesticider, der er analyseret for er alle hyppigt anvendte, der optræder som rester i fødevarer. Eksponering via kosten må formodes at være den væsentligste kilde til børnenes nuværende pesticideksponering. Måling af metabolitter fra neurotoksiske insekticider (organofosfater, karbamater og pyrethroider) samt fra dithiocarbamat fungicider er udført på Center of Disease Control (CDC) i Atlanta i USA (Tabel 2.3). Der er analyseret 174 urinprøver. Analyserne er udført i tre separate kørsler:

1. Fire organofosfatinsekticider (acephat, methamidophos, omethoat, dimethoate) og 2 metabolitter af dithiocarbamatfungicider (ethylenethiourea og propylenethiourea) analyseret med 96-brøndsplade automatiseret ekstraktion og efterfølgende HPLC-MS/MS [Jayatilaka et al., 2010]. CDC har endnu ikke fastlagt referenceværdier for disse 6 stoffer.

2. Seks dialkylphosphat (DAP) metabolitter: dimethylphosphat (DMP), diethylphosphat (DEP), dimethylthiophosphate (DMTP), dimethyldithiophosphat (DMDTP), diethylthiophosphat (DETP) og diethyldithiophosphate (DEDTP) målt ved lyofilisering med gaskromatografi-tandem massespektrometri and isotopfortyndingskvantificering [Bravo et al., 2004]. CDC har bestemt referenceværdier for disse 6 DAP-metabolitter i den amerikanske befolkning:

<http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/FourthReport.pdf>.

3. Fire pyrethroidmetabolitter: 4-fluoro-3-phenoxybenzoylsyre (4-F-3-PBA), cis-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropan (cis-DBCA), 3-phenoxybenzoylsyre (3-PBA), and trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropan (trans-DCCA). Analyserne er udført med en væskrokromatografi-tandem massespektrometri multiresidue metode [Olsson et al., 2004]. Referenceværdier for den amerikanske befolkning kan ligeledes findes i rapporten: <http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/FourthReport.pdf>

Tabel 2.3 Pesticidmetabolitter målt i urinprøver hos CDC

Metabolit navn	Forkortelse	Moderpesticid	LSTD	Units	Reference Range (g/L) †Median - 95th
4-fluoro-3-phenoxybenzoylsyre	4FP	Cyfluthrin (Pyrethroid)	0.32-0.40	µg/L	<LOD
cis-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropan	CBC3	Deltamethrin (Pyrethroid)	0.22-0.36	µg/L	<LOD
3-phenoxybenzoylsyre	OPM	general pyrethroid metabolite	0.67-0.80	µg/L	0.28 - 3.32
trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropan	TCC	permethrin; cypermethrin; cyfluthrin (Pyrethroid)	1.39-1.97	µg/L	<LOD - 2.54
Diethyldithiophosphat	DEDTP	O,O-diethyl substituerede OP insekticider med to svovlatomer	0.45 - 0.56	µg/L	0.1 - 0.9
Diethylphosphat	DEP	O,O-diethyl substituerede OP insekticider	0.50 - 0.57	µg/L	1.2 - 13.0
Dimethyldithiophosphat	DMDTP	O,O-dimethyl substituerede OP insekticider med to svovlatomer	0.52 - 0.58	µg/L	<LOD - 19.0
Dimethylphosphat	DMP	O,O-dimethyl substituerede OP insekticider	0.47 - 0.55	µg/L	0.7 - 14.0
Dimethylthiophosphat	DMTP	O,O-dimethyl substituerede OP insekticider med et svovlatom	0.53 - 0.56	µg/L	2.7 - 48.0
Diethylthiophosphat	DETP	O,O-diethyl substituerede OP insekticider med to svovlatomer	0.46 - 0.57	µg/L	0.5 - 2.2
acephat	APE	Acephate (OP)	0.27-0.30	g/L	Ikke fastlagt
dimethoat	MTO	Dimethoate (OP)	0.26-0.38	g/L	Ikke fastlagt
methamidophos	MMI	Methamidophos (OP)	0.25-0.27	g/L	Ikke fastlagt
o-methoat	OMO	o-methoate (OP)	0.28-0.29	g/L	Ikke fastlagt
propylene thiourea	PTU	bis-dithiocarbamates	0.10-0.30	g/L	Ikke fastlagt
ethylene thiourea	ETU	bis-dithiocarbamates	0.37-0.65	g/L	Ikke fastlagt

OP: organofosfate

LSTD: laveste standard. <LOD(limit of detecion): mindre end detektionsgrænsen

†Median og 95 percentiler for den amerikanske befolkning over 6 år bestemt i NHANES 2003-2004 (<http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/FourthReport.pdf>)

Målinger af fungicidet prochloraz og metabolitterne 2,4,6-trichlorophenoxy eddikesyre (TCPAA) og trichlorphenol (TCP) i urinprøverne er udført på afdeling for Miljømedicin, Syddansk Universitet. Der er anvendt HPLC-MS/MS (triplequadrophol massespektrofotometri) med miconazol som intern standard. Urinprøverne (2 ml) blev inden måling ekstraheret på fastfase kolonner.

2.3.4 Phthalatmetabolitter i urin

Målinger af phthalatmetabolitterne MEP, MiBP, MBzP, MPP, MEHP, MEHHP, MEOHP, MECPP, MOP, MiNP, MhiNP, MoiNP og MciOP er udført på afdeling for Vækst og Reproduktion med LC-MS/MS (væskekromatografisk tandem masse spektrometri) [Frederiksen et al., 2010] i urin fra 173 børn. 160 af disse urinprøver var morgenuriner mens 13 var spotprøver lavet på stedet.

2.3.5 Ethiske forhold

Projektet er anmeldt til og godkendt af Den Videnskabsetiske Komité for Region Syddanmark (projekt-ID: S-20070068) og Datatilsynet (J.nr.: 2007-41-0956).

En tillægsansøgning om inkludering af flere børn til kontrolgruppen ved at dele invitationer ud til de familier, som allerede deltager, er anmeldt og godkendt d. 6. November 2007 af Den Videnskabsetiske Komité for Region Syddanmark under samme projekt-ID som anført ovenfor.

2.3.6 Dataanalyser

2.3.6.1 Definitioner og beregninger

Vægt i forhold til gestationsalder (WGA) blev udtrykt som afvigelsen (%) fra den forventede gennemsnitlige WGA [Marsal et al., 1996]. Normalvægtige (appropriate for gestational age, AGA) blev defineret som fødselsvægte mellem -22% og +22% af den forventede vægt ved gestationsalderen, hvilket svarer til -2 og +2 SD. Lille i forhold til gestationsalder (small for gestational age, SGA) blev defineret som WGA under -22% og stor i forhold til gestationsalder (large for gestational age, LGA) over 22% i forhold til den forventede vægt.

Sum af fire hudfolder (mm) blev beregnet som summen af: triceps + subscapulær + biceps + flankehudfolder (mm). Kropsfedtprocent er beregnet ud fra hudfoldstykkelsen ved en køns- og aldersspecifik ligning. For piger: $(1,33 (\text{triceps} + \text{subscapular}) - 0,013 (\text{triceps} + \text{subscapular})^2 - 2,5)$, når summen af triceps og subscapulære hudfolder er lavere end 35 mm og $(0,546 (\text{triceps} + \text{subscapular}) + 9,7)$, når summen er højere end 35 mm. For drenge: $(1,21 (\text{triceps} + \text{subscapular}) - 0,008 (\text{triceps} + \text{subscapular})^2 - 1,7)$, når summen af triceps og subscapulære hudfolder er lavere end 35 mm og $(0,783 (\text{triceps} + \text{subscapular}) + 1,6)$, når summen er højere end 35 mm. [Slaughter et al., 1988].

Body Mass Index (BMI) blev beregnet som kg/m^2 og Ponderal-Indeks (PI) som kg/m^3 . Alders- og kønsspecifikke BMI Z-score blev beregnet som barnets BMI-værdi minus gennemsnitsværdien for BMI for en køns- og aldersmatchet referencegruppe divideret med standardafvigelsen for referencegruppen. En nutidig dansk referencegruppe blev anvendt [Nysom et al., 2001]. Forskellen i

BMI Z-score (Δ BMI) fra fødsel til skolealder blev beregnet ved at subtrahere BMI Z-score ved fødslen fra BMI Z-score i skolealderen. En Δ BMI Z-score $> 0,67$ blev betragtet som en betydelig klinisk ændring, idet $0,67$ SD repræsenterer bredden af hvert percentilbånd i standard vækstdiagrammer (dvs. 2. til 9. 9. til 25., 25. til 50 centiler osv.) (Ong et al. 2000).

Husstandens socialgruppestatus er bestemt på baggrund af forældrenes stillingsbetegnelse (Hansen 1986) (se Socialforskningsinstituttets retningslinjer: <http://www.sfi.dk/Default.aspx?ID=1178>). Den højeste socialgruppestatus for forældre der bor sammen med barnet er anvendt.

2.3.6.2 Statistiske analyser

Log-transformering af variablene blev anvendt, hvis det var nødvendigt for at opnå normalfordeling af residualerne.

Δ BMI Z-score blev både anvendt som kategorisk variabel (+ / - klinisk signifikant ændring) og som kontinuert variabel i regressionsanalyser.

På grund af det lave antal børn i de tre øverste socialgrupper, blev socialgruppe omkodet til tre kategorier: Gruppe 1-3, gruppe 4 eller gruppe 5, og indgår i modellerne som to dummy-variable med gruppe 4 som reference, da de fleste familier tilhørte denne gruppe.

Prænatal pesticideksponering indgik generelt i analyserne som binær variabel med 0: ueksponeret; 1: eksponeret. I analyser, hvor eksponeringen er yderligere opdelt i middel og høj eksponering, er der anvendt to dummy-variable for middel og højteksponerede med ueksponeret som reference. I trend analyser for dosis-respons indgik variabelen som 0: ueksponeret, 1: middel og 2: høj eksponeret.

Maternel rygning og alkoholindtag i graviditeten indgik som binære variable (0: nej; 1: ja). I nogle analyser er rygning i graviditeten endvidere opdelt i over eller under 10 cigaretter dagligt og indgår i analyserne som to dummy-variable med ikke-rygere som reference.

Forskelle i karakteristika mellem gruppen af prænatalt pesticideksponerede børn og ueksponerede børn, mellem de to typer kontrolbørn samt mellem de to PON1 192 genotyper er for kategoriske variable testet med Fishers-eksakte-test ved 2 kategorier og Pearsons chi-i-anden-test ved flere kategorier. Forskelle på ujusterede kontinuerte variable er testet med Mann-Whitney U-test eller med ANOVA (forskelle mellem genotyper).

Effekten af prænatal pesticideksponering på diverse udfald blev undersøgt ved multiple regressionsanalyser med inklusion af relevante forklarende variable som anført nedenfor for de undersøgte udfald.

Effekter på kønsudvikling

Vurdering af betydningen af prænatal pesticideksponering (0 = nej, 1 = ja) for sandsynligheden for brystudvikling (0: ikke palpabelt brystvæv (Tanner B1) og 1: Tanner B2 eller B3) blev undersøgt med logistisk regression. Logit analyse blev brugt til at identificere den gennemsnitlige alder for brystudvikling hos ueksponerede og eksponerede. Den første model inkluderede alder som en kontinuert variable. Den anden model inkluderede desuden BMI som kontinuert variabel. Resultaterne er angivet som odds ratio (OR) med 95% konfidensintervaller (KI) og p-værdier.

Forskelle på testikelstørrelse og penislængde mellem prænalt pesticideksponerede og ueksponerede drenge blev undersøgt med lineær regression. Tre drenge, alle i den ueksponerede gruppe, med påbegyndt pubertet er udeladt fra analyserne. Der er anvendt tre regressionsmodeller. Alder og vægt indgår som kovariater i alle tre modeller. Model 1 inkluderer desuden prænatal pesticideksponering (ja/nej), model 2 og 3 inkluderer middel og høj eksponering som dummy-variable og model 3 inkluderer endvidere genitale misdannelser som kovariat. Korrelationer mellem genitaliers størrelse ved 6-11 og 3 måneders alderen blev analyseret med multivariat regression og justering for alder og vægt.

Effekter på vækst og kropssammensætning

Sammenhænge mellem prænatal pesticideksponering og fødselsudkom og kropssammensætning i 6-11 års alderen blev analyseret ved multipel lineær regression. Rygning og alkoholindtag i graviditeten, forældres rygevaner under barnets opvækst, moders etnicitet, amning, socialgruppe, køn, flerfoldsgraviditet, barnets alder på undersøgelsestidspunktet, og gestationsalder blev betragtet som mulige konfoundere. De variable som resulterede i ændringer af estimatet (β) på 10% eller derover blev inkluderet i de endelige modeller. Modellen for fødselsudkom inkluderede gestationsalder, maternal rygning i graviditet og prænatal pesticideksponering. Børn fra flerfoldsgraviditeter blev udeladt. Modellen for kropssammensætning i 6-11 års alderen inkluderede køn og alder på undersøgelsestidspunktet (på nær for BMI Z-score), socialgruppe, maternal rygning i graviditet og prænatal pesticideksponering.

Hormonmålinger

Dataanalyserne er udført separat for drenge og piger.

Forskellen i andelen af prøver hvor serumkoncentrationen af reproduktionshormoner var under detektionsgrænsen (LOD) mellem eksponerede og ueksponerede blev testet med Fishers-eksakte-test. Forskelle i serumkoncentrationer af reproduktionshormoner mellem eksponerede og ueksponerede er testet på ln-transformerede variable med lineær regressionsanalyse efter justering for alder. Serum niveauer under detektionsgrænsen blev sat til halvdelen af LOD.

Forskelle i vækstfaktorer (IGF-I og IGFBP3) og skjoldbruskkirtel hormoner mellem eksponerede og ueksponerede blev analyseret med lineær regression. Kovariater i modellen var alder, BMI, og pubertet (hos piger). Tidspunkt på dagen hvor blodprøven tages kan påvirke serumniveauer af thyreoideahormoner, men dette blev ikke medtaget i den endelige model, da det ikke ændrede estimatet.

Pesticider i urin

Koncentrationen af dialkylfosfatmetabolitter (tre dimethylmetabolitter og tre diethylmetabolitter), som samlet dækker et bredt spektrum af de anvendte organofosfater, blev omregnet til nmol/g creatinin og adderet til mål for henholdsvis diethylmetabolitter samlet (DEPs), dimethylmetabolitter samlet (DMPs) og dialkylmetabolitter samlet (DAPs = DEPs + DMPs). Forskelle mellem prænalt pesticideksponerede og ueksponerede børn samt mellem børn med og uden R-allelet i PON1 192 genet er testet med Mann-Whitneys U-test.

Effekt af nuværende organofosfateksponering (DAPs) på neurologiske effektvariable er undersøgt med DAP-koncentrationen som kontinuert variabel (log-transformeret).

De mere specifikke pesticidmetabolitter blev detekteret i under halvdelen af urinprøverne og indgår ikke i yderligere statistiske analyser.

Geno- og fænotype af paraoxonase (PON1)

Forskelle i PON1-aktivitet mellem de forskellige PON1-genotyper blev analyseret med ANOVA and Least Significant Difference (LSD) test. Effekten af relevante kovariater på PON1 aktiviteten (log-transformeret) blev undersøgt ved lineær regression. De tre PON1 polymorfier indgik som 3 binære variable hvor typen med højest aktivitet blev sat til 1.

Effekten af prænatal pesticideksponering på diverse udfald blev undersøgt ved lineær regression og udført samlet for de 144 børn som fik bestemt PON1 aktivitet og for de to PON1 Q192R-genotyper separat. Køn og alder indgik som obligatoriske kovariater i alle modellerne. For effekter på vækst og kropssammensætning indgik desuden socialgruppe og maternel rygning (som binær variabel). For fødselsvægt og Δ BMI Z-score blev gestationsalder medtaget i modellerne. For blodtryk og hjerterate-variabilitet indgik maternel rygning og for blodtryk endvidere BMI. IGF-I og IGFBP3 blev analyseret både med og uden justering for BVM.

Neurofysiologiske undersøgelser

Effekten af prænatal pesticideksponering på hjerterate variabilitet (CVrr) (ln-transformeret) og evoked potentials (EPs) er undersøgt ved lineær regression efter justering for alder, køn, moders rygning i graviditet og for EPs også alkoholindtag i graviditeten.

Neuropsykologiske undersøgelser

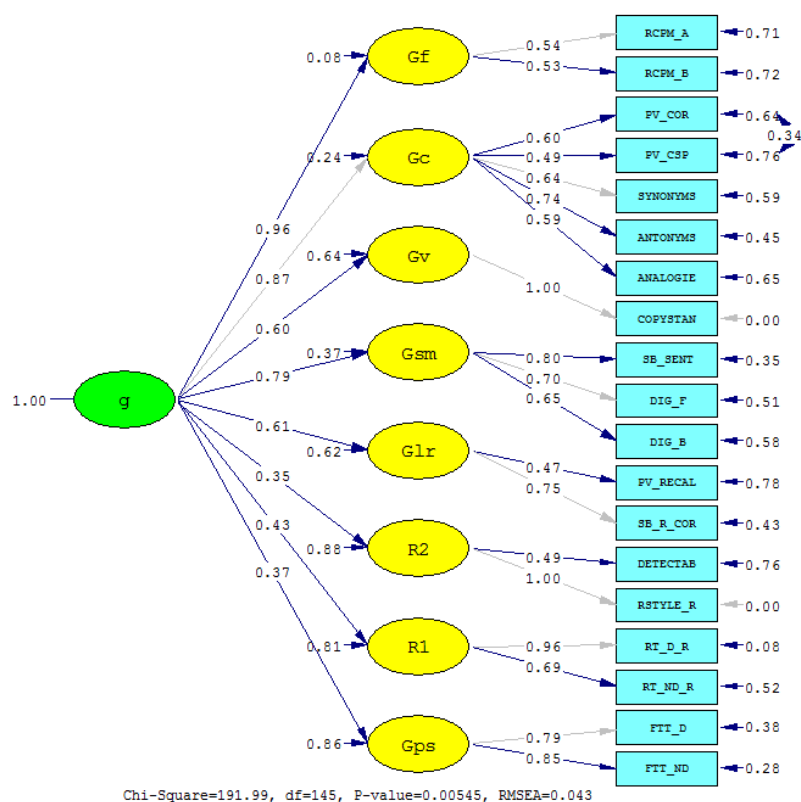
Effekter af prænatal og nuværende pesticideksponering på forskellige neuropsykologiske funktioner er analyseret dels for de enkelte effektvariable hver for sig og dels i en efterfølgende samlet analyse.

Effekter af prænatal pesticideksponering (binær variabel) eller i tre kategorier (dummy-variable) samt nuværende eksponering for organofosfater, målt ved DAP-koncentrationen i urin (log-transformeret), på de enkelte effektvariable er analyseret ved lineær regression. Barnets alder, moderens rygning og alkoholindtag under graviditet, neurologisk sygdom eller hjernerystelse hos barnet og familiens socialgruppe er medtaget som obligate forklarende variable i alle analyserne. Desuden er køn inkluderet som forklarende variabel, både som selvstændig variabel og som vekselvirkning mellem køn og eksponering. Hvis der var kønsforskel på effektvariablen eller signifikant interaktion mellem køn og effekt blev regressionsanalyserne gentaget separat for hvert køn.

En række andre mulige prædiktorer så som moderens etnicitet, hvor mange børn der er i husstanden, om barnet har små søskende og/eller store søskende eller hvor mange timer barnet bruger dagligt foran en skærm er testet og bibeholdt i analyserne, hvis de ændrede effekten (β) med mere end 10%. Det fremgår af de enkelte tabeller i resultatafsnittet, hvilke forklarende variable resultaterne er korrigeret for.

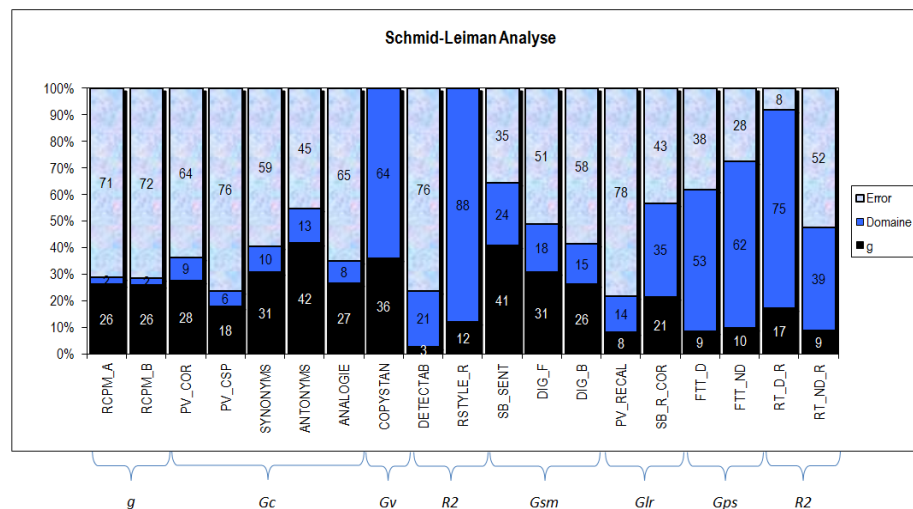
Når der er fundet effektestimater, der er signifikante med p-værdier $\leq 0,05$ er analyserne gentaget med eksklusion af de ny-rekrutterede kontrolbørn, for at undersøge om effektestimateret bevæger sig i den samme retning, når analysen kun baseres på børn fra den oprindelige kohorte.

Data fra de neuropsykologiske undersøgelser er desuden analyseret i en samlet model baseret på strukturelle ligninger [Budtz-Jorgensen et al., 2010; Budtz-Jorgensen et al., 2002]. Den strukturelle ligningsmodel for analysen er, med enkelte mindre efterfølgende justeringer, opstillet ud fra kendte sammenhænge fra litteraturen og bygger i det væsentlige på den dominerende teori på området, den såkaldte CHC-teori (Cattell-Horn-Carroll). Carrolls tre-stratum teori (CHC-teorien) har været inspirationskilde for mange moderne hierarkiske konfirmatoriske evnemodeller (også kaldet højere-ordens modeller). Et moderne intelligensprøvebatteri som Woodcock-Johnson Test of Cognitive Abilities III (WJ-III), er bl.a. konstrueret på grundlag af tre-stratum teorien. Modellen i det nærværende studie er dannet som en hierarkisk højere-ordens model med den taxonomi og nomenklatur, som også anvendes i WJ-III. Latente variable opfattes her som reelt eksisterende determinanter og kilder til variation, som i forskellig mængde reflekteres i de manifeste testresultater.



Figur 2.14. Et eksempel på en enkel målemodel over de psykometriske testresultater i undersøgelsen. Der er postuleret en latent generel evnefaktor (g), som påvirker otte underliggende latente brede domænefaktorer, som igen hver især påvirker et antal manifeste målevariable. Der vises standardiserede koefficienter (loadings) for, hvor stærkt en latent variabel eller faktor påvirker de underliggende faktorer eller testvariable. Desuden ses proportionen af uforklaret varians i brede domænefaktorer og i de manifeste tests.

Gf betegner fluid intelligens, Gc krystalliseret intelligens (her alene specificeret som sproglige evner), Gv visuel forarbejdning, Gsm korttidshukommelse og Glr betegner langtidslagring og genkaldelse. R1 og R2 betegner reaktionstider på hhv. simple stimuli og komplekse stimuli, hvor de sidste kræver et valg imellem to eller flere stimulusalternativer. Disse henregnes sammen med enkelte andre snævre faktorer almindeligvis under det brede evnedomæne Gt, som betegner beslutnings- og reaktionstid. Grunden til at R1 og R2 ikke her er henregnet under en Gt-faktor er, at de valgte indikatorer for R2 ikke er reaktionstider, men dels et komplekst beregnet signal-støjforhold (Detectability) og reaktionsstilen (hurtighed vs. nøjagtighed) og at korrelationen med R1 derfor er lav. Både R1 og R2 loader imidlertid hver især højt på *g*-faktoren og de er derfor taget med i modellen som selvstændige faktorer. Gps betegner psykomotorisk hastighed.



Figur 2.15. Figuren illustrerer betydningen af, at anvende hierarkiske latente variabelmodeller. Der er tale om en såkaldt Schmid-Leiman transformation af den specificerede hierarkiske evnemodel i figur 2.14, og den viser fordeling af variansen i de manifesterede variable, dvs. en beregning af, hvor stor en del (i procent) af variansen i de enkelte tests kan tilskrives (eller forklares af) hhv. den generelle evnefaktor (*g*), de domæne-specifikke evnefaktorer (som fluid intelligens, sprog, visuospatial funktion, korttidshukommelse, langtidshukommelse, mv.) samt uforklaret varians (fejlvariens).

Man kan igennem Schmid-Leiman analysen konkret se, nede på det manifesterede testniveau, at de forskellige tests har forskellig *g*-loading (altså hvor megen *g*-variens de rummer), hvor megen domænespecifik varians de rummer eller hvor megen uforklaret varians de rummer (dvs. hvor fejlbehæftede de er) - eller sagt på en anden måde, hvor stor en del af variansen i hver enkelt test kan forklares af hhv. den generelle evnefaktor, den pågældende tests domænefaktor samt hvor stor en del af variansen, modellen ikke kan forklare i hver enkelt test.

