Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής

Διδακτορική Διατριβή

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΟΡΦΩΝ ΣΕΛΗΝΙΟΥ ΣΕ ΟΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.

Σοφία Λέτσιου

Επιβλέπουσα: Καθ. Σ. Αντωνοπούλου

ΑΘΗΝΑ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2010

....Ο γλάρος Ιωανάθαν πέρασε όλη την υπόλοιπη ζωή του μόνος αλλά πέταξε πολύ μακριά, πέρα κι από τους Μακρινούς Βράχους. Η μεγάλη του θλίψη δεν οφειλόταν τόσο στη μοναξιά όσο στο ότι οι άλλοι γλάροι δε θέλησαν να πιστέψουν στο μεγαλείο της πτήσης που τους περίμενε. Είχαν αρνηθεί ν'ανοίξουν τα μάτια τους και να δουν. Εκείνος πάλι, κάθε μέρα, μάθαινε και πιο πολλά. Έμαθε να κοιμάται στον αέρα και χαράζοντας μια νυκτερινή πορεία δια μέσου του θαλασσινού ανέμου, κάλυπτε εκατό μίλια από το ηλιοβασίλεμα μέχρι το χάραμα. Θ' αρχίσεις να πλησιάζεις τον παράδεισο, Ιωνάθαν, τη στιγμή πού θα πλησιάσεις την τέλεια ταχύτητα. Κι αυτό δεν σημαίνει να πετάς χίλια μίλια την ώρα, η ένα εκατομμύριο, η να πετάς με την ταχύτητα του φωτός. Γιατί ο κάθε αριθμός είναι ένα όριο και η τελειότητα δέν έχει όρια. Η τέλεια ταχύτητα, γιέ μου, είναι το να βρίσκεσαι εκεί.....

"Ο Γλάρος Ιωνάθαν Λίβινγκστον" του Richard Bach

Ευχαριστίες

Η συμβολή ορισμένων ανθρώπων για τη γραφή του παρόντος πονήματος ήταν αναμφίβολα καθοριστική και ουσιαστική. Προς τούτο, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά πρωτίστως την Καθ. κ. Σμαραγδή Αντωνοπούλου, της οποίας οι συμβουλές και οι οδηγίες, ως επιβλέπουσα του έργου αυτού, ήταν βαρύνουσες και καθοριστικές στην ερευνητική προσέγγιση της διατριβής. Επίσης, απευθύνω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στο Επίκ. Καθ. κ. Τζώρτζη Νομικό, με τον οποίο συνεργάστηκα αποτελεσματικά καθ΄ όλη τη διάρκεια της διατριβής μου και του οποίου η συμβολή ήταν πολύ σημαντική. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπλ. Καθ. κ. Σπύρο Περγαντή για τις πολύτιμες συμβουλές του στη Φασματομετρία Μάζας βάσει της οποίας πραγματοποιήθηκε η πειραματική μελέτη. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Λέκτορα κ. Ελισάβετ Φραγκοπούλου για τις χρήσιμες παρεμβάσεις της στην υλοποίηση του έργου αυτού. Παράλληλα, οφείλω να ευχαριστήσω τον Αναπλ. Καθ. Δημοσθένη Παναγιωτάκο για τις ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις στη στατιστική ανάλυση της διδακτορική μου διατριβής. Επιπροσθέτως, θέλω να ευχαριστήσω θερμά όλα τα άτομα του εργαστηρίου Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του ανθρώπου και των μικροοργανισμών καθώς και τα άτομα του εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας/ Περιβαλλοντικών και Χημικών Εργασιών του Πανεπιστημιου Κρήτης για τις ουσιαστικές ανταλλαγές απόψεων μαζί τους. Η παρούσα διδακτορική εργασία υποστηρίχθηκε από το πρόγραμμα:’’Marie Curie Excellence Grant’’ με τίτλο: «Development of Advanced Analytical Method of Determining Metal species and Their Interactions in Enviromental and Biological Systems». Τέλος, θα ήταν παράλειψη να μην συμπεριλάβω στις θερμές ευχαριστίες μου και την οικογένειά μου, η οποία με στήριξε ουσιαστικά σε όλη τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη 11
Περίληψη (Abstract) 13
1.Εισαγωγή 14
1.1 Ιστορική Αναδρομή Σεληνίου 15
1.2 Χημεία Σεληνίου 16
1.3 Βιοχημεία Σεληνίου 17
1.3.1 Μορφές Σεληνίου Στον Ανθρώπινο Οργανισμό 17
1.3.1.1 Οργανικές και ανόργανες μορφές σεληνίου 17
1.3.1.2 Πρωτεΐνες που περιέχουν σελήνιο 18
1.3.2 Οι σημαντικότερες σεληνοπρωτείνες 21
1.3.3 Μεταβολισμός του Σεληνίου στον Ανθρώπινο Οργανισμό 29
1.3.3.1 Κατανομή Σεληνίου στους Ιστούς 29
1.3.3.2 Στάδια Μεταβολισμού Σεληνίου 29
1.3.3.3 Απορρόφηση, Μεταφορά και Αποβολή Σεληνίου 32
1.3.3.4 Συμμετοχή του σεληνίου στη σύνθεση των σεληνοπρωτεινών 34
1.4 Φυσιολογικός Ρόλος του Σεληνίου 34
1.4.1 Αναγκαιότητα του σεληνίου για τη ζωή 34
1.4.2 Σελήνιο και ανοσολογικό σύστημα 35
1.4.3 Σελήνιο και οξειδωτικό στρες 37
1.4.4 Σελήνιο και ρύθμιση οξειδοαναγωγικής ισορροπίας 38
1.4.5 Σελήνιο και θυρεοειδής αδένας 39
1.5 Σελήνιο και Διατροφή 40
1.5.1 Πηγές Σεληνίου 40
1.5.2 Βιοδιαθεσιμότητα σεληνίου 42
1.5.3 Προτεινόμενες διατροφικές προσλήψεις σεληνίου 42
1.5.4 Αξιολόγηση Κατάστασης του Σεληνίου στον Οργανισμό 45
1.5.5 Κατάσταση Σεληνίου ανά το κόσμο 47
1.5.6 Μέθοδοι αύξησης της διατροφικής πρόσληψης σεληνίου 48
1.6 Σελήνιο και καρδιαγγειακά νοσήματα 50
1.6.1 Εμπλοκή των σεληνοπρωτεινών στους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς καρδιαγγειακών νοσημάτων 50
1.6.2 Σελήνιο και καρδιαγγειακό κίνδυνος 52

1.6.2.1 Προοπτικές επιδημιολογικές μελέτες 52
1.6.2.2 Διατροφικές παρεμβάσεις με σελήνιο και καρδιαγγειακός κίνδυνος 54
1.6.2.3 Σελήνιο και παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα 55
1.7 Αναλυτικές μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον ολικό προσδιορισμό και ειδοπροσδιορισμό σεληνίου σε δείγματα ανθρώπινου ορού αίματος. 57
2. Σκοπός 61
3. Μέθοδοι & Υλικά 63
3.1 Φασματομετρία Μαζών Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS) 63
3.1.1 Οργανολογία ICP-MS 64
3.1.2 Σύστημα Εισαγωγής Δείγματος 64
3.1.3 Πηγή Ιόντων 65
3.1.4 Σημεία Διασύνδεσης 67
3.1 5 Φακοί Εστίασης 68
3.1.6 Αναλυτής Μάζας 68
3.1.7 Ανιχνευτής 70
3.1.8 Παρεμποδίσεις 70
3.1.8.1 Φασματοσκοπικές Παρεμποδίσεις 70
3.1.8.2 Μη Φασματοσκοπικές Παρεμποδίσεις 71
3.2. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Perfomance Liquid Chromatogaphy 72
3.3. Ισοτοπική Αραίωση (Isotope Dilution Analaysis)Συνοπτικός Σχεδιασμός της Μελέτης 74
3.4 Προσδιορισμοί στον Ορό Αίματος 78
3.4.1 Ποσοτικός Προσδιορισμός Ολικού Σεληνίου Σε Δείγματα Ανθρώπινου Ορού Αίματος. 78
3.4.2 Ανίχνευση και Ποσοτικός Προσδιορισμός Πρωτεϊνών Σεληνίου Σε Δείγματα Ανθρώπινου Ορού Αίματος 80
3.4.2.1. Σύζευξη χρωματογραφικής στήλης αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography) στο σύστημα dAF-ICP-MS 85
3.5 Σχεδιασμός της μελέτης ΑΤΤΙΚΗ 89
3.5.1 Πληθυσμός της μελέτης 89
3.5.2 Εξεταζόμενες παράμετροι 90

3.5.2.1 Ανθρωπομετρικά Χαρακτηριστικά 90
3.5.2.2 Βιοχημικές Παράμετροι 90
3.5.2.3 Κλινικές Παράμετροι 91
3.5.2.4 Αποτίμηση του Τρόπου Ζωής 92
3.5.2.5 Διατροφική Αποτίμηση 92
3.6 Στατιστική Ανάλυση 93
4. Αποτελέσματα της Μελέτης 97
4.1. Αποτελέσματα από τη μέθοδο για προσδιορισμό ολικού σεληνίου σε ανθρώπινο ορό αίματος 97
4.1.1. Μέθοδος για προσδιορισμό επιπέδων ολικού σεληνίου σε ανθρώπινο ορό αίματος-Ανάλυση Αποτελεσμάτων 97
4.2 Αποτελέσματα από τη μέθοδο για ειδοπροσδιορισμό σεληνίου σε ανθρώπινο ορό αίματος 98
4.2.1 Βελτιστοποίηση αναλυτικής μεθόδου για ειδοπροσδιορισμό σεληνίου σε ανθρώπινο ορό αίματος. 98
4.2.2 Σύγκριση επιπέδων ειδών Se με άλλες μελέτες καθώς και με υλικά αναφοράς 103
4.2.3 Σύγκριση αποτελεσμάτων με τα αποτελέσματα της μεθόδου ολικού προσδιορισμού σεληνίου. 105
4.2.4 Συμπεράσματα 108
4.3 Μέτρηση ολικού σεληνίου και σεληνοπρωτεϊνών στη μελέτη ΑΤΤΙΚΗ-Συσχέτιση με διατροφικά και παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου. 111
4.3.1 Περιγραφή του πληθυσμού της μελέτης 111
4.3.2 Επίπεδα ολικού σεληνίου και πρωτεϊνών σεληνίου στη μελέτη ΑΤΤΙΚΗ 112
4.3.3. Στατιστικές συσχετίσεις επιπέδων ολικού σεληνίου και πρωτεϊνών σεληνίου με διατροφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού 120
4.3.4. Στατιστικές συσχετίσεις επιπέδων ολικού σεληνίου και πρωτεϊνών σεληνίου με παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου. 132
4.3.4.1 Επίπεδα σεληνίου/πρωτεϊνών σεληνίου και ηλικία 132
4.3.4.2 Επίπεδα σεληνίου/πρωτεϊνών σεληνίου και κάπνισμα 136
4.3.4.3 Επίπεδα σεληνίου/πρωτεϊνών σεληνίου και φυσική Δραστηριότητα 140

4.3.4.4 Επίπεδα σεληνίου/πρωτεϊνών σεληνίου και παχυσαρκία 143
4.3.4.5 Επίπεδα σεληνίου/πρωτεϊνών σεληνίου και υπέρταση 147
4.3.4.6 Επίπεδα σεληνίου/πρωτεϊνών σεληνίου και γλυκαιμικό προφίλ 152
4.3.4.7 Επίπεδα σεληνίου/πρωτεϊνών σεληνίου και λιπιδαιμικό προφίλ 155
4.3.4.8 Ολικό σελήνιο/πρωτεΐνες σεληνίου και δείκτες συστηματικής Φλεγμονής 158
4.4 Διερεύνηση της πρωτεϊνικής κατανομής GPx-3/SelP 163
5. Γενικά Συμπεράσματα –Προτασεις για το Μέλλον 167
5.1 Συμπεράσματα της Μελέτης 167
5.2 Μελλοντική Εργασία 170
6. Βιβλιογραφία 173
Παράρτημα 201
Δημοσιεύσεις & Εργασίες παρουσιασμένες σε επιστημονικά συνέδρια 203

Περίληψη

Το σελήνιο (Se) αποτελεί απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τη ζωή ασκώντας τις δράσεις του ως απαραίτητο δομικό στοιχείο των σεληνοπρωτεινών (υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης, σεληνοπρωτείνη P, αναγωγάση της θειορεδοξίνης, αποϊωδιονάσες της ιωδοθυροξίνης κ.α.), οι οποίες με τη σειρά τους έχουν ενεργό ρόλο στους αντιοξειδωτικούς/αντιφλεγμονώδεις μηχανισμούς του οργανισμού, στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων και στο μεταβολισμό των θυρεοειδικών ορμονών. Συνεπώς, η επαρκής πρόσληψη Se με τη διατροφή είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη σωστή λειτουργία του οργανισμού. Ωστόσο, οι διατροφικοί παράγοντες που καθορίζουν τα επίπεδα Se στον ανθρώπινο οργανισμό δεν είναι πλήρως διευκρινισμένοι ενώ καμία μεγάλη επιδημιολογική μελέτη δεν έχει γίνει στον Ελληνικό πληθυσμό. Παράλληλα, αν και η αυξημένη πρόσληψη Se έχει συσχετιστεί θετικά με το κίνδυνο εμφάνισης συγκεκριμένων νοσημάτων (διαβήτης, υπέρταση), η σχέση του με παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα είναι πολύ λιγότερο μελετημένη και τα αποτελέσματα αντικρουόμενα. Αυτό εν μέρει οφείλεται στις πλειοτροπικές και πολλές φορές αντίθετες δράσεις των σεληνοπρωτεϊνών στους μηχανισμούς εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η συσχέτιση συνεπώς των επιπέδων ολικού Se με παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα δεν επαρκεί και είναι πλέον απαραίτητη η ανάπτυξη ισχυρών αναλυτικών μεθόδων, οι οποίες θα έχουν την ικανότητα να προσδιορίζουν ταυτόχρονα τις διάφορες σεληνομορφές στα βιολογικά δείγματα

Στα πλαίσια αυτά, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν: α) η βελτιστοποίηση αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού ολικού Se (TSe) αλλά και η ανάπτυξη αναλυτικής τεχνικής ταυτόχρονου προσδιορισμού πρωτεϊνών Se (υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης(GPX-3), σεληνοπρωτείνης P(SelP) και σεληνοαλβουμίνης (SeAlb)) σε ορό ανθρώπινου αίματος με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος, β) η εφαρμογή των ανωτέρων μεθόδων για μέτρηση TSe και πρωτεϊνών Se στο ορό αίματος ενός υποπληθυσμού της μελέτης ΑΤΤΙΚΗ, γ) η μελέτη των συσχετίσεων μεταξύ TSe/πρωτεϊνών Se με τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, τις διατροφικές συνήθειες των εθελοντών καθώς και με βιοχημικούς/κλινικούς παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα.

Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης διατριβής, χρησιμοποιήθηκε αναλυτική μέθοδος βασισμένη στη χρωματογραφία συγγένειας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας επαγωγικά

συζευγμένου πλάσματος (dAF-(LC)-ICP/MS). Στη συνέχεια της μελέτης, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω διερεύνηση της συνύπαρξης μικρών οργανικών μορίων και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης-3. Για το σκοπό αυτό έγινε σύζευξη χρωματογραφικής στήλης μοριακού αποκλεισμού στο σύστημα dAF-ICP-MS. Τα αποτελέσματα των αναλυτικών μεθόδων ανέδειξαν ότι το Se βρίσκεται με τη μορφή SelP(54%), GPx-3 (26%), SelAlb (12%) και άγνωστης μορφή (8%) στον ορό αίματος.

Απο την εφαρμογή της μεθόδου σε ένα υποπληθυσμό της μελέτης «ΑΤΤΙΚΗ»(N=399) προέκυψε ότι ένα σημαντικό μέρος του Ελληνικού πληθυσμού, όπως αυτό τουλάχιστον εκφράζεται από τη μελέτη ΑΤΤΙΚΗ, έχει έλλειψη σεληνίου. Οι διατροφικοί παράγοντες που συσχετίζονται θετικά με τα επίπεδα Se είναι η κατανάλωση κόκκινου κρέατος και πουλερικών (κρεατοφαγική δίαιτα). Η ανάλυση των σχέσεων σεληνίου/πρωτεινών σεληνίου με παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου έδειξε ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση του Se με τους περισσότερους κλασσικούς παράγοντες (ηλικία, παχυσαρκία, κάπνισμα, υπέρταση, γλυκαιμία, λιπιδαιμία, δείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής), η οποία διαμεσολαβείται από διαφορετικές πρωτεΐνες σεληνίου. Παράλληλα, διαφάνηκε ότι όχι μόνο το ολικό σελήνιο αλλά κυρίως η διαφορετική κατανομή μου στις πρωτεΐνες σεληνίου σχετίζονται με τους παράγοντες κινδύνου γεγονός που υποδεικνύει ότι η κατανομή αυτή αποτελεί καλύτερο δείκτη της κατάστασης Se ενός ανθρώπου και ίσως αποδίδει καλύτερα τη σχέση του με τους παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα.

Abstract

Selenium is an essential nutrient for human health. It has been reported that a low serum Se status is associated with several chronic diseases such as cardiovascular diseases, thyroid disorder and cancer. The essential role of selenium has been explained through its action as part of the active site of glutathione peroxidases. The cellular biochemistry of Se is known to involve, in addition to glutathione peroxidases the expression of a variety of other selenoproteins, such as Selenoprotein P, thioredoxin reductases and others which are involved in human antioxidant defense.

The objectives of the present study include the evaluation and improvement of a dcAF-LC-ICP-quadrupole based mass spectrometric (QMS) method for selenium speciation in human serum samples, to demonstrate its suitability for the analysis of large numbers of human serum samples (n=399), to establish baseline selenium species levels for an apparently healthy human population, as well as to provide preliminary biostatistical analysis for the distribution of selenium species in human serum. Additionally, improved validity of the analytical method used in this study was further achieved by adding a size exclusion chromatography column after the two affinity columns via a switching valve. This allowed for the separation of small selenium-containing molecules from glutathione peroxidase.

Using these advanced analytical approaches it was emerged that selenium distributed 54% as Selenoprotein P, 26% as glutathione peroxidase-3 and 12% as selenoalbumin in human serum samples taken from an apparently healthy Greek population. Evaluation of the relationship between serum total selenium as well as selenium species with major food groups by multi-adjusted analysis revealed that serum Se was positively correlated with the consumption of red meat and poultry (diet rich in red meat, poultry and potatoes). Moreover, multi-adjusted analysis revealed a negative correlation among total selenium status as well as selenium species with risk factors for cardiovascular disease. However, the variation of selenium distribution to proteins seems to better describe the relation between selenium and risk factors for cardiovascular disease.

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Ιστορική αναδρομή

Το σελήνιο (Se) ανακαλύφθηκε από το Σουηδό χημικό Berzelius το 1817 και πήρε το όνομά του από την ελληνική λέξη σελήνη [1]. Το Se μέχρι και τα μέσα του περασμένου αιώνα χαρακτηριζόταν ως τοξικό, υπεύθυνο για τις δηλητηριάσεις ζώων σε περιοχές της Dakota και Wyoming των Η.Π.Α. όπου το έδαφος είναι πλούσιο σε αυτό [2]. Επιπλέον, είχε παρατηρηθεί ότι στις περιοχές αυτές, όπου το έδαφος ήταν αλκαλικό, κάποια φυτά έχουν την ικανότητα να απορροφούν μεγάλες συγκεντρώσεις Se προκαλώντας αναπηρία και καταστροφή στις οπλές των ζώων που τα κατανάλωναν. Επτά περίπου αιώνες πριν, καταγράφεται από το Μάρκο Πόλο, κατά τη διάρκεια ενός ταξιδιού του στην Κίνα, ένα δηλητηριώδες φυτό που προκαλεί καταστροφή των οπλών των ζώων. Να σημειωθεί ότι η τοξικότητα του Se έχει εμφανιστεί σε ανθρώπους που ζουν στην Κίνα, στη Νότια Ντακότα και στη Βενεζουέλα [2].

Το 1957, οι Schwarz και Flotz παρατήρησαν για το Se ότι πρόκειται για ένα στοιχείο εξαιρετικής σημασίας εφόσον μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πρόληψη διατροφικής ανεπάρκειας Se κυρίως όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την πρόσληψη βιταμίνης Ε καθώς και αμινοξέων που περιέχουν θείο [3].

Μετά απο 15 χρόνια εμπειρικών μελετών σχετικά με την ανεπάρκεια Se τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε θηλαστικά ο βιοχημικός ρόλος του Se αναδείχθηκε το 1973 όταν δύο βακτηριακά ένζυμα η αφυδρογονάση του μυρμηγκικού οξέος [4] και η αναγωγάση της γλυκίνης [5] καθώς και ένα ένζυμο που εντοπίστηκε σε θηλαστικά, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης [6], καταγράφηκε ότι περιέχουν Se.

Ο σημαντικός ρόλος του Se στον ανθρώπινο οργανισμό εδραιώθηκε το 1979 όταν χορηγήθηκε με επιτυχία συμπλήρωμα Se για θεραπεία ασθενούς με μυϊκή δυστροφία, η οποία ασθένεια αντιμετωπιζόταν με μακροπρόθεσμη παρεντερική διατροφή [2] καθώς και όταν γνωστοποιήθηκε ο ρόλος του Se στην ασθένεια Keshan η οποία πρόκειται για μια θανατηφόρο καρδιομυοπάθεια [7]

Στη συνέχεια άλλες μελέτες έδειξαν ότι το Se, σε αντίθεση με άλλα ιχνοστοιχεία τα οποία ενσωματώνονται στις πρωτεΐνες ως συμπαράγοντες, ενσωματώνεται στις σεληνο πρωτεΐνες μέσω του μεταφραστικού μηχανισμού μέσω του αμινοξέος της σεληνοκυστεΐνης [8,9,10]. Αρχικά, δεδομένης της παγιωμένης γνώσης ότι ο γενετικός κώδικας κωδικοποιούσε 20 πρωτεϊνικά αμινοξέα, η παρουσία σεληνοκυστεΐνης στις σεληνοπρωτεΐνες θεωρείτο ότι προέκυπτε από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Ωστόσο, το 1986, οι Chambers και συν. βρήκαν ότι το κωδικόνιο TGA, που κανονικά ήταν κωδικόνιο τερματισμού κωδικοποιούσε και σεληνοκυστεΐνη στην υπεροξειδάση της γλουταθείονης ποντικού [11]. Στη συνέχεια βρέθηκε ότι το TGA κωδικοποιούσε την ενσωμάτωση σεληνοκυστεΐνης όχι μόνο στην GPX [12] αλλά και σε βακτηριακές σεληνοπρωτεΐνες [9]. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου το κωδικόνιο τερματισμού TGA οδηγεί στην ενσωμάτωση σεληνοκυστεΐνης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως.

1.2 Χημεία Σεληνίου

Το Se έχει έξι ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα, ανήκει στην 6η ομάδα του περιοδικού πίνακα και βρίσκεται κάτω από το θείο (S). Συνεπώς, παρουσιάζει παραπλήσιες χημικές ιδιότητες με αυτό έχοντας όμως μεγαλύτερο και «μαλακότερο» άτομο, γεγονός που του επιτρέπει να ανταλλάσσει τα εξωτερικά του ηλεκτρόνια ευκολότερα με άλλα άτομα ή και με άτομα Se. Επιπλέον, λόγω της παραπάνω ιδιότητάς του χαρακτηρίζεται ως μεταλλοειδές αφού μπορεί να δίνει και να παίρνει ηλεκτρόνια από μέταλλα ή το υδρογόνο [2].

Ο μεταλλικός του χαρακτήρας γίνεται εμφανής κυρίως στις ενώσεις του με το οξυγόνο, όπου έχει την τάση να δίνει ηλεκτρόνια, δικαιολογώντας κατ' αυτόν τον τρόπο την στερεά μορφή των ενώσεων αυτών, όπως π.χ. το διοξείδιο του Se (SeO_2). Ο μη-μεταλλικός του χαρακτήρας εμφανίζεται κυρίως στις ενώσεις του με υδρογόνο όπως στο υδρίδιο του Se (H_2Se) το οποίο εμφανίζεται περισσότερο όξινο από ό,τι το αντίστοιχο υδρίδιο του θείου (H_2S). Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της ικανότητας που παρουσιάζει το Se να δέχεται ηλεκτρόνια από το υδρογόνο δημιουργώντας έτσι ένα πρωτόνιο H^+ και HSe^-. Η ιδιότητα αυτή του Se βρίσκει εφαρμογή σε βιολογικά συστήματα [2]. Η διαφορά ενέργειας μεταξύ των ενεργειακών επιπέδων της βασικής και της διεγερμένης κατάστασης είναι πολύ μικρή τόσο σε στερεά μορφή στοιχειακού Se αλλά και σε ενώσεις του με μέταλλα. Αυτό επιτρέπει στις ενώσεις αυτές να εμφανίζονται ως καλοί ημιαγωγοί του ηλεκτρισμού, ως καλοί φωτοαγωγοί και να εμφανίζουν έντονο χρώμα. Σημειώνεται ότι η εμπορική χρήση του Se βασίζεται στις παραπάνω ιδιότητες.

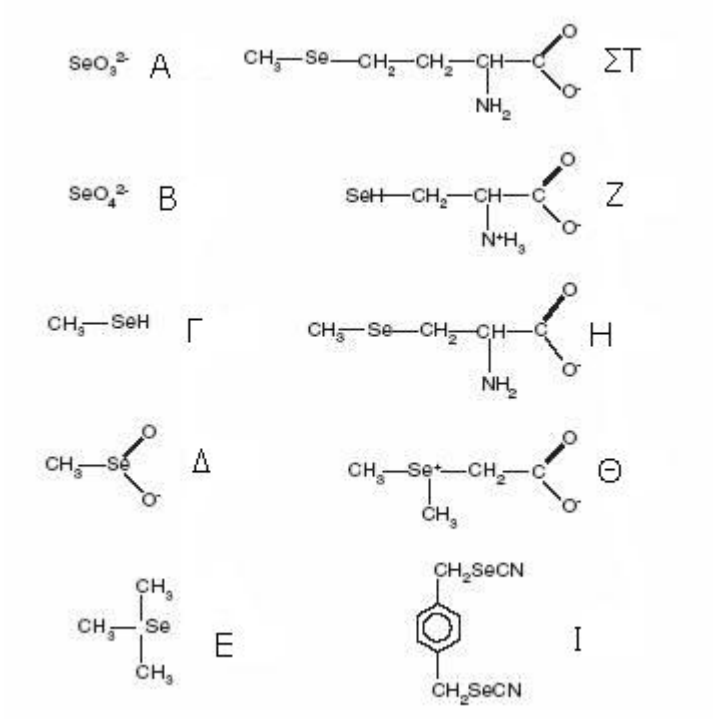
Τέλος, το Se έχει έξι σταθερά ισότοπα: 74Se (0.9 % ποσοστό φυσικής αφθονίας), 76Se (9.0 %), 77Se (7.6 %), 78Se (23.5 %), 80Se (49.8 %) και 82Se (9.2%), και αρκετά ραδιοϊσότοπα εκ των οποίων το 75Se (120 ημέρες χρόνο ημίσειως ζωής) βρίσκει εφαρμογή σε βιολογικές μελέτες. Τα ισότοπα του Se είναι ιδιαίτερα χρήσιμα κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό αυτού και των ενώσεών του με την τεχνική της φασματομετρίας μάζας.

1.3 Βιοχημεία Σεληνίου

1.3.1 Μορφές σεληνίου στον ανθρώπινο οργανισμό

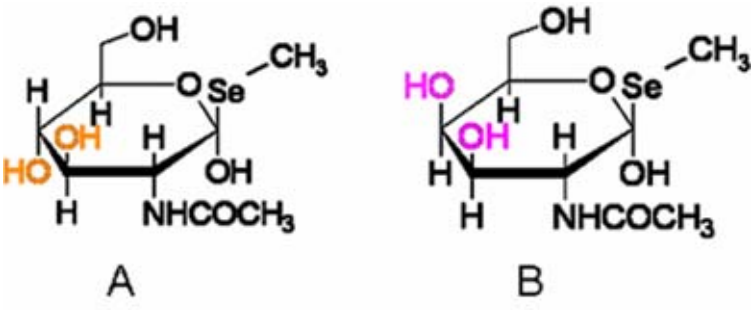
1.3.1.1 Οργανικές και ανόργανες μορφές σεληνίου

Το Se βρίσκεται στον ανθρώπινο οργανισμό με τη μορφή οργανικών, ανόργανων ενώσεων (Σχ.1.1) καθώς και με τη μορφή πρωτεϊνών.



Σχήμα 1.1. Χημικές δομές των Α: σεληνιώδες οξύ, Β: σεληνικό οξύ, Γ: μεθυλοσελήνιο, Δ: μεθυλοσεληνικό οξύ, Ε: ιόν τριμεθυλοσεληνίου, ΣΤ: σεληνομεθειονίνη, Ζ: σεληνοκυστείνη, Η: σεληνομεθυλοσεληνοκυστείνη, Θ: σεληνοβεταίνη, και Ι:1,4-φαίνυλοδις (μεθυλένο) σεληνοκυανικό οξύ.

Από τις οργανικές μορφές Se η πιο γνωστή είναι η σεληνοκυστεΐνη (Sec), η οποία θεωρείται το 21 πρωτεϊνικό αμινοξύ (13,14) (Σχ.1.1, Ζ) και η σεληνομεθειονίνη (SeMet) [15](Σχ.1.1, ΣΤ) η οποία πρόκειται για ένα ανάλογο της μεθειονίνης. Το Se συναντάται επίσης με τη μορφή σεληνοσακχάρων (Σχ.1.2, Σχ.1.3) τα οποία θεωρούνται η κύρια μορφή αποβολής Se από τον ανθρώπινο οργανισμό. Επιπλέον, το Se αποβάλλεται και με τις μορφές μεθυλοσελήνιο καθώς και τρι-μεθυλοσελήνιο μέσω της αναπνοής και των ούρων, αντίστοιχα. Τέλος, άλλες οργανικές μορφές Se όπως η σεληνοβεταίνη, μεθυλοσεληνικό οξύ και 1,4-φαινυλενοδις(μεθυλενο) σεληνοκυανικό οξύ (Σχ.1.1, Γ,Δ,Ε,Η,Θ,Ι) είναι γνωστές σήμερα λόγω της αντικαρκινικής δραστηριότητας που παρουσιάζουν (16) Αντίθετα, οι κύριες ανόργανες μορφές Se στον ανθρώπινο οργανισμό είναι το σεληνιώδες και το σεληνικό οξύ (Σχ.1.1, Α,Β).



Σχήμα 1.2.Δομές σεληνοσακχάρων Α: 1-β μεθυλοσεληνο-Ν-ακέτυλο-γλυκοζαμίνη. Β: 1-β-μεθυλοσεληνο-Ν-ακέτυλο-γαλακτοζαμίνη

1.3.1.2 Πρωτεΐνες που περιέχουν σελήνιο

Υπάρχουν τρία είδη πρωτεΐνων που περιέχουν Se. Αυτά είναι : i) πρωτεΐνες στις οποίες το Se βρίσκεται με τη μορφή σεληνοκυστεϊνης γνωστές ως σεληνοπρωτεΐνες (17), ii) πρωτεΐνες στις οποίες το Se προσδένεται ειδικά ως συμπαράγοντας (Se-binding proteins), iii) πρωτεΐνες στις οποίες το Se προσδένεται μη-ειδικά με τη μορφή σεληνομεθειονίνης (Se-Containing Proteins)

Πρωτεΐνες στις οποίες το Se βρίσκεται με τη μορφή σεληνοκυστεΐνης γνωστές ως σεληνοπρωτεΐνες.

Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι πρωτεΐνες που περιέχουν Se στις πολυπεπτιδικές τους αλυσίδες με τη μορφή σεληνοκυστεΐνης. Οι σεληνοπρωτεΐνες εντοπίζονται σε όλες της μορφές ζωής όπως τα βακτήρια, τα αρχαία και τα ακάρεα. Μέχρι σήμερα είναι γνωστές 30 οικογένειες σεληνοπρωτεϊνών [18, 19,20] (Σχ.1.4).

Το σεληνοπρωτέωμα (το σύνολο των σεληνοπρωτεϊνών των κυττάρων) ανάμεσα στα διάφορα είδη ζωής είναι σχετικά περιορισμένο. Συγκεκριμένα, τα ψάρια περιέχουν 30 σεληνοπρωτεΐνες, το οποίο θεωρείται και το μεγαλύτερο σύνολο σεληνοπρωτεϊνών, που ακολουθείται απο τους ανθρώπους και τα τρωκτικά με 25 και 24 σεληνοπρωτεΐνες αντιστοίχως [18]. Ο περιορισμένος αριθμός του σεληνοπρωτεόματος οφείλεται στη μικρή σχετικά διαθεσιμότητα του Se στη φύση καθώς και στην ενεργειακά δαπανερή διαδικασία σύνθεσης των σεληνοπρωτεϊνών. Ωστόσο, το γονιδίωμα των θηλαστικών αναμένεται ότι μπορεί θεωρητικά να κωδικοποιήσει 30 με 50 σεληνοπρωτεΐνες [17].

Αντίθετα, τα ανώτερα φυτά και η ζύμη δεν περιέχουν σεληνοπρωτεΐνες καθώς και τους απαραίτητους παράγοντες για την σύνθεσή τους. Ωστόσο έχουν εντοπιστεί σε αυτά ομόλογες πρωτείνες με τις σεληνοπρωτείνες των θηλαστικών που περιέχουν κυστεΐνη αντί για σεληνοκυστείνη [19]. Άλλωστε για τις περισσότερες οικογένειες σεληνοπρωτεινών η αλληλομετατροπή Sec/Cys, ανάμεσα στα είδη είναι κοινή [18].

Το ανθρώπινο σεληνοπρωτέωμα (Σχ.1.3) περιέχει 17 οικογένειες σεληνοπρωτεϊνών ορισμένες απο τις οποίες παρουσιάζουν πολλαπλά γονίδια με παραπλήσια δράση. [19]. Οι οικογένειες αυτές είναι :

- Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) (5 γονίδια)
- Αναγωγάση της θειορεδοξίνης (TrxR) (3 γονίδια)
- Αποϊωδιονάση τηςιωδοθυρονίνης΄ (iodothyronine deiodinase-DIO)

(3 γονίδια)

- Συνθετάση 2 σεληνοφωσφορικού οξέος (SPS2).

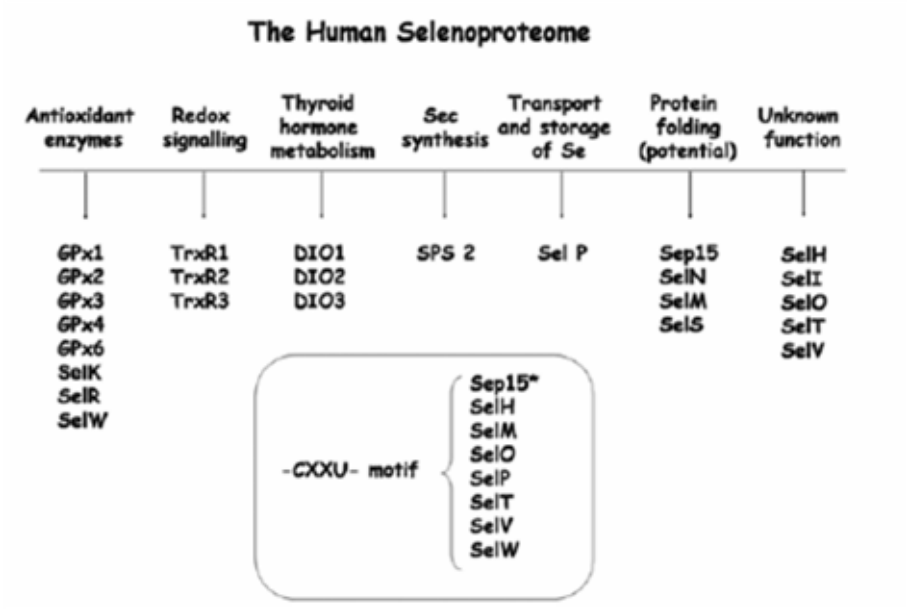
• Οι υπόλοιπες σεληνοπρωτεΐνες έχουν επισημανθεί με αλφαβητική σειρά και περιλαμβάνουν τις: 15-kDa σεληνοπρωτεΐνη/Sep15, SelH, SelI, SelK, SelM, SelN, SelO, SelP/SepP,SelR, SelS, SelT, SelV, and SelW.

Οι σεληνοπρωτεΐνες ανάλογα με τη θέση της Sec στην πολυπεπτιδική αλυσίδα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες :

Στην πρώτη κατηγορία, η Sec εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας των σεληνοπρωτεινών μερικές θέσεις πρίν το κωδικόνιο λήξης UGA. Στη κατηγορία αυτή ανήκουν η οικογένεια των αναγωγασών της θειοredοξίνης (TRs) καθώς και οι σεληνοπρωτεΐνες Sel S, SelR, SelO, SelI.

Στη δεύτερη κατηγορία, η Sec εντοπίζεται στο N-τελικό άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας [21]. Στη κατηγορία αυτή ανήκουν ισχυρά αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η οικογένεια των GPXs, των αποϊωδinασών της ιωδοθυρονίνης (DIOs) καθώς και οι σεληνοπρωτεΐνες Sel P, SelM, SelN.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι από τις σεληνοπρωτεΐνες που αναφέρθηκαν ο λειτουργικός ρόλος των GPXs, TrxRs, SPS2, και DIOs έχει χαρακτηρισθεί πλήρως.



Σχήμα 1.3. Το ανθρώπινο σεληνοπρωτέομα [14]

Πρωτεΐνες στις οποίες το Se προσδένεται ειδικά ως συμπαράγοντας (Se-binding proteins).

Στα θηλαστικά έχουν εντοπιστεί δύο πρωτεΐνες στις οποίες το Se προσδένεται ειδικά ως συμπαράγοντας. Αυτές είναι :

- η 14-kDa πρωτεΐνη (SLP-14)

- η 56-kDa πρωτεΐνη (SLP-56), SBP56, hSP56, και η Se-binding protein 1 (SELENBP1 ή SBP1) [19].

- Μία δεύτερη 56-kDa πρωτεΐνη σχεδόν ίδιου cDNA και πρωτεϊνικής δομής με την SP56, αλλά κωδικοποείται από διαφορετικό γονίδιο [19]. Η αρχική ονομασία της πρωτεΐνης αυτής ήταν AP56 γιατί είχε διαπιστωθεί ότι δεσμεύει ακεταμινοφαινόνη αλλά η ονομασία της σήμερα είναι SBP2.

Η πρωτεΐνη SELENBP1 φαίνεται να εμπλέκεται σε μηχανισμούς αποτοξίνωσης [22], ρύθμισης της ανάπτυξης των κυττάρων [23], μεταφοράς των πρωτεϊνών διαμέσου των σωματιδίων Golgi [24], στη γήρανση [25], και στον μεταβολισμό των λιποειδών [26].

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι αρκετές μελέτες ανάφεραν χαμηλά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών SELENBP1, SELENBP2 σε κακοήθης όγκους σε σύγκριση με φυσιολογικό ιστό. Επιπλέον, in vitro μελέτες έδειξαν χαμηλά mRNA επίπεδα των πρωτεϊνών SELENBP1, SELENBP2 σε καρκινώματα του δέρματος και των μαστών [27] καθώς και του προστάτη [28]. Τέλος, πρόσφατες μελέτες εντόπισαν χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης SELENBP1 σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα [29], καρκίνο στο στομάχι [30], καρκίνο στις ωοθήκες [31], καρκίνο του παχέους εντέρου (32), καρκίνο του θυρεοειδούς αδένα [33] σε σύγκριση με φυσιολογικό πληθυσμό. Σε δύο από αυτές τις μελέτες διαπιστώθηκε μια θετική συσχέτιση μεταξύ των χαμηλών επιπέδων έκφρασης της SELENBP1 [32] και της κακής πρόγνωσης των ασθενών. Οι παρατηρήσεις αυτές, ως εκ τούτου δεν τονίζουν μόνο τις αντικαρκινικές ιδιότητες του Se αλλά επίσης δείχνουν ότι η πρωτεΐνη SELENBP1 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως πιθανός βιοδείκτης τόσο στην ανάπτυξη του καρκίνου όσο και στην έκβαση της κατάστασης των ασθενών που πάσχουν απο διάφορες μορφές καρκίνου.

Πρωτεΐνες στις οποίες το Se συνδέεται μη ειδικά με τη μορφή σεληνομεθειονίνης (Se-containing proteins).

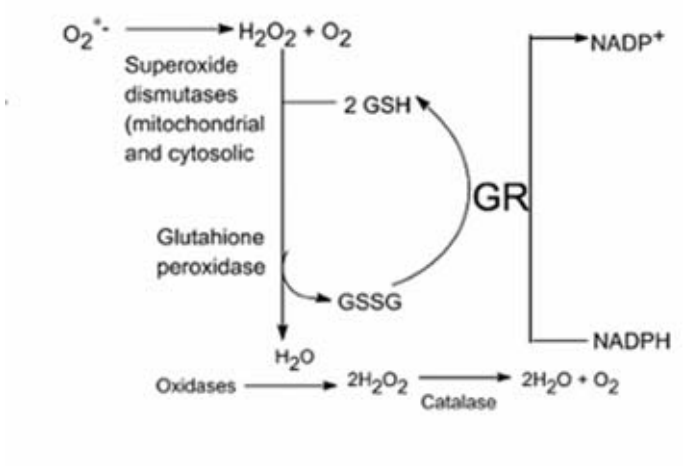
Η κατηγορία αυτή προκύπτει με μη ειδική αντικατάσταση της μεθειονίνης των πρωτεϊνών απο την σεληνομεθειονίνη. Η αντικατάσταση αυτή συμβαίνει σε μεγάλη πρόσληψη σεληνομεθειονίνης, όταν τα επίπεδα της μεθειονίνης είναι χαμηλά και όταν η ενδομοριακή κατανομή S/Se είναι χαμηλή [17]. Ο βιολογικός της ρόλος δεν έχει διευκρινισθεί μέχρι σήμερα, παρόλο αυτά πρόσφατες μελέτες δείχνουν πιθανή σχέση μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών και της εμφάνισης καρκίνου [17].

1.3.2 Οι σημαντικότερες σεληνοπρωτεΐνες

Η οικογένεια της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης

Υπάρχουν πέντε μορφές υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στον ανθρώπινο οργανισμό που έχουν χαρακτηρισθεί και συμβολίζονται ως GPX 1, 2, 3, 4 και 5. Το καθένα από τα πέντε ένζυμα καταλύει την ίδια αντίδραση, αλλά σε διαφορετικούς ιστούς. Οι πρώτες τέσσερις μορφές είναι εξαρτώμενες από το Se και περιέχουν τέσσερα κατάλοιπα σεληνοκυστεΐνης [34].

Ο κύριος ρόλος της GPX είναι ότι καταλύει την απομάκρυνση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H2O2) και άλλων οργανικών υπεροξειδίων (υπεροξείδια λιποειδών, LOOH, γενικά οργανικά υπεροξείδια ROOH ή υπεροξείδια αζώτου, ONOO) από τους ιστούς σύμφωνα με την αντίδραση που φαίνεται στο σχήμα 1.4. Τα υπεροξείδια αυτά αν δεν απομακρυνθούν, μπορεί να καταστρέψουν τις κυτταρικές μεμβράνες. Σύμφωνα με το σχήμα ο καταλυτικός ρόλος της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στη μείωση τόσο των οργανικών όσο και των υπεροξειδίων αζώτου περιλαμβάνει την οξείδωση στο αντίστοιχο σεληνικό οξύ (R-SeOH) η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την αναγωγή των ROOH και ONOO σε αλκοόλες και νερό αντίστοιχα [35].



Σχήμα 1.4. Ο ρόλος της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στην απομάκρυνση του υπεροξειδίου του υδρογόνου στους ανθρώπινους ιστούς [36].

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης -1 (GPX1) ανακαλύφθηκε το 1957 από τον Mills [37] στη προσπάθειά του να βρει παράγοντες που προστατεύουν τα ερυθροκύτταρα από οξειδωτική αιμόλυση. Πρόκειται για μια τεταρτοταγής πρωτεΐνη με τέσσερις όμοιες σφαιρικές υπομονάδες μοριακού βάρους 23kDa η κάθε μία, στις οποίες περιέχεται ένα άτομο Se. Με τη βοήθεια της κρυσταλλογραφίας βρέθηκε ότι οι σφαιρικές υπομονάδες έχουν διάμετρο 3.8 nm και διατάσσονται στο ίδιο τετραγωνικό οπτικό επίπεδο στο χώρο. Τα άτομα Se απέχουν μεταξύ τους περίπου 2 nm γεγονός που δηλώνει ότι δρουν ανεξάρτητα. Το κατάλοιπο της Sec βρίσκεται στο τέλος της α-έλικας, η οποία συνδέεται με δύο παράλληλες αλυσίδες β-διαμόρφωσης με δομή βαβ.

Ο κύριος ρόλος της GPX1 είναι η αναγωγή των ενδοκυτταρικών υπεροξειδίων και η απομάκρυνσή τους από τους ιστούς σύμφωνα με την αντίδραση 2GSH + ROOH → GSSG + ROH + H2O. Η γλουταθειόνη, ένα τριπεπτίδιο από γλυκίνη, κυστείνη και γλουταμινικό, που απαντάται στα περισσότερα κύτταρα του σώματος, χρειάζεται στην ανηγμένη του μορφή και αποδίδει ανηγμένα ισοδύναμα για την προηγούμενη αντίδραση. Τα οργανικά υπεροξείδια προέρχονται από τη χοληστερόλη και τα ακόρεστα λιπαρά οξέα κυρίως. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου παράγεται από πολλά κύτταρα του σώματος ως μέρος του φυσιολογικού μεταβολισμού και μπορεί να παραχθεί σε μεγάλες ποσότητες από τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα. Η αντίδραση που καταλύεται από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης εξουδετερώνει ή εξαλείφει το H2O2 και τα οργανικά υπεροξείδια. Τα υπεροξείδια αυτά αν δεν απομακρυνθούν, μπορεί να καταστρέψουν τις κυτταρικές μεμβράνες.

Μια δεύτερη μορφή GPX που είχε εντοπιστεί στο κυτταρόπλασμα είχε αρχικά ονομαστεί γαστρεντερική GPX ή GPXG1. Η τωρινή της ονομασία είναι GPX-2 (34). Η πολυπεπτιδική

αλυσίδα της GPX-2 παρουσιάζει κατά 65% ομοιότητα με την πολυπεπτιδική αλυσίδα της GPX-1 [34]. Η GPX-1 και η GPX-2 έχουν όμοια ενζυμική δραστικότητα εφόσον συμβάλλουν και οι δύο στην απομάκρυνση τόσο των υπεροξειδίων του υδρογόνου όσο και των υπεροξειδίων των λιπαρών οξέων ενώ δεν συμβάλουν στην απομάκρυνση των φωσφολιπιδικών υπεροξειδίων. Στα ποντίκια, το mRNA της GPX-2 εντοπίζεται κυρίως στο γαστροεντερικό σωλήνα ενώ στους ανθρώπους το mRNA εντοπίζεται στο ήπαρ και στο παχύ έντερο [34]. Ο ρόλος της GPX-2 στα θηλαστικά δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Παρόλ' αυτά η ασυνήθιστη κατανομή της στα επιθηλιακά κύτταρα της γαστροεντερικής οδού υποδηλώνει τον ιδιαίτερο ρόλο της GPX-2 στο μεταβολισμό των υπεροξειδίων των λιπαρών οξέων στο πεπτικό σύστημα. [34]. Μετά από πειράματα σε κύτταρα σχετικά με τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της GPX-2 παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της εκδηλώνεται και σε περιβάλλον φτωχό σε Se σε αντίθεση με άλλες GPXs [34].

Μετά την ανακάλυψη της GPX-1 θεωρούνταν ότι η ύπαρξη GPX στο πλάσμα οφείλεται στη διαρροή του ενζύμου αυτού από το ήπαρ ή από διάφορα όργανα στην κυκλοφορία του αίματος. Επιπλέον, είχε παρατηρηθεί ότι η ενζυμική δραστικότητα της GPX πλάσματος αυξάνεται με τα αυξημένα επίπεδα ολικού Se ενώ μειώνεται με τα χαμηλά επίπεδα ολικού Se στο ήπαρ. Επιπλέον, είχε παρατηρηθεί ότι η GPX του πλάσματος κατέλυε το ίδιο υπόστρωμα με την GPX-1ενώ αντιδρούσε διαφορετικά στην παρουσία αντισωμάτων ειδικών για την GPX-1 [34]. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην εύρεση μιας τρίτης ισομορφής GPX της GPX-3 του πλάσματος, με διακριτές ιδιότητες σε σχέση με τις άλλες μορφές.

Σε αντίθεση με την GPX-1, η GPX-3 παρουσιάζει ενζυμική δραστικότητα έναντι των υδροϋπεροξειδίων των φωσφολιποειδών έχοντας έτσι έναν άμεσο ρόλο στην προστασία των κυτταρικών μεμβρανών [34]. Πρόκειται για μία εκκρινόμενη, τετραμερής γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 22 kDa. Η πολυπεπτιδική της αλυσίδα περιέχει 226 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 25,389 ενώ παρουσιάζει 44% κατανομή με την GPX-1. Το μόριο της σεληνοκυστεΐνης προσδένεται στο κατάλοιπο 73 της πολυπεπτιδικής της αλυσίδας. Μέσα στους ιστούς, η GPX-3 απαντάται κυρίως (περίπου 70%) στο κυτταρόπλασμα και σε μικρότερη έκταση (περίπου 30%) στη μήτρα των μιτοχονδρίων.

Η GPX-3 παράγεται κυρίως στους νεφρούς. Συγκεκριμένα, το mRNA για την βιοσύνθεση της GPX-3 βρίσκεται στα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς σωληναρίων. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι ασθενείς με νεφρικές παθήσεις καθώς και ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση παρουσιάζουν χαμηλή GPX-3 δραστικότητα. Παρόλ' αυτά τα μειωμένα επίπεδα στο πλάσμα δεν

συσχετίζονται με ανεπάρκεια Se στους συγκριμένους ασθενείς. Επιπλέον, η GPX-3 έχει εντοπιστεί και σε άλλα όργανα του ανθρώπινου οργανισμού όπως καρδιά, πνεύμονες πλακούντα, θυρεοειδή αδένα, καθώς και σε γαστροεντερικά κύτταρα. Τέλος, η παρουσία της στο μητρικό γάλα υποδηλώνει την παρουσία της GPX-3 στα κύτταρα των μαστών [34].

Η τέταρτη μορφή GPX που έχει χαρακτηρισθεί είναι η GPX-4 ή υπεροξειδάση της γλουταθειόνης φωσφολιποειδικών υδροϋπεροξειδίων. Η GPX-4 απομονώθηκε το 1982, ενώ το γεγονός ότι περιέχει Se επιβεβαιώθηκε το 1985 [34]. Η GPX-4 σε αντίθεση με τη GPX-1 έχει ως υπόστρωμα φωσφολιποειδικά υδροϋπεροξείδια. Επιπλέον, η GPX-4 μπορεί να προσδεθεί σε πλήθος αναγωγικών υποστρομάτων όπως και στη γλουταθειόνη σε αντίθεση με τις GPX-1 και GPX-2 [34]. Από πειράματα κλωνοποίησης φάνηκε ότι η GPX-4 αποτελείται απο πολυπεπτιδική αλυσίδα των 170 αμινοξέων με μοριακό βάρος περίπου 19 kDa. Η πολυπεπτιδική της αλυσίδα παρουσιάζει κατανομή 30-40% με την πολυπεπτιδική αλυσίδα της GPX-1. Η GPX-4 παρουσιάζει δομικές διαφορές από τις άλλες GPX. Η κύρια δομική διαφορά είναι ότι η GPX-4 είναι μονομερής πρωτεΐνη σε αντίθεση με τις τετραμερείς μορφές που παρουσιάζουν οι άλλες GPX [34]. Το γεγονός αυτό επιτρέπει στην GPX-4 να προσδένεται σε πληθώρα υποστρωμάτων σε σχέση με τις άλλες GPX [34].

Εκτός από τις GPX που αναφέρθηκαν υπάρχουν και άλλες μορφές οι οποίες ενώ παρουσιάζουν ομοιότητα με τις GPX δεν περιέχουν σεληνοκυστείνη αλλά κυστείνη. Συναντώνται τόσο στον ανθρώπινο οργανισμό όσο και στα υπόλοιπα θηλαστικά. Δύο από αυτές τις μορφές είναι μία εντοπισμένη στην επιδιδυμίδα GPX (GPX-5) με 60-70% δομική ομοιότητα με την GPX-1 και μια πρωτείνη εντοπισμένη στους οσφρητικούς αδένες υπεύθυνη για το μεταβολισμό πτητικών ενώσεων των οσμών (GPX-6) [34].

Η οικογένεια των 5'- αποΐωδιονασών

Η οικογένεια των αποΐωδιονασών συμμετέχει στον περιφερικό μεταβολισμό των θυρεοειδικών ορμονών και εμπλέκει το Se στο μεταβολισμό αυτών (Σχ.1.5). Η εξειδικευμένη για κάθε ιστό αποιωδίωση των θυρεοειδικών ορμονών καθορίζει σε μεγάλο βαθμό και τη μεταβολική τους τύχη. Στο μεγαλύτερο ποσοστό της η ενεργοποίηση της προ-ορμόνης Τ4 στην Τ3 γίνεται με αποιωδίωση εκτός θυρεοειδή. Η απενεργοποίηση της Τ3 στο Τ2 ισομερές της, η απενεργοποίηση της Τ4 στην rT3 και στην συνέχεια η αποικοδόμηση της rT3 στο Τ2 ισομερές της καταλύονται και αυτές από αποιωδιονάσες. Αυτή η σταδιακή απομάκρυνση ιωδίου από το βενζολικό δακτύλιο της

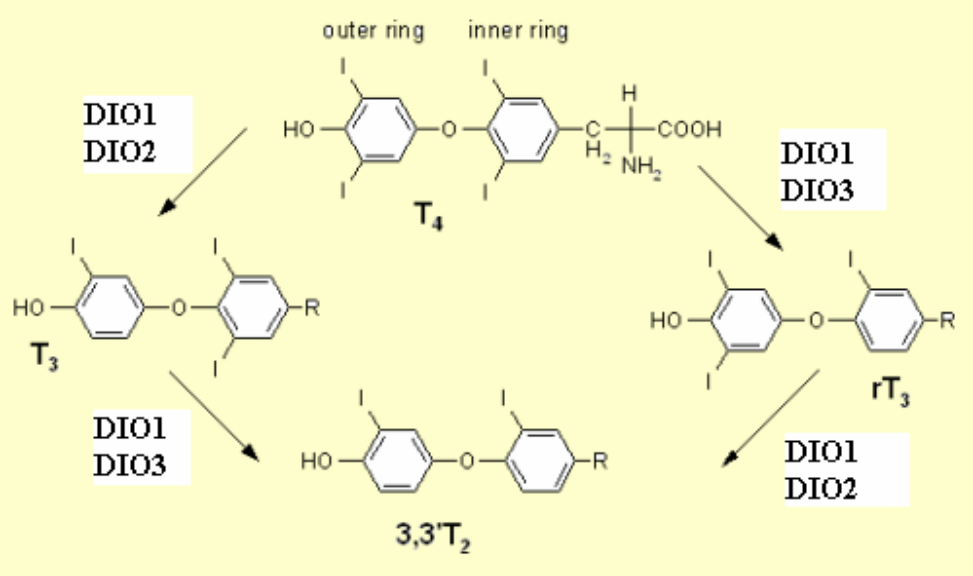
τυροσίνης είναι η βασική πορεία περιφερικού μεταβολισμού των θυρεοειδικών ορμονών και καταλύεται από την οικογένεια των αποιωδιονασών [38]

Στην οικογένεια αυτή ανήκουν 3 ισομορφές 5'-αποΐωδιονάσων, οι I, II, και III. Οι ισομορφές αυτές διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον τόπο δράσης τους, το υπόστρωμα που καταλύουν, τη ρύθμιση της δράσης τους και την κινητική των αντιδράσεων που καταλύουν [38].

Συγκεκριμένα, η αποιωδινάση τύπου I (5'-DIO), η οποία ανακαλύφθηκε το 1981, είναι ομοδιμερής πρωτείνη και κάθε της υπομονάδα έχει MB 27-kDa. Η 5'-DIO εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, στα νεφρά και στον θυρεοειδή αδένα και εντοπίζεται κυρίως στη κυτταροπλασματική μεμβράνη και στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων. Η DIO1 παίρνει μέρος στην 5'- και 5-αποιωδίωση της θυροξίνης Τ4 για την παραγωγή της ενεργής μορφής τριΐωδοθυρονίνης (Τ3) ή στην ανενεργή της μορφή (rT3). Η 5'-DIO είναι ένζυμο, του οποίου η δραστικότητα εξαρτάται από το Se και έχει μία σεληνοκυστεΐνη στο ενεργό κέντρο του ενζύμου σε αντίθεση με την 5-DIO που δεν απαιτεί Se για να εκφράσει τη δραστικότητά της [38].

Η αποιωδινάση τύπου II (5'-DIO2) είναι ετεροτριμερής πρωτείνη των 200 kDa που περιέχει μια υπομονάδα 29-kDa που αλληλεπιδρά με ακτίνη. Σε αντίθεση με την 5'-DIO1, η 5'-D12 προτιμά την Τ4 ως υπόστρωμα. Ο τύπος αυτός εντοπίζεται σε σημαντικό ποσοστό, στον εγκέφαλο, στην υπόφυση και στο φαιό λιπώδη ιστό. Αυτή η ισομορφή φαίνεται να πραγματοποιεί μόνο 5'-αποιωδίωση σε αντίθεση με την ισομορφή τύπου Ι. Ωστόσο, σε αντίθεση με την τύπου 5'-DIO, αυτό το ένζυμο, δεν απαιτεί το Se για τη δράση του. Τέλος η 5'-DIO2 συμβάλλει στη διέγερση της υπόφυσης προκειμένου να πραγματοποιηθεί η σύνθεση και η έκκριση τελικά της θυρεοτρόπου ορμόνης TSH [38].

Η αποιωδινάση τύπου III (5'-DIO3) εμποδίζει την ενεργοποίηση της ορμόνης Τ4 μέσω της απομάκρυνσης ιωδίου από το δακτύλιο της τυροσόλης [39]. Η δομή του ενζύμου αυτού δεν έχει διευκρινιστεί παρόλ' αυτά θεωρείται ότι περιέχει μια υπομονάδα μοριακού βάρους 32-kDa. Ο τύπος 5΄-DIO3 εντοπίζεται σε διάφορους ιστούς όχι όμως στο συκώτι, νεφρούς, θυρεοειδή αδένα και υπόφυση. Ο συγκεκριμένος τύπος αποΐωδινάσων εμφανίζει ένα διαφορετικό προφίλ σε σχέση με τους άλλους δύο τύπους. Συγκεκριμένα, εμποδίζει τη συσσώρευση της ορμόνης Τ4 καθώς και της ενεργούς μορφής Τ3 στα κύτταρα και στους ιστούς σε καθορισμένο χρόνο τόσο κατά την περίοδο ανάπτυξής όσο και κατά την ενηλικίωση του ανθρώπινου οργανισμού [39].



Σχήμα 1.5. Μεταβολισμός της θυρεοειδούς ορμόνης Τ4 παρουσία αποϊωδινάσων D1O1, D1O2, D1O3 [14].

Αναγωγάση της θειορεδοξίνης (thioredoxin reductase TrxR)

Η αναγωγάση της θειορεδοξίνης (TrxR), η θειορεδοξίνη (Trx), και η ανηγμένη μορφή του νικοτινάμιδο-αδένινο-φωσφοδινουκλεοτίδιου (NADPH) αποτελούν το κύριο οξειδοαναγωγικό σύστημα στους ζώντες οργανισμούς [40]. Στα θηλαστικά η αναγωγάση της θειορεδοξίνης παρουσιάζει ομοιότητες με την αναγωγάση της γλουταθειόνης. Οι TrxR αν και βασικά ένζυμα της κυτταρικής λειτουργίας επάγονται ταυτόγχρονα κάτω από διαφορετικές φυσιολογικές συνθήκες. Δρουν τόσο με το να ρυθμίζουν τη δράση της θειορεδοξίνης αλλά και με το να ανάγουν άμεσα πολλά υποστρώματα. Οι TrxR περιέχουν μία περιοχή σύνδεσης FAD, μία περιοχή σύνδεσης NADPH μία διφασική περιοχή και μία σεληνοκυστείνης κοντά στο C-τελικό άκρο που είναι απαραίτητη για την εμφάνιση της δραστικότητάς τους. Ο μηχανισμός αναγωγής μέσω της TrxR περιλαμβάνει μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADPH στο FAD. Στο μηχανισμό αυτό συμμετέχει και η σεληνοκυστείνη του ενεργού κέντρου του ενζύμου [14,40].

Τρεις μορφές του ενζύμου αυτού είναι γνωστές μέχρι σήμερα. Αυτές είναι η κυτταροπλασματική αναγωγάση της θειορεδοξίνης TrxR1, η μιτοχονδριακή TrxR2, και η TGR/TrxR3 η οποία εντοπίζεται στους όρχεις και παρουσιάζει παρόμοια δραστικότητα με την αναγωγάση της γλουταθειόνης και την αναγωγάση της γλουταρεδοξίνης [14,40]. Τέλος, σύμφωνα με τα παραπάνω η οικογένεια των θειορεδοξίνων παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, μέσω οξειδοαναγωγικού ελέγχου, των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB,

Ref-1, AP-1, P53, υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, κινάση ASK1. Με αυτό τον τρόπο ρυθμίζει διάφορες κυτταρικές δραστηριότητες όπως ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, ο κυτταρικός θάνατος και η ανοσολογική απόκριση των κυττάρων [14,40].

Σεληνοπρωτεΐνη P(SelP)

Η σεληνοπρωτεΐνη P (SelP) είναι η κύρια πρωτεΐνη του πλάσματος. Η σεληνοπρωτεΐνη P στους ανθρώπους αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα 362 αμινοξέων με μοριακό βάρος 57 kDa [41]. Η SelP περιέχει 10 κατάλοιπα σεληνοκυστεΐνης, τα οποία έχουν προβλεφθεί από τον αριθμό των UGA κωδικονίων που υπάρχουν στο mRNA της [41]. Βέβαια μπορεί να συντεθεί και με λιγότερα στην περίπτωση που το Se είναι περιορισμένο. Τα εννέα απο τα δέκα κατάλοιπα σεληνοκυστεΐνης εντοπίζονται στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης στους αριθμούς αμινοξέων 281–358, ενώ το δέκατο είναι το 40ο αμινοξύ της πολυπεπτιδικής της αλυσίδας. Η SeP είναι η μοναδική πρωτεΐνη που περιέχει περισσότερα από ένα άτομο Se στην πολυπεπτιδική της αλυσίδα.

Αυτή η γλυκοπρωτεΐνη συντίθεται κυρίως στο ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό στους νεφρούς, στην καρδιά και στους πνεύμονες. Περιέχει περίπου το 40% του Se του πλάσματος για τους φυσιολογικούς ανθρώπους ενώ μαζί με την GPX-3 αποτελούν το 90% του Se στο πλάσμα. Τα επίπεδά της ελαττώνονται σε ασθενείς που παρουσιάζουν πρόβλημα στο ήπαρ. Η SelP παρέχει το απαραίτητο Se για τη σύνθεση της GPX-3 στο ήπαρ, η οποία εισέρχεται στη συνέχεια, στη κυκλοφορία του αίματος [42-44].

Ο κύριος ρόλος της SelP εστιάζεται στη μεταφορά Se ανάμεσα στα κύτταρα ενώ παράλληλα παίρνει μέρος στην ανταλλαγή δισουλφιδικών δεσμών, λόγω του υψηλού ποσοστού κυστεΐνης και σεληνοκυστεΐνης που περιέχει. Επιπλέον, η SelP εμπλέκεται στη δημιουργία χηλικών ενώσεων με βαρέα μέταλλα οδηγώντας στο σχηματισμό μη τοξικών Se-μεταλλοσυμπλόκων προστατεύοντας έτσι από τη νευροτοξικότητα [45]. Επιπροσθέτως, η SelP παρουσιάζει έντονες αντιοξειδωτικές δράσεις. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες φάνηκε ότι η SelP προστατεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα απο το οξειδωτικό στρες όπως επίσης εμποδίζει την οξείδωση των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDLs). Τέλος, το ποσοστό SelP στο πλάσμα αίματος αποτελεί δείκτη καθημερινής πρόσληψης Se από τον ανθρώπινο οργανισμό. Έτσι, σε περιοχές με έδαφος φτωχό σε Se όπως η Κίνα, θεωρείται ότι το ποσοστό SelP στο πλάσμα είναι μικρότερο κατά 10-20% σε σχέση με μια περιοχή με έδαφος πλούσιο σε Se όπως η Η.Π.Α [34].

Τέλος, η SelP παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση του Se στον ανθρώπινο οργανισμό (Σχ.1.6) [46]. Μειωμένα επίπεδα SelP οδηγούν στην αυξημένη αποβολή Se μέσω των ούρων και κατ'επέκταση μειωμένα επίπεδα Se στον οργανισμό. Ουσιαστικά, κατά το μεταβολισμό του Se επικρατεί ένας ανταγωνισμός μεταξύ των ενώσεων Se που εκκρίνονται από το συκώτι. Ειδικότερα, επικρατεί ανταγωνισμός μεταξύ της σύνθεσης SelP καθώς και σύνθεσης πρωτεϊνών που περιέχουν σελήνομεθειονίνη οι οποίες περνούν στη κυκλοφορία του αίματος με τη σύνθεση ενώσεων Se που αποβάλλονται μέσω των ούρων (Σχ.1.6).



Σχήμα 1.6. Συμμετοχή σεληνοπρωτεΐνης P(SelP) στην ομοιοστασία του σεληνίου στον ανθρώπινο οργανισμό [46].

Σεληνοπρωτεΐνη W (SelW)

Η σεληνοπρωτεΐνη W βρίσκεται συνήθως στο κυτταρόπλασμα του καρδιακού και του σκελετικού μυός καθώς και σε άλλους ιστούς [14]. Η πολυπεπτιδική της αλυσίδα αποτελείται από 87 ή 88 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 9.8 kDa, το δε μόριο της σεληνοκυστεΐνης προσδένεται στο 13ο αμινοξύ. Παρόλο που ο ρόλος της δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως παρατηρήθηκε ότι με τη χορήγηση Se μέσω συμπληρώματος, τα επίπεδα της στους μύες αυξάνονται σημαντικά [14].

Σεληνοπρωτεΐνη S (SelS)

Η σεληνοπρωτεΐνη S είναι μία διαμεβρανική πρωτεΐνη που περιέχει σεληνοκυστεΐνη και βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων [47]. Η σεληνοπρωτεΐνη S συμμετέχει στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών με λανθασμένη χωροδιάταξη (misfolded) από το ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων και με αυτό τον τρόπο παίρνει μέρος στη μείωση της φλεγμονής του ενδοπλασματικού δικτύου. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι πρόκειται για δείκτη καρδιαγγειακού κινδύνου στις γυναίκες καθώς και προεκλαμψίας [47].

1.3.3 Μεταβολισμός του Σεληνίου στον Ανθρώπινο Οργανισμό

1.3.3.1 Κατανομή Σεληνίου στους Ιστούς

Οι νεφροί, το ήπαρ, και ο μυϊκός ιστός του ανθρώπινου οργανισμού, εμφανίζουν σχετικά υψηλότερες συγκεντρώσεις Se, αντίθετα οι πνεύμονες, ο εγκέφαλος, τα οστά και τα ερυθρά αιμοσφαίρια εμφανίζουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις Se [48]. Η κατανομή του Se στους ιστούς εξαρτάται απο την ομοιόσταση του Se στον ανθρώπινο οργανισμό. Η ομοιόσταση του Se στον οργανισμό επιτυγχάνεται μέσω διατήρησης της ισορροπίας μεταξύ αποθήκευσης ή κατανομής Se σε διάφορους ιστούς και αποβολής Se [49]. Οι νεφροί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτό [50]. Διάφορα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά (ηλικία, δείκτης μάζας σώματος), κλινικά χαρακτηριστικά (υπέρταση), βιοχημικά χαρακτηριστικά (ολική χοληστερόλη, HDL-χοληστερόλη, LDL-χοληστερόλη) καθώς και χαρακτηριστικά τρόπου ζωής (διατροφή, κάπνισμα) έχουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση ή στη διατάραξη αυτής της ισορροπίας. Η διατάραξη αυτής της ισορροπίας έχει ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη παθολογικών καταστάσεων όπως εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων, καρκίνου, διαβήτη, προβλημάτων αναπαραγωγής και δυσλειτουργία του θυρεοειδούς αδένα [51].

Επιπλέον, η κατανομή του Se στους διάφορούς ιστούς εξαρτάται από τη διατροφή [52]. Συγκεκριμένα ανάλογα με την πρόσληψή Se επικρατεί μια ιεραρχία ως προς την κατανομή του στα διάφορα όργανα του ανθρώπινου οργανισμού [53]. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε οτι οι τα υψηλά επίπεδα Se σε αυτούς αποτελούν ένδειξη κορεσμού Se σ'ενα οργανισμό ενώ ταυτόχρονα αποτελούν την ελάχιστη εξασφάλιση επιπέδων Se εις βάρος άλλων οργάνων σε χαμηλή διατροφική πρόσληψη Se [53].

1.3.3.2 Στάδια Μεταβολισμού Σεληνίου

Η κατανόηση του μεταβολισμού του Se είναι δύσκολη, αφενός γιατί το Se είναι σχεδόν πάντα ομοιοπολικά συνδεμένο με άτομο άνθρακα, αφετέρου γιατί χρειάζονται πολλά ενδιάμεσα μοναδικά μεταβολικά στάδια προκειμένου να μετατραπούν οι μορφές Se που παίρνουμε από την τροφή σε σεληνοπρωτείνες [14]. Αυτά τα στάδια περιλαμβάνουν μεταβολισμό ανόργανων μορφών Se και καταβολισμό οργανικών μορφών Se (Σχ. 1.7).

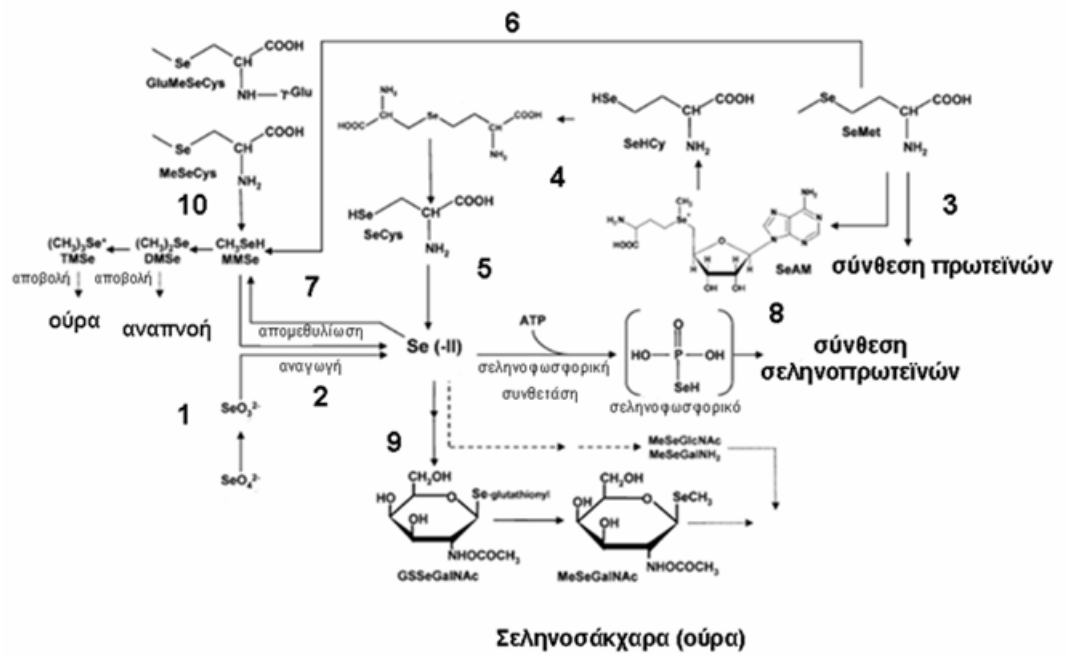
Κατά την πορεία μεταβολισμού των ανόργανων μορφών Se, το σεληνικό οξύ (selenate) ανάγεται σε σεληνιώδες οξύ (selenite) μέσω αδενοσινοφωσφοσεληνικού οξέος (APSe) ή φωσφοαδενοσινοφωσφοσεληνικού οξέος (PAPSe). Στη συνέχεια, το σεληνιώδες ανάγεται μη ενζυμικά, μέσω γλουταθειόνης, σε στοιχειακό Se που βρίσκεται στη μορφή GS-Se-SG (Σχ. 1.9, μονοπάτι 1), το οποίο στη συνέχεια με τη βοήθεια της αναγωγάσης της γλουταθειόνης μετατρέπεται σε υδροσελήνιο (selenide) ή ανιον Se^{-2}. (Σχ. 1.9, μονοπάτι 2) [54]. Η τελευταία αναγωγή λαμβάνει χώρα στα εντερικά κύτταρα αλλά και στα ερυθροκύτταρα [14]. Το σεληνικό οξύ δεν ανάγεται σε υδροσελήνιο (selenide) ή ανιόν Se^{-2} μέσω γλουτεθειόνης αφού αυτό απαιτεί έντονες ενζυμικές συνθήκες αντίδρασης προκειμένου να πραγματοποιηθεί η συγκεκριμένη αναγωγή. Στα ζώα, το διατροφικό σεληνιώδες οξύ απορροφάται από τα ερυθροκύτταρα όπου ανάγεται προς υδροσελήνιο (selenide) ή ανιόν Se^{-2} με τη βοήθεια γλουταθειόνης. Το παραγόμενο υδροσελήνιο (selenide) ή ανιόν Se^{-2} στα ερυθροκύτταρα προσδένεται στην αλβουμίνη μέσω της οποίας μεταφέρεται στους διάφορους ιστούς ή όργανα του οργανισμού. Αντίθετα, έχει παρατηρηθεί ότι το σεληνικό οξύ μεταφέρεται απευθείας στους διάφορους ιστούς ή όργανα του οργανισμού όπου και ανάγεται, παρόλο που δεν έχει διευκρινιστεί μέχρι σήμερα ο τρόπος αναγωγής του.

