

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«Ανάπτυξη Νέων Αναλυτικών Τεχνικών Υγρής
Χρωματογραφίας Συζευγμένης με Φασματομετρία
Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος για την
Μεταλλοπρωτεωμική Ανάλυση Περιβαλλοντικών και
Βιολογικών Δειγμάτων»**

ΠΑΝΑΓΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Σ. Α. ΠΕΡΓΑΝΤΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2021

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
MASTERS OF CHEMISTRY PROGRAMME



MASTER THESIS

«Development of New Analytical Techniques of Liquid Chromatography Coupled With Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for the Metalloproteomic Analysis of Environmental and Biological Samples»

PANAGOU GEORGIA

MASTER THESIS SUPERVISOR: S. A. PERGANTIS

HERAKLION 2021

Στη μητέρα μου...

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Περγαντής Σπυρίδων

Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Λυδάκης – Σημαντήρης Νικόλαος

*Καθηγητής Τμήματος Μηχανικών Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος,
Ελληνικό Μεσογειακό Πανεπιστήμιο*

Μήλιος Κωνσταντίνος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την αποδοχή μου στο Γενικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα καθώς και για την υλικοτεχνική υποστήριξη. Επίσης, ευχαριστώ θερμά το Ίδρυμα Ωνάση, το οποίο στήριξε τις μεταπτυχιακές μου σπουδές τιμώντας με την υποτροφία του.

Εν συνεχεία, ευχαριστώ ειλικρινά τον υπεύθυνο καθηγητή μου κ. Σπύρο Α. Περγαντή για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου την συγκεκριμένη εργασία. Εκτιμώ βαθύτατα τον χρόνο που αφιέρωσε για να συζητήσει μαζί μου τις ιδέες και τους προβληματισμούς που προέκυπταν καθόλη τη διάρκεια της και τον ευχαριστώ πολύ για την πολύτιμη στήριξη και καθοδήγηση του.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου μας, Μάνο Μαυράκη για τις πολύ εποικοδομητικές συζητήσεις που είχαμε και για όλες τις συμβουλές του. Παράλληλα, ευχαριστώ εκείνον αλλά και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το όμορφο κλίμα που διατηρήσαμε τόσο εντός όσο και εκτός του εργαστηρίου.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή κ. Νικόλαο Λυδάκη-Σημαντήρη για την παροχή των κυτταρικών δειγμάτων που αναλύθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας και για τις σημαντικές συμβουλές του σε σχέση με την διαχείριση τους. Αντίστοιχα, ευχαριστώ και τον καθηγητή κ. Τζώρτζη Νομικό, για την παροχή των δειγμάτων ορού ανθρώπινου αίματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και πάλι τον κ. Λυδάκη αλλά και τον καθηγητή κ. Μήλιο, που δέχθηκαν να αποτελέσουν μέλη της τριμελούς επιτροπής, για την αξιολόγηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τους φίλους μου Μαριλίζα Ζαντιώτη και Μιχάλη Χρονάκη για την αγάπη και την υποστήριξη τους, η οποία ήταν πολύτιμη για εμένα αυτά τα δύο χρόνια. Και φυσικά την οικογένειά μου, τον αδερφό μου Μανώλη και την μαμά μου Βερονίκη, η οποία παρότι δεν βρίσκεται πια στη ζωή, είναι εκείνη που μου έμαθε να προσπαθώ για τους στόχους μου και να επιμένω μέχρι να τους επιτύχω.

Περίληψη

Οι μεταλλοπρωτεΐνες αποτελούν περίπου το ένα τρίτο των πρωτεϊνών που συναντώνται στα βιολογικά συστήματα. Η παρουσία τους είναι καθοριστικής σημασίας για βασικές λειτουργίες των κυττάρων αφού στην πλειονότητα τους συνιστούν ένζυμα και μέρος των μηχανισμών ομοιόστασης των μετάλλων.¹ Οι μεταλλοπρωτεωμικές αναλύσεις αποτελούν ένα εργαλείο για τον δομικό και λειτουργικό χαρακτηρισμό των μεταλλοπρωτεϊνών, ενώ επιτρέπουν και τον ποσοτικό τους προσδιορισμό, συμβάλλοντας στην καλύτερη κατανόηση διαφόρων διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στα βιολογικά συστήματα.²

Η χρήση των μεθόδων υγρής χρωματογραφίας συζευγμένων με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (HPLC-ICP-MS) εμφανίζει σημαντική αύξηση τις τελευταίες δεκαετίες, λόγω της πληθώρας πλεονεκτημάτων που διαθέτουν.³ Ειδικότερα, η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού και η χρωματογραφία χημικής συγγένειας, καθιστούν δυνατό τον διαχωρισμό των μεταλλοπρωτεϊνών σε ήπιες συνθήκες επιτρέποντας τη διατήρηση της δομής των πρωτεϊνών και αποτρέποντας τις απώλειες των περιεχόμενων μετάλλων. Παράλληλα, το ICP-MS επιτρέπει την ανίχνευση των μετάλλων, στα πολύπλοκα βιολογικά δείγματα, με υψηλή ευαισθησία προσφέροντας και τη δυνατότητα πολυστοιχειακής ανάλυσης.^{1,4,5}

Στην παρούσα εργασία αναπτύσσεται μέθοδος χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού (HiTrap Desalting HP) και χημικής συγγένειας (HiTrap Blue-HP) συζευγμένη με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS) για την ανάλυση μεταλλοπρωτεϊνών που περιέχουν Mg, Ca, Se, Fe, Co, Ni ή και Zn σε δείγματα ορού ανθρώπινου αίματος. Σε αυτές τις αναλύσεις, η χρήση του universal cell ως κυψελίδα συγκρούσεων με ροή αερίου He 2 ml/min πλεονεκτεί έναντι της χρήσης της ως κυψελίδα αντίδρασης με ροή αερίου O₂ 1,5 ml/min. Από την ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος διαφορετικών αθλητών, για την πλειονότητα των στοιχείων, προκύπτουν δύο διαφορετικά χρωματογραφικά προφίλ. Σε δείγματα που ελήφθησαν για τον ίδιο αθλητή πριν και μετά την άσκηση παρατηρούνται κυρίως μεταβολές στη συγκέντρωση των μετάλλων στα διάφορα κλάσματα, υποδεικνύοντας την επίδραση της άσκησης στις μορφές και τις συγκεντρώσεις των μετάλλων στον ορό αίματος. Παράλληλα, πραγματοποιείται προσπάθεια αντιστοίχισης των κλασμάτων, που προκύπτουν για κάθε μέταλλο, με τις μεταλλοπρωτεΐνες που περιέχονται στον ορό αίματος σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.

Επιπλέον, στην παρούσα εργασία αναπτύσσεται μέθοδος χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού συζευγμένη με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (SEC-ICP-MS) για την ταχεία ανάλυση σεληνοπρωτεϊνών στα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii*. Η μέθοδος αξιοποιείται για την μελέτη των μορφών του σεληνίου στα κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων SeO₄²⁻. Τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων λύσης των κυττάρων υποδεικνύουν την πρόσληψη ποσότητας Se από τα κύτταρα. Μέρος της ποσότητας αυτής εντάσσεται σε μακρομόρια (>5 kDa) έως ότου οι συγκεντρώσεις του Se(VI) στην καλλιέργεια υπερβούν τα 100 μM. Η υπόλοιπη ποσότητα Se υφίστανται σε ανόργανη ή και οργανική μορφή χαμηλού μοριακού βάρους (<5 kDa). Συγκρίνοντας την ολική συγκέντρωση του Se όπως προέκυψε από τη μέθοδο SEC-ICP-MS και τη συμβατική

μέθοδο ανάλυσης (Conventional ICP-MS), προκύπτει ικανοποιητική ανάκτηση του Se (>96%)

Abstract

Metalloproteins make up almost one third of all proteins in biological systems. Their role is crucial for numerous biological functions, since the majority of them are enzymes contributing to the homeostatic mechanisms of metals.¹ Metalloproteomics is a useful tool for the structural and functional characterization of metalloproteins, while also making their quantification possible. These characterizations contribute to the better understanding of numerous processes that occur in biological systems.²

Liquid chromatography techniques coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS), have been widely used, in the past few decades, for the metalloproteins analysis due to their numerous advantages.³ More specifically, size exclusion chromatography and affinity chromatography enable the separation of metalloproteins in mild conditions, which prevents the denaturation of the proteins and therefore the loss of metal content. Moreover, ICP-MS allows for multielemental analysis in complicated biologic matrices, characterized by high sensitivity.^{1,4,5}

This thesis consists of the development of a technique that combines size exclusion chromatography (HiTrap Desalting HP) and affinity chromatography (HiTrap Blue-HP) coupled online with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the analysis of metalloproteins which contain Mg, Ca, Se, Fe, Co, Ni or/and Zn in human blood serum samples. In these analyses, the use of universal cell as a collision cell (He, 2 ml/min) has an advantage over its use as a reaction cell (O₂, 1.5 ml/min). From the analysis of human blood serum samples of different athletes, for the majority of metals, two chromatographic profiles emerge.

In samples of the same athlete, that had been taken before and after the exercising, are changes have been mainly observed in the concentration of metals, which indicates that exercising affects the form and concentration of metals in human blood serum. Moreover, each metal fraction has been matched with metalloproteins found in human serum, in accordance with bibliography.

In addition, this thesis includes the development of a size exclusion chromatography technique coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry for the rapid analysis of selenoproteins in *Chlamydomonas reinhardtii* cells. This technique is used for the study of different selenium forms in cells that have been cultivated in the presence of different concentrations of SeO₄²⁻. The chromatographs, of the lysates of each cell culture, indicate the accumulation of selenium by the cells. Part of the accumulated Se is incorporated in macromolecules (>5 kDa), until the concentration of Se(VI) exceeds 100 μM. The rest of Se(VI) quantity can be found in the cells in inorganic or low molecular weight organic forms (<1 kDa). Comparing the total concentration of Se, measured with SEC-ICP-MS, with the respective values from Conventional ICP-MS analysis, a high recovery of >96% is obtained.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή	3
1.1 Μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση	3
1.2 Μεταλλοπρωτεΐνες	3
1.2.1 Μεταλλοπρωτεΐνες και metal – binding πρωτεΐνες	3
1.2.2 Κύριες λειτουργίες μεταλλοπρωτεϊνών	4
1.3 Μέταλλα και μεταλλοπρωτεΐνες σε βιολογικά – περιβαλλοντικά δείγματα	4
1.3.1 Ορός ανθρώπινου αίματος.	4
1.3.2 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	7
1.4 Αναλυτικές τεχνικές μεταλλοπρωτεωμικής ανάλυσης	9
1.4.1 Υπάρχουσες τεχνικές μεταλλοπρωτεωμικής ανάλυσης.....	9
1.4.2 Δυσκολίες μεταλλοπρωτεωμικών αναλύσεων	10
1.5 Ανάπτυξη νέων μεθόδων χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού και χρωματογραφίας συγγένειας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος και αρχές λειτουργίας των επιμέρους τμημάτων	10
1.5.1 Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (SEC)	11
1.5.2 Χρωματογραφία συγγένειας (AF).....	13
1.5.3 Φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS) ..	14
1.5.4 Εφαρμογές αναλυτικών τεχνικών SEC και AF συζευγμένες με ICP-MS .	17
1.6 Σκοπός της εργασίας	17
Κεφάλαιο 2: Πειραματικό Μέρος	19
2.1 Αντιδραστήρια.....	19
2.2 Οργανολογία - Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	20
2.3 Δειγματοληψία και συντήρηση δειγμάτων.....	20
2.3.1 Δείγματα ορού αίματος αθλητών.....	20
2.3.2 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	21
2.4 Μέτρα εργαστηριακής ασφάλειας	22
2.5 Ανάπτυξη μεθόδων dcSEC-AF-ICP-MS και SEC-ICP-MS.....	22
2.5.1 Προετοιμασία απαραίτητων διαλυμάτων.....	23
2.5.2 Προετοιμασία δειγμάτων προς ανάλυση	25
2.5.3 Εφαρμογή των μεθόδων dcSEC-AF-ICP-MS και SEC-ICP-MS.	26
Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα – Συζήτηση	33
3.1 Μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος.	33
3.1.1 Mg – αλβουμίνη και Ca – αλβουμίνη.....	33

3.2	Σύγκριση επίδρασης των διαφορετικών λειτουργιών του της καθολικής κυψελίδας (universal cell) στην μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος.....	43
3.2.1	Σύγκριση Συμβατικής Λειτουργίας, Λειτουργίας με He και Λειτουργίας με O ₂ για την ανίχνευση μετάλλων.	43
3.2.2	Ανίχνευση πρωτεϊνών μέσω της παρουσίας του θείου.....	48
3.2.3	He mode: Διερεύνηση επίδρασης διαφορετικών ροών He	51
3.3	Αναλύσεις δειγμάτων ορού αίματος αθλητών	54
3.3.1	Μαγνήσιο.....	55
3.3.2	Ασβέστιο.....	58
3.3.3	Σελήνιο	61
3.3.4	Σίδηρος.....	64
3.3.5	Κοβάλτιο.....	67
3.3.6	Χαλκός	70
3.3.7	Νικέλιο	73
3.3.8	Ψευδάργυρος	78
3.4	Πρότυπα διαλύματα και καμπύλες βαθμονόμησης	83
3.4.1	Προβλήματα χρήσης πρότυπων πολυστοιχειακών ιοντικών διαλυμάτων.	83
3.4.2	Καμπύλες βαθμονόμησης: Mg, Ca, Se, Fe και Cu	84
3.4.3	Καμπύλες βαθμονόμησης: Zn, Co και Ni.	85
3.5	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	87
3.5.1	Ποιοτική μελέτη μορφών σεληνίου συναρτήσει της συγκέντρωσης Se(VI) στο περιβάλλον καλλιέργειας.	87
3.5.2	Ποσοτικοποίηση κλασμάτων σεληνίου.....	92
3.5.3	% Ανάκτηση σεληνίου.....	94
Κεφάλαιο 4:	Συμπεράσματα	95
Κεφάλαιο 5:	Βιβλιογραφικές αναφορές	98
Κεφάλαιο 6:	Παραρτήματα	105

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση

Η μεταλλομική ανάλυση αποτελεί μια από τις κύριες προσεγγίσεις που ακολουθείται για τον προσδιορισμό του μεταβολισμού, της βιοδιαθεσιμότητας και της τοξικότητας ενός μετάλλου σε βιολογικά και περιβαλλοντικά συστήματα και περιλαμβάνει την ποιοτική και ποσοτική μελέτη του συνόλου των μετάλλων και των μεταλλοειδών ενός κυττάρου ή ιστού. Η προσέγγιση αυτή δεν είναι επαρκής, διότι τα μέταλλα^a, στην πλειονότητα των δειγμάτων, δεν υφίστανται μόνο ως ελεύθερα ιόντα, αλλά αποτελούν και μέρος μεγαλύτερων μορίων, όπως είναι οι πρωτεΐνες.^{4,3} Υπολογίζεται πως πάνω από το 40% του συνόλου των πρωτεϊνών, διαθέτουν μεταλλικά ιόντα στη δομή τους και επιτελούν πληθώρα λειτουργιών στα κύτταρα, επομένως είναι απαραίτητη η ύπαρξη αναλυτικών τεχνικών που να επιτρέπουν την μελέτη τους.⁶

Η μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση αποτελεί ένα συνδυασμό της μεταλλομικής και της πρωτεωμικής ανάλυσης, η οποία περιλαμβάνει την μελέτη του συνόλου των πρωτεϊνών, που εκφράζονται από το γονιδίωμα ενός οργανισμού.^{4,3} Ειδικότερα, η μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση αποτελεί τη μελέτη των μεταλλοπρωτεϊνών και των πρωτεϊνών που δύναται να προσδέσουν μέταλλα (metal-binding proteins), παρέχοντας πληροφορίες τόσο για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών αυτών, όσο και για τις αλληλεπιδράσεις μετάλλου - πρωτεΐνης.^{1,7}

Λόγω της αφθονίας και της σημασίας των μεταλλοπρωτεϊνών για τους διάφορους οργανισμούς, η αξιοποίηση των μεταλλοπρωτεωμικών αναλύσεων έχει σημειώσει σημαντική αύξηση τις τελευταίες δεκαετίες στον τομέα της Βιοχημείας, της Κλινικής Χημείας, της Μοριακής Βιολογίας, της Τοξικολογίας καθώς και των Περιβαλλοντικών Επιστημών.⁸

1.2 Μεταλλοπρωτεΐνες

1.2.1 Μεταλλοπρωτεΐνες και metal – binding πρωτεΐνες

Οι μεταλλοπρωτεΐνες είναι πρωτεΐνες, για την λειτουργικότητα των οποίων απαιτείται η πρόσδεση ενός ή περισσότερων μετάλλων.³ Τα μέταλλα αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες μέσω ιοντικών αλληλεπιδράσεων με αρνητικά φορτισμένα ή πολικά αμινοξέα, εντάσσονται σε προσθετικές οργανικές ομάδες των πρωτεϊνών ή βρίσκονται ομοιοπολικά προσδεμένα σε αυτές (Se).⁵ Γενικά, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μετάλλου – πρωτεΐνης χαρακτηρίζονται από υψηλή χημική συγγένεια.⁹

Αντιθέτως, στις metal-binding πρωτεΐνες το μέταλλο δεν συμβάλλει στην λειτουργία τους και η συμπλοκοποίηση τους πραγματοποιείται λόγω θερμοδυναμικής ισορροπίας στο σύστημα.⁵ Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μετάλλου – πρωτεΐνης είναι ασθενείς, με αποτέλεσμα το μέταλλο να απομακρύνεται εύκολα από την πρωτεΐνη.

^a Ο όρος μέταλλα, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, αναφέρεται και στα μεταλλοειδή στοιχεία.

Στην παρούσα εργασία, όλες οι πρωτεΐνες που διαθέτουν προσδεμένα μέταλλα ή αλληλεπιδρούν με αυτά αναφέρονται με τον όρο «μεταλλοπρωτεΐνες».

1.2.2 Κύριες λειτουργίες μεταλλοπρωτεϊνών

Οι μεταλλοπρωτεΐνες, που φέρουν την πλειονότητα των μετάλλων στα βιολογικά δείγματα, αποτελούν πρωτεΐνες μεταφοράς και αποθήκευσης. Οι μεταλλοπρωτεΐνες αυτές έχουν σημαντικό ρόλο στην ομοίωση των μετάλλων στους οργανισμούς και συχνά είναι πλούσιες σε κυστεΐνη.³ Παράδειγμα μεταλλοπρωτεΐνης – μεταφορέα σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα αποτελεί η Cu - ATPάση μεταφορέας,¹⁰ ενώ χαρακτηριστική μεταλλοπρωτεΐνη – αποθήκευσης του σιδήρου στον ανθρώπινο οργανισμό είναι η φερριτίνη.¹¹

Μεταλλοπρωτεΐνες αποτελούν και πολλά ένζυμα, τα οποία είναι σημαντικά για ποικίλες βιολογικές διεργασίες, όπως η φωτοσύνθεση και η αναπνοή. Τα μέταλλα, στις μεταλλοπρωτεΐνες, δύναται να συμμετέχουν άμεσα στην καταλυτική διαδικασία, να λειτουργούν ως γεφυρωτική ομάδα σύνδεσης του υποστρώματος με την πρωτεΐνη ή/και να σταθεροποιούν την δομή του ενζύμου καθιστώντας το ενεργό.^{5,11} Τα πιο συχνά απαντώμενα μέταλλα σε οξειδοαναγωγικά ένζυμα είναι ο σίδηρος (Fe), το μαγγάνιο (Mn), το κοβάλτιο (Co), το μολυβδαίνιο (Mo), ο χαλκός (Cu) και το νικέλιο (Ni), ενώ σε μη-οξειδοαναγωγικά ένζυμα το μαγνήσιο (Mg) και ο ψευδάργυρος (Zn).¹² Χαρακτηριστικά παραδείγματα μεταλλοπρωτεϊνών-ενζύμων αποτελούν η αιμογλοβίνη, η οποία περιέχει ιόντα Fe ενταγμένα στα μόρια της αίμης και είναι υπεύθυνη για την μεταφορά του οξυγόνου, από τους πνεύμονες στους ιστούς κατά την αναπνοή,¹³ και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο, το οποίο συναντάται σε ποικίλους οργανισμούς και διαθέτει σεληνοκυστεΐνη στο ενεργό του κέντρο.¹⁴

Τέλος, οι μεταλλοπρωτεΐνες συμβάλλουν σημαντικά στο μηχανισμό προστασίας ορισμένων οργανισμών, όπως τα φυτά και τα βακτήρια, έναντι του στρες λόγω υψηλών συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων (metal stress). Οι αποπρωτεΐνες παράγονται στα κύτταρα, με στόχο τη δέσμευση της περίσσειας του εκάστοτε μετάλλου στο κυτταρόπλασμα. Παράδειγμα τέτοιων μεταλλοπρωτεϊνών στα θηλαστικά και στα φυτά αποτελούν οι μεταλλοθειονίνες και φυτοχελατίνες, αντίστοιχα.^{15,16}

1.3 Μέταλλα και μεταλλοπρωτεΐνες σε βιολογικά – περιβαλλοντικά δείγματα

1.3.1 Ορός ανθρώπινου αίματος.

Ο ορός ανθρώπινου αίματος αποτελεί το υγρό που απομένει από την απομάκρυνση των ερυθρών και λευκών κυττάρων καθώς και των πηκτικών παραγόντων από το αίμα. Ο ορός ανθρώπινου αίματος περιέχει νερό, ορισμένες ορμόνες, μέταλλα καθώς και (μέταλλο)πρωτεΐνες. Η συγκέντρωση του ορού αίματος σε πρωτεΐνες είναι υψηλή και κυμαίνεται μεταξύ 60-80mg/ml, το 80% του οποίου συνίσταται από την αλβουμίνη και ορισμένες γλοβουλίνες.¹⁷ Η αλβουμίνη διαθέτει σημαντικό ρόλο στην ομοίωση των μεταλλικών ιόντων στον ανθρώπινο οργανισμό, συμμετέχοντας στην μεταφορά και την αποθήκευσή τους.

Το υψηλό πρωτεϊνικό περιεχόμενο του ορού και η μη επεμβατική μέθοδος λήψης του από τους ανθρώπους, το καθιστά συχνή επιλογή για τις μελέτες εύρεσης (μέταλλο)πρωτεϊνών - βιοδείκτες για τη πρόγνωση και διάγνωση ποικίλων ασθενειών, όπως ο καρκίνος,¹⁸ ο διαβήτης¹⁹ ακόμη και οι ψυχικές διαταραχές.²⁰

Παρακάτω παρατίθενται οι λειτουργίες ορισμένων από τα σημαντικότερα μέταλλα που συναντώνται στον ανθρώπινο οργανισμό, οι κύριες μεταλλοπρωτεΐνες αυτών, οι οποίες ανιχνεύονται στο ορό αίματος, καθώς και η συσχέτισή τους με διαταραχές της ανθρώπινης υγείας.

1.3.1.1 Ασβέστιο (Ca)

Το Ca αποτελεί το πιο άφθονο μέταλλο στον ανθρώπινο οργανισμό, διαθέτει σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση εντός και εκτός των κυττάρων και είναι απαραίτητο για την σωστή λειτουργία των πηκτικών παραγόντων και του νευρομυϊκού συστήματος.²¹

Αντίστοιχα, το Ca αποτελεί ένα από τα δύο πιο άφθονα μέταλλα στο αίμα, όπου περίπου το 40% της συνολικής του ποσότητας βρίσκεται προσδεμένο με πρωτεΐνες. Ειδικότερα, το 80% αλληλεπιδρά ασθενώς με την αλβουμίνη, ενώ το 20% αλληλεπιδρά με γλοβουλίνες. Η υπόλοιπη ποσότητα του Ca βρίσκεται προσδεμένο με μικρότερα μόρια ή με την μορφή ελεύθερων ιόντων (Ca^{2+}).²²

Το ελεύθερο ιοντικό Ca αποτελεί την βιολογικά ενεργή μορφή του ασβεστίου, επομένως τα επίπεδα του στο αίμα αποτελούν τον πιο κατάλληλο δείκτη της κατάστασης του μετάλλου στον οργανισμό.²³ Σημαντικές αποκλίσεις της ποσότητας Ca, από τα φυσιολογικά επίπεδα, συνδέονται με ποικίλες ασθένειες όπως η νεφρική ανεπάρκεια, ο παραθυροειδισμός και ο καρκίνος.²¹

1.3.1.2 Μαγνήσιο

Το Mg αποτελεί το τέταρτο πιο άφθονο μέταλλο στον ανθρώπινο οργανισμό και περίπου το 45% της συνολικής του ποσότητας βρίσκεται ενδοκυτταρικά. Αποτελεί συμπαραγοντα για μεγάλο αριθμό ενζύμων, συνεπώς είναι απαραίτητο για βασικές λειτουργίες του οργανισμού όπως η πρωτεϊνοσύνθεση, η γλυκόλυση και η οξειδωτική φωσφορυλίωση.²¹

Στο αίμα περιλαμβάνεται περίπου το 1% της ποσότητας του συνολικού Mg, από το οποίο το 55% βρίσκεται σε ελεύθερη ιοντική μορφή (Mg^{2+}), το 15% είναι προσδεμένο με ανιόντα, ενώ το 30% βρίσκεται προσδεμένο σε πρωτεΐνες, όπως η αλβουμίνη και οι γλοβουλίνες.²¹

Διαταραχές της συγκέντρωσης του Mg στο αίμα οδηγούν σε ασθένειες, όπως η υπερμαγνησαιμία και η υπομαγνησαιμία, οι οποίες έχουν συσχετιστεί με άλλες ασθένειες, όπως η υπέρταση και ο διαβήτης.