Antager man i overensstemmelse hermed i det nærværende materiale, at sætningsgengivelsesprøven fra Stanford-Binet systemet måler korttidshukommelse, så kan dette ud fra den hierarkiske evnemodel med latente variable siges at være en sandhed med modifikationer. Hele 41 % af testens varians forklares nemlig af den generelle evnefaktor (*g*) mod kun 24 % af domænefaktoren for korttidshukommelse (*Gsm*). Den resterende andel af variansen på 35 % er i modellen uforklaret. Sætningsgengivelsesprøven måler således ikke bare korttidshukommelse. Faktisk er det dét, den mindst måler. En

naiv antagelse om specificitet ville i dette konkrete tilfælde være mere plausibel for eks. reaktionstider på simple stimuli eller for en manuel-motorisk test som Finger Tapping, selv om det også her vil være misvisende at hævde, at disse tests alene måler det, de, ud fra en rationel betragtning, er tiltænkt at skulle måle. Undersøger man f.eks. effekten af en uafhængig variabel (eks. pesticideksponering) på en enkelt test (eller et sæt af tests betragtet enkeltvis), så ved man reelt set ikke, om den effekt, man måtte finde, er en effekt på g-variansen, den specifikke varians eller den uforklarede varians, eller om effekten måske er ligeligt fordelt på hver af disse varianskomponenter, eller om den muligvis indvirker i et vægtet forhold på hver af disse. Man kender ikke varianskildernes indbyrdes proportioner i den givne test, og man ved ikke hvilken af varianskilderne, der er effekt på. Sandsynligheden for at komme til at drage fejlagtige konklusioner kan derfor være betragtelig.

I en hierarkisk reflektiv evnemodel med latente variable udvindes sand varians fra alle de manifesterede psykometriske tests, mens fejlvariansen udbalanceres. Herved opnås en større 'renhed' i de latente variable, end man vil kunne opnå i nogen enkelttest. En stor del af variansen i datasættet kan på denne måde forklares ved blot én faktor, og endnu mere kan forklares ved at indføre et mindre antal underfaktorer.

Ved at teste effekter i én samlet model undgås dertil problemet med multipel statistisk testning og den deraf følgende fare for at komme til at udnytte chancen for at opnå signifikante resultater ved ren tilfældighed. Ved etableringen af en generel evnefaktor (g) opnås muligheden for at måle effekter på det teoretiske begreb (construct), som i mange undersøgelser har vist den største prædiktive validitet vurderet i forhold til andre konkurrerende mål, noget som ingen enkelttest kan give.

De prædiktorer, som er medtaget i den strukturelle model i denne undersøgelse er valgt ud fra viden og antagelser om, hvilke faktorer der påvirker intelligensmål i populationer. Disse er barnets alder ved follow-up undersøgelsen, forældres sociale status i tre kategorier (hvoraf de to højeste er medtaget som selvstændige variable og den laveste fungerer som reference), moders etnicitet (dansk vs. ikke dansk), rygning og alkoholindtag under graviditet, neurologisk sygdom eller hjernerystelse hos barnet, antal børn i husstanden, pesticideksponering, køn og interaktionen (produktet) af køn og pesticideksponering. Disse variable defineres i modellen til at have direkte effekt på g. Hånddominans er dertil sat ind som prædiktor for g efter at være korrigeret for køn, eftersom der er flere venstrehåandede drenge end piger, og for social status (her kun den højeste kategori mod de to øvrige). Til sidst er fødselsvægt sat ind som prædiktor for g efter korrektion for gestationslængde (graviditet i antal dage) og for køn, da nyfødte piger i gennemsnit vejer mindre end nyfødte drenge. Pesticideksponeringen nedsatte fødselsvægten men da fødselsvægten er sat ind som en medierende variabel får pesticideksponeringen foruden de 'direkte effekter' også en 'indirekte' effekt på g via fødselsvægten (hvor pesticideksponeringen først påvirker fødselsvægten som siden igen påvirker g). Den opstillede model har et ekstremt godt fit ($RMSEA < 0,0001$) og er altså en god beskrivelse af de indgående data.

3 Resultater

3.1 Opgørelse af deltagelse i projektet

Der blev udsendt invitationer til alle de 203 børn, som indgik i den første undersøgelse, bortset fra 3, der er flyttet fra landet, hvorfor deres adresse ikke længere er registreret i CPR-registret (Tabel 3.1). Ud over de 3 familier, der er flyttet fra landet, var det ikke muligt at komme i kontakt med yderligere 7 familier, idet disse ikke svarede på det tilsendte brev og efterfølgende telefonopkald. Et barn er desuden død siden første undersøgelse.

Tabel 3.1. Opgørelse af deltagelse i projektet i forhold til den oprindelige kohorte af børn som blev undersøgt i 3 måneders alderen samt nye børn (kontroller) uden prænatal pesticideksponering

	Ikke-pesticideksponerede, N (%)		Pesticideksponerede N (%)		Samlet antal N (5)
	Drenge	Piger	Drenge	Piger	
Antal invitationer udsendt*	22	13	91	77	203
Deltager	14 (64)	7 (54)	59 (65)	53 (69)	133 (66)
Ønskede ikke at deltage	8 (36)	6 (46)	25 (27)	20 (26)	59 (29)
Kontakt ikke mulig			7 (8)	4 (5)	11 (5)
Nye kontroller	21	23			44
Samlet antal som deltog i follow-up undersøgelse	35	30	59	53	177
Samlet antal som har deltaget i første eller denne undersøgelse	43	36	91	77	247

*oprindelige kohorte (113 drenge og 90 piger)

I alt er der undersøgt 177 børn. Heraf er 133 børn fra den oprindelige kohorte og 44 børn er nye kontroller. Den samlede deltagelsesprocent fra den oprindelige kohorte er på 65,5 %, hvilket er noget lavere end forventet. Årsagen er formodentligt det lange tidsinterval på 6 til 11 år fra den første undersøgelse samt at børnene nu er med til at bestemme, om de vil deltage.

I alt meldte 59 af de 203 oprindelige familier afbud til denne undersøgelse. For 44 af afbuddene er der ikke oplyst nogen grund. Af etiske grunde er der ikke bedt om nogen grund til afbud på invitationen men for de resterende 15 afbud oplyste 4 familier, at barnet ikke ønskede at deltage i undersøgelsen, 1 familie (bosat i Eskildstrup) begrundede afbuddet med den store afstand, 2 familier begrundede afbuddet med mangel på tid eller betænkeligheder ved at skulle tage fri fra hhv. arbejde og skole for at deltage, et afbud skyldtes at barnets mor var død kort tid forinden, 4 afbud blev begrundet med sygdom hos barnet (1 barn lider af Tourette syndrom, 1 barn har cystisk fibrose, 2 børn havde gentagne gange været indlagt på hospitalet), et barn blev beskrevet som et meget følsomt barn der ikke kunne tåle mange mennesker omkring sig (der foreligger ingen diagnose, men barnet går i en specialklasse med kun 6 elever), et barn ønskede ikke at deltage fordi det var født med kun ét øre og en

familie havde ikke overskud til at deltage fordi moderen led af migræne (og var førtidspensionist).

Den lavere deltagelse er særligt problematisk med hensyn til antallet af kontrolbørn, som var lavt allerede i første undersøgelsesrunde. Derfor valgte vi som tidligere beskrevet at rekruttere nye kontrolbørn gennem de familier, som deltog i undersøgelsen. Vi inkluderede derved 44 nye kontrolbørn i undersøgelsen (21 drenge og 23 piger), så den samlede gruppe børn som blev undersøgt var 177.

3.2 Erfaringer med børn som undersøgelsespopulation

Familierne der indgik i den første undersøgelse, da børnene var 3 måneder gamle, var den gang meget motiverede for at deltage og vi forventede at de overvejende ville være positivt indstillet overfor at få undersøgt børnene igen. Dog var vi opmærksomme på at børnene nu var blevet så store at de naturligvis også selv skulle være indstillet på at deltage. For at gøre børnene så trygge som muligt ved at deltage, blev det i invitationen understreget at vi naturligvis ville respektere, hvis der var dele af undersøgelsen, som barnet ikke ville deltage i. Det fremgik ligeledes af invitationen at barnet ville få udbetalt et vederlag på 150 kr, mens den lille gave, som barnet kunne vælge i slutningen af lægeundersøgelsen, ikke blev nævnt. Det var dog tydeligt, at flere børn havde hørt om denne gave fra andre børn, der havde deltaget og at den virkede meget motiverende. Vi havde endvidere bestræbt os på at indrette det rum, som familierne blev modtaget og opholdt sig i mellem de enkelte undersøgelser, så børnevenligt som muligt. Vi sørgede for at der var tegneserier, børnebøger, tusser og papir samt saftvand, kaffe/the, frugt, gulerødder, knækbrød og kiks til fri afbenyttelse. Der var typisk 3 familier til undersøgelse samtidigt og de delte 'venterummet'. Generelt var der en god stemning og vi oplevede ingen problemer med at inkludere børn i denne aldersgruppe (6-11 år) til trods for den lange undersøgelsestid på ca. 3 timer. Både de og forældrene var generelt positive og nysgerrige og kun få børn valgte at afstå fra blodprøvetagning eller andre dele af undersøgelsesprogrammet.

3.3 Beskrivelse af undersøgelseskohorten

Ud af de i alt 177 børn, der deltog i denne undersøgelse, var 94 drenge og 83 piger. 112 af børnene (63,3 %) havde været eksponeret for pesticider prænatalt via moderens arbejde i væksthushavet. Blandt drengene var 59 (62,8 %) prænatalt pesticideksponerede, og det tilsvarende tal for pigerne var 53 (63,6 %) (Tabel 3.1).

Aldersfordelingen var meget ens for de to grupper af børn (Tabel 3.2). Samlet har 172 (97,2 %) af børnene søskende og/eller halvsøskende. Mens kun 5 (2,8 %) børn var enebørn, var der yderligere 5 børn, som ikke boede sammen med deres søskende/ halvsøskende men som var det eneste barn i husstanden.

En mindre andel af børnene med prænatal pesticideksponering boede sammen med begge forældre sammenlignet med de ueksponerede børn (Tabel 3.2).

Hvis barnet boede sammen med begge forældre blev den højeste socialgruppe blandt forældrene anvendt (Tabel 3.2). Der var statistisk signifikant forskel på

socialgruppedelingen mellem gruppen af pesticideksponerede børn og de ueksponerede, idet der blandt de eksponerede børn var en større andel som tilhørte socialgruppe 4 og 5 og en mindre andel som tilhørte socialgruppe 1 og 2. Denne forskel skyldes at flere af de ny-rekrutterede kontrolbørn tilhørte socialgruppe 1 og 2 og en mindre andel tilhørte socialgruppe 4 og 5 (Tabel 3.2). Der var desuden en tendens til at flere af de ny-rekrutterede børn havde samboende forældre og de var en anelse yngre end kontrolbørnene fra den oprindelige kohorte.

Tabel 3.2 Socioøkonomiske forhold for børnene i undersøgelseskohorten

	Ueksponerede (N=65)	Eksponerede (N=112)	p-værdi	Kontroller fra oprindelig kohorte (N=21)	Ny-rekrutterede kontroller (N=44)	p-værdi
Alder ved undersøgelsen (år) [median (interval)]	8,3 (6,2-11,3)	8,6 (6,3-10,7)	0,91	8,8 (6,8-10,5)	8,0 (6,2-11,3)	0,08
Har søskende [antal (%)]	64 (98,5)	107 (96,4)	0,43	20 (95,2)	44 (100,0)	0,32
Nummer i søskendeflok						
1	22 (34,4)	46 (41,1)		6 (30,0)	16 (36,4)	
2	33 (51,6)	48 (42,9)		12 (60,0)	21 (47,7)	
3	8 (12,5)	14 (12,5)		2 (10,0)	6 (13,6)	
4	1 (1,6)	3 (2,7)		0	1 (2,3)	
5	0	1 (0,9)	0,75	0	0	0,76
Samboende forældre [antal (%)]	59 (90,8)	89 (79,5)	0,05	17 (81,0)	42 (95,5)	0,08
Moder aktuel gartneriansat [antal (%)]	8 (12,3)	49 (43,8)	0,001	6 (30,0)	2 (5,0)	0,01
Socialgruppe						
1	5 (7,7)	0		0	5 (11,4)	
2	17 (26,2)	12 (10,7)		1 (4,8)	16 (36,4)	
3	4 (6,2)	11 (9,8)		1 (4,8)	3 (6,8)	
4	26 (40,0)	62 (55,4)		13 (61,9)	12 (27,3)	
5	13 (20,0)	27 (24,1)	0,002	6 (28,6)	8 (18,2)	0,01
Nogensinde rygere i husstand [antal (%)]	36 (55,4)	56 (50,0)	0,53	13 (61,9)	23 (52,3)	0,60
Nuværende rygere i husstand [antal (%)]	24 (36,9)	39 (34,8)	0,87	8 (38,1)	16 (36,4)	1,00
Moder af ikke dansk etnicitet [antal (%)]	4 (6,2)	4 (3,6)	0,47	1 (4,8)	3 (6,8)	1,0

Forskelle mellem gruppen af pesticideksponerede og ikke-eksponerede børn samt mellem de to typer kontrolbørn er testet med Fishers-eksakte-test ved 2 kategorier og Pearsons chi-i-anden-test ved flere kategorier, på nær alder som er testet med Mann-Whitney U-test.

For 85 (48,0 %) af de undersøgte børn oplyses det, at der ikke er nogen i husstanden, der røget, siden deres fødsel. For 114 (64,4 %) af børnene er der ikke på nuværende tidspunkt nogen medlemmer af husstanden som ryger. For kun 34 af børnene (19,2 %) oplyses det, at der bliver røget inden for i hjemmet dagligt. Hos 1 barn (0,6 %) bliver der røget inden for i hjemmet 1-6

dage om ugen, mens 31 familier (17,5 %) oplyser at der bliver røget i hjemmet mindre end 1 dag om ugen. Hos 111 familier (62,7 %) bliver der aldrig røget inden for i hjemmet.

3.4 Resultater fra den lægelige undersøgelse

Tabel 3.3 viser en oversigt over de målinger der blev foretaget ved den lægelige undersøgelse. En mere detaljeret gennemgang og analyse af disse resultater følger i de næste afsnit.

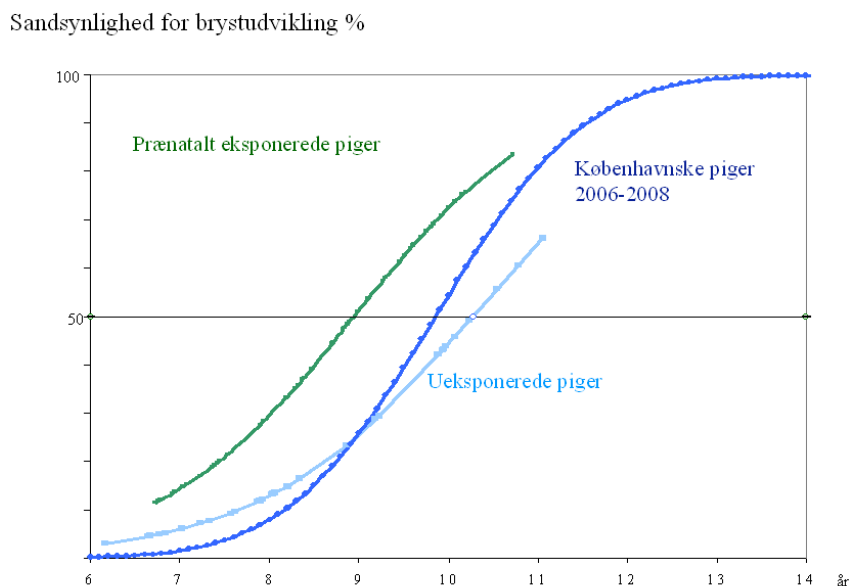
Tabel 3.3 Resultater fra den kliniske undersøgelse af de 177 børn i 6-11 års alderen (for kontinuerte variable præsenteret som geometriske gennemsnit (for BMI Z-score og BMI Z-score: medianer) (5; 95 percentiler) og for kategoriske variable som n (%)).

	Piger		Drenge	
	Ueksponerede n=30	Pesticideksponerede n=53	Ueksponerede n= 35	Pesticid eksponerede n=59
Flanke hudfold (mm)*	9,4(5,0-28,0)	12,6(5,6-40,2)	7,5(4,0-32,4)	10,3(4,8-34,3)
Triceps hudfold (mm)*	13,0(8,4-22,3)	14,2 (8,3-24,2)	10,6(5,4-20,8)	12,3(7,0-22,6)
Biceps hudfold (mm)	13,0(7,0-21,5)	13,2(7,7-28,6)	10,2(4,8-20,1)	11,2(6,1-22,4)
Subscapulær hudfold (mm)	7,9(4,9-18,8)	8,4 (4,7-31,4)	6,5(4,2-16,3)	7,7(4,4-20,5)
BMI (kg/m ²)	16,6(13,8-22,0)	17,0(13,9-22,4)	16,2(14,3-19,7)	17,0(14-21,8)
BMI Z-score (SD)	0,28(-1,03-3,15)	0,19(-0,91-3,97)	-0,1(-1,09-2,84)	0,45(-1,27-3,29)
BMI Z-score siden fødslen (SD) *	-0,55(-1,87; 2,59)	0,53(-2,06; 4,66)	-0,21(-2,52; 3,11)	0,54(-2,19; 3,67)
Sum af fire hudfolder (mm)	43,9(27,5-82,4)	49,3(28,8-108,9)	35,4(19,4-82,6)	42,1(23-86,6)
Fedtprocent (%) *	19,89(12,99-31,32)	21,67(13,57-37,82)	16,55(10,12-30,41)	19,12(11,36-32,22)
Penislængde (cm)			5,4 (4,1; 6,9)	5,2(4,2; 6,3)
Testikelvolumen (mm ³) (*drenge)			602,1(339,9; 2252,3)	461,8(267,7; 827,5)
Genital misdannelse (*drenge)			0	8(14,3)
I pubertet ved undersøgelsen (*piger)	7(23,3)	24(45,2)	3(9,4)	0

* $p \leq 0.05$ (forskelle mellem eksponerede og ueksponerede er undersøgt med Fishers-eksakte-test for kategoriske variable og Mann-Whitney U-test for kontinuerte variable, drenge og piger sammen med mindre andet angivet). Resultaterne i denne tabel er ikke justeret for mulige konfundere.

3.4.1 Effekter på kønsudvikling

Ved undersøgelsen havde 31 ud af 83 piger brystudvikling (Tannerstadiet B2: 27, B3: 4). Syv af disse piger havde endvidere fået kønsbehåring (PH2-PH3). Ingen af pigerne havde haft første menstruation på undersøgelsestidspunktet. Vi sammenlignede også pigerne i gartnerkohorten med en større gruppe af københavnske skolepiger (N=492) i samme aldersgruppe (6-11 år) der blev undersøgt i perioden 2006-2008 med samme undersøgelsesmetoder [Aksglaede et al., 2009]. Som det fremgår af figur 3.1 havde de pesticideksponerede piger brystudvikling ca. 1-1½ år tidligere end de ueksponerede og københavnske piger.



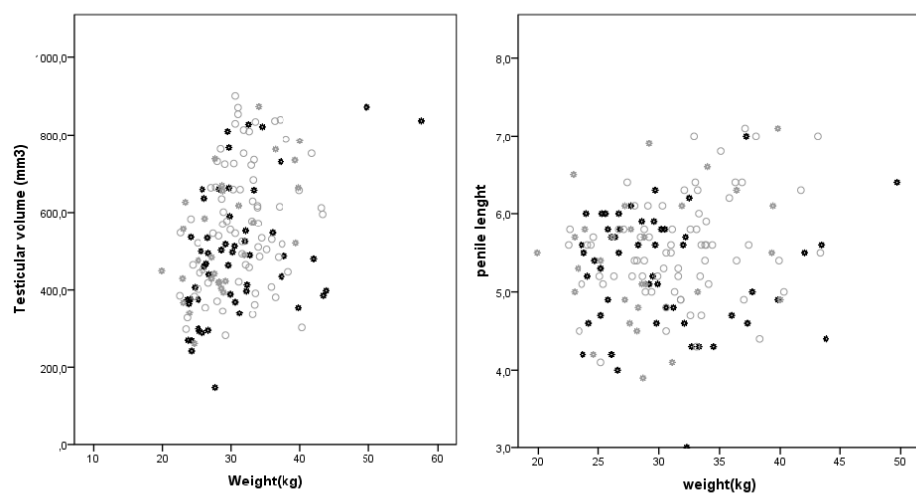
Figur 3.1 Prædikteret sandsynlighed for brystudvikling i forhold til alder hos prænatalt pesticideksponerede piger (grøn kurve), ueksponerede (lyseblå kurve) og københavnske piger (mørkeblå kurve)

Ifølge regressionsmodellen var gennemsnitsalderen for brystudvikling 8,9 år (95%-KI: 8,2-9,7) år hos eksponerede piger og 10,4 år (95%CI: 9,3-11,6) for de ueksponerede. Forskellen (Odds ratio: 3,1; 95%-KI:1,0-9,7, $p=0,054$) mellem grupperne blev ikke væsentligt ændret efter justering for BMI (Odds ratio: 3,3; 95%-KI: 0,8-12,8, $p=0,089$). Der var ikke forskel på brystudvikling mellem de ueksponerede piger og københavnske piger, men de eksponerede piger fik signifikant tidligere brystudvikling end de københavnske piger (OR: 3,4, 95%-KI: 1,7-6,7; $p<0,0001$) også efter justering for BMI (OR: 3,1, 95%CI:1,6-6,2, $p=0,002$).

Kun få drenge viste tegn på pubertet på undersøgelsestidspunktet og vi har derfor ikke kunnet svare på om prænatal pesticideksponering påvirker alder ved pubertetsstart hos drengene. Der var 8 drenge som ikke ønskede at medvirke til genitalundersøgelse og vi har derfor ikke pubertetsvurdering, penis- og testikelmålinger på disse.

Før puberteten vokser penis og testikler kun sparsomt og er i højere grad korreleret til drengens vægt end til hans alder [Tomova et al., 2010]. Ved

pubertetsstart vokser penis og testikler pludseligt hurtigt og med stor individuel variation. Vi har derfor valgt at udelukke drenge der er påbegyndt pubertet fra dataanalyserne, hvor testikelstørrelse og penislængde blev sammenlignet mellem grupperne. Tre ueksponerede drenge med testikelvolumen på hhv. 4374, 2416, 1827 mm³ (alle over 10 år) blev således udeladt. Som gruppe havde de prænatale pesticideksponerede drenge mindre testikler (målt med ultralyd) end de ueksponerede drenge (Tabel 3.4, Model 1). Ved opdeling i eksponeringskategorier var effekten kun signifikant for drenge med høj prænatal eksponering (Tabel 3.4, Model 2). Denne gruppe havde også signifikant kortere penislængde end ueksponerede. Begge effekter var stadig signifikante efter justering for genitale misdannelser hos drengene (Tabel 3.4, Model 3). Billedet var det samme ved sammenligning med raske københavnske drenge mellem 6 og 11 år undersøgt i 2010 af samme læge (Figur 3.2).



Figur 3.2 Testikelvolumen og penislængde i forhold til vægt hos præpubertale prænatale pesticideksponerede drenge (sorte stjerner), ueksponerede drenge (grå stjerner) og københavnske drenge undersøgt af samme læge.

Ved 3 måneders undersøgelsen fandt vi også signifikant kortere penislængde og tendens til mindre testikler (ikke-signifikant) hos de eksponerede drenge [Andersen et al., 2008]. Testikelvolumen og penislængden i 6-11 års alderen korrelerede signifikant ($p \leq 0,001$) med målingerne fra samme dreng i 3 måneders alderen (justeret for alder og vægt ved 6-11 år). Det vil sige, at drenge med mindre kønsorganer da de var 3 måneder stadig har mindre kønsorganer ved skolealderen.

Udover de tilfælde af kryptorkisme der blev fundet ved 3 måneders undersøgelsen havde yderligere 2 drenge deres testikler placeret højt i pungen (bilateral ascensus testis). Hos en tredje dreng mandede urinrøret ikke ud svarende til spidsen af penis (glandulær hypospadi). De tre drenge med (nyopdagede) milde kønsmisdannelser var alle prænatale eksponerede (Tabel 3.3).

Tabel 3.4. Resultater fra multiple regressionsanalyser af prænatal pesticideksponering betydning for testikelstørrelse og penislængde hos præpubertale drenge.

