



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ

ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ - ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

**Διερεύνηση της σχέσης ανάμεσα στη βαρύτητα της νόσου και στα επίπεδα
ιχνοστοιχείων σε πλάσμα ασθενών με Μη Αλκοολική Λιπώδη Νόσο του Ήπατος
NAFLD**

Διπλωματική Εργασία

Ασπρούλη Ελένη



Αθήνα, 2017



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ

ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ - ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καλογερόπουλος Νικόλαος (Επιβλέπων)

**Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας Τροφίμων και Περιβάλλοντος, Τμήμα
επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

Δεδούσης Γεώργιος

**Καθηγητής Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας του Ανθρώπου, Τμήμα
επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

Δασενάκης Εμμανουήλ

**Καθηγητής Χημείας Περιβάλλοντος, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών**

Η Ασπρούλη Ελένη

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

1. Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.
2. Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Καλογερόπουλο Νικόλαο, για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη και την καθοδήγησή του σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αλλά και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου πρόσφερε.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον κ. Δεδούση Γεώργιο, Καθηγητή Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας του Ανθρώπου για την άριστη συνεργασία και τη στήριξή του, καθώς και όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Υποψήφια Διδάκτορα Ιωάννα – Παναγιώτα Καλαφάτη, για τη βοήθειά της σε όλα τα στάδια της εργασίας. Ευχαριστώ επίσης τον κ. Δασενάκη Εμμανουήλ, Καθηγητή Χημείας Περιβάλλοντος ΕΚΠΑ, για τη στήριξη και την παραχώρηση του εργαστηρίου για τις αναλύσεις των ιχνοστοιχείων. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στη Δρ Αικατερίνη Σακελλάρη και το Δρ Σωτήριο Καραβόλτσο για την πολύτιμη βοήθεια και την εμπύχωση που μου προσέφεραν κατά την προετοιμασία των δειγμάτων και τον προσδιορισμό των ιχνοστοιχείων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη στήριξη και την κατανόηση που έδειξαν σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη στα Ελληνικά	σ.7
Περίληψη στα Αγγλικά	σ.8
Κατάλογος Εικόνων	σ.9
Κατάλογος Πινάκων	σ.10
Κατάλογος Σχημάτων	σ.11
Συντομογραφίες	σ.12
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	σ.13
Κεφ.1 Μη Αλκοολική Λιπώδης Νόσος του Ήπατος (NAFLD)	σ.13
1.1 Ορισμός – Φυσική εξέλιξη	σ.13
1.2 Επιδημιολογία	σ.15
1.3 Παράγοντες κινδύνου	σ.17
1.4 Παθοφυσιολογία	σ.22
1.4.1 Θεωρίες	σ.22
1.4.2 Ινσουλινοαντίσταση και NAFLD	σ.25
1.4.3 De novo Λιπογένεση	σ.26
1.4.4 Οξειδωτικό στρες και NAFLD	σ.27
1.4.5 Φλεγμονή και NAFLD	σ.28
1.4.6 Στρες του Ενδοπλασματικού δικτύου κ.α.	σ.29
Κεφ.2 ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ	σ.31
2.1 Γενικά	σ.31
2.2 Ευεργετικές δράσεις των Ιχνοστοιχείων	σ.32
2.2.1 Αντιοξειδωτική δράση	σ.32
2.2.2 Αντιφλεγμονώδης δράση	σ.35
2.2.3 Αντιμικροβιακή δράση	σ.36
2.2.4 Άλλες δράσεις	σ.36
2.3 Τοξικά ιχνοστοιχεία	σ.38
2.4 Πηγές πρόσληψης απαραίτητων ιχνοστοιχείων	σ.44
2.5 Μέθοδοι ανάλυσης ιχνοστοιχείων	σ.44
2.5.1 Φασματομετρία ατομικής απορόφησης σε φλόγα (FAAS)	σ.46
2.5.2 Φασματομετρία ατομικής απορόφησης σε φούρνο γραφίτη (GFAAS)	σ.46

2.5.3 Φασματομετρία ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-AES)	σ.47
2.5.4 Φασματομετρία μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-MS)	σ.47
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ – ΔΙΑΤΥΠΩΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΥΠΟΘΕΣΗΣ	σ.48
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	σ.49
3.1 Σχεδιασμός της έρευνας	σ.49
3.2 Δείγμα της έρευνας	σ.49
3.3 Μετρήσιμα χαρακτηριστικά	σ.49
3.3.1 Διάγνωση της NAFLD	σ.49
3.3.2 Δειγματοληψία αίματος και ανάλυση	σ.49
3.3.3 Διασφάλιση ποιότητας	σ.50
3.4 Στατιστική ανάλυση	σ.51
3.5 Βιοηθική	σ.51
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	σ.52
4.1 Χαρακτηριστικά του δείγματος	σ.52
4.2 Συσχετίσεις	σ.52
4.2.1 Συσχέτιση συγκέντρωσης ιχνοστοιχείων και επιπέδων βαρύτητας της νόσου	σ.52
4.2.2 Συσχέτιση ιχνοστοιχείων με βιοχημικούς δείκτες	σ.53
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	σ.55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σ.58
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	σ.65

Περίληψη στα Ελληνικά

Η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (NAFLD) θεωρείται ως η ηπατική εκδήλωση του μεταβολικού συνδρόμου και αποτελεί την πιο κοινή ασθένεια του ήπατος παγκοσμίως. Εντοπίζεται κυρίως σε παχύσαρκα άτομα με διατροφή πλούσια σε λιπαρά και με ελάχιστη φυσική δραστηριότητα και εμφανίζει υψηλό επιπολασμό, που εκτιμάται ότι κυμαίνεται μεταξύ 25-45% του παγκόσμιου πληθυσμού. Δεδομένης της σχέσης του ήπατος με διάφορα ιχνοστοιχεία και του ρόλου που τα τελευταία μπορούν να διαδραματίσουν σε σχετικές νόσους, έχει γίνει αρκετή έρευνα για το ρόλο των ιχνοστοιχείων σε διάφορες ηπατικές ασθένειες, όχι όμως για τη σχέση των επιπέδων των ιχνοστοιχείων με τη NAFLD. Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην καταγραφή των συγκεντρώσεων διαφόρων ιχνοστοιχείων σε πλάσμα αίματος ασθενών με NAFLD, τη συσχέτισή τους με τη βαρύτητα της νόσου και με βιοχημικούς δείκτες που σχετίζονται με τη νόσο. Προσδιορίστηκαν τα ιχνοστοιχεία κοβάλτιο (Co), χαλκός (Cu), ψευδάργυρος (Zn), ρουβίδιο (Rb), στρόντιο (Sr), κάδμιο (Cd), καίσιο (Cs), βάριο (Ba), θάλλιο (Tl) και αρσενικό (As) σε πλάσμα 189 εθελοντών με ICP-MS (Induced Coupled Plasma- Mass Spectrometry) έπειτα από κατάλληλη προκατεργασία. Οι εθελοντές είχαν είτε απουσία νόσου, είτε είχαν τη νόσο σε επίπεδα βαρύτητας που κυμαίνονταν από χαμηλό, μέτριο έως υψηλό. Ο Zn εμφάνισε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση, ενώ το Cs στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με τα επίπεδα βαρύτητας της νόσου. Επιπρόσθετα, το Tl συσχετίστηκε αρνητικά με τα επίπεδα ινσουλίνης. Ασθενείς σε προχωρημένο στάδιο της νόσου εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα Zn και υψηλότερα επίπεδα Cs, ενώ οι υψηλότερες συγκεντρώσεις Tl σχετίζονται με χαμηλότερα επίπεδα ινσουλίνης. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για επιβεβαίωση και ερμηνεία των ευρημάτων.

Λέξεις κλειδιά: Μη Αλκοολική Λιπώδης Νόσος του Ήπατος, Ιχνοστοιχεία, Πλάσμα αίματος, ICP-MS

Abstract

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is considered to be the hepatic manifestation of the metabolic syndrome, representing the most common hepatic disease worldwide, rapidly becoming a major public health concern. It occurs mainly in obese individuals with a high-fat diet and low levels of physical activity and its global prevalence is estimated between 25% and 45%. Given the relationship between the liver and several trace elements (TEs), many studies have investigated TEs association with liver diseases, though not with NAFLD. The aim of the present work was the examination of TEs levels in the blood plasma of NAFLD patients, their possible association with various stages of the disease and with biochemical indices which are involved in NAFLD. Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS) was employed for the determination of cobalt (Co), copper (Cu), zinc (Zn), rubidium (Rb), strontium (Sr), cadmium (Cd), cesium (Cs), barium (Ba), thallium (Tl) and arsenic (As) in the blood plasma of 189 participants after proper pretreatment. The participants had either absence of the disease, or were NAFLD patients with varying severity of the disease -- low, medium or high. Zinc exhibited a statistically significant negative association, while Cs showed a statistically significant positive association with the severity of NAFLD. Moreover, Tl was inversely associated with insulin. Patients in more advanced stages of NAFLD, display lower concentrations of plasma Zn and higher concentrations of plasma Cs, while increased concentrations of Tl are associated with lower insulin. Further research is required for the verification and interpretation of these findings.

Keywords: Nonalcoholic fatty liver disease, Trace elements, Blood plasma, ICP-MS

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικ.1.1.1: Υγιές ήπαρ, ήπαρ με NAFLD και ήπαρ με NASH, στο μικροσκόπιο	σ.14
Εικ.1.4.4.1: Η παραγωγή ελεύθερων ριζών από τα μιτοχόνδρια	σ.28
Εικ.2.3.1: Οι επιπτώσεις της έκθεσης σε Pb στα παιδιά και τους ενήλικες	σ.41

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίν.4.1.1: Χαρακτηριστικά του δείγματος	σ.52
Πίν.4.2.1.1: Επίπεδα ιχνοστοιχείων (μg/L) ανάμεσα στις ομάδες βαρύτητας της NAFLD	σ.53
Πίν.4.2.1.2: Μοντέλο κανονικής παλινδρόμησης, όπου φαίνονται οι συσχετίσεις μεταξύ της συγκέντρωσης ιχνοστοιχείων στο πλάσμα αίματος και της βαρύτητας της NAFLD	σ.53
Πίν.4.2.2.1: Μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης, όπου φαίνονται οι συσχετίσεις ανάμεσα στα ιχνοστοιχεία και τους βιοχημικούς δείκτες	σ.54

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχ.1.1.1: Τα ως σήμερα γνωστά δεδομένα για τη φυσική εξέλιξη της Μη Αλκοολικής Λιπώδους Νόσου του Ήπατος (NAFLD)	σ.13
Σχ.1.1.2: Κλινική εξέλιξη της Μη Αλκοολικής Λιπώδους Νόσου του Ήπατος (NAFLD)	σ.15
Σχ.1.2.1: Παγκόσμιος επιπολασμός της NAFLD	σ.16
Σχ.1.2.2: Ο επιπολασμός της NAFLD σε σχέση με τον επιπολασμό της παχυσαρκίας σε διάφορες χώρες του κόσμου	σ.17
Σχ.1.3.1: Κύριοι παράγοντες κινδύνου της NAFLD	σ.18
Σχ.1.4.1: Η παραδοσιακή θεωρία των «δύο χτυπημάτων»	σ.23
Σχ.1.4.2: Η «τροποποιημένη θεωρία των δύο χτυπημάτων»	σ.24
Σχ.1.4.3: Η θεωρία των «τριών χτυπημάτων»	σ.24
Σχ.1.4.4: Η θεωρία των «πολλαπλών χτυπημάτων»	σ.25
Σχ.1.4.4.1: Ο μηχανισμός με τον οποίο το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε οργανικές βλάβες	σ.27
Σχ.2.2.1.1: Το ανθρώπινο αντιοξειδωτικό δίκτυο, όπου φαίνεται μεταξύ άλλων η δράση των αντιοξειδωτικών ιχνοστοιχείων ψευδαργύρου και σεληνίου	σ.33
Σχ.2.3.1: Οι επιπτώσεις στον οργανισμό από την έκθεση σε As	σ.40
Σχ.2.3.2: Οι επιπτώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό λόγω έκθεσης σε Hg	σ.43
Σχ.2.3.3: Ο μηχανισμός καρκινογόνου δράσης του εξασθενούς χρωμίου μετά από έκθεση σε αυτό μέσω πόσιμου νερού	σ.44
Σχ.2.5.1: Γενικό διάγραμμα των φασματοχημικών τεχνικών	σ.45

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

NAFLD	Nonalcoholic Fatty Liver Disease
NASH	Nonalcoholic Steatohepatitis
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
PPAR-α	Peroxisome proliferator-activated receptor-α
TC	Ολική χοληστερόλη
HDL	Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
LDL	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
VLDL	Λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας
FFA	Ελεύθερα λιπαρά οξέα
TG	Τριγλυκερίδια
TGF-β	Transforming growth factor-β
SOD	Υπεροξειδική δισμουτάση
ROS/RNS	Reactive oxygen/nitrogen species
CAT	Καταλάση
CRP	C-reactive protein
NOS	Συνθάση του νιτρικού οξειδίου
GPx	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
TRX	Αναγωγάση της θειορεδοξίνης
GSH	Γλουταθειόνη
GLUT2	Μεταφορέας γλυκόζης 2
MDA	Μηλονική Αλδεϋδη
NMDA	N-μέθυλο-D-ασπαρτικό
TNF-α	Παράγοντας νέκρωσης όγκων α
IL-1β, 6, 8	Ιντερλευκίνη-1β, 6, 8
IARC	International Agency for Research in Cancer
USEPA	United States Environmental Protection Agency
FAAS	Φασματομετρία ατομικής απορρόφησης σε φλόγα
GFAAS	Φασματομετρία ατομικής απορρόφησης σε φούρνο γραφίτη
ICP-AES	Φασματομετρία ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα
ICP-MS	Φασματομετρία μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα
LOD	Όριο ανίχνευσης
LOQ	Όριο ποσοτικοποίησης
AST	Αμινοτρανσφεράση του ασπαραγινικού
ALT	Αμινοτρανσφεράση της αλανίνης
γGT	γ-γλουταμυλ-τρανσπεπτιδάση
NF-κB	Nuclear Factor-κB
ΔΜΣ	Δείκτης Μάζας Σώματος
ΣΔ	Σακχαρώδης Διαβήτης
HOMA-IR	Μοντέλο εκτίμησης αντίστασης στην ινσουλίνη

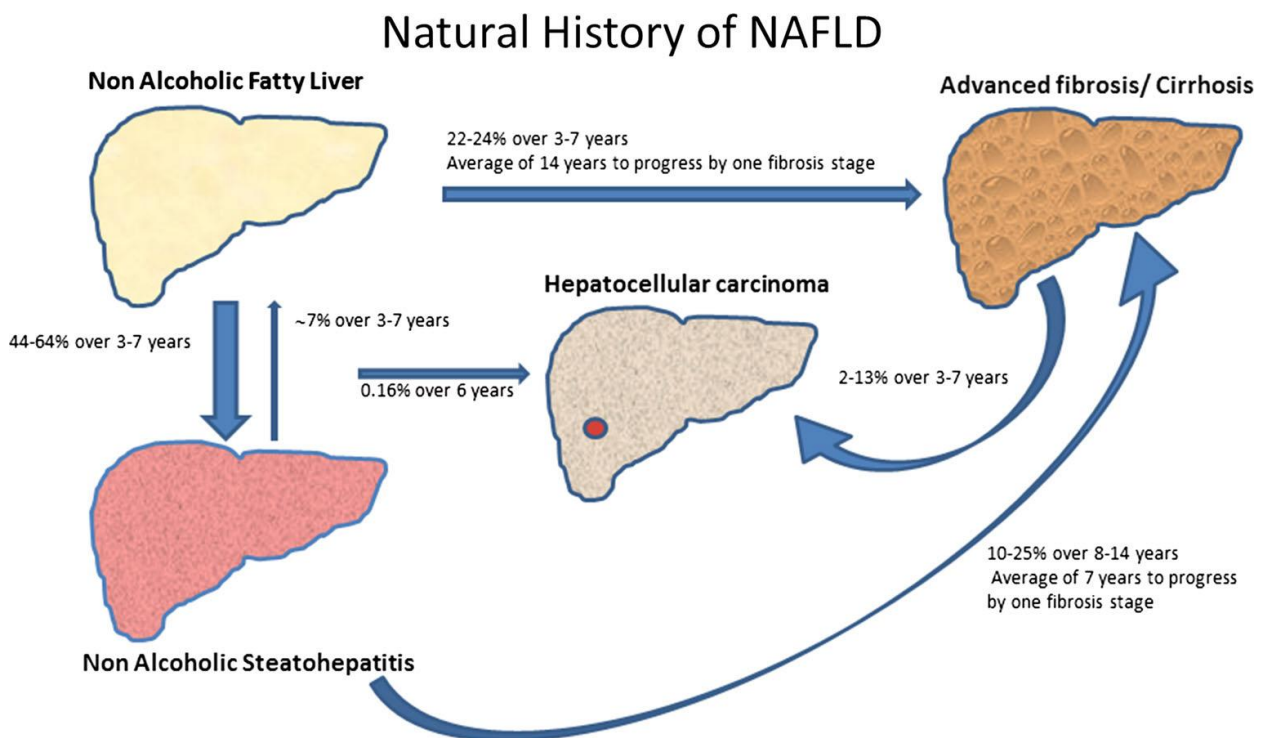
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦ.1: Μη Αλκοολική Λιπώδης Νόσος του Ήπατος (NAFLD)

1.1 Ορισμός - Φυσική εξέλιξη

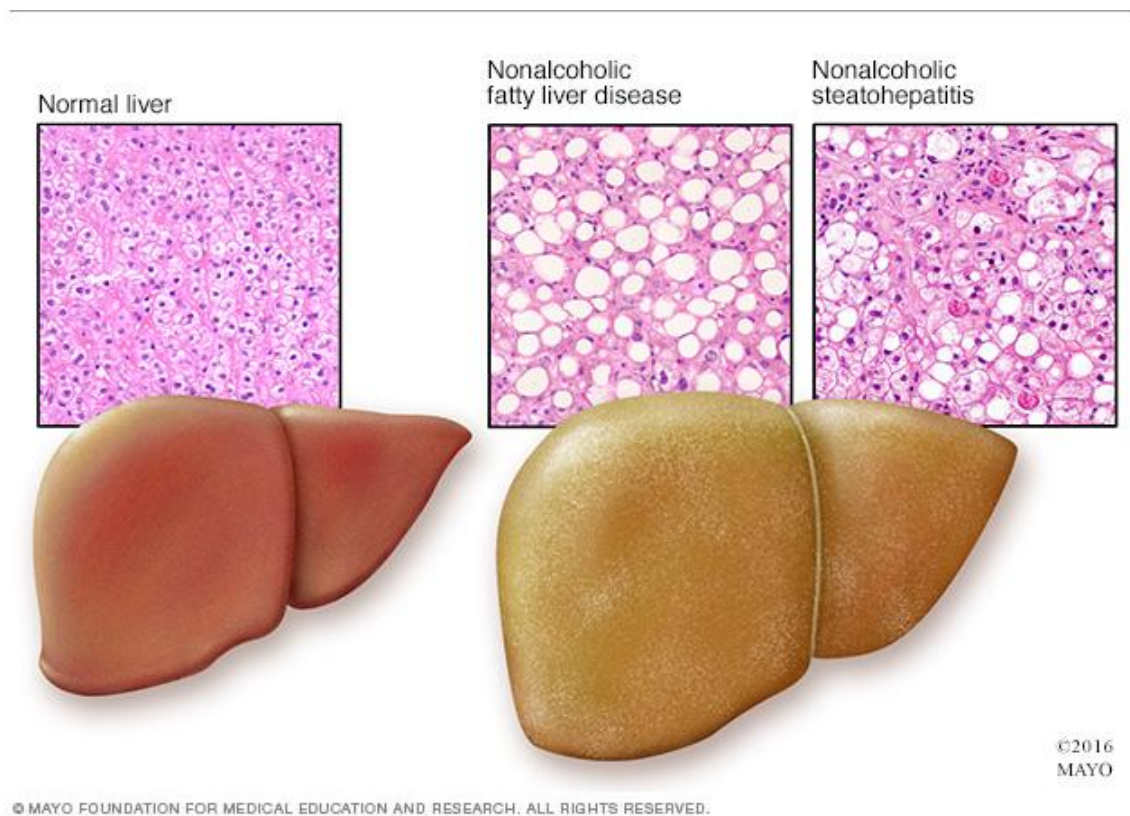
Η Μη Αλκοολική Λιπώδης Νόσος του Ήπατος (NAFLD) θεωρείται πως είναι η ηπατική εκδήλωση του μεταβολικού συνδρόμου και ορίζεται ως η ύπαρξη λίπους (με τη μορφή τριγλυκεριδίων - TGs) στο ήπαρ (στεάτωση) σε ποσοστό μεγαλύτερο του 5% των ηπατοκυττάρων και η οποία δεν οφείλεται σε αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ ή σε φαρμακευτική αγωγή¹.

Ο όρος περιλαμβάνει ένα εύρος εκδηλώσεων που κυμαίνεται από απλή στεάτωση (Μη αλκοολικό λιπώδες ήπαρ - Non-alcoholic fatty liver - NAFL) ως Μη αλκοολική Στεατοηπατίτιδα (Non-alcoholic steatohepatitis - NASH), η οποία μπορεί να οδηγήσει σε κίρρωση, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και θάνατο^{1,2} (Σχήμα 1.1.1).



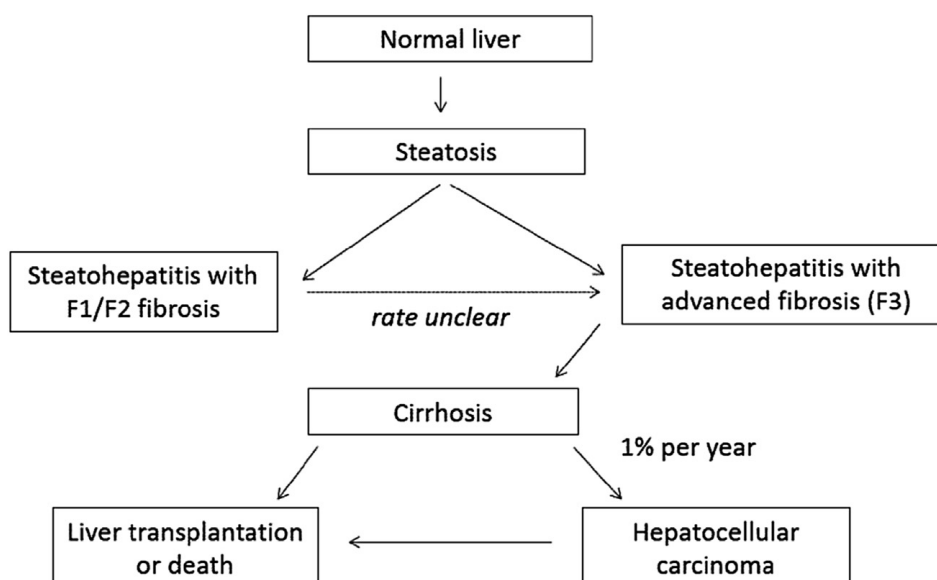
Σχήμα 1.1.1: Τα ως σήμερα γνωστά δεδομένα για τη φυσική εξέλιξη της Μη Αλκοολικής Λιπώδους Νόσου του Ήπατος (NAFLD)³.

Η απλή στεάτωση θεωρείται σε γενικές γραμμές καλοήθης, με μικρή πιθανότητα να προχωρήσει σε ίνωση και κίρρωση, ενώ συνήθως δεν παρατηρείται ιδιαίτερη φλεγμονή^{2,4}. (Εικόνα 1.1.1).



Εικόνα 1.1.1 : Υγιές ήπαρ, ήπαρ με NAFLD και ήπαρ με NASH, όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο⁵.

Η NASH χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη στεάτωσης σε συνδυασμό με φλεγμονή και ενδείξεις ηπατικής βλάβης με τη μορφή οιδήματος, με ή χωρίς ίνωση². Ένα ποσοστό 20% - 25% των περιστατικών με NAFL εξελίσσεται σε NASH και από αυτά, 20% θα αναπτύξουν ίνωση και τελικά κίρρωση του ήπατος, ενώ 1% αυτών ανά έτος θα εξελιχθεί σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα⁴ (Σχήμα 1.1.2). Τα αρχικά στάδια της νόσου είναι αναστρέψιμα, αν όμως η νόσος προχωρήσει σε NASH η κατάσταση είναι πλέον μη αντιστρεπτή⁶.



Σχήμα 1.1.2 : Κλινική εξέλιξη της Μη Αλκοολικής Λιπώδους Νόσου του Ήπατος (NAFLD)⁴.

Η NAFLD σχετίζεται ισχυρά με την ινσουλινοαντίσταση και άλλους μεταβολικούς παράγοντες κινδύνου όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔΤ2), η κεντρική παχυσαρκία και η δυσλιπιδαιμία ενώ η ίδια η νόσος αποτελεί ξεχωριστό παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο. Τέλος, η NAFLD σχετίζεται επίσης με αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας σχετιζόμενο αλλά και μη σχετιζόμενο με το ήπαρ όπως οι κακοήθειες, ο διαβήτης και η στεφανιαία νόσος^{4,7}. Τα τελευταία έτη, η NAFLD έχει συσχετιστεί και με τη χρόνια νεφρική νόσο, αλλά και άλλα νοσήματα όπως η υπνική άπνοια, ενδοκρινοπάθειες, οστεοπόρωση, ψωρίαση και καρκίνος στο κόλον⁸.