Οι οργανικές μορφές Se με τις οποίες αυτό βρίσκεται στις διάφορες διατροφικές πηγές είναι η σεληνομεθειονίνη (SeMet), η σεληνοκυστείνη (SeC), η μεθυλοσεληνοκυστείνη (MeSeCys) και η γ-γλουταμυλομεθυλοσεληνοκυστείνη GluMeSeCys. Συγκεκριμένα, η SeC βρίσκεται σε πρωτεΐνες στο κρέας ή στο γάλα ενώ η SeMet βρίσκεται σε πρωτεΐνες στο κρέας ή στα λαχανικά. Αντίθετα οι MeSeCys, GluMeSeCys εντοπίζονται σε διάφορα διατροφικά συμπληρώματα Se (π.χ. ζύμη) καθώς και σε φυτά που θεωρούνται συσσωρευτές Se. Κατά τον καταβολισμό του Se, η σεληνομεθειονίνη (που προέρχεται κυρίως από τη διατροφή) μπορεί είτε να αποθηκευτεί ως σεληνομεθειονίνη σε μια δεξαμενή αμινοξέων, είτε να χρησιμοποιηθεί για πρωτεΐνοσύνθεση με τον ίδιο τρόπο που

χρησιμοποιείται το αμινοξύ μεθειονίνη (Σχ. 1.7, μονοπάτι 3), είτε να καταβολιστεί σε σεληνοαδενοζυλοκυστεΐνη μέσω της σεληνοαδενοζυλομεθειονίνης (SeAM) και τελικά να μετατραπεί σε σεληνοκυστεΐνη μέσω δράσης του ενζύμου β-συνθετάσης της κυσταθειόνης (μονοπάτι 4) και γ-λυάσης της κυσταθειόνης (Σχ. 1.7, μονοπάτι 4) [54]. Η σεληνοκυστεΐνη (που προέρχεται από το μεταβολισμό της σεληνομεθειονίνης) μπορεί να αποικοδομηθεί από τη β-λυάση της σεληνοκυστεΐνης για να αποδώσει ελεύθερο στοιχειακό Se [54]. Το ελεύθερο στοιχειακό Se μπορεί να αναχθεί στο σώμα σε υδροσελήνιο, από υδρογόνα που προέρχονται από τη γλουταθειόνη ή άλλες θειόλες (Σχ. 1.7, μονοπάτι 5) [54]. Τέλος η σεληνομεθειονίνη μπορεί να μεθυλιωθεί σε μεθυλοσελήνιο καθώς και διμεθυλοσελήνιο ή τριμεθυλοσελήνιο και να απεκκριθεί στα ούρα (Σχ. 1.7, μονοπάτι 6)

Το υδροσελήνιο ή τα ιόντα Se-2 μπορούν να μεθυλιωθούν ενζυμικά σε μεθυλοσελήνιο καθώς και διμεθυλοσελήνιο ,τριμεθυλοσελήνιο με τη δράση S-μεθυλ-τρανσφεράσης και θειοαιθερικής-S-μεθυλοτρανσφεράσης αντίστοιχα (Σχ. 1.7, μονοπάτια 7) και να απεκκριθεί στα ούρα ή μπορεί να μετατραπεί σε σεληνοφωσφορικό οξύ, ένα σημαντικό ενδιάμεσο της σύνθεσης των σεληνοεξαρτώμενων ενζύμων του σώματος (Σχ. 1.7, μονοπάτι 8) [54]. Επιπλέον, μέσω μιας διαδικασίας που περιγράφεται στη μελέτη των Kobayashi και των συνεργατών του [55] ένα μέρος του υδριδίου του Se (μονοπάτι 9) καταλήγει στο σχηματισμό των σεληνοσακχάρων. Συγκεκριμένα, το σεληνοσάκχαρο MeSeGalNac θεωρείται ο σημαντικότερος μεταβολίτης απέκκρισης Se στον ανθρώπινο οργανισμό [14, 54] (Σχ. 1.7).

Οι ενώσεις MeSeCys, GluMeSeCys μετατρέπονται σε μεθυλοϋδροσελήνιο (CH3SeH) μέσω β-λύασης. Στη συνέχεια το CH_3SeH απομεθυλιώνεται προς σχηματισμό υδροσεληνίου ή ιόντων Se-2 οδηγώντας προς το σχηματισμό σεληνοπρωτεϊνών (μονοπάτι 10) [54]. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι το υδροσελήνιο ή τα ιόντα Se-2 αποτελούν το πιο σημαντικό ενδιάμεσο προϊόν κατά το μεταβολισμό του Se *in vivo* εντούτοις δεν μπορεί να απομονωθούν εξαιτίας της μεγάλης του δραστικότητας. Επιπλέον, το σεληνοφωσφορικό οξύ αποτελεί το ενδιάμεσο «κλειδί» για τη σύνθεση των σεληνοπρωτεϊνών παρόλο αυτά ο ρόλος του δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως μέχρι σήμερα [54].



Σχήμα 1.7 Στάδια μεταβολισμού σεληνίου στον ανθρώπινο οργανισμό[54]

1.3.3.3 Απορρόφηση, Μεταφορά και Αποβολή Σεληνίου

Η απορρόφηση του Se λαμβάνει χώρα στο λεπτό έντερο και η απορρόφησή του εκτιμάται περίπου 80% είτε βρίσκεται σε οργανική είτε ανόργανη μορφή. [56]

Ωστόσο, η χημική δομή των ενώσεων Se φαίνεται να επηρεάζει την απορρόφηση του. Οι οργανικές ενώσεις Se απορροφώνται σε μεγαλύτερο βαθμό από ό,τι οι ανόργανες ενώσεις Se. Για παράδειγμα η σεληνομεθειονίνη απορροφάται κατά 90% σε σχέση με το σεληνιώδες οξύ, το οποίο απορροφάται κατά 60% από το έντερο [57]. Επιπλέον, η μορφή του τροφίμου και η περιεκτικότητά του σε μακρο- και μικροθρεπτικά συστατικά αποτελεί έναν ακόμα παράγοντα που επηρεάζει την απορρόφηση του Se [58]. Συγκεκριμένα, η απορρόφηση του Se αυξάνεται με την παρουσία πρωτεϊνών, βιταμίνων Α και Ε καθώς επίσης και με την παρουσία ανηγμένης γλουταθειόνης στον εντερικό αυλό. Αντίθετα η παρουσία θείου, αρσενικού και υδράργυρου θεωρείται ότι παρεμποδίζουν την απορρόφηση Se μέσω σχηματισμού χηλικών ενώσεων και κατακρήμνισης του σχηματιζόμενου συμπλόκου [45].

Αφότου απορροφηθεί το Se ενσωματώνεται σε μία ευρεία ποικιλία πρωτεϊνών που μπορούν να αναλάβουν αποθηκευτικό και μεταφορικό ρόλο. Η σεληνοπρωτεΐνη P μεταφέρει το μεγαλύτερο ποσοστό (άνω του 50%) του Se στο πλάσμα. Στο αίμα το Se συνδέεται με σουλφυδρυλομάδες στις α και β σφαιρίνες, όπως στις VLDL και LDL λιποπρωτείνες, αντίστοιχα [59]. Η σύνθεση αυτών των πρωτεϊνών φαίνεται πως επάγεται από το Se. Οι επαναλαμβανόμενες αυξομειώσεις των συγκεντρώσεων διαφόρων σεληνοπρωτεϊνών υποδηλώνει πως οι πρωτεΐνες αυτές πιθανώς είναι σημαντικές στην εισροή του Se στους ιστούς [60]. Ο μηχανισμός με τον οποίον το Se απελευθερώνεται από τις πρωτεΐνες-μεταφορείς του πλάσματος δεν είναι επαρκώς γνωστός. Τα οργανικά σεληνοαμινοξέα που δεν ενσωματώνονται σε κάποια πρωτεΐνη, καταβολίζονται από μία λυάση προκειμένου να απελευθερωθεί το Se και να χρησιμοποιηθεί εν συνεχεία από ένζυμα. Η λυάση της σεληνοκυστεΐνης, παραδείγματος χάριν, υδρολύει τη σεληνοκυστεΐνη προς αλανίνη και H2Se (Σχ. 1.7).

Το Se αποβάλλεται διαμέσου των ούρων (50-67% της συνολικής ποσότητας που απεκκρίνεται) και των κοπράνων (40-50%). Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, το Se απαντάται με τη μορφή σεληνοσακχάρων στα ούρα [61]. Συγκεκριμένα, το σεληνοσάκχαρο SeGalNAc (1-μεθυλοσεληνο-2-ακεταμιδο-1,2-διδεοξυ-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης) θεωρείται ο κύριος μεταβολίτης του Se στα ούρα, ενώ το SeGalNH2 (1-μεθυλοσεληνο-1,2-διδεοξυ-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης) και το

τριμεθυλοσεληνίο (Se(CH3)3) εμφανίζονται σε μικρότερο ποσοστό σε αυτά. Η απομάκρυνση Se διαμέσου της αναπνευστικής οδού πραγματοποιείται με την εκπνοή μιας πτητικής ουσίας Se (με οσμή σκόρδου) που ονομάζεται διμεθυλσελήνιο, [(CH3)2Se]. Τέλος, σε περιπτώσεις όπου παρατηρείται υπέρμετρη πρόσληψη Se, η αποβολή του πραγματοποιείται διαμέσου του δέρματος και των πνευμόνων.

1.3.3.4 Συμμετοχή του σεληνίου στη σύνθεση των σεληνοπρωτεινών

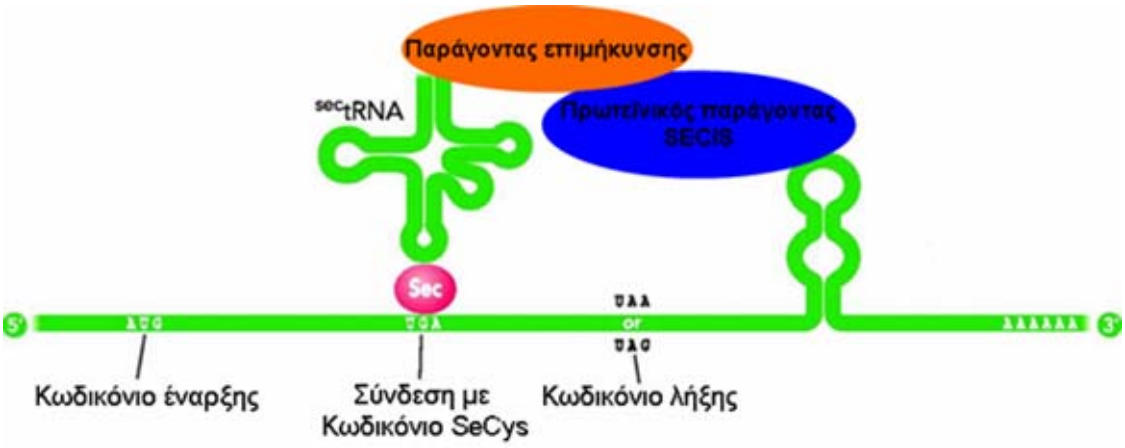
Το Se στις πρωτεΐνες εντοπίζεται με τη μορφή SeCys ή SeMet. Ειδικότερα με τη μορφή SeMet εντοπίζεται στις πρωτείνες που ενσωματώνεται μη ειδικά ενώ με τη μορφή SeCys στις σεληνοπρωτεΐνες. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι στη σύνθεση των σεληνοπρωτεϊνών δεν χρησιμοποιείται η SeCys που λαμβάνεται απο τη διατροφή αλλά εκείνη που παράγεται de novo (Σχ.1.7, μονοπάτι 5).

Η SeCys ενσωματώνεται στις πρωτεΐνες με τη βοήθεια του αγγελιοφόρου RNA (tRNA) το οποίο περιέχει το κωδικόνιο έναρξης UGA συμπληρωματικό του anti-κωδικονίου της SeCys DNA (TGA). Σε αντίθεση με τα 20 αμινοξέα του γενετικού κώδικα η SeCys συντίθεται καθολικά χρησιμοποιώντας το δικό της tRNA και τη σερίνη ως ενδιάμεσο. Έτσι, το tRNA που χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία βιοσύνθεσης των σεληνοπρωτεϊνών είναι το Sec tRNA[Ser]Sec.

Η συμμετοχή της SeCys στη σεληνοπρωτεϊνοσύνθεση γίνεται μέσω συγκεκριμένης αλληλουχίας βάσεων SECIS (selenocysteine-inserting sequences) η οποία εντοπίζεται στο mRNA. Η αλληλουχία αυτή αποτελείται από δύο έλικες αζευγάρωτων βάσεων και στο κέντρο υπάρχει μια θηλιά (loop) βάσεων. Στην αρχή της αλληλουχίας υπάρχει η χαρακτηριστική τριπλέτα βάσεων AAA, στο άκρο 3’ η τριπλέτα AUG και στο 5’άκρο η τριπλέτα UGR [62]. Το Sec tRNA[Ser]Sec είναι αναγκαία αλλά όχι ικανή από μόνη της ώστε το κωδικόνιο UGA να επάγει την ενσωμάτωση σεληνοκυστείνης. Για να μπορέσει το UGA να οδηγήσει στην ενσωμάτωση σεληνοκυστείνης απαραίτητη είναι η παρουσία στο mRNA της περιοχής SECIS. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η αλληλουχία βάσεων SECIS εντοπίζεται ανάμεσα στην 3΄αμετάφραστη περιοχή του mRNA ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις απέχει μερικές κιλοβάσεις από το κωδικόνιο έναρξης UGA [62]. Η αλληλουχία βάσεων SECIS εμφανίζει δύο ισομορφές χωρίς σημαντικές ομοιότητες μεταξύ τους. Η δομική διαφορά τους εντοπίζεται στην παρουσία ενός εσωτερικού βρόχου στη δευτεροταγή δομή. Η

δευτεροταγής δομή τους είναι απαραίτητη για την ενσωμάτωση της Sec και κατ'επέκταση για τη σύνθεση των σεληνοπρωτεϊνών στους ευκαρυωτιούς οργανισμούς [63]. Αντίθετα, για τη σύνθεση της σεληνοπρωτεΐνης P στούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς, χρειάζονται και οι δύο ισομορφές του πρωτεϊνικού παράγοντα SECIS σε αντίθεση με τις υπόλοιπες σεληνοπρωτεϊνες [63]. Επιπλέον, ο πρωτεϊνικός παράγοντας SBP2 (SECIS-binding protein 2) καθώς και ο παράγοντας επιμήκυνσης mSelB/eEFSec (Sec specific elongation factor) απαιτούνται επιπλέον για τη σύνθεση σεληνοπρωτεϊνών στους ευκαρυωτιούς οργανισμούς, ενώ πρόσφατα, βρέθηκαν ότι απαιτούνται επιπλέον η ριβοσωμική πρωτεΐνη (L30), η πρωτεΐνη πρόσδεσης στο RNA (Secp43) και η διαλυτή αντιγονική πρωτεΐνη στο ήπαρ (SLA) (Σχ.1.8) [62].

Η αλληλουχία βάσεων SECIS σχετίζεται περαιτέρω με το φαινόμενο που αναφέρεται ως «ιεραρχία» σεληνοπρωτεϊνών. Σύμφωνα με αυτό κάθε σεληνοπρωτεΐνη διαφέρει όσον αφορά την απόκρισή της σε συνθήκες έλλειψης Se. Ενώ μερικές σεληνοπρωτεΐνες μειώνονται δραματικά κάτω από έλλειψη Se και επανασχηματίζονται αργά όταν επαναχορηγείται Se [64], άλλες μειώνονται πολύ αργά σε έλλειψη Se και επανασχηματίζονται ταχύτατα ύστερα από χορήγηση αυτού [65] Ο βασικός μηχανισμός που καθορίζει την ιεραρχία των σεληνοπρωτεϊνών είναι η επίδραση της συγκέντρωσης Se στη σταθερότητα του mRNA που πιθανότατα ρυθμίζεται από πρωτεΐνες πάνω στις οποίες συνδέεται το Se και αυτές με τις σειρά τους συνδέονται πάνω σε συγκεκριμένες δομικές περιοχές του mRNA [65]



Σχήμα 1.8 Συμμετοχή της σεληνοκυστεΐνης στη σύνθεση των σεληνοπρωτεϊνών στα ευκαρυωτικά κύτταρα [13].

1.4 Φυσιολογικός Ρόλος του Σεληνίου

1.4.1 Αναγκαιότητα του σεληνίου για τη ζωή

Το Se δεν είναι απαραίτητο για τη ζωή γενικότερα αφού τόσο οι ζύμες όσο και τα ανώτερα φυτά δεν απαιτούν την παρουσία σεληνοπρωτεΐνών. Ωστόσο, στα θηλαστικά τουλάχιστον κάποιες από τις σεληνοπρωτεΐνες είναι ζωτικής σημασίας. Εξουδετέρωση του γονιδίου του σεληνοκυστεϊνυλο-tRNA απο τα ποντίκια, το οποίο οδηγεί σε αδυναμία σύνθεσης σεληνοπρωτεϊνών οδηγούσε σε θάνατο από την εμβρυική ηλικία. [66]. Μεταξύ όλων των σεληνοπρωτεϊνών αυτές που φαίνεται να είναι απολύτως απαραίτητες για τη ζωή είναι οι αναγωγάσες της θειοredοξίνης. Το προϊόν τους, η ανηγμένη θειοredοξίνη, εμπλέκεται σε πλήθος οξειδοαναγωγικών διεργασίων στο κύτταρο αλλά είναι και το υπόστρωμα της αναγωγάσης των ριβονουκλεοτιδίων και συνεπώς απαραίτητη για τη σύνθεση DNA [67].

1.4.2 Σελήνιο και ανοσολογικό σύστημα

Το Se εμπλέκεται τόσο στους ειδικούς (επίκτητη ανοσία) όσο και στους μη ειδικούς ανοσολογικούς μηχανισμούς άμυνας (φυσική ανοσία). Επιπλέον, το Se εντοπίζεται σε σημαντικές ποσότητες σε όργανα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως το συκώτι , ο σπλήνας και ο λεμφαδένας [68]. Η παρουσία Se φαίνεται να επηρεάζει το λειτουργικό ρόλο ορισμένων κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος:

Τα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα εμφανίζουν υπερέκφραση της συνθετάσης του σεληνοφωσφορικού οξέος, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό σεληνοκυστεΐνης το βασικό δομικό λίθο των σεληνοπρωτεϊνών. Υποδεικνύεται με αυτό τον τρόπο η σημασία των σεληνοπρωτεϊνών στα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα και στη ρύθμιση της ανοσιακής απόκρισης [69].Το mRNA αρκετών, σχετιζόμενων με Τ-κύτταρα, γονιδίων (π.χ.η υπομονάδα CD4 του υποδοχέα της IL-2), έχει θεωρητικά την δυνατότητα να κωδικοποιεί λειτουργικές σεληνοπρωτεΐνες γεγονός που δείχνει ότι ο ρόλος του Se στο ανοσοποιητικό σύστημα είναι πιο περίπλοκος από ότι θεωρείται. [70]

Παράλληλα, η έλλειψη Se παρεμποδίζει τη σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος αφού:

• Στα μακροφάγα κύτταρα μειώνεται η έκκριση του λευκοτριένιου Β4 το οποίο είναι σημαντικό στη χημειοταξεία των ουδετερόφιλων στη φλεγμονή [68,71]

• Τα ενδοθηλιακά κύτταρα ασθματικών εμφανίζουν αξιοσημείωτα χαμηλά επίπεδα Se που συνδυάζεται με αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης και αυξημένη προσκόλληση ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο [68,71]

• Τα ουδετερόφιλα ποντικών και αρουραίων με ανεπαρκή επίπεδα Se μπορούν να εγκολπώνουν τα βακτήρια χωρίς όμως να οδηγούν στη φαγοκυττάρωση σε αντίθεση με ουδετερόφιλα κύτταρα ποντικιών και αρουραίων με επαρκή επίπεδα Se που οδηγούν στη φαγοκυττάρωση των βακτηρίων. Αυτή η δυσλειτουργία των ουδετερόφιλων έχει συσχετισθεί με τα χαμηλά επίπεδα της ενδοκυτταρικής GPX1, η οποία επιτρέπει στις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται να καταστρέφουν τα ίδια τα ουδετερόφιλα [72]

• Η ικανότητα των λεμφοκυττάρων να πολλαπλασιάζονται σε απόκριση μιτογόνων ελλατώνεται σημαντικά

• Μειώνονται οι τίτλοι των ανοσοσφαιρνών IgM, IgG και IgA στους αρουραίους και των ανοσοσφαιρινών IgG and IgM στούς ανθρώπους [68,71].

Η χορήγηση συμπληρώματος Se, ακόμα και σε περιπτώσεις με επαρκή επίπεδα Se έχει σημαντικά ανοσοδιεγερτικά αποτελέσματα αφού :

• Αυξάνεται ο πολλαπλασιασμός των ενεργοποιημένων Τ-κυττάρων [73].

• Ενεργοποιείται η απόκριση των λεμφοκυττάρων σε αντιγονική ενεργοποίηση καθώς και η ικανότητά τους να μετατρέπονται σε κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα και να καταστρέφουν καρκινικά κύτταρα

• Αυξάνεται η δραστικότητα των φονικών κυττάρων (ΝΚ κυττάρων) [73]

Επίσης, το Se αυξάνει την έκφραση των υποδοχέων για την IL-2 στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων και ΝΚ κυττάρων. Η δράση της IL-2 σε αυτά τα κύτταρα είναι σημαντική για τη διαφοροποίησή τους σε κυτταροτοξικά Τ κύτταρα [73].

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες έχει φανεί ότι η ανεπάρκεια του Se συνδέεται με την εμφάνιση, την παθογένεια ή την εξέλιξη ορισμένων ιογενών νόσων. [74]. Συγκεκριμένα ο Beck και οι συνεργάτες του [75] έδειξαν ότι η ανεπάρκεια Se του ξενιστή ιού Coxsackie είναι δυνατό να οδηγήσει στη μετατροπή του σε θανατηφόρο ιό. Σ'αυτή τη συμπεριφορά του ιού οφείλεται η

εμφάνιση της ασθένειας Keshan. Επιπλέον, μια άλλη μελέτη βασισμένη σε GPX-1-knock-out ποντίκια ανέδειξε τη σημαντική δράση της GPX-1 στην αποφυγή της οξειδωτικής καταστροφής του RNA-ιικού γονιδιώματος η οποία οδηγεί στη δημιουργία μεταλλάξεων του μυοκαρδίου [76].

Παράλληλα, το Se θεωρείται βασικό συστατικό της διατροφής ασθενών με HIV και αυτό γιατί μελέτες σε κύτταρα έδειξαν ότι το Se αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό του ιού HIV [77]. Πάνω από 20 μελέτες έχουν δείξει την ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων Se με το θάνατο των Τ-βοηθητικών λεμφοκυττάρων (CD4) σε ασθενείς με νόσο HIV στα πρώτα στάδια της νόσου [78] .Από την άλλη πλευρά υπάρχουν μελέτες που τονίζουν ότι τα επίπεδα Se στο πλάσμα αίματος μπορούν να αποτελέσουν ένα ισχυρό δείκτη πρόγνωσης για την εξέλιξη της νόσου HIV. Συγκεκριμένα ο Baum και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι ασθενείς με νόσο HIV και με ανεπαρκή επίπεδα Se στο πλάσμα αίματος(<85 g/L) παρουσίαζαν 20 φορές περισσότερο την πιθανότητα να πεθάνουν από τη συγκεκριμένη νόσο σε σύγκριση με ασθενείς με επαρκή επίπεδα Se ($p<0.0001$)[79]. Επιπλέον, ο Baum και οι συνεργάτες του τόνισαν ότι τα χαμηλά επίπεδα Se πλάσματος αποτελούν μεγαλύτερο κίνδυνο θνησιμότητας από τη νόσο HIV σε σχέση με τον θάνατο των Τ-βοηθητικών λεμφοκυττάρων [79]. Τέλος, σε παιδιά με νόσο HIV τόσο ο κίνδυνος θνητότητας από τη συγκεκριμένη νόσο είναι σημαντικά υψηλότερος όσο και η εξέλιξη της νόσου είναι ταχύτερη όταν τα επίπεδα Se του αίματος είναι ανεπαρκή (σχετικός κίνδυνος 5,96; $p=0.02$) [80].

Επιπλέον, το Se φαίνεται να προστατεύει ασθενείς με ηπατίτιδα Β, Γ για την ανάπτυξη καρκίνου στο ήπαρ [81,82]

Η μείωση των επιπέδων σεληνίων κάτω από συνθήκες ιογενών λοιμώξεων είναι πιθανόν να οφείλεται σε χρησιμοποίηση,από τον ιό, των αποθεμάτων Se του ξενιστή για την παραγωγή ιικών σεληνοπρωτεϊνών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας του ξενιστή για ισχυρή ανοσολογική απόκριση.Κάτω από συνθήκες ανεπάρκειας Se το αυξημένο οξειδωτικό στρες και η αυξημένη απόπτωση ενεργοποιούν τον ιό, ο οποίος πολλαπλασιάζεται με μεγαλύτερο ρυθμό στην προσπάθεια του να ξεφύγει από τα αποπτωτικά κύτταρα και με αυτό τον τρόπο αυξάνει η παθογονικότητα του.

1.4.3 Σελήνιο και οξειδωτικό στρες

Το στοιχειακό Se, οι οργανικές ή ανόργανες ενώσεις του καθώς και οι σεληνοπρωτεΐνες δεν μπορούν να χαρακτηρισθούν ως αντιοξειδωτικά με την κλασική έννοια του όρου, δηλαδή δεν μπορούν να διακόψουν οξειδωτικές διεργασίες που εκκινούνται από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.Το ίδιο ισχύει και για τις σεληνοπρωτεΐνες. Ωστόσο, αρκετές, μικρού μοριακού βάρους, σεληνοενώσεις (RSeR) μπορούν να μιμηθούν την αντίδραση σεληνοκυστεΐνης στις σεληνοπρωτεΐνες και να λειτουργήσουν ως αντιοξειδωτικά. Για παράδειγμα κατά την αντίδραση της σεληνομεθειονίνης με ONOO• σχηματίζεται το αντίστοιχο σεληνοοξείδιο (RSeOR), το οποίο στη συνέχεια ανάγεται από την αναγωγάση της θειορεδοξίνης.

Παρόλο αυτά οι μισές από τις σεληνοπρωτεΐνες που έχουν χαρακτηρισθεί παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες [83]. Γι'αυτό το λόγο η συσχέτιση που παρατηρείται ανάμεσα στην ανάπτυξη ορισμένων νοσημάτων και των χαμηλών επιπέδων Se είναι πιθανό να οφείλεται στο αυξημένο οξειδωτικό στρες που παρατηρείται στα νοσήματα αυτά. Συγκεκριμένα το Se αποτελεί το ενεργό κέντρο της GPX, η οποία καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και άλλων υδροϋπεροξειδίων σε H_2O και αλκοόλη. Με αυτόν τον τρόπο η GPX προστατεύει τον οργανισμό απο το οξειδωτικό στρές.

Ο σημαντικός ρόλος της GPX στο οξειδωτικό στρες έγινε αντιληπτός μέσα απο πειράματα σε ποντίκια απο τα οποία έχει αφαιρεθεί το γονίδιο για την GPX-1(cGPX(- /-). Τα ποντίκια (cGPX(- /-) αναπτύσσονται κανονικά ωστόσο εμφανίζονται επιρρεπή σε συνθήκες που επάγουν οξειδωτικό στρες όπως στο υπεροξείδιο του υδρογόνου, σε διάφορα ζιζανιοκτόνα όπως το paraquat και diquat καθώς και σε συνθήκες φλεγμονής (ενεργοποίηση με λιποπολυσακχαρίτες). Ουσιαστικά τα ποντίκια (cGPX(- /-) λειτουργούν όπως ασθενείς με έλλειψη του ενζύμου αφυδρογονάση της 6-φωσφογλυκόζης, οι οποίοι εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα αναγέννησης ανηγμένης γλουταθειόνης και άρα ελλατωματική δράση της GPX [84,85].

Είναι αξιοσημείωτο ωστόσο ότι παρά την παρουσία πλήθους σεληνοπρωτεϊνών μέσα στον οργανισμό από μόνη της η έλλειψη GPX-1 οδηγεί σε φαινότυπο που μοιάζει με αυτόν που εμφανίζεται σε συνθήκες έλλειψης Se. Αυτό οφείλεται στο φαινόμενο της ιεραρχίας των σεληνοπρωτεινών και στη θέση που κατέχει σε αυτήν η GPX-1. Η GPX-1 βρίσκεται στη χαμηλότερη θέση της ιεραρχίας και μειώνεται δραματικά σε συνθήκες έλλειψης Se όταν οι περισσότερες πρωτεΐνες διατηρούν τα επίπεδά τους. Ακόμα πιο αξιοσημείωτο είναι το ότι η

ευαισθησία του (cGPX(- /-) ποντικού στο οξειδωτικό στρες δεν επηρεάζεται από την κατάσταση Se ή τα επίπεδα των άλλων σεληνοπρωτεϊνών, γεγονός που υποδεικνύει ότι καμμία από τις άλλες σεληνοπρωτεΐνες δεν μπορεί να αντικαταστήσει την GPX-1 στην προσπάθεια του οργανισμού να αντιμετωπίσει το οξειδωτικό στρες

1.4.4 Σελήνιο και ρύθμιση οξειδοαναγωγικής ισορροπίας

Οι σεληνοπρωτεΐνες και ειδικότερα η cGPX και η TrxR αποτρέπουν την υπέρμετρη παραγωγή ελευθέρων ρίζων ενώ παράλληλα ρυθμίζουν τα ενδοκυτταρικά τους επίπεδα σε συγκεντρώσεις, τέτοιες ώστε να είναι απαραίτητες για τις φυσιολογικές λειτουργίες ενός κυττάρου. Συγκεκριμένα, μικρές ποσότητες ελευθέρων ριζών είναι ενδιάμεσα ενζυμικών αντιδράσεων ενώ συμμετέχουν σε πάρα πολλούς μηχανισμούς μεταγωγής σήματος στο εσωτερικό των κυττάρων. Για παράδειγμα:

Η GPX-1 παρεμποδίζει τη σύνθεση προσταγλανδινών και λευκοτριενίων μέσω της εκκαθάρισης υπεροξειδίων αφού τα βασικά ένζυμα της βιοσύνθεσής τους απαιτούν μία ελάχιστη ποσότητα υπεροξειδίων για να ενεργοποιηθούν. Συνεπώς, οι ενδοκυτταρικές GPX-1 εμποδίζουν τη χρησιμοποίηση του αραχιδονικού από τις κυκλοοξυγενάσες [86], 5-λιποξυγενάση [87] και 15-λιποξυγενάση [88].

Η GPX-3 και η SelP ρυθμίζουν τη φλεγμονώδη ενεργοποίηση. Επίσης, η GPX-3 ρυθμίζει τη φλεγμονώδη απόκριση εκκαθαρίζοντας υπεροξείδια. Κάθε οξειδωτική έκρηξη ενεργοποιούμενη από οποιοδήποτε ερέθισμα σε μερικά πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλα ή μακροφάγα θα οδηγούσε μοιραία σε μία πλήρη φλεγμονώδη ιστική αντίδραση αν δεν ρυθμιζόταν από μία ταχείας δράσης υπεροξειδάση στον εξωκυτταρικό χώρο. Από την άλλη, μία πλήρης απενεργοποίηση ενός τέτοιου ερεθίσματος δεν θα ήταν επιθυμητή αφού θα παρεμπόδιζε τους μηχανισμούς εξουδετέρωσης του βλαπτικού παράγοντα. Μία ταχεία υπεροξειδάση, όπως είναι η GPX-3 είναι ιδανική στο να διακρίνει μεταξύ ειδικών και μη ειδικών φλεγμονωδών ερεθισμάτων. Η SelP πιθανότατα επικουρεί τη δράση της GPX-3 αφού συνδεόμενη με τα ενδοθηλιακά κύτταρα τα προστατεύει από προφλεγμονώδη υπεροξείδια [89]. Πλήθος στοιχείων δείχνουν ότι οι καταρράκτες φωσφορυλιώσεων στους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος ρυθμίζονται οξειδοαναγωγικά και στους μηχανισμούς αυτούς ενεργό ρόλο παίζουν οι ενδοκυτταρικές GPX. Ενεργοποίηση του NF-kB από διάφορα ερεθίσματα αναστέλλεται από υπερέκφραση κυτταροπλασματικής GPX και PHGPX [90], κυρίως από τη δεύτερη. Επίσης, υπερέκφραση των GPX μειώνει τη μεταγωγή σήματος που οδηγεί

σε απόπτωση σε απόκριση ερεθισμάτων όπως ο TNFa και αυτό συνάδει με την υπόθεση που υποστηρίζει ότι τα υδρουπεροξείδια συμμετέχουν στα αρχικά στάδια της απόπτωσης [91].

1.4.5 Σελήνιο και θυρεοειδής αδένας

Το Se εμπλέκεται στη λειτουργία του θυρεοειδούς αδένα ρυθμίζοντας το μεταβολισμό των θυρεοειδικών ορμονών, ενώ τόσο ενδοκυτταρικές, όσο και εκκρινόμενες μορφές της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης προστατεύουν το θυρεοειδικό αδένα από το παραγόμενο H2O2 το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών.

Η εμπλοκή του Se στο μεταβολισμό των θυρεοειδικών ορμονών γίνεται μέσω δύο βιοχημικών μονοπατιών. Πρώτον, το σεληνοένζυμο D11 μετατρέπει την προ ορμόνη (θυροξίνη) T4 στην ενεργή της μορφή T3. Δεύτερον, ένα πλήθος σεληνοπρωτεϊνών οι οποίες εντοπίζονται στο θυρεοειδή αδένα όπως υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης, αναγωγάση της θειορεδοξίνης, σεληνοπρωτείνη 15 (Sep15), 5΄–αποϊωδινάσες απενεργοποιούν το ισχυρό οξειδωτικό υπεροξείδιο του υδρογόνου το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση της ορμόνης T4 και διατηρούν τη δομική ακεραιότητα του αδένα [39]. Παρόλαυτά, παραμένει να διερευνηθεί αν μόνο η GPX ή η TxR ή οποιοδήποτε άλλο σεληνοένζυμο συμβάλλει στην προστασία του θυρεοειδούς αδένα από την αυξημένη παραγωγή ιωδίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου, ή άλλου προϊόντος οξείδωσης.

Η σημασία του Se στη θυρεοειδική λειτουργία φαίνεται και από το γεγονός ότι εντοπίζεται σε σημαντικό ποσοστό στον θυρεοειδή αδένα σε σύγκριση με άλλα όργανα του ανθρώπινου οργανισμού [39]. Το γεγονός αυτό είναι ανεξάρτητο από τα επίπεδα του Se σε έναν οργανισμό όπως προέκυψε από μελέτη στην οποία φάνηκε ότι σε ανεπάρκεια Se ο εγκέφαλος και ο θυρεοειδής αδένας διατηρούν υψηλά ποσοστά Se ενώ η συγκέντρωση GPX στο πλάσμα αίματος, στο συκώτι ή στους νεφρούς βρίσκεται σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα [38].Τα σχετικά χαμηλά επίπεδα Se έχουν σαν αποτέλεσμα τη μείωση της δραστικότητας της D11 με αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή θυρεοειδικών ορμονών [39]. Αντίθετα μια άλλη μελέτη έδειξε ότι υψηλά επίπεδα Se ή σχετικά χαμηλά επίπεδα Se ενός οργανισμού δεν επιφέρουν καμία αλλαγή στη δραστικότητα της D11 και κατ'επέκταση στα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών. Αυτό σημαίνει ότι η δραστικότητα της D11 δεν επηρεάζεται απο επαρκή ή σχετικά χαμηλά επίπεδα Se παρά μόνο από ανεπαρκή επίπεδα Se σε συνδυασμό με γενετικούς παράγοντες [40].

Τα τελευταία χρόνια διάφορες μελέτες διερεύνησαν τη σχέση Se και της αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας Hashimoto [38,40]. Συγκεκριμένα διάφορες επιδημιολογικές μελέτες διατροφικής παρέμβασης τόνισαν την ευεργετική δράση του συμπληρώματος Se σε ασθενείς με αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα Hashimoto. Μετά από 3-12 μήνες χορήγηση συμπληρώματος Se διαφόρων μορφών (σεληνικού οξέος, σεληνομεθειονίνη, μαγιά, Se) παρατηρήθηκε μείωση των αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων TPOab, βελτίωση της εικόνας του θυρεοειδούς αδένα όπως προέκυψε από υπερηχογράφημα και σε μια μελέτη καταγράφηκε ότι βελτιώθηκε η διάθεση των ασθενών [38]. Τα ευεργετικά αποτελέσματα που καταγράφηκαν οφείλονται στις σεληνοπρωτείνες αφού και οι τρεις μορφές συμπληρωμάτων Se που χρησιμοποιήθηκαν οδηγούσαν σε αυξημένη βιοσύνθεσή τους. Παρόλο αυτά ο τρόπος δράσης τους στο νόσημα αυτό δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα.

Τέλος, μια πρόσφατη προοπτική μελέτη επιβεβαίωσε την ευεργετική δράση του συμπληρώματος Se στην αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα σε γυναίκες κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης [40]. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και της χορήγησης Se τα επίπεδα των αντισωμάτων TPOab ήταν χαμηλά και η συχνότητα του υποθυρεοειδισμού μειώθηκε. Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων αυτών καθώς επίσης και οι περαιτέρω μελέτες είναι δυνατόν να οδηγήσουν στην επιτυχή αντιμετώπιση της μητρικής θυρεοειδικής νόσου και στη σωστή ανάπτυξη του εμβρύου.

1.5 Σελήνιο και Διατροφή

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για το ρόλο του Se στη διατροφή. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι πλήθος επιδημιολογικών μελετών τονίζουν το ρόλο του Se στη μείωση κινδύνου εμφάνισης χρόνιων ασθενειών, όπως ο καρκίνος και οι καρδιοπάθειες [47,49] Παρατηρείται λοιπόν μια έξαρση διατροφικών συμπληρωμάτων Se που σε ορισμένες περιπτώσεις επιφέρει αντίθετα αποτελέσματα [92]. Σύμφωνα με τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι προκειμένου να κατανοηθεί ο ρόλος του Se στη διατροφή πρέπει να απαντηθούν τα εξής ερωτήματα: α) πως το Se εισέρχεται στην τροφική αλυσίδα, β) από ποιους παράγοντες επηρεάζεται η πρόσληψη Se γ) πόσο διαφέρει η πρόσληψη Se από περιοχή σε περιοχή και δ) πως τα επίπεδα πρόσληψης Se επηρεάζουν δείκτες υγείας του ανθρώπινου οργανισμού.

1.5.1 Πηγές Σεληνίου

Η συγκέντρωση του Se στο έδαφος ποικίλει σε μεγάλο βαθμό, ίσως περισσότερο από οποιουδήποτε άλλου απαραίτητου ιχνοστοιχείου, σε διάφορες περιοχές του κόσμου. Αυτό, με τη σειρά του, σχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση Se στα φυτικά τρόφιμα. Στην πραγματικότητα, αυτή η ετερογενής κατανομή έχει επιστημονικό όφελος, διότι παρέχει μια καθαρή συσχέτιση μεταξύ των περιοχών του κόσμου που είναι φτωχές σε Se (όπως μέρη της Κίνας) και της εμφάνισης ασθενειών που σχετίζονται με την έλλειψη Se [59].

Το Se εισέρχεται στην τροφική αλυσίδα μέσω των φυτών. Το ποσοστό του Se στα τρόφιμα εξαρτάται από γεωλογικούς και γεωγραφικούς παράγοντες που αφορούν κυρίως στο έδαφος καθώς και στη βιοδιαθεσιμότητα Se στα φυτά. Η βιοδιαθεσιμότητα του Se στα φυτά εξαρτάται από το pH και την αναγωγική δράση τους και από ορισμένα χαρακτηριστικά του εδάφους όπως το ποσοστό οργανικών ενώσεων σε αυτό, η μικροβιολογική δραστηριότητα, η θερμοκρασία, η υφή, το ποσοστό βροχοπτώσεων κατά την περίοδο ανάπτυξης των φυτών καθώς επίσης και από το pH [93,94]. Επιπλέον, η σχετική κατανομή των μορφών Se στο έδαφος παίζει σημαντικό ρόλο στη βιοδιαθεσιμότητά του στα φυτά, π.χ το σεληνικό οξύ είναι περισσότερο ευδιάλυτο και απορροφάται σε μεγαλύτερο ποσοστό από το σεληνιώδες οξύ [93].

Τα φυτά ανάλογα με την ικανότητά τους να αφομοιώνουν και να συσσωρεύουν Se διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: α) φυτά που δεν συσσωρεύουν Se (non-accumulators), β) συσσωρευτές Se (Se-indicators or secondary Se-accumulators) και γ) υπερσυσσωρευτές Se (Se-hyperaccumulators) [96]. Φυτά που περιέχουν Se λιγότερο από 100 μg/kg είναι ελλειμματικά σε διατροφικό Se και βρίσκονται σε εδάφη που περιέχουν Se λιγότερο από 0,6 mg/kg. Αντίθετα, μερικά φυτικά είδη είναι υπερσυσσωρευτές Se και περιέχουν έως και 40000 μg/kg [96]. Για παράδειγμα, το δέντρο Bertholletia excelsa χαρακτηρίζεται ως υπερσυσσωρευτής Se και ο καρπός του, βραζιλιάνικα φυστίκια, είναι βρώσιμος [97]. Επιπλέον, ως συσσωρευτές Se χαρακτηρίζονται το μπρόκολο, το λάχανο, το σκόρδο και το κρεμμύδι ενώ αντίθετα τα δημητριακά όπως το σιτάρι, η βρώμη, το κριθάρι και η σίκαλη χαρακτηρίζονται ως ελλειμματικά σε Se [94]

Λόγω της μεγάλης ανομοιογένειας των συγκεντρώσεων Se στο έδαφος των διαφόρων περιοχών της γης, οι πίνακες που καταγράφουν την περιεκτικότητα του στοιχείου στα διάφορα τρόφιμα μπορούν να παρέχουν μόνο ενδεικτικές τιμές. Πλούσια πηγή Se θεωρούνται τα θαλασσινά και τα κρέατα (~0.4-1.5μg/g), τα γαλακτοκομικά προϊόντα (~0.1-0.3μg/g), τα δημητριακά (~0.1-

0.8μg/g), τα φρούτα και λαχανικά (< 0.1μg/g) και οι ξηροί καρποί με κύριο αντιπρόσωπο τα φυστίκια βραζιλίας (~0.03-512μg/g). Αξίζει να σημειωθεί ότι σημαντικότερη διακύμανση τιμών περιεκτικότητας Se εμφανίζεται στην ομάδα των δημητριακών [93]. Αντίθετα, τα λαχανικά και τα φρούτα δεν εμφανίζουν μεγάλη διακύμανση τιμών Se ακόμα και αν αναπτύσσονται σε έδαφος υψηλής περιεκτικότητας σε Se [93]. Τέλος, τα κρέατα εμφανίζονται ως μια πλούσια πηγή Se στις περισσότερες περιοχές παγκοσμίως ενώ οι υψηλότερες τιμές της εμφανίζονται στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (Η.Π.Α) [93]. Επιπλέον, η χορήγηση συμπληρώματος Se (0.1 ± 0.3 mg/kg ξηρή μορφή), σε ζώα έχει σαν αποτέλεσμα οι μύες των περισσότερων ζώων να περιέχουν 0.3 ± 0.4 mgSe/kg (νωπή μορφή) [98]. Στο συκώτι των περισσότερων ζώων συσσωρεύεται τέσσερις φορές περισσότερο Se σε σχέση με τους μύες. Παράλληλα στο συκώτι των βοδιών, αρνιών και χοίρων συσσωρεύεται 10 ± 16 φορές περισσότερο Se σε σχέση με τους μύες. [98]

Ένας ακόμα παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει το ποσοστό Se στα τρόφιμα είναι το μαγείρεμα [93]. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, το ποσοστό περιεκτικότητας σε Se μειώνεται κατά τη διαδικασία του μαγειρέματος γεγονός που οφείλεται τόσο στο βράσιμο όσο και στη χρήση άλλων συστατικών όπως για παράδειγμα αλάτι ή ξύδι [93]. Η κατανομή του Se στα μέρη ενός τροφίμου μπορεί επίσης να συμβάλλει στη μείωση του ποσοστού Se στο τρόφιμο. Έτσι, σε μια πατάτα εμπλουτισμένη με Se ο εξωτερικός φλοιός της περιέχει περισσότερο Se σε αντίθεση με τη σάρκα της [93].

1.5.2 Βιοδιαθεσιμότητα σεληνίου

Η βιοδιαθεσιμότητα του Se στον ανθρώπινο οργανισμό εξαρτάται από τη μορφή των ενώσεων Se, από τη σύσταση των τροφών καθώς και από τη γενικότερη εικόνα του οργανισμού [52]. Γενικότερα, δεν υπάρχει ομοιοστατικός μηχανισμός που να ρυθμίζει την απορρόφηση Se με αποτέλεσμα αυτό να απορροφάται σε μεγάλο ποσοστό ανεξάρτητα της ποσότητάς του στον οργανισμό [56]

Το διατροφικό Se απορροφάται από τον οργανισμό με τη μορφή οργανικών ενώσεων (περίπου 70-95 %) [98]. Οι οργανικές ενώσεις SeMet, SeCys παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα. Ειδικότερα, η SeMet παρουσιάζει παραπάνω απο 90% βιοδιαθεσιμοτητα ενώ η πρόσληψή από φυτά ή/και ζώα ευθύνεται για τη μισή σχεδόν διατροφική πρόσληψη Se [99]. Το τελευταίο οφείλεται στο γεγονός ότι ενσωματώνεται σε πρωτεΐνες (αιμογλοβίνη, αλβουμίνη) στη

θέση της μεθειονίνης [100] εφόσον πρώτα καταβολιστεί προς υδροσελήνιο, (μεταβολισμός Se), με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων Se. Η SeMet απορροφάται ισχυρότερα από τις ανόργανες μορφές Se [45].

Από πειράματα βιοδιαθεσιμότητας που έγιναν σε ανθρώπους παρατηρήθηκε ότι διατροφή που χαρακτηρίζεται από κατανάλωση κρέατος υψηλής περιεκτικότητας σε Se (0.35μg/Kg κρέατος) οδηγεί σε υψηλά επίπεδα Se στο πλάσμα αίματος και ευνοεί τη βιοσύνθεση των σεληνοπρωτεϊνών [101,102]. Αντίθετα, η παρουσία στα τρόφιμα φυτικών ινών (λαχανικά, φρούτα) ή άλλων μετάλλων (θαλασσινά) και λίπους δρούνε αρνητικά στη βιοδιαθεσιμότητα του Se [52,103]. Το Se αλληλεπιδρά ισχυρά με βαρέα μέταλλα όπως κάδμιο, άργυρο και υδράργυρο τα οποία βρίσκονται στα θαλασσινά και μειώνει την απορρόφησή τους άρα και την τοξικότητά τους. Παράλληλα, βέβαια η σύνδεση του Se με τα βαρέα μέταλλα μειώνει και τη βιοδιαθεσιμότητα του Se.

1.5.3 Προτεινόμενες διατροφικές προσλήψεις σεληνίου

Η επαρκής πρόσληψη Se είναι απαραίτητη για τη βέλτιστη δραστικότητα των σεληνοενζύμων GPX και TrxR [47,93]. Το κριτήριο για την οριοθέτηση των τιμών αναφοράς της προτεινόμενης διατροφικής πρόσληψης (Dietary Reference Intake) Se είναι η επίτευξη της μέγιστης ενεργοποίησης του σεληνοενζύμου GPX , το οποίο χρησιμοποιήθηκε πρόσφατα από τη σχετική επιτροπή αξιολόγησης των τιμών αναφοράς διατροφικής πρόσληψης (Standing Committee on the Evaluation of Dietary Reference Intakes, 2000) [93]. Παρόλ' αυτά, επικρατεί σκεπτικισμός σχετικά με την εγκυρότητα του κριτηρίου αυτού κυρίως για ότι αφορά τον πιθανό προστατευτικό ρόλο της υψηλής πρόσληψης Se έναντι χρόνιων παθήσεων.

Σύμφωνα με το προαναφερθέν κριτήριο προκειμένου να οριοθετηθεί η βέλτιστη πρόσληψη Se πρέπει να ληφθούν υπόψιν τα εξής : α) κατά πόσο η μορφή των ενώσεων Se με την οποία εισέρχεται στον οργανισμό επηρεάζει στη βιοσύνθεση των σεληνοενζύμων [104] β) κατά πόσο η συγκέντρωση ορισμένων σεληνοενζύμων επηρεάζεται περισσότερο από τα χαμηλά ή υψηλά επίπεδα Se ενός οργανισμού λόγω του φαινομένου της ιεραρχίας των σεληνοπρωτεινών και γ) κατά πόσο η χορήγηση Se επηρεάζει διαφορετικά τη συγκέντρωση σεληνοενζύμων απο άνθρωπο σε άνθρωπο [104]

Σε χαμηλή ή πολύ χαμηλή πρόσληψη Se τα επίπεδα Se στον ορό ή πλάσμα αίματος συσχετίζονται θετικά με την ερυθροκυτταρική GPX-1 [34] ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις η δραστικότητά της φτάνει σε πλατώ, το οποίο σημαίνει ότι τα επίπεδα Se στον ορό ή πλάσμα

αίματος μπορούν να αποτελέσουν σημαντικό δείκτη πρόσληψης Se σε πληθυσμό με χαμηλή ή πολύ χαμηλή πρόσληψη Se. Παρόλ' αυτά, διατροφική πρόσληψη Se ικανή να προκαλεί κορεσμό της δραστικότητα της GPX-1, ενώ ικανοποιεί τον αντιοξειδωτικό ρόλο του Se δεν δεν φαίνεται να έχει προστατευτικό ρόλο έναντι του καρκίνου.

Μελέτες διατροφικής παρέμβασης στην Ευρώπη και στην Αμερική έδειξαν ότι ημερήσια πρόσληψη Se μεταξύ 80-100μg οδηγούν στη μέγιστη ενεργοποίηση του σεληνοενζύμου GPX. Αυτό προέκυψε μετά από την παρατήρηση της επίδρασης συμπληρώματος Se στα επίπεδα της GPX-1 [105]. Σύμφωνα με το βρετανικό δείκτη αναφοράς διατροφικής πρόσληψης (UK Reference Nutrient Intake, NRI) η ημερήσια πρόσληψη Se 75 μg per για τους άντρες και 60 μg για τις γυναίκες, η οποία αντιστοιχεί σε συγκέντρωση Se στο πλάσμα αίματος 95 (~89–114) μg/L, επαρκεί για τη μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα της GPX-3 [106]. Σύμφωνα με την πρόσφατη αμερικάνικη προτεινόμενη διατροφική πρόσληψη (RDA) (Πίν.1.1). Η ημερήσια πρόσληψη Se είναι 55 μg για τους άντρες και τις γυναίκες αντίστοιχα, προκειμένου να διασφαλιστεί η ενζυμική δραστικότητα της GPX. Η συγκεκριμένη προτεινόμενη διατροφική πρόσληψη είναι χαμηλότερη της προηγούμενης (70 και 55 μg/ημέρα για άντρες και γυναίκες αντίστοιχα) και προέκυψε απο δύο μελέτες που έλαβαν χώρα στην Κίνα [107] και στη Νέα Ζηλανδία [108]. Αντίθετα, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας [48] χρησιμοποιώντας τα δεδομένα των μελετών που έλαβαν χώρα στην Κίνα [107] και στη Νέα Ζηλανδία [108] προχώρησε στην οριοθέτηση τιμών ημερήσιας πρόσληψης Se 40μg για τους άντρες και 30μg για τις γυναίκες με την αυθαίρετη παραδοχή ότι η συγκεκριμένη διατροφική πρόσληψη επαρκεί για την ενεργοποίηση των 2/3 της ενζυμικής δραστικότητας της GPX.

Η ημερήσια πρόσληψη Se η οποία αντιστοιχεί στη μέγιστη δραστικότητα της σεληνοπρωτεΐνης P δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα. Μια άλλη μελέτη υποστηρίζει ότι εξαιτίας της ιεράρχησης των σεληνοπρωτεϊνών [109] στον ανθρώπινο οργανισμό τα σεληνοένζυμα εκτός της GPX ενεργοποιούνται σε χαμηλότερη διατροφική πρόσληψη Se σε σχέση με αυτή που χρειάζεται για την GPX, [110]. Αντίστοιχα, μια μελέτη στη Νέα Ζηλανδία δίνει ως όριο τα 30 μg Se/ημέρα που αντιστοιχεί στη μέγιστη ενζυμική δραστικότητα των αποιωδινάσων [108]. Τέλος, η διατροφική πρόσληψη Se ανάμεσα 350-700 μg/ημέρα αγγίξει επίπεδα τοξικότητας τόσο στα ζώα όσο και στους ανθρώπους.

Ιδανική πρόσληψη Se για προστασία απο χρόνια νοσήματα.

Παραδοσιακά, η συνιστώμενη διαιτητική πρόσληψη συγκεκριμένων διατροφικών συστατικών έχει σαν στόχο να εμποδίσει την ανεπάρκειά τους στον ανθρώπινο οργανισμό [106]. Στις μέρες μας, η συνιστώμενη διαιτητική πρόσληψη αναφέρεται περισσότερο στη συσχέτιση μεταξύ της διατροφής και της υγείας του ανθρώπινου οργανισμού [106] με στόχο αφενός τη διατήρηση καλής υγείας και αφετέρου την προστασία του οργανισμού από την ανάπτυξη διαφόρων νοσημάτων.

Συγκεκριμένα, πρόσληψη Se μεγαλύτερη από αυτή που απαιτείται για την αποφυγή της ανεπάρκειάς του ή από αυτή που απαιτείται για τη μέγιστη ενεργοποίηση των σεληνοενζύμων είναι πιθανό να οδηγήσει σε προστασία του ανθρώπινου οργανισμού από διάφορες μορφές καρκίνου καθώς και καρδιαγγειακών νοσημάτων [47]. Αν και επί του παρόντος, δεν έχει εκτιμηθεί αξιόπιστα μια τιμή Se στο ορό ή πλάσμα αίματος στην οποία να αντικατοπτρίζεται ο προστατευτικός ρόλος του Se σε διάφορα νοσήματα έγιναν ορισμένες προσπάθειες προς αυτή την κατεύθυνση. Σε διάφορες κλινικές μελέτες παρατηρήθηκε ότι μετά από χορήγηση Se τόσο οι εθελοντές που ανήκαν στο χαμηλό τριτημόριο συγκέντρωσης Se (1.34 (106 mg) mmol/l) όσο και οι εθελοντές που ανήκαν στο μεσαίο τριτημόριο (1.34–1.53 (106–121 mg) mmol/l) παρουσίασαν σημαντική ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία $p=0.002$, $p=0.03$ αντίστοιχα. [111].

Σε μια άλλη μελέτη, αναδείχθηκε ότι εάν η συγκέντρωση Se στο πλάσμα αίματος αντρών ήταν μεγαλύτερη από 1.86 mmol/l παρουσίαζαν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη(147 mg/l) [112]. Μία άλλη μελέτη χρησιμοποιώντας μια θεωρητική σχέση μεταξύ διατροφικής πρόσληψης και επίπεδα πλάσματος έδειξε ότι ο προστατευτικός ρόλος του Se στον καρκίνο αρχίζει να φαίνεται σε προσλήψεις μεταξύ 75–125 mg/ημέρα [113].

Τέλος, οι απαιτήσεις στην πρόσληψη Se διαφοροποιούνται ανάλογα με τον τρόπο ζωής που ακολουθείται. Συγκεκριμένα παράγοντες του τρόπου ζωής που σχετίζονται με το αυξημένο οξειδωτικό στρες όπως κάπνισμα [114], κατανάλωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA), έντονη άσκηση [115] αυξάνουν τις διατροφικές απαιτήσεις σε Se προκειμένου να ανταποκριθεί ο οργανισμός στο οξειδωτικό στρες.

Πίνακας 1.1 Προτεινόμενη πρόσληψη σεληνίου στους άντρες και στις γυναίκες ανά τον κόσμο [106].

Περιοχές	**Πρόσληψη Σεληνίου(μg/ημέρα)**	
	Άντρες	**Γυναίκες**
Αυστραλία	85	70
ΗΠΑ, Καναδάς	55	55
Ευρώπη	55	55
Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας	40	30

1.5.4 Αξιολόγηση Κατάστασης του Σεληνίου στον Οργανισμό

Τα επίπεδα του Se στο αίμα είναι ο δείκτης που χρησιμοποιείται συνηθέστερα για την αξιολόγηση της κατάστασης του Se στον οργανισμό και της διατροφικής του πρόσληψης [105,106]. Ειδικότερα, η συγκέντρωση Se στον ορό και το πλάσμα φανερώνουν βραχυπρόθεσμη πρόσληψη Se από τη διατροφή αντίθετα τα επίπεδα Se στα ερυθροκύτταρα φανερώνουν μακροπρόθεσμη πρόσληψη. Άμεσες συγκρίσεις του περιεχομένου Se στο πλάσμα και στο ολικό αίμα έδειξε ότι η συγκέντρωση Se (ng/ml) στο πλάσμα αντιστοιχεί στο 81% της συγκέντρωσης Se στο ολικό αίμα [116] και στο 94% της συγκέντρωσης Se στον ορό αίματος [117]. Ωστόσο, δεν υπάρχουν φυσιολογικά επίπεδα Se στο πλάσμα ή ορό αίματος λόγω της μεγάλης διαφοροποίησης Se στο έδαφος απο περιοχή σε περιοχή.

Παράλληλα, έχει προταθεί ότι τα επίπεδα Se στα νύχια των ποδιών και στα μαλλιά αντανακλούν μακροπρόθεσμη πρόσληψη Se [113] Ωστόσο, τα νύχια και τα μαλλιά επηρεάζονται από τις μορφές του Se που προσλαμβάνονται και στην περίπτωση των μαλλιών, από το χρώμα και την επιμόλυνση από τα σαμπουάν και άλλα προϊόντα [118]. Επιπλέον, η συγκέντρωση του Se στα ούρα συνδέεται με τη συγκέντρωση Se στο πλάσμα αίματος και με τη διατροφική πρόσληψη Se σε πληθυσμούς με χαμηλά επίπεδα Se [119] ως εκ τούτου η συγκέντρωση Se στα ούρα μπορεί να αποτελέσει κριτήριο βραχυπρόθεσμης πρόσληψης Se. Μια μελέτη έδειξε ότι σε περίπτωση ευρέος φάσματος διατροφικών προσλήψεων η διατροφική πρόσληψη Se αντιστοιχεί στη διπλάσια συγκέντρωση Se στα ούρα [117].

Η συγκέντρωση Se στους ιστούς δεν αντικατοπτρίζει αξιόπιστα τα επίπεδα Se σε έναν οργανισμό, γιατί η συγκέντρωσή του σε αυτούς εξαρτάται απο τη μορφή με την οποία εισέρχεται στον οργανισμό. [118]. Για παράδειγμα εάν η μορφή με την οποία το Se εισέρχεται στον οργανισμό είναι η σεληνομεθειονίνη, τότε η συγκέντρωσή του στους ιστούς θα είναι υψηλή ακριβώς γιατί η SeMet ενσωματώνεται στις πρωτεΐνες μη ειδικά στη θέση της μεθειονίνης [119].

Το πιο αξιόπιστο μέτρο των επιπέδων Se σ έναν οργανισμό θα πρέπει να αντικατοπτρίζει τα επίπεδα των λειτουργικών σεληνοπρωτεϊνών. Έτσι, η μέτρηση των σεληνοπρωτεϊνών παρέχει αξιόπιστες και περισσότερο ακριβείς πληροφορίες σε σύγκριση με τη μέτρηση των επιπέδων ολικού Se [120]. Βέβαια, και η μέτρηση μιας μόνο σεληνοπρωτεΐνης είναι ανεπαρκής λόγω της ιεράρχησης σεληνοπρωτεϊνών.

Τα επίπεδα GPX-3 καθώς και GPX-1 μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αξιόπιστοι δείκτες Se σε πληθυσμό με χαμηλά επίπεδα Se. Επιπλέον, παρέχουν πληροφορίες για τη διατροφική πρόσληψη Se για τον ίδιο πληθυσμό [49]. Η GPX των αιμοπεταλίων θεωρείται ότι είναι αξιόπιστος δείκτης διατροφικής πρόσληψης Se γιατί τα επίπεδα της αυξάνονται σε διάστημα 1-2 εβδομάδων από τη στιγμή που χορηγείται διατροφικό συμπλήρωμα Se [121,122]. Πρόσφατα, η μέτρηση επιπέδων σεληνοπρωτεΐνης P έδειξε ότι μπορεί να αποτελέσει έναν επιπλέον σημαντικό βιοχημικό δείκτη για τα επίπεδα Se στον ανθρώπινο οργανισμό [41, 46]. Τέλος, άλλες μελέτες έδειξαν ότι η κατανομή T4/T3 (θυροξίνης ορμόνης/τρι-ιωδοθυρονίνη) μπορεί να αποτελέσει δείκτη των αποιωδινάσων σε περιοχές που δεν μπορεί να μετρηθούν [123,124].

Επιπλέον, μέθοδο έμμεσης αξιολόγησης της κατάστασης του Se στον οργανισμό αποτελεί η ανάλυση της διατροφικής πρόσληψης είτε μέσω ερωτηματολογίων ανάκλησης 24ώρου είτε μέσω ερωτηματολογίων τύπου συχνότητας (FFQ). Ωστόσο, η προσέγγιση αυτή δεν κρίνεται αρκετά αποτελεσματική, συγκεκριμένα για το Se, λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας που παρατηρείται στη σύσταση των τροφίμων από περιοχή σε περιοχή [125].

Εν κατακλείδι, δεν υπάρχει συγκεκριμένος δείκτης ικανός να αξιολογήσει με ακρίβεια τα επίπεδα Se σ'έναν οργανισμό αλλά μια σειρά δεικτών που μπορούν να εφαρμοστούν σε συγκεκριμένο πληθυσμό και για συγκεκριμένα προβλήματα. Πρός το παρόν, τα ολικά επίπεδα Se στο πλάσμα ή ορό αίματος φαίνεται να είναι ο επικρατέστερος δείκτης για την εκτίμηση των επιπέδων Se και σύγκριση αυτών σε διάφορες χώρες.

1.5.5 Κατάσταση Σεληνίου ανά το κόσμο

Η ακριβής εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης Se είναι δύσκολη λόγω της μεγάλης διαφοροποίησης των τιμών Se στο έδαφος της κάθε περιοχής, τις γεωπονικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται, τη διαθεσιμότητα τροφίμων της κάθε περιοχής όπως επίσης και από τις διατροφικές προτιμήσεις του πληθυσμού της περιοχής. Ενδεικτικά παραδείγματα αυτής της διαφοράς παρουσιάζονται στον Πίν. 1.2. Σύμφωνα με τον πίνακα αυτό τοξικά (5mg/d) χαρακτηρίζονται τα επίπεδα πρόσληψης Se σε διάφορες περιοχές της Κίνας, υψηλά (199-724 μg/d) χαρακτηρίζονται στις περιοχές της Βενεζουέλας, Βόρειας Αμερικής (Βόρεια και Νότια Ντακότα, Μοντάνα, Γουαϊόμιγκ), από επαρκή έως υψηλά (100-199 μg/d) χαρακτηρίζονται τα επίπεδα στις υπόλοιπες περιοχές της Βόρειας Αμερικής και στην Ιαπωνία, επαρκή (30-90 μg/d) χαρακτηρίζονται τα επίπεδα των περιοχών Αυστραλίας, Ευρώπης, Νέας Ζηλανδίας και χαμηλά έως και πολύ χαμηλά (7-30 μg/d) εμφανίζονται τα επίπεδα σε κάποιες περιοχές της Κίνας και της Ανατολικής Ευρώπης [93]. Η χαμηλότερη τιμή πρόσληψης Se (7±11 mg) εντοπίστηκε σε περιοχές της Κίνας στις οποίες εμφανίζονται ενδημικές ασθένειες (ασθένεια Keshan) λόγω της ανεπάρκειας διατροφικής πρόσληψης Se. Σε άλλες περιοχές (Φιλανδία, Νέα Ζηλανδία) όπου έχουν παρατηρηθεί κρούσματα ασθενειών λόγω της διατροφικής ανεπάρκειας Se, η διατροφική πρόσληψη Se εκτιμήθηκε ότι είναι 3 φορές περισσότερη από αυτή των αντίστοιχων περιοχών της Κίνας.

Η διατροφική πρόσληψη Se επηρεάζει καθοριστικά τα επίπεδα Se στο αίμα σε σχέση με άλλους παράγοντες όπως φύλο, ηλικία, κάπνισμα, περιβάλλον [126]. Έτσι οι χαμηλές τιμές πρόσληψης Se έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση σοβαρών ασθενειών στον άνθρωπο σε διάφορες επιδημιολογικές μελέτες [47,93]. Παράδειγμα τέτοιων ασθενειών είναι η ασθένεια Keshan [7] η οποία πρόκειται για ένα είδος μυοκαρδιοπάθειας που εμφανίστηκε στην ομώνυμη περιοχή της Κίνας, στην οποία η καθημερινή πρόσληψη Se ήταν 10-15 mg. Επίσης, η ασθένεια Kashin-Beck [127] η οποία είναι ένα είδος οστεοαρθρίτιδας που εντοπίστηκε στις περιοχές της Κίνας, του Θιβέτ και της Σιβηρίας, αποτελεί ένα χαρακτηριστικό επιπλέον παράδειγμα χαμηλής ημερήσιας πρόσληψης Se. Επιπροσθέτως, οι υψηλές τιμές Se έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση τοξικότητας στον ανθρώπινο οργανισμό [7,107]. Η ασθένεια σελήνωση η οποία έχει παρατηρηθεί σε μεγαλύτερο ποσοστό στον άνθρωπο αλλά και στα ζώα, έχει εντοπιστεί στην περιοχή της Κίνας (Enshi), στη Βενεζουέλα, στην Κολομβία, και στη βόρεια Αμερική. Τα τοξικά συμπτώματα της σελήνωσης έγιναν εμφανή σε αυτές τις περιοχές όταν τα επίπεδα ημερήσιας πρόσληψης Se κυμαίνονται 4-9 mg [128].

Πίνακας 1.2 Ημερήσια Πρόσληψη Se κατ' άτομο (μg/άτομο/ημέρα) ανά το κόσμο [93].

Χώρες	**Ημερήσια Πρόσληψη Σεληνίου κατ' Ατομο**
Αυστραλία	57-87
Αυστρία	48
Βέλγιο	28-61
Βραζιλία	28-37
Τσεχία	10-25 (κατ'εκτίμηση)
Καναδάς	98-224
Κίνα	7-4099
Κροατία	27
Δανία	38-47
Αίγυπτο	29
Γαλλία	29-43
Γερμανία	35
Ινδία	27-48
Ιρλανδία	50
Ιταλία	43
Ιαπωνία	104-198
Νεπάλ	23
Ολλανδία	39-54
Νέα Γουινέα	20
Νέα Ζηλανδία	55-80
Πολωνία	30-40 (υπολογισμένο)
Πορτογαλία	37
Σαουδική Αραβία	15
Σερβία	30
Σλοβακία	38
Σλοβενία	30
Ισπανία	35
Σουηδία	31-38
Ελβετία	70
Τουρκία	30-37
Ηνωμένο Βασίλειο	29-39
Αμερική	106
Βενεζουέλα	199-350
Ελλάδα	39.3

1.5.6 Μέθοδοι αύξησης της διατροφικής πρόσληψης σεληνίου

Μέχρι σήμερα οι συνηθέστεροι τρόποι για την αύξηση της πρόσληψης Se, εκτός της κατανάλωσης των τροφίμων πλούσιων σε Se είναι: α) ο εμπλουτισμός των εδαφών με λιπάσματα πλούσια σε Se, β) εμπλουτισμός τροφίμων με Se καθώς και γ) χορήγηση συμπληρωμάτων διατροφής Se.

Ο εμπλουτισμός των εδαφών με λιπάσματα πλούσια σε Se πραγματοποιήθηκε τόσο στην Ευρώπη όσο και σε περιοχές της Αυστραλίας [129,130] με σκοπό τόσο τη βελτίωση της υγείας των ζώων όσο και την αύξηση της παραγωγής σε φυτικά ή ζωικά προϊόντα. Στην Ευρώπη, χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η Φιλανδία όπου κατόπιν προτροπής της Φιλανδικής κυβέρνησης εισάχθηκε Se με τη μορφή σεληνικού ή σεληνιώδους οξέος στα λιπάσματα όλης της χώρας. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης Se σε διάφορα τρόφιμα όπως ψωμί, πατάτες και κόκκινο κρέας κατά τρεις, δέκα και τρεις φορές αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκε 40% αύξηση των επιπέδων Se στον ορό αίματος των Φιλανδών μετά τον εμπλουτισμό του εδάφους [130] Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια, το Se πρωταγωνιστεί στη βελτίωση της ποιότητας των «λειτουργικών» τροφίμων [52,93]. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε με απευθείας εμπλουτισμό Se στα τρόφιμα όπως αλάτι, μαργαρίνη,δημητριακά αλλά και σε αφεψήματα, είτε με εμπλουτισμό Se σε λιπάσματα για τα τρόφιμα/αφεψήματα όπως λαχανάκια Βρυξελών, μπρόκολο, λαχανικά του είδους Brassica, σκόρδο, κρεμμύδια, σέλινο, μέντα, χαμομήλι, τσάι, ξύδι, μπύρα, μαγιά, μανιτάρια και μύδια. Στην ελληνική αγορά είναι διαθέσιμα διάφορα προϊόντα εμπλουτισμένα με Se όπως δημητριακά, γάλα, καφές.

Δεδομένης της ετερογένειας των τροφίμων όσον αφορά την περιεκτικότητά τους σε Se, η οποία εξαρτάται από τα γεωεδαφολογικά χαρακτηριστικά της κάθε περιοχής καθώς και της παγκοσμιοποίησης της αγοράς τροφίμων, είναι σχεδόν αδύνατον αλλαγές στις διατροφικές συνήθειες ενός ανθρώπου να μπορούν να προβλέψουν τις μεταβολές στη διαιτητική πρόσληψη Se [93]. Για αυτούς τους λόγους η χορήγηση συμπληρωμάτων διατροφής Se αποτελεί το πιο δόκιμο και ελεγχόμενο τρόπο ρύθμισης των επιπέδων Se στον ανθρώπινο οργανισμό. Όσον αφορά τα εμπορικά διαθέσιμα συμπληρώματα που περιέχουν μόνο Se, σε αυτά το Se βρίσκεται είτε με τη μορφή σεληνομεθειονίνης, είτε με τη μορφή ανόργανου Se, είτε με τη μορφή ζύμης εμπλουτισμένης με Se. Οι περισσότερες διατροφικές παρεμβάσεις με τα συμπληρώματα αυτά έχουν γίνει σε παθολογικούς πληθυσμούς (κυρίως καρκινοπαθείς) με απώτερο σκοπό τη βελτίωση της κλινικής εικόνας του ασθενούς. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες παρέμβασης με συμπληρώματα Se και σε φυσιολογικούς πληθυσμούς [131].

1.6 Σελήνιο και καρδιαγγειακά νοσήματα

1.6.1 Εμπλοκή των σεληνοπρωτεινών στους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς καρδιαγγειακών νοσημάτων

Το Se εμπλέκεται πλειοτροπικά στην παθοφυσιολογία των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η επαρκής διατροφική πρόσληψη Se κρίνεται απαραίτητη για την αντιοξειδωτική προστασία του αγγειακού τοιχώματος. Ειδικότερα, πειράματα σε αρουραίους έδειξαν ότι αρουραίοι που λάμβαναν δίαιτα φτωχή σε Se παρουσίαζαν χαμηλή δραστικότητα της GPX και υψηλά επίπεδα λιποειδών στο αίμα σε σύγκριση με τους αρουραίους που λάμβαναν δίαιτα πλούσια σε Se [132,133]. Ενδοθηλιακά κύτταρα αρουραίων που λάμβαναν δίαιτα πλούσια σε Se ήταν λιγότερο ευάλωτα στο οξειδωτικό στρες που επαγόταν από οξειδωμένα προϊόντα χοληστερόλης σε σχέση με αυτά αρουραίων που λάμβαναν δίαιτα φτωχή σε Se. Επιπλέον, η σεληνοπρωτεΐνη P φάνηκε ότι προστατεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού από την οξείδωση εμμέσως γιατί ενεργοποιεί την δραστικότητα της GPX σε αυτά [134].

Παράλληλα, το Se προστατεύει έναντι της καρδιαγγειακής νόσου συμβάλλοντας στη μείωση της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, η GPX-4 μειώνει την παραγωγή των φωσφολιποειδικών υδροϋπεροξειδίων καθώς και υδροϋπεροξειδίων των εστέρων της χοληστερόλης συμβάλλοντας κατ'επέκταση στη μείωση της συσσώρευσης της οξειδωμένης LDL στο αγγειακό τοίχωμα Ωστόσο και η SelP μπορεί να συνεισφέρει στη μείωση του οξειδωτικού στρες στο επίπεδο του ενδοθηλίου. Καθαρή SelP αναστέλλει την επαγόμενη από Cu2+ οξείδωση της LDL in vitro. Εξαιτίας της ικανότητας της SelP να συνδέεται στις μεμβράνες των ενδοθηλιακών κυττάρων από την εξωκυτταρική πλευρά, μπορεί μέσω της αντιοξειδωτικής της δράσης να προστατεύει το ενδοθήλιο από τις εξωκυτταρικές οξειδωτικές προσβολές [135,136].

Η διατροφική έλλειψη Se μπορεί να οδηγήσει σε προ-θρομβωτικές καταστάσεις. Συγκεκριμένα, οι GPX απαιτούνται για το μεταβολισμό των υδροϋπεροξειδίων τα οποία παράγονται κατά τη σύνθεση των εικοσανοειδών μέσω των οδών της κυκλοξυγενάσης και λιποξυγενάσης. Σε ανεπάρκεια Se, η μειωμένη δραστικότητα GPX οδηγεί σε μία συσσώρευση αυτών των υδροϋπεροξειδίων τα οποία αναστέλλουν τη δράση της συνθετάσης της προστακυκλίνης, η οποία είναι υπεύθυνη για την παραγωγή της αγγειοδιασταλτικής προστακυκλίνης από το ενδοθήλιο, ενώ ταυτόχρονα ενεργοποιείται η σύνθεση θρομβοξανίου, το οποίο είναι αγγειοσυσταλτικό και ενεργοποιητής της συσσώρευσης αιμοπεταλίων [137]. Σε

συμφωνία με το αποτέλεσμα αυτό, έχει παρατηρηθεί ότι σε άντρες με στεφανιαία νόσο, η συσσώρευση των αιμοπεταλίων συσχετίζεται αντίστροφα με τη διατροφική πρόσληψη Se [138].

Ένα άλλο μονοπάτι με το οποίο το Se εμπλέκεται στην αθηρογένεση είναι η άμεση επίδρασή του στο ανοσοποιητικό σύστημα. Η έλλειψη Se σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών από τα φαγοκυτταρικά κύτταρα αφού η GPX δεν μπορεί επιτυχώς να τις εκκαθαρίσει. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, κάτω από συνθήκες ανοσιακής διέργεσης, την αυξημένη οξείδωση της LDL και συνεπώς την επιτάχυνση της αθηρογενετικής διαδικασίας [139].

Παράλληλα, η GPX-1 μέσω της ρύθμισης των κυτταρικών επιπέδων λιποειδικών υδροϋπεροξείδιων συμμετέχει στην οξειδοαναγωγική ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB. Ο NF-kB παίζει σημαντικό ρόλο στην αθηρογενετική διαδικασία αφού επάγει τη σύνθεση προφλεγμονωδών κυτταροκινών από το αγγειακό ενδοθήλιο. Η GPX-1 μέσω μείωσης των ενδοκυτταρικών επιπέδων των υδροϋπεροξειδίων αναστέλλει έμμεσα την ενεργοποίηση του NF-kB και τελικά την πρόοδο της αθηρογένεσης [140, 141].