Testikelvolumen ^a (log-transformeret)	Model 1 B (95%-KI)	Model 2 B (95%-KI)	Model 3 B (95%-KI)
Eksponering (ja/nej)	-14.1(-25.4; -1.1)*		
Middel eksponering		-8.0(-20.6; 6.6)	-3.6(-16.4; 11.2)
Høj eksponering		-24.7(-62.2; -10.1)*	-21.3(-33.6; -6.9)*
Genital misdannelse			-31.6(-46.2; -12.9)*
Penislængde ^a (log-transformeret)			
Eksponering (ja/nej)	-4.1(-10.5; 2.6)		
Middel eksponering		-1.1(-8.1; 6.1)	0.9(-6.0; 8.4)
Høj eksponering		-9.4(-16.8; -1.1)*	-8.0(-15.3; 0)*
Genital misdannelse			-13.5(-22.7; -3.4)*

^ajusteret for alder og vægt, * $p \leq 0,05$

3.4.2 Effekter på vækst og kropssammensætning

Fødselsvægt og vægt for gestationsalder (WGA) var signifikant lavere hos de prænalt eksponerede børn (Tabel 3.5), også efter justering for relevante kovariater (tabel 3.6). BMI og Ponderal index var også signifikant lavere hos eksponerede børn (Tabel 3.5) men efter justering for konfoundere var forskellen kun statistisk signifikant for BMI for de højt eksponerede børn (Tabel 3.6). Gestationsalder var ikke signifikant forskellig for eksponerede og ueksponerede børn (Tabel 3.5). Der var ikke forskel på de forskellige fødselsudfald mellem børn der deltog i genundersøgelsen ved skolealderen og de børn som ikke blev genundersøgt.

Maternel rygning under graviditeten og prænatal pesticideksponering havde begge en signifikant dosis-relateret negativ effekt på fødselsvægt og WGA (Tabel 3.7 og Figur 3.3). Børn som var prænalt udsat for pesticider og hvis moder også havde røget (uanset antal cigaretter) havde tykkere hudfolder (46,9%, 95%-KI: 8,1;99,5, $p=0,015$) og fedtprocent (29,1%, 95%-KI: 3,0; 61,4, $p=0,028$) efter justering for alder, køn og socialgruppe. De eksponerede børn havde større forskel i BMI Z-score (iBMI Z-score) fra fødsel til skolealder end ueksponerede (Tabel 3.7). Ligeledes havde en større andel af de eksponerede (44,6% vs. 26,2% ueksponerede, $p = 0,05$) en iBMI Z-score på mere end 0,67 (0,67 SD svarer til bredden af hvert centil på en standard vækstkurve fx 2. til 9., 9. til 25., 25. til 50 centiler, dvs et markant spring i BMI Z-score).

Mål for kropssammensætning (de enkelte hudfolder, summen af hudfolder, fedtprocent, BMI og BMI Z-score) var alle højere hos eksponerede (undtaget BMI og BMI Z-Score hos piger). Efter justering for relevante konfoundere, inklusiv maternel rygning i graviditeten, var fedtprocenten og sum-af-fire-hudfolder signifikant højere hos de højt eksponerede end ueksponerede (Tabel 3.7). Når vi gentog analyserne med de to typer kontrollbørn separat fik vi sammenlignelige resultater, som dog ikke var signifikante på grund af det lavere antal børn. For eksempel var ændringen (β (95%KI)) i fedtprocent mellem 'gamle' kontroller og middel eksponerede: 3.0 (-11,7; 20,5) og for højt

eksponerede: 10,2 (-6,5; 30). De tilsvarende ændringer i forhold til 'nye' kontroller var: 6,7 (-5,5; 20,2) og 13,8 (0,0; 29,4) for henholdsvis middel og højt eksponerede.

Tabel 3.5 Karakteristika og fødselsudfald for alle børn (n=247) der har deltaget i gartnerkohorten^a, udtrykt som n (%) for kategoriske variable og medianer (5; 95 percentiles) for kontinuerte variable

	Piger		Drenge	
	Ueksponerede (n=36)	Pesticideksponerede (n=77)	Ueksponerede (n=43)	Pesticideksponerede (n=91)
Fødselsvægt (g) *	3640 (2842; 4600)	3440 (2300; 4200)	3800 (2850; 4720)	3525 (2321; 4400)
Gestationsalder (dage)	282 (262; 294)	282 (260; 298)	282 (263; 297)	281 (252; 296)
Flerfoldsgraviditet*	0 (0)	4 (5,2)	0 (0)	7 (7,7)
SGA (Small for gestational age) *	1 (2,8)	5 (6,5)	0 (0)	7 (7,7)
LGA (Large for gestational age)	3 (8,3)	1(1,3)	3 (7,0)	1 (1,1)
WGA(vægt for gestationsalder %)*	2(-17; 24)	-3(-26; 18)	1(-18; 22)	-4(-27; 19)
Fødselslængde (cm)	52(49; 58)	52(48; 56)	53(49; 56)	53(48; 56)
BMI (kg/ m ²) *	13,2(11,4; 16,4)	12,8(10,0; 15,0)	13,1(11,3; 15,2)	13,0(10,4; 15,0)
Ponderal index (kg/m ³) *	25,3(21,4; 28,6)	24,2(20,2; 29,8)	24,8(22,4; 28,1)	24,5(20,2; 28,1)
Maternel rygning i graviditeten (ja)	11 (32,4)	20 (26,0)	12 (27,9)	29 (32,6)
Alkoholindtag i graviditet ^b	12 (41,4)	19 (36,5)	9 (25,7)	23 (39,7)
Ammes ved 3 måneders alder ^c	8(61,5)	54 (70,1)	13 (61,9)	64 (72,7)

^a 177 børn i opfølgingsundersøgelsen og 70 børn som deltog i 3. mdrs undersøgelsen men ikke i follow-up, jf Tabel 3.1

^b Information vedr. alkoholindtag i graviditeten (ja /nej) (n= 174).

^c Information vedr. amning indtil 3 måneders alder (overvejende/ udelukkende eller ikke/kun lidt) (n=200).

* p < 0,05. Forskelle mellem eksponerede og ueksponerede (drenge og piger sammen) er testet med Fishers-eksakte-test for kategoriskel variable og Mann-Whitney U-test for kontinuerte variable.

Table 3.6 Resultater fra multipele lineære regressionsanalyse^a for fødselsudfald og relevante kovariater for alle 247 børn der har indgået i kohorten. Resultaterne er angivet som ændringer i gennemsnit (95%-KI). Børn fra flerfoldsgraviditeter er udeladt.

Kovariater i modellen	WGA Vægt for gestationsalder (%)	Fødselsvægt (g)	Fødselslængde (cm)	BMI (kg/m ²)	Ponderal index (kg/m ³)
Gestations alder (dage)	-----	27 (22; 32)*	0,1 (0,1; 0,1) *	0,05 (0,03; 0,06)*	0,04 (0,01; 0,07)*
Hunkøn	-----	-132 (-247; -18)*	-0,8 (-1,4; -0,3)*	-0,1(-0,4; 0,2)	0,3(-0,3; 0,9)
Maternal rygning i graviditeten < 10 cigaretter/dag	-2,2(-7,0; -2,6)	-77(-251; -97)	-0,3(-1,0; -0,5)*	-0,2 (-0,6; 0,2)	-0,3 (-1,2; 0,6)
Maternal rygning i graviditeten ≥ 10 cigaretter/dag	-6,0 (-10,3; -1,6)*	-213 (-372; -54)*	0,7 (-1,0; 0,0)*	-0,4 (-0,8; 0,0)*	-0,5 (-1,3; 0,3)
Prænatal pesticideksponering, middel	-3,6 (-7,2; -0,0)*	-139 (-272; -6)*	-0,3 (-1,0; 0,3)	-0,2 (-0,6; 0,1)	-0,3 (-1,0; 0,4)
Prænatal pesticideksponering, høj	-4,8 (-9,0; -0,7)*	-173 (-322; -23)*	-0,4 (-1,0; 0,3)	-0,4 (-0,8; 0,0)*	-0,7 (-1,4; 0,1)

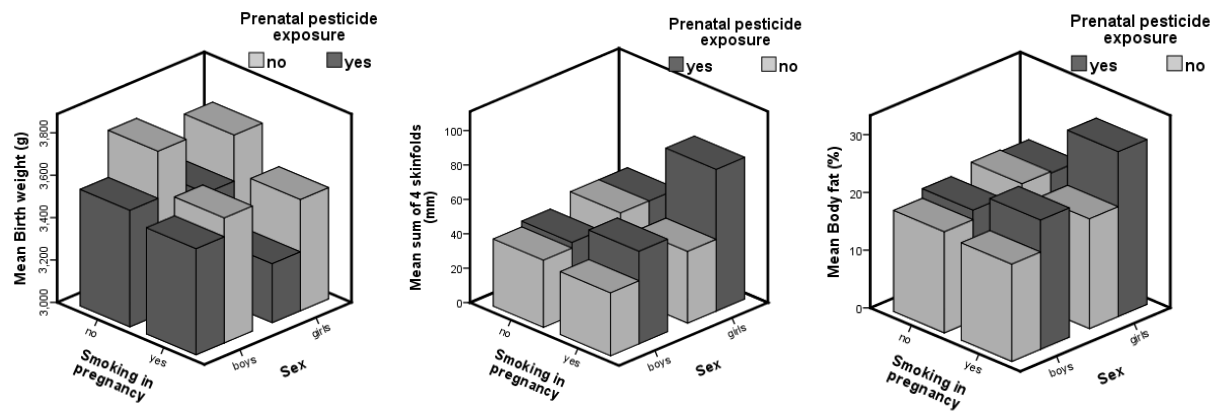
* p < 0,05.

Tabel 3.7 Resultater fra multipel regressionsanalyse af kropssammensætningsmål og relevante kovariater hos de 177 børn i kohorten ved 6-11 års alderen ^a

Effektmål og kovariater i modellen	Alle (N=177)	
	(95%-KI)	p
BMI Z-score		
Socialgruppe 5 ^b	0,04 (-0,45; 0,53)	0,876
Socialgruppe 1-3 ^b	-0,54 (-1,03; -0,09)	0,023
Maternel rygning i graviditeten (<10 cigaretter)	0,68 (0,09; 1,29)	0,025
Maternel rygning i graviditeten (> 10 cigaretter)	0,48 (-0,10; 1,05)	0,106
Maternel pesticid eksponering, middel	0,17 (-0,28; 0,63)	0,452
Maternel pesticid eksponering, høj	0,26(-0,15; 0,67)	0,150
BMI Z-score mellem fødslen og skolealder		
Gestationsalder (dage)	-0,06 (-0,08; -0,04)	0,000
Socialgruppe 5 ^b	0,28 (-0,28; 0,82)	0,324
Socialgruppe 1-3 ^b	-0,75 (-1,3; -0,22)	0,006
Maternel rygning i graviditeten (<10 cigaretter)	0,76 (0,11; 1,44)	0,025
Maternel rygning i graviditeten (> 10 cigaretter)	0,76 (0,11; 1,41)	0,022
Maternel pesticid eksponering, middel	0,49 (-0,02; 0,99)	0,061
Maternel pesticid eksponering, høj	0,63 (0,08; 1,19)	0,026
Sum af fire hudfolder, mm (log-transformeret)		
Køn (pige)	22,2 (8,4; 37,4)	0,001
Alder, år	4,7 (-0,2; 9,9)	0,057
Socialgruppe 5 ^b	1,4 (-12,7; 17,5)	0,876
Socialgruppe 1-3 ^b	-14,7(-25,5; -0,9)	0,030
Maternel rygning i graviditeten (<10 cigaretter)	13,5 (- 5,2; 36,1)	0,165
Maternel rygning i graviditeten (> 10 cigaretter)	16,9 (1,8; 39,6)	0,078
Maternel pesticid eksponering, middel	9,4 (-4,5; 25,3)	0,198
Maternel pesticid eksponering, høj	11,9 (-0,9; 26,5)	0,069
Fedtprocent (log-transformeret)		
Køn (pige)	12,5 (2,8; 22,7)	0,009
Alder, år	3,3 (0,5; 7,2)	0,096
Socialgruppe 5 ^b	-1,1 (-11,7; 10,9)	0,860
Socialgruppe 1-3 ^b	-10,1 (-18,9; 2,3)	0,067
Maternel rygning i graviditeten (<10 cigaretter)	8,4 (-5,6; 24,5)	0,232
Maternel rygning i graviditeten (> 10 cigaretter)	14,5 (2,3; 31,2)	0,026
Maternel pesticid eksponering, middel	5,7(-4,9; 17,2)	0,277
Maternel pesticid eksponering, høj	13,0 (0,7; 26,8)	0,034

^a udtrykt som forskel på gennemsnit (95%-KI) for BMI Z-score og BMI Z-score mellem skolealder og fødsel. og relative forskel i procent (95%-KI) for Sum af fire hudfolder og fedtprocent (log-transformede variable).

^b Socialklasse 4 er brugt som reference.



Figur 3.3 Gennemsnitlig fødselsvægt (n=247), sum af fire hudfolder (n=177) og fedtprocent (n=177) i forhold til prænatal pesticideksponering og køn. De mørke blokke repræsenterer prænatalt pesticideksponerede børn.

3.5 Resultater fra laboratorieanalyser

Der er taget blodprøver fra 145 ud af de 177 børn (84 drenge og 61 piger). Der blev indsamlet urinprøver fra 175 af børnene, heraf var 13 spoturinprøver produceret ved undersøgelsen og resten medbragte morgenurinprøver fra undersøgelsesdagen.

3.5.1 Hormonmålinger

3.5.1.1 Reproduktionshormoner

På grund af analysemetodernes følsomhed er nogle reproduktionshormoner ofte umålelige hos børn før og tidligt i puberteten. Som forventet var niveauet af østradiol, testosteron og LH (luteiniserende hormon) derfor ikke målbart hos mange af børnene. Da der således er målinger fra færre børn kan det være svært at påvise eventuelle små forskelle mellem grupperne.

Flere piger med brystudvikling (B2-B3) havde målbare koncentrationer af testosteron ($p=0.05$) og østradiol ($p=0.008$) end piger uden brystudvikling (B1). Lidt flere eksponerede end ueksponerede piger havde måleligt niveau af østradiol men denne forskel var ikke signifikant ($p=0,09$) (Tabel 3.8). Ved sammenligning med københavnske piger (på samme alder og undersøgelsestidspunkt) fandt vi lavere FSH koncentrationer hos de pesticideksponerede piger i samme brystudviklings stadie ($p=0,008$) mens antal målelige østradiol- og LH- koncentrationer ikke var forskelligt (data ikke vist). Koncentrationer af binyreandrogenene androstendion og DHEAS var højere hos eksponerede piger, men forskellen var kun signifikant for androstendion ($p\leq 0,05$). Koncentrationen af AMH (Anti müllerian hormon) var lidt lavere hos eksponerede end hos ueksponerede. Forskellen var dog kun signifikant ved sammenligning med de københavnske piger (24%, $p=0,012$).

Hos drengene var der ikke signifikante forskelle i serumkoncentrationer af reproduktionshormoner mellem eksponerede og ueksponerede (Tabel 3.9).

Tabel 3.8 Serumkoncentrationer af reproduktionshormoner hos pigerne

	Ueksponerede (n=24)		Eksponerede (n=37)	
	Median/geometrisk (5-95 percentiler)	< LOD n (%)	Median/geometrisk gennemsnit (5-95 percentiler)	< LOD n (%)
Østradiol (pmol/l) †	<18(<18-75)	23 (96%)	<18(<18-35)	29 (78%)
Total testosteron (nmol/l) †	0.11 (<0.1-0.45)	11 (45%)	0.13 (<0.10-0.38)	11 (30%)
SHBG (nmol/l) ‡	97 (55-181)		94 (34-156)	
Inhibin A (pg/ml) †	<12(<12-<12)	24 (100%)	<12(<12-1<2)	36 (97%)
Inhibin B (pg/ml) †	<20(<20-78)	13 (54%)	<20(<20-97)	21 (57%)
LH (U/l) †	<0.05(<0.05-1.14)	15 (63%)	<0.05 (<0.05-0.21)	22 (59%)
FSH (U/l) ‡	1.07 (0.35-3.78)		1.12 (0.29-3.35)	
Prolactin (mIU/L) ‡	117 (42-335)		84 (7-227)	
DHT (nmol/l) †	<0.1(<0.1-0.435)	18 (75%)	<0.1 (<0.1-0.679)	23 (62%)
Androstendion (nmol/l) ‡ *	0.58 (0.17-1.51)		0.79 (0.32-1.73)	
DHEAS (nmol/l) ‡	1159 (225-4285)		1336 (413-4729)	
AMH (pmol/l) ‡	20.3 (2.3-49.8)		16.4 (2.8-53.2)	

†Serumkoncentrationer af østradiol, testosteron, inhibin A, inhibin B, LH og DHT er angivet som medianer. Forskellen i andelen af prøver under LOD mellem eksponerede og ueksponerede er testet med Fishers-eksakte-test. Der var ingen signifikante forskelle.
‡Forskelle mellem eksponerede og ueksponerede er testet på log-transformerede variable med lineær regressionsanalyse efter justering for alder. *p<0.05

Tabel 3.9 Serum koncentrationer af reproduktionshormoner hos drengene

	Ueksponerede (n=31)		Eksponerede (n=53)	
	Median/geometrisk gennemsnit (5-95 percentiler)	< LOD n (%)	Median/geometrisk gennemsnit (5-95 percentiler)	< LOD n (%)
Total testosteron (nmol/l) [†]	<0.1(<0.1-0.87)	16 (52%)	<0.1(<0.1-1.45)	28 (52%)
SHBG (nmol/l) [‡]	110(52-196)		99 (43-169)	
Inhibin B (pg/ml) [‡]	90 (35-273)		85 (46-154)	
LH (U/l) [†]	0.05(<0.05-0.44)	14(45%)	0.01(<0.05-0.26)	28 (53%)
FSH (U/l) [‡]	0.65(0.27-1.99)		0.55 (0.24-1.48)	
Prolactin (miu/L) [‡]	101(45-187)		107(8-213)	
DHT (nmol/l) [†]	0.05 (0.05-0.47)	17 (57%)	0.05 (0.05-0.45)	27 (52%)
Androstendion (nmol/l) [‡]	0.43(0.14-1.55)		0.48 (0.12-1.41)	
DHEAS (nmol/l) [‡]	1029(263-4170)		1131(227-5330)	
AMH (pmol/l) [‡]	521(177-1040)		594 (250-1219)	

[†]Serumkoncentrationer af testosteron, LH og DHT er angivet som medianer. Forskellen i andelen af prøver under LOD mellem eksponerede og ueksponerede er testet med Fishers-eksakte-test. Der var ingen signifikante forskelle.

[‡]Forskelle mellem eksponerede og ueksponerede er testet på log-transformerede variable med lineær regressionsanalyse efter justering for alder. *p≤0.05

3.5.1.2 Vækstfaktorer og thyroideahormoner

Regressionsanalyser for vækstfaktorer og thyroideahormoner blev udført separat for piger og drenge (Tabel 3.10). Alder, BMI og for piger også pubertetsstadiet, indgik som kovariate. Eksponerede piger havde lavere koncentrationer af IGF-I (insulin-like growth factor 1) end ueksponerede piger (p=0,008), hvorimod de eksponerede drenge havde tendens til højere IGF-I end ueksponerede. Dette var dog ikke signifikant efter justering for BMI. TSH (Thyroidea stimulerende hormon) var lidt lavere hos ueksponerede børn, men forskellen var kun signifikant efter justering for BMI. Dvs. eksponerede børn havde lidt lavere TSH niveau end ueksponerede børn med samme BMI (p= 0,043).

Tabel 3.10 Serum koncentrationer af IGF-I, IGF-BP3, og thyroideahormoner (medianer (5; 95 percentiler)).

	Piger		Drenge	
	Ueksponerede	Eksponerede	Ueksponerede	Eksponerede
IGF-I (ng/ml)	188(101; 315)	157(75; 241)	118(60; 214)	151(69; 238)
IGFBP3 (ng/ml)	3550(2360; 4840)	3490(2440; 4960)	3150(2410; 4140)	3460(2240; 4740)
TSH (mU/l)	2,40(0,83; 4,79)	2,03(0,99; 4,19)	2,28(1,23; 5,60)	2,13(1,03; 4,31)
T3 (nmol/l)	2,63(2,19; 3,15)	2,49(1,99; 3,50)	2,38(1,97; 2,86)	2,49(2,15; 3,28)

T4 (nmol/l)	117,5(105,8; 148,0)	112,0(87,1; 157,3)	107,6(84,1; 140,9)	107,2(82,70; 115,5)
FT3 (pmol/l)	6,78(5,56; 7,67)	6,43(4,87; 7,78)	6,37(5,29; 7,36)	6,58(5,60; 7,57)
FT4 (pmol/l)	18,0(16,2; 20,3)	17,4(14,3; 21,6)	17,9(15,8; 22,1)	17,3(14,7; 22,1)

3.5.2 Pesticider i urin

Pesticidmetabolitter blev målt i morgenurinprøver. Formålet var at estimere børnenes nuværende pesticideksponering, som antages primært at ske gennem pesticidrester i kosten. Der er målt på en række metabolitter som stammer fra grupper af pesticider, organofosfater, pyrethroider, dithiokarbamater og azoler, der ofte detekteres i fødevarer. Desuden blev imidazolforbindelsen, prochloraz, målt. Målinger af disse metabolitter i urinprøver er markører for nylig eksponering d.v.s. indenfor få dage.

3.5.2.1 Prochloraz

Imidazolforbindelsen, prochloraz, blev målt som eksempel på et azolfungicid. Anvendelse af prochloraz er ikke længere tilladt i EU, men anvendes i andre dele af verden, hvorfra fødevarer kan indeholde rester. Den interne standard (miconazol) viste sig at være ustabil og at blive omdannet langsomt til forbindelser som interfererede med analysen. Efter korrektion for dette havde ingen af de 175 analyserede urinprøver kvantificerbare koncentrationer af prochloraz eller metabolitter af prochloraz.

3.5.2.2 Insekticider og dithiokarbamatfungicider

Der er målt pesticidmetabolitter i 174 urinprøver hos CDC i Atlanta, USA. De målte metabolitter og hvilke pesticider de stammer fra er angivet i Tabel 2.2 og koncentrationer målt i urinprøver fra børnene er angivet i Tabel 3.11.

Organofosfat-insekticider

Der blev målt tre metabolitter fra specifikke organofosfater, men de kunne kun detekteres i ganske få prøver. Desuden blev der målt seks forskellige dialkylfosfatmetabolitter (tre dimethylmetabolitter og tre diethylmetabolitter), som samlet dækker et bredt spektrum af de anvendte organofosfater. For at estimere den samlede organofosfateksponering, er de målte værdier omregnet til nmol/L, hvilket gør det muligt at addere stoffernes koncentration. Ved at korrigere for creatinin-koncentrationen i urinprøverne kan man tage højde for urinprøvens fortyndingsgrad. Der var som forventeligt ikke forskel på prænatalt eksponerede og ueksponerede børn med hensyn til koncentrationen af organofosfatmetabolitter i urinen eller antal af prøver over detektionsgrænsen (Tabel 3.12). Da paraoxonase 1 spiller en rolle for nedbrydningen af organofosfater, undersøgte vi om der var forskel på urinkoncentrationer af organofosfatmetabolitterne mellem børn med PON1 192 QQ genotypen og PON1 192 R-bærere men fandt ingen signifikante forskelle.

Urinkoncentrationerne målt i de fynske gartnerbørn ligger noget højere end målinger fra jævnaldrene børn i USA [Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2009], men på samme niveau som fundet hos italienske [Aprea et al., 2000] eller tyske børn [Heudorf et al., 2004]. Den væsentligste eksponeringskilde antages at være kosten og økologisk kost er da også påvist at medføre nedsat koncentrationen af organofosfatmetabolitter i urinen [Curl et al., 2003]. Dette kunne ikke demonstreres i denne undersøgelse da kun 10 af gartnerkohorte-børnene (4 prænatalt ueksponerede og 6 eksponerede) overvejende indtog økologisk kost (grøntsager og mælk).

