

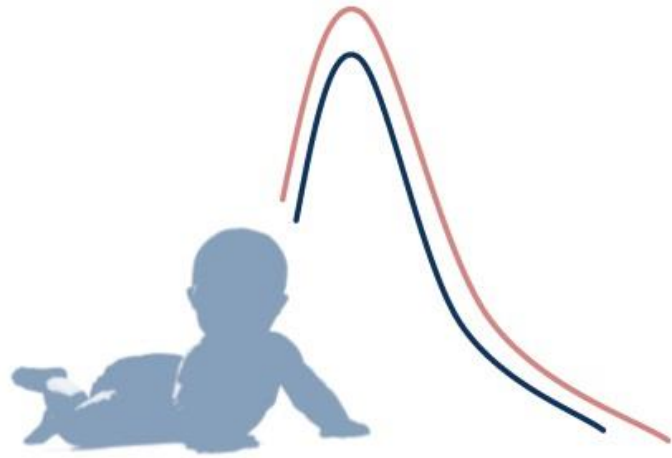


# Spædbørn og deres forældres udsættelse for hormonforstyrrende stoffer

Hanne Frederiksen

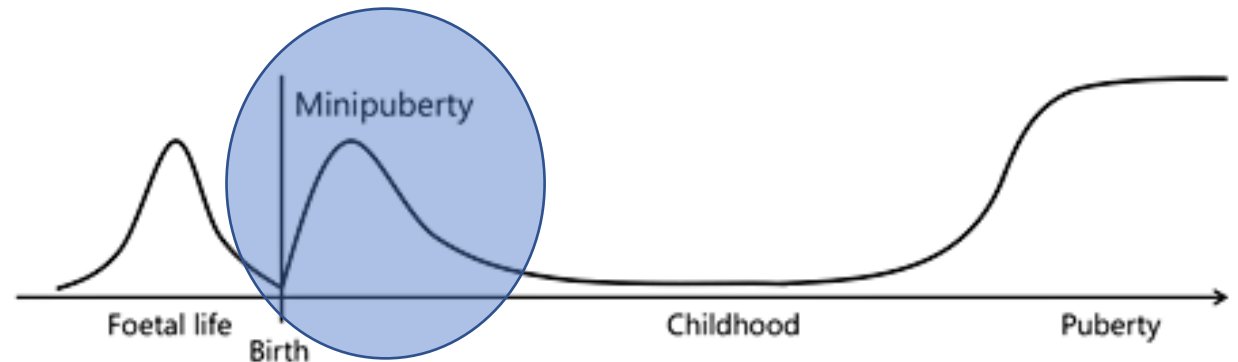
Afdeling for Vækst og Reproduktion, Rigshospitalet

Center for Hormonforstyrrende Stoffer, Informationsdag 23. marts 2023



# COPENHAGEN Minipuberty Study

## Det Københavnske minipubertets studie



Kuiri-Hänninen et al. Horm Res Paediatr 2014

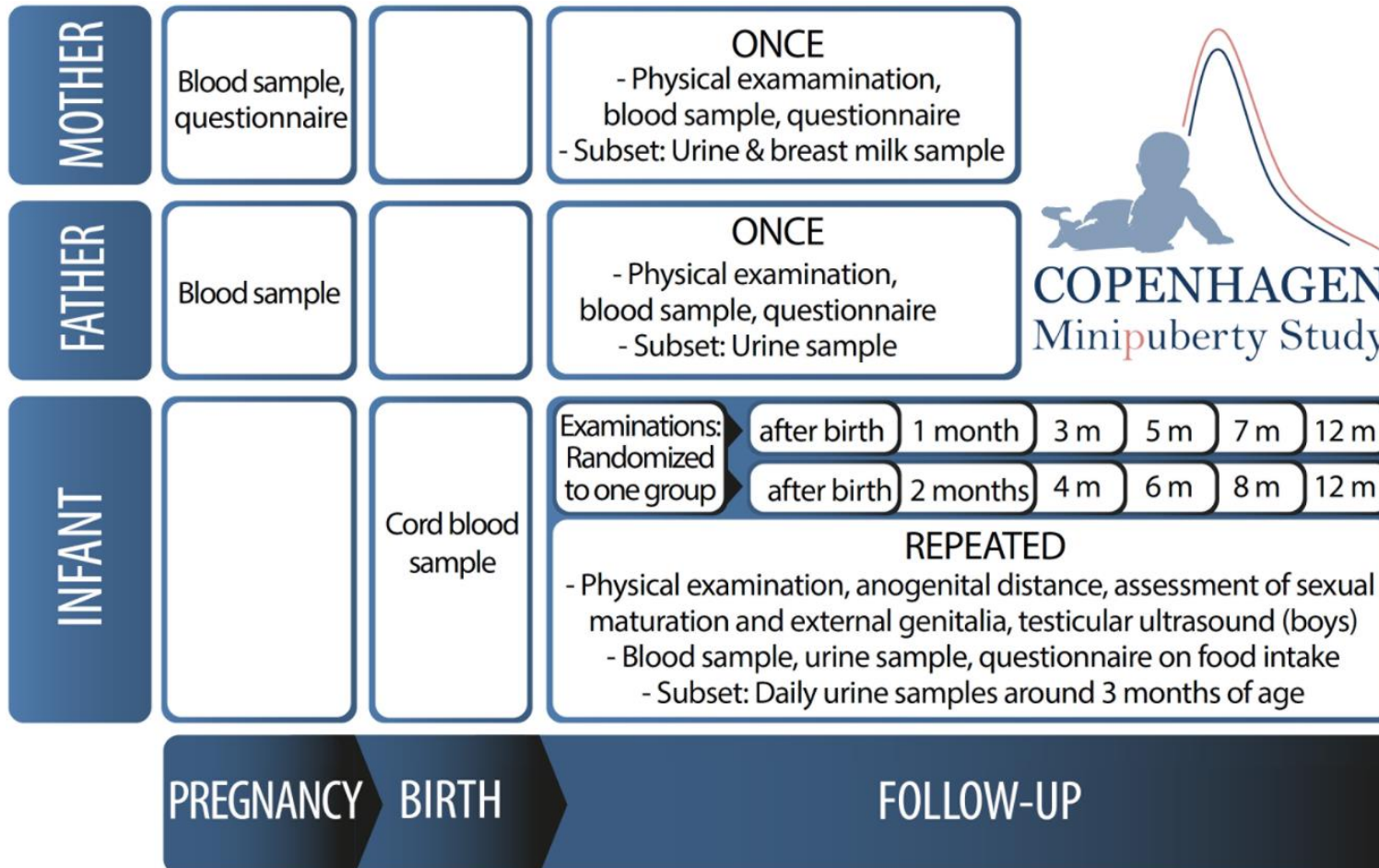
- Minipubertet optræder i 1-3 måneders alderen
- Niveaueet af bl.a. kønshormoner stiger
- Pubertets lignende tegn: bumser, brystudvikling mm



- **Hvorfor har spædbørn minipubertet?**
- **Hvad betyder minipuberteten?**

# Studie design

- Longitudinel observations studie gennemført 2016-2019
- 233 raske spædbørn deltog fra fødslen
- 6 undersøgelser gennem det første leveår
- 186 børn deltog helt til sidste undersøgelse (ca 1 år)





## Barn ved hver undersøgelse

- Højde
- Vægt
- Fedtfolder
- Anogenital distance
- Ultralydsscan af ovarier og testikler
- Blodprøve
- Urinprøve
- Spørgeskema om amning og kost

## Forældre (en gang)

- Spørgeskema og graviditets data
- Højde
- Vægt
- Blodprøve før og efter fødsel
- brystmælk
- Urinprøve

## Cohort profile: The COPENHAGEN Minipuberty Study—A longitudinal prospective cohort of healthy full-term infants and their parents

Alexander Siegfried Busch<sup>1,2</sup>  | Marie Lindhardt Ljubcic<sup>1,2</sup> | Emmie N. Upners<sup>1,2</sup> | Margit Bistrup Fischer<sup>1,2</sup> | Nanna Kolby<sup>1,2</sup> | Camilla Eckert-Lind<sup>1,2</sup> | Kirstine Jespersen<sup>1,2</sup> | Anna-Maria Andersson<sup>1</sup> | Hanne Frederiksen<sup>1,2</sup> | Trine Holm Johannsen<sup>1,2</sup> | Hanne Kristine Hegaard<sup>3,4</sup> | Heidi Sharif<sup>3</sup> | Casper P. Hagen<sup>1,2</sup> | Anders Juul<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Growth and Reproduction, Copenhagen University Hospital - Rigshospitalet, Copenhagen O, Denmark

<sup>2</sup>International Center for Research and Research Training in Endocrine Disruption of Male Reproduction and Child Health (EDMaRC), Copenhagen University Hospital - Rigshospitalet, Copenhagen O, Denmark

### Abstract

**Background:** The hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis governs sexual maturation and reproductive function in humans. In early postnatal life, it is transiently active during which circulating sex steroids reach adult levels. While this so-called minipuberty represents a universal phenomenon in infants of both sexes, its role for early maturation and growth remains incompletely understood.

Ljubcic ML, Madsen A, Upners EN, Fischer MB, Busch AS, Frederiksen H, Johannsen TH, Juul A, Hagen CP. **Longitudinal evaluation of breast tissue in healthy infants: Prevalence and relation to reproductive hormones and growth factors.** *Front Endocrinol.* 2022 PMID: PMC9751745.