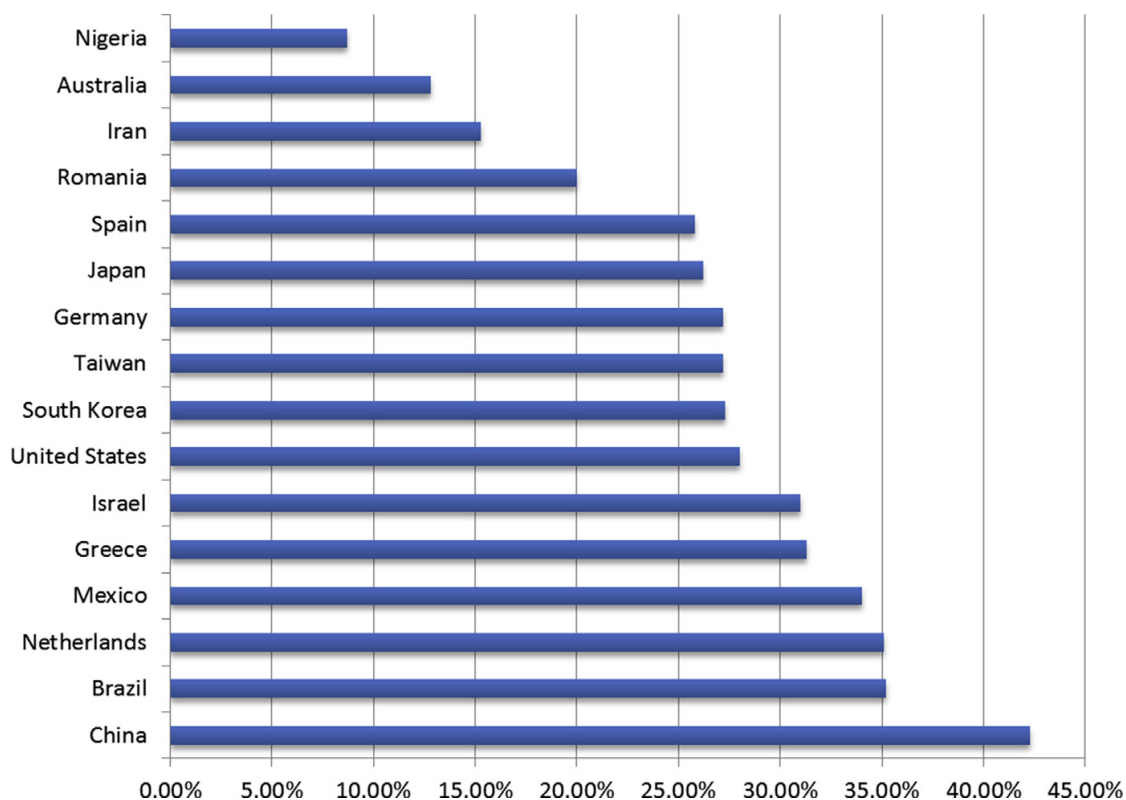
Σχετικά με τις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις της νόσου, έχει διαπιστωθεί πως οι ασθενείς με NAFLD έχουν υψηλότερο κίνδυνο θνησιμότητας σε σχέση με το γενικότερο πληθυσμό, ενώ ο κίνδυνος αυξάνεται ακόμα περισσότερο στα άτομα με NASH και μάλιστα το στάδιο-κλειδί που θεωρείται ως πιο σημαντικό για τη μακροπρόθεσμη πρόγνωση είναι αυτό της ίνωσης³.

1.2 Επιδημιολογία

Η NAFLD αποτελεί την πιο κοινή ηπατική νόσο παγκοσμίως. Ο πραγματικός επιπολασμός της όμως είναι δύσκολο να εκτιμηθεί διότι οι περισσότερες μελέτες διαφέρουν στο σχεδιασμό, στα κριτήρια εισαγωγής, στις μεθόδους διάγνωσης αλλά και λόγω της ασυμπτωματικής φύσης της νόσου. Επιπλέον, ο επιπολασμός της διαφέρει σημαντικά ανά τον κόσμο και φαίνεται να εξαρτάται από την εθνικότητα⁷. (Σχήμα 1.2.1).

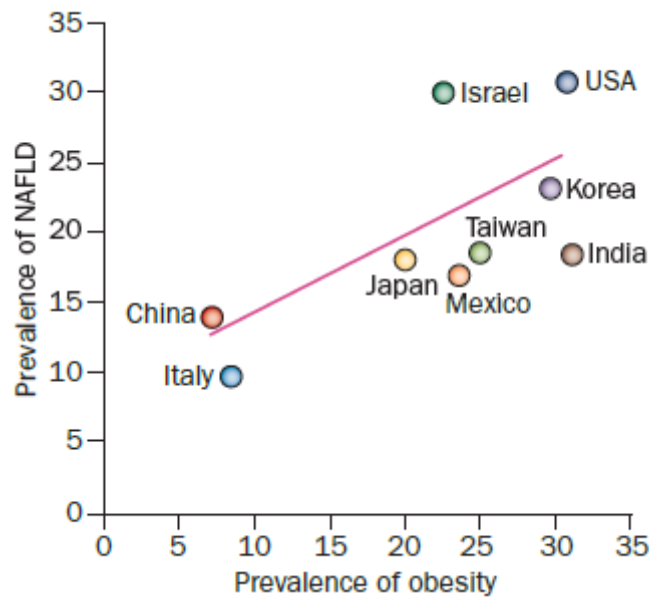
Ο παγκόσμιος επιπολασμός της NAFLD εκτιμάται μεταξύ 25 – 45% του γενικού πληθυσμού, 20 – 30% στο δυτικό κόσμο, ενώ στην Ασία 5 – 18% με αυξητική τάση⁷. Ο επιπολασμός της NASH

εκτιμάται σε παγκόσμια κλίμακα στο 2 – 3%⁷. Παρόλη τη δυσκολία εκτίμησης του πραγματικού επιπολασμού, οι Loomba et al εκτιμούν πως περίπου 1 δις άνθρωποι έχουν σήμερα NAFLD, ενώ οι Abenavoli et al υποστηρίζουν ότι ιδιαίτερα στο δυτικό κόσμο αναμένεται τα ποσοστά αυτά να αυξηθούν τα επόμενα χρόνια^{1,9}.



Σχήμα 1.2.1 : Παγκόσμιος επιπολασμός της NAFLD¹⁰.

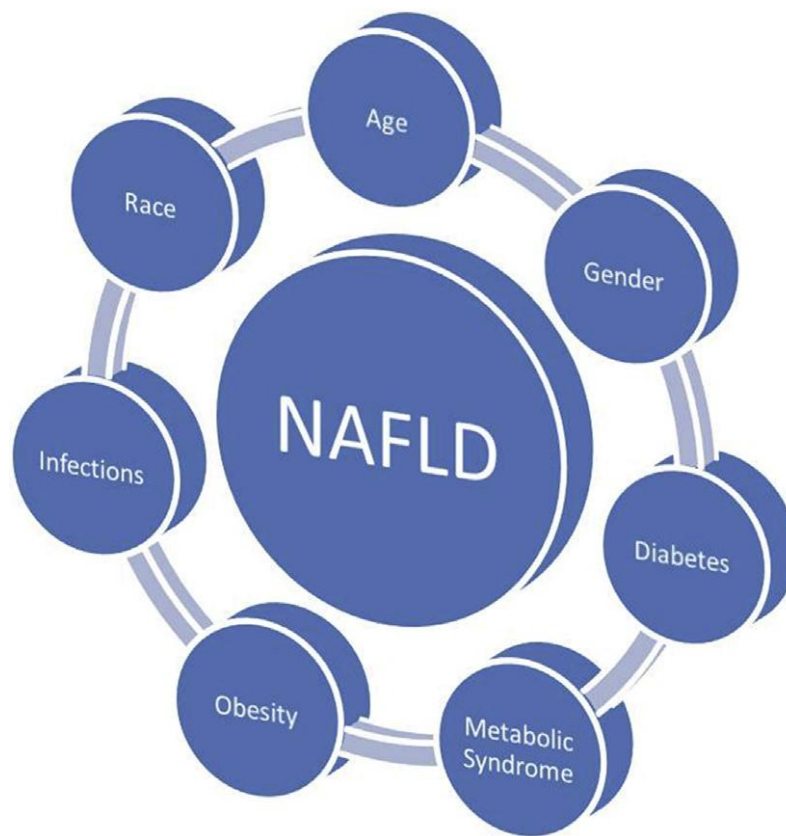
Η αυξητική τάση της NAFLD αντικατοπτρίζει εκείνη του διαβήτη και της παχυσαρκίας ενώ μια πρόσφατη μεταανάλυση συσχέτισε θετικά τον παγκόσμιο επιπολασμό της νόσου με το οικονομικό επίπεδο^{1,7}. (Σχήμα 1.2.2).



Σχήμα 1.2.2 : Ο επιπολασμός της NAFLD σε σχέση με τον επιπολασμό της παχυσαρκίας σε διάφορες χώρες του κόσμου¹.

1.3 Παράγοντες κινδύνου

Αν και η NAFLD αποτελεί μια πολυπαραγοντική νόσο, οι κύριοι παράγοντες κινδύνου είναι μεταβολικοί - όπως παχυσαρκία, υπερλιπιδαιμία, υπέρταση, ινσουλινοαντίσταση, σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 – δημογραφικοί – φύλο, ηλικία, εθνικότητα – γενετικοί – έχουν ενοχοποιηθεί συγκεκριμένοι γονιδιακοί πολυμορφισμοί – ακόμα και περιβαλλοντικοί – διατροφή, φυσική δραστηριότητα, κάπνισμα^{4,7,10,11} (Σχήμα 1.3.1).



Σχήμα 1.3.1 : Κύριοι παράγοντες κινδύνου της NAFLD¹⁰.

Όσον αφορά την ηλικία, έχει παρατηρηθεί ότι η NAFLD εμφανίζεται σε σημαντικά υψηλότερα ποσοστά στους ηλικιωμένους⁷. Για παράδειγμα, μια μελέτη ασθενών – μαρτύρων στην Κίνα που σύγκρινε τα ποσοστά ατόμων με NAFLD, βρήκε πως στην ομάδα >60 ετών το ποσοστό ήταν 26.7% έναντι της ομάδας <60 ετών που ήταν 22.8%⁷. Τα τελευταία χρόνια όμως παρατηρείται ραγδαία αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης της νόσου και στα παιδιά¹². Μια μελέτη στην Αμερική βρήκε πρόσφατα πως 9.6% των παιδιών που συμμετείχαν, με ηλικίες μεταξύ 2 και 19 ετών εμφάνιζαν λιπώδες ήπαρ⁷.

Σχετικά με το φύλο, τα δεδομένα έρχονται σε σύγκρουση μεταξύ τους. Κάποιες μελέτες προτείνουν πως τα ποσοστά είναι υψηλότερα στους άνδρες, ενώ άλλες πως η νόσος είναι πιο κοινή στις γυναίκες. Ενδεικτικά, μια μελέτη των Williams et al κατέληξε στο συμπέρασμα πως οι ασθενείς με NAFLD είναι πιο πιθανό να είναι άνδρες, ενώ αντίθετα μια μελέτη των Agonridge et al σε νεότερα άτομα βρήκε πως η νόσος είναι πιο συχνή ανάμεσα στις γυναίκες^{13,14}.

Αναφορικά με τους μεταβολικούς παράγοντες, είναι γνωστό πως ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί παγκόσμιο πρόβλημα¹⁵. Ο ΣΔ και η ινσουλινοαντίσταση θεωρούνται ισχυρά προγνωστικά στοιχεία για την εξέλιξη της NAFLD σε ίνωση και κίρρωση¹⁶. Τα τελευταία χρόνια, όμως, παρατηρείται η εμφάνιση της NAFLD και σε άτομα χωρίς ΣΔ ή ινσουλινοαντίσταση¹⁶. Σε

κάθε περίπτωση, λόγω της αμφίδρομης σχέσης μεταξύ NAFLD και ΣΔ είναι δύσκολο να ειπωθεί με σιγουριά αν η νόσος παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση ΣΔ ή αν αποτελεί συνέπεια της ύπαρξης ΣΔ¹⁶.

Η παχυσαρκία (που ορίζεται ως Δείκτης Μάζας Σώματος – ΔΜΣ $> 30 \text{ kg/m}^2$) έχει χαρακτηριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ως «παγκόσμια επιδημία», τόσο στα παιδιά και τους εφήβους, όσο και στους ενήλικες⁷. Η NAFLD σχετίζεται ισχυρά με την παχυσαρκία, μάλιστα ο επιπολασμός της νόσου στους παχύσαρκους φτάνει στο 80% ενώ στα άτομα με φυσιολογικό ΔΜΣ και χωρίς άλλους μεταβολικούς παράγοντες κινδύνου ο επιπολασμός είναι 16%⁷. Χαρακτηριστικό είναι, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω πως ο επιπολασμός της νόσου αυξάνει παράλληλα με αυτόν της παχυσαρκίας. Σε κάθε περίπτωση, η νόσος μπορεί να εμφανιστεί και σε άτομα με φυσιολογικό ΔΜΣ σύμφωνα με τη μελέτη των Margariti et al οι οποίοι παρατήρησαν πως 1 στους 8 ασθενείς που συμμετείχε στην έρευνά τους είχε φυσιολογικό ΔΜΣ και οι ασθενείς αυτοί δεν είχαν απαραίτητα ινσουλινοαντίσταση ή μεταβολικές διαταραχές¹⁷.

Σχετικά με το λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών με NAFLD, σύμφωνα με στοιχεία από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (NIH) το 20 με 80% των διαγνωσμένων ασθενών εμφανίζει δυσλιπιδαιμία¹⁸. Πιο συγκεκριμένα, το λιπιδαιμικό προφίλ των ατόμων με NAFLD χαρακτηρίζεται συνήθως από υψηλές τιμές τριγλυκεριδίων ορού, LDL χοληστερόλης, VLDL χοληστερόλης καθώς και από χαμηλές τιμές HDL χοληστερόλης, ενώ πιο συγκεκριμένα όσον αφορά τους ασθενείς με ηπατική στεάτωση, στο 64% αυτών απαντάται υπετριγλυκεριδαιμία και στο 30 - 42% αυτών χαμηλές τιμές HDL χοληστερόλης^{18,19}. Η σχέση της δυσλιπιδαιμίας με την NAFLD είναι επίσης αμφίδρομη με την πρώτη να συνιστά τόσο κλινικό παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση της νόσου όσο και βασική επιπλοκή αυτής, η οποία αυξάνει σημαντικά τον καρδιαγγειακό κίνδυνο των ασθενών. Όπως υποστηρίζουν οι Clark et al άτομα με τιμές τριγλυκεριδίων ορού $>200 \text{ mg/dL}$ εμφανίζουν 3 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου σε σχέση με τα άτομα που έχουν φυσιολογικές τιμές τριγλυκεριδίων, ενώ και τιμές της HDL $< 35 \text{ mg/dL}$ φαίνεται να διπλασιάζουν τον κίνδυνο για την εκδήλωση της νόσου²⁰.

Σχετικά με την υπέρταση, η βιβλιογραφία αναφέρει 64% επιπολασμό αυτής μεταξύ των ασθενών με διεγνωσμένη NAFLD, ενώ επιπλέον, ιδιαίτερα η αυξημένη συστολική πίεση αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση της NAFLD ακόμα και σε άτομα με φυσιολογικό ΔΜΣ και χωρίς ΣΔ¹⁸.

Αν και η NAFLD επηρεάζει άτομα όλων των εθνικοτήτων, υψηλότερος επιπολασμός συναντάται στους Ισπανόφωνους πληθυσμούς (45%), στους Ισπανόφωνους λευκούς (33%) και

στους Αφροαμερικανούς (24%)²¹. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αυτό οφείλεται σε γενετικά αίτια και πιο συγκεκριμένα οι ερευνητές οδηγήθηκαν στη συσχέτιση του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού I148M στο γονίδιο PNPLA3 (patatin-like phospholipase domain-containing protein 3) με την πρόοδο της νόσου. Ο συγκεκριμένος γονιδιακός πολυμορφισμός εμφανίζεται με διαφορετική συχνότητα στις διάφορες φυλές γεγονός που κάνει τους ερευνητές να πιστεύουν πως ίσως αυτό να εξηγεί τις παρατηρούμενες διαφορές συχνότητας εμφάνισης της NAFLD στα άτομα διαφορετικών εθνικοτήτων^{2,22}. Αντίστοιχα, στους Καυκάσιους πληθυσμούς έχουν συσχετιστεί με τη NAFLD, την ηπατική στεάτωση και την ίνωση πολυμορφισμοί στα γονίδια FDFT1, COL13A1, EFCAB4B, PZP ενώ στους Ινδούς ασθενείς στα γονίδια PNPLA3, SAMM50, PARVB και PZP².

Διάφορες υποθέσεις έχουν συνδέσει γονίδια με τη νόσο, τα οποία είτε δρουν προστατευτικά, είτε επιβαρύνουν και καθιστούν το άτομο πιο ευάλωτο στην εμφάνιση στεάτωσης, της NAFLD και πιο γρήγορη εξέλιξη της νόσου. Ενδεικτικά, μια μελέτη έδειξε πως το αλληλόμορφο «Α» του πολυμορφισμού rs2101247 του γονιδίου SCAP ιδιαίτερα στις γυναίκες με μεταβολικό σύνδρομο μπορεί να μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης NAFLD, ο μηχανισμός όμως πίσω από τη δράση του είναι άγνωστος². Ένας άλλος πολυμορφισμός, στο γονίδιο PNPLA-I148M, έχειδειχθεί ότι σχετίζεται με νεκροφλεγμονή, βαριά στεατοηπατίτιδα και προχωρημένη ίνωση ενώ στην Ινδία, υψηλότερη συχνότητα των γονοτύπων C/G και G/C του πολυμορφισμού rs738409 έχει παρατηρηθεί σε άτομα με NAFLD και αυτό σχετίζεται με σημαντικά υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης νηστείας, HOMA-IR, τρανσαμινάσης της αλανίνης και τρανσαμινάσης του ασπαραγινικού². Γενικότερα, γονίδια που έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της NAFLD ή/και της NASH περιλαμβάνουν γονίδια που σχετίζονται πρωταρχικά με το μεταβολισμό της γλυκόζης και την έκκριση ή αντίσταση στην ινσουλίνη (πχ ENPP1, IRS1, KLF6, GCKR, SLC2A1, TCF7L2 και PPARG), γονίδια που εμπλέκονται στον ηπατικό μεταβολισμό των λιπιδίων (πχ DGAT2, SLC25A13, PEMT, MTP, APOC3, APOE, TM6SF2, ATGL και LIPA), γονίδια που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο οξειδωτικού στρες και φλεγμονής (πχ SOD2, NOS2, GCLC, TLR4, CD14, TNF, IL6, ADIPOQ, ADIPOR1, ADIPOR2, και STAT3)²³. Σε κάθε περίπτωση, η συσχέτιση γονιδίων με μια νόσο είναι ένα πολύπλοκο θέμα καθώς η έκφραση ενός γονιδίου επηρεάζεται από πολλούς ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες και η έρευνα στο συγκεκριμένο τομέα έχει ακόμα πολλά να φέρει στο φως.

Όσον αφορά τους περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου, οι οποίοι περιλαμβάνουν τον τρόπο ζωής, δηλαδή τη διατροφή, τη φυσική δραστηριότητα και άλλες συνήθειες όπως το κάπνισμα, έχουν αποδειχθεί κρίσιμοι για την ανάπτυξη και την εξέλιξη της NAFLD. Η

υιοθέτηση ενός μη υγιεινού τρόπου ζωής φαίνεται να σχετίζεται με τα συνεχώς αυξανόμενα ποσοστά της νόσου⁷. Η βαρύτητα της NAFLD αυξάνεται όσο μειώνεται η φυσική δραστηριότητα⁷. Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει την καθιστική ζωή με αυξημένο κίνδυνο για NAFLD ή NASH. Πιο συγκεκριμένα, μια μελέτη εξέτασε τη συνήθη φυσική δραστηριότητα 191 εργαζόμενων σε μια κλινική στην Ιταλία και τα ευρήματά της έδειξαν πως μόνο το 2% των ατόμων με φυσική δραστηριότητα στο πρώτο τεταρτημόριο είχαν NAFLD ενώ ο επιπολασμός της νόσου κυμαινόταν στο 11 με 25% στα χαμηλότερα τεταρτημόρια²⁴. Μια άλλη μελέτη στο Ισραήλ που αποτελούσε τμήμα μεγαλύτερης επιδημιολογικής μελέτης διαπίστωσε πως η φυσική δραστηριότητα ως μέρος του ελεύθερου χρόνου συσχετιζόταν με μειωμένο επιπολασμό της NAFLD²⁵.

Από την άλλη πλευρά, η βιβλιογραφία υποστηρίζει πως τόσο η ποσότητα προσλαμβανόμενης ενέργειας όσο και η σύσταση της διατροφής παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο. Πιο συγκεκριμένα, μια διατροφή πλούσια σε υδατάνθρακες μπορεί να επιβαρύνει τους ασθενείς με NAFLD ενώ έχει παρατηρηθεί πως διατροφή πλούσια σε λιπαρά αποτελεί ξεχωριστό παράγοντα κινδύνου για την εξέλιξη σε στεατοηπατίτιδα⁷. Επιπλέον, το είδος των λιπαρών που περιέχονται στη διατροφή αποτελεί κλειδί για την παθογένεση της NAFLD και πιο συγκεκριμένα τα μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα έχει καταδειχθεί ότι έχουν ευεργετικό ρόλο⁷. Τέλος, η «δυτικού τύπου» διατροφή που χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση κόκκινου κρέατος, επεξεργασμένων δημητριακών και ζάχαρης αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης μεταβολικού συνδρόμου, άρα και της NAFLD, ενώ αντίθετα προσκόλληση σε διατροφικά πρότυπα όπως η Μεσογειακή Διατροφή, που είναι πλούσια σε λαχανικά, φρούτα, δημητριακά ολικής αλέσεως, όσπρια και ψάρια φαίνεται να δρα προστατευτικά⁷. Όσον αφορά τα μικροθρεπτικά συστατικά, καθότι το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στην παθογένεση και την εξέλιξη της νόσου, όπως περιγράφεται αναλυτικότερα σε επόμενη ενότητα, ένα χαμηλό σε αντιοξειδωτικά διατροφικό πρότυπο το οποίο χαρακτηρίζεται πιθανά από χαμηλή διαιτητική πρόσληψη βιταμίνης E ή/και ψευδαργύρου, έχει συσχετιστεί θετικά με τον αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου²⁶.

Τέλος, το κάπνισμα αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου εμφάνισης της NAFLD καθώς το 2011 οι Zein et al δημοσίευσαν την πρώτη μελέτη τα αποτελέσματα της οποίας υποστήριξαν ότι το κάπνισμα πιθανά σχετίζεται με τη σοβαρότητα της ίνωσης στους ασθενείς με NAFLD, επισημαίνοντας ότι μπορεί να επιταχύνει την εξέλιξη της νόσου²⁷.

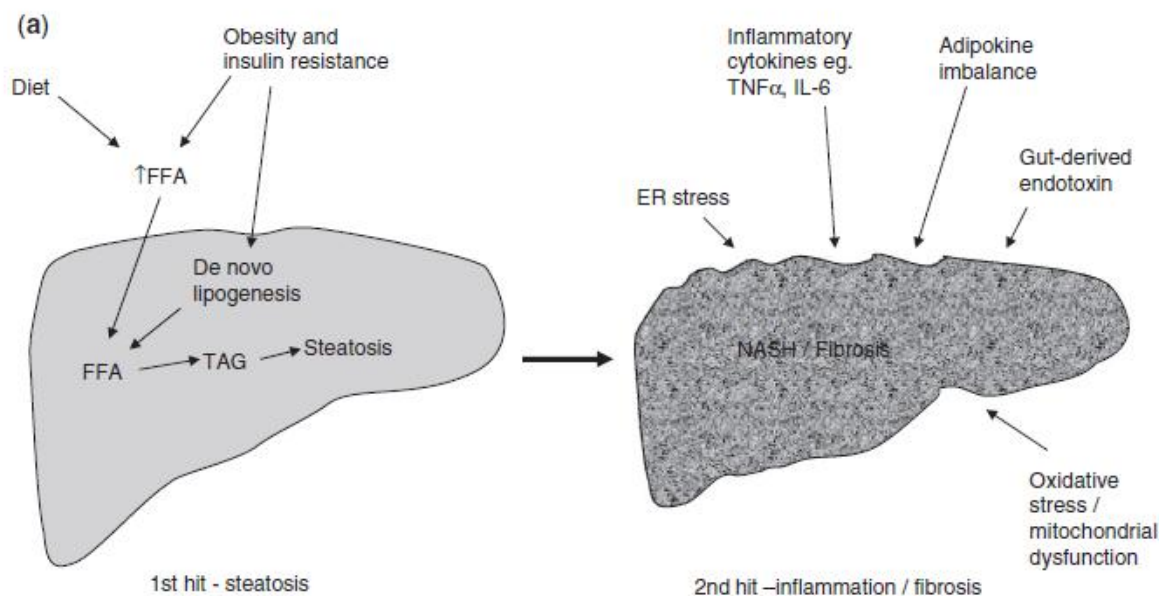
Φυσικά, είναι απαραίτητες πολλές ακόμα έρευνες για να συσχετιστούν με σιγουριά συγκεκριμένες συμπεριφορές με τη NAFLD.

1.4 Παθοφυσιολογία

Οι μηχανισμοί που επλέκονται στην παθοφυσιολογία της NAFLD είναι πολύπλοκοι και όχι επαρκώς ξεκαθαρισμένοι ακόμα. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος προς την κατανόηση των μηχανισμών αυτών⁴.

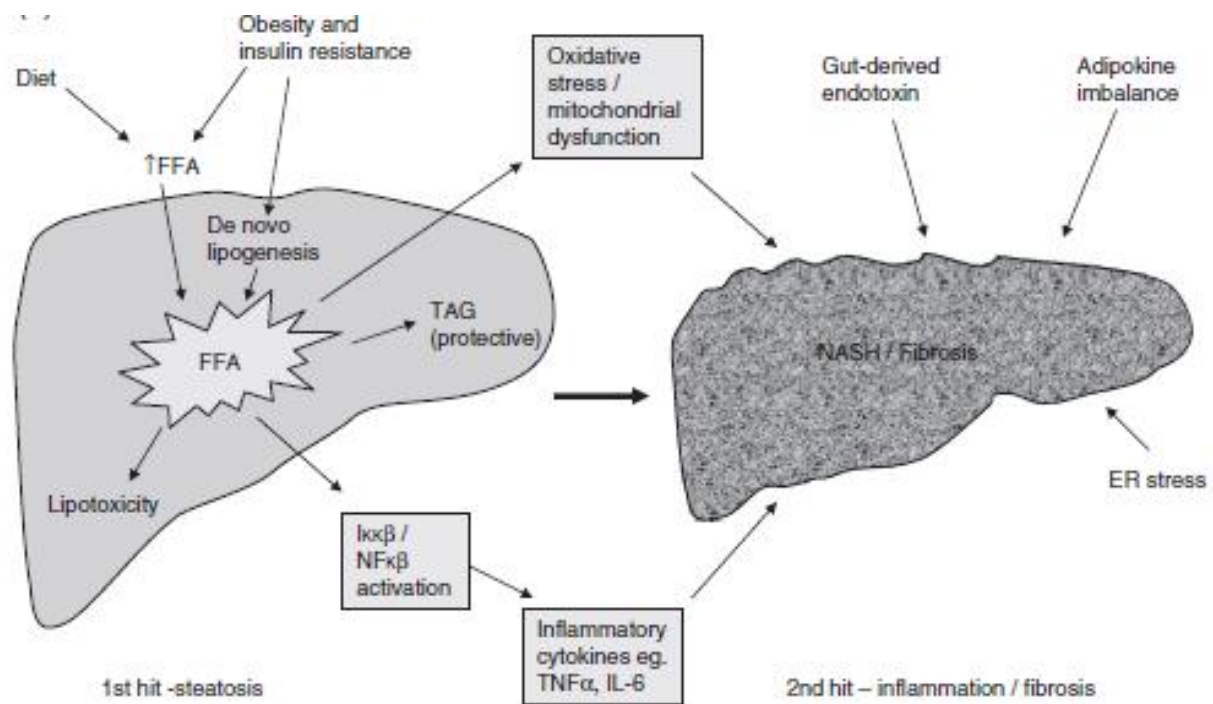
1.4.1 Θεωρίες

Το 1998 οι Day και James διατύπωσαν ως πιθανή εξήγηση της παθογένεσης της νόσου τη θεωρία των «δύο χτυπημάτων» βασιζόμενοι στα ευρήματα της μελέτης του Berson και των συνεργατών του σχετικά με την υπεροξείδωση των λιπιδίων στην ηπατική βλάβη²⁸. Ουσιαστικά, αυτή η θεωρία προτείνει πως το «πρώτο χτύπημα» είναι η ηπατική στεάτωση λόγω συσσώρευσης TG στα ηπατοκύτταρα, η οποία εγείρει την ευαισθησία του ήπατος σε διάφορα πιθανά «δεύτερα χτυπήματα»²⁸. Η συσσώρευση TG στο ήπαρ μπορεί να είναι αποτέλεσμα πολλών παραγόντων, όπως αυξημένη πρόσληψη λιπαρών οξέων από τη διατροφή, αυξημένη περιφεριακή λιπόλυση λόγω ινσουλιναντίστασης, και αυξημένη ηπατική *de novo* λιπογένεση λόγω υπερινσουλιναϊμίας²⁹. Επιπλέον, πιθανά να εμπλέκεται στη συσσώρευση των TGs και η μειωμένη οξείδωση των λιπαρών οξέων²⁹. Τα «δεύτερα χτυπήματα» με τη σειρά τους οδηγούν σε φλεγμονή, ίνωση και κυτταρικό θάνατο, χαρακτηριστικά της NASH²⁸. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω διαφόρων μηχανισμών που περιλαμβάνουν α) υπεροξείδωση, β) οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά τις β- και ω-οξειδώσεις των ελεύθερων λιπαρών οξέων (Free Fatty Acids - FFAs), γ) ποσοτικές και ποιοτικές αλλαγές στον εντερικό μικροβιόκοσμο, δ) ενεργοποίηση των ηπατικών κυττάρων, ε) δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, στ) παραγωγή ενδοτοξινών²⁹ (Σχήμα 1.4.1).