1.3.1.3 Σελήνιο (Se)

Η συμμετοχή του Se στις διάφορες βιολογικές διεργασίες επιτελείται μέσω των μεταλλοπρωτεϊνών, στην πλειονότητα των οποίων υφίσταται στην περιοχή του ενεργού κέντρου, με την μορφή σεληνοκουστεΐνης. Αντίστοιχα, το Se ανιχνεύεται στον ορό ανθρώπινου αίματος κυρίως με τη μορφή τριών σεληνοπρωτεϊνών: την Se-

αλβουμίνη, την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και την σεληνοπρωτεΐνη-P, στην οποία περιέχεται και σε μεγαλύτερη ποσότητα.²⁴

Στον ανθρώπινο οργανισμό υφίστανται 25 γονίδια που κωδικοποιούν σεληνοπρωτεΐνες, οι οποίες χαρακτηρίζονται για την αντιοξειδωτική τους δράση.²⁵ Η έλλειψη Se έχει συσχετιστεί με ασθένειες όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η νόσος Alzheimer, αλλά και ο καρκίνος.²⁶

1.3.1.4 Σίδηρος (Fe)

Ο Fe αποτελεί ένα απαραίτητο μέταλλο για τα βιολογικά συστήματα, καθώς συμμετέχει στην διαδικασία της αναπνοής, του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της σύνθεσης του DNA. Αυξημένα επίπεδα ελεύθερων ιόντων Fe στους οργανισμούς είναι τοξικά, επομένως η ομοιόσταση του Fe ελέγχεται αυστηρά μέσω παραγωγής πρωτεϊνών δέσμευσης, μεταφοράς και αποθήκευσής του.²⁷

Η πλειονότητα του Fe στον ορό αίματος εντοπίζεται στην τρανσφερίνη, η οποία είναι υπεύθυνη για την μεταφορά του στα κύτταρα, αλλά και στην φερριτίνη. Ποσότητες Fe δύναται να αλληλεπιδρούν και με μόρια αλβουμίνης.^{28,29}

Διαταραχές στα επίπεδα της φερριτίνης και άλλων μεταλλοπρωτεϊνών του Fe έχουν συσχετιστεί με την πρόγνωση και την διάγνωση ορισμένων ασθενειών όπως η αναιμία, ηπατίτιδα C και ο καρκίνος του μαστού.³⁰⁻³²

1.3.1.5 Κοβάλτιο (Co)

Το Co αποτελεί ένα σημαντικό συμπράγοντα της βιταμίνης B12 και ορισμένων μεταβολικών ενζύμων, στα οποία λειτουργεί ως οξειδοαναγωγικό ενεργό κέντρο. Επιπλέον, στα θηλαστικά είναι απαραίτητο για τον σχηματισμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων.¹²

Στον ορό ανθρώπινου αίματος το Co υφίσταται κυρίως συμπλοκοποιημένο με πρωτεΐνες ή ελεύθερα αμινοξέα. Ειδικότερα, εμφανίζει σχετικά μεγάλη χημική συγγένεια με την η αλβουμίνη και την κυανοκοβαλαμίνη. Η ποσότητα ελεύθερων ιόντων Co (Co^{2+}) διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα, διότι όταν βρίσκονται σε περίσσεια συνδέονται με ποικίλα βιομόρια και υποδοχείς κυττάρων με αποτέλεσμα να οδηγούν σε τοξικότητα.³³

Αυξημένες ποσότητες ελεύθερου Co^{2+} σε δείγματα ορού αίματος δύναται να συσχετιστούν με οξείες φλεγμονώδεις ασθένειες και κατ' επέκταση με χρόνιες παθήσεις.³³

1.3.1.6 Χαλκός (Cu)

Ο Cu αποτελεί συμπράγοντα πολλών ενζύμων, απαραίτητων για βασικές βιολογικές διεργασίες των κυττάρων, όπως ο πολλαπλασιασμός και η σηματοδότηση. Αντίστοιχα, στον ανθρώπινο οργανισμό, συμβάλλει στο μεταβολισμό των συνδετικών ιστών και στη σύνθεση της αιμογλοβίνης. Αντίστοιχα με το Fe, η περίσσεια ποσότητα Cu έχει τοξική δράση, συνεπώς η ομοιόσταση του στα βιολογικά συστήματα ελέγχεται μέσω ποικίλων μηχανισμών.³⁴

Στον ορό αίματος η πλειονότητα του Cu είναι συνδεδεμένη με την ceruloplasmin, ενώ σημαντικές ποσότητες ανιχνεύονται στην αλβουμίνη, στην transcuprein και σε ελεύθερα αμινοξέα.^{11,28,35}

Ο μεταβολισμός και οι μορφές του Cu στο αίμα έχουν συσχετιστεί με ασθένειες, όπως η ασθένεια Wilson και η ασθένεια Menkes.^{36,37}

1.3.1.7 Ψευδάργυρος (Zn)

Ο Zn αποτελεί το δεύτερο πιο άφθονο μέταλλο στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.³⁸ Υπολογίζεται πως το 10% των πρωτεϊνών περιέχουν ένα ή περισσότερα ιόντα Zn και συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διαδικασίες όπως η ρύθμιση της οξειδοαναγωγής και της δέσμευσης του άνθρακα εντός των κυττάρων. Σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι τοξικός, διότι δρα ανταγωνιστικά για τις θέσεις πρόσδεσης άλλων ιόντων όπως ο Fe^{2+} , το Co^{2+} και το Mn^{2+} . Ο μεταβολισμός του Zn περιλαμβάνει τη υπερέκφραση πρωτεϊνών δέσμευσης του Zn^{2+} για τον περιορισμό της περισσειας ποσότητας του.

Η πλειονότητα του Zn (75-90%)³⁹ στον ορό αίματος συγκρατείται από τα μόρια της αλβουμίνης, μικρή ποσότητα αλληλεπιδρά ισχυρά με την α_2 -μακρογλοβουλίνη, ενώ αλληλεπιδρά και με ελεύθερα αμινοξέα.³⁵

Ο Zn συμμετέχει στην βιοσύνθεση και την έκκριση της ινσουλίνης, συσχετίζοντας τον άμεσα με ασθένειες όπως ο διαβήτης τύπου 2, ενώ είναι πιθανό να συμβάλλει και στην ανάπτυξη της νόσου Alzheimer.⁴⁰

1.3.1.8 Νικέλιο (Ni)

Το Ni, σε μικρές συγκεντρώσεις, αποτελεί ένα απαραίτητο μέταλλο για τους βιολογικούς οργανισμούς. Συμμετέχει στην ρύθμιση ορισμένων μεταλλοενζύμων, συμβάλλει στην παραγωγή και τη λειτουργία ορισμένων ορμονών και είναι απαραίτητο για το μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων στον ανθρώπινο οργανισμό. Σε υψηλές συγκεντρώσεις το Ni έχει τοξική δράση.⁴¹

Στον ορό ανθρώπινου αίματος τα ιόντα Ni (Ni^{2+}) βρίσκονται συνδεδεμένα με την αλβουμίνη ή την nickeloplasmin (πρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους), ενώ μικρότερες ποσότητες συνδέονται με ελεύθερα αμινοξέα, όπως η L-ιστιδίνη.⁴²

Η τοξικότητα του Ni οδηγεί σε ποικίλα προβλήματα υγείας, όπως η δηλητηρίαση του νεφρικού και καρδιαγγειακού συστήματος, ενώ έχει συσχετιστεί και με την καρκινογένεση.⁴³

1.3.2 ***Chlamydomonas reinhardtii***

Το *Chlamydomonas reinhardtii* αποτελεί ένα μονοκύτταρο πράσινο φύκη και χρησιμοποιείται ως πρότυπος οργανισμός για την μελέτη βασικών βιολογικών διαδικασιών, όπως η φωτοσύνθεση και η αφομοίωση του αζώτου, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί και για τη διεξαγωγή γενετικών μελετών.⁴⁴ Ο κυτταρικός μεταβολισμός των *C. reinhardtii*, σε σχέση με την καλλιέργειά τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μετάλλων έχει μελετηθεί εκτενώς,⁴⁵⁻⁴⁸ ενώ το ενδιαφέρον έχει στραφεί και στην

επίδραση των μετάλλων αυτών στο σύνολο των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των μεταβολιτών των κυττάρων.⁴⁹⁻⁵²

Σε κυτταρικό επίπεδο, η παρουσία μετάλλων σε επίπεδα υψηλότερα του βέλτιστου ή βαρέων μετάλλων, τα οποία είναι τοξικά ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις, δύναται να προκαλέσουν διαταραχές στην ισορροπία του κυττάρου. Ειδικότερα, είναι πιθανό να προκαλέσουν αντικατάσταση των μετάλλων, που υφίστανται φυσιολογικά στις μεταλλοπρωτεΐνες, προκαλώντας οξειδωτικό στρες και πληθώρα άλλων προβλημάτων. Ο μηχανισμός άμυνας των ευκαρυωτικών κυττάρων, όπως τα *Chlamydomonas reinhardtii*, έναντι στην αρνητική επίδραση της περίσσειας μετάλλων περιλαμβάνει την υπερέκφραση μορίων, όπως τα οργανικά οξέα, τα αμινοξέα και τα πεπτιδία, τα οποία δύναται να προσδέσουν την περίσσεια μετάλλων και να συμβάλλουν στην διαχείριση και την απέκκριση τους.⁴⁵

1.3.2.1 Σελήνιο

Τα *C. reinhardtii* διαθέτουν τουλάχιστον 10 είδη σεληνοπρωτεϊνών, με τη σεληνοπρωτεΐνη W (7 kDa) και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (18 kDa) να εντοπίζονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Επιπλέον, τα *C. reinhardtii* συνθέτουν μια χαρακτηριστική για αυτά σεληνοπρωτεΐνη, τη αναγωγάση του σουλφοξειδίου της μεθειονίνης, η οποία φέρει ένα κατάλοιπο σεληνοκουστεΐνης.⁴⁹

Το Se αποτελεί σημαντικό στοιχείο για την ανάπτυξη των *Chlamydomonas reinhardtii*.⁴⁹ Σε μελέτες του μεταβολισμού του Se των *C. reinhardtii*, προέκυψε πως έπειτα από δεκαπεντάωρη έκθεση των κυττάρων σε 30μM Se(IV), το 92% του Se που περιέχεται στα κύτταρα βρίσκεται σε οργανική μορφή (σεληνομεθειονίνη, σεληνοκουστεΐνη). Παράλληλα, περιλαμβάνεται μικρή ποσότητα Se(0). Αντιθέτως, έπειτα από έκθεση των κυττάρων σε 75μM Se(IV), η πλειονότητα του περιεχόμενου Se (83%) υφίσταται με την μορφή κόκκινου Se(0) (δακτύλιοι Se₈), ενώ η ποσότητα οργανικού Se είναι σημαντικά μικρότερη.⁵¹ Από τα παραπάνω, είναι εμφανές πως ο μεταβολισμός και οι μορφές του Se εντός των *Chlamydomonas reinhardtii*, σχετίζονται άμεσα με τη συγκέντρωση του Se στο περιβάλλον καλλιέργειας τους. Περαιτέρω μελέτη της συσχέτισης αυτής, είναι απαραίτητη προκειμένου να γίνει κατανοητός ο μηχανισμός ομοιόστασης του Se, σε αυτόν το οργανισμό.

1.3.2.2 Συμπληρώματα διατροφής

Η ικανότητα των *Chlamydomonas reinhardtii* να παράγουν σεληνοπρωτεΐνες, και παράλληλα να είναι βρώσιμοι και μη τοξικοί για τον άνθρωπο, καθιστούν πιθανή την χρήση τους σε συμπληρώματα διατροφής. Όπως αναφέρεται στην Παράγραφο 1.3.1.3, το Se αποτελεί ένα απαραίτητο στοιχείο για την σωστή λειτουργία του οργανισμού και δύναται να συμβάλει στην πρόληψη του καρκίνου⁵³ και στη βελτίωση της νόσου Alzheimer.⁵⁴ Επομένως, εντάσσεται συχνά σε συμπληρώματα διατροφής για την διασφάλιση της απαραίτητης ημερήσιας πρόσληψής του^b. Στα συμπληρώματα διατροφής, η χρήση του οργανικού Se (σεληνομεθειονίνη, σεληνοκουστεΐνη) πλεονεκτεί έναντι των ανόργανων μορφών του, καθώς η τοξικότητα του είναι χαμηλότερη και η βιοδιαθεσιμότητα είναι σημαντικά υψηλότερη.^{25,26} Επιπλέον, τα *C.reinhardtii*, ως

^b Συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη σεληνίου: 55μg/ημέρα για άτομα άνω των 14 ετών.¹⁰⁷

μικροάλγη, εκτός από τις (μέταλλο)πρωτεΐνες, είναι πλούσια και σε άλλα θρεπτικά συστατικά, όπως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και οι πολυσακχαρίτες.⁵⁵

1.4 Αναλυτικές τεχνικές μεταλλοπρωτεωμικής ανάλυσης

1.4.1 Υπάρχουσες τεχνικές μεταλλοπρωτεωμικής ανάλυσης

Οι μεταλλοπρωτεωμικές αναλύσεις βιολογικών και περιβαλλοντικών δειγμάτων, όπου περιέχεται ποσότητα μεταλλοπρωτεϊνών στις οποίες το μέταλλο δεν είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο, δύναται να έχουν δύο προσεγγίσεις ανάλογα με τον στόχο της εκάστοτε ανάλυσης.⁵

Η πρώτη προσέγγιση περιλαμβάνει την εκχύλιση του πρωτεώματος ενός δείγματος και εν συνεχεία την απομόνωση των πρωτεϊνών που εμφανίζουν χημική συγγένεια με ορισμένα μέταλλα. Οι πρωτεΐνες αυτές ταυτοποιούνται μέσω πρωτεωμικής ανάλυσης. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει τον εντοπισμό των πρωτεϊνών ενός δείγματος που εμφανίζουν χημική συγγένεια για ορισμένα μέταλλα. Όμως, εφόσον δεν διασφαλίζεται η διατήρηση των αλληλεπιδράσεων μετάλλου-πρωτεΐνης όπως υφίστανται στο δείγμα, δεν δύναται να εξαχθούν συμπεράσματα για την κατάσταση της μεταλλοπρωτεΐνης σε αυτό.

Στη δεύτερη προσέγγιση, η οποία και επιλέχθηκε στην παρούσα εργασία, διασφαλίζονται οι αλληλεπιδράσεις μετάλλου-πρωτεΐνης κατά την διαδικασία της εκχύλισης, του διαχωρισμού και της ταυτοποίησης των μεταλλοπρωτεϊνών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη εξαγωγή πληροφοριών για την ποσότητα και το είδος των μετάλλων που αλληλεπιδρούν με τις αντίστοιχες μεταλλοπρωτεΐνες εντός του δείγματος.

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρέως για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών είναι η ηλεκτροφόρηση γέλης, η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς και η υγρή χρωματογραφία.²

Με την χρήση της ηλεκτροφόρησης γέλης, η ανίχνευση των μετάλλων πραγματοποιείται πάνω στη γέλη με την βοήθεια της αυτοραδιογραφίας (απαιτείται η χρήση ραδιοϊσότοπων), της φασματοσκοπίας απορρόφησης ακτίνων Χ, της φασματοσκοπίας φθορισμού ακτίνων Χ ή της αποσύνθεσης με laser (laser ablation) συζευγμένης με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (LA-ICP-MS).⁶

Αντίθετα, για την ανίχνευση των μετάλλων, έπειτα από κλασμάτωση του δείγματος με υγρή χρωματογραφία (HPLC) ή ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς (CE), επιλέγεται η φασματοσκοπία απορρόφησης ακτίνων Χ, η φασματοσκοπία οπτικής εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-OES) ή η φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS).⁶

Η σύζευξη των παραπάνω τεχνικών διαχωρισμού (HPLC, CE) με τεχνικές μοριακής φασματομετρίας, όπως η φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS), επιτρέπει την ταυτοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών. Η χρήση της μοριακής φασματομετρίας για τις μεταλλοπρωτεωμικές αναλύσεις, είναι περιορισμένη διότι συχνά οι συνθήκες που απαιτούνται για τη διατήρηση της δομής και τον διαχωρισμό

των μεταλλοπρωτεϊνών, όπως η σύσταση της κινητής φάσης, δεν συνάδουν με τις απαιτήσεις της τεχνικής.^{2,5}

Λόγω της πολυπλοκότητας των βιολογικών και περιβαλλοντικών δειγμάτων, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη αναλυτική προσέγγιση περιλαμβάνει, αρχικά, τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με τεχνικές υγρής χρωματογραφίας ή ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς και, εν συνεχεία, την ανίχνευση των μεταλλοπρωτεϊνών, μέσω των περιεχόμενων μετάλλων, με έναν ανιχνευτή υψηλής ευαισθησίας, όπως το φασματόμετρο μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS).^{2,5}

1.4.2 Δυσκολίες μεταλλοπρωτεωμικών αναλύσεων

Μία από τις βασικές δυσκολίες που συναντώνται στις μεταλλοπρωτεωμικές αναλύσεις αποτελεί η απομάκρυνση των μετάλλων από τις πρωτεΐνες κατά στα στάδια της ανάλυσης που προηγούνται της ανίχνευσης. Επιμολύνσεις μετάλλων, κατά την προετοιμασία ή την κλασμάτωση του δείγματος δύναται να προκαλέσουν αντικατάσταση του μετάλλου της πρωτεΐνης. Παράλληλα, αλλαγές στο περιβάλλον των μεταλλοπρωτεϊνών, όπως το pH ή η ιοντική ισχύ είναι πιθανό να προκαλέσουν δομικές αλλαγές στις πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των περιεχόμενων μετάλλων.⁴ Επομένως, στις μεταλλοπρωτεωμικές αναλύσεις είναι απαραίτητο οι συνθήκες να διασφαλίζουν την ακεραιότητα της δομής των πρωτεϊνών, προκειμένου να μην διαταραχθούν οι αλληλεπιδράσεις μετάλλου – πρωτεΐνης.

Επιπλέον, η πλειονότητα των μετάλλων βρίσκονται σε μικρή αφθονία στα βιολογικά και περιβαλλοντικά δείγματα,² επομένως για την ανάλυση τους είναι απαραίτητη η επιλογή μιας τεχνικής ανίχνευσης υψηλής ευαισθησίας.

Τέλος, η έλλειψη διαθέσιμων πρότυπων διαλυμάτων για μεγάλο αριθμό μεταλλοπρωτεϊνών, προσδίδει στην ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση τους αρκετές δυσκολίες.

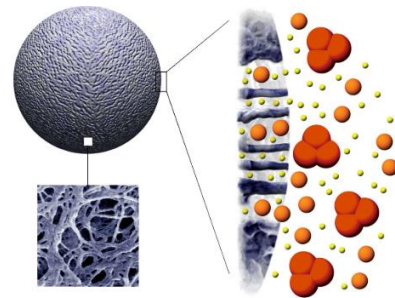
1.5 Ανάπτυξη νέων μεθόδων χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού και χρωματογραφίας συγγένειας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος και αρχές λειτουργίας των επιμέρους τμημάτων

Στην παρούσα εργασία, για την κλασμάτωση των μεταλλοπρωτεϊνών σε δείγματα ορού αίματος και δείγματα λύσης των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* επιλέχθηκαν τεχνικές υγρής χρωματογραφίας, όπως η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (SEC) και η χρωματογραφία χημικής συγγένειας (AF). Αντίστοιχα, η ανίχνευση των μετάλλων πραγματοποιήθηκε με φασματόμετρο επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS).

1.5.1 Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (SEC)

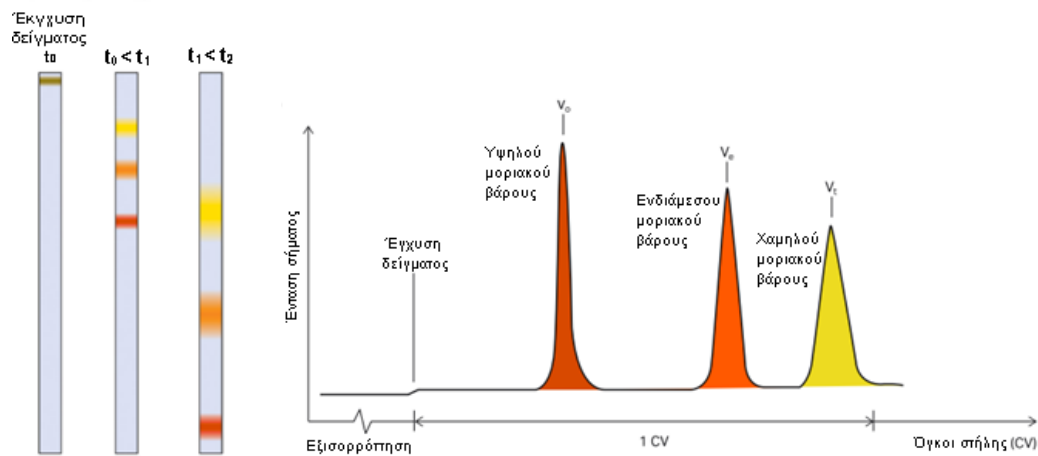
1.5.1.1 Αρχή λειτουργίας

Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού αποτελεί ένα είδος υγρής χρωματογραφίας, όπου ο διαχωρισμός των ουσιών ενός μείγματος βασίζεται στο μέγεθος τους. Η στατική φάση αποτελεί ένα πορώδες υλικό, με μέγεθος πόρων που βρίσκονται εντός ορισμένου εύρους τιμών. Κατά την διέλευση ενός μείγματος από τη χρωματογραφική στήλη, τα μόρια που έχουν μικρότερο μέγεθος από τους πόρους του υλικού, εισέρχονται σε αυτούς, σε αντίθεση με τα μόρια μεγαλύτερου μεγέθους. Τα μόρια ενδιάμεσου μεγέθους έχουν την δυνατότητα να εισάγονται μόνο σε ορισμένο βάθος των πόρων της στατικής φάσης ανάλογα με το μέγεθός τους.



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση σωματιδίου ρητίνης και μεγέθυνση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.¹

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα μικρού μεγέθους μόρια (κίτρινο) να καλύπτουν μεγαλύτερη διαδρομή εντός της στήλης και να απαιτούν μεγαλύτερο όγκο κινητής φάσης για την έκλουσή τους, συγκριτικά με τα ενδιάμεσου (πορτοκαλί) και τα μεγαλύτερου μεγέθους μόρια (κόκκινο), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2.^{56,57}



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση πορείας χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού και προκύπτον χρωματογράφημα. (Μοριακό βάρος μορίων: κίτρινο < πορτοκαλί < κόκκινο)¹

Σε ιδανικές συνθήκες ανάλυσης με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, ο διαχωρισμός των μορίων βασίζεται αποκλειστικά στο μέγεθος τους, επομένως τα μεγάλα μεγέθους μόρια εκλούνται σε όγκο ίσο με τον κενό όγκο (V_0).^c Σε πραγματικές συνθήκες, όμως, υφίσταται προσρόφηση των ουσιών και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μακρομορίων και της στατικής φάσης, με αποτέλεσμα να καθυστερείται η έκλουσή τους. Τέλος, εφόσον ο διαχωρισμός των μορίων βασίζεται στον υδροδυναμικό τους όγκο, κατά την ανάλυση μειγμάτων πρωτεϊνών, οι σφαιρικές πρωτεΐνες παρουσιάζουν μεγαλύτερο χρόνο έκλουσης από τις ανοιχτές δομές.¹¹

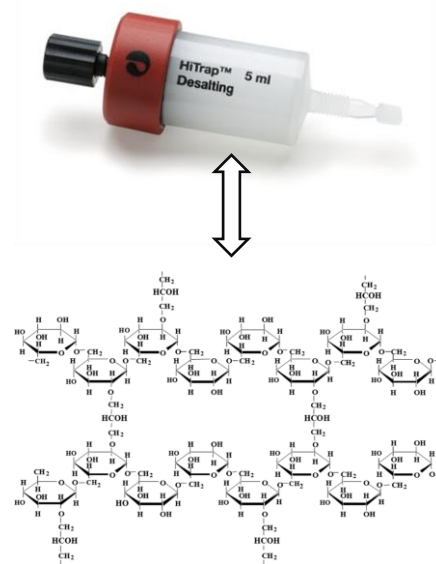
^c Κενός όγκος (V_0): όγκος κινητής φάσης που βρίσκεται έξω από τα σωματίδια της στατικής φάσης.

1.5.1.2 Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού και μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση

Στην (μεταλλο)πρωτεωμική ανάλυση, η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού διαθέτει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των άλλων χρωματογραφικών τεχνικών. Αρχικά, ο διαχωρισμός των ουσιών δεν βασίζεται στην αλληλεπίδραση τους με την στατική φάση, με αποτέλεσμα να μην επηρεάζει την δομή των πρωτεϊνών. Λόγω της αρχής του διαχωρισμού, η σύσταση της κινητής φάσης, δεν επηρεάζει άμεσα τη διαχωριστική ικανότητα, επομένως, η κινητή φάση που επιλέγεται, δύναται να είναι προσαρμοσμένη στις απαιτήσεις της σταθερότητας του εκάστοτε δείγματος.⁵⁶ Η διατήρηση της δομής των πρωτεϊνών ενός δείγματος και η εξασφάλιση των βέλτιστων συνθηκών συμβάλλει στην προστασία της αλληλεπίδρασης μετάλλου-πρωτεΐνης των μεταλλοπρωτεϊνών.

1.5.1.3 Εφαρμογή στην παρούσα αναλυτική μέθοδο

Η στήλη μοριακού αποκλεισμού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι η HiTrap Desalting. Η στήλη αυτή αξιοποιείται στον διαχωρισμό ενώσεων μικρού μοριακού βάρους από τα μακρομόρια ενός δείγματος, όπως είναι οι πρωτεΐνες. Αναλυτικότερα, το πληρωτικό υλικό της χρησιμοποιούμενης χρωματογραφικής στήλης είναι η ρητίνη Sephadex G-25 (Superfine), η οποία σχηματίζεται από διασταυρούμενη σύνδεση δεξτράνης και επιχλωροϋδρίνης (Εικόνα 3). Η μικρή διάμετρος των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού (20-50 μm), παρέχει αυξημένη απόδοση και διαχωριστική ικανότητα. Η περιοχή κλασμάτωσης (fractionation range) της στήλης HiTrap Desalting, για σφαιρικές πρωτεΐνες είναι 1000-5000 Da, επομένως επιτυγχάνει αποδοτικό διαχωρισμό ουσιών με μοριακό βάρος που εμπίπτει στην περιοχή αυτή, καθυστερεί σημαντικά την έκλουση ουσιών με μοριακό βάρος μικρότερο των 1000 Da, ενώ μόρια μεγαλύτερα των 5000 Da δεν εισάγονται στους πόρους των σωματιδίων, με αποτέλεσμα να εκλούνται ταχύτατα. Ο κενός όγκος της χρησιμοποιούμενης στήλης είναι 1,5 ml, επομένως εάν η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης είναι ίση με 0,7 ml/min, η έκλουση των μακρομορίων αναμένεται να ξεκινήσει στα 129 s, ενώ τα μικρότερου μοριακού βάρους μόρια ($M_r < 1000$) έπειτα από περίπου 300 s (όγκος κινητής φάσης 3.5 mL). Για την ανάλυση της πλειονότητας των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο από τις παραπάνω στήλες, συνδεδεμένες σε σειρά, προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των κορυφών. Σε αυτή την περίπτωση, η έκλουση των μακρομορίων αναμένεται περίπου στα 260 s και των μορίων μικρού μοριακού βάρους στα 600 s.⁵⁶

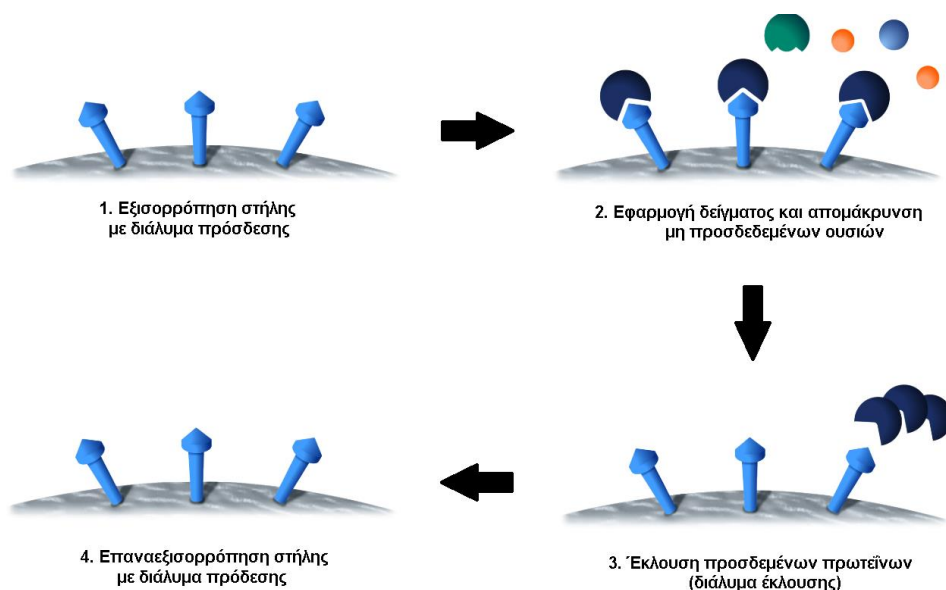


Εικόνα 3: Στήλη χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού HiTrap Desalting και η δομή της περιεχόμενης στατικής φάσης.¹⁰⁸

1.5.2 Χρωματογραφία συγγένειας (AF)

1.5.2.1 Αρχή λειτουργίας

Η χρωματογραφία συγγένειας βασίζεται στην αναστρέψιμη αλληλεπίδραση μεταξύ ενός ή περισσότερων βιομορίων με έναν υποκαταστάτη, που βρίσκεται προσδεμένος στο υπόστρωμα της στατικής φάσης. Αναλυτικότερα, κατά την εισαγωγή ενός δείγματος βιομορίων σε μια στήλη χρωματογραφίας συγγένειας τα βιομόρια, που εμφανίζουν χημική συγγένεια με τον υποκαταστάτη της στατικής φάσης, συγκρατούνται στην στήλη, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος απομακρύνονται. Οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των βιομορίων ενδιαφέροντος και του υποκαταστάτη δύναται να είναι ηλεκτροστατικές, υδρόφοβες ή van der Waals, ενώ συχνά δημιουργούνται και δεσμοί υδρογόνου. Για την έκλυση



Εικόνα 4: Απαιτούμενα στάδια για την ανάλυση δειγμάτων με χρωματογραφία συγγένειας.⁵⁸

των βιομορίων ενδιαφέροντος, απαιτείται εξασθένιση αυτών των αλληλεπιδράσεων, η οποία επιτυγχάνεται μέσω της χρήσης ενός ανταγωνιστικού υποκαταστάτη, της αύξησης της ιοντικής ισχύος ή/και αλλαγή του pH ή της πολικότητας της κινητής φάσης.⁵⁸ Τα στάδια της χρωματογραφίας συγγένειας συνοψίζονται στην Εικόνα 4.