3.11 Urinkoncentration (ug/L) af pesticidmetabolitter hos børnene i gartnerkohorten

Metabolit	Pesticid	Alle børn (N=174)		Prænatalt ueksponerede (N=64)		Prænatalt eksponerede (N=110)	
		Median (min-max) ^a	< LOD N (%)	Median (min-max) ^a	< LOD N (%)	Median (min-max) ^a	< LOD N (%)
APE	Organofosfat (acephat)		174 (100)		64 (100)		110 (100)
MTO	Organofosfat (dimethoat)		174 (100)		64 (100)		110 (100)
MMI	Organofosfat (methamidophos)	0,28 (0,27- 0,28)	172 (99)	0,28 (0,27-0,28)	62 (97)		110 (100)
OMO	Organofosfat (o-methoat)	0,43 (0,34- 0,52)	172 (99)	0,34	63 (98)	0,52	109 (99)
DMP	Organofosfater (f.eks. dichlorvos, fenthion, malathion)	17,38 (3,03- 208,01)	74 (43)	17,35 (4,80-208,01)	24 (38)	17,38 (3,03- 120,22)	50 (45)
DMTP	Organofosfater (f.eks. dichlorvos, fenthion, malathion)	5,72 (0,63- 239,38)	7 (4)	4,73 (0,84-86,2)	2 (3)	5,85 (0,63- 239,38)	5 (4,5)
DMDTP	Organofosfater (f.eks. azinphphos dimethoat, phosmet)	3,94 (0,54- 20,72)	146 (84)	2,92 (0,54-20,72)	54 (84)	6,18 (1,34-18,42)	92 (84)
DEP	Organofosfater (f.eks. chlorpyrifos, diazinon, parathion)	8,83 (1,60- 69,67)	67 (39)	8,33 (2,54-69,67)	25 (39)	8,96 (1,60- 49,38)	42 (38)
DETP	Organofosfater (f.eks. chlorpyrifos, diazinon, parathion)	2,64 (0,51- 70,23)	67 (39)	3,59 (0,61-56,63)	22 (34)	2,62 (0,51- 70,23)	45 (41)
DEDTP	Organofosfater (fx disulfoton, ethion, phorate og tebufos)	6,56 (5,03- 31,8)	171 (98)	6,56 (5,03-31,8)	61 (95)		110 (100)
4FP	Pyrethroid (cyfluthrin)	0,55 (0,37- 3,11)	166 (95)	0,58 (0,37- 3,11)	60 (94)	0,55 (0,41- 1,90)	106 (96)
CBC3	Pyrethroid (deltamethrin)	0,82 (0,36- 13,09)	153 (88)	1,03 (0,39- 6,91)	54 (84)	0,81 (0,36- 13,09)	99 (90)
OPM	Pyrethroider (generelt)	1,14 (0,68- 49,04)	103 (59)	1,75 (0,72- 8,97)	46 (72)	1,09 (0,68- 49,04)	57 (52)
TCC	Pyrethroider (fx permethrin, cypermethrin, cyfluthrin)	2,54 (1,99-10,63)	169 (97)	5,43	63 (98)	2,28 (1,99- 10,63)	106 (96)
PTU	Bis-dithiokarbamater (bredt)		174 (100)		64 (100)		110 (100)
ETU	Bis-dithiokarbamater (bredt)	2,49 (0,61- 693,00)	143 (82)	2,13 (0,63-5,81)	52 (81)	2,89 (0,61- 693)	91 (83)

^a Beregnet for urinprøver med koncentrationer over detektionsgrænsen (LOD)

3.12 Urinkoncentration af dialkyl fosfatmetabolitter i børn fra gartnerkohorten

Metabolit	Prænatalt ueksponerede (N=64)			Prænatalt eksponerede (N=110)		
	Antal over LOD, N(%)	median (5-95% percentiler) nmol/L	median (5-95% percentiler) nmol/g creatinin	Antal over LOD, N(%)	median (5-95% percentiler) nmol/L	median (5-95% percentiler) nmol/g creatinin
DMP	40 (63,5)	71,2 (1,9-403,4)	64,3 (1,1-456,2)	60 (54,5)	42,0 (1,9-601,8)	43,3 (1,3-417,9)
DMTP	62 (96,9)	32,9 (9,2-362,5)	25,7 (6,2-369,2)	105 (95,5)	40,2 (4,5-567,0)	30,0 (3,6-539,2)
DMDTP	10 (15,6)	-	-	18 (16,4)	-	-
DEP	39 (60,9)	30,6 (1,6-156,8)	22,3 (1,0-170,9)	68 (61,8)	34,3 (1,6-173,7)	25,6 (1,2-161,6)
DETP	42 (65,6)	6,2 (1,4-175,3)	5,1 (0,9-220,3)	65 (59,6)	5,8 (1,5-55,2)	4,4 (0,8-63,6)
DEDTP	3 (4,7)	-	-	0 (0)	-	-
Sum af dimethyl-metabolitter	62 (96,9)	108,3 (12,9-900,8)	109,5 (9,4-739,1)	105 (95,5)	108,2 (8,2-1206,3)	86,3 (7,5-963,9)
Sum af diethyl-metabolitter	55 (85,9)	48,5 (4,3-330,1)	34,8 (3,1-299,0)	85 (77,3)	44,2 (4,8-224,8)	34,6 (3,5-185,1)
Dialkylmetabolitter samlet	64 (100)	160,9 (22,0-917,8)	173,2 (16,5-806,0)	108 (98,2)	148,2 (17,3-1444,9)	128,2 (19,1-1149,1)

For metabolitter hvor mindst halvdelen af prøverne er under LOD er medianen ikke bestemt. For øvrige metabolitter er LOD/2 anvendt for prøver med værdier under LOD. Forskellen i andelen af prøver over LOD mellem prænatalt eksponerede og ueksponerede er testet med Fishers-eksakte-test. Forskelle på urinkoncentrationer mellem prænatalt eksponerede og ueksponerede er testet med Mann-Whitney U-test.

3.5.3 Phthalatmålinger i urin

Nye data har vist at danske børn eksponeres i betydelig grad for phthalater og at indholdet af phthalater i urinen hos børn i samme alder som børnene i gartnerkohorten er associeret med deres stofskifte (thyroideafunktion) og vækst [Boas et al., 2010]. Phthalater har også i dyreforsøg vist at kunne have effekter på testikeludvikling [Sharpe, 2006]. Hvis der var forskel på phthalateksponeringen mellem børnene i gartnerkohorten og gruppen af københavnske børn, der indgår som sammenligningsgrundlag for nogle variable, kunne dette være en væsentlig konfounder i dataanalyserne af mulige sammenhænge mellem pesticideksponering og børnenes vækst og reproduktive udvikling.

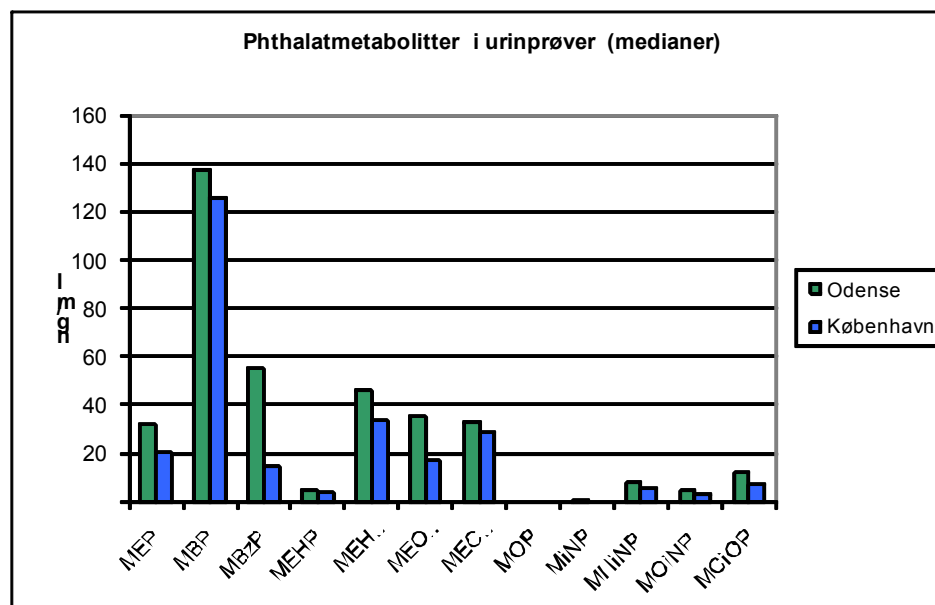


Figure 3.4 Phthalatmetabolitter i urinprøver fra børn i den fynske gartnerkohorte og i jævnaldrene børn fra København

De målte koncentrationer af phthalatmetabolitter i urinprøverne fra børnene i gartnerkohorten ligger generelt i samme niveau som i københavnske børns uriner [Boas et al., 2010]. Koncentrationerne af metabolitterne er lidt højere hos børnene i den fynske gartnerkohorte svarende til den forventede forskel, der findes mellem morgenurinprøver og spotprøver (københavnerbørn afleverede spoturinprøver). Der er således tale om en systematisk forskel som skyldes forskellige prøvetyper og der er ikke grundlag for at tro at børnene i gartnerkohorten er anderledes eksponeret for phthalater end københavnske børn vi sammenligner med for enkelte udfald.

3.5.4 Geno- og fænotype af paraoxonase (PON1)

Der er bestemt genotype af PON1 i 141 af de 145 blodprøver fra børnene. Der er bestemt to gen-polymorfier for PON1 i den kodende region, 55M/L og 192Q/R samt en promotor variant -107C/T. Flere polymorfier i PON1 genet influerer på den substratspecifikke enzymaktivitet. R-allelet i position 192 synes at beskytte bedre mod toksiske effekter af nogle organofosfater som f.eks. chlorpyrifos og parathion men dårligere mod andre som f.eks. diazinon end Q-allelet. Polymorfier i promotorregionens position -107 har især betydning for hvor meget af enzymet der udtrykkes, således at C-allelet er associeret med højere koncentration af PON1 i forholdet til T-allelet [Deakin et al., 2003; Deakin and James R. W., 2004].

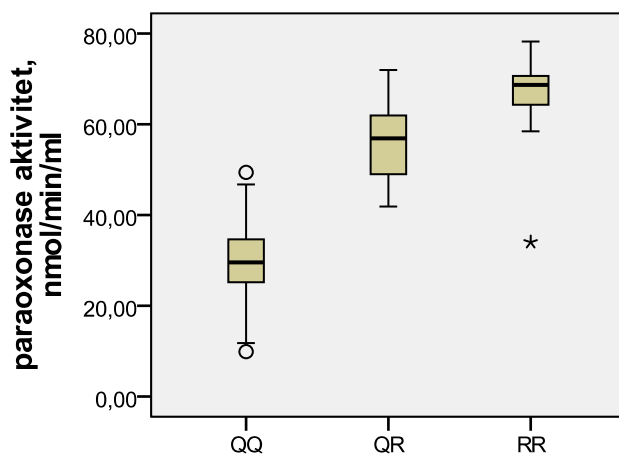
Genotypefrekvenserne for PON1 192 var 56,7% QQ, 35,5% QR og 7,8% RR svarende til en Q allel frekvens på 74%. For PON1 55 var frekvenserne 36,9 % LL, 47,5 % ML og 14,2% MM med en L allel frekvens på 61%. For PON1 107 polymorfien var frekvenserne 28,4% CC, 56,7% CT og 21,3% TT med en C allel frekvens på 56,7%. Fordelingen af genotyperne i position 192 og 55 var meget ens fordelt mellem prænatale eksponerede og ueksponerede mens der var en lidt skævere fordeling for polymorfien i position 107, hvor en større andel af de eksponerede børn havde CT-genotypen og en mindre andel havde CC-genotypen (Tabel 3.13). Forskellen var ikke statistisk signifikant. Fordelingen af individer mellem de forskellige PON1 genotyper stemmer rimeligt godt overens med en tidligere dansk undersøgelse [Christiansen et al., 2004], dog var der en lidt større hyppighed af PON1 107CT genotypen i gartnerbørnkohorten.

Tabel 3.13. Fordeling af genpolymorfier af paraoxonase PON1 i 141 børn fra gartnerbørnkohorten samlet og for prænatal pesticideksponerede og ueksponerede børn.

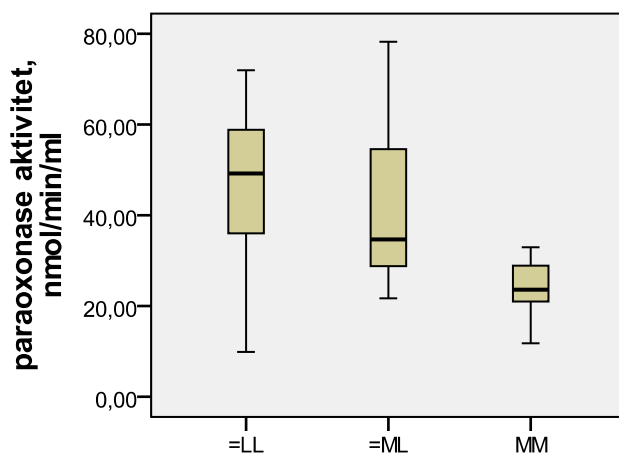
	Ueksponeret	Eksponeret	p-værdi	Samlet
Antal undersøgte prøver, N (%)	53	88		141
PON1 -107C/T				
CC	19 (35,8)	21 (23,9)	0,13	40 (28,4)
CT	21 (39,6)	59 (56,8)		80 (56,7)
TT	13 (24,5)	17 (19,3)		30 (21,3)
PON1 55M/L				
MM	6 (11,5)	14 (15,9)	0,77	20 (14,2)
ML	25 (50,0)	42 (47,7)		67 (47,5)
LL	20 (38,5)	32 (36,4)		52 (36,9)
PON1 192Q/R				
QQ	31 (58,5)	49 (55,7)	0,74	80 (56,7)
QR	17 (32,1)	33 (37,5)		50 (35,5)
RR	5 (9,4)	6 (6,8)		11 (7,8)

Forskelle på fordelingen af genotyper mellem de prænatale eksponerede og ueksponerede børn er testet med Pearsons chi-i-anden-test.

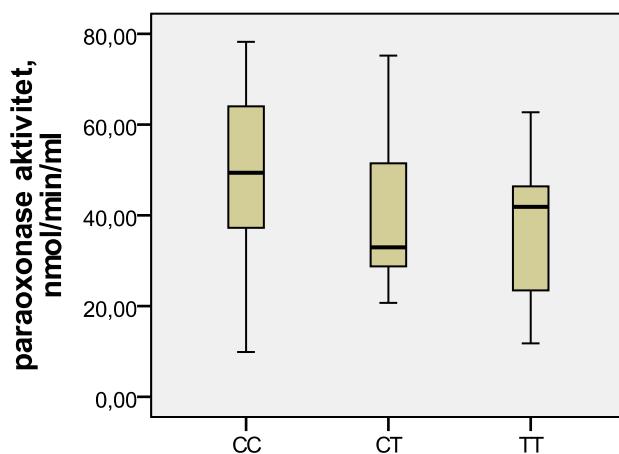
Aktiviteten af paraoxonase var som ventet relateret til genotypen (Figur 3.5 og Tabel 3.14). Ændringer i position 192 og 55 havde størst betydning for aktiviteten. For den samlede kohorte var der signifikant forskel i serumaktiviteten for de tre grupper med forskellige alloformer af henholdsvis PON1_{192Q/R} og PON1_{55M/L}. For PON1_{107C/T} var der signifikant højere aktivitet for CC-allotypen mens der ikke var signifikant forskel mellem CT og TT-allotyperne.



PON192



PON55



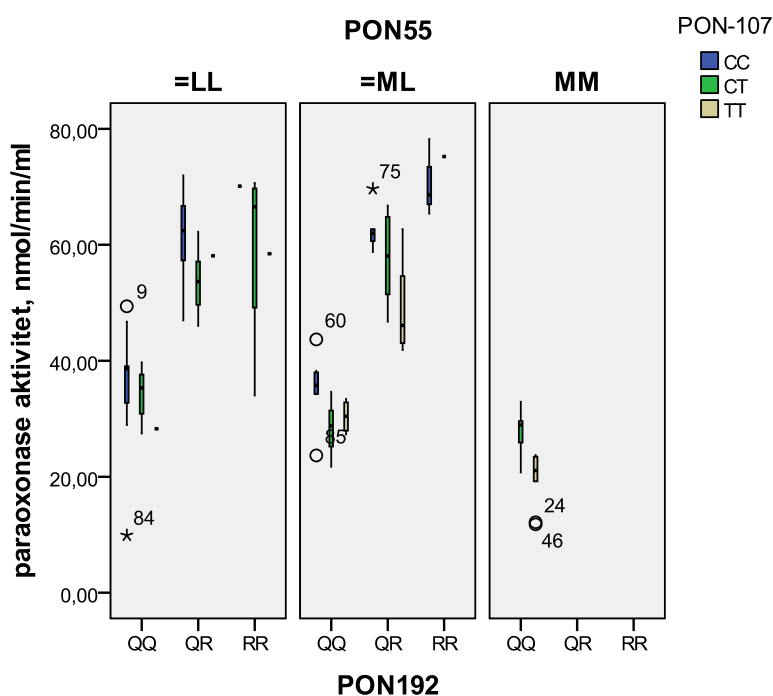
PON-107

Figur 3.5 Aktiviteten af paraoxonase i serum for hver af de tre genotyper. Værdierne er angivet som median (-), 25 og 75% kvartiler (boks) samt minimum og maksimum (|). Outliers er angivet med o og *, hvor * angiver at punktet er mere end 3 gange bokslængden fra 25 eller 75% kvartilen.

Tabel 3.14. Aktiviteten af paraoxonase i serum for hver af de tre undersøgte genotyper af PON1 i hele undersøgelseskohorten samt i grupperne af prænatalt pesticideksponerede og ueksponerede børn.

	Paraoxonase aktivitet i serum (mmol/min/ml), gennemsnit \pm sd (N)		
	Ueksponeret	Eksponeret	Hele kohorten
PON1 -107C/T			
CC	48,55 \pm 17,35 (19)*	51,21 \pm 15,44 (20)*	49,92 \pm 16,24 (39)*
CT	37,01 \pm 14,68 (20)	39,88 \pm 14,49 (49)	39,05 \pm 14,50 (69)
TT	34,39 \pm 16,87 (13)	39,84 \pm 14,16 (16)	37,39 \pm 15,40 (29)
PON1 55M/L			
MM	18,69 \pm 5,41 (6)*	26,32 \pm 4,18 (12)*	23,78 \pm 5,80 (18)*
ML	40,91 \pm 16,36 (25)	41,67 \pm 14,86 (41)*	41,38 \pm 15,33 (66)*
LL	45,79 \pm 15,50 (20)	49,74 \pm 13,57 (32)*	48,22 \pm 14,32 (52)*
PON1 192Q/R			
QQ	28,20 \pm 8,59 (30)*	31,06 \pm 5,97 (48)*	29,97 \pm 7,18 (78)*
QR	56,22 \pm 6,28 (17)	55,60 \pm 9,02 (32)*	55,81 \pm 8,11 (49)*
RR	61,62 \pm 16,94 (5)	69,14 \pm 4,41 (5)*	65,38 \pm 12,33 (10)*

*Signifikant forskellig fra de to andre allotyper, $p < 0,05$ (ANOVA og Least Significant Difference).



Figur 3.6 Aktiviteten af paraoxonase i serum i relation til de tre PON1-genotyper. Værdierne er angivet som median (-), 25 og 75% kvartiler (boks) samt minimum og maksimum (|). Outliers er angivet med o og *

Samlet set havde polymorfier i PON1 192 positionen størst betydning for aktiviteten (Figur 3.6). Individuer med genotypen $PON1_{192QQ}$ havde således altid en relativt lav aktivitet og den blev yderligere reduceret lidt i individer der samtidigt havde genotypen $PON1_{MM}$ eller $PON1_{ML}$. Disse individer må formodes at være mere sårbare overfor bestemte organofosfater (herunder parathion) end individer med de øvrige genotyper. Aktiviteten afhænger imidlertid af substratet og disse individer antages derfor at være mindre sårbare overfor toksiciteten af andre organofosfater.

Tabel 3.15. Kombination af genotyper i kohorten.

PON192 QQ (lav aktivitet)				PON192 QR eller RR (høj aktivitet)			
PON55 MM (lav aktivitet)		PON55 ML eller LL (høj aktivitet)		PON55 MM (lav aktivitet)		PON55 ML eller LL (høj aktivitet)	
PON107 CT eller TT (lav)	PON107 CC (høj)	PON107 CT eller TT (lav)	PON107 CC (høj)	PON107 CT eller TT (lav)	PON107 CC (høj)	PON107 CT eller TT (lav)	PON107 CC (høj)
20	0	41	19	0	0	39	21

For de 140 børn hvor alle tre polymorfier blev bestemt havde 80 PON192 QQ typen som koder for lav aktivitet og 20 af disse havde samtidigt PON55 MM typen (Tabel 3.15).

Genotypen forklarer imidlertid ikke hele variationen i enzymaktiviteten og andre faktorer som alder og køn spiller også ind [Huen et al., 2009; Richter and Furlong C. E., 1999]. I en multiple regressionsmodel med genotyper, køn, alder, moders rygning under graviditet samt prænatal pesticideksponering som prædiktorer for PON1 aktiviteten havde PON1 192 polymorfien størst betydning og forklarede over 70% af variationen i aktiviteten. Alder, køn eller om moderen havde røget under graviditeten påvirkede ikke paraoxonase aktiviteten. Derimod øgede prænatal pesticideksponering aktiviteten signifikant ($p=0.006$) (Tabel 3.16).

Tabel 3.16. Forskellige faktorerers betydning for paraoxonaseaktiviteten i en lineær regressionsmodel. **B** udtrykker den relative ændring (%) i den gennemsnitlige aktivitet. PON genotyperne indgår som binære variable med den pågældende genotype der medfører lav paraoxonaseaktivitet som reference.

Prædiktor	B (95%-KI)	p
PON192 QR eller RR (høj)	80,1 (67,1; 94,1)	<0,0001
PON55 LM eller LL (høj)	29,7 (15,9; 45,1)	<0,0001
PON-107 CC (høj)	18,7 (9,6; 28,6)	<0,0001
Alder (år)	-0,5 (-3,4; 2,4)	0,72
Dreng i forhold til pige	4,7 (-2,5; 12,5)	0,20
Moder røget under graviditet	2,2 (-6,3; 11,4)	0,63
Prænatal pesticideksponering	10,7 (3,0; 19,0)	0,006

3.5.4.1 Betydning af PON1 192 genotype på børnenes vækst og udvikling

PON1 192 genotypen er således den enkeltfaktor som har størst betydning for paraoxonaseaktiviteten og dermed kapaciteten til at nedbryde kemiske substrater herunder organofosfater. Samtidigt er PON1 192 genotypen i flere undersøgelser fundet associeret til risikoen for udvikling af hjertekarsygdomme, hvor R-bærere synes at have øget risiko. Evnen til at beskytte mod hjertekarsygdomme synes derfor ikke at være relateret til R-bærernes højere paraoxonaseaktivitet [Mackness et al., 2002; Durrington et al., 2001; Seo and Goldschmidt-Clermont P., 2009; Wheeler et al., 2004]. Selvom PON1 192 genotypen har betydning for både evnen til at omsætte pesticider og til at beskytte mod hjertekarsygdomme, er der ingen der tidligere har set på om eksponering for PON1 substrater, herunder pesticider, kan have betydning for risikoen for at udvikle hjertekarsygdomme. Som forventet var der forskel på PON1 aktiviteten mellem PON1 192 R-bærere og QQ homozygote, men desuden havde gruppen af børn med R-allelet signifikant højere diastolisk blodtryk og lavere CVRR mens der ikke var signifikant forskel på de øvrige variable (Tabel 3.16).