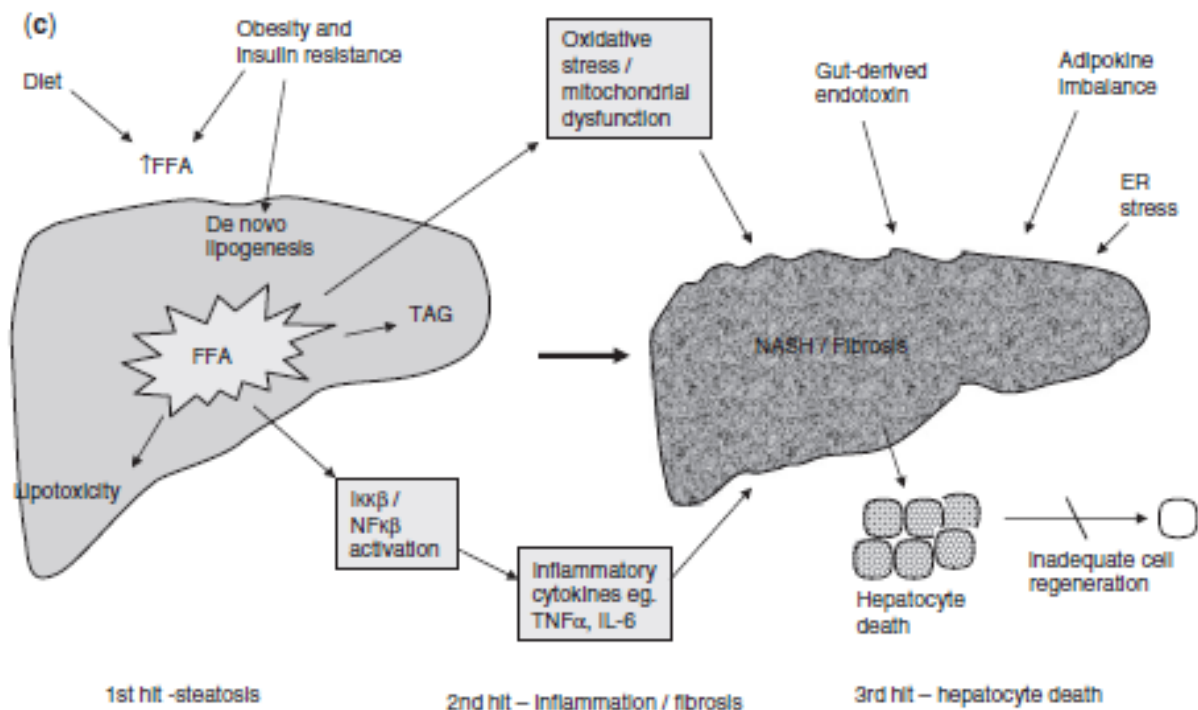
Σχήμα 1.4.1 : Η παραδοσιακή θεωρία των «δύο χτυπημάτων»³⁰.

Αργότερα, η θεωρία αυτή τροποποιήθηκε καθώς άρχισε να αναγνωρίζεται ο ρόλος των FFAs, ο οποίος είναι να επάγουν την ηπατική βλάβη, κάτι που οδήγησε στην «τροποποιημένη θεωρία των δύο χτυπημάτων»³⁰. Η θεωρία αυτή υποστηρίζει ότι στην παχυσαρκία και την ινσουλινοαντίσταση αυξάνεται η εισροή FFAs στο ήπαρ. Τα λιπαρά αυτά οξέα υφίστανται β-οξείδωση και εστεροποιούνται με γλυκερόλη, παράγοντας TGs και με αυτό τον τρόπο προκαλείται ηπατική συσσώρευση λίπους. Υπάρχουν σημαντικά δεδομένα πλέον που υποστηρίζουν ότι τα FFAs μπορούν άμεσα να προκαλέσουν τοξικότητα μέσω αύξησης του οξειδωτικού στρες και μέσω ενεργοποίησης μονοπατιών φλεγμονής³⁰ (Σχήμα 1.4.2).



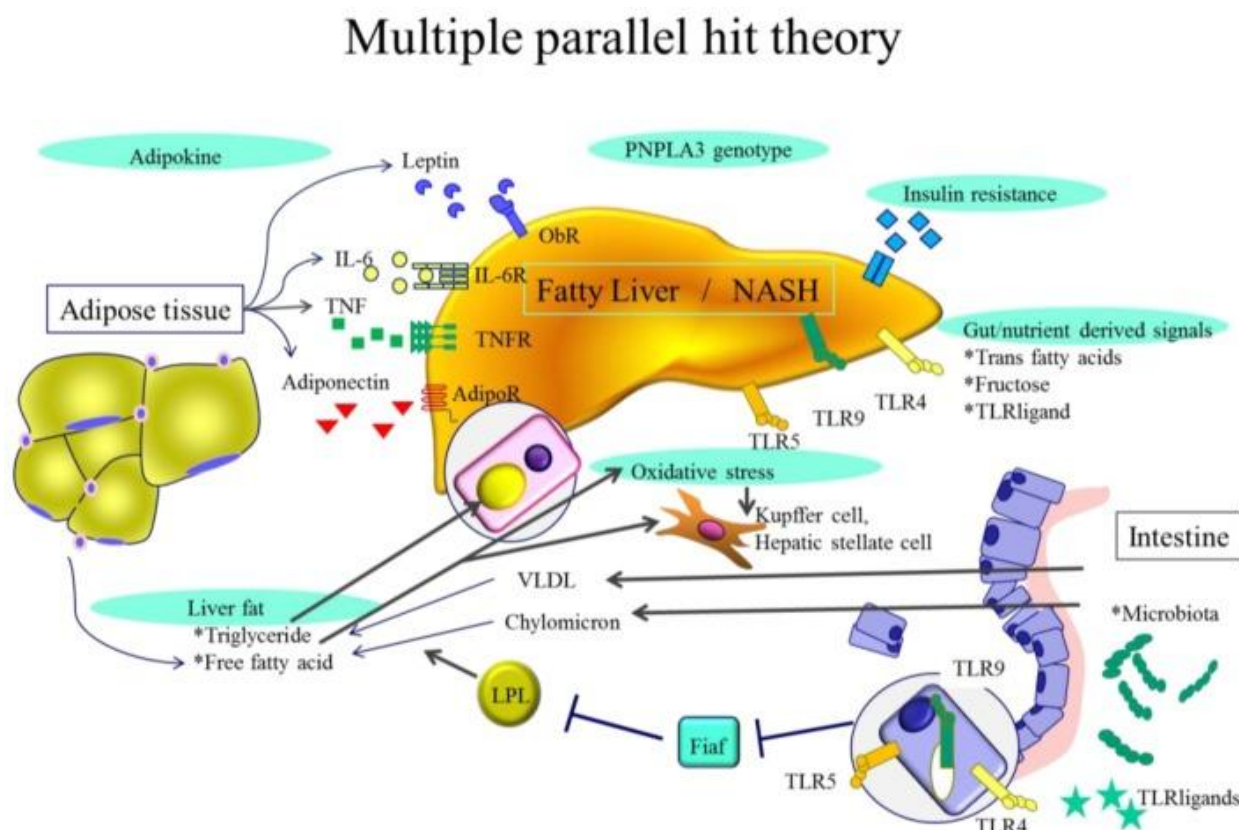
Σχήμα 1.4.2 : Η «τροποποιημένη θεωρία των δύο χτυπημάτων»³⁰.

Στη συνέχεια, η θεωρία εξελίχθηκε ακόμα περισσότερο καθώς προστέθηκε σε αυτή ένα ακόμα στοιχείο ώστε να συμπεριληφθεί και η μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού των ηπατικών κυττάρων λόγω οξειδωτικού στρες και έτσι προέκυψε η θεωρία των «τριών χτυπημάτων»³⁰ (Σχήμα 1.4.3)



Σχήμα 1.4.3 : Η θεωρία των «τριών χτυπημάτων»³⁰.

Τέλος, η πιο πρόσφατη και ακριβής θεωρία για την περιγραφή της παθογένεσης της νόσου υποστηρίζει πως η ηπατική στεάτωση είναι αποτέλεσμα πολλών παραγόντων που δρουν παράλληλα και όχι διαδοχικά και οδηγούν στη συνέχεια σε φλεγμονή και σε NASH³¹ (Σχήμα 1.4.4).



Σχήμα 1.4.4 : Η θεωρία των «πολλαπλών χτυπημάτων»³².

Παρακάτω, αναλύονται οι πιο βασικοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί ανάπτυξης NAFLD και εξέλιξης σε NASH.

1.4.2 Ινσουλινοαντίσταση και NAFLD

Οι ασθενείς με NAFLD εμφανίζουν μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη, τόσο στους μύες όσο και στο ήπαρ αλλά και στο λιπώδη ιστό, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της νόσου⁴. Λόγω της ινσουλινοαντίστασης ο λιπώδης ιστός γίνεται ανθεκτικός στην αντιλιπολυτική επίδραση της ινσουλίνης με αποτέλεσμα την περιφερική λιπόλυση η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε αύξηση εισροής των FFAs στο ήπαρ και παράλληλα σε *de novo* λιπογένεση⁴. Επιπλέον, η συσσώρευση λιπιδίων στα β-κύτταρα του παγκρέατος διαταράσσει την έκκριση ινσουλίνης και αλλάζει την έκφραση του γονιδίου PPAR-α (peroxisome

proliferator-activated receptor-a), της γλυκοκινάσης, του μεταφορέα γλυκόζης-2 (glucose transporter-2, GLUT 2) τα οποία μπορεί να οδηγήσουν σε ινσουλινοαντίσταση ως αποτέλεσμα της απόπτωσης των παγκρεατικών β-κυττάρων λόγω των FFAs^{4,28}. Αξίζει να σημειωθεί ότι πολλοί ακόμη παράγοντες εμπλέκονται στην αλληλουχία σημάτων της ινσουλίνης και συνεισφέρουν στην ινσουλινοαντίσταση, όπως είναι ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (Tumour necrosis factor-α, TNF-α), ο πυρηνικός παράγοντας-kB (Nuclear factor-kB, NF-kB), το κυτόχρωμα CYP2E1 και άλλα³⁰.

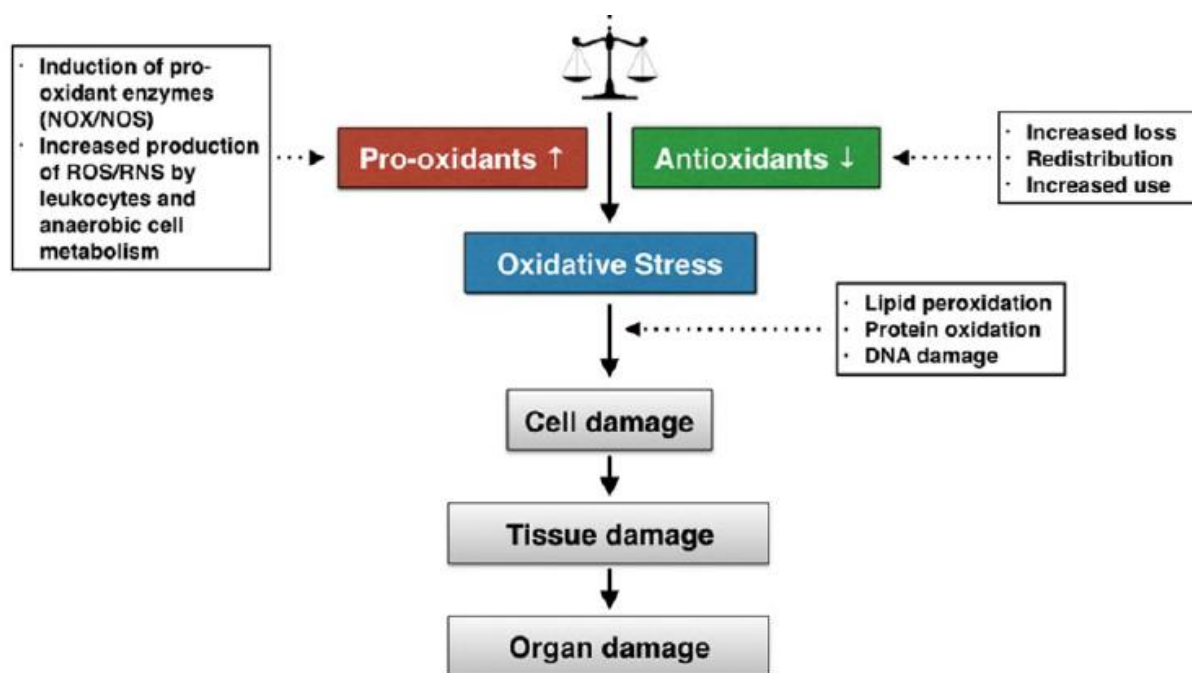
1.4.3 *De novo* λιπογένεση

Η λιπογένεση στο ήπαρ αυξάνεται λόγω της παρατηρούμενης στεάτωσης που αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό της NAFLD²⁸. Ο ρόλος της *de novo* λιπογένεσης στην ανάπτυξη ηπατικής στεάτωσης υποστηρίζεται από δεδομένα μιας πρόσφατης έρευνας σε άτομα με μεταβολικό σύνδρομο και υψηλό ποσοστό ηπατικού λίπους και η οποία έδειξε πως τα άτομα αυτά είχαν τριπλάσιο ρυθμό *de novo* σύνθεσης FFAs²⁸. Η *de novo* λιπογένεση αυξάνεται με διατροφή πλούσια σε υδατάνθρακες και χαμηλή σε λίπη, η οποία οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων TGs στο αίμα, τα οποία προκαλούν αύξηση της σύνθεσης και της έκκρισης VLDL στο ήπαρ και με αυτό τον τρόπο επέρχεται ηπατική υπερτριγλυκεριδαιμία και ηπατική στεάτωση⁴. Επιπλέον, η χρόνια υπερινσουλιναμία που παρατηρείται στη NAFLD προκαλεί ηπατική *de novo* λιπογένεση λόγω διέγερσης των λιπογενετικών μεταγραφικών παραγόντων⁴.

Τέλος, η βιβλιογραφία αναφέρει πως δύο αδιποκίνες που παίζουν σημαντικό ρόλο στη νόσο μέσω της ικανότητάς τους να επηρεάζουν την ίνωση στο ήπαρ είναι η λεπτίνη και η αδιπονεκτίνη⁶. Η αδιπονεκτίνη είναι μια αδιποκίνη που παράγεται κυρίως στο λιπώδη ιστό, έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, βοηθά στην ευαισθητοποίηση στην ινσουλίνη και προστατεύει από την ίνωση⁶. Η ινσουλινοαντίσταση όμως προκαλεί μείωση των επιπέδων της αδιπονεκτίνης, ενώ μια μελέτη σε άτομα με NASH έδειξε μείωσή της ακόμα και απουσία ινσουλινοαντίστασης⁶. Η λεπτίνη από την άλλη πλευρά, είναι μια αδιποκίνη που προάγει την ηπατική ίνωση καθώς αυξάνει τη σύνθεση κολλαγόνου από τα ηπατικά κύτταρα, μέσω ενεργοποίησης της έκφρασης του παράγοντα TGF-β (transforming growth factor-β)^{6,33}. Επιπλέον, η λεπτίνη ρυθμίζει τη διατροφική πρόσληψη και το μεταβολισμό του λίπους μέσω του κεντρικού νευρικού συστήματος⁶. Οι δράσεις της λεπτίνης και της αδιπονεκτίνης είναι αντίστροφες καθώς η δεύτερη ανταγωνίζεται την πρώτη στην ηπατική ίνωση και καθώς η τελευταία προχωρά, τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης μειώνονται⁶.

1.4.4 Οξειδωτικό στρες και NAFLD

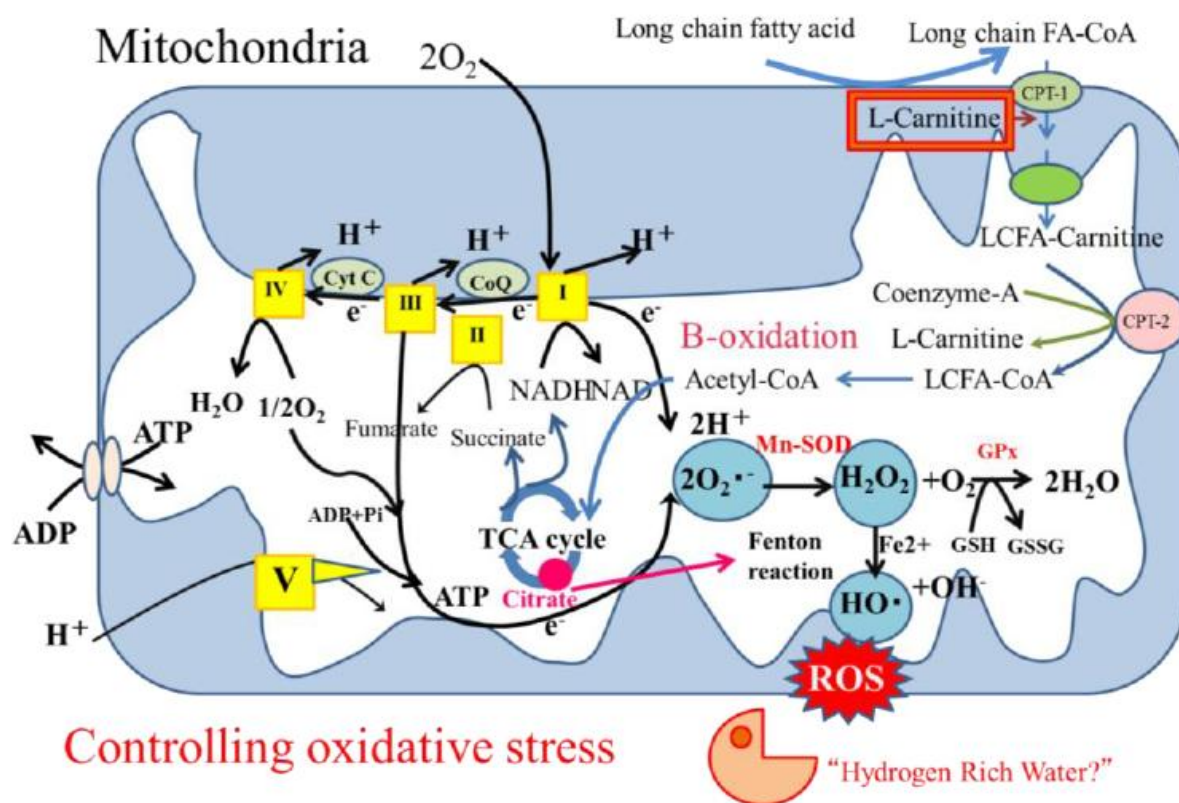
Η δημιουργία ελεύθερων ριζών στα βιολογικά συστήματα έχει διττό ρόλο, με ευεργετικά αλλά και επιβαρυντικά για τον οργανισμό αποτελέσματα. Όσο τα επίπεδα των ριζών διατηρούνται σε χαμηλά ως μέτρια επίπεδα βοηθούν στην άμυνα ενάντια σε μολυσματικούς παράγοντες και παίρνουν μέρος σε αρκετά κυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος³⁴. Τα επιβλαβή αποτελέσματα των ROS προκύπτουν όταν η υπερπαραγωγή αυτών οδηγεί σε συσσώρευση ριζών και επομένως σε οξειδωτικό στρες λόγω της αδυναμίας του κυττάρου να αντεπεξέλθει στις αυξημένες αντιοξειδωτικές απαιτήσεις³⁴ (Σχήμα 1.4.4.1).



Σχήμα 1.4.4.1 : Ο μηχανισμός με τον οποίο το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε οργανικές βλάβες³⁵.

Το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στις διεργασίες της γήρανσης, της καρκινογένεσης και στην πρόοδο της αθηροσκλήρωσης, του Alzheimer και άλλων νευροεκφυλιστικών ασθενειών^{32,34}. Η β-οξείδωση που γίνεται φυσιολογικά στα μιτοχόνδρια των ηπατικών κυττάρων διαταράσσεται λόγω της NAFLD, εξαιτίας της συσσώρευσης των FFAs, η οποία προκαλεί την «υπερφόρτωση» των μιτοχονδρίων και την αδυναμία αυτών να αντιμετωπίσουν το συνεχώς αυξανόμενο φορτίο ROS³⁰ (Εικόνα 1.4.4.1). Η διατάραξη της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας που προκαλείται από μιτοχονδριακές, υπεροξυσωμικές και μικροσωμικές ελεύθερες ρίζες (Reactive oxygen/nitrogen species, ROS/RNS) έχει ως αποτέλεσμα την απόπτωση και την καταστροφή του πυρηνικού και μιτοχονδριακού DNA^{28,32}. Η μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα συνεισφέρει στην εξέλιξη

τόσο της NASH όσο και της ηπατοκαρκινογένεσης, ενώ πιο προχωρημένα στάδια της νόσου χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο βαθμό οξειδωτικού στρες^{30,32}.



Εικόνα 1.4.4.1 : Η παραγωγή ελεύθερων ριζών από τα μιτοχόνδρια³².

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν την ιδέα ότι το οξειδωτικό στρες μπορεί να είναι η κύρια αιτία της ηπατικής συσσώρευσης λίπους και της επερχόμενης ηπατικής βλάβης και ότι οι ROS πιθανά να εμπλέκονται ακόμη και στην ανάπτυξη της ίνωσης²⁸. Οι ρίζες αυτές μπορούν να ξεκινήσουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων μέσω στοχοποίησης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και να δημιουργήσουν με αυτό τον τρόπο πολύ δραστικά αλδεϋδικά προϊόντα όπως η 4-υδροξυ-2-νονενάλη και η μηλονική διαλδεϋδη, οι οποίες δυνητικά μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στους ιστούς λόγω διάχυσης των ROS/RNS στον εξωκυτταρικό χώρο²⁸.

1.4.5 Φλεγμονή και NAFLD

Ως φλεγμονή ορίζεται η φυσική αντίδραση που ελέγχεται από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού και στόχο έχει την προστασία από μολύνσεις παθογόνων οργανισμών ή του περιβάλλοντος, αλλά και την προώθηση της ίασης πληγών και τραυμάτων³⁶. Παρόλα αυτά, η χρόνια φλεγμονή είναι καταστροφική για τον οργανισμό, καθώς η υπερπαραγωγή και η υπερέκθεση σε φλεγμονώδεις παράγοντες (κυτταροκίνες, προσταγλανδίνες, δραστικές ρίζες

οξυγόνου και αζώτου) δύναται να οδηγήσει σε αλλαγές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, απόπτωση, αγγειογένεση, να διαταράξει τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, να αυξήσει τις βλάβες στο DNA και να οδηγήσει σε καρκίνο³⁶.

Η παρουσία στεάτωσης είναι στενά συνδεδεμένη με τη χρόνια ηπατική φλεγμονή, κάτι που ελέγχεται μερικώς από την ενεργοποίηση του NF-κΒ, η αυξημένη δράση του οποίου σχετίζεται με αυξημένη ηπατική έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως ο TNF-α, η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και η ιντερλευκίνη 1β (IL-1β)³⁰. Το μονοπάτι του NF-κΒ στα ηπατοκύτταρα δύναται να ενεργοποιηθεί από τα FFAs κάτι που μπορεί να εξηγήσει γιατί η συσσώρευση αυτών συνεισφέρει στην ανάπτυξη φλεγμονής, ενώ η μετατροπή των λιπαρών οξέων σε TGs μπορεί να χρησιμεύει ως προστατευτικό μέτρο ενάντια στην τοξική συσσώρευση των πρώτων στο ήπαρ^{6,30}.

Στους ασθενείς με NASH είναι αυξημένα τα επίπεδα του TNF-α τόσο στον ορό του αίματος όσο και στο ήπαρ και μάλιστα αυτά αυξάνονται όσο πιο προχωρημένο είναι το στάδιο της νόσου³⁰. Εκτός από την προφλεγμονώδη δράση του, ο TNF-α προάγει και την ινσουλινοαντίσταση^{28,30}. Με παρόμοιο τρόπο η IL-6 του ορού είναι αυξημένη σε ζωικά μοντέλα και σε ανθρώπους με ινσουλινοαντίσταση και NAFLD και μάλιστα τα επίπεδα αυξάνονται αναλογικά με την πρόοδο της ηπατικής φλεγμονής και ίνωσης³⁰. Τέλος, η βιβλιογραφία υποστηρίζει πως η φλεγμονή και η ενεργοποίηση του NF-κΒ μπορούν να προάγουν την καρκινογένεση και πως η χρόνια φλεγμονή με ηπατική στεάτωση μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα³⁰.

1.4.6 Στρες του ενδοπλασματικού δικτύου κ.α.