1.5.2.2 Χρωματογραφία συγγένειας και μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση

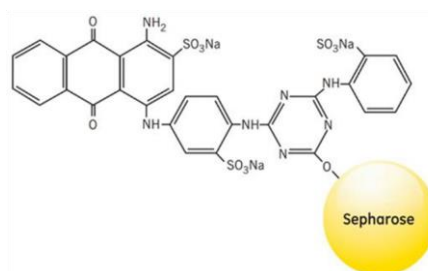
Το είδος χρωματογραφίας συγγένειας που κυριαρχεί στην μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση βιολογικών και περιβαλλοντικών δειγμάτων, είναι η χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου. Η χρήση χρωματογραφικής στήλης, που διαθέτει συγκεκριμένα μεταλλικά ιόντα, επιτρέπει την επιλεκτική κατακράτηση των μεταλλοπρωτεϊνών που έχουν χημική συγγένεια με τα αντίστοιχα μέταλλα με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ μεταλλοπρωτεΐνης – μετάλλου καθώς και ο εντοπισμός νέων μεταλλοπρωτεϊνών.

Ευρεία εφαρμογή στην πρωτεωμική ανάλυση έχει και η χρωματογραφία συγγένειας όπου ο ακινητοποιημένος υποκαταστάτης είναι μια χρωστική. Η χημική συγγένεια μεταξύ της χρωστικής και ορισμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιείται συχνά για

την απομόνωση- καθαρισμό συγκεκριμένων πρωτεϊνών από μείγματα ή γενικότερα για την κλασμάτωση βιολογικών και περιβαλλοντικών δειγμάτων.

1.5.2.3 Εφαρμογή στην παρούσα αναλυτική μέθοδο

Η HiTrap Blue High Performance αποτελεί μια στήλη χρωματογραφίας συγγένειας η οποία περιλαμβάνει τον υποκαταστάτη Cibacron Blue F3G-A ομοιοπολικά συνδεδεμένο σε υπόστρωμα Σεφαρόζης (Εικόνα 5).⁵⁸ Ο υποκαταστάτης εμφανίζει δομική ομοιότητα με ορισμένους νουκλεοτιδικούς συμπαραγοντες, με αποτέλεσμα πρωτεΐνες, όπως τα νουκλεοτιδοεξαρτώμενα ένζυμα, να αλληλεπιδρούν με αυτόν βιοεκλεκτικά. Παράλληλα, ως ανιοντικός πολυαρωματικός υποκαταστάτης, μπορεί να αναπτύξει ηλεκτροστατικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες, όπως η αλβουμίνη, η α2-μακρογλοβουλίνη κ.α.⁵⁹ Η αλληλεπίδραση του υποκαταστάτη με την ανθρώπινη αλβουμίνη είναι πολύ ισχυρή, με αποτέλεσμα η έκλουση της από την στήλη να απαιτεί διάλυμα έκλουσης με συγκέντρωση άλατος μεγαλύτερη από 1 M, χρήση χαστροπικών ιόντων ή ηλεκτροφόρηση.⁵⁹⁻⁶²



Εικόνα 5: Χρωματογραφική στήλη HiTrap Blue HP και δομή της περιεχόμενης στατικής φάσης.⁶²

1.5.3 Φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS)

Η φασματομετρία μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος αποτελεί μια τεχνική υψηλής ευαισθησίας, ταχείας πολυστοιχειακής ανάλυσης, με την οποία επιτυγχάνονται όρια ανίχνευσης της τάξεως των ppt για τα περισσότερα στοιχεία του περιοδικού πίνακα.^{63,64}

1.5.3.1 Αρχή λειτουργίας – Εφαρμογή στην παρούσα αναλυτική μέθοδο

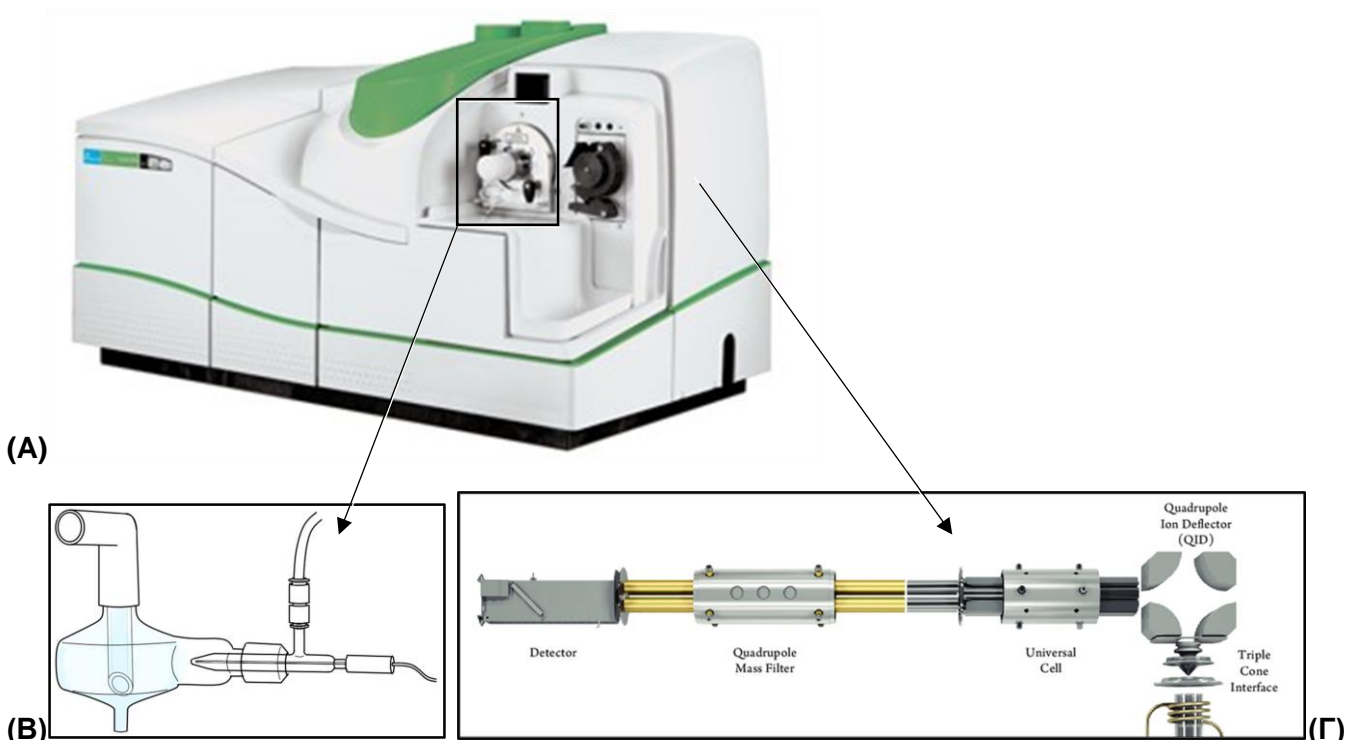
Στην παρούσα αναλυτική μέθοδο χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο μάζας NexION 350X ICP-MS για την ανίχνευση των μετάλλων, αλλά και του θείου, που περιέχεται στις μεταλλοπρωτεΐνες του εκλούσματος από το σύστημα χρωματογραφίας. Ειδικότερα, το έκλουσμα, εισάγεται στον ομόκεντρο πνευματικό εκνεφωτή και μετατρέπεται σε αερόλυμα. Το αερόλυμα μεταφέρεται στον κυκλωνικό θάλαμο εκνέφωσης^d, όπου τα μεγαλύτερης διαμέτρου σταγονίδια απομακρύνονται και το, πλέον, λεπτόκοκκο αερόλυμα μεταφέρεται στον πυρσό, όπου υφίσταται ένα υψηλής θερμοκρασίας (6,000-10.000K) επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα αργού.

Το πλάσμα αποτελεί ένα αέριο μίγμα ατόμων και ιόντων αργού και ελεύθερων ηλεκτρονίων, όπου πραγματοποιείται απομάκρυνση του διαλύτη, εξάχνωση,

^d Σε ορισμένες αναλύσεις, έναντι του κυκλωνικού θαλάμου εκνέφωσης, χρησιμοποιήθηκε κωνικός θάλαμος εκνέφωσης με σφαιρίδιο πρόσκρουσης.

ατομοποίηση και ιοντισμός του δείγματος. Η διέλευση του αερολύματος από το πλάσμα έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή του σε ένα αέριο αποτελούμενο κυρίως από μονοφορτισμένα ιόντα. Το αέριο μεταφέρεται μέσω της διεπιφάνειας στον τετραπολικό ανακλαστή ιόντων (quadrupole ion deflector). Η διεπιφάνεια συνίσταται από τρεις κώνους νικελίου: τον κώνο δειγματοληψίας (sampler), τον αποκορυφωτή (skimmer) και τον υπεραποκορυφωτή (hyperskimmer). Η διεπιφάνεια καθιστά δυνατή την ομαλή μετάβαση του αερίου από τις συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, όπου βρίσκεται το πλάσμα, στις συνθήκες πίεσης μικρότερης των 10^{-4} Torr, όπου βρίσκεται το φασματομέτρο μάζας ενώ συμβάλλει και στην ψύξη του. Στον τετραπολικό ανακλαστή ιόντων πραγματοποιείται απομάκρυνση των ουδέτερων ατόμων ή των φωτονίων, που ενδέχεται να προέκυψαν στο πλάσμα και μεταφορά των ιόντων, στον τετραπολικό αναλυτή μάζας.⁶⁵

Το τετράπολο αποτελείται από 4 παράλληλες ράβδους, ανά δύο συνδεδεμένες μεταξύ τους, πάνω στις οποίες εφαρμόζονται συνεχή και εναλλασσόμενα δυναμικά, με σταθερό λόγο. Ανάλογα με την τιμή των εφαρμοζόμενων δυναμικών, από το τετράπολο επιτρέπεται η διέλευση των ιόντων που διαθέτουν ορισμένο λόγο μάζα προς φορτίο (m/z). Ο τετραπολικός αναλυτής μάζας διαθέτει τη δυνατότητα σάρωσης σε μια μεγάλη περιοχή τιμών m/z , σε μερικά ms καθιστώντας δυνατή την πολυστοιχειακή ανάλυση των δειγμάτων. Τα ιόντα που εξέρχονται από το τετράπολο προσπίπτουν στον ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή, ο οποίος τα μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα. Το ηλεκτρικό σήμα μετατρέπεται σε ψηφιακό και καταγράφεται με την βοήθεια ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή.^{64,65}



Εικόνα 6: (Α) Φασματομέτρο μάζας ICP-MS NexION 350X (PerkinElmer), (Β) Εκνεφωτής και κυκλωνικός θάλαμος εκνέφωσης, (Γ) Εσωτερική απεικόνιση φασματομέτρου.⁶⁴

1.5.3.2 Καθολική κυψελίδα (universal cell)

Μεταξύ του τετραπόλου ανάκλασης ιόντων και του τετραπολικού αναλυτή μάζας υφίσταται η καθολική κυψελίδα (universal cell). Η χρήση του universal cell στοχεύει στην απομάκρυνση των φασματοσκοπικών παρεμποδίσεων, που δύναται να υφίστανται για ορισμένους αναλύτες.

1.5.3.2.1 Φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις

Οι κατηγορίες των φασματοσκοπικών παρεμποδίσεων είναι οι εξής.^{57,63}

α) Ισοβαρικές παρεμποδίσεις αποτελούν τα ιόντα που διαθέτουν την ίδια μάζα με τον αναλύτη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το $^{40}\text{Ar}^+$ το οποίο αποτελεί ισοβαρική παρεμπόδιση του $^{40}\text{Ca}^+$. Οι ισοβαρικές παρεμποδίσεις, κυρίως, αντιμετωπίζονται μέσω της παρακολούθησης ενός ισοτόπου μικρότερης αφθονίας του αναλύτη.

β) Πολυατομικές παρεμποδίσεις αποτελούν τα μοριακά ιόντα που σχηματίζονται κυρίως μέσω αλληλεπιδράσεων των σωματιδίων της μήτρας του δείγματος και του πλάσματος και διαθέτουν την ίδια μάζα με τον αναλύτη. Σε αυτές τις παρεμποδίσεις εμπίπτουν τα οξείδια και τα υδροξείδια που δύναται να σχηματιστούν από τον αναλύτη, τα συστατικά της μήτρας και το πλάσμα.

1.5.3.2.2 Λειτουργίες universal cell

Οι δυνατές λειτουργίες του universal cell είναι οι εξής:

Συμβατική λειτουργία (Standard mode): Το universal cell δεν χρησιμοποιείται, επομένως η δέσμη ιόντων μεταβαίνει από το quadrupole ion deflector στον τετραπολικό αναλυτή μάζας χωρίς περαιτέρω επεξεργασία.

Collision cell mode: Το universal cell λειτουργεί ως κυψελίδα συγκρούσεων. Συγκεκριμένα, στην κυψελίδα συγκρούσεων εισάγεται, με ορισμένη ροή, ποσότητα αδρανούς αερίου. Τα πολυατομικά ιόντα (παρεμπόδιση), διαθέτουν μεγαλύτερο μέγεθος από τα ιόντα των αναλυτών (μονοατομικά ιόντα), επομένως κατά τη διέλευση τους από την κυψελίδα συγκρούσεων, πραγματοποιούν μεγαλύτερο αριθμό συγκρούσεων με τα άτομα του αδρανούς αερίου. Ο αυξημένος αριθμός συγκρούσεων οδηγεί σε σημαντική μείωση της κινητικής ενέργειας των πολυατομικών ιόντων. Στην έξοδο της κυψελίδας υφίσταται ένα ενεργειακό φράγμα, το οποίο διαπερνάται από τα υψηλής κινητικής ενέργειας ιόντα των αναλυτών και όχι από τα πολυατομικά ιόντα. (Kinetic Energy Discrimination). Η χρήση της κυψελίδας κρούσεων έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των πολυατομικών παρεμποδίσεων και του χημικού υποβάθρου, όμως δύναται να οδηγήσει και σε καταστολή του σήματος των αναλυτών, επομένως είναι απαραίτητη η προσεκτική επιλογή των παραμέτρων λειτουργίας της.⁶⁴ Στην παρούσα οργανολογία, για τη χρήση του universal cell ως κυψελίδα συγκρούσεων χρησιμοποιείται αέριο ήλιο, επομένως για το υπόλοιπο της εργασίας η συγκεκριμένη λειτουργία θα αναφέρεται ως «He mode».

Reaction cell mode: Το universal cell λειτουργεί ως κυψελίδα αντίδρασης. Συγκεκριμένα, στην κυψελίδα αντίδρασης εισάγεται, με ορισμένη ροή, ποσότητα δραστικού αερίου. Στην παρούσα οργανολογία χρησιμοποιείται αέριο οξυγόνο, ενώ σε άλλα όργανα υπάρχει η δυνατότητα χρήσης αέριας αμμωνίας. Η χρήση αυτής της

λειτουργίας πραγματοποιείται με στόχο την αντίδραση των ισοβαρών ή πολυατομικών ιόντων με το δραστικό αέριο και την μετατροπή τους σε άλλα χημικά είδη, με διαφορετική μάζα από του αναλύτη, ή/και την αντίδραση του αναλύτη με το δραστικό αέριο και την μετέπειτα ανίχνευση του νέου χημικού είδους που σχηματίστηκε. Οι παράμετροι και της κυψελίδας αντίδρασης απαιτούν ιδιαίτερη προσοχή, διότι με την χρήση του δραστικού αερίου δύναται να σχηματιστούν νέες παρεμποδίσεις.⁶⁴ Λόγω της χρήσης αερίου O₂ ως δραστικό αέριο, για το υπόλοιπο της εργασίας η συγκεκριμένη λειτουργία θα αναφέρεται ως «O₂ mode».

1.5.4 Εφαρμογές αναλυτικών τεχνικών SEC και AF συζευγμένες με ICP-MS

Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού συζευγμένη με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος έχει χρησιμοποιηθεί για την μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση ποικίλων βιολογικών δειγμάτων ανθρώπου και ζώων όπως η ανάλυση μητρικού γάλακτος⁶⁶, πλάσμα αίματος ανθρώπου^{36,67} και λαγού⁶⁸, ορό ανθρώπινου αίματος^{35,69}, υαλώδες ορό ανθρώπινου ματιού⁷⁰, εγκεφαλονωτιαίο μυελό⁶⁹. Η τεχνική SEC-ICP-MS έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ορισμένων μεταλλοπρωτεϊνών σε δείγματα κυτάρων *Chlamydomonas reinhardtii*.⁵⁰

Αντίστοιχα, η χρωματογραφία συγγένειας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος έχει εφαρμοστεί σε αρκετές μελέτες για την ανάλυση μεταλλοπρωτεϊνών σε πλάσμα ανθρώπινου αίματος.^{67,71}

Ο συνδυασμός των δύο παραπάνω ειδών υγρής χρωματογραφίας και της φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος έχει αξιοποιηθεί για την ανάλυση σεληνοπρωτεϊνών σε ορό ανθρώπινου αίματος²⁴ και την μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση πλάσματος ανθρώπινου αίματος ασθενών με εγκεφαλικό⁶⁷.

1.6 Σκοπός της εργασίας

Στόχος της παρούσας εργασίας αποτελεί η ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος κατάλληλη για την μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος. Επιπλέον, στοχεύει στην εφαρμογή της μεθόδου αυτής σε δείγματα ορού αίματος αθλητών για την σύγκριση του μεταλλοπρωτεωμικού προφίλ μεταξύ των διαφορετικών υποκειμένων αλλά και τη διερεύνηση της επίδρασης της έντονης άσκησης στις μορφές και στις αντίστοιχες ποσότητες των μετάλλων. Ακόμη, γίνεται προσπάθεια ερμηνείας των παρατηρούμενων μεταβολών και αντιστοίχισης των κλασμάτων που ανιχνεύονται με τις μεταλλοπρωτεΐνες που, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, περιέχονται στον ορό ανθρώπινου αίματος.

Ένας επιπλέον στόχος της παρούσας εργασίας αποτελεί η ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού συζευγμένης με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος για τον προσδιορισμό σεληνοπρωτεϊνών σε κύτταρα του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii*. Η

εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιείται σε *Chlamydomonas reinhardtii* που έχουν καλλιεργηθεί παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων Se(VI) με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης αυτών των συγκεντρώσεων στην ποσότητα και στις μορφές του σεληνίου στα κύτταρα.

Κεφάλαιο 2: Πειραματικό Μέρος

2.1 Αντιδραστήρια

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια: οξικό αμμώνιο (Sigma-Aldrich), νιτρικό οξύ (Fisher Chemical), μεθανόλη (Carlo Erba reagents), αιθανόλη (Fisher Chemical), αιθυλενοδιαμινωτετραοξικό οξύ (Sigma-Aldrich), φαινυλομεθυλοσουλφονυλοφθορίδιο: PMSF (Sigma-Aldrich), 1,4-διθειοθρεϊτόλη: DTT (Sigma-Aldrich), τρισυδροξυλοαμινομεθάνιο – υδροχλωρίο: Tris-HCl (Sigma-Aldrich), Seronorm™ Trace elements serum Level 2 (Seronorm™), πρότυπα μονοστοιχειακά διαλύματα (CPI International Peak Performance)

Πίνακας 1: Συγκεντρώσεις χρησιμοποιούμενων πρότυπων μονοστοιχειακών διαλυμάτων.

Στοιχείο	Συγκέντρωση	Μήτρα διαλύματος
Ασβέστιο (Ca)	10000	4% HNO ₃
Μαγνήσιο (Mg)	10000	4% HNO ₃
Χαλκός (Cu)	10000	4% HNO ₃
Σίδηρος (Fe)	10000	4% HNO ₃
Ψευδάργυρος (Zn)	10000	4% HNO ₃
Σελήνιο (Se)	10000	4% HNO ₃
Αρσενικό (As)	10000	4% HNO ₃
Μόλυβδος (Pb)	10000	4% HNO ₃
Μολυβδαίνιο (Mo)	10000	4% HNO ₃
Χρώμιο (Cr)	10000	4% HNO ₃
Νικέλιο (Ni)	10000	4% HNO ₃
Μαγγάνιο (Mn)	10000	4% HNO ₃
Βανάδιο (V)	5000	4% HNO ₃
Αργυρος (Ag)	10000	4% HNO ₃
Κοβάλτιο (Co)	10000	4% HNO ₃
Κάδμιο (Cd)	10000	4% HNO ₃
Βολφράμιο (W)	10000	4% HNO ₃ + 2% HF
Τιτάνιο (Ti)	10000	4% HNO ₃ + 2% HF
Θάλιο (Tl)	10000	4% HNO ₃

2.2 Οργανολογία - Εργαστηριακός εξοπλισμός

Φασματόμετρο μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος]

- NexION 300X ICP-MS με χρήση του λογισμικού Syngistix, *Perkin Elmer*
- Φιάλη αργού (Ar) υπό πίεση
- Φιάλη ηλίου (He)
- Φιάλη οξυγόνου (O₂)
- Γυάλινος ομόκεντρος πνευματικός εκνεφωτής Type C, *Meinhard*
- Κυκλωνικός θάλαμος εκνέφωσης, *Meinhard*

Σύστημα χρωματογραφίας

- LC-20AD gradient pump, *Shimadzu*
- Manual sample injector model 7010, *Rheodyne*
- Switching Valve EV700-100, *Rheodyne*
- Στήλες χρωματογραφίας συγγένειας: HiTrap Heparin και HiTrap Blue (0.7 x 2.5cm (1ml)), *GE Healthcare*
- Στήλη μοριακού αποκλεισμού: HiTrap Desalting (1.6 x 2.5cm (5ml)), *GE Healthcare*
- Εξαρτήματα χρωματογραφίας (PEEK tubings, PEEK fittings, βρόγχος (loop) δείγματος 100μl)
- Σύριγγα των 500μl, *Hamilton*

Επιπρόσθετος εργαστηριακός εξοπλισμός

- Αναλυτικός ζυγός, resolution: 0.1 mg, linearity: ±0.2 mg, Kern ABT *Sigma-Aldrich*
- Reax 2000 vortex shaker, *Heidolph*
- Πιπέτες Pasteur και ρυθμιζόμενου όγκου *Gilson*
- Διηθητικό χαρτί (διάμετρος πόρων: 4μM) *Whatman*

2.3 Δειγματοληψία και συντήρηση δειγμάτων

2.3.1 Δείγματα ορού αίματος αθλητών

Τα δείγματα ορού αίματος των αθλητών συλλέχθηκαν στα πλαίσια ερευνητικής εργασίας του τμήματος “Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής” του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του επίκουρου καθηγητή Βιοχημείας κ. Νομικού Τζώρτζη, το 2017.⁷² Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραπάνω εργασίας, συλλέχθηκαν 5 δείγματα φλεβικού αίματος από υγιείς εθελοντές αθλητές. Συγκεκριμένα, τα πρώτο ελήφθη έπειτα από ολονύχτια νηστεία ενώ τα υπόλοιπα ελήφθησαν 2, 24, 48 και 72 ώρες μετά την ολοκλήρωση της αθλητικής δραστηριότητας του εκάστοτε αθλητή. Το πρωτόκολλο δειγματοληψίας καθώς και λεπτομέρειες για την αθλητική δραστηριότητα των εθελοντών αναφέρονται στην βιβλιογραφία⁷² Οι εθελοντές αθλητές, στα πλαίσια της συμμετοχής τους στο παραπάνω ερευνητικό πρόγραμμα, δεν ακολούθησαν συγκεκριμένο πρόγραμμα διατροφής αλλά απείχαν από οποιαδήποτε χρήση συμπληρωμάτων διατροφής.

Έπειτα από τη συλλογή τους, τα δείγματα αίματος των εθελοντών φυγοκεντρήθηκαν και λήφθηκε το κλάσμα του ορού. Ποσότητες του ορού αίματος 19 αθλητών παραδόθηκαν στο εργαστήριο του κ. Περγαντή για την μεταλλοπρωτεωμική τους ανάλυση, στα πλαίσια της μεταπτυχιακής ερευνητικής εργασίας της κα. Τρασανίδου.⁷¹ Τα δείγματα συντηρήθηκαν στους -40°C.

Λόγω της εκτεταμένης συντήρησης των δειγμάτων στην κατάψυξη καθώς και των κύκλων ψύξης-απόψυξης, που υπέστη για την ανάλυση τους στα πλαίσια της προηγούμενης ερευνητικής εργασίας ορισμένα δείγματα εμφάνισαν αλλοιώσεις, όπως αιωρήματα και ιζήματα. Για τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν ορισμένα δείγματα ορού αίματος, τα οποία δεν είχαν κάποια εμφανή αλλοίωση.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2), καταγράφονται οι κωδικές ονομασίες των δειγμάτων των εθελοντών αθλητών, που αναλύθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, όπως αυτές παραδόθηκαν από την ερευνητική ομάδα του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου. Ο κωδικός ονομασίες έχουν την μορφή xx-BL-yy, όπου xx, ο κωδικός του εκάστοτε αθλητή, BL, η ένδειξη αποχής από την κατανάλωση συμπληρωμάτων διατροφής και yy, οι ώρες που μεσολάβησαν από την αθλητική δραστηριότητα μέχρι τη στιγμή της δειγματοληψίας. Επιπλέον, αναγράφεται και η αρίθμηση κάθε αθλητή όπως αυτή αποδόθηκε στα πλαίσια της προηγούμενης ερευνητικής εργασίας.

Πίνακας 2: Λίστα με την κωδική ονομασία των δειγμάτων ορού αίματος του κάθε αθλητή.

Ωρες μετά την άσκηση	0	2	24	48	72
Αριθμός αθλητή					
Αθλητής 1	51-BL-0	51-BL-2	51-BL-24	51-BL-48	51-BL-72
Αθλητής 2	50-BL-0	50-BL-2	50-BL-24	50-BL-48	50-BL-72
Αθλητής 6	-	-	-	-	32-BL-72
Αθλητής 10	22-BL-0	22-BL-2	22-BL-24	22-BL-48	22-BL-72
Αθλητής 16	-	-	-	6-BL-48	-
Αθλητής 19	2-BL-0	2-BL-2	2-BL-24	-	2-BL-72

2.3.2 *Chlamydomonas reinhardtii*

Από την ερευνητική ομάδα του κ. Λυδάκη – Σημαντήρη Νικόλαου, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια στελεχών άγριου τύπου *Chlamydomonas reinhardtii* CC-1690. Η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε 3 L θρεπτικού διαλύματος (TAP), pH 7.0, υπό συνεχή ακτινοβολία και ανάδευση, σε θερμοκρασία 25 °C. Το θρεπτικό διάλυμα αποτελούνταν από τρις(υδροξυμέθυλο)αμινομεθάνιο (Trizma-base) φωσφορικά και οξικά ανιόντα. Από τα κύτταρα αυτά δημιουργήθηκαν 5 επιμέρους καλλιέργειες, στις οποίες έγινε χρήση θρεπτικού διαλύματος TAP, στο οποίο είχαν

προσθεθεί κατάλληλες ποσότητες NaSeO₄, προκειμένου η τελική συγκέντρωση του Se (VI) στις καλλιέργειες να είναι ίση με 20, 50, 100 και 150 μM, αντίστοιχα. Μια καλλιέργεια αναπτύχθηκε χωρίς την παρουσία ποσότητας NaSeO₄ και αποτελεί το "Control". Η επώαση πραγματοποιήθηκε για 5 ημέρες και στην συνέχεια έγινε συλλογή και έκπλυση των κυττάρων με διάλυμα 50 mM Trizma-base. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν στους -80 °C σε διάλυμα 0,8 M σουκρόζης 50 mM Trizma-base και pH 7,0. Τα δείγματα αυτά αποτέλεσαν τα πυκνά stock κυττάρων που παραδόθηκαν στο εργαστήριο του κ. Περγαντή και χρησιμοποιήθηκαν, στη συνέχεια, για τις μεταλλοπρωτεωμικές αναλύσεις. Η συγκεντρώσεις των κυττάρων τα πυκνά stock αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3)

Πίνακας 3: Συγκέντρωση κυττάρων στα πυκνά stock δείγματα.