Από την άλλη πλευρά ο σημαντικός ρόλος του Se στα καρδιαγγειακά νοσήματα αντικατοπτρίζεται στην εμπλοκή του Se στη λειτουργία του θυρεοειδούς αδένα μιας και η δυσλειτουργία θυρεοειδούς αδένα (υποθυρεοειδισμός-υπερθυρεοειδισμός) αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακών νοσημάτων [142,143]. Έρευνες δείχνουν ότι η αποκατάσταση της λειτουργίας του θυρεοειδούς αδένα συμβάλλει στη σωστή καρδιακή λειτουργία ασθενών με καρδιαγγειακά νοσήματα. Η τριΐωδοθυρονίνη (T3) συνδέεται άμεσα με τη ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα LDL στο mRNA [144]. Η T3 προέρχεται από τη μετατροπή της θυροξίνης (T4) σε τριΐωδοθυρονίνη (T3) στο πλάσμα. Η αντίδραση μετατροπής καταλύεται από την 5΄– αποΐωδινάση της ιωδοθυρίνης τύπου I (5'-DIO1) η οποία πρόκειται για μια σεληνοπρωτεΐνη. Έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια έδειξε ότι η χορήγηση συμπληρώματος περιεκτικότητας 2% σε χοληστερόλη μειώνει τη δραστικότητα της 5-DIO1 στο συκώτι. Αυτό πιθανό να συμβαίνει επειδή λόγω υπερχοληστερολαιμίας μειώνονται τα επίπεδα του Se τόσο ώστε δεν επαρκούν για τη βιοσύνθεση και κατ'επέκταση την ενεργοποίηση του ενζύμου. Στην ίδια μελέτη η χορήγηση συμπληρώματος Se συγκέντρωσης 1 ppm οδήγησε στην ενεργοποίηση του ενζύμου. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης επιβεβαιώθηκαν και απο άλλες έρευνες που έγιναν σε ποντίκια [145,146] οδηγώντας στο συμπεράσμα ότι υπάρχει ένας ισχυρός δεσμός μεταξύ υπερχοληστερολαιμίας και υποθυρεοειδισμού. Επιπλέον έρευνες που έγιναν σε ανθρώπους έδειξαν ότι η οξείδωση της LDL χοληστερόλης λαμβάνει χώρα σε σημαντικότερο βαθμό σε ανθρώπους με

υποθυρεοειδισμό [147], οδηγώντας τελικά σε υπερχοληστερολαιμία. Παράλληλα υπάρχουν έρευνες που χαρακτηρίζουν τη χορήγηση συμπληρώματος Se ως ευεργετική για την ομαλή λειτουργία του θυρεοειδούς αδένα παρόλο αυτά δεν υπάρχουν έρευνες που να δείχνουν κατά πόσο η χορήγηση Se μπορεί να επηρεάσει τη σχέση μεταξύ δυσλειτουργίας του θυρεοειδούς αδένα και υπερχοληστερολαιμίας.

Επιπλέον, πέντε μελέτες ανέδειξαν τη σχέση Se και ομοκυστεΐνης. Μια μελέτη σε ποντίκια έδειξε ότι η μειωμένη πρόσληψη διατροφικού Se οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης [148]. Αντίθετα, μελέτες σε γενικό πληθυσμό φέρουν αμφισβητούμενα αποτελέσματα [149-151]. Παρόλ' αυτά μια μελέτη σε παθολογικό πληθυσμό έδειξε μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων Se και των επιπέδων ομοκυστεΐνης η οποία οφείλεται στην επιβαρυμένη αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού [152]. Επιπλέον, η ανεπάρκεια Se καθώς και η ανεπάρκεια βιταμίνης Ε ενισχύουν την καρδιοτοξικότητα στελεχών του ιού coxsackie η οποία οδηγεί στην εμφάνιση μυοκαρδίτιδας [153].

Τέλος, το Se αλληλεπιδρά με βαρέα μέταλλα όπως το κάδμιο και ο ψευδάργυρος σχηματίζοντας λιγότερο τοξικές ενώσεις προστατεύοντας τον οργανισμό από την έντονη τοξικότητα που παρουσιάζουν τα μέταλλα αυτά [154].

1.6.2 Σελήνιο και καρδιαγγειακό κίνδυνος

1.6.2.1 Προοπτικές επιδημιολογικές μελέτες

Για τη διερεύνηση της σχέσης Se με τα καρδιαγγειακά νοσήματα έχουν πραγματοποιηθεί δεκατρείς προοπτικές μελέτες [155-168]. Έντεκα απο αυτές τις μελέτες έχουν λάβει χώρα στην Ευρώπη ενώ μια στην Κίνα σε πληθυσμό με χαμηλή διατροφική πρόσληψη Se. Το μεγαλύτερο ποσοστό των προαναφερθέντων μελετών τονίζει την αρνητική συσχέτιση μεταξύ του Se και του κινδύνου ανάπτυξης καρδιαγγειακών νοσημάτων αλλά οι πληθυσμοί των μελετών ήταν σχετικά μικροί και το διάστημα εμπιστοσύνης αρκετά ευρύ.

Στη μοναδική μελέτη που έλαβε χώρα στην Αμερική ο πληθυσμός της μελέτης παρουσίαζε υψηλά επίπεδα Se ορού (113 ± 16 mg/l) και ο σχετικός κίνδυνος για εμφράγμα του μυοκαρδίου ήταν 1.53 (95% CI 0.61-3.84) συγκρίνοντας τους εθελοντές στο χαμηλότερο (92mg/l) με αυτούς στο υψηλότερο (134mg/l) πεμπτατημόριο επιπέδων Se [163].

Ο Salonen και οι συνεργάτες του [169] παρατήρησαν ότι τα επίπεδα Se συσχετίζονται με την εξέλιξη της καρωτιδικής αθηρωμάτωσης σε άντρες με υψηλά επίπεδα LDL-χοληστερόλης και χαλκού στο αίμα. Σε μια άλλη μελέτη η ίδια ερευνητική ομάδα παρατήρησε ότι εθελοντές με καρδιαγγειακά νοσήματα με συγκέντρωση Se ορού αίματος χαμηλότερη των 45 g/L παρουσίασαν δύο με τρεις φορές μεγαλύτερη καρδιαγγειακή θνητότητα και θνησιμότητα σε σύγκριση με τους εθελοντές που είχαν συγκέντρωση Se ορού μεγαλύτερης των 45 g/L [155]. Τέλος, η ίδια ερευνητική ομάδα παρατήρησε ότι εθελοντές της Ανατολικής Φιλανδίας με χαμηλή συγκέντρωση Se ορού και δίχως ιστορικό στεφανιαίας νόσου παρουσίασαν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου καθώς και υψηλό ποσοστό θνησιμότητας απο ισχαιμικές καρδιοπάθειες [158].

Μια μελέτη του Suadicani και των συνεργατών του έδειξε ότι άντρες μέσης ηλικίας και ηλικιωμένοι με επίπεδα Se ορού χαμηλότερα απο 79 g/L παρουσιάσαν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης ισχαιμικής καρδιοπάθειας [162].

Το παραπάνω αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε από τον Kardinaal και τους συνεργάτες του [170] στην πολυκεντρική μελέτη EURAMIC όπου διαπιστώθηκε η αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων Se στα νύχια και της πιθανότητας εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου στην περιοχή με το χαμηλότερο Se (Γερμανία).

Από την άλλη έξι τουλάχιστον μελέτες δεν έχουν δείξει καθαρή προστατευτική δράση της υψηλής κατανάλωσης Se και καρδιαγγειακού κινδύνου. Ο Virtamo και οι συνεργάτες του [157] δεν παρατήρησαν καμία συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων σεληνίου ορού και της πιθανότητας εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων σε περιοχές της ανατολικής και νοτιοδυτικής Φιλανδίας. Επιπλέον, ο Miettinen και οι συνεργάτες του [156] δεν παρατήρησαν καμία συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων Se ορού και της εμφάνισης ισχαιμικής καρδιοπάθειας στην περιοχή του Ελσίνκι. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και μελέτες που έλαβαν χώρα στην Νορβηγία [171], στην Ολλανδία [160] και στην Αμερική [163]. Στις μελέτες αυτές τα επίπεδα του Se στον ορό αίματος των εθελοντών ήταν αρκετά υψηλά (>100μg/L)

Σύμφωνα με τα παραπάνω οι χαμηλές συγκεντρώσεις Se στον ορό (~45μg/L) φαίνονται να εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρδιαγγειακών νοσημάτων. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στις μελέτες μπορούν να εξηγηθούν και από το επίπεδο αντιοξειδωτικών όπως η βιταμίνη Ε η οποία μπορεί να αντισταθμίζει την ανεπάρκεια Se σ'έναν οργανισμό προστατεύοντας απο την αθηροσκλήρωση. [170]. Τέλος, μια μελέτη μέτα-ανάλυσης έδειξε ότι ο συγκεντρωτικός σχετικός

κίνδυνος ανάπτυξης στεφανιαίων νοσημάτων ανάμεσα σε εθελοντές με υψηλά και χαμηλά επίπεδα Se ορού αίματος ήταν 0.84 (95% CI 0.71–0.99) [172]. Στη συγκεκριμένη μέτα-ανάλυση δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων ανάμεσα σε εθελοντές με επίπεδα Se πάνω και κάτω από 70μg/L.

Ένας επιπλέον παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπ'όψιν κατά την εκτίμηση τέτοιων μελετών είναι το ότι η αθηροσκλήρωση είναι μια φλεγμονώδης διεργασία και επάγει την απόκριση οξείας φάσης σε βαθμό που σχετίζεται με την έκτασή της. Συνεπώς, από τη στιγμή που το Se αποτελεί αντιδρών της οξείας φάσης αναμένεται μία πτώση των επιπέδων του στο πλάσμα σε ανθρώπους με αθηροσκλήρωση ακόμα και όταν δεν έχουν εμφανίσει ακόμα κάποιο καρδιαγγειακό επεισόδιο.

1.6.2.2 Διατροφικές παρεμβάσεις με Se και καρδιαγγειακός κίνδυνος

Ελάχιστες μελέτες διατροφικής παρέμβασης έχουν εκτιμήσει τη σχέση μεταξύ επιπέδων Se ορού και καρδιαγγειακών νοσημάτων. Μια μεγάλη μελέτη παρέμβασης (1004 εθελοντές) [173] έλαβε χώρα στην Αμερική με την ονομασία NPC (National Prevention of Cancer) και διήρκεσε 7.6 χρόνια. Η ποσότητα του Se που χορηγήθηκε ήταν 200μg/ημερησίως. Ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης καρδιαγγειακών νοσημάτων, εμφράγματος του μυοκαρδίου και εγκεφαλικού επεισοδίου ήταν 1.03 (0.78–1.367), 0.94 (0.61–1.44) και 1.02 (0.63–1.65) αντίστοιχα ενώ ο κίνδυνος θνησιμότητας καρδιαγγειακών νοσημάτων ήταν 1.22 (0.76–1.95) συγκρίνοντας την ομάδα που λάμβανε συμπλήρωμα Se με την ομάδα που λάμβανε εικονικό συμπλήρωμα. Η συγκεκριμένη μελέτη δεν ανέδειξε καμία σημαντική σχέση μεταξύ των επιπέδων Se και των καρδιαγγειακών νοσημάτων κυρίως γιατί οι εθελοντές της μελέτης χαρακτηρίζονταν από επαρκή επίπεδα Se στο πλάσμα (113 ±22 mg/l).

Στη Γαλλία, οι εθελοντές (13017) της μελέτης SU.VI.MAX [174] (Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals) λάμβαναν καθημερινά συμπλήρώμα που περιείχε 100mg Se, 120mg βιταμίνης C, 30mg βιταμίνης E, και 20mg ψευδαργύρου. Ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης στεφανιαίων νοσημάτων ήταν 0.97 (95% CI 0.77–1.20) συγκρίνοντας την ομάδα που λάμβανε τα συμπληρώματα με την ομάδα που λάμβανε εικονικό συμπλήρωμα. Η συγκεκριμένη μελέτη δεν ανέδειξε καμία σημαντική σχέση μεταξύ των επιπέδων Se και των καρδιαγγειακών νοσημάτων κυρίως γιατί οι εθελοντές της μελέτης χαρακτηρίζονταν από σχετικά υψηλά επίπεδα Se στο πλάσμα αίματος (88 ±15 mg/l).

Στην περιοχή της Κίνας Linqu έλαβε χώρα μια μελέτη κατά την οποία οι εθελοντές της (3411) κατανάλωναν καθημερινά 75mg Se, 500mg βιταμίνης C, 200 βιταμίνης E και 15mg b-καροτένιο περίπου για 3.3 χρόνια [175]. Δεν παρουσιάστηκε καμία σημαντική σχέση μεταξύ των επιπέδων Se και καρδιαγγειακών νοσημάτων

Οι προαναφερθέντες μελέτες μαζί με άλλες τρεις μικρότερες μελέτες συμπεριλήφθηκαν σε μια μέτα-ανάλυση. Ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης στεφανιαίων νοσημάτων που προέκυψε από τη συγκεκριμένη μετα-ανάλυση ήταν 0.89 (95% CI 0.68–1.17) μετά από σύγκριση εθελοντών που λάμβαναν συμπληρώματα Se και εθελοντών που λάμβαναν εικονικό συμπλήρωμα. Ο περιορισμένος αριθμός των μελετών καθώς και το γεγονός ότι στις περισσότερες μελέτες το συμπλήρωμα Se λαμβανόταν σε συνδυασμό με άλλα συμπληρώματα βιταμινών καθιστούν ανεπαρκή τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων μελετών προκειμένου να θεσπιστεί ο ακριβής ρόλος του συμπληρώματος Se στη στεφανιαία νόσο.

Επιπλέον, σε μια άλλη πρόφατη μέτα-ανάλυση, η οποία εκτίμησε το ρόλο του συμπληρώματος Se στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης απέτυχε να αναδείξει τον προστατευτικό ρόλο του Se στην αθηροσκλήρωση. [176]. Στη συγκεκριμένη μετα-ανάλυση από τις μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν μόνο σε δύο, αυτές των Stranges και συνεργατών [173] και the HDL-Atherosclerosis Treatment Study (HATS) [177] χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά συμπλήρωμα Se.

Εν κατακλείδι, το δυνητικό όφελος των συμπληρωμάτων Se θα γίνει περισσότερο κατανοητό μόνο όταν εφαρμοστούν τυχαιοποιημένες μελέτες σε πληθυσμούς που χαρακτηρίζονται από χαμηλά έως μέτρια επίπεδα Se

1.6.2.3 Σελήνιο και παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα

Δυσλιπιδαιμία

Δέκα μελέτες έχουν εστιάσει στη σχέση του σεληνίου με την ολική χοληστερόλη. Θετική συσχέτιση εντοπίστηκε σε επτά συγχρονικές μελέτες [161,162, 178-182]. Στις μελέτες αυτές τα επίπεδα σεληνίου στον ορό κυμαίνονταν από 76-125ng/mL. Αντίθετα, τρεις μικρότερες μελέτες (n=60-126) έδειξαν το αντίθετο αποτέλεσμα [178, 183, 184]. Επιπλέον μια μικρή μελέτη στην Ιαπωνία (n=127) έδειξε θετική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων σεληνίου ορού και ολικής χοληστερόλης μόνο όμως σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες [185]. Τέλος, μια μελέτη στη Κορέα έδειξε ότι οι

εθελοντές με αυξημένα επίπεδα σεληνίου παρουσίαζαν χαμηλότερες τιμές ολικής χοληστερόλης χωρίς όμως να έχει γίνει έλεγχος εάν η σχέση αυτή επηρεάζεται από άλλους παράγοντες όπως η ηλικία [186]. Σύμφωνα με τα παραπάνω μπορούμε να πούμε ότι υπάρχει μια θετική σχέση μεταξύ επιπέδων ολικού σεληνίου και ολικής χοληστερόλης αίματος. Παρόλ' αυτά η εκτίμηση της σχέσης μεταξύ ολικών επιπέδων σεληνίου και δεικτών λιπιδαιμικού προφίλ δεν φαίνεται να οδηγούν σε ξεκάθαρο συμπέρασμα. Συγκεκριμένα, δύο μελέτες βρήκαν ότι υπάρχει θετική σχέση μεταξύ σεληνίου και LDL χοληστερόλης [179,181] ενώ δύο έδειξαν το αντίθετο [178,183]. Σε τρεις μελέτες καταγράφηκε θετική σχέση σεληνίου και HDL χοληστερόλης [178,179,183] ενώ σε δύο το αντίθετο [171,182]. Στις μελέτες που μελετήθηκε η σχέση σεληνίου με τριγλυκερίδια [162,171, 180,182] καμία δεν έδειξε θετική συσχέτιση εκτός από μια [179].

Οι μελέτες διατροφικής παρέμβασης (μελέτη SU.VI.MAX[n = 12,741: 7,713 γυναίκες(35-60έτη), και 5,028 άντρες(45-60έτη)] [174], και η μελέτη EVA [178] που έγινε για τη διερεύνηση της παραπάνω σχέσης ήταν περιορισμένες χωρίς να οδηγούν σε ξεκάθαρα αποτελέσματα. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στο γεγονός ότι το συμπλήρωμα του σεληνίου δεν ήταν απαλλαγμένο από άλλες βιταμίνες (βιταμίνη A,E, C). Σε αντίθεση με τα παραπάνω, μελέτες σε ποντίκια δείχνουν ότι υπάρχει αρνητική σχέση σεληνίου με την LDL χοληστερόλη. Συγκεκριμένα απο μια μελέτη που έγινε σε ποντίκια φαίνεται ότι η χορήγηση 1 μg/g σεληνίου οδηγεί σε αύξηση της ενεργοποίησης του LDL υποδοχέα και έκφρασής του στο mRNA το οποίο αποδίδεται στη δράση της αποιωδινάσης 5'DIO1[187]. Επιπλέον, δύο μελέτες που έγιναν σε ποντίκια έδειξαν ότι η χορήγηση 1 ppm σεληνίου μειώνει τα επίπεδα apoB [188-189].

Υπέρταση

Λίγες παρατηρητικές μελέτες έχουν αναζητήσει τη σχέση μεταξύ σεληνίου και αρτηριακής πίεσης και τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα.

Στη μελέτη FLEMENGHO (N=710εθελοντές, Μ.Ο.ηλικίας:48.8έτη, 51.8% γυναίκες), υψηλότερα επίπεδα σεληνίου στο αίμα, στην αρχή της μελέτης, σχετίζονται με χαμηλότερη διαστολική και συστολική πίεση και χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης υπέρτασης μόνο στους άντρες μόνο στα 5,2 χρόνια παρακολούθησης των εθελοντών [190]. Σε μια συγχρονική μελέτη που διεξήχθη πάλι στη Φιλανδία τα επιπέδα σεληνίου ορού σχετίζονταν αντίστροφα με τη συστολική πίεση σε 722 Φιλανδούς άντρες 54 ετών[191].

Αντιθέτως, στην μελέτη Etude du Viellissement Arte´riel (EVA)(N=1389εθελοντές, ηλικία: 59-71έτη), τα επίπεδα σεληνιού στον ορό δεν συσχετίζονταν με τη συστολική πίεση. Παράλληλα, οι άντρες της μελέτης με υπέρταση είχαν υψηλότερα επίπεδα σεληνίου σε σχέση με τους άντρες που δεν εμφάνιζαν σημαντικούς καρδιαγγγειακούς παράγοντες κινδύνου [178]. Ενώ η μελέτη NHANES (2,638 εθελοντές, ηλικίας ≥40έτη) έδειξε ότι αυξημένα επίπεδα σεληνίου (>160μg/L) συσχετίζονται με υψηλά επίπεδα πίεσης αίματος και οδηγούν σε αυξημένο επιπολασμό της υπέρτασης [193]

Επίσης, στην μελέτη HATS χορήγηση συμπληρωμάτων σεληνίου δεν είχε επίδραση στην πίεση των εθελοντών [177]. Αντιθέτως, μια μελέτη (29.584 εθελοντές, 40-60έτη,55% γυναίκες)στην Κίνα, η χορήγηση συμπληρώματος που περιείχε 50 mg Se, 60 mg α-τοκοφερόλη και 15 mg β-καροτενίου αύξησε τη διαστολική πίεση, όχι όμως και την συστολική πίεση [179].

Διαβήτης

Λίγες μόνο μελέτες έχουν ερευνήσει το ρόλο του Se στον κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη και τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η πρόσληψη σεληνίου μπορεί να τον επηρεάσει. Συγκεκριμένα: Στη μελέτη NPC [194] φάνηκε ότι οι εθελοντές που λάμβαναν ημερησίως 200μg συμπλήρωμα σεληνίου παρουσίασαν αυξημένο κίνδυνο (1.50, 95% CI 1.03–2.33) να εμφανίσουν διαβήτη σε σχέση με τους εθελοντές που λάμβαναν το εικονικό συμπλήρωμα. Η αύξηση αυτή περιοριζόταν στους εθελοντές με επίπεδα σεληνίου πάνω απο >121.6 g/ml οι οποίοι εμφάνιζαν σχετικό κίνδυνο 2.70 (95% CI 1.30–5.61). Βέβαια, τα ποτελέσματα αυτής της μελέτης δεν είναι ιδιαίτερα αντιπροσωπευτικά γιατί περιλαμβάνουν μόνο ηλικιωμένους εθελοντές(Μ.Ο.ηλικίας 63.5έτη) με ιστορικό στον καρκίνο του δέρματος.

Στη μελέτη NHANES III (Third National Health and Nutrition Examination Survey) εθελοντές με επίπεδα σεληνίου >137.66 ng/ml παρουσίαζαν μεγαλύτερο επιπολασμό διαβήτη σε σχέση με εθελοντές με επίπεδα σεληνίου <111.62 ng/ml[195].

Σε συμφωνία με τις προαναφερθέντες μελέτες, στις μελέτες SU.VI.MAX και EVA παρατηρήθηκε μια θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων σεληνίου στο πλάσμα και των επιπέδων γλυκόζης στον πληθυσμό μελέτης. Αντιθέτως, σε δύο συγχρονικές μελέτες [196] παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων σεληνίου και της ανάπτυξης διαβήτη ενώ σε μια άλλη μελέτη δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση [197].

1.7 Αναλυτικές μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον ολικό προσδιορισμό και ειδοπροσδιορισμό σεληνίου σε δείγματα ανθρώπινου ορού αίματος.

Ο ακριβής προσδιορισμός ολικού Se σε βιολογικά δείγματα και ειδικότερα στον ορό είναι σημαντικός εφόσον αποτελεί βασικό στάδιο πολλών επιδημιολογικών μελετών. Επιπλέον, ο ολικός προσδιορισμός αποτελεί το πρώτο βήμα για το μετέπειτα ειδοπροσδιορισμό του εκάστοτε στοιχείου.

Ο ολικός προσδιορισμός του Se σε δείγματα ορού ή ολικού αίματος τις περασμένες δεκαετίες βασιζόταν στις τεχνικές της φασματομετρίας ατομικής απορρόφησης με ηλεκτροθερμική

ατομοποίηση (ET-AAS) καθώς και με την τεχνική υδριδίων (HG-AAS)[198]. Στις μέρες μας για τον προσδιορισμό ολικού Se χρησιμοποιούμε τη φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS [199-201]. Παρόλ' αυτά, οι αναλύσεις Se με ICP-MS δίνουν υψηλότερα όρια ανίχνευσης σε σχέση με άλλα στοιχεία λόγω φασματοσκοπικών παρεμποδίσεων εξαιτίας των πολλών ισοτόπων του που οδηγούν στη δημιουργία πολυατομικών ιόντων. Οι παρεμποδίσεις αυτές αντιμετωπίζονται σημαντικά με διάφορους τρόπους όπως χρησιμοποιώντας την τεχνική των υδριδίων, προκαλώντας μεγάλη αραίωση στα δείγματα με κατάλληλο συνδυασμό διαλυτών όπως Triton X-100, 1% HNO3 [200] ή πραγματοποιώντας εκνέφωση κατά τη διάρκεια της ανάλυσης [202]. Τέλος, η τεχνική επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος ατομικής εκπομπής ICP-AES [203,204] έχει χρησιμοποιηθεί για ολικό προσδιορισμό Se δίνοντας βέβαια όρια ανίχνευσης υψηλότερα της τεχνικής ICP-MS το οποίο μπορεί να αποφευχθεί εφαρμόζοντας την τεχνική των υδριδίων.

Από την άλλη πλευρά ο ειδοπροσδιορισμός του Se αποτελεί πρόκληση στον τομέα της αναλυτικής χημείας μια και είναι ιδιαίτερα δύσκολος αλλά και στον τομέα της επιδημιολογίας εφόσον δίνει τη δυνατότητα μιας διεισδυτικής ματιάς του μεταβολισμού του Se στον ανθρώπινο οργανισμό. Μια από τις δυσκολίες κατά τον ειδοπροσδιορισμό Se σε δείγματα ορού είναι ότι δεν υπάρχουν υλικά αναφοράς ανθρώπινου ορού αίματος με πιστοποιημένη τιμή των ειδών Se ώστε να είναι εφικτή η σύγκριση με αποτελέσματα διαφόρων προηγούμενων μεθόδων. Αντίθετα, υλικά αναφοράς ανθρώπινου ορού με πιστοποιημένη τιμή ολικού Se είναι διαθέσιμα (BCR 637, 638, 639, Seronorm). Παρόλ' αυτά, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες που αναφέρονται στον ειδοπροσδιορισμό σεληνοπρωτεϊνών εφόσον αποτελούν το 90% των επιπέδων ολικού Se στον ορό αίματος αλλά ο αριθμός δειγμάτων που αναλύθηκαν είναι μικρός. Αντίθετα, οι μελέτες που αφορούν τον ειδοπροσδιορισμό ενώσεων Se εκτός πρωτεϊνών σε ορό ανθρώπινου αίματος φέρουν αμφισβητούμενα αποτελέσματα [205, 206]

Μια αρχική προσπάθεια ειδοπροσδιορισμού σεληνοπρωτεϊνών έγινε το 1983 όπου οι Akesson και Martensson [207] βασιζόμενοι στην ιδιότητα της σεληνοπρωτεΐνης P να αντιδρά ειδικά με την ηπαρίνη [208] προχώρησαν στο διαχωρισμό δυο κλασμάτων (συνδεόμενο ή μη συνδεόμενο με την ηπαρίνη) του ορού αίματος.

Στη συνέχεια ο Deagen και οι συνεργάτες του [209] στηριζόμενοι στη μελέτη των Akesson και Martensson [207] πέτυχαν το διαχωρισμό τριών κλασμάτων Se στον ορό χρησιμοποιώντας δύο στήλες χρωματογραφίας συγγένειας συνδεμένες σε σειρά (heparin-Sepharose και reactive blue 2-Sepharose). Επιπλέον, δήλωσαν ότι τα τρία αυτά κλάσματα περιείχαν υπεροξειδάση της

γλουταθειόνης (GPX), σεληνοπρωτεΐνη P (SelP) και αλβουμίνη, αντίστοιχα. Το περιεχόμενο Se σε κάθε ένα από αυτά τα κλάσματα προσδιορίστηκε κάνοντας αρχικά χώνευση των κλασμάτων με οξύ και στη συνέχεια χρησιμοποιώντας ημιαυτόματη φθορισμομετρική μέθοδο. Επιπροσθέτως, ο Harrison και οι συνεργάτες του [210] τροποποιώντας τη μέθοδο των Deagen και των συνεργατών του [209] πέτυχαν το διαχωρισμό ορού Se σε τρία πρωτεϊνικά κλάσματα χρησιμοποιώντας ηλεκτροθερμική φασματομετρία ατομικής απορρόφησης. Εντούτοις, οι συγκεκριμένες μέθοδοι ήταν χρονοβόρες και δεν επέτρεπαν τον προσδιορισμό διαφόρων ισοτόπων Se τα οποία είναι χρήσιμα για τη μελέτη του μεταβολισμού του Se.

Εναλλακτικά, χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι στηριζόμενες στη χρωματογραφία αποκλεισμού (size exclusion chromatography) καθώς και χρωματογραφία μοριακής διήθησης (gel filtration)[211,212]. Ωστόσο, οι συγκεκριμένες μέθοδοι χαρακτηρίστηκαν απο χαμηλή διαχωριστική ικανότητα εφόσον δεν ήταν εφικτός ο διαχωρισμός μεταξύ σεληνοπρωτεϊνών και πρωτεϊνών που περιέχουν Se με τη μορφή σεληνομεθειονίνης (Se-containing proteins). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν για προσδιορισμό είτε SelP είτε GPX σε ορό αίματος, ανοσολογικές τεχνικές βασιζόμενες σε τεχνική των αντισωμάτων [213,214] ή στην ενζυματική ανοσολογική τεχνική (ELISA) [215]. Ο προσδιορισμός Se έλαβε χώρα βασιζόμενος σε διάφορες τεχνικές προσδιορισμού όπως φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS) [212], ηλεκτροθερμική φασματομετρία ατομικής απορρόφησης [216], τεχνικές φθορισμού [217] και ραδιοανοσολογικές τεχνικές [218].

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός χρωματογραφίας αποκλεισμού με χρωματογραφία συγγένειας σε σειρά με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος προκειμένου για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών που περιέχουν Se στον ορό [219]. Η μέθοδος αυτή είναι κρίθηκε ως ιδιαίτερα χρονοβόρα μιας και απαιτεί την απομάκρυνση αλβουμίνης από τα δείγματα ορού καθώς και τον καθαρισμό της σεληνοπρωτεΐνης P. Επιπλέον ο παραπάνω συνδυασμός δεν οδηγεί σε ικανοποιητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών που περιέχουν Se στον ορό αίματος λόγω αλληλοεπικάλυψης των κορυφών σεληνοαλβουμίνης και υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης που παρατηρήθηκε [219].

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες η υγρή χρωματογραφία συγγένειας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος φαίνεται να είναι η πιο αποτελεσματική μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό σεληνοπρωτεϊνών και πρωτεϊνών που περιέχουν Se με τη μορφή σεληνομεθειονίνης (Se-containing proteins) [220-224]. Συγκεκριμένα ο Reyes και οι

συνεργάτες του [220] χρησιμοποίησαν υγρή χρωματογραφία συγγένειας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (dcAF-LC-ICP-MS) για την ανίχνευση των ειδών Se στον ορό αίματος ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με την τεχνική της ισοτοπικής αραίωσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι το ICP-MS που χρησιμοποιήθηκε ήταν εξοπλισμένο με κυψελίδα πρόσκρουσης ενώ για την ισοτοπική αραίωση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα με εμπλουτισμένο ισότοπο 77 του Se. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό Se σε κάθε είδος χρησιμοποιήθηκαν οι ισοτοπικές αναλογίες 78Se/77Se ή 80Se/77Se. Παρόλο που η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από ακρίβεια και αποτελεσματικό διαχωρισμό των ειδών Se εφαρμόστηκε σε πολύ μικρό αριθμό δειγμάτων (πέντε δείγματα υγιών και πέντε παθολογικών εθελοντών). Ακολούθως, ο Jitaru και οι συνεργάτες του [221] βελτίωσαν περαιτέρω τη μέθοδο των Reyes και των συνεργάτες του [220] προχωρώντας στον διαχωρισμό GPX, SelP και σεληνοαλβουμίνης (SeAlb) χρησιμοποιώντας συμβατικό ICP MS. Για το λόγο αυτό χρησιμοποίησαν στο σύστημα στηλών χρωματογραφίας συγγένειας επιπλέον στήλη ανιοανταλλαγής προκειμένου να απομακρυνθούν φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις που παρατηρούνται για το ισότοπο 77Se (40Ar37Cl)77 και 82Se (81Br1H) του Se. Επιπλέον, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ειδών Se χρησιμοποιήθηκε εκτός απο την ισοτοπική αραίωση [220-222], και καμπύλη εξωτερικής βαθμονόμησης [221]. Εντούτοις και αυτή η μέθοδος εφαρμόστηκε σε μικρό αριθμό δειγμάτων (τρεις υγιείς εθελοντές).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η εφαρμογή μίας τέτοιας μεθόδου σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων η οποία θα αποτελεί τη βάση μιας επιδημιολογικής μελέτης δεν έχει πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα. Για το σκοπό αυτό κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη και η εφαρμογή μιας μεθόδου «ρουτίνας» για τον εύκολο, γρήγορο ακριβή καθώς και αποτελεσματικό προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων σεληνοπρωτεϊνών και πρωτεϊνών που περιέχουν Se με τη μορφή σεληνομεθειονίνης στον ορό ανθρώπινου αίματος. Η έννοια της «εύκολης και γρήγορης» τεχνικής συνδέεται με την ανάγκη τα προς ανάλυση δείγματα να μην υποβάλλονται σε εκτενή επεξεργασία προκειμένου να αναλυθούν. Ο ακριβής προσδιορισμός ενώσεων Se συνδέεται με τη χρήση της φασματομετρίας μάζας λόγω της ανίχνευσης των πολλαπλών ισοτόπων του Se που επιτρέπει. Τέλος, η αποτελεσματικότητα μιας μεθόδου εκτός από αυτά που έχουν αναλυθεί προηγουμένως περιλαμβάνει και την εφαρμογή μιας αναλυτικής μεθόδου σε ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων ξεπερνώντας διάφορες δυσκολίες που μπορούν να προκύψουν κατά την ανάλυση.

Κεφάλαιο 2: Σκοπός της Μελέτης

Το Se αποτελεί απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τη ζωή ασκώντας τις δράσεις του ως απαραίτητο δομικό στοιχείο των σεληνοπρωτεϊνών (υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης, σεληνοπρωτεΐνη P, αναγωγάση της θειορεδοξίνης, αποϊωδιονάσες της ιωδοθυροξίνης κ.α.), οι οποίες με τη σειρά τους έχουν ενεργό ρόλο στους αντιοξειδωτικούς/αντιφλεγμονώδεις μηχανισμούς του οργανισμού, στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων και στο μεταβολισμό των θυρεοειδικών ορμονών. Συνεπώς, η επαρκής πρόσληψη σεληνίου με τη διατροφή είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη σωστή λειτουργία του οργανισμού. Ωστόσο, οι διατροφικοί παράγοντες που καθορίζουν τα επίπεδα Se στον ανθρώπινο οργανισμό δεν είναι πλήρως διευκρινισμένοι ενώ καμία μεγάλη επιδημιολογική μελέτη δεν έχει γίνει στον Ελληνικό πληθυσμό. Παράλληλα, αν και η αυξημένη πρόσληψη Se έχει σχετιστεί θετικά με τον κίνδυνο εμφάνισης συγκεκριμένων ειδών καρκίνου, η σχέση του με παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα είναι πολύ λιγότερο μελετημένη και τα αποτελέσματα αντικρουόμενα. Αυτό εν μέρει οφείλεται στις πλειοτροπικές και πολλές φορές αντίθετες δράσεις των σεληνοπρωτεϊνών στους μηχανισμούς εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η συσχέτιση συνεπώς των επιπέδων TSe με παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα δεν επαρκεί και είναι πλέον απαραίτητη η ανάπτυξη ισχυρών αναλυτικών μεθόδων, οι οποίες θα έχουν την ικανότητα να προσδιορίζουν ταυτόχρονα τις διάφορες σεληνομορφές στα βιολογικά δείγματα.

Στα πλαίσια αυτά, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν: α) η βελτιστοποίηση αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού TSe αλλά και η ανάπτυξη αναλυτικής τεχνικής ταυτόχρονου προσδιορισμού πρωτεϊνών Se (υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, σεληνοπρωτεΐνης P και σεληνοαλβουμίνης) σε ορό ανθρώπινου αίματος με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος, β) η εφαρμογή των ανωτέρων μεθόδων για μέτρηση TSe και πρωτεϊνών Se στο ορό αίματος ενός υποπληθυσμού της μελέτης ΑΤΤΙΚΗ, γ) η μελέτη των συσχετίσεων μεταξύ TSe/πρωτεϊνών Se με τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, τις διατροφικές συνήθειες των εθελοντών καθώς και με βιοχημικούς/κλινικούς παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα.

Κεφάλαιο 3^{ο} : Μέθοδοι & Υλικά

Ο προσδιορισμός επιπέδων ολικού Se καθώς και η ανίχνευση και ο προσδιορισμός ειδών Se στον ανθρώπινο ορό πραγματοποιήθηκαν με μεθόδους βασισμένες στη φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS). Οι βασικές αρχές που διέπουν τη φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος καθώς και η οργανολογία της παρουσιάζεται διεξοδικά στη συνέχεια. Επιπλέον, στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή, χρησιμοποιήθηκε Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σελήνιου και ισοτοπική αραίωση για τον ποσοτικό προσδιορισμό, τα οποία παρουσιάζονται στη συνέχεια.

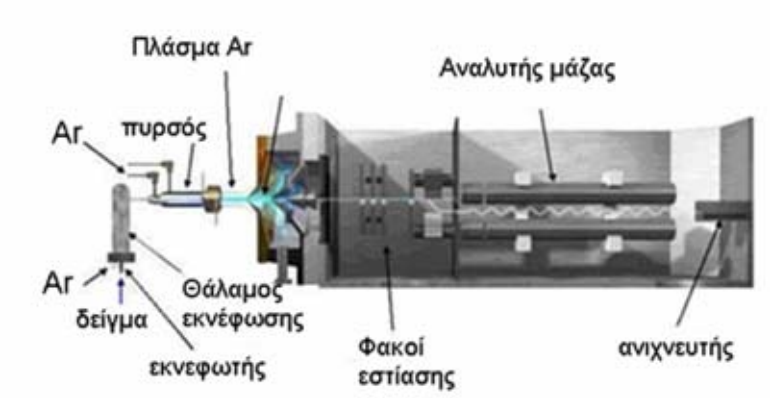
3.1 Φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS)

Οι συχνότερα εφαρμοζόμενες τεχνικές μέτρησης των επιπέδων του Se στον ορό είναι η φθορισμομετρία, η φασματομετρία ατομικής απορρόφησης και η φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS).

Η τεχνική ICP-MS αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές ανίχνευσης και προσδιορισμού στοιχείων καθώς παρέχει τη δυνατότητα πολυστοιχειακών αναλύσεων, με μεγάλη ευαισθησία, εκλεκτικότητα και ακρίβεια, σε μικρούς χρόνους ανάλυσης. Παράλληλα με τα χαμηλά όρια ανίχνευσης που επιτυγχάνονται, βασικό πλεονέκτημα της τεχνικής ICP-MS είναι και η μεγάλη γραμμική αναλυτική περιοχή. Επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση στοιχείων για ένα ευρύ πεδίο συγκεντρώσεων, κάνοντας εφικτό τον προσδιορισμό συστατικών του ίδιου δείγματος χωρίς αραίωση, με διαφορά συγκέντρωσης μέχρι και 8 τάξεων μεγέθους. Επιπλέον, είναι δυνατή η παρακολούθηση των ισοτόπων των στοιχείων [223]. Το επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα αποτελεί πηγή ιονισμού πολύ υψηλής θερμοκρασίας (5000-10000 K), η οποία μπορεί αποτελεσματικά να εξατμίσει το δείγμα, να ατομοποιήσει, να διεγείρει και να ιονίσει τα άτομα του αναλύτη. Οι μοριακές παρεμποδίσεις μειώνονται δραστικά, χωρίς βέβαια να εξαλείφονται πλήρως. Η πηγή ICP χρησιμοποιείται για τη διέγερση των ατόμων κατά τη φασματοσκοπία ατομικής εκπομπής (ICP-AES) και για τον ιονισμό των ατόμων κατά τη φασματομετρία μάζας (ICP-MS) [224].

3.1.1 Οργανολογία ICP-MS

Η οργανολογία που χρησιμοποιείται με την τεχνική ICP-MS αποτελείται από τρία βασικά μέρη, το σύστημα εισαγωγής του υγρού δείγματος, την πηγή ιόντων (πλάσμα Ar) και τον αναλυτή μάζας (Σχ.3.1).



Σχήμα 3.1 Σχηματική Αναπαράσταση του ICP-MS [225]

3.1.2 Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Τα δείγματα τα οποία εισάγονται στο ICP-MS βρίσκονται συνήθως υπό τη μορφή διαλυμάτων. Οι απαραίτητες διεργασίες οι οποίες λαμβάνουν χώρα είναι η μετατροπή του υγρού σε αερόλυμα και η επιλογή σταγόνων κατάλληλου μεγέθους ώστε να εισέλθουν στο πλάσμα. Κύρια τμήματα του συστήματος εισαγωγής δείγματος είναι ο εκνεφωτής και ο θάλαμος εκνέφωσης [225]. Το υγρό δείγμα μεταφέρεται στον εκνεφωτή, μέσω αντλίας όπου υπό την επίδραση ροής αερίου αργού (Ar) μετατρέπεται σε αερόλυμα. Το αερόλυμα, κατόπιν, οδηγείται στο θάλαμο εκνέφωσης όπου πραγματοποιείται η διαλογή των σταγόνων, με τις μεγαλύτερες και βαρύτερες να οδηγούνται στο δοχείο αποβλήτων και τις μικρότερες να κατευθύνονται προς το πλάσμα.

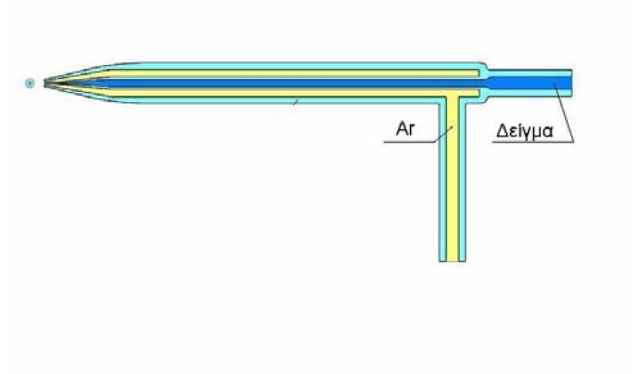
Βασική λειτουργία του θαλάμου εκνέφωσης είναι ο διαχωρισμός των σταγόνων. Επιτρέποντας μόνο σε σταγονίδια μικρού μεγέθους (διαμέτρου ~5–10 μm) να εισέρχονται στο πλάσμα και απομονώνοντας τις σταγόνες μεγάλου μεγέθους (διαμέτρου μεγαλύτερης από 10 μm), αποτρέπει τη δημιουργία παρεμποδίσεων λόγω αναποτελεσματικής αποσύνθεσής τους στο πλάσμα.

Είδη εκνεφωτών

Τα είδη εκνεφωτών που χρησιμοποιούνται στη διάταξη του ICP-MS είναι ο πνευματικός εκνεφωτής, ο θερμικός, ο υδραυλικός εκνεφωτής υψηλής πίεσης και ο εκνεφωτής υπερήχων. Στην παρούσα εργασία αναλυτικότερα περιγράφεται ο πνευματικός εκνεφωτής καθώς αποτελεί και το είδος εκείνο το οποίο χρησιμοποιείται συχνότερα κατά την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων και χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία.

Πνευματικός εκνεφωτής

Ο πνευματικός εκνεφωτής εκμεταλλεύεται τις μηχανικές δυνάμεις που προκαλεί το αέριο Ar στο υδατικό δείγμα για τη δημιουργία του αερολύματος. Το υλικό κατασκευής του εκνεφωτή είναι στις περισσότερες περιπτώσεις γυαλί, ενώ μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν διάφορα είδη πολυμερών υλικών. Ανάλογα με τη γεωμετρία της αλληλεπίδρασης υγρού – αερίου διακρίνονται δύο είδη πνευματικών εκνεφωτών, ο ομόκεντρος (pneumatic concentric nebulizer) στον οποίο η αλληλεπίδραση υγρού-αερίου λαμβάνει χώρα ομόκεντρα (Σχ. 3.2), και ο εκνεφωτής διασταυρούμενης ροής (cross-flow nebulizer), στον οποίο η αλληλεπίδραση υγρού-αερίου πραγματοποιείται κάθετα.

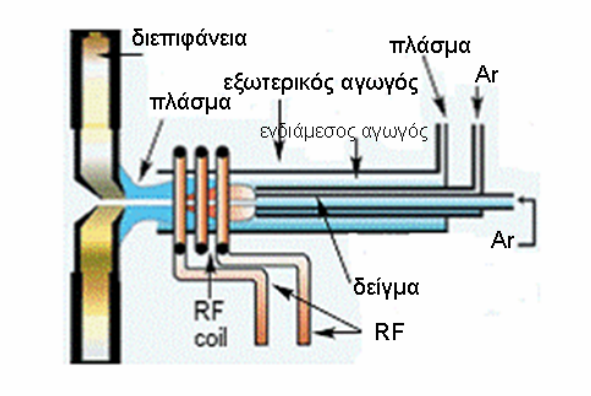


Σχήμα 3.2. Αναπαράσταση ομόκεντρου πνευματικού εκνεφωτή [226].

Στον ομόκεντρο πνευματικό εκνεφωτή, το δείγμα εισάγεται μέσω τριχοειδούς σωλήνα σε μια περιοχή χαμηλής πίεσης που δημιουργείται με την παροχή μιας ταχείας ροής αερίου Ar. Ο συνδυασμός της χαμηλής πίεσης με τη μεγάλη ταχύτητα του αερίου, έχουν ως αποτέλεσμα τη μετατροπή του δείγματος σε αερόλυμα. Το συγκεκριμένο είδος εκνεφωτή παρέχει ιδιαίτερα υψηλή ευαισθησία και σταθερότητα, ωστόσο δεν εκλείπουν προβλήματα φραγμού του στομίου του εκνεφωτή κατά την ανάλυση δειγμάτων πολύπλοκης μήτρας.

3.1.3 Πηγή ιόντων

Η πηγή ιόντων του ICP-MS αποτελείται βασικά από το πλάσμα Ar για τη δημιουργία του οποίου απαιτείται ένας πυρσός (torch), ένα σπείραμα ραδιοσυχνοτήτων (RF coil) και μια γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων (RF power)[227]. (Σχ. 3.3).



Σχήμα 3.3. Σχηματική αναπαράσταση της πηγής ιόντων του ICP-MS [227].

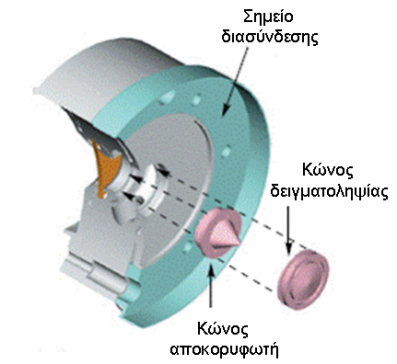
Ο πυρσός του πλάσματος αποτελείται από τρεις ομόκεντρους αγωγούς, τον κεντρικό (injector tube), τον ενδιάμεσο (middle tube) και τον εξωτερικό αγωγό (outer tube), κατασκευασμένους συνήθως από χαλαζία. Μεταξύ του εξωτερικού και του ενδιάμεσου σωλήνα διέρχεται αέριο Ar (plasma gas) με ροή 12-17 L/min το οποίο αποσκοπεί στη διατήρηση και σταθεροποίηση του πλάσματος. Επιπλέον, προστατεύει τον εξωτερικό σωλήνα από την υψηλή θερμοκρασία που αναπτύσσεται στο πλάσμα. Μια δεύτερη ροή Ar (auxiliary gas), διέρχεται μεταξύ του ενδιάμεσου και του κεντρικού σωλήνα με ροή 1 L/min και έχει ως στόχο να κατευθύνει το πλάσμα μέσα στον πυρσό. Επίσης και αυτή η ροή Ar δρα προστατευτικά προς τον κεντρικό σωλήνα εμποδίζοντας την υπερθέρμανσή του από τις υψηλές θερμοκρασίες του πλάσματος. Τέλος, μια τρίτη ροή Ar (nebulizer gas), η οποία διέρχεται από τον εκνεφωτή, με ρυθμό περίπου 1 L/min μεταφέρει το

δείγμα με τη μορφή σταγόνων και συμβάλλει στην εισαγωγή του στο κεντρικό τμήμα του πλάσματος [228]. Ο πυρσός του πλάσματος είναι τοποθετημένος οριζόντια στο κέντρο ενός υδρόψυκτου σπειράματος (RF coil) το οποίο συνδέεται με μια γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων (ισχύος 1-5 kW και συχνότητας 27 MHz). Υπό την επίδραση της γεννήτριας, το σπείραμα τροφοδοτείται με εναλλασσόμενο ρεύμα το οποίο δημιουργεί ισχυρό ηλεκτρομαγνητικό πεδίο στα άκρα του πυρσού. Αρχικά μια στιγμιαία ηλεκτρική εκκένωση Tesla προκαλεί έναν αρχικό ιοντισμό του Ar ακολουθούμενη από απομάκρυνση ηλεκτρονίων από τα άτομα του Ar και συνεπώς ο ιοντισμός του Ar. Εν συνεχεία, τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται μέσα στο μαγνητικό πεδίο και συγκρούονται με άλλα άτομα Ar, προκαλώντας επιπλέον απομάκρυνση ηλεκτρονίων. Ο επαγώμενος ιονισμός του Ar εξακολουθεί προκαλώντας πλάσμα υψηλής θερμοκρασίας ωμικής τριβής από την κίνηση των φορτισμένων σωματιδίων. Η μεταφορά ενέργειας μέσω αυτής της διαδικασίας αποκαλείται επαγώγική σύζευξη.

Το αερόλυμα του δείγματος εισέρχεται, κινούμενο με μεγάλη ταχύτητα, από τον κεντρικό αγωγό του πυρσού στο πλάσμα, δημιουργώντας μια οπή στο κέντρο του πλάσματος. Κατόπιν, η υγρή σταγόνα του δείγματος εξατμίζεται αφήνοντας ένα μικρό στερεό υπόλειμμα. Καθώς το στερεό σωματίδιο κινείται μέσα στο πλάσμα, περιέρχεται σε αέρια μορφή και τελικά ατομοποιείται. Η τελική διαδικασία μετατροπής του ατόμου σε ιόν επιτυγχάνεται κυρίως μέσω των συγκρούσεων των ουδέτερων ατόμων του στοιχείου με τα ελεύθερα ηλεκτρόνια καθώς και με τα κατιόντα Ar. Τα ιόντα που προκύπτουν με την διαδικασία που περιγράφηκε, εξέρχονται από το πλάσμα κατευθυνόμενα προς τον αναλυτή μάζας διερχόμενα από τα σημεία διασύνδεσης του πλάσματος με τον αναλυτή μάζας [228].

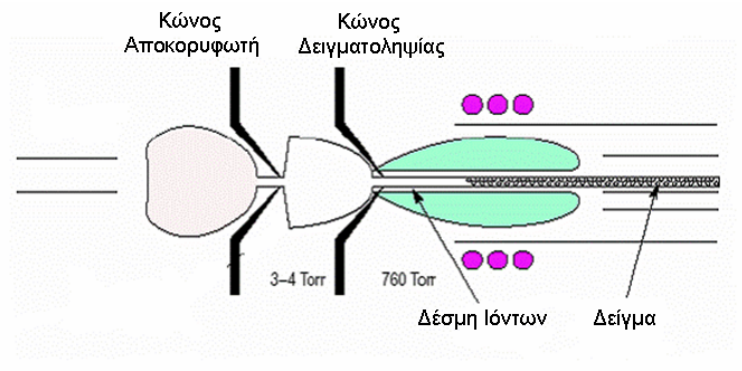
3.1.4 Σημεία διασύνδεσης

Η μεταφορά των ιόντων από τον πυρσό του πλάσματος προς τον αναλυτή μαζών πραγματοποιείται μέσω των διεπιφανειών που παρεμβάλλονται μεταξύ των δύο τμημάτων του ICP-MS. Ο ρόλος, συνεπώς, των σημείων διασύνδεσης είναι να εξασφαλίζουν την αποτελεσματική, συνεχή παροχή ιόντων από το πλάσμα, το οποίο λειτουργεί σε ατμοσφαιρική πίεση, προς το φασματόμετρο μάζας που βρίσκεται σε πίεση (26,47) 10^{-6} Torr [229].



Σχήμα 3.4. Σχηματική αναπαράσταση του κώνου δειγματοληψίας και του αποκορυφωτή στο σημείο διασύνδεσης του πλάσματος με το φασματόμετρο μάζας [228].

Η επιφάνεια αυτή αποτελείται από δύο μεταλλικούς κώνους από νικέλιο, οι οποίοι διατηρούνται σε πίεση περίπου 2 Torr με μια μηχανική αντλία. Ο πρώτος κώνος, ο κώνος δειγματοληψίας (sampler cone) έχει στόμιο διαμέτρου 0,8 - 1,2 mm ενώ ο δεύτερος κώνος, ο οποίος ονομάζεται αποκορυφωτής (skimmer cone) έχει στόμιο διαμέτρου 0,4 - 0,8 mm (Σχ.3.4) [228].Τα ιόντα που δημιουργούνται στο πλάσμα, διέρχονται από τον κώνο δειγματοληψίας και επιταχύνονται αποκτώντας ταχύτητα μεγαλύτερη από του ήχου, οπότε δημιουργείται ένα κρουστικό κύμα του οποίου το εσωτερικό ονομάζεται ‘ζώνη σιγής’. Τα ιόντα που βρίσκεται στο εσωτερικό αυτής της περιοχής, διέρχονται από τον αποκορυφωτή και εξερχόμενα κατευθύνονται προς τους φακούς εστίασης ώστε να εισέλθουν τελικά ως εστιασμένη δέσμη ιόντων στο φασματόμετρο μάζας (Σχ.3.5). Προκειμένου να μειωθούν οι επιδράσεις της υψηλής θερμοκρασίας του πλάσματος στους κώνους, η περιοχή όπου βρίσκονται τα σημεία σύνδεσης είναι υδρόψυκτη και κατασκευασμένη συνήθως από χαλκό ή αργίλιο.



Σχήμα 3.5. Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής διασύνδεσης του πυρσού με το φασματόμετρο μάζας [228].

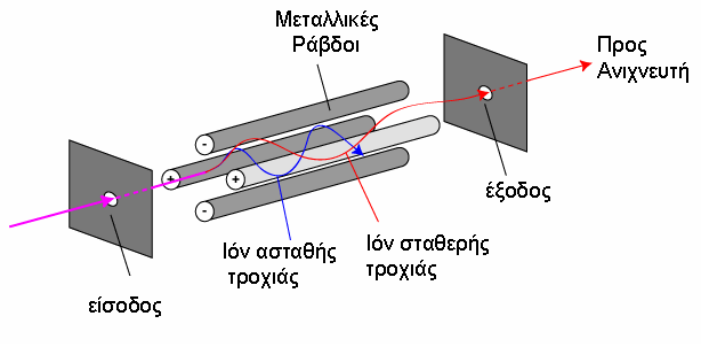
3.1.5 Φακοί εστίασης

Οι φακοί εστίασης βρίσκονται τοποθετημένοι αμέσως μετά από τον αποκορυφωτή και πριν από τον αναλυτή μάζας. Αποτελούνται από σειρά ηλεκτρικών φακών (σε μορφή μεταλλικών δίσκων, πλακιδίων ή κυλίνδρων) στους οποίους εφαρμόζονται κατάλληλα δυναμικά. Μέσω της συγκεκριμένης περιοχής, τα ιόντα εστιάζονται και μεταφέρονται από τα σημεία διασύνδεσης στον αναλυτή μάζας [224,229].

Ο ρόλος των φακών εστίασης είναι να μεταφέρουν το μέγιστο δυνατό αριθμό ιόντων του αναλύτη, από την περιοχή σύζευξης στο φασματόμετρο μάζας, αποπροσανατολίζοντας ταυτόχρονα τα συστατικά της μήτρας του δείγματος τα οποία ευρισκόμενα σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τον αναλύτη δύνανται να επιφέρουν μεγάλες παρεμποδίσεις κατά τον προσδιορισμό του. Επιπρόσθετα, με την παρεμβολή του συστήματος των φακών εστίασης, αποτρέπεται η είσοδος στο φασματόμετρο μάζας ουδέτερων ειδών, σωματιδίων και φωτονίων, η ύπαρξη των οποίων επηρεάζει τη σταθερότητα του σήματος και την απόδοση του συστήματος.

3.1.6 Αναλυτής μάζας

Ο αναλυτής μάζας βρίσκεται μεταξύ των φακών εστίασης και του ανιχνευτή. Καθώς τα ιόντα εξέρχονται από το σύστημα φακών, εισέρχονται στον αναλυτή μάζας προκειμένου να διαχωριστούν ανάλογα με την τιμή του λόγου m/z [224,229]. Ο συχνότερα χρησιμοποιούμενος αναλυτής μάζας για την τεχνική ICP-MS, είναι ο τετραπολικός. Αποτελείται από τέσσερις παράλληλες μεταλλικές ράβδους, ίσου μήκους και διαμέτρου, οι οποίες διαγωνίως συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Κάθε ζεύγος ράβδων συνδέεται με πόλο πηγής, που περιέχει μια συνεχή και μια εναλλασσόμενη τάση (Σχ.3.6).



Σχήμα 3.6. Σχηματική αναπαράσταση τετραπολικού αναλυτή μάζας [228].

Στις δύο αντίθετες ράβδους εφαρμόζεται δυναμικό +(U+Vcos(ωt)) ενώ στις δύο άλλες -(U+Vcos(ωt)), όπου U είναι η συνεχής τάση και ο παράγοντας Vcos(ωt) αναπαριστά ένα πεδίο ραδιοσυχνοτήτων με πλάτος V και συχνότητα ω. Ανάλογα με το ηλεκτρικό πεδίο το οποίο παράγεται, ιόντα με συγκεκριμένη τιμή m/z θα φτάσουν στον ανιχνευτή, ενώ τα υπόλοιπα θα προσκρούσουν στις ράβδους και θα εξέλθουν από το τετράπολο. Κατά συνέπεια, μεταβάλλοντας την ένταση και τη συχνότητα του ηλεκτρικού πεδίου, αλλάζει και το είδος του ιόντος το οποίο φτάνει στον ανιχνευτή [224,228,229]. Κατά μήκος του κεντρικού άξονα του τετραπόλου η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου είναι μηδενική, ενώ στην κατακόρυφη διεύθυνση ένα ιόν ταλαντώνεται μεταξύ των πόλων, ακολουθώντας τροχιά εξαρτώμενη από την τιμή του m/z, τη συχνότητα και τα δυναμικά U και V. Επομένως, με κατάλληλη επιλογή τιμών των παραμέτρων αυτών, μόνο ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z ταλαντώνονται σταθερά και φτάνουν από τον αναλυτή μάζας στον ανιχνευτή. Όλα τα υπόλοιπα ιόντα παρουσιάζουν μεγαλύτερο πλάτος ταλάντωσης με αποτέλεσμα την πρόσκρουσή τους στις ράβδους του τετραπόλου.

3.1.7 Ανιχνευτής

Ο συνηθέστερος τύπος ανιχνευτή στη φασματομετρία μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος είναι ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (electron multiplier), ο οποίος αποτελείται από σειρά δυνόδων αυξανόμενων δυναμικών. Καθώς το ιόν προσπίπτει σε μια δύνοδο, αφού πρώτα επιταχυνθεί, προκαλεί την εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων, τα οποία προσπίπτουν στη δεύτερη δύνοδο κ.ο.κ, προκαλώντας διαδοχικά την εκπομπή περισσότερων ηλεκτρονίων. Η τυπική ενίσχυση του ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή είναι 1 εκατομμύριο, δηλαδή με την πρόσκρουση ενός ηλεκτρονίου στην πρώτη δύνοδο παράγονται περίπου 10^6 ηλεκτρόνια στην έξοδο του ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή [228].

3.1.8 Παρεμποδίσεις

Οι παρεμποδίσεις στη φασματομετρία επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις φασματοσκοπικές και τις μη φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις.

3.1.8.1 Φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις

Φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις προκύπτουν από την παρουσία στο πλάσμα ενός ιόντος που έχει τον ίδιο λόγο m/z με το ιόν του αναλύτη. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει παρεμποδίσεις από ισοβαρικά ιόντα, πολυατομικά και διπλοφορτισμένα ιόντα καθώς και παρεμποδίσεις από ιόντα οξειδίων [224,228].

▪ Οι ισοβαρικές παρεμποδίσεις προκύπτουν από ισότοπα στοιχείων που παρουσιάζουν τον ίδιο λόγο m/z με αυτόν του αναλύτη. Συνήθως, αυτό το είδος παρεμπόδισης παρουσιάζεται στα ισότοπα μεγαλύτερης φυσικής αφθονίας κάποιου στοιχείου. Χαρακτηριστική περίπτωση ισοβαρικής παρεμπόδισης αποτελεί η επικάλυψη της κορυφής του $^{40}Ca^+$, που είναι το ισότοπο του ασβεστίου με τη μεγαλύτερη φυσική αφθονία (97%), από την κορυφή του $^{40}Ar^+$. Οι παρεμποδίσεις αυτής της κατηγορίας είναι δυνατό να προβλεφθούν και να διορθωθούν με χρήση κατάλληλου λογισμικού προγράμματος και μαθηματικών διορθωτικών εξισώσεων, καθώς πληροφορίες για τις ισοτοπικές επικαλύψεις παρέχονται από πίνακες φυσικής αφθονίας των ισοτόπων.

▪ Οι παρεμποδίσεις πολυατομικών ιόντων προκύπτουν κατά το συνδυασμό δύο ή περισσότερων ατομικών ιόντων. Πολυατομικά σωματίδια σχηματίζονται από αλληλεπιδράσεις

μεταξύ σωματιδίων του πλάσματος και σωματιδίων της μήτρας του δείγματος ή της ατμόσφαιρας ή ακόμα και με αλληλεπιδράσεις του χρησιμοποιούμενου αερίου με σωματίδια του υλικού κατασκευής τμημάτων του οργάνου (π.χ. υλικό κατασκευής του αποκορυφωτή). Τα σχηματιζόμενα πολυατομικά ιόντα παρεμποδίζουν την ανίχνευση του προς ανάλυση ιόντος. Οι συνηθέστερες παρεμποδίσεις αυτής της κατηγορίας προκαλούνται από τα σωματίδια $^{40}Ar^{+2}$, $^{40}ArH^{+}$,$H_2{}^{16}O_2{}^{+}$, $^{16}OH^{+}$. Ορισμένες από τις παρεμποδίσεις αυτές μπορούν να διορθωθούν με μέτρηση τυφλού διαλύματος. Σε άλλες περιπτώσεις ωστόσο, επιλέγεται διαφορετικό ισότοπο του αναλύτη.

▪ Οι παρεμποδίσεις από οξείδια και υδροξείδια αποτελούν και τη σοβαρότερη κατηγορία φασματοσκοπικών παρεμποδίσεων στην τεχνική ICP-MS. Οφείλονται στα οξείδια και υδροξείδια που σχηματίζονται από τον ίδιο τον αναλύτη, από τα συστατικά της μήτρας, από το διαλύτη και τα αέρια του πλάσματος. Ως αποτέλεσμα οι κορυφές των σωματιδίων αυτών επικαλύπτουν τις κορυφές ενός από τα ιόντα του αναλύτη. Επιπλέον, στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι παρεμποδίσεις που προέρχονται από διπλά φορτισμένα ιόντα. Αυτό το είδος ιόντων παρουσιάζει κορυφή σε τιμή m/z, μισή της κανονικής τιμής, επικαλύπτοντας την κορυφή του στοιχείου εκείνου που χαρακτηρίζεται επίσης από m/z ίδιας τιμής. Οι παρεμποδίσεις αυτής της κατηγορίας είναι δυνατό να αντιμετωπιστούν με ρύθμιση ορισμένων πειραματικών μεταβλητών που επηρεάζουν το σχηματισμό των οξειδίων, όπως είναι η σύσταση των αερίων του πλάσματος, το ποσοστό και το είδος του απομακρυνόμενου διαλύτη, το μέγεθος του στομίου εισαγωγής δείγματος, ο τρόπος εισαγωγής δείγματος, το σύστημα φακών εστίασης κ.α.

3.1.8.2 Μη φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις

Οι παρεμποδίσεις αυτής της κατηγορίας προκαλούνται κυρίως από υψηλές συγκεντρώσεις των συστατικών της μήτρας του δείγματος. Υπό την επίδραση αυτών, το σήμα του αναλύτη μειώνεται αν και υπό ορισμένες πειραματικές συνθήκες μπορεί να παρατηρηθεί και ενίσχυση του σήματος [224,228]. Οι επιδράσεις των συστατικών της μήτρας είναι δυνατό να αντιμετωπιστούν με αραίωση των διαλυμάτων, με αλλαγή της πορείας εισαγωγής του δείγματος ή με απομάκρυνση των συστατικών της μήτρας που προκαλούν παρεμπόδιση. Επιπλέον, είναι δυνατό να εξουδετερωθούν με χρήση κατάλληλου εσωτερικού προτύπου. Ένα στοιχείο κρίνεται ως κατάλληλο εσωτερικό πρότυπο όταν δεν αποτελεί συστατικό του δείγματος, χαρακτηρίζεται από μάζα και δυναμικό ιονισμού παρόμοια με του αναλύτη και όταν σπανίως εντοπίζεται σε πραγματικά δείγματα.

Εσωτερικά πρότυπα που χρησιμοποιούνται συχνά είναι τα ^{115}In, ^{103}Rh, ^{45}Sc, ^{9}Be και ^{232}Th [228,229].

Τέλος, η ανάλυση σεληνίου σε βιολογικά δείγματα με ICP-MS παρουσιάζει παρεμποδίσεις οι οποίες συνοψίζονται στον Πίνακα 4.1. Σύμφωνα με τον Πίνακα 4.1 οι παρεμποδίσεις αυτές μπορεί να είναι ισοβαρικές, παρεμποδίσεις πολυατομικών ιόντων καθώς και παρεμποδίσεις που προκαλούνται από υψηλές συγκεντρώσεις των συστατικών της μήτρας ενός δείγματος.

Πίνακας 3.1. Φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις κατά την ανάλυση Se σε βιολογικά δείγματα με ICP-MS.

Ισότοπο Σεληνίου	**Παρεμπόδιση**
74	$^{38}Ar^{36}Ar^{+}$, Cl_2^{+}, $^{38}ArS^{+}$
76	$^{40}Ar^{36}Ar^{+}$, $^{40}Ar^{36}S^{+}$, $^{31}P_2\,^{14}N^{+}$
77	$^{40}Ar^{36}ArH^{+}$, $^{38}Ar_2H^{+}$, $^{40}Ar^{37}Cl$
78	$^{40}Ar^{38}Ar^{+}$, $^{31}P_2{}^{16}O^{+}$
80	$^{40}Ar_2^{+}$, $^{79}BrH^{+}$
82	$^{40}Ar_2H_2^{+}$, $^{12}C^{35}Cl_2^{+}$, $^{81}BrH^{+}$, $^{34}S^{16}O_3^{+}$

Επίσης για το Se έχουν παρατηρηθεί και μη φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις από την ύπαρξη σημαντικών ποσοτήτων οργανικών συστατικών στο υπό εξέταση δείγμα. Αυτό οφείλεται στη μεταβολή της απόδοσης ιονισμού του. Συνήθως μικρές ποσότητες άνθρακα αυξάνουν τον ιονισμό του.

3.2. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Perfomance Liquid Chromatogaphy)

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σεληνίου χρησιμοποιήθηκε Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης η οποία περιλαμβάνει :

Σύστημα παροχής κινητής φάσης. Περιλαμβάνει αντλία βαθμιδωτής έκλουσης κινητής φάσης με ταχύτητα ροής 1mL/min (Shimadzu LC-20AD, Shimadzu corporation, Kyoto, Japan)

Σύστημα εισαγωγής δείγματος. Ο απαιτούμενος όγκος δείγματος εισέρχεται με μικροσύριγγα, στη βαλβίδα εισαγωγής με βρόγχο δείγματος 100μL.

Στήλες διαχωρισμού. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν στήλες χρωματογραφίας συγγένειας (affinity chromatography) και χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (size exclusion chromatography).

Χρωματογραφία Συγγένειας (Affinity chromatography)

Η χρωματογραφία συγγένειας αποτελεί την πιο εκλεπτυσμένη και αποτελεσματική χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού και καθαρισμού πρωτεϊνών [229]. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής βασίζεται στη βιολογική συγγένεια, η οποία στα ένζυμα εκφράζεται με την ικανότητά τους να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν με εκλεκτικό και αντιστρέψιμο τρόπο συγκεκριμένα μόρια-δεσμευτές (ligand). Αν κάποιος δεσμευτής, π.χ. ενζυμικό υπόστρωμα, αναστολέας, συνένζυμο, αντίσωμα, μέταλλο κ.α., δεσμευθεί χημικά (ακινητοποιηθεί) σε κατάλληλο πολυμερές στερεό υλικό, το οποίο αποκαλείται φορέας, τότε λαμβάνεται ο λεγόμενος προσροφητής συγγένειας (affinity adsorbent). Σε ορισμένες περιπτώσεις, δεσμευτής και φορέας γεφυρώνονται χημικά από μόριο το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ τους και ονομάζεται βραχίονας (spacer). Όταν ένα βιολογικό δείγμα που περιέχει μίγμα μακρομορίων περάσει από τη χρωματογραφική στήλη που φέρει τον προσροφητή τότε, τυπικά, μόνο το μακρομόριο που παρουσιάζει συγγένεια με το δεσμευτή θα συγκρατηθεί (προσροφηθεί) στη στήλη, ενώ όλα τα άλλα μόρια θα απομακρυνθούν κατά το επόμενο στάδιο, της έκπλυσης. Ακολούθως, το προσροφημένο μακρομόριο εκλούεται υπό συνθήκες που εξασθενούν τις δυνάμεις μοριακής αναγνώρισης με το δεσμευτή, με αποτέλεσμα την παραλαβή του μακρομορίου.

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι χρωματογραφίες στήλες Heparin Sepharose (Hep-HP) και Blue Sepharose (Blue-HP) (Εικ.4.2.1), μήκους 5cm και εσωτερικής διαμέτρου 4.6 mm i.d. Το υλικό πλήρωσης που χρησιμοποιήθηκε υπήρχε σε μικροστήλες εκχύλισης στερεάς φάσης (HitrapTM Heparin cartridge and HiTrapTM Blue cartridge) της εταιρίας GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Πιο συγκεκριμένα, στη στήλη Heparin Sepharose (Hep-HP) το μόριο δεσμευτής είναι η ηπαρίνη, η οποία δεσμεύει τη σεληνοπρωτεΐνη P. Αντίστοιχα, στη στήλη Blue Sepharose (Blue-HP) το μόριο δεσμευτής είναι το Cibacron™ Blue F3G-A το οποίο δεσμεύει την αλβουμίνη μέσω ισχυρών ηλεκτροστατικών ή/και υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων.

Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (size exclusion chromatography) η οποία ονομάζεται και χρωματογραφία διήθησης με πηκτή (gel filtration chromatography)[229] είναι μια πανίσχυρη τεχνική ιδιαίτερα εφαρμόσιμη σε ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους. Τα υλικά πλήρωσης για τη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών αποτελούνται από μικρά (≈ 10μm) σωματίδια πυριτίας ή πολυμερούς που περιέχουν ένα δίκτυο ομοιόμορφων πόρων, μέσα απο τους οποίους μπορούν να διαχέονται τα μόρια του διαλύτη και των διαλυμένων σωματιδίων. Όσο βρίσκονται στους πόρους, τα μόρια είναι πρακτικά παγιδευμένα και απομακρύνονται με το ρεύμα ροής της κινητής φάσης. Ο μέσος χρόνος παραμονής στους πόρους εξαρτάται από το πραγματικό μέγεθος των μορίων του αναλύτη. Μόρια, τα οποία είναι μεγαλύτερα απο το μέσο μέγεθος των πόρων του υλικού πλήρωσης, αποβάλλονται και δεν υφίστανται καμία κατακράτηση. Τα μόρια αυτά εκλύονται πρώτα από τη στήλη. Μόρια με διάμετρο σημαντικά μικρότερη από τους πόρους μπορούν να διεισδύσουν ή να διαπεράσουν στο λαβυρινθώδες περιβάλλον τους και έτσι παγιδεύονται για μεγαλύτερο χρόνο. Τα μόρια αυτά εκλύονται τελευταία από τη στήλη. Μεταξύ αυτών των δύο περιπτώσεων υπάρχουν μόρια ενδιάμεσου μεγέθους των οποίων ο μέσος όρος διείσδυσης στους πόρους του υλικού πλήρωσης της στήλης εξαρτάται από τη διάμετρό τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι στη τεχνική διαχωρισμού αποκλεισμού μεγέθους δεν υπάρχει καμία αλληλεπίδραση μεταξύ αναλύτη και στατικής φάσης. Αντίθετα, καταβάλλεται κάθε προσπάθεια αποφυγής τέτοιων αλληλεπιδράσεων, επειδή οδηγούν σε μείωση των αποδόσεων.

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφική στήλη Shodex Asahipak GS-520 HQ (300 x 7.6 mm). Το πληρωτικό υλικό της στήλης ήταν πολυβινυλοαλκοόλη (polyvinyl alcohol) με μέγεθος σωματιδίων 7 μm. Επιπλέον το όριο αποκλεισμού μοριακού βάρους ήταν $3x10^5$.

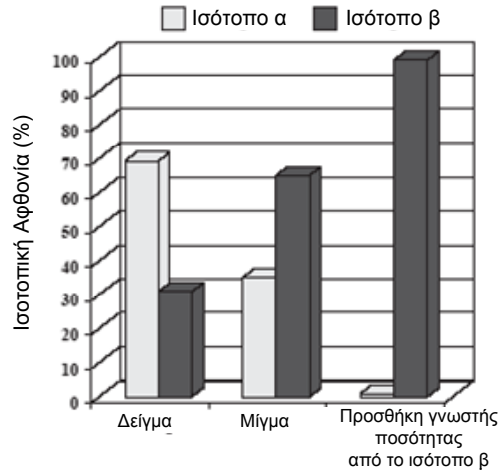
3.3. Ισοτοπική Αραίωση (Isotope Dilution Analaysis)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ειδών σεληνίου στον ορό αίματος βασίστηκε στην μέθοδο της ισοτοπικής αραίωσης. Η μέθοδος της ισοτοπικής αραίωσης για ολικό ποσοτικό προσδιορισμό επιπέδων ενός στοιχείου έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως [230-235]. Εντούτοις, περιορισμένος αριθμός των δημοσιεύσεων αναφέρεται στη μέθοδο αυτή για ποσοτικό προσδιορισμό των ειδών ενός στοιχείου μετά από το χρωματογραφικό διαχωρισμό τους [220,221].

Μια από τις δυσκολίες του ποσοτικού ειδοπροσδιορισμού σεληνίου είναι ότι δεν υπάρχουν πρότυπα δείγματα πρωτεϊνών σεληνίου με γνωστή συγκέντρωση σεληνίου. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε η μέθοδος της ισοτοπικής αραίωσης η οποία δίνει τη δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των ειδών σεληνίου χωρίς τη χρησιμοποίηση πρότυπων πρωτεϊνών σεληνίου.

Αρχή της Ισοτοπικής Αραίωσης

Η ισοτοπική αραίωση βασίζεται στην αλλαγή της ισοτοπικής αφθονίας ενός στοιχείου σε ένα δείγμα με την προσθήκη γνωστής ποσότητας ενός εμπλουτισμένου ισοτόπου του ίδιου στοιχείου στο δείγμα (spike). Αυτό προϋποθέτει ότι το προς ανάλυση στοιχείο θα πρέπει να έχει τουλάχιστον δύο σταθερά ισότοπα ικανά να ανιχνευτούν με φασματομετρία μάζας χωρίς τον κίνδυνο παρεμποδίσεων (φασματοσκοπικές). Η αρχή αυτή απεικονίζεται στο σχήμα 3.7 [231]. Σύμφωνα, με το σχήμα 3.7 σε ένα δείγμα ένα στοιχείο έχει δύο σταθερά ισότοπα a και b. Το ισότοπο a βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία σε σχέση με το ισότοπο b δείγμα. Μετά την προσθήκη γνωστής ποσότητας από το ισότοπο b (spike) η αρχική ισοτοπική κατανομή του δείγματος αλλάζει (mixture). Οι σχέσεις μεταξύ δείγματος-προσθήκη γνωστής ποσότητας περιγράφονται με τη βοήθεια μαθηματικών εξισώσεων [231].



Σχήμα 3.7. Σχηματική απεικόνιση ισοτοπικής αραίωσης [231]

Μαθηματικές εξισώσεις που χρησιμοποιούνται στην Ισοτοπική Αραίωση.