Το ενδοπλασματικό δίκτυο είναι ένα μεγάλο δυναμικό δίκτυο υπεύθυνο για τη σύνθεση, την αναδίπλωση/επισκευή και την κυκλοφορία πολλών πρωτεϊνών²⁸. Κάτω από παθολογικές ή/και στρεσογόνες καταστάσεις, έχει παρατηρηθεί ότι η ικανότητα του ενδοπλασματικού δικτύου για τις παραπάνω διεργασίες μειώνεται, ενώ η ανάγκη για πρωτεϊνοσύνθεση αυξάνεται²⁸. Αυτή η ανισορροπία μεταξύ των αναγκών σε πρωτεΐνες και της δυνατότητας του ενδοπλασματικού δικτύου να αντεπεξέλθει ονομάζεται «στρες του ενδοπλασματικού δικτύου», το οποίο σε συνδυασμό με τη φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες, την αντίσταση στην ινσουλίνη και την απόπτωση, φαίνεται να εμπλέκεται στη σύνθεση των λιπιδίων μεταξύ των οποίων ο μεταβολισμός της χοληστερόλης²⁸.

Παράλληλα, μελέτες σε ασθενείς με NAFLD δείχνουν πως η απόπτωση των ηπατικών κυττάρων είναι σύνηθες παθολογικό χαρακτηριστικό⁶. Μάλιστα, υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της

απόπτωσης, του σταδίου ίνωσης και του βαθμού φλεγμονής, ενώ όλο και περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι η συσσώρευση λίπους στα ηπατοκύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της απόπτωσης⁶. Από την άλλη πλευρά, η απόπτωση πιθανά να σχετίζεται άμεσα και με την ίνωση, αφού η βιβλιογραφία υποστηρίζει πως τα ηπατικά κύτταρα απορροφούν τα αποπτωτικά τμήματα και έτσι επάγεται ο μηχανισμός της ίνωσης⁶.

Τέλος, τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότεροι ερευνητές στρέφονται στη διερεύνηση της σχέσης του εντερικού μικροβιόκοσμου με διάφορες ασθένειες. Έτσι, έχει γίνει γνωστό πως η εντερική μικροχλωρίδα παίζει σημαντικό ρόλο στην NAFLD, στη NASH, στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα κ.α.³². Ο εντερικός μικροβιόκοσμος ρυθμίζει μεταξύ άλλων και τη διαπερατότητα του εντερικού φραγμού, επομένως αλλαγές στη σύστασή του μπορούν να επηρεάσουν τη διαπερατότητα αυτή³². Οι ενδοτοξίνες που παράγονται από τον εντερικό μικροβιόκοσμο μπορούν να μεταφερθούν στο ήπαρ μέσω του εντερικού φραγμού και να οδηγήσουν σε συσσώρευση τοξικών βακτηριακών υποπροϊόντων στο ήπαρ, η οποία δύναται να προκαλέσει ηπατική φλεγμονή, μέσω ενεργοποίησης του TNF- α ^{28,32}.

ΚΕΦ.2: ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ

2.1 Γενικά

Ο όρος «ιχνοστοιχεία» αναφέρεται στα χημικά στοιχεία που βρίσκονται στον ανθρώπινο οργανισμό σε πολύ μικρές ποσότητες -«ίχνη»- και έχουν σημαντικές επιδράσεις στις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού³⁷. Από τα φυσικώς απαντώμενα χημικά στοιχεία, 26 θεωρούνται απαραίτητα για την υγεία των ανθρώπων ή των ζώων³⁷. Εκτός από τη διατροφική πρόσληψη, η περιβαλλοντική αλληλεπίδραση δύναται να επηρεάσει την απορρόφηση των ιχνοστοιχείων, τα οποία μπορεί να φτάσουν σε τοξικά υψηλά επίπεδα ή σε ανεπάρκειες/ελλείψεις³⁷.

Αν και κάποια ιχνοστοιχεία θεωρούνται απαραίτητα, όλα τα ιχνοστοιχεία μπορούν να παίξουν κάποιο ρόλο στην υγεία του ανθρώπου, είτε θετικό είτε επιβαρυντικό. Για παράδειγμα, ιχνοστοιχεία όπως ο ψευδάργυρος (Zn), το σελήνιο (Se) και ο χαλκός (Cu) έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, ενώ εμπλέκονται σε πολλές μεταβολικές διεργασίες του οργανισμού³⁸. Ακόμα, ο Cu, ο Zn και ο σίδηρος (Fe) εμπλέκονται στη φλεγμονή, στην παραγωγή κυτταροκινών και στην καλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ αποτελούν και ενζυμικούς συμπαράγοντες ή ρυθμιστές μεταγραφικών παραγόντων³⁷.

Αντίθετα, ιχνοστοιχεία όπως το αρσενικό (As), το κάδμιο (Cd), το θάλλιο (Tl) κ.α., είναι τοξικά για τον οργανισμό εκδηλώνοντας είτε οξεία είτε χρόνια τοξικότητα, καθώς έχουν την ικανότητα να αντικαθιστούν τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία, να συσσωρεύονται σε διάφορα όργανα, να επεμβαίνουν στις μεταβολικές διεργασίες και έτσι να προκαλούν νευρολογικές διαταραχές, καρκίνο ή ακόμη και θάνατο^{39,40,41}.

Παράλληλα, πολλές νόσοι έχει βρεθεί ότι είναι αποτέλεσμα ανεπάρκειας ή έλλειψης ιχνοστοιχείων, όπως είναι η σιδηροπενική αναιμία, η θυρεοειδική βρογχοκήλη λόγω ανεπάρκειας ιωδίου και νευρολογικές, ανοσολογικές και ορμονολογικές διαταραχές λόγω ανεπάρκειας Zn, ενώ άλλες νόσοι, όπως διάφορες ηπατοπάθειες επηρεάζουν τα επίπεδα ιχνοστοιχείων του οργανισμού, όπως για παράδειγμα η παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων Se στους ασθενείς με ηπατίτιδα C^{38,41}.

Η επαρκής πρόσληψη ιχνοστοιχείων μέσω της διατροφής είναι απαραίτητη ώστε να αποφευχθούν καταστάσεις ανεπάρκειας⁴¹. Η έκθεση τόσο σε τοξικά όσο και σε απαραίτητα ιχνοστοιχεία γίνεται μέσω της διατροφής και μέσω απορρόφησης από το δέρμα, για το γενικό πληθυσμό⁴¹. Για κανένα από τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία δεν είναι αναγκαία η πρόσληψη μέσω της εισπνοής, αλλά η έκθεση σε τοξικά ιχνοστοιχεία μέσω αυτής γίνεται κυρίως λόγω της

ρύπανσης του ατμοσφαιρικού αέρα⁴¹. Τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας είναι τα εξής: χρώμιο (Cr), κοβάλτιο (Co), χαλκός (Cu), σίδηρος (Fe), μολυβδένιο (Mo), σελήνιο (Se), ψευδάργυρος (Zn), μαγγάνιο (Mn), και ιώδιο (I)⁴¹.

Στη συνέχεια αναλύονται οι πιο βασικές δράσεις των ιχνοστοιχείων, ευεργετικές και επιβαρυντικές, για τον ανθρώπινο οργανισμό.

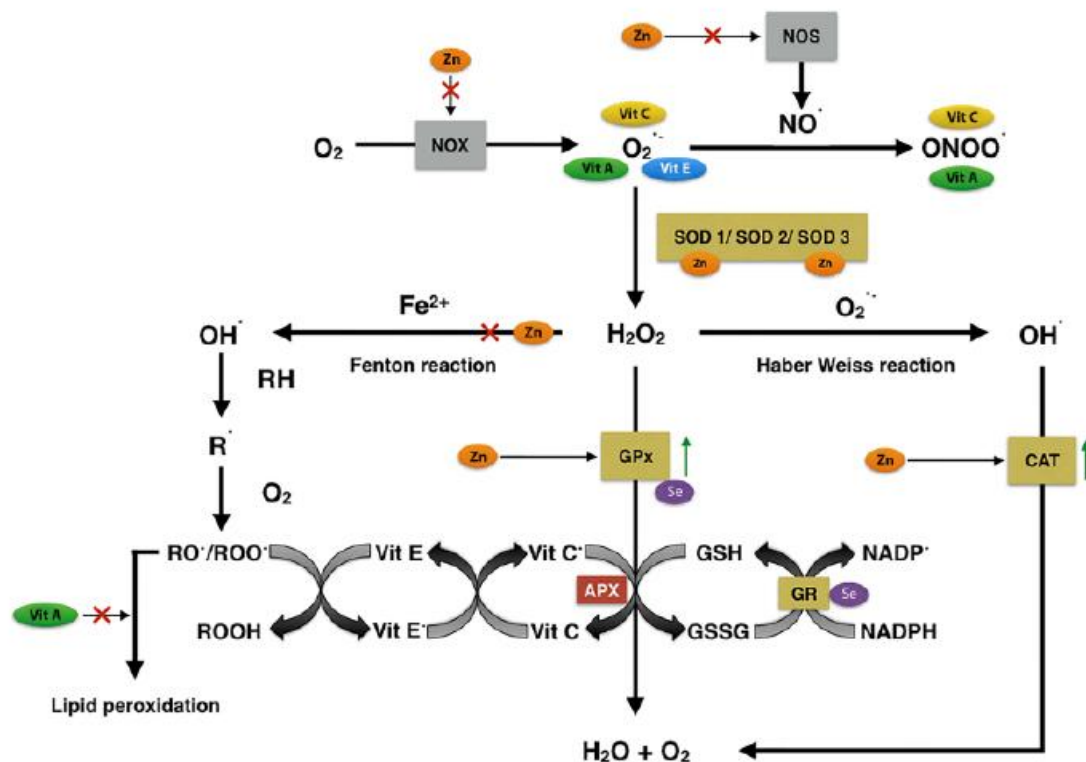
2.2 Ευεργετικές δράσεις ιχνοστοιχείων

Τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έχουν αρκετές ευεργετικές δράσεις για τον οργανισμό, όταν τα επίπεδα τους είναι εντός του φυσιολογικού εύρους και επομένως δεν υπάρχει κίνδυνος τοξικότητας. Οι βασικότερες δράσεις αναφέρονται στη συνέχεια.

2.2.1 Αντιοξειδωτική δράση

Ως «αντιοξειδωτικό» ορίζεται κάθε ουσία που εμποδίζει άμεσα ή έμμεσα το οξειδωτικό στρες, με έναν ή/και περισσότερους από τους παρακάτω μηχανισμούς: α) εμποδίζει τη μεταφορά ελεύθερων ηλεκτρονίων μεταξύ μοριακού οξυγόνου και οργανικών ενώσεων, β) σταθεροποιεί τις οργανικές ρίζες ή γ) σταματά τις αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης των οργανικών μορίων³⁵. Το αντιοξειδωτικό σύστημα του οργανισμού αποτελείται από ένζυμα και ενώσεις οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους³⁵.

Τα αντιοξειδωτικά ιχνοστοιχεία, όπως το Se και ο Zn, αποτελούν ενζυμικούς συμπαράγοντες και εμπλέκονται σε πολλές διεργασίες, έχοντας πολύπλοκο ρόλο που περιλαμβάνει μεταξύ άλλων αναστολή των προοξειδωτικών ενζύμων συνθάση του νιτρικού οξειδίου (NOS) και οξειδάση του φωσφορικού νικοτιναμιδοαδενοσινοδινουκλεοτιδίου (NOX), επαγωγή δράσης αντιοξειδωτικών ενζύμων και δράση ως συμπαράγοντες αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών³⁵ (Σχήμα 2.2.1.1).



Σχήμα 2.2.1.1 : Το ανθρώπινο αντιοξειδωτικό δίκτυο, όπου φαίνεται μεταξύ άλλων η δράση των αντιοξειδωτικών ιχνοστοιχείων ψευδαργύρου και σεληνίου³⁵.

Πιο συγκεκριμένα, το σελήνιο είναι ένα από τα πιο μελετημένα ιχνοστοιχεία καθώς αποτελεί συμπαράγοντα για πάνω από 30 σεληνοπρωτεΐνες, στις οποίες ενσωματώνεται με τη μορφή της σεληνοκυστεΐνης^{34,35}. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν πολλαπλούς βιολογικούς ρόλους, ιδιαίτερα στην οξειδωαναγωγική μεταγωγή σήματος, την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού, το μεταβολισμό των θυρεοειδικών ορμονών και στην ανοσολογική απόκριση του οργανισμού³⁵. Από τις σεληνοπρωτεΐνες, περισσότερες από το 50% εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση, εκ των οποίων οι πιο γνωστές είναι οι οικογένειες των GPx (υπεροξειδάση της γλουταθειόνης) και TRX (αναγωγάση της θειορεδοξίνης)^{34,35}. Η οικογένεια GPx αποτελείται από 8 ισομορφές που καταλύουν την αναγωγή διαφόρων υδροϋπεροξειδίων και δρουν συνεργιστικά με την α-τοκοφερόλη στην αντιοξειδωτική άμυνα ενάντια στην υπεροξείδωση των λιπιδίων³⁵. Η οικογένεια TRX αποτελείται από 3 ισομορφές που βρίσκονται στο κυτοσόλιο και στα μιτοχόνδρια και καταλύουν την αντίδραση μετατροπής του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό³⁵. Επιπλέον, οι σεληνοπρωτεΐνες μπορούν να αναστέλλουν την ενεργοποίηση του NF-κΒ μέσω οξειδωαναγωγικής μεταγωγής σήματος και με αυτό τον τρόπο να εμποδίζουν τον «καταρράκτη» κυτταροκινών και το σχηματισμό δραστικών ριζών οξυγόνου και αζώτου⁴². Πρόσφατα, οι έρευνες εστιάζονται στα μικρά οργανοσεληνικά μόρια (πχ

σεληνομεθειονίνη), καθώς αυτά είναι πιο βιοδιαθέσιμα και πιο εύκολα ενσωματώσιμα στις πρωτεΐνες από τις ανόργανες ενώσεις, αν και υπάρχουν πλέον μελέτες που δείχνουν πως και οι ανόργανες μορφές του Se (πχ διοξείδιο του σεληνίου) διαθέτουν παρόμοιες αντιοξειδωτικές ικανότητες³⁵.

Όσον αφορά τον ψευδάργυρο, αποτελεί τμήμα περισσότερων από 1000 πρωτεϊνών, οι οποίες περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικά ένζυμα, μεταλλοένζυμα, μεταφορείς Zn και παράγοντες δέσμησης Zn και είναι απαραίτητες για μια ποικιλία βιολογικών διαδικασιών όπως μεταβολισμός υδατανθράκων και πρωτεϊνών, σύνθεση DNA και RNA, πολλαπλασιασμός και κυτταρική διαφοροποίηση, και ρύθμιση ορμονών⁴³. Ο Zn δρα έμμεσα ως αντιοξειδωτικό καθώς δεν αλληλεπιδρά απευθείας με τις ελεύθερες ρίζες αλλά εμπλέκεται σε πολλά αντιοξειδωτικά μονοπάτια³⁵. Καταρχάς, ο Zn αυξάνει την ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως τα GPx, SOD (σουπεροξειδική δισμουτάση) και CAT (καταλάση)^{35,44}. Αποτελεί συμπαράγοντα των SOD τύπου 1 και 3 καθώς δύναται να ενσωματώνεται στο ένζυμο, ενώ μπορεί να επάγει τη σύνθεση της γλουταθειόνης και έτσι δρα ως έμμεσος συμπαράγοντας της GPx³⁵. Επιπλέον, αναστέλλει σημαντικά προοξειδωτικά ένζυμα όπως η οξειδάση του NADPH, το iNOS και το NMDA (N-μεθυλο-D-ασπαρτικό)^{35,44}. Το τελευταίο αποτελεί μέρος των κυττάρων των νευρώνων και σε καταστάσεις ανεπάρκειας Zn το NMDA επάγει αύξηση στη συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού Ca, το οποίο ακολούθως οδηγεί σε ενεργοποίηση της NADPH και του NOS (συνθάση του νιτρικού οξειδίου)³⁵. Τρίτον, ο Zn ανταγωνίζεται τα προοξειδωτικά μέταλλα μετάπτωσης, όπως ο Fe και ο Cu, σε συγκεκριμένα σημεία πρόσδεσης -στις κυτταρικές μεμβράνες και τις πρωτεΐνες- και με αυτό τον τρόπο τα εμποδίζει από το να καταλύσουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών και να ξεκινήσουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων^{35,44}. Καθώς ο Zn προσδένεται στα προαναφερθέντα σημεία, ο Fe και ο Cu αναγκαστικά υφίστανται υδρολυτικό πολυμερισμό και μετατρέπονται σε μη δραστικές δομές³⁵. Τέταρτος μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης του Zn είναι μέσω πρόσδεσής του στις σουλφυδρυλικές ομάδες των πρωτεϊνών και με αυτό τον τρόπο τις προστατεύει από την οξείδωση³⁵. Ακόμη, ο Zn επηρεάζει το αντιοξειδωτικό δίκτυο λόγω της ικανότητάς του να προσδένεται στη θειονίνη σχηματίζοντας μεταλλοθειονίνη, η οποία είναι «δεσμευτής» ελεύθερων ριζών και μάλιστα έρευνες δείχνουν πως συμπληρωματική αγωγή με Zn αυξάνει την έκφραση της θειονίνης³⁵. Άλλοι έμμεσοι τρόποι με τους οποίους ο Zn μειώνει το οξειδωτικό φορτίο περιλαμβάνουν την αναστολή του NF-kB, οδηγώντας σε μειωμένη ενεργοποίηση κυτταροκινών και προοξειδωτικών ενζύμων, ενώ επιπρόσθετα ο Zn εμμέσως μειώνει την υπεργλυκαιμία και άρα το οξειδωτικό στρες μέσω μείωσης της μεταφοράς

γλυκόζης μέσα στα κύτταρα, προάγοντας τη φωσφορυλίωση των υποδοχέων ινσουλίνης και καταλύοντας τη μετατροπή της προϊνσουλίνης σε ινсуλίνη³⁵.

Ο Fe μπορεί με τη σειρά του να λάβει μέρος στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού εξαιτίας της οξειδοαναγωγικής του ικανότητας ($\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}$)⁴⁵. Λόγω αυτού, είναι ιδανικός ως δότης/δέκτης ηλεκτρονίων στην αλυσίδα αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίων αλλά και σε άλλες σημαντικές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις⁴⁵. Ο Cu από την άλλη, εκτός από μεταφορέας ηλεκτρονίων στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, εμπλέκεται και ως συμπαραάγοντας στην οξειδάση του κυτοχρώματος c⁴⁵. Η χρησιμότητά του οφείλεται στην ικανότητα του Cu να οξειδώνεται (Cu^{2+}) και να ανάγεται (Cu^{+}) και έτσι συνεισφέρει στην αντιοξειδωτική άμυνα μέσω του ενζύμου δισμουτάση του σουπεροξειδίου Cu/Zn (Cu/Zn-SOD)⁴⁵.

Παρόμοια αντιοξειδωτική δράση, μέσω της εξαρτώμενης από το μαγγάνιο δισμουτάσης του σουπεροξειδίου, έχει και το Mn στα μιτοχόνδρια. Ο μηχανισμός που έχει προταθεί περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός ενδιάμεσου Mn^{3+} που οξειδώνει το σουπεροξείδιο⁴⁶.

2.2.2 Αντιφλεγμονώδης δράση

Η αντιφλεγμονώδης δράση των ιχνοστοιχείων -και πάλι τα περισσότερα μελετημένα είναι ο Zn και το Se- οφείλεται κυρίως στην επίδρασή τους στο ανοσοποιητικό σύστημα.

Ο ρόλος του Se στη φλεγμονή σχετίζεται με την επίδρασή του στα κύτταρα του ανοσοποιητικού και ιδιαίτερα στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος των μακροφάγων⁴⁷. Μειωμένες τιμές Se ορού έχουν μετρηθεί σε περιπτώσεις οξείας και χρόνιας φλεγμονής με αυξημένα επίπεδα CRP, στο σύνδρομο οξείας φλεγμονώδους αντίδρασης (severe inflammatory response syndrome) το οποίο χαρακτηρίζεται από αυξημένη παραγωγή ROS από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, σε ασθενείς με σήψη – ιδιαίτερα στους τελευταίους, χαμηλά επίπεδα Se έχει βρεθεί ότι συσχετίζονται με εκτεταμένη οργανική βλάβη – ενώ η συμπληρωματική αγωγή με Se στις παραπάνω έρευνες έδειξε βελτίωση της κατάστασης των ασθενών⁴⁷. Ο μηχανισμός της αντιφλεγμονώδους δράσης του Se οφείλεται στην ικανότητά του (με τη μορφή των σεληνοπρωτεϊνών) να μειώνει την έκφραση γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή κυτταροκινών διότι εμποδίζει την πρόσδεση του NF-kB στον εκκινητή των γονιδίων⁴⁷.

Όσον αφορά το Zn, τόσο σε *In vitro* όσο και σε *In vivo* μοντέλα έχει φανεί ότι ανεπάρκεια σε αυτό το ιχνοστοιχείο σχετίζεται με αύξηση στις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και άλλους δείκτες φλεγμονής³⁶. Σε ένα *In vitro* μοντέλο με καρκινικά κύτταρα του προστάτη, μείωση στα ενδοκυττάρια επίπεδα Zn οδήγησε σε αύξηση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-6, IL-8

και πιθανά να συνεισέφερε στην εξέλιξη της ογκογένεσης³⁶. Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ανεπάρκεια σε Zn αυξάνει το οξειδωτικό στρες και τις βλάβες στο DNA που επίσης παίζουν ρόλο στη φλεγμονή³⁶. Ο μηχανισμός δράσης του Zn πιθανά περιλαμβάνει ως στόχο τον παράγοντα NF-kB, καθώς ανεπάρκεια Zn οδηγεί σε αυξημένη ενεργοποίηση του παράγοντα αυτού, άρα σε αύξηση της ελεγχόμενης από τον NF-kB έκφρασης των γονιδίων των προφλεγμονωδών κυτταροκινών³⁶. Παρόμοια με το Se, αρκετές μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει πως η συμπληρωματική χορήγηση Zn μπορεί να έχει αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα³⁶.

2.2.3 Αντιμικροβιακή δράση

Διατροφικά ιχνοστοιχεία έχουν χρησιμοποιηθεί για να θεραπεύσουν μικροβιακές μολύνσεις. Πριν ανακαλυφθούν τα αντιβιοτικά, τοξικές ενώσεις που περιείχαν Hg ή As χρησιμοποιούνταν για τη θεραπεία μολύνσεων όπως η σύφιλη⁴⁸. Πιο πρόσφατα, ο άργυρος (Ag) έχει χρησιμοποιηθεί για τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες για παράδειγμα σε επιθέματα πληγών, ενώ το γάλλιο (Ga) έχει δείξει αντιμικροβιακή δράση ενάντια στη μόλυνση των πνευμόνων από *Pseudomonas aeruginosa*⁴⁸. Στις μέρες μας, μεταλλοθεραπευτικοί παράγοντες ερευνούνται για τη θεραπεία παρασιτικών μολύνσεων. Μερικά παραδείγματα τέτοιων μετάλλων είναι το ρουθίνιο, το ρόδιο αλλά και παράγωγα του χρυσού κατά της ελονοσίας⁴⁸. Παρόλα αυτά, οι γνώσεις σχετικά με τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των ιχνοστοιχείων είναι πολύ περιορισμένες και απαιτείται αρκετή έρευνα ώστε να χρησιμοποιηθούν αυτά σε αντιμικροβιακές θεραπείες. Από την άλλη πλευρά, οι ανεπάρκειες σε ιχνοστοιχεία και οι διαταραχές της ομοιόστασης αυτών έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα και άρα την ικανότητα του οργανισμού να αντιμετωπίζει τις λοιμώξεις⁴⁹. Πιο συγκεκριμένα, το Se ενεργοποιεί τη δημιουργία αντισωμάτων, ενισχύει τη λειτουργία των κυτταροτοξικών T- και NK-κυττάρων, ενώ μέσω της αντιοξειδωτικής του δράσης που αναλύθηκε παραπάνω βοηθά έμμεσα τη διατήρηση της υγείας των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς η συσσώρευση ελεύθερων ριζών στο μικροπεριβάλλον των κυττάρων αποτελεί σημαντικό παράγοντα αναστολής της δράσης αυτών⁵⁰. Ο Zn από την άλλη πλευρά θεωρείται κρίσιμος για την καλή λειτουργία του ανοσοποιητικού διότι αλληλεπιδρά με πολύ συγκεκριμένους τρόπους με αυτό⁵¹. Ειδικότερα, ο Zn προσδένεται σε ένζυμα, πρωτεΐνες και πεπτίδια με διαφορετική συγγένεια και μεταφέρεται μέσω αυτών -κυρίως μέσω της αλβουμίνης, της α2-μακρογλοβουλίνης και της τρανσφερίνης- στα κύτταρα⁵¹. Η λειτουργία της α2-μακρογλοβουλίνης ελέγχεται από τον ίδιο τον Zn, διότι ο δεύτερος δύναται να αλλάζει τη δομή της α2-μακρογλοβουλίνης και να ενισχύει την αλληλεπίδρασή της με τις κυτταροκίνες και τις

πρωτεάσες, και να επηρεάζει έτσι την ανοσολογική απόκριση⁵¹. Επιπλέον, η ανεπάρκεια Zn έχει φανεί ότι έχει αρνητική επίδραση στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και μπορεί να αποτελεί την πιο συνηθισμένη αιτία δευτερογενούς ανοσοανεπάρκειας στους ανθρώπους⁵¹. Τέλος, η ανεπάρκεια Zn έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο μολύνσεων από ιούς, βακτήρια, παράσιτα αλλά και με αυτοάνοσα νοσήματα⁵².

2.2.4 Άλλες δράσεις

Άλλες ευεργετικές δράσεις των ιχνοστοιχείων περιλαμβάνουν τις καρδιαγγειακές νόσους, τον καρκίνο, τη γήρανση, νευροεκφυλιστικές νόσους όπως το Alzheimer, το διαβήτη, την κατάθλιψη, τα οστά κ.α και βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στις προαναφερθείσες αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Στη συνέχεια αναφέρονται ενδεικτικά κάποιες από αυτές τις ιδιότητες.

Ένα παράδειγμα μετάλλου με δράση διαφορετική από την αντιοξειδωτική ή την αντιφλεγμονώδη είναι το κοβάλτιο. Το ανθρώπινο σώμα χρειάζεται το Co για το σχηματισμό της κοβαλαμίνης (βιταμίνη B12)⁴⁵. Η κοβαλαμίνη συντίθεται από βακτήρια και ο ανθρώπινος οργανισμός εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από αυτά για την παροχή της⁴⁵. Η βιταμίνη αυτή εμπλέκεται σε μεγάλο εύρος κυτταρικών μονοπατιών όπως ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων και των αμινοξέων, η σύνθεση του DNA και η παραγωγή ενέργειας, καθώς ενσωματώνεται σε τρία είδη ενζύμων, τις ισομεράσες, τις μεθυλοτρανσφεράσες και τις αναγωγικές αφυδρογονάσες^{45,53}. Το Co συσσωρεύεται κυρίως στο ήπαρ, τα νεφρά, το πάγκρεας και την καρδιά, και έχει οξεία τοξικότητα σε μεγάλες δόσεις ενώ η συσσωρευτική και χρόνια έκθεση σε αυτό (ακόμα και σε χαμηλό επίπεδο) μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση διαφόρων ανεπιθύμητων παρενεργειών σε διάφορα όργανα και ιστούς⁵³.