Δείγμα	Συγκέντρωση κυττάρων (Κύτταρα/ml)
Control	2.78E+08
20 μM	1.80E+08
50 μM	1.50E+07
100 μM	1.39E+07
150 μM	1.74E+07

2.4 Μέτρα εργαστηριακής ασφάλειας

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε διαχείριση και ανάλυση βιολογικών δειγμάτων επομένως ήταν απαραίτητη η λήψη αυστηρών μέτρων για την προσωπική αλλά και την εργαστηριακή ασφάλεια. Στα προσωπικά μέτρα ασφαλείας περιλαμβάνεται η χρήση εργαστηριακής ρόμπας, γαντιών και προστατευτικών γυαλιών. Μετά το πέρας της ανάλυσης, έλαβε χώρα απολύμανση του πάγκου εργασίας, καθώς και όλων των επιφανειών που ήρθαν σε επαφή με τα βιολογικά δείγματα, με χλωρίνη και στη συνέχεια νερό.

Όλα τα απόβλητα, που προέκυψαν από την ανάλυση των βιολογικών δειγμάτων, απορρίφθηκαν στα υδατικά απόβλητα του εργαστηρίου, όπου και αποθηκεύονται έως ότου αποσταλούν, για εξουδετέρωση, στους αρμόδιους φορείς.

2.5 Ανάπτυξη μεθόδων dcSEC-AF-ICP-MS και SEC-ICP-MS

Η μέθοδος dcSEC-AF-ICP-MS αναπτύχθηκε για την μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος, ενώ η μέθοδος SEC-ICP-MS αξιοποιήθηκε στην ανάλυση σεληνοπρωτεϊνών στον μονοκύτταρο οργανισμό *Chlamydomonas reinhardtii*.

2.5.1 Προετοιμασία απαραίτητων διαλυμάτων

2.5.1.1 Ρυθμιστικά διαλύματα (Κινητή φάση)

Κατά την χρωματογραφική ανάλυση των βιολογικών δειγμάτων είναι επιθυμητή η διατήρηση, κατά το δυνατόν, της τρισδιάστατης δομής των περιεχόμενων πρωτεϊνών, για την ελαχιστοποίηση της απομάκρυνσης των μετάλλων, που αλληλεπιδρούν με αυτές. Για αυτό το λόγο, η κινητή φάση πρέπει να προσομοιάζει κατά το δυνατόν το pH και την ιοντική ισχύ της μήτρας των μεταλλοπρωτεϊνών. Η κινητή φάση είναι σημαντικό να μη φέρει ουσίες οι οποίες τείνουν να σχηματίσουν σύμπλοκα με τα περιεχόμενα μεταλλικά ιόντα ή να ενισχύουν ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βιομορίων και της στατικής φάσης, όπως συμβαίνει στα ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών αλάτων. Επιπλέον, η κινητή φάση πρέπει να είναι συμβατή με το σύστημα της φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος. Σύμφωνα με τα παραπάνω, ως κινητές φάσεις για την χρωματογραφική ανάλυση επιλέχθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα οξικού αμμωνίου.⁷³

Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε ένα ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου συγκέντρωσης 0,05 M, pH 7,0, (Buffer A) και ένα διάλυμα οξικού αμμωνίου συγκέντρωσης 1,5 M, pH 7,0 (Buffer B). Η ρύθμιση του pH των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια πεχαμέτρου και την στάγδην προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος NH₄OH 10% ή CH₃COOH 10%. Στη συνέχεια, κάθε διάλυμα υπέστη διήθηση υπό κενό, με χρήση διηθητικού χαρτιού Whatman (πόρων 4 μm), για την απομάκρυνση τυχόν μεταλλικών σωματιδίων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε απαέρωση των διαλυμάτων με την βοήθεια υπερήχων για 30 λεπτά, για την απομάκρυνση φυσαλίδων αέρα, οι οποίες δύναται να προκαλέσουν προβλήματα στη χρωματογραφική ανάλυση.

Στην μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS έγινε χρήση των κινητών φάσεων Buffer A και Buffer B. Συγκεκριμένα, το Buffer A, χρησιμοποιήθηκε ως ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης και έκλουσης ενώ το Buffer B, όντας ένα διάλυμα σημαντικά μεγαλύτερης ιοντικής ισχύος, χρησιμοποιήθηκε ως δεύτερο ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης για την στήλη χημικής συγγένειας Blue-HP, προκειμένου να εξασφαλιστεί η έκλουση των ουσιών που προσδένονται ισχυρά σε αυτήν.

Στην μέθοδο SEC -ICP-MS, ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε το Buffer A..

2.5.1.2 Πρότυπα διαλύματα

Για την ποσοτικοποίηση των μετάλλων στα βιολογικά δείγματα, στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της εξωτερικής βαθμονόμησης.

- Μέθοδος dcSEC-AF-ICP-MS

Για την κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν τέσσερα πρότυπα πολυστοιχειακά διαλύματα, η συγκέντρωση των οποίων καθορίστηκε έπειτα από βιβλιογραφική αναζήτηση για τον προσδιορισμό του αναμενόμενου εύρους της συγκέντρωσης κάθε στοιχείου, σε δείγματα ορού αίματος.^{74,75} Η παρασκευή του πρότυπου διαλύματος υψηλότερης συγκέντρωσης (STD4) πραγματοποιήθηκε μέσω κατάλληλων διαδοχικών αραιώσεων των πρότυπων μονοστοιχειακών διαλυμάτων (Πίνακας 1), σε υπερκάθαρο νερό, ενώ η τελευταία αραιώση πραγματοποιήθηκε σε υδατικό διάλυμα 8 mM EDTA, 0,05M CH₃COONH₄, pH 7. Τα υπόλοιπα πρότυπα

διαλύματα παρασκευάστηκαν μέσω κατάλληλων αραιώσεων του STD4, σε ποσότητα. Το STD1 αποτελεί ποσότητα Buffer A. Οι συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Συγκέντρωση στοιχείων στα πρότυπα πολυστοιχειακά διαλύματα.

Στοιχείο	STD1 (ppb)	STD2 (ppb)	STD3 (ppb)	STD4 (ppb)
Ασβέστιο (Ca)	0	50000	100000	200000
Μαγνήσιο (Mg)	0	5000	10000	20000
Χαλκός (Cu)	0	1500	3000	6000
Σίδηρος (Fe)	0	750	1500	3000
Ψευδάργυρος (Zn)	0	125	250	500
Σελήνιο (Se)	0	50	100	200
Αρσενικό (As)	0	3	6	12
Μόλυβδος (Pb)	0	2.5	5	10
Μολυβδένιο (Mo)	0	1.25	2.5	5
Χρώμιο (Cr)	0	1	2	4
Νικέλιο (Ni)	0	0.5	1	2
Μαγγάνιο (Mn)	0	0.5	1	2
Βανάδιο (V)	0	0.5	1	2
Άργυρος (Ag)	0	0.25	0.5	1
Κοβάλτιο (Co)	0	0.15	0.3	0.6
Κάδμιο (Cd)	0	0.15	0.3	0.6
Βολφράμιο (W)	0	0.15	0.3	0.6
Τιτάνιο (Ti)	0	0.15	0.3	0.6
Θάλιο (Tl)	0	0.075	0.15	0.3

- Μέθοδος SEC-ICP-MS

Για την ποσοτικοποίηση του Se στα κλάσματα που προκύπτουν από τη χρωματογραφική ανάλυση, παρασκευάστηκαν δύο πρότυπα διαλύματα ιοντικού σεληνίου, συγκέντρωσης 250 ppb και 500 ppb, αντίστοιχα. Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις του πρότυπου μονοστοιχειακού διαλύματος Se (Πίνακας 1) σε υπερκάρθο νερό και τέλος σε ποσότητα διαλύματος κυτάρων control που έχουν υποστεί λύση. Η χρήση του διαλύματος κυτάρων control για την τελική αραιώση των προτύπων αποσκοπεί στην αποφυγή φαινομένων επίδρασης μήτρας.

2.5.1.3 Διάλυμα λύσης κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* (lysis buffer)

Για την λύση των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 10 mM DTT, 1 mM PMSF και 1 mM EDTA, με την διάλυση κατάλληλης ποσότητας στερεών αντιδραστηρίων σε υπερκάθαρο νερό.

Η σύσταση του διαλύματος λύσης, αποσκοπεί στην διασφάλιση της ακεραιότητας των μεταλλοπρωτεϊνών μετά τη απελευθέρωση του κυτοσόλιου των κυττάρων στο διάλυμα. Ειδικότερα, με την παρουσία του Tris-HCl πραγματοποιείται ρύθμιση του pH και της ιοντικής ισχύς του διαλύματος σε ευνοϊκά επίπεδα για την σταθερότητα και την διατήρηση της διαλυτότητας των πρωτεϊνών. Επιπλέον, μέσω της χρήσης αναστολέων όπως το PMSF, επιτυγχάνεται, αναστολή της δράσης των πρωτεασών ενώ, η χρήση DTT αποσκοπεί στην προστασία των πρωτεϊνών από οξειδωτικές βλάβες.⁷⁶

2.5.1.4 Επιπρόσθετα διαλύματα

Για την έκπλυση της σύριγγας αλλά και του συστήματος εισαγωγής δείγματος, για την αποφυγή επιμολύνσεων μεταξύ των δειγμάτων παρασκευάστηκε διάλυμα νιτρικού οξέος (HNO₃) 2% καθώς και διάλυμα μεθανόλης (MeOH) 10%. Για την απομάκρυνση των ιόντων του δείγματος, που κατακρατούνται στο σύστημα χρωματογραφίας, παρασκευάστηκαν διαλύματα 2 mM και 8 mM EDTA, 0,05 M CH₃COONH₄, pH 7,0. Η ρύθμιση του pH των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια πεχαμέτρου και την στάγδην προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος NH₄OH. Τέλος, παρασκευάστηκε διάλυμα αιθανόλης (CH₃CH₂OH) 10% για τον καθαρισμό και την συντήρηση των στηλών χρωματογραφίας μετά από κάθε χρήση τους.

Για την παρασκευή των παραπάνω διαλυμάτων, τις απαραίτητες αραιώσεις καθώς και τις εκπλύσεις της σύριγγας και του συστήματος εισαγωγής δείγματος έγινε χρήση νερού υψηλής καθαρότητας (18.2 MΩ·cm).

2.5.2 Προετοιμασία δειγμάτων προς ανάλυση

2.5.2.1 Δείγματα ορού αίματος αθλητών

Τα προς ανάλυση δείγματα αφαιρούνται από την κατάψυξη και αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, αναδεύονται με τη χρήση του vortex ως ότου ομοιογενοποιηθούν, ενώ δεν υπόκεινται σε περεταίρω επεξεργασία.

2.5.2.2 *Chlamydomonas reinhardtii*

Για την ανάλυση των σεληνοπρωτεϊνών των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* στα διάφορα δείγματα και την σύγκριση των αποτελεσμάτων ποσοτικοποίησης των ειδών του Se είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί λύση και στην συνέχεια ανάλυση του ίδιου κυτταρικού πληθυσμού. Επομένως, παρασκευάστηκαν αιωρήματα κυττάρων μέσω αραιώσης κατάλληλης ποσότητας των πυκνών stock κυττάρων σε διάλυμα λύσης (lysis buffer). Η σύσταση και η συγκέντρωση των αιωρημάτων παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5)

Πίνακας 5: Όγκος πυκνών stock κυττάρων και διαλύματος λύσης (lysis buffer) που λήφθηκαν για την παρασκευή των τελικών αιωρημάτων ορισμένης κυτταρικής συγκέντρωσης.

Δείγμα	Όγκος πυκνού stock κυττάρων (μl)	Όγκος lysis buffer (μl)	Αιώρημα (Κύτταρα/ml)
Control	10	990	2.78E+06
20 μM	15	985	2.70E+06
50 μM	174	826	2.61E+06
100 μM	188	812	2.61E+06
150 μM	150	850	2.61E+06

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η λύση των κυττάρων. Αναλυτικότερα, το αιώρημα εισάγεται σε λουτρό πάγου και υπόκειται σε κατεργασία με υπερήχους (sonication). Το σύστημα υπερήχων ενεργοποιείται για 10 s και έπειτα απενεργοποιείται για 50 s, προκειμένου να αποφευχθεί αύξηση θερμοκρασίας στο δείγμα, λόγω της υψηλής ενέργειας που παρέχεται στο σύστημα. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 9 φορές. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 20 min, στα 16.000 g. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται σε Eppendorf και αναλύεται με την μέθοδο SEC-ICP-MS.

Πίνακας 6: Παράμετροι sonication για την λύση των κυττάρων.

Παράμετροι sonication	
Amplitude	35%
Απαιτούμενος χρόνος ανά δείγμα	10 min
Κύκλοι	10
Πρόγραμμα	10 s ON – 50 s OFF

2.5.3 Εφαρμογή των μεθόδων dcSEC-AF-ICP-MS και SEC-ICP-MS.

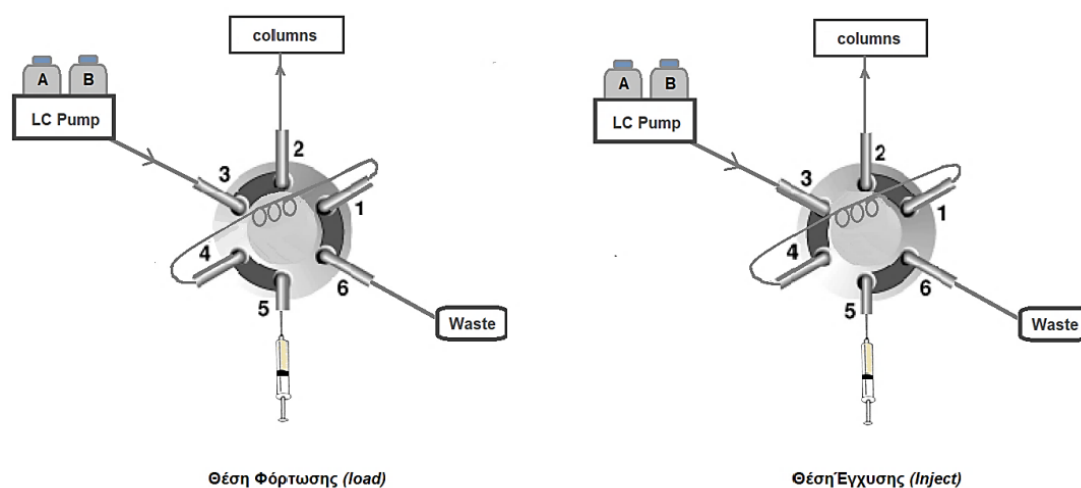
Η πειραματική διάταξη και το δύο μεθόδων ανάλυσης που αναπτύχθηκαν στην παρούσα εργασία αποτελούνται από το σύστημα χρωματογραφίας και το φασματόμετρο μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος. Η διαφορά της πειραματικής διάταξης των δύο μεθόδων εντοπίζεται στο σύστημα χρωματογραφίας και συγκεκριμένα στις χρωματογραφικές στήλες που χρησιμοποιούνται. Πέρα από την πειραματική διάταξη, ορισμένες διαφορές υπάρχουν και σε διάφορες χρωματογραφικές παραμέτρους. Οι διαφορές αυτές επισημαίνονται στη συνέχεια.

2.5.3.1 Πειραματική διάταξη

Το χρωματογραφικό σύστημα αποτελείται από μια παλινδρομική αντλία (LC-20AD gradient pump, Shimadzu) σταθερής ροής, η οποία συνδέεται με τις κινητές φάσεις, που χρησιμοποιούνται στις αντίστοιχες μεθόδους. Η αντλία διαθέτει την δυνατότητα προγραμματισμού της σύστασης της κινητής φάσης, που παρέχεται στο σύστημα συναρτήσει του χρόνου. Για τις αναλύσεις, όπου απαιτείται η χρήση του Buffer B για

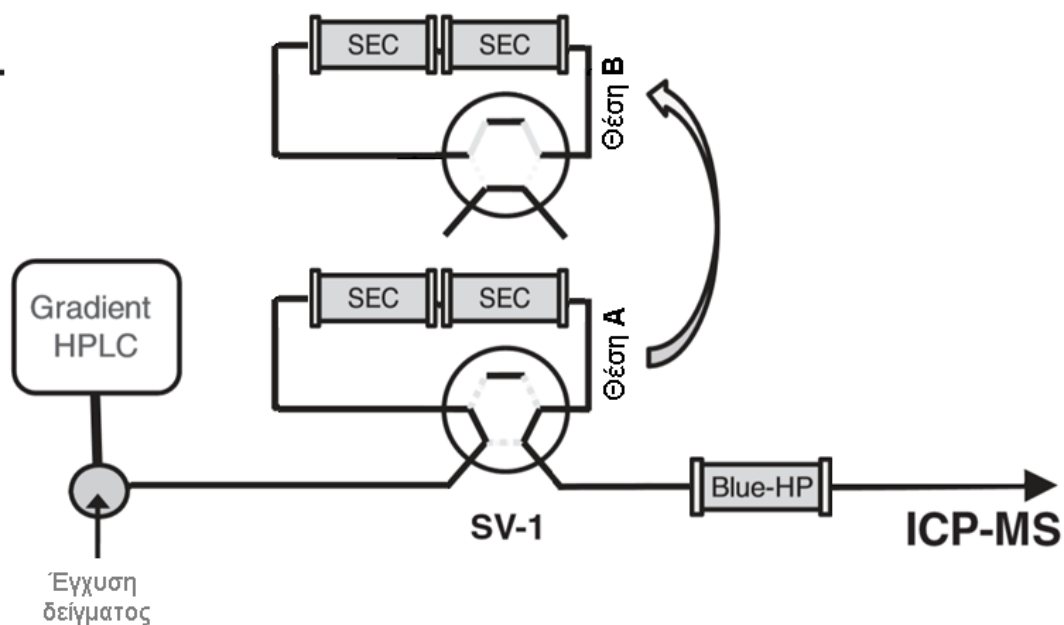
την έκλουση των κλασμάτων, πραγματοποιείται η ρύθμιση των παραμέτρων της αντλίας, προκειμένου να παρέχεται το Buffer A ή το Buffer B, ανάλογα με το χρόνο της ανάλυσης.

Η αντλία συνδέεται με τη βαλβίδα εισαγωγής δείγματος (Manual sample injector model 7010, Rheodyne) η οποία επιτρέπει την εισαγωγή ορισμένου όγκου δείγματος στις στήλες χρωματογραφίας. Αναλυτικότερα, η βαλβίδα εισαγωγής δείγματος διαθέτει δύο θέσεις λειτουργίας, τη θέση φόρτωσης (load) και την θέση έγχυσης (inject). Στη θέση φόρτωσης η κινητή φάση, που παρέχεται από την αντλία, διέρχεται από τη βαλβίδα και μεταφέρεται απευθείας στη χρωματογραφική στήλη. Παράλληλα ο βρόχος συνδέεται με τη θέση παροχής του δείγματος, επομένως είναι εφικτή η πλήρωση του με το δείγμα. Η περίσσεια του δείγματος που εισάγεται στο βρόγχο μεταφέρεται στα απόβλητα. Για την έγχυση του δείγματος στις στήλες η βαλβίδα εισαγωγής δείγματος ρυθμίζεται στη θέση έγχυσης. Στη θέση αυτή, η κινητή φάση διέρχεται από το βρόγχο παρασύρει το δείγμα και το μεταφέρει στη στήλη χρωματογραφίας.

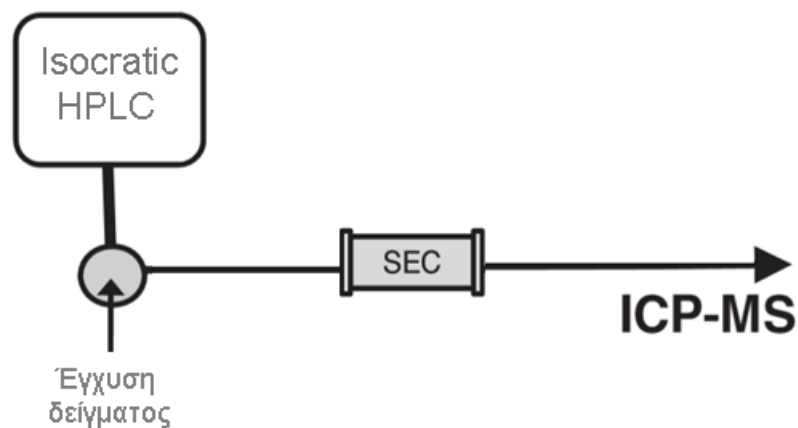


Εικόνα 7: Απεικόνιση του συστήματος εισαγωγής δείγματος στη θέση φόρτωσης (load) και έγχυσης (inject).

Οι στήλες χρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS είναι δύο στήλες χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού HiTrap Desalting HP (GE Healthcare) συνδεδεμένες σε σειρά (double column SEC ή dcSEC), ακολουθούμενες από μια στήλη χρωματογραφίας χημικής συγγένειας HiTrap Blue-HP (GE Healthcare). Η dcSEC είναι τοποθετημένη σε μία βαλβίδα εναλλαγής, η οποία επιτρέπει την επιλεκτική της απομόνωση από το σύστημα χρωματογραφίας. Αντίστοιχα με τη βαλβίδα εισαγωγής δείγματος, η βαλβίδα εναλλαγής (Switching Valve EV700-100, Rheodyne) διαθέτει δύο θέσεις λειτουργίας: τη θέση εισαγωγής (Θέση A) και τη θέση απομόνωσης (Θέση B). Στην θέση εισαγωγής η κινητή φάση διέρχεται από τη dcSEC και το έκλουσμα, στη συνέχεια, μεταφέρεται στη Blue-HP. Αντιθέτως, όταν η βαλβίδα εναλλαγής βρίσκεται στη θέση απομόνωσης, η κινητή φάση δεν διέρχεται από τη dcSEC και μεταφέρεται απευθείας στη στήλη Blue-HP.



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση πειραματικής διάταξης του συστήματος dcSEC-AF-ICP-MS.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση πειραματικής διάταξης του συστήματος SEC-ICP-MS.

Στη μέθοδο SEC-ICP-MS, χρησιμοποιείται μία στήλη χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού HiTrap Desalting HP (GE Healthcare), ενώ στο σύστημα δεν περιλαμβάνεται κάποια βαλβίδα εναλλαγής.

Οι παράμετροι των χρωματογραφικών αναλύσεων για κάθε τύπο δείγματος, συνοψίζεται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Παράμετροι χρωματογραφικών παραμέτρων για κάθε μέθοδο ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

Δείγματα προς ανάλυση	Ορός αίματος, πρότυπο δείγμα ορού Seronorm	Chlamydomonas reinhardtii	
Παράμετροι χρωματογραφικής ανάλυσης			
Χρωματογραφική στήλη	dcSEC – Blue-HP ή Blue-HP	dcSEC	SEC
Κινητή φάση	Buffer A *	Buffer A ή Buffer A2	Buffer A
	Buffer B ***		
Ταχύτητα ροής κινητής φάσης	0.7 ml/min	0.7 ml/min	0.7 ml/min
Παρατηρούμενη πίεση αντλίας	2-3 bar	2 bar	2 bar
Εισαγόμενη ποσότητα δείγματος	150 µl	150 µl	200 µl
Βρόγχος	100 µl	100 µl	100 µl
Προφίλ έκλουσης	Διακριτά βαθμιδωτή (step-gradient)	Ισοκρατική	Ισοκρατική
Χρόνος ανάλυσης δείγματος	75 min	45 min	15 min

*Buffer A: CH₃COONH₄ 0.05 M, pH 7.0

**Buffer A2: CH₃COONH₄ 0.05 M, pH 8.0

***Buffer B: CH₃COONH₄ 1.5 M, pH 7.0

Το πρόγραμμα έκλουσης που εφαρμόστηκε για τις αναλύσεις με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS αναγράφεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Πρόγραμμα διαλυτών και πρόγραμμα έκλουσης μεθόδου dcSEC-AF-ICP-MS.

Χρόνος (s)	Buffer A	Buffer B	Στήλη on-line
0-1800	100%	0	dcSEC – Blue-HP
1800-3000	0	100%	Blue-HP
3000-3120	100%	0	Blue-HP
3120-4500	100%	0	dcSEC – Blue-HP

Σε ορισμένες αναλύσεις έγινε χρήση διαφορετικού συστήματος χρωματογραφίας ή προγράμματος έκλουσης. Στις περιπτώσεις αυτές η περιγραφή του συστήματος και

του προγράμματος έκλουσης παρατίθεται πριν τα αντίστοιχα αποτελέσματα στο Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα – Συζήτηση .

Σε κάθε περίπτωση το έκλουσμα, από το σύστημα χρωματογραφίας, μεταφέρεται στον εκνεφωτή του ICP-MS. Η σύνδεση όλων των επιμέρους τμημάτων πραγματοποιείται με τη χρήση peek tubing.

Οι διεργασίες στις οποίες υπόκειται το έκλουσμα στο σύστημα του ICP-MS, περιγράφονται στη Παράγραφο 1.5.3.1, ενώ οι παράμετροι λειτουργίας του ICP-MS παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 9). Η επεξήγηση των παραμέτρων λειτουργίας αναγράφεται στο Παράρτημα 6.1.

Πίνακας 9: Παράμετροι συστήματος φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος

Παράμετροι συστήματος ICP-MS	
Nebulizer gas flow	0.89 L/min
Auxiliary gas flow	1.20 L/min
Plasma gas flow	18 L/min
RF power	1400 kW
Peristaltic pump speed	20 rpm
Mode of operation	Standard mode, He mode ή O ₂ mode
Dwell time	50 ms
Sweeps/Reading	1
Readings/ Replicate	1775
Replicates	1
Estimated sample time	75 min

2.5.3.2 Πειραματική διαδικασία μεθόδου dcSEC-AF-ICP-MS.

Στην αρχή κάθε πειραματικής μέρας πραγματοποιείται έκπλυση της χρωματογραφικής αντλίας με ποσότητες από τις αντίστοιχες κινητές φάσεις για τον καθαρισμό των σωληνώσεων της αντλίας και την απομάκρυνση τυχόν φυσαλίδων.

Επιπλέον, πριν την σύζευξη του συστήματος χρωματογραφίας με το ICP-MS πραγματοποιείται έλεγχος της καλής λειτουργίας του οργάνου (Performance check). Ο έλεγχος επιτυγχάνεται μέσω της ανάλυσης ενός πρότυπου διαλύματος (tune- solution) 1% HNO₃ που περιέχει τα στοιχεία Ίνδιο (In), Βηρύλλιο (Be), Δημήτριο (Ce), Μόλυβδο (Pb), Ουράνιο (U), Σίδηρο (Fe), Λίθιο (Li) και Μαγνήσιο (Mg) σε συγκέντρωση 1 µg/L. Η ανάλυση πραγματοποιείται μέσω της μεθόδου STD performance check low flow.

Κατά το Performance check γίνεται έλεγχος ορισμένων παραμέτρων όπως ένταση του σήματος του In⁺ και ο λόγος των εντάσεων CeO⁺/Ce⁺. Οι στόχοι για τους

αντίστοιχους παραμέτρους, σύμφωνα με τις οδηγίες του οργάνου, παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10).

Πίνακας 10: Επιθυμητοί στόχοι των παραμέτρων του Performance check.

Παράμετρος	Στόχος
Ένταση In (m/z = 114.9)	> 40000 cps
Ένταση U (m/z =238.1)	> 30000 cps
Ένταση Be (m/z =9.0)	> 2000 cps
Ένταση Ce (m/z =139.9)	>0
Ένταση CeO (m/z =155.9)	>0
Λόγος εντάσεων CeO ⁺ (155.9) / Ce ⁺ (139.9)	≤ 0.025
Background ion 220	≤ 1

Εάν κάποιος από τους παραπάνω στόχους δεν πληρείται, πραγματοποιείται βελτιστοποίηση των παραμέτρων λειτουργίας του ICP-MS, όπως της ροής του αερίου εκνέφωσης, της ευθυγράμμισης του πυρσού, των εφαρμοζόμενες τάσεις στο ανιχνευτή κ.α..