Στην εξίσωση 1 το N_S παριστάνει τον αριθμό των ατόμων σε ένα δείγμα, αντίστοιχα το N_{SP} παριστάνει τον αριθμό των ατόμων της ποσότητας που προστίθεται στο δείγμα ενώ το N_M παριστάνει τον αριθμό των ατόμων του μίγματος. Επιπλέον αν ληφθεί υπόψιν ότι το υπό μελέτη στοιχείο έχει δύο σταθερά ισότοπα a,b τότε η εξίσωση 1 μορφοποιείται προς τις εξισώσεις 2 και 3 [231].

$$N_M = N_S + N_{SP} \textbf{ (1)}$$

$$N_M^a = N_S^a + N_{SP}^a \textbf{ (2)}$$

$$N_M^b = N_S^b + N_{SP}^b \textbf{ (3)}$$

Διαιρώντας τις εξισώσεις (2) και (3) προκύπτει η εξίσωση (4) η οποία εκφράζει την ισοτοπική κατανομή του μίγματος (R_M). Όπου $N_S^\alpha = N_S A_S^a$, $N_S^b = N_S A_S^b$, $N_{SP}^\alpha = N_{SP} A_{SP}^a$, $N_{SP}^b = N_{SP} A_{SP}^b$ [231].

$$R_M = \frac{N_M^a}{N_M^b} = \frac{N_S^a + N_{SP}^a}{N_S^b + N_{SP}^b} = \frac{NA_S^a + NA_{SP}^a}{NA_S^b + NA_{SP}^b} \textbf{ (4)}$$

Αν λύσουμε την εξίσωση (4) ως προς N_S προκύπτει η εξίσωση (5). Η εξίσωση 5 αποτελεί και την πιο βασική εξίσωση της ισοτοπικής αραίωσης. Από την εξίσωση αυτή προκύπτει ότι μπορεί να υπολογιστεί η ισοτοπική κατανομή του μίγματος εφόσον είναι γνωστός ο αριθμός των μορίων τόσο του δείγματος των δύο ισοτόπων όσο και ο αριθμός των μορίων της ποσότητας που προστίθεται. Επιπλέον η σχέση αυτή μπορεί να εκφραστεί χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις αντί τον αριθμό των μορίων. Έτσι, λαμβάνοντας υπόψιν την ισοτοπική κατανομή (b/a) στο δείγμα εκφρασμένης ως προς $R_S = A_S^b / A_S^a$,καθώς και την ισοτοπική κατανομή (a/b) στη ποσότητα που προστίθεται εκφρασμένης ως $R_{SP} = A_{SP}^a / A_{SP}^b$ προκύπτει η εξίσωση 6. Στην εξίσωση 6 αν χρησιμοποιηθούν $N_S = (c_S m_s)/(M_S)$, $N_{SP} = (c_{SP} m_{SP})/(M_{SP})$ προκύπτει η εξίσωση 7. Όπου C_S, C_{SP} οι συγκεντρώσεις του στοιχείου στο δείγμα και στην ποσότητα που προστίθεται, m_S, m_{SP} οι μάζες του δείγματος και της ποσότητας που προστίθεται στο μίγμα και M_S, M_{SP} τα ατομικά βάρη του στοιχείου στο δείγμα και στην ποσότητα που προστίθεται [231].

$$N_S = N_{SP} \frac{R_M A_{SP}^b + A_{SP}^a}{A_S^a + R_M A_S^b} \textbf{ (5)}$$

$$\mathrm{N}_S = N_{SP} \frac{A_{SP}^b}{A_S^a} \left(\frac{R_M - R_{SP}}{1 - R_M R_S} \right) \textbf{(6)}$$

$$C_S = C_{SP} \frac{m_{SP}}{m_S} \frac{M_S}{M_{SP}} \frac{A_{SP}^b}{A_S^a} \left(\frac{R_M - R_{SP}}{1 - R_M R_S} \right) \textbf{(7)}$$

Απο την εξίσωση 7 προκύπτει ότι ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του στοιχείου του δείγματος εξαρτάται μόνο από τον υπολογισμό της κατανομής R_M το οποίο με τη βοήθεια της φασματομετρίας μάζας μπορεί να υπολογιστεί με εξαιρετική ακρίβεια.

Πλεονεκτήματα σε σχέση με τις κλασικές μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού.

- Το πρώτο και σημαντικό πλεονέκτημα της ισοτοπικής αραίωσης είναι ότι ο υπολογισμός της τελικής συγκέντρωσης του υπό ανάλυση στοιχείου είναι ανεξάρτητος των παρεμποδίσεων που μπορούν να οφείλονται είτε στη μήτρα των δειγμάτων είτε στην αλλαγή της ευαισθησίας του οργάνου κατά την ανάλυση (εξίσωση 7) [231].

- Επιπλέον, η ακρίβεια του υπολογισμού της τελικής συγκέντρωσης του στοιχείου βασίζεται στην ακρίβεια υπολογισμού των ισοτοπικών αναλογιών R_S, R_{Sp} ,R_m. Έχοντας σα δεδομένο ότι τόσο η ισοτοπική κατανομή R_S, όσο και η R_{Sp} είναι γνωστές διαπιστώνεται ότι μόνο η ισοτοπική αναλογία R_m μπορεί να επηρεάσει ουσιαστικά τον ακριβή υπολογισμό της τελικής συγκέντρωσης του στοιχείου. Η ισοτοπική αναλογία R_m μπορεί να υπολογιστεί με εξαιρετική ακρίβεια με τη βοήθεια της φασματομετρίας μάζας [231].

- Επιπροσθέτως, αξίζει να σημειωθεί ότι εφόσον επιτευχθεί ισοτοπική ισορροπία μεταξύ του δείγματος και της προσθήκης γνωστής ποσότητας (spike) οποιαδήποτε ατύχημα που αφορά είτε το διάλυμα εμπλουτισμένο με ισότοπο είτε το δείγμα (π.χ. χύσιμο του διαλύματος) δεν επιφέρει καμία αλλαγή στο σύστημα γιατί η τιμή της ισοτοπικής κατανομής R_m παραμένει ίδια [231].

Εν κατακλείδι, εάν κατά την ισοτοπική αραίωση επιλεχθούν ισότοπα του υπό ανάλυση στοιχείου που δεν οδηγούν σε παρεμποδίσεις, τηρηθούν τα προαναφερθέντα και γίνει εκτενή ανάλυση δειγμάτων blank (πριν την κύρια ανάλυση δειγμάτων) προς αποφυγή μολύνσεων του ισοτοπικού διαλύματος τότε ο προσδιορισμός της τελικής ποσότητας του υπό ανάλυση στοιχείου δεν μπορεί παρά να χαρακτηριστεί εξαιρετικά ακριβής.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, που δεν υπάρχουν πρότυπα αναφοράς για τα είδη του σεληνίου η ισοτοπική αραίωση λαμβάνει χώρα μετά το χρωματογραφικό διαχωρισμό των ενώσεων (post column isotope dilution analysis). Στην περίπτωση αυτή οι μαθηματικές εξισώσεις που αναφέρθηκαν διαφοροποιούνται ως προς το γεγονός ότι λαμβάνεται υπόψιν ο ρυθμός ροής του υπό ανάλυση στοιχείου (flow rate) στο δείγμα καθώς και η πυκνότητα του δείγματος (density). Έτσι, η εξίσωση 1 διαμορφώνεται ως εξής : $N_s^a d_s f_s + N_{sp}^a d_{sp} f_{sp} = N_m^a d_m f_m$ ενώ η εξίσωση 7 ως εξής

$$c_s d_s f_s = c_{sp} d_{sp} f_{sp} \frac{M_s}{M_{sp}} \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \left(\frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s} \right)$$

Σύμφωνα με την τελευταία εξίσωση και στην περίπτωση αυτή η τελική συγκέντρωση του υπό ανάλυση στοιχείου εξαρτάται μόνο από τον υπολογισμό της κατανομής R_m. Μειονέκτημα της συγκεκριμένης ανάλυσης (post isotope dilution analysis) αποτελεί το γεγονός ότι οι μαθηματικές εξισώσεις που χρησιμοποιούνται δεν μπορούν να διορθώσουν για λάθη που μπορούν να συμβούν πριν την ανάμειξη του διαλύματος με το εμπλουτισμένο ισότοπο και του δείγματος του υπό ανάλυση στοιχείου μετά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των ειδών του. Παρόλο αυτά είναι η μοναδική μέθοδος που δίνει τη δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των ειδών σεληνίου χωρίς τη χρησιμοποίηση πρότυπων δειγμάτων με σημαντική ακρίβεια.

3.4 Προσδιορισμοί στον Ορό Αίματος

3.4.1 Ποσοτικός Προσδιορισμός Ολικού Σεληνίου Σε Δείγματα Ανθρώπινου Ορού Αίματος.

Αντιδραστήρια

Για την παρασκευή της κινητής φάσης

- Απιοντισμένο νερό, di. H_2O (18 MΩ cm, Ultra Clear Basic water purification system from SG GmbH, Germany)
- Διάλυμα νιτρικού οξέος (HNO_3, 65% Riedel-de Haen, Seelze, Germany) συγκέντρωσης 1%
- Απορρυπαντικό Triton X-100 συγκέντρωσης 0,1%
- Διάλυμα 1-βουτανόλης (1-Butanol) συγκέντρωσης 6 %
- Διάλυμα Ινδίου (In) συγκέντρωσης 1000 ppm

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς

- Διάλυμα Σεληνικού οξέος (Selenate, ≥98% Merck) συγκέντρωσης 1000 μg/L.

Δείγματα

- 506 δείγματα ανθρώπινου ορού
- Πρότυποι οροί για τον έλεγχο της ποιότητας των πσοτικών προσδιορισμών Se, 1) SeronormTM Trace Elements Serum, SERO και 2) BCR-637, European Commission-Joint Research centre, Institute for reference materials and measurements (IRMM), Belgium.

Οργανολογία

ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer), σύστημα φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος-τετραπολικού ανιχνευτή μαζών X-series ICP-MS (Thermo Electron , Winsford, UK) εξοπλισμένο με ομόκεντρο πνευματικό εκνεφωτή και θάλαμο εκνέφωσης.

Αναλυτική πορεία

Η διαδικασία προσδιορισμού Se σε δείγματα ανθρώπινου ορού έγινε σύμφωνα με τροποποιημένη μέθοδο των Sieniawska και συνεργατών του [200]. Συγκεκριμένα, η εισαγωγή του δείγματος έγινε με συνεχή εισαγωγή δείγματος στο ICP-MS. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκε κινητή φάση σύνθεσης απιοντισμένου νερού, 1% νιτρικού οξέος, 6% βουτανόλης, απορρυπαντικού 0,5% Triton x-100. και 1000ppm ίνδιο ως εσωτερικό πρότυπο (Πιν.3.2). Επίσης η κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε για αραίωση 1:10 όλων των δειγμάτων ορού.

Πίνακας 3.2. Συστατικά της κινητής φάσης (Vτελ.=1000 ml) για ολικό προσδιορισμό Se με ICP-MS.

Διαλύτης	**Συγκέντρωση**	**Όγκος**
Triton X-100	0,5%	5 ml
In	1000ppm	5μl
HNO_3	1%	10ml
1-Butanol	6%	25ml
di.H_2O	-	955ml

Στη συνέχεια προκειμένου για τον ποσοτικό προσδιορισμό ολικού Se έγινε κατασκευή καμπύλης αναφοράς. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα ανόργανου Se(selenate) συγκέντρωσης 10 ppm καθώς και μια σειρά πρότυπων διαλυμάτων A,B,C,D (Πιν.3.3). Τόσο στα πρότυπα διαλύματα όσο και στα δείγματα ορού πραγματοποιήθηκε αραίωση 1 προς 10 με την κινητή φάση

Η ακρίβεια και ορθότητα της παραπάνω πειραματικής διαδικασίας πιστοποιήθηκε με την ανάλυση πρότυπου υλικού ορού που περιείχε πιστοποιημένη ποσότητα Se. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το BCR-637, European Commission-Joint Research centre, Institute for reference materials and measurements (IRMM), Belgium όπου οι τιμές Se προσδιορίζονται σύμφωνα με τις βασικές απαιτήσεις της ευρωπαϊκής κοινότητας.

Πίνακας 3.3. Πρότυπα διαλύματα Se για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς.

Πρότυπο Διάλυμα	**Όγκος διαλύματοςSe (10ppm) (ml)**	**Όγκος di.H_2O (ml)**	**Όγκος HNO_3 (ml)**	**Τελική συγκέντρωση Se (ppb)**
Std D	0,200	9,300	0,100	200
Std C	0,100	9,600	0,100	100
Std B	0,050	9,750	0,100	50
Std A	0,010	9,840	0,100	10
Blank	-	9,900	0,100	0

3.4.2 Ανίχνευση και Ποσοτικός Προσδιορισμός Πρωτεϊνών Σεληνίου Σε Δείγματα Ανθρώπινου Ορού.

Αντιδραστήρια

Για την παρασκευή της κινητής φάσης

- Απιοντισμένο νερό, di.H2O (18 MΩ cm, Ultra Clear Basic water purification system from SG GmbH, Germany)

- Διάλυμα οξικού αμμωνίου (ammonium acetate (≥99.99%) from Riedel-de Haen, Seelze, Germany) συγκέντρωσης 0.05 molL-1 CH_3COONH_4, pH≈7, για την κινητή φάση

κατακράτησης Α και συγκέντρωσης 1.5 $molL^{-1}$ CH_3COONH_4, pH≈7 για την κινητή φάση έκλουσης Β.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών Se σε ορό

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών Se στον ορό έγινε με ισοτοπική αραίωση (Isotope Dilution Analysis). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- Διάλυμα νιτρικού οξέος (HNO3, 65% Riedel-de Haen, Seelze, Germany) συγκέντρωσης 1%
- Πρότυπο διάλυμα Σεληνικού οξέος (Selenate, ≥98% Merck) συγκέντρωσης 1000 ppm
- Εμπλουτισμένο ισότοπο ^{77}Se (99%), ISOFLEX USA (San Francisco, CA, USA).
- Διάλυμα Μεθανόλης (gradient elution ACS grade) συγκέντρωσης 99.8%
- 399 δείγματα ανθρώπινου ορού

Οροί ποιοτικού ελέγχου, BCR-637, BCR-638, BCR-639, European Commission-Joint Research centre, Institute for reference materials and measurements (IRMM), Belgium,

Οργανολογία

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών Se χρησιμοποιήθηκε διάταξη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) η οποία περιλαμβάνει :

- Σύστημα παροχής κινητής φάσης

Περιλαμβάνει αντλία βαθμιδωτής έκλουσης κινητής φάσης με ταχύτητα ροής 1mL/min (Shimadzu LC-20AD, Shimadzu corporation, Kyoto, Japan)

- Σύστημα εισαγωγής δείγματος.

Ο απαιτούμενος όγκος δείγματος εισέρχεται με σύριγγα, στη βαλβίδα εισαγωγής υψηλής πίεσης με βρόχο δείγματος 100μL.

- Στήλες Διαχωρισμού .

Για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών Se χρησιμοποιήθηκαν δύο στήλες χρωματογραφίας συγγένειας, Heparin Sepharose (Hep-HP) και Blue Sepharose (Blue-HP) (Εικ.3.1), μήκους 5cm και εσωτερικής διαμέτρου 4.6 mm i.d. Κατά τη διαδικασία ανάλυσης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε πακετάρισμα στηλών ανά τακτά χρονικά διαστήματα συμβάλλοντας έτσι τόσο στην αύξηση της ανθεκτικότητας των στηλών στις υψηλές πιέσεις λόγω της επιβαρημένης μήτρας των δειγμάτων ορού. Το υλικό πλήρωσης που χρησιμοποιήθηκε υπήρχε σε μικροστήλες εκχύλισης στερεάς φάσης (HitrapTM Heparin cartridge and HiTrapTM Blue cartridge) της εταιρίας GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Το πακετάρισμα των στηλών έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που παρουσιάζεται από τον Jitaru και του συνεργάτες του [221].

- Σύστημα Διαχωρισμού Πρωτεϊνών Se

Το σύστημα διαχωρισμού των πρωτεϊνών Se παρουσιάζεται στην εικόνα 3.2. Συγκεκριμένα αποτελείται από ένα σύστημα εισαγωγής δείγματος (βαλβίδα εισαγωγής), δύο χρωματογραφικές στήλες συγγένειας, μια βαλβίδα εναλλαγής, μια αντλία βαθμιδωτής εισαγωγής κινητής φάσης. Το δείγμα εισάγεται στη βαλβίδα εισαγωγής με βρόχο δείγματος 100μL και μαζί με την κινητή φάση, η σύσταση της οποίας καθορίζεται μέσω της αντλίας βαθμιδωτής εισαγωγής κινητής φάσης μεταφέρεται στη βαλβίδα εναλλαγής των δύο χρωματογραφικών στηλών. Στη συνέχεια το μίγμα δείγματος-κινητής φάσης εισέρχεται μέσω σωλήνα PEEK μήκους 45cm και εσωτερικής διαμέτρου 0.51mm σε σύνδεσμο τριπλής εισόδου σχήματος Τ όπου αναμιγνύεται με το διάλυμα εμπλουτισμένο με Se 77 (τροφοδοσία του ισοτοπικού διαλύματος με ροή 0.02 mL/min γίνεται με περισταλτική αντλία μέσω σπειράματος κατασκευασμένο από Teflon μήκους 1m και εσωτερικής διαμέτρου 0.8mm). Το τελικό μίγμα εισέρχεται στον εκνεφωτή όπου μέρος του σχηματιζόμενου αερολύματος μεταφέρεται μέσω του θαλάμου εκνέφωσης στο ICP-MS, ενώ τα υγρά απόβλητα απομακρύνονται απο την έξοδο του θαλάμου εκνέφωσης. Πριν την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη HEP-HP τοποθετείται ειδικό φιλτράκι (peak metal-free in line, filter W/2 micron filte, Altech) προκειμένου να αποφευχθεί η εισροή ανεπιθύμητων σωματιδίων στις στήλες(Εικ.3.1).

- Τεχνική ταυτοποίησης στοιχείων σε δείγματα και προσδιορισμού των συγκεντρώσεών τους.

ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer), σύστημα φασματομέτρου μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος με τετραπολικό ανιχνευτή μαζών X-series ICP-MS (Thermo

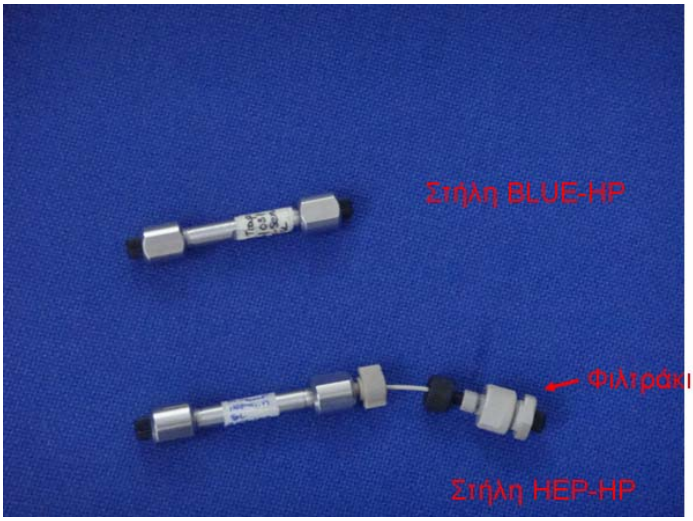
Electron Elemental Analysis, Winsford, UK) εξοπλισμένο με ομόκεντρο πνευματικό εκνεφωτή και θάλαμο εκνέφωσης. Οι συνθήκες ανάλυσης φαίνονται στον Πίνακα 4.3.

Αναλυτική πορεία

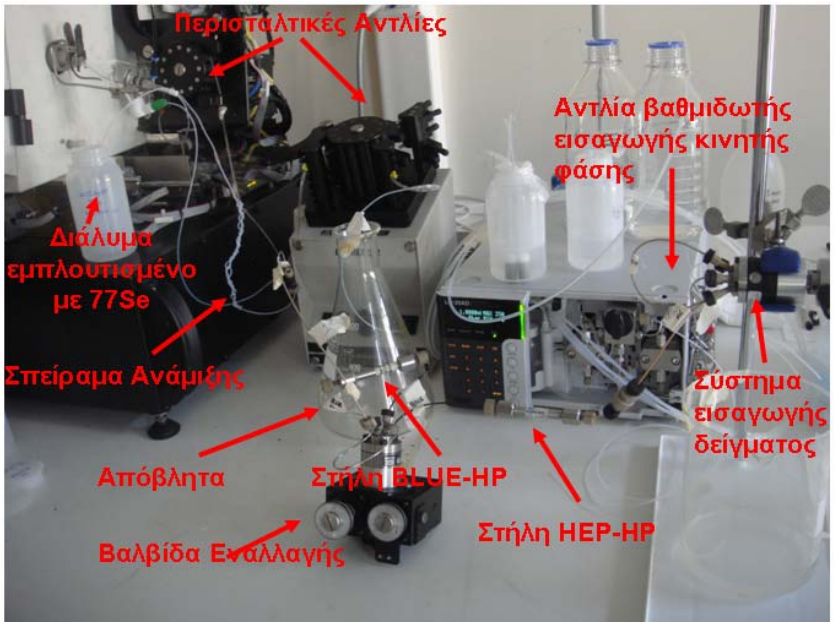
Η διάρκεια της ανάλυσης του εκάστοτε δείγματος ήταν 20 λεπτά. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως χρειάστηκαν δύο στήλες χρωματογραφίας συγγένειας η BLUE-HP και η HEP-HP. Στα πρώτα 5 λεπτά της ανάλυσης (0-5min) οι δύο στήλες βρίσκονται σε σειρά, συγκεκριμένα η βαλβίδα εναλλαγής βρίσκεται στη θέση Α (εικ.3.3) και από το σύστημα περνάει η κινητή φάση Α χαμηλής συγκέντρωσης (0.05 M ammonium acetate). Στο διάστημα αυτό η GPx καθώς και οποιαδήποτε άλλη ένωση Se που δεν κατακρατάτε από τις στήλες εκλούονται. Στα 5 λεπτά η περιστρεφόμενη βαλβίδα τοποθετείται στη θέση Β (εικ.3.4) και παραμένει εκεί για 5 λεπτά (5-10min). Στη θέση αυτή (θέση Β) από το σύστημα εξαιρείται η στήλη Blue-HP, ενώ από την στήλη HEP-HP, που παραμένει στο σύστημα (εικ.3.2), διέρχεται η κινητή φάση Β υψηλής συγκέντρωσης (1.5 M ammonium acetate) έχοντας σαν αποτέλεσμα την έκλουση της SelP. Με το πέρας των 10 λεπτών η περιστρεφόμενη βαλβίδα τοποθετείται στη θέση Α όπου λαμβάνει χώρα η έκλουση της SeAlb με τη βοήθεια της κινητής φάσης Β στα επόμενα 5 λεπτά (10-15 min). Τέλος, στα τελευταία 5 λεπτά (15-20 min) η κινητή φάση Α περνάει από το σύστημα, ενώ οι δύο στήλες βρίσκονται σε σειρά, με σκοπό το ξέπλυμα όλου του συστήματος και τη διατήρηση των επιθυμητών συνθηκών για την επόμενη ανάλυση.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών Se βασίστηκε στη μέθοδο της ισοτοπικής αραίωσης [231].

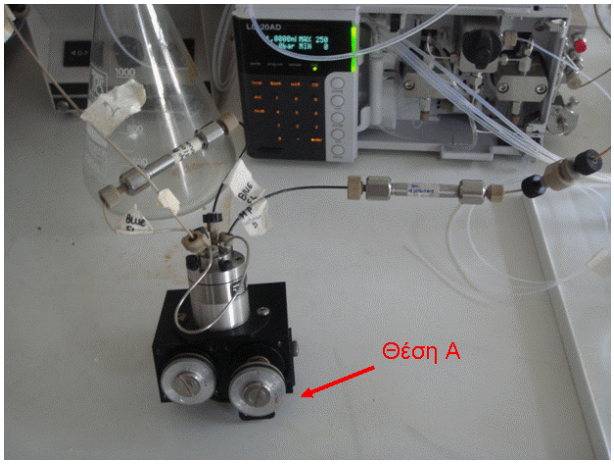
Η αξιοπιστία και ορθότητα της παραπάνω πειραματικής διαδικασίας πιστοποιήθηκε με την ανάλυση ορού πρότυπου υλικού αναφοράς. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα BCR-637, BCR-638, BCR-639 (European Commission-Joint Research centre, Institute for reference materials and measurements (IRMM), Belgium).



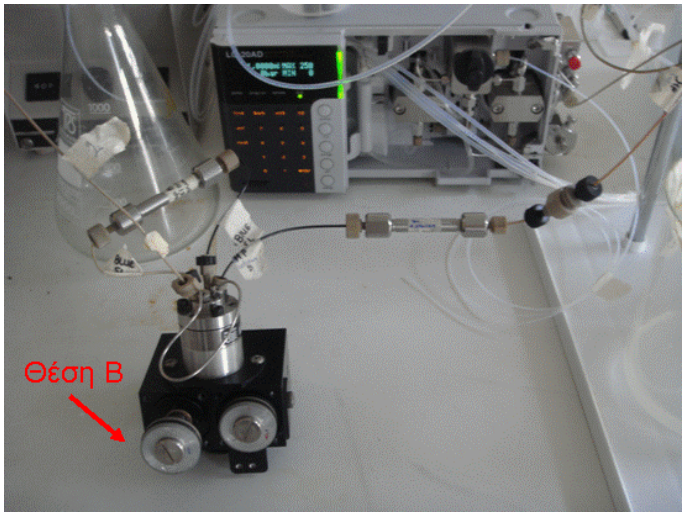
Εικόνα 3.1 Στήλες χρωματογραφίας συγγένειας, Heparin Sepharose (Hep-HP) και Blue Sepharose (Blue-HP)



Εικόνα 3.2. Διάταξη του συστήματος διαχωρισμού και ανίχνευσης πρωτεϊνών Se σε δείγματα ορού με χρήση υγρής χρωματογραφίας συγγένειας σε συνδυασμό με φασματόμετρο μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος.



Εικόνα 3.3. Βαλβίδα εναλλαγής Θέση Α**:** οι χρωματογραφικές στήλες βρίσκονται σε σειρά και από το σύστημα περνάει η κινητή φάση Α μικρότερης συγκέντρωσης (0.05 M ammonium acetate)



Εικόνα 3.4. Βαλβίδα εναλλαγής Θέση Β**:** Από το σύστημα εξαιρείται η στήλη Blue-HP ενώ από την στήλη HEP-HP, που παραμένει στο σύστημα, διέρχεται η κινητή φάση Β υψηλότερης συγκέντρωσης (1.5 M ammonium acetate)

Πίνακας 3.4 Πειραματικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια αναλύσεων των δειγμάτων.

Συνθήκες Υψηλής Πίεσης Υγρής Χρωματογραφίας	
Στήλες	Στήλες χρωματογραφίας συγγένειας : HEP-HP, BLUE-HP, 5 x 4.6 mm i.d.
Όγκος εισαγωγής	100μl
Ταχύτητα Ροής	1.0 mL/min
Τρόπος Εισαγωγής Κινητής Φάσης	Βαθμιδωτός
Κινητή Φάση	Κινητή φάση Κατακράτησης Α: 0.05 $molL^{-1}$ CH_3COONH_4, pH≈7 Κινητή φάση Εκλουσης Β : 1.5 $molL^{-1}$ CH_3COONH_4, pH≈7
Παράμετροι Λειτουργίας ICP-MS	
Ισχύς Πλάσματος (RF power)	1350
Ροή Ar του εκνεφωτή (L/min)	1.0
Ροή βοηθητικού αερίου (L/min)	1.0
Ροή ψυκτικού αερίου (L/min)	13
ICP-MS Παράμετροι καταγραφής δεδομένων	
Μέθοδος καταγραφής	**Παρακολούθηση επιλεγμένων κορυφών**
Σημεία/κορυφή φάσματος	3
Ισότοπα Se	m/z 77, 78 και 82 για ανίχνευση Se,ενώ m/z 75, 81, 83 για ανίχνευση παρεμποδίσεων

3.4.2.1. Σύζευξη χρωματογραφικής στήλης αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography) στο σύστημα dAF-ICP-MS.

Η προσθήκη της χρωματογραφικής στήλης SEC (Shodex Asahipak GS-520 HQ, 300 x 7.6 mm, 7 μm particle size) (εικ.3.5) έγινε με εισαγωγή μιας δεύτερης βαλβίδας εναλλαγής στο

σύστημα dAF-ICP-MS. Η διαδικασία της βαθμιδωτής έκλουσης άλλαξε ανάλογα και παρουσιάζεται αναλυτικά παρακάτω. Η διάταξη του συστήματος dAF- SEC -ICP-MS φαίνεται στο σχήμα 3.8 σε αντιπαράθεση με το σύστημα dAF-ICP-MS. Οι υπόλοιπες παράμετροι για το σύστημα είναι όμοιες με αυτές του συστήματος dAF-ICP-MS.

- Δείγματα
- 6 δείγματα ανθρώπινου ορού
- Οροί ποιοτικού ελέγχου, BCR-637, (BCR-638, BCR-639) αυτά τα κάναμε με την SEC;, European Commission-Joint Research centre, Institute for reference materials and measurements (IRMM), Belgium.

Αναλυτική Πορεία

Η διάρκεια της ανάλυσης του εκάστοτε δείγματος ήταν 36 λεπτά. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως χρειάστηκαν δύο στήλες χρωματογραφίας συγγένειας η BLUE-HP και η HEP-HP, μια στήλη SEC και δύο βαλβίδες εναλλαγής (Σχ.3.8). Στα πρώτα 19 λεπτά της ανάλυσης (0-19min) οι τρεις στήλες βρίσκονται σε σειρά, συγκεκριμένα οι δυο βαλβίδες εναλλαγής βρίσκονται στη θέση Α (Εικ.3.3) και από το σύστημα περνάει η κινητή φάση Α χαμηλής συγκέντρωσης (0.05 M ammonium acetate). Στο διάστημα αυτό η GPx καθώς και οποιαδήποτε άλλη οργανική ή ανόργανη ένωση Se που δεν κατακρατούνται απο τις στήλες HEP-HP και Blue-HP εκλούονται απο τη στήλη SEC σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος. Αντίστοιχα η SelP παραμένει στη στήλη HEP-HP ενώ η SeAlb παραμένει στη στήλη Blue-HP.

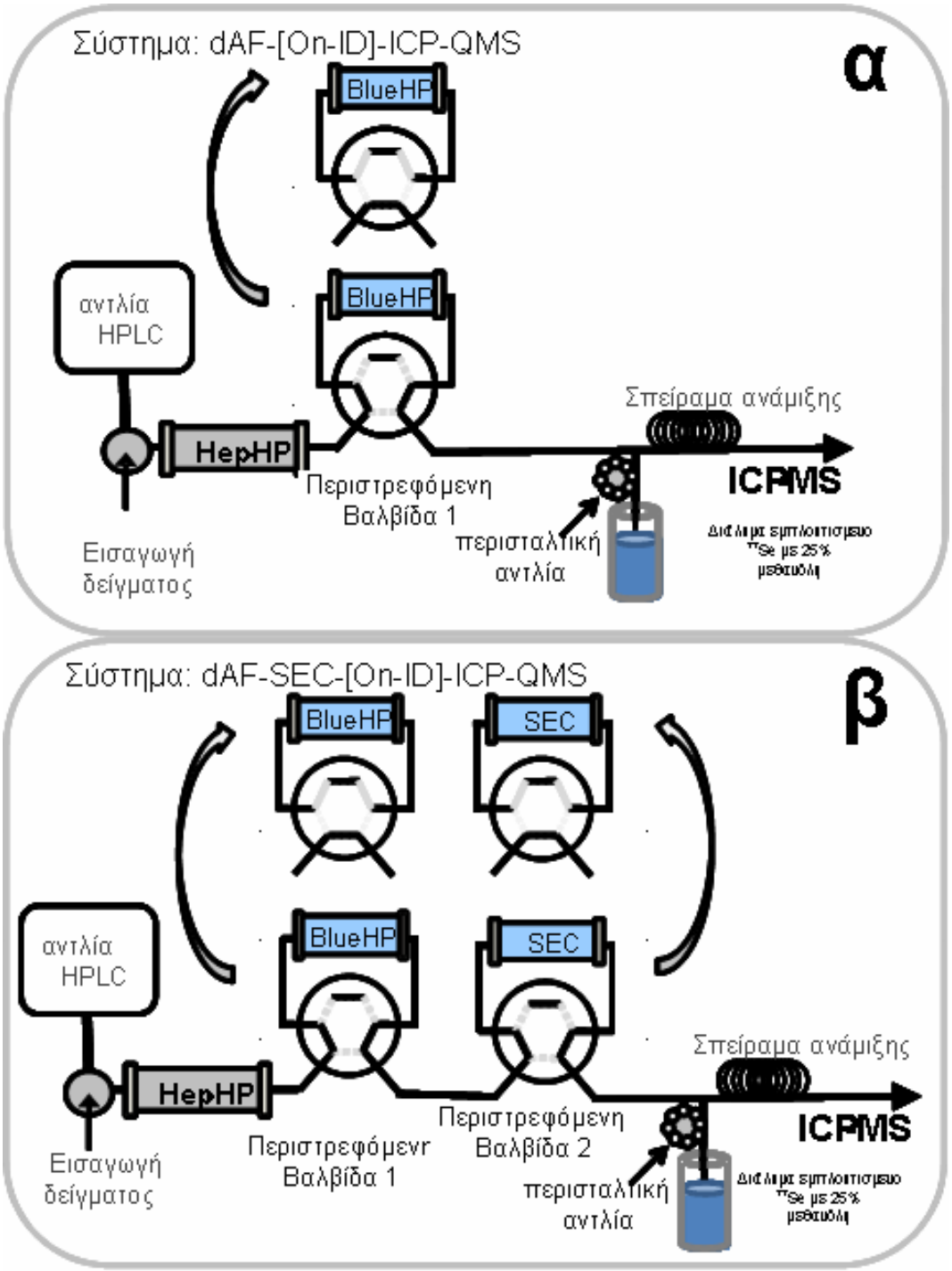
Στα 19 λεπτά οι περιστρεφόμενες βαλβίδες τοποθετούνται στη θέση Β (Εικ.3.4) και παραμένει εκεί για 5 λεπτά (19-24min). Στη θέση αυτή (θέση Β) από το σύστημα εξαιρούνται η στήλη Blue-HP καθώς και η στήλη SEC, ενώ από την στήλη HEP-HP, που παραμένει στο σύστημα (Σχ.3.8), διέρχεται η κινητή φάση Β υψηλής συγκέντρωσης (1.5 M ammonium acetate) έχοντας σαν αποτέλεσμα την έκλουση της SelP. Με το πέρας των 5 λεπτών η περιστρεφόμενη βαλβίδα που συνδέεται με τις στήλες χρωματογραφίας συγγένειας τοποθετείται στη θέση Α όπου λαμβάνει χώρα η έκλουση της SeAlb από την στήλη Blue-HP με τη βοήθεια της κινητής φάσης Β στα επόμενα 5 λεπτά (24-29 min). Τέλος, στα τελευταία 7 λεπτά (29-36 min) η κινητή φάση Α περνάει από το

σύστημα, ενώ οι τρεις στήλες βρίσκονται σε σειρά (βαλβίδα εναλλαγής που συνδέεται με τη χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού βρίσκεται στη θέση Α) με σκοπό το ξέπλυμα όλου του συστήματος και τη διατήρηση των επιθυμητών συνθηκών για την επόμενη ανάλυση.

Η αξιοπιστία και ορθότητα της παραπάνω πειραματικής διαδικασίας πιστοποιήθηκε με την ανάλυση ορού πρότυπου υλικού αναφοράς. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα BCR-637, BCR-638, BCR-639, (European Commission-Joint Research centre, Institute for reference materials and measurements (IRMM), Belgium). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν και πρότυπα διαλύματα ανόργανων και οργανικών ενώσεων προκειμένου για την ταυτοποίηση των κορυφών.



Εικόνα 3.5. Χρωματογραφική στήλη αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography).



Σχήμα 3.8. Σχηματική παράσταση της διάταξης του συστήματος dAF-[On-ID]-ICP-MS(α) σε αντιπαράθεση με τη διάταξη του συστήματος dAF-SEC-[On-ID]-ICP-MS(β).

3.5 Σχεδιασμός της μελέτης ΑΤΤΙΚΗ

Η μελέτη «ΑΤΤΙΚΗ» είναι μια προοπτική μελέτη παρακολούθησης δείγματος του γενικού πληθυσμού. Έχει σαν αρχικό στόχο να καταγράψει τις τιμές διαφόρων δημογραφικών, βιοχημικών, κλινικών, γενετικών, διατροφικών παραμέτρων σε τυχαία επιλεγμένο και στρωματοποιημένο, κατά ηλικία και φύλο, δείγμα του νομού Αττικής. Ο πληθυσμός αυτός καταγράφει ένα γενικό τύπο Έλληνα μια και αποτελείται από άτομα αστικών, ημιαστικών και αγροτικών περιοχών [236]. Παράλληλα αποτελεί το 40% του γενικότερου πληθυσμού της χώρας (Ε.Σ.Υ.Ε. 2001).

3.5.1 Πληθυσμός της μελέτης

Το τελικό δείγμα της μελέτης «ΑΤΤΙΚΗ» περιλαμβάνει 3042 άτομα. Εξ αυτών 1514 είναι άνδρες (49%) και 1528 γυναίκες (51%)[236,237]. Η ηλικιακή κατανομή τους προέκυψε από τα στοιχεία των δημοτολογίων που διατίθενται από την Εθνική Στατιστική Υπηρεσία της Ελλάδος (απογραφή 2001). Το τελικό μέγεθος του δείγματος προέκυψε έπειτα από ανάλυση ισχύος με βάση την αποτίμηση διαφόρων στον εκτιμώμενο σχετικό κίνδυνο (hazard ratio) για προοπτική παρακολούθηση 10 ετών μεγαλύτερο από 10% σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας < 5% και με στατιστική ισχύ >80%. Το δείγμα είναι τυχαίο και αντιπροσωπευτικό του πληθυσμού της γεωγραφικής περιφέρειας του νομού Αττικής. Με βάση την πληθυσμιακή στρωματοποίηση της Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας της Ελλάδος (Ε.Σ.Υ.Ε. 1991) δημιουργήθηκαν «χάρτες» ανά περιοχή μελέτης έτσι ώστε να προσδιορίζεται επακριβώς ο πληθυσμός στόχος. Η συνεισφορά των περιοχών της Αττικής στην μελέτη είναι η ακόλουθη: Δήμος Αθηναίων (20%), Δήμος Πειραιώς (8%), ευρύτερη περιφέρεια πρωτεύουσας (41%), υπόλοιπο Αττικής (29%) και νήσοι (2%).

Η επιλογή των ατόμων έγινε κατά τρόπο ώστε να επιλέγεται (τυχαία) ένα άτομο ανά οικογένεια, οικοδομικό συγκρότημα και τετράγωνο. Τα στοιχεία συγκεντρώθηκαν σε ειδικό ερωτηματολόγιο και έπειτα κωδικοποιήθηκαν σε στατιστική βάση δεδομένων που σχεδιάστηκε για το σκοπό αυτό. Τα ερωτηματολόγια της μελέτης είναι εμπιστευτικά, απλά και γρήγορα προσπελάσιμα. Πέντε τοις εκατό των ανδρών και 3% των γυναικών εξαιρέθηκαν από τη μελέτη γιατί ανέφεραν ιστορικό καρδιαγγειακής ή άλλης αθηροσκληρωτικής νόσου, ή κάποιας χρόνιας ιογενούς λοίμωξης. Επιπλέον οι συμμετέχοντες δεν ανέφεραν γριππώδη συνδρομή, οξεία αναπνευστική λοίμωξη, οδοντιατρικά προβλήματα ή οποιοδήποτε είδος χειρουργικής επέμβασης

την τελευταία εβδομάδα. Τα άτομα που διέμεναν σε ιδρύματα εξαιρέθηκαν από τη δειγματοληψία. Όλα τα άτομα ενημερώθηκαν για τους σκοπούς της μελέτης και συμφώνησαν να συμμετάσχουν.

Στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθηκαν 399 άτομα (236 άντρες, 163 γυναίκες) τα οποία επελέγησαν τυχαία από το συνολικό δείγμα της μελέτης ΑΤΤΙΚΗ.

3.5.2 Εξεταζόμενες παράμετροι

3.5.2.1 Ανθρωπομετρικά Χαρακτηριστικά

Το ύψος των ατόμων μετρήθηκε μία φορά. Τα άτομα του δείγματος ήταν χωρίς παπούτσια, με την πλάτη ίσια και ακουμπισμένη σε μεζούρα του τοίχου και τα μάτια να κοιτάζουν ίσια εμπρός. Χρησιμοποιήθηκε ορθογώνιο τρίγωνο με τη μία κάθετη πλευρά του να εφάπτεται στο τριχωτό της κεφαλής του ατόμου και την άλλη στον τοίχο. Εξασφαλίστηκε έτσι ο οπτικός άξονας να είναι οριζόντιος μιας και η άνω πλευρά του έξω ακουστικού πόρου βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με την κάτω πλευρά του οφθαλμικού κόγχου. Οι μετρήσεις στρογγυλοποιήθηκαν στο πλησιέστερο 0.5cm του μέτρου.

Το βάρος των ατόμων επίσης μετρήθηκε μια φορά. Τα άτομα ήταν χωρίς παπούτσια και με ελαφρά ένδυση. Η ζυγαριά ρυθμιζόταν και ελεγχόταν πριν από κάθε ζύγιση. Οι μετρήσεις στρογγυλοποιήθηκαν στην πλησιέστερη εκατοντάδα γραμμαρίων. Ο δείκτης μάζας σώματος υπολογίστηκε σαν βάρος (Kgr)/ύψος2(m). Η παχυσαρκία ορίστηκε ως δείκτης μάζας σώματος> 29.9 Kgr/ m2. Η περιφέρεια μέσης (cm) υπολογίστηκε γύρω από τους γλουτούς, στο ύψος, της μέγιστης έκτασης. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο λόγος περιφέρειας μέσης/ισχίων [237].

3.5.2.2 Βιοχημικές Παράμετροι

Το δείγμα νηστείας συλλέχθηκε από τις 8.00 έως τις 10.00π.μ. Σε κάθε αιμοληψία λαμβάνονταν ~10 ml αίματος από τη μέση (λοξή) φλέβα του πήχη του άκρου που δεν υποβαλλόταν σε άσκηση (επιδέξιο). Από το συνολικό λαμβανόμενο όγκο αίματος, 3 ml για προσδιορισμούς στον ορό. Τα δείγματα ορού φυλάσσονταν σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) μέχρι να αναλυθούν, ενώ τα

δείγματα πλάσματος (citrated) σχεδόν άμεσα χρησιμοποιούνταν προκειμένου να μετρηθεί το περιεχόμενο ινωδογόνο. Στη συνέχεια ακολουθεί αναλυτική περιγραφή όλων των μεθόδων προσδιορισμού στο αίμα που εφαρμόσθηκαν για τις ανάγκες της έρευνας.

Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη μετρήθηκε με ανοσονεφελομετρία (αυτόματο νεφελόμετρο BNI της Dale Behring). Η IL-6, TNFa, αντιπονεκτίνη, λεπτίνη μετρήθηκαν με ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA σε διπλά δείγματα ορού (R&D systems Inc.Minneapolis,Minessota). Ο συντελεστής μεταβλητότητας (intra-assay και inter-assay coefficient of variation) ήταν <5% για την C-αντιδρώσα πρωτεΐνη και <10% για την IL-6,,την αδιπονεκτίνη και τη λεπτίνη. Η μέτρηση της TSH έγινε με βιοχημικό αναλυτή AIA600II με αντιδραστήρια της εταιρίας Tosoh (Tokyo, Japan). Τα επίπεδα ομοκυστείνης μετρήθηκαν με αυτόματο βιοχημικό αναλυτή (Abott Axsym, Germany). Τα επίπεδα γλυκόζης αίματος μέτρησαν με αναλυτή Beckman (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). Οι συγκεντρώσεις ινσουλίνης ορού μετρήθηκαν με ραδιοανοσολογική μέθοδο (RIA 100, Pharmacia Co., Erlangen, Germany) και ο συντελεστής μεταβλητότητας ήταν 9%. Επιπλέον, η ινσουλινοαντίσταση (HOMA-R υπολογίστηκε με τον τύπο: (γλυκόζη (mg/dl) x ινσουλίνη (μU/ml) / 22.5) ενώ η ικανότητα έκκρισης ινσουλίνης (HOMA-B) σύμφωνα με τον τύπο: (ινσουλίνη νηστείας (μU/ml)) x 3.33 / (γλυκόζη νηστείας (mg/dl) - 3.5). Τα επίπεδα λιποειδών αίματος (ολική χοληστερόλη, HDL-χοληστερόλη και τριγλυκερίδια) μετρήθηκαν με τη χρήση αυτόματου βιοχημικού αναλυτή RA 1000 της Techikon (χρωματομετρική ενζυματική μέθοδος). Η LDL-χοληστερόλη υπολογίστηκε από τον τύπο Friedewald: (ολική χοληστερόλη)- (HDL-χοληστερόλη)-1/5 τριγλυκεριδίων. Οι συντελεστές μεταβλητότητας (intra-assay και inter-assay coefficient of variation) για τα επίπεδα χοληστερόλης δεν ξεπέρασαν το 3%, για τα τριγλυκερίδια το 4% και για την HDL-χοληστερόλη το 4%. Επιπλέον, μετρήθηκαν τα επίπεδα απολίποπρωτεΐνης A1 (apoA) και B (apoB) καθώς και λιποπρωτεΐνη –(α)(Lp(a) με αυτοματοποιημένη ανοσονεφελομετρική μέθοδο .

3.5.2.3 Κλινικές παράμετροι

Η αρτηριακή πίεση μετρήθηκε στο αριστερό χέρι έχοντας τα άτομα σε καθιστή θέση και σε ήρεμη κατάσταση. Έγιναν τρεις μετρήσεις και υπολογίσθηκε ο μέσος όρος τους. Αν για κάποιο λόγο η μέτρηση έγινε στο δεξί χέρι σημειώθηκε στο ερωτηματολόγιο του ατόμου. Επίσης σημειώθηκε αν ψηλαφώντας τις κερκίδικες αρτηρίες άμφω, διαπιστώθηκε διαφορά στο σφυγμό στα δύο χέρια, όποτε μετρήθηκε η αρτηριακή πίεση και στο δεξί χέρι. Η τιμή της συστολικής πίεσης

αντιστοιχούσε στην τιμή που έδειχνε το πιεσόμετρο όταν ακουγόταν ο πρώτος ήχος. Η τιμή της διαστολικής πίεσης καθοριζόταν όταν ο ήχος σταματούσε να ακούγεται ρυθμικός και ακουγόταν συνεχόμενος. Ο χρόνος μεταξύ των μετρήσεων ήταν ακριβώς όσος χρειαζόταν για να καταγραφεί η προηγούμενη μέτρηση και αφού η περιχειρίδα του πιεσόμετρου ξεφουσκωνόταν εντελώς. Το σφυγμομανόμετρο που χρησιμοποιήθηκε είχε ελεγχθεί πρόσφατα και η στήλη του υδραργύρου ήταν 0 mmHg της κλίμακας όταν η περιχειρίδα ήταν εντελώς ξεφουσκωμένη.

Άτομα των οποίων ο μέσος όρος των επιπέδων αρτηριακής πίεσης ήταν μεγαλύτερος ή ίσος με 140/90 mmHg ή βρισκόντανε υπό αντι-υπερτασική αγωγή ταξινομήθηκαν ως υπερτασικά. Ως σακχαρώδης διαβήτης (τύπου ΙΙ) ορίστηκαν τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας >125 mg/dl. ή η χρήση αντιδιαβητικών φαρμάκων. Άτομα με τύπου Ι διαβήτη αποκλείστηκαν από την ανάλυση εξ αιτίας του πολύ μικρού δείγματος (<1% του πληθυσμού της μελέτης). Ως υπερχοληστερολαιμία ορίστηκαν τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης >200 mg/dΛ ή η χρήση αντιλιπιδαιμικών φαρμάκων.

3.5.2.4 Αποτίμηση του τρόπου ζωής.

Για την εκτίμηση της φυσικής δραστηριότητας δημιουργήθηκε ένας δείκτης εβδομαδιαίας ενεργειακής δαπάνης χρησιμοποιώντας τη συχνότητα (φορές/εβδομάδα), τη διάρκεια (λεπτά/φορά) και την ένταση των αθλημάτων που σχετίζονται με φυσική δραστηριότητα. Η ένταση διαβαθμίστηκε ως ελαφρά (δαπανώμενες θερμίδες <4 Kcal/min σε δραστηριότητες όπως π.χ. Ar περπάτημα) μέτρια (δαπανώμενες θερμίδες <4 -7Kcal/min σε δραστηριότητες όπως π.χ. έντονο περπάτημα,μέτριο κολύμπι,ποδηλασία κτλ.) και υψηλή (δαπανώμενες θερμίδες >7 Kcal/min σε δραστηριότητες όπως π.χ. έντονο ανηφορικό περπάτημα, τρέξιμο μεγάλων αποστάσεων, γρήγορη ποδηλασία). Άτομα που δεν ανέφεραν καμία φυσική δραστηριότητα θεωρήθηκαν ότι ακολουθούν καθιστική ζωή. Για τα υπόλοιπα άτομα υπολογίστηκε ένα συνδυαστικό σκόρ πολλαπλασιάζοντας την εβδομαδιαία συχνότητα, διάρκεια και ένταση της φυσικής δραστηριότητας [238].

Οι πληροφορίες σχετικά με το κάπνισμα συλλέχθηκαν με βάση τυποποιημένο ερωτηματολόγιο που σχεδιάστηκε για τη μελέτη και το οποίο διερευνούσε τα έτη καπνίσματος, τον ημερήσιο αριθμό τσιγάρων, τα αίτια διακοπής καθώς και την έκθεση σε παθητικό κάπνισμα. Ως καπνιστές ορίστηκαν αυτοί που κάπνιζαν τουλάχιστον ένα τσιγάρο ημερησίως, ως πρώην καπνιστές αυτοί που είχαν σταματήσει το κάπνισμα για τουλάχιστον ένα έτος και οι υπόλοιποι ορίστηκαν ως μη καπνιστές.

3.5.2.5 Διατροφική Αποτίμηση

Χρησιμοποιήθηκε το ερωτηματολόγιο του Ευρωπαϊκού Προγράμματος Συνεργασίας Ιατρικής και Κοινωνίας (ΕΠΙΚ) από το εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών [239]. Ζητήθηκε από τους συμμετέχοντες να αναφέρουν την ημερήσια ή εβδομαδιαία κατά μέσο όρο πρόσληψη ορισμένων τροφίμων (στη διάρκεια του τελευταίου χρόνου). Στη συνέχεια, η συχνότητα της κατανάλωσης ποσοτικοποιήθηκε με βάση το πόσες φορές το μήνα καταναλωνόταν κάθε τρόφιμο. Έτσι, η καθημερινή κατανάλωση πολλαπλασιαζόταν με 30, η εβδομαδιαία με 4 και η τιμή 0 αντιστοιχούσε σε τρόφιμα που καταναλώνονταν σπάνια ή ποτέ. Η κατανάλωση αλκοόλ μετρήθηκε με ποτήρια κρασιού (100ml) και ποσοτικοποιήθηκε με την πρόληψη αιθανόλης (γραμμάρια ανά ποτό). Ένα ποτήρι κρασιού αντιστοιχούσε σε ποσότητα αιθανόλης 12g. Σύμφωνα με μια ομάδα του Harvard με σημαντική συμμετοχή Ελλήνων επιστημόνων, δημιουργήθηκε μια διαιτητική πυραμίδα για να περιγράψει το Μεσογειακό πρότυπο διατροφής [240]. Σύμφωνα με το Μεσογειακό αυτό διαιτητικό πρότυπο και την αναφερόμενη μηνιαία συχνότητα κατανάλωσης τροφίμων, υπολογίσθηκε ένα ειδικό διαιτητικό σκορ για κάθε συμμετέχοντα που εκτιμά την προσκόλλησή του στη Μεσογειακή δίαιτα (εύρος τιμών 0-55). Συγκεκριμένα, για την κατανάλωση τροφίμων που θεωρούνται κοντά στο Μεσογειακό πρότυπο (π.χ. αυτά που συστήνονται σε καθημερινή βάση ή περισσότερο από 4 μερίδες την εβδομάδα) σημειωνόταν 0 σκορ όταν ο συμμετέχων ανέφερε μηδενική κατανάλωση, 1 όταν η αναφερόμενη κατανάλωση ήταν 1-4 φορές/μήνα, 2 για 5-8 φορές, 3 για 9-12 φορές/μήνα, 4 για 13-18 φορές/μήνα και 5 για κατανάλωση περισσότερες από 18 φορές/μήνα. Από την άλλη πλευρά, για την κατανάλωση τροφίμων που θεωρούνται μακριά από το Μεσογειακό πρότυπο (όπως το κρέας και τα προϊόντα του) σημειώνονταν τα αντίστροφα σκορ (π.χ. 0 όταν ο συμμετέχων ανέφερε σχεδόν καθημερινή κατανάλωση και 5 για σπάνια ή μηδενική κατανάλωση) [241]. Ειδικά για το αλκοόλ σημειωνόταν σκορ 5 για κατανάλωση λιγότερων από 3 ποτήρια κρασιού ημερησίως και σκορ 4-1 για κατανάλωση 3,4-5,6 και 7 ποτηριών ημερησίως. Υψηλότερες τιμές του διαιτητικού σκορ δείχνουν μεγαλύτερη προσκόλληση στη Μεσογειακή διατροφή. Υπολογίστηκαν επίσης τα τριτημόρια αυτού του σκορ.

3.6 Στατιστική Ανάλυση

Όλες οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± SD (standard deviation of the mean, σταθερό σφάλμα του μέσου) και τεταρτημόρια. Η κανονικότητα των συνεχών μεταβλητών εξετάσθηκε γραφικά με εφαρμογή των διαγραμμάτων Q-Q plots. Στη συγκεκριμένη μελέτη τα επίπεδα TSe, GPX-3, SelP, SeAlb ακολουθούν κανονική κατανομή ενώ οι πρωτεϊνικές κατανομές τους όχι. Στη περίπτωση των μη κανονικών κατανομών χρησιμοποιήθηκε η λογαριθμική μορφή τους προκειμένου να διασφαλιστεί η κανονικότητα.

Επιπλέον, η μέθοδος της ανάλυσης διακύμανσης επαναλαμβανομένων μετρήσεων (repeated measures ANOVA) όπως και το Student's t-test εφαρμόσθηκε προκειμένου να αξιολογηθούν οι πιθανές συσχετίσεις μεταξύ διάφορων συνεχών μεταβλητών και κατηγορικών μεταβλητών καθ'όλη την φάση αξιολόγησης. Συγκεκριμένα, η σύγκριση μεταξύ των βιοχημικών, κλινικών χαρακτηριστικών, χαρακτηριστικών αποτίμησης τρόπου ζωής του πληθυσμού της μελέτης, επιπέδων TSe, GPX-3, SelP, SeAlb, GPX-3/SelP, SelP/SeAlb, GPX-3/SeAlb μεταξύ των δύο φύλων έγινε με το Student's t-test. Η σύγκριση της επιπέδων TSe, GPX-3, SelP, SeAlb, GPX-3/SelP, SelP/SeAlb, GPX-3/SeAlb ανά τριτημόριο TSe στο σύνολο του πληθυσμού έγινε με repeated measures ANOVA. Η σύγκριση των επιπέδων TSe, GPX-3, SelP, SeAlb, GPX-3/SelP, SelP/SeAlb, GPX-3/SeAlb σε άντρες και γυναίκες στις διάφορες ηλικιακές ομάδες του πληθυσμού μελέτης έγινε με ANOVA. Η σύγκριση των επιπέδων TSe, GPX-3, SelP, SeAlb, GPX-3/SelP, SelP/SeAlb, GPX-3/SeAlb σε σχέση με τις ομάδες του δείκτη μάζας σώματος μεταξύ των δύο έγινε με ANOVA. Εξ αιτίας των πολλαπλών συγκρίσεων χρησιμοποιήθηκε η διόρθωση κατά Bonferroni προκειμένου να ερμηνευθεί η αύξηση σφάλματος τύπου I. Οι συσχετίσεις μεταξύ των TSe, GPX-3, SelP, SeAlb, και των βιοχημικών, κλινικών χαρακτηριστικών, χαρακτηριστικών αποτίμησης τρόπου ζωής του πληθυσμού της μελέτης έγινε με τη χρήση του συντελεστή συσχέτισης Pearson r ενώ οι αντίστοιχες συσχετίσεις για τα επίπεδα GPX-3/SelP, SelP/SeAlb, GPX-3/SeAlb πραγματοποιήθηκαν με τον συντελεστή Spearman ρ. Επιπλέον, οι συσχετίσεις μεταξύ της ηλικίας των εθελοντών και της κατανάλωσης ομάων τροφίμων έγινε με τη χρήση του συντελεστή συσχέτισης Pearson r. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση για έλεγχο πιθανών συγχυτικών παραγόντων στις σημαντικές συσχετίσεις που παρατηρληθηκαν με τις μεθόδους που αναφέρθηκαν.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση σε Κύριες Συνιστώσες η οποία είναι μια πολυμεταβλητή στατιστική μέθοδος η οποία σκοπό έχει εκμεταλλευόμενη τις πιθανές συσχετίσεις σε ένα σύνολο χαρακτηριστικών ενός δείγματος, να δημιουργήσει ένα σύνολο νέων μεταβλητών. Οι

νέες μεταβλητές είναι ασυσχέτιστες μεταξύ τους και αποτελούν γραμμικούς συνδυασμούς των αρχικών μεταβλητών από τις οποίες προέκυψαν. Με τον τρόπο αυτό προκύπτει στην πραγματικότητα ισάριθμο πλήθος γραμμικών μετασχηματισμών με το πλήθος των αρχικών μεταβλητών. Ειδικότερα, η ανάλυση σε Κύριες Συνιστώσες χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση διατροφικών προτύπων του πληθυσμού μελέτης. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 12 ομάδες τροφίμων οι οποίες συσχετίζονται μεταξύ τους ($|r| > 0.2$). Αρχικά αποφασίστηκε ποιοι παράγοντες θα χρησιμοποιηθούν εφαρμόζοντας το κριτήριο: το ποσοστό της αρχικής μεταβλητότητας που ερμηνεύουν οι παράγοντες πρέπει να καλύπτει το 80%. Σύμφωνα με αυτό χρησιμοποιήθηκαν 8 απο τους 12 παράγοντες. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε μια ορθογώνια περιστροφή για να προαχθούν οι βέλτιστοι μη συσχετιζόμενοι παράγοντες (διατροφικά πρότυπα). Οι πληροφορίες περιστράφηκαν προκειμένου να αυξηθεί η αντιπροσώπευση κάθε τροφίμου σε ένα παράγοντα,κάτι που αυξάνει την ερμηνεία του καθενός παράγοντα. Με βάση την αρχή ότι οι παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν ερμηνεύονται με τον ίδιο τρόπο που ερμηνεύονται και οι συντελεστές συσχετισμού, κατά συνέπεια προέκυψε ότι οι υψηλότερες απόλυτες τιμές δείχνουν ότι κάθε τρόφιμο-μεταβλητή συμβάλλει πιο πολύ στην υλοποίηση του διατροφικού προτύπου σύμφωνα με τα αποτελέσματα των τροφίμων που συσχετίστηκαν περισσότερο με τους παράγοντες (σκορ>0.5). Αφού εντοπιστούν τα διατροφικά πρότυπα στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση για να διαπιστωθεί κατά πόσο τα συγκεκριμένα διατροφικά πρότυπα επηρεάζουν τη σχέση μεταξύ επιπέδων ορού Se καθώς και ειδών Se και διαφόρων κλινικών, βιοχημικών χαρακτηριστικών και χαρακτηριστικών αποτίμησης τρόπου ζωής.

Ο προσδιορισμός της επιθυμητής τιμής κατανάλωσης (μερίδα/εβδομάδα) μιας ομάδας τροφίμων η οποία να αντιστοιχεί σε επίπεδα Se ικανά τόσο για την σύνθεση των πρωτεϊνών Se οσό και την ενεργοποίησή τους βασίστηκε στη μεγαλύτερη απόσταση από τη διαγώνιο της καμπύλης ROC (receiver operating characteristic curve)[ευαισθησία-1-(ειδικότητα)]

Τέλος, εφαρμόστηκε η διακρίνουσα ανάλυση για την ιεράρχηση των παραγόντων που επέδρασαν στη διαφοροποίηση των τιμών της πρωτεΐνικής κατανομής GPx-3/selP. Η διακρίνουσα ανάλυση χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπου επιθυμείται ο σχεδιασμός ενός μοντέλου διάκρισης που βασίζεται στα παρατηρούμενα χαρακτηριστικά κάθε περίπτωσης. Η διαδικασία γενικεύει μια διαχωριστική λειτουργία (ή για περισσότερες απο δύο ομάδες ένα πακέτο διαχωριστικών λειτουργιών) που βασίζεται στους γραμμικούς συνδυασμούς των μεταβλητών που προβλέπουν ότι

παρέχει τον καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ ομάδων. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε $p<0.05$. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται το στατιστικό πακέτο SPSS version 16.0.

Κεφάλαιο 4ο: Αποτελέσματα της Μελέτης

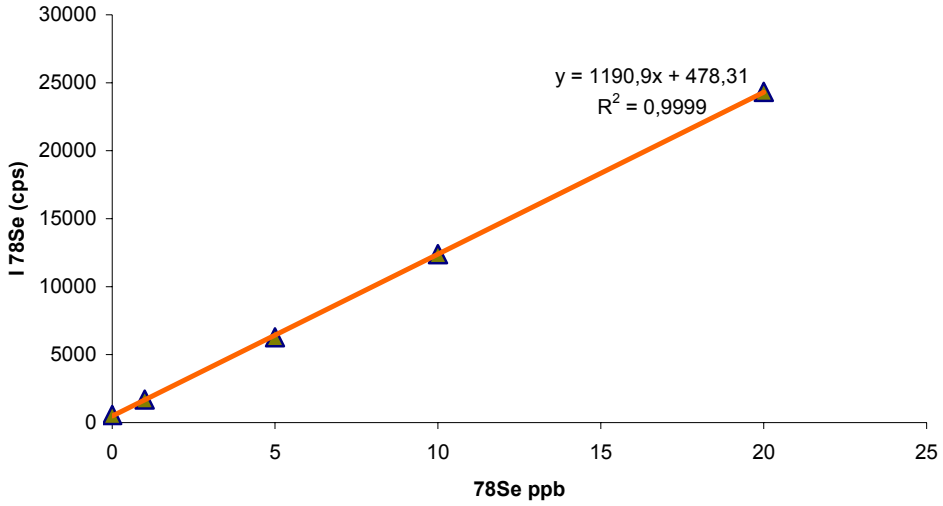
4.1 Αποτελέσματα από τη μέθοδο για προσδιορισμό επιπέδων ολικού σεληνίου σε ανθρώπινο ορό αίματος

4.1.1. Μέθοδος για προσδιορισμό επιπέδων ολικού σεληνίου σε ανθρώπινο ορό αίματος- Ανάλυση Αποτελεσμάτων.

Σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε (§ 3.4.1) αναλύθηκαν 506 δείγματα ορού αίματος. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο παρατηρήθηκαν τα τρία ισότοπα του Se: ^{77}Se, ^{78}Se καθώς και ^{82}Se. Παρόλο αυτά, στη ποσοτική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε μόνο το ισότοπο ^{78}Se.

Χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων Se 0, 1, 4, 10, 20 μg Se/L για την ποσοτική ανάλυση των αραιωμένων (1:10) δειγμάτων. Η καμπύλη βαθμονόμησης που προέκυψε φαίνεται στο σχήμα 4.1. Το όριο ανίχνευσης που επιτεύχθηκε με την παρούσα μέθοδο ήταν 0.1 μg Se/L. Τέλος, κατά τη διάρκεια της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε ^{115}In ως εσωτερικό πρότυπο.

Η ακρίβεια και η ορθότητα της πειραματικής διαδικασίας πιστοποιήθηκε με την ανάλυση πρότυπου υλικού ορού που περιείχε πιστοποιημένη ποσότητα Se. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το BCR-637 (European Commission, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements). Κάθε 40-50 δείγματα ορού αίματος πραγματοποιούνταν ανάλυση του BCR-637. Η συγκέντρωση του BCR-637 που προέκυψε ήταν 82 ± 6 μg Se /L (n=12) η οποία είναι σε συμφωνία με την αρχική πιστοποιημένη του τιμή 81 ± 7 μg Se /L. Αντίστοιχα ο μέσος όρος συγκέντρωσης Se στα δείγματα ορού αίματος που αναλύθηκαν ήταν 91.9 ± 33.7 μg/L (n= 506).



Σχήμα 4.1. Καμπύλη βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό των επιπέδων ολικού σεληνίου.

4.2 Αποτελέσματα από τη μέθοδο για ειδοπροσδιορισμό σεληνίου σε ανθρώπινο ορό αίματος

4.2.1 Βελτιστοποίηση αναλυτικής μεθόδου για ειδοπροσδιορισμό σεληνίου σε ανθρώπινο ορό αίματος. Ανάλυση Αποτελεσμάτων.

Στην παρούσα μελέτη επιτεύχθηκε η ανίχνευση των πρωτεϊνών Se με μέθοδο στηριζόμενη στη χρωματογραφία συγγένειας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (dcAF-LC- (me) ID - ICP-QMS) ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός τους έγινε με ισοτοπική αραίωση (κεφ. 3.3).

Αξιολογήθηκε και βελτιστοποιήθηκε η αναλυτική μέθοδος που αρχικά εφαρμόστηκε από τον Reyes και τους συνεργάτες του [220] η οποία στη συνέχεια τροποποιήθηκε από τον Jitaru και τους συνεργάτες του [221]. Συγκεκριμένα, βελτιστοποιήθηκε η μέθοδος που βασίστηκε στη χρωματογραφία συγγένειας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS). Η σχηματική παράσταση της διάταξης του συστήματος φαίνεται στην εικόνα 3.2. Επιπλέον, ένα αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα (μάζας-χρόνου) που προέκυψε μετά από ανάλυση των δειγμάτων παρουσιάζεται στο σχήμα 4.2. Η μετατροπή ενός χρωματογραφήματος

(απόκριση-χρόνου) σε χρωματογράφημα (μάζας-χρόνου) έγινε μέσω καλά τεκμηριωμένων εξισώσεων που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο της ισοτοπικής αραίωσης (§ 3.3). Οι χρόνος έκλουσης των πρωτεϊνών Se της συγκεκριμένης μελέτης, όπως φαίνονται στο χρωματογράφημα του σχήματος 4.2, συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες [220-222]. Συγκεκριμένα, η πρώτη κορυφή Se που προέκυψε μετά από εισαγωγή του δείγματος στο σύστημα είναι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης-3 [220-222](Σχ.4.2). Στην ίδια κορυφή είναι πιθανό να βρίσκονται και μικρότερες οργανικές ενώσεις Se. Παρόλ' αυτά οι ενώσεις αυτές έχουν παρατηρηθεί σε ιχνοποσότητες και η παρουσία τους πιθανολογείται να οφείλεται κυρίως στην αποθήκευση των δειγμάτων σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία [242] έτσι η κυρίαρχη ένωση στη συγκεκριμένη περιοχή ανίχνευσης προκύπτει να είναι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης-3 (GPx-3). Η δεύτερη κορυφή Se που προέκυψε μετά από έκλουση του δείγματος από τη στήλη Hep-HP αντιστοιχεί στην σεληνοπρωτεΐνη P (SelP) [220-222] (Σχ.4.2). Τέλος, η τρίτη κορυφή που προέκυψε μετά από έκλουση του δείγματος από τη στήλη Blue-HP αντιστοιχεί στην σεληνοαλβουμίνη (SeAlb) [220-222](Σχ.4.2).

Η βελτιστοποίηση που έγινε αφορούσε κυρίως στην απομάκρυνση παρεμποδίσεων με τη μορφή $ArCl^+$ εξαιτίας της πολύ υψηλής συγκέντρωσης ιόντων Cl της μήτρας των δειγμάτων ορού. Ο σχηματισμός παρεμποδίσεων δυσχεραίνει την ανίχνευση των ισοτόπων ^{77}Se και ^{78}Se του Se. Το συμβατικό μοντέλο ICP-MS που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή, εν αντιθέσει με τη μελέτη [220], απαιτούσε την ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου υψηλής ευαισθησίας προκειμένου να αναπτυχθεί μέθοδος με τον επιτυχή προσδιορισμό των ισοτόπων ^{77}Se και ^{78}Se του Se. Στη μελέτη του Jitaru και των συνεργατών του προκειμένου για την αποφυγή των παρεμποδίσεων εισάχθηκε στο σύστημα των δύο στηλών χρωματογραφίας συγγένειας και μια τρίτη στήλη ανιοανταλλαγής (AE)[221] Στην παρούσα μελέτη, η απομάκρυνση των παρεμποδίσεων επιτεύχθηκε με την εισαγωγή 4.2 % v/v μεθανόλης στο σύστημα ICP-MS (§ 3.4.2). Η εισαγωγή οργανικού διαλύτη για ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών Se χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ενώ έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τον ποσοτικό προσδιορισμό επιπέδων ολικού Se καθώς και ειδοπροσδιορισμό μικρών οργανικών ενώσεων Se σε βιολογικά δείγματα [243]. Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, φάνηκε ότι η εισαγωγή οργανικού διαλύτη συμβάλλει στην ενίσχυση της απόκρισης σήματος του αναλυτή, απομάκρυνση παρεμποδίσεων και στην αύξηση της σταθερότητας των παραμέτρων της μεθόδου κατά την ανάλυση [243].

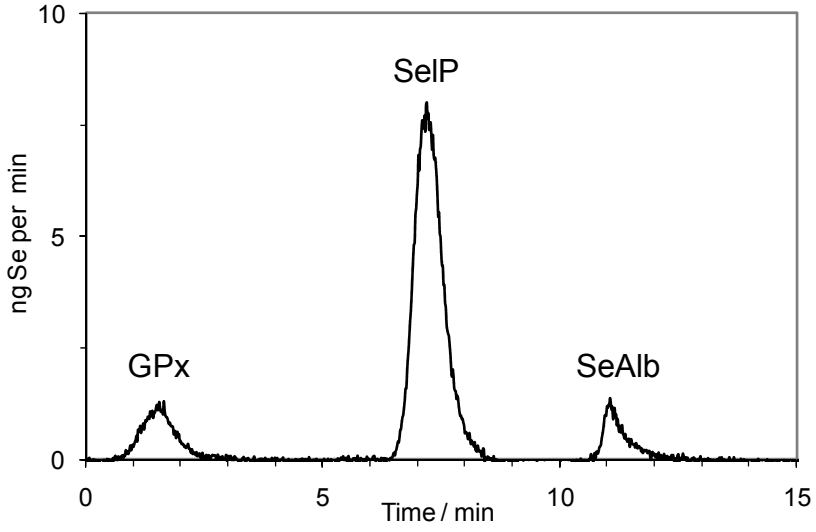
Ειδικότερα στη συγκεκριμένη μελέτη, παρατηρήθηκε ότι η εισαγωγή μεθανόλης ενίσχυσε την ευαισθησία της μεθόδου για τον προσδιορισμό Se κατά πέντε φορές όταν χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης Α και κατά μιάμιση φορά όταν χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης Β. Αυτό φαίνεται και στο σχήμα 4.3. Στο σχήμα 4.3 φαίνονται τρία χρωματογραφήματα τα οποία προέκυψαν κατά την ανάλυση δείγματος που περιείχε 5 mg L^{-1} Br και 3.5 g L^{-1} Cl με και χωρίς την προσθήκη μεθανόλης στο σύστημα. Οι ποσότητες Br και Cl που περιέχονταν στο δείγμα προσομοιώνουν τις αντίστοιχες ποσότητες αλάτων που περιέχονται στο ανθρώπινο αίμα. Σύμφωνα με την απόκριση του σήματος στα σχήματα 4.3α και 4.3b η προσθήκη μεθανόλης ευνοούσε την απομάκρυνση των παρεμποδίσεων της μορφής $^{40}Ar^{37}Cl^{+}$ καθώς και $^{40}Ar^{38}Ar^{+}$ αντίστοιχα. Αντίθετα κάτι τέτοιο δεν συνέβαινε για το ισότοπο ^{82}Se γιατί σύμφωνα με το σχήμα 4.3c η παρεμπόδιση της μορφής $^{1}H^{81}Br^{+}$ δεν απομακρυνόταν με την προσθήκη μεθανόλης. Έτσι, γίνεται εμφανές ότι ο ακριβής προσδιορισμός των πρωτεϊνών Se στηρίχθηκε στον προσδιορισμό των ισοτόπων 77 και 78 του Se.

Οι μικρές αυξομειώσεις που παρατηρήθηκαν στην απόκριση σήματος και αφορούν m/z 77 και 78 (Σχ.4.3) προήλθαν από την εναλλαγή της βαλβίδας εναλλαγής από τη θέση Α στη θέση Β (Εικ.3.3,Εικ.3.4) ή το αντίθετο (το οποίο προϋποθέτει αντίστοιχα την εναλλαγή από την κινητή φάση υψηλής συγκέντρωσης (1.5 Μ οξικό αμμώνιο) σε κινητή φάση χαμηλής συγκέντρωσης (0.05 Μ οξικό αμμώνιο). Κατά την εναλλαγή της κινητής φάσης από υψηλότερης συγκέντρωσης σε χαμηλότερης υπήρχε ένα διάστημα 1min (10-11min)(Σχ. 4.3) όπου το σήμα επηρεαζόταν από την ποσότητα της κινητής φάσης χαμηλής συγκέντρωσης όπου είχε μείνει στη στήλη Blue Sepharose για 5 min, μεταξύ του διαστήματος 5 και 10 min στη διάρκεια ανάλυσης. Η ποσότητα αυτή, εξέρχεται από το σύστημα κατά την εισαγωγή της στήλης Blue Sepharose στο σύστημα (10min). Παρόλο αυτά οι αυξομειώσεις του σήματος διορθώνονται με την προσθήκη του εμπλουτισμένου ισότοπου ^{77}Se και τις εξισώσεις της ισοτοπικής αραίωσης (§3.3).