Το χρώμιο είναι ένα ιχνοστοιχείο που στα βιολογικά συστήματα βρίσκεται με τη μορφή των CrO_4^{2-} ⁴⁵. Η χρησιμότητα του Cr^{3+} στην ανθρώπινη υγεία είναι υπό συζήτηση. Έχει προταθεί πως εμπλέκεται στο μεταβολισμό της γλυκόζης, μέσω αλληλεπίδρασης με διάφορες πτυχές του μονοπατιού σηματοδότησης της ινσουλίνης, μέχρι σήμερα όμως δεν έχει βρεθεί μηχανισμός που να εξηγεί επαρκώς αυτή τη δράση⁴⁶.

Σχετικά με τις νευροεκφυλιστικές νόσους και πάλι ο Zn φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, καθώς δρα ως αγωνιστής για τον υποδοχέα του GPR39, ο οποίος αποτελεί στόχο-κλειδί για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων⁵⁴. Ο GPR39 είναι πιθανός στόχος για τη διαχείριση αρκετών νευροπαθολογικών ασθενειών όπως το Alzheimer, η κατάθλιψη και η επιληψία, χρειάζονται όμως πολλές ακόμα έρευνες για να ξεκαθαριστεί επαρκώς η λειτουργία του⁵⁴.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η επίδραση του Zn στη νόσο του Crohn. Στη νόσο αυτή, η διαπερατότητα του λεπτού εντέρου είναι συχνά αυξημένη και μπορεί να οδηγήσει σε υποτροπή ενώ δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία για τους ασθενείς αυτούς⁵⁵. Μια μελέτη όμως υποστηρίζει ότι η συμπληρωματική χορήγηση Zn μπορεί να μειώσει τις αλλοιώσεις της διαπερατότητας στους ασθενείς με νόσο Crohn και πως η βελτίωση αυτή του εντερικού φραγμού δύναται να συνεισφέρει στη μείωση του κινδύνου υποτροπής⁵⁵.

Μια πρόσφατη μεταανάλυση που εξέτασε την επίδραση της συμπληρωματικής χορήγησης Zn στα λιπίδια του πλάσματος είχε ενδιαφέροντα αποτελέσματα⁵⁶. Η συγκεκριμένη μελέτη περιείχε 24 έρευνες με συνολικά 14515 συμμετέχοντες. Τα αποτελέσματα της μεταανάλυσης έδειξαν πως η συμπληρωματική χορήγηση Zn είχε ευνοϊκή επίδραση στα λιπίδια του πλάσματος. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της ολικής χοληστερόλης, της LDL χοληστερόλης και των TG. Επιπλέον, η χορήγηση Zn σε ασθενείς έδειξε σημαντική αύξηση της HDL χοληστερόλης. Επομένως, είναι πιθανό ο Zn να μπορεί να μειώσει τη συχνότητα θανάτων λόγω αθηροσκλήρωσης κυρίως στους ασθενείς με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αθηροσκλήρωσης.

Επιπλέον, έχει μελετηθεί η σχέση του Zn με το διαβήτη. Είναι γνωστό πως άτομα με ΣΔΤ2 έχουν μειωμένα επίπεδα του ιχνοστοιχείου, εν μέρει λόγω μειωμένης απορρόφησης αυτού από το γαστρεντερικό σωλήνα, και ο ΣΔΤ2 σχετίζεται με μέση μείωση του Zn ορού κατά 12.56 μg/dL⁵⁷. Ο Zn αποτελεί σημαντικό ιχνοστοιχείο στην παραγωγή ινσουλίνης, στη ρύθμιση των μηχανισμών σύνθεσης, αποθήκευσης, έκκρισης και μεταφοράς ορμονών με τέτοιο τρόπο που μια πιθανή ανεπάρκεια μπορεί να μειώσει την απόκριση του υποδοχέα στην ορμόνη⁵⁷. Ο μηχανισμός που έχει προταθεί για την εξήγηση του ρόλου του Zn στο ΣΔΤ2 είναι πως το ιχνοστοιχείο αυτό εμπλέκεται στη μεταγωγή σήματος του υποδοχέα της ινσουλίνης και με αυτό τον τρόπο συνεισφέρει στον καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο και εμφανίζει ινσουλινομιμητική δράση⁵⁷.

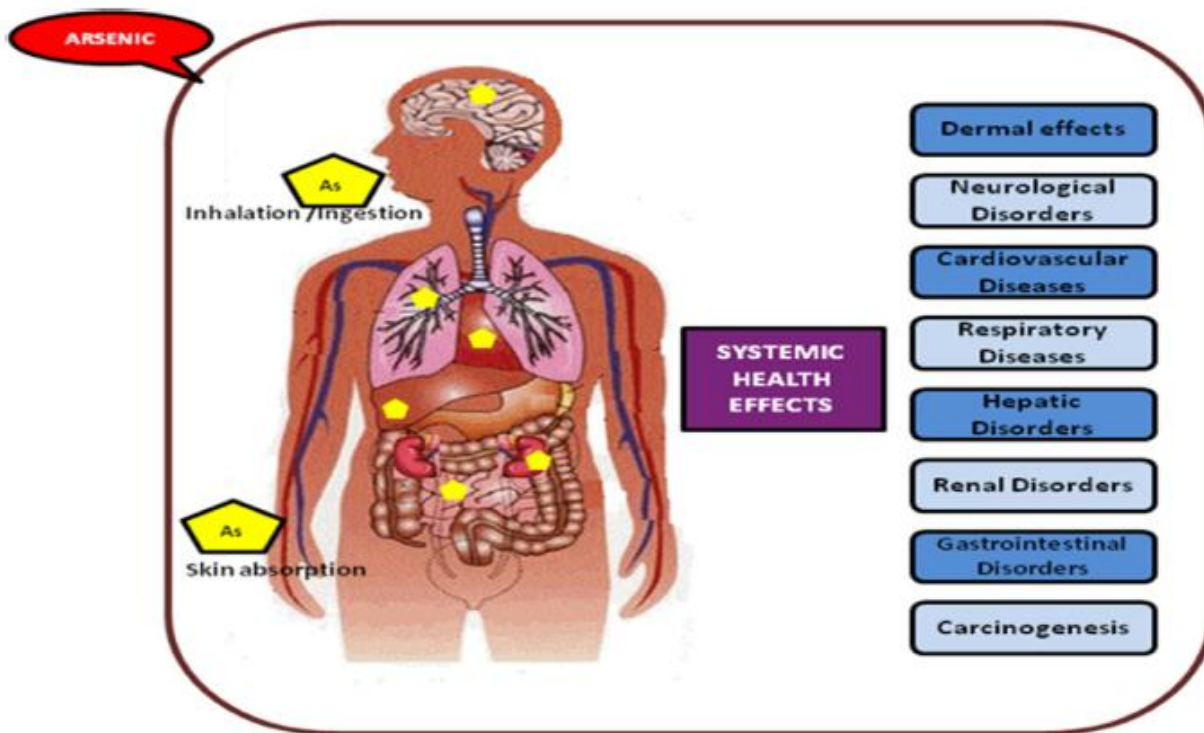
2.3 Τοξικά ιχνοστοιχεία

Η τοξικότητα των ιχνοστοιχείων και το κατά πόσο αυτή θα εκδηλωθεί, εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες όπως η δόση, οι συνθήκες έκθεσης, η βιοδιαθεσιμότητα και η χημική μορφή του ιχνοστοιχείου⁴¹. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τοξική δράση μπορούν να εμφανίσουν ακόμα και τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία αν η πρόσληψη αυτών ξεπεράσει τα ασφαλή όρια, αν η χημική μορφή του ιχνοστοιχείου ή ο τρόπος πρόσληψης αυτού δεν είναι ο φυσιολογικός⁴¹. Επιπλέον, η τοξικότητα των ιχνοστοιχείων ποικίλει ανάλογα με διάφορους διατροφικούς παράγοντες,

όπως η πρωτεϊνική πρόσληψη και οι βιταμίνες, ενώ επηρεάζεται και από τα επίπεδα άλλων ιχνοστοιχείων όπως ο Fe, ο Zn και το Ca⁴¹. Τέλος, υπάρχουν ιχνοστοιχεία που δεν έχουν κανένα ευεργετικό βιολογικό ρόλο και η έκθεση σε αυτά έστω και σε ελάχιστες ποσότητες μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτών είναι τα βαρέα μέταλλα μόλυβδος (Pb), υδράργυρος (Hg), κάδμιο (Cd), το εξασθενές χρώμιο Cr(VI) αλλά και το αρσενικό (As)⁴¹.

Η χημική μορφή του ιχνοστοιχείου όπως αναφέρθηκε παραπάνω παίζει σημαντικό ρόλο στο βαθμό τοξικότητας κάποιων ιχνοστοιχείων. Πιο συγκεκριμένα, ο ανόργανος, μεταλλικός Hg⁰ και οι ανόργανες ενώσεις του Hg²⁺, διαφέρουν κατά πολύ από τις οργανικές του ενώσεις όπως ο μεθυλϋδράργυρος CH₃Hg, που είναι η κυρίαρχη υδραργυρική ένωση που συναντάται στα ψάρια και είναι ισχυρά τοξική⁵⁸. Αντίθετα, η ανόργανη μορφή του αρσενικού, As(V) και ιδιαίτερα το As(III), είναι πολύ πιο τοξική από τις οργανικές ενώσεις του⁵⁸. Η έκθεση στα τοξικά στοιχεία συνήθως γίνεται μέσω της τροφής, του νερού και σε κάποιες περιπτώσεις μέσω του επαγγελματικού χώρου⁵⁸. Στη συνέχεια αναφέρονται κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα τοξικότητας ιχνοστοιχείων.

Το As και οι ανόργανες ενώσεις του είναι καρκινογόνες για τον άνθρωπο και έχουν καταταχθεί στην ομάδα 1 της IARC (International Agency for Research on Cancer) ενώ οι οργανικές του ενώσεις θεωρούνται «πιθανώς καρκινογόνες» για τον άνθρωπο και έχουν καταταχθεί στην ομάδα 2B της IARC⁵⁹. Παρόλα αυτά, το τριοξείδιο του αρσενικού έχει εγκριθεί για τη θεραπεία της οξείας προμυελοτικής λευχαιμίας σε ασθενείς των οποίων η ασθένεια δεν έχει βελτιωθεί με άλλη χημειοθεραπεία, ή έχει υποτροπιάσει, ενώ μελετάται και η χρήση του για τη θεραπεία άλλων μορφών καρκίνου⁵⁹. Η οξεία δηλητηρίαση από As είναι γνωστή για τη σοβαρότητά της λόγω της ικανότητας του μετάλλου να καταστρέφει τα αγγεία του αίματος και το γαστρεντερικό ιστό, ενώ προκαλεί και νευρολογικές διαταραχές όπως η περιφερική νευροπάθεια και η εγκεφαλοπάθεια^{59,60}. Η χρόνια έκθεση σε αρσενικό μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο διαφόρων οργάνων όπως το δέρμα, η ουροδόχος κύστη, τα νεφρά, οι πνεύμονες και το ήπαρ σε συνδυασμό με άλλα νευρολογικά, ενδοκρινολογικά και κυκλοφορικά προβλήματα⁶⁰ (Σχήμα 2.3.1). Παρόλα αυτά, έρευνες έχουν δείξει πως μικρές ποσότητες As έχουν ευεργετική δράση σε αρουραίους και άλλα ζώα, επομένως είναι πιθανό να αποτελεί χρήσιμο μέταλλο σε πολύ μικρές ποσότητες⁶¹.

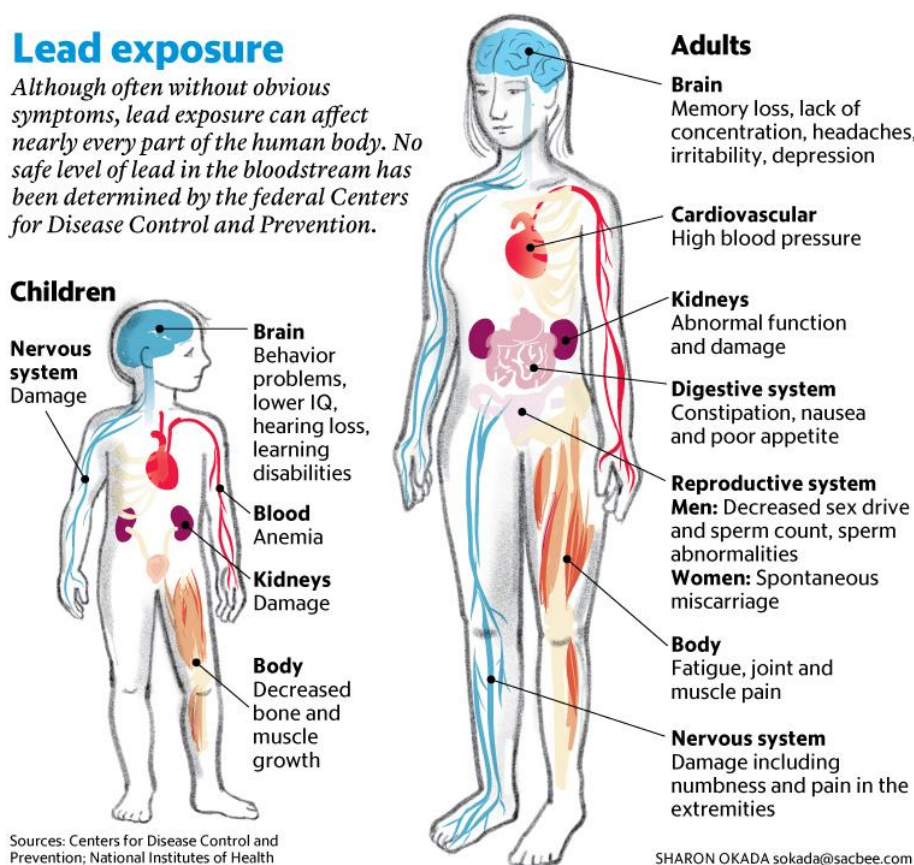


Σχήμα 2.3.1 : Οι επιπτώσεις στον οργανισμό από την έκθεση σε As⁶².

Το Cd αποτελεί πολύ σημαντικό μέταλλο από άποψη τοξικότητας καθώς έκθεση σε αυτό μπορεί να προκαλέσει τόσο οξεία όσο και χρόνια τοξικότητα στους ζωντανούς οργανισμούς και οι ενώσεις του έχουν καταταχθεί στην ομάδα 1 της IARC, καθώς προκαλούν καρκίνο στους πνεύμονες, ενώ θετικά έχει συσχετιστεί και με τον καρκίνο του προστάτη και των νεφρών⁵⁹. Οι επιβαρυντικές δράσεις του μετάλλου αυτού είναι ακόμη πιο σοβαρές λόγω της ανικανότητας του ανθρώπινου οργανισμού να το απομακρύνει με αποτέλεσμα τη βιοσυσσώρευσή του κυρίως στα νεφρά και το ήπαρ, με χαρακτηριστικό χρόνο ημιζωής 10-35 χρόνια^{59,63}. Η οξεία τοξικότητα του Cd δύναται να προκαλέσει σοβαρό αναπνευστικό ερεθισμό, ενώ δηλητηρίαση με Cd οδηγεί σε πνευμονική, νεφρική και σκελετική βλάβη αλλά και σε νόσο *Itai-Itai*⁵⁹. Κύριοι τρόποι έκθεσης στο Cd είναι μέσω της εργασίας, του περιβάλλοντος και του καπνίσματος, ενώ βρίσκεται και σε κάποια τρόφιμα όπως τα θαλασσινά, τα εντόσθια των ζώων, τα όσπρια, τα δημητριακά, τα μανιτάρια, τα φυλλώδη λαχανικά, στις πατάτες και σε μικρότερο βαθμό στα ψάρια, τα φρούτα και το κρέας^{59,63}.

Ο Pb βρίσκεται στο περιβάλλον είτε από φυσικές πηγές είτε λόγω των ανθρωπογενών διεργασιών, παραγόμενος κυρίως από εργοστασιακές μονάδες και χυτήρια και μεταφέρεται στον αέρα, το έδαφος και το νερό μέσω των φυσικών και χημικών διεργασιών όπως η κατακάθιση σκόνης, η κίνηση των υδάτων στους ποταμούς και η κατακρίμνιση⁵⁹. Αποροφάται

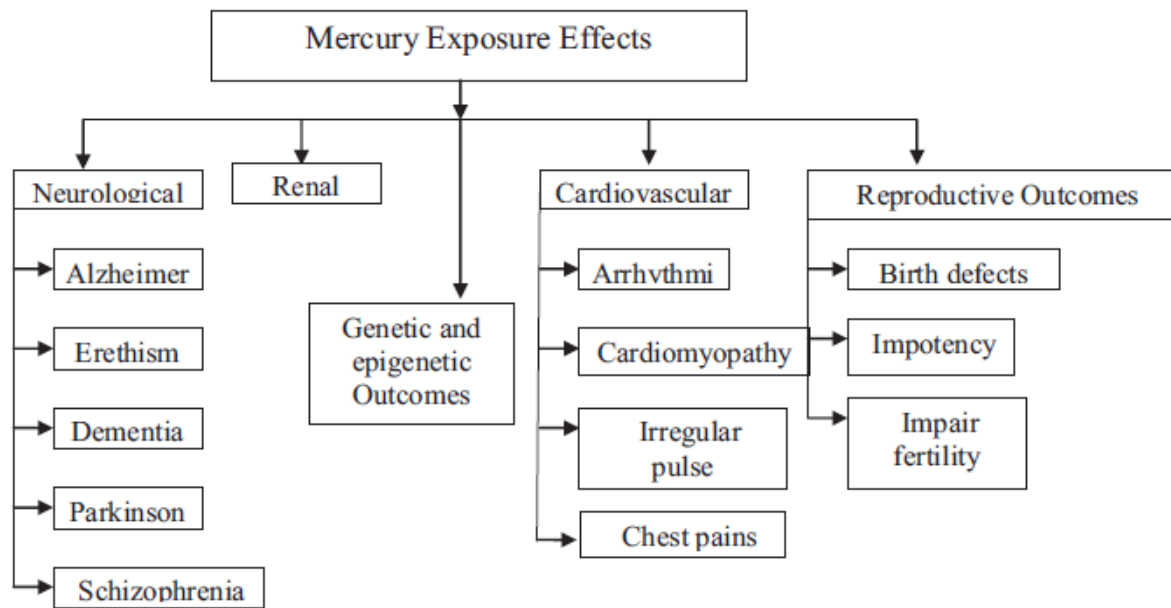
στο σώμα μέσω της εισπνοής και της κατάποσης και σε μικρότερο βαθμό μέσω του δέρματος⁵⁹. Οι ανόργανες ενώσεις του Pb είναι «πιθανώς καρκινογόνες» για τους ανθρώπους (ομάδα 3), εκτός από την καρκινογόνο δράση του όμως προκαλεί διάφορα προβλήματα υγείας σε ενήλικες και σε παιδιά (Εικόνα 2.3.1). Στα παιδιά, έκθεση σε Pb έχει συσχετιστεί με συμπεριφορικές διαταραχές, καθυστερημένη ήβη και μείωση ακοής, διανοητικής ικανότητας, ύψους και ανάπτυξης μετά τη γέννηση⁵⁹. Στους ενήλικες, δύναται να προκαλέσει καρδιαγγειακά προβλήματα, νευρολογικές διαταραχές, υπέρταση, αυξημένη λειτουργία νεφρών, και να καθυστερήσει τη σύλληψη λόγω ανεπιθύμητων επιδράσεων στο σπέρμα όπως είναι η μειωμένη κινητικότητα και ο αριθμός των σπερματοζωαρίων⁵⁹. Διαιτητικές πηγές του Pb αποτελούν τα θαλασσινά, το κρέας θηραμάτων, τα ψάρια, ενώ τα τρόφιμα με την υψηλότερη συνεισφορά Pb στην ευρωπαϊκή διατροφή είναι τα δημητριακά, οι σπόροι, τα φρούτα, το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα λαχανικά, τα ποτά -αλκοολούχα και μη-, και το πόσιμο νερό⁵⁸.



Εικόνα 2.3.1 : Οι επιπτώσεις της έκθεσης σε Pb στα παιδιά και τους ενήλικες⁶⁴.

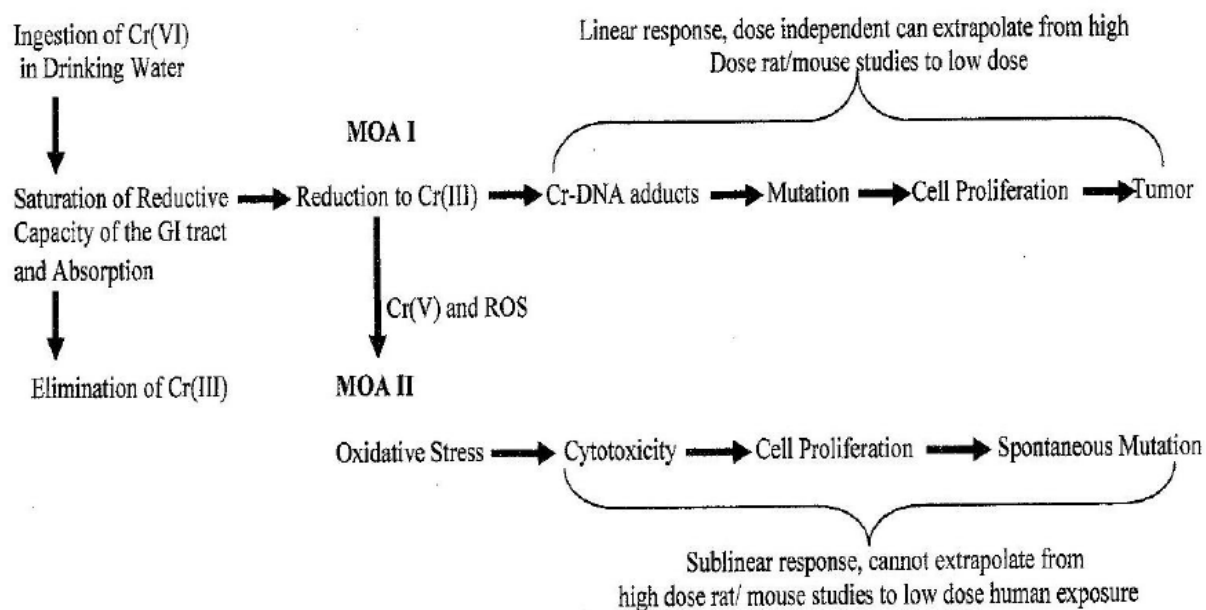
Ένα ακόμη πολύ μελετημένο τοξικό μέταλλο είναι ο Hg, του οποίου η τοξικότητα έχει να κάνει με την εκάστοτε χημική μορφή (Σχήμα 2.3.2). Οι πηγές στο περιβάλλον είναι ανθρωπογενείς, κυρίως η καύση ορυκτών καυσίμων, η εξόρυξη μετάλλων και οι βιομηχανικές διεργασίες, και

λιγότερο φυσικές όπως οι ηφαιστιακές εκρήξεις⁶⁵. Οι άνθρωποι εκτίθενται στους ατμούς ανόργανου Hg^0 μέσω του αέρα και των οδοντιατρικών αμαλγαμάτων, έρευνες όμως δείχνουν ότι κανένας από τους δύο τρόπους δεν ενέχει κίνδυνο για την υγεία⁶⁵. Αντιθέτως, η επαγγελματική έκθεση επιφέρει εισπνοή μεγάλων ποσοτήτων Hg^0 με μεγάλο εύρος δυσμενών επιπτώσεων καθώς ο εισπνεόμενος Hg συσσωρεύεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια και μεταφέρεται σε ποικίλους ιστούς του σώματος, ενώ δύναται να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και το φραγμό του πλακούντα⁶⁵. Παρατεταμένη έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις ανόργανου Hg^0 έχει φανεί ότι επιδρά στο νευρικό σύστημα προκαλώντας διαταραχές όπως τρόμος και ψυχολογικές αλλαγές, στο καρδιαγγειακό, στο αναπνευστικό, στο αναπαραγωγικό και το ανοσοποιητικό σύστημα αλλά και στο ήπαρ και το δέρμα⁶⁵. Όσον αφορά τον Hg^{2+} , κύριος τρόπος έκθεσης σε αυτόν είναι μέσω της τροφής και του εδάφους, ενώ βιοσυσσωρεύεται στα νεφρά και το ήπαρ καθώς δε διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό και το φραγμό του πλακούντα με την ίδια ευκολία όπως ο στοιχειακός Hg ⁶⁵. Λόγω της συσσώρευσης αυτής, δύναται να καταστρέψει τη λειτουργία των νεφρών και του γαστρεντερικού συστήματος, ενώ προκαλεί και στοματίτιδες, γαστρεντερίτιδα, διαταραχές του ανοσοποιητικού, ακόμα και την ανάπτυξη αυτοάνοσου νοσήματος⁶⁵. Σχετικά με τον μεθυλδράργυρο, την πιο τοξική μορφή του Hg , βρίσκεται κυρίως στα ψάρια, ενώ πρόσφατα ενοχοποιήθηκε και το ρύζι⁶⁵. Μόλις ο CH_3Hg καταποθεί, το 95% αυτού απορροφάται από το γαστρεντερικό σύστημα, ενώ η απομάκρυνσή του από τον οργανισμό είναι πολύ δύσκολη -η βιβλιογραφία αναφέρει πως λιγότερο από 10% του CH_3Hg απεκρίνεται τελικά από το σώμα⁶⁵. Το νευρικό σύστημα είναι αυτό που επηρεάζεται πρωτίστως από το μεθυλδράργυρο, ο οποίος προκαλεί ποικίλα συμπτώματα όπως αταξία, δυσαρθρία, τρόμο ενώ πρόσφατα βρέθηκε πως η έκθεση σε αυτόν μπορεί να προκαλέσει καρδιαγγειακή νόσο, βλάβες στο αναπαραγωγικό και το ανοσοποιητικό σύστημα μεταξύ άλλων⁶⁵.



Σχήμα 2.3.2 : Επιπτώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό λόγω έκθεσης σε Hg⁶⁶.