Η ανάλυση των πρότυπων διαλυμάτων αλλά και των δειγμάτων με την μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS ακολουθεί το προφίλ έκλουσης που παρατίθεται στον Πίνακας 8 ενώ η αναλυτική διαδικασία είναι η εξής:

Ποσότητα δείγματος (150 µl) εισάγεται στον βρόγχο, με την βαλβίδα εισαγωγής δείγματος να βρίσκεται στη θέση load. Η βαλβίδα εναλλάσσεται στην θέση inject, για την έκχυση του δείγματος στη στήλη, και ταυτόχρονα ενεργοποιείται το πρόγραμμα διακριτά βαθμιδωτής έκλουσης στην αντλία και ξεκινά η καταγραφή του χρωματογραφήματος της ανάλυσης, μέσω του λογισμικού Syngistics. Μετά την έγχυση του δείγματος πραγματοποιείται έκπλυση της σύριγγας με υπερκάρθαρο H₂O, διάλυμα 2% HNO₃, διάλυμα 10% CH₃OH και εκ νέου H₂O, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης της. Αντίστοιχα, πραγματοποιείται έκπλυση της βαλβίδας εισαγωγής καθώς βρίσκεται στην θέση inject. Τα 30 πρώτα λεπτά της ανάλυσης, η αντλία παρέχει στο σύστημα Buffer A, το οποίο διέρχεται από τη στήλη dcSEC και Blue-HP. Στο 30^ο λεπτό της ανάλυσης, γίνεται εναλλαγή της βαλβίδας εναλλαγής από τη θέση εισαγωγής στη θέση απομόνωσης, επομένως η στήλη dcSEC απομονώνεται από το σύστημα. Παράλληλα, η βαλβίδα εισαγωγής δείγματος επαναφέρεται στην θέση load και ξεκινά η παροχή Buffer B από την αντλία. Το Buffer B διέρχεται από την στήλη Blue – HP, για 20 λεπτά. Στο διάστημα αυτό, πραγματοποιείται έκπλυση του βρόγχου, η οποία ταυτίζεται με την διαδικασία έκπλυσης της σύριγγας, που αναφέρθηκε παραπάνω. Το 50^ο λεπτό, ξεκινά και πάλι η παροχή Buffer A από την αντλία και το 52^ο λεπτό, αφού έχει απομακρυνθεί η ποσότητα Buffer B από το σύστημα μεταξύ της αντλίας και της βαλβίδας εναλλαγής, εισάγεται η στήλη dcSEC, μέσω επαναφοράς της βαλβίδας εναλλαγής στη θέση εισαγωγής. Έπειτα πραγματοποιείται εισαγωγή 250 µl διαλύματος 8 mM EDTA, 0.5 M CH₃COONH₄, pH 7.0, στον βρόγχο και έγχυση αυτού στο σύστημα 20 δευτερόλεπτα μετά την εισαγωγή της στήλης

dcSEC, μέσω της εναλλαγής της βαλβίδας εισαγωγής δείγματος στη θέση inject. Τέλος, η βαλβίδα εισαγωγής επαναφέρεται στη θέση load και εκπλένεται εκ νέου.

Η έκχυση διαλύματος EDTA πραγματοποιείται για την απομάκρυνση και τον προσδιορισμό της ποσότητας των μετάλλων του δείγματος, που παρέμεινε προσδεμένο στις χρωματογραφικές στήλες, αλλά και την προετοιμασία του συστήματος για την έγχυση του επόμενου δείγματος.

Πίνακας 11: Πρόγραμμα διαλυτών και έκλυσης μεθόδου dcSEC-AF-ICP-MS.

Χρόνος (min)	Switching valve	Στήλες on-line	Buffer A %	Buffer B%
0-30	Θέση 1	dcSEC- Blue-HP	100	0
30-50	Θέση 2	Blue-HP	0	100
50-52	Θέση 1	Blue-HP	100	0
52-75 (52min + 20s: EDTA injection)	Θέση 1	dcSEC- Blue-HP	100	0

2.5.3.3 Πειραματική διαδικασία μεθόδου SEC -ICP-MS.

Πριν την διεξαγωγή αναλύσεων με την μέθοδο SEC -ICP-MS, πραγματοποιείται η διαδικασία έκπλυσης της αντλίας χρωματογραφίας και του ελέγχου της καλής λειτουργίας του ICP-MS, όπως αναφέρεται στην Παράγραφο 2.5.3.2.

Για την ανάλυση των πρότυπων διαλυμάτων αλλά και των δειγμάτων με την μέθοδο SEC-ICP-MS ακολουθείται η παρακάτω πειραματική διαδικασία.

Ποσότητα δείγματος (250 μl) εισάγεται στον βρόγχο, με την βαλβίδα εισαγωγής δείγματος να βρίσκεται στη θέση load. Η βαλβίδα εναλλάσσεται στην θέση inject, για την έκχυση του δείγματος στη στήλη-και ξεκινά η καταγραφή του χρωματογραφήματος της ανάλυσης, μέσω του λογισμικού Syngistics. Μετά την έγχυση του δείγματος πραγματοποιείται έκπλυση της σύριγγας με υπερκάθαρο H₂O, διάλυμα 2% HNO₃, διάλυμα 10% CH₃OH και εκ νέου H₂O. Η κινητή φάση που παρέχεται από την αντλία καθόλη τη διάρκεια της ανάλυσης είναι το Buffer A. Μετά το πέρας των 10 λεπτών, η ανάλυση έχει ολοκληρωθεί και η βαλβίδα εισαγωγής επαναφέρεται στη θέση load και εκπλένεται εκ νέου.

Μετά το τέλος των αναλύσεων και στις δύο μεθόδους πραγματοποιείται καθαρισμός του συστήματος χρωματογραφίας μέσω της διέλευσης διαλύματος CH₃CH₂OH 10%, για την απομάκρυνση πρωτεϊνών που έχουν συσσωματωθεί στις στήλες. Να σημειωθεί πως το διάλυμα CH₃CH₂OH 10% περιέχει σημαντικές ποσότητες μεταλλικών ιόντων, επομένως κρίνεται απαραίτητο στην αρχή της πειραματικής ημέρας, έπειτα από την εξισορρόπηση του συστήματος με το Buffer A και τη σύζευξη του με το ICP-MS, να πραγματοποιούνται εγχύσεις διαλύματος EDTA έως ότου διαπιστωθεί η απομάκρυνση της περίσσειας των ιόντων.

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα – Συζήτηση

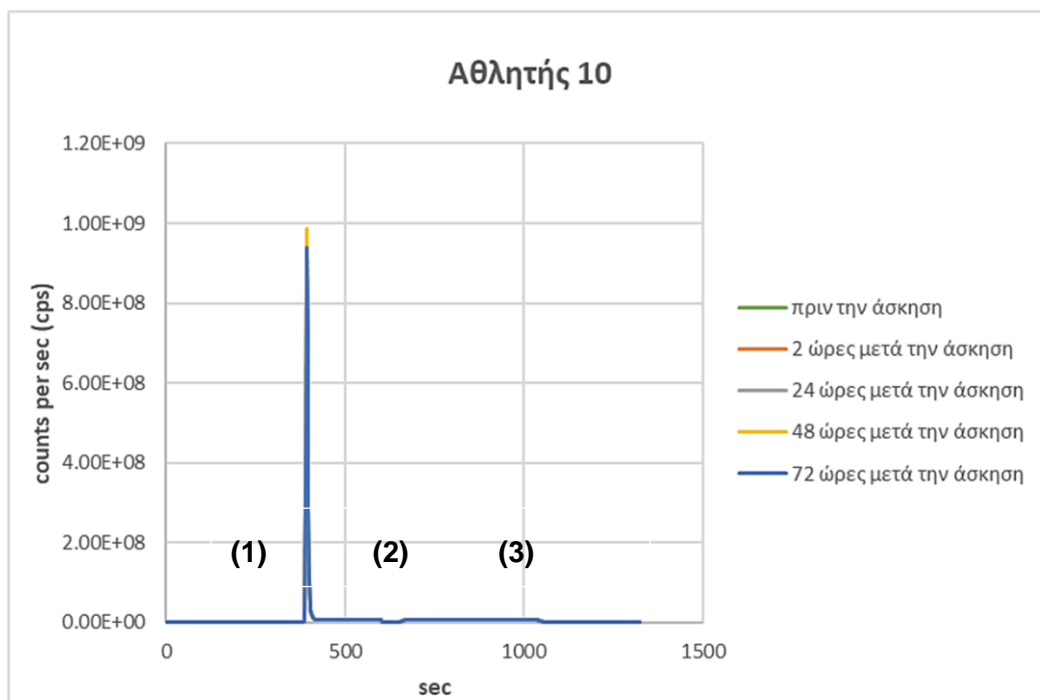
3.1 Μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος.

3.1.1 Mg – αλβουμίνη και Ca – αλβουμίνη

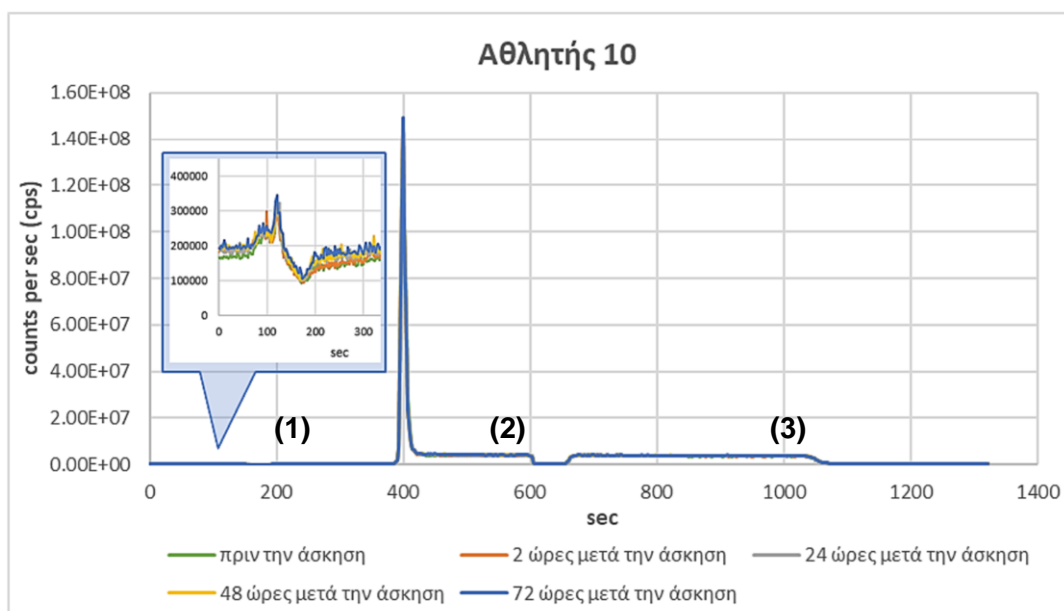
3.1.1.1 Ανάπτυξη βελτιωμένου αναλυτικού συστήματος προσδιορισμού μεταλλοπρωτεϊνών με τις συστάσεις προηγούμενης μελέτης.

Τα δείγματα ορού αίματος αθλητών που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία, είχαν αναλυθεί και σε προηγούμενη μελέτη που διεξήχθη στο ίδιο εργαστήριο από την κα. Τρασανίδου Λ. στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδικευσής της⁷¹. Στην μελέτη αυτή, πραγματοποιήθηκε μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιώντας την χρωματογραφική στήλη χημικής συγγένειας Heparin-HP ακολουθούμενη από την Blue-HP και ανίχνευση των μετάλλων με τη χρήση του ICP-MS. Στην πλειονότητα των χρωματογραφημάτων των στοιχείων που αναλύθηκαν εκτενώς, προέκυψαν τρία κλάσματα: (1) τα χημικά είδη (μεταλλοπρωτεΐνες ή άλλα μόρια που αλληλεπιδρούν με το εκάστοτε μέταλλο) που δεν αλληλεπιδρούν με καμία από τις χρησιμοποιούμενες στήλες, (2) τα χημικά είδη που αλληλεπιδρούν ισχυρά με την Heparin-HP, (3) τα χημικά είδη που αλληλεπιδρούν ισχυρά με την Blue-HP.

Στα χρωματογραφήματα του Mg και του Ca, δεν παρατηρήθηκε έκλυση ποσότητας μετάλλων στο κλάσμα που περιέχεται η αλβουμίνη. Είναι γνωστό ότι η μεγαλύτερη ποσότητα Mg και Ca στον ορό ανθρώπινου αίματος βρίσκεται προσδεμένη στα μόρια της αλβουμίνης²¹. Η αλβουμίνη εμφανίζει υψηλή χημική συγγένεια με τη στήλη Blue-HP, επομένως στο τρίτο κλάσμα έκλυσης θα έπρεπε να περιέχεται μεγάλη ποσότητα των δύο μετάλλων. Αυτό όμως δεν παρατηρήθηκε, όπως διαπιστώνεται και από τις Εικόνα 10 και Εικόνα 11. Ενώ το γεγονός αποδόθηκε στην αποδέσμευση των ιόντων Mg(II) και Ca(II) από την πρωτεΐνη κατά την διέλευση της από τη στήλη Heparin-HP, λόγω των αρνητικά φορτισμένων σουλφονικές που περιέχει.⁶⁰



Εικόνα 10: Συγκεντρωτικό γράφημα των χρωματογραφημάτων του ^{24}Mg για τον ορό αίματος του Αθλητή 10, πριν και μετά την άσκηση, όπως προέκυψε από την προηγούμενη μελέτη.⁷¹ Χημικές ενώσεις οι οποίες (κλάσμα 1) δεν αλληλεπιδρούν με καμία από τις χρησιμοποιούμενες στήλες, (κλάσμα 2) αλληλεπιδρούν ισχυρά με την Heraqin-HP, (κλάσμα 3) αλληλεπιδρούν ισχυρά με την Blue-HP.



Εικόνα 11: Συγκεντρωτικό γράφημα των χρωματογραφημάτων του ^{44}Ca για τον ορό αίματος του Αθλητή 10, πριν και μετά την άσκηση, όπως προέκυψε από την προηγούμενη μελέτη.⁷¹ Χημικές ενώσεις οι οποίες (κλάσμα 1) δεν αλληλεπιδρούν με καμία από τις χρησιμοποιούμενες στήλες, (κλάσμα 2) αλληλεπιδρούν ισχυρά με την Heraqin-HP, (κλάσμα 3) αλληλεπιδρούν ισχυρά με την Blue-HP.

Για τη διατήρηση των ιόντων στο μόριο της αλβουμίνης, προτάθηκε, από την ίδια μελέτη, η χρήση της χρωματογραφικής στήλης Blue-HP, πριν από τη στήλη Heparin-HP, προκειμένου η αλβουμίνη να κατακρατηθεί σε αυτήν, και να μην διέλθει από την Heparin-HP.

Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της παραπάνω πρότασης, στην παρούσα εργασία, έλαβε χώρα τροποποίηση του συστήματος χρωματογραφίας, προκειμένου να περιλαμβάνει τη στήλη Blue-HP ακολουθούμενη από την Heparin-HP, και χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του προτύπου διαλύματος ορού αίματος, Seronorm. Οι υπόλοιπες παράμετροι (σύσταση κινητής φάσης, ροή κινητής φάσης, συνθήκες ICP-MS) διατηρήθηκαν σταθερές.

Το πρόγραμμα έκλουσης της προηγούμενης μεθόδου και της τροποποιημένης μεθόδου αναγράφεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 12).

Πίνακας 12: Πρόγραμμα έκλουσης μεθόδου Τρασανίδου και βελτιωμένη μέθοδος παρούσας εργασίας.

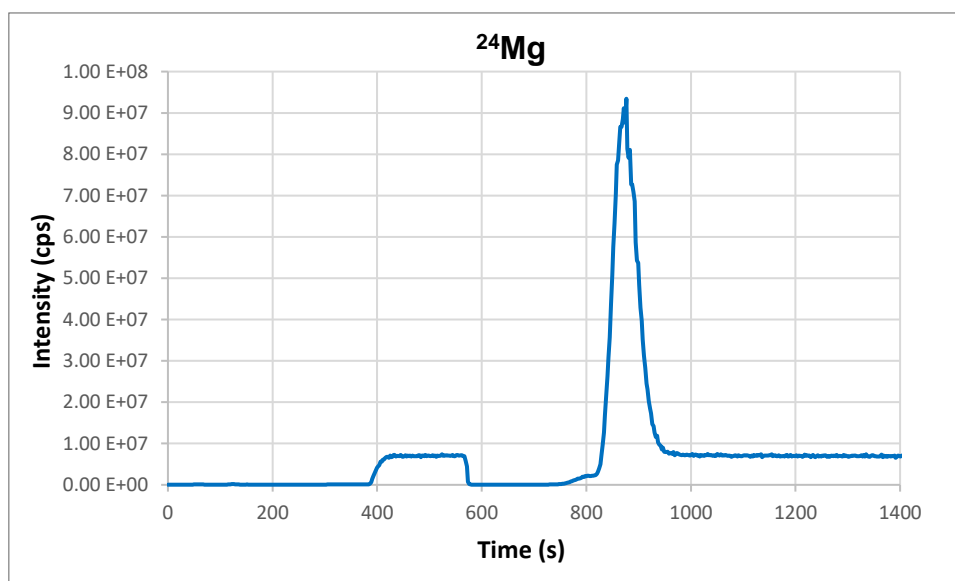
Χρόνος έκλουσης(min)	Τρασανίδου ⁷¹		Βελτιωμένη μέθοδος	
	Buffer *, **, ***	Στήλη on-line	Buffer	Στήλη on-line
0-5	A	Heparin-HP και Blue-HP	A	Blue-HP και Heparin-HP
5-10	B	Heparin -HP	B	Blue-HP
10-20	B	Heparin-HP και Blue-HP	B	Blue-HP και Heparin-HP
20-27	A	Heparin-HP και Blue-HP	A	Blue-HP και Heparin-HP

*Buffer A: Υδατικό διάλυμα CH₃COONH₄ 0.05 M, pH 7.0

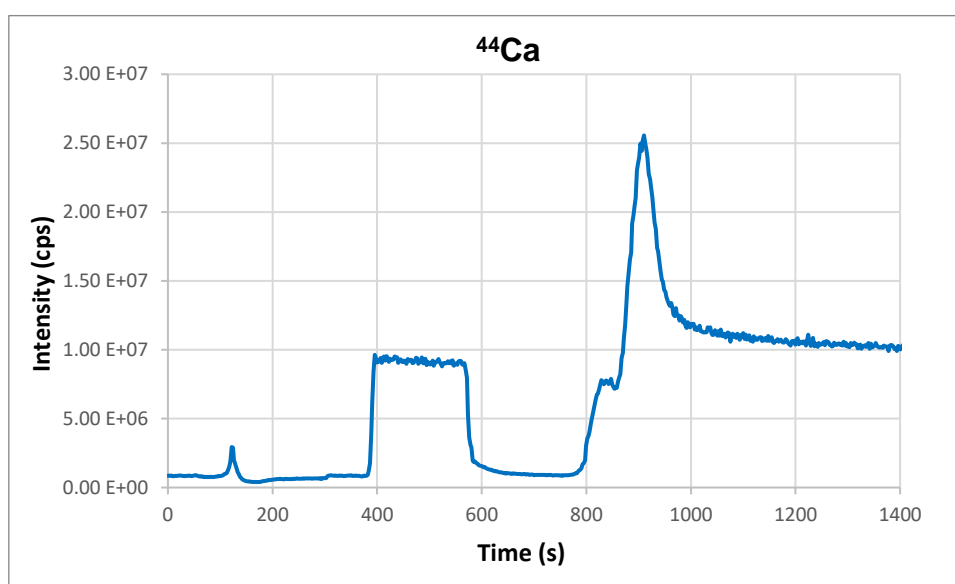
** Buffer B: Υδατικό διάλυμα CH₃COONH₄ 1.5 M, pH 7.0

***ροή κινητής φάσης (Buffer): 1 ml/min

Από την ανάλυση του προτύπου διαλύματος ορού αίματος με την τροποποιημένη μέθοδο, δεν ανιχνεύθηκε ποσότητα Ca ή Mg κατά την έκλουση της στήλης Blue-HP με το διάλυμα υψηλότερης ιοντικής ισχύος (Buffer B), δηλαδή στο κλάσμα που περιέχεται η αλβουμίνη (Εικόνα 12 και Εικόνα 13).



Εικόνα 12: Χρωματογράφημα ^{24}Mg από την ανάλυση Seronorm με την χρήση της Τροποποιημένης μεθόδου. (Standard mode).



Εικόνα 13: Χρωματογράφημα ^{44}Ca από την ανάλυση Seronorm με τη χρήση της Τροποποιημένης μεθόδου (Standard mode).

Η απουσία κορυφής για το Mg, στο κλάσμα που περιέχεται η αλβουμίνη, με αναμενόμενο χρόνο έκλουσης από τα 600 s μέχρι τα 1200 s (έκλουση Blue-HP με το Buffer B), υποδεικνύει πως η απομάκρυνση των ιόντων Mg από την αλβουμίνη δεν οφείλεται αποκλειστικά στην στήλη Heparin-HP. Παράλληλα, η κορυφή Mg, που αντιστοιχεί στην στήλη αυτή κατά την έκλουση της με Buffer B, επιβεβαιώνει την ισχυρή αλληλεπίδραση των ιόντων Mg με την ηπαρίνη. Αντιστοίχως, και για τα ιόντα Ca(II).

3.1.2 Έλεγχος αλληλεπίδρασης δείγματος πρότυπου ορού αίματος με τη στήλη Blue – HP

Για την περαιτέρω μελέτη της αλληλεπίδρασης των δειγμάτων ορού αίματος με την στήλη Blue-HP, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του προτύπου διαλύματος ορού αίματος, Seronorm, μόνο με τη συγκεκριμένη χρωματογραφική στήλη. Το πρόγραμμα έκλουσης παρατίθεται στον Πίνακα 13. Οι υπόλοιπες χρωματογραφικές συνθήκες διατηρήθηκαν σταθερές.

Πίνακας 13: Πρόγραμμα έκλουσης στήλης Blue-HP για την ανάλυση δείγματος ορού αίματος.

Χρόνος έκλουσης(min)	Buffer *, **, ***	Στήλη on-line
0-12	A	Blue-HP
12-24	B	Blue-HP
24-27	A	Blue-HP

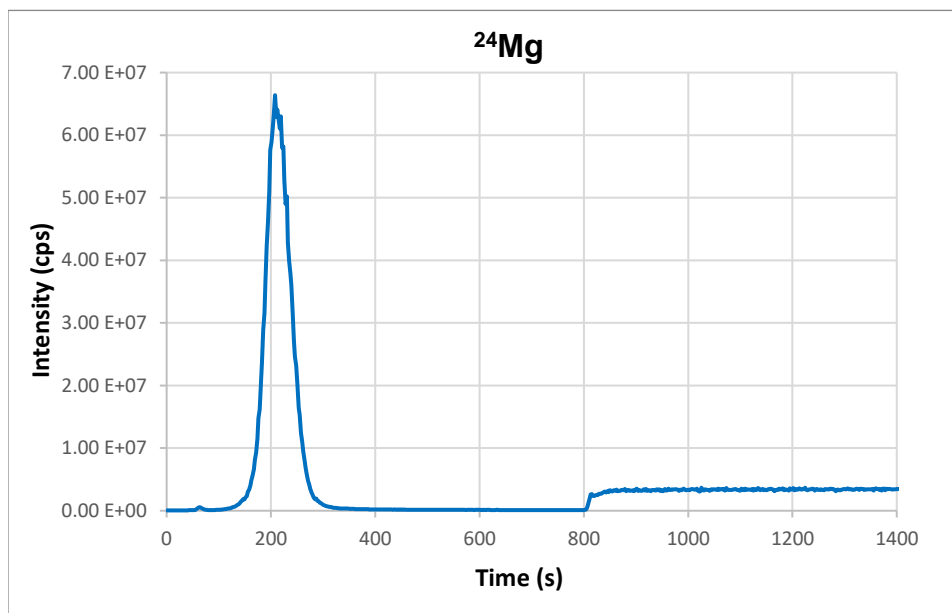
*Buffer A: Υδατικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0.05 M, pH 7.0

**Buffer B: Υδατικό διάλυμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 1.5 M, pH 7.0

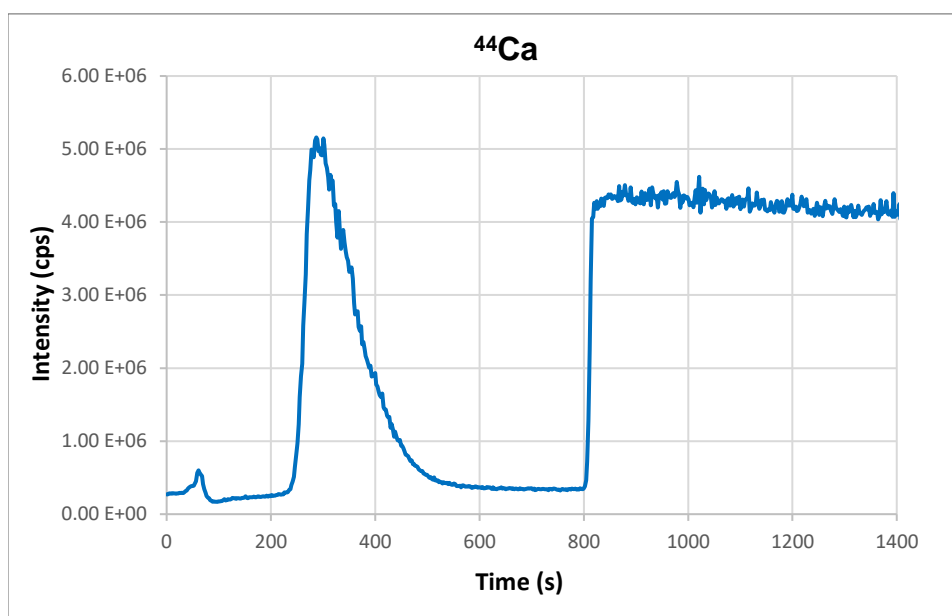
***ροή κινητής φάσης (Buffer): 1 ml/min

Τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν για τα στοιχεία Mg, Ca, Se, Fe, Co, Cu, Ni και Zn παρατίθενται στο Παράρτημα 6.3.

Τα ιόντα Mg(II) και Ca(II) έχουν παραπλήσια και χαμηλή συγγένεια με τα μόρια της αλβουμίνης, η σύνδεσή τους σε αυτήν είναι μη ομοιοπολική και πραγματοποιείται μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τα αρνητικά φορτία, που φέρει η επιφάνεια της πρωτεΐνης.³⁹ Στα αντίστοιχα χρωματογραφήματα παρατηρείται πως το Mg και το Ca εκκλύονται από την στήλη Blue-HP με Buffer A (στα 210 και 300 s, αντίστοιχα), ενώ η έκλυση της αλβουμίνης απαιτεί την χρήση ρυθμιστικού διαλύματος μεγαλύτερης ιοντικής ισχύς και διαθέτει αναμενόμενο χρόνο έκλυσης μεταξύ 800 s και 1440 s, περίπου.