Ljubcic ML, Busch AS, Upners EN, Fischer MB, Petersen JH, Raket LL, Frederiksen H, Johannsen TH, Juul A, Hagen CP. **A Biphasic Pattern of Reproductive Hormones in Healthy Female Infants: The COPENHAGEN Minipuberty Study.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2022 PMID: 35704034.

Ljubcic ML, Busch AS, Upners EN, Fischer MB, Main KM, Andersson AM, Johannsen TH, Hagen CP, Juul A. **Dynamic changes in LH/FSH ratios in infants with normal sex development.** *Eur J Endocrinol.* 2022 PMID: 35521767.

Busch AS, Ljubcic ML, Upners EN, Fischer MB, Raket LL, Frederiksen H, Albrethsen J, Johannsen TH, Hagen CP, Juul A. **Dynamic Changes of Reproductive Hormones in Male Minipuberty: Temporal Dissociation of Leydig and Sertoli Cell Activity.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2022 PMID: 35225342.

Upners EN, Ljubcic ML, Busch AS, Fischer MB, Almstrup K, Petersen JH, Jensen RB, Hagen CP, Juul A. **Dynamic Changes in Serum IGF-I and Growth During Infancy: Associations to Body Fat, Target Height, and PAPA2 Genotype.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2022 PMID: 34476481.

Fischer MB, Ljubcic ML, Hagen CP, Thankamony A, Ong K, Hughes I, Jensen TK, Main KM, Petersen JH, Busch AS, Upners EN, Sathyanarayana S, Swan SH, Juul A. **Anogenital Distance in Healthy Infants: Method-, Age- and Sex-related Reference Ranges.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2020 PMID: PMC7368455.

# MiniPub Trio studiet

## Formål:

- At undersøge eksponeringen for phthalater og substitutter, samt UV filtre (benzophenoner), bisphenoler og andre phenoler hos spædbørn og deres forældre.
- At undersøge om eksponering i familier (mødre, fædre og børn) kan associeres?

## Materiale:

- MiniPub Trio: Urinprøver fra 142 spædbørn (ialt 211 prøver), 127 mødre og 118 fædre

## Metode:

- Kemisk analyse af urinprøver vha. LC-MS/MS



Phthalater er  
plastblødgørende stoffer  
i industrielle produkter



Phthalate diesters and phthalate substitutes and their metabolites				
	Phthalate diester		Human urine metabolite	
<b>Phthalates</b>				
	Di-methyl phthalate	DMP	Mono-methyl phthalate	MMP
	Di-ethyl phthalate	DEP	Mono-ethyl phthalate	MEP
	Di-iso-propyl phthalate	DiPrP	Mono-iso-propyl phthalate	MiPrP
	Di-n-propyl phthalate	DPrP	Mono-propyl phthalate	MPrP
	Di-iso-butyl phthalate	DiBP	Mono-iso-butyl phthalate	MiBP
	Di-n-butyl phthalate	DnBP	Mono-n-butyl phthalate	MnBP
			Mono-(3-hydroxybutyl) phthalate	MHBP
	Butylbenzyl phthalate	BBzP	Mono-benzyl phthalate	MBzP
	Di-n-pentyl phthalate	DnPeP	Mono-n-pentyl phthalate	MnPeP
			Mono-(4-hydroxypentyl) phthalate	MHPeP
	Di-(2-ethyl-hexyl) phthalate	DEHP	Mono-(2-ethyl-hexyl) phthalate	MEHP
			Mono-(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate	MEHHP
			Mono-(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate	MEOHP
			Mono-(2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate	MECPP
			Mono-(2-carboxymethyl-hexyl) phthalate	MCMHP
	Di-n-hexyl phthalate	DnHP	Mono-n-hexyl phthalate	MHxP
			Mono-(5-hydroxyhexyl) phthalate	MHHxP
			Mono-(5-carboxypentyl) phthalate	MCPeP
	Di-cyclohexyl phthalate	DCHP	Mono-cyclohexyl phthalate	MCHP
	Di-n-heptyl phthalate	DnHpP	Mono-n-heptyl phthalate	MHpP
			Mono-(6-hydroxyheptyl) phthalate	MHHpP
			Mono-(6-carboxyl-hexyl) phthalate	MCHpP
	Di-octyl phthalate	DnOP	Mono-n-octyl phthalate	MnOP
			Mono-(3-carboxy-nonyl) phthalate	MCPP*
	Di-iso-nonyl phthalate	DiNP	Mono-iso-nonyl phthalate	MiNP
			Mono-hydroxy-iso-nonyl phthalate	MHiNP
			Mono-oxo-iso-nonyl phthalate	MOiNP
			Mono-carboxy-iso-octyl phthalate	MCIOP
	Di-iso-decylphthalate	DiDP	Mono-iso-decyl phthalate	MiDP
			Mono-(9-hydroxydecyl) phthalate	MHiDP
			Mono-(9-oxodecyl) phthalate	MOiDP
			Mono-(9-carboxynonyl) phthalate	MCIiNP
<b>Phthalate substitutes</b>				
	Di-2-ethylhexyl terephthalate	DEHTP	Mono-(2-ethyl-5-hydroxy-hexyl) terephthalate	MEHHTP
			Mono-(2-ethyl-5-oxo-hexyl) terephthalate	MEOHTP
			Mono-(2-ethyl-5-caboxyl-pentyl) terephthalate	MECPTP
			Mono-(2-caboxyl-methyl-hexyl) terephthalate	MCMHTP
	Di-iso-nonyl-cyclohexane-1,2-dicarboxylate	DINCH	Cyclohexane-1,2-dicarboxylate-mono-(hydroxyl-iso-nonyl) ester	MHiNCH
			Cyclohexane-1,2-dicarboxylate-mono-(carboxy-iso-octyl) ester	MCIoCH

\* MCPP is the major metabolite of DnOP but are not specific for DnOP

**32 metabolitter fra 15 phthalater  
og  
6 metabolitter fra 2 phthalat substitutter  
(DINCH og DEHTP)**

# 7 UV-filtre, 7 bisphenoler og 7 andre phenoler

UV filters	
Benzophenone	BP
Benzophenone-1	BP-1
Benzophenone-2	BP-2
Benzophenone-3 (oxobenzone)	BP-3
Benzophenone-7 (5-chloro-2-hydroxybenzophenone)	BP-7
4-hydroxy-benzophenone	4-HBP
4-methyl-benzophenone	4-MBP
Bisphenols	
Bisphenol A (2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane)	BPA
Bisphenol S (4,4'-Sulfonyldiphenol)	BPS
Bisphenol F (4,4'-Methylenediphenol)	BPF
Bisphenol AF (4,4'-(Hexafluoroisopropylidene)diphenol)	BPAF
Bisphenol E (1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)ethane)	BPE
Bisphenol C (2,2-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane)	BPC
Bisphenol G (2,2-Bis(4-hydroxy-3-isopropylphenyl)propane)	BPG
Bisphenol PG (1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-1,1diphenylmethane)	BPBP
Other substances	
Triclosan	TCS
Triclocarban	TCC
2,4-Dichlorophenol	2,4-DCP
2,5-Dichlorophenol	2,5-DCP
2,4,5-Trichlorophenol	2,4,5-TCP
2-Phenylphenol	2-PP
4-Phenylphenol	4-PP

UV-filtre og absorbere



Polykarbonat og epoxy-resin



Anti-mikrobielle konserveringsmidler



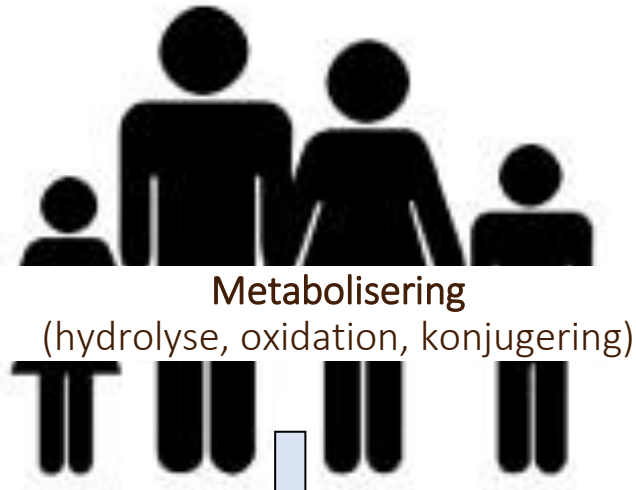
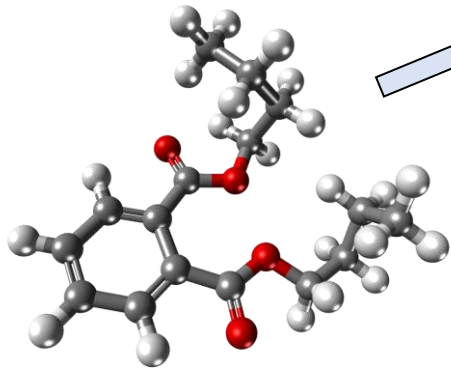
Pesticider og intermediater i organisk syntese