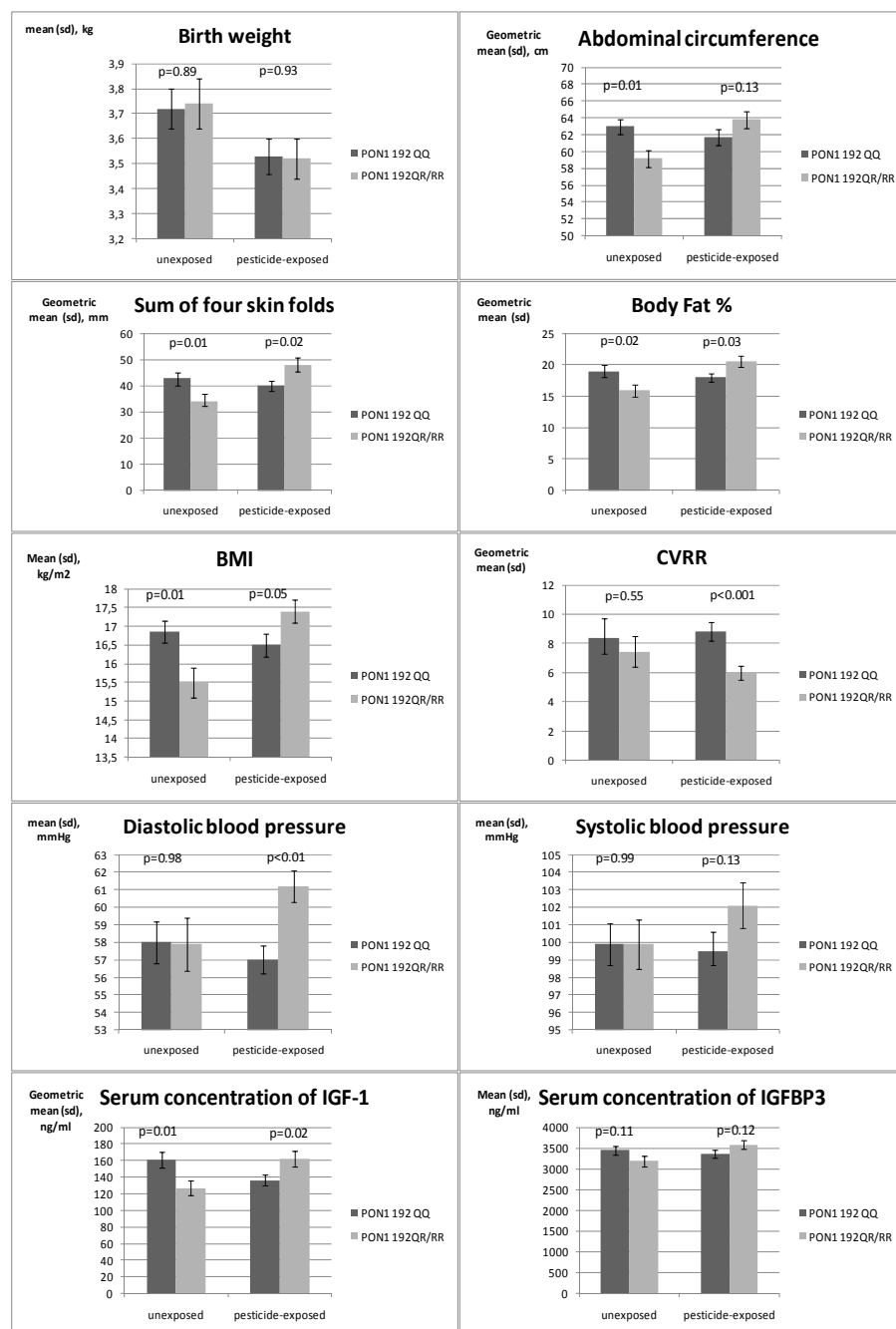
Tabel 3.17 Karakteristika for de 141 børn fordelt på PON1 192 genotype

	PON192QQ (lav aktivitet)	PON192 QR eller RR (høj aktivitet)	p-værdi
Antal drenge/piger (% drenge)	47/33 (58,8)	(35/26 (57,4)	1,00
Prænatal pesticideksponering [antal (%)]			
Ueksponeret	31 (38,8)	22 (36,1)	
Middel	28 (35,0)	24 (39,3)	
Høj	21 (26,3)	15 (24,6)	0,87
Alder (år)	8,7 (8,4;9,0)	8,5 (8,2; 8,8)	0,31
Højde (cm)	133,8 (132,1; 135,5)	132,8 (130,5; 135,0)	0,44
Vægt (kg)	30,0 (28,8; 31,2)	29,8 (28,1; 31,5)	0,86
Fødselsvægt (g)	3586 (3457; 3716)	3623 (3485; 3762)	0,70
Gestationsalder (dage)	280 (277; 283)	281 (278; 284)	0,68
Socialgruppe [antal (%)]			
1-3	28 (35,0)	14 (23,0)	
4	37(46,3)	33 (54,1)	
5	15 (18,8)	14 (23,0)	0,29
Moderen røg under graviditeten [antal (%)]	19 (23,8)	13 (21,3)	0,84
Moderen indtog alkohol under graviditeten [antal (%)]	32 (40,0)	18 (30,5)	0,29
Spiser overvejende økologisk [antal (%)]	5 (6,3)	3 (4,9)	1,00
PON1 aktivitet, (nmol/min/ml)	30,0 (28,3; 31,6)	57,4 (54,9; 59,9)	<0,001
BMI (kg/m ²)	16,6 (16,2; 17,1)	16,8 (16,2; 17,3)	0,75
Abdominalomkreds (cm), In-transformeret	62,3 (60,9; 63,7)	62,0 (60,4; 63,7)	0,81
Sum af fire hudfolder (mm), In-transformeret	40,7 (37,5; 44,3)	41,9 (38,3; 46,0)	0,65
Kropsfedtprocent (In-transformeret)	18,4 (17,2; 19,6)	18,8 (17,5; 20,1)	0,67
Systolisk blodtryk (mm Hg)	99,8 (98,1; 101,4)	101,2 (99,2; 103,2)	0,26
Diastolisk blodtryk (mm Hg)	57,4 (56,0; 58,9)	60,0 (58,3; 61,5)	0,02
CV _{RR} (In-transformed)	8,6 (7,5; 9,8)	6,5 (5,7; 7,4)	0,004

For kontinuere data angiver data gennemsnit (eller geometrisk gennemsnit for In-transformerede data) og 95%-KI og forskellen mellem de to genotyper er testet med ANOVA. For de kategoriske data er forskellen testet med Fishers-eksakte-test ved 2 kategorier og ved Pearsons chi-i-anden test for socialgruppe.

Prænatal pesticideksponering øgede signifikant abdominalomfang, tykkelse af hudfolder, kropsfedtprocent, BMI Z-score samt systolisk og diastolisk blodtryk hos gruppen af børn med R-allelet (Tabel 3.18, Tabel 3.19 og Tabel 3.20) efter justering for relevante konfoundere. Effekten var dosis-relateret og for abdominalomfang og systolisk blodtryk var den kun signifikant for gruppen med høj prænatal eksponering. Der var desuden en tendens til nedsat CV_{RR} hos de eksponerede børn med R-allelet, men denne sammenhæng var ikke signifikant, hvilket kan skyldes at færre børn fik målt CV_{RR}. For vækstfaktorerne sås en signifikant dosis-relateret stigning i serumkoncentrationen af IGF-1 mens IGFBP3-koncentrationen kun var signifikant øget hos den middeleksponerede gruppe. Efter justering for BMI, var der imidlertid ingen signifikant effekt af pesticideksponering (Tabel 3.21). Hos QQ homozygote børn, var der ikke nogen signifikant effekt af prænatal pesticideksponering på disse variable, på nær IGF-1 som var lavere hos de middeleksponerede børn (Tabel 3.21). Fødselsvægten var signifikant reduceret for hele gruppen af eksponerede børn (Tabel 3.5) men for de 144 børn som fik målt PON-genotype var effekten kun signifikant for gruppen af middeleksponerede børn samlet og for R-bærerne (Tabel 3.19).

Ved sammenligning af ovennævnte variable mellem de to genotyper for de ueksponerede børn sås at ueksponerede R-bærerne havde lavere gennemsnitlig abdominalomfang, tykkelse af hudfolder, kropsfedtprocent, BMI z-score og serumkoncentration af IGF-1 end ueksponerede QQ homozygote børn (Figur 3.6 og Tabel 3.18, Tabel 3.19 og Tabel 3.21). På nær abdominalomkredesen var disse variable dog stadig højere hos prænatalt pesticideksponerede børn med R-allelet sammenlignet med eksponerede QQ homozygote, men de var ikke signifikant forskellige fra de ueksponerede QQ homozygote. For blodtryk, CV_{RR} og IGFBP3 var der ikke forskel mellem de to genotyper for de ueksponerede børn, men for de eksponerede børn var blodtryk signifikant højere og CV_{RR} signifikant lavere for R-bærere end for QQ-homozygote (Tabel 3.20).



Figur 3.6 Effekt af PON1 192 genotype på forskellige variable i børn eksponeret for pesticider prænatalt og ueksponerede børn. Fødsel svægt er justeret for køn, gestationsalder og rygning under graviditet. De øvrige

værdier er justeret for køn, alder ved undersøgelsen, social gruppe og moders rygning under graviditet.

Det kan ikke udelukkes at de associationer der ses mellem PON1 192 QR/RR genotypen og effekter af prænatal pesticideksponering kan skyldes andre polymorfier i PON1 genet som er linket til denne polymorfi. For eksempel er fordelingen af PON1 55 genotyperne ikke uafhængige af PON1 192 genotyperne. Indenfor gruppen af børn med PON1 192 QQ typen havde gruppen af børn med 55MM typen imidlertid højere fødselsvægt end de to andre PON1 55 genotyper. Der var ikke forskel på nogle af de ovennævnte variable ved skolealderen mellem de forskellige PON1 55 genotyper og hvis vi inkluderede PON1 55 genotypen i regressionsanalyserne (som 0 (MM), 1 (ML), and 2 (LL)) ændrede det ikke på ovennævnte resultater

Tabel 3.18 Resultater fra regressionsanalyser af prænatal pesticideksponerings betydning for antropometriske mål ved skolealderen i relation til PON1 192 genotype.

	Alle børn		PON1 192QQ		PON1 192QR/RR	
	Geometrisk gennemsnit (95%-KI)	(95%-KI)	Geometrisk gennemsnit (95%-KI)	(95%-KI)	Geometrisk gennemsnit (95%-KI)	(95%-KI)
Abdominalomfang (cm)						
Ueksponerede	62.3 (60.6; 63.9)		63.2 (61.0; 65.4)		59.2 (56.8; 61.7)##	
Middel eksponerede	63.2 (61.6; 64.8)	1.4 (-2.2; 5.3)	61.0 (58.8; 63.3)	-3.4 (-8.2; 1.6)	62.4 (60.0; 64.8)	5.4 (-0.4; 11.5)
Højt eksponerede	63.8 (61.9; 65.8)	2.4 (-1.6; 6.7)	62.7 (60.1; 65.4)	-0.7 (-6.0; 4.8)	65.9 (62.7; 69.3) **	11.4 (4.3; 19.0)
Sum-af-fire-hudfolder (mm)						
Ueksponerede	40 (36; 44)		43 (38; 49)		34 (30; 39)##	
Middel eksponerede	44 (40; 48)	9.4 (-4.6; 25.5)	36 (32; 42)	-14.8 (-29.4; 2.8)	44 (39; 50) #**	30.4 (8.0; 57.5)
Højt eksponerede	46 (41; 52)	15.9 (-0.2; 34.7)	44 (38; 51)	3.0 (-15.9; 26.1)	52 (44; 62) ***	53.8 (23.6; 91.4)
Fedtprocent (%)						
Ueksponerede	18.1 (16.8; 19.5)		19.1 (17.2; 21.1)		16.0 (14.4; 17.9)#	
Middel eksponerede	19.1 (17.8; 20.6)	5.7 (-4.8; 17.4)	16.8 (15.1; 18.7)	-12.1 (-24.1; 1.9)	19.5 (17.5; 21.6) #**	21.4 (4.4; 41.2)
Højt eksponerede	20.4 (18.7; 22.3) *	12.7 (0.5; 26.5)	19.6 (17.4; 22.2)	2.8 (-12.3; 20.5)	22.3 (19.6; 25.5) ***	39.5 (17.1; 66.3)

Resultaterne er justeret for køn, alder, socialgruppe og maternel rygning under graviditet. Alle udfaldsvariablene var log-transformerede og udtrykker den gennemsnitlige relative forskel i % i forhold til ueksponerede.

* p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001 sammenlignet med ueksponerede, # p<0.05 ## p<0.01 sammenlignet med PON1 192QQ i samme eksponeringsgruppe

Tabel 3.19. Resultater fra regressionsanalyser af prænatal pesticideksponerings betydning for fødselsvægt, alders- og kønsspecifik BMI Z-scoring ved skolealderen og forskellen mellem BMI Z-scoring ved fødsel og skolealder i relation til PON1 Q192R genotype.

	Alle børn		PON1 192QQ		PON1 192QR/RR	
	Gennemsnit (95%-KI)	(95%-KI)	Gennemsnit (95%-KI)	(95%-KI)	Gennemsnit (95%-KI)	(95%-KI)
Fødselsvægt (kg)^a						
Ueksponerede	3.68 (3.56; 3.80)		3.67 (3.49; 3.85)		3.74 (3.56; 3.92)	
Middel eksponerede	3.51 (3.39; 3.63) *	-0.17 (-0.34;	3.59 (3.39; 3.79)	-0.08 (-0.35; 0.19)	3.46 (3.30; 3.63) *	-0.28 (-0.53; -0.04)
Højt eksponerede	3.54 (3.40; 3.68)	0.00)	3.45 (3.21; 3.69)	-0.22 (-0.52;	3.69 (3.48; 3.90) #	-0.06 (-0.33; 0.21)
		-0.14 (-0.33; 0.05)		0.08)		
BMI Z-score^b						
Ueksponerede	0.48 (0.16; 0.80)		0.61 (0.20; 1.03)		-0.13 (-0.66; 0.39) ##	
Middel eksponerede	0.65 (0.33; 0.96)	0.17 (-0.28; 0.62)	0.16 (-0.28; 0.59)	-0.45 (-1.06; 0.15)	0.66 (0.17; 1.14) *	0.79 (0.09; 1.50)
Højt eksponerede	0.84 (0.47; 1.22)	0.37 (-0.13; 0.86)	0.54 (0.04; 1.04)	-0.07 (-0.73; 0.58)	1.43 (0.82; 2.04) #***	1.57 (0.76; 2.37)
BMI Z-score mellem skolealder og fødsel^c						
Ueksponerede	0.05 (-0.32; 0.43)		0.13 (-0.38; 0.63)		-0.41 (-1.00; 0.19)	
Middel eksponerede	0.50 (0.14; 0.86)	0.45 (-0.08; 0.98)	-0.22 (-0.75; 0.31)	-0.35 (-1.08; 0.39)	0.73 (0.16; 1.30) **	1.13 (0.28; 1.99)
Højt eksponerede	0.49 (0.06; 0.93)	0.44 (-0.14; 1.02)	0.27 (-0.35; 0.91)	0.15 (-0.66; 0.97)	0.88 (0.18; 0.91) **	1.29 (0.36; 2.21)

udtrykker den gennemsnitlige forskel, ^a justeret for køn, alder og moders rygning i graviditet, ^b justeret for socialgruppe og moders rygning i graviditet, ^c justeret for gestationsalder, socialgruppe og moders rygning i graviditet, * p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001 sammenlignet med ueksponerede, # p<0.05 ## p<0.01 sammenlignet med PON1 192QQ i samme eksponeringsgruppe

Tabel 3.20 Resultater fra regressionsanalyser af prænatal pesticideksponerings betydning for systolisk og diastolisk blodtryk og hjerteratevariabilitet (CV_{RR}) ved skolealderen i relation til PON1 Q192R genotype.

	Alle børn		PON1 192QQ		PON1 192QR/RR	
	Gennemsnit/geometrisk gennemsnit (95%-KI)	(95%-KI)	Gennemsnit/geometrisk gennemsnit (95%-KI)	(95%-KI)	Gennemsnit/geometrisk gennemsnit (95%-KI)	(95%-KI)
Systolisk blodtryk, mmHg						
Ueksponerede	100.6 (98.7; 102.6)		100.1 (97.4; 102.7)		99.1 (95.6; 102.7)	
Middel eksponerede	100.1 (98.2; 102.0)	-0.5 (-3.3; 2.2)	99.4 (96.6; 102.3)	-0.7 (-4.6; 3.3)	99.6 (96.6; 102.5)	0.5 (-3.3; 5.6)
Højt eksponerede	101.7 (99.4; 104.0)	1.1 (-1.9; 4.1)	99.7 (96.4; 103.0)	-0.4 (-4.6; 3.9)	108.4 (104.1; 112.7) ## ***	9.3 (4.1; 15.8)
Diastolisk blodtryk, mmHg						
Ueksponerede	58.9 (57.2; 60.6)		58.2 (55.9; 60.4)		57.4 (54.8; 60.0)	
Middel eksponerede	59.2 (57.5; 60.8)	0.3 (-2.1; 2.6)	58.1 (55.7; 60.5)	-0.1 (-3.3; 3.2)	61.1 (58.7; 63.4) #*	3.7 (0.2; 7.2)
Højt eksponerede	57.8 (55.8; 59.7)	-1.1 (-3.7; 1.5)	55.5 (52.8; 58.3)	-2.7 (-6.1; 0.9)	62.0 (58.6; 65.5) #*	4.7 (0.1; 9.3)
CV_{RR}^a, (ln-transformeret)						
Ueksponerede	7.4 (6.3; 8.7)		8.2 (6.3; 10.7)		7.4 (5.8; 9.5)	
Middel eksponerede	7.4 (6.5; 8.4)	0 (-19; 24)	8.8 (7.1; 10.8)	7 (-24; 51)	6.1 (4.9; 7.5) ##	-18 (-41; 14)
Højt eksponerede	7.5 (6.3; 8.8)	1 (-20; 28)	8.7 (6.7; 11.2)	5 (-27; 52)	6.1 (4.7; 8.0) #	-18 (-43; 19)

Resultaterne er justeret for køn, alder, moders rygning i graviditet og for systolisk og diastolisk blodtryk desuden for BMI.

udtrykker den gennemsnitlige forskel for systolisk og diastolisk blodtryk og den relative forskel i % for CV_{RR} .

* $p \leq 0.05$. ** $p \leq 0.01$. *** $p \leq 0.001$ sammenlignet med ueksponerede, # $p \leq 0.05$ ## $p \leq 0.01$ sammenlignet med PON1 192QQ i samme eksponeringsgruppe

^aPå grund af tekniske vanskeligheder med pulsmåleren, blev CV_{RR} kun optaget for 98 børn (14 QQ og 14 QR/RR ueksponerede, 23 QQ og 19 QR/RR middel-eksponerede og 16 QQ og 12 QR/RR højt-eksponerede) ud af de 141 børn for hvem PON1 genotype blev bestemt.

Tabel 3.21. Resultater fra regressionsanalyser af prænatal pesticideksponerings betydning for serumkoncentrationer af IGF1 (geometrisk gennemsnit) og IGFBP3 (gennemsnit) ved skolealderen i relation til PON1 Q192R genotype.

	Alle børn		PON1 192QQ		PON1 192QR/RR	
	Gennemsnit/geometrisk gennemsnit (95%-KI)	(95%-KI)	Gennemsnit/geometrisk gennemsnit (95%-KI)	(95%-KI)	Gennemsnit/geometrisk gennemsnit (95%-KI)	(95%-KI)
Model A						
IGF-1, ng/ml						
Ueksponerede	143.9 (131.0; 158.1)		158.7 (139.8; 180.1)		125.1 (108.2; 144.6)##	
Middel eksponerede	139.0 (126.5; 152.7)	-3.4 (-15.4; 10.3)	127.0 (111.2; 145.1)*	-20. (-33.3; -3.9)	155.4 (135.2; 178.6) #*	24.3 (1.7; 51.9)
Højt eksponerede	163.1 (145.4; 183.0)	13.3 (-2.3; 31.4)	154.8 (132.8; 180.5)	-2.5 (-19.9; 18.8)	173.0 (144.6; 206.9)**	38.4 (9.7; 74.6)
IGFBP3, ng/ml						
Ueksponerede	3339 (3169; 351)		3341 (3212; 3670)		3169 (2897; 3441)	
Middel eksponerede	3369 (3198; 3540)	30 (-211; 271)	3209 (2971; 3447)	-233 (-560; 94)	3586 (3323; 3849) #*	417 (37; 796)
Højt eksponerede	3592 (3384; 3802)	253 (-16; 523)	3615 (3341; 3890)	173 (-180; 527)	3558 (3219; 3897)	389 (-51; 828)
Model B						
IGF-1, ng/ml						
Ueksponerede	148.0 (135.5; 161.7)		156.9 (139.2; 176.9)		133.7 (115.8; 154.5)	
Middel eksponerede	139.1 (127.5; 151.9)	-5.9 (-16.9; 6.5)	130.4 (114.8; 148.0)*	-17.0 (-30.4; -1.2)	153.3 (134.3; 175.0)	14.9 (-5.9; 40.2)
Højt eksponerede	156.4 (140.2; 174.3)	5.8 (-8.2; 21.8)	151.9 (131.3; 175.8)	-3.3 (-19.8; 16.6)	160.6 (134.3; 192.0)	20.4 (-5.7; 53.6)
IGFBP3, ng/ml						
Ueksponerede	3375 (3210; 3541)		3423 (3205; 3642)		3240 (2955; 3524)	
Middel eksponerede	3370 (3205; 3536)	-5 (-238; 231)	3249 (3018; 3480)	-177 (-494; 141)	3570 (3310; 3831)	325 (-67; 717)
Højt eksponerede	3539 (3333; 3745)	164 (-101; 432)	3585 (3320; 3851)	159 (-181; 500)	3472 (3120; 3824)	227 (-253; 707)

Model A: justeret for køn og alder, Model B: justeret for køn, alder og BMI, β udtrykker den gennemsnitlige forskel for IGFBP3 og den relative forskel (%) for IGF-1 (ln-transformeret). * $p \leq 0.05$. ** $p \leq 0.01$. *** $p \leq 0.001$ compared to unexposed, ## $p \leq 0.01$ compared to PON1 192QQ unexposed

3.6 Resultater fra de neurofysiologiske undersøgelser

3.6.1 Blodtryk og hjerterate variabilitet

Øget blodtryk kan skyldes hjerte-karsygdomme men kan også skyldes neurotoksiske påvirkninger af nerveceller i hjernestammen, som er med til at kontrollere kontraktionen af blodkarrene som led i reguleringen af blodtrykket [Grandjean et al., 2006]. Rygning under graviditeten medførte tendens til øget systolisk blodtryk ($\beta=2,5$; $p=0,07$) hos børnene, mens der ikke var signifikant effekt på det diastoliske blodtryk. For den samlede gruppe børn (uden hensyn til PON1 192 genotypen) var der ikke signifikant forskel på hverken systoliske eller diastoliske blodtryk mellem gruppen af prænatalt pesticideksponerede og ueksponerede børn (Tabel 3.20) hverken før eller efter justering for om moderen røg under graviditeten. Gentagelse af analysen med alle 177 børn ændrede ikke dette resultatet.

Der blev målt Hjerteratevariabilitet (CV_{RR}) på i alt 128 børn. For tre børn med CV_{RR} over 20% og et barn med CV_{RR} under 2% blev værdierne vurderet abnorme og de blev ekskluderet fra dataanalyserne. Inklusion af de 26 børn for hvem der ikke blev bestemt PON1 genotype ændrede ikke på at prænatal pesticideksponering ikke signifikant påvirkede CV_{RR} for den samlede gruppe børn (Tabel 3.20). Der var ikke signifikante kønsforskelle på CV_{RR} for hverken ueksponerede eller eksponerede børn.

De abnorme værdier for de fire børn skyldes sandsynligvis at nogle af børnene havde svært ved at være helt afslappede og i ro under målingerne. Dette forklarer formodentligt også den ret store variation på CV_{RR} -målingerne. Gentagelse af dataanalyserne uden eksklusion af de fire børn ændrede ikke resultaterne af betydning.

3.6.2 Evoked Potentials (EP)

Tiden fra en auditiv eller visuel stimulering til måling af elektriske potentialer i centralnervesystemet er målt på 93 af børnene (47 prænatal eksponerede og 46 ueksponerede). Der er målt 3 potentialer efter henholdsvis auditiv stimulering (BAEP) og visuel stimulering (VEP). En forsinkelse af disse potentiale-peaks, samt tiden imellem BAEP-peaks er et objektivi mål for nedsat nerveledningshastighed i hjernen [Murata et al., 1999]. Resultaterne er opgjort af Professor Murata i Japan, som ikke havde andre informationer om børnene.

Generelt synes BAEP-peaks at være forsinkede hos de prænatalt eksponerede børn hvor imod VEP-peaks synes at optræde hurtigere (tabel 3.22). Dette tyder på en nedsat nerveledningshastighed mellem den akustiske nerve og midthjernen hos de eksponerede børn. Tilsvarende effekter er set efter prænatal eksponering for metylkviksølv hos børn på Færøerne [Murata et al., 2004]. At nerveledningshastigheden synes øget mellem retina og den visuelle hjernebark er overraskende og fundet er sandsynligvis tilfældigt.

Tabel 3.22 Resultater (gennemsnit og regressionskoefficient, β) fra multipel regression af prænatal pesticideksponering som prædikator for latenstid i elektrisk potentiale efter auditiv (BAEP) eller visuel (VEP) stimulering hos 93 børn i gartnerkohorten.

	Ueksponerede børn (N=46)	Eksponerede børn (N=47)			
	Gennemsnit (95%-KI), msec	Model 1 B (95%-KI)	p-værdi	Model 2 B (95%-KI)	p-værdi
BAEP, 20 Hz					
I	1,74 (1,70; 1,79)	0,04 (-0,02; 0,10)	0,24	0,05 (-0,02; 0,11)	0,11
III	3,86 (3,79; 3,92)		0,13		0,11
V	5,65 (5,58; 5,71)	0,07 (-0,02; 0,15)	0,006	0,07 (-0,02; 0,16)	0,007
I-III	2,11 (2,06; 2,17)	0,11 (0,03; 0,20)	0,43		0,50
III-V	1,79 (1,75; 1,83)	0,03 (-0,05; 0,10)	0,10	0,12 (0,03; 0,20)	0,15
I-V	3,90 (3,85; 3,96)	0,05 (-0,01; 0,11)	0,04	0,03 (-0,05; 0,10)	0,06
		0,08 (0,00; 0,15)		0,05 (-0,02; 0,11)	
				0,07 (0,00; 0,15)	
BAEP, 40 Hz					
I	1,78 (1,73; 1,83)	0,02 (-0,04; 0,09)	0,43	0,03 (-0,03; 0,10)	0,30
III	3,94 (3,87; 4,00)		0,02		0,10
V	5,77 (5,72; 5,83)	0,10 (0,02; 0,19)	0,001	0,11 (0,03; 0,20)	0,001
I-III	2,15 (2,10; 2,21)	0,14 (0,06; 0,22)	0,03	0,14 (0,06; 0,22)	0,03
III-V	1,84 (1,79; 1,88)	0,08 (0,01; 0,15)	0,23	0,08 (0,01; 0,16)	0,39
I-V	3,99 (3,94; 4,04)	0,04 (-0,02; 0,10)	0,003	0,03 (-0,03; 0,09)	0,007
		0,12 (0,04; 0,19)		0,11 (0,03; 0,18)	
VEP					
N75	75,3 (73,6; 76,9)	-2,2 (-5,1; 0,7)	0,14	-2,2 (-5,2; 0,8)	0,14
P100	106,3 (103,9; 108,7)	-4,4 (-8,8; -0,8)	0,02	-4,4 (-8,1; -0,7)	0,02
N145	149,9 (144,3; 155,5)	-13,9 (-21,4; -6,4)	<0,001	-14,0 (-21,4; -6,6)	<0,001

Model 1: justeret for alder og køn, Model 2: justeret for barnets alder, køn, moders rygning og alkoholindtag under graviditet (ja/nej).