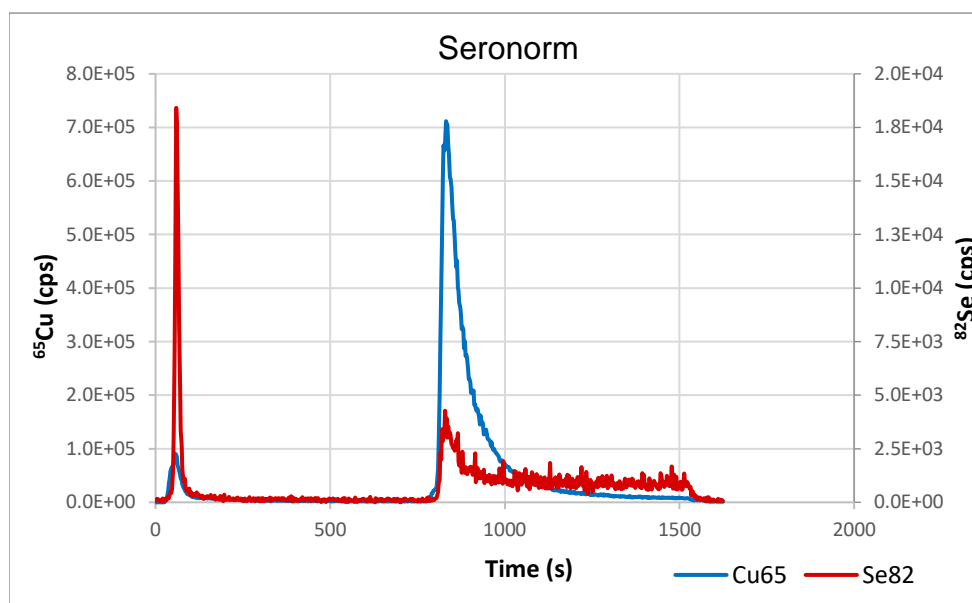


Εικόνα 14: Χρωματογράφημα ^{24}Mg από την ανάλυση Seronorm με την στήλη Blue-HP(Standard mode).



Εικόνα 15: Χρωματογράφημα ^{44}Ca από την ανάλυση Seronorm με την στήλη Blue-HP. (Standard mode)

Αντιθέτως, το Se, που είναι ομοιοπολικά προσδεμένο στην αλβουμίνη, καθώς και μέταλλα όπως ο Cu, τα οποία εμφανίζουν υψηλή χημική συγγένεια με αυτήν,³⁹ ανιχνεύονται στο κλάσμα που περιέχεται η αλβουμίνη.



Εικόνα 16: Συγκεντρωτικό γράφημα των χρωματογραφημάτων του ^{65}Cu και του ^{82}Se από την ανάλυση Seronorm με την στήλη Blue-HP. (Standard mode)

Τα ιόντα $\text{Mg}(\text{II})$ και $\text{Ca}(\text{II})$ έχουν παραπλήσια και χαμηλή συγγένεια με τα μόρια της αλβουμίνης, η σύνδεσή τους σε αυτήν είναι μη ομοιοπολική και πραγματοποιείται μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τα αρνητικά φορτία, που φέρει η επιφάνεια της πρωτεΐνης.³⁹ Συμπερασματικά, σύμφωνα με τις παραπάνω παρατηρήσεις, η απουσία των ιόντων $\text{Mg}(\text{II})$ και $\text{Ca}(\text{II})$ από το κλάσμα της αλβουμίνης θα μπορούσε να αποδοθεί σε απομάκρυνση τους από την αλβουμίνη κατά την κατακράτηση της στην στήλη Blue-HP, λόγω της διέλευσης του Buffer A για μεγάλο χρονικό διάστημα.

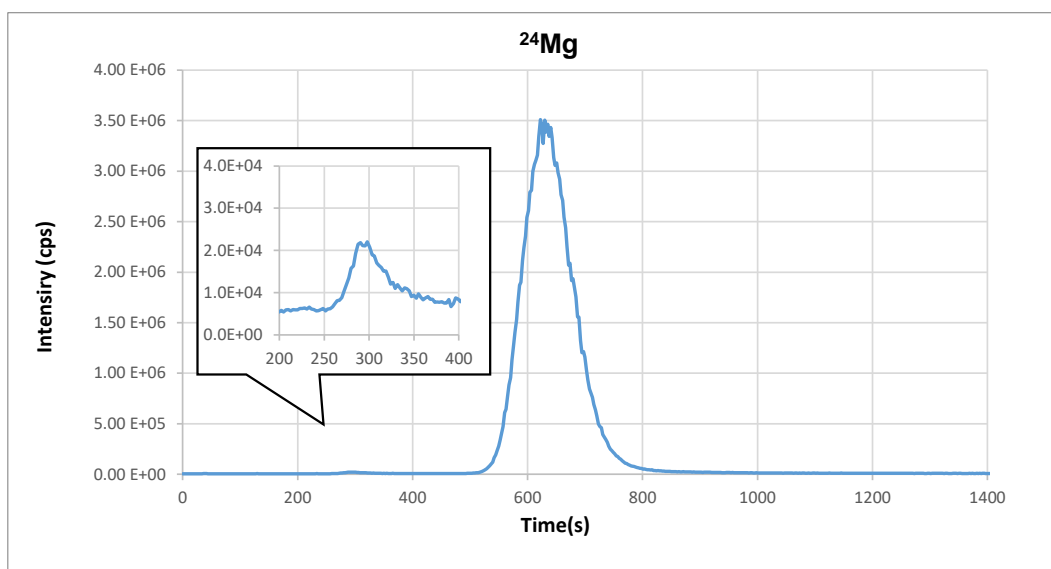
3.1.3 Έλεγχος αλληλεπίδρασης δείγματος ορού αίματος με τη διπλή στήλη Desalting Hi-Trap HP (SEC στήλη) και επίδρασης pH κινητής φάσης στο χρωματογραφικό προφίλ των στοιχείων.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παραπάνω υπόθεση, πραγματοποιήθηκε ανάλυση δείγματος ορού αίματος Αθλητή με τη διπλή στήλη Desalting Hi-Trap HP (dcSEC). Συγκεκριμένα, αναλύθηκε το δείγμα του Αθλητή 16 (6-BL-48), με την χρήση του Buffer A για 30 λεπτά.

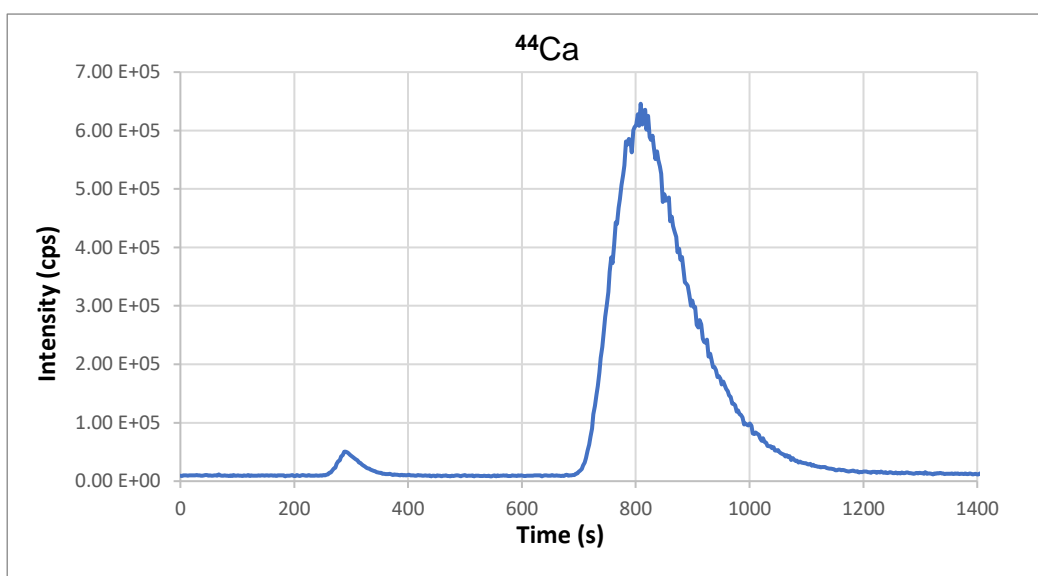
Η αλβουμίνη διαθέτει μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 5 kDa (66 kDa), συνεπώς αναμένεται να εκλουστεί στον κενό όγκο της στήλης άρα η αλληλεπίδραση της με το Buffer A είναι η ελάχιστη δυνατή.

Τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν για τα στοιχεία Mg, Ca, Se, Fe, Co, Cu, Ni και Zn παρατίθενται στο Παράρτημα 6.4.

Στα χρωματογραφήματα της πλειονότητας των στοιχείων παρατηρείται η έκλυση δύο κλασμάτων. Από το χρόνο κατακράτησης του κάθε κλάσματος (300 s και >645 s, αντίστοιχα) προκύπτει πως το πρώτο κλάσμα αντιστοιχεί στα μέταλλα που αλληλεπιδρούν με μακρομόρια, όπου και περιλαμβάνεται η αλβουμίνη, ενώ το δεύτερο κλάσμα αντιστοιχεί σε χημικά είδη των μετάλλων μοριακού βάρους μικρότερο των 5 kDa.



Εικόνα 17: Χρωματογράφημα ^{24}Mg από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος του Αθλητή 6 (6-BL-48) με τη διπλή στήλη HiTrap Desalting (He mode: 2 ml/min)



Εικόνα 18: Χρωματογράφημα ^{44}Ca από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος του Αθλητή 16 (6-BL-48) με τη διπλή στήλη HiTrap Desalting (He mode: 2 ml/min)

Από τα χρωματογραφήματα του Mg και του Ca (Εικόνα 17 και Εικόνα 18, αντίστοιχα), παρατηρείται πως η κορυφή που αντιστοιχεί στα δεσμευμένα, από μακρομόρια, μέταλλα είναι πολύ μικρής έντασης, γεγονός που υποδεικνύει πως η

απουσία των ιόντων αυτών από τα μόρια της αλβουμίνης δεν μπορεί να αποδοθεί, σε απομάκρυνση τους λόγω εκτεταμένης επαφής της πρωτεΐνης με το Buffer A. Δεν μπορεί όμως να αποκλειστεί η ταχύτερη απομάκρυνση του παρούσα του Buffer A.

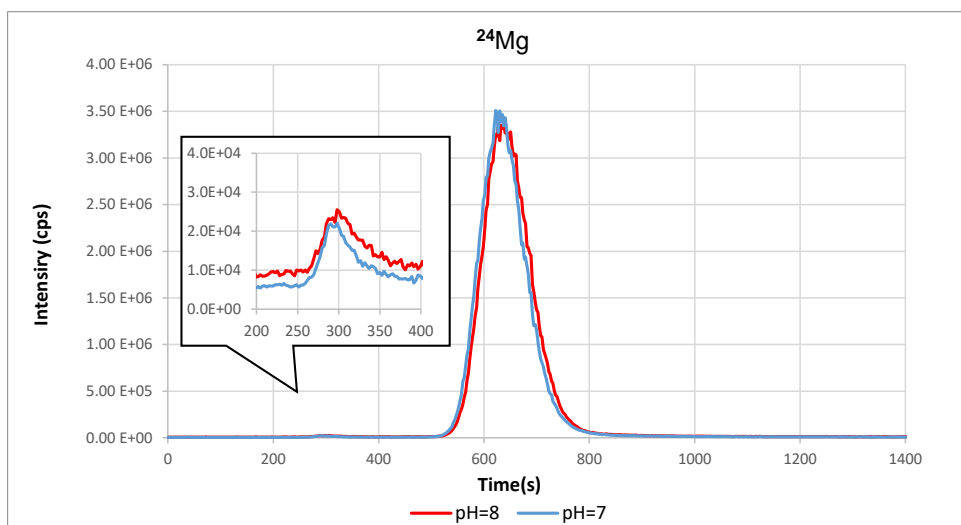
Επίσης δεν μπορεί να αποκλειστεί πως τα ιόντα Mg(II) και Ca(II), δεν είναι συνδεδεμένα στα μόρια της αλβουμίνης εντός του δείγματος, πριν την ανάλυση. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη μη ιδανική κατάσταση των δειγμάτων, λόγω του μεγάλου αριθμού κύκλων ψύξης-απόψυξης και του μεγάλου χρόνου αποθήκευσής τους.

Συμπερασματικά, από τα παραπάνω προκύπτει πως τα ιόντα Mg και Ca, είτε δεν βρίσκονται συνδεδεμένα στα μόρια της αλβουμίνης εντός του δείγματος, πριν την ανάλυση, είτε απομακρύνονται ταχύτερα από αυτά, εντός του χρωματογραφικού συστήματος. Στην πρώτη περίπτωση η απομάκρυνση των ιόντων οφείλεται στην μη ιδανική κατάσταση των δειγμάτων, λόγω του μεγάλου αριθμού κύκλων ψύξης-απόψυξης του μεγάλου χρόνου αποθήκευσης τους. Στην δεύτερη περίπτωση η απομάκρυνση των ιόντων οφείλεται στην σύσταση της κινητής φάσης.

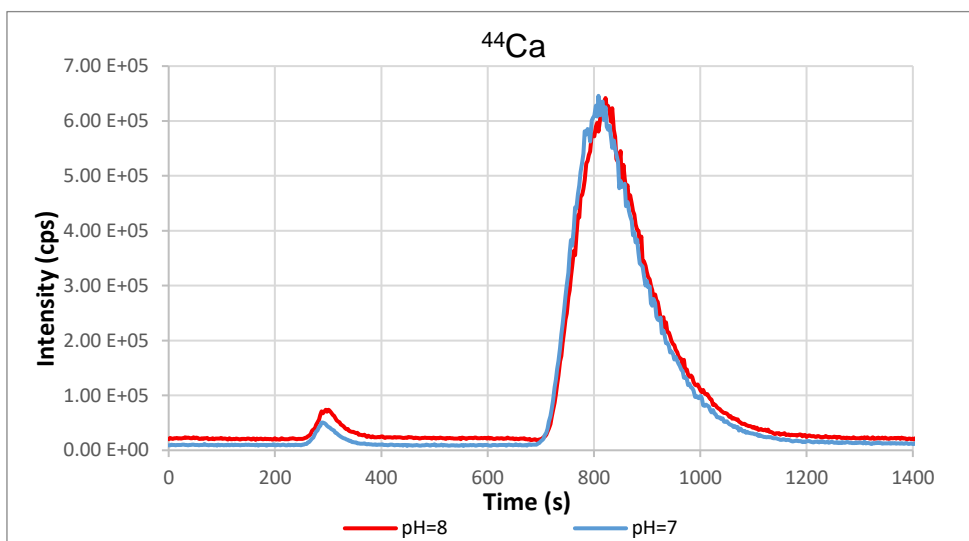
Σύμφωνα με μελέτη⁷⁷, όπου διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση της αλβουμίνης με τα ιόντα Mg και Ca, μέσω της ακινητοποίησης μορίων αλβουμίνης σε στατική φάση και διέλευση ιοντικών διαλυμάτων, προέκυψε πως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ Mg ή Ca και αλβουμίνης δεν επηρεάζονται από τη θερμοκρασία της χρωματογραφικής στήλης ή την ιοντική ισχύ της κινητής φάσης, όταν αυτές κυμαίνονται μεταξύ 10-30 °C και $8.25 \cdot 10^{-4}$ M φωσφορικού αμμωνίου, αντίστοιχα. Παρότι, η ισχύς της αλληλεπίδρασης των ιόντων με την αλβουμίνη βρέθηκε ανεξάρτητη του μεγάλου εύρους pH της κινητής φάσης, αρνητική επίδραση, παρατηρήθηκε όταν η τιμή του pH βρίσκεται μεταξύ 7.0-7.5, λόγω της ισορροπίας της αλβουμίνης μεταξύ μιας διατεταγμένης και αποδιατεταγμένης δομής.

Για την διερεύνηση της επίδρασης του pH της κινητής φάσης στο χρωματογραφικό προφίλ των στοιχείων και ειδικότερα του Mg και του Ca, η ανάλυση του προηγούμενου δείγματος επαναλήφθηκε, με την χρήση Buffer A, του οποίου το pH ρυθμίστηκε στο 8.0, μέσω προσθήκης ποσότητας NH_4OH . Η συγκεκριμένη τιμή επιλέχθηκε, διότι βρίσκεται εκτός του εύρους 7.0-7.5 και παράλληλα κοντά στο φυσιολογικό pH συνεπώς δεν αναμένεται να προκαλέσει δραστικές αλλαγές στην δομή των πρωτεϊνών, οι οποίες θα οδηγούσαν σε σημαντικές απώλειες μετάλλων.⁷⁸

Συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα της ανάλυσης του ίδιου δείγματος, με κινητή φάση ίδιας ιοντικής ισχύος αλλά διαφορετικού pH (pH 7.0 και 8.0, αντίστοιχα), δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στο προφίλ της Mg ή του Ca. Αντίστοιχα, με την αύξηση του pH της κινητής φάσης, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στο χρωματογραφικό προφίλ των υπόλοιπων μετάλλων (Se, Fe, Co, Cu, Ni και Zn). Επομένως, η τιμή του pH της χρησιμοποιούμενης κινητής φάσης (pH 7.0) δεν συμβάλλει στην απομάκρυνση του Mg(II) και του Ca(II) από τα μόρια της αλβουμίνης. Τα χρωματογραφήματα παρατίθενται στο Παράρτημα 6.5.



Εικόνα 19: Συγκενρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων Mg από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος του Αθλητή 16 (6-BL-48) με τη διπλή στήλη HiTrap Desalting και Buffer A με pH 7.0 και 8.0, αντίστοιχα. (He mode: 2 ml/min)



Εικόνα 20: Συγκενρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων Ca από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος του Αθλητή 16 (6-BL-48) με τη διπλή στήλη HiTrap Desalting και Buffer A με pH 7.0 και 8.0, αντίστοιχα. (He mode: 2 ml/min)

Το είδος του άλατος, που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή της κινητής φάσης (Buffer A), είναι διαφορετικό από εκείνο που χρησιμοποιήθηκε στην προαναφερθείσα μελέτη⁷⁷ και παράλληλα η συγκέντρωσή της (0,05 M) είναι υψηλότερη από το εύρος όπου η αλληλεπίδραση μεταξύ Mg (ή Ca)-αλβουμίνης βρέθηκε πως παραμένει σταθερή (8.25 - 25.25×10⁻⁴ M). Επομένως, κρίνεται απαραίτητη η διερεύνηση της επίδρασης της ιοντικής ισχύς του Buffer A στο χρωματογραφικό προφίλ του Mg και του Ca, σε δείγματα ορού ανθρώπινου αίματος.

3.2 Σύγκριση επίδρασης των διαφορετικών λειτουργιών του της καθολικής κυψελίδας (universal cell) στην μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος.

3.2.1 Σύγκριση Συμβατικής Λειτουργίας, Λειτουργίας με He και Λειτουργίας με O₂ για την ανίχνευση μετάλλων.

Ο ορός αίματος, όπως και η πλειονότητα των βιολογικών δειγμάτων, περιέχει μεγάλη πληθώρα χημικών ενώσεων σε σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εκείνες των περιεχόμενων μετάλλων. Η πολύπλοκη μήτρα των δειγμάτων δύναται να προκαλέσει τον σχηματισμό πολυατομικών ισοβαρικών παρεμποδίσεων για τα στοιχεία που αναλύονται, με αποτέλεσμα τον περιορισμό των ορίων ανίχνευσης και της αξιοπιστίας της ανάλυσης. Οι λειτουργίες του universal cell χρησιμοποιούνται για την καταστολή αυτών των παρεμποδίσεων.⁶⁵

Για την διερεύνηση της παρουσίας πολυατομικών παρεμποδίσεων για τα στοιχεία που μελετώνται στην παρούσα εργασία (Ca, Mg, Fe, Co, Cu, Ni και Zn) καθώς και της επίδρασης των διαφορετικών λειτουργιών του universal cell στη μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση ενός δείγματος ορού αίματος αθλητή σε Συμβατική λειτουργία (Standard mode), Λειτουργία με He (He mode) και Λειτουργία με O₂ (O₂ mode). Συγκεκριμένα, το δείγμα ορού αίματος του Αθλητή 6 (32-BL-72) αναλύθηκε, με την μέθοδο, που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία (dcSEC-AF-ICP-MS), για κάθε μια από τις συνθήκες λειτουργίας του universal cell, που παρατίθενται στον Πίνακα 14.

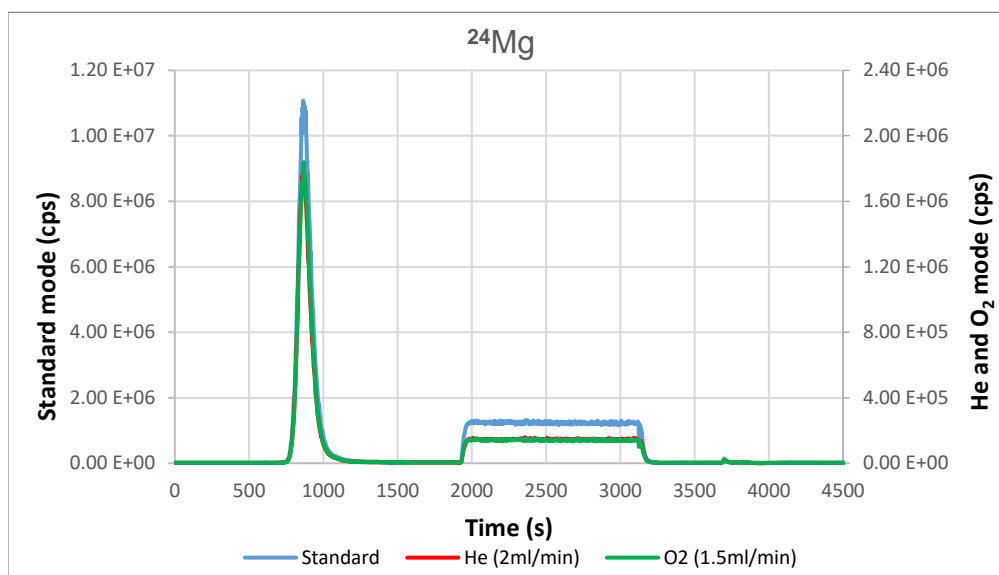
Πίνακας 14: Παράμετροι λειτουργίας του universal cell.

Λειτουργία κυψελίδας	Αέριο	Ροή αερίου (ml/min)
Standard mode	-	-
He mode	Ήλιο	2
O ₂ mode	Οξυγόνο	1.5

Στις παραπάνω αναλύσεις, για την εισαγωγή του εκλούσματος στο ICP-MS χρησιμοποιήθηκε κωνικός θάλαμος εκνέφωσης με σφαιρίδιο πρόσκρουσης και τα συγκεντρωτικά γραφήματα των χρωματογραφημάτων των στοιχείων Ca, Mg, Se, Fe, Co, Cu, Ni και Zn, που προέκυψαν, παρατίθενται στο Παράρτημα 6.6.

Στο χρωματογράφημα του ²⁴Mg (Εικόνα 21), παρατηρείται σημαντική μείωση του υποβάθρου αλλά και της έντασης της κορυφής με τη χρήση αερίου He ή O₂. Αντίστοιχη μείωση παρατηρείται και στα χρωματογραφήματα των υπόλοιπων στοιχείων. Στην περίπτωση του He mode, η πτώση του σήματος μπορεί να αποδοθεί στην μείωση της κινητικής ενέργειας των ατομικών ιόντων του εκάστοτε αναλύτη, λόγω των συγκρούσεων με τα άτομα του He. Η μείωση της κινητικής ενέργειας του αναλύτη καθιστά αδύνατη τη διαπέραση του ενεργειακού φράγματος, που υφίσταται στην έξοδο

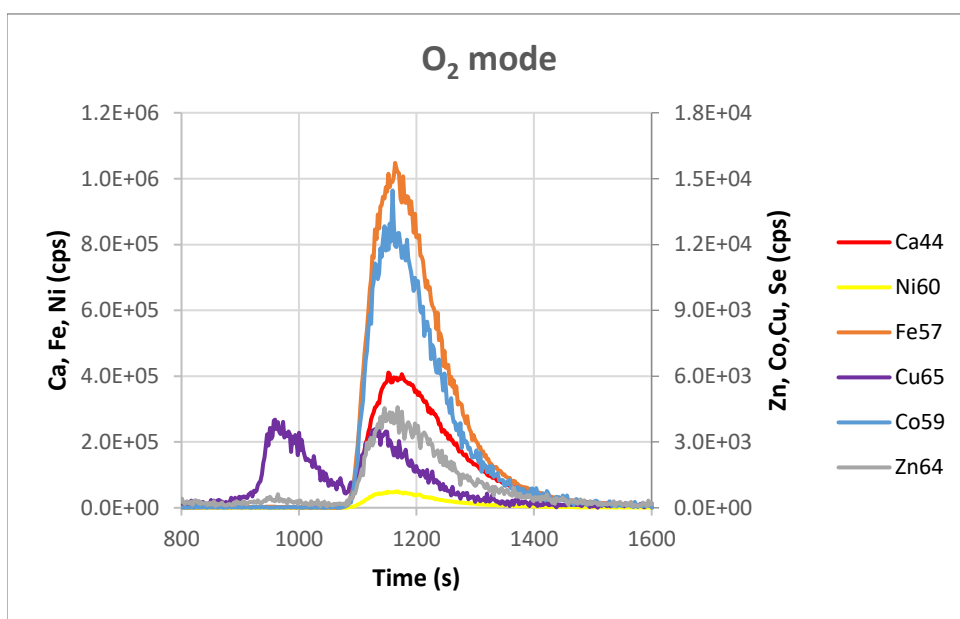
της κυψελίδας, και κατ'επέκταση την άφιξή τους στον ανιχνευτή. Αντίθετα, στην περίπτωση του O₂ mode, το αέριο O₂ αντιδρά με τον αναλύτη ή με παρεμποδιστικά στοιχεία, με αποτέλεσμα μέρος της ποσότητας τους να μετατρέπεται στα αντίστοιχα οξείδια. Τα οξείδια του, έχοντας μεγαλύτερη μάζα, δεν ανιχνεύονται στον αντίστοιχο λόγο μάζας/φορτίου (m/z) του αναλύτη.



Εικόνα 21: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφμάτων ²⁴Mg από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος του Αθλητή 11 (32-BL-72), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS και τις λειτουργίες universal cell: Standard mode, He mode και O₂ mode, αντίστοιχα.

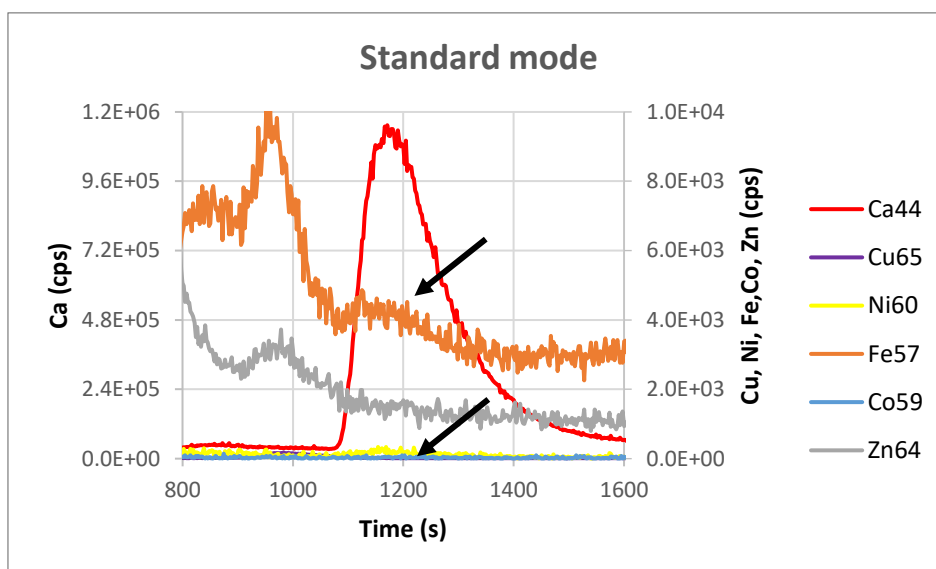
Στα χρωματογραφήματα των στοιχείων Ca, Ni, Co, Cu, Fe, και Zn, που προέκυψαν από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος, σε O₂ mode, παρατηρήθηκε η παρουσία μία κορυφής υψηλής έντασης μεταξύ 1070 s και 1400 s (Εικόνα 22).

Έπειτα από έλεγχο της ισοτοπικής αναλογίας, για καθένα από τα στοιχεία Ca, Ni, Cu, και Zn, διαπιστώθηκε πως η αναμενόμενη ισοτοπική αναλογία υφίσταται μόνο στην κορυφή που αντιστοιχεί για το Ca ($^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca} = 3.22$), συνεπώς η κορυφή που εμφανίζεται στην περιοχή αυτή στα υπόλοιπα χρωματογραφήματα δεν αντιστοιχεί σε ποσότητες των αντίστοιχων μετάλλων. Ο έλεγχος της ισοτοπικής αναλογίας δεν ήταν εφικτός στην περίπτωση του Co, διότι διαθέτει ένα ισότοπο (^{59}Co). Αντιστοίχως, ο έλεγχος δεν ήταν δυνατός για το Fe, διότι τα υπόλοιπα ισότοπα του (^{54}Fe , ^{56}Fe , ^{58}Fe) διαθέτουν σημαντικές πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις (Παράρτημα 6.2), οι οποίες περιέχουν οξυγόνο και προκαλούν αύξηση του υποβάθρου, καθιστώντας μην εφικτή την ανίχνευσή των ισωτόπων του Fe κατά τη χρήση της κυψελίδας αντίδρασης με αέριο οξυγόνο.