Fungicider

# Human Biomonitoring

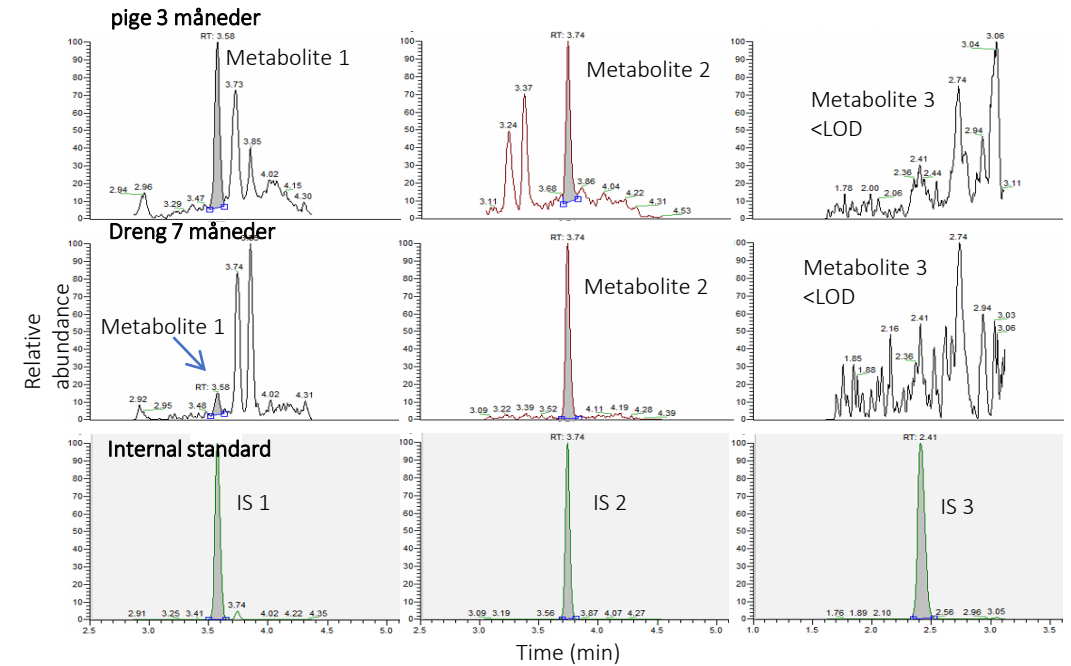
Eksponering ved  
indtag, indånding eller hudkontakt



Metabolitter udskilles i urin (4-24 timer)



**Spoturin (ng/mL)**  
Første morgenurin (ng/mL)  
24 timers urin ( $\mu\text{g}/24\text{t}$ )



# Trio studiet - Phthalater

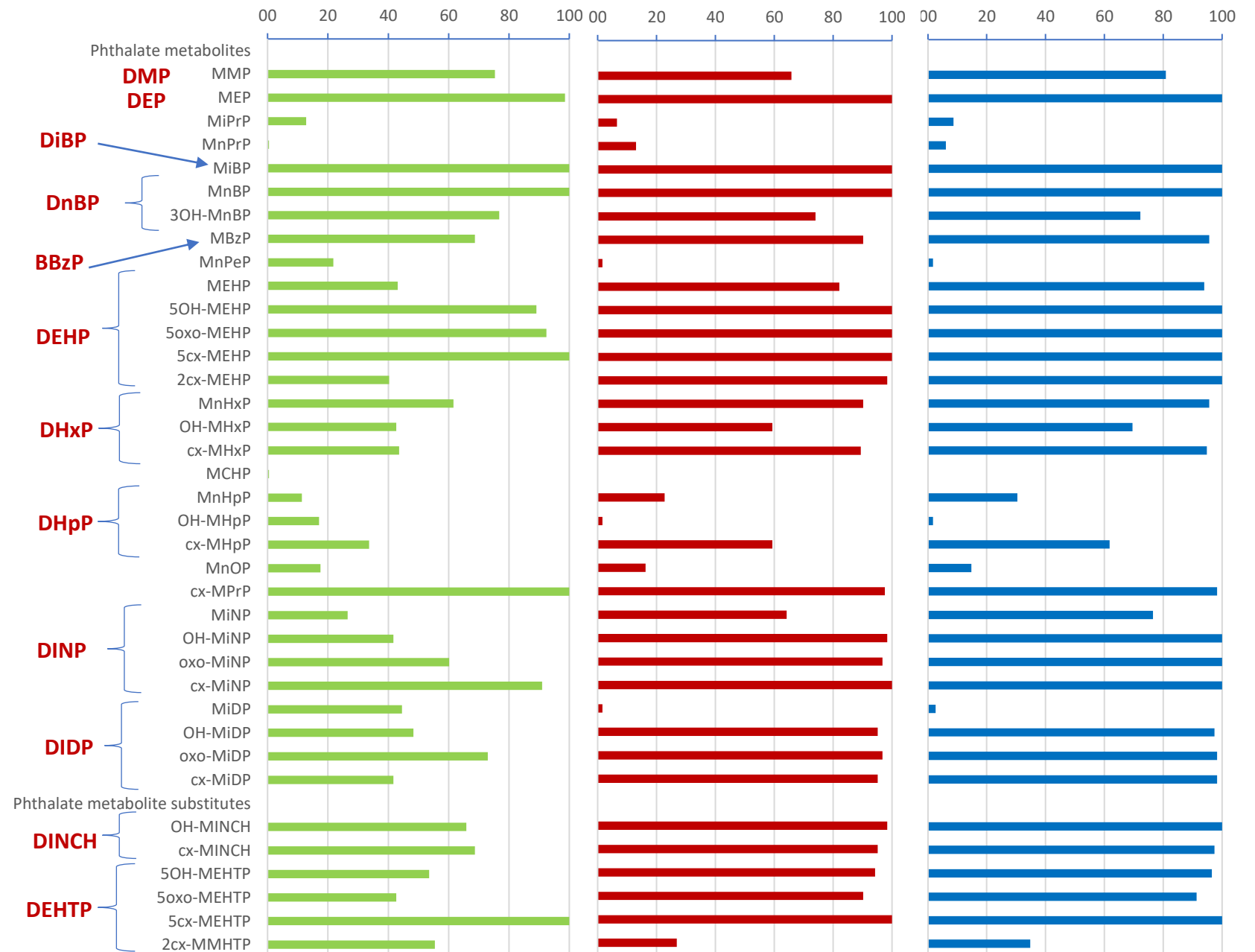
Spædbørn, n=142 (ialt 211 prøver)

Mødre, n=123

Fædre, n=115

## % eksponerede deltagere

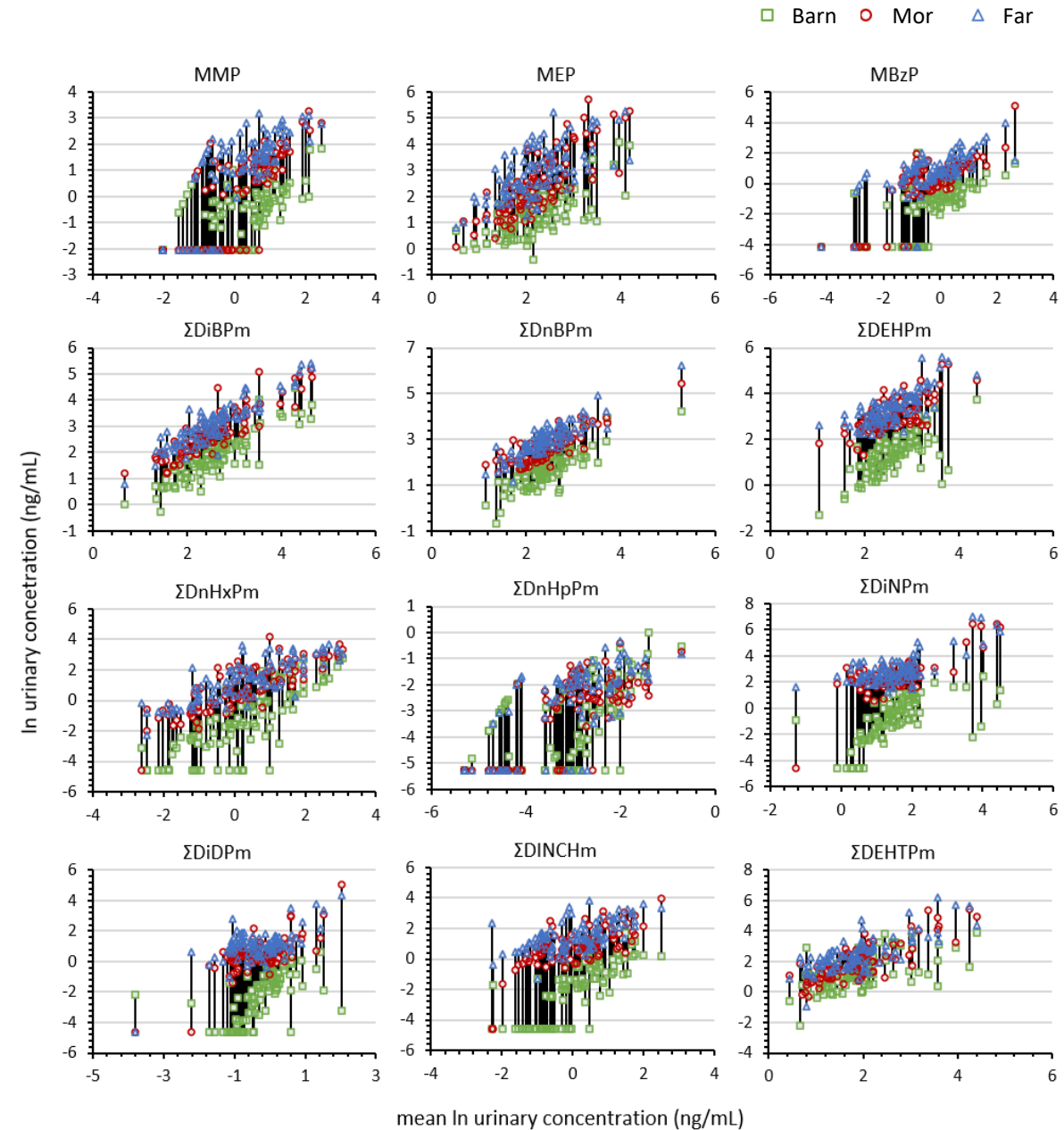
- Metabolitter af 15 phthalater og 2 phthalat substitutter blev målt
- 11 phthalater og begge substitutter blev målt i 59-100% af prøverne
- > 75% af alle prøver indeholdt mere en 8 forskellige phthalater og begge substitutter