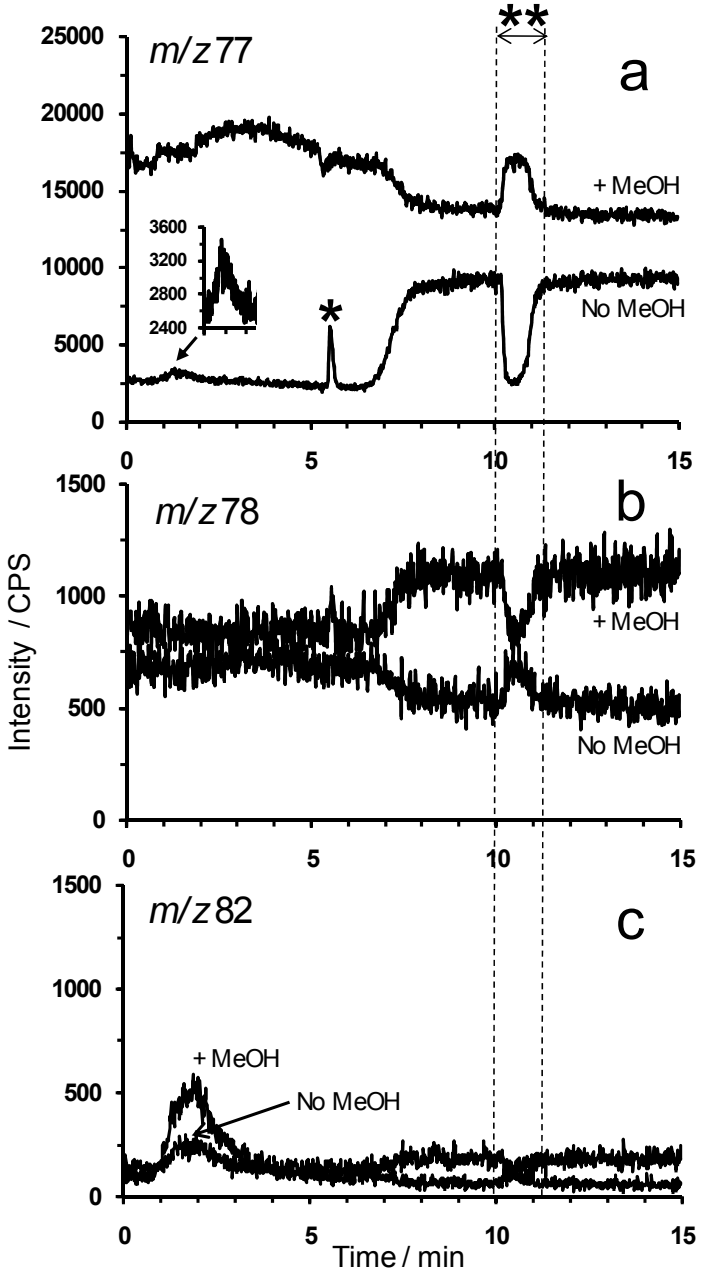
Επιπλέον, κατά την εισαγωγή μεθανόλης στο σύστημα. παρατηρήθηκε ότι όταν η κινητή φάση χαμηλής συγκέντρωσης περνούσε από το σύστημα η απόκριση σήματος για m/z 77 ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με την απόκριση σήματος για m/z 77 όταν περνούσε η κινητή φάση υψηλότερης συγκέντρωσης. Αυτό πιθανώς συνέβαινε γιατί όταν από το σύστημα περνούσε η κινητή φάση υψηλής συγκέντρωσης και ταυτόχρονα γινόταν προσθήκη μεθανόλης, η πηγή άνθρακα (μεθανόλη + κινητή φάση) ξεπερνάει το ιδανικό κατώφλι για τη μέγιστη ένταση σήματος στον προσδιορισμό Se. Το αντίθετο συμβαίνει όταν δεν γίνεται προσθήκη μεθανόλης στο ισοτοπικό διάλυμα. Στην περίπτωση αυτή η κινητή φάση υψηλής συγκέντρωσης είναι η μοναδική πηγή

άνθρακα (Σχ. 4.3α). Τα αντίθετα ισχύουν για την περίπτωση του σήματος m/z 78 (Σχ. 4.3b). Η συμπεριφορά αυτή του ισοτόπου 78 πιθανώς οφείλεται στο σχηματισμό παρεμποδίσεων άγνωστης προέλευσης, και όχι σε παρεμποδίσεις που μπορεί να προέρχονται από τις ακαθαρσίες του ιχνηθετιμένου Se. Παρόλ'αυτά, ο θόρυβος που παρατηρήθηκε είναι πολύ χαμηλός και σταθερός με αποτέλεσμα να μην δημιουργούνται προβλήματα κατά την ανάλυση πρωτεϊνών Se.

Τέλος, παρατηρήθηκαν αυξομειώσεις στην απόκριση του σήματος για m/z 77 κατά την πάροδο των πρώτων 5 λεπτών. Αυτό συμβαίνει λόγω μη-φασματοσκοπικών παρεμποδίσεων. Οι αυξομειώσεις αυτές διορθώνονται μέσω προσθήκης του εμπλουτισμένου ισότοπου ^{77}Se και των εξισώσεων που χρησιμοποιούνται κατά την ισοτοπική αραίωση (§. 3.3).



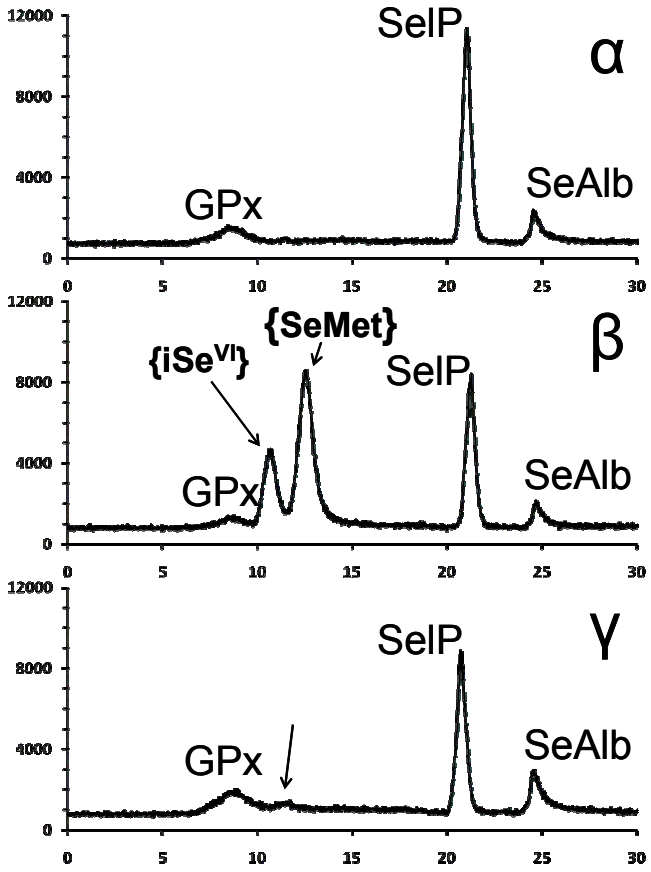
Σχήμα 4.2. Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα ροής μάζας πρωτεϊνών σεληνίου στον ορό ανθρώπινου αίματος μετά απο εφαρμογή της μεθόδου χρωματογραφία συγγένειας σε συνδυασμό με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα και προσθήκη μεθανόλης (dcAF-LC- methanol enhanced (me) ID - ICP-QMS).



Σχήμα 4.3. Χρωματογράφημα για m/z 77,78,82 που προέκυψαν μετά από ανάλυση δείγματος που περιέχει 5 mg L^{-1} Br^-και 3.5 g L^{-1} Cl H μέθοδος εφαρμόστηκε με ή χωρίς την προσθήκη μεθανόλης στο ισοτοπικό διάλυμα. (*) αυξομείωση στην απόκριση του σήματος εξαιτίας εναλλαγών της περιστροφικής βαλβίδας. (**) αυξομείωση στην απόκριση του σήματος εξαιτίας εναλλαγών των κινητών φάσεων A,B.

Στη συνέχεια της μελέτης, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω διερεύνηση της συνύπαρξης μικρών οργανικών μορίων και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Για το σκοπό αυτό έγινε σύζευξη

χρωματογραφικής στήλης μοριακού αποκλεισμού (Size Exclusion Chromatography) στο σύστημα dAF-ICP-MS. Προκαταρτικά πειράματα έδειξαν ότι η προσθήκη της στήλης SEC βελτιώνει τη διαχωριστική ικανότητα της μεθόδου dAF-ICP-MS διότι επιτρέπει το διαχωρισμό των μικρών μορίων Se από τις σεληνοπρωτεΐνες, ειδικότερα από την GPx. Μετά από ανάλυση 7 δειγμάτων ορού φάνηκε η παρουσία μικρών μορίων Se (Σχ.4.4γ) σε ιχνοποσότητες. Παρόλο αυτά, περαιτέρω πειράματα κρίνονται απαραίτητα προκειμένου να διευκρινιστεί πλήρως η ύπαρξη μικρών μορίων Se στον ορό. Στο σχήμα 4.4 φαίνονται τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από το σύστημα dAF-SEC-ICP-MS (Σχ.4.4 α, β,γ).



Σχήμα 4.4. Χρωματογραφήματα που προέκυψαν από την εφαρμογή του συστήματος dAF-SEC-ICP-MS για το ισότοπο 78Se μετά από ανάλυση δειγμάτων (α) πιστοποιημένου ορού BCR 637 (β) πιστοποιημένου ορού BCR 637 στον οποίο έγινε εισαγωγή σεληνομεθειονίνης (SeMet, 33 ng Se ml^{-1}) και σεληνιώδους οξέος (iSeVI, 20ng Se ml^{-1}) (γ) δείγμα ορού αίματος, το βέλος δείχνει την παρουσία μικρού μορίου Se.

4.2.2. Σύγκριση επιπέδων πρωτεϊνών Se με άλλες μελέτες καθώς και με υλικά αναφοράς.

Μια από τις δυσκολίες κατά τον ειδοπροσδιορισμό Se σε δείγματα ορού είναι ότι δεν υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα, υλικά αναφοράς ανθρώπινου ορού με πιστοποιημένη τιμή Se στις πρωτεΐνες Se ώστε να είναι εφικτή η άμεση σύγκριση με αποτελέσματα διαφόρων προηγούμενων μεθόδων. Αντίθετα, υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα υλικά αναφοράς ανθρώπινου ορού με πιστοποιημένη τιμή ολικού Se (BCR 637, 638, 639, Seronorm 1 , Seronorm 2)[221,222,244,245]. Πρόσφατα, το BCR 637 έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για αναλύσεις ειδοπροσδιορισμού Se με διάφορες αναλυτικές μεθόδους απο τον Jitaru και τους συνεργάτες του [221,222] βασισμένες στη χρωματογραφία συγγένειας σε συνδυασμό με φασματόμετρα μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος είτε με τετραπολικό αναλυτή είτε με αναλυτές μαγνητικού και ηλεκτροστατικού πεδίου. Έτσι, για τη συγκεκριμένη έρευνα, υπάρχουν σημαντικές πληροφορίες για ότι αφορά στον ειδοπροσδιορισμό Se σε ανθρώπινο ορό.

Στη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχθηκαν σαν υλικά αναφοράς τα BCR 637, 638 και 639. Τα υλικά αυτά αναλύθηκαν συστηματικά μία ή δύο φορές για κάθε 20 δείγματα ορού από τα 399 δείγματα ορού που αναλύθηκαν συνολικά. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν σε σχέση με αποτελέσματα άλλων μελετών φαίνονται στον πίνακα 4.1. Σύμφωνα με τα ευρήματα του πίνακα 4.1 τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα άλλων μελετών. Ειδικότερα, στον πίνακα 4.1 παρουσιάζονται μελέτες ειδοπροσδιορισμού Se στις οποίες χρησιμοποιήθηκε ICP με τετραπολικό αναλυτή με (CRC-ICP-QMS)[244] ή χωρίς κυψελίδα πρόσκρουσης, ICP με αναλυτές μαγνητικού και ηλεκτροστατικού πεδίου ((SF) ICP-MS)[245]. Επιπροσθέτως, στις μελέτες αυτές ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε είτε με καμπύλη εξωτερικής βαθμονόμησης είτε με ισοτοπική αραίωση. Επιπλέον, στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε τετραπολικός αναλυτής η απομάκρυνση ιόντων Cl και Br, έγινε με τη βοήθεια στήλης ανιοανταλλαγής(AE) (on-line or off-line). Στις μελέτες αυτές παρατηρήθηκε υψηλότερη συγκέντρωση σεληνοαλβουμίνης, το οποίο πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι η καθυστερημένη έκλουση των ιόντων Cl και Br συμβάλλει στη δημιουργία παρεμποδίσεων οι οποίες εκλούονται μαζί με τη σεληνοαλβουμινη. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης που αφορούν στη συγκέντρωση της σεληνοαλβουμίνης συμφωνούν με τα αποτελέσματα μελετών στις οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί αναλυτές μαγνητικού και ηλεκτροστατικού πεδίου ((SF) ICP-MS)[245]. Τέλος, στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν και υλικά αναφοράς όπως το BCR 638, 639 που περιέχουν ανόργανο Se. Όπως φαίνεται από τον πίνακα 4.1 οι τιμές που αντιστοιχούν στη GPx-3 δεν

διαφοροποιούνται σε σχέση με την τιμή που αντιστοιχεί στο BCR 637. Επιπλέον, για πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκαν τα υλικά αναφοράς Seronorm Level 1/Level 2 [244,245], τα οποία φαίνεται να δίνουν συγκρίσιμα αποτελέσματα με τα αντίστοιχα υλικά αναφοράς BCR.

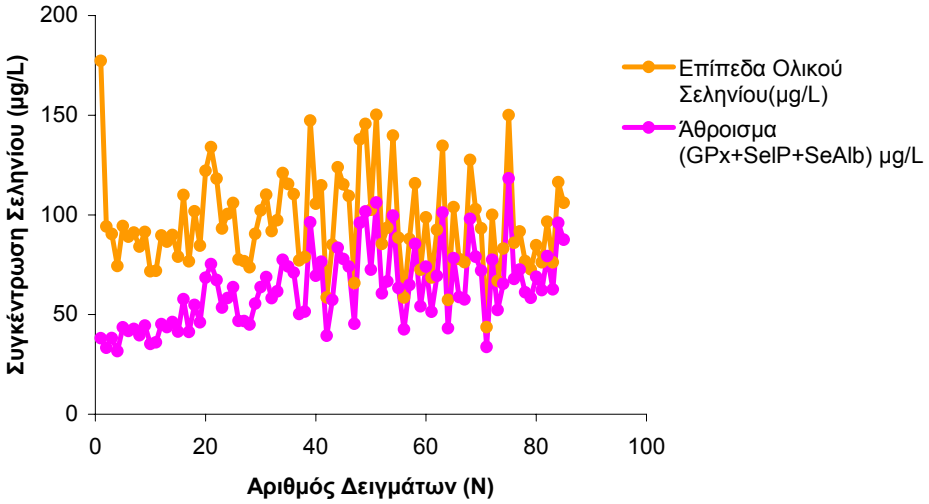
Αξίζει να σημειωθεί ότι με την αναλυτική μέθοδο που παρουσιάστηκε αναλύθηκε ο μεγαλύτερος αριθμός υλικών αναφοράς ορού (n=27) σε σχέση με τις άλλες μελέτες. Ο περιορισμένος αριθμός αναλύσεων που παρουσιάστηκε από άλλες μελέτες λαμβάνει χώρα σε ένα εικοσιτετράωρο, αντίθετα η συγκεκριμένη ανάλυση διήρκεσε πολλούς μήνες. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια των αναλύσεων χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά μπουκαλάκια υλικών αναφοράς. Με το τέλος της κάθε ανάλυσης τα μπουκαλάκια με το υλικό αναφοράς ορού φυλάσσονταν στο ψυγείο στους -82 ^{o}C μέχρι την επόμενη ανάλυση. Όλα τα παραπάνω πιθανός να συνέβαλλαν στις μεγαλύτερες τυπικές αποκλίσεις που παρουσιάστηκαν σε σχέση με τις άλλες μελέτες. Στη συνέχεια συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης με άλλες μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ανοσολογικές τεχνικές για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων Se στον ορό (Πιν. 4. 2). Για τον σκοπό της σύγκρισης έγινε μετατροπή των συγκεντρώσεων πρωτεϊνών από ανοσολογικές τεχνικές σε συγκέντρωση Se. Η μετατροπή βασίστηκε στην παραδοχή ότι η σεληνοπρωτεΐνη P περιέχει 10 άτομα Se με τη μορφή σεληνοκυστεΐνης ενώ σε κάθε μονομέρες της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης περιέχεται ένα άτομο Se με μορφή σεληνοκυστεΐνης [41]. Από τον πίνακα 4.2 προέκυψε ότι τα αποτελέσματα με τη μέθοδο dcAF-LC-(Me) ID - ICP-QMS συμφωνούν με τα αποτελέσματα από ανοσολογικές τεχνικές στο μεγαλύτερο βαθμό. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της μελέτης στην οποία χρησιμοποιήθηκε η κλασική ενζυματική μέθοδος (ELISA)[215] αποκλίνουν τόσο από τα αποτελέσματα με τη μέθοδο dcAF-LC-(Me) ID - ICP-QMS όσο και από τα αποτελέσματα των άλλων ανοσολογικών τεχνικών το οποίο πιθανώς να οφείλεται στη χρησιμοποίηση ακατάλληλου αντισώματος πρωτεΐνης Se [213,214]. Επιπλέον, μια άλλη πρόσφατη μελέτη [246] αναφέρει ότι μέθοδος ELISA φαίνεται να υπερεκτιμά σημαντικά την πραγματική συγκέντρωση της GPx-3 στο πλάσμα . Συγκεκριμένα το άτομο του Se είναι επιρρεπές στην οξείδωση έτσι η σταθερότητα των σεληνοπρωτεϊνών GPx-3 και SelP είναι υπό διερεύνηση [246,247]. Επιπλέον, στις μεθόδους αυτές, η παρουσία της GPx-3 μπορεί να συγχυστεί με την παρουσία άλλων μορφών GPx, όπως είναι, η GPx-5 ή η GPx-6. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες παρουσιάζουν μια σημαντική δομική ομοιότητα με την GPx-3 ενώ δεν περιέχουν Se γιατί στο ενεργό τους κέντρο περιέχεται κυστεΐνη αντί για σεληνοκυστεΐνη. Τέλος, προηγούμενη μελέτη κατέγραψε την απομόνωση ανθρώπινης υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και χρησιμοποίηση αυτής ως πρότυπο αναφοράς χωρίς όμως να

καταλήγει σε ακριβή αποτελέσματα μιας και υπερεκτιμάται το ποσοστό Se στην υπεροξειδάση της γλουταθειόνης-3 σε χαμηλά επίπεδα ορού Se [248].

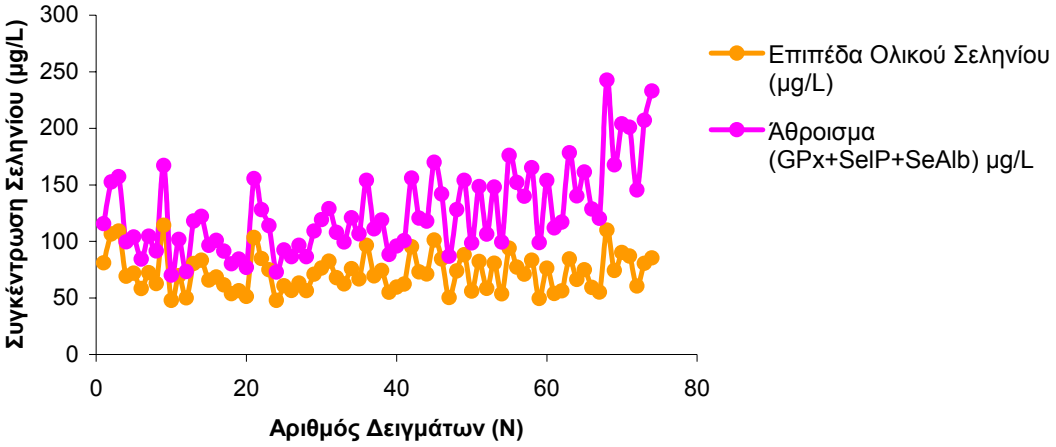
4.2.3 Σύγκριση αποτελεσμάτων με τα αποτελέσματα της μεθόδου ολικού προσδιορισμού σεληνίου.

Στο υποκεφάλαιο αυτό γίνεται μια σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους που παρουσιάστηκαν (§3.4.1,§3.4.2). Η σύγκριση αφορά στον υπολογισμό των επιπέδων TSe. Με τη μέθοδο για τον ολικό προσδιορισμό Se υπολογίζονται απευθείας ενώ με τη μέθοδο του ειδοπροσδιορισμού Se υπολογίζονται μέσω του αθροίσματος των επιμέρους πρωτεϊνών Se που βρίσκονται στον ορό αίματος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους σε κάποια δείγματα επικράτησε ασυμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων. Ειδικότερα, κάποια δείγματα εμφάνισαν υπερτιμημένες τιμές Se με τη μέθοδο του ολικού προσδιορισμού σε σχέση με τη μέθοδο του ειδοπροσδιορισμού (Σχ.4.5) ενώ κάποια άλλα εμφάνισαν υπερτιμημένες τιμές ολικού Se με τη μέθοδο του ειδοπροσδιορισμού (Σχ.4.6). Παρόλο αυτά στο μεγαλύτερο ποσοστό των δειγμάτων επικρατεί συμφωνία αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο μεθόδων (Σχ.4.7).

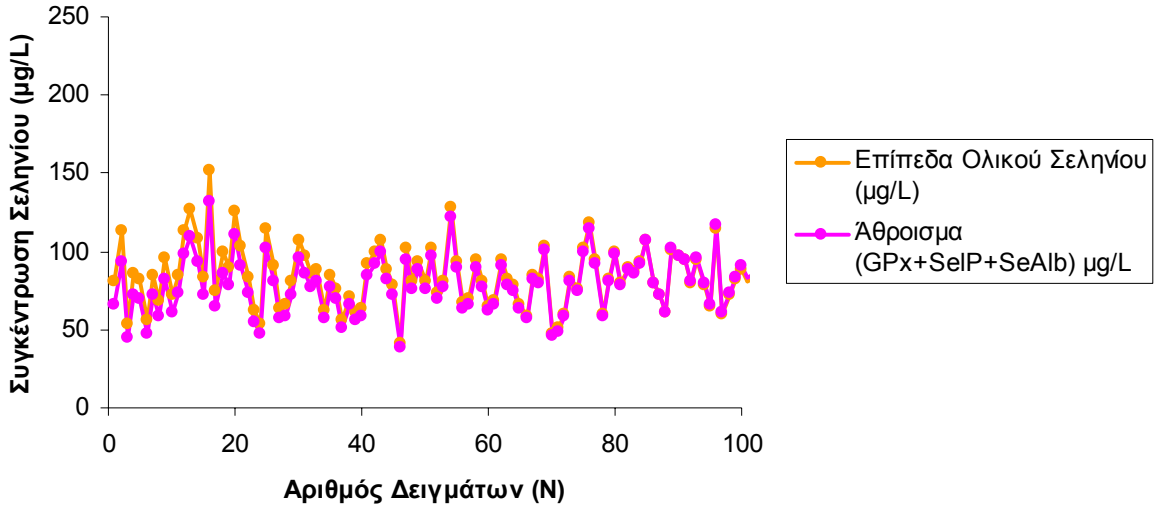
Η ασυμφωνία που παρατηρήθηκε σε ορισμένα δείγματα οφείλεται σε διάφορους λόγους. Καθοριστική διαφορά των δύο μεθόδων αποτελεί το γεγονός ότι κατά τη μέθοδο συνεχής εισαγωγής δείγματος στο ICP-MS, χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο το ^{115}In ενώ αντίστοιχα στη μέθοδο του ειδοπροσδιορισμού χρησιμοποιήθηκε το ^{77}Se το οποίο σαφώς υπερτερεί του εσωτερικού προτύπου ^{115}In μιας και παρουσιάζει όμοιες ιδιότητες με τον αναλύτη που παρακολουθείται. Επιπλέον, ο ποσοτικός προσδιορισμός με τη μέθοδο συνεχής εισαγωγής δείγματος στο ICP-MS στηρίχθηκε στη κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης ενώ αντίστοιχα ο ποσοτικός προσδιορισμός με τη μέθοδο του ειδοπροσδιορισμού στηρίχθηκε στην ισοτοπική αραίωση τα πλεονεκτήματα της οποίας σχέση με τις κλασικές μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού έχουν ήδη αναφερθεί (§3.3). Σύμφωνα με τα παραπάνω η μέθοδος του ειδοπροσδιορισμού υπερτερεί της μεθόδου συνεχής εισαγωγής δείγματος στο ICP-MS. Έτσι, στο υποκεφάλαιο που ακολουθεί η βιοστατιστική ανάλυση έγινε με βάση τα αποτελέσματα της μεθόδου ειδοπροσδιορισμού, προκειμένου να διασφαλιστεί η ακρίβεια και η πιστότητα τόσο στη παρουσίαση των αποτελεσμάτων αλλά και στην ερμηνεία τους. Συγκεκριμένα σαν ολικό Se ορού χρησιμοποιήθηκε το άθροισμα των επιμέρους πρωτεϊνών Se.



Σχήμα 4.5 Επίπεδα Se (μg/L) με τη μέθοδο συνεχής εισαγωγής δείγματος (πορτοκαλί χρώμα) καθώς και με τη μέθοδο ειδοπροσδιορισμού (ρόζ χρώμα). Κάποια δείγματα εμφάνισαν υπερτιμημένες τιμές Se με τη μέθοδο συνεχής εισαγωγής δείγματος στο ICP-MS σε σχέση με τη μέθοδο του ειδοπροσδιορισμού



Σχήμα 4.6. Επίπεδα Se (μg/L) με τη μέθοδο συνεχής εισαγωγής δείγματος (πορτοκαλί χρώμα) καθώς και με τη μέθοδο ειδοπροσδιορισμού (ρόζ χρώμα). Κάποια δείγματα εμφάνισαν υπερτιμημένες τιμές Se με τη μέθοδο του ειδοπροσδιορισμού σε σχέση με τη μέθοδο απευθείας εισαγωγής δείγματος στο ICP-MS.



Σχήμα 4.7 Επίπεδα Se (μg/L) με τη μέθοδο συνεχής εισαγωγής δείγματος (πορτοκαλί χρώμα) καθώς και με τη μέθοδο ειδοπροσδιορισμού (ρόζ χρώμα). Επικρατεί συμφωνία στα αποτελέσματα με τις δύο μεθόδους.

4.2.4 Συμπεράσματα

Η συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδος που παρουσιάστηκε εφαρμόστηκε στο μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ορού μέχρι σήμερα. Επιπλέον, έχει αναλυθεί και ο μεγαλύτερος αριθμός υλικών αναφοράς Se. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι συγκρίσιμα με τις περισσότερες μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε διαφορετική αναλυτική μέθοδος. Ειδικότερα, έλαβε χώρα η σύγκριση ανάμεσα στα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης με μελέτες βασιζόμενες στη φασματομετρία μάζας αλλά και σε ανοσολογικές τεχνικές.

Όσον αφορά τις μελέτες βασισμένες στη φασματομετρία μάζας όπου χρησιμοποιείται τετραπολικός αναλυτής, η προσθήκη μεθανόλης φαίνεται να ευνοεί την απομάκρυνση παρεμποδίσεων που οφείλονται στη μήτρα των δειγμάτων σε σχέση με τη χρησιμοποίηση στήλης ανιοανταλλαγής. Το γεγονός αυτό καθώς και το γεγονός ότι πρόκειται για τη λιγότερο χρονοβόρα μέθοδο ενισχύει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Επιπροσθέτως τα αποτελέσματα της μεθόδου είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν απο τις μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν ICP με αναλυτές μαγνητικού και ηλεκτροστατικού πεδίου ICP-MS στις αναλύσεις. Το προαναφερθέν καθώς και το γεγονός ότι τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των ενώσεων με την ισοτοπική αραίωση συμφωνούν με τη μέθοδο καμπύλης εξωτερικής βαθμονόμησης ενισχύει την αξιοπιστία της μεθόδου. Τέλος, προέκυψε ότι ο ταυτόχρονος προσδιορισμός ενώσεων Se σε ορό αίματος λαμβάνει χώρα μόνο με την εφαρμογή

φασματομετρίας μάζας.

Όσον αφορά τις μελέτες βασισμένες σε ανοσολογικές τεχνικές ,τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι συγκρίσιμα με τις περισσότερες από αυτές. Παρόλ' αυτά οι μελέτες βασισμένες στη μέθοδο ELISA φέρουν αντικρουόμενα αποτελέσματα τόσο με τη συγκεκριμένη μελέτη όσο και με άλλες μελέτες βασισμένες στη φασματομετρία μάζας. Το γεγονός αυτό απαιτεί την ιδιαίτερη προσοχή μελλοντικών μελετών με την τεχνική αυτή για τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες.

Τέλος, η συγκεκριμένη μέθοδος πλεονεκτεί και στον υπολογισμό των επιπέδων ολικού Se σε σχέση με τη μέθοδο συνεχής εισαγωγής δείγματος στο ICP-MS. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι απαιτείται ιδιαίτερη διερεύνηση ως προς τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό επιπέδων ολικού Se σε ορό αίματος.

Πίνακας 4.1 Σύγκριση των αποτελεσμάτων των υλικών αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν

Μελέτες	Μέθοδος	No Δειγμάτων	GPx-3 + ιχνοποσότητες ανόργανων ενώσεων Se	SelP	SeAlb	Άθροισμα (GPx-3+ SelP+ SeAlb)	Πιστηποιημένη τιμή σελήνιο (ng mL^{-1})	% Ανάκτηση
			ng Se /ml ανθρώπινου ορού αίματος					
BCR 637							81 ± 7	
Συγκεκριμένη Μελέτη	dcAF-LC -[ON-meID]-ICP-QMS	27	16 ± 3	52 ± 5	8.9 ± 2.5	77 ± 9		95 ± 12
221	AE-dcAF-LC-[ON-ID]-ICP-QMS	3	13 ± 1	65 ± 5	14 ± 1	92 ± 5		114 ± 9
221	AE-dcAF-LC-[ON-EC]-ICP-QMS	3	13 ± 1	59 ± 2	16 ± 1	88 ± 2		109 ± 7
221	AE-dcAF-LC-[OFF-EC]-ICP-SFMS	3	10 ± 1	57 ± 2	7 ± 1	74 ± 2		91 ± 7
222	AE-SPE- dcAF-LC-[ON-EC]-ICP-QMS	3	9.9 ± 0.1	51 ± 1	18 ± 3	79 ± 3		98 ± 8
222	dcAF-LC-[ON-EC]-ICP-QMS	3	30.4 ± 0.3	57 ± 1	24 ± 0.4	111 ± 1		137 ± 7
244	dcAF-LC-[ON-EC]-CRC-ICP-QMS	3	11 ± 1	54 ± 2	12 ± 1	77 ± 2		95 ± 8
245	dcAF-LC -[ON-ID]-ICP-SFMS	3	18 ± 1	61 ± 3	13 ± 1	92 ± 3		114 ± 8
245	AE-dcAF-LC -[ON-ID]-ICP-QMS	3	13 ± 1	65 ± 5	14 ± 1	92 ± 5		114 ± 9
245	dcAF-LC -[ON-EC]-ICP-SFMS	3	18 ± 1	62 ± 9	9 ± 1	89 ± 9		110 ± 11
245	AE-dcAF-LC -[ON-EC]-ICP-QMS	3	13 ± 1	59 ± 1	16 ± 1	88 ± 2		109 ± 7
BCR 639							133 ± 12	
Συγκεκριμένη Μελέτη	dcAF-LC -[ON-meID]-ICP-QMS	7	48 ± 5	52 ± 3	15 ± 4	115 ± 1		86 ± 5
222	AE-SPE- dcAF-LC-[ON-EC]-ICP-QMS	3	9 ± 1	56 ± 1	18 ± 3	83 ± 3		62 ± 12
222	dcAF-LC-[ON-EC]-ICP-QMS	3	62 ± 1	54 ± 1	25.1 ± 0.2	141 ± 2		106 ± 12
BCR 638							104 ± 7	
Συγκεκριμένη Μελέτη	dcAF-LC - [ON-meID]-ICP-QMS	3	23 ± 4	54 ± 12	12 ± 3	90 ± 5		86 ± 15
SERONORM LEVEL 1								
245	dcAF-LC-[ON-EC]-CRC-ICP-QMS	3	10.7 ± 0.7	44 ± 1	13.4 ± 0.4	68 ± 1	59 ± 3	115 ± 3
SERONORM LEVEL 2								
245	dcAF-LC-[ON-EC]-CRC-ICP-QMS	3	72 ± 4	47 ± 1	16 ± 1	135 ± 4	136 ± 9	99 ± 10

Συντομεύσεις

dcAF: Δύο στήλες χρωματογραφίας συγγένειας
AE: στήλη ανιοανταλλαγής
ON-ID: on-line ισοτοπική αραίωση
ON-meID: on-line προσθήκη μεθανόλης για ισοτοπική αραίωση
OFF-EC: Off-line καμπύλη εξωτερικής βαθμονόμησης
ON-EC: on-line καμπύλη εξωτερικής βαθμονόμησης
AE-SPE: στήλη ανιοανταλλαγής- εκχύλιση στερεάς φάσης
ICP-QMS: επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα με τετράπολο αναλύτη
ICP-SFMS: ICP με αναλυτές ηλεκτροστατικού και μαγνητικού πεδίου
CRC-ICP: ICP με κυψελίδα πρόσκρουσης

Πίνακας 4.2. Σύγκριση των αποτελέσματα των πρωτεϊνών Se στη μελέτη αυτή με προηγούμενες μελέτες

Μελέτη	Μέθοδος	No εθελοντών	Κατάσταση εθελοντών	GPx -3	SelP	SeAlb	ολικό σελήνιο (μg/L)
				μg Se/ L ανθρώπινου ορού αίματος			
Συγκεκριμένη μελέτη	dcAF-LC -[ON-mID]-ICP-QMS	399	φυσιολογικοί	23 ± 10	49 ± 15	11 ± 5	91 ± 33
212	SPE-ICP-QMS	5	φυσιολογικοί	ND	0.3-70.8 *	ND	
219	MARC-SEC-ICP-QMS	1	φυσιολογικοί	16 ± 2	20 ± 2	28 ± 2	61 ± 4
221	AE-dcAF-LC-[ON-ID]-ICP-QMS	3	φυσιολογικοί	13 ± 1	69 ± 5	14 ± 1	99 ± 3
	AE-dcAF-LC-[ON-EC]-ICP-QMS	3	φυσιολογικοί	17 ± 1	62.9 ± 0.3	15 ± 1	
	AE-dcAF-LC-[OFF-EC]-ICP-SFMS	3	φυσιολογικοί	14 ± 1	65 ± 7	10 ± 2	
222	AE-SPE-dcAF-LC-[ON-EC]-ICP-QMS	3	φυσιολογικοί	26 ± 1	62 ± 2	22 ± 1	110 ± 2
222	dcAF-LC-[ON-EC]-ICP-QMS	3	φυσιολογικοί	10.0 ± 0.3	57 ± 1	19 ± 1	86 ± 1
220	dcAF-LC -[ON-ID]-ICP-QMS	5	φυσιολογικοί	18.6 ± 2.7	54.8 ± 10.6	15 ± 2	99.6 ± 1.83
		5	παθολογικοί	13.8 ±1.5	35.2 ± 7.52	10 ± 2	65.9 ± 1.05
246	ανοσολογική μέθοδος	68	φυσιολογικοί	3.90 - 18.6	7.5-30.6**	ND	30-156
247	ανοσολογική μέθοδος	20	φυσιολογικοί	ND	47.1 ±11.1	ND	ND
		37	παθολογικοί	ND	24.9 ± 6.9	ND	ND
215	ELISA	170	φυσιολογικοί	60 ± 30	ND	ND	108.9 (67.4 268.0)
249	ανοσολογική μέθοδος	318	φυσιολογικοί	ND	47.1 (36-47.1)	ND	98.4 ± 0.2

ND	Μη ανιχνευσιμο
MARC	Multi Affinity Removal Column
SPE	Εκχύλιση στερεάς φάσης
*	με σχετική τυπική απόκλιση 2%
**	arbitrary units
SEC	Στήλη μοριακού αποκλεισμού

4.3 Μέτρηση ολικού σεληνίου και πρωτεϊνών σεληνίου σε ορό φαινομενικά υγειών εθελοντών (Μελέτη ΑΤΤΙΚΗ) - Συσχέτιση με τα διατροφικά χαρακτηριστικά των εθελοντών και παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου.

Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 4.2 η σύγκριση μεταξύ των δύο μεθόδων προσδιορισμού TSe στον ορό, δηλαδή είτε με μέτρηση του Se με άμεση εισαγωγή του δείγματος στο φασματογράφο μάζας, είτε με άθροιση του Se των επιμέρους πρωτεϊνών Se, έδειξε ότι η δεύτερη μέθοδος μπορεί να θεωρηθεί πιο αξιόπιστη. Στα πλαίσια αυτά η παρακάτω στατιστική μελέτη γίνεται χρησιμοποιώντας ως TSe το άθροισμα των επιμέρους πρωτεϊνών Se.

4.3.1 Περιγραφή του πληθυσμού της μελέτης

Ο πληθυσμός μελέτης αποτελούνταν από 163 γυναίκες και 236 άντρες. Στον πίνακα 4.3. παρουσιάζονται τα σημαντικότερα ανθρωπομετρικά, κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού.

Σύμφωνα με τον πίνακα 4.3 οι γυναίκες του πληθυσμού μελέτης είναι νεότερης ηλικίας (37±12) από τους άντρες (40±11). Επίσης, είναι λιγότερο παχύσαρκες (ΔΜΣ: 24±5 έναντι 27±4 Kg/m^2) και καπνίζουν λιγότερο από τους άντρες του πληθυσμού μελέτης (37% έναντι 52%). Αντίθετα, οι άντρες της μελέτης παρουσιάζουν επιβαρημένο κλινικό και βιοχημικό προφίλ σε σχέση με τις γυναίκες σύμφωνα με τα ευρήματα του πίνακα 4.3. Συγκεκριμένα, παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα λιποειδών (ολική χοληστερόλη TC, LDL-χοληστερόλη (LDL-C), τριακυλογλυκερόλες (TAG)) στο αίμα, καθώς και υψηλότερη διαστολική και συστολική αρτηριακή πίεση (ΣΑΠ,ΔΑΠ αντίστοιχα). Όπως αναμενόταν, οι γυναίκες παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα HDL-χοληστερόλη (HDL-C). Επιπλέον, από τις γυναίκες του πληθυσμού μελέτης το 10% είναι εμμηνοπαυσιακές γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας 52 ± 7 έτη.

Πίνακας 4.3. Ανθρωπομετρικά, βιοχημικά, κλινικά χαρακτηριστικά καθώς και χαρακτηριστικά αποτίμησης τρόπου ζωής του πληθυσμού της μελέτης.

Χαρακτηριστικά	**Ολικός Πληθυσμός (N=399)**	**Άντρες (N=236)**	**Γυναίκες (N=163)**	**P (φύλο)**
Ηλικία (έτη)	39 ± 11	40 ± 11	37 ± 12	0,003**
ΔΜΣ (Kg/m2)	26 ± 5	27 ± 4	24 ± 5	<0,001**
Κάπνισμα (N, %)	45% (n=231)	52% (n=154)	37% (n=77)	0,001**
Φυσική Δραστηριότητα (N,%)	78% (n=314)	78% (n=185)	79% (n=129)	0,631
ΔΑΠ (mmHg)	78 ± 13	81 ± 13	75 ± 12	<0,001**
ΣΑΠ (mmHg)	120 ± 17	124 ± 16	115 ± 16	<0,001**
Γλυκόζη (mg/dL)	88 ± 18	89 ± 16	88 ± 21	0,590
TC (mg/dL)	188 ± 37	191 ± 38	182 ± 40	0,010*
HDL-C (mg/dL)	47 ± 13	44 ± 12	52 ± 12	<0,001**
LDL-C (mg/dL)	119 ± 33	123 ± 35	112 ± 29	0,002*
TAG (mg/dL)	105 ± 64	118 ± 73	85 ± 43	<0,001**
WBC (x1000 counts)	7 ± 3	8 ± 2	7 ± 2	0,200
CRP (mg/L)	1.8 ± 0.17	1.9 ± 0.22	1.7 ± 0.01	0,431

Σημείωση: ΔΜΣ: Δείκτης μάζας σώματος, ΔΑΠ: Διαστολική αρτηριακή πίεση, ΣΑΠ: Συστολική αρτηριακή πίεση, TC: Ολική χοληστερόλη, TAG: Τριακυλογλυκερόλες WBC: Αριθμός λευκοκυττάρων, CRP: C-αντιδρώσα πρωτείνη. * p <0,05, ** p<0,001.

4.3.2 Επίπεδα ολικού σεληνίου ορού και πρωτεϊνών σεληνίου ορού στη μελέτη ΑΤΤΙΚΗ

Στον πίνακα 4.4 παρατίθενται τα επίπεδα TSe υπολογισμένα με τη μέθοδο απευθείας εισαγωγής δείγματος στο ICP (Μέθοδος 1) σε αντιπαράθεση με τα επίπεδα TSe υπολογισμένα με τη μέθοδο του ειδοπροσδιορισμού δηλαδή ως το άθροισμα των επιμέρους πρωτεϊνών Se (Μέθοδος 2). Η μέση τιμή TSe ήταν 91.9 ± 33.7 (N=506) ενώ η τιμή TSe που αντιστοιχεί στον πληθυσμό μελέτης ήταν 91.2 ± 34.5 (N=399) ενώ η μέση τιμή του αθροίσματος πρωτεϊνών Se ήταν 83.6 ± 21.5 μg/mL

(N=399). Στα κεφάλαια 4.1,4.2 αναλύονται οι λόγοι για τους οποίους επιλέχθηκε η τιμή του αθροίσματος πρωτεϊνών Se να αντιστοιχεί στο TSE.

Πίνακας 4.4. Επίπεδα ολικού σεληνίου ορού (μgSe/L) που προέκυψαν μετά από εφαρμογή των δύο αναλυτικών μεθόδων.

	Συνολικός Πληθυσμός	**Άντρες**	**Γυναίκες**	**p (φύλο)**
TSe (μgSe/L) (Μέθοδος 1)	91,9 ± 33,7 (N=506)	90,5 ± 35,1 (N=296)	93,9 ±31,6 (N=210)	0,26
TSe (μgSe/L) (Μέθοδος 1)	91,2 ± 34,5 (N=399)	90,1 ± 36,1 (N=236)	92,9 ±32,2 (N=163)	0,41
TSe (μgSe/L) (Μέθοδος 2)	83,6 ± 21,5 (N=399)	82,1 ± 20,3 (N=236)	85,9 ±23,1 (N=163)	0,10

Στα γραφήματα 1Α,Β του παραρτήματος απεικονίζονται οι κανονικές κατανομές συχνοτήτων των τιμών TSe στο συνολικό πληθυσμό με τα αντίστοιχα διαγράμματα Q-Q. Το φύλο και στις δύο περιπτώσεις δεν επηρεάζει τα επίπεδα TSe. Συγκεκριμένα, οι γυναίκες σε σχέση με τους άντρες είχαν 5% υψηλότερα επίπεδα αθροίσματος TSe (85,9 ± 23,1μg/mL έναντι 82,1 ± 20,3μg/mL, p=0,278), χωρίς ωστόσο αυτή η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική. Στον πίνακα 4.5 παρατίθενται τα επίπεδα πρωτεϊνών Se ορού του πληθυσμού της μελέτης μαζί με τις αντίστοιχες πρωτεϊνικές κατανομές. Στα γραφήματα 1Γ-Ε του παραρτήματος απεικονίζονται οι κανονικές κατανομές συχνοτήτων των τιμών GPX-3, SelP, SeAlb στο συνολικό πληθυσμό με τα αντίστοιχα διαγράμματα Q-Q(βλ.παράρτημα). Οι γυναίκες σε σχέση με τους άντρες είχαν 6% υψηλότερα επίπεδα SelP (50,8 ± 14,1 μgSe/L έναντι 48,1 ± 15,8 μgSe/L, p=0,07) και 16% υψηλότερα επίπεδα SeAlb (11,7 ± 4,79 μgSe/L έναντι 10,7 ± 4,30 μgSe/L, p=0,03).

Πίνακας 4.5. Επίπεδα πρωτεϊνών σεληνίου ορού καθώς και οι αντίστοιχες πρωτεϊνικές κατανομές τους.

	Συνολικός Πληθυσμός (N=399)	**Άντρες (N=236)**	**Γυναίκες (N=163)**	**p (φύλο)**
GPX-3 (μgSe/L)	23,4 ± 9,52	23,4 ± 9,75	23,4 ± 9,21	0,974
SelP (μgSe/L)	49,2 ± 15,1	48,1 ± 15,8	50,8 ± 14,1	0,07
SeAlb (μgSe/L)	11,1 ± 4,53	10,7 ± 4,30	11,7 ± 4,79	0,03*
GPx/SeAlb	2,30 ± 1,06	2,42 ± 1,25	2,11 ± 0,651	0,002*
SelP/SeAlb	5,20 ± 2,83	5,35 ± 3,15	4,98± 2,29	0,184
GPx/SelP	0,550 ± 0,450	0,601 ±0,551	0,480 ±0,210	0,002*

Σημείωση: *p<0,05

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψε ότι η κατανομή του Se στον ορό ήταν 28 ± 10 % στη μορφή της GPX-3, 59 ± 11 % στη μορφή της SelP και 13 ± 4% στη μορφή SeAlb. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση της κατανομής Se στις γυναίκες και στους άντρες αντίστοιχα. Παρόλ' αυτά στα φύλα η κατανομή διαφοροποιείται ως εξής: 27 ± 7% στη μορφή της GPX-3, 60 ± 13% στη μορφή της SelP και 13 ± 4 % στη μορφή SeAlb στις γυναίκες ενώ στους άντρες ως 29 ± 11% στη μορφή της GPX-3, 58 ± 13% στη μορφή της SelP και 13 ± 4% στη μορφή SeAlb.

Στη συνέχεια, προκειμένου να κατανοηθεί τόσο η σχέση μεταξύ επιπέδων TSe με τα επίπεδα των πρωτεϊνών Se ορού όσο και η σχέση των πρωτεϊνών Se μεταξύ τους πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός των πρωτεϊνικών κατανομών. Συγκεκριμένα υπολογίστηκε η κατανομή του Se της GPX-3 προς Se της SeAlb (GPX-3/SeAlb), η κατανομή Se της GPX-3 προς Se της SelP (GPX-3/SelP) καθώς η κατανομή Se της SelP προς Se της SeAlb (SelP/SeAlb) (Πίν.4.5). Στον πληθυσμό μελέτης παρατηρήθηκε ότι η πρωτεϊνική κατανομή GPX-3/SeAlb όπως και η πρωτεϊνική κατανομή GPX-3/SelP παρουσιάστηκαν αυξημένοι στους άντρες σε σχέση με αυτούς στις γυναίκες. Δεδομένου ότι η ποσότητα Se στην GPX-3 είναι ίδια και στα δύο φύλα, η αυξημένη τιμή στους λόγους GPX-3/SelP και GPX-3/SeAlb στους άντρες οφείλεται στη μειωμένη ποσότητα SelP και SeAlb που εμφανίζουν οι άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες. Παρόλ' αυτά, οι παραπάνω διαφορές μεταξύ αντρών και γυναικών δεν παρέμειναν στατιστικά σημαντικές μετά από εφαρμογή της

πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης και έλεγχο ως προς την ηλικία, το δείκτη μάζας σώματος και το κάπνισμα.

Τέλος, διερευνήθηκε κατά πόσο η συνολική ποσότητα Se ορού μπορεί να επηρεάσει την κατανομή του Se στις πρωτεΐνες. Για το λόγο αυτό υπολογίστηκαν τα επίπεδα πρωτεϊνών Se και των κατανομών τους στα τριτημόρια TSe (Πιν.4.6). Σύμφωνα με τον πίνακα 4.6 όσο αυξάνονται τα επίπεδα του TSe προφανώς αυξάνεται και η ποσότητα Se στις διάφορες πρωτεΐνες. Ωστόσο, καθώς αυξάνει το TSe το ποσοστό Se στην GPX-3 τείνει να μειώνεται, το ποσοστό Se της SelP παραμένει σταθερό και το ποσοστό Se στην SeAlb παρουσιάζει την τάση να αυξάνεται. Οι τάσεις αυτές απεικονίζονται ξεκάθαρα στις αντίστοιχες πρωτεϊνικές κατανομές GPX-3/SelP, GPX-3/SeAlb, SelP/SeAlb. Συγκεκριμένα, ο λόγος GPX-3/SelP μειώνεται κατά 20% με την αύξηση των επιπέδων TSe (μεταξύ 1ου και 3ου τριτημορίου) το οποίο οφείλεται βασικά στη μείωση της κατανομής του Se στην GPX-3. Αντίστοιχα ο λόγος SelP/SeAlb μειώνεται κατά 19% με την αύξηση των επιπέδων TSe (μεταξύ 1ου και 3ου τριτημορίου) το οποίο αποδίδεται στην αύξηση της κατανομής του Se στην SeAlb. Τέλος, ο λόγος GPX-3/SeAlb μειώνεται κατά 18% με την αύξηση των επιπέδων του TSe (μεταξύ 1ου και 3ου τριτημορίου) το οποίο αποδίδεται τόσο στην αύξηση της κατανομής Se στην SeAlb όσο κα στη μείωση της κατανομής του Se στην GPX-3. Επιπλέον, οι προαναφερθέντες πρωτεϊνικές κατανομές καθώς και τα ποσοστά κατανομής του Se στις αντίστοιχες πρωτεΐνες ακολουθούν το αντίστοιχο μοτίβο στους άντρες και στις γυναίκες του πληθυσμού μελέτης.

Πίνακας 4.6 Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σεληνίου, οι πρωτεϊνικές κατανομές τους καθώς και τα ποσοστά κατανομής σεληνίου σε κάθε πρωτεΐνη ανά τριτημόριο επιπέδων ολικού σεληνίου στο σύνολο του πληθυσμού.

	Τριτημόρια Επιπέδων TSe (μg/L)			
	≤75	**75-90**	**≥91**	**P**
GPX-3 (μgSe/L)	17,9 ± 7,91	22,5 ± 6,92	29,9 ± 9,51	<0,0001[1]
SelP (μgSe/L)	36,4 ± 10,1	48,5 ± 9,41	62,9 ± 12,1	<0,0001[1]
SeAlb (μgSe/L	7,92 ± 3,12	10,5 ± 3,21	14,7 ± 4,21	<0,0001[1]
GPX-3/SelP	0,631 ± 0,660	0,520 ± 0,320	0,501 ± 0,230	0,030[2]
GPX-3/SeAlb	2,53 ± 1,49	2,28 ± 0,880	2,07 ± 0,521	0,002[3]
SelP/SeAlb	5,71 ± 3,81	5,25 ± 2,50	4,63 ± 1,65	0,008[4]
% Se στην GPX-3	29 ± 13%	27 ± 9%	27 ± 7%	0,478
% Se στην SelP	58 ± 15%	59 ± 11%	58 ± 9%	0,773
% Se στην SeAlb	12 ± 5%	13 ± 4%	14± 4%	0,105

1 στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών τριτημορίων (διόρθωση κατά Bonferroni για πολλαπλές συγκρίσεις), p<0,0001,

2 στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ 1ου και 3ου τριτημορίου (διόρθωση κατά Bonferroni για πολλαπλές συγκρίσεις), p=0,04

3 στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ 1ου και 3ου τριτημορίου (διόρθωση κατά Bonferroni για πολλαπλές συγκρίσεις), p=0,001.

4 στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ 1ου και 3ου τριτημορίου (διόρθωση κατά Bonferroni για πολλαπλές συγκρίσεις), p=0,006.

Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Ο σημαντικός ρόλος του Se αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης διαφόρων επιδημιολογικών μελετών [47, 51]. Για το λόγο αυτό ο προσδιορισμός των επιπέδων TSe και των πρωτεϊνών Se αποτελεί σημαντική πληροφορία εφόσον τα επίπεδα αυτά μπορούν να αποτελέσουν επιφανή κριτήρια των επιπέδων διατροφής και υγείας ενός πληθυσμού.

Ο υπολογισμός των επιπέδων TSe στον Ελληνικό πληθυσμό έχει αποτελέσει αντικείμενο προηγούμενων μελετών. Ωστόσο, η συγκεκριμένη μελέτη είναι η μεγαλύτερη, τόσο όσον αφορά τον αριθμό του δείγματος του φυσιολογικού πληθυσμού όσο και τον αριθμό των υπόλοιπων ανθρωπομετρικών, διατροφικών, κλινικών και βιοχημικών δεδομένων του πληθυσμού. Αυτό είχε

σαν αποτέλεσμα να διερευνηθεί εκτενέστερα η σχέση επιπέδων Se με ανθρωπομετρικά, βιοχημικά χαρακτηριστικά καθώς και χαρακτηριστικά αποτίμησης τρόπου ζωής ενός Ελληνικού πληθυσμού.

Μετά από σύγκριση των επιπέδων TSe της συγκεκριμένης μελέτης με μελέτες σε φυσιολογικό πληθυσμό της Ελλάδας προέκυψε ότι, οι μελέτες του Van Cauwenbergh και των συνεργατών του [250] του Kostakopoulos και των συνεργατών του [251] όπως και του Thorling και των συνεργατών του [252] παρουσίασαν επίπεδα TSe χαμηλότερα (68 μg/L, N= 160, 55 μg/L, N=100, 63 μg/L, N≈50,αντίστοιχα) από τα επίπεδα TSe της συγκεκριμένης μελέτης. Αντίθετα, οι μελέτες του Schrauzer και των συνεργατών του [253] (130 μg/L) καθώς και του Kallistros και των συνεργατών του [254] (~136 μg/L, N= 40) παρουσίασαν επίπεδα Se ορού υψηλότερα από τα επίπεδα Se της συγκεκριμένης μελέτης. Τέλος, τα επίπεδα TSe ορού ήταν σε συμφωνία με τα επίπεδα που προσδιορίστηκαν στη μελέτη των Milias και συνεργατών του (80 μg/L, N=14) [255]. Η διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων μεταξύ της παρούσας εργασίας και των προηγούμενων μελετών πιθανόν να οφείλεται στις διαφορετικές διατροφικές συνήθειες του ελληνικού πληθυσμού της σύγχρονης εποχής σε σχέση με αυτές πριν 15-20 χρόνια, όταν δημοσιεύτηκαν οι αρχικές μελέτες για τα επίπεδα TSe. Επιπλέον, η ανεπάρκεια δεδομένων όσον αφορά σε άλλα χαρακτηριστικά πληθυσμού σε αυτές τις μελέτες όπως κάπνισμα, φύλο, διατροφικά και κλινικά χαρακτηριστικά δεν ευνοεί την ικανοποιητική σύγκριση των πληθυσμών για τα επίπεδα TSe. Τέλος, ένα άλλο σημαντικό εμπόδιο είναι η ανεπάρκεια δεδομένων που αφορούν την περιεκτικότητα Se στο έδαφος της κάθε περιοχής προκειμένου να έχουμε μια ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με την πρόσληψη Se.

Τα δεδομένα αυτής της μελέτης, όσον αφορά τα επίπεδα TSe σε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα, τουλάχιστον για την πρωτεύουσα της χώρας, μπορούν να οδηγήσουν σε χρήσιμα συμπεράσματα όσον αφορά την επάρκεια πρόσληψης Se από τη διατροφή δεδομένου ότι αυτή καθορίζει σε ένα μεγάλο βαθμό τη συγκέντρωσή του στον ορό. Γενικότερα, τα επίπεδα TSe θεωρούνται ένας καλός δείκτης για την κατάσταση Se ενός οργανισμού και την επάρκεια διατροφικής πρόσληψης αυτού. Βέβαια, φυσιολογικές τιμές TSe δεν έχουν θεσπιστεί ακόμα ακριβώς λόγω της μεγάλης μεταβλητότητας των επιπέδων του Se στο έδαφος από χώρα σε χώρα. Το συνηθέστερο κριτήριο εκτίμησης της κατάστασης Se ενός οργανισμού είναι μέχρι σήμερα το ποσό εκείνο Se που μπορεί να οδηγήσει στη μέγιστη έκφραση της GPX-3. Αν και οι μελέτες δεν συμφωνούν για την ακριβή συγκέντρωση Se ορού στην οποία μπορεί να επιτευχθεί αυτό, συγκεντρώσεις από 80 έως 95 μg/L χαρακτηρίζονται ως «ικανές» προκειμένου να επιτευχθεί η

μέγιστη βιοσύνθεση της GPX-3 [106]. Μόνο το 53% του πληθυσμού της μελέτης παρουσίασε επίπεδα TSe πάνω από 80 μg/L, γεγονός που υποδηλώνει ότι σχεδόν ο μισός πληθυσμός της μελέτης έχει μη επαρκή πρόσληψη Se. Κατά πόσο αυτό το συμπέρασμα μπορεί να γενικευτεί στο σύνολο του Ελληνικού πληθυσμού δεν είναι γνωστό, δεδομένης ωστόσο της σημασίας της επαρκούς πρόσληψης Se για τον οργανισμό, το παραπάνω αποτέλεσμα πρέπει να αποτελέσει το έναυσμα για μια πιο ενδελεχή μελέτη της κατάστασης Se στον Ελληνικό χώρο.

Όσον αφορά την κατάσταση Se που παρατηρείται σε αυτή τη μελέτη σε σχέση με τις υπόλοιπες χώρες του κόσμου, τα επίπεδα Se της συγκεκριμένης μελέτης βρίσκονται σε μια μέση θέση παγκοσμίως. Οι τιμές TSe ορού που έχουν παρατηρηθεί στις υπόλοιπες χώρες (εξαιρούνται περιοχές στον κόσμο με σοβαρή έλλειψη Se στο έδαφος όπως ορισμένες περιοχές της Κίνας) κυμαίνονται από 40 μg/L μέχρι 140 μg/L με τη μικρότερη να παρατηρείται στην περιοχή της Αλβανίας και τη μεγαλύτερη στην ευρύτερη περιοχή της Β. Αμερικής [51]. Πρέπει να τονιστεί ότι γενικότερα η ευρύτερη περιοχή των Βαλκανίων χαρακτηρίζεται γενικότερα από ανεπαρκή επίπεδα TSe (Κροατία, άντρες: 73 μg/L [256], Σερβία: 62 μg/L [257], Σλοβενία: 70 μg/L [258], Τουρκία: 74 μg/L [259]) και σε αυτό φαίνεται ότι συμφωνεί και η δική μας μελέτη

Από την άλλη πλευρά, τα επίπεδα των πρωτεϊνών Se ορού στον Ελληνικό πληθυσμό παρατίθενται για πρώτη φορά. Άλλωστε αυτή η μελέτη, όσο γνωρίζουμε, είναι η μεγαλύτερη μέχρι σήμερα πληθυσμιακή μελέτη παγκοσμίως (σε γενικό και μη πληθυσμό) στην οποία έχει γίνει ταυτόχρονος προσδιορισμός πρωτεϊνών Se και έχει βρεθεί η κατανομή του Se σε αυτές. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών Se που παρουσιάζονται στη συγκεκριμένη μελέτη συμφωνούν στο μεγαλύτερο ποσοστό με προηγούμενες μελέτες [214,220-222,244-249],(Πιν.4.2,§4.2.3) σε αντίθεση με ορισμένες άλλες [215]. Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτά η κατανομή του Se στις πρωτεΐνες του δεν παρουσιάζει σημαντική διαφοροποίηση τιμών σε αντίθεση με τα επίπεδα TSe ανεξαρτήτως μεθόδου προσδιορισμού. Το γεγονός αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στ' ότι ο ανθρώπινος οργανισμός, εφόσον λειτουργεί σωστά, εμφανίζει την τάση να εξασφαλίζει τα απαραίτητα επίπεδα πρωτεϊνών Se. Από τον πίνακα 4.6 είναι φανερό ότι η αυξημένη συγκέντρωση TSe οδηγεί και σε αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνών Se ορού όπως και αναμενόταν. Ωστόσο, αυτό που είναι χαρακτηριστικό είναι ότι η κατανομή Se στις σεληνοπρωτεΐνες εξαρτάται από τα επίπεδα TSe. Αυτό φαίνεται χαρακτηριστικότερα μελετώντας τις πρωτεϊνικές κατανομές, όπου φαίνεται ότι όσο αυξάνει το TSe υπάρχει μία μετατόπιση του Se από την GPX-3 στις SelP και SeAlb. Μεταξύ 1ου και 3ου τριτημορίου Se εμφανίζεται μια μείωση του ποσοστού Se που διατίθεται στην GPX-3 και μία

αντίστοιχη αύξηση αυτού του ποσοστού στην SeAlb. Αυτό είναι γνωστό και από άλλες μελέτες διατροφικών παρεμβάσεων που έχουν δείξει ότι όταν κορεστούν οι αποθήκες Se στις GPX-3 και SelP τότε η περαιτέρω ποσότητα Se ενσωματώνεται μη ειδικά στην SeAlb [260]. Ένα άλλο συμπέρασμα που προκύπτει από τον πίνακα 4.6 είναι ότι ακόμα και σε χαμηλά επίπεδα TSe, η GPX-3 διατηρεί τα επίπεδά της ενάντια στη θεωρία της ιεραρχίας των πρωτεϊνών που λέει ότι σε μείωση της πρόσληψης Se η πρώτη πρωτεΐνη που επηρεάζεται είναι η GPX-3. Αυτό έχει φανεί από διατροφικές παρεμβάσεις τόσο σε πειραματόζωα [261] όσο και στον άνθρωπο [262]. Ωστόσο, δεν πρέπει να μας διαφεύγει ότι οι προηγούμενες μελέτες έχουν γίνει σε πολύ συγκεκριμένους πληθυσμούς με παρόμοια ανθρωπομετρικά και κλινικά χαρακτηριστικά με αποτέλεσμα η κατανομή Se να μην επηρεάζεται από αυτά. Στη δική μας μελέτη υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στον πληθυσμό με αποτέλεσμα στην κατανομή Se να μην επιδρά μόνο η συνολική ποσότητα Se αλλά και πλήθος βιοχημικών και κλινικών παραμέτρων. Για παράδειγμα, όπως θα φανεί και παρακάτω το χαμηλό TSe συμβαδίζει με αυξημένη ηλικία, η οποία μπορεί να επηρεάζει και αυτή με το δικό της τρόπο την κατανομή. Επιβεβαίωση για τα παραπάνω είναι οι μεγάλες τυπικές αποκλίσεις που εμφανίζονται στους λόγους των σεληνοπρωτεϊνών ακόμα και μέσα στο ίδιο τριτημόριο TSe γεγονός που υποδηλώνει ότι ακόμα και αν δύο εθελοντές έχουν το ίδιο TSe ορού, η κατανομή αυτού στις διάφορες σεληνοπρωτείνες μπορεί να διαφέρει σημαντικά. Το πώς ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και κλινικά χαρακτηριστικά επηρεάζουν αυτή τη κατανομή θα φανεί παρακάτω. Τέλος, σε αυτό το στάδιο της ανάλυσης παρατηρήθηκε μία μικρή, στατιστικά σημαντική, διαφορά μεταξύ των επιπέδων πρωτεϊνών Se και κατανομής Se μεταξύ των δύο φύλων. Συγκεκριμένα, ενώ η GPX-3 δεν διαφοροποιείται, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα SelP και SeAlb στις γυναίκες σε σχέση με τους άντρες και αυτό αντικατοπτρίζεται ακόμα καλύτερα στις πρωτεϊνικές κατανομές. Προηγούμενες μελέτες δίνουν αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά την επίδραση του φύλου στα επίπεδα πρωτεϊνών Se.

Τέλος, η μελέτη αυτή δεν ανέδειξε καμία επιρροή του φύλου τόσο στα επίπεδα TSe όσο και στα επίπεδα πρωτεινών Se στον ορό. Παρόλο που και η σχέση μεταξύ επιπέδων TSe και φύλου δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και με προηγούμενες μελέτες [263-269]. Επιπροσθέτως, αδιευκρίνιστη παραμένει η επιρροή του φύλου στα επίπεδα των πρωτεϊνών Se στον ορό αίματος. Συγκρίσεις μεταξύ αντρών και γυναικών δεν μπορούν να γίνουν άμεσα αν οι δύο πληθυσμοί δεν έχουν τα ίδια επίπεδα TSe, εφόσον είναι ο βασικός παράγοντας που καθορίζει τα επίπεδα πρωτεϊνών Se στον ορό. Τρεις μελέτες δείχνουν ότι τα επίπεδα της SelP δεν διαφέρουν μεταξύ αντρών και γυναικών [249,270]. Μια μελέτη αναφέρει ότι τα επίπεδα της SelP είναι

υψηλότερα στους άντρες [271] ενώ μια άλλη μελέτη αναφέρει ότι τα επίπεδα της SelP είναι υψηλότερα στις γυναίκες [272]. Από την άλλη πλευρά, δύο μελέτες έχουν δείξει ότι το φύλο δεν επηρεάζει τα επίπεδα GPX-3 [214, 215, 271] ενώ μια μελέτη σε νέους ηλικίας 20 χρονών έδειξε ότι τα επίπεδα GPX-3 είναι υψηλότερα στις γυναίκες έναντι των αντρών [273]. Στη συγκεκριμένη μελέτη οι διατροφικές συνήθειες του πληθυσμού δεν διαφοροποιούνται σημαντικά γι' αυτό και δεν αναδείχθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των επιπέδωνTSe και των ειδών του στον ορό

Στη δική μας μελέτη τα ελαφρά αυξημένα επίπεδα TSe στις γυναίκες είναι πιθανόν να οδηγούν και στα αυξημένα επίπεδα SeAlb και SelP αφού όπως φαίνεται από τον πίνακα 4.6 αύξηση TSe οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα αυτών των πρωτεϊνών. Αυτό αντικατοπτρίζεται και στους μειωμένους λόγους GPX-3/SeAlb και GPX-3/SelP στις γυναίκες αφού τα επίπεδα GPX-3 παραμένουν έτσι και αλλιώς σταθερά μεταξύ των φύλων. Παρόλ' αυτά, περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης φύλου με τα επίπεδα των πρωτεϊνών Se έδειξε ότι σε χαμηλά επίπεδα Se (≤75 μg/L) οι γυναίκες εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα SelP σε σχέση με τους άντρες (p=0,01) καθώς και οι άντρες εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα GPX-3 σε σχέση με τις γυναίκες (p=0,004). Το γεγονός αυτό δεν έχει να κάνει με τα επίπεδα TSe εφόσον η διερεύνηση αφορά παρόμοια επίπεδα TSe αλλά με άλλους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη σχέση αυτή. Από την άλλη το επιβαρυμένο μεταβολικό προφίλ (υψηλότερη πίεση αίματος, υψηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης αίματος, υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης αίματος) που εμφανίζουν οι άντρες σε σχέση με τις γυναίκες θα μπορούσαν να επηρεάσουν τα επίπεδα της SelP όπως θα φανεί και στη συνέχεια της μελέτης, Από την άλλη πλευρά οι παρόμοιες διατροφικές συνήθειες που έχουν υιοθετήσει τα δύο φύλα δεν δικαιολογούν την επίδραση της διατροφής στα επίπεδα των πρωτεϊνών Se μεταξύ αντρών και γυναικών.

4.3.3. Ολικό σελήνιο ορού, πρωτεΐνες σεληνίου και διατροφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού

Στην ενότητα αυτή εξετάστηκε η σχέση μεταξύ επιπέδων TSe και πρωτεϊνών του με την κατανάλωση διαφόρων βασικών ομάδων τροφίμων (ψάρια, ξηροί καρποί, γαλακτοκομικά προϊόντα, αυγά, πατάτες, φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, όσπρια, κόκκινο κρέας, πουλερικά, γλυκά).

Αρχικά, στον πίνακα 4.7 απεικονίζονται οι διατροφικές συνήθεις των εθελοντών όπως αυτές εμφανίζονται μέσα από το μέσο όρο κατανάλωσης ομάδων τροφίμων στο σύνολο του πληθυσμού και ξεχωριστά σε άντρες και γυναίκες.

Πίνακας 4.7. Μέσος όρος κατανάλωσης ομάδων τροφίμων και βαθμού υιοθέτησης της μεσογειακής διατροφής στο σύνολο του πληθυσμού καθώς και στους άντρες και στις γυναίκες ξεχωριστά.

Ομάδες Τροφίμων (μερίδες/εβδομάδα)	**Συνολικός Πληθυσμός (N=399)**	**Γυναίκες (N = 163)**	**Άντρες (N=236)**	**P**
Ψάρια	2,12 ± 1,39	2,10 ± 1,28	2,20 ± 1,54	0,74
Ξηροί Καρποί	1,61 ± 1,25	1,44 ± 1,45	1,72 ± 1,68	0,07
Όσπρια	5,22 ± 2,95	4,77 ± 2,64	5,30 ± 2,94	0,07
Λαχανικά	33,6 ± 15,4	33,7 ± 13,1	33,7 ± 16,8	0,74
Γαλακτοκομικά Προϊόντα	11,9 ± 4,87	12,6 ± 4,52	11,4 ± 4,93	0,03*
Πατάτες	12,3 ± 7,65	12,5 ± 7,76	12,4 ± 7,51	0,88
Δημητριακά	53,7 ± 20,1	53,8 ± 16,7	52,6 ± 20,4	0,47
Γλυκά	5,05 ± 2,51	5,02 ± 2,36	5,06 ± 2,61	0,81
Κόκκινο Κρέας	4,86 ± 2,48	4,53 ± 2,30	5,04 ± 2,56	0,05*
Πουλερικά	1,29 ± 0,76	1,35 ± 0,982	1,28 ± 0,602	0,18
Ολικό Κρέας	6,08 ± 2,83	5,84 ± 2,81	6,25 ± 2,80	0,12
Αυγά	1,06 ± 0,87	1,14 ± 0,901	1,05 ± 0,832	0,43
Φρούτα	25,9 ± 13,09	26,9 ± 11,6	25,1 ± 13,7	0,11
Med Diet Score	27,4 ± 5,72	29,5 ± 6,02	25,8 ± 4,97	0,001

Σύμφωνα με τα ευρήματα του συγκεκριμένου πίνακα οι γυναίκες κατανάλωναν περισσότερα γαλακτοκομικά προϊόντα σε σχέση με τους άντρες (p=0,03) και ακολουθούσαν περισσότερο τη μεσογειακή διατροφή (p=0,001). Αντίθετα, οι άντρες κατανάλωναν περισσότερο κόκκινο κρέας (p=0,05). Παρά τις διαφορές αυτές, δεν παρατηρήθηκαν πολύ σημαντικές διαφοροποιήσεις ως προς τις καταναλώσεις των σημαντικότερων ομάδων τροφίμων μεταξύ των δύο φύλων του πληθυσμού μελέτης.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η σχέση των επιπέδων TSe και πρωτεϊνών Se με τη συχνότητα κατανάλωσης των βασικών ομάδων τροφίμων. Οι απλές συσχετίσεις κατά Pearson έδειξαν ότι α) το TSe σχετίζεται θετικά με την κατανάλωση ολικού κρέατος (rho= 0,193, p=0,004), πουλερικών (rho= 0,184, p=0,007) και κόκκονου κρέατος (rho= 0,214, p=0,002) ενώ αρνητικά με την κατανάλωση λαχανικών (rho= -0,153, p=0,025) β) η GPX-3 σχετίζεται θετικά με την κατανάλωση

πουλερικών (rho= 0,183, p=0,007) και με την κατανάλωση ολικού κρέατος (rho= 0,135, p=0,047), γ) η SelP σχετίζεται θετικά με την κατανάλωση αυγών (rho= 0,142, p=0,038) δ) η SeAlb σχετίζεται θετικά με την κατανάλωση πουλερικών (rho= 0,161, p=0,02) και γλυκών (rho= 0,156, p=0,02) ε) η κατανομή GPX-3/SelP σχετίζεται θετικά με την κατανάλωση πατατών (rho= 0,135, p= 0,04) στ) η κατανομή GPX-3/SeAlb σχετίζεται αρνητικά με το βαθμό υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής (Med Diet Score)(rho= -0,108, p= 0,03) Μετά από εφαρμογή της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης και έλεγχο ως προς ηλικία, φύλο, δείκτη μάζας σώματος, κάπνισμα, και μεσογειακό σκορ προέκυψαν οι συσχετίσεις που παρουσιάζονται στον πίνακα 4.8. Οι περισσότερες από τις προαναφερθέντες συσχετίσεις χάθηκαν με την εισαγωγή της ηλικίας στο μοντέλο της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης, το οποίο σημαίνει ότι η ηλικία μεσολαβεί στη σχέση μεταξύ των διατροφικών συνηθειών και των επιπέδων TSe και πρωτεϊνών Se. Με άλλα λόγια οι παρατηρούμενες συσχετίσεις οφείλονται στη διαφοροποίηση της συχνότητας κατανάλωσης των τροφίμων με την ηλικία και δεν οφείλονται στην άμεση επίδραση αυτής στα ανωτέρω επίπεδα. Παρόλο αυτά, σύμφωνα με το μοντέλο της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης στο συνολικό πληθυσμό παρατηρήθηκαν θετικές συσχετίσεις: α) μεταξύ των επιπέδων TSe και κατανάλωσης ολικού κρέατος/πουλερικών, β) μεταξύ των επιπέδων GPX-3 και κατανάλωσης πουλερικών, γ) μεταξύ των επιπέδων SelP και κατανάλωσης δημητριακών καθώς και δ) μεταξύ των επιπέδων SeAlb και κατανάλωσης γλυκών , πουλερικών (Πίν.4.8). Οι συσχετίσεις αυτές παρέμειναν σημαντικές μόνο στις γυναίκες του πληθυσμού μελέτης, γεγονός που σημαίνει ότι η διατροφή που ακολουθούν οι γυναίκες του συγκεκριμένου πληθυσμού επηρεάζει θετικά τα επίπεδα TSe στον ορό αίματος καθώς και την κατανομή του Se στις πρωτεΐνες.

Σύμφωνα με τον πίνακα 4.8 προκύπτει ότι κάθε μερίδα ολικού κρέατος/εβδομάδα οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων TSe κατά 1,21μg/L στον ολικό πληθυσμό. Η ίδια τάση φαίνεται στις γυναίκες και στους άντρες του πληθυσμού. Στην αύξηση των επιπέδων TSe κατά 4,57μg/L στο συνολικό πληθυσμό και κατά 4,98μg/L στις γυναίκες συμβάλλει κάθε μερίδα πουλερικών εβδομαδιαίας κατανάλωσης.

Παράλληλα, η κατανάλωση κάθε μερίδας πουλερικών εβδομαδιαίως συμβάλλει στην αύξηση επιπέδων της GPX-3 κατά 2,33 μgSe/L στον ολικό πληθυσμό και κατά 2,11 μgSe/L στις γυναίκες η ίδια δε τάση φαίνεται να διατηρείται και στους άντρες. Επιπλέον η κατανάλωση κάθε μερίδας πουλερικών συμβάλλει και στην αύξηση των επιπέδων της SeAlb κατά 0,89μg/L στον ολικό πληθυσμό ενώ η ίδια τάση διατηρείται στους άντρες και στις γυναίκες αντίστοιχα. Στην

αύξηση των επιπέδων SeAlb συμβάλλει και η κατανάλωση κάθε μέριδας γλυκών εβδομαδιαίως κατά 0,25μg/L στον ολικό πληθυσμό και 0,76μg/L στις γυναίκες. Επιπλέον, η κατανάλωση κάθε μερίδας δημητριακών εβδομαδιαίως συμβάλλει στην αύξηση επιπέδων SelP κατά 0,24μg/L μόνο στις γυναίκες. Με τη βοήθεια της καμπύλης ROC παρατηρήθηκε ότι η εβδομαδιαία κατανάλωση μίας μερίδας (~1,12μερίδα/εβδομάδα) πουλερικών είναι το «κατώφλι» προκειμένου να εξασφαλιστούν επίπεδα TSe πάνω απο 80μg/L τα οποία οδηγούν στην μέγιστη σύνθεση σεληνοπρωτεϊνών στον ορό. Η ίδια εβδομαδιαία κατανάλωση απαιτείται προκειμένου να υπάρχουν επίπεδα TSe ικανά για την ενεργοποίηση της GPX-3 (Γράφημα 2.Α,Β βλ. Παράρτημα).

Πίνακας 4.8. Συντελεστές συσχέτισης ανάμεσα στην κατανάλωση διαφόρων ομάδων τροφίμων και στα επίπεδα ολικού σεληνίου, πρωτεϊνών σεληνίου και πρωτεϊνικών κατανομών τους στο πληθυσμό της μελέτης.