Τέλος, αξίζει να αναφερθούμε και στο εξασθενές χρώμιο (Cr(VI)) προς διαχωρισμό του από το χρήσιμο για τον οργανισμό τρισθενές χρώμιο (Cr(III)). Αν και το Cr βρίσκεται φυσικά στο περιβάλλον, η εξασθενής μορφή του αποτελεί ανθρωπογενή ρύπο που οφείλεται στη βιομηχανία και με αυτό τον τρόπο περνά στα ύδατα και στη συνέχεια στην τροφική αλυσίδα⁶⁷. Το Cr(VI) είναι βιολογικά τοξικό (100 φορές πιο τοξικό από το τρισθενές) διότι είναι σταθερό, πολύ ευδιάλυτο και ικανό να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες, να εισέρχεται στο κύτταρο και να αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες και το DNA⁶⁷. Οι ενώσεις του έχουν τοξική, γενετοξική, μεταλλαξιογόνο και καρκινογόνο δράση στους ανθρώπους, τα ζώα και τα φυτά, ακόμα και στους μικροοργανισμούς, ενώ συσσωρεύεται κυρίως στα νεφρά και το ήπαρ⁶⁷. Εισερχόμενο στη διατροφική αλυσίδα μπορεί να προκαλέσει, με την κατανάλωσή του, σοβαρά προβλήματα υγείας όπως δερματικούς ερεθισμούς, εξελκώσεις, ακόμα και καρκίνο στους πνεύμονες⁶⁷. Η USEPA (United States Environmental Protection Agency) έχει συμπεριλάβει το εξασθενές χρώμιο στα 17 πιο επιβλαβή για τον άνθρωπο χημικά⁶⁷. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται ο μηχανισμός καρκινογόνου δράσης του εξασθενούς χρωμίου μετά από έκθεση σε αυτό μέσω του πόσιμου νερού (Σχήμα 2.3.3).



Σχήμα 2.3.3 : Ο μηχανισμός καρκινογόνου δράσης του εξασθενούς χρωμίου μετά από έκθεση σε αυτό μέσω πόσιμου νερού⁶⁷.

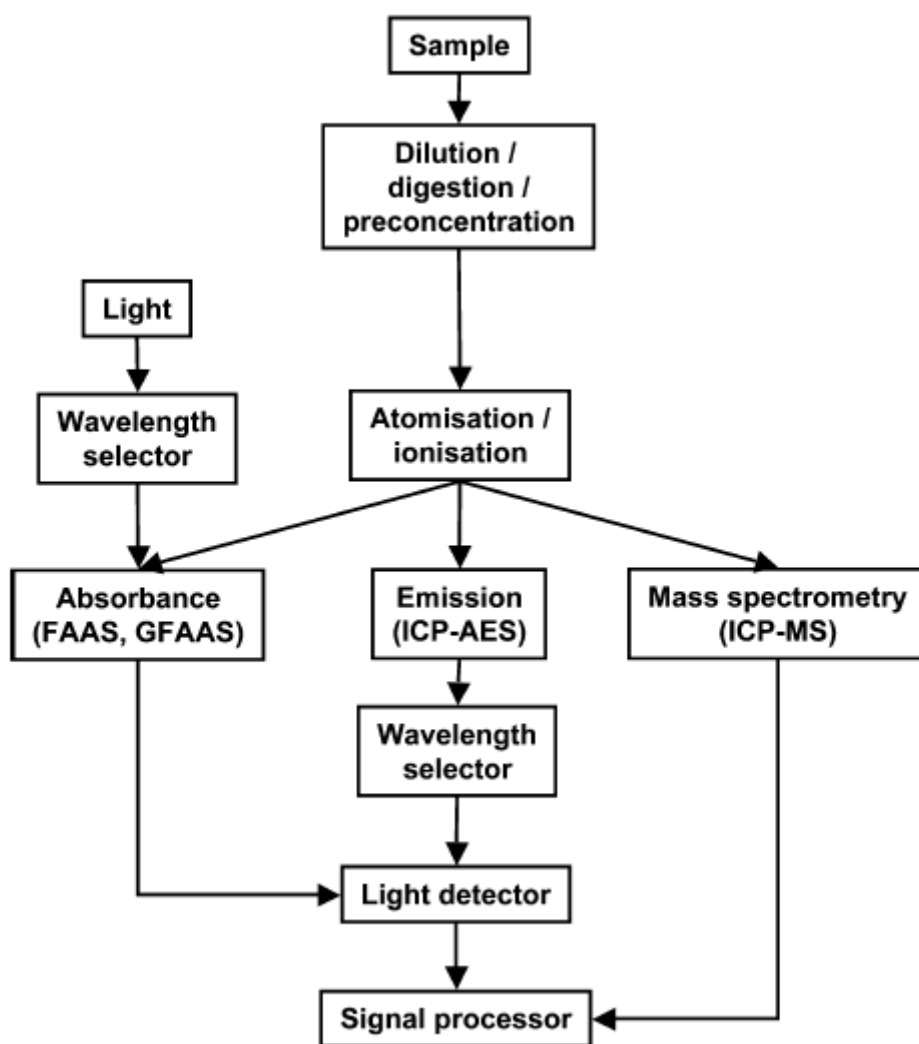
2.4 Πηγές πρόσληψης απαραίτητων ιχνοστοιχείων

Τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία προσλαμβάνονται κυρίως μέσω της διατροφής. Για παράδειγμα, ο Zn βρίσκεται σε πολλά τρόφιμα και απορροφάται πιο εύκολα από το κρέας, ενώ υπάρχει και στο γάλα, το τυρί, τα αυγά, τα δημητριακά ολικής αλέσεως, τα οστρακοειδή, τους ξηρούς καρπούς και τα όσπρια⁶⁸. Το ιώδιο προσλαμβάνεται κυρίως από τα θαλασσινά, αλλά και από το ιωδιούχο αλάτι, ενώ η περιεκτικότητα των φυτικών τροφών σε αυτό το ιχνοστοιχείο ποικίλει πολύ και εξαρτάται από το I που υπάρχει στο νερό και το έδαφος της καλλιέργειας⁶⁸. Διατροφικές πηγές Cu αποτελούν τα οστρακόδερμα, το συκώτι, τα νεφρά, τα δημητριακά ολικής αλέσεως και οι ξηροί καρποί⁶⁸. Το Se υπάρχει σε μεγάλη ποικιλία τροφών, ιδιαίτερα όμως στα βραζιλιάνικα φυστίκια, τα ψάρια, το κρέας και τα αυγά⁶⁸. Το Mn λαμβάνεται κυρίως από τα λαχανικά, τα δημητριακά και τους ξηρούς καρπούς, ενώ πλούσια πηγή αποτελεί και το τσάι⁶⁸. Τέλος, το Cr βρίσκεται στο κρέας, τους ξηρούς καρπούς, τα δημητριακά και τη μαγιά της μύρας⁶⁸.

2.5 Μέθοδοι ανάλυσης ιχνοστοιχείων

Η ανάλυση των ιχνοστοιχείων στα βιολογικά υγρά και τους ιστούς εξυπηρετεί πολλούς σκοπούς, οι οποίοι περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της κατανομής αρκετών απαραίτητων ιχνοστοιχείων σε υγιείς και σε νοσούντες, τον προσδιορισμό πιθανών

τοξικών στοιχείων και τη διάγνωση ανεπαρκειών και νόσων σχετιζόμενων με τα ιχνοστοιχεία⁶⁹. Οι τέσσερις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές για την ανάλυση των ιχνοστοιχείων σε ανθρώπινα βιολογικά υλικά είναι φασματομετρία ατομικής απορόφησης σε φλόγα (FAAS - Flame atomic absorption spectrometry), η φασματομετρία ατομικής απορόφησης σε φούρνο γραφίτη (GFAAS - Graphite furnace atomic absorption spectrometry), η ατομική φασματομετρία εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-AES – Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry) και η φασματομετρία μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-MS – Inductively coupled plasma mass spectrometry)⁶⁹. Γενικά, στις τεχνικές ατομικής φασματομετρίας τα δείγματα εισάγονται σε έναν ατομοποιητή και μετατρέπονται σε ελεύθερα άτομα ή/και ιόντα⁶⁹ (Σχήμα 2.5.1).



Σχήμα 2.5.1 : Γενικό διάγραμμα των φασματοχημικών τεχνικών⁶⁹.

Οι τεχνικές FAAS και GFAAS εξαρτώνται από την απορόφηση του φωτός από ατμοποιημένα, ουδέτερα άτομα και η πηγή φωτός τους είναι μια κενή λάμπα καθόδου που περιέχει το ίδιο

μέταλλο με το προς ανάλυση⁶⁹. Μόλις το μέταλλο μέσα στη λάμπα θερμανθεί, οι ατμοί του εκπέμπουν το ατομικό φάσμα του μετάλλου, η ακτίνα αυτή μεταφέρεται μέσα στον ατμό του αναλύτη, όπου ελεύθερα άτομα του εκάστοτε στοιχείου απορροφούν τμήμα του φωτός αυτού⁶⁹. Η μετρούμενη απορόφηση, σε μια μονή, συγκεκριμένη γραμμή του φάσματος του στοιχείου δίνει ένα ποσοτικό μέτρο της συγκέντρωσης αυτού⁶⁹.

Στη φασματομετρία ατομικής εκπομπής τα στοιχεία προς ανάλυση διεγείρονται (πχ από πλάσμα αργού), η ακτινοβολία που εκπέμπεται από τα διεγερμένα αυτά άτομα μετράται, τα οπτικά σήματα περνούν στον ανιχνευτή, αυτά που βρίσκονται εντός του επιλεγμένου εύρους μήκους κύματος μετατρέπονται σε ηλεκτρικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια επεξεργάζονται και προκύπτει η μέτρηση των προς ανάλυση στοιχείων⁶⁹.

2.5.1 Φασματοσκοπία ατομικής απορόφησης σε φλόγα (FAAS)

Στην FAAS χρησιμοποιείται για ατομοποίηση του διαλύματος φλόγα, συνήθως αέρα-ακετυλενίου ή σπανιότερα οξειδίου-ακετυλενίου⁶⁹. Η FAAS αποτελεί την πιο απλή και εύκολη αναλυτική τεχνική για στοιχειακή ανάλυση και για προσδιορισμό στοιχείων σε συγκεντρώσεις της τάξεως του mg/L η ακρίβεια της τεχνικής είναι 1% σχετική τυπική απόκλιση⁶⁹. Ο προσδιορισμός ενός στοιχείου γίνεται γρήγορα αλλά η μέτρηση πολλών ιχνοστοιχείων είναι αρκετά χρονοβόρα ακόμα και με αυτοματοποιημένη μέθοδο, όμως αποτελεί σχετικά φθηνή τεχνική και είναι η πρώτη επιλογή αν στο δείγμα μετρώνται μέχρι το πολύ 3 στοιχεία⁶⁹. Σημαντικά μειονεκτήματα της τεχνικής είναι το μεγάλο απαιτούμενο δείγμα (αρκετά mL), το οποίο πρέπει να είναι σε μορφή υδατικού διαλύματος καθώς η τεχνική δε δύναται να αναλύσει απευθείας στερεά δείγματα, ενώ επιπλέον έχει υψηλά όρια ανίχνευσης κάτι που καθιστά την ακρίβεια μέτρησης στοιχείων σε επίπεδα των mg/L, πολύ μικρή⁶⁹.

2.5.2 Φασματομετρία ατομικής απορόφησης σε φούρνο γραφίτη (GFAAS)

Στη GFAAS η ατομοποίηση γίνεται σε φούρνο γραφίτη που θερμαίνεται με ηλεκτρικό ρεύμα⁶⁹. Συνήθως απαιτείται μικρή ποσότητα δείγματος (5-100μL), η οποία εισάγεται στο φούρνο και υφίσταται μια σειρά από ελεγχόμενες θερμάνσεις που απαιτούνται για την ξήρανσή του, για την απομάκρυνση ικανοποιητικής ποσότητας της μήτρας αυτού, και τελικά επέρχεται η ατομοποίηση μέσα σε κλάσματα δευτερολέπτου⁶⁹. Η GFAAS είναι πολύ πιο αργή τεχνική από τη FAAS, γι' αυτό χρειάζονται μερικά λεπτά για την ανάλυση του δείγματος⁶⁹. Το κύριο αναλυτικό πλεονέκτημά της είναι το χαμηλό όριο ανίχνευσης, περίπου 10- 100 φορές χαμηλότερο από τη FAAS⁶⁹. Παραδοσιακά η τεχνική χρησιμοποιούταν για μέτρηση ενός

στοιχείου αλλά με σύγχρονες διορθώσεις είναι δυνατός ο προσδιορισμός 4-6 στοιχείων ταυτόχρονα⁶⁹. Η GFAAS απαιτεί πολύ μικρό όγκο δείγματος, μικρότερο ακόμα και από τις ICP-AES και ICP-MS, ενώ επιπλέον είναι απλή και φθηνότερη τεχνική⁶⁹.

2.5.3 Φασματομετρία ατομικής εκπομπής με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-AES)

Το επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα είναι ένα ηλεκτρικά αγώγιμο αέριο μίγμα αργού, ιόντων αργού και ηλεκτρονίων, το οποίο παράγεται από ροή αερίου αργού που ενεργοποιείται μέσω ενός πεδίου ραδιοσυχνότητας υψηλής ενέργειας, οδηγώντας σε ατομοποίηση και ιονισμό του ρέοντος αργού και δημιουργία υψηλής θερμοκρασίας 7000-10000K⁶⁹. Το δείγμα εισάγεται με τη μορφή αερολύματος αναμεμιγμένου με αργό, μέσα στο πλάσμα όπου η υψηλή θερμοκρασία προκαλεί επαρκή εξάτμιση, ατομοποίηση, διέγερση και ιονισμό του δείγματος⁶⁹. Η ICP-AES έχει τη δυνατότητα ανάλυσης πολλών στοιχείων ταυτόχρονα επομένως είναι εύκολος ο προσδιορισμός αυτών σε πολλά δείγματα σε μικρό χρονικό διάστημα, έχει όμως σχετικά υψηλά όρια ανίχνευσης (παρόμοια με τη FAAS)⁶⁹.

2.5.4 Φασματομετρία μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-MS)

Η ICP-MS συνδυάζει πηγή ιόντων με φασματογράφο μάζας. Ο φασματογράφος μάζας διαχωρίζει και προσδιορίζει τα ιόντα που παράγονται από το ICP, με βάση το λόγο μάζα/φορτίο και μετρά τη συγκέντρωση του αναλύτη με κλασματοποίηση, προσφέροντας έτσι μια ευαίσθητη μέθοδο ανάλυσης⁶⁹. Επομένως, η ICP-MS συνδυάζει την ικανότητα πολυστοιχειακής ανάλυσης της ICP-AES και τα χαμηλά όρια ανίχνευσης της GFAAS, ή ακόμα και χαμηλότερα, είναι όμως ακριβή τεχνική και απαιτείται εκπαιδευμένο προσωπικό για το χειρισμό του οργάνου⁶⁹. Αποτελεί παρόλα αυτά τη μέθοδο εκλογής για πολυστοιχειακές αναλύσεις όταν είναι διαθέσιμη.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ-ΔΙΑΤΥΠΩΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΥΠΟΘΕΣΗΣ

Από την ανασκόπηση που πραγματοποιήθηκε είναι φανερό πως η NAFLD αποτελεί μια νόσο με ολοένα αυξανόμενο επιπολασμό και η οποία σχετίζεται με ένα πλήθος μεταβολικών και μη νοσημάτων. Τη νόσο αυτή χαρακτηρίζει το οξειδωτικό στρες και η χρόνια φλεγμονή, με παθοφυσιολογία που εξαρτάται από πολλαπλούς παράγοντες κινδύνου. Από την άλλη πλευρά, τα ιχνοστοιχεία, ευεργετικά ή/και τοξικά, παίζουν σημαντικό ρόλο στην υγεία του οργανισμού, είτε λαμβάνοντας μέρος σε βιοχημικές διεργασίες, ασκώντας αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, ανοσολογική ή αντιμικροβιακή δράση, είτε προκαλώντας χρόνιες ή οξείες τοξικότητες, ποικίλες νόσους, ακόμα και καρκίνο. Το κύριο όργανο αποθήκευσης και ρύθμισης των επιπέδων των ιχνοστοιχείων του οργανισμού είναι το ήπαρ, επομένως είναι λογικό όταν η λειτουργία αυτού διαταραχθεί από την ύπαρξη κάποιας νόσου, να επηρεαστούν και τα επίπεδα ιχνοστοιχείων. Επιπλέον, είναι πιθανό η διαταραχή της ομοιόστασης των ιχνοστοιχείων του οργανισμού να οδηγεί σε κάποιες ηπατικές νόσους.

Οι έρευνες σχετικά με τα επίπεδα ιχνοστοιχείων σε ασθενείς με ηπατικές νόσους είναι περιορισμένες, ενώ δεν υπάρχουν μελέτες που να διερευνούν τα επίπεδα αυτών στο πλάσμα αίματος σε ανθρώπους, σε σχέση με τη NAFLD και την εξέλιξη αυτής. Δεδομένης της σχέσης των ιχνοστοιχείων με τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες και τη χαρακτηριστική ύπαρξη των δύο τελευταίων στη NAFLD, σκοπός της εργασίας ήταν α) να μελετηθούν τα επίπεδα ενός πλήθους ιχνοστοιχείων, στο πλάσμα ατόμων με διαφορετικά επίπεδα βαρύτητας της νόσου σε σχέση με άτομα με απουσία της νόσου και β) να διερευνηθεί η σχέση αυτών των ιχνοστοιχείων με την εξέλιξη της νόσου αλλά και με διάφορους βιοχημικούς δείκτες σχετιζόμενους με τη NAFLD.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Σχεδιασμός της έρευνας

Η παρούσα μελέτη αποτελεί τμήμα μιας μεγαλύτερης μελέτης «ασθενών - μαρτύρων» που έλαβε χώρα την περίοδο Ιουνίου 2012 – Φεβρουαρίου 2015, στην Αθήνα.

3.2 Δείγμα της έρευνας

Το δείγμα της έρευνας περιλάμβανε 189 συμμετέχοντες που στρατολογήθηκαν ανάμεσα σε ασθενείς που επισκέφτηκαν τα εξωτερικά ιατρεία ηπατολογίας και παχυσαρκίας Α' ΠΠΚ του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Λαϊκό». Η συμμετοχή ήταν εθελοντική, όλοι οι ασθενείς εξετάστηκαν για την παρουσία NAFLD στο τμήμα Ραδιολογίας του νοσοκομείου, ενημερώθηκαν για τους στόχους της μελέτης και έδωσαν την ενυπόγραφη συνέναισή τους.

3.3 Μετρήσιμα χαρακτηριστικά

3.3.1 Διάγνωση της NAFLD

Οι ενήλικες α) με απουσία συνακόλουθων παραγόντων κινδύνου για τη NAFLD τη χρονική περίοδο της στρατολόγησης και β) χωρίς υπερβάλλουσα πρόσληψη αλκοόλ (>30g/ημέρα για τους άνδρες, >20g/ημέρα για τις γυναίκες), εξετάστηκαν για την ύπαρξη της νόσου όπως ορίζεται από την Αμερικάνικη Ένωση Μελέτης των Ηπατικών Νόσων (American Association for the Study of Liver Diseases-AASLD)⁷⁰. Σε όλους τους συμμετέχοντες διενεργήθηκε υπέρηχος κοιλίας από τον ίδιο χειριστή καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Η διάγνωση της NAFLD βασίστηκε στις εξής παραμέτρους: α) διάχυτη ηχογένεια ήπατος, β) αυξημένη ηχογένεια σε σχέση με το νεφρικό φλοιό, γ) απώλεια σαφήνειας του διαφράγματος και θόλωση των αγγειακών ορίων. Στη συνέχεια τα άτομα κατηγοριοποιήθηκαν ως εξής:

- Απουσία ηπατικής στεάτωσης: φυσιολογική ηχογένεια
- Ήπια ηπατική στεάτωση: ελαφρώς αυξημένη ηχογένεια, φυσιολογικό διάφραγμα και σαφήνεια αγγειακών ορίων
- Μέτρια ηπατική στεάτωση: μετρίως αυξημένη ηχογένεια, ήπια απώλεια διαφράγματος και σαφήνειας αγγειακών ορίων
- Σοβαρή ηπατική στεάτωση: σοβαρά αυξημένη ηχογένεια και απώλεια διαφράγματος και σαφήνειας αγγειακών ορίων.

3.3.2 Δειγματοληψία αίματος και ανάλυση

Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν μετά από 12ωρη νηστεία, η ανάλυση αίματος περιλάμβανε ολική χοληστερόλη (TC), HDL χοληστερόλη, τριγλυκερίδια (TG), γλυκόζη νηστείας, ισουλίνη νηστείας, και τα ηπατικά ένζυμα AST, ALT, γGT. Η LDL χοληστερόλη υπολογίστηκε από την εξίσωση Friedewald και η αντίσταση στην ινσουλίνη από το μοντέλο εκτίμησης αντίστασης HOMA-IR^{71,72}. Επιπρόσθετα, απομονώθηκαν ο ορός και το πλάσμα, τα οποία φυλάχθηκαν στους -80 °C μέχρι την ανάλυση. Όλα τα πλαστικά υλικά που ήρθαν σε επαφή με τα δείγματα αίματος είχαν προηγουμένως πλυθεί διεξοδικά, εμβαπτιστεί σε αραιό HNO₃ (Merck, Darmstadt, Germany) και εκπλυθεί με υπερκαθαρό ύδωρ 18.2 MΩ (Millipore, Bedford, MA, USA). Όλες οι μικροπιπέτες που χρησιμοποιήθηκαν για την αραιώση των δειγμάτων βαθμονομούνταν συχνά. Για την προετοιμασία όλων των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε ογκομετρικός εξοπλισμός κλάσης A.

Τα δείγματα χωνεύτηκαν σε μείγμα HNO₃ (suprapur 65%) (Merck) και H₂O₂ (suprapur 30%) (Merck), κατά τη διαδικασία που περιγράφεται από τους Jin et al και Batarion et al, ελαφρώς τροποποιημένη^{74,75}. Τα χωνεμένα δείγματα αναλύθηκαν με ICP-MS (Thermo Scientific ICAP Qc) (Waltham, MA USA). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο single collision cell mode, με kinetic energy discrimination (KED), με χρήση καθαρού He. Η καταστολή σήματος λόγω της μήτρας του δείγματος και η ολίσθηση του οργάνου διορθώθηκαν με χρήση εσωτερικού προτύπου (⁴⁵Sc, ¹⁰³Rh).

Τα συλλεχθέντα δείγματα αναλύθηκαν εις δειπλούν. Ο μέσος όρος των δύο αναλύσεων χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ), μετρημένα σύμφωνα με την US EPA, ήταν αντίστοιχα ίσα με 0.05 και 0.16 μg L⁻¹ για το Co και το Cd, 0.1 και 0.3 μg L⁻¹ για το Cu και το Rb, 0.4 και 1.3 μg L⁻¹ για τον Zn, 0.3 και 1.0 μg L⁻¹ για το Sr, 0.03 και 0.10 μg L⁻¹ για το Cs και το Tl, 0.2 και 0.7 μg L⁻¹ για το Ba και 0.15 και 0.50 μg L⁻¹ για το As⁷⁵. Για τους στατιστικούς υπολογισμούς, οι τιμές κάτω των MDLs αντικαταστάθηκαν με τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου διαιρεμένα δια √2. Το ποσοστό τιμών κάτω του LOQ (τιμές μεταξύ LOD και LOQ) ήταν λιγότερο από 10%. Οι τιμές που μετρήθηκαν από το εργαστήριο διατηρήθηκαν και στην περίπτωση που η ακρίβεια ήταν μικρότερη διότι σε επίπεδα μικρής ανιχνευσιμότητας (<15%) η μέθοδος διαχείρισης left censored δεδομένων δεν έχει μεγάλη διαφορά⁷⁶.

3.3.3 Διασφάλιση Ποιότητας

Για σκοπούς διασφάλισης ποιότητας, όταν τα δείγματα αναλύθηκαν σε παρτίδες, τουλάχιστον ένα τυφλό δείγμα συμπεριλαμβανόταν στην ανάλυση. Όστε να επαληθεφτεί η ακρίβεια της

μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν τα διαπιστευμένα υλικά αναφοράς (Certified Reference Materials-CRMs) «Plasma Control lyophilized, Levels I και II». Οι ανακτήσεις των Co, Cu, Zn, Cd, Tl και As κυμαινόνταν μεταξύ 95.0 και 103% (διαπιστευμένες τιμές για Rb, Sr, Cs και Ba δεν συμπεριλαμβάνονταν στα συγκεκριμένα CRMs).

3.4 Στατιστική ανάλυση

Οι ποιοτικές μεταβλητές δίνονται ως συχνότητα (%), τα συνεχή παραμετρικά χαρακτηριστικά ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση (SD). Για τη σύγκριση των μέσων διαφορών μεταξύ των επιπέδων βαρύτητας της νόσου χρησιμοποιήθηκε One-way ANOVA. Για τα ιχνοστοιχεία και τους βιοδείκτες που σχετίζονται με τη NAFLD υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson. Πολλαπλή κανονική παλινδρόμηση (Multiple Ordinal Regression) εφαρμόστηκε για να ελεγχθεί η υπόθεση της συσχέτισης μεταξύ ιχνοστοιχείων και NAFLD, διορθωμένη για την ηλικία, το φύλο και το ΔΜΣ. Πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση (Multiple Linear Regression) εφαρμόστηκε για τον έλεγχο της υπόθεσης της συσχέτισης ιχνοστοιχείων με βιοχημικούς δείκτες, επίσης διορθωμένη για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ ενώ προστέθηκε στο μοντέλο επιπλέον το επίπεδο βαρύτητας της νόσου. Ο ΣΔΤ2 προστέθηκε στο μοντέλο ως συγχυτικός παράγοντας για τα γλυκαιμικά χαρακτηριστικά. Όλες οι δοκιμές ήταν two-sided και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ως $p\text{-value} \leq 0.05$. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το SPSS 21.0 για Windows (IBM Corp. Chicago, IL, USA).

3.5 Βιοηθική

Όλοι οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν για τους στόχους της μελέτης και έδωσαν την έγγραφη συναίνεσή τους. Η μελέτη έχει εγκριθεί από την Επιτροπή Ηθικής του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου Αθηνών (35/25-07-2012), βασισμένη στη Διακήρυξη του Ελσίνκι.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Χαρακτηριστικά του δείγματος

Τα κύρια χαρακτηριστικά του δείγματος, φαίνονται στον πίνακα 4.1.1. Το δείγμα αποτελούταν από 189 άτομα, εκ των οποίων 76 ήταν άνδρες. Ο μέσος όρος ηλικίας ήταν 45.3 ± 12.6 έτη και ο μέσος όρος του ΔΜΣ ήταν $27.6 \pm 5.02 \text{ kg/m}^2$. Εβδομήντα εκ των συμμετεχόντων είχαν απουσία νόσου, 35 διαγνώστηκαν με ήπια στεάτωση, 52 με μέτρια και 32 με σοβαρή στεάτωση.