## Trio studiet - Phthalater

### Phthalat metabolit koncentration i urin hos spædbørn og deres forældre

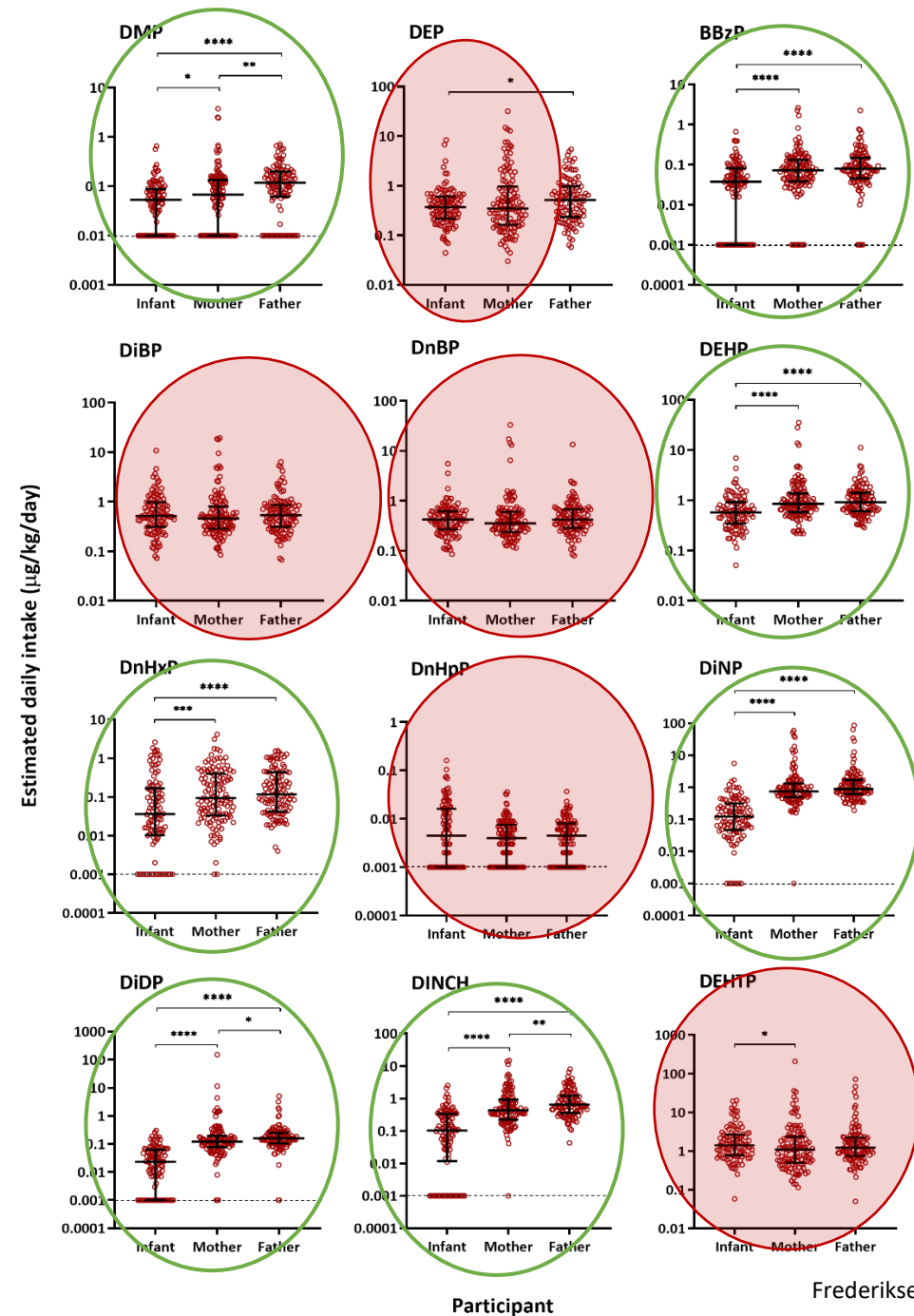
- Børn < forældre
- Variation inden for familien < variationen mellem familier
- Nogle familier har høje phthalat koncentrationer, mens andre familier har lave koncentrationer
- Familier med høje koncentrationer af en phthalat har ofte også høje koncentrationer af de andre phthalater



# Trio studiet - Phthalater

## Estimeret daglig eksponering for phthalater

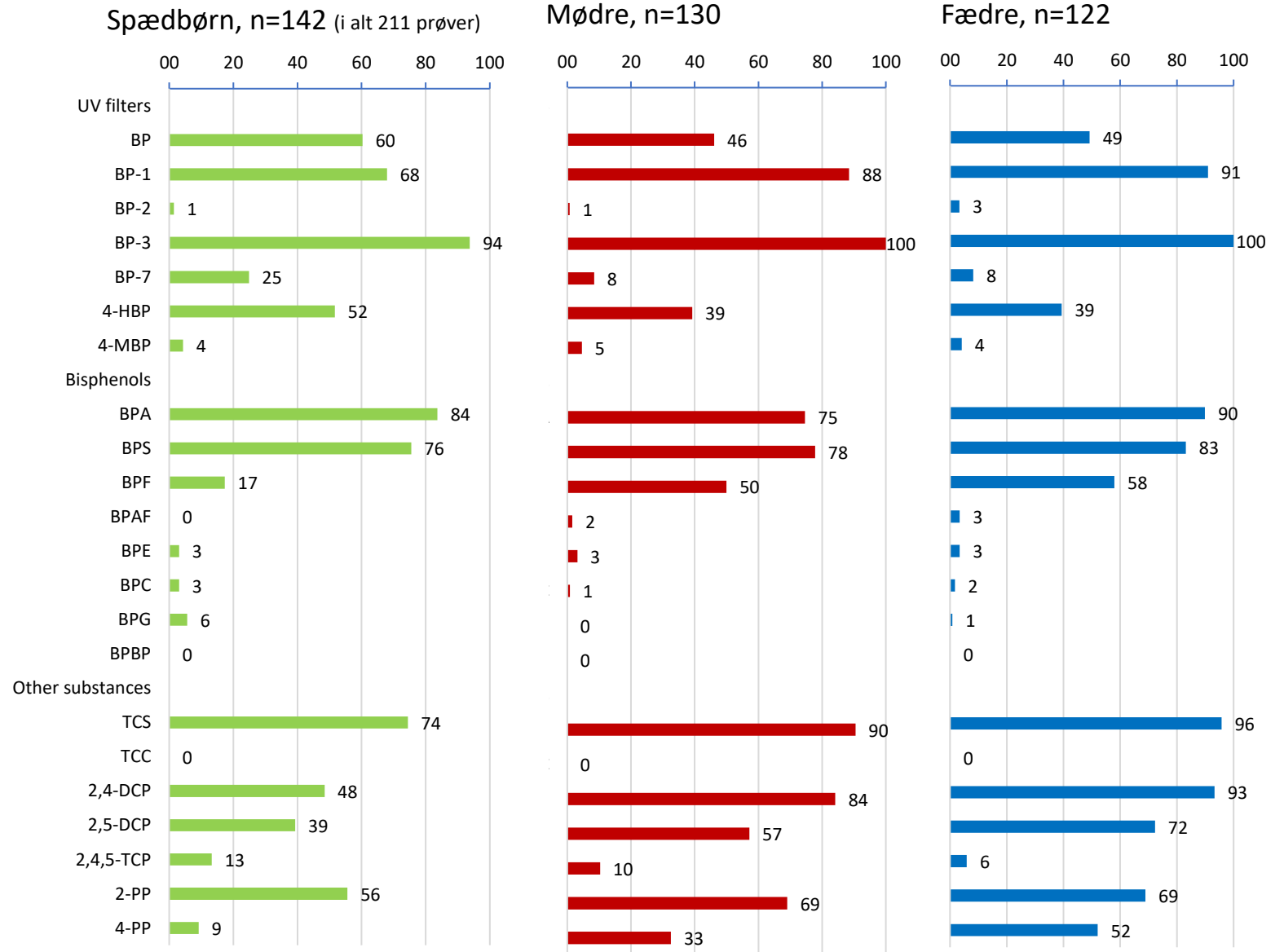
- Fædre og mødre er signifikant højere eksponeret for nogle phthalater end deres små børn
- Flere af disse phthalater, f.eks DEHP bruges ofte i plastik produkter
  