3.7 Resultater fra de neuropsykologiske undersøgelser

Da alderen har afgørende betydning for børnenes evne til at udføre de anvendte tests præsenteres alle resultater efter justering for alder. Desuden er der ofte forskel på drenge og pigers evner i de individuelle tests og resultaterne præsenteres derfor både samlet og for hvert køn separat. Foruden alderen er moderens rygning og alkoholindtag under graviditet, neurologisk sygdom eller hjernerystelse hos barnet og familiens socialgruppe medtaget som obligate forklarende variable i alle analyserne.

En højere andel af de ueksponerede børn havde haft hjernerystelse (Tabel 3.23) sammenlignet med de eksponerede børn.

Tabel 3.23 Andel af børn hvor det blev oplyst i spørgeskemaet at de havde en neurologisk diagnose eller tidligere havde haft hjernerystelse

	Ueksponerede	Eksponerede	p-værdi
Neurologisk diagnose N (%)	3 (4,6) 1 pige, 2 drenge	4 (3,6) 1 pige, 3 drenge	0,71
Haft hjernerystelse N (%)	13 (20,0) 4 piger, 9 drenge	9 (8,0) 2 piger, 7 drenge	0,03

Testet med Fishers-eksakte-test

De forskellige neuropsykologiske funktioner er dels blevet analyseret enkeltvis og til sidst er der foretaget en samlet analyse for at vurdere om der er en samlet effekt af prænatal pesticideksponering på børnenes samlede neuropsykologiske funktion.

3.7.1 Motorisk funktion

Børnenes motoriske funktion blev undersøgt dels som simpel reaktionstid efter en auditiv stimulering og dels som hastigheden, hvormed barnet kunne trykke på en lille plade i den såkaldte 'fingertapping' test. Der var ingen signifikante effekter af prænatal pesticideksponering for drenge og piger samlet (Tabel 3.24). Der er kønsforskel på de to effektvariable og hos piger medførte prænatal pesticideksponering en signifikant nedsat motorisk hastighed (Tabel 3.25). Ved eksklusion af de nye kontrolbørn, sås stadig en negativ effekt af prænatal pesticideksponering på motorisk hastighed (β (95%-KI)= -3,2 (-8,4; 2,0), $p=0,22$) for piger, som dog ikke var signifikant for så få børn (53 eksponerede og 7 ueksponerede). Der var også en tendens til en lidt længere reaktionstid for de prænatalt pesticideksponerede piger, men forskellen var ikke signifikant. Hos drengene var der ingen effekt af prænatal pesticideksponering på hverken reaktionstid eller motorisk hastighed (Tabel 3.25). Børnenes aktuelle udsættelse for organofosfater var signifikant negativt associeret til børnenes motoriske hastighed (Tabel 3.26) og i modsætning til effekten af den prænatale eksponering, var denne effekt mere markant for drenge end for piger (Tabel 3.26, model 2). Der var ingen effekt af den nuværende eksponering på børnenes reaktionstid.

Tabel 3.24 Resultater fra multipel regressionsanalyse af reaktionstid og motorisk hastighed i forhold til prænatal pesticideksponering hos de 177 børn i kohorten ved 6-11 års alderen.

	Gennemsnit (95%-KI)		
	Gns for begge hænder	Dominant hånd	Ikke-dominant hånd
Reaktionstid ^a (msek)			
Ueksponerede	294 (284; 304)	295 (285; 305)	293 (279; 307)
Middel eksponerede	305 (295; 316)	304 (294; 314)	304 (290; 318)
Højt eksponerede	297 (285; 309)	291 (280; 303)	302 (286; 319)
Motorisk hastighed ^a (antal tryk/15 sek)			
Ueksponerede	49,5 (47,3; 49,7)	52,4 (50,5; 54,2)	46,6 (44,9; 48,4)
Middel eksponerede	47,5 (45,9; 49,0)	50,6 (48,8; 52,4)	44,4 (42,7; 46,1)
Højt eksponerede	49,9 (48,1; 51,8)	52,6 (50,5; 54,7)	47,3 (45,3; 49,3)

^aJusteret for alder, neurologisk sygdom/hjernerytelse, moders rygning og alkoholindtag under graviditet og social gruppe, * $p \leq 0$

Tabel 3.25 Effekt af prænatal pesticideksponering (middel og høj kombineret), køn og nuværende organofosfateksponering (DAP) på reaktionstid og motorisk hastighed hos de 177 børn i kohorten ved 6-11 års alderen efter justering for relevante konfoundere. B-angiver gennemsnitlig forskel (95%-KI)

	Begge hænder		Dominant hånd		Ikke-dominant hånd	
	B (95%-KI)	p-værdi	B (95%-KI)	p-værdi	B (95%-KI)	p-værdi
Reaktionstid^a (msek)						
<i>Model 1</i>						
Køn (dreng)	-13 (-26; -0,2)	0,05	-9 (-21; 3)	0,13	-17 (-34; -0,1)	0,05
Prænatal pesticideksponering (ja/nej)	7 (-6; 21)	0,30	3 (-9; 16)	0,62	11 (-6; 29)	0,21
<i>Model 2</i>						
Køn (dreng)	-13 (-26; -0,4)	0,04	-10 (-22; 2)	0,11	-17 (-34; -0,1)	0,05
Prænatal middel pesticideksponering	10 (-4; 26)	0,17	9 (-5; 23)	0,22	12 (-8; 32)	0,23
Prænatal høj pesticideksponering	3 (-14; 19)	0,74	-4 (-19; 11)	0,60	10 (-12; 31)	0,37
<i>Model 3</i>						
Køn (dreng)	-4 (-25; 16)	0,69	-4 (-23; 16)	0,73	-5 (-32; 22)	0,71
Prænatal pesticideksponering (ja/nej)	15 (-5; 34)	0,14	8 (-10; 26)	0,37	22 (-4; 47)	0,10
Køn* Prænatal pesticideksponering (interaktion)	-14 (-40; 12)	0,29	-10 (-34; 15)	0,44	-19 (-54; 15)	0,27
<i>Model 4</i>						
Prænatal pesticideksponering (ja/nej), piger separat	21 (-1; 44)	0,06	12 (-6; 31)	0,19	30 (-1; 62)	0,06
Prænatal pesticideksponering (ja/nej), drenge separat	2 (-14; 18)	0,77	3 (-14; 20)	0,76	2 (-17; 21)	0,84
Motorisk hastighed^a (antal tryk/15 sek)						
<i>Model 1</i>						
Køn (dreng)	3,9 (2,1; 5,8)	<0,001	4,1 (2,0; 6,2)	<0,001	3,8 (1,7; 5,8)	<0,001
Prænatal pesticideksponering (ja/nej)	-1,0 (-3,0; 0,9)	0,31	-1,0 (-3,2; 1,3)	0,39	-1,1 (-3,2; 1,1)	0,34
<i>Model 2</i>						
Køn (dreng)	4,0 (2,1; 5,8)	<0,001	4,1 (2,0; 6,2)	<0,001	3,8 (1,8; 5,8)	<0,001
Prænatal middel pesticideksponering	-2,1 (-4,2; 0,1)	0,06	-1,9 (4,3; 0,6)	0,14	-2,3 (-4,7; 0,04)	0,05
Prænatal høj pesticideksponering	0,47 (-1,9; 2,8)	0,70	0,23 (-2,5; 3,0)	0,86	0,71 (-1,9; 3,2)	0,59
<i>Model 3</i>						
Køn (dreng)	1,7 (-1,3; 4,7)	0,27	1,7 (-1,7; 5,2)	0,33	1,6 (-1,7; 5,0)	0,33
Prænatal pesticideksponering (ja/nej)	-2,9 (-5,7; -0,1)	0,04	-3,0 (-6,2; 0,2)	0,07	-2,9 (-6,0; 0,2)	0,07
Køn* Prænatal pesticideksponering (interaktion)	3,6 (-0,2; 7,4)	0,06	3,8 (-0,57; 8,1)	0,09	3,4(-0,80; 7,6)	0,11
<i>Model 4</i>						
Prænatal pesticideksponering (ja/nej), piger separat	-3,6 (-6,6; -0,6)	0,02	-3,6 (-7,0; -0,2)	0,04	-3,6 (-6,8; -0,4)	0,03
Prænatal pesticideksponering (ja/nej), drenge separat	0,9 (-1,7; 3,5)	0,50	0,9 (-2,2; 4,0)	0,57	0,9 (-2,0; 3,9)	0,53

^aJusteret for alder, neurologisk sygdom/hjernerystelse, moders rygning og alkoholindtag under graviditet og socialgruppe.

Tabel 3.26 Effekt af børnenes nuværende eksponering for organofosfatpesticider (mål t som koncentrationen af metabolitter (DAP) i urin) på reaktionstid og motorisk hastighed hos de 177 børn i kohorten ved 6-11 års alderen efter justering for relevante konfoundere. B-angiver gennemsnitlig forskel (95%-KI)

	Begge hænder		Dominant hånd		Ikke-dominant hånd	
	B (95%-KI)	p-værdi	B (95%-KI)	p-værdi	B (95%-KI)	p-værdi
Reaktionstid ^a (msek)						
<i>Model 1</i>						
Køn (dreng)	-11 (-24; 2)	0,10	-7 (-20; 5)	0,23	-15 (-32; 3)	0,10
Nuværende DAP ^b eksponering	0,4 (-5; 6)	0,87	0,0 (-5; 5)	0,99	0,9 (-6; 8)	0,79
<i>Model 2</i>						
Nuværende DAP ^b eksponering, piger separat	-2 (-10; 6)	0,62	-3 (-9; 4)	0,44	-2 (-13; 10)	0,79
Nuværende DAP ^b eksponering, drenge separat	3 (-3; 10)	0,34	2 (-4; 9)	0,49	4 (-4; 12)	0,32
Motorisk hastighed ^a (antal tryk/15 sek)						
<i>Model 1</i>						
Køn (dreng)	3,7 (1,9; 5,5)	<0,001	3,8 (1,7; 5,9)	0,001	3,6 (1,6; 5,6)	0,001
Nuværende DAP ^b eksponering	-1,0 (-1,8; -0,1)	0,02	-1,0 (-1,8; -0,1)	0,02	-0,9 (-1,7; -0,1)	0,02
<i>Model 2</i>						
Nuværende DAP ^b eksponering, piger separat	-0,7 (-1,8; 0,3)	0,15	-0,9 (-2,1; 0,2)	0,12	-0,5 (-1,6; 0,5)	0,33
Nuværende DAP ^b eksponering, drenge separat	-1,1 (-2,1; -0,1)	0,04	-1,0 (-2,3; 0,2)	0,11	-1,2 (-2,3; 0,0)	0,05

^aJusteret for alder, neurologisk sygdom/hjernerystelse, moders rygning og alkoholindtag under graviditet og socialgruppe. ^bµmol dialkylfosfatmetabolitter (DAP)/g creatinin, ln-transformeret

Lateralisering kan bestemmes som forskellen i motorisk hastighed mellem dominante og ikke-dominante hånd i forholdet til summen af begge hænder: $(\text{Finger Tapping}_{\text{dominant hånd}} - \text{Finger tapping}_{\text{ikke-dominante hånd}}) \times 100 / (\text{Finger Tapping}_{\text{dominant hånd}} + \text{Finger tapping}_{\text{ikke-dominante hånd}})$. Der var en tendens til øget venstrehåndtethed hos drenge sammenlignet med piger ($p=0,11$), men der var ikke forskel på venstrehåndtethed eller lateralisering mellem ueksponerede og eksponerede børn hverken for drenge eller piger (Tabel 3.27) eller for begge køn samlet.

Tabel 3.27 Hånddominans og lateral isering

	Drenge			Piger		
	ueksponeret	eksponeret	p-værdi	ueksponeret	eksponeret	p-værdi
Venstre dominant hånd, N (%)	6 (17,1)	5 (8,6)	0,32	0	4 (8,2)	0,29
lateralisering	4,66	4,77	0,93	4,52	5,56	0,45

Fishers-eksakte-test

3.7.2 Sproglig funktion

Børnenes sproglige evner er undersøgt med WJ III (Woodcock-Johnson III) Verbal Comprehension testen og WJ III Picture Vocabulary testen, som omfatter fire delprøver (Picture Vocabulary, Synonyms, Antonyms og Verbal Analogies). Resultaterne er justeret for barnets alder, om barnet har neurologisk sygdom eller har haft hjernerystelse, familiens socialstatus, moders etnicitet samt moders rygning og alkoholindtag under graviditet. Om moderen havde anden etnicitet end dansk havde signifikant betydning i alle de sproglige test og lav social status havde negativ non-signifikant betydning. Om der var mindre og/eller større søskende påvirkede ikke resultaterne.

Effekten af prænatal pesticideksponering var forskellig på de enkelte sproglige prøver. Der var således en negativ effekt af pesticideksponering på pigers evne til at benævne forskellige billeder (både inden og efter cueing) (Tabel 3.28) mens der ikke var nogen effekt for drengene. For pigerne steg scoren i denne test med omkring 0,5 (β værdi i regressionsanalysen) pr år barnet blev ældre. Effekten af prænatal pesticideksponering svarer således til over et års forsinkelse. Den Verbale Forståelsesfaktor (Verbal Comprehension Factor), som er et vægtet gennemsnit af de sproglige prøver, var nærsignifikant negativ påvirket af eksponering i gruppen af piger. Dette tyder på en reel negativ effekt af eksponering for piger på den almene sprogfunktion. For drengene var der ingen effekt på Den Verbale Forståelsesfaktor men paradoksalt nok, en positiv effekt af eksponering på deres evne til at angive analogier. Denne effekt er formodentlig tilfældig, da der ikke var effekt på andre sproglige funktioner hos drengene heller ikke på deres evne til at angive synonymer og antonymer (ikke vist).

Børnenes evne til abstrakt tænkning blev undersøgt med Raven Coloured Progressive Matrices, som er en non-verbal test af generel intelligens, hvor barnets evne til at registrere det organisatoriske princip (rumligt, designmæssigt og numerisk) i et visuelt materiale testes. Den visuospatiale funktion blev testet ved Copying testen fra Stanford-Binet IV, hvor figurer af stigende kompleksitet aftegnes (Tabel 3.29).

Tabel 3.28 Resultater fra regressionsanalyser af sammenhæng mellem prænatal pesticideksponering og effekter i test for sproglig funktion. Resultaterne angiver gennemsnitlige scores for ueksponerede børn og den gennemsnitlige forskel (β) mellem eksponerede og ueksponerede børn.

Test	Alle børn (N=173)			Drengene (N=92)			Piger (N=81)		
	Ueksponeret Gennemsnit (95%-KI)	Eksponeret β (95%-KI)	p	Ueksponeret Gennemsnit (95%-KI)	Eksponeret β (95%-KI)	p	Ueksponeret Gennemsnit (95%-KI)	Eksponeret β (95%-KI)	p
Picture Vocabulary WJ III, correct without cue ^a	14,5(14,2; 14,8)	-0,2 (-0,6; 0,1)	0,17	14,3 (13,9; 15,2)	0,04 (-0,5; 0,5)	0,89	14,8 (14,4; 15,2)	-0,8 (-1,3; -0,2)	0,004
Picture Vocabulary WJ III, correct without cue+with stim. cue+with phon. cue ^a	15,7 (15,4; 15,9)	-0,2 (-0,5; 0,1)	0,15	15,3 (15,0; 15,67)	0,1 (-0,3; 0,5)	0,70	16,1 (15,7; 16,4)	-0,6 (-1,0; -0,2)	0,003
Verbal Comprehension, WJ III, Analogies ^a	5,9 (5,5; 6,3)	0,2 (-0,3; 0,7)	0,46	5,3 (4,8; 5,8)	1,0 (0,3; 1,6)	0,01	6,5 (6,0; 7,1)	-0,5 (-1,2; 0,1)	0,12
Verbal Comprehension Factor (pic w. cues) ^a	0,06 (-0,12; 0,24)	-0,07 (-0,31; 0,16)	0,53	-0,01 (-0,25; 0,22)	0,14 (-0,16; 0,44)	0,36	0,17 (-0,11; 0,45)	-0,35 (-0,71; -0,01)	0,06

^aJusteret for alder, neurologisk sygdom/hjernerystelse, familiens socialgruppe, moders etnicitet samt moders rygning og alkoholindtag under graviditet

Tabel 3.29 Resultater fra regressionsanalyser af sammenhæng mellem prænatal pesticideksponering og effekter i test for abstrakt tænkning, visuospatial funktion og hukommelse. Resultaterne angiver gennemsnitlige scores for ueksponerede børn og den gennemsnitlige forskel (β) mellem eksponerede og ueksponerede børn.

Test	Alle børn (N=173)			Drengene (N=92)			Piger (N=81)		
	Ueksponeret Gennemsnit (95%-KI)	Eksponeret β (95%-KI)	p	Ueksponeret Gennemsnit (95%-KI)	Eksponeret β (95%-KI)	p	Ueksponeret Gennemsnit (95%-KI)	Eksponeret β (95%-KI)	p
Abstrakt tænkning Raven coloured progressive Matrices	18,0 (17,3; 18,7)	-0,1 (-1,0; 0,7)	0,76	17,6 (16,7; 18,5)	0,01 (-1,2; 1,2)	0,98	18,4 (17,3; 29,4)	-0,3 (-1,6; 1,0)	0,62
Visuospatial funktion S-B Copying total	22,2 (21,5; 23,0)	0,4 (-0,5; 1,3)	0,41	21,1 (20,1; 22,1)	0,7(-0,5; 2,0)	0,25	23,5 (22,5; 24,5)*	-0,1 (-1,4; 1,2)	0,92
Korttidshukommelse Digit span ^a SB-Memory for sentences ^a	8,7 (8,1; 9,3) 20,8 (19,8; 21,8)	0,1 (-0,7; 0,9) -0,5 (-1,7; 0,8)	0,82 0,48	8,4 (7,5; 9,3) 20,4 (19,0; 21,8)	0,6 (-0,6; 1,8) 0,6 (-1,2; 2,3)	0,30 0,52	9,0 (8,2; 9,9) 21,1 (19,6; 22,6)	-0,4 (-1,5; 0,7) -1,4 (-3,4; 0,5)	0,50 0,14
Langtidshukommelse Pict. Vocab. Recall ^a Copying recall ^a	4,7 (4,1; 5,2) 5,4 (4,9; 5,8)	-0,6 (-1,3; 0,2) -0,3 (-0,9; 0,3)	0,12 0,36	3,9 (3,1; 4,8) 4,7 (4,1; 5,3)	-0,1 (-1,2; 1,0) 0,1 (-0,7; 0,9)	0,89 0,78	5,5 (4,6; 6,3)* 6,2 (5,5; 6,8)*	-1,2 (-2,3; -0,1) -0,8 (-1,7; 0,05)	0,03 0,06

^aJusteret for alder, neurologisk sygdom/hjernerystelse, familiens socialgruppe, moders etnicitet samt moders rygning og alkoholindtag under graviditet

* Signifikant ($p < 0,05$) forskellig fra ueksponerede drenge.

Korttidshukommelse blev testet ved børnenes evne til at huske og gengive talrækker forfra og bagfra samt deres evne til at gengive sætninger af stigende kompleksitet. Langtidshukommelsen blev testet ved at undersøge hvor mange af de billeder, som de havde set i sprogtesten (Picture Vocabulary WJ III) de kunne huske ved slutningen af undersøgelsen (ca. 40 minutter senere) og hvor mange af de figurer de tidligere havde tegnet i testen for visuospatial funktion (S-B Copying) de kunne gengive efter ca. 30 minutter. Der var ingen effekt af prænatal pesticideksponering på børnenes evne til abstrakt tænkning eller deres visuospatiale funktion (Tabel 3.29). For pigerne var der en signifikant forringet langtidshukommelse, men der var ingen effekt hos drengene.

Sammenfattende sås der således signifikant negativ effekt af prænatal pesticideksponering på piger inden for sprogfunktion (Tabel 3.28), langtidshukommelse (Tabel 3.29) og manuel motorisk hastighed (Tabel 3.25). Generelt var der for pigerne tendens til negativ effekt af eksponeringen på de fleste effektmål, omend de ikke alle var signifikante. For drengene blev der ikke set negative effekter på resultater fra de neuropsykologiske test. Samlet sås der heller ingen negative effekter af eksponeringen på børnene, hvis de ikke var opdelt i køn.

Børnenes nuværende pesticideksponering, som overvejende kommer fra kosten, var som forventet ikke forskellig mellem prænatal eksponerede og ueksponerede børn. At medtage den totale urinkoncentration af dialkylmetabolitter, som mål for deres nuværende organofosfateksponering, i analyserne vedrørende effekter af prænatal eksponering ændrede ikke resultaterne.

3.7.3 Samlet analyse af de psykometriske data (strukturel ligningsmodel)

Den strukturelle ligningsmodel analyserer hvordan den samlede neuropsykologiske funktion(g), som er et mål for intelligens, er påvirket ved at inddrage resultater fra alle de udførte psykometriske test. Alder og social status havde, som forventet, en signifikant positiv effekt på g mens anden nationalitet end dansk hos moderen havde en signifikant negativ effekt på børnenes g. Dette skyldes sandsynligvis sproglige forhold. Rygning, alkoholindtag og neurologisk sygdom havde ikke signifikant effekt på g. Muligvis kan man tale om en tendens til negativ effekt af rygning ($p = 0,06$ i ensidig test). Antal søskende i husstanden havde ligeledes ingen effekt på g.

Højrehåndehed havde en signifikant positiv effekt på g, og var ikke selv signifikant influeret af nogen prædiktor. Høj social status havde muligvis en selvstændig tendens til positiv effekt ($p = 0.06$ i tosidet test).

Det er vist, at forskelle i fødselsvægt imellem søskende (korrigeret for gestationsalder og køn samt for moders alder ved fødselen, fødselsorden, familiens indtægt og, som oplyst i email fra forfatteren, også for moderens etnicitet) har en positiv effekt på intelligens [Lawlor et al., 2005]. Fødselsvægt havde ikke i sig selv signifikant effekt på g. Fødselsvægten var, som forventet, stærkt signifikant positivt påvirket af gestationsalderen og var også signifikant negativt påvirket af køn (pigebørn vejede mindre). Gestationsalder (gravdag) blev medtaget som prædiktor for g, og hele rækken af kovariater er sat ind som korrektion af hånddominans og af fødselsvægt, bortset fra interaktionen

mellem køn og eksponering, som ikke antages at have betydning for disse to variable.

På baggrund af resultaterne fra enkeltanalyserne af de forskellige effektmål præsenteret i de forrige afsnit, var vores hypotese at prænatal pesticideksponering ville have en samlet negativ effekt på pigernes, men ikke drengenes, neuropsykologiske funktion (g). Denne hypotese blev bekræftet, idet der for eksponerede piger var en signifikant negativ effekt på g efter korrektion for alle de ovenfor nævnte variable ($p = 0,03$ i tosidet test). Ueksponerede piger havde modsat en signifikant positiv effekt på g , hvilket indikerer at pigerne som udgangspunkt var mere intelligente end drengene. For eksponerede drenge var der ingen signifikant effekt på g .

Konklusionen på de neuropsykologiske undersøgelser var således at tidlig prænatal pesticideksponering synes at have en negativ påvirkning af nervesystemets udvikling som er registrerbar hos pigerne, men ikke hos drengene, i 6-11 års alderen.

3.7.4 Betydning af PON1 192 genotype på neurologisk funktion

Som beskrevet tidligere var diastoliske blodtryk signifikant øget og CV_{RR} signifikant nedsat efter prænatal pesticideksponering i gruppen af børn med et eller to R-alleler i PON1 192 genet men ikke i QQ-homozygote børn. Det kunne tyde på en effekt på det autonome nervesystem i R-bærere og en øget følsomhed overfor neurotoksiske påvirkninger i forhold til QQ-homozygote. Der var imidlertid ingen signifikante forskelle mellem de to genotyper med hensyn til effekten af prænatal pesticideksponering på de øvrige neuropsykologiske funktioner testet i denne undersøgelse.

4 Diskussion

Resultaterne fra denne undersøgelse tyder på, at erhvervsmæssig eksponering for pesticider tidligt i graviditeten kan have langtidseffekter på børns vækst og udvikling.

Vi fandt en dosisrelateret effekt på børnenes kropssammensætning, så eksponerede børn akkumulerede mere fedt fra fødslen til skolealderen og derfor havde højere BMI og fedtprocent. Denne effekt blev forstærket, hvis moderen havde røget i graviditeten. Desuden var børn med et R-allel i PON1 192- genen mere sårbare overfor pesticidrelaterede effekter på kropssammensætning og blodtryk.

Hos pigerne medførte prænatal pesticideksponering tidligere brystudvikling og nedsat neuropsykologisk funktion og eksponerede drenge havde lidt mindre kønsorganer end ikke-eksponerede drenge.