Πίνακας 4.1.1: Χαρακτηριστικά του δείγματος

	Απουσία	Ήπια	Μέτρια	Σοβαρή
N (%)	70 (37)	35 (18.5)	52 (27.5)	32 (16.9)
Άνδρες, n (%)	27 (38.6)	11 (31.4)	25 (48.1)	13 (40.6)
ΔΜΣ (kg/m²)	23.81 ± 2.97	25.95 ± 3.02	30.61 ± 3.98	32.96 ± 4.10
Ηλικία (έτη)	36.54 ± 11.41	47.31 ± 11.25	51.14 ± 9.78	52.88 ± 9.06
Βιοχημικά χαρακτηριστικά				
AST (U/L)	21.18 ± 5.39	20.17 ± 8.67	21.39 ± 6.57	28.83 ± 10.19
ALT (U/L)	21.18 ± 9.09	22.97 ± 19.11	26.04 ± 8.68	42.27 ± 16.31
AST/ALT	1.10 ± 0.33	1.02 ± 0.27	0.87 ± 0.25	0.72 ± 0.17
γGT (U/L)	19.08 ± 18.31	36.17 ± 41.49	24.19 ± 11.72	36.0 ± 22.71
Ινσουλίνη (μU/mL)	9.51 ± 3.68	12.28 ± 10.0	12.61 ± 5.11	32.11 ± 44.41
Γλυκόζη (mg/dL)	82.94 ± 7.42	84.07 ± 6.77	90.13 ± 9.86	101.40 ± 14.58
HOMA-IR	2.01 ± 0.83	2.62 ± 2.38	2.83 ± 1.28	8.33 ± 12.81

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως συχνότητες ή ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση (SD).

4.2 Συσχετίσεις

4.2.1 Συσχέτιση συγκέντρωσης ιχνοστοιχείων και επιπέδων βαρύτητας της νόσου

Στον Πίνακα 4.2.1.1 φαίνονται οι μέσες τιμές των ιχνοστοιχείων ανάμεσα στα διαφορετικά επίπεδα βαρύτητας της νόσου. Τα περισσότερα ιχνοστοιχεία δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανά επίπεδο, εκτός από τα Zn, Cs, Ba και Tl. Πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση Zn στο πλάσμα του αίματος φαινόταν να μειώνεται με την εξέλιξη της νόσου ($p < 0.001$). Αντιθέτως, η συγκέντρωση Cs στο πλάσμα του αίματος φαίνεται πως είχε αυξητική τάση όσο η νόσος εξελισσόταν σε σοβαρότερο επίπεδο ($p < 0.001$). Το Ba και το Tl εμφάνισαν μικτή τάση ($p < 0.047$ και $p < 0.010$ αντίστοιχα).

Πίνακας 4.2.1.1 : Επίπεδα ιχνοστοιχείων (μg/L) ανάμεσα στις ομάδες βαρύτητας της NAFLD

Ιχνοστοιχεία	Απουσία (N = 70)	Ήπια (N = 35)	Μέτρια (N = 52)	Σοβαρή (N = 32)	p*
Co	0.52 ± 0.61	0.50 ± 0.43	0.49 ± 0.46	0.38 ± 0.45	0.266
Cu	1223 ± 371	1234 ± 277	1220 ± 223	1152 ± 353	0.654
Zn	1453 ± 560 ^{a,d,e}	1357 ± 422 ^{b,f}	1157 ± 473 ^{a,c,e,f}	962 ± 446 ^{b,c,d}	<0.001
Rb	365 ± 109	367 ± 65.6	396 ± 128	391 ± 142	0.575
Sr	33.7 ± 16.2	36.1 ± 14.4	38.1 ± 16.2	38.0 ± 14.2	0.311
Cd	0.16 ± 0.30	0.06 ± 0.05	0.13 ± 0.22	0.08 ± 0.20	0.358
Cs	0.36 ± 0.40 ^{a,b,c}	0.61 ± 0.31 ^a	0.64 ± 0.34 ^b	0.68 ± 0.35 ^c	<0.001
Ba	8.46 ± 7.50 ^a	6.86 ± 7.76	6.36 ± 8.11 ^a	7.01 ± 7.08	0.047
Tl	0.04 ± 0.03 ^a	0.04 ± 0.02 ^b	0.05 ± 0.03 ^c	0.03 ± 0.03 ^{a,b,c}	0.010
As	2.55 ± 4.72	2.79 ± 3.94	2.86 ± 4.28	4.19 ± 6.77	0.115

*Διαφορά ανά επίπεδο βαρύτητας.

^{a-f}Τιμές στην ίδια γραμμή που έχουν ίδιο εκθέτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (p ≤ 0.05).

Τα αποτελέσματα της κανονικής παλινδρόμησης φαίνονται στον **Πίνακα 4.2.1.2**. Το μοντέλο διορθώθηκε για ΔΜΣ, φύλο και ηλικία. Το Ba και το Tl δεν εμφάνιζαν πλέον στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα επίπεδα βαρύτητας της νόσου. Ωστόσο, σχετικά με το Zn, τα αποτελέσματα έδειξαν πως αύξηση 1 μg/L αυτού στο πλάσμα μειώνει την πιθανότητα εξέλιξης της νόσου κατά 0.001 (SE = 0.000, p = 0.003). Αντίστοιχα, αύξηση του Cs κατά 1 μg/L στο πλάσμα αυξάνει την πιθανότητα εξέλιξης της νόσου κατά 1.462 (SE = 0.429, p = 0.001).

Πίνακας 4.2.1.2 : Μοντέλο κανονικής παλινδρόμησης, όπου φαίνονται οι συσχετίσεις μεταξύ της συγκέντρωσης ιχνοστοιχείων στο πλάσμα αίματος και της βαρύτητας της NAFLD.

Ιχνοστοιχεία (μg/L) *	Beta	SE	p
Zn	-0.001	0.000	0.003
Cs	1.462	0.429	0.001
Ba	0.019	0.020	0.334
Tl	-2.359	5.678	0.678

*Διορθωμένα ως προς φύλο, ηλικία και ΔΜΣ.

SE, τυπικό σφάλμα.

4.2.2 Συσχέτιση ιχνοστοιχείων με βιοχημικούς δείκτες

Οι βιοχημικοί δείκτες που μελετήθηκαν ήταν οι AST, ALT, γGT, AST/ALT, γλυκόζη, ινσουλίνη και HOMA-IR, δεδομένης της σχέσης τους με την ηπατική υγεία. Ανάμεσα στα ιχνοστοιχεία,

στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις εμφανίστηκαν στα εξής: Zn και ινσουλίνη ($r = -0.232$, $p = 0.002$), Zn και HOMA-IR ($r = -0.200$, $p = 0.009$), Cs και ALT ($r = 0.211$, $p = 0.006$), Cs και γGT ($r = 0.296$, $p < 0.001$), Cs και AST/ALT ($r = -0.212$, $p = 0.006$), Cs και ινσουλίνη ($r = 0.276$, $p < 0.001$), Cs και HOMA-IR ($r = 0.240$, $p = 0.001$), Rb και γGT ($r = 0.215$, $p = 0.005$), As και ALT ($r = 0.166$, $p = 0.030$), As και γGT ($r = 0.194$, $p = 0.011$). Το TI συσχετίστηκε ελαφρά με την ινσουλίνη, αλλά όχι στατιστικά σημαντικά ($r = -0.132$, $p = 0.075$).

Τα αποτελέσματα της γραμμικής παλινδρόμησης εμφανίζονται στον **πίνακα 4.2.2.1**. Έπειτα από διόρθωση για το φύλο, την ηλικία, ΔΜΣ και επίπεδο βαρύτητας NAFLD, η πλειονότητα των παραπάνω συσχετίσεων εξαφανίστηκε. Σχετικά με το TI, η συσχέτιση με την ινσουλίνη παρέμεινε στατιστικά σημαντική μετά τη διόρθωση για τους προαναφερθέντες συγχυτικούς παράγοντες ($p = 0.009$). Επιπλέον, μετά από διαχωρισμό των συγκεντρώσεων TI στο πλάσμα σε δύο ομάδες, φάνηκε πως η ομάδα με την υψηλότερη συγκέντρωση TI είχε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ινσουλίνης σε σχέση με την ομάδα χαμηλότερου TI ($10.78 \pm 4.18 \mu\text{g/mL}$ έναντι $14.26 \pm 12.44 \mu\text{g/mL}$, $p = 0.034$). Ακόμη, παρατηρήθηκε πως στα άτομα με χαμηλό Κ ορού ($4.29 \pm 1.86 \mu\text{g/L}$, εύρος 3.60-4.50) το TI φάνηκε να συσχετίζεται αντίστροφα με την ινσουλίνη, ενώ αντιθέτως, στα άτομα με υψηλότερο Κ ορού ($4.79 \pm 1.90 \mu\text{g/L}$, εύρος 4.60 - 5.60) δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση TI και ινσουλίνης.

Πίνακας 4.2.2.1 : Μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης, όπου φαίνονται οι συσχετίσεις ανάμεσα στα ιχνοστοιχεία και τους βιοχημικούς δείκτες.

Βιοχημικοί δείκτες	Ιχνοστοιχεία	Beta	SE	<i>p</i>
ALT (U/L)	Cs	-1.315	2.350	0.577
	As	0.124	0.170	0.467
AST/ALT	Cs	-0.061	0.049	0.209
γGT (U/L)	Cs	6.249	3.645	0.088
	Rb	0.014	0.012	0.226
	As	-0.144	0.268	0.591
Ινσουλίνη (μg/mL)	Zn	-0.001	0.001	0.595
	Cs	-1.985	1.876	0.291
	TI	-65.188	24.697	0.009
	TI*	-65.284	24.743	0.009
HOMA-IR	Zn	-0.000035	0.001	0.968
	Cs	-0.482	1.182	0.684

*Το μοντέλο είναι επιπλέον διορθωμένο και για ΣΔΤ2.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι πιθανές σχέσεις μεταξύ κάποιων ιχνοστοιχείων, της βαρύτητας της NAFLD και σχετιζόμενων με αυτή βιοχημικών δεικτών. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως υψηλότερα επίπεδα Zn στο πλάσμα του αίματος συσχετίζονται με χαμηλότερο επίπεδο βαρύτητας της νόσου, ενώ αναφορικά με το Cs παρατηρήθηκε το αντίστροφο, δηλαδή υψηλότερη συγκέντρωση του μετάλλου στο πλάσμα αίματος συσχετίζεται με πιο προχωρημένο στάδιο της NAFLD. Όσον αφορά τα υπόλοιπα ιχνοστοιχεία, δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση αυτών με το επίπεδο βαρύτητας της νόσου. Επιπλέον, ανάμεσα στα ιχνοστοιχεία που μελετήθηκαν, τα επίπεδα TI στο πλάσμα φάνηκε να συσχετίζονται στατιστικά σημαντικά με την ινσουλίνη. Πιο συγκεκριμένα, ασθενείς με υψηλότερο TI στο αίμα τους είχαν χαμηλότερα επίπεδα ινσουλίνης σε σχέση αυτούς με χαμηλότερο TI. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι οι συγκεντρώσεις των ιχνοστοιχείων που βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν γενικά εντός του εύρους φυσιολογικών τιμών που δίνει η βιβλιογραφία. Ο σχετικός πίνακας με τις τιμές αναφοράς παρατίθεται στο παράρτημα.

Τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν είναι σε συμφωνία με την πρόσφατη έρευνα των Gatiatulina et al, οι οποίοι μελέτησαν τα επίπεδα ιχνοστοιχείων σε μοντέλο ποντικών με NAFLD και διαπίστωσαν σημαντική διαταραχή των επιπέδων αρκετών ιχνοστοιχείων στο αίμα και στο ήπαρ, μεταξύ αυτών και ο Zn⁷⁷. Αντιθέτως, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική αλλαγή στα επίπεδα των Co και Sr στο πλάσμα, όπως ανέφεραν οι Gatiatulina et al. Τέλος, συμφωνούμε με τους παραπάνω ερευνητές στο ότι πιθανότατα η ύπαρξη και η εξέλιξη της νόσου μπορεί να επηρεάζει τα επίπεδα κάποιων ιχνοστοιχείων.

Η σχέση του Zn με τις χρόνιες ηπατικές νόσους είναι γνωστή⁷⁸. Σε παλαιότερη μελέτη οι Goode et al κατέγραψαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα Zn στο πλάσμα ασθενών με NAFLD σε σχέση με άτομα άνευ νόσου⁷⁹. Σε πιο πρόσφατη μελέτη φάνηκε πως η συγκέντρωση Zn σε υγιείς ανθρώπους είναι υψηλότερη από αυτή των ασθενών με NAFLD και αυτό πιθανόν να οφείλεται στη διατροφική πρόσληψη⁸⁰. Επίσης, οι Gatiatulina et al, βρήκαν μειωμένα επίπεδα Zn στο ζωικό τους μοντέλο⁷⁷. Η μέση συγκέντρωση Zn στα δείγματα της παρούσας μελέτης είναι εντός του φυσιολογικού εύρους που δίνει η βιβλιογραφία για τα επίπεδα στο πλάσμα, τα οποία είναι 587 - 1215 $\mu\text{g/L}$ ⁸¹. Καθώς η NAFLD χαρακτηρίζεται κατεξοχήν από φλεγμονή και

οξειδωτικό στρες, αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει τη συσχέτιση που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη. Μια παρόμοια εξήγηση έχει δοθεί από τους Zoli et al, οι οποίοι παρατήρησαν χαμηλότερα επίπεδα Zn στον ορό σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (μια νόσο που χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή), σε σχέση με υγιείς⁸². Η μείωση αυτή αποδόθηκε στις κυτταροκίνες, γνωστές για τη συμμετοχή τους στη φλεγμονή και οι οποίες μπορεί να παίζουν ρόλο στο μεταβολισμό κάποιων ιχνοστοιχείων. Κατ' αυτό τον τρόπο, αυτή είναι μια πιθανή ερμηνεία των αποτελεσμάτων και της παρούσας μελέτης, παρόλο που δεν είναι διαθέσιμα δεδομένα σχετικά με τις κυτταροκίνες. Επιπλέον, η παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων Zn όσο η νόσος εξελίσσεται θα μπορούσε να οφείλεται και στην παρουσία του έντονου οξειδωτικού στρες. Η ύπαρξη χρόνιου οξειδωτικού στρες συνεπάγεται αυξημένες ανάγκες του οργανισμού για αντιοξειδωτική άμυνα, επομένως οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί είναι λογικό να μη μπορούν να αντεπεξέλθουν μετά από ένα σημείο και έτσι να παρατηρείται αυτή η μείωση του ψευδαργύρου, λόγω εξάντλησης των αποθεμάτων αυτού.

Σχετικά με το Cs, οι περισσότερες μελέτες αφορούν τα ραδιενεργά ισότοπά του (Cs 137 και Cs 134). Το φυσικώς απαντώμενο Cs 133 είναι σχετικά ασφαλές, παρόλα αυτά οι πληροφορίες σχετικά με την πιθανή χρόνια ή την οξεία τοξικότητά του είναι ανεπαρκείς⁸³. Υψηλές δόσεις Cs έχει παρατηρηθεί ότι διαταράσσουν την ομοιόσταση του K, προκαλώντας καρδιακά προβλήματα όπως η ταχυκαρδία, και το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου⁸³. Μια ενδιαφέρουσα μελέτη των Padilla et al αναφέρει στατιστικά σημαντική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων Cs στα ούρα και της παχυσαρκίας⁸⁴. Μέχρι σήμερα όμως δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα για τη σχέση του Cs με τις ηπατικές νόσους, το οξειδωτικό στρες ή τη φλεγμονή. Τα επίπεδα αναφοράς του Cs στον ορό του αίματος είναι 0.11 - 5.2 μg/L, ενώ το όριο ασφαλείας για την εμφάνιση μεταβολικών ανομαλιών είναι 6.8 μg/L⁸⁵. Τα δείγματα της παρούσας μελέτης είναι εντός των ορίων αυτών, επομένως δεν υπήρχαν συμπτώματα που να μπορούσαν να αποδοθούν σε τοξικότητα του Cs. Μια μελέτη που επιχείρησε να μετρήσει την επίδραση της έκθεσης σε Cs 133, στο οξειδωτικό στρες στο φυτικό οργανισμό *Nitella pseudoflabellata*, βρήκε πως η χρόνια έκθεση στο χημικό αυτό στοιχείο προκαλεί μείωση της ανάπτυξης του φυτού και επαγωγή του οξειδωτικού στρες μέσω διαταραχής της λειτουργίας των αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η καταλάση⁸⁶. Υποθετικά, μέταλλα όπως το Cs θα μπορούσαν να εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στο οξειδωτικό στρες που αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό της NAFLD και με αυτό τον τρόπο να εξηγείται το παρατηρούμενο αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης. Λόγω όμως της φύσης του μετάλλου και του μικρού πλήθους σχετικών ερευνών, είναι απαραίτητο να γίνουν περισσότερες μελέτες ώστε να εξηγηθεί το αποτέλεσμα αυτό.

Το ΤΙ θεωρείται τοξικό, με οξεία τοξικότητα ακόμη μεγαλύτερη από βαρέα μέταλλα όπως Hg, Cd και Pb³⁹. Η τοξικότητα αυτή αποδίδεται στην ικανότητά του να αντικαθιστά το Κ, να συσσωρεύεται στα κύτταρα και να επεμβαίνει σε διάφορες εξαρτώμενες από το Κ διεργασίες ενώ έχει συσχετιστεί θετικά με την παχυσαρκία^{39,84}. Δεδομένου του ρόλου των διαύλων Κ στην έκκριση ινσουλίνης, μια πιθανή εξήγηση της παρατηρούμενης συσχέτισης μεταξύ ΤΙ και ινσουλίνης θα μπορούσε να είναι ότι το ΤΙ αλληλεπιδρά με τους διαύλους Κ και έτσι να επηρεάζει την έκκριση ινσουλίνης^{87,88}. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται περαιτέρω, από το ότι η παραπάνω συσχέτιση παρέμεινε στατιστικά σημαντική μόνο στους ασθενείς με χαμηλό Κ ορού, στην παρούσα μελέτη. Συγκέντρωση ΤΙ μικρότερη από 0.4 μg/L θεωρείται φυσιολογική και ασφαλής^{81,85}. Όλα τα δείγματα της μελέτης είχαν συγκέντρωση ΤΙ μικρότερη από το παραπάνω όριο.

Ανάμεσα στα πλεονεκτήματα της παρούσας μελέτης, πρέπει να αναφερθεί πως είναι η πρώτη που επιχειρεί να διερευνήσει τα επίπεδα ιχνοστοιχείων σε άτομα με διαφορετικά επίπεδα NAFLD και τη σχέση αυτών με βιοδείκτες της νόσου. Ένα άλλο πλεονέκτημα της μελέτης είναι η χρήση της ICP-MS για τη μέτρηση των ιχνοστοιχείων, μιας τεχνικής που προσφέρει πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης και μεγάλη ακρίβεια.

Η παρούσα μελέτη όμως διαθέτει και κάποια μειονεκτήματα. Το πρώτο από αυτά είναι το σχετικά μικρό μέγεθος δείγματος (n = 189) το οποίο προσφέρει μικρή στατιστική ισχύ. Το δεύτερο μειονέκτημα, το οποίο πηγάζει από το σχεδιασμό της μελέτης, είναι ότι δεν είναι δυνατό να προταθεί μηχανισμός για τα παρατηρούμενα αποτελέσματα, επομένως μόνο υποθέσεις μπορούν να γίνουν ως προς την εξήγηση των ευρημάτων.

Συμπερασματικά λοιπόν, τα ευρήματα της παρούσας εργασίας προτείνουν πως τα επίπεδα των ιχνοστοιχείων είναι πιθανό να επηρεάζονται από την παρουσία και την εξέλιξη της NAFLD, ή και το αντίστροφο. Περισσότερες έρευνες είναι απαραίτητες για να εξηγηθούν οι μηχανισμοί με τους οποίους τα ιχνοστοιχεία εμπλέκονται στην παθογένεση της NAFLD. Η αποκωδικοποίηση του ρόλου των ιχνοστοιχείων στην εμφάνιση και την εξέλιξη της νόσου θα μπορούσε να είναι μείζουσας σημασίας στη θεραπεία της NAFLD.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, doi: 10.1038/nrgastro.2013.171.
2. Sharma M, Mitnala S, Vishnubhotla RK, Mukherjee R, Reddy DN, Rao PN. The riddle of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Progression from Nonalcoholic Fatty Liver to Nonalcoholic Steatohepatitis. *J Clin Exp Hepatol* 2015; 5: 147-158.
3. Goh GBB, McCullough AJ. Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci* 2016; 61: 1226-1233.
4. Than NN, Newsome PN. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis* 2015; 239: 192-202.
5. Mayo Clinic Stuff. Nonalcoholic Fatty Liver Disease (Overview). Mayo Clinic 2016. <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/nonalcoholic-fatty-liver-disease/home/ovc-20211638>, Ανακτήθηκε: 11/5/2017.
6. Levene AP, Goldin RD. The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. *Histopathology* 2012; 61: 141-152.
7. Satapathy SK, Sanyal AJ. Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis* 2015; 35: 221-235.
8. Byrne CD, Targher G. NAFLD: A multisystem disease. *J Hepatol* 2015; 62: 47-64.
9. Abenavoli L, Milic N, Di Renzo L, Preveden T, Medic-Stojanoska M, De Lorenzo A. Metabolic aspects of adult patients with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 2016. 22 (31): 7006-7016.
10. Sayiner M, Koenig A, Henry L, Younossi ZM. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in the United States and the rest of the world. *Clin Liver Dis* 2016; 20 (2): 205-214.
11. Sun C, Fan JG, Qiao L. Potential Epigenetic Mechanism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci* 2015; 16 (3): 5161-5179.
12. Clemente MG, Mandato C, Poeta M, Vajro P. Pediatric non-alcoholic fatty liver disease: Recent solutions, unresolved issues, and future research directions. *World J Gastroenterol* 2016; 22 (36): 8078-8093.
13. Williams CD, Stengel J, Asike MI, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing

- ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* 2011; 140: 124-31.
14. Ayonrinde OT, Olynyk JK, Beilin LJ, et al. Gender-specific differences in adipose distribution and adipocytokines influence adolescent nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2011; 53: 800–9.
 15. Leite NC, Villela-Nogueira C, Cardoso CRL, Salles G. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes: From physiopathological interplay to diagnosis and treatment. *World J Gastroenterol* 2014; 20 (26): 8377-8392.
 16. Valenti L, Bugianesi E, Pajvani U, Targher G. Nonalcoholic fatty liver disease: cause or consequence of type 2 diabetes? *Liver Int* 2016; DOI: 10.1111/liv.13185.
 17. Margariti E, Deutsch M, Manolakopoulos S, Papatheodoridis GV. Non-alcoholic fatty liver disease may develop in individuals with normal body mass index. *Ann Gastroenterol* 2012; 25: 45-51.
 18. Souza, M.R., et al., Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. *Arq Gastroenterol* 2012. 49(1): 89-96.
 19. Bhatia, L.S., et al., Non-alcoholic fatty liver disease: a new and important cardiovascular risk factor? *Eur Heart J* 2012; 33(10): 1190-1200.
 20. Clark, J.M., F.L. Brancati, and A.M. Diehl, Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122 (6): 1649-1657.
 21. Yao, H., et al., Herbal medicines and nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2016; 22 (30): 6890-6905.
 22. Hassan, K., et al., Nonalcoholic fatty liver disease: A comprehensive review of a growing epidemic. *World J Gastroenterol* 2014; 20 (34): 12082-12101.
 23. Saponaro C, Gaggini M, Gastaldelli A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Type 2 Diabetes: Common Pathophysiologic Mechanisms. *Cur Diab Rep* 2015; 15: 34.
 24. Perseghin G, Lattuada G, De Cobelli F, et al. Habitual physical activity is associated with intrahepatic fat content in humans. *Diabetes Care* 2007; 30(3): 683–688.
 25. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Goldsmith R, et al. Role of leisuretime physical activity in nonalcoholic fatty liver disease: a population-based study. *Hepatology* 2008; 48(6): 1791–1798.
 26. Fan, J.G. and H.X. Cao, Role of diet and nutritional management in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28(4): 81-87.

27. Zein, C.O., et al., Smoking and severity of hepatic fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2011; 54(4): 753-9.
28. Yu J, Marsh S, Hu J, Feng W, Wu C. The Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Genetic Background. *Gastroenterol Res Pract* 2016; doi: 10.1155/2016/2862173.
29. Dongiovanni P, Lanti C, Riso P, Valenti L. Nutritional therapy for nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem* 2016; 29: 1-11.
30. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Q J Med* 2010; 103: 71-83.
31. Tilg, H. and A.R. Moschen, Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010; 52(5): 1836-1846.
32. Takaki A, Kawai D, Yamamoto K. Multiple Hits, Including Oxidative Stress, as Pathogenesis and Treatment Target in Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci* 2013; 14: 20704-20728.
33. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Leptin in nonalcoholic fatty liver disease: A narrative review. *Metab Clin Exp* 2015; 64: 60-78.
34. Ramoutar RR, Brumaghim JL. Antioxidant and Anticancer Properties and Mechanisms of Inorganic Selenium, Oxo-Sulfur, and Oxo-Selenium Compounds. *Cell Biochem Biophys* 2010; 58: 1-23.
35. Koekkoek WAC, van Zanten ARH. Antioxidant Vitamins and Trace Elements in Critical Illness. *Nutr Clin Pract* 2016; 31 (4): 457-474.
36. Wong CP, Ho E. Zinc and its role in age-related inflammation and immune dysfunction. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56: 77-87.
37. Spritzer PM, Lecke SB, Fabris VC, Ziegelmann PK, Amaral L. Blood Trace Element Concentrations in Polycystic Ovary Syndrome: Systematic Review and Meta-analysis. *Biol Trace Elem Res* 2017; 175: 254-262.
38. Guo CH, Chen PC, Ko WS. Status of Essential Trace Minerals and Oxidative Stress in Viral Hepatitis C Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Med Sci* 2013; 10(6): 730-737.
39. Peter ALJ, Viraraghavan T. Thallium: a review of public health and environmental concerns. *Environ Int* 2005; 31 (4): 493– 501.