- Børn er eksponeret for samme eller højere mængder end deres forældre af en række andre phthalater
- Flere af disse phthalater, f.eks DEP, DiBP og DnBP bruges ofte i personlige plejeprodukter



# Trio studiet - Phenoler

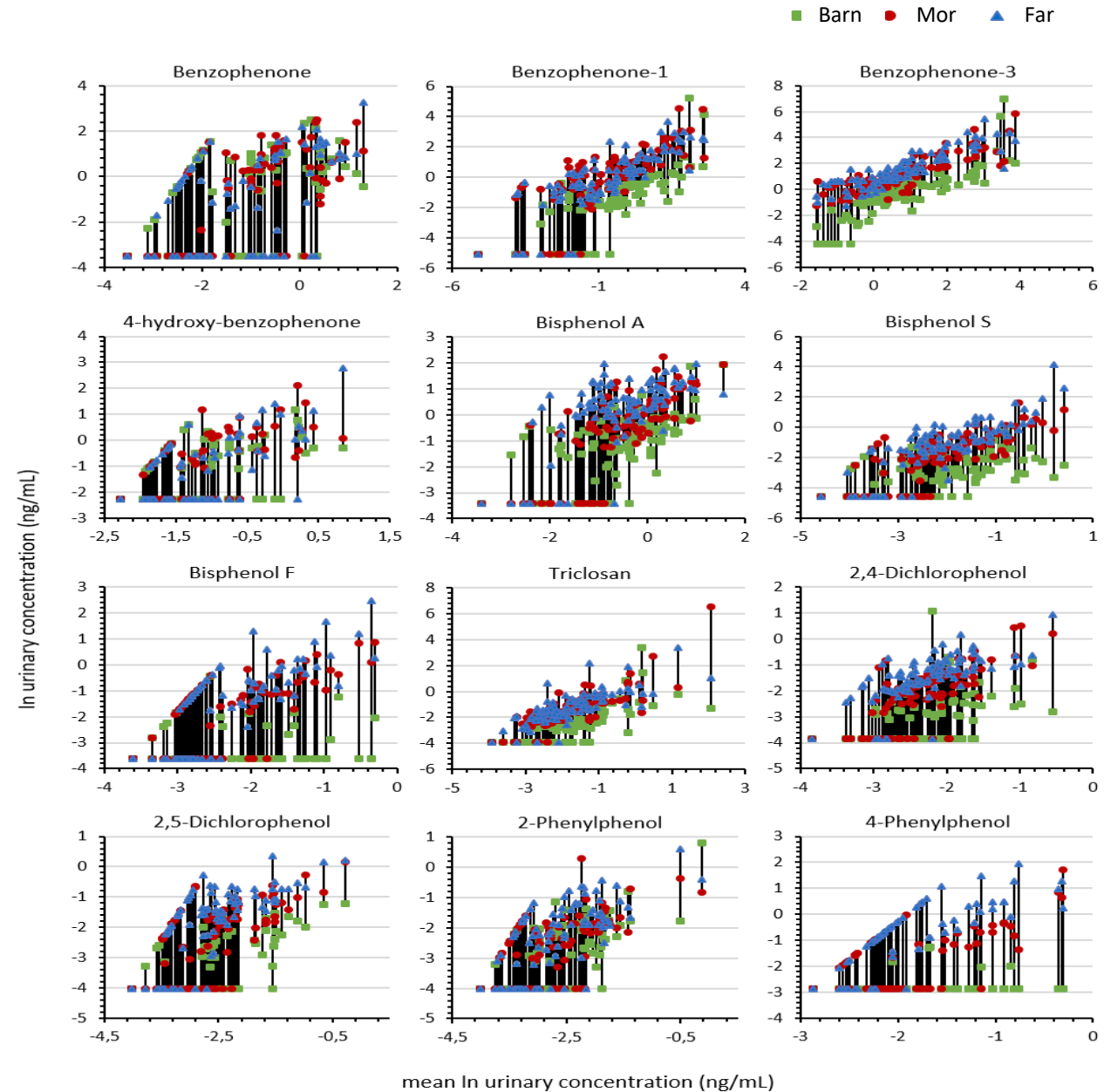
## % eksponerede deltagere

- 22 UV-filtre, bisphenoler og andre phenoler målt i urinprøver
- 75-94 % af børnenes urin indeholdt BP-3, BPA, BPS og TCS, mens 39-68% indeholdt 6 andre stoffer
- Generelt havde flere forældre end børn indhold af de målte stoffer



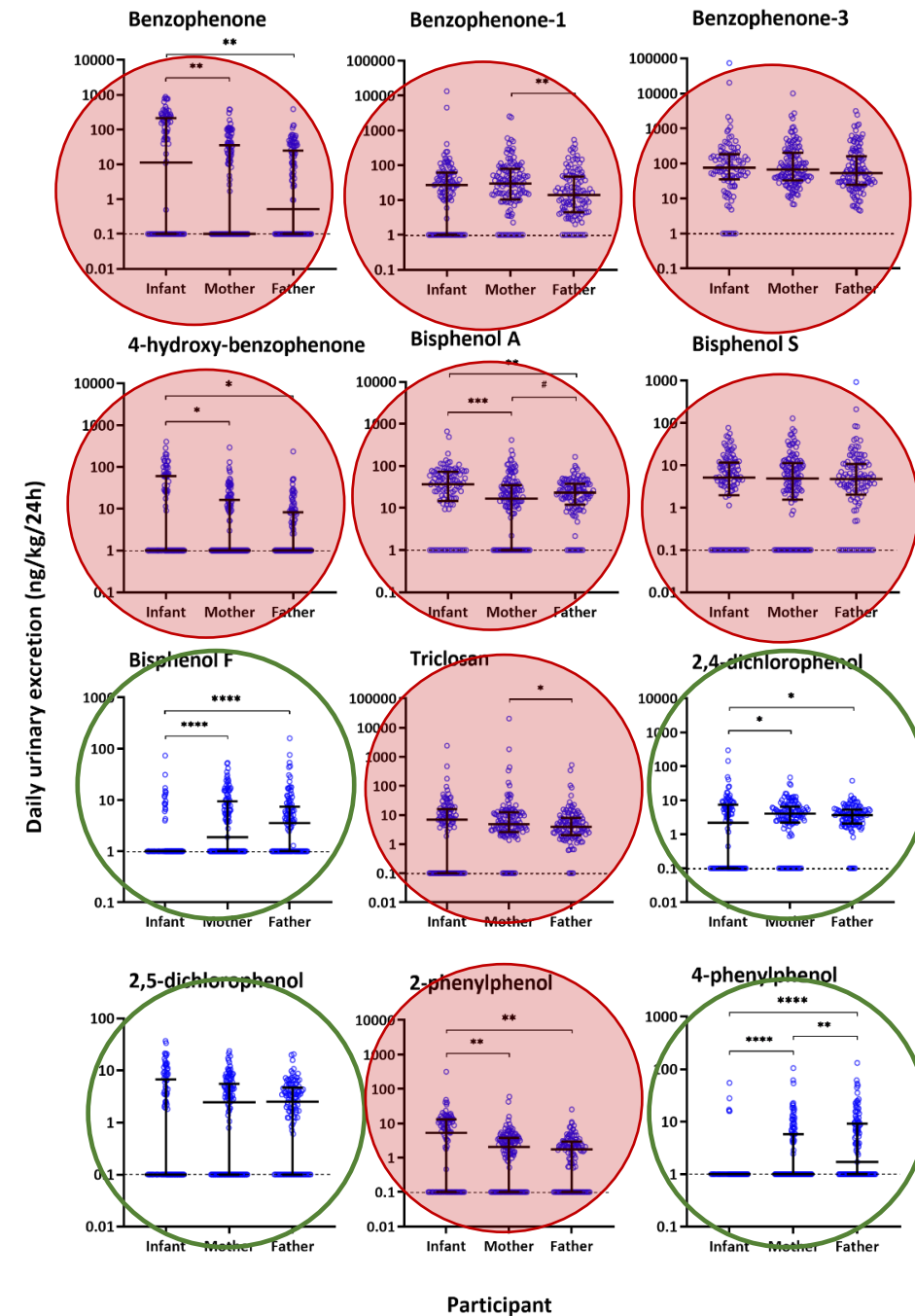
## Phenol koncentration i urin hos spædbørn og forældre

- Børn < forældre
- Variation inden for familien < variationen mellem familier
- Nogle familier har høje koncentrationer af nogle phenoler, mens andre familier har lave koncentrationer



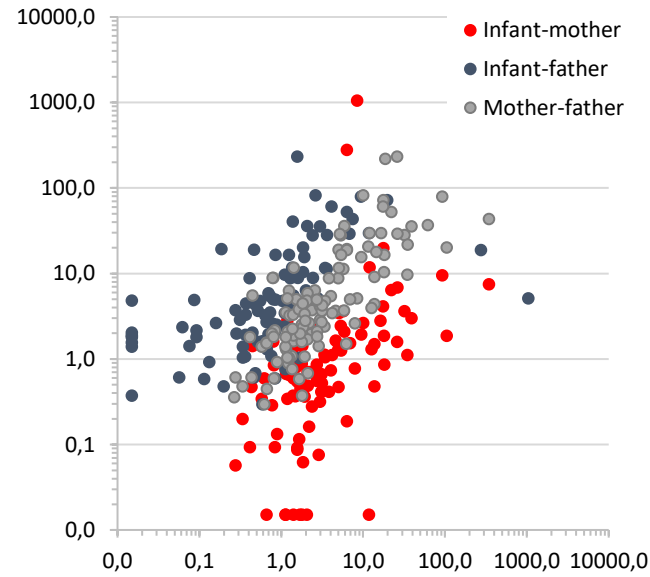
## Estimeret daglig eksponering for phenoler