Styrken ved denne undersøgelse er det longitudinale design, hvor gruppen af børn har været fulgt siden tidligt i fostertilstanden. Detaljerede oplysninger om moderens pesticideksponering, livsstil og helbred blev indhentet prospektivt på det relevante eksponeringstidspunkt tidligt i graviditeten og er derfor langt mere valide end oplysninger indhentet retrospektivt flere år efter eksponeringen har fundet sted. Opdelingen af mødrene som høj, middel eller lav/ikke pesticideksponerede, fandt sted allerede inden børnene blev født. Desuden er alle børn undersøgt af den samme læge og psykolog indenfor en begrænset tidsperiode og med standardiserede velafprøvede metoder. Hverken lægen eller psykologen kendte på undersøgelsestidspunktet til moderens eksponeringsstatus under graviditeten.

Svagheder ved undersøgelsen er antallet af børn i undersøgelsen, - især det lave antal af ueksponerede kontrolbørn, som ønskede at deltage i genundersøgelsen. Vi valgte derfor at supplere denne gruppe gennem venner og familie til dem, som allerede var med. Dette har introduceret nogle mulige fejlkilder, som vi har forsøgt at tage højde for i data-analyserne. Udover at justere for socialgruppe i analyserne, da relativt flere af de ny-rekrutterede børn tilhørte socialgruppe 1-3, har vi, når det var relevant, gentaget data-analyserne med de oprindelige kontrolbørn og de 'nye' kontrolbørn separat. I alle tilfælde fandt vi, at effekten bevægede sig i den samme retning, som når den samlede gruppe af ueksponerede kontrolbørn indgik, omend resultatet ikke opnåede statistisk signifikans på 0,05-niveau på grund af det lavere antal børn. Der er endvidere indsamlet rigtigt mange data og udført mange data-analyser og nogle fund kan derfor være tilfældige. Alle de undersøgte sammenhænge mellem pesticideksponering og effekter er dog analyseret på baggrund af hypoteser, der var opstillet på forhånd og mange af de målte effekter er biologisk relaterede. Overordnet mener vi derfor at de opnåede resultater er valide og troværdige.

Piger der prænalt blev eksponeret for pesticider fik brystudvikling 1-1½ år tidligere end de ueksponerede og en større gruppe af københavnske piger. Brystudviklingen var ikke associeret med højere serum gonadotropiner eller østradiolniveauer blandt eksponerede piger. Pigerne var ikke højere og havde heller ikke højere (faktisk lavere) IGF-I end ueksponerede, hvilket også står i kontrast til det man normalt ser ved pubertetsstart efter en centralt (hypofyse)

aktiveret pubertet. Derimod havde pigerne højere serumkoncentrationer af binyreandrogener foreneligt med adrenarche (aktivering af androgenproduktion i binyrerne). Binyreandrogner kan aromatiseres til østriol, som er biologisk aktivt og kan være årsag til den tidlige brystudvikling (thelarche). Eksponerede piger havde også lavere koncentrationer af AMH end ueksponerede (kun signifikant ved sammenligning med københavnske piger). AMH har ikke tidligere været brugt som en biomarkør for reproduktive effekter af miljøpåvirkning på ovariefunktion. AMH syntetiseres i granulosaacellerne i primære og præantrale ovariefollikler og er alment accepteret som markør for ovariel reserve hos voksne kvinder. Et nyt studie på raske piger og piger med Turner syndrome [Hagen et al., 2010] indikerer at AMH også kan bruges som markør for follikelpool i ovarier hos piger. Nedsat serum koncentration af AMH hos de eksponerede piger kan derfor være et udtryk for nedsat ovariefunktion.

Da drenge generelt går 1-1½ senere i pubertet end piger, kan vi ikke ud fra undersøgelsen sige så meget om pubertetsstart hos drengene. De eksponerede drenge havde, som i 3 måneders alderen, tendens til mindre genitalier og der var en signifikant korrelation mellem målingerne på de to alderstrin, så de drenge der var mest påvirket ved 3 måneder også var mest påvirket ved skolealderen. Der var ikke signifikante forskelle på serumkoncentrationen af kønshormoner mellem eksponerede og ueksponerede drenge ved skolealderen. Os bekendt foreligger der ikke andre undersøgelser af prænatal eksponering og genitaliers størrelse hos mennesker, men reduceret vægt af kønsorganer er ofte rapporteret, sammen med andre effekter som f.eks. nedsat ano-genital afstand, i han-afkom efter pesticideksponering i drægtighedsperioden [Blystone et al., 2007; Vinggaard et al., 2005].

De eksponerede børn havde signifikant lavere fødselsvægt også efter justering for gestationsalder. Ved skolealderen havde de eksponerede børn tendens til tykkere hudfolder og højere fedtprocent, især hvis moderen røg under graviditeten. Denne bifasiske effekt på prænatal og postnatal vækst afspejlede sig desuden i en større forskel (i) i BMI z-score fra fødsel til skolealder hos de eksponerede. Sideløbende med de mulige effekter på kropssammensætningen fandt vi mindre, men signifikante, forskelle i vækstoffaktoren IGF-I og thyroidea-stimulerende-hormon (TSH). Lav fødselsvægt efterfulgt af øget fedtakkumulering i barndommen er fundet relateret til øget risiko for fedme, insulin og leptin resistens og hjertekarsygdomme senere i livet [Baird et al., 2005; Dulloo, 2008; Ong, 2010].

Flere epidemiologiske studier har fundet en sammenhæng mellem øget BMI i barndommen og prænatal eksponering for persistente forureningsstoffer som PCBer og pesticiderne HCB og DDT [Karmaus et al., 2009; Slink et al., 2008; Mendez et al., 2010; Tang-Peronard et al., 2011], men der er ikke fundet undersøgelser vedrørende eksponering for moderne pesticider. I forsøgsdyr er der set øget vægt i afkommet efter prænatal eksponering for lave doser organofosfater [Lassiter and Brimijoin S., 2008].

Børn med PON1 192 QR/ RR genotypen havde højere blodtryk, BMI, kropsfedtprocent, hudfoldstykkelser og IGF-1 serumkoncentration i 6-11 års alderen hvis de havde været prænalt eksponeret for pesticider i forhold til ueksponerede børn. Selvom PON1-genotyper i litteraturen er fundet associeret til både pesticidtoksicitet og risiko for hjertekarsygdomme, er der os bekendt ikke andre, der har undersøgt, om pesticideksponering i samspil med PON1 kan påvirke risikoen for udvikling af hjertekarsygdomme. Dette studie

tyder på, at prænatal pesticideksponering i kombination med PON1 192 R-allelet kan øge kendte risikofaktorer for hjertekarsygdomme. Resultaterne tyder på en gen-miljøinteraktion tidligt i fostertilstanden, så pesticideksponeringen øger risikofaktorer for hjertekarsygdomme, som allerede er fundet associeret med R-allelet [Durrington et al., 2001].

Kun meget få undersøgelser har set på samspil mellem PON1-aktivitet eller genotype og pesticideksponering under graviditet. I et studie fandt man at mødre med målbare urinkoncentrationer af chlorpyrifosmetabolitter kombineret med lav maternel PON1-koncentration var associeret med nedsat hovedomfang og hovedstørrelse af børnene ved fødslen [Berkowitz et al., 2004]. Kvinder som arbejdede i blomstergartnerier i Mexico havde øget risiko for at få børn med lav fødselsvægt hvis de havde PON1 192RR genotypen end hvis de havde et eller to Q-alleler [Moreno-Banda et al., 2009]. R-allelet var betydeligt hyppigere i denne befolkning (genfrekvens på 61,4% mod ca 25% i vores kohorte). Den lavere fødselsvægt relateret til mødre med RR-genotypen stemmer med vores studie, hvor vi ser lavere fødselsvægt, hvis barnet er R-bærer.

Om PON1-enzymet kan nedbryde andre typer af pesticider end organofosfater er os bekendt endnu ikke undersøgt. Enzymet synes dog at have en meget bred substratspecificitet, specielt overfor aromatiske estere, hvorfor det synes muligt også at kunne hydrolysere f.eks. methylkarbamater og pyrethroidestere.

Selvom PON1 menes primært at beskytte mod neurotoksiske insekticider, så vi ikke i denne undersøgelse forskel på PON1 genotyper og effekter af prænatal pesticideksponering på nervesystemets udvikling hos børnene. Vi fandt derimod en kønsbetinget forskel i følsomheden, idet udviklingen af pigernes nervesystem synes at være mere sårbart end drengenes overfor eksponering for pesticider tidligt i graviditeten. Især pigernes motoriske hastighed, deres sproglige funktion samt langtidshukommelse var påvirket og en samlet analyse af alle testene indikerer en generel forringelse af pigernes intellekt.

En række af de insektmidler, der anvendes i væksthushavsgartnerier er kendte neurotoksiske stoffer. De har insekters nervesystem som det primære mål for deres effekt. Eftersom der er stor lighed mellem de kemiske processer, der foregår i nervesystemet hos insekter og pattedyr, har disse stoffer også neurotoksisk virkning på pattedyr herunder også mennesker. Således er den primære virkningsmekanisme for organofosfater og karbamater en hæmning af enzymet acetylcholinesterase (AChE) [Costa, 2006; Ecobichon, 2001]. En optimal udvikling af centralnervesystemet kræver, at en række processer finder sted indenfor en nøje kontrolleret tidsramme. Således er korrekt neuron migration styret af intercellulær kommunikation, der involverer signalstoffer som for eksempel acetylcholin. Organofosfater og karbamater, der hæmmer AChE, kan derfor påvirke disse processer og føre til permanent skade, hvis eksponeringen sker i en "sårbar periode" [Lauder, 1988; Weiss, 2000; Rice and Barone S Jr, 2000; Lauders and Schambra U. B., 1999]. Eksperimentelle studier i gnavere har således vist, at eksponering for neurotoksiske pesticider under den tidlige udvikling kan medføre blivende neurologiske skader ved doser, der er helt uskadelig for voksne forsøgsdyr [Ahlbom et al., 1995; Eriksson, 1997; Slotkin and Seidler F. J., 2005]. Det er endvidere påvist, at prænatal eksponering for selv meget lave doser af organofosfatet, chlorpyrifos, som medfører meget lille eller slet ingen målbar hæmning af AChE kan skade

nervesystemets udvikling i gnavere [Dam et al., 2000; Ricceri et al., 2003; Icenogle et al., 2004; Ricceri et al., 2006; Qiao et al., 2004]. Det er således muligt, at organofosfater også kan forårsage neurotoksicitet under hjernens udvikling via andre mekanismer end hæmning af AChE.

I en undersøgelse fra New York City fandt man en sammenhæng mellem koncentrationer af organofosfatmetabolitter i moderens urin under graviditeten og svage reflekser hos spædbørnene [Engel et al., 2007]. I Californien har man ligeledes fundet en sammenhæng mellem koncentrationen af organofosfatmetabolitter i moderens urin under graviditeten og svagere reflekser hos de nyfødte børn [Young et al., 2005]. Ved en opfølgende undersøgelse af de samme børn sås en negativ sammenhæng mellem dialkylfosfatmetabolitter i moderens urin under graviditeten og børnenes mentale udvikling i 2-års alderen [Eskenazi et al., 2007] og ved 3½ år og 5 år [Marks et al., 2010].

I en anden undersøgelse fra New York City fandt man en negativ sammenhæng mellem prænatal eksponering for chlorpyrifos og fødselsvægt og – længde [Whyatt et al., 2004b]. Da børnene blev genundersøgt som 3-årige fandt man en større andel af børn med forsinket psykomotorisk og mental udvikling i gruppen af prænatalt højt eksponerede børn sammenlignet med gruppen af lavt eksponerede børn [Rauh et al., 2006]. Ved opfølgning af disse børn som 7-årige var deres neuropsykologiske udvikling stadig påvirket [Rauh et al., 2011].

Pyrethroider er en anden type insektmidler, der anvendes hyppigt i såvel væksthushavene som i landbruget. Pyrethroidernes primære virkningsmekanisme er, at de påvirker kinetikken af de spændingsafhængige natriumkanaler i nervecellernes membraner. Disse kanaler er ansvarlige for dannelse af den indadrettede natrium-strøm, der giver anledning til aktionspotentialer [Ray and Fry J. R., 2006]. Nyfødte rotter er 4-17 gange så sårbare overfor akut forgiftning med pyrethroider som voksne rotter [Sheets et al., 1994; Cantalamessa, 1993]. Dette skyldes sandsynligvis, at nyfødte rotter har en lavere kapacitet til at metabolisere og afgifte pyrethroiderne [Sheets et al., 1994]. Det er desuden muligt, at den øgede følsomhed hos unge dyr kan skyldes, at der er forskel på de natriumkanaler, der udtrykkes på forskellige udviklingstrin, og disse kan have forskellig sensitivitet overfor pyrethroider [Shafer et al., 2005]. En række undersøgelser i gnavere har vist, at eksponering for pyrethroider under nervesystemets udvikling kan medføre blivende histokemiske og adfærdsmæssige ændringer [Ahlbom et al., 1994; Eriksson and Fredriksson A., 1991; Aziz et al., 2001; Moniz et al., 1990] [Lazarini et al., 2001; Nasuti et al., 2007] samt ændret permeabilitet af blod-hjerne barrieren [Gupta et al., 1999]. Der er netop publiceret en epidemiologisk undersøgelse, som viser at prænatal eksponering for pyrethroidet piperonyl butoxid var negativt associeret med neurologisk udvikling hos 36-måneders gamle børn mens der ikke sås effekt af permethrin [Horton et al., 2011]. Pyrethroiderne havde været brugt til insektbekæmpelse i boliger i New York City som erstatning for tidligere anvendte organofosfater.

I et antropologisk studie fra Mexico sammenlignede man to grupper af asymptomatiske 4-5 årige børn [Guillette et al., 1998]. Den gruppe, som havde været eksponeret for pesticider, klarede sig signifikant dårligere ved testning af korttidshukommelse og var dårligere til at tegne.

I to studier foretaget i Ecuador blev 7-8 årige børn, hvis mødre havde arbejdet i væksthushavestue under graviditeten, undersøgt. Der sås nedsat evne til at genkende og kopiere figurer og til at huske figurerne senere (copying recall), nedsat motorisk hastighed (fingertapping) samt højere blodtryk end hos ikke-eksponerede børn fra samme område [Grandjean et al., 2006; Harari et al., 2010]. I disse to studier blev der anvendt samme metoder som i denne follow-up undersøgelse til at undersøge børnenes neuropsykologiske funktion. Både hos de ecuadorianske børn og de danske børn, nedsatte prænatal pesticideksponering langtidshukommelse, og motorisk hastighed og øgede blodtrykket. I de ecuadorianske børn var der ikke forskel på effekterne mellem de to køn (personlig kommunikation med Grandjean) som i denne undersøgelse, hvor effekterne udelukkende ses hos pigerne. I det hele taget er der ingen af de tidligere epidemiologiske undersøgelser af prænatal pesticideksponering og neurologisk udvikling, som rapporterer om kønsforskelle i effekterne. Om det skyldes at der ikke er set kønsforskelle eller om det ikke er undersøgt i studierne vides ikke.

De fleste af ovennævnte undersøgelser har endvidere været fokuseret på neurotoksiske insekticider mens pesticideksponeringen i denne undersøgelse er bredere og måske i højere grad omfatter hormonforstyrrende svampemidler. Om dette kan være en medvirkende forklaring på forskellen i effekt mellem drenge og piger vides ikke, men i rotteforsøg har man set en feminisering af hannernes adfærd som voksne, hvis de var udsat for det antiandrogene svampemiddel prochloraz [Vinggaard et al., 2006]. Kroppens funktioner reguleres i et samspil mellem nervesystemet og det endokrine system, som samlet kaldes det neuroendokrine system. Hormonproduktionen i de endokrine kirtler reguleres via signalstoffer fra hypothalamus og hypofysen og frigivelse af disse signalstoffer tilbagereguleres ofte af hormonerne. Det er derfor tænkeligt at stoffer, som kan påvirke udviklingen af det ene system også vil have effekter på udviklingen af det andet. Desuden er pigerne i denne aldersgruppe på 6-11 år generelt længere i deres endokrine udvikling end drengene, hvilket også afspejlede sig i at flere piger end drenge var gået i pubertet.

Det kan derfor tænkes, at de effekter vi ser på pigernes neuropsykologiske funktion skyldes denne forskel i udvikling og at tilsvarende effekter ville kunne registreres hos drengene, hvis de undersøges igen, når de er blevet et par år ældre.

Til trods for de detaljerede oplysninger om mødrenes pesticideksponering i graviditeten, har det ikke været muligt at identificere specifikke aktivstoffer som årsag til de fundne effekter. Vi har bl.a. set på eksponeringsmønstre for de børn som var mest påvirkede i forskellige effektvariable, men der er ikke fundet nogen pesticider, som var specielt hyppigt anvendt i mødrenes arbejdsområder. At se på pesticidgrupper i stedet for enkeltstoffer har heller ikke givet resultat, idet stort set alle eksponerede mødre har været udsat for repræsentanter fra de forskellige pesticidgrupper. For eksempel er der anvendt organofosfater i arbejdsområdet for 91 % af de eksponerede mødre. Det er derfor sandsynligt, at effekterne skyldes kombinationer af pesticidaktivstoffer og eventuelt andre indholdsstoffer i salgsformuleringerne.

5 Konklusion

Erhvervsmæssig udsættelse for moderne ikke-persistente pesticider under graviditeten kan medføre langtidseffekter på børnenes udvikling til trods for særlige forholdsregler, der skal beskytte gravide arbejdstagere. Denne undersøgelse viser at eksponering for pesticider tidligt i graviditeten, inden kvinderne er blevet fraværsmeldt eller omplaceret, kan have effekter på børnenes vækst og kropssammensætning samt deres køns- og neuropsykologiske udvikling senere i barndommen. Selvom effekterne er relativt små, ved vi endnu ikke, om disse effekter kan have betydning for børnenes funktion og sygdomsrisiko senere i livet.

6 Perspektivering

Forskningsmæssige

1. Til trods for meget detaljerede oplysninger om eksponeringsforhold har det ikke været muligt at identificere enkelte pesticider eller bestemte pesticidgrupper som værende hovedårsagen. Udvikling af mere følsomme målemetoder til måling af pesticider i blodprøver og/eller urinprøver vil være ønskeligt

2. Andre kemikalier i salgsformuleringen (opløsningsmidler, spredemidler m.m.) kan måske være involveret og delvist forklare, hvorfor det ikke er muligt at identificere enkelte aktivstoffer. Per- og polyflourerede stoffer (PFCs) er nævnt som mulige additiver. Da disse stoffer, eller nedbrydningsprodukter af disse, er biologisk persistente, kunne det være en mulig forklaring på, at eksponering så tidligt i graviditeten kan medføre effekter. Dersom målinger af PFCs, og evt. andre relevante additiver, i blodprøver fra pesticideksponerede kvinder er højere end hos ikke-eksponerede kvinder, vil det være nærliggende at undersøge denne problemstilling yderligere.

3. Mekanismerne bag de observerede effekter er stort set ukendte. At børnene med en særlig genotype (R-allel i PON1 192 genet) er særligt sårbare overfor nogle af effekterne, gør det muligt at undersøge og sammenligne effekter på biomarkører af betydning for fedmeudvikling og øget blodtryk (fx insulin og leptin) mellem de forskellige genotyper. Ligeledes vil en dyremodel, hvor PON1 udtrykkes forskelligt kunne anvendes.

4. PON1 antages at være det vigtigste enzym i blodbanen til nedbrydning af organofosfater. Dette har særligt betydning for hudeksponering, hvor pesticiderne ikke passerer leveren før fordeling i kroppen. PON1-genotypen af mødrene kan derfor have betydning for beskyttelse af deres fostre mod pesticider. I fremtidige undersøgelser vil det derfor være relevant også at måle genotype og aktivitet hos mødrene.

5. Organofosfater er velkendte PON1-substrater. I de senere år er flere lægemidler vist også at være substrater for PON1. Mere viden om hvorvidt andre pesticider (og andre kemikalier) er PON1-substrater vil være relevant.

Reguleringsmæssige

At vi finder effekter på børnene af erhvervmæssig udsættelse for pesticider tidligt i graviditeten bør medføre overvejelser om, hvordan gravide arbejdstagere i gartneribranchen kan beskyttes bedre. Da effekterne er opstået til trods for, at kvinderne er blevet fraværsmeldt og/eller omplaceret, så snart de har erkendt deres graviditet, tyder resultaterne fra denne undersøgelse på, at disse tiltag ikke er tilstrækkelige.

Selvom nogle af de pesticider, der blev anvendt, da mødrene i denne undersøgelse var gravide (1996-2000) ikke anvendes i dag, bliver hovedparten af midlerne stadig anvendt og nye er kommet til. Fire af de aktivstoffer, som ikke anvendes aktuelt: endosulfan, deltamethrin, prochloraz og vinclozolin, har alle hormonforstyrrende egenskaber. Disse stoffer optrådte imidlertid ikke hyppigere som eksponeringer blandt børn, der synes særligt påvirkede (højeste

BMI, mindste kønsorganer, tidlig brystudvikling, nedsat motorisk hastighed) end de øvrige eksponerede børn.

Den bedste løsning vil være, at fjerne pesticider med hormonforstyrrende og neurotoksiske egenskaber. Hovedparten af de midler der anvendes er imidlertid utilstrækkeligt undersøgt for hormonforstyrrende og neurotoksiske effekter under fosterudviklingen. En nylig undersøgelse viste at 23 ud af de 37 svampemidler, der anvendes mest i EU har anti-androgene egenskaber, heraf ni som ikke tidligere var påvist at være anti-androgene. [Orton et al., 2011]. Problemet kan ikke løses ved kun at fjerne aktivstoffer, som tilfældigvis er blevet identificeret som hormonforstyrrende eller neurotoksiske. Indtil alle pesticider er bedre undersøgt for mulige effekter på hormon- og nervesystem, må der derfor findes andre løsninger.

Da de foranstaltninger der i dag anvendes for at beskytte gravide arbejdstagere ikke er tilstrækkelige, bør arbejdsmiljøet i gartnerierhvervet indrettes så alle, inklusive gravide, kan arbejde uden sundhedsmæssige risici. Dette kan muligvis opnås ved at øge tiden mellem udlægning/sprøjtning med pesticider og håndtering af behandlede planter og ophold i drivhusene kombineret med skrappe krav til og bedre vejledning om anvendelse af personlige værnemidler. Alternativt må det overvejes om den del af gartneribranchen, som anvender kemiske pesticider, er egnet til beskæftigelse af kvinder i den fertile alder.

Referencer

- Ahlbom J, Fredriksson A, Eriksson P. 1994. Neonatal exposure to a type-I pyrethroid (bioallethrin) induces dose-response changes in brain muscarinic receptors and behaviour in neonatal and adult mice. *Brain Res.* **645** 318-324.
- Ahlbom J, Fredriksson A, Eriksson P. 1995. Exposure to an organophosphate (DFP) during a defined period in neonatal life induces permanent changes in brain muscarinic receptors and behaviour in adult mice. *Brain Res.* **677** 13-19.
- Aksglaede L, Sorensen K, Petersen J H, Skakkebaek N E, Juul A. 2009. Recent decline in age at breast development: the Copenhagen Puberty Study. *Pediatrics* **123** e932-e939.
- Andersen HR, Nielsen F, Nielsen J B, Kjaerstad M B, Baelum J, Grandjean P. 2007. Xeno-oestrogenic activity in serum as marker of occupational pesticide exposure. *Occup. Environ. Med.* **64** 708-714.
- Andersen HR, Schmidt I M, Grandjean P, Jensen T K, Budtz-Jorgensen E, Kjaerstad M B, Baelum J, Nielsen J B, Skakkebaek N E, Main K M. 2008. Impaired Reproductive Development in Sons of Women Occupationally Exposed to Pesticides during Pregnancy. *Environ. Health Perspect.* **116** 566-572.
- Andersen HR, Vinggaard A M, Rasmussen T H, Gjermansen I M, Bonfeld-Jorgensen E C. 2002. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **179** 1-12.
- Apra C, Strambi M, Novelli M T, Lunghini L, Bozzi N. 2000. Biologic monitoring of exposure to organophosphorus pesticides in 195 Italian children. *Environ. Health Perspect.* **108** 521-525.
- Aziz MH, Agrawal A K, Adhami V M, Shukla Y, Seth P K. 2001. Neurodevelopmental consequences of gestational exposure (GD14-GD20) to low dose deltamethrin in rats. *Neurosci. Lett.* **300** 161-165.
- Baird J, Fisher D, Lucas P, Kleijnen J, Roberts H, Law C. 2005. Being big or growing fast: systematic review of size and growth in infancy and later obesity. *BMJ* **331** 929.
- Berkowitz GS, Wetmur J G, Birman-Deych E, Obel J, Lapinski R H, Godbold J H, Holzman I R, Wolff M S. 2004. In utero pesticide exposure, maternal paraoxonase activity, and head circumference. *Environ. Health Perspect.* **112** 388-391.
- Blystone CR, Furr J, Lambright C S, Howdeshell K L, Ryan B C, Wilson V S, LeBlanc G A, Gray L E, Jr. 2007. Prochloraz inhibits testosterone production at dosages below those that affect androgen-dependent organ weights or the onset of puberty in the male Sprague Dawley rat. *Toxicol. Sci* **97** 65-74.