Ομάδες Τροφίμων (μερίδα/εβδομάδα)	**Επίπεδα Se στον ορό (μg/L)**		
	Συνολικός Πληθυσμός(N=399)	**Άντρες(N=269)**	**Γυναίκες(N=163)**
		TSe (μg/L)	
Κόκκινο Κρέας	1,21 ± 0,14, p=0,03*	1,09 ± 0,14, p=0,09	1,79 ± 0,17, p=0,14
Πουλερικά	4,57 ± 0,16, p=0,01*	4,01 ± 0,11, p=0,19	4,98 ± 0,21, p=0,04*
		GPX-3 (μg/L)	
Πουλερικά	2,33 ±0,18,p=0,009**	2,37 ± 0,13, p=0,14	2,11 ± 0,21, p=0,05*
		SelP (μg/L)	
Δημητριακά	-0,03 ± 0,07, p=0,96	-0,09 ± 0,13, p=0,117	0,24 ± 0,08,p=0,005**
		SeAlb (μg/L)	
Γλυκά	0,25 ± 0,13, p=0,05*	0,05 ± 0,03, p=0,72	0,76 ± 0,32,p=0,004**
Πουλερικά	0,89 ± 0,15, p=0,03*	0,96 ± 0,13, p=0,16	0,85 ± 0,16, p=0,14

Σημείωση : Οι συντελεστές συσχέτισης και τα p προκύπτουν μετά από έλεγχο για ηλικία, φύλο, δείκτη μάζας σώματος, κάπνισμα και βαθμό υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής (Med Diet Score). * p <0,05, ** p<0,001

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η σχέση μεταξύ των επιπέδων TSe και πρωτεϊνών Se με την κατανάλωση αλκοόλης, κρασιού καθώς και με την κατανάλωση καφέ. Προέκυψε μια θετική συσχέτιση μεταξύ της πρωτεϊνικής κατανομής GPX-3/SelP και της κατανάλωσης αλκοόλ (0,037 ± 0,036, p=0,03), ενώ παράλληλα η ίδια πρωτεϊνική κατανομή συσχετίζεται οριακά θετικά με την εβδομαδιαία κατανάλωση κρασιού (0,005 ± 0,003, p=0,07), μετά την εφαρμογή της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης και έλεγχο ως προς ηλικία, φύλο, δείκτη μάζας σώματος, κάπνισμα, και κατανάλωση ολικού κρέατος.

Τέλος, στη μελέτη αυτή υπολογίστηκε η θεωρητική πρόσληψη Se των εθελοντών σύμφωνα με τους πίνακες σύνθεσης τροφίμων απο την αμερικάνικη βάση δεδομένων USDA. Η θεωρητική πρόσληψη που προέκυψε ήταν 115 ± 34 μgSe/ημερησίως η οποία δεν παρουσιάζει καμία συσχέτιση με τα επίπεδα TSe στον ορό αίματος (p=0,309).

Σελήνιο και Διατροφικές Συνήθειες των Εθελοντών της Μελέτης

Στη συνέχεια της μελέτης διερευνήθηκε αν οι διατροφικές συνήθειες του συγκεκριμένου πληθυσμού μελέτης επηρεάζουν τα επίπεδα TSe καθώς και τα επίπεδα πρωτεϊνών Se στον ορό αίματος. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση σε κύριες συνιστώσες (Principal Components Analysis). Σύμφωνα με την ανάλυση αυτή προέκυψαν τρία διατροφικά πρότυπα (Πιν.4.9) Το πρώτο διατροφικό πρότυπο (1) που εμφανίστηκε στο δείγμα μελέτης χαρακτηριζόταν από την υψηλή κατανάλωση ψαριών, λαχανικών, όσπριων, δημητριακών και φρούτων των εθελοντών. Το δεύτερο διατροφικό πρότυπο (2) χαρακτηριζόταν κυρίως από την υψηλή κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων και αυγών ενώ στο τρίτο διατροφικό πρότυπο (3) οι εθελοντές κατανάλωναν περισσότερο κρέας (κόκκινο-λευκό) και πατάτες. Στη συνέχεια προκειμένου να διερευνηθεί η σχέση των διατροφικών προτύπων, που προέκυψαν, με τα επίπεδα του TSe και των πρωτεϊνών του εφαρμόστηκε πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση (Πιν 4.10).

Από τον πίνακα προέκυψαν στατιστικά σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ του τρίτου διατροφικού προτύπου και των επιπέδων TSe (p=0,03), της GPX-3 (p=0,004) και της SeAlb (p=0,06) όχι όμως και της SelP. Σύμφωνα με τα παραπάνω είναι αναμενόμενη και η θετική συσχέτιση που προέκυψε μεταξύ τρίτου διατροφικού προτύπου και της πρωτεϊνικής κατανομής GPX/SelP. Τέλος, σημειώνεται ότι η ίδια τάση παρουσιάζεται και στα επίπεδα TSe όπως προσδιορίστηκε με την πρώτη μεθοδολογία (p =0,13).

Πίνακας 4.9. Τα διατροφικά πρότυπα και οι ομάδες τροφίμων που τα χαρακτηρίζουν.

Ομάδες τροφίμων	**Διατροφικά Πρότυπα**		
	1	**2**	**3**
Ψάρια	**0,780**	-0,083	0,020
Ξηροί Καρποί	0,442	0,258	0,240
Όσπρια	**0,699**	0,116	0,098
Γαλακτοκομικά Προϊόντα	0,212	**0,732**	0,107
Φρούτα	**0,505**	**0,505**	-0,067
Λαχανικά	**0,767**	0,172	-0,003
Πατάτες	0,122	0,212	**0,694**
Δημητριακά	**0,617**	0,280	0,353
Γλυκά	0,406	0,462	0,379
Κόκκινο Κρέας	0,046	0,193	**0,769**
Αυγά	-0,004	**0,760**	0,076
Πουλερικά	0,046	-0,157	**0,654**

Σημείωση: Οι υψηλότερες απόλυτες τιμές δείχνουν ότι κάθε τρόφιμο-μεταβλητή συσχετίζεται περισσότερο με το καθένα από αυτά τα διατροφικά πρότυπα (σκορ $\geq 0,5$)

Πίνακας 4.10 Μοντέλα Πολλαπλής Γραμμικής Παλινδρόμησης για διερεύνηση της σχέσης μεταξύ των επιπέδων ολικού σεληνίου, και πρωτεϊνών σεληνίου και των πρωτεϊνικών κατανομών στον ορό (εξαρτημένες μεταβλητές) με τα διατροφικά πρότυπα των εθελοντών (ανεξάρτητη μεταβλητή)

Μοντέλα	**b ± SE**	**P**
Μοντέλο 1		
Διατροφικό Πρότυπο 1	-0,35 ± 1,38	0,79
Διατροφικό Πρότυπο 2	0,71 ± 1,47	0,63
Διατροφικό Πρότυπο 3	3,07 ± 1,44	0,03
Μοντέλο 2		
Διατροφικό Πρότυπο 1	-0,02 ± 0,65	0,97
Διατροφικό Πρότυπο 2	-0,35 ± 0,70	0,62
Διατροφικό Πρότυπο 3	2,02 ± 0,69	0,004
Μοντέλο 3		
Διατροφικό Πρότυπο 1	-0,42 ± 0,97	0,66
Διατροφικό Πρότυπο 2	1,09 ± 1,03	0,29
Διατροφικό Πρότυπο 3	0,42 ± 1,02	0,68
Μοντέλο 4		
Διατροφικό Πρότυπο 1	0,10 ± 0,31	0,75
Διατροφικό Πρότυπο 2	-0,03 ± 0,33	0,92
Διατροφικό Πρότυπο 3	0,62 ± 0,33	0,06
Μοντέλο 5		
Διατροφικό Πρότυπο 1	0,01 ± 0,01	0,48
Διατροφικό Πρότυπο 2	-0,01 ± 0,01	0,34
Διατροφικό Πρότυπο 3	0,03 ± 0,01	0,05

Μοντέλο 1: επίπεδα ολικούTSe (εξαρτημένη μεταβλητή),
Μοντέλο 2: επίπεδα GPX-3 (εξαρτημένη μεταβλητή)
Μοντέλο 3: επίπεδα SelP (εξαρτημένη μεταβλητή)
Μοντέλο 4: επίπεδα SelAlb (εξαρτημένη μεταβλητή)
Μοντέλο 5: επίπεδα πρωτεϊνικού λόγου GPX-3/SelP (εξαρτημένη μεταβλητή)
Σημείωση: Οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης δίνονται μετά από έλεγχο για ηλικία, φύλο, δείκτη μάζας σώματος,κάπνισμα.

Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Λαμβάνοντας υπόψιν το σημαντικό ρόλο του Se στον ανθρώπινο οργανισμό (§2.4) καθώς και το γεγονός ότι το Se εισάγεται στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της διατροφής (§2.5), στο υποκεφάλαιο αυτό, εκτιμήθηκε η επιρροή της κατανάλωσης τροφίμων στα επίπεδα TSe αίματος ενός φαινομενικά υγιούς πληθυσμού. Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκε η σχέση μεταξύ κατανάλωσης βασικών ομάδων τροφίμων του ελληνικού πληθυσμού με τα επίπεδα TSe καθώς και πρωτεϊνών Se ορού. Επιπλέον, διερευνήθηκε αν οι διατροφικές συνήθειες του πληθυσμού μελέτης επηρεάζουν τόσο τα επίπεδα TSe όσο και τις πρωτεΐνες Se στον ορό αίματος.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η πλειοψηφία των προηγούμενων μελετών εστιάζεται στην εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης Se μέσω ερωτηματολογίων συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων ή ανακλήσεων και πινάκων σύνθεσης τροφίμων και λίγες μόνο μεγάλες συγχρονικές μελέτες εστιάζονται στην επίδραση που έχει η κατανάλωση τροφίμων στην κατάσταση Se του οργανισμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι η πρώτη φορά που καταγράφεται η σχέση μεταξύ κατανάλωσης τροφίμων καθώς και διατροφικών προτύπων με τα επίπεδα TSe καθώς και πρωτεϊνών Se του ελληνικού πληθυσμού. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι αυτή είναι η μεγαλύτερη μελέτη (όσον αφορά το μέγεθος πληθυσμού) στην οποία επιχειρείται να συσχετιστούν οι διατροφικές συνήθειες του πληθυσμού με τη συγκέντρωση των βασικών πρωτεϊνών Se του ορού αίματος και με την κατανομή του Se σε αυτές.

Τα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης ανέδειξαν μια σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων TSe ορού και της κατανάλωσης κόκκινου κρέατος (στο σύνολο και οριακά στους άντρες) και πουλερικών (στο σύνολο και στις γυναίκες). Παράλληλα, η κατανάλωση πουλερικών συσχετίζεται θετικά και με τις GPX-3 (στο σύνολο και στις γυναίκες) και SeAlb (στο σύνολο). Επιπλέον, παρατηρήθηκε μια σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων SelP με την κατανάλωση δημητριακών (μόνο στις γυναίκες) καθώς και μια θετική συσχέτιση μεταξύ κατανάλωσης γλυκών και επιπέδων SeAlb (στο σύνολο και στις γυναίκες).

Η θετική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων TSe με την κατανάλωση κόκκινου ή λευκού κρέατος αποτελεί αναμενόμενο αποτέλεσμα μιας και το κόκκινο ή λευκό κρέας θεωρείται κύρια πηγή Se όπως αναφέρεται και στην §2.5 του θεωρητικού μέρους. Επίσης, τα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης που αφορούν τη θετική συσχέτιση TSe ορού και κατανάλωσης κρέατος βρίσκονται σε συμφωνία με ευρήματα προηγούμενων μελετών σε Γαλλικό πληθυσμό [274], σε Πολωνικό

πληθυσμό με έλλειψη Se [275] και Ισπανικό πληθυσμό ηλικιωμένων [276]. Σύμφωνα με διατροφικές μελέτες στις οποίες έχει προσδιοριστεί η % συνεισφορά κάθε τροφίμου στην πρόσληψη Se έχει όντως αποδειχτεί ότι το κρέας μαζί με τα δημητριακά, τα ψάρια, τα γαλακτοκομικά προιόντα και τα αυγά αποτελούν τις καλύτερες πηγές Se στην καθημερινή διατροφή [277, 278]. Η % συνεισφορά κάθε τροφίμου εξαρτάται από τις διατροφικές συνήθειες κάθε πληθυσμού. Σε μία αντίστοιχη μελέτη που έχει γίνει στον Ελληνικό χώρο οι κύριες πηγές διατροφικού Se είναι το ψωμί (27%), ψάρια (21%), κρέας (18%), γαλακτοκομικά (13%) και αυγά (4%) [279].

Το ερώτημα βέβαια που τίθεται στην παρούσα μελέτη είναι γιατί μόνο το κόκκινο κρέας και τα πουλερικά συσχετίζονται με τα επίπεδα TSe και όχι και οι υπόλοιπες ομάδες τροφίμων που είναι σίγουρο πως συνεισφέρουν και αυτές στην καθημερινή πρόσληψη αυτού. Τεκμηριωμένες απαντήσεις από τα δεδομένα της συγκεκριμένης μελέτης δεν μπορούν να δοθούν (αφού δεν είναι γνωστές οι συγκεντρώσεις Se των Ελληνικών τροφίμων) ωστόσο μπορούν να γίνουν σίγουρα κάποιες υποθέσεις. Αρχικά, πρέπει να τονιστεί ότι το κρέας περιέχει κυρίως οργανικές μορφές Se (σεληνομεθειονίνη και σεληνοκυστείνη), οι οποίες είναι και οι πιο βιοδιαθέσιμες μορφές τους [52, 57]. Έχει μάλιστα βρεθεί ότι η κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν σεληνομεθειονίνη από τα ζώα (ζωοτροφές, σιτάρι, κριθάρι) συμβάλλει στην αποθήκευση Se με τη μορφή σεληνομεθειονίνης στους ιστούς του ζώου ενώ η κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν σεληνικό οξύ συμβάλλει στην αποθήκευση Se με τη μορφή σεληνοκυστεΐνης στους ιστούς του ζώου [280,281]. Επιπλέον από πειράματα σε ποντίκια παρατηρήθηκε ότι όσο μεγαλύτερο είναι το TSe του οργανισμού τόσο περισσότερο αυξάνει και το ποσοστό αποθήκευσης της σεληνομεθειονίνης στους ιστούς ενός ζώου [281]. Η κατανάλωση σεληνομεθειονίνης ευνοεί και τη μη ειδική δέσμευση Se, κυρίως σε αλβουμίνη και αιμοσφαιρίνη και κατά συνέπεια την καλύτερη κατακράτηση Se στον οργανισμό [282].

Επίσης, η απορρόφηση Se από το κρέας δεν υπόκειται στην επίδραση των φυτικών ινών που υπάρχουν στα φυτικά τρόφιμα και οι οποίες μπορούν μη ειδικά να μειώσουν την απορρόφηση Se [283]. Τέλος πρέπει να τονιστεί ότι η σύγχρονη βιομηχανική εκτροφή των βοειδών και πουλερικών (προϊόντα της οποίας καταναλώνονται σε ένα αστικό περιβάλλον όπως αυτό της ΑΤΤΙΚΗΣ) προβλέπει την παρουσία κατάλληλων ποσοτήτων Se στις ζωοτροφές. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η διακύμανση στα επίπεδα Se στα ζωικά προιόντα να κυμαίνεται σε στενά όρια. Αντίθετα, τα φυτικά τρόφιμα και δημητριακά, μπορεί να προέρχονται από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας ή και του κόσμου, με διαφορετικά επίπεδα Se στο έδαφος και αυτό να έχει αντίκτυπο στην ομοιογένεια της

σύστασης αυτών των τροφίμων σε Se. Τα παραπάνω σε συνδυασμό με το γεγονός πως μέσα σε μία μερίδα λαχανικών ή φρούτων μπορεί να περιέχονται πολύ διαφορετικά είδη (με διαφορετική συγκέντρωση Se) έχει σαν τελικό αποτέλεσμα η συνεισφορά μίας μερίδας φυτικών τροφίμων στην καθημερινή πρόσληψη Se να διαφοροποιείται σημαντικά από εθελοντή σε εθελοντή και αυτό να οδηγεί σε αδυναμία εύρεσης στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων.

Αναφορά πρέπει να γίνει επίσης στο ότι δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση TSe με την κατανάλωση ψαριού αν και κάτι τέτοιο έχει παρατηρηθεί σε αρκετές μεγάλες συγχρονικές μελέτες [274,284,285]. Πιθανότατα και αυτό να οφείλεται στη μεταβλητότητα στη σύσταση Se ανάλογα το είδος ψαριού, το αν είναι ελευθέρας βοσκής ή ελεύθερης αλιείας, από την περιοχή ψαρέματος αλλά και από την εποχή ψαρέματος [2]. Επίσης, πρέπει να τονιστεί ότι ο πληθυσμός της μελέτης προτιμούσε την κατανάλωση κρέατος σε σχέση με την κατανάλωση θαλασσινών [286] (Πίνακας 4.7) με αποτέλεσμα η συνεισφορά αυτού του προϊόντος στην καθημερινή πρόσληψη Se να ήταν μικρότερη από άλλα τρόφιμα και αυτό να είχε αντίκτυπο στη σχέση κατανάλωσης ψαριού και TSe.

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι στη συγκεκριμένη μελέτη, η κατανάλωση κάθε μίας μερίδας πουλερικών οδηγεί σε αύξηση στο TSe ορού κατά 4 σχεδόν φορές μεγαλύτερη από ότι η κατανάλωση μίας μερίδας ολικού κρέατος. Αυτό προφανώς οφείλεται είτε στην αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα του Se από τα πουλερικά ή στη μεγαλύτερη περιεκτικότητά τους σε Se σε σχέση με το κόκκινο κρέας. Σύμφωνα με την υπάρχουσα αρθρογραφία το Se εντοπίζεται είτε με τη μορφή SeCys είτε με τη μορφή SeMet στα πουλερικά και στο κόκκινο κρέας. Σύμφωνα με το δεδομένο αυτό φαίνεται να μην υπάρχει διαφορά στη βιοδιαθεσιμότητα του Se απο τις τροφές αυτές. Πιθανότατα λοιπόν η διαφορά που εντοπίζεται να έχει σχέση με τη διατροφή των πουλερικών ή των βοοειδών [287]. Για την εκτροφή των πουλερικών χρησιμοποιείται κυρίως σιτάρι το οποίο και αποτελεί σημαντική πηγή Se με τη μορφή SeMet σε ποσοστό 56-83% το γεγονός δε αυτό πιθανώς να συμβάλλει στα υψηλότερα βιοδιαθέσιμα επίπεδα Se στα πουλερικά σε σχέση με τα βοοειδή. Επιπλέον, από μια μελέτη που έγινε στον ελληνικό πληθυσμό παρατηρήθηκε υψηλότερη συγκέντρωση Se στο λευκό κρέας σε σχέση με το κόκκινο κρέας [279]. Επιπλέον, στη συγκεκριμένη μελέτη οι εθελοντές με υψηλά επίπεδα TSe (>80μg/L) καταναλώνουν περισσότερες μερίδες πουλερικών σε σχέση με μερίδες κόκκινου κρέατος από τους εθελοντές με χαμηλότερα επίπεδα TSe (<80μg/L)(p=0.04). Έτσι η συνεισφορά της κατανάλωσης πουλερικών στην καθημερινή πρόσληψη Se είναι μεγαλύτερη.

Η διερεύνηση της σχέσης μεταξύ διατροφικών δεδομένων και επιπέδων SelP, GPX-3 και SeAlb δεν έχει διερευνηθεί πλήρως. Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα των GPX-3, SelP, SeAlb επηρεάζονται από την πρόσληψη διατροφικού Se ενώ ελάχιστες μελέτες επικεντρώνονται στη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ κατανάλωσης συγκεκριμένων ομάδων τροφίμων και επιπέδων GPX-3, SelP. Συγκεκριμένα, η κατανάλωση ψαριών συσχετίστηκε θετικά με τα επίπεδα GPX-3, SelP σε Λετονούς ψαράδες με υψηλή κατανάλωση ψαριού [246], ενώ η παραπάνω σχέση, όσον αφορά την SelP δεν έχει επιβεβαιωθεί σε άλλες δύο μελέτες [270,288]. Επιπρόσθετα, δεν υπάρχει καμία μελέτη που να βασίζεται στην εξέταση της σχέσης μεταξύ κατανάλωσης συγκεκριμένων ομάδων τροφίμων και επιπέδων SeAlb καθώς και στην κατανομή Se στις αντίστοιχες πρωτεΐνες ορού.

Η επίδραση της κατανάλωσης πουλερικών στην αύξηση του TSe αντικατοπτρίζεται στη θετική συσχέτιση μεταξύ κατανάλωσης πουλερικών και της συγκέντρωσης της GPX-3 και SeAlb όχι όμως και της SelP. Η αύξηση της GPX-3 και της SeAlb με την αυξημένη κατανάλωση πουλερικών είναι αναμενόμενη αφού όπως φαίνεται από τον Πίνακα 4.6 και οι δύο πρωτεΐνες Se αυξάνονται με την αύξηση του TSe. Ωστόσο, παράδοξο είναι το γεγονός ότι η SelP, που και αυτή αυξάνεται με τα επίπεδα TSe δεν επηρεάζεται από τη κατανάλωση πουλερικών.

Το γεγονός ότι η κατανάλωση κόκκινου κρέατος δεν δίνει τις αντίστοιχες συσχετίσεις με τις GPX-3 και SeAlb πιθανόν να οφείλεται στο ότι η αύξηση που επάγει η κατανάλωση κόκκινου κρέατος στο TSe ορού είναι πολύ μικρότερη από αυτή που επάγεται από την κατανάλωση πουλερικών (Πίν. 4.8)

Ένα άλλο σημαντικό εύρημα της μελέτης αφορά τη θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων SelP και κατανάλωσης δημητριακών στις γυναίκες μόνο. Το εύρημα αυτό καταγράφεται για πρώτη φορά στην υπάρχουσα αρθρογραφία. Αν και τα ερωτηματολόγια της συγκεκριμένης μελέτης δεν έκαναν διάκριση μεταξύ δημητριακών ολικών άλεσης και ραφιναρισμένων, είναι προφανές ότι η αυξημένη κατανάλωση δημητριακών συνοδεύεται και από αυξημένη κατανάλωση Se, το οποίο είναι ήδη γνωστό από τη βιβλιογραφία [289,275]. Βέβαια όλα τα παραπάνω θα εξηγούσαν τη θετική συσχέτιση μεταξύ πρόσληψης δημητριακών και SelP αν αυτή συνοδευόταν από μία αντίστοιχη θετική συσχέτιση με τα επίπεδα TSe. Το γεγονός ότι κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται υποδεικνύει πιθανότατα μία εξειδικευμένη επίδραση κάποιων μακρο/μικροθρεπτικών συστατικών των δημητριακών ειδικά στα επίπεδα της SelP.

Από τον Πίνακα 4.8 παρατηρείται επίσης μία θετική συσχέτιση της κατανάλωσης γλυκών με τα επίπεδα της σεληνοαλβουμίνης, πάλι μόνο στις γυναίκες. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι τα αυγά που αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα συστατικά των γλυκών ταυτόχρονα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελούν και σημαντική πηγή Se. Συγκεκριμένα το ασπράδι των αυγών είναι πλούσιο σε SeMet (>50%)[290] η οποία συμβάλλει στη σύνθεση της σεληνοαλβουμίνης. Στις γυναίκες φαίνεται η κατανάλωση γλυκών να δρα ευεργετικά στην αύξηση επιπέδων SeAlb η βιοσύνθεση της οποίας ευνοείται απο την περίσσεια SeMet.

Επιπλέον, από τον Πίνακα 4.8 παρατηρείται η τάση οι σημαντικές συσχετίσεις να εμφανίζονται στο γυναικείο φύλο. Αν και στις γυναίκες υπάρχει πάντα το πρόβλημα της έμμηνου ρύσης, η οποία δεν ελέγχθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη φαίνεται ότι το επιβαρημένο βιοχημικό και κλινικό προφίλ των αντρών σε σχέση με τις γυναίκες (Πίνακας 4.3) καλύπτει την οποιαδήποτε αλληλεπίδραση της διατροφής στα επίπεδα Se.

Τέλος, εξετάστηκε αν η κατανάλωση αλκοόλ και ειδικότερα κατανάλωση κρασιού, καθώς και διαφόρων αφεψημάτων όπως καφές, τσάι μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα TSe, τις πρωτεΐνες Se καθώς και τις αντίστοιχες πρωτεϊνικές κατανομές. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε μια θετική συσχέτιση μεταξύ του λόγου GPX-3/SelP με την κατανάλωση αλκοόλ στον ολικό πληθυσμό. Το παραπάνω εύρημα ουσιαστικά σημαίνει ότι η κατανάλωση αλκοόλ συμβάλλει στην κατανομή του Se προς GPX-3 έναντι της SelP. Η θετική σχέση που παρατηρήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη πιθανώς να εξηγείται μέσω των διαφορετικών διατροφικών συνηθειών που ακολουθούνται με την κατανάλωση αλκοόλ. Συγκεκριμένα, οι εθελοντές της μελέτης που κατανάλωναν αλκοόλ κατανάλωναν και πατάτες (p=0,01), η κατανάλωση των οποίων φαίνεται να επηρεάζει θετικά τα επίπεδα GPX-3/SelP εφόσον παρατηρήθηκε ότι διατροφή πλούσια σε κρεατικά και πατάτες ευνοεί την αύξηση των επιπέδων GPX-3/SelP (Πίνακας 4.10). Σύμφωνα με την υπάρχουσα αρθρογραφία δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως πώς επηρεάζει η κατανάλωση αλκοόλ τόσο τα επίπεδα TSe όσο και τα επίπεδα πρωτεϊνών Se εφόσον υπάρχει περιορισμένος αριθμός δημοσιεύσεων. Συγκεκριμένα υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων TSe και της κατανάλωσης αλκοόλ στις γυναίκες [274,291] αναδεικνύοντας τον προστατευτικό ρόλο του Se σε γυναίκες με αυξημένο οξειδωτικό στρες οπως επίσης και μια μελέτη στην οποία αναδείχθηκε αρνητική σχέση μεταξύ των επιπέδων TSe και της κατανάλωσης αλκοόλ [275]. Επιπλέον, αρνητική συσχέτιση επιπέδων TSe και κατανάλωσης αλκοόλ αναδείχθηκε σε πληθυσμό με ανεπαρκή επίπεδα TSe(<70μg/L). Παράλληλα, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η υπερβολική κατανάλωση

αλκοόλ (πάνω απο 80g/ημερησίως), επίπεδα που δεν παρατηρούνται στη δική μας μελέτη, οδηγεί στη μείωση των επιπέδων TSe στον ορό αίματος και αναφέρεται ότι σχετίζεται με την επιδείνωση της ηπατικής λειτουργίας και του υποσιτισμού [292]. Τέλος, υπάρχει μελέτη στην οποία δεν παρατηρήθηκε καμμία συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης αλκοόλ και των επιπέδων TSe σε μεσήλικους άντρες. [293]. Επιπροσθέτως, στις αντίστοιχες μελέτες για τα επίπεδα GPX-3 και SelP δεν αναδεικνύονται σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων τους και της κατανάλωσης αλκοόλ [215, 270]. Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα των ερευνών πιθανόν να οφείλονται και στο ότι η κατάσταση Se ενός οργανισμού δεν επηρεάζεται απαραίτητα από την απόλυτη κατανάλωση αιθανόλης αλλά και από το είδος αλκοόλ που καταναλώνεται. Ωστόσο, μελέτες πάνω στη συγκεκριμένη υπόθεση δεν έχουν γίνει ακόμα.

Στη συνέχεια, σε μία προσπάθεια να γίνει μια ολιστική προσέγγιση του τρόπου με τον οποίο οι διατροφικές συνήθειες του πληθυσμού μας επηρεάζουν την κατάσταση Se έγινε ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Components Analysis) από την οποία προέκυψαν τρία διατροφικά πρότυπα (§4.3.3) Το πρώτο διατροφικό πρότυπο (1) που εμφανίστηκε στο δείγμα μελέτης χαρακτηριζόταν από την υψηλή κατανάλωση ψαριών, λαχανικών, όσπριων, δημητριακών και φρούτων των εθελοντών. Το δεύτερο διατροφικό πρότυπο (2) χαρακτηριζόταν κυρίως από την υψηλή κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων και αυγών ενώ στο τρίτο διατροφικό πρότυπο (3) οι εθελοντές κατανάλωναν περισσότερο κρέας (κόκκινο-λευκό) και πατάτες. Τα αποτελέσματα του Πίνακα 4.8 που αφορούν στην κατανάλωση κρέατος (κόκκινου-λευκού) επιβεβαιώθηκαν και με διερεύνηση των διατροφικών προτύπων των εθελοντών εφόσον τα επίπεδα TSe, τα επίπεδα GPX-3, SeAlb αλλά και η πρωτεϊνική κατανομή GPX-3/SelP στον ορό συσχετίστηκαν θετικά με το τρίτο διατροφικό πρότυπο των εθελοντών. Είναι λοιπόν προφανές ότι μία κρεατοφαγική δίαιτα συσχετίζεται θετικά και οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα TSe και πρωτεϊνών Se. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από μελέτες άλλων ερευνητών που έχουν δείξει ότι τα επίπεδα TSe στον ορό φυτοφάγων ήταν χαμηλότερα από αυτά στον ορό μη φυτοφάγων/κρεατοφάγων [294,295]. Στη μελέτη μάλιστα των Hoeflich και συν.[295] βρέθηκε ότι οι φυτοφάγοι έχουν χαμηλότερα επίπεδα Se και SelP σε σχέση με τους κρεατοφάγους ενώ τα επίπεδα GPX-3 δεν είχαν διαφορά σε αντίθεση με τη δική μας μελέτη όπου φάνηκε ότι υπήρχε θετική συσχέτιση του κρεατοφαγικού προτύπου με την GPX-3 και καμμία συσχέτιση με την SelP.

4.3.4. Ολικό σελήνιο ορού, πρωτείνες σεληνίου και παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου.

4.3.4.1 Επίπεδα ολικού σεληνίου/πρωτεϊνών σεληνίου και ηλικία

Αρχικά εξετάστηκε η σχέση μεταξύ των επιπέδων TSe και πρωτεϊνών Se με την ηλικία των εθελοντών. Μετά από εφαρμογή πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης ελέγχοντας ως προς φύλο, δείκτη μάζας σώματος και κάπνισμα, προέκυψε μια σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ ηλικίας εθελοντών με τα επίπεδα TSe, η οποία διατηρείται στις γυναίκες μόνο. Η μείωση αυτή των επιπέδων TSe αντικατοπτρίζεται στη μείωση των επιπέδων SelP με την ηλικία και όχι στις άλλες πρωτεΐνες Se. Στους άντρες, φαίνεται να υπάρχει μια οριακή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων SelP και ηλικίας (p=0,12) ενώ κάτι τέτοιο δεν φαίνεται να ισχύει για τα επίπεδα TSe (p=0,34). (Πιν.4.11).Τα παραπάνω αποτελέσματα δεν άλλαξαν όταν έγινε έλεγχος και για διατροφικούς παράγοντες όπως η κατανάλωση ολικού κρέατος καθώς και το διατροφικό πρότυπο 3 (§ 4.3.3) που θα μπορούσαν να δράσουν ως συγχυτικοί παράγοντες.

Πίνακας 4.11. Συντελεστές συσχέτισης ανάμεσα στην ηλικία και τα επίπεδα ολικού σεληνίου και πρωτεϊνών σεληνίου.

	Συνολικός πληθυσμός			
	TSe (μgSe/L)	GPX-3 (μgSe/L)	SelP (μgSe/L)	SeAlb (μgSe/L)
Ηλικία (έτη)	-0,23 ± 0,10, p=0,021*	-0,006 ± 0,045, p= 0,905	-0,19±0,07, p= 0,04*	-0,02 ± 0,02, p= 0,165
	Άντρες			
	TSe (μgSe/L)	GPX-3 (μgSe/L)	SelP (μgSe/L)	SeAlb (μgSe/L)
Ηλικία	-0,10 ± 0,13 p= 0,428	0,058 ± 0,064, p= 0,365	-0,15± 0,02, p= 0,128	-0,05 ± 0,03, p= 0,100
	Γυναίκες			
	TSe (μgSe/L)	GPX-3 (μgSe/L)	SelP (μgSe/L)	SeAlb (μgSe/L)
Ηλικία	-0,33 ± 0,15, p= 0,034*	-0,07 ± 0,06, p= 0,282	-0,21± 0,03, p= 0,026*	-0,05± 0,03, p=0,861

Σημείωση :Οι συντελεστές συσχέτισης και τα p προκύπτουν μετά από έλεγχο για ηλικία, φύλο, δείκτη μάζας σώματος, κάπνισμα, κατανάλωση ολικού κρέατος. *p<0,05

Παρακολουθώντας τη μείωση των επιπέδων TSe στον ορό αίματος παρατηρήθηκε ότι μετά το πέρας του 31ο έτους των εθελοντών ακολουθεί έντονη μείωση των επιπέδων TSe η οποία, στη συνέχεια, ακολουθείται απο ένα πλατώ τιμών επιπέδων TSe και στη συνέχεια με την αύξηση της ηλικίας τα επίπεδα TSe μειώνονται πάλι. Σύμφωνα με την παρατήρηση αυτή δημιουργήθηκαν τέσσερις ηλικιακές ομάδες οι οποίες φαίνονται στον πίνακα 4.12 καθώς και οι μέσοι όροι TSe κα πρωτεϊνών Se ανά ηλικιακή ομάδα. Παρατηρείται ότι τα επίπεδα τόσο TSe όσο και των πρωτεϊνών του (SelP ,SeAlb) στον ορό αίματος μειώνονταν μετά το πέρας του τριακοστού πρώτου (31ο) ηλικιακού έτους των εθελοντών. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι και τα επίπεδα της GPX-3 φαίνονται να ελαττώνονται με την αύξηση της ηλικίας (p=0,16) και εδώ η μείωση εντοπίζεται με το πέρας του τριακοστού πρώτου (31ο) έτους των εθελοντών (Πιν. 4.12)

Πίνακας 4.12. Επίπεδα ολικού σεληνίου ορού και πρωτεϊνών σεληνίου σε άντρες και γυναίκες στις διάφορες ηλικιακές ομάδες του πληθυσμού μελέτης.

Ηλικία	**Συνολικός πληθυσμός (N=399)**			
Ηλικιακές Ομάδες	TSe (μgSe/L)	GPX-3 (μgSe/L)	SelP (μgSe/L)	SeAlb (μgSe/L)
<31 (N=118)	89,1 ± 24,5	23,9 ± 10,3	52,8 ± 15,7	12,1 ± 4,81
32-40 (N=107)	83,3 ± 18,1	22,6 ± 8,46	49,8 ± 12,8	10,9 ± 4,2
41-48 (N=86)	79,2±19,6*[1]	22,9 ± 9,88	46,6± 15,1*[1]	9,91 ± 4,11*[1]
>49 (N=88)	81,2 ± 21,8	23,5 ± 8,37	46,6± 16,4*[2]	11,1 ± 4,8
p	0,006*	0,71	0,005*	0,008*
	Άντρες (N=236)			
	TSe (μgSe/L)	GPX-3 (μgSe/L)	SelP (μgSe/L)	SeAlb (μgSe/L)
<31 (N=118)	85,4 ± 20,5	23,1 ± 9,63	50,8 ± 16,3	11,5 ± 4,21
32-40 (N=107)	83,8 ± 19,1	22,9 ± 8,84	50,2 ± 13,9	10,5 ± 4,12
41-48 (N=86)	79,7 ± 20,9	24,1 ± 11,1	45,9 ± 16,6	9,71 ± 4,21
>49 (N=88)	78,9 ± 20,6	23,7 ± 9,70	44,5 ± 15,9	10,7 ± 4,50
p	0,25	0,06	0,07	0,21
	Γυναίκες (N=163)			
	TSe (μgSe/L)	GPX-3 (μgSe/L)	SelP (μgSe/L)	SeAlb (μgSe/L)
<31 (N=118)	92,8 ± 27,8	25,3 ± 10,9	52,8 ± 15,7	12,6 ± 5,3
32-40 (N=107)	82,5 ± 16,5	22,1 ± 7,84	49,8 ± 12,8	11,4 ± 4,2
41-48 (N=86)	78,3±17,5*[1]	20,5 ± 6,84	46,6 ± 15,1	10,1 ± 3,61
>49 (N=88)	81,2 ± 21,8	23,4 ± 8,80	46,6 ± 16,4	11,8 ± 5,21
p	0,02*	0,92	0,06	0,09

Σημείωση: 1 στατιστικά σημαντική διαφορά από 1ο και 3ο τεταρτημόριο (διόρθωση κατά Bonferroni για πολλαπλές συγκρίσεις).2 στατιστικά σημαντική διαφορά από 1ο και 4ο τεταρτημόριο (διόρθωση κατά Bonferroni για πολλαπλές συγκρίσεις). * $p<0,05$,**$p<0,001$

Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Στο υποκεφάλαιο αυτό διερευνήθηκε η σχέση μεταξύ επιπέδων TSe και ηλικίας στον πληθυσμό της μελέτης μας. Από αυτή τη διερεύνηση αποκαλύφθηκε μια ισχυρή αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην ηλικία και στα επίπεδα TSe η οποία ήταν ανεξάρτητη από ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και χαρακτηριστικά αποτίμησης τρόπου ζωής και αφορά στον ολικό πληθυσμό και στις γυναίκες. Η ίδια σημαντική σχέση αντικατοπτρίζεται και στα επίπεδα SelP. Είναι μάλιστα χαρακτηριστικό ότι αυτή η μείωση εμφανίζεται κυρίως μεταξύ των ηλικιακών ομάδων κάτω των 31 ετών και άνω των 31 ετών. Ειδικά στις ηλικιακές ομάδες άνω των 40 ετών τα επίπεδα TSe είναι σχεδόν σταθερά ανεξαρτήτως ηλικίας ενώ τα επίπεδα της GPX-3 δεν επηρεάζονται από την ηλικία.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες προκύπτει ότι η σχέση μεταξύ επιπέδων TSe ορού και ηλικίας έχει απασχολήσει αρκετά την επιστημονική κοινότητα του Se. Παρόλο αυτά δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως μέχρι σήμερα το πώς επηρεάζει η ηλικία τα επίπεδα TSe καθώς και τις πρωτεΐνες Se στον ορό ενός φυσιολογικού πληθυσμού. Τα αποτελέσματα των συγχρονικών μελετών είναι αντικρουόμενα. Υπάρχουν μελέτες που έχουν δείξει αρνητική συσχέτιση TSe και ηλικίας κυρίως μετά τα 40 [259,266, 274,264,296] και οι οποίες επιβεβαιώνουν και τις δικές μας παρατηρήσεις. Ωστόσο, υπάρχουν και πολλές μελέτες που δε δείχνουν συσχέτιση [297, 298] αλλά έχει ακόμα καταγραφει και θετική συσχέτιση μεταξύ ηλικίας και TSe [284,299]. Είναι προφανές ότι τα αντικρουόμενα αποτελέσματα οφείλονται τόσο στα διαφορετικά ηλικιακά εύρη των μελετών όσο και στο διαφορετικό τρόπο με τον οποίο κάθε λαός διαφοροποιεί τις διατροφικές του συνήθεις με την πάροδο των χρόνων.

Επιπλέον, δεν υπάρχει ξεκάθαρη εικόνα για την επιρροή της ηλικίας στα επίπεδα των πρωτεϊνών Se. Σε δύο μελέτες φαίνεται ότι τα επίπεδα SelP αυξάνονται με την ηλικία κυρίως μετά το πέρας των 50 ετών [249,284]. Η εξήγηση είναι ότι με την αύξηση της ηλικίας αυξάνεται και η κατανάλωση των διατροφικών συμπληρωμάτων τα οποία οδηγούν στην αύξηση των επιπέδων TSe [284]. Ως μια άλλη πιθανή εξήγηση αναφέρεται ότι η αύξηση της ηλικίας ευνοεί τη βιοσύνθεση των σεληνοπρωτεϊνών μετά από μελέτη που έγινε σε ποντίκια [300]. Παράλληλα, μια μελέτη έδειξε ότι δεν υπάρχει καμία σχέση μεταξύ της ηλικίας και των επιπέδων SelP [301]. Για τα επίπεδα της GPX-3 υπάρχουν δύο μελέτες που δείχνουν ότι τα επίπεδά της δεν επηρεάζονται από την αύξηση της ηλικίας [214,215] ενώ σε μια μελέτη φαίνεται ότι τα επίπεδά της μειώνονται με την αύξηση της

ηλικίας [302]. Η μείωση που παρατηρήθηκε στην τελευταία μελέτη αυτή εξηγείται μέσω της ποιότητας ζωής που ακολουθούν οι εθελοντές (κάπνισμα, κατανάλωση αλκοόλ)

Στη συγκεκριμένη μελέτη, όσο αυξάνεται η ηλικία οι εθελοντές τείνουν να υιοθετούν διατροφή φτωχή σε τρόφιμα που περιέχουν σημαντικές ποσότητες Se όπως κρέας(p=0,02), αυγά (p=0,04) και γαλακτοκομικά προϊόντα(p<0,001). Από την άλλη πλευρά, είναι αξιοσημείωτο ότι με την πάροδο της ηλικίας, η μείωση του TSe οδηγεί σε μείωση μόνο της SelP και όχι και της GPX-3 γεγονός που οδηγεί σε αύξηση και του ποσοστού κατανομής της GPX-3 και στα δύο φύλα (p=0,06). Με άλλα λόγια ο οργανισμός, με την πάροδο της ηλικίας, τείνει να διατηρεί τα αποθέματα Se για την GPX-3 έτσι ώστε να εξασφαλίσει την απαιτούμενη αντιοξειδωτική προστασία και να προστατευτεί από το επαγόμενο με τη γήρανση οξειδωτικό στρες.

Τέλος, πειράματα που έγιναν σε ποντίκια έδειξαν ότι μια δίαιτα φτωχή σε Se μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των επιπέδων TSe λόγω ανακατανομής του σε διάφορα όργανα του οργανισμού [304, 305]. Συγκεκριμένα στις περιπτώσεις αυτές, αυξανόταν η συγκέντρωση Se στο συκώτι και στα νεφρά έναντι του πλάσματος. Είναι πολύ πιθανό, λοιπόν,το ίδιο να ισχύει και στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα δεδομένα αυτά έρχεται να ενισχύσει και μια μελέτη των Suzuki και των συνεργατών του στα ποντίκια όπου φαίνεται ότι το Se απορροφάται σε μεγαλύτερο βαθμό από ένα νεαρής ηλικίας οργανισμό σε αντίθεση με έναν μεγαλύτερης [306].

4.3.4.2 Επίπεδα ολικού σεληνίου/πρωτεϊνών σεληνίου και κάπνισμα

Στο πληθυσμό μελέτης παρατηρήθηκε ότι οι καπνιστές (81,3 ± 21,3, N=225) παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα TSe (κατά 6%) σε σχέση με τους μη καπνιστές (86,7 ± 21,5,N=174) (p=0,01) στο συνολικό πληθυσμό και στους άντρες (79,7 ± 18,6 έναντι 87,1 ± 22,8, p=0,01) (Πιν.4.13). Το εύρημα αυτό αναδείχθηκε μετά την εφαρμογή της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης ελέγχοντας ως προς ηλικία, φύλο, δείκτη μάζας σώματος και κατανάλωση ολικού κρέατος, με συντελεστές συσχέτισης (-4,05 ± 2,17, p=0,06) στο συνολικό πληθυσμό καθώς και στους άντρες του πληθυσμού μελέτης (-7,23 ± 2,85, p=0,01). Συγκεκριμένα, για τους άντρες καπνιστές παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα TSe μειώνονται κατά 7,23 μονάδες ενώ στο συνολικό πληθυσμό τα επίπεδα TSe μειώνονται κατά 4,05 μονάδες. Η μείωση των επιπέδων TSe στους άντρες φαίνεται μεγαλύτερη ακριβώς γιατί στις γυναίκες δεν παρατηρείται καμία επιρροή του καπνίσματος στα επίπεδα TSe. Επιπλέον, οι περισσότερες απο τις σημαντικές συσχετίσεις που παρουσιάζονται στον

πίνακα 4.13 και αφορούν στη διερεύνηση των επιπέδων πρωτεϊνών Se καθώς και τις κατανομές τους με τη συνήθεια του καπνίσματος δεν παραμένουν στατιστικά σημαντικές με την εισαγωγή της ηλικίας στο μοντέλο της γραμμικής παλινδρόμησης. Αντίθετα, οι καπνιστές εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα SelP στο συνολικό πληθυσμό (-4,77 ± 2,24, p=0,08) ενώ χαμηλότερα επίπεδα SeAlb (-1,10 ± 0,61, p=0,03) παρατηρήθηκαν μόνο στις γυναίκες που καπνίζουν, μετά από έλεγχο για τους προαναφερθέντες παράγοντες. Συγκεκριμένα οι καπνιστές εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα SelP κατά 4,77 μονάδες σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα των μη καπνιστών στο συνολικό πληθυσμό. Επιπλέον, τα επίπεδα της SeAlb στις γυναίκες που καπνίζουν εμφανίζονται χαμηλότερα κατά 1,10 μονάδες σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα στις γυναίκες που δεν καπνίζουν. Τα επίπεδα της GPX-3 καθώς και οι πρωτεϊνικές κατανομές δεν φαίνεται να επηρεάζονται από τη συνήθεια του καπνίσματος.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε περαιτέρω η σχέση TSe με το κάπνισμα. Για το σκοπό αυτό συσχετίσθηκαν ορισμένα χαρακτηριστικά των καπνιστών του πληθυσμού όπως αριθμός τσιγάρων, έτη καπνίσματος καθώς και ο λόγος πακέτων τσιγάρων προς τα έτη καπνίσματος. με τα επίπεδα ολικούTSe στον ορό αίματος. Παρόλο αυτά δεν προέκυψε καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ των συγκεκριμένων χαρακτηριστικών των καπνιστών και των επιπέδων TSe, πρωτεϊνών Se καθώς και των κατανομών τους στο συγκεκριμένο πληθυσμό.

Πίνακας 4.13. Επίπεδα ολικού σεληνίου/ πρωτεϊνών σεληνίου και πρωτεϊνικών κατανομών στο συνολικό πληθυσμό, στις γυναίκες και στους άντρες της μελέτης.

Επίπεδα ολικού σεληνίου ,πρωτεϊνών σεληνιου και πρωτεϊνικών κατανομών	**Καπνιστές (N=225)**	**Μη Καπνιστές (N=174)**	**p**
	Συνολικός Πληθυσμός (N=399)		
TSe (μgSe/L)	81,3 ± 21,3	86,7 ± 21,5	0,01*
GPX-3 (μgSe/L)	23,1 ± 9,84	23,8 ± 9,10	0,45
SelP (μgSe/L)	47,6 ± 15,4	51,2 ± 14,6	0,02*
SeAlb (μgSe/L)	10,6 ± 4,40	11,7 ± 4,62	0,01*
GPX-3/SelP	0,57 ± 0,46	0,53 ± 0,42	0,36
GPX-3/SeAlb	2,37 ± 1,01	2,20 ± 1,11	0,10
SelP/SeAlb	5,46 ± 3,31	4,86 ± 2,04	0,02*
	Άντρες (N=236)		
TSe (μgSe/L)	79,7 ± 18,6	87,1 ± 22,8	0,01*
GPX-3 (μgSe/L)	23,1 ± 9,87	24,1 ± 9,56	0,46
SelP (μgSe/L)	46,3 ± 14,8	51,6 ± 17,3	0,02*
SeAlb (μgSe/L)	10,3 ± 4,35	11,4 ± 4,12	0,05*
GPX-3/SelP	0,61 ± 0,53	0,60 ± 0,52	0,82
GPX-3/SeAlb	2,46 ± 1,09	2,35 ± 1,55	0,59
SelP/SeAlb	5,54± 3,47	4,94 ± 2,31	0,12
	Γυναίκες (N=163)		
TSe (μgSe/L)	85,1 ± 26,6	86,4 ± 20,6	0,74
GPX-3 (μgSe/L)	23,1 ± 9,84	23,6 ± 9,10	0,75
SelP (μgSe/L)	50,8 ± 15,4	50,8 ± 14,6	0,99
SeAlb (μgSe/L)	11,2 ± 4,49	11,9 ± 4,98	0,31
GPX-3/SelP	0,47 ± 0,21	0,48 ± 0,22	0,84
GPX-3/SeAlb	2,17 ± 0,72	2,08 ± 0,68	0,39
SelP/SeAlb	5,25 ± 2,80	4,80 ± 1,80	0,26

Σημείωση: * $p<0,05$.

Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Στο υποκεφάλαιο αυτό εξετάστηκε η σχέση TSe και καπνίσματος. Το κάπνισμα συσχετίζεται με χαμηλότερα επίπεδα TSe και πρωτεϊνών Se στον ορό αλλά η σχέση αυτή καθορίζεται από το φύλο. Συγκεκριμένα, χαμηλότερα επίπεδα TSe εμφανίζονται μόνο στους άντρες καπνιστές ενώ στα μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης η SeAlb σχετίζεται αρνητικά με το κάπνισμα στις γυναίκες. Επιπλέον, η μείωση των επίπέδων TSe συνοδευόταν από μείωση της SelP στο συνολικό πληθυσμό

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες η συνήθεια του καπνίσματος συμβάλλει στη μείωση των επιπέδων TSe στον ορό [306-308]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι το κάπνισμα συμβάλλει στη μείωση των επιπέδων της SelP [309,310]. Λίγο πιο περίπλοκα είναι τα πράγματα όσον αφορά τις GPX. Οι περισσότερες μελέτες έχουν γίνει στην ερυθροκυτταρική GPX και έχουν δείξει μείωση της δραστικότητάς της με το κάπνισμα [306,311]. Από την άλλη μία μελέτη έχει δείξει ότι ενώ το κάπνισμα μπορεί να μειώσει τα επίπεδα της ερυθροκυτταρικής δραστικότητας της GPX δεν επηρεάζει τη δραστικότητα της GPX-3 στο πλάσμα, γεγονός που δείχνει ότι η ερυθροκυτταρική GPX είναι ίσως πιο ευαίσθητος δείκτης της επίδρασης του καπνίσματος σε σχέση με την GPX-3 της κυκλοφορίας του αίματος [312]. Βέβαια υπάρχουν και πρόσφατες μελέτες που έχουν δείξει ενεργοποιητική δράση του καπνίσματος στη δραστικότητα της GPX [313]. Σε συμφωνία με αυτό έχει βρεθεί ότι στους μη καπνιστές η έκφραση των GPX-1 και GPX-3 στα λευκοκύτταρα ανθρώπου είναι χαμηλότερη σε σχέση με τους καπνιστές [314]

Το κάπνισμα μπορεί να επηρεάσει με πολλούς τρόπους την κατάσταση Se ενός οργανισμού χωρίς ωστόσο να είναι ξεκάθαρο ποιος έχει τη μεγαλύτερη συνεισφορά στα επίπεδα TSe. Αφενός το κάπνισμα εμπλέκεται στην εμφάνιση της συστηματικής φλεγμονής η οποία συμβάλλει στη μείωση των επιπέδων τόσο TSe στον ορό όσο και επιπέδων SelP [315]. Από την άλλη, ο καπνός του τσιγάρου έχει κάδμιο, το οποίο μπορεί να απορροφηθεί στον ανθρώπινο οργανισμό [316]. Το κάδμιο μέσω δημιουργίας συμπλόκων με το Se μπορεί να εμποδίσει το μεταβολισμό του και την είσοδό του στις μεταβολικές αποθήκες του στους ιστούς. Ειδικότερα, το κάδμιο εμποδίζει το σχηματισμό σεληνογλουταθειόνης (GS Se SG), η οποία δεν μπορεί να παίξει το ρόλο της ως μεταβολικό ενδιάμεσο για την ενσωμάτωση του Se στην GPX των ερυθροκυττάρων και στις σεληνοπρωτείνες του πλάσματος [317]. Τέλος, υπάρχουν και μελέτες που δείχνουν ότι ο καπνός του τσιγάρου περιέχει Se και ένα μέρος αυτού μπορεί να εισέλθει στην κυκλοφορία με την εισπνοή του τσιγάρου και έτσι με αυτό τον τρόπο να αυξήσει τα επίπεδά του στον οργανισμό [318]

Στη δική μας εργασία αυτά που ήταν αξιοπρόσεκτα ήταν ότι α) η μείωση του TSe στους καπνιστές, αυτή η μείωση εμφανιζόταν στο συνολικό πληθυσμό και στους άντρες β) η μείωση των επιπέδων TSe συνοδευόταν μόνο από μείωση της SelP στο συνολικό πληθυσμό. Η μείωση του TSe συνοδεύεται και με μείωση των επιπέδων SelP το οποίο είναι αναμενόμενο να συμβεί μιας και αυτή η πρωτείνη συνεισφέρει περισσότερο στα επίπεδα TSe στον ορό αίματος. Όσον αφορά την GPX-3 η μείωση του TSe μπορεί να αντισταθμίζεται από μία προσπάθεια του οργανισμού να διατηρήσει τα επίπεδα της υψηλά ώστε να μειώσει το επαγόμενο από κάπνισμα οξειδωτικό στρες [302, 314]. Βέβαια θα μπορούσε να συμβαίνει και το αντίθετο, δηλαδή το κάπνισμα με αδιευκρίνιστο ακόμα βιοχημικό μηχανισμό θα μπορούσε να επάγει μια μείωση του μεταφορέα του Se στο πλάσμα της SelP και αυτή η μείωση να οδηγεί σε μειωμένο Se.

Όσον αφορά την παρατηρούμενη μείωση του Se μόνο στους άντρες κάτι τέτοιο έχει προκύψει και από την ανάλυση των δεδομένων της NHANES III [319] χωρίς ωστόσο να δίνεται εξήγηση από τους ερευνητές ούτε να μελετώνται τα διατροφικά χαρακτηριστικά των εθελοντών. Στην παρούσα μελέτη, τα διατροφικά χαρακτηριστικά φαίνονται ότι διαφοροποιούν την απόκριση των δύο φύλων στο κάπνισμα. Συγκεκριμένα, οι γυναίκες καπνίστριες παρουσιάζουν χαμηλότερο βαθμό προσκόλλησης στη μεσογειακή διατροφή σε σχέση με τις γυναίκες που δεν καπνίζουν (28 έναντι 30 ,p=0,03) με αποτέλεσμα να μην προσλαμβάνουν τρόφιμα πλούσια σε SeMet, η οποία αποτελεί βασικό συστατικό φυτικών προϊόντων [283] και να παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα SeAlb εφόσον δεν ευνοείται η βιοσύνθεσή της. Απο την άλλη πλευρά οι άντρες καπνιστές της μελέτης καταναλώνουν χαμηλότερες ποσότητες αυγών σε σχέση με τους άντρες μη καπνιστές (p=0,05) με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν και χαμηλότερα επίπεδα TSe εφόσον τα αυγά θεωρούνται σημαντική πηγή Se όπως έχει αναφερθεί. Επιπλέον, οι μη καπνιστές της μελέτης παρουσίαζαν την τάση να ακολουθούν μια διατροφή πλούσια σε αυγά (p=0,08) και γαλακτοκομικά προϊόντα (p=0,1) σε σχέση με τους καπνιστές. Τόσο τα αυγά όσο και τα γαλακτοκομικά προϊόντα συνεισφέρουν στα αυξημένα επίπεδα Se που παρατηρήθηκαν.

4.3.4.3 Επίπεδα ολικού σεληνίου/πρωτεϊνών σεληνίου και φυσική δραστηριότητα

Στο συνολικό πληθυσμό, οι φυσικά δραστήριοι παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα SelP (κατά 4%) σε σχέση με τους μη φυσικά δραστήριους εθελοντές (51,1 ± 14,2 έναντι 48,1 ± 15,5, p=0,05, αντίστοιχα), ενώ η GPX-3 δεν διαφοροποιείται. (Πιν.4.14). Το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζεται και

στις πρωτεϊνικές κατανομές GPX-3/SelP, GPX-3/SeAlb του συνολικού πληθυσμού (Πιν.4.14). Στους άντρες της μελέτης εντοπίζονται υψηλότερα επίπεδα TSe (κατά 8%), SelP (κατά 6%) και SeAlb (κατά 11 %) καθώς και GPX-3/SeAlb (κατά 6%) στους φυσικά δραστήριους (N=87) σε σχέση με τους μη φυσικά δραστήριους εθελοντές (N=149). Στις γυναίκες της μελέτης, ο λόγος GPX-3/SelP ήταν κατά 13% υψηλότερος στις φυσικά μη δραστήριες (N=106) σε σχέση με τις φυσικά δραστήριες (N=57) εθελόντριες.

Μετά απο εφαρμογή της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης και έλεγχο ως προς την ηλικία, φύλο, BMI, κάπνισμα, κατανάλωση ολικού κρέατος επιβεβαιώνεται ότι τα επίπεδα SeAlb (1,15 ± 0,59, p=0,05) και SelP (3,83 ± 2,15, p=0,05) παρουσιάζονται αυξημένα στους φυσικά δραστήριους άντρες του πληθυσμού της μελέτης. Συγκεκριμένα τα επίπεδα SeAlb παρουσιάζονται αυξημένα κατά 1,15 μgSe/L και τα επίπεδα SelP κατά 3,83 μgSe/L μονάδες στους φυσικά δραστήριους άντρες της μελέτης. Οι υπόλοιπες συσχετίσεις χάθηκαν με την εισαγωγή της ηλικίας στο μοντέλο ακριβώς γιατί οι φυσικά δραστήριοι εθελοντές είναι νεότερης ηλικίας σε σχέση με τους μη φυσικά δραστήριους (37 ± 12 έναντι 39 ± 10, p=0,07 και παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα TSe στον ορό αίματος όπως έχει ήδη αναφερθεί (Πίνακας 4.12)

Στη συνέχεια εξετάστηκαν διάφορα χαρακτηριστικά της φυσικής δραστηριότητας των εθελοντών όπως το είδος της φυσικής δραστηριότητας καθώς και η διάρκεια της φυσικής δραστηριότητας αλλά δεν παρατηρήθηκε καμία διαφοροποίηση ως προς τα επίπεδα TSe, πρωτεϊνών Se καθώς και των πρωτεϊνικών κατανομών τους.

Πίνακας 4.14. Επίπεδα ολικού σεληνίου, πρωτεϊνών σεληνίου και πρωτεϊνικών κατανομών στον συνολικό πληθυσμό, στις γυναίκες και στους άντρες της μελέτης σε σχέση με τη φυσική δραστηριότητά τους.

Επίπεδα ολικού σεληνίου,πρωτεϊνών σεληνίου και πρωτεϊνικών κατανομών	**Φυσικά Δραστήριοι (N=144)**	**Φυσικά μη Δραστήριοι (N=255)**	**p**
	Συνολικός Πληθυσμός (N=399)		
TSe (μgSe/L)	85,9 ± 21,1	82,3 ± 21,7	0,11
GPX-3 (μgSe/L)	23,3 ± 9,10	23,4 ± 9,77	0,89
SelP (μgSe/L)	51,1 ± 14,2	48,1 ± 15,5	0,05*
SeAlb (μgSe/L)	11,4 ± 4,64	10,9 ± 4,46	0,18
GPX-3/SelP	0,50 ± 0,32	0,58 ± 0,32	0,05
GPX-3/SeAlb	2,17 ± 0,83	2,37 ± 1,16	0,06
SelP/SeAlb	5,14 ± 2,55	5,23 ± 2,99	0,75
	Άντρες (N=236)		
	Φυσικά Δραστήριοι (N=87)	**Φυσικά μη Δραστήριοι (N=149)**	
TSe (μgSe/L)	86,4 ± 20,1	79,6 ± 20,1	0,01*
GPX-3 (μgSe/L)	23,9 ± 9,32	23,1 ± 10,1	0,50
SelP (μgSe/L)	51,1 ± 14,2	48,1 ± 15,5	0,02*
SeAlb (μgSe/L)	11,4 ± 4,64	10,2 ± 4,46	0,038*
GPX-3/SelP	0,54 ± 0,39	0,64 ± 0,62	0,14
GPX-3/SeAlb	2,23 ± 0,93	2,53 ± 1,40	0,058
SelP/SeAlb	5,11 ± 2,80	5,48 ± 3,35	0,36
	Γυναίκες (N=163)		
	Φυσικά Δραστήριοι (N=57)	**Φυσικά μη Δραστήριοι (N=106)**	
TSe (μgSe/L)	85,1 ± 22,9	86,3 ± 23,3	0,75
GPX-3 (μgSe/L)	22,3 ± 8,73	23,9 ± 9,45	0,28
SelP (μgSe/L)	51,3 ± 13,1	50,6 ± 14,6	0,77
SeAlb (μgSe/L)	11,5 ± 5,25	11,8 ± 4,55	0,77
GPX-3/SelP	0,44 ± 0,15	0,50 ± 0,24	0,04*
GPX-3/SeAlb	2,01 ± 0,65	2,13 ± 0,68	0,58
SelP/SeAlb	5,19 ± 2,13	4,87 ± 2,38	0,39

Σημείωση: *p<0,05.

Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Στο υποκεφάλαιο αυτό εξετάστηκε η σχέση Se και της φυσικής δραστηριότητας. Η πλειοψηφία των συγχρονικών μελετών δεν έχει δείξει σχέση μεταξύ TSe και φυσικής δραστικότητας [270, 320]. Παράλληλα, δύο μελέτες έχουν δείξει ότι οι άνθρωποι που γυμνάζονται είχαν αυξημένη δραστικότητα GPX-1 [321] και GPX-3 [322] σε ερυθροκύτταρα και πλάσμα αντίστοιχα, σε σχέση με ανθρώπους που ακολουθούσαν καθιστική ζωή ενώ δύο άλλες μελέτες δεν έχουν δείξει παρόμοια σχέση [274, 323]. Αντιθέτως, δεν υπάρχει καμία σχετική μελέτη που να αφορά στη συσχέτιση SelP και SeAlb με τη φυσική δραστηριότητα. Παράλληλα, μακροχρόνια πρωτόκολλα άσκησης [324], αλλά και μεμονωμένες συνεδρίες σε ανθρώπους [325] έχουν δείξει αύξηση της δραστικότητα της GPX του πλάσματος και των ερυθροκυττάρων, πιθανότατα σε μία προσπάθεια του οργανισμού να αντισταθμίσει το ασκησιογενές οξειδωτικό στρες.

Στη δική μας μελέτη η φυσική δραστηριότητα σχετίζεται με υψηλότερα επίπεδα Se και SelP στον ορό αλλά η σχέση αυτή καθορίζεται από το φύλο. Συγκεκριμένα, υψηλότερα επίπεδα TSe, SeAlb και SelP παρουσιάζονται μόνο στους φυσικά δραστήριους άντρες του πληθυσμού μελέτης. Η ηλικία φαίνεται να επηρεάζει τη σχέση Se με τη φυσική δραστηριότητα εφόσον οι φυσικά δραστήριοι εθελοντές ήταν νεότερης ηλικίας με υψηλότερα επίπεδα TSe. Απο την άλλη, στους άντρες της μελέτης εντοπίζονται διαφορές στα επίπεδα SeAlb, SelP στους φυσικά δραστήριους παρόλο που λαμβάνεται υπόψιν ο καταλυτικός ρόλος της ηλικίας. Ο λόγος που η κατανομή Se στη SelP αυξάνεται σε αντίθεση με την GPX-3 δεν είναι γνωστός, ούτε μπορεί να εξηγηθεί από πειράματα άλλων μελετών. Εν μέρει αυτό πιθανόν να οφείλεται στις διαφορετικές διατροφικές συνήθειες που ακολουθούσαν οι φυσικά δραστήριοι άντρες της μελέτης. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι οι φυσικά δραστήριοι άντρες κατανάλωναν αυξημένες ποσότητες γαλακτοκομικών προϊόντων ($p=0,002$) και γλυκών ($p=0,02$) σε σχέση με τους μη φυσικά δραστήριους άντρες. Από την άλλη το γεγονός ότι στα μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης το Se δεν είναι αυξημένο στους φυσικά δραστήριους άντρες σε σχέση με αυτούς που ακολουθούσαν καθιστική ζωή αλλά αντιθέτως είναι αυξημένες οι SelP και SeAlb μπορεί να σημαίνει μια εξειδικευμένη επιρροή της φυσικής δραστηριότητας στα επίπεδα SeAlb και SelP.

4.3.4.4 Επίπεδα ολικού σεληνίου/πρωτεϊνών σεληνίου και παχυσαρκία

Στη συνέχεια εξετάστηκε η σχέση TSe με ανθρωπομετρικούς δείκτες παχυσαρκίας. Αρχικά, διαχωρίστηκε ο πληθυσμός σε ελλιποβαρείς (BMI<20), φυσιολογικούς (BMI=20-24,9), υπέρβαρους (BMI=25-29,9) και παχύσαρκους BMI (>30) και επιχειρήθηκε να βρεθεί αν υπάρχουν διαφορές στα επίπεδα TSe, πρωτεϊνών Se καθώς και πρωτεϊνικών κατανομών μεταξύ των ομάδων (Πίνακας 4.15). Παρατηρείται ότι με την αύξηση της παχυσαρκίας τα επίπεδα TSe μειώνονται στατιστικά σημαντικά στο σύνολο του πληθυσμού. Η μείωση αυτή συνοδεύεται από αντίστοιχη μείωση όλων των σεληνοπρωτεϊνών, μόνο όμως αυτή της αλβουμίνης είναι στατιστικά σημαντική. Η ίδια σταδιακή μείωση των επιπέδων ολικού Se και σεληνοπρωτεϊνών παρατηρείται και στους άντρες (αν και μη στατιστικά σημαντική) και στις γυναίκες. Μετά από εφαρμογή πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης ελέγχοντας για την ηλικία, φύλο, κάπνισμα, κατανάλωση ολικού κρέατος προέκυψε σημαντική αρνητική συσχέτιση των επιπέδων TSe με το BMI στο σύνολο του πληθυσμού καθώς και στους άντρες. Οι υπόλοιπες συσχετίσεις χάθηκαν με την εισαγωγή της ηλικίας στο μοντέλο της πολλαπλής γραμμικής παλινδόμησης .

Η αρνητική επιρροή του δείκτη μάζας σώματος επιβεβαιώθηκε και στις αντίστροφες συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ των δεικτών παχυσαρκίας (περίμετρος μέσης, περιφέρεια ισχίων, λόγος περίμετρος μέσης/περιφέρεια ισχίων,) και των επιπέδων TSe και με τις πρωτεΐνες Se. Παρόλο αυτά οι συσχετίσεις αυτές δεν ήταν σημαντικές όταν στο μοντέλο της γραμμικής πολλαπλής παλινδρόμησης εισήχθηκε η ηλικία.

Πίνακας 4.15. Επίπεδα ολικού σεληνίου, πρωτεϊνών σεληνίου και πρωτεϊνικών κατανομών στο συνολικό πληθυσμό, στις γυναίκες και στους άντρες της μελέτης σε ελλιποβαρείς, φυσιολογικούς,παχύσαρκους και υπέρβαρους.

Επίπεδα ολικού σεληνίου, ,πρωτεϊνών Se και πρωτεϊνικών κατανομών.	***Ομάδες BMI***				
	Συνολικός Πληθυσμός (N=315)				
	<20(N=33)	***20-25(N=124)***	***25-30(N=106)***	***>30 (N=52)***	***P***
TSe (μgSe/L)	92,2 ± 27,1	82,8 ±20,1	81,4 ± 20,9	79,6 ± 17,4	0,04*
GPX-3 (μgSe/L)	25,1 ± 9,81	23,2 ±9,32	23,1 ± 9,31	22,2 ± 8,84	0,61
SelP (μgSe/L)	54,4 ± 15,1	48,8 ±13,7	47,5 ± 16,8	47,2 ± 14,8	0,12
SeAlb (μgSe/L)	12,7 ± 4,53	10,8 ±4,98	10,7 ± 3,85	9,99 ± 3,74	0,04*
GPX-3/SelP	0,45 ± 0,11	0,54 ± 0,37	0,61 ± 0,58	0,59 ± 0,52	0,33
GPX-3/SeAlb	2,02 ± 0,38	2,40 ± 1,13	2,31 ± 0,98	2,52 ± 1,63	0,20
SelP/SeAlb	4,68 ± 1,67	5,38 ± 2,78	5,16 ± 3,24	5,58 ± 3,43	0,53
	Άντρες (N=185)				
TSe (μgSe/L)	89,7 ± 23,9	86,5 ± 22,1	80,4 ± 20,1	77,2 ± 16,5	0,14
GPX-3 (μgSe/L)	22,1 ± 8,98	24,9 ± 10,8	22,8 ± 9,15	22,7 ± 9,55	0,57
SelP (μgSe/L)	54,8 ± 14,3	50,6 ± 15,6	46,9 ± 17,1	45,2 ± 16,1	0,37
SeAlb (μgSe/L)	12,8 ± 4,53	10,9 ± 5,01	10,6 ± 3,82	9,2 ± 3,69	0,26
GPX-3/SelP	0,39 ± 0,06	0,58 ± 0,46	0,63 ± 0,33	0,69 ± 0,62	0,82
GPX-3/SeAlb	1,69 ± 0,62	2,60 ± 1,39	2,35 ± 1,03	2,85 ± 2,05	0,25
SelP/SeAlb	4,23 ± 0,91	5,63 ± 3,23	5,23 ± 3,43	5,72 ± 3,01	0,78
	Γυναίκες (N=130)				
TSe (μgSe/L)	92,4 ± 27,8	79,1 ± 17,2	87,8 ± 25,3	82,5 ± 18,5	0,04*
GPX-3 (μgSe/L)	25,3 ± 9,98	21,5 ± 7,29	24,5 ± 10,4	21,7 ± 8,03	0,17
SelP (μgSe/L)	54,4 ± 15,3	46,9 ± 11,3	51,5 ± 15,4	49,8 ± 13,1	0,07
SeAlb (μgSe/L)	12,8 ± 4,63	10,7 ± 4,99	11,6 ± 4,02	10,9 ± 3,64	0,25
GPX-3/SelP	0,46 ± 0,12	0,48 ± 0,23	0,49 ± 0,21	0,46 ± 0,21	0,90
GPX-3/SeAlb	2,02 ± 0,37	2,19 ± 0,72	2,10 ± 0,47	2,10 ± 0,71	0,68
SelP/SeAlb	4,71 ± 1,71	5,13 ± 2,13	4,73 ± 1,67	5,41 ± 3,96	0,70

Σημείωση: *p<0,05.

Πίνακας 4.16. Συντελεστές συσχέτισης ανάμεσα στο δείκτη μάζας σώματος και τα επίπεδα ολικού σεληνίου, υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης-3, σεληνοπρωτεΐνης P και σεληνοαλβουμίνης του πληθυσμού μελέτης.

	Συνολικός πληθυσμός (N=399)			
	TSe (μSe/L)	GPX-3 (μSe/L)	SelP (μSe/L)	SeAlb (μSe/L)
Δείκτης Μάζας Σώματος (Kg/m^2)	-1,06 ± 0,34, p=0,002*	-0,19± 0,16, p= 0,088	-0,22 ±0,17, p= 0,220	-0,08 ± 0,18, p= 0,124
	Άντρες (N=236)			
	TSe (μSe/L)	GPX-3 (μSe/L)	SelP (μSe/L)	SeAlb (μSe/L)
Δείκτης Μάζας Σώματος (Kg/m^2)	-1,49 ± 0,46, p=0,002*	-0,21±0,15, p= 0,235	-0,41± 0,25, p= 0,125	-0,06± 0,01, p= 0,463
	Γυναίκες (N=163)			
	TSe (μSe/L)	GPX-3 (μSe/L)	SelP (μSe/L)	SeAlb (μSe/L)
Δείκτης Μάζας Σώματος (Kg/m^2)	-0,34±0,25, p= 0,384	-0,19±0,15, p= 0,214	-0,08±0,07, p= 0,71	-0,10±0,07, p=0,144

Σημείωση: Οι συντελεστές συσχέτισης και τα p προκύπτουν μετά από έλεγχο για ηλικία, φύλο, κάπνισμα, κατανάλωση ολικού κρέατος. *p<0,05.

Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Στο υποκεφάλαιο αυτό εξετάστηκε η σχέση TSe και δεικτών παχυσαρκίας. Το κύριο εύρημα της μελέτης είναι ότι τα επίπεδα TSe επηρεάζονται αρνητικά από την αύξηση του δείκτη μάζας σώματος στο συνολικό πληθυσμό (-1,06 ± 0,34,p=0,002) και στους άντρες της μελέτης (-1,49 ± 0,46,p=0,002). Η μείωση αυτή δεν συνοδεύεται και από αντίστοιχη, στατιστικά σημαντική μείωση των σεληνοπρωτεϊνών, ούτε μεταβολή της κατανομής Se στις πρωτεΐνες. Όσον αφορά τη σχέση του TSe με την παχυσαρκία, η ίδια αρνητική σχέση μεταξύ του δείκτη μάζας σώματος και των επιπέδων TSe συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες [180,291]. Ωστόσο υπάρχουν και πολλές συγχρονικές μελέτες που έχουν δείξει ότι η παχυσαρκία δεν επηρεάζει το TSe. Παρόλ' αυτά υπάρχουν και μελέτες στις οποίες δεν φαίνεται καμία σχέση μεταξύ δείκτη μάζας σώματος και των επιπέδων TSe στον αίμα [263, 275, 309, 310]. Τέλος, υπάρχει μελέτη όπου φαίνεται θετική σχέση μεταξύ των επιπέδων Se και του δείκτη μάζας σώματος στις γυναίκες [299].

Είναι προφανές ότι η επιλογή του πληθυσμού μελέτης και τα συνυπάρχοντα μεταβολικά χαρακτηριστικά τους επηρεάζει τη σχέση παχυσαρκίας και TSe. Όσον αφορά τα δικά μας αποτελέσματα είναι ιδιαίτερα σημαντική η μείωση του TSe με την παχυσαρκία δεδομένου ότι σε πολλά είδη τροφίμων οι παχύσαρκοι δείχνουν αυξημένη κατανάλωση και άρα θεωρητικά αυξημένη πρόσληψη Se. Η σχέση αυτή δεν χάνεται με την ηλικία γεγονός που υποδηλώνει ότι η μεταβολική δυσλειτουργία του οργανισμού στους παχύσαρκους επηρεάζει την απορρόφηση και το μεταβολισμό του. Ίσως το αυξημένο οξειδωτικό στρες που παρατηρείται σε ανθρώπους με μεγάλο σωματικό βάρος να οδηγεί σε αυξημένες αντιοξειδωτικές ανάγκες και κατανάλωση των αποθεμάτων Se. Από την άλλη φαίνεται ότι αυτή η μείωση του TSe δεν έχει επίπτωση σε μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη Se αλλά ισοκατανέμεται σε όλες τις πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να μην παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση σε αυτές. Μηχανιστικά πειράματα που να μελετούν τη σχέση παχυσαρκίας και κατάστασης Se δεν έχουν γίνει.

4.3.4.5 Επίπεδα ολικού Se/πρωτεϊνών σεληνίου και υπέρταση

Στο υποκεφάλαιο αυτό διερευνήθηκε η σχέση του Se με την αρτηριακή πίεση. Αρχικά μελετήθηκε η κατάσταση Se σε υπερτασικούς και μη υπερτασικούς. Στο συνολικό πληθυσμό της μελέτης παρατηρήθηκε ότι οι υπερτασικοί παρουσίαζαν, κατά 10%, χαμηλότερα επίπεδα GPX-3 σε σχέση με τους μη υπερτασικούς (p=0,01). Η ίδια τάση εμφανίζεται και στην πρωτεϊνική κατανομή GPX-3/SelP, η οποία μειώνεται κατά 17% στους υπερτασικούς σε σχέση με τους μη υπερτασικούς (p=0,05). Η μείωση της GPX-3/SelP στους υπερτασικούς οφείλεται στη μείωση των επιπέδων GPX-3 αλλά και στη μικρή, μη στατιστικά σημαντική όμως αύξηση των επιπέδων SelP η οποία αντικατοπτρίζεται στην αύξηση του λόγου SelP/SeAlb, κατά 14%,στους υπερτασικούς σε σχέση με τους μη υπερτασικούς (p=0,03*).