- Fædre og mødre er signifikant højere eksponeret for nogle phenoler end deres små børn
- Bl.a. to pesticider og et fungicid som formodes at komme fra kosten
- Børn er eksponeret for samme eller højere mængder end deres forældre af en række andre phenoler
- Bl.a. UV-filtrene, to bisphenoler, triclosan og et fungicid



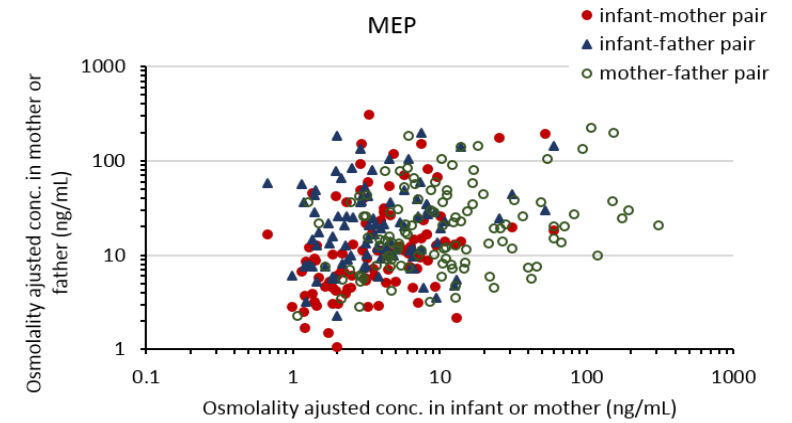
# Trio studiet – Phenoler og Phthalater

## Benzophenone-3 (ng/mL)

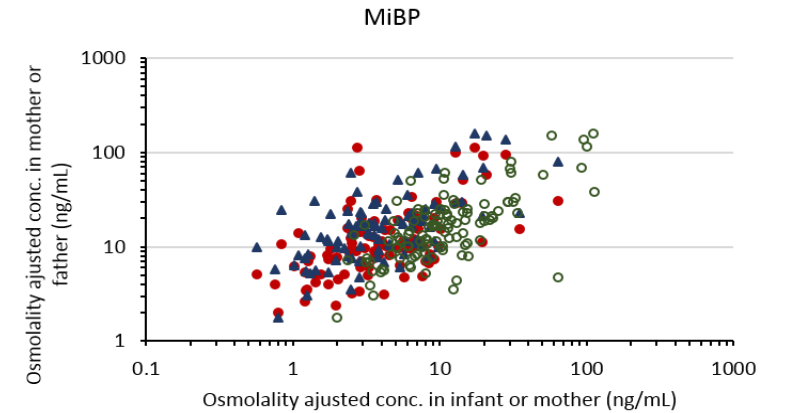


- Signifikant korrelation mellem mange kemikaliekoncentrationer målt i urin hos mor-barn, far-barn og mor-far
- Signifikant korrelation mellem mange kemikalier, dvs højt eksponeret for et kemikalie ofte også højt eksponeret for mange andre kemikalier

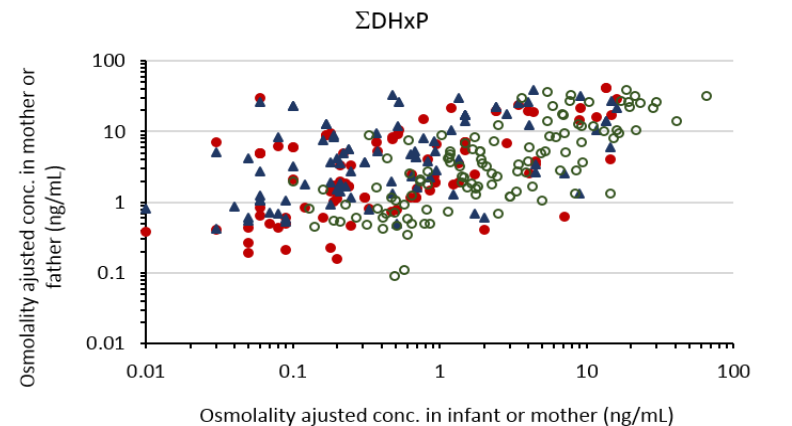
## MEP



## MiBP



## $\Sigma$ DHxP



## MiniPub Trio studiet – konklusion

- I alt blev 39 kemikalier som er eller er mistænkt for at være hormonforstyrrende analyseret
- Både børn og deres forældre var eksponeret for de fleste af de målte kemikalier
- Børnene var eksponeret for 13 kemikalier på samme niveau eller højere end deres forældre
- Signifikante korrelationer mellem børn og deres forældres eksponering



# MiniPub Food studiet

## Formål:

- At undersøge eksponeringen for phthalater og substitutter, samt UV filtre (benzophenoner), bisphenoler og andre phenoler hos spædbørn der udelukkende fik brystmælk og senere hvor børnene fik en blandet kost
- At undersøge om spædbørns eksponering er påvirket af kosten - amning vs. blandet kost?

## Materiale:

- MiniPub Food: 2 x 60 urinprøvepar indsamlet i hhv. ammeperioden og bagefter, hvor barnet fik blandet kost

## Metode:

- Kemisk analyse af urinprøver vha. LC-MS/MS

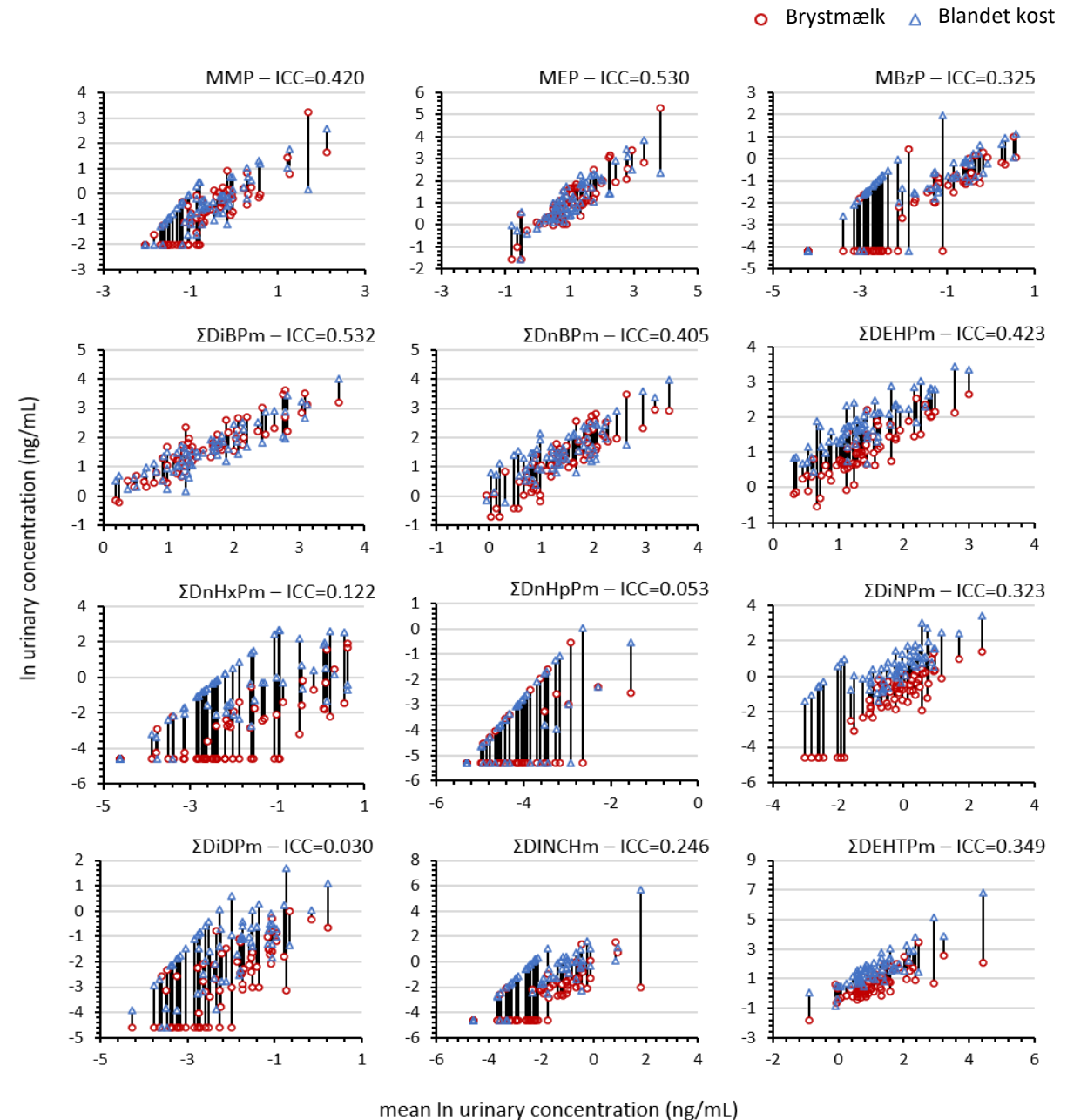
Frederiksen et al, Environ.Int. 2022 a  
Frederiksen et al, Environ.Int. 2022 b