- Boas M, Frederiksen H, Feldt-Rasmussen U, Skakkebaek N E, Hegedus L, Hilsted L, Juul A, Main K M. 2010. Childhood exposure to phthalates: associations with thyroid function, insulin-like growth factor I, and growth. *Environ. Health Perspect.* **118** 1458-1464.
- Boisen KA, Kaleva M, Main K M, Virtanen H E, Haavisto A M, Schmidt I M, Chellakooty M, Damgaard I N, Mau C, Reunanen M, Skakkebaek N E, Toppari J. 2004. Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two Nordic countries. *Lancet* **363** 1264-1269.
- Bravo R, Calabiano L M, Weerasekera G, Whitehead R D, Fernandez C, Needham L L, Bradman A, Barr D B. 2004. Measurement of dialkyl phosphate metabolites of organophosphorus pesticides in human urine using lyophilization with gas chromatography-tandem mass spectrometry and isotope dilution quantification. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* **14** 249-259.
- Brouwer DH, Brouwer R, Mik D G, Maas L C, Van Hemmen J J. 1992. Pesticides in the cultivation of carnations in greenhouses: Part 1 - Exposure and concomitant health risk. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **53** 575-581.
- Buck Louis GM, Gray L E, Jr., Marcus M, Ojeda S R, Pescovitz O H, Witchel S F, Sippell W, Abbott D H, Soto A, Tyl R W, Bourguignon J P, Skakkebaek N E, Swan S H, Golub M S, Wabitsch M, Toppari J, Euling S Y. 2008. Environmental factors and puberty timing: expert panel research needs. *Pediatrics* **121 Suppl 3** S192-S207.
- Budtz-Jorgensen E, Debes F, Weihe P, Grandjean P. 2010. Structural equation models for meta-analysis in environmental risk assessment. *Environmetrics.* **21** 510-527.
- Budtz-Jorgensen E, Keiding N, Grandjean P, Weihe P. 2002. Estimation of health effects of prenatal methylmercury exposure using structural equation models. *Environ. Health* **1** 2.
- Cantalamesa F. 1993. Acute toxicity of two pyrethroids, permethrin, and cypermethrin in neonatal and adult rats. *Arch. Toxicol.* **67** 510-513.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. In Atlanta, US.
- Christiansen L, Bathum L, Frederiksen H, Christensen K. 2004. Paraoxonase 1 polymorphisms and survival. *Eur. J. Hum. Genet.* **12** 843-847.
- Costa LG. 2006. Current issues in organophosphate toxicology. *Clin. Chim. Acta* **366** 1-13.
- Costa LG, Cole T B, Furlong C E. 2003. Polymorphisms of paraoxonase (PON1) and their significance in clinical toxicology of organophosphates. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **41** 37-45.
- Costa LG, Li W F, Richter R J, Shih D M, Lusi A, Furlong C E. 1999. The role of paraoxonase (PON1) in the detoxication of organophosphates and its human polymorphism. *Chem. Biol. Interact.* **119-120** 429-438.

- Curl CL, Fenske R A, Elgethun K. 2003. Organophosphorus pesticide exposure of urban and suburban preschool children with organic and conventional diets. *Environ. Health Perspect.* **111** 377-382.
- Dabrowski S, Hanke W, Polanska K, Makowiec-Dabrowska T, Sobala W. 2003. Pesticide exposure and birthweight: an epidemiological study in Central Poland. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* **16** 31-39.
- Dalgard C, Christiansen L, Jonung T, Mackness M I, de Maat M P, Horder M. 2007. No influence of increased intake of orange and blackcurrant juices and dietary amounts of vitamin E on paraoxonase-1 activity in patients with peripheral arterial disease. *Eur. J. Nutr.* **46** 354-363.
- Dam K, Seidler F J, Slotkin T A. 2000. Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-selective deficits in the development of coordination skills and locomotor activity. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **121** 179-187.
- Damgaard IN, Skakkebaek N E, Toppari J, Virtanen H E, Shen H, Schramm K W, Petersen J H, Jensen T K, Main K M. 2006. Persistent pesticides in human breast milk and cryptorchidism. *Environ. Health Perspect.* **114** 1133-1138.
- Deakin S, Leviev I, Brulhart-Meynet M C, James R W. 2003. Paraoxonase-1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: a predominant role for polymorphic position - 107, implicating the Sp1 transcription factor. *Biochem. J.* **372** 643-649.
- Deakin SP, James R W. 2004. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin. Sci (Lond)* **107** 435-447.
- Draganov DI, La Du B N. 2004. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **369** 78-88.
- Dulloo AG. 2008. Thrifty energy metabolism in catch-up growth trajectories to insulin and leptin resistance. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab* **22** 155-171.
- Dunger DB, Ahmed M L, Ong K K. 2006. Early and late weight gain and the timing of puberty. *Mol. Cell Endocrinol.* **254-255** 140-145.
- Durrington PN, Mackness B, Mackness M I. 2001. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21** 473-480.
- Ecobichon DJ. Carbamate Insecticides. In *Handbook of Pesticide Toxicology*, Krieger RI (ed). Academic Press: San Diego; pp 1087-1106.
- Engel SM, Berkowitz G S, Barr D B, Teitelbaum S L, Siskind J, Meisel S J, Wetmur J G, Wolff M S. 2007. Prenatal organophosphate metabolite and organochlorine levels and performance on the Brazelton Neonatal Behavioral Assessment Scale in a multiethnic pregnancy cohort. *Am. J. Epidemiol.* **165** 1397-1404.
- Eriksson P. 1997. Developmental neurotoxicity of environmental agents in the neonate. *Neurotoxicology.* **18** 719-726.

- Eriksson P, Fredriksson A. 1991. Neurotoxic effects of two different pyrethroids, bioallethrin and deltamethrin, on immature and adult mice: changes in behavioral and muscarinic receptor variables. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **108** 78-85.
- Eskenazi B, Marks A R, Bradman A, Harley K, Barr D B, Johnson C, Morga N, Jewell N P. 2007. Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in young Mexican-American children. *Environ. Health Perspect.* **115** 792-798.
- Euling SY, Herman-Giddens M E, Lee P A, Selevan S G, Juul A, Sorensen T I, Dunkel L, Himes J H, Teilmann G, Swan S H. 2008. Examination of US puberty-timing data from 1940 to 1994 for secular trends: panel findings. *Pediatrics* **121 Suppl 3** S172-S191.
- Frederiksen H, Jorgensen N, Andersson A M. 2010. Correlations between phthalate metabolites in urine, serum, and seminal plasma from young Danish men determined by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **34** 400-410.
- Garcia-Rodriguez J, Garcia-Martin M, Nogueras-Ocana M, de Dios Luna-del-Castillo, Espigares G M, Olea N, Lardelli-Claret P. 1996. Exposure to pesticides and cryptorchidism: geographical evidence of a possible association. *Environ. Health Perspect.* **104** 1090-1095.
- Golub MS, Collman G W, Foster P M, Kimmel C A, Rajpert-De M E, Reiter E O, Sharpe R M, Skakkebaek N E, Toppari J. 2008. Public health implications of altered puberty timing. *Pediatrics* **121 Suppl 3** S218-S230.
- Grandjean P. 2007. Methylmercury toxicity and functional programming. *Reprod. Toxicol.* **23** 414-420.
- Grandjean P, Harari R, Barr D B, Debes F. 2006. Pesticide exposure and stunting as independent predictors of neurobehavioral deficits in Ecuadorian school children. *Pediatrics* **117** e546-e556.
- Grandjean P, Landrigan P J. 2006. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* **368** 2167-2178.
- Grandjean P, Weihe P, White R F, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, Sorensen N, Dahl R, Jorgensen P J. 1997. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol. Teratol.* **19** 417-428.
- Guillette EA, Conard C, Lares F, Aguilar M G, McLachlan J, Guillette L J, Jr. 2006. Altered breast development in young girls from an agricultural environment. *Environ. Health Perspect.* **114** 471-475.
- Guillette EA, Meza M M, Aquilar M G, Soto A D, Garcia I E. 1998. An anthropological approach to the evaluation of preschool children exposed to pesticides in Mexico. *Environ. Health Perspect.* **106** 347-353.
- Gupta A, Agarwal R, Shukla G S. 1999. Functional impairment of blood-brain barrier following pesticide exposure during early development in rats. *Hum. Exp. Toxicol.* **18** 174-179.

- Hagen CP, Aksglaede L, Sorensen K, Main K M, Boas M, Cleemann L, Holm K, Gravholt C H, Andersson A M, Pedersen A T, Petersen J H, Linneberg A, Kjaergaard S, Juul A. 2010. Serum levels of anti-Mullerian hormone as a marker of ovarian function in 926 healthy females from birth to adulthood and in 172 Turner syndrome patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **95** 5003-5010.
- Hanke W, Romitti P, Fuortes L, Sobala W, Mikulski M. 2003. The use of pesticides in a Polish rural population and its effect on birth weight. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **76** 614-620.
- Harari R, Julvez J, Murata K, Barr D, Bellinger D C, Debes F, Grandjean P. 2010. Neurobehavioral deficits and increased blood pressure in school-age children prenatally exposed to pesticides. *Environ. Health Perspect.* **118** 890-896.
- Heindel JJ, vom Saal F S. 2009. Role of nutrition and environmental endocrine disrupting chemicals during the perinatal period on the aetiology of obesity. *Mol. Cell Endocrinol.* **304** 90-96.
- Heudorf U, Angerer J, Drexler H. 2004. Current internal exposure to pesticides in children and adolescents in Germany: urinary levels of metabolites of pyrethroid and organophosphorus insecticides. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **77** 67-72.
- Horton MK, Rundle A, Camann D E, Barr D B, Rauh V A, Whyatt R M. 2011. Impact of Prenatal Exposure to Piperonyl Butoxide and Permethrin on 36-Month Neurodevelopment. *Pediatrics*
- Huen K, Harley K, Brooks J, Hubbard A, Bradman A, Eskenazi B, Holland N. 2009. Developmental changes in PON1 enzyme activity in young children and effects of PON1 polymorphisms. *Environ. Health Perspect.* **117** 1632-1638.
- Icenogle LM, Christopher N C, Blackwelder W P, Caldwell D P, Qiao D, Seidler F J, Slotkin T A, Levin E D. 2004. Behavioral alterations in adolescent and adult rats caused by a brief subtoxic exposure to chlorpyrifos during neurulation. *Neurotoxicol. Teratol.* **26** 95-101.
- Illing HPA. 1997. The management of pesticide exposure in greenhouses. *Indoor and Built Environment* **6** 254-263.
- Jayatilaka NK, Angela M M, Whitehead R D, Jr., Schloth S J, Needham L L, Barr D B. 2010. High-Throughput Sample Preparation for the Quantitation of Acephate, Methamidophos, Omethoate, Dimethoate, Ethylenethiourea, and Propylenethiourea in Human Urine Using 96-Well-Plate Automated Extraction and High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Arch. Environ. Contam Toxicol.*
- Juul A, Teilmann G, Scheike T, Hertel N T, Holm K, Laursen E M, Main K M, Skakkebaek N E. 2006. Pubertal development in Danish children: comparison of recent European and US data. *Int. J. Androl* **29** 247-255.
- Karmaus W, Osuch J R, Eneli I, Mudd L M, Zhang J, Mikucki D, Haan P, Davis S. 2009. Maternal levels of dichlorodiphenyl-dichloroethylene (DDE)

- may increase weight and body mass index in adult female offspring. *Occup. Environ. Med.* **66** 143-149.
- Kristensen P, Irgens L M, Andersen A, Bye A S, Sundheim L. 1997. Birth defects among offspring of Norwegian farmers, 1967-1991. *Epidemiology.* **8** 537-544.
- Laier P, Metzdorff S B, Borch J, Hagen M L, Hass U, Christiansen S, Axelstad M, Kledal T, Dalgaard M, McKinnell C, Brokken L J, Vinggaard A M. 2006. Mechanisms of action underlying the antiandrogenic effects of the fungicide prochloraz. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **213** 160-171.
- Lassiter TL, Brimijoin S. 2008. Rats gain excess weight after developmental exposure to the organophosphorothionate pesticide, chlorpyrifos. *Neurotoxicol. Teratol.* **30** 125-130.
- Lassiter TL, Ryde I T, Levin E D, Seidler F J, Slotkin T A. 2010. Neonatal exposure to parathion alters lipid metabolism in adulthood: Interactions with dietary fat intake and implications for neurodevelopmental deficits. *Brain Res. Bull.* **81** 85-91.
- Lassiter TL, Ryde I T, Mackillop E A, Brown K K, Levin E D, Seidler F J, Slotkin T A. 2008. Exposure of neonatal rats to parathion elicits sex-selective reprogramming of metabolism and alters the response to a high-fat diet in adulthood. *Environ Health Perspect.* **116** 1456-1462.
- Lauder JM. 1988. Neurotransmitters as morphogens. *Prog. Brain Res.* **73** 365-387.
- Lauder JM, Schambra U B. 1999. Morphogenetic roles of acetylcholine. *Environ. Health Perspect.* **107** Suppl 1 65-69.
- Lawlor DA, Bor W, O'Callaghan M J, Williams G M, Najman J M. 2005. Intrauterine growth and intelligence within sibling pairs: findings from the Mater-University study of pregnancy and its outcomes. *J. Epidemiol. Community Health* **59** 279-282.
- Lazarini CA, Florio J C, Lemonica I P, Bernardi M M. 2001. Effects of prenatal exposure to deltamethrin on forced swimming behavior, motor activity, and striatal dopamine levels in male and female rats. *Neurotoxicol. Teratol.* **23** 665-673.
- Levario-Carrillo M, Amato D, Ostrosky-Wegman P, Gonzalez-Horta C, Corona Y, Sanin L H. 2004. Relation between pesticide exposure and intrauterine growth retardation. *Chemosphere* **55** 1421-1427.
- Li AA, Baum M J, McIntosh L J, Day M, Liu F, Gray L E, Jr. 2008. Building a scientific framework for studying hormonal effects on behavior and on the development of the sexually dimorphic nervous system. *Neurotoxicology* **29** 504-519.
- Mackness B, Durrington P N, Mackness M I. 1998. Human serum paraoxonase. *Gen. Pharmacol.* **31** 329-336.
- Mackness M I, Harty D, Bhatnagar D, Winocour P H, Arrol S, Ishola M, Durrington P N. 1991. Serum paraoxonase activity in familial

hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* **86** 193-199.

Mackness MI, Mackness B, Durrington P N. 2002. Paraoxonase and coronary heart disease. *Atheroscler. Suppl* **3** 49-55.

Marks AR, Harley K, Bradman A, Kogut K, Barr D B, Johnson C, Calderon N, Eskenazi B. 2010. Organophosphate pesticide exposure and attention in young Mexican-American children: the CHAMACOS study. *Environ Health Perspect.* **118** 1768-1774.

Marsal K, Persson P H, Larsen T, Lilja H, Selbing A, Sultan B. 1996. Intrauterine growth curves based on ultrasonically estimated foetal weights. *Acta Paediatr.* **85** 843-848.

Marshall WA, Tanner J M. 1969. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch. Dis. Child* **44** 291-303.

Mendez MA, Garcia-Esteban R, Guxens M, Vrijheid M, Kogevinas M, Goni F, Fochs S, Sunyer J. 2010. Prenatal Organochlorine Compound Exposure, Rapid Weight Gain and Overweight in Infancy. *Environ. Health Perspect.*

Miller MD, Crofton K M, Rice D C, Zoeller R T. 2009. Thyroid-disrupting chemicals: interpreting upstream biomarkers of adverse outcomes. *Environ. Health Perspect.* **117** 1033-1041.

Moniz AC, Bernardi M M, Souza-Spinosa H S, Palermo-Neto J. 1990. Effects of exposure to a pyrethroid insecticide during lactation on the behavior of infant and adult rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **23** 45-48.

Moreno-Banda G, Blanco-Munoz J, Lacasana M, Rothenberg S J, Aguilar-Garduno C, Gamboa R, Perez-Mendez O. 2009. Maternal exposure to floricultural work during pregnancy, PON1 Q192R polymorphisms and the risk of low birth weight. *Sci. Total Environ.* **407** 5478-5485.

Murata K, Weihe P, Budtz-Jorgensen E, Jorgensen P J, Grandjean P. 2004. Delayed brainstem auditory evoked potential latencies in 14-year-old children exposed to methylmercury. *J. Pediatr.* **144** 177-183.

Murata K, Weihe P, Renzoni A, Debes F, Vasconcelos R, Zino F, Araki S, Jorgensen P J, White R F, Grandjean P. 1999. Delayed evoked potentials in children exposed to methylmercury from seafood. *Neurotoxicol. Teratol.* **21** 343-348.

Nasuti C, Gabbianelli R, Falcioni M L, Di S A, Sozio P, Cantalamessa F. 2007. Dopaminergic system modulation, behavioral changes, and oxidative stress after neonatal administration of pyrethroids. *Toxicology* **229** 194-205.

Nielsen E, Thorup I, Schnipper A, Hass U, Meyer O, Ladefoged O, Larsen J C, Østergaard G. 2001. *Children and the unborn child: exposure and susceptibility to chemical substances - an evaluation*. The Institute of Food Safety and Toxicology, Danish Veterinary and Food Administration: Denmark.

Nielsen JB, Andersen H R. 2002. Cholinesterase activity in female greenhouse workers - Influence of work practices and use of oral contraceptives. *Journal of Occupational Health* **44** 234-239.

Nysom K, Molgaard C, Hutchings B, Michaelsen K F. 2001. Body mass index of 0 to 45-y-old Danes: reference values and comparison with published European reference values. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **25** 177-184.

Olsson AO, Baker S E, Nguyen J V, Romanoff L C, Udunka S O, Walker R D, Flemmen K L, Barr D B. 2004. A liquid chromatography--tandem mass spectrometry multiresidue method for quantification of specific metabolites of organophosphorus pesticides, synthetic pyrethroids, selected herbicides, and deet in human urine. *Anal. Chem.* **76** 2453-2461.

Ong KK. 2010. Early Determinants of Obesity. *Endocr. Dev.* **19** 53-61.

Orton F, Rosivatz E, Scholze M, Kortenkamp A. 2011. Widely Used Pesticides with Previously Unknown Endocrine Activity Revealed as in Vitro Anti-Androgens. *Environ. Health Perspect.*

Qiao D, Seidler F J, breu-Villaca Y, Tate C A, Cousins M M, Slotkin T A. 2004. Chlorpyrifos exposure during neurulation: cholinergic synaptic dysfunction and cellular alterations in brain regions at adolescence and adulthood. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **148** 43-52.

Rauh V, Arunajadai S, Horton M, Perera F, Hoepner L, Barr D B, Whyatt R. 2011. 7-Year Neurodevelopmental Scores and Prenatal Exposure to Chlorpyrifos, a Common Agricultural Pesticide. *Environ. Health Perspect.*

Rauh VA, Garfinkel R, Perera F P, Andrews H F, Hoepner L, Barr D B, Whitehead R, Tang D, Whyatt R W. 2006. Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Pediatrics* **118** e1845-e1859.

Ray DE, Fry J R. 2006. A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacol. Ther.* **111** 174-193.

Ricceri L, Markina N, Valanzano A, Fortuna S, Cometa M F, Meneguz A, Calamandrei G. 2003. Developmental exposure to chlorpyrifos alters reactivity to environmental and social cues in adolescent mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **191** 189-201.

Ricceri L, Venerosi A, Capone F, Cometa M F, Lorenzini P, Fortuna S, Calamandrei G. 2006. Developmental neurotoxicity of organophosphorous pesticides: fetal and neonatal exposure to chlorpyrifos alters sex-specific behaviors at adulthood in mice. *Toxicol. Sci.* **93** 105-113.

Rice D, Barone S Jr. 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* **108 Suppl 3** 511-533.

Richter RJ, Furlong C E. 1999. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* **9** 745-753.

Robertson GS. 1967. Serum protein and cholinesterase changes in association with contraceptive pills. *Lancet* **1** 232-235.

Sagiv SK, Tolbert P E, Altshul L M, Korrick S A. 2007. Organochlorine exposures during pregnancy and infant size at birth. *Epidemiology* **18** 120-129.

- Seo D, Goldschmidt-Clermont P. 2009. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **11** 182-187.
- Shafer TJ, Meyer D A, Crofton K M. 2005. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environ. Health Perspect.* **113** 123-136.
- Sharpe RM. 2006. Perinatal determinants of adult testis size and function. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **91** 2503-2505.
- Sheets LP, Doherty J D, Law M W, Reiter L W, Crofton K M. 1994. Age-dependent differences in the susceptibility of rats to deltamethrin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **126** 186-190.
- Slaughter MH, Lohman T G, Boileau R A, Horswill C A, Stillman R J, Van Loan M D, Bembien D A. 1988. Skinfold equations for estimation of body fatness in children and youth. *Hum. Biol.* **60** 709-723.
- Slotkin TA, Seidler F J. 2005. The alterations in CNS serotonergic mechanisms caused by neonatal chlorpyrifos exposure are permanent. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **158** 115-119.
- Smink A, Ribas-Fito N, Garcia R, Torrent M, Mendez M A, Grimalt J O, Sunyer J. 2008. Exposure to hexachlorobenzene during pregnancy increases the risk of overweight in children aged 6 years. *Acta Paediatr.*
- Tang-Peronard JL, Andersen H R, Jensen T K, Heitmann B L. 2011. Endocrine-disrupting chemicals and obesity development in humans: a review. *Obes. Rev.* **12** 622-636.
- Taxvig C, Hass U, Axelstad M, Dalgaard M, Boberg J, Andersen H R, Vinggaard A M. 2007. Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicol. Sci.* **100** 464-473.
- Tomova A, Deepinder F, Robeva R, Lalabonova H, Kumanov P, Agarwal A. 2010. Growth and development of male external genitalia: a cross-sectional study of 6200 males aged 0 to 19 years. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **164** 1152-1157.
- Vinggaard AM, Christiansen S, Laier P, Poulsen M E, Breinholt V, Jarfelt K, Jacobsen H, Dalgaard M, Nellemann C, Hass U. 2005. Perinatal exposure to the fungicide prochloraz feminizes the male rat offspring. *Toxicol. Sci.* **85** 886-897.
- Vinggaard AM, Hass U, Dalgaard M, Andersen H R, Bonefeld-Jorgensen E, Christiansen S, Laier P, Poulsen M E. 2006. Prochloraz: an imidazole fungicide with multiple mechanisms of action. *Int. J. Androl* **29** 186-192.
- Weidner IS, Moller H, Jensen T K, Skakkebaek N E. 1998. Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. *Environ. Health Perspect.* **106** 793-796.
- Weihe P, Hansen J C, Murata K, Debes F, Jorgensen P, Steuerwald U, White R F, Grandjean P. 2002. Neurobehavioral performance of Inuit children with increased prenatal exposure to methylmercury. *Int. J. Circumpolar. Health* **61** 41-49.

Weiss B. 2000. Vulnerability of children and the developing brain to neurotoxic hazards. *Environ. Health Perspect.* **108 Suppl 3** 375-381.

Wheeler JG, Keavney B D, Watkins H, Collins R, Danesh J. 2004. Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet* **363** 689-695.

Whyatt RM, Rauh V, Barr D B, Camann D E, Andrews H F, Garfinkel R, Hoepner L A, Diaz D, Dietrich J, Reyes A, Tang D, Kinney P L, Perera F P. 2004a. Prenatal insecticide exposures and birth weight and length among an urban minority cohort. *Environ. Health Perspect.* **112** 1125-1132.

Whyatt RM, Rauh V, Barr D B, Camann D E, Andrews H F, Garfinkel R, Hoepner L A, Diaz D, Dietrich J, Reyes A, Tang D, Kinney P L, Perera F P. 2004b. Prenatal insecticide exposures and birth weight and length among an urban minority cohort. *Environ. Health Perspect.* **112** 1125-1132.

Wohlfahrt-Veje C, Main K M, Schmidt I M, Boas M, Jensen T K, Grandjean P, Skakkebaek N E, Andersen H R. 2011. Lower birth weight and increased body fat at school age in children prenatally exposed to modern pesticides: A prospective study. *Environ Health* **10** 79.

Young JG, Eskenazi B, Gladstone E A, Bradman A, Pedersen L, Johnson C, Barr D B, Furlong C E, Holland N T. 2005. Association between in utero organophosphate pesticide exposure and abnormal reflexes in neonates. *Neurotoxicology* **26** 199-209.

Resumé

Formålet med projektet var at undersøge, om kvinders udsættelse for pesticider ved at arbejde i væksthushavener tidligt i graviditeten kan påvirke børnenes vækst og udvikling i skolealderen. Vi fandt en sammenhæng mellem mødrenes pesticideksponering og børnenes BMI og fedtindhold i kroppen. Denne sammenhæng var forstærket, hvis moderen havde røget i graviditeten. Desuden var børn med en bestemt genotype mere sårbare overfor pesticidrelaterede effekter på kropssammensætning og blodtryk. Hos piger fandt vi tidligere brystudvikling og hos drenge lidt mindre kønsorganer, hvis mødre havde været udsat for pesticider. Endelig var mødrenes udsættelse for pesticider relateret til en negativ påvirkning af nervesystemets udvikling, som var registrerbar hos pigerne, men ikke hos drengene.



Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

Strandgade 29
DK - 1401 København K
Tlf.: (+45) 72 54 40 00

www.mst.dk