Ωστόσο, αυτό που είναι ξεκάθαρο από τον Πίνακα 4.17 είναι ότι η σχέση Se και πίεσης εμφανίζει φυλετικό διμορφισμό αφού παρατηρούνται σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο φύλων. Συγκεκριμένα, στους άντρες η μόνη διαφορά που παρατηρείται είναι μια αύξηση των επιπέδων SelP στους υπερτασικούς κατά 10% σε σχέση με τους μη υπερτασικούς (p=0,02).

Αντιθέτως, οι υπερτασικές γυναίκες εμφανίζουν και χαμηλότερα επίπεδα TSe κατά 11% (p=0,03), τα οποία οδηγούν και σε μειωμένα επίπεδα όλων των πρωτεϊνών σεληνίου αλλά στατιστικά σημαντικές μειώσεις εμφανίζονται μόνο στην GPX-3 (p=0,02) και στην SeAlb (p=0,02).

Οι αλλαγές αυτές οδηγούν σε μείωση του λόγου GPX-3/SeAlb κατά 18% (p=0,02) και αύξηση του λόγου SelP/SeAlb κατά 27% (p=0,03) στις υπερτασικές γυναίκες του πληθυσμού.

Από τη διερεύνηση της σχέσης των επιπέδων TSe και πρωτεϊνών του με τη ΣΑΠ και ΔΑΠ και μετά από εφαρμογή της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης και έλεγχο ως προς ηλικία, φύλο, δείκτη μάζας σώματος, κατανάλωση ολικού κρέατος και κάπνισμα προέκυψαν τα ευρήματα του πίνακα 4.18. Συγκεκριμένα, η συστολική πίεση συσχετίζεται αρνητικά με την GPX-3 και το λόγο GPX-3/SelP στον ολικό πληθυσμό, στους άντρες και στις γυναίκες. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μια θετική συσχέτιση με τη συστολική πίεση και την κατανομή πρωτεϊνών SelP/SeAlb στο συνολικό πληθυσμό και στους άντρες (0,003 ± 0,001, p=0,001). Η ΔΑΠ συσχετίζεται αρνητικά με την GPX-3 και με SeAlb στον συνολικό πληθυσμό και στις γυναίκες. Θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της ΔΑΠ και της κατανομής SelP/SeAlb στο συνολικό πληθυσμό, στους άντρες και στις γυναίκες.

Πίνακας 4.17. Επίπεδα ολικού σεληνίου, πρωτεϊνών σεληνίου και πρωτεϊνικών λόγων σε υπερτασικούς και μη υπερτασικούς εθελοντές.

	Υπερτασικοί (N=95)	**Μη Υπερτασικοί (N=289)**	
	Συνολικός Πληθυσμός (N=384)		**p**
TSe (μgSe/L)	83,1 ± 19,9	83,8 ± 22,1	0,76
GPX-3 (μgSe/L)	21,5 ± 8,92	24,1 ± 9,71	0,01*
SelP (μgSe/L)	50,9 ± 14,6	48,4 ± 15,4	0,15
SeAlb (μgSe/L)	10,5 ± 4,60	11,2 ± 4,51	0,20
GPX-3/SelP	0,48 ± 0,40	0,58 ± 0,47	0,05*
GPX-3/SeAlb	2,26 ± 0,96	2,33 ± 1,11	0,56
SelP/SeAlb	5,81 ± 3,25	5,01 ± 2,71	0,03*
	Άντρες (N= 230)		
	Υπερτασικοί (N=68)	**Μη Υπερτασικοί (N=162)**	
TSe (μgSe/L)	84,9± 20,2	80,8 ± 20,3	0,16
GPX-3 (μgSe/L)	22,5 ± 9,48	23,9 ± 9,92	0,32
SelP (μgSe/L)	51,6 ± 15,5	46,4 ± 15,8	0,02*
SeAlb (μgSe/L)	10,8 ± 4,59	10,5 ± 4,17	0,69
GPX-3/SelP	0,51 ± 0,46	0,64 ± 0,58	0,07
GPX-3/SeAlb	2,25 ± 0,93	2,51 ± 1,38	0,10
SelP/SeAlb	5,56 ± 2,87	5,25 ± 3,29	0,48
	Γυναίκες (N=154)		
	Υπερτασικοί (N=27)	**Μη Υπερτασικοί (N=127)**	
TSe (μgSe/L)	78,1± 18,6	87,5 ± 23,6	0,03*
GPX-3 (μgSe/L)	19,1 ± 6,87	24,4 ± 9,46	0,001*
SelP (μgSe/L)	49,2 ± 12,3	51,1 ± 14,5	0,51
SeAlb (μgSe/L)	9,78 ± 4,63	12,1 ± 4,80	0,02*
GPX-3/SelP	0,41 ± 0,18	0,50 ± 0,22	0,02*
GPX-3/SeAlb	2,28 ± 1,06	2,10 ± 0,54	0,40
SelP/SeAlb	6,46 ± 4,04	4,69 ± 1,65	0,03*

Σημείωση : * $p<0,05$.

Πίνακας 4.18 Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ ΣΑΠ/ΔΑΠ και επιπέδων ολικού σεληνίου, πρωτεινών σεληνίου και των πρωτεϊνικών κατανομών τους.

Πίεση Αίματος (mmHg)	**Συνολικός Πληθυσμός (N=399)**	**Άντρες (N=236)**	**Γυναίκες (N=163)**
ΣΑΠ (mmHg)		**GPX-3**	
	-0,155 ± 0,032, p<0,0001**	-0,114 ± 0,043, p=0,008**	-0,220 ± 0,050, p<0,0001**
		GPX-3/SelP	
	-1,009 ± 0,002, p<0,0001**	-1,01 ± 0,02, p<0,0001**	-1,07 ± 0,01, p=0,001**
		SelP/SeAlb	
	1,005 ± 0,001, p=0,004*	1,008 ± 0,001, p=0,001*	1,011 ± 1,21, p=0,449
ΔΑΠ (mmHg)		**GPX-3**	
	-0,116 ± 0,041, p=0,005*	-0,061 ± 0,053, p=0,250	-0,238 ± 0,066, p<0,0001**
		SeAlb	
	-0,040 ± 0,019, p=0,041	-0,012 ± 0,023, p=0,619	-0,093 ± 0,035, p=0,009*
		SelP/SeAlb	
	1,006 ± 0,001, p=0,002*	1,007 ± 0,001, p=0,020*	1,006 ± 0,001, p=0.024

Σημείωση: Οι συντελεστές συσχέτισης και τα p προκύπτουν μετά από έλεγχο για ηλικία, φύλο, δείκτη μάζας σώματος, κάπνισμα, κατανάλωση ολικού κρέατος.*p<0,05,**p<0,001.

Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Στο υποκεφάλαιο αυτό διερευνήθηκε η σχέση μεταξύ επίπεδων TSe με την αρτηριακή πίεση. Τα κύρια ευρήματα της ανάλυσης ήταν α) η σημαντική μείωση των επιπέδων TSe στις υπερτασικές γυναίκες που συνοδευόταν από μία αντίστοιχη μείωση των επιπέδων GPX-3 και SeAlb και β) η

αρνητική συσχέτιση μεταξύ GPX-3 και αρτηριακής πίεσης (τόσο στους άντρες αλλά ειδικότερα στις γυναίκες), η οποία φαίνεται ότι είναι ανεξάρτητη καπνίσματος, παχυσαρκίας και διατροφής.

Και στην περίπτωση της σχέσης μεταξύ αρτηριακής πίεσης και Se τα αποτελέσματα των συγχρονικών μελετών και των μελετών ασθενών μαρτύρων είναι αντικρουόμενα. Υπάρχουν μελέτες που δεν δείχνουν επίδραση της αρτηριακής πίεσης στην κατάσταση Se [326,327], μελέτες σε Λιβανέζικο και Αμερικάνικο πληθυσμό που δείχνουν αυξημένο επιπολασμό υπέρτασης στους εθελοντές με υψηλά επίπεδα TSe [328, 329] αλλά και μελέτες που δείχνουν την ίδια τάση με τα δικά μας ευρήματα [190, 269, 330]. Η ετερογένεια των αποτελεσμάτων σε αυτές τις μελέτες οφείλεται κυρίως στα διαφορετικά επίπεδα TSe του κάθε πληθυσμού αφού φαίνεται ότι πολύ υψηλά επίπεδα και πολύ χαμηλά επίπεδα TSe οδηγούν σε αύξηση της πίεσης. Πρέπει όμως να τονιστεί ότι σε αντίθεση με τις περισσότερες από τις άλλες μελέτες η δική μας είχε επαρκή διατροφικά δεδομένα που έδειξαν ότι οι διατροφικές συνήθειες (συχνότητα κατανάλωσης ομάδων τροφίμων) υπερτασικών-φυσιολογικών δεν είχαν διαφορά. Συνεπώς, οι οποιεσδήποτε διαφορές μεταξύ του TSe και πρωτεϊνών σεληνίου δεν μπορεί να αποδοθεί σε αυτές. Από την άλλη, οι υπερτασικοί ήταν μεγαλύτεροι σε ηλικία. Δεδομένης της αρνητικής συσχέτισης μεταξύ ηλικίας και TSe τα μειωμένα επίπεδα TSe στις γυναίκες θα μπορούσαν να αποδοθούν σε αυτή τη διαφορά. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης όπου η εισαγωγή της ηλικίας αίρει τη στατιστική σημαντικότητα της αρνητικής συσχέτισης ΔΑΠ/ΣΑΠ και TSe. Επίσης, πρέπει να τονιστεί ότι, επειδή στην ομάδα των υπερτασικών συμπεριλαμβάνονται και ασθενείς με αντιυπερτασική αγωγή, προηγούμενες μελέτες σε υπερτασικούς ασθενείς δεν έχουν δείξει καμμία επίδραση της αντι-υπερτασικής αγωγής στην κατάσταση Se του οργανισμού [331, 332, 333].

Στην περίπτωση της GPX-3, η αρνητική συσχέτιση με την ΣΑΠ/ΔΑΠ δεν μπορεί να εξηγηθεί ούτε με την ηλικία ούτε με τις διατροφικές συνήθειες. Ωστόσο, μηχανιστικά μπορεί να εξηγηθεί μία άμεση επίδραση των μειωμένων επιπέδων GPX γενικότερα, και όχι αποκλειστικά της GPX-3 στην αύξηση της πίεσης. Αυτό συμβαίνει γιατί μειωμένα επίπεδα GPX μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένα προϊόντα λιποειδικής υπεροξείδωσης και αυτά με τη σειρά τους να μειώσουν τη βιοδιαθεσιμότητα του NO που λειτουργεί ως αγγειοδιασταλτικό [334]. Παράλληλα, αυξημένα επίπεδα λιποειδικών υπεροξειδίων οδηγούν σε μείωση της συνθετάσης της προστακυκλίνης και μπορεί να οδηγήσουν το μεταβολισμό των προσταγλανδινών από τη μετατροπή τους στην αγγειοδιασταλτική και υποτασική προστακυκλίνη στο σχηματισμό θρομβοξανίων [335

Τέλος, άλλο ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της κατάστασης Se, που παρατηρείται και στην περίπτωση της πίεσης είναι ότι το φύλο επιδρά ξεχωριστά στη σχέση ΣΑΠ /ΔΑΠ με το Se. Πειράματα σε ποντίκια έχουν δείξει ότι η έκφραση των διαφόρων σεληνοπρωτεϊνών και ο μεταβολισμός τους διαφοροποιείται στα δύο φύλα [300]. Αυτή η διαφοροποίηση επιβεβαιώνεται και στους ανθρώπους κυρίως μέσα από επιδημιολογικές μελέτες. Κατά πόσο αυτή η διαφοροποιήση επιδρά στις διαφορετικές συσχετίσεις που παρατηρούνται μεταξύ TSe και σεληνοπρωτεϊνών απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

4.3.4.6 Επίπεδα ολικού σεληνίου/πρωτεϊνών σεληνίου και γλυκαιμικό προφίλ

Στη συνέχεια της συγκεκριμένης μελέτης εξετάστηκε η σχέση μεταξύ TSe και του γλυκαιμικού προφίλ των εθελοντών. Για το σκοπό αυτό εξετάστηκαν οι συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων γλυκόζης αίματος, ινσουλίνης, HOMA-IR και HOMA-b με τα επίπεδα TSe, GPX-3, SelP, SeAlb καθώς των πρωτεϊνικών κατανομών στον ορό. Μετά από εφαρμογή της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης και έλεγχο ως προς ηλικία, φύλο, δείκτη μάζας σώματος, κατανάλωση ολικού κρέατος και κάπνισμα προέκυψαν τα ευρήματα του πίνακα 4.19. Τα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης αίματος συσχετίζονται θετικά με τα1 επίπεδα SeAlb στο συνολικό πληθυσμό. Συγκεκριμένα τα επίπεδα SeAlb αυξάνονται κατά 0,04 μgSe/L με την αύξηση κατά μία μονάδα (mg/dL) των επιπέδων γλυκόζης και κατά 0,351 μgSe/L με την αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης. Όπως ήταν αναμενόμενο, το HOMA-IR, το οποίο προκύπτει από το γινόμενο της γλυκόζης και της ινσουλίνης νηστείας, συσχετίζεται και αυτό θετικά με τα επίπεδα SeAlb στον ολικό πληθυσμό ενώ το HOMA-b συσχετίζεται αρνητικά με τα επίπεδα SelP στον ολικό πληθυσμό και θετικά στους άντρες. Τέλος, δεν προέκυψαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων TSe, GPX-3, SelP, SeAlb και των πρωτεινικών κατανομών στον ορό με τους δείκτες γλυκαιμικού προφίλ των εθελοντών.

Πίνακας 4.19. Συντελεστές συσχέτισης ανάμεσα σε δείκτες γλυκαιμικού προφίλ και στα επίπεδα ολικού σεληνίου, υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, σεληνοπρωτεΐνης P και σεληνοαλβουμίνης του πληθυσμού μελέτης.

Δείκτες Γλυκαιμικού Προφίλ	**Συνολικός Πληθυσμός (N=399)**	**Άντρες (N=236)**	**Γυναίκες (N=163)**
Γλυκόζη αίματος(mmol/L)	**SeAlb (μg/L)**		
	0,040 ± 0,016, p= 0,01*	0,043 ± 0,026, p= 0,102	0,037 ± 0,024, p= 0,126
	SeAlb (μg/L)		
Ινσουλίνη αίματος(mmol/L)	0,351 ± 0,117, p= 0,04*	0,463 ± 0,282, p= 0,104	0,286 ± 0,246, p= 0,248
HOMA-r (ινσουλινοαντίσταση)	**SeAlb (μg/L)**		
	0,492 ± 0,216, p= 0,024*	0,665 ± 0,427, p= 0,122	0,399 ± 0,288, p= 0,169
HOMA-b (έκκριση ινσουλίνης)	**SelP (μg/L)**		
	-6,130 ± 3,089, p= 0,05*	3,498 ± 1,482, p= 0,020*	-0,728 ± 0,729, p= 0,322

Σημείωση: Οι συντελεστές συσχέτισης και τα p προκύπτουν μετά από έλεγχο για ηλικία, φύλο, δείκτη μάζας σώματος, κάπνισμα, κατανάλωση ολικού κρέατος.*$p<0,05$.

Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Στο υποκεφάλαιο αυτό εξετάστηκε η σχέση Se με δείκτες γλυκαιμικού προφίλ. Το σημαντικότερο εύρημα της εξέτασης αυτής ήταν η θετική συσχέτιση μεταξύ της SeAlb και υπεργλυκαιμίας/υπερινσουλιναιμίας. Η σχέση αυτή δεν έχει ξανααναφερθεί στη βιβλιογραφία και φαίνεται ότι είναι πολύ ισχυρή αφού δεν επηρεάζεται από συγχυτικούς παράγοντες.

Γενικότερα, η σχέση ινσουλινοαντίστασης και διαβήτη είναι πολύπλοκη με αντικρουομένα αποτελέσματα. Πειράματα σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι η έλλειψη Se οδηγεί σε ινσουλινοαντίσταση [336] ενώ παράλληλα πειράματα χορήγησης Se σε διαβητικά ποντίκια έχουν δείξει ότι το Se μπορεί να έχει ινσουλινομιμητικές ιδιότητες [337, 338]. Ωστόσο, χορήγηση Se σε υψηλές δοσολογίες μπορεί να έχει τις αντίθετες ιδιότητες δηλαδή να προκαλέσει υπεργλυκαιμία στα

πειραματόζωα [339]. Επιπροσθέτως, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση Se στους ανθρώπους μπορεί να αυξήσει τον επιπολασμό του διαβήτη τύπου ΙΙ [194]. Σε συμφωνία με τα παραπάνω αντικρουόμενα αποτελέσματα είναι και οι επιδημιολογικές μελέτες που δείχνουν τόσο μειωμένα επίπεδα TSe σε διαβητικούς [340] όσο και το αντίθετο [341]. Όπως έχει αναφερθεί και στα προηγούμενα κεφάλαια, το είδος του πληθυσμού και τα αρχικά επίπεδα TSe παίζουν καθοριστικό ρόλο στη σχέση Se και γλυκαιμίας. Ωστόσο, φαίνεται ότι τελικά αυτή η σχέση είναι της μορφής U. Με άλλα λόγια χαμηλά επίπεδα Se μπορούν να ενισχύουν το οξειδωτικό στρες, το οποίο με τη σειρά του οδηγεί σε καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος [342]. Από την άλλη έχει προταθεί ότι πολύ υψηλά επίπεδα Se μπορούν να αναστείλουν πλήρως την παραγωγή ελευθέρων ριζών και τελικά το σήμα της ινσουλίνης που εξαρτάται από αυτές [343]

Στη δική μας μελέτη ο πληθυσμός ήταν στην πλειοψηφία του φυσιολογικός όσον αφορά την ινσουλινοαντίσταση με μη ακραίες τιμές γλυκόζης και ινσουλίνης και ίσως αυτό να οδήγησε και στην έλλειψη συσχετίσεων μεταξύ Se και δεικτών ινσουλινοαντίστασης. Από την άλλη η ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ γλυκαιμίας/ινσουλιναιμίας και SeAlb αναφέρεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία αφού έτσι και αλλιώς οι επιδημιολογικές μελέτες που έχουν γίνει με μέτρηση των πρωτεϊνών σεληνίου είναι ελάχιστες. Μία πιθανή εξήγηση για αυτή τη σχέση είναι ότι η υπεργλυκαιμία μπορεί να οδηγεί σε απόκριση οξείας φάσης, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή αλβουμίνης από το ήπαρ [344]. Δεδομένου όι η αλβουμίνη μπορεί να δεσμεύσει μη ειδικά το Se, η θετική σχέση SeAlb-γλυκαιμίας είναι πιθανόν να εκφράζει περισσότερο τη θετική σχέση γλυκαιμίας με αλβουμίνη παρά τη θετική σχέση γλυκαιμίας και Se.

Παράλληλα, στη συγκεκριμένη μελέτη παρατηρήθηκε ότι σε TSe<80μg/L αυξάνεται το ποσοστό κατανομής της GPX-3($p=0,05$) εις βάρος της SelP($p=0,02$) με την αύξηση της έκκρισης ινσουλίνης στο συνολικό πληθυσμό. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι τα επίπεδα της GPX-3 αυξάνονται για να προστατεύσουν τον οργανισμό από το αυξημένο οξειδωτικό στρες που προκαλεί η ινσουλινοαντίσταση.

4.3.4.7 Επίπεδα ολικού σεληνίου/πρωτεϊνών σεληνίου και λιπιδαιμικό προφιλ

Στο υποκεφάλαιο αυτό εξετάστηκε η σχέση της κατάστασης Se με το λιπιδαιμικό προφίλ των εθελοντών. Οι δείκτες λιπιδαιμικού προφίλ που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τριακυλογλυκερόλες, HDL, LDL, Lp(a), apoA, apoB, apoA/apoB, ολική χοληστερόλη. Μετά από εφαρμογή της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης και έλεγχο ως προς ηλικία, φύλο, δείκτη μάζας σώματος και κάπνισμα προέκυψαν τα αποτελέσματα που φαίνονται στον πίνακα 4.20. Τα παραπάνω αποτελέσματα δεν άλλαξαν όταν έγινε έλεγχος και για διατροφικούς παράγοντες όπως η κατανάλωση ολικού κρέατος που θα μπορούσε να δράσει ως συγχυτικός παράγοντας.

Σύμφωνα με τον πίνακα 4.20 η ολική χοληστερόλη (TC) συσχετίστηκε θετικά με την κατανομή πρωτεϊνών SelP/SeAlb στον ολικό πληθυσμό και στις γυναίκες οριακά. Επιπροσθέτως, η ολική χοληστερόλη συσχετίστηκε θετικά με την πρωτεϊνική κατανομή GPX-3/SelP στον ολικό πληθυσμό και στους άντρες οριακά. Η LDL συσχετίζεται θετικά με την πρωτεϊνική κατανομή SelP/SeAlb στον ολικό πληθυσμό και στις γυναίκες και οριακά στους άντρες. Αντίθετα, η LDL συσχετίζεται αρνητικά με την πρωτεϊνική κατανομή GPX-3/SelP στο συνολικό πληθυσμό και στις γυναίκες. Όσον αφορά την HDL-C αυτή παρουσιάζει μια ισχυρά θετική συσχέτιση με το TSe και την SeAlb (σύνολο, άντρες, γυναίκες) και την SelP (σύνολο, γυναίκες). Τα τριγλυκερίδια συσχετίζονται θετικά με την κατανομή πρωτεϊνών GPX-3/SelP στον ολικό πληθυσμό και στους άντρες.

Πίνακας 4.20. Συντελεστές συσχέτισης ανάμεσα σε δείκτες λιπιδαιμικού προφίλ και στα επίπεδα ολικού σεληνίου, των πρωτεϊνών του και των πρωτεϊνικών κατανομών τους

.

Δείκτες Λιπιδαιμικού Προφίλ	**Συνολικός πληθυσμός (N=399)**	**Άντρες (N=236)**	**Γυναίκες (N=163)**
Τριγλυκερίδια Αίματος (mmol/L)	**GPX-3/SelP**		
	1,007 ± 0,002, p=0,009*	1,006 ± 0,001, p=0,022	1,012 ± 1,021, p=0,529
HDL-Χοληστερόλη (mmol/L)		**SelP(μg/L)**	
	0,183 ± 0,065, p=0,005	0,121 ± 0,088, p=0,171	0,334 ± 0,097, p=0,001*
	SeAlb(μg/L)		
	0,061 ± 0,020, p=0,002	0,063 ± 0,024, p=0,009	0,063 ± 0,035, p=0,07
	TSe (μg/L)		
	0,334±0,092, p<0,0001**	0,454 ± 0,164, p=0,006	0,296 ± 0,111, p=0,008*
LDL-Χοληστερόλη Αίματος (mmol/L)	**SelP/SeAlb**		
	1,03 ± 0,05, p=0,006	1,05 ± 0,07, p=0,098	1,03 ± 0,06, p=0,035
	GPX-3/SelP		
	-1,02 ± 0,01, p=0,003*	-1,001 ± 0,08, p=0,082	-1,003 ±0,001, p=0,017*
Ολική Χοληστερόλη Αίματος (mmol/L)	**SelP/SeAlb**		
	1,011 ± 0,01, p=0,05*	1,04 ± 0,9, p=0,252	1,005 ± 0,03, p=0,06
	GPX-3/SelP		
	1,101 ±0,01, p=0,048*	1,06 ± 0,001, p=0,088	-1,02 ± 0,01, p=0,110

Σημείωση: Οι συντελεστές συσχέτισης και τα p προκύπτουν μετά από έλεγχο για ηλικία, φύλο, δείκτη μάζας σώματος, κάπνισμα, κατανάλωση ολικού κρέατος.*p<0,05,**p<0,001.

Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα του πίνακα 4.20 δείχνουν ότι η κατάσταση Se και το λιπιδαιμικό προφίλ αλληλοσχετίζονται και επηρεάζουν το ένα το άλλο. Όσον αφορά τα επίπεδα της ολικής και LDL-C καθώς και των τριακυλογλυκερολών φαίνεται ότι σημαντικότερος καθοριστής τους ήταν η κατανομή Se μεταξύ των πρωτεϊνών και ειδικότερα μεταξύ GPX-3 και SelP, αφού συσχετίσεις θετικές εμφανίζονται με το λόγο GPX-3/SelP και όχι με το TSe. Ωστόσο, η πιο ισχυρή συσχέτιση και ίσως το σημαντικότερο εύρημα αυτής της μελέτης είναι η ισχυρά θετική σχέση μεταξύ HDL-C με TSe, SelP και SeAlb.

Προηγούμενες μελέτες συνηγορούν υπέρ μιας θετικής σχέσης μεταξύ επιπέδων TSe και TC/LDL-C. Θετική συσχέτιση εντοπίστηκε σε εφτά μεγάλες συγχρονικές μελέτες [162,171,174,178,180,182,183]. Στις μελέτες αυτές τα επίπεδα TSe στον ορό κυμαίνονταν από 76-125 ng/mL. Αντίθετα τρεις μικρότερες μελέτες (n=60-126) έδειξαν το αντίθετο [184-186]. Επιπλέον μια μικρή μελέτη στην Ιαπωνία (n=127) έδειξε θετική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων TSe ορού και TC μόνο όμως σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες [345]. Τέλος, μια μελέτη στην Κορέα έδειξε ότι οι εθελοντές με αυξημένα επίπεδα Se παρουσίαζαν χαμηλότερες τιμές ολικής χοληστερόλης χωρίς όμως να έχει γίνει έλεγχος εάν η σχέση αυτή επηρεάζεται από άλλους παράγοντες όπως η ηλικία [346]. Στη δική μας μελέτη μία τέτοια θετική σχέση δεν εντοπίστηκε, πιθανότατα γιατί ο πληθυσμός μας ήταν στο μεγαλύτερο ποσοστό του νορμολιπιδαιμικός και χωρίς μεγάλες διακυμάνσεις στα επίπεδα χοληστερόλης. Σε αυτές τις περιπτώσεις πιθανότατα η κατανομή Se και όχι τα επίπεδα TSe διακρίνουν καλύτερα τα επίπεδα της χοληστερόλης και των λιποπρωτεϊνών της. Όσον αφορά τη θετική συσχέτιση μεταξύ HDL-C και TSe οι περισσότερες μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες την επιβεβαιώνουν [138,180,299].

Μελέτες σε πειραματόζωα όντως έχουν αποδείξει ότι το Se είναι ρυθμιστής του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών και ότι η δράση του καθορίζεται από τα επίπεδά του. Έλλειψη πρόσληψης Se από τους αρουραίους οδηγούσε σε αύξηση της ολικής χοληστερόλης, της LDL-C και των VLDL τριγλυκεριδίων στο πλάσμα. Αυτό οφειλόταν στη μείωση της β-οξείδωσης των λιπαρών οξέων στο ήπαρ και αύξησης της επανεστεροποίησης τους σε τριακυλογλυκερόλες ή εστέρες χοληστερόλης [347] αλλά και σε ενεργοποίηση της β-υδροξυμεθυλογλουταρυλο-CoA αναγωγάσης, που αποτελεί το βασικό ρυθμιστικό ένζυμο της βιοσύνθεσης χοληστερόλης [348]. Παράλληλα, η έλλειψη Se έχει ως αποτελέσμα την ενεργοποίηση της έκφρασης της apoE [349] και apoB αποπρωτεϊνης [350]. Από

την άλλη πειράματα χορήγησης αυξημένων ποσοτήτων Se σε πειραματόζωα στα οποία χορηγούνταν παράλληλα και δίαιτα πλούσια σε λίπος έδειξαν ότι η αυξημένη πρόσληψη Se μπορεί να μειώσει τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων [351], και χοληστερόλης [352]. Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι η επίδραση του Se στον μεταβολισμό των λιποειδών μπορεί να γίνει και έμμεσα μέσω της εμπλοκής των απόϊωδιονασών στο μεταβολισμό των θυρεοειδικών ορμονών [124]. Οι θυρεοειδικές ορμόνες μπορούν πλειοτροπικά να επηρεάσουν το μεταβολισμό των λιποειδών μέσω: α) αυξημένης οξείδωσης λιπιδικών υποστρωμάτων, β) αύξησης στη σύνθεση και κινητοποίηση των τριακυλογλυκερολών από το λιπώδη ιστο, γ) αύξησης στην συγκέντρωση των μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων, δ) αύξησης στη δραστικότητα της λιποπρωτεινικής λιπάσης. Γενικότερα υποθυρεοειδικές καταστάσεις συνοδεύονται από υπερλιπιδαιμία [353]. Με ποιο μηχανισμό μπορεί το Se, μέσω της εμπλοκής του στο μεταβολισμό των θυρεοειδικών ορμονών να επηρεάσει τα λιποειδή του αίματος είναι άγνωστο και δύσκολο να προβλεφθεί αφού συμμετέχει σε ένζυμα που οδηγούν τόσο στη σύνθεση όσο και στη αποικοδόμηση των θυρεοειδικών ορμονών.

Τα δικά μας αποτελέσματα διαφοροποιούνται με τα πειραματικά δεδομένα αφού θα έπρεπε κανονικά να βλέπαμε μείωση της LDL-χοληστερόλης με αύξηση του TSe. Ωστόσο πρέπει να τονιστεί ότι οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται στα πειραματόζωα είναι σε δοσολογίες πολύ μεγαλύτερες από τη συνήθη πρόσληψη του ανθρώπινου οργανισμού. Επίσης, στην δική μας μελέτη δεν φάνηκε να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ TSe ή σεληνοπρωτεϊνών με τις απολιποπρωτεΐνες, γεγονός που δείχνει ότι η οποιαδήποτε επίδραση του Se στις λιποπρωτείνες γίνεται σε επίπεδο μεταβολισμού λιποειδών. Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι η σημαντικότερη συσχέτιση, λαμβάνοντας υπόψιν τους συντελεστές της γραμμικής παλινδρόμησης είναι αυτή μεταξύ HDL-C και TSe. Σε αυτή την περίπτωση, η αυξημένη πρόσληψη Se φαίνεται ότι δρα προστατευτικά σε ένα σημαντικό παράγοντα κινδύνου της αθηρωματικής νόσου. Το γιατί υπάρχει αυτή η σχέση δεν είναι γνωστό, ωστόσο χορήγηση Se μπορεί να ενεργοποιήσει την έκφραση του υποδοχέα LDL-R. Επειδή η ενδοκυττάρωση της χοληστερόλης είναι μία από της πηγές της HDL-C στην αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης μέσω των HDL, η αύξηση της ενδοκυττάρωσης της LDL από το Se μπορεί να οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα HDL. Ωστόσο, είναι γεγονός ότι ο γενικότερος τρόπος δράσης του Se και των σεληνοπρωτεϊνών στο μεταβολισμό των λιποειδών είναι πολύ θολός και απαιτεί πολλά περισσότερα μηχανιστικά πειράματα.

4.3.4.8 Ολικό σελήνιο/πρωτεΐνες σεληνίου και δείκτες συστηματικής φλεγμονής και οξειδωτικού στρες

Στο υποκεφάλαιο αυτό εξετάστηκε η σχέση μεταξύ δεικτών φλεγμονής όπως η CRP, IL-6, IL-10, TNFa, αδιπονεκτίνη, λεπτίνη, και δεικτών οξειδωτικού στρες όπως η oxLDL και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (TAC) με την κατάσταση Se. Μετά από εφαρμογή της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης και έλεγχο ως προς ηλικία, φύλο, δείκτη μάζας σώματος, κάπνισμα και κατανάλωσης ολικού κρέατος προέκυψαν τα ευρήματα του πίνακα 4.21.

Απο τους δείκτες οξειδωτικού στρες που εξετάστηκαν, τα επίπεδα του TAC συσχετίζονται αρνητικά με τα επίπεδα SelP στους άντρες και οριακά στο σύνολο του πληθυσμού.

Σε αντίθεση με τους κλασικούς δείκτες συστηματικής φλεγμονής (CRP, IL-6, TNFa) που δεν έδωσαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με το Se και τις πρωτεΐνες, οι ορμόνες τους λιπώδους ιστούς αδιπονεκτίνη και λεπτίνη συσχετίζονται με την κατάσταση Se. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα αδιπονεκτίνης στο αίμα συσχετίζονται θετικά με τα επίπεδα της GPX-3 στους άντρες. Επιπλέον, τα επίπεδα αδιπονεκτίνης στο αίμα συσχετίζονται θετικά και με την κατανομή πρωτεϊνών GPX-3/SelP στον ολικό πληθυσμό και στους άντρες. Επιπλέον, τα αποτελέσματα δεν άλλαξαν όταν έγινε έλεγχος και για διατροφικούς παράγοντες όπως η κατανάλωση ολικού κρέατος. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκε το διατροφικό πρότυπο 3 (§ 4.3.3) που θα μπορούσε να δράσει ως συγχυτικός παράγοντας χάθηκε η θετική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων GPX-3 και αδιπονεκτίνης. Επιπλέον, τα επίπεδα της λεπτίνης στο αίμα συσχετίζονται αρνητικά με τα επίπεδα TSe, της GPX-3, της SeAlb και της πρωτεϊνικής κατανομής GPX-3/SelP στον ολικό πληθυσμό. Στην περίπτωση της GPX-3 και TSe, η αρνητική τους σχέση με την λεπτίνη παραμένει στον αντρικό μόνο πληθυσμό, ενώ η αρνητική σχέση λεπτίνης με GPX-3/SelP και TSe παραμένει και στα δύο φύλα. Τέλος, η πρωτεϊνική κατανομή SelP/SeAlb συσχετίζεται θετικά με τη λεπτίνη στο συνολικό πληθυσμό και στα δύο φύλα. Τα αποτελέσματα δεν άλλαξαν όταν έγινε έλεγχος και για διατροφικούς παράγοντες όπως η κατανάλωση ολικού κρέατος. Αντίστοιχα, όταν έγινε έλεγχος για και το διατροφικό πρότυπο 3 (§ 4.3.3) η θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων λεπτίνης και της πρωτεϊνικής κατανομής SelP/SeAlb χάθηκε ενώ οι υπόλοιπες συσχετίσεις παρέμειναν στατιστικά σημαντικές.

Τα επίπεδα ομοκυστεΐνης στο αίμα συσχετίζονται οριακά θετικά με την κατανομή πρωτεϊνών GPX-3/SelP στον ολικό πληθυσμό. Τα αποτελέσματα δεν άλλαξαν όταν έγινε έλεγχος και για διατροφικούς παράγοντες όπως η καταναλωση ολικού κρέατος καθώς και το διατροφικό πρότυπο 3 (§ 4.3.3) που θα μπορούσαν να δράσουν ως συγχυτικοί παράγοντες. Επιπλέον, παρουσιάστηκε μια

οριακή θετική συσχέτιση μεταξύ της πρωτεϊνικής κατανομής GPX-3/SelP και του TNF-α στο συνολικό πληθυσμό και στους άντρες μετά απο έλεγχο για τους προαναφερθέντες παράγοντες.

Πίνακας 4.21 Συντελεστές συσχέτισης ανάμεσα σε δείκτες φλεγμονής και στα επίπεδα ολικού σεληνίου, πρωτεϊνών σεληνίου και των πρωτεϊνικών κατανομών .

Δείκτες Συστηματικής Φλεγμονής και οξειδωτικού στρες	**Συνολικός πληθυσμός (N=399)**	**Άντρες (N=236)**	**Γυναίκες (N=163)**
Αδιπονεκτίνη (μmol/L)	**GPX-3 (μg/L)**		
	0,498 ± 0,321, p= 0,121	1,386 ± 0,455, p= 0,003	-0,359 ± 0,488, p= 0,423
	GPX-3/SelP		
	1,45 ± 0,17, p= 0,002*	1,24 ± 0,07, p<0,0001**	1,07 ± 1,01, p= 0,516
Λεπτίνη (μmol/L)	**GPX-3 (μg/L)**		
	-0,609 ± 0,158, p<0,0001**	-0,807 ± 0,195, p<0,0001**	-0,244 ± 0,263, p= 0,354
	SeAlb (μg/L)		
	-0,331 ± 0,076, p<0,0001**	-0,380 ± 0,120,p= 0,002*	-0,297 ± 0,102, p = 0,004*
	GPX-3/SelP		
	-1,02 ± 0,009, p = 0,002*	1,07 ± 0,97, p= 0,322	-1,03 ± 0,007, p<0,0001**
	SelP/SeAlb		
	1,48 ± 0,07, p = 0,001**	1,74 ± 0,34, p = 0,013*	1,44 ± 0,17, p = 0,003*
	TSe (μg/L)		
	-0,879 ± 0,348, p=0,01*	-0,879 ± 0,348, p=0,01*	-1,33 ± 0,514, p=0,010*
	GPX-3/SelP		
Όμοκυστεΐνη (μmol/L)	1,01 ± 0,007, p = 0,07	1,01 ± 0,84, p= 0,128	1,003 ± 0,99, p=0,315
		GPX-3/SelP	
TNF-α (μmol/L)	1,009 ± 0,005, p = 0,06	1,020 ± 0,004, p = 0,01	1,001 ± 0,95, p = 0,94
TAC (μmol/L)		**SelP (μg/L)**	
	-0,126 ± 0,068, p = 0,07	-0,240 ± 0,094, p= 0,026	-0,014 ± 0,099, p=0,889

Σημείωση: Οι συντελεστές συσχέτισης και τα p προκύπτουν μετά από έλεγχο για ηλικία, φύλο, δείκτη μάζας σώματος, κάπνισμα, κατανάλωση ολικού κρέατος.*p<0,05,**p<0,001.

Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Στο υποκεφάλαιο αυτό διερευνήθηκε η σχέση επιπέδων TSe και πρωτεϊνών Se με δείκτες φλεγμονής και οξειδωτικού στρες. Οι συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν αναφέρονται για πρώτη φορά σε υγιή πληθυσμό γι'αυτό και η ερμηνεία τους χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Το πρώτο σημαντικό δεδομένο που προέκυψε από την ανάλυση είναι η ισχυρά θετική συσχέτιση μεταξύ αδιπονεκτίνης και GPX-3 και κατ'επέκταση αδιπονεκτίνης και GPX-3/SelP που εντοπίζεται κυρίως στους άντρες. Μελέτες που να διερευνούν τη σχέση Se και αδιπονεκτίνης δεν έχουν γίνει ξανά. Από τη στιγμή που το οξειδωτικό στρες μειώνει την παραγωγή της αδιπονεκτίνης από τα λιποκύτταρα [354], η πιο λογικοφανής εξήγηση για τη θετική συσχέτιση GPX-3 και αδιπονεκτίνης είναι ότι αυξημένα επίπεδα GPX-3, προστατεύουν τα λιποκύτταρα από το οξειδωτικό στρες και άρα διατηρούν τη σύνθεση αδιπονεκτίνης σε υψηλά επίπεδα. Υπάρχει βέβαια πάντα η περίπτωση να συμβαίνει και το αντίθετο, δηλαδή τα υψηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης να επάγουν την αυξημένη κατανομή Se προς GPX-3 αλλή η υπόθεση αυτή δεν μπορεί ακόμα να υποστηριχτεί με πειραματικά δεδομένα. Επιπλέον η θετική σχέση μεταξύ επιπέδων GPX-3 με τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης χάθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε το διατροφικό πρότυπο 3 σαν συμπαράγοντας στο μοντέλο της πολλαπλής παλινδρόμησης. Αυτό πιθανώς να συμβαίνει γιατί το διατροφικό πρότυπο 3 επηρεάζει περισσότερο τα επίπεδα της GPX-3 σε σχέση με τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης με αποτέλεσμα να χάνεται η γραμμική τους σχέση. Σύμφωνα με άλλες μελέτες στους διατροφικούς παράγοντες που αυξάνουν τα επίπεδα αδιπονεκτίνης περιλαμβάνονται τα ιχθυέλαια, οι φυτικές ίνες, τα ω-3 λιπαρά οξέα, η πρωτεΐνη σόγιας ενώ τα κορεσμένα λιπαρά επηρεάζουν αρνητικά τα επίπεδά της [355,356]

Επιπροσθέτως, στη συγκεκριμένη μελέτη παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της κατανομής GPX-3/SelP και των επιπέδων ομοκυστεΐνης. Η κατανομή GPX-3/SelP είναι αυξημένη στους εθελοντές που παρουσιάζουν τα χαμηλότερα επίπεδα TSe ορού. Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη σε ποντίκια φάνηκε ότι η μειωμένη πρόσληψη διατροφικού Se οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης [148]. Αντίθετα, στις αντίστοιχες μελέτες σε γενικό πληθυσμό καταγράφονται αμφισβητούμενα αποτελέσματα [149-151]. Παρόλ' αυτά μια μελέτη σε παθολογικό πληθυσμό έδειξε μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων TSe και των επιπέδων ομοκυστεΐνης η οποία οφείλεται στην επιβαρημένη αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού [152]. Επιπλέον, μια άλλη πιθανή εξήγηση της θετικής συσχέτισης μεταξύ της κατανομής GPX-3/SelP και των επιπέδων

ομοκυστεΐνης, μπορεί να είναι η εξής: Στον κύκλο της ομοκυστεΐνης λαμβάνει χώρα μια σειρά μεθυλιώσεων που οδηγούν στον σχηματισμό του ενδιάμεσου προϊόντος S-αδενοσυλομεθειονίνης, το οποίο ευθύνεται και για άλλες μεθυλιώσεις που παρατηρούνται στον ανθρώπινο οργανισμό [357]. Μια εκ των οποίων είναι η μεθυλίωση Se προκειμένου να αποβληθεί απο τον οργανισμό μέσω τριμεθυλοσεληνίου ή διμεθυλοσεληνίου (Σχ2.7). Έτσι είναι πιθανό όσο αυξάνονται τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης να αυξάνεται η παραγωγή S-αδενοσυλομεθειονίνης, καθώς και η παραγωγή τριμεθυλοσεληνίου ή διμεθυλοσεληνίου με αποτέλεσμα να αυξάνεται η αποβολή Se. Αν ισχύει αυτό η λογική σειρά γεγονότων είναι: αυξημένη ομοκυστείνη οδηγεί σε μειωμένο Se στην κυκλοφορία το οποίο οδηγεί σε αυξημένο λόγο GPX-3/SelP, που επιβεβαιώνεται από τα ευρήματά μας. Από την άλλη πλευρά, λόγω ομοιόστασης Se, είναι πιθανό η αύξηση της αποβολής Se να προκαλεί αύξηση της αποθήκευσης Se με τη μορφή GPX-3 στα νεφρά και κατά συνέπεια στην κυκλοφορία.

Το πλέον χαρακτηριστικό εύρημα σε αυτή τη σειρά αναλύσεων ήταν η ισχυρά αρνητική συσχέτιση του TSe, GPX-3 και SeAlb με τη λεπτίνη. Επειδή, τα χαμηλά επίπεδα TSe συνοδεύονται και με αυξημένο λόγο SelP/SeAlb δικαιολογείται και η θετική συσχέτιση λεπτίνης-SelP/SeAlb. Επιπλέον, η αρνητική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων λεπτίνης και της κατανομής GPX-3/SelP ουσιαστικά οφείλεται στην αύξηση του ποσοστού κατανομής της SelP εις βάρος του ποσοστού κατανομής της GPX-3 στο TSe ορού με την αύξηση των επιπέδων λεπτίνης. Οι σχέσεις αυτές παρουσιάζονται και στις δύο ομάδες εθελοντών μετά τη διαίρεση του πληθυσμού με βάση τη διάμεσο του TSe. Επιπροσθέτως είναι ανεξάρτητες τόσο από ηλικία, φύλο, δείκτη μάζας σώματος κάπνισμα καθώς και διατροφικών παραγόντων όπως η κατανάλωση ολικού κρέατος καθώς και το διατροφικό πρότυπο-3. Σύμφωνα με την υπάρχουσα αρθρογραφία είναι η πρώτη φορά που παρατηρήθηκαν τα ευρήματα αυτά σε φυσιολογικό πληθυσμό. Παρόλ' αυτά παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων λεπτίνης στον ορό αίματος με αντίστοιχη μείωση επιπέδων TSe σε γυναίκες που έπαθαν προεκλαμψία, συνδέοντας τα μειωμένα επίπεδα TSe με το αυξημένο οξειδωτικό στρές που επάγεται [358]. Επιπλέον μελέτες σε ζώα έδειξαν ότι η χορήγηση λεπτίνης οδήγησε σε μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων στο πλάσμα [359]. Παράλληλα, κάτι τέτοιο παρατηρήθηκε και σε ανθρώπους που έχουν μετάλλαξη του γονιδίου της λεπτίνης [360]. Σύμφωνα με τις παραπάνω μελέτες η αρνητική σχέση του TSe και των πρωτεϊνών του με τα επίπεδα λεπτίνης στον ορό εξηγείται μέσω οξειδωτικού στρες. Βέβαια τα ευρήματα της δικής μας μελέτης έρχονται σε αντίθεση με μηχανιστικά πειράματα σε αρουραίους που έχουν δείξει ότι δίαιτα φτωχή σε Se, λόγω αυξημένου οξειδωτικού στρες, οδηγεί σε μείωση της βιοσύνθεσης στεροειδών ορμονών και άρα και

κορτικοστεροειδών τα οποία μπορούν να επάγουν την έκκριση λεπτίνης [361]. Κάτι τέτοιο βέβαια θα μπορούσε να ισχύει σε έντονη έλλειψη Se κάτι που δεν παρατηρείται στη δική μας μελέτη.

Τέλος, οσον αφορά την αρνητική σχέση μεταξύ SelP και TAC και αυτή μπορεί να εξηγηθεί με βάση το είδος της δίαιτας που οδηγεί σε πολύ Se και άρα SelP ωστόσο στην προκειμένη περίπτωση αυξημένα επίπεδα SelP μπορεί ταυτόγχρονα να σημαίνουν και χαμηλά επίπεδα GPX-3 και άρα μειωμένο αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος. Βέβαια σε αυτή τη περίπτωση θα ήταν αναμενόμενη και μία αρνητική συσχέτιση μεταξύ TAC και GPX-3/SelP. Το γεγονός ότι δεν εμφανίζεται κάνει την πρώτη εξήγηση πιο πιθανή.

4.4 Διερεύνηση της πρωτεϊνικής κατανομής GPX-3/SelP

Στη συνέχεια της μελέτης παρατηρήθηκε ότι οι πρωτεϊνικές κατανομές SelP/SeAlb καθώς και GPX-3/SeAlb δεν παρουσίαζαν έντονη διαφοροποίηση τιμών, αντίθετα με τις τιμές της πρωτεϊνικής κατανομής GPX-3/SelP. Συγκεκριμένα, εθελοντές με τα ίδια περίπου επίπεδα TSe εμφάνιζαν κατανομή Se με σημαντικά διαφορετικό τρόπο στις δύο σεληνοπρωτεΐνες.

Σύμφωνα με τις τιμές που παρουσίαζε η πρωτεϊνική κατανομή GPX-3/SelP προέκυψαν τρεις κατηγορίες. Θεωρώντας ότι η τιμή 0,5 εκφράζει τη γενική τάση της κατανομής στο γενικό πληθυσμό (εφόσον παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα της SelP είναι περίπου διπλάσια των επιπέδων της GPX-3) ο πληθυσμός χωρίστηκε σε τρείς ομάδες. Στην ομάδα Β, στην οποία ανήκουν οι εθελοντές με πρωτεϊνική κατανομή μεταξύ των τιμών 0,5 ± SD/3 (n= 168), στην ομάδα Α στην οποία ανήκουν εθελοντές με πρωτεϊνική κατανομή <0,5 - SD/3 (n=92)και στην ομάδα Γ στην οποία ανήκουν οι εθελοντές με κατανομή >0,5+SD/3 (122). Προκειμένου να βρεθεί ποιοι παράγοντες επηρεάζουν την κατανομή αυτή εφαρμόστηκε διακρίνουσα ανάλυση με σκοπό την ιεράρχηση των παραγόντων που επέδρασαν στις διάφορες τιμές της πρωτεϊνικής κατανομής. Στον πίνακα 4.22 φαίνονται τα αποτελέσματα της διακρίνουσας ανάλυσης.

Πίνακας 4.22. Χαρακτηριστικά του πληθυσμού μελέτης σύμφωνα με της τρεις κατηγορίες των ομάδων της κατανομής GPX-3-3/SelP

	GPX-3/SelP <0,5 (N=122)	**GPX-3/SelP 0,35-0,60 (N=168)**	**GPX-3/SelP >0,60 (N=92)**	***p***	***Wilk's Λ***
Ηλικία (έτη)	38 ± 10	36 ± 10[1]	41 ± 11	0,005	0,96
ΣΑΠ (mmHg)	124 ± 17[1]	118 ± 17	117 ± 13	0,009	0,97
ΔΑΠ (mmHg)	81 ± 15	77 ± 10	77 ± 13	0,070	0,98
TAG (mg/dL)	103 ± 50	94 ± 50	126 ± 95[1]	0,002	0,96
Περίμετρος μέσης/Περιφέρεια Ισχίων	0,88 ± 0,10	0,84 ± 0,10[2]	0,90 ±0,09	<0,001	0,95
LDL-C (mg/dL)	130 ± 35[2]	114 ± 32	119 ± 34	0,002	0,96
BMI (Kg/m^2)	26 ± 4	25 ± 5[1]	26 ± 4	0,07	0,98
TNFa (pg/mL)	6,70 ± 2,63	6,12 ± 2,29	7,00 ± 2,28[2]	0,03	0,97
Όμοκυστεΐνη (μmol/L)	10,8 ± 4,15	10,9 ± 4,73	12,4± 4,85[1]	0,046	0,98
TC (mmol/L)	196 ± 38[1]	183 ± 35	187 ± 35	0,04	0,98
HDL-C (mmol/L)	45 ± 11	50 ± 11[1]	46 ± 12	0,03	0,97
IL-6 (mg/dl)	1,41 ± 0,38	1,34 ± 0,28	1,39 ± 0,25	0,214	0,99
Ποσοστό Άντρών (%)	65%	50%[1]	69%	0,01	0,97
Καπνιστές (%)	61%	50%	64%	0,112	0,97

Σημείωση: [1]στατιστικά σημαντική διαφορά απο τις άλλες ομάδες του λόγου GPX-3/SelP(διόρθωση κατά Bonferroni για πολλαπλές συγκρίσεις), $p<0,05$, [2]Στατιστικά σημαντική διαφορά απο τις άλλες ομάδες του λόγου GPX-3/SelP(διόρθωση κατά Bonferroni για πολλαπλές συγκρίσεις), $p<0,001$.

Σύμφωνα με τον πίνακα 4.22 πολλά βιοχημικά και ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των εθελοντών διαφοροποιούνται με μη γραμμικό τρόπο με την κατανομή με την πρωτεϊνική κατανομή GPX-3/SelP. Συγκεκριμένα, μεταβλητές όπως η ηλικία, τα τριγλυκερίδια, περίμετρος μέσης/περιφέρεια ισχύων, η ολική χοληστερόλη, η LDL-C, το BMI, ο TNFa, η IL-6, το ποσοστό αντρών και το ποσοστό καπνιστών εμφανίζουν τις μικρότερες τιμές τους στις μεσαίες τιμές του λόγου (ομάδα B) και μεγαλύτερες τιμές στις ακραίες τιμές του λόγου. Το αντίθετο εμφανίζει η HDL-C. Η ΣΑΠ/ΔΑΠ εμφανίζουν τις μεγαλύτερες τιμές σε λόγους <0,35 ενώ η ομοκυστεϊνη τα υψηλότερα επίπεδα της σε λόγους >0,60.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της διακρίνουσας ανάλυσης τη μεγαλύτερη διακρίνουσα ικανότητα στη διαφοροποίηση των τιμών της κατανομής GPX-3/SelP στο πληθυσμό μελέτης έχει η Περίμετρος μέσης/Περιφέρεια Ισχίων (L Wilk's 0,95). Η δεύτερη μεταβλητή που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη διαφοροποίηση των τιμών της κατανομής GPX-3/SelP είναι τα επίπεδα τριγλυκεριδίων (L Wilk's 0,96), η LDL χοληστερόλης(L Wilk's 0,96), καθώς και η ηλικία (L Wilk's 0,96). Στον ίδιο βαθμό επηρεάζουν η συστολική πίεση του αίματος(L Wilk's 0,97), η HDL χοληστερόλη (L Wilk's 0,97), ο TNFa (L Wilk's 0,97) και το φύλο (L Wilk's 0,97). Επιπλέον, στον ίδιο βαθμό επηρεάζουν τα επίπεδα της ομοκυστείνης (L Wilk's 0,98) ο Δείκτης Μάζας Σώματος (L Wilk's 0,98), η διαστολική πίεση (L Wilk's 0,98) και τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης αίματος(L Wilk's 0,98), Ενώ τη μικρότερη επίδραση στη διαφοροποίηση των τιμών της κατανομής GPX-3/SelP φαίνεται να έχουν τα επίπεδα της ιντερλευκίνης-6 (L Wilk's 0,99).

Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Η SelP καθώς και η GPX-3 αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεϊνών Se στον ορό. Οι περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες έχουν επικεντρώσει την προσοχή τους στη σχέση διαφόρων ανθρωπομετρικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών με τα επίπεδα TSe, ή τα επίπεδα των επιμέρους πρωτεϊνών σεληνίου. Ωστόσο, προσεκτική παρατήρηση της κατανομής του Se στις διάφορες πρωτεΐνες Se μας έδειξε ότι άνθρωποι με παρόμοια επίπεδα TSe είχαν μεγάλες διαφοροποιήσεις ως προς την κατανομή του Se σε σεληνοπρωτεΐνες στον ορό όπως αυτό εκφραζόταν με το λόγο GPX-3/SelP. Δεδομένου ότι κάθε μια από αυτές τις σεληνοπρωτεΐνες έχει διακριτές και ξεχωριστές δράσεις, μία αλλαγή στον τρόπο με τον οποίο ο οργανισμός κατανέμει το Se του, θα μπορούσε να έχει επίδραση σε διάφορα μεταβολικά συστήματα του οργανισμού. Σε μία προσπάθεια να μελετήσουμε τη περίπτωση αυτή έγινε η στατιστική ανάλυση που παρουσιάζεται στον πίνακα 4.22

Το βασικό εύρημα της μελέτης είναι ότι η πρωτεϊνική κατανομή GPX-3/SelP επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό πολλούς παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου. Μάλιστα είναι χαρακτηριστικό ότι στις ακραίες τιμές του λόγου εμφανίζεται και το χειρότερο μεταβολικό προφίλ. Με άλλα λόγια η σχέση των περισσότερων δεικτών καρδιαγγειακού κινδύνου και της πρωτεϊνικής κατανομής GPX-3/SelP εμφανίζει σχέση τύπου U. Φαίνεται ότι υπάρχει μία βέλτιστη τιμή του λόγου (μεταξύ 0,35-0,60) στις οποίες εμφανίζεται το βέλτιστο μεταβολικό προφίλ.

Το ερώτημα που τίθεται βέβαια είναι αν ένα κακό μεταβολικό και ανθρωπομετρικό προφίλ οδηγεί το λόγο αυτό στις ακραίες τιμές τους ή μία γενετικά προκαθορισμένη κατανομή του Se στις δύο σεληνοπρωτεΐνες επηρεάζει τους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου. Στην πρώτη περίπτωση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διακρίνουσα ανάλυση δείχνουν ότι τα επίπεδα LDL-C, ΣΑΠ/ΔΑΠ, TAG, ομοκυστεΐνης και TNF-α φαίνεται να είναι από εκείνους τους παράγοντες που διακρίνουν καλύτερα το συγκεκριμένο πληθυσμό μελέτης στις τρεις ομάδες της κατανομής GPX-3/SelP. Για τη δεύτερη περίπτωση απαιτούνται κατάλληλα πειράματα προκειμένου να ξεκαθαριστεί το τοπίο.

Η ισχυρή σχέση της κατανομής Se με παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου εμφανίζεται για πρώτη φορά σε αυτή τη μελέτη και υποδεικνύει ότι η μέτρηση του TSe ή μόνο μίας από τις επιμέρους πρωτεΐνες του δεν είναι αρκετή για να εξηγήσει την επίπτωση του Se στους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της καρδιαγγειακής νόσου. Αντιθέτως, απαιτείται με ευρύτερη προσέγγιση selenoproteomics με ανάπτυξη των κατάλληλων αναλυτικών τεχνικών.

Κεφάλαιο 5ο : Γενικά Συμπεράσματα-Προτάσεις για το Μέλλον

5.1 Συμπεράσματα της μελέτης

Το Se μέσω των σεληνοπρωτεϊνών (υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης, σεληνοπρωτείνη P, αναγωγάση της θειορεδοξίνης, αποϊωδιονάσες της ιωδοθυροξίνης κ.α.) έχει ενεργό ρόλο στους αντιοξειδωτικούς/αντιφλεγμονώδεις μηχανισμούς του οργανισμού, στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων και στο μεταβολισμό των θυρεοειδικών ορμονών με αποτέλεσμα να αποτελεί απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τη ζωή.

Η διατροφή φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στα συνολικά επίπεδα σεληνίου αλλά τα αποτελέσματα των διατροφικών μελετών όσον αφορά τα διατροφικά πρότυπα που επηρεάζουν τα επίπεδα Se είναι αντικρουόμενα. Παράλληλα, δεν είναι γνωστό κατά πόσο συγκεκριμένες διατροφικές συνήθειες μπορούν να επηρεάσουν εκλεκτικά συγκεκριμένες πρωτείνες σεληνίου. Επίσης, μέσω της εμπλοκής του στους παραπάνω παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς το Se, δυνητικά, παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των καρδιαγγειακών παθήσεων. Ωστόσο, μεγάλες συγχρονικές μελέτες έχουν δώσει αντικρουόμενα αποτελέσματα ενώ καμμία μεγάλη συγχρονική μελέτη δεν έχει γίνει για φαινομενικά υγιή Ελληνικό πληθυσμό. Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα είναι δυνατόν να οφείλονται, είτε στο ότι δεν έχουν ληφθεί υπ'οψιν οι διατροφικές συνήθειες των εθελοντών, είτε και στο ότι δεν έχει ληφθεί υπ'όψιν η διαφορετικότητα στην κατανομή του Se στις διάφορες σεληνοπρωτείνες. Κάτι τέτοιο απαιτεί βέβαια την ανάπτυξη αναλυτικών τεχνικών ρουτίνας, οι οποίες πέρα από τον προσδιορισμό του ολικού Se να επιτυγχάνουν ειδοπροσδιορισμό μορφών σελήνιου. Στα πλαίσια αυτά στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε προσπάθεια μίας τέτοιας τεχνικής και η εφαρμογή της σε μία κοορτή η οποία είχε πληροφορίες τόσο για τις διατροφικές συνήθειες των εθελοντών όσο και για τους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου. Πρέπει να τονιστεί ότι μέχρι στιγμής αυτή είναι η μεγαλύτερη κοορτή στην οποία έχει επιχειρηθεί ειδοπροσδιορισμός σεληνοπρωτεινών ορού.

Τα βασικά συμπεράσματα της μελέτης ήταν:

✓ Η μέθοδος βασισμένη σε dcAF-LC-meID-ICP-MS κρίνεται κατάλληλη για την ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών σεληνίου στον ορό αίματος, εφόσον εφαρμόστηκε σε σημαντικό

αριθμό δειγμάτων (N=399) και έφερε συγκρίσιμα αποτελέσματα με προηγούμενες μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν για τον ίδιο σκοπό.

✓ Το Se βρίσκεται ως SelP(54%), GPx-3 (26%), SelAlb (12%) και σε μία άγνωστη μορφή (8%) στον ορό αίματος.

✓ Φυσιολογικές τιμές TSe δεν έχουν θεσπιστεί ακόμα ακριβώς λόγω της μεγάλης μεταβλητότητας των επιπέδων του Se στο έδαφος από χώρα σε χώρα. Το συνηθέστερο κριτήριο εκτίμησης της κατάστασης Se ενός οργανισμού είναι μέχρι σήμερα το ποσό εκείνο Se που μπορεί να οδηγήσει στην μέγιστη δραστικότητα της GPX-3. Μόνο το 53% του πληθυσμού της μελέτης παρουσίασε επίπεδα TSe πάνω από 80 μg/L, γεγονός που υποδηλώνει ότι σχεδόν ο μισός πληθυσμός της μελέτης έχει μη επαρκή πρόσληψη Se.

✓ Όσον αφορά τη κατάσταση Se που παρατηρείται σε αυτή τη μελέτη σε σχέση με τις υπόλοιπες χώρες του κόσμου, τα επίπεδα Se της συγκεκριμένης μελέτης βρίσκονται σε μια μέση θέση παγκοσμίως

✓ Η κατανομή Se στις σεληνοπρωτεΐνες εξαρτάται από τα επίπεδα TSe. Όταν κορεστούν οι αποθήκες Se στις GPX-3 και SelP τότε η περαιτέρω ποσότητα Se ενσωματώνεται μη ειδικά στην SeAlb.

✓ Στη συγκεκριμένη μελέτη φάνηκε ότι δεν υπάρχει επιρροή του φύλου στα επίπεδα των πρωτεϊνών Se /ολικού Se στον ορό αίματος. Αντίθετα ο ρόλος της ηλικίας φαίνεται να είναι καταλυτικός.

✓ Η κατανάλωση κόκκινου κρέατος και πουλερικών (κρεατοφαγική δίαιτα) οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα TSe αλλά και πρωτεϊνών σεληνίου (GPX-3, SeAlb).

✓ Τα επίπεδα Se/πρωτεΐνες Se συσχετίζονται αρνητικά με παράγοντες κινδύνου καρδιαγγειακών νοσημάτων. Το φύλο παίζει σημαντικό ρόλο στον τρόπο με τον οποίο το Se μπορεί να επηρεάσει τους παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα.

✓ Η κατανομή σεληνίου στις σεληνοπρωτεΐνες αποτελεί καλύτερο δείκτη της κατάστασης Se ενός ανθρώπου και ίσως αποδίδει καλύτερα τη σχέση του με τους παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα.

Η συνεισφορά της παρούσας διδακτορικής διατριβής στην επιστήμη, συνοπτικά περιγράφεται από τα εξής: (α) βελτιστοποιήθηκε και αναπτύχθηκε αναλυτική μέθοδος με εξαιρετική ανθεκτικότητα για αναλύσεις πολλών δειγμάτων. (β) η μέθοδος αυτή ανταποκρίνεται και για τον υπολογισμό των επιπέδων ολικού σεληνίου στον ορό αίματος (γ) αναλύθηκε σημαντικός αριθμός υλικών αναφοράς Se κάνοντας ένα σημαντικό βήμα στην ανάπτυξη πρότυπων δειγμάτων πρωτεϊνών Se γνωστής συγκέντρωσης Se δ) από τις συσχετίσεις που προέκυψαν η αναλογία GPx-3/SelP χρήζει ιδιαίτερης προσοχής και περαιτέρω μελλοντικής διερεύνησης. Συγκεκριμένα, τόσο οι χαμηλές τιμές της αναλογίας GPx-3/SelP(<0.35) όσο και οι υψηλές τιμές της αναλογίας GPx-3/SelP(>0.60) φαίνεται να συσχετίζονται με δείκτες καρδιαγγειακού κινδύνου. Αντίθετα, οι τιμές της αναλογίας GPx-3/SelP (0.35-0.60) φαίνεται να αντικατοπτρίζουν τον προστατευτικό ρόλο των σεληνοπρωτεϊνών. Επιπλέον, στη παρούσα μελέτη παρουσιάσθηκαν πολλά πρωτότυπα ευρήματα τα οποία προκειμένου να οδηγήσουν σε μονοπάτια που αφορούν τον μηχανιστικό ρόλο του σεληνίου και των σεληνοπρωτεϊνών στον ανθρώπινο οργανισμό.

Εν κατακλείδι το σελήνιο, απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή τόσο στο τομέα της επιδημιολογίας όσο και στον τομέα της αναλυτικής χημείας κυρίως λόγω της σημαντικής εμπλοκής του σε διάφορα νοσήματα. Παρόλο αυτά παραμένουν αναπάντητα πολλά ερωτήματα σχετικά με τη συμπεριφορά των επιμέρους πρωτεϊνών σεληνίου στον ανθρώπινο οργανισμό λόγω των ιδιαίτερων λειτουργιών που παρουσιάζουν.

5.2 Μελλοντική Εργασία

Η ποικιλότροπη χρήση της τεχνικής φασματομετρίας μάζας σε πληθώρα διαφορετικών εφαρμογών αποδεικνύει την ανεξάντλητη χρησιμότητά της. Τα τελευταία χρόνια σημαντική έμφαση έχει δοθεί στην ανάπτυξη και εφαρμογή τεχνικών φασματομετρίας μάζας (mass spectrometry, MS) στην ποσοτική πρωτεϊνωματική ανάλυση (proteomics). Η πρωτεϊνωματική ανάλυση, πρόκειται για μια ιδιαίτερη προσέγγιση η οποία χρησιμοποιεί ηλεκτροψεκασμό (electrospray, ES), σε συνδυασμό με αναλυτή μάζας τριπλού τετραπόλου (triple quadrupole), για τον ποσοτικό προσδιορισμό πεπτιδίων που προκύπτουν από την πρωτεολυτική διάσπαση των πρωτεϊνών στόχων. Η τεχνική κάνει χρήση του τριπλού τετραπόλου για την παρακολούθηση επιλεγμένων αντιδράσεων (selected reaction monitoring, SRM) που προκύπτουν από τη φασματομετρική θραυσματοποίηση των πεπτιδίων. Τα θραύσματα είναι χαρακτηριστικά των πεπτιδίων της πρωτεΐνης στόχου και έτσι η παρακολούθησή τους με ES-SRM-MS για ποσοτική πρωτεϊνωματική ανάλυση έχει τα σημαντικά πλεονεκτήματα της μεγάλης εκλεκτικότητας και ευαισθησίας. Η τεχνική ES-SRM-MS είναι ιδιαίτερα σημαντική διότι επιτρέπει την άμεση σύγκριση με τις τεχνικές που βασίζονται αποκλειστικά σε χρόνους κατακράτησης για την ταυτοποίηση των ενώσεων/πρωτεϊνών σεληνίου όπως είναι η dcAF-ICP-MS και SEC-dcAF-ICPMS. Επιπρόσθετα μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό ατόμων σεληνίου που βρίσκονται στην κάθε σεληνοπρωτεΐνη. Για παράδειγμα, σε κάθε μόριο SelP αναφέρεται στην βιβλιογραφία ότι βρίσκονται μέχρι 10 άτομα σεληνίου. Η πληροφορία για τα άτομα Se ανά μόριο πρωτεΐνης ίσως αποτελέσει και βιοδείκτη μεταβολικής κατάστασης του οργανισμού. Η εφαρμογή της νέας μεθόδου θα επιτρέψει τον ελέγχο της καθαρότητας των 3 κορυφών σεληνίου που ανιχνεύονται με τις τεχνικές dcAF-ICP-MS και SEC-dcAF-ICP-MS.

Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια στροφή της επιστημονικής κοινότητας στη μελέτη του ρόλου του σεληνίου στα επιγενετικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι τόσο το σελήνιο όσο και το αρσενικό εμπλέκονται σε διάφορες μεθυλιώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό οι οποίες ευθύνονται για συγκεκριμένα επιγενετικά χαρακτηριστικά. Στη επιγενετική μελέτη έγιναν σημαντικές προσπάθειες και από τον τομέα της αναλυτικής χημείας με κυρίαρχη τη μεταλλομική ανάλυση (metallomics). Η μεταλλομική ανάλυση επικεντρώνεται σε ειδομορφικούς προσδιορισμούς ενώσεων μετάλλων με βιομόρια και αναπτύσσονται μεθοδολογίες με συνδυασμό Υγρής Χρωματογραφίας και Φασματομετρίας Μαζών (LC-MS), Παγίδας Ιόντων και Χρόνου πτήσης σε διαδοχική σύζευξη. Μελλοντικές μελέτες

βασιζόμενες στη μεταλλομική ανάλυση του σεληνίου και του αρσενικού που θα επικεντρώνονται στη διερεύνηση των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους πιθανώς να οδηγήσουν σε νέα μονοπάτια επιγενετικής συμπεριφοράς του σεληνίου στον ανθρώπινο οργανισμό.

Απο την άλλη πλευρά, φαίνεται ότι από αποτελέσματα παρεμβατικών και επιδημιολογικών μελετών, ότι η αύξηση της πρόσληψης σεληνίου σε ανθρώπους με χαμηλά επίπεδα αυτού μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης των καρδιαγγειακών νοσημάτων καθώς και σε μείωση των κλινικών συμπτωμάτων που συνοδεύουν αυτές. Παρόλο αυτά η χορήγηση συμπληρωμάτων σεληνίου πρέπει να γίνεται με προσοχή και μόνο σε ανθρώπους με χαμηλά επίπεδα αυτού (<80 μg/L) αφού πάνω από κάποιο κατώφλι φαίνεται ότι δρα επιβαρυντικά σε παράγοντες κινδύνου για ΚΑΔ (υπερτάση, δυσλιπιδαιμία, διαβήτης). Μέχρι σήμερα οι συνηθέστεροι τρόποι για την αύξηση της πρόσληψης σεληνίου είναι: α) ο εμπλουτισμός των εδαφών με λιπάσματα πλούσια σε σελήνιο, β) χορήγηση συμπληρωμάτων διατροφής σεληνίου καθώς και γ) εμπλουτισμός τροφίμων με σελήνιο. Δεδομένης της ετερογένειας των τροφίμων όσον αφορά την περιεκτικότητά τους σε σελήνιο η οποία εξαρτάται απο τα γεωεδαφολογικά χαρακτηριστικά της κάθε περιοχής καθώς και της παγκοσμιοποίησης της αγοράς τροφίμων είναι σχεδόν αδύνατο αλλαγές στις διατροφικές συνήθειες ενός ανθρώπου να μπορούν να προβλέψουν τις μεταβολές στη διαιτητική πρόσληψη σεληνίου. Για αυτούς του λόγους η χορήγηση συμπληρωμάτων διατροφής σεληνίου αποτελεί το πιο δόκιμο και ελεγχόμενο τρόπο ρύθμισης των επιπέδων σεληνίου στον ανθρώπινο οργανισμό. Μέχρι τώρα, δεν υπάρχει παγιωμένο κριτήριο στόχος αυτών των παρεμβάσεων. Άλλες μελέτες στοχεύουν σε επίπεδα ολικού σεληνίου ορού 125 μg/L, στα οποία εμφανίζεται η βέλτιστη δραστικότητα του αντιοξειδωτικού ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ορού, ενώ άλλες μελέτες στοχεύουν σε επίπεδα ολικού σεληνίου ορού 80 μg/L, στα οποία πιστεύεται ότι εξασφαλιζεται η απρόσκοπτη βιοσύνθεση όλων των σεληνοπρωτεινών. Ωστόσο, οι μελέτες αυτές δεν λαμβάνουν υπ'οψιν τη σχετική αναλογία των διαφόρων σεληνοπρωτείνων αλλά και τη παρουσία άλλων σεληνομορφών (οργανικών και ανόργανων), οι οποίες τα τελευταία χρόνια έχει δειχθεί ότι έχουν σημαντικό αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινικό ρόλο. Ο καθορισμός συνεπώς της ιδανικής πρόσληψης σεληνίου θα πρέπει να λαμβάνει υπόψιν τη σχετική αναλογία όλων των μορφών σελήνιου, το οποίο μέχρι σήμερα ήταν ιδιαιτέρα δύσκολο με τις υπάρχουσες αναλυτικές τεχνικές.

Όσον αφορά τα εμπορικά διαθέσιμα συμπληρώματα που περιέχουν μόνο σεληνίου, σε αυτά το σελήνιο βρίσκεται είτε με τη μορφή σεληνομεθειονίνης, είτε με τη μορφή ανόργανου σεληνίου, είτε με τη μορφή μαγιάς σεληνίου. Οι περισσότερες διατροφικές παρεμβάσεις με τα συμπληρώματα

αυτά έχουν γίνει σε παθολογικούς πληθυσμούς (κυρίως καρκινοπαθείς) με απώτερο σκοπό τη βελτίωση της κλινικής εικόνας τους ασθενούς. Ωστόσο, δεν υπάρχουν μελέτες παρέμβασεις με συμπληρώματα σεληνίου σε φυσιολογικούς πλήθυσμούς με χαμηλά επίπεδα σεληνίου και το σημαντικότερο δεν υπάρχουν μελέτες που να εστιάζονται στον τρόπο με τον οποίο το είδος του συμπληρώματος, η χρονική διάρκεια της παρέμβασης αλλά και η δοσολογία μπορούν να ρυθμίσουν τα σχετικά επίπεδα των σεληνομορφών (πρωτεινικών και οργανικών) σε αίμα. Τα αποτελέσματα μίας τέτοιας μελέτης έδιναν σημαντικές πληροφορίες, όσον αφορά τη βασική έρευνα του σεληνίου: α) Για τη βιοδιαθεσιμότητα του σεληνίου αναλόγως της αρχικής μορφής του, β) Για τον ενδογενή μεταβολισμό του σεληνίου, γ) Για την ιεραρχία βιοσύνθεσης των σεληνοπρωτεινών, δ) Για την παρουσία νέων βιοδραστικών μορφών σεληνίου. Παράλληλα, θα βοηθούσε τον κλινικό γιατρό/διαιτολόγο να καθορίσει με συγκεκριμένο τρόπο παρεμβάσεις με συμπληρώματα σεληνίου σε πληθυσμούς που τα χρειάζονται, αφού θα γνώριζε την κινητική αύξησης των μορφών σεληνίου υπό την επίδραση των διαφόρων συμπληρωμάτων. Πρέπει να τονιστεί ότι διαφορετικές σεληνοπρωτείνες και σεληνομορφές συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία των διαφόρων χρόνειων νοσημάτων συνεπώς η δυνατότητα εκλεκτικής αύξησης συγκεκριμένων μορφών σελήνιου ανάλογα την πάθηση, με τη βοήθεια συμπληρωμάτων, θα ήταν σημαντικό επικουρικό εργαλείο στα χέρια του κλινικού γιατρού.

Κεφάλαιο 6 : Βιβλιογραφία

1. Berzelius JJ. Lettre de M. Berzelius. M. Berthollet sur deux mitaux nouveaux. Ann. Chimie et Phys 1918, 2:199-202.

2. Conor Reilly. Selenium in food and health. New York,USA: Springer Science and Business Media, LLC 2006, 3-19.

3. Schwartz K. and Foltz CM. Selenium an integral part of Factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. J Am Chem Soc 1957,79: 3292.

4. Andreesen JR, Ljungdahl LG. Formate dehydrogenase of Clostridium thermoaceticum: incorporation of selenium-75, and the effects of selenite, molybdate, and tungstate on the enzyme. J Bacteriol 1973,116:867-73.

5. Turner DC and Stadman TC. Selenium a requirement for glycine reductase activity in Clostridium sticklandii, Arch Biochem Biophys 1973, 154: 366–81.

6. Rotruck JT, et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science 1972, 179:588-90.

7. Yang GQ, Chen JS, Wen ZM, Ge KY, Zhu LZ, Chen XC, Chen XS. The role of selenium in Keshan disease.Adv Nutr Res 1984, 6:203-31.

8. Günzler WA, Steffens GJ, Grossmann A, Kim SM, Otting F, Wendel A, Flohé L. Hoppe Seylers Z The amino-acid sequence of bovine glutathione peroxidase. Physiol Chem 1984, 365:195-212.

9. Zinoni F, Birkmann A, Stadtman TC, Böck A. Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986, 83:4650-4.

10. Böck A, Forchhammer K, Heider J, Baron C. Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. Trends Biochem Sci. 1991, 16:463-7.

11. Chambers I, Frampton J, Goldfarb P, Affara N, McBain W, Harrison PR. The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon TGA. EMBO J 1986, 5:1221-7.