# Food studiet - Phthalater

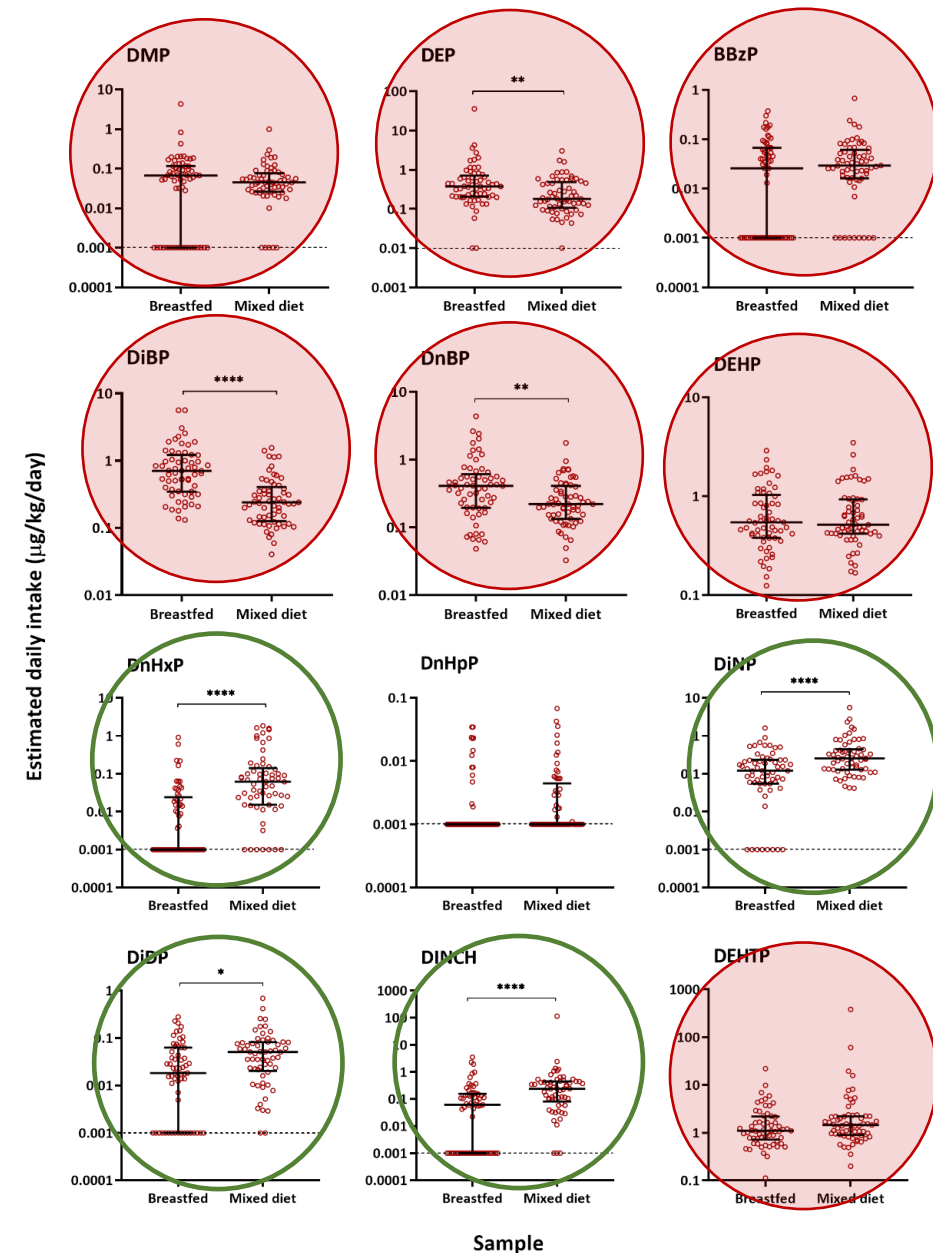
## Phthalat metabolit koncentration i urin hos brystbørn og børn med blandet kost

- Urinkoncentrationen af nogle få phthalater var lavere hos brystbørn end senere hvor de samme børn fik blandet kost
- Uanset kost, gælder for de fleste phthalater, at nogle børn havde høje koncentrationer, mens andre børn havde lave koncentrationer



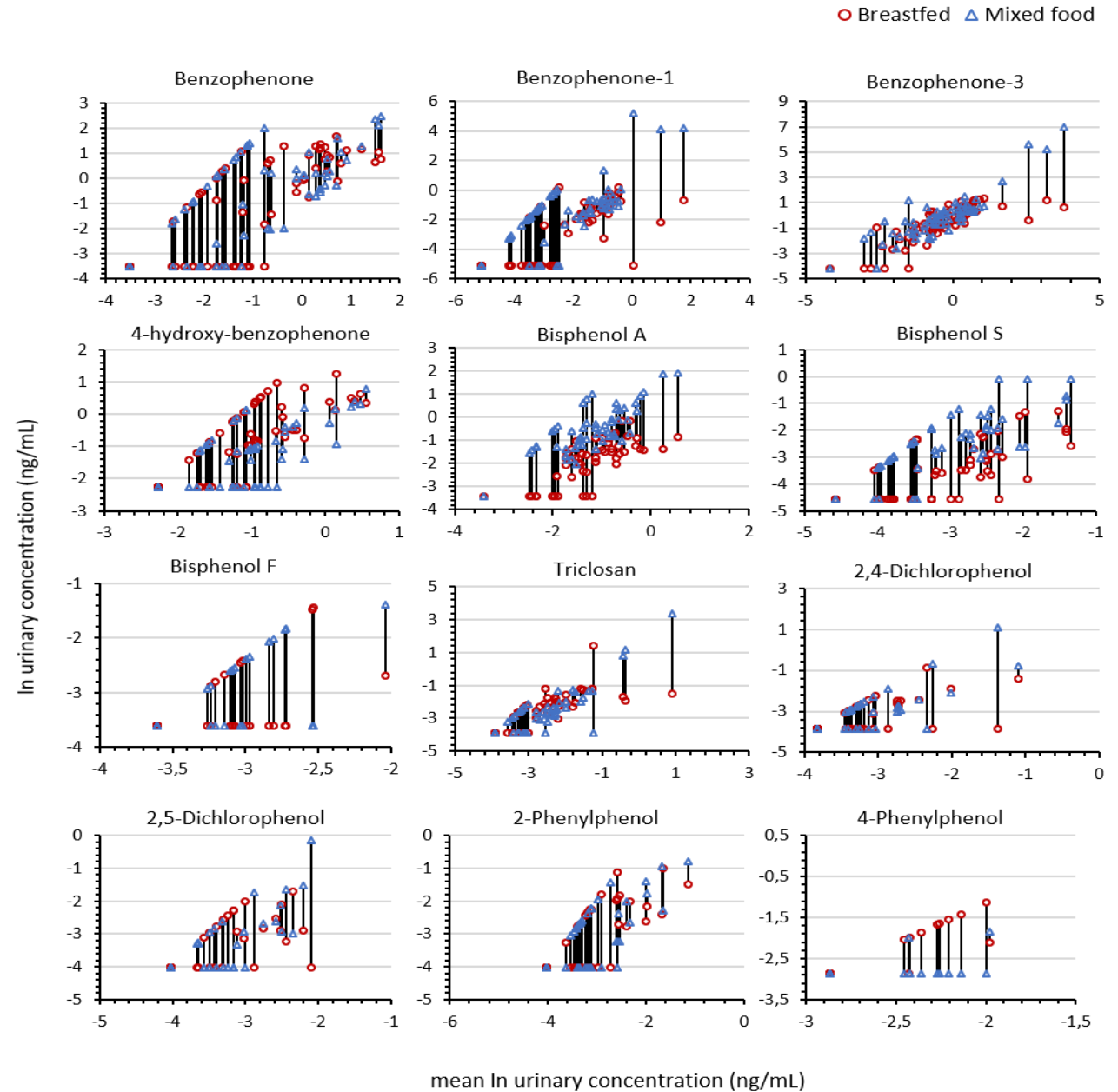
## Estimeret daglig eksponering for phthalater

- Eksponeringen for nogle få phthalater var signifikant højere hos der fik blandet kost
- Eksponeringen for mange phthalater var den samme eller signifikant højere hos børn mens de udelukkende blev ammet, sammenlignet med senere hvor de fik blandet kost