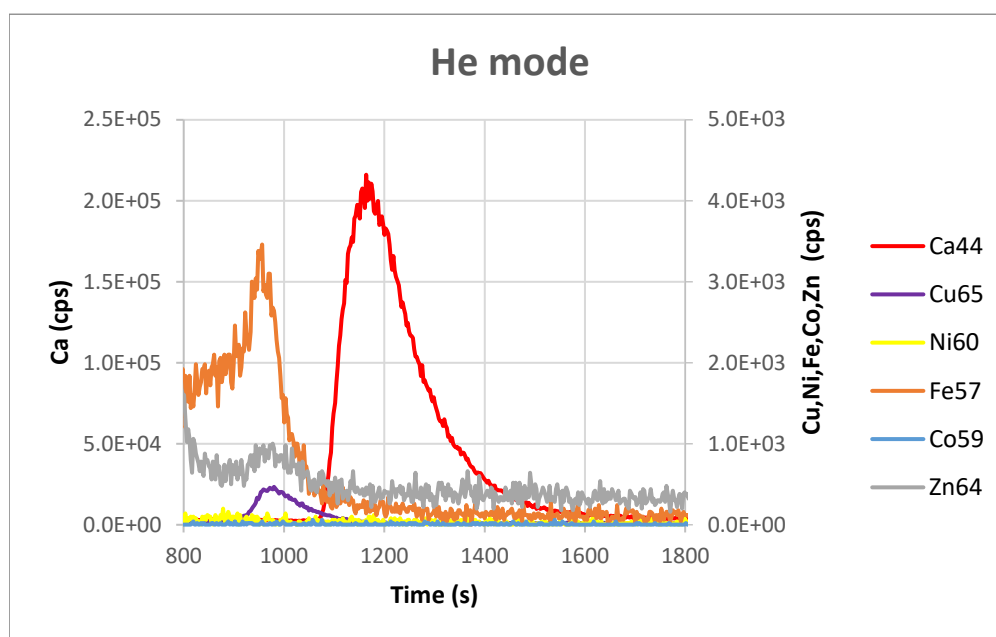


Εικόνα 22: Συγκεντρωτικό γράφημα περιοχής 800-1600 s των χρωματογραφημάτων των ισότοπων ^{44}Ca , ^{60}Ni , ^{57}Fe , ^{65}Cu , ^{59}Co και ^{64}Zn για το δείγμα ορού αίματος του Αθλητή 6 (32-BL-72), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS (O_2 mode).

Η παραπάνω κορυφή παρατηρείται και στα χρωματογραφήματα του Ca, που προέκυψαν από την ανάλυση του δείγματος ορού αίματος σε Standard και He mode. Αντιθέτως, στα χρωματογραφήματα των στοιχείων Ni, Co, Cu, Fe, και Zn η κορυφή απουσιάζει. Εξαίρεση αποτελεί το χρωματογράφημα του Fe και του Ni σε Standard mode, όπου η κορυφή είναι εμφανής, αλλά χαμηλής έντασης.



Εικόνα 23: Συγκεντρωτικό γράφημα περιοχής 800 - 1600 s των χρωματογραφημάτων των ισότοπων ^{44}Ca , ^{60}Ni , ^{57}Fe , ^{65}Cu , ^{59}Co και ^{64}Zn για το δείγμα ορού αίματος του Αθλητή 6 (32-BL-72), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS (Standard mode). Βέλη: κορυφές που οφείλονται σε πολλατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις.



Εικόνα 24: Συγκεντρωτικό γράφημα περιοχής 800 - 1600 s των χρωματογραφημάτων των ισότοπων ^{44}Ca , ^{60}Ni , ^{57}Fe , ^{65}Cu , ^{59}Co και ^{64}Zn για το δείγμα ορού αίματος του Αθλητή 6 (32-BL-72), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS (Standard mode).

Τα ισότοπα των στοιχείων Ni, Co, Cu, Fe, και Zn, στα οποία παρατηρείται κορυφή κατά την ανάλυση δείγματος ορού αίματος αθλητών σε O_2 mode, διαθέτουν πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις οξειδίων και υδροξειδίων του Ca (Πίνακας 15). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την μεγάλη ποσότητα Ca που εκλούεται στον ίδιο χρόνο, οδηγεί στο συμπέρασμα πως η κορυφή αυτή οφείλεται στα χημικά είδη του Ca, που προκύπτουν από την αντίδραση του με το αέριο O_2 στην κυψελίδα αντίδρασης. Η απουσία της κορυφής από τα χρωματογραφήματα της ανάλυσης σε Standard και He mode ενισχύει το παραπάνω συμπέρασμα.

Πίνακας 15: Οξείδια και υδροξείδια του Ca που αποτελούν ισοβαρικές παρεμποδίσεις για τα ισότοπα ^{60}Ni , ^{57}Fe , ^{65}Cu , ^{59}Co και ^{64}Zn , αντίστοιχα. ^{79, 80}

Ισότοπο	Ισοβαρικές πολυατομικές παρεμποδίσεις που περιέχουν Ca
^{60}Ni	$^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$
^{65}Cu	$^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$
^{64}Zn	$^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$
^{57}Fe	$^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$
^{59}Co	$^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, $^{42}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$

Η παρουσία της κορυφής στα χρωματογραφήματα του Fe και του Ni, που λήφθηκαν σε Standard mode, δύναται επίσης να αποδοθεί στα οξείδια του Ca, παρά

την απουσία οξυγόνου στο universal cell. Είναι γνωστό, πως στο σύστημα του ICP-MS, λόγω της ατελούς ατομοποίησης του δείγματος στο πλάσμα ή των αντιδράσεων ανασυνδυασμού των ιόντων κατά την μεταφορά τους στον αναλυτή μάζας, λαμβάνει χώρα σχηματισμός μικρής ποσότητας οξειδίων και άλλων πολυατομικών ιόντων.⁸¹ Ο σχηματισμός των οξειδίων ελέγχεται στην αρχή κάθε εργαστηριακής μέρας, μέσω του λόγου CeO^+/Ce^+ , ο οποίος προκύπτει από την ανάλυση ενός πρότυπου διαλύματος (Tuning solution) συγκέντρωσης Ce ίση με 1 ppb. Τιμές του λόγου CeO^+/Ce^+ μικρότερες του 0,03 θεωρούνται αποδεκτές για την διεξαγωγή ποσοτικών αναλύσεων με το σύστημα ICP-MS. Στην παρούσα ανάλυση, ο λόγος CeO^+/Ce^+ ήταν ίσος με 0,031 (3,1%), που κρίνεται οριακά αποδεκτός.

Τα οξείδια του Ca που αποτελούν παρεμπόδισης για τα ισότοπα ^{57}Fe και ^{60}Ni , περιλαμβάνουν τα μεγαλύτερης αφθονίας ισότοπα του, ^{40}Ca (96,94 %) και ^{44}Ca (2,09 %), αντίστοιχα. Συνεπώς, παρότι η ποσότητα των παραγόμενων οξειδίων στο σύστημα είναι μικρή, η ποσότητα των συγκεκριμένων οξειδίων του Ca είναι μεγαλύτερη των υπόλοιπων ισωτόπων του, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται ως κορυφές στα ισότοπα ^{57}Fe και ^{60}Ni .

Συμπερασματικά προκύπτει ότι, η παρουσία του Ca, σε υψηλές συγκεντρώσεις στα δείγματα ορού αίματος, καθιστά τα οξείδια και τα υδροξείδια του σημαντική ισοβαρική παρεμπόδιση των στοιχείων Ni, Fe, Cu, Co και Zn. Ο σχηματισμός των οξειδίων και των υδροξειδίων ευνοείται με την χρήση της κυψελίδας αντίδρασης με αέριο O_2 , επομένως αυτή η λειτουργία του universal cell, στις συγκεκριμένες συνθήκες ροής αερίου, κρίνεται ακατάλληλη για την πολυστοιχειακή μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος καθώς και δειγμάτων που αναμένεται να περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις Ca.

Κατά την ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος και άλλων δειγμάτων με υψηλές συγκεντρώσεις Ca, σε Standard mode, είναι πιθανό να παρουσιαστούν πλασματικές κορυφές για τα στοιχεία Ni, Fe, Cu, Co και Zn σε χρόνο που αντιστοιχεί στο χρόνο έκλουσης μεγάλης ποσότητας Ca. Το φαινόμενο αυτό είναι πιθανότερο για και το Ni και το Fe. Η διεξαγωγή μελέτης για την εύρεση των συγκεντρώσεων Ca και των παραμέτρων λειτουργίας του ICP-MS, στις οποίες δεν ευνοείται ο σχηματισμός των οξειδίων και υδροξειδίων του Ca, κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να μπορέσει η συγκεκριμένη λειτουργία να αξιοποιηθεί σε μεταλλοπρωτεωμικές αναλύσεις. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, η μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος συγκέντρωσης Ca περίπου 116 ppm, αναμένεται να οδηγήσει σε σφάλματα στην ανάλυση των στοιχείων Ni και Fe. Το Standard mode δύναται να αξιοποιηθεί σε μεταλλοπρωτεωμικές αναλύσεις δειγμάτων, που διαθέτουν χαμηλές συγκεντρώσεις Ca.

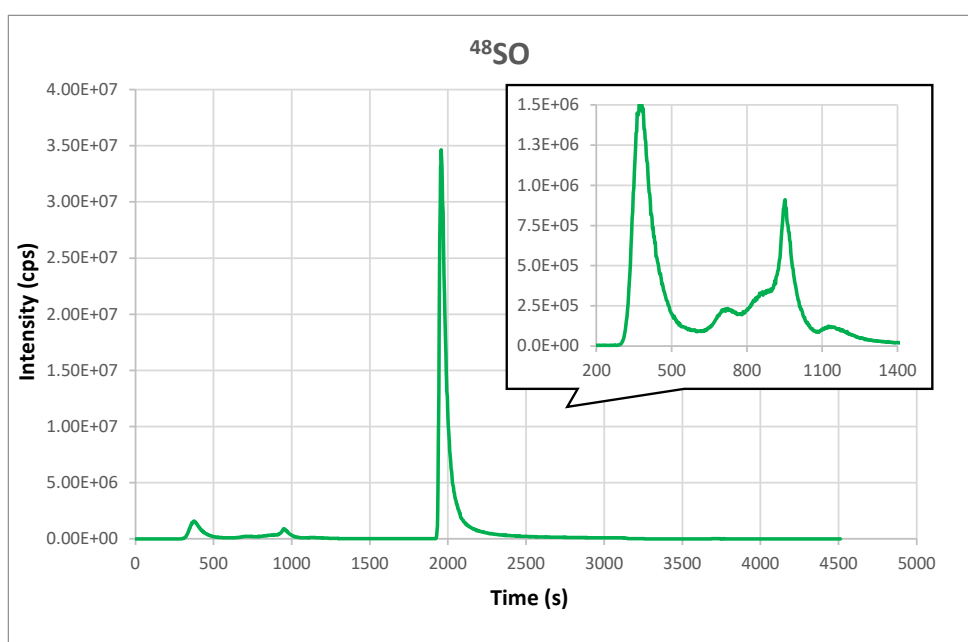
Με τη χρήση της κυψελίδας συγκρούσεων, για συγκέντρωση Ca περίπου 116 ppm⁷¹ και ροή He 2 ml/min, παρατηρήθηκε αποτελεσματική καταστολή των πολυατομικών ισοβαρικών παρεμποδίσσεων, επομένως κρίνεται η καταλληλότερη λειτουργία για τη μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος. Βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας η ροή He 2 ml/min κρίνεται επαρκής για την ανάλυση δειγμάτων με συγκεντρώσεις Ca έως και 116 ppm.

Να σημειωθεί πως η ποσοτικοποίηση του Ca στο δείγμα που αναλύθηκε για τις παραπάνω μελέτες, πραγματοποιήθηκε σε προηγούμενη μελέτη⁷¹ και όχι στην παρούσα εργασία.

3.2.2 Ανίχνευση πρωτεϊνών μέσω της παρουσίας του θείου.

3.2.2.1 Ανάλυση χρωματογραφήματος ⁴⁸SO (O₂ mode)

Για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με την χρήση του ICP-MS επιλέγεται η χρήση της κυψελίδας αντίδρασης με αέριο O₂ (O₂ mode) για την μετατροπή του θείου, που υφίσταται φυσικά στις πρωτεΐνες, σε ³²S¹⁶O και ανίχνευσή του σε λόγο m/z ίσο με 48, απαλλαγμένο από την πληθώρα παρεμποδίσεων που υφίστανται στα κύρια ισότοπα του S (³²S και ³⁴S).⁸²



Εικόνα 25: Χρωματογράφημα ⁴⁸SO από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος του Αθλητή 6 (32-BL-72), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε O₂ mode.

Στο παραπάνω χρωματογράφημα (Εικόνα 25) παρατηρείται η έκλυση ενός κλάσματος η οποία ξεκινά περίπου στα 300 s, χρόνος που αντιστοιχεί στον κενό όγκο του χρωματογραφικού συστήματος, επομένως υποδεικνύει την παρουσία πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους, οι οποίες δεν αλληλεπιδρούν με την χρωματογραφική στήλη Blue-HP. Η κορυφή του παραπάνω κλάσματος παρουσιάζει μικρή αλληλεπικάλυψη με το σύνολο των κορυφών του κλάσματος που ακολουθεί.

Στα 650 s έως τα 1050 s, παρατηρείται έκλυση ενός συνόλου κορυφών, οι οποίες εμφανίζουν εκτενή αλληλεπικάλυψη, και η ένταση τους εμφανίζει τοπικά μέγιστα στα 740 s (κορυφή α) και 955 s (κορυφή β). Η κορυφή β διαθέτει, σε χρόνο μικρότερο των 955 s, έναν ώμο ο οποίος δύναται να υποδεικνύει την παρουσία επιπλέον κορυφής μεταξύ των κορυφών α και β. Ο όγκος έκλυσης του συνόλου των κορυφών είναι μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο του όγκο της κινητής φάσης στην διπλή στήλη SEC, επομένως αντιστοιχεί σε πρωτεΐνες οι οποίες εμφανίζουν αλληλεπίδραση με τη στήλη

Blue-HP. Επιπλέον, παρατηρείται η έκλυση μιας ακόμη κορυφής, χαμηλής έντασης με μέγιστο στα 1160 s. Τα κλάσματα αυτά δύναται να αποδοθούν στις περιεχόμενες γλοβουλίνες του δείγματος καθώς και σε μόρια μικρότερου μοριακού βάρους που περιέχουν άτομα S, όπως τα αμινοξέα μεθειονίνη και κυστεΐνη.

Τέλος, παρατηρείται μια κορυφή υψηλής έντασης κατά την έκλυση της στήλης Blue-HP με την κινητή φάση υψηλής ιοντικής ισχύς (Buffer B), δηλαδή μεταξύ 1800 s και 2000 s. Σε αυτό το κλάσμα περιέχονται οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν πολύ ισχυρά με τη στήλη αυτή, όπως η αλβουμίνη που είναι μια πρωτεΐνη υψηλής αφθονίας.

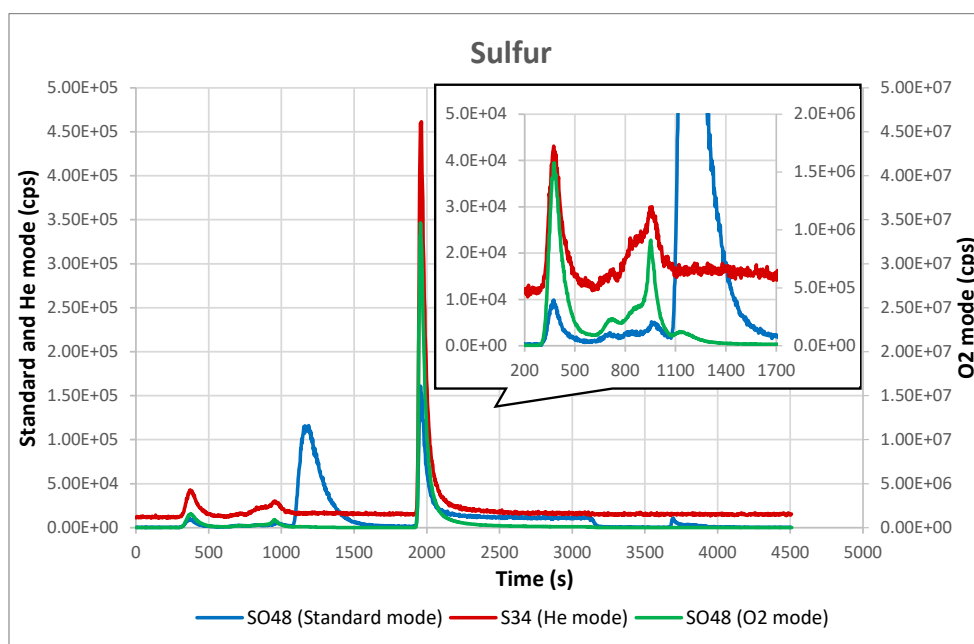
Λόγω της έλλειψης πρότυπων διαλυμάτων πρωτεϊνών, δεν είναι δυνατή η ακριβής ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που αντιστοιχούν σε κάθε κλάσμα. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την εκτενή αλληλεπικάλυψη των κορυφών, καθιστά αδύνατη την αντιστοίχιση μιας πρωτεΐνης σε κάθε κορυφή, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να πραγματοποιηθεί ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών μέσω της συγκέντρωσης του θείου που αντιστοιχεί σε κάθε χρωματογραφική κορυφή. Αλλά, ίσως είναι εφικτή μια ημιποσοτική εκτίμηση της συνολικής ποσότητας των πρωτεϊνών του δείγματος.

3.2.2.2 Σύγκριση O₂ mode, Standard mode και He mode για την ανίχνευση πρωτεϊνών μέσω του θείου.

Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών, όταν η ανάλυση πραγματοποιείται σε Standard mode, μπορεί να αξιοποιηθεί ο σχηματισμός της ποσότητας των οξειδίων που λαμβάνει χώρα στο πλάσμα αργού, προκειμένου η ποσότητα του S των πρωτεϊνών να ανιχνευθεί με την μορφή ³²S¹⁶O.

Αντίθετα με τις δύο προαναφερθείσες λειτουργίες του universal cell, στις αναλύσεις που εκτελούνται σε He mode, η παρακολούθηση του ³²S¹⁶O δεν είναι εφικτή, αφού αποτελεί πολυατομικό ιόν και το σήμα του καταστέλλεται, λόγω χρήσης της κυψελίδας συγκρούσεων. Σε αυτή την λειτουργία, είναι δυνατή η ανίχνευση του ³⁴S, καθώς πραγματοποιείται καταστολή των αντίστοιχων παρεμποδίσεων του.

Από το συγκεντρωτικό γράφημα που ακολουθεί (Εικόνα 26) είναι εμφανές πως η ένταση των κορυφών είναι σημαντικά μεγαλύτερη κατά την ανάλυση του δείγματος ορού αίματος σε O₂ mode. Στο χρωματογράφημα του ⁴⁸SO, από την ανάλυση σε Standard mode, παρατηρείται μια κορυφή πολύ υψηλής έντασης, η οποία εκλύεται σε χρόνο 1100 s έως 1700 s περίπου. Η κορυφή αυτή δύναται να αποδοθεί σε ισοβαρική παρεμπόδιση και συγκεκριμένα στο ισότοπο ⁴⁸Ca (0,19%), καθώς ο χρόνος έκλυσης της κορυφής αντιστοιχεί με εκείνον του Ca. Οι υπόλοιπες κορυφές, που εμπίπτουν στο διάστημα έκλυσης του συστήματος με την κινητή φάση χαμηλής ιοντικής ισχύος (από 0 s έως 1800 s), έχουν χαμηλή ένταση.



Εικόνα 26: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{48}SO (Standard και O_2 mode, αντίστοιχα) και ^{34}S (He mode) από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος του Αθλητή 6 (32-BL-72), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS.

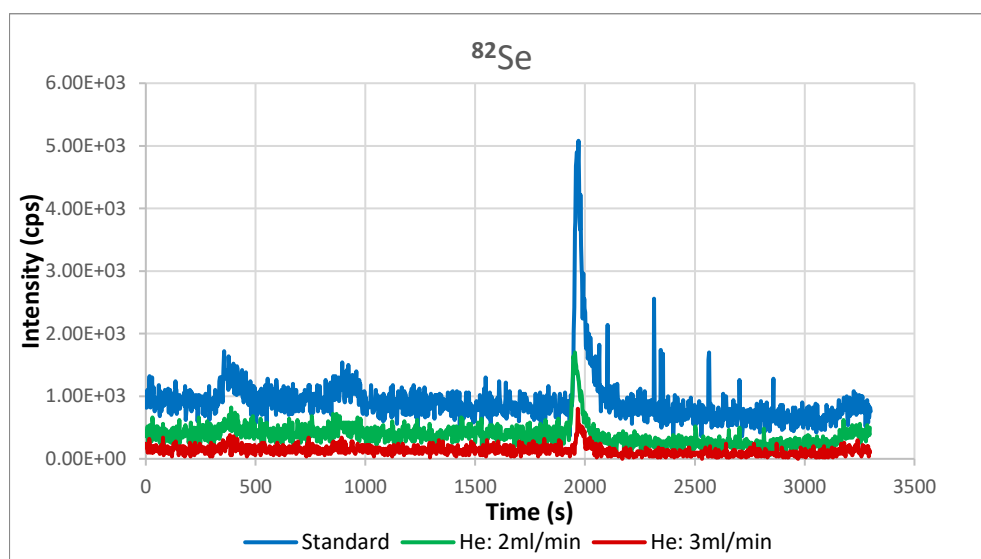
Ορισμένες πρωτεΐνες υφίστανται στα βιολογικά δείγματα σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ άλλες διαθέτουν μικρή περιεκτικότητα σε θείο. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την περιορισμένη παραγωγή οξειδίων σε αναλύσεις που πραγματοποιούνται σε Standard mode, καθώς και την σημαντική παρεμπόδιση του ^{48}SO από το ^{48}Ca , οδηγεί στο συμπέρασμα πως το Standard mode δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για την παρουσία πρωτεϊνών μέσω του θείου σε δείγματα ορού αίματος. Επιπλέον, η χρήση αυτής της λειτουργίας δεν ενδείκνυται για δείγματα που περιέχουν πρωτεΐνες σε χαμηλές συγκεντρώσεις ή/και υψηλές συγκεντρώσεις Ca.

Στο χρωματογράφημα του ^{34}S (He mode) παρατηρείται η εμφάνιση κορυφών του για τα κλάσματα τα οποία, όπως προκύπτει από το χρωματογράφημα του ^{48}SO (O_2 mode) περιέχουν μεγάλες ποσότητες S. Αντίθετα, τα κλάσματα που περιέχουν μικρές ποσότητες S, δεν ανιχνεύονται λόγω του σημαντικά υψηλού υποβάθρου. Επομένως, συμπεραίνεται πως η κυψελίδα συγκρούσεων με ροή αερίου He 2 ml/min δύναται να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση πρωτεϊνών στην (μεταλλο)πρωτεωμική ανάλυση δειγμάτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών μεγάλης περιεκτικότητας σε κυστεΐνη ή μεθειονίνη (μεγάλος αριθμός ατόμων S ανά μόριο πρωτεΐνης).

3.2.3 He mode: Διερεύνηση επίδρασης διαφορετικών ροών He

Από την σύγκριση της μεταλλοπρωτεωμικής ανάλυσης του δείγματος ορού αίματος του Αθλητή 6 (32-BL-72) στις τρεις λειτουργίες του universal cell, προέκυψε πως η ανάλυση σε He mode συμβάλλει στην καταστολή πολυατομικών ισοβαρικών παρεμποδίσεων, οι οποίες προκαλούν την εμφάνιση πλασματικών κορυφών σε πολλά στοιχεία. Παράλληλα, επιτρέπει την ανίχνευση πρωτεϊνών που υφίστανται στο δείγμα σε μεγαλύτερη αφθονία, επομένως η λειτουργία αυτή κρίθηκε κατάλληλη για την μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος με την μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS.

Για την εύρεση της βέλτιστης ροής αερίου He στην κυψελίδα συγκρούσεων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση ενός δείγματος ορού αίματος αθλητή σε δύο διαφορετικές ροές He. Συγκεκριμένα, το δείγμα που αναλύθηκε ανήκει στον Αθλητή 10 (22-BL-2), οι ροές He που χρησιμοποιήθηκαν είναι 2 ml/min και 3 ml/min ενώ το δείγμα αναλύθηκε και σε Standard mode. Η ανάλυση του δείγματος σε Standard mode πραγματοποιήθηκε προκειμένου μέσω της σύγκρισης των αποτελεσμάτων με τα αντίστοιχα του He mode, να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα της καταστολής των παρεμποδίσεων καθώς και να γίνει έλεγχος της επίδρασης της εκάστοτε ροής στις κορυφές χαμηλής έντασης.



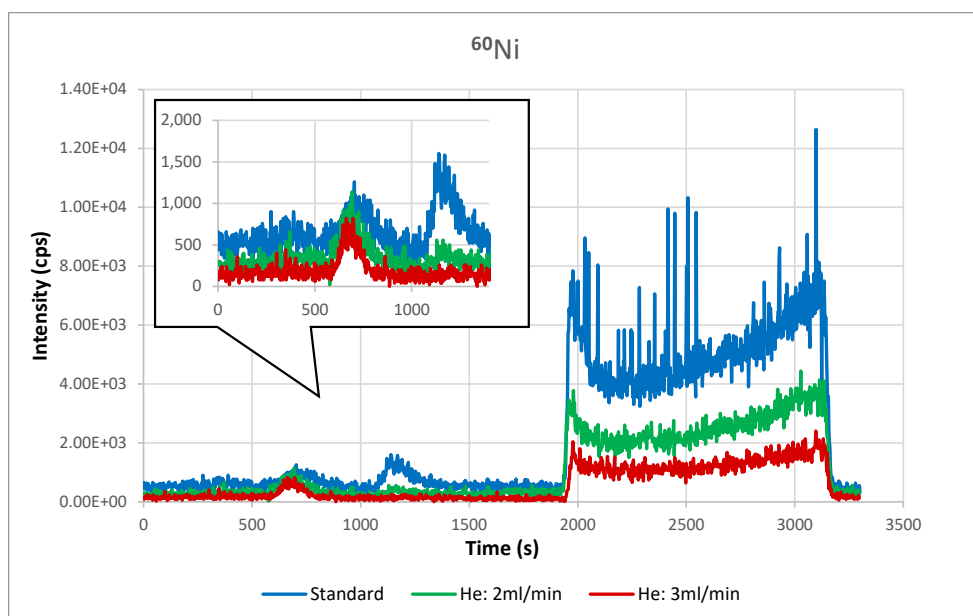
Εικόνα 27: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{82}Se από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος του Αθλητή 10 (22-BL-2), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε Standard mode και He mode (ροή He: 2 ml/min και 3 ml/min)

Από το παραπάνω γράφημα (Εικόνα 27) παρατηρείται πως, η αυξημένη ροή αερίου He (3 ml/min), σε σχέση με το Standard mode ή τη ροή He 2 ml/min, προκαλεί μεγαλύτερη μείωση του υποβάθρου αλλά και του σήματος των κορυφών, για το ^{82}Se . Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι κορυφές χαμηλής έντασης, οι οποίες αντιστοιχούν σε μικρή ποσότητα μετάλλων, σε αυτές τις συνθήκες, να μην είναι πλέον εμφανείς. Αντίστοιχη μείωση παρατηρείται σε όλα τα στοιχεία που αναλύθηκαν (Ca, Mg, Fe, Co,

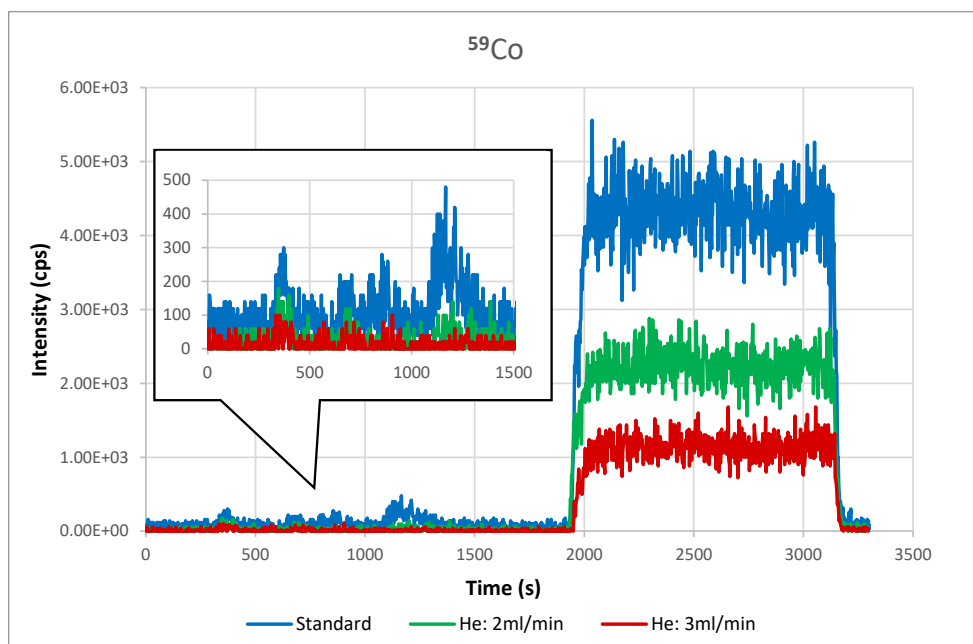
Cu, Ni και Zn). Τα συγκεντρωτικά γραφήματα των στοιχείων παρατίθενται στο Παράρτημα 6.7.