12. Mullenbach GT, Tabrizi A, Irvine BD, Bell GI, Tainer JA, Hallewell RA. Selenocysteine's mechanism of incorporation and evolution revealed in cDNAs of three glutathione peroxidases. Protein Eng 1988, 2:239-46.

13. Moghadaszadeh B, Beggs AH. Selenoproteins and their impact on human health through diverse physiological pathways. Physiology (Bethesda) 2006, 21:307-15.

14. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. Antioxid Redox Signal 2007, 9:775-06.
15. Schrauzer GN. Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. J Nutr 2000, 130:1653-6.
16. Abdulah R, Miyazaki K, Nakazawa M, Koyama H. Chemical forms of selenium for cancer prevention. J Trace Elem Med and Biol 2005, 19:141–50.
17. Behne D, Kyriakopoulos A. Mammalian selenium-containing proteins. Annu Rev Nutr 2001, 21:453-73.
18. Castellano S, Lobanov AV, Chapple C, Novoselov SV, Albrecht M, Hua D, Lescure A, Lengauer T, Krol A, Gladyshev VN, Guigó R. Diversity and functional plasticity of eukaryotic selenoproteins: identification and characterization of the SelJ family. Proc Natl Acad Sci USA. 2005, 102:16188-93.
19. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigó R, Gladyshev VN. Characterization of mammalian selenoproteomes. Science. 2003, 300:1439-43.
20. Zhang Y, Gladyshev VN. An algorithm for identification of bacterial selenocysteine insertion sequence elements and selenoprotein genes. Bioinformatics. 2005, 21:2580-9.
21. Fomenko DE, Xing W, Adair BM, Thomas DJ, Gladyshev VN. High-throughput identification of catalytic redox-active cysteine residues. Science. 2007, 315:387-9.
22. Pumford NR, Martin BM, Hinson JA A metabolite of acetaminophen covalently binds to the 56 kDa selenium binding protein. Biochem Biophys Res Commun. 1992, 182:1348-55.
23 Bansal MP, Mukhopadhyay T, Scott J, Cook RG, Mukhopadhyay R, Medina D.DNA sequencing of a mouse liver protein that binds selenium: implications for selenium's mechanism of action in cancer prevention.Carcinogenesis. 1990, 11:2071-3.
24. Porat A, Sagiv Y, Elazar Z. A 56-kDa selenium-binding protein participates in intra-Golgi protein transport. J Biol Chem. 2000, 275:14457-65.
25. Cho YM, Takahashi S, Asamoto M, Suzuki S, Inaguma S, Hokaiwado N, Shirai T. Age-dependent histopathological findings in the prostate of probasin/SV40 T antigen transgenic rats: lack of influence of carcinogen or testosterone treatment. Cancer Sci. 2003, 94:153-7.
26. Park JY, Kim EJ, Kwon KJ, Jung YS, Moon CH, Lee SH, Baik EJ. Neuroprotection by fructose-1,6-bisphosphate involves ROS alterations via p38 MAPK/ERK. Brain Res 2004, 1026:295-301.
27. Lanfear J, Fleming J, Walker M, Harrison P. Different patterns of regulation of the genes encoding the closely related 56 kDa selenium- and acetaminophen-binding proteins in normal tissues and during carcinogenesis. Carcinogenesis. 1993, 14:335-40.

28. Yang M, Sytkowski AJ.Differential expression and androgen regulation of the human selenium-binding protein gene hSP56 in prostate cancer cells. Cancer Res. 1998, 58:3150-3.
29. Chen G, Wang H, Miller CT, Thomas DG, Gharib TG, Misek DE, Giordano TJ, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. Reduced selenium-binding protein 1 expression is associated with poor outcome in lung adenocarcinomas. J Pathol 2004, 202:321-9.
30. He QY, Cheung YH, Leung SY, Yuen ST, Chu KM, Chiu JF. Diverse proteomic alterations in gastric adenocarcinoma. Proteomics. 2004, 4:3276-87.
31. Huang KC, Park DC, Ng SK, Lee JY, Ni X, Ng WC, Bandera CA, Welch WR, Berkowitz RS, Mok SC, Ng SW. Selenium binding protein 1 in ovarian cancer. Int J Cancer. 2006, 118:2433-40.
32. Kim H, Kang HJ, You KT, Kim SH, Lee KY, Kim TI, Kim C, Song SY, Kim HJ, Lee C. Suppression of human selenium-binding protein 1 is a late event in colorectal carcinogenesis and is associated with poor survival.Proteomics. 2006, 6:3466-76.
33. Brown LM, Helmke SM, Hunsucker SW, Netea-Maier RT, Chiang SA, Heinz DE, Shroyer KR, Duncan MW, Haugen BR. Quantitative and qualitative differences in protein expression between papillary thyroid carcinoma and normal thyroid tissue. Mol Carcinog. 2006, 45:613-26.
34. Arthur JR. The glutathione peroxidases. Cell Mol Life Sci 2000, 57:1825–35.
35. Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase.J Biol Chem. 1997, 272:27812-7.
36. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. Biomed Pharmacother. 2003, 57:134-44.
37. Mills GC. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. J Biol Chem 1957, 229:189-97.
38. Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H, Kohrle J. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. Biochem Biophys Res Commun 1990, 173:1143-9.
39. Schomburg L, Köhrle J. On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health. Mol Nutr Food Res. 2008, 52:1235-46.
40 Arnér ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Eur J Biochem. 2000, 267:6102-9.
41. Moschos MP. Selenoprotein P. Cell Mol. Life Sci.2000, 57:1836-45.
42. Whitin JC., Bhamre S., Tham DM., and Cohen HJ. Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells Am J Physiol 2002, 283:20–8.

43. Avissar N, Ornt DB, Yagil Y, Horowitz S, Watkins RH, Kerl EA, Takahashi K, Palmer IS, and Cohen HJ. Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. Am J Physiol 1994, 266:367–75.
44. Maser RL, Magenheimer BS, and Calvet JP. Mouse plasma glutathione peroxidase. cDNA sequence analysis and renal proximal tubular expression and secretion J Biol Chem 1994, 269: 27066–73.
45. Fairweather-Tait SJ. Bioavailability of selenium. Eur J Clin Nutr 1997, 51:20-23.
46. Burk RF, Hill KE. Selenoprotein P—Expression, functions, and roles in mammals Eur J Clin Nutr 1997, 51:20-23. Review
47. Rayman MP. Selenoproteins and human health: Insights from epidemiological data Biochimica et Biophysica Acta 2009, 1790:1533–40. Review
48. WHO/FAO. Human Vitamin and Mineral Requirements: Report of a Joint WHO/FAO Expert Committee. World Health Organization/Food and AgriculturalOrganisation, Rome 2002, 235-55.
49. Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health: a review. Public Health Nutr 2001, 4:593-9.
50. Robinson JR, Robinson MF, Levander OA, Thomson CD: Urinary excretion of selenium by New Zealand and North American human subjects on differing intakes. Am J Clin Nutr 1985, 41:1023-31.
51. Rayman MP. The importance of selenium to human health. Lancet 2000, 356:233-41. Review
52. Combs GF. Selenium in global food systems. Br J Nutr 2001, 85:517-47.
53. Oster O, Schmiedel G, Prellwitz W. The organ distribution of selenium in German adults. Biol Trace Elem Res 1988, 15:23-4.
54. Ogra Y and Anan Y. Selenometabolomics: Identification of selenometabolites and specification of their biological significance by complementary use of elemental and molecular mass spectrometry. J Anal At Spectrom 2009, 24:1477–88.
55. Kobayashi Y, Ogra Y, Ishiwata K, Takayama H, Aimi N, Suzuki KT. Selenosugars are key and urinary metabolites for selenium excretion within the required to low-toxic range. Proc Natl Acad Sci USA 2002, 99:15932-6.
56. Patrick L. Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature. Altern Med Rev. 2004, 9: 239-58.
57. Finley JW. Bioavailability of selenium from foods. Nutr Rev 2006, 64:146-51.

58.Finley JW, Grusak MA, Keck AS, Gregoire BR. Bioavailability of selenium from meat and broccoli as determined by retention and distribution of 75Se. Biol Trace Elem Res 2004, 99:191-209.

59. Gropper S, Smith J, Groff J. Advanced nutrition and human metabolism. Wadsworth 2005, 526-34.

60. Evenson JK, Sunde RA. Selenium incorporation into selenoproteins in the Se-adequate and Se-deficient rat. Proc Soc Exp Biol Med 1988, 187:169-80.

61. Kobayashi Y, Ogra Y, Ishiwata K, Takayama H, Aimi N, Suzuki KT. Selenosugars are key and urinary metabolites for selenium excretion within the required to low-toxic range. Proc Natl Acad Sci U S A 2002, 99:15932-.6

62. Berry MJ, Banu L, Harney JW, Larsen PR Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. EMBO J. 1993, 12:3315-22.

63. Krol A Evolutionarily different RNA motifs and RNA-protein complexes to achieve selenoprotein synthesis..Biochimie. 2002, 84:765-74. Review.

64. Burk RF, Hill KE.Regulation of selenoproteins.Annu Rev Nutr 1993, 13:65-81. Review

65. Wingler K, Böcher M, Flohé L, Kollmus H, Brigelius-Flohé R.mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins.Eur J Biochem. 1999, 259:149-57.

66. Bösl MR, Takaku K, Oshima M, Nishimura S, Taketo MM.Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp). Proc Natl Acad Sci USA. 1997, 94:5531-4.

67. Matsui M, Oshima M, Oshima H, Takaku K, Maruyama T, Yodoi J, Taketo MM. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. Dev Biol. 1996, 178:179-85.

68. Arthur JR, McKenzie RC, Beckett GJ. Selenium in the immune system. J Nutr 2003, 133:1457-9.

69. Guimarães MJ, Peterson D, Vicari A, Cocks BG, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Ferrick DA, Kastelein RA, Bazan JF, Zlotnik A.Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism?Proc Natl Acad Sci USA. 1996, 93:15086-91.

70. Zhang W, Ramanathan CS, Nadimpalli RG, Bhat AA, Cox AG, Taylor EW.Selenium-dependent glutathione peroxidase modules encoded by RNA viruses.Biol Trace Elem Res. 1999, 70:97-116.

71. Hoffmann PR, Berry MJ. The influence of selenium on immune responses. Mol Nutr Food Res 2008, 52:1273-80.
72. Boyne R, Arthur JR, Wilson AB.An in vivo and in vitro study of selenium deficiency and infection in rats.J Comp Pathol. 1986, 96:379-86.
73. Kiremidjian-Schumacher L, Roy M, Wishe HI, Cohen MW, Stotzky G.Supplementation with selenium and human immune cell functions. II. Effect on cytotoxic lymphocytes and natural killer cells.Biol Trace Elem Res. 1994, 41:115-27.
74. Taylor EW, Nadimpalli RG, Ramanathan CS Genomic structures of viral agents in relation to the biosynthesis of selenoproteins.Biol Trace Elem Res. 1997, 56:63-91.
75. Beck MA, Shi Q, Morris VC, Levander. Rapid genomic evolution of a non-virulent coxsackievirus B3 in selenium-deficient mice results in selection of identical virulent isolates. OA Nat Med. 1995, 1:433-6.
76. Beck MA, Esworthy RS, Ho YS, Chu FF.Glutathione peroxidase protects mice from viral-induced myocarditis.FASEB J. 1998, 12:1143-9.
77. Sappey C, Legrand-Poels S, Best-Belpomme M, Favier A, Rentier B, Piette Stimulation of glutathione peroxidase activity decreases HIV type 1 activation after oxidative stress. J.AIDS Res Hum Retroviruses. 1994, 11:1451-61.
78. Look MP, Rockstroh JK, Rao GS, Kreuzer KA, Barton S, Lemoch H, Sudhop T, Hoch J, Stockinger K, Spengler U, Sauerbruch T GSH-Px)-levels in asymptomatic versus symptomatic human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-infection..Eur J Clin Nutr. 1997, 51:266-72.
79. Baum MK, Shor-Posner G, Lai S, Zhang G, Lai H, Fletcher MA, Sauberlich H, Page JB.High risk of HIV-related mortality is associated with selenium deficiency.J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1997, 15:370-4.
80. Campa A, Shor-Posner G, Indacochea F, Zhang G, Lai H, Asthana D, Scott GB, Baum MK.Mortality risk in selenium-deficient HIV-positive children.J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1999, 20:508-13.
81. Yu SY, Zhu YJ, Li WG.Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong.Biol Trace Elem Res. 1997, 56:117-24.
82. Yu MW, Horng IS, Hsu KH, Chiang YC, Liaw YF, Chen CJ.Plasma selenium levels and risk of hepatocellular carcinoma among men with chronic hepatitis virus infection.Am J Epidemiol. 1999, 150:367-74.
83. Gladyshev VN, Hatfield DL.Selenocysteine-containing proteins in mammals.J Biomed Sci. 1999, 6:151-60. Review

84. Cheng WH, Ho YS, Valentine BA, Ross DA, Combs GF Jr, Lei XG.Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice.J Nutr 1998, 128:1070-76.

85. Fu Y, Cheng WH, Ross DA, Lei X. Cellular glutathione peroxidase protects mice against lethal oxidative stress induced by various doses of diquat.Proc Soc Exp Biol Med. 1999, 222:164-9.

86. Smith WL, Lands WE Oxygenation of unsaturated fatty acids by soybean lipoxygenase.J Biol Chem. 1972, 247:1038-47.

87. Haurand M, Flohé L Kinetic studies on arachidonate 5-lipoxygenase from rat basophilic leukemia cells.Biol Chem Hoppe Seyler. 1988, 369:133-42.

88. Schnurr K, Belkner J, Ursini F, Schewe T, Kühn H.The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase controls the activity of the 15-lipoxygenase with complex substrates and preserves the specificity of the oxygenation products.J Biol Chem. 1996, 271:4653-8.

89. Sies H, Klotz LO, Sharov VS, Assmann A, Briviba K.Z Naturforsch C. Protection against peroxynitrite by selenoproteins. 1998, 53:228-32. Review

90. Brigelius-Flohé R.Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases.Free Radic Biol Med. 1999, 27:951-65. Review

91. Hampton MB, Fadeel B, Orrenius S. Redox regulation of the caspases during apoptosis.Ann N Y Acad Sci. 1998, 854:328-35. Review.

92. Clark RF, Strukle E, Williams SR, Manoguerra AS. Selenium poisoning from a nutritional supplement. JAMA 1996, 275:1087-8.

93. Rayman MP. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. Br J Nutr 2008, 100:254-68.

94. Fordyce FM, Guangdi Z, Greena K and Xinping L. Soil, grain and water chemistry in relation to human elenium responsive diseases in Enshi District, China. China Appl Geochem 2000, 15: 117-32.

95 Rayman MP, Infante HG, Sargent M. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. Br J Nutr 2008, 100:238-53.

96. Broadley MR, White PJ, Bryson RJ et al. Biofortification of UK food crops with selenium. Proc Nutr Soc 2006, 65:169-81.

97. Terry N, Zayed AM, De Souza MP, Tarun AS. Sellenium in higer plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 2000, 51:401-32.

98. Combs GF Jr and Combs SB. The biological availability of selenium in foods and feeds, in: The Role of Selenium in Nutrition, Academic Press, New York, 1986, pp. 127–177.

99. Thomson CD, Robinson MF.Urinary and fecal excretions and absorption of a large supplement of selenium: superiority of selenate over selenite. Am J Clin Nutr. 1986, 44:659-63.
100. Thomson CD, Robinson MF, Butler JA, Whanger PD.Long-term supplementation with selenate and selenomethionine: selenium and glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) in blood components of New Zealand women.Br J Nutr. 1993, 69:577-88.
101. Finley J and Penland J. Adequacy or deprivation of dietary selenium in healthy men: Clinical and psychological findings. J Trace Elem Exp Med 1998, 11:11-27.
102. Van Der Torre HW, Van Dokkum G, Wedel SM, and Ockhuizen T. Effect of various levels of selenium in wheat and meat on blood Se status indices and on Se balance in Dutch men. Br J Nutr 1991, 65:69-80.
103. Magos L, Webb M. The interactions of selenium with cadmium and mercury.Crit Rev Toxicol. 1980 Nov;8(1):1-42. Review.
104. Brown KM, Pickard K, Nicol F, Beckett GJ, Duthie GG, Arthur JR. Effects of organic and inorganic selenium supplementation on selenoenzyme activity in blood lymphocytes, granulocytes, platelets and erythrocytes. Clin Sci (Lond). 2000, 98:593-9.
105. Nève J. New approaches to assess selenium status and requirement.Nutr Rev. 2000, 58:363-9. Review.
106. Thomson CD. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. Eur J Clin Nutr. 2004, 58:391-402. Review.
107. Yang GQ, Wang SZ, Zhou RH, Sun SZ. Endemic selenium intoxication of humans in China. Am J Clin Nutr 1983, 37:872-81.
108. Duffield AJ, Thomson CD, Hill KE, Williams S. An estimation of selenium requirements for New Zealanders.Am J Clin Nutr. 1999, 70:896-903.
109. Behne D, Kyriakopoulos A. New selenoproteins Med Klin (Munich). 1995, 90::5-7. Review
110. Levander OA, Whanger PD. Deliberations and evaluations of the approaches, endpoints and paradigms for selenium and iodine dietary recommendations. J Nutr. 1996, 126:2427-34.
111. Combs GF Jr. Impact of selenium and cancer-prevention findings on the nutrition-health paradigm. Nutr Cancer. 2001, 40:6-11.
112. Nomura AM, Lee J, Stemmermann GN, Combs GF Jr Serum selenium and subsequent risk of prostate cancer.Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000, 9:883-7.
113. Longnecker MP, Stram DO, Taylor PR, Levander OA, Howe M, Veillon C, McAdam PA, Patterson KY, Holden JM, Morris JS, Swanson CA, Willett WC.Use of selenium concentration in

whole blood, serum, toenails, or urine as a surrogate measure of selenium intake.Epidemiology. 1996, 7:384-90.
114. Thomas MJ.The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working? Crit Rev Food Sci Nutr. 1995, 35:21-39.
115. Kanter M Free radicals, exercise and antioxidant supplementation.Proc Nutr Soc. 1998, 57:9-13. Review.
116. Burk RF Jr, Pearson WN, Wood RP 2nd, Viteri F. Blood-selenium levels and in vitro red blood cell uptake of 75-Se in kwashiorkor. Am J Clin Nutr. 1967, 20:723-33.
117. Thomson CD.Selenium speciation in human body fluids.Analyst. 1998, 123:827-31
118. Nève J. Human selenium supplementation as assessed by changes in blood selenium concentration and glutathione peroxidase activity.J Trace Elem Med Biol. 1995, 9:65-73.
119. Behne D, Kyriakopoulos A, Scheid S, Gessner H. Effects of chemical form and dosage on the incorporation of selenium into tissue proteins in rats.J Nutr. 1991, 121:806-14.
120. Patching SG, Gardiner PH Recent developments in selenium metabolism and chemical speciation: a review. J Trace Elem Med Biol. 1999, 13:193-214.
121. Levander OA, DeLoach DP, Morris VC, Moser PB. Platelet glutathione peroxidase activity as an index of selenium status in rats. J Nutr. 1983, 113:55-63.
122. Alfthan G, Aro A, Arvilommi H, Huttunen JK. Selenium metabolism and platelet glutathione peroxidase activity in healthy Finnish men: effects of selenium yeast, selenite, and selenate.Am J Clin Nutr. 1991, 53:120-5.
123. Olivieri O, Girelli D, Stanzial AM, Rossi L, Bassi A, Corrocher R. Selenium, zinc, and thyroid hormones in healthy subjects: low T3/T4 ratio in the elderly is related to impaired selenium status. Biol Trace Elem Res 1996, 51:31-41.
124.Beckett GJ, Arthur JR. Selenium and endocrine systems. J Endocrinol 2005, 184:455-65.
125. Diplock AT. Indexes of selenium status in human populations. Am J Clin Nutr 1993, 57:256-8.
126. Robberecht H, Deelstra H.Factors influencing blood selenium concentration values: a literature review. J Trace Elem Electrolytes Health Dis. 1994, 8:129-43. Review.
127. Moreno-Reyes R, Suetens C, Mathieu F et al. Kashin-Beck osteoarthropathy in rural Tibet in relation to selenium and iodine status. N Engl J Med 1998, 339:1112-20.
128.Standing Committee on the Evaluation of Dietary Reference Intakes of the Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, the National Academies and Health Canada. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids, Washington, DC: National Academy Press.2000

129. Rayman MP. The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? Br J Nutr 2004, 92:557-73.
130. Mäkelä AL, Näntö V, Mäkelä P, Wang W. The effect of nationwide selenium enrichment of fertilizers on selenium status of healthy Finnish medical students living in south western Finland. Biol Trace Elem Res. 1993, 36:151-7.
131. Ashton K, Hooper L, Harvey LJ, Hurst R, Casgrain A, Fairweather-Tait SJ. Methods of selenium status in humans: a systemic review. Am J Clin Nutr 2009, 89:2025-39.
132. Huang K, Liu H, Chen Z, Xu H.Role of selenium in cytoprotection against cholesterol oxide-induced vascular damage in rats. Atherosclerosis. 2002, 162:137-44.
133. Wu Q, Huang K Effect of long-term Se deficiency on the antioxidant capacities of rat vascular tissue. Biol Trace Elem Res. 2004, 98:73-84.
134. Steinbrenner H, Bilgic E, Alili L, Sies H, Brenneisen P. Selenoprotein P protects endothelial cells from oxidative damage by stimulation of glutathione peroxidase expression and activity. Free Radic Res. 2006, 40:936-43.
135. Sattler W, Maiorino M, Stocker R. Reduction of HDL- and LDL-associated cholesterylester and phospholipid hydroperoxides by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and Ebselen (PZ 51).Arch Biochem Biophys. 1994, 309:214-21.
136. Vitoux D, Chappuis P, Arnaud J, Bost M, Accominotti M, Roussel AM. Selenium, glutathione peroxidase, peroxides and platelet functions.Ann Biol Clin (Paris). 1996, 54:181-7.
137. Spallholz JE.Selenium and glutathione peroxidase: essential nutrient and antioxidant component of the immune system.Adv Exp Med Biol. 1990, 262:145-58. Review.
138. Salonen JT, Salonen R, Seppanen K . Relationship of serum selenium and antioxidants to plasma lipoproteins, platelet aggregability and prevalent ischaemic heart disease in Eastern Finnish men. Atherosclerosis 1988, 70:155–60.
139. Spallholz JE, Stewart JR. Advances in the role of minerals in immunobiology. Biol Trace Elem Res. 1989, 19:129-51.
140. Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. Biochem Pharmacol. 2000, 59:13-23. Review
141. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. Clin Chem. 1999, 45:7-17. Review
142.Pingitore A, Landi P, Taddei MC, Ripoli A, L'Abbate A, Iervasi G. Triiodothyronine levels for risk stratification of patients with chronic heart failure. Am J Med 2005, 118:132–36.

143. Canturk Z, Cetinarslan B, Tarkun I, Canturk NZ, Ozden M, Duman C. Hemostatic system as a risk factor for cardiovascular disease in women with subclinical hypothyroidism. Thyroid 2003, 13:971–77.

144. Siegmund W, Spieker K, Weike AI, et al. Replacement therapy with levothyroxine plus triiodothyronine (bioavailable molar ratio 14:1) is not superior to thyroxine alone to improve well-being and cognitive performance in hypothyroidism. Clin Endocrinol (Oxf) 2004, 60: 750–57.

145. Gross M, Oertel M, Kohrle J. Differential selenium dependent expression of type I 5¢-deiodinase and glutathione peroxidase in the porcine epithelial kidney cell line LLC–PK1. Biochem J 1995, 306:851–55.

146. Depalo D, Kinlaw WB, Zhao C, Engelberg-Kulka H, St. Germain DL. Effect of selenium deficiency on type I 5¢-deiodinase. J Biol Chem 1994, 269: 6223–28.

147. Sundaram V, Hanna AN, Koneru L, Newman HA, Falko JM. Both hypothyroidism and hyperthyroidism enhance low density lipoprotein oxidation. J Clin Endocrinol Metab 1997, 82: 3421–24.

148. Uthus E, Yokoi K, Davis C: Selenium deficiency in Fisher-344 rats decreases plasma and tissue homocysteine concentrations and alters plasma homocysteine and cysteine redox status. J Nutr 2002, 132:1122-28.

149. Gonzalez S, Huerta JM, Alvarez-Uria J, Fernandez S et al: Serum selenium is associated with plasma homocysteine concentrations in elderly humans. J Nutr 2004, 134:1736–40.

150. Klapcinska B, Poprzecki S, Danch A, Sobczak A, Kempa K: Selenium levels in blood of upper Silesian population: evidence of suboptimal selenium status in a significant percentage of the population. Biol Trace Elem Res 2005, 108:1–15.

151. Venn B, Grant A, Thomson C, Green T. Selenium supplements do not increase plasma total homocysteine concentrations in men and women. J Nutr 2003, 133: 418-20.

152. Evgeniya A. Angelova, Penka A. Atanassova, Nedka T. Chalakova, Borislav D Dimitrov. Associations between Serum Selenium and Total Plasma Homocysteine during the Acute Phase of Ischaemic Stroke. Eur Neurol 2008,60:298–03.

153. Beck MA, Levander OA. Host nutritional status and its effect on a viral pathogen.J Infect Dis. 2000, 182:93-6. Review.

154.Lindh U, Danersund A, Lindvall A.Selenium protection against toxicity from cadmium and mercury studied at the cellular level.Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 1996, 42:39-48.

155. Salonen JT, Alfthan G, Huttunen JK, Pikkarainen J, Puska P. Association between cardiovascular death and myocardial infarction and serum selenium in a matched-pair longitudinal study. Lancet 1982, 2:175–9.
156. Miettinen TA, Alfthan G, Huttunen JK, et al. Serum selenium concentration related to myocardial infarction and fatty acid content of serum lipids. Br Med J (Clin Res Ed) 1983;287:517–9.
157. Virtamo J, Valkeila E, Alfthan G, Punsar S, Huttunen JK, Karvonen MJ. Serum selenium and the risk of coronary heart disease and stroke. Am J Epidemiol 1985, 122:276–82.
158. Salonen JT, Salonen R, Penttila I, et al. Serum fatty acids, apolipoproteins, selenium and vitamin antioxidants and the risk of death from coronary artery disease. Am J Cardiol 1985, 56:226–31.
159. Ringstad J, Thelle D. Risk of myocardial infarction in relation to serum concentrations of selenium. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) 1986, 59:336–9.
160. Kok FJ, de Bruijn AM, Hofman A, Valkenburg HA. Selenium status and chronic disease mortality: Dutch epidemiological findings. Int J Epidemiol 1987, 16:329–32.
161. Ringstad J, Jacobsen BK, Thomassen Y, Thelle DS. The Tromso Heart Study: serum selenium and risk of myocardial infarction a nested case-control study. J Epidemiol Community Health 1987, 41:329–32.
162. Suadicani P, Hein HO, Gyntelberg F. Serum selenium concentration and risk of ischaemic heart disease in a prospective cohort study of 3000 males. Atherosclerosis 1992, 96:33–42.
163. Salvini S, Hennekens CH, Morris JS, Willett WC, Stampfer MJ. Plasma levels of the antioxidant selenium and risk of myocardial infarction among U.S. physicians Am J Cardiol 1995, 76:1218–21.
164. Marniemi J, Jarvisalo J, Toikka T, Raiha I, Ahotupa M, Sourander L. Blood vitamins, mineral elements and inflammation markers as risk factors of vascular and non-vascular disease mortality in an elderly population. Int J Epidemiol 1998, 27:799–807.
165. Kilander L, Berglund L, Boberg M, Vessby B, Lithell H. Education, lifestyle factors and mortality from cardiovascular disease and cancer. A 25-year follow-up of Swedish 50-year-old men. Int J Epidemiol 2001, 30:1119–26.
166. Yoshizawa K, Ascherio A, Morris JS, et al. Prospective study of selenium levels in toenails and risk of coronary heart disease in men. Am J Epidemiol 2003, 158:852–60.

167. Wei WQ, Abnet CC, Qiao YL, et al. Prospective study of serum selenium concentrations and esophageal and gastric cardia cancer, heart disease, stroke, and total death. Am J Clin Nutr 2004, 79:80–5.
168. Akbaraly NT, Arnaud J, Hininger-Favier I, Gourlet V, Roussel AM, Berr C. Selenium and mortality in the elderly: results from the EVA study. Clin Chem 2005, 51:2117–23.
169. Salonen JT, Salonen R, Seppänen K, Kantola M, Suntioinen S, Korpela H. Interactions of serum copper, selenium, and low density lipoprotein cholesterol in atherogenesis. BMJ. 1991, 302:756-60.
170. Kardinaal AF, Kok FJ, Kohlmeier L, Martin-Moreno JM, Ringstad J, Gómez-Aracena J, Mazaev VP, Thamm M, Martin BC, Aro A, Kark JD, Delgado-Rodriguez M, Riemersma RA, van 't Veer P, Huttunen JK. Association between toenail selenium and risk of acute myocardial infarction in European men. The EURAMIC Study. European Antioxidant Myocardial Infarction and Breast Cancer. Am J Epidemiol. 1997, 145:373-9.
171. Ringstad J, Jacobsen BK, Thomassen Y. The Tromsø Heart Study: relationships between the concentration of selenium in serum and risk factors for coronary heart disease. J Trace Elem Electrolytes Health Dis. 1987, 1:27-31.
172. Flores-Mateo G, Navas-Acien A, Pastor-Barriuso R, Guallar E Selenium and coronary heart disease: a meta-analysis.Am J Clin Nutr. 2006, 84:762-73.
173. Stranges S, Marshall JR, Trevisan M, Natarajan R, Donahue RP, Combs GF, Farinaro E, Clark LC, Reid ME. Effects of selenium supplementation on cardiovascular disease incidence and mortality: secondary analyses in a randomized clinical trial.Am J Epidemiol. 2006, 163:694-9.
174. Hercberg S, Galan P, Preziosi P, Bertrais S, Mennen L, Malvy D, Roussel AM, Favier A, Briançon S.The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. Arch Intern Med. 2004, 164:2335-42.
175. You WC, Chang YS, Heinrich J, Ma JL, Liu WD, Zhang L, Brown LM, Yang CS, Gail MH Fraumeni JF Jr, Xu GW. An intervention trial to inhibit the progression of precancerous gastric lesions: compliance, serum micronutrients and S-allyl cysteine levels, and toxicity.. Eur J Cancer Prev. 2001, 10:257-63.
176. Bleys J, Miller ER 3rd, Pastor-Barriuso R, Appel LJ, Guallar E. Vitamin-mineral supplementation and the progression of atherosclerosis: a meta-analysis of randomized controlled trials.Am J Clin Nutr. 2006, 84:880-7.
177. Brown BG, Zhao XQ, Chait A, Frohlich J, Cheung M, Heise N, Dowdy A, DeAngelis D, Fisher LD, Albers J.Lipid altering or antioxidant vitamins for patients with coronary disease and

very low HDL cholesterol? The HDL-Atherosclerosis Treatment Study Design.Can J Cardiol. 1998, 14:6-13. Review.

178. Coudray C, Roussel AM, Mainard F, Arnaud J, Favier A. Lipid peroxidation level and antioxidant micronutrient status in a pre-aging population; correlation with chronic disease prevalence in a French epidemiological study (Nantes, France). J Am Coll Nutr 1997, 16:584–91.

179. Mueller AS. Selenium, an ambivalent factor in diabetes? established facts, recent findings and perspectives. Current Nutrition & Food Science 2006, 2:151–54.

180.Joachim Bleys, Ana Navas-Acien, Saverio Stranges, Andy Menke, Edgar R Miller III, and Eliseo Guallar Serum selenium and serum lipids in US adults. Am J Clin Nutr 2008, 88:416 –23.

181. Hercberg S, Bertrais S, Czernichow S, et al. Alterations of the lipid profile after 7.5 years of low-dose antioxidant supplementation in the SU. VI.MAX Study. Lipids 2005, 40:335– 42.

182. Gamez C, Ruiz-Lopez D, Artacho R, Navarro M, Puerta A, Lopez C. Serum selenium in institutionalized elderly subjects and relation to other nutritional markers. Clin Chem 1997, 43:693–4.

183. Jossa F, Trevisan M, Krogh V. Serum selenium and coronary heart disease risk factors in southern Italian men. Atherosclerosis 1991, 87:129–34.

184. Viegas-Crespo AM, Neve J, Monteiro ML, Amorim MF, Paulo OS, Halpern MJ. Selenium and lipid parameters in plasma of Portuguese subjects. J Trace Elem Electrolytes Health Dis 1994, 8:119 –22.

185. Bukkens SG, de Vos N, Kok FJ, Schouten EG, de Bruijn AM, Hofman A. Selenium status and cardiovascular risk factors in healthy Dutch subjects. J Am Coll Nutr 1990, 9:128 –35.

186. Koskinen T, Pyykko K, Kudo R, Jokela H, Punnonen R. Serum selenium, vitamin A, vitaminEand cholesterol concentrations in Finnish and Japanese postmenopausal women. Int J Vitam Nutr Res 1987, 57:111– 4.

187. Luoma PV, Sotaniemi EA, Korpela H, Kumpulainen J. Serum selenium, glutathione peroxidase activity and high-density lipoprotein cholesterol–effect of selenium supplementation. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1984, 46:469 –72.

188. Yu SY, Mao BL, Xiao P, et al. Intervention trial with selenium for the prevention of lung cancer among tin miners in Yunnan, China. A pilot study Biol Trace Elem Res 1990, 24:105– 8.

189. Dhingra S, Bansal MP. Hypercholesterolemia and LDL receptormRNA expression: modulation by selenium supplementation. Biometals 2006, 19:493–501.

190. Tim S. Nawrot, Jan A. Staessen, Harry A. Roels, Elly Den Hond, Lutgarde Thijs, Robert H. Fagard, Anna F. Dominiczak, and Harry A. Struijker-Boudier. Blood pressure and blood selenium: a cross-sectional and longitudinal population study. European Heart Journal 2007, 28: 628–33.

191. Salonen JT, Salonen R, Seppanen K, Kantola M, Parviainen M, Alfthan G, Maenpaa PH, Taskinen E, Rauramaa R. Relationship of serum selenium and antioxidants to plasma lipoproteins, platelet aggregability and prevalent ischaemic heart disease in Eastern Finnish men. Atherosclerosis 1988, 70:155–60.

192. Hilse H, Oehme P, Krause W, Hecht K. Effect of sodium selenite on experimental hypertension in rat. Acta Physiol Pharmacol Bulg 1979, 5:47–50.

193. Laclaustra M, Navas-Acien A, Stranges S, Ordovas JM, Guallar E. Serum selenium concentrations and hypertension in the US Population. Circ Cardiovasc Qual Outcomes. 2009;2:369-76.

194. Stranges S, Marshall JR, Natarajan R, Donahue RP, Trevisan M, Combs GF, Cappuccio FP, Ceriello A, Reid ME. Effects of long-term selenium supplementation on the incidence of type 2 diabetes: a randomized trial.Ann Intern Med. 2007, 147:217-23.

195. Bleys J, Navas-Acien A, Guallar E. Serum selenium and diabetes in U.S. adults.Diabetes Care. 2007, 30:829-34.

196. Rajpathak S, Rimm E, Morris JS, Hu F. Toenail selenium and cardiovascular disease in men with diabetes. J Am Coll Nutr. 2005, 24:250-6.

197. Hughes K, Choo M, Kuperan P, Ong CN, Aw TC Cardiovascular risk factors in non-insulin-dependent diabetics compared to non-diabetic controls: a population-based survey among Asians in Singapore. Atherosclerosis. 1998, 136:25-31.

198. David E.Nixon, Kenneth R, Neubauer Steven J, Eckdahl John A, and Butza Mary F. Evaluation of a tunable bandpass reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometer for the determination of selenium in serum and urine. Spectrochimica Acta 2003, 58:97-110.

199. Labat L, Dehon B, Lhermitte M. Rapid and simple determination of selenium in blood serum by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). Anal Bioanal Chem 2003,376:270-3.

200. Sieniawska CE, Mensikov R, Delves HT. Determination of total selenium in serum, whole blood and erythrocytes by ICP-MS. J Anal At Spectrom 1999,14:109-12.

201. Turner J, Hill SJ, Evans EH, Fairman B. The use of ETV-ICP-MS for the deter- mination of selenium in serum. J Anal At Spectrom 2009,14:121-6.

202. Machat J, Kanicky V, Otruba V. Determination of selenium in blood serum by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with pneumatic nebulization. Anal Bioanal Chem 2002, 372:576-81.
203. Grinberg P, Goncalves RA, de Campos RC. The determination of total Se in urine and serum by graphite furnace atomic absorption spectrometry using Ir as permanent modifier and in situ oxidation for complete trimethylselenonium recovery. Anal Bioanal Chem 2005, 383:1044-51.
204. Borella P, Bargellini A, Caselgrandi E, Menditto A, Patriarca M, Taylor A and Vivoli G Selenium Determination in Biological Matrices. Microchemical Journal 1998, 58:325-36.
205. Encinar JR, Schaumloffel D, Ogra Y, Lobinski R. Determination of selenomethionine and selenocysteine in human serum using speciated isotope dilution-capillary HPLC-inductively coupled plasma collision cell mass spectrometry. Anal Chem 2004, 76:6635-42.
206. Michalke B. Selenium speciation in human serum of cystic fibrosis patients compared to serum from healthy persons. J Chromatogr A 2004, 1058:203-8.
207. Akesson, B, Martensson, B. Chromatography of selenoproteins in human serum using matrix-bound heparin. Int J Vitam Nutr Res. 1991, 61:72-76.
208. Akesson B, Martensson B. Heparin interacts with selenoproteins in human plasma. J. Inorg Biochem. 1988, 33:257-61.
209. Deagen JT, Butler JA, Zachara BA, Whanger PD. Determination of the distribution of selenium between glutathionine peroxidase, selenoprotein P and albumn in plasma. Anal Biochem. 1993, 208:176-81.
210. Harrison I, Littlejohn D, Fell GS. Improved molecular fluorescence method for the determination of selenium in biological samples. Analyst 1996, 121:1641-6.
211. Koyama H, Omura K, Ejima A, Kasanuma Y. et al. Separation of selenium-containing proteins in human and mouse plasma using tandem high-performance liquid chromatography columns coupled with inductively plasma mass spectrometry. Anal Biochem 1999, 267:84-91.
212. Bendahl L, Sidenius U, Gammelgaard B. Determination of selenoprotein P in human plasma by solid phase extraction and inductively coupled plasma mass spectroscopy. Anal Chim Act 1999, 411:103-8.
213. Marchaluk E, Persson-Moschos M, Thorling EB, Akesson B. Variation in selenoprotein P concentration in serum from different European regions. Eur J Clin Nutr 1995, 49:42–8.
214. Whanger PD, Beilstein MA, Thomson CD, Robinson MF, Howe M. Blood selenium and glutathione peroxidase activity of populations in New Zealand, Oregon, and South Dakota. FASEB J 1988, 2:2996-02.

215. Jacobson GA, Narkowicz C, Tong YC, Peterson GM. Plasma glutathione peroxidase by ELISA and relationship to selenium level. Clin Chim Acta 2006, 369:100-3.
216. Plecko T, Nordmann S, Rukgauer M, Kruse-Jarres JD. Determination and distribution of human plasma selenoproteins. Anal. Chem. 1999, 363:517-19.
217. Harrison, I., Littlejohn, D., Fell, G. S., Improved molecular fluorescence method for the determination of selenium in biological samples. Analyst 1996, 121:1641-46.
218. Person-Moschos M, Huang W, Srikumar TS, Akesson B et al. Selenoprotein P in serum as a biochemical marker of selenium status. Analyst 1995, 120:833-36.
219. Palacios O, Ruiz EJ, Schaumloffel D, Lobinski R. Fractionation of selenium-containing proteins in serum by multiaffinity liquid chromatography before size-exclusion chromatography-ICPMS. Anal Bioanal Chem 2006, 384:1276-83.
220. Reyes LH, Marchante-Gayon JM, Garcia Alonso JI, Sanz-Medel A. Quantitative speciation of selenium in human serum by affinity chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis ICP-MS. J Anal At Spectrom 2003, 18:1210-16.
221. Jitaru P, Cozzi G, Gambaro A, Cescon P et al. Simultaneous speciation analysis of glutathione peroxidase, selenoprotein P and selenoalbumin in human serum by tandem anion exchange-affinity HPLC and on-line isotope dilution ICP-quadropole MS. Anal Bioanal Chem 2008, 391:661-69.
222. Jitaru, P., Prete, M., Cozzi, G., Turetta, C., et al., Speciation analysis of selenoproteins in human serum by solid phase extraction and affinity HPLC hyphenated to ICP-quadrupole MS. J. Anal. At. Spectrom. 2008, 23:402-6.
223. Rosen LA, Hieftje GM. Inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry for speciation analysis: applications and instrumentation. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy 2003, 59:135-46.
224. Stephanou GE. Introduction to Modern Mass Spectrometry. Environmental Analytical Chemistry Course 2006.
225. Thomas RA. Beginner's Guide to ICP-MS, Part II: The Sample-Introduction System. Spectroscopy 2006, 16:56-60.
226. Mora J, Maestre S, Hernandis V, Todolú JL. The sample introduction step in plasma spectrometry. Trends in Analytical Chemistry 2003, 22:123-32.
227. Zahran NF, Helal AI, Amr MA, Abdel-Hafiez A, Mohsen AT. Formation of polyatomic ions from the skimmer cone in the inductively coupled plasma mass spectrometry. International Journal of Mass Spectrometry 2003, 226:271-8.

228. Thomas R. Beginner's Guide to ICP-MS Part VI — The Mass Analyzer. Spectroscopy, 2001, 16:38-44.
229. Skoog DA, Holler FJ, Nieman A. Αρχές της Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης. Εκδόσεις Κωσταράκη, 5η έκδοση, Αθήνα 2002.
230. Adams F, Gijbels R, Van Grieken R (Eds.), Inorganic Mass Spectrometry, Wiley, New York, 1998, pp. 301– 76.
231. Heumann KG, Isotope dilution mass spectrometry, Int J Mass Spectrom Ion Process. 1992, 118: 575–92.
232. Fasset JD, Paulsen PJ, Isotope dilution mass spectrometry for accurate elemental analysis, Anal Chem 1989, 61:623-44.
233. Bievre PD, Isotope-dilution mass spectrometry, Tech Instrum Anal Chem 1994, 15:169-83.
234. K.G. Heumann, Isotope Dilution mass spectrometry (IDMS) of the elements, Mass Spectrom Rev 1992, 11:41–67.
235. Rodrıguez-Gonzalez P, Marchante-Gayon JM, Ignacio J, Alonso GT, Sanz-Medel A. Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review. Spectrochimica Acta Part B 2005, 60:151– 07.
236. Pitsavos C, Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Stefanadis C. Epidemiology of cardiovascular risk factors in Greece: aims, design and baseline characteristics of the ATTICA study. BMC Public Health 2003, 3:1-9.
237. Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Pitsavos C, Skoumas J, Lentzas Y, Katinioti A, Stefanadis C Hierarchical analysis of anthropometric indices in the prediction of 5-year incidence of hypertension in apparently healthy adults: the ATTICA study.Atherosclerosis. 2009, 206:314-20.
238. Hallal PC, Victora CG. Reliability and validity of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ). Med. Sci. Sports Exerc. 2004, 35:1381-95.
239. Katsouyanni K, Rimm EB, Gnardellis C. Trichopoulos D, Polychronopoulos E, Trichopoulou A. Reproducibility and relative validity of extensive semi-quantitative food frequency questionnaire using dietary records and biochemical markers among Greek school teachers. Int J Epidemiol 1997, 26:18-127.
240. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Stefanadis C. Dietary Patterns: a Mediterranean diet score and its relation to CVD risk and markers. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2006, 16:559-568.
241. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Arvaniti F, Stefanadis C. Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity among healthy adults:the accuracy of Med DietScore. Prev Med 2007, 44:334-40.

242. Palacios O, Lobinski R. Investigation of selenoproteins during storage of human serum by size-exclusion LC-ICP-MS. Talanta 2007, 71:1813-16.
243. B´hmer, C., Caruso, J. A., Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry. J Chromatogr A 2006, 1114:1-20.
244. Jitaru P, Goenaga-Infante H, Vaslin-Reimann S, Fisicaro P. A systematic approach to the accurate quantification of selenium in serum selenoalbumin by HPLC-ICP-MS. Anal Chim Acta. 2010 Jan 11;657(2):100-7.
245. Petru Jitaru, Marco Roman, Giulio Cozzi ,Paola Fisicaro, Paolo Cescon, Carlo Barbante. Speciation analysis of selenoproteins in human serum by microbore affinity-HPLC hyphenated to ICP-Sector field-MS using a high efficiency sample introduction system. Microchim Acta 2009, 166:319–27.
246. Hagmar, L., Persson-Moschos, M., Akesson, B., Schutz, A., Plasma levels of selenium, selenoprotein P and glutathione peroxidase and their correlations to fish intake and serum levels of thyrotropin and thyroid hormones: a study on Latvian fish consumers. Eur J Clin Nutr 1998, 52:796-800.
247. Andoh, A., Hirashima, M., Maeda, H., Hata, K., et al. Serum selenoprotein-P levels in patients with inflammatory bowel disease. Nutrition. 2005, 21:574-79.
248 Guillaume Ballihaut & Sandra Mounicou & Ryszard Lobinski. Multitechnique mass-spectrometric approach for the detection of bovine glutathione peroxidase selenoprotein: focus on the selenopeptide. Anal Bioanal Chem. 2007, 388:585–91.
249. Hollenbach, B., Morgenthaler, N. C., Struck, J., Alonso, C., et al., New assay for the measurement of selenoprotein P as a sepsis biomarker from serum. J Trace Elem Med Biol 2008, 22:24-32.
250. Van Cauwenbergh R, Robberecht H, Deelstra H, Picramenos D, Kostakopoulos A. Selenium concentration in serum of healthy Greek adults. J Trace Elem Electrolytes Health Dis 1994, 8:99-09.
251. Kostakopoulos A, Kotsalos A, Alexopoulos J, Sofras F, Deliveliotis C, Kallistratos G. Serum selenium levels in healthy adults and its changes in chronic renal failure. Int Urol Nephrol 1990, 22:397-01.
252. Thorling EB, Overvad K, Geboers. Selenium status in Europe--human data. A multicenter study. J.Ann Clin Res. 1986;18:3-7.
253. Schrauzer GN, White DA, Schneider CJ. Cancer mortality correlation studies--III: statistical associations with dietary selenium intakes. Bioinorg Chem 1977, 7:23-31.

254. Kallistros G, Evangelou A, Seferiadis K, Vezyrak P, Barboutis K. Selenium and haemodialysis: serum selenium levels in healthy persons, non-cancer and cancer patients with chronic renal failure. Nephron 1985,41:217-22.

255. Milias GA, Nomikos T, Fragopoulou E, Athanasopoulos S, Antonopoulou S. Effects of baseline serum levels of Se on markers of eccentric exercise-induced muscle injury. Biofactors 2006, 26:161-70.

256. Telisman S, Jurasović J, Pizent A, Cvitković P. Blood pressure in relation to biomarkers of lead, cadmium, copper, zinc, and selenium in men without occupational exposure to metals. Environ Res. 2001, 87:57-68.

257. Maksimović Z, Rsumović M, Jović V, Kosanović M, Jovanović T.Selenium in soil, grass, and human serum in the Zlatibor mountain area (Serbia): geomedical aspects. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 1998, 17:221-7.

258. Li F, Rossipal E, Micetic-Turk D. Determination of selenium in serum by FI-HG-AAS and calculation of dietary intake. Biol Trace Elem Res. 2000, 73:201-10.

259. Hincal F, Başaran N, Yetgin S, Gökmen O. Selenium status in Turkey. II. Serum selenium concentration in healthy residents of different ages in Ankara. J Trace Elem Electrolytes Health Dis. 1994,1:9-12.

260. Burk RF, Hill KE, Motley AK. Plasma selenium in specific and non-specific forms. Biofactors. 2001,14:107-14.

261. Burk RF, Hill KE, Read R, Bellew T.Response of rat selenoprotein P to selenium administration and fate of its selenium.Am J Physiol. 1991,261:26-30.

262. Persson-Moschos M, Huang W, Srikumar TS, Akesson B, Lindeberg S. Selenoprotein P in serum as a biochemical marker of selenium status. Analyst. 1995,120:833-6.

263. Li N, Gao Z, Luo D, Tang X, Chen D, Hu Y. Selenium level in the environment and the population of Zhoukoudian area, Beijing, China. Sci Total Environ 2007, 381:105-11.

264. Chen CJ, Lai JS, Wu CC, Lin TS. Serum selenium in adult Taiwanese. Sci Total Environ 2006,367:448-50.

265. Ghayour-Mobarhan M, Taylor A, New SA, Lamb DJ, Ferns GA. Determinants of serum copper, zinc and selenium in healthy subjects. Ann Clin Biochem 2005, 42:364-75.

266. Morisi G, Patriarca M, Marano G, Giampaoli S, Taggi F. Age and sex specific reference serum selenium levels estimated for the Italian population. Ann Ist Super Sanita 1989, 25:393-403.

267. Lopes PA, Santos MC, Vicente L, Rodrigues MO, Pavão ML, Nève J, Viegas-Crespo AM. Trace element status (Se, Cu, Zn) in healthy Portuguese subjects of Lisbon population: a reference study, Biol. Trace Elem. Res. 2004, 101:1-17.

268. Brtková A, Magálová T, Babinská K, Béderová A. Serum selenium levels in Slovak population. Biol Trace Elem Res 1994, 46:163-71.

269. Luty-Frackiewicz A, Jethon Z, Januszewska L. Effect of smoking and alcohol consumption on the serum selenium level of Lower Silesian population. Sci Total Environ 2002, 285:89-95.

270. Banke Rasmussen, Birgit Hollenbach, PeterLaurberg, AllanCarle, Antonia Hog Torben Jørgensend, Pernille Vejbjergd, Lars Ovesene, Lutz Schomburg. Serum selenium and selenoprotein P status in adult Danes–8-year follow up. J Trace Elem Med Biol 2009, 23:265–71.

271. Akesson B, Huang W, Persson-Moschos M, Marchaluk E, Jacobsson L, Lindga¨rde F. Glutathioneperoxidase, selenoprotein P and selenium in serum of elderly subjects in relation to other biomarkers of nutritional status and food intake.NutrBiochem1997, 8:508–17.

272. Burk RF, Norsworthy BK, Hill KE, Motley AK, Byrne DW. Effects of chemical form of selenium on plasma biomarkers in a high-dose human supplementation trial. Cancer Epid Bio Prev. 2006, 15:804–10.

273. Marchaluk E, Persson-Moschos M, Thorling EB, Akesson B. Variation in selenoprotein P concentration in serum from different European regions. Eur J Clin Nutr 1995, 49:42–8.

274. Arnaud J, Bertrais S, Rousel AM et al. Serum selenium determinants in French adults: the SU.VI.MAX study. Br J Nutr 2006, 95:313-20.

275. Borawska MH, Witkowska AM, Hukalowicz K, Markiewicz R. Influence of dietary habits on serum selenium concentration. Ann Nutr Metab 2004, 48:134-40.

276. González S, Huerta JM, Fernández S, Patterson EM, Lasheras C. Food intake and serum selenium concentration in elderly people Ann Nutr Metab. 2006, 50:126-31.

277. Lombardi-Boccia G, Lanzi S, Lucarini M, Di Lullo G. Meat and meat products consumption in Italy: contribution to trace elements, heme iron and selected B vitamins supply. Int J Vitam Nutr Res. 2004, 74:247-51.

278. Murphy J, Hannon EM, Kiely M, Flynn A, Cashman KD Selenium intakes in 18-64-y-old Irish adults.Eur J Clin Nutr. 2002, 56:402-8.

279. Pappa EC, Pappas AC, Surai PF.Selenium content in selected foods from the Greek market and estimation of the daily intake.Sci Total Environ. 2006, 372:100-8.

280. Van Ryssen, JB, Deagen JT, Beilstein M, and Whanger P. Comparative metabolism of organic and inorganic selenium by sheep. J Agric Food Chem1989, 37:1358-63.

281. Finley JW. Does selenium accumulation in meat confer a health benefit to the consumer? Proceedings of the American Society of Animal Science, 1999.
282. Xia Y, Zhao X, Zhu L, and Whanger PD. Metabolism of selenate and selenomethionine by a selenium-deficient population of men in China. J Nutr Biochem 1992, 3:202-10.
283. Gibson RS Content and bioavailability of trace elements in vegetarian diets.Am J Clin Nutr. 1994, 59:1223-32.
284. Bates CJ, Prentice A, Birch MC, Delves HT. Dependence of blood indices of selenium and mercury on estimated fish intake in a national survey of British adults. Public Health Nutr. 2007, 10:508-17.
285. Wang Y, Crawford MA, Chen J, Li J, Ghebremeskel K, Campbell TC, Fan W, Parker R, Leyton J.Comp. Fish consumption, blood docosahexaenoic acid and chronic diseases in Chinese rural populations. Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2003, 136:127-40.
286. Arvaniti F, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Zampelas A, Stefanadis C. Dietary habits in a Greek sample of men and women: the ATTICA study. Cent Eur J Public Health 2006, 14:74-7.
287. Fairweather-Tait SJ, Collings R, Hurst R. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. Am J Clin Nutr. 2010, 91:1484-91.
288. Huang W, Akesson B, Svensson BG, Schütz A, Burk RF, Skerfving S. Selenoprotein P and glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) in plasma as indices of selenium status in relation to the intake of fish.Br J Nutr. 1995, 73:455-61.
289. Golubkina NA, Alfthan GV. The human selenium status in 27 regions of Russia. J Trace Elem Med Biol 1999, 13:15-20.
290. Lipiec E, Siara G, Bierla K, Ouerdane L, Szpunar J. Determination of selenomethionine, selenocysteine, and inorganic selenium in eggs by HPLC-inductively coupled plasma mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. 2010, 397:731-41.
291. Kaffai MR, Ganji V. Sex, age, geographical location, smoking and alcohol consumption influence serum selenium concentrations in the USA: third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 1988-1994. J Trace Elem Med Biol 2003, 17:13-8.
292. Robberecht H & Deelstra H (1994) Factors influencing blood selenium concentration values: a literature review. J Trace Elem Electrolytes Health Dis 8: 129–43.
293. Koyama H, Watanabe C, Satoh H, Hosokai H & Tamura S. Consistent relationship between selenium and apolipoprotein A-II concentrations in the sera of fasting middle-aged male abstainers and regular consumers of alcohol. Biol Trace Elem Res 1995, 50:33–42.

294. Kadrabová J, Madaric A, Kovácziková Z, Ginter E Selenium status, plasma zinc, copper, and magnesium in vegetarians.Biol Trace Elem Res. 1995, 50:13-24,
295. Hoeflich J, Hollenbach B, Behrends T, Hoeg A, Stosnach H, Schomburg L The choice of biomarkers determines the selenium status in young German vegans and vegetarians. Br J Nutr. 2010, 19:1-4
296. Kłapcińska B, Poprzecki S, Danch A, Sobczak A, Kempa K. Selenium levels in blood of upper Silesian population: evidence of suboptimal selenium status in a significant percentage of the population. Biol Trace Elem Res. 2005, 108:1-15.
297. Madaric A, Kadrabová J, Ginter E. Selenium concentration in plasma and erythrocytes in a healthy Slovak population. J Trace Elem Electrolytes Health Dis. 1994, 8:43-7.
298. Sesana G, Baj A, Toffoletto F, Sega R, Ghezzi L. Plasma selenium levels of the general population of an area in northern Italy.Sci Total Environ. 1992,120:97-102.
299. Benes B, Spevácková V, Smíd J, Batáriová A, Cejchanová M, Zítková L. Effects of age, BMI, smoking and contraception on levels of Cu, Se and Zn in the blood of the population in the Czech Republic. Cent Eur J Public Health. 2005, 13:202-7.
300. Schomburg L, Riese C, Renko K, Schweizer U. Effect of age on sexually dimorphic selenoprotein expression in mice. Biol Chem2007, 388:1035–41.
301. Marchaluk E, Persson-Moschos M, Thorling EB, Akesson B. Variation in selenoprotein P concentration in serum from different European regions. Eur J Clin Nutr 1995, 49:42–8.
302. Labbe MR, Collins MW, Trick KD, Laffey P. Glutathione peroxidase activity in a healthy Canadian population. Effects of age, smoking and drinking habits, exercise and oral contraceptive use. J Trace Elem Med. 1992, 9:45-53.
303. D. Behne, T. Hã–Fer-Bosse. Effects of a Low Selenium Status on the Distribution and Retention of Selenium in the Rat. J Nutr 1984, 14:1289-96.
304. D. Behne, W. Wolters. Distribution of Selenium and Glutathione Peroxidase in the Rat, J. Nutr. 1983, 13:456-61.
305. Suzuki K, Kurasaki K, Okazaki N, Ogra Y. Selenosugar and trimethylselenonium among urinary Se metabolites: dose- and age-related changes, Toxicol Appl. Pharmacol. 2005, 206:1-8.
306. Lloyd B, Lloyd RS, and Clayton BE. Effect of smoking, alcohol, and other factors on the selenium status of a healthy population. J Epidemiol Comm Health 1983, 37: 213–17.
307. Swanson CA, Longnecker MP, Veillon C, Howe SM, Levander OA, Taylor PR et al. Selenium intake, age, gender, and smoking in relation to indices of selenium status of adults residing in a seleniferous area. Am J Clin Nutr. 1990, 52:858–62.

308. Galan P, Viteri FE, Bertrais S, Czernichow S, Faure H, Arnaud J, Ruffieux D, Chenal S, Arnault N, Favier A, Roussel AM, Hercberg S. Serum concentrations of beta-carotene, vitamins C and E, zinc and selenium are influenced by sex, age, diet, smoking status, alcohol consumption and corpulence in a general French adult population. Eur J Clin Nutr. 2005, 59:1181-90.

309.Persson-Moschos M., Stavenow L., A, kesson B. and Lindgarde F. Selenoprotein P in plasma in relation to cancer morbidity in middle-aged Swedish men. Nutr. Cancer 2000, 36:19–26.

310. Akesson B, Huang W, Persson-Moschos M, Marchaluk E, Jacobsson L, Lindga¨rde F. Glutathioneperoxidase, selenoprotein P and selenium in serum of elderly subjects in relation to other biomarkers of nutritional status and food intake.NutrBiochem1997, 8:508–17.

311. Kocyigit A, Erel O, Gur S. Effects of tobacco smoking on plasma selenium, zinc, copper and iron concentrations and related antioxidative enzyme activities. Clin Biochem. 2001, 34:629-33.

312. Orhan H, Evelo CT, Sahin G. Erythrocyte antioxidant defense response against cigarette smoking in humans--the glutathione S-transferase vulnerability. J Biochem Mol Toxicol. 2005,19:226-33.

313. L'abbe MR, Collins MW, Trick KD, Laffey PJ. Glutathione peroxidase activity in a healthy Canadian population. Effects of age, smoking and drinking habits, exercise and oral contraceptive use. Trace Elem Med. 1992, 9:45-53.

314. Reszka E, Gromadzinska J, Jablonska E, Wasowicz W, Jablonowski Z, Sosnowski M. Level of selenoprotein transcripts in peripheral leukocytes of patients with bladder cancer and healthy individuals. Clin Chem Lab Med. 2009, 47:1125-32.

315. Duntas LH Selenium and inflammation: underlying anti-inflammatory mechanisms.Horm Metab Res. 2009, 41:443-7

316. Lewis GP, Coughlin LL, Jusko WJ, Hartz S.Contribution of cigarette smoking to cadmium accumulation in man.Lancet. 1972, 1:291-2.

317. Magos L, Webb M. The interactions of selenium with cadmium and mercury. In: Goldberg L. ed. Critical reviews in toxicology. Vol 8. Cleveland, Ohio: CRC Press, 1980: 1-42

318. Chortyk OT, Schlotzhauer WS Increasing selenium in cigarettes and smoke: transfer to smoke. Arch Environ Health. 1984 Nov-Dec;39(6):419-24.

319. Wei W, Kim Y, Boudreau N. Association of smoking with serum and dietary levels of antioxidants in adults: NHANES III, 1988-1994. Am J Public Health. 2001 Feb;91(2):258-64.

320. Sánchez C, López-Jurado M, Aranda P, Llopis J Plasma levels of copper, manganese and selenium in an adult population in southern Spain: influence of age, obesity and lifestyle factors. Sci Total Environ. 2010 Feb 1;408(5):1014-20.

321. Rousseau AS, Margaritis I, Arnaud J, Faure H, Roussel AM. Physical activity alters antioxidant status in exercising elderly subjects. J Nutr Biochem. 2006, 17:463-70.
322. Alshammari E, Shafi S, Nurmi-Lawton J, Taylor A, Lanham-New S, Ferns G. Altered antioxidant and trace-element status in adolescent female gymnasts.Int J Sport Nutr Exerc Metab. 2010,20:291-8.
323. Andrew Rundle, Catherine Richards, Deliang Tang, and Frederica Perera. Lack of Association Between Physical Activity in Smokers and Plasma Glutathione Peroxidase Levels. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008, 17:1004-6.
324. Tessier F, Margaritis I, Richard MJ, Moynot C, Marconnet P Selenium and training effects on the glutathione system and aerobic performance. Med Sci Sports Exerc. 1995, 27:390-6.
325. Laaksonen DE, Atalay M, Niskanen L, Uusitupa M, Hänninen O, Sen CK Blood glutathione homeostasis as a determinant of resting and exercise-induced oxidative stress in young men. Redox Rep. 1999;4:53-9.
326. Russo C, Olivieri O, Girelli D, Faccini G, Zenari ML, Lombardi S, Corrocher R.Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. J Hypertens. 1998, 16:1267-71.
327. Moran JP, Cohen L, Greene JM, Xu G, Feldman EB, Hames CG, Feldman DS. Plasma ascorbic acid concentrations relate inversely to blood pressure in human subjects. Am J Clin Nutr. 1993, 57:213-7.
328. Obeid O, Elfakhani M, Hlais S, Iskandar M, Batal M, Mouneimne Y, Adra N, Hwalla N. Plasma copper, zinc, and selenium levels and correlates with metabolic syndrome components of lebanese adults.Biol Trace Elem Res. 2008, 123:58-65.
329. Laclaustra M, Navas-Acien A, Stranges S, Ordovas JM, Guallar E. Serum selenium concentrations and hypertension in the US Population. Circ Cardiovasc Qual Outcomes. 2009, 2:369-76.
330. Mihailović MB, Avramović DM, Jovanović IB, Pesut OJ, Matić DP, Stojanov VJ.Blood and plasma selenium levels and GSH-Px activities in patients with arterial hypertension and chronic heart disease.J Environ Pathol Toxicol Oncol. 1998, 17:285-9.
331. Prisant LM, Carr AA, Desnoyers M, Westcott RJ, Zinny MA, O'Donnell DM, Bryzinski B, McKee B, Nelson BR.Multicenter evaluation of the hemodynamic effects of bisoprolol in patients with mild to moderate hypertension.J Clin Pharmacol. 1990, 12:1096-101.
332. Verho M, Bossaller W, Malerczyk V.Serum selenium levels in diuretic-treated hypertensives: a double-blind trial of piretanide against hydrochlorothiazide plus amiloride.Int J Clin Pharmacol Res. 1988, 8:5-8.

333. Djordjević VB, Grubor-Lajsić G, Jovanovic-Galović A, Pavlović D, Cvetković T, Pejović M, Lecić N. Selenium-dependent GSH-Px in erythrocytes of patients with hypertension treated with ACE inhibitors. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 1998, 17:277-80.

334. Hayakawa H, Raij L Relationship between hypercholesterolaemia, endothelial dysfunction and hypertension. J Hypertens. 1999, 17:611-9.

335. Oster O, Prellwitz W. Selenium and cardiovascular disease.Biol Trace Elem Res. 1990, 24:91-103.

336. Slonim AE, Surber ML, Page DL, Sharp RA, Burr IM.Modification of chemically induced diabetes in rats by vitamin E. Supplementation minimizes and depletion enhances development of diabetes. J Clin Invest. 1983, 71:1282-8.

337. Ghosh R, Mukherjee B, Chatterjee M. A novel effect of selenium on streptozotocin-induced diabetic mice.Diabetes Res. 1994, 25:165-71.

338. Stapleton SR, Garlock GL, Foellmi-Adams L, Kletzien RF Selenium: potent stimulator of tyrosyl phosphorylation and activator of MAP kinase.Biochim Biophys Acta. 1997,355:259-69.

339. Rasekh HR, Potmis RA, Nonavinakere VK, Early JL, Iszard MB Effect of selenium on plasma glucose of rats: role of insulin and glucocorticoids. Toxicol Lett. 1991, 58:199-07.

340. Ruíz C, Alegría A, Barberá R, Farré R, Lagarda J. J.Selenium, zinc and copper in plasma of patients with type 1 diabetes mellitus in different metabolic control states. Trace Elem Med Biol. 1998, 12:91-5.

341. Laclaustra M, Navas-Acien A, Stranges S, Ordovas JM, Guallar E. Serum selenium concentrations and diabetes in U.S. adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004. Environ Health Perspect. 2009, 117:1409-13.

342. Asayama K, Kooy NW, Burr IM Effect of vitamin E deficiency and selenium deficiency on insulin secretory reserve and free radical scavenging systems in islets: decrease of islet manganosuperoxide dismutase. J Lab Clin Med. 1986, 107:459-64.

343. McClung JP, Roneker CA, Mu W, Lisk DJ, Langlais P, Liu F, Lei XG Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004, 101:8852-7.

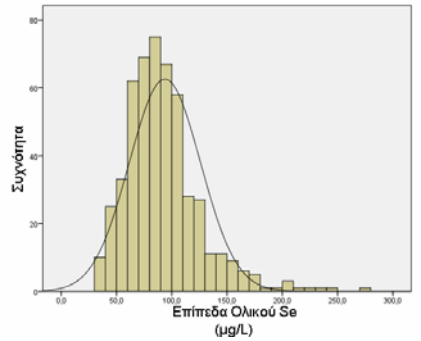
344. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med. 1999, 340:448-54.

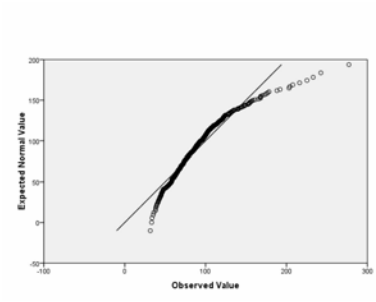
345. Dhingra S, Bansal MP. Modulation of hypercholesterolemia-induced alterations in apolipoprotein B and HMG-CoA reductase expression by selenium supplementation. Chem Biol Interact 2006, 161:49 –56.

346. Lee O, Moon J, Chung Y. The relationship between serum selenium levels and lipid profiles in adult women. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 2003, 49:397-04.
347. Stone WL, Scott RL, Stewart EM, Kheshti A. Lipoprotein alterations in the spontaneously hypertensive rat fed diets deficient in selenium and vitamin E. Proc Soc Exp Biol Med. 1994,206:130-7.
348. Nassir F, Moundras C, Bayle D, et al. Effect of selenium deficiency on hepatic lipid and lipoprotein metabolism in the rat. Br J Nutr 199, 78:493–500.
349. Sengupta A, Carlson BA, Hoffmann VJ, Gladyshev VN, Hatfield DL. Loss of housekeeping selenoprotein expression in mouse liver modulates lipoprotein metabolism. Biochem Biophys Res Commun. 2008, 365:446-52.
350. Dhingra S, Bansal MP Hypercholesterolemia and apolipoprotein B expression: regulation by selenium status.Lipids Health Dis. 2005,4:28.
351. Crespo AM, Reis MA, Lança MJ. Effect of selenium supplementation on polyunsaturated fatty acids in rats.Biol Trace Elem Res. 1995, 47:335-41.
352. Kang BP, Mehta U, Bansal MP. Effect of diet induced hypercholesterolemia and selenium supplementation on nitric oxide synthase activity.Arch Physiol Biochem. 1997, 105:603-6.
353. Pucci E, Chiovato L, Pinchera A.Thyroid and lipid metabolism. Int J Obes Relat Metab Disord. 2000, 2:109-12.
354. Swarbrick MM, Havel PJ. Physiological, pharmacological, and nutritional regulation of circulating adiponectin concentrations in humans.Metab Syndr Relat Disord. 2008, 6:87-102.
355. Seidelin JB , Nielsen OH , Strom J . Soluble L-selectin levels predict survival in sepsis Intensive . Care Med 2001, 28:1613–18.
356. Schnabel R, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Torzewski M, Lubos E, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Münzel T, Blankenberg S. Glutathione peroxidase-1 and homocysteine for cardiovascular risk prediction: results from the AtheroGene study. J Am Coll Cardiol. 2005, 45:1631-37.
357. Upchurch GR Jr., Welch GN, Fabian AJ, et al. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. J Biol Chem 1997, 272:17012–7.
358. Yildiz Atamer, Yuksel Kcyigit, Beran Yokus ,Aytac Atamer , Ali Ceylan Erden. Lipid peroxidation, antioxidant defense, status of trace metals and leptin levels in preeclampsia. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 2005, 119:60–66.
359. Balasubramaniyan V, Kalaivani Sailaja J, Nalini N Role of leptin on alcohol-induced oxidative stress in Swiss mice. Pharmacol Res. 2003, 47:211-16.

360. Ozata M, Uckaya G, Aydin A, Isimer A, Ozdemir IC. Defective antioxidant defense system in patients with a human leptin gene mutation. Horm Metab Res. 2000, 32:269-72.
361. Chanoine JP, Wong AC, Lavoie JC. Selenium deficiency impairs corticosterone and leptin responses to adrenocorticotropin in the rat. Biofactors. 2004, 2:109-18.

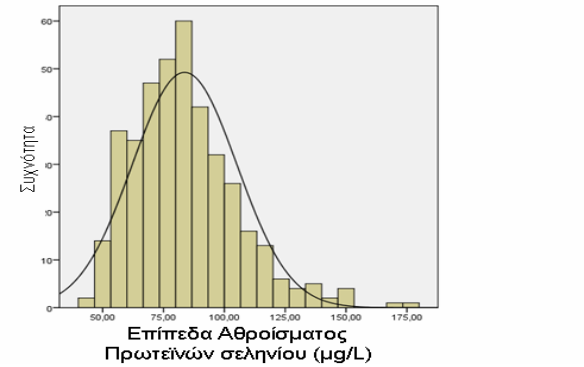
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

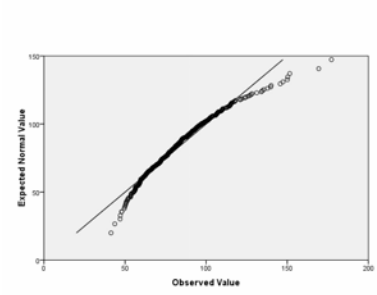




Γράφημα 1Α. Ιστόγραμμα κατανομής-συχνοτήτων των επιπέδων Ολικού σεληνίου(μgSe/L) στον συνολικό πληθυσμό.

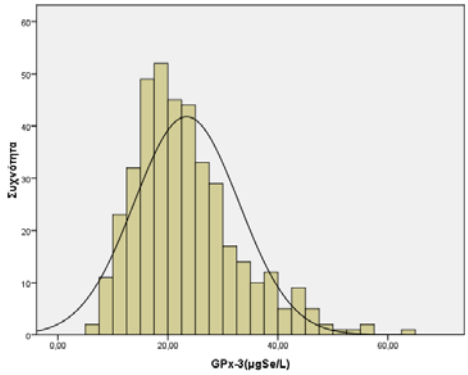
Διάγραμμα Q-Q (αντίστοιχα)

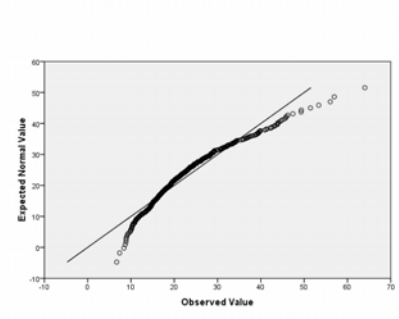




Γράφημα 1Β. Ιστόγραμμα κατανομής συχνοτήτων του αθροίσματος πρωτεϊνών σεληνίου(μgSe/L) στον συνολικό πληθυσμό.

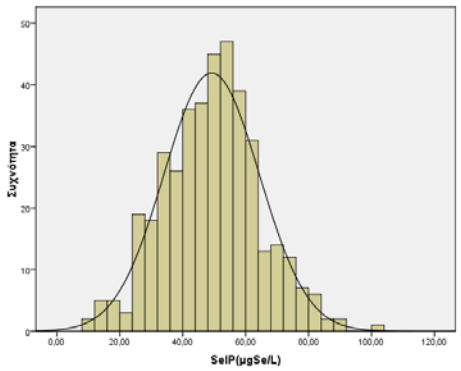
Διάγραμμα Q-Q (αντίστοιχα)

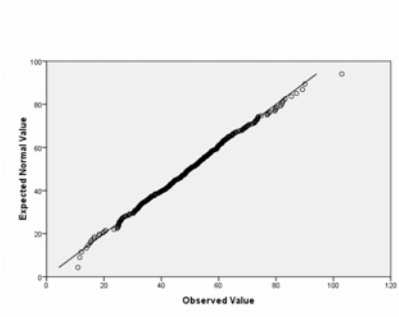




Γράφημα 1Γ. Ιστόγραμμα κατανομής συχνοτήτων των επιπέδων υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης-3 (μgSe/L) στον συνολικό πληθυσμό.

Διάγραμμα Q-Q (αντίστοιχα).





Γράφημα 1Δ. Ιστόγραμμα κατανομής συχνοτήτων των επιπέδων σεληνοπρωτεΐνης P(μgSe/L) στον συνολικό πληθυσμό.

Διάγραμμα Q-Q (αντίστοιχα)

Δημοσιεύσεις & Εργασίες παρουσιασμένες σε επιστημονικά συνέδρια

Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά

Sophia Letsiou, Ying Lu, Tzortzis Nomikos, Smaragdi Antonopoulou, Spiros A. Pergantis "High Throughput Quantification of Selenium in Individual Serum Proteins from a Healthy Human Population Using High-Performance Liquid Chromatography On-line with Isotope Dilution Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry. Proteomics. 2010 Oct;10(19):3447-57

Sophia Letsiou, Tzortzis Nomikos, Demosthenes Panagiotakos, Spiros Pergantis, Elizabeth Fragopoulou, Smaragdi Antonopoulou, ChristosPitsavos, Christodoulos Stefanadis. "Serum Total Selenium Status in Greek Adults and Its Relation to Age. The ATTICA Study Cohort''. Biol Trace Elem Res 2009, 128(1): 8-17.

Sophia Letsiou, Tzortzis Nomikos, Demosthenes Panagiotakos, Spiros Pergantis, Elizabeth Fragopoulou, Smaragdi Antonopoulou, Christos Pitsavos, Christodoulos Stefanadis **'**Dietary habits of Greek adults and serum total selenium concentration. The ATTICA study.'' Eur J Nutr. 2010 Apr 13. [Epub ahead of print].

Sophia Letsiou and Spiros Pergantis "Analytical methods for determination and speciation of selenium in human plasma-A review'' Analytical Chimica Acta (On process)

Εργασίες παρουσιασμένες σε επιστημονικά συνέδρια

1. 2nd National Conference of Atherosclerosis, Athens, Greece 30/11-1 Dec 2007(Poster)
2. Federation of European Biochemical Societies (FEBS) International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), 28-3July 2008, Athens (poster)
3. Conference of Oxidative stress, Ioannina, Greece, Sept 2008 (Poster)
4. The 12th Workshop on Progress in Analytical Methodologies for Trace Metal Speciation (TRACESPEC 2009), 15-18 September, 2009, Mainz, Germany (poster)
5. 60th National conference of Biochemistry and Molecular Biology Athens, Greece, 20-22 November 2009 (Poster)
6. 3rd National Conference of Atherosclerosis, Athens, Greece 4/5-Dec 2009 (Poster)