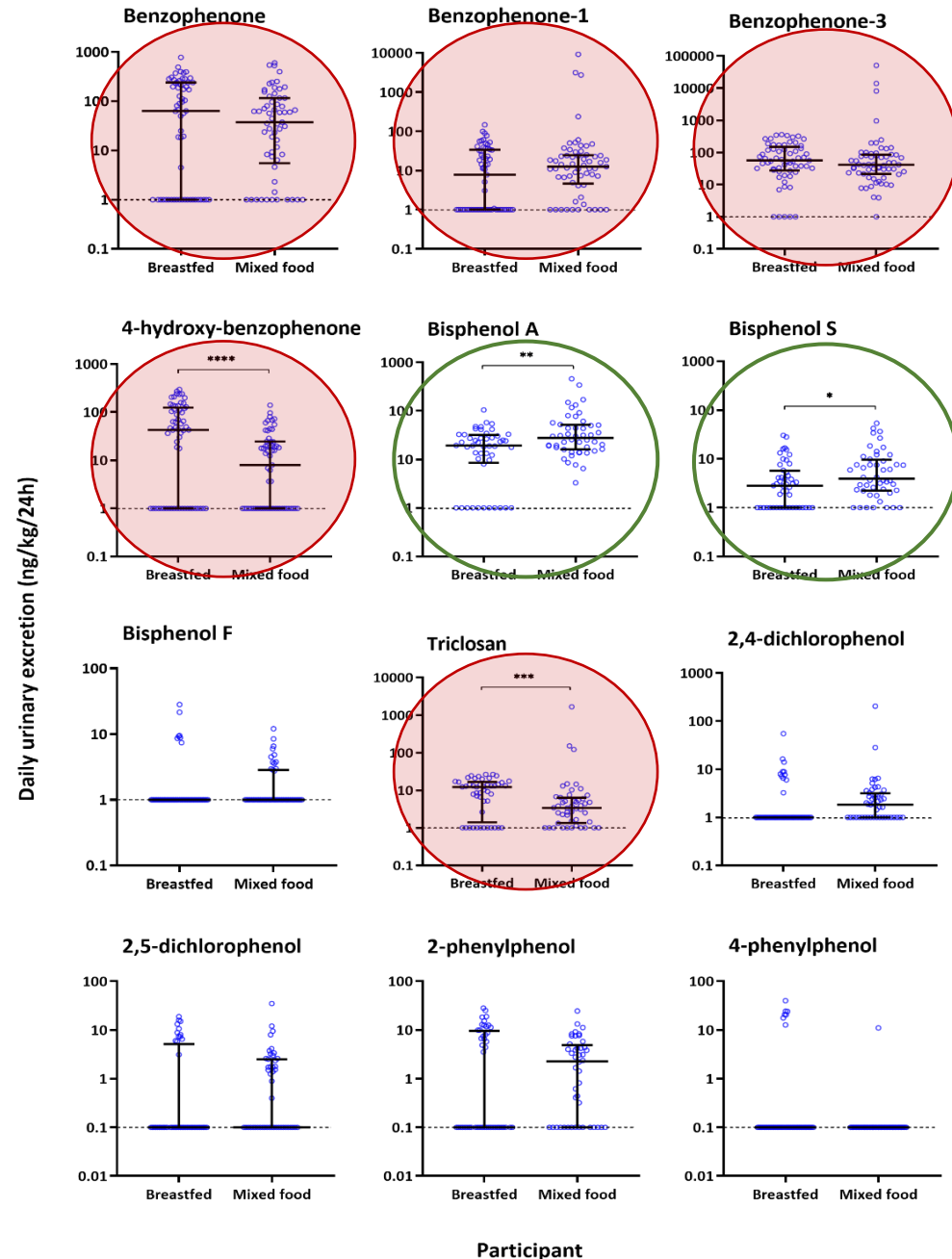
## Phenol koncentration i urin hos brystbørn og børn med blandet kost

- Urinkoncentrationen af nogle få phenoler var lavere hos brystbørn end senere hvor de samme børn fik blandet kost
- Uanset kost, gælder for nogle phenoler, at nogle børn havde høje koncentrationer, mens andre børn havde lave koncentrationer



## Estimeret daglig eksponering for Phenoler

- Eksponeringen for BPA og BPS var signifikant højere hos børn der fik blandet kost
- Eksponeringen for mange andre UV-filtre og triclosan var den samme eller signifikant højere hos børnene mens de udelukkende blev ammet sammenlignet med senere hvor de fik blandet kost



## MiniPub Food studiet – konklusion



- Spædbørn der ammes eller får blandet kost eksponeres for mange potentielt hormonforstyrrende stoffer
- Spædbørn der kun blev ammet havde en signifikant højere estimeret daglig eksponering for kemikalier som ofte findes i personlige plejeprodukter og rengøringsmidler (lav-molekylære phthalater, UV-filtre og triclosan)



- De lidt ældre børn der fik en blandet kost havde en signifikant højere estimeret daglig eksponering for kemikalier som ofte findes i diverse plastikprodukter (høj-molekylære phthalater, bisphenoler)





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Environment International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/envint](http://www.elsevier.com/locate/envint)



# MiniPub Trio/Food studierne

Full length article

## Exposure to 15 phthalates and two substitutes (DEHTP and DINCH) assessed in trios of infants and their parents as well as longitudinally in infants exclusively breastfed and after the introduction of a mixed diet

Hanne Frederiksen<sup>a,b,\*</sup>, Emmie N. Uppers<sup>a,b</sup>, Marie Lindhardt Ljubicic<sup>a,b</sup>, Margit Bistrup Fischer<sup>a,b</sup>, Alexander Siegfried Busch<sup>a,b</sup>, Casper P. Hagen<sup>a,b</sup>, Anders Juul<sup>a,b,c</sup>, Anna-Maria Andersson<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Copenhagen University Hospital-Rigshospitalet, Department of Growth and Reproduction, Denmark

<sup>b</sup> Copenhagen University Hospital-Rigshospitalet, International Center for Research and Research Training in Endocrine Disruption of Male Reproduction and Child Health (EDMaRC), Denmark

<sup>c</sup> University of Copenhagen, Department of Clinical Medicine, Denmark

### ARTICLE INFO

Handling Editor: Adrian Covaci

#### Keywords:

Human biomonitoring  
Endocrine disrupting chemicals  
Infant  
Parent  
Phthalate  
DI-2-ethylhexyl terephthalate (DEHTP)  
DINCH

### ABSTRACT

**Objective:** Several phthalates have been restricted/banned due to their adverse endocrine di The use of other phthalates and substitutes has increased. Here we examine the current expo family trios comprised of infants and their parents and in infants exclusive breastfed and fol to a mixed diet.

**Methods:** Metabolites of 15 phthalates and two substitutes, di(2-ethylhexyl)-teraphthc diisononyl-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH), were measured in urine samples collecte and their parents and in paired urine samples collected from 67 infants, while they were e and when they got mixed diet.

**Results:** Among infants and their parents, metabolites of nine out of 15 phthalates and bc



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Environment International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/envint](http://www.elsevier.com/locate/envint)



Full length article

## Benzophenones, bisphenols and other polychlorinated/phenolic substances in Danish infants and their parents – including longitudinal assessments before and after introduction to mixed diet

Hanne Frederiksen<sup>a,b,\*</sup>, Marie Lindhardt Ljubicic<sup>a,b</sup>, Emmie N. Uppers<sup>a,b</sup>, Margit Bistrup Fischer<sup>a,b</sup>, Alexander Siegfried Busch<sup>a,b</sup>, Casper P. Hagen<sup>a,b</sup>, Anders Juul<sup>a,b,c</sup>, Anna-Maria Andersson<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Department of Growth and Reproduction, Copenhagen University Hospital – Rigshospitalet, DK-2100 Copenhagen, Denmark

<sup>b</sup> International Center for Research and Research Training in Endocrine Disruption of Male Reproduction and Child Health (EDMaRC), Copenhagen University Hospital – Rigshospitalet, DK-2100 Copenhagen, Denmark

<sup>c</sup> Department of Clinical Medicine, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark



### ARTICLE INFO

Handling Editor: Shoji Nakayama

#### Keywords:

Endocrine disruptor  
Infant  
Breastfed  
Bisphenol  
Benzophenone

### ABSTRACT

**Background:** Humans are widely exposed to chemicals with known or suspected endocrine disrupting effects. Among those are several benzophenones, bisphenols and other phenols commonly used in consumer products. **Objectives:** To provide human biomonitoring data from young families including infants and their parents as well as longitudinal data of infants exclusively breastfed versus on mixed diet.

**Method:** Twenty-two benzophenones, bisphenols and other phenols, were measured in urine sample sets collected from more than 100 infants and their parents (the TRIO study) and in paired samples from 61 infants when exclusively breastfed and after introduction of mixed diet (the FOOD study).

**Results:** Twelve out of 22 substances were detectable in more than half of the urine samples from infants, mothers

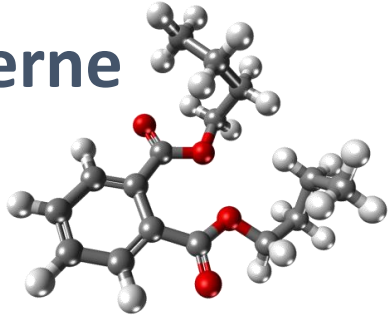


Mange tak  
til alle børn  
og deres  
forældre



# Mange tak til

## MiniPub Trio og Food studierne



# CEHOS



Endocrine Disruption of  
Male Reproduction and Child Health



Ole Nielsen  
Stine E. Andersen  
Anna-Maria Andersson  
Anders Juul  
Casper Hagen  
Emmie Nicolina Upners  
Marie Lindhardt Ljubicic  
Alexander Siegfried Busch  
Margit Bistrup Fischer  
Camilla Eckert-Lind  
Kirstine Jespersen  
Nanna Kolby  
og vores andre kollegaer på Afdeling for  
Vækst og Reproduktion – Rigshospitalet  
Københavns Universitets Hospital



The COPENHAGEN Minipuberty  
Study modtog støtte fra:  
The Absalon Foundation,  
Aase og Ejnar Danielsens Fond  
Candy Foundation  
EDMaRC  
The Research Council of RegionH  
Rigshospitalet



Velux Fondene  
Augustinus fonden  
Svend Andersen fonden