Στοιχεία όπως το Se, το Co και το Ni βρίσκονται σε μικρή αφθονία στα βιολογικά και περιβαλλοντικά δείγματα, επομένως για την ανίχνευσή τους απαιτούνται αναλυτικές τεχνικές μεγάλης ευαισθησίας.⁵ Η μείωση στην ευαισθησία που παρατηρείται λόγω της αυξημένης ροής του He στην κυψελίδα συγκρούσεων, καθιστά τα 3 ml/min ακατάλληλη ροή He, για την ανάλυση τέτοιων δειγμάτων.

Αντιθέτως, με τη χρήση 3 ml/min αερίου He, παρατηρείται πως οι κορυφές που οφείλονταν στα οξειδία του Ca, δεν είναι πλέον εμφανείς στα χρωματογραφήματα των στοιχείων Ni, Fe, Cu, Co και Zn. Επομένως, συμπεραίνεται ότι οι υψηλότερες ροές αερίου He θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την καταστολή ισοβαρικών παρεμποδισμών από τα οξειδία του Ca σε πολυστοιχειακές αναλύσεις δειγμάτων, στα οποία αναμένονται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μετάλλων και σημαντικές ποσότητες Ca.

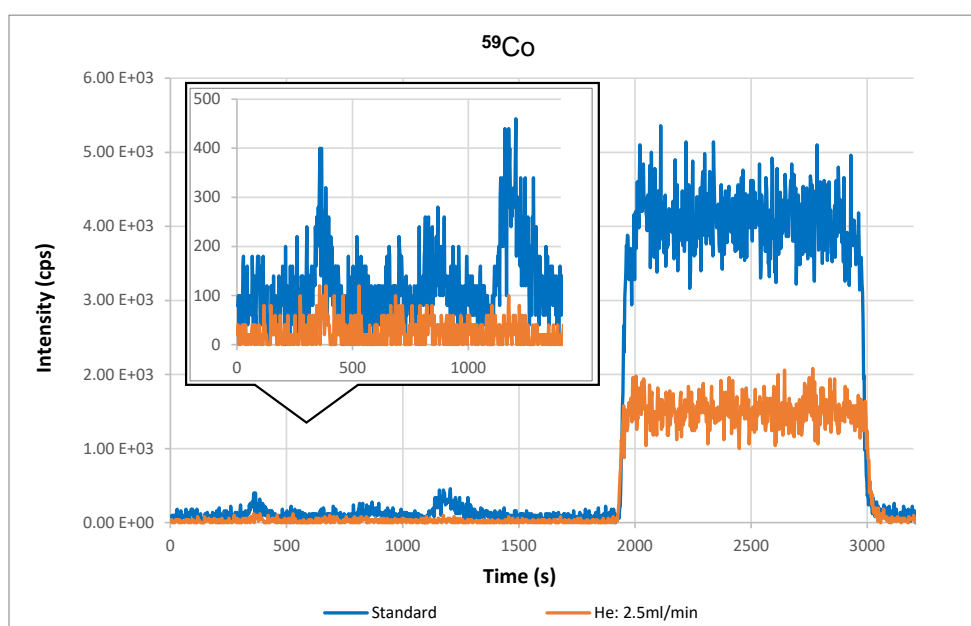


Εικόνα 28: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{60}Ni από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος του Αθλητή 10 (22-BL-2), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε Standard mode και He mode (ροή He: 2 ml/min και 3 ml/min).



Εικόνα 29: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{59}Co από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος του Αθλητή 10 (22-BL-2), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε Standard mode και He mode (ροή He: 2 ml/min και 3 ml/min).

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διαφορετικού δείγματος, του ίδιου Αθλητή (22-BL-24) σε Standard mode και He mode, με ροή αερίου 2.5 ml/min. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση του δείγματος με ροή He 2.5 ml/min ήταν αντίστοιχα των αναλύσεων με ροή 3 ml/min, για τα στοιχεία Ca, Mg, Fe, Co, Cu, Νί και Zn.



Εικόνα 30: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{59}Co από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος του Αθλητή 10 (22-BL-24), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε Standard mode και He mode (ροή He: 2.5 ml/min).

Για μεγάλες συγκεντρώσεις Ca είναι εμφανές πως η ροή He 2 ml/min δεν επαρκεί για την καταστολή των πολυατομικών ισοβαρικών παρεμποδίσεων των στοιχείων Fe, Co, Cu, Ni και Zn. Όμως για την διασφάλιση της ανίχνευσης των κλασμάτων που αντιστοιχούν σε χαμηλές συγκεντρώσεις μετάλλων, για τις περαιτέρω αναλύσεις δειγμάτων ορού αίματος επιλέχθηκε το He mode με ροή αερίου 2 ml/min.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η επιλογή της κατάλληλης ροής του αερίου He για την μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος αλλά και άλλων βιολογικών δειγμάτων, απαιτεί περισσότερη διερεύνηση και εξαρτάται από το αναμενόμενο εύρος συγκεντρώσεων των περιεχόμενων μετάλλων και τους στόχους της εκάστοτε ανάλυσης.

3.3 Αναλύσεις δειγμάτων ορού αίματος αθλητών

Για τα δείγματα ορού αθλητών, έλαβαν χώρα δύο μελέτες. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος διαφορετικών αθλητών για την διερεύνηση των χρωματογραφικών προφίλ για κάθε στοιχείο. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος του ίδιου αθλητή, τα οποία λήφθηκαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές από τη στιγμή άθλησης του, για την μελέτη της επίδρασης της άθλησης στα επίπεδα των μεταλλοπρωτεϊνών και άλλων χημικών ειδών των μετάλλων στον ορό αίματος.

Ειδικότερα, στην πρώτη μελέτη, πραγματοποιήθηκε ανάλυση δειγμάτων των αθλητών 1, 2, 10 και 19, με την μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε Standard mode, προκειμένου να γίνει σύγκριση των χρωματογραφικών προφίλ των δειγμάτων διαφορετικών υποκειμένων. Τα αναλυθέντα δείγματα για την παραπάνω ανάλυση, είναι τα δείγματα των αθλητών που ελήφθησαν 72 ώρες μετά την άσκηση.

Στα χρωματογραφήματα, αυτών των αναλύσεων, δεν περιλαμβάνεται η έγχυση διαλύματος 8 mM EDTA, που περιλαμβάνεται στην τελική μέθοδο της παρούσας εργασίας, καθώς, λόγω των περιορισμένων δειγμάτων, η μελέτη για τη εύρεση της κατάλληλης μεθόδου απομάκρυνσης των ιόντων του δείγματος που κατακρατούνται στο χρωματογραφικό σύστημα, πραγματοποιούνταν παράλληλα με τις αναλύσεις των δειγμάτων. Επιπλέον, η χρήση του Standard mode, παρότι δεν αποτελεί την λειτουργία που συστήνεται για την ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος, επιλέχθηκε για την πιο άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων με την προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στα ίδια δείγματα.⁷¹

Έπειτα από τη σύγκριση όλων των χρωματογραφημάτων που προέκυψαν για κάθε στοιχείο (Παράρτημα 6.9), για κάθε δείγμα ορού αίματος, διαπιστώθηκαν δύο χρωματογραφικά προφίλ. Στο πρώτο υπάγονται οι αθλητές 1 και 2, ενώ στο δεύτερο οι αθλητές 9, 10 και 19. Για το υπόλοιπο της εργασίας οι αθλητές 1 και 2 θα αναφέρονται ως ομάδα A και οι αθλητές 10, 11 και 19 ως ομάδα B.^e Η διαφορά των χρωματογραφικών προφίλ που αντιστοιχούν στα δείγματα των δύο ομάδων, διαπιστώθηκε και από την προηγούμενη μελέτη των δειγμάτων.⁷¹

^e Το δείγμα του αθλητή 11 (32-BL-72) αναλύθηκε με θάλαμο εκνέφωσης γυάλινου σφαιριδίου και τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα παρατίθενται στο Παράρτημα 6.6.

Η πλειονότητα των χρωματογραφημάτων ,που μελετώνται στη συνέχεια, προκύπτουν από την ανάλυση των δειγμάτων ορού αίματος με το σύστημα χρωματογραφίας που περιλαμβάνει την διπλή στήλη μοριακού αποκλεισμού ακολουθούμενη από την στήλη χημικής συγγένειας Blue-HP. Για την ορθότερη απόδοση των χρωματογραφικών κορυφών, στα αντίστοιχα χημικά είδη, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των χρωματογραφημάτων των δειγμάτων με χρωματογραφήματα του υλικού αναφοράς Seronorm, το οποίο αναλύθηκε μόνο με την στήλη Blue-HP.

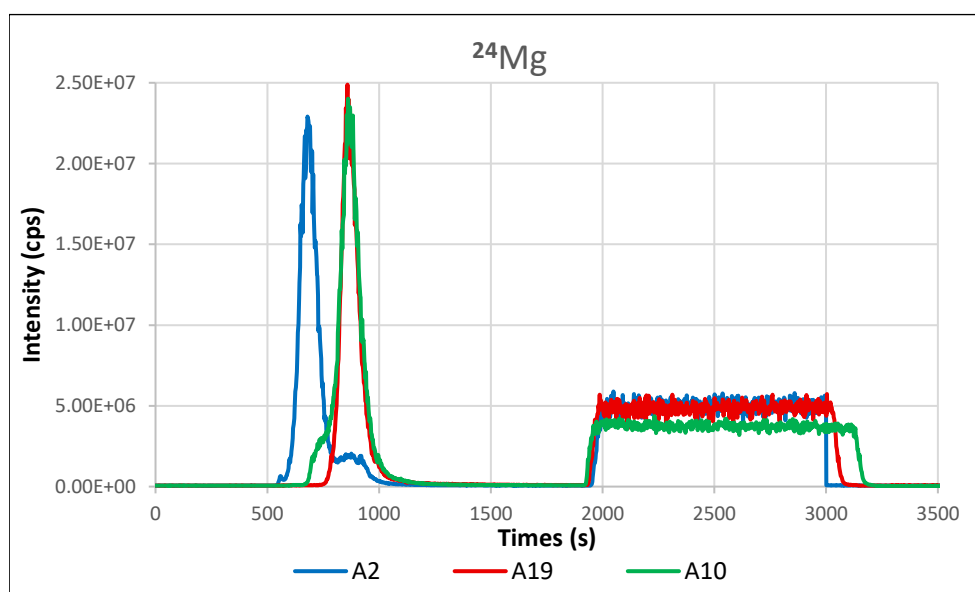
Η ανάλυση του Seronorm με την στήλη Blue-HP πραγματοποιήθηκε για την εύρεση του αριθμού των κλασμάτων στον ορό αίματος, που αναμένεται να αλληλεπιδράσουν ασθενώς (έκλυση με Buffer A) ή ισχυρά (έκλυση με Buffer B) με τη συγκεκριμένη στατική φάση. Τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από την παραπάνω ανάλυση παρατίθενται στο Παράρτημα 6.3.

Τέλος, για την μελέτη της επίδρασης της άθλησης στη συγκέντρωση και τα χημικά είδη των στοιχείων που περιέχονται στον ορό αίματος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των δειγμάτων του Αθλητή 10, με την μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε He mode (2 ml/min). Ειδικότερα, αναλύθηκαν τα δείγματα που ελήφθησαν πριν την άσκηση του αθλητή (22-BL-0), 2 ώρες μετά (22-BL-2), και 48 ώρες μετά την άσκηση (22-BL-48). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για κάθε στοιχείο συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα της προηγούμενης μελέτης.⁷¹

3.3.1 Μαγνήσιο

3.3.1.1 Μελέτη δειγμάτων ορού αίματος διαφορετικών αθλητών.

Στα χρωματογραφήματα του Mg, των αθλητών της ομάδας A, διαπιστώθηκαν 2 κορυφές. Η πρώτη (κλάσμα 1) εντοπίζεται μεταξύ 545 s και 790 s και διαθέτει σημαντικά υψηλότερη ένταση από την δεύτερη (κλάσμα 2), η οποία εντοπίζεται μεταξύ των 790 s και 1100 s. Οι κορυφές εμφανίζουν εκτενή αλληλεπικάλυψη. Αντίθετα, στα δείγματα της ομάδας B παρατηρείται η παρουσία μόνο της κορυφής που αντιστοιχεί στο κλάσμα 2 (865 s – 1200 s), η οποία διαθέτει υψηλή ένταση. Εξαιρέση αποτελεί το δείγμα του Αθλητή 10, όπου η προκύπτουσα κορυφή διαθέτει έναν ώμο, ο οποίος πιθανόν αντιστοιχεί στην παρουσία μικρής ποσότητας του κλάσματος 1.



Εικόνα 31: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{24}Mg από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος των Αθλητών 2, 10 και 19 (72 ώρες μετά την άσκηση), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε Standard mode.

Και οι δύο κορυφές δύναται να αποδοθούν σε ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους (<1 kDa), με τις αντίστοιχες του κλάσματος 2 να αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με την στήλη Blue-HP. Συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων ορού αίματος με του πολυστοιχειακού πρότυπου διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης (STD4 : 20 ppm Mg), προκύπτει πως ο χρόνος έκλουσης του κλάσματος 2 συμπίπτει με το χρόνο έκλουσης του ελεύθερου ιοντικού Mg (735 – 1130 s). Αντίστοιχα, ο χρόνος έκλουσης του κλάσματος 1 συσχετίζεται με τον χρόνο έκλουσης του συμπλόκου EDTA-Mg (560-820 s, περίπου), επομένως μπορεί να αποδοθεί σε σύμπλοκα του Mg(II) με υποκαταστάτες χαμηλού μοριακού βάρους, όπως τα αμινοξέα ή το κιτρικό ανιόν.

Στα δείγματα ορού αίματος αθλητών, μικρή ποσότητα του δεσμευμένου Mg αναμένεται να υφίσταται συνδεδεμένο με την α-1 και α-2- γλοβουλίνη.⁸³ Οι γλοβουλίνες διαθέτουν μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 5 kDa, επομένως εκλύονται από την διπλή στήλη SEC με τον κενό όγκο, όμως αναμένεται να αλληλεπιδρούν ασθενώς με την στήλη Blue-HP. Συνεπώς, δεν είναι εφικτό να αποκλεισθεί η παρουσία δεσμευμένου Mg σε γλοβουλίνες στα κλάσματα 1 ή 2.

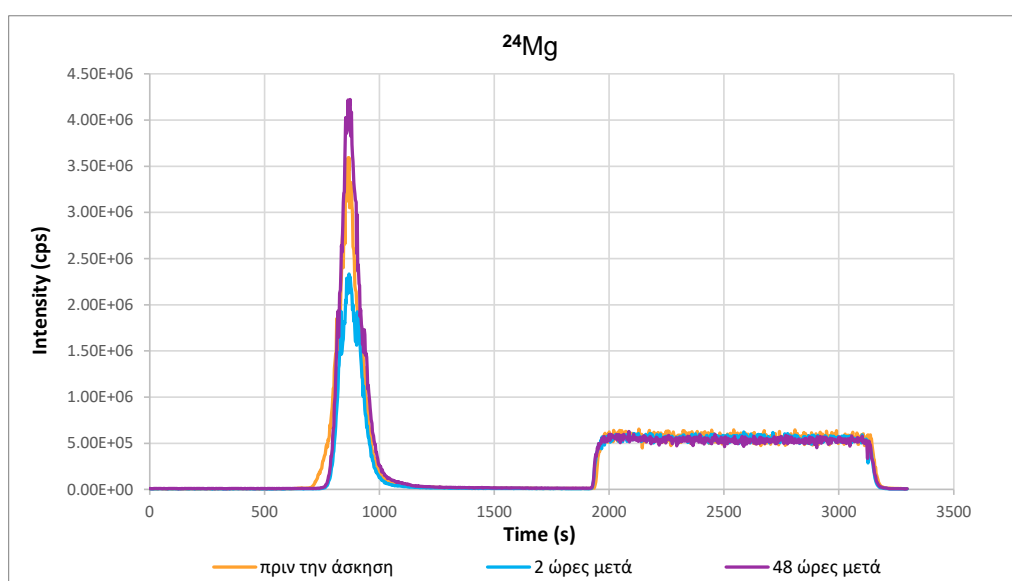
Σε κανένα δείγμα ορού αίματος δεν παρατηρήθηκε η έκλυση ποσότητας Mg στο χρόνο που αναμένεται η έκλυση της αλβουμίνης (1800 – 3000 s), γεγονός που οφείλεται είτε στην κατάσταση των δειγμάτων είτε στην ιοντική ισχύ της κινητής φάσης, όπως αναλύθηκε στην Παράγραφο 3.1.1. Η πλειονότητα της ποσότητας του ελεύθερου Mg(II) που ανιχνεύεται στα δείγματα των αθλητών της ομάδας Β, μπορεί να συνιστά τα ιόντα που βρίσκονταν αρχικά συνδεδεμένα με τα μόρια της αλβουμίνης.

Αντιθέτως, η παρουσία μεγάλης ποσότητας συμπλόκων Mg(II) με μόρια μικρού μοριακού βάρους, και όχι ελεύθερου ιοντικού Mg(II), στα δείγματα των αθλητών της ομάδας Α, πιθανόν να οφείλεται σε αυξημένη ποσότητα αμινοξέων και άλλων μικρών

μορίων στον ορό αίματος των αθλητών. Τα μόρια αυτά είτε αλληλεπιδρούσαν, εξ αρχής, με ιόντα Mg(II) είτε συνδέθηκαν με αυτά κατά την απομάκρυνσή τους από τα μόρια της αλβουμίνης.

Το διαφορετικό χρωματογραφικό προφίλ των δύο ομάδων μπορεί να συνδεθεί με διαφορές στη διατροφή των αθλητών ή με την κατανάλωση συμπληρωμάτων διατροφής, στα οποία το Mg συναντάται με πολλές μορφές όπως το κιτρικό Mg ή το στεατικό Mg.^{84,85} Περαιτέρω εξέταση της ταυτότητας των μορφών αυτών μπορεί να γίνει με την τεχνική του ηλεκτροφεκασμού και αναλυτή μάζας υψηλής διαχωριστικής ικανότητας.

3.3.1.2 Μελέτη δειγμάτων ορού αίματος του ίδιου αθλητή.



Εικόνα 32: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{24}Mg από την ανάλυση τριών δειγμάτων ορού αίματος του Αθλητή 10, που ελήφθησαν πριν, 2 ώρες μετά και 48 ώρες μετά την άσκηση, αντίστοιχα, με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε He mode (He: 2 ml/min)

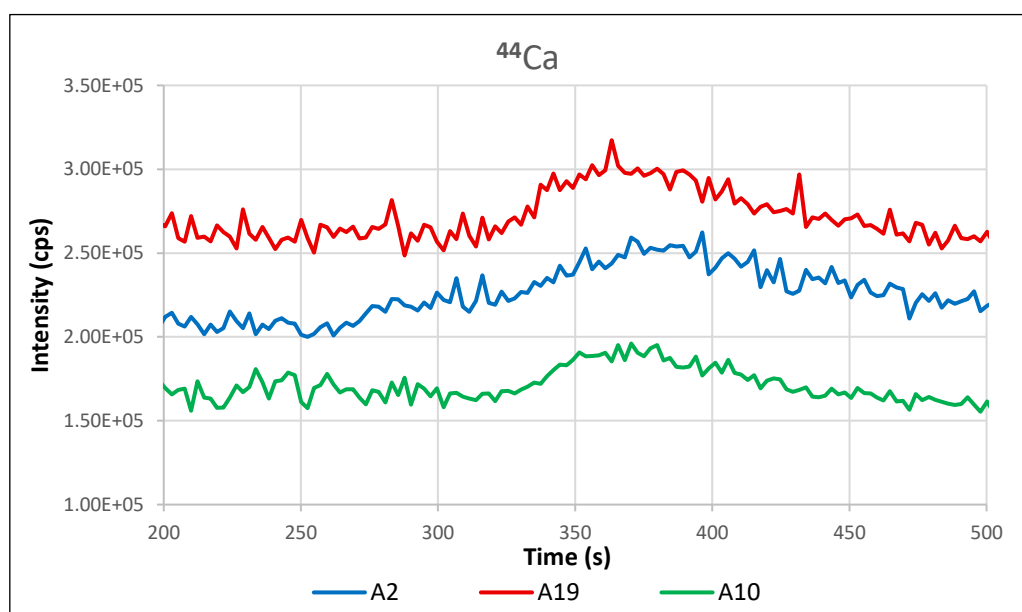
Από το παραπάνω συγκεντρωτικό γράφημα παρατηρείται πως σε όλα τα δείγματα του Αθλητή 10 ανιχνεύεται μόνο το κλάσμα 2. Η μορφή των κορυφών είναι παραπλήσια, συνεπώς συμπεραίνεται πως δεν προκαλούνται σημαντικές αλλαγές στις μορφές του Mg στον ορό αίματος του αθλητή πριν και μετά την άσκηση. Αντιθέτως, σημαντικές διαφορές παρατηρούνται στα επίπεδα του Mg. Συγκεκριμένα, στο δείγμα που λήφθηκε 2 ώρες μετά την άσκηση τα επίπεδα είναι σημαντικά χαμηλότερα συγκριτικά με τα επίπεδα που ανιχνεύθηκαν πριν την άσκηση, ενώ μετά το πέρας των 48 ωρών από την άσκηση παρατηρείται πως η συγκέντρωση του Mg αυξήθηκε, σε επίπεδα παραπλήσια με αυτά που ανιχνεύθηκαν πριν την άσκηση. Οι παραπάνω παρατηρήσεις συνάδουν με τα αποτελέσματα της προηγούμενης μελέτης για το συγκεκριμένο δείγμα.

Η μείωση των επιπέδων του Mg, που παρατηρείται σε μικρό χρονικό διάστημα μετά την άσκηση, μπορεί να αποδοθεί σε ανακατανομή του Mg στο σώμα του αθλητή λόγω εφίδρωσης καθώς και στην πρόσληψη Mg από τα κύτταρα του λιπώδους ιστού κατά τη διαδικασία της λιπόλυσης που λαμβάνει χώρα κατά την έντονη άσκηση.^{86,87}

3.3.2 Ασβέστιο

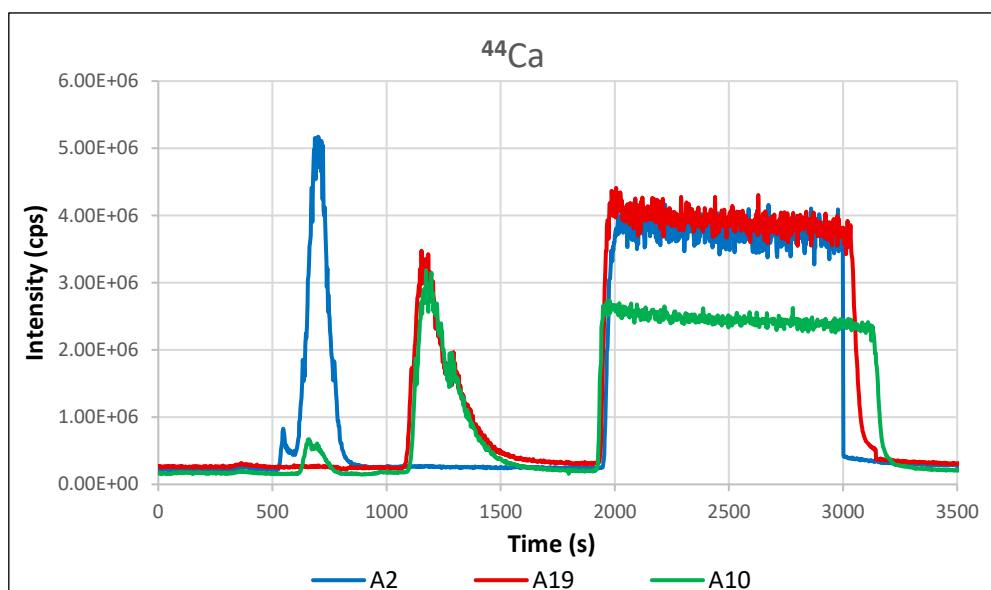
3.3.2.1 Μελέτη δειγμάτων ορού αίματος διαφορετικών αθλητών.

Στα χρωματογραφήματα του Ca, και στις δύο ομάδες αθλητών, ανιχνεύθηκε μια κορυφή πολύ μικρής έντασης, η οποία εκκλύεται μεταξύ των 320 s και 430 s περίπου (κλάσμα 1). Ο χρόνος έκλυσης αντιστοιχεί στην έκλυση του κενού όγκου του χρωματογραφικού συστήματος, επομένως το κλάσμα 1 περιλαμβάνει μόρια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 5 kDa, τα οποία δεν αλληλεπιδρούν με την στήλη Blue-HP. Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό πως η δεσμευμένη ποσότητα Ca, σε δείγματα ορού αίματος, εντοπίζεται κυρίως στην αλβουμίνη ενώ σε μικρότερη ποσότητα στην β-γλοβουλίνη.⁸⁸ Η αλβουμίνη, αλληλεπιδρά ισχυρά με τη Blue-HP συνεπώς η έκλυση της αναμένεται να πραγματοποιηθεί κατά την έκλυση της στήλης με την κινητή φάση υψηλής ιοντικής ισχύος (Buffer B), δηλαδή μεταξύ 1800 s και 3000 s. Η β-γλοβουλίνη αναμένεται να εμφανίζει χημική συγγένεια με την στήλη Blue-HP και κατ' επέκταση μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης από τον κενό όγκο του συστήματος.⁸⁹ Συμπερασματικά προκύπτει πως οι γνωστές δεσμευμένες μορφές του Ca που υφίστανται στον ορό ανθρώπινου αίματος δεν περιλαμβάνονται στο κλάσμα 1.⁸⁸



Εικόνα 33: Συγκεντρωτικό γράφημα περιοχής 200 s - 500 s χρωματογραφημάτων ⁴⁴Ca από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος των Αθλητών 2 και 19 (72 ώρες μετά την άσκηση), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε Standard mode.

Στα δείγματα των αθλητών της ομάδας Α παρατηρείται μια κορυφή μεγάλης έντασης μεταξύ 560 s και 840 s, περίπου (κλάσμα 2). Αντιθέτως, στα δείγματα της ομάδας Β παρατηρείται