40. Jablonska-Czapla M. Arsenic, antimony, chromium and thallium speciation in water and sediment samples with the LC-ICP-MS Technique. *Int J Anal Chem* 2015; doi 10.1155/2015/171478.
41. Nordberg M, Nordberg GF. Trace element research-historical and future aspects. *J Trace Elem Med Biol* 2016; 38: 46-52.
42. Hardy G, Hardy I, Manzanares W. Selenium supplementation in the critically ill. *Nutr Clin Pract* 2012; 27(1): 21-33.
43. Wilson RL, Grieger JA, Bianco-Miotto T, Roberts CT. Association between Maternal Zinc Status, Dietary Zinc Intake and Pregnancy Complications: A Systematic Review *Nutrients* 2016; 8(10): 641-669.
44. Prasad AS, Beck FWJ, Snell DC, Kucuk O. Zinc in cancer prevention. *Nutr Cancer* 2009; 61(6): 879-887.
45. Nriagu JO, Skaar EP. Trace elements and infectious diseases. Strungman Forum Reports, *the MIT Press* 2015; p.14.
46. Nriagu JO, Skaar EP. Trace elements and infectious diseases. Strungman Forum Reports, *the MIT Press* 2015; p.15.
47. Duntas LH. Selenium and Inflammation: Underlying Anti-inflammatory Mechanisms. *Horm Metab Res* 2009; 41: 443-447.
48. Nriagu JO, Skaar EP. Trace elements and infectious diseases. Strungman Forum Reports, *the MIT Press* 2015; p.121.
49. Nriagu JO, Skaar EP. Trace elements and infectious diseases. Strungman Forum Reports, *the MIT Press* 2015; p.141.
50. Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, Malavolta M, Basso A, Piacenza F, Ostan R, Cevenini E, Gonos ES, Monti D. Micronutrient-gene interactions related to inflammatory/immune response and antioxidant activity in ageing and inflammation. A systematic review. *Mech Ageing Dev* 2014; 136: 29-49.
51. Chasapis CT, Loutsidou AC, Spiliopoulou CA, Stefanidou ME. Zinc and human health: an update. *Arch Toxicol* 2012; 86: 521-534.
52. Bonaventura P, Benedetti G, Albareda F, Miossec P. Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmun Rev* 2015; 14: 277-285.
53. Nriagu JO, Skaar EP. Trace elements and infectious diseases. Strungman Forum Reports, *the MIT Press* 2015; p.127

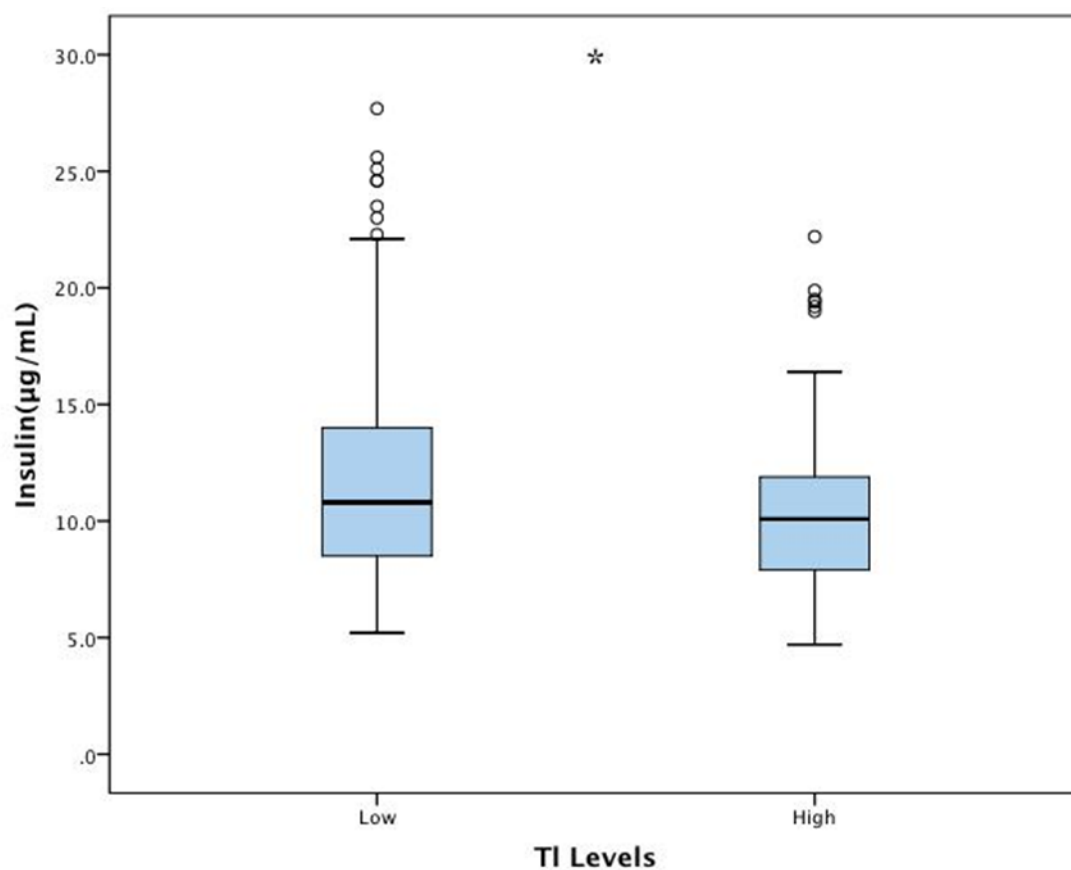
54. Khan MZ. A possible significant role of zinc and GPR39 zinc sensing receptor in Alzheimer disease and epilepsy. *Biomed Pharmacother* 2016; 79: 263-272.
55. Wasiko-Czopnik D, Paradowski L. The Influence of Deficiencies of Essential Trace Elements and Vitamins on the Course of Crohn's Disease. *Adv Clin Exp Med* 2012; 21 (1): 5-11.
56. Ranasinghe P, Wathurapatha WS, Ishara MH, Jayawardana R, Galappatthy P, Katulanda P, Constantine GR. Effects of Zinc supplementation on serum lipids: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Metab* 2015; 12: 26-42.
57. De Carvalho GB, Brandao-Lima PN, Maia CSC, Barbosa KBF, Pires LV. Zinc's role in the glycemic control of patients with type 2 diabetes: a systematic review. *Biometals* 2017; 30: 151-162.
58. Vasquez M, Calatayud M, Jadan Piedra C, Chiocchetti GM, Velez D, Devesa V. Toxic trace elements at gastrointestinal level. *Food Chem Toxicol* 2015; 86: 163-175.
59. Waseem A, Arshad J. A review of Human Biomonitoring studies of trace elements in Pakistan. *Chemosphere* 2016; 163: 153-176.
60. Abdul KSM, Jayasinghe SS, Chandana EPS, Jayasumana C, de Silva PM. Arsenic and human health effects: A review. *Env Toxicol Pharmacol* 2015; 40: 828-846.
61. Nriagu JO, Skaar EP. Trace elements and infectious diseases. Strungman Forum Reports, *the MIT Press* 2015; p.135.
62. Flora SJS. Arsenic and dichlorvos: Possible interaction between two environmental contaminants. *J Trace Elem Med Biol* 2016; 35: 43-60.
63. Go YM, Sutliff RL, Chandler JD, Khalidur R, Kang BY, Anania FA, Orr M, Fowler BA, Jones DP. Low-Dose Cadmium Causes Metabolic and Genetic Dysregulation Associated with Fatty Liver Disease in Mice. *Toxicol Sci* 2015; 147 (2): 524-534.
64. <https://mooreonhealth.files.wordpress.com/2016/05/leadeffects041016.jpg>
Ανακτήθηκε: 14/5/17
65. Li WC, Tse HF. Health risk and significance of mercury in the environment. *Environ Sci Pollut Res* 2015; 22: 192-201.
66. Kim KH, Kabir E, Jahan SA. A review on the distribution of Hg in the environment and its human health impacts. *J Hazard Mater* 2016; 306: 376-385.
67. Mishra S, Bharagava RN. Toxic and genotoxic effects of hexavalent chromium in environment and its bioremediation strategies. *J Environ Sci Health C* 2015; doi: 10.1080/10590501.2015.1096883.

68. British Nutrition Foundation. Minerals and Trace elements. <https://www.nutrition.org.uk/nutritionscience/nutrients-food-and-ingredients/minerals-and-trace-elements.html?showall=1&limitstart>, Ανακτήθηκε: 3/5/17.
69. Bolann BJ, Rahil-Khazen R, Henriksen H, Isrenn R, Ulvik RJ. Evaluation of methods for trace-element determination with emphasis on their usability in the clinical routine laboratory. *Scand J Clin Lab Inv* 2007; 67: 353-366.
70. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 2012; 55 (6): 2005–2023.
71. Friedewald WT, Levi RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *ClinChem* 1972; 18 (6): 499–502.
72. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28 (7): 412–419.
73. Jin L, Liu J, Ye B, Ren A. Concentrations of selected heavy metals in maternal blood and associated factors in rural areas in Shanxi Province, China. *Environ Int* 2014; 66: 157-164.
74. Batárióvá A, Spěváčková V, Beneš B, Čejchanová M, Šmíd J, Černá M. Blood and urine levels of Pb, Cd and Hg in the general population of the Czech Republic and proposed reference values. *Int J Hyg Environ Health* 2006; 209 (4): 359-366.
75. US EPA, 1997. Definition and procedures for the determination of the method detection limit. App. B, Part 136, 343–345 (40 CFR Ch. (7-1-12 edition)).
76. Falq G, Zeghnoun A, Pascal M, et al. Blood lead levels in the adult population living in France the French Nutrition and Health Survey (ENNS 2006-2007). *Environ Int* 2011; 37 (3): 565–571.
77. Gatiatulina ER, Popova EV, Polyakova VS, et al. Evaluation of tissue metal and trace element content in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease using ICP-DRC-MS. *J Trace Elem Med Biol* 2017; 39: 91–99.

78. Stamoulis I, Kouraklis G, Theocharis S. Zinc and the liver: an active interaction. *Dig Dis Sci* 2007; 52 (7): 1595–1612.
79. Goode HF, Kelleher J, Walker BE. Relationship between zinc status and hepatic functional reserve in patients with liver disease. *Gut* 1990; 31 (6): 694-697.
80. Zolfaghari H, Askari G, Siassi F, Feizi A, Sotoudeh G. Intake of nutrients, fiber and sugar in patients with nonalcoholic fatty liver disease in comparison to healthy individuals. *Int J Prev Med* 2016; doi 10.4103/2008-7802.188083.
81. Alimonti A, Bocca B, Mannella E, et al. Assessment of reference values for selected elements in a healthy urban population. *Ann Ist Super Sanita* 2005; 41(2): 181 - 187.
82. Zoli A, Altomonte L, Caricchio R, et al. Serum Zinc and Copper in Active Rheumatoid Arthritis: Correlation with Interleukin 1 β and Tumor Necrosis Factor- α . *Clin Rheumatol* 1998; 17 (5): 378-382.
83. Melnikov P, Zanoni LZ. Clinical effects of cesium intake. *Biol Trace Elem Res* 2009; 135 (1-3): 1–9.
84. Padilla MA, Elobeid M, Ruden DM, Allison DB. An examination of the association of selected toxic metals with total and central obesity indices: NHANES 99-02. *Int J Environ Res Public Health* 2010; 7 (9): 3332-3347.
85. Minoia C, Sabbioni E, Apostoli P, et al. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European community I. A study of 46 elements in urine, blood, and serum of Italian subjects. *Sci Total Environ* 1990; 95: 89-105.
86. Atapaththu KSS, Rashid H, Asaeda T. Growth and Oxidative Stress of Brittlewort (Nitella pseudoflabellata) in Response to Cesium Exposure. *Bull Environ Contam Toxicol* 2016; 96: 347–353.
87. Petit P, Loubatieres-Mariani MM. Potassium channels of the insulin-secreting B cell. *Fundam Clin Pharmacol* 1992; 6(3): 123-134.
88. Yang SN, Shi Y, Yang G, Li Y, Yu J, Berggren PO. Ionic mechanisms in pancreatic b cell signaling. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71(21): 4149–4177.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Επίπεδα TI στο πλάσμα αίματος σε σχέση με την ινσουλίνη



Συγκέντρωση Ιχνοστοιχείων (µg/L) στο πλάσμα αίματος των εθελοντών

Δείγμα	Co	Cu	Zn	Rb	Sr	Cd	Cs	Ba	TI	As
1327	0.55	925	1480	375	73	0.88	0.62	18	0.24	2.0
1223	0.35	918	1218	657	53	1.1	1.2	14	0.16	1.3
1290	0.70	870	2082	698	68	<0.05	0.98	17	0.14	0.98
1326	0.55	1122	773	553	45	<0.05	1.1	52	0.10	3.7
1343	0.62	1196	1182	767	32	<0.05	1.1	7.3	0.10	0.37
2060	1.1	1339	2130	539	93	2.2	0.76	17	0.10	16.2
1121	0.77	1215	554	662	60	0.34	1.2	5.3	0.06	1.5
1341	1.3	1469	1509	663	68	0.44	1.2	17	0.05	0.37
1322	1.7	1394	1147	732	46	0.22	0.96	7.1	0.04	10.6
2065	1.3	1255	1662	553	57	0.60	0.70	12	0.10	0.45
1338	<0.05	779	1653	257	43	<0.05	<0.03	17	<0.03	<0.15

Δείγμα	Co	Cu	Zn	Rb	Sr	Cd	Cs	Ba	Tl	As
1342	<0.05	748	2074	252	43	<0.05	0.06	19	<0.03	<0.15
2093	<0.05	755	829	272	29	<0.05	0.25	52	<0.03	<0.15
2085	<0.05	696	1496	285	35	<0.05	<0.03	51	<0.03	<0.15
2082	<0.05	1017	1635	330	36	<0.05	<0.03	84	<0.03	<0.15
2088	<0.05	816	1106	268	13	<0.05	<0.03	4.9	<0.03	<0.15
2087	<0.05	1019	1375	222	31	<0.05	<0.03	12	<0.03	<0.15
2083	<0.05	890	1694	255	54	<0.05	<0.03	24	<0.03	21.3
2081	<0.05	839	1018	249	24	<0.05	<0.03	6.6	<0.03	<0.15
1028	<0.05	1428	1290	292	33	<0.05	0.20	10	<0.03	22.0
2079	8.0	945	1963	298	31	2.4	0.20	31	<0.03	<0.15
2061	0.81	756	2622	291	41	1.2	1.5	14	<0.03	<0.15
2080	<0.05	732	1605	242	22	0.40	<0.03	3.6	<0.03	<0.15
2066	<0.05	766	2154	180	30	1.9	<0.03	3.9	<0.03	<0.15
2078	<0.05	796	1061	357	26	<0.05	<0.03	4.8	<0.03	<0.15
2073	0.19	1032	978	228	32	0.07	<0.03	5.6	<0.03	<0.15
2071	0.13	1004	1422	271	25	0.36	<0.03	8.7	<0.03	2.8
2077	<0.05	921	1205	236	21	<0.05	0.11	12	<0.03	<0.15
2075	0.59	910	1036	316	12	<0.05	0.07	3.9	<0.03	<0.15
2059	<0.05	823	932	210	20	<0.05	<0.03	10	<0.03	9.7
2074	<0.05	662	2584	271	32	0.07	0.11	14	<0.03	<0.15
2067	<0.05	1035	2380	261	29	<0.05	0.08	3.7	<0.03	<0.15
2064	<0.05	592	2958	220	39	1.5	<0.03	10	<0.03	<0.15
2063	<0.05	1201	2915	217	51	2.1	<0.03	9.0	<0.03	12.7
2072	0.33	759	1638	250	29	2.4	<0.03	6.0	<0.03	2.2
2068	<0.05	989	2960	294	46	1.2	<0.03	8.2	<0.03	<0.15
2062	<0.05	1068	2615	324	28	1.1	0.07	43	<0.03	<0.15
2076	<0.05	804	1747	304	24	1.4	<0.03	5.8	<0.03	<0.15
2070	<0.05	809	1184	324	15	0.80	<0.03	3.5	<0.03	<0.15
1339	1.4	1242	904	460	16	<0.05	0.11	14	<0.03	10.0
1349	0.08	542	327	235	11	0.79	<0.03	25	<0.03	0.76
1292	<0.05	1131	764	730	45	<0.05	0.89	20	<0.03	1.4
1336	0.58	1248	1110	725	51	0.99	0.56	20	0.06	2.6
1362	<0.05	1319	928	659	59	1.7	0.80	22	<0.03	0.76
1334	0.51	1360	1024	695	39	1.8	0.97	22	<0.03	0.90
2058	0.72	1160	720	770	54	<0.05	1.8	4.6	<0.03	<0.15
2057	0.34	1379	2030	468	33	<0.05	1.8	4.4	0.05	1.6
2056	2.6	1426	1570	588	32	<0.05	1.3	5.8	0.04	1.1
2055	0.90	1440	1477	504	40	<0.05	0.95	2.3	0.06	6.2
2054	0.29	2199	742	674	33	<0.05	1.2	3.0	<0.03	0.90
2086	0.46	1419	1417	513	47	<0.05	2.0	6.8	<0.03	49.8
2090	0.41	1569	888	382	79	<0.05	1.2	3.6	<0.03	23.1
2094	2.4	1434	2051	626	36	0.51	0.95	4.8	<0.03	0.63
1228	1.3	1534	884	547	42	<0.05	0.61	2.4	<0.03	2.1
2053	0.18	1658	1146	401	58	<0.05	0.85	3.4	<0.03	0.76
2084	1.4	1658	1385	536	68	<0.05	1.5	23	0.05	0.84
1317	0.48	1270	1698	596	48	0.288	1.5	4.2	0.05	16.0
1313	<0.05	1213	1074	382	38	<0.05	0.70	4.4	0.05	1.5
1311	<0.05	924	728	357	37	<0.05	0.65	3.3	0.06	2.9
2092	0.08	1077	574	465	22	<0.05	0.43	1.5	0.03	0.98
1142	0.80	1028	821	429	30	<0.05	1.5	1.7	<0.03	0.53

Δείγμα	Co	Cu	Zn	Rb	Sr	Cd	Cs	Ba	Tl	As
1077	0.34	1073	797	346	27	<0.05	0.75	1.7	<0.03	1.1
1160	<0.05	1559	516	426	23	<0.05	0.73	1.2	<0.03	0.62
1179	<0.05	983	743	299	29	<0.05	1.1	2.8	<0.03	2.6
1161	0.44	1233	610	268	32	<0.05	0.58	1.2	<0.03	3.1
1194	<0.05	818	626	297	18	<0.05	1.1	2.9	<0.03	0.94
1246	<0.05	1254	524	258	20	<0.05	0.36	1.6	<0.03	<0.15
1238	<0.05	895	541	380	24	<0.05	0.56	2.7	<0.03	0.15
1324	<0.05	1214	883	427	65	<0.05	0.78	3.2	<0.03	76.8
1214	<0.05	700	685	250	22	<0.05	0.43	2.3	<0.03	2.4
1193	0.24	821	829	287	19	<0.05	0.95	2.7	<0.03	0.67
1201	<0.05	719	1289	371	26	<0.05	1.0	2.1	<0.03	<0.15
1352	<0.05	403	460	293	28	<0.05	0.72	2.5	<0.03	1.3
1319	0.85	1008	1051	498	22	<0.05	0.63	4.7	<0.03	2.1
1328	0.10	876	854	385	24	<0.05	0.83	4.1	<0.03	20.9
1323	1.9	1128	566	201	24	<0.05	0.57	4.0	<0.03	1.7
1265	1.0	1298	950	362	31	<0.05	0.68	1.5	<0.03	14.6
1365	0.38	891	501	342	36	<0.05	0.80	1.8	<0.03	0.80
1325	0.52	1545	755	381	46	<0.05	0.91	2.2	<0.03	6.8
2010	0.56	1688	911	321	18	<0.05	0.56	3.0	<0.03	0.26
1058	1.0	1253	1005	399	34	0.21	0.94	1.4	0.06	0.75
1055	0.14	1043	1120	284	48	0.14	0.86	1.7	<0.03	0.85
1050	0.24	950	1555	280	40	<0.05	0.40	1.2	<0.03	0.40
1056	0.91	1266	743	313	29	<0.05	0.77	2.2	<0.03	1.4
1047	0.91	1170	755	300	28	<0.05	0.43	1.5	<0.03	7.1
1041	0.11	998	954	377	31	<0.05	0.91	0.46	<0.03	0.60
1059	0.20	990	833	343	35	0.07	0.51	0.26	0.06	1.3
1033	0.55	1509	706	276	44	0.06	0.65	1.0	<0.03	23.9
1048	<0.05	669	826	318	38	<0.05	0.32	6.3	<0.03	6.3
1031	0.36	1057	635	370	24	<0.05	0.60	2.9	<0.03	<0.15
1006	0.13	1739	3066	291	58	<0.05	0.53	5.7	<0.03	20.7
1100	1.7	1582	2009	500	31	<0.05	1.0	4.3	<0.03	<0.15
1101	0.47	1059	1400	519	42	<0.05	0.60	0.73	0.07	0.29
1104	0.33	1053	1097	410	31	<0.05	0.60	6.1	0.07	1.2
1108	1.2	1180	1640	410	27	<0.05	0.53	12	<0.03	1.1
1106	0.20	891	1780	343	21	<0.05	0.40	2.1	0.07	14.4
1113	0.11	1462	972	359	45	<0.05	0.40	6.3	0.06	1.1
1023	0.20	1436	952	287	26	<0.05	0.40	0.60	<0.03	2.1
1285	0.20	1116	890	514	25	<0.05	0.67	0.40	0.07	<0.15
1286	1.0	1082	793	451	49	<0.05	1.1	0.40	<0.03	5.3
1287	0.13	995	836	417	32	<0.05	0.27	2.3	<0.03	<0.15
1199	0.48	1585	1170	356	23	<0.05	0.48	3.1	0.08	0.70
1204	0.56	1046	2328	368	45	<0.05	0.56	2.7	0.08	3.4
1208	0.32	1404	1206	271	33	<0.05	0.48	1.4	0.08	9.9
1210	0.40	1825	2661	261	52	<0.05	0.32	3.9	0.08	2.0
1095	0.16	1216	1139	353	38	<0.05	1.1	1.8	<0.03	2.2
1096	0.57	1114	994	466	32	<0.05	1.1	1.5	0.06	0.38

Δείγμα	Co	Cu	Zn	Rb	Sr	Cd	Cs	Ba	Tl	As
1097	0.34	1263	2218	341	35	<0.05	0.63	0.91	0.06	2.6
1302	0.20	1079	3346	483	59	0.48	0.70	5.7	0.10	1.1
1305	1.0	1020	1590	324	41	<0.05	0.70	6.6	<0.03	0.44
1306	0.40	1267	1912	462	26	<0.05	0.90	4.6	<0.03	0.55
1308	1.3	1103	1709	446	22	0.12	1.4	5.1	0.10	0.33
1262	0.80	1329	935	363	20	<0.05	0.46	0.38	0.06	0.69
1264	0.24	1374	1323	343	28	<0.05	0.40	1.1	<0.03	0.35
1270	0.17	1147	1020	379	24	<0.05	0.57	1.7	0.06	0.25
1279	0.23	978	1097	360	41	<0.05	1.0	1.8	0.06	0.75
1281	0.24	962	1197	416	55	<0.05	0.32	4.1	<0.03	0.53
1283	<0.05	1031	1181	334	29	0.07	0.63	0.46	0.06	0.82
1140	0.11	1164	2005	377	64	<0.05	0.91	2.7	0.06	6.7
1141	1.0	1252	2210	416	33	<0.05	0.48	2.3	<0.03	<0.15
1115	0.17	983	1090	278	21	<0.05	0.51	0.29	<0.03	3.3
1117	<0.05	1107	1080	419	14	<0.05	0.32	0.88	<0.03	0.79
1119	0.56	938	1208	255	43	0.19	0.24	6.6	<0.03	<0.15
1127	0.17	1354	1367	321	26	<0.05	0.63	3.9	<0.03	2.7
1132	0.13	1397	1070	430	33	0.08	0.93	0.47	<0.03	0.29
1133	0.13	620	748	333	14	<0.05	0.20	0.53	<0.03	0.29
1135	0.34	895	1099	317	34	0.07	0.69	29	0.06	3.8
1299	0.20	1012	704	343	33	<0.05	0.93	0.60	<0.03	<0.15
1234	0.56	1246	739	327	28	<0.05	0.24	3.7	<0.03	4.7
1236	0.23	1356	578	324	77	0.07	0.57	1.7	0.06	0.31
1241	0.24	996	1039	270	340	0.19	0.24	6.2	<0.03	2.4
1242	0.16	1266	685	425	24	<0.05	0.72	0.20	<0.03	0.70
1245	0.32	1393	952	459	30	<0.05	0.32	0.96	<0.03	1.3
1251	0.27	1453	677	427	46	0,08	0.93	4.9	0.07	1.5
1255	<0.05	1118	585	302	36	<0.05	0.86	0.20	<0.03	6.0
1353	<0.05	1760	803	275	43	<0.05	0.72	39	<0.03	6.6
1358	0.40	1135	588	253	19	<0.05	1.0	1.1	<0.03	<0.15
1360	0.23	1140	1746	292	32	0.21	0.63	9.3	0.06	0.63
2036	0.24	2017	1390	311	32	<0.05	0.40	0.24	<0.03	0.97
2038	<0.05	871	1171	377	34	<0.05	0.47	4.7	0.07	<0.15
1215	0.13	1198	1367	203	49	0.40	0.20	2.2	<0.03	0.81
1216	0.87	1268	1142	218	16	<0.05	0.27	0.53	0.07	<0.15
1217	0.27	1315	1849	234	49	<0.05	0.53	2.0	0.07	1.4
1218	0.27	1187	1742	250	55	<0.05	0.27	12	0.07	<0.15
1221	0.34	1230	1944	422	39	<0.05	0.63	7.6	0.06	9.1
1222	0.23	1423	1242	403	25	<0.05	<0.03	2.3	0.06	1.4
1226	1.6	1324	1448	420	74	<0.05	0.29	27	0.06	0.57
1227	0.29	1507	1004	487	17	<0.05	0.46	0.11	0.06	0.25
2026	<0.05	1408	853	392	19	0.07	0.06	0.46	0.06	6.3
2027	<0.05	1565	1841	479	36	<0.05	0.51	6.0	0.06	0.44
2028	0.91	1046	849	454	25	<0.05	0.06	10.1	0.06	0.52

Δείγμα	Co	Cu	Zn	Rb	Sr	Cd	Cs	Ba	Tl	As
2029	0.40	1017	974	524	11	<0.05	0.34	3.5	0.06	0.82
2030	0.48	1671	1488	471	20	<0.05	0.16	2.2	0.08	10.7
2031	0.40	1687	1591	345	13	<0.05	<0.03	15	<0.03	9.5
2032	0.33	1147	1239	314	15	0.16	<0.03	3.0	0.07	1.3
2033	0.40	1277	1186	427	7.8	0.14	0.23	4.5	0.06	1.2
2034	0.24	1129	1422	328	7.7	<0.05	0.08	3.8	<0.03	0.26

Τιμές αναφοράς για τα ιχνοστοιχεία στον ορό/πλάσμα του αίματος^{81,85}

Ιχνοστοιχεία	Τιμές αναφοράς (μg/L)
Ba	0.4 – 1.7
Co	0.08 – 0.4
Cs	0.11 – 5.2
Cu	601 – 1373
Cd	0.04 – 0.36
Rb	78 – 317
Tl	0.02 – 0.34
Sr	28 – 44
Zn	587 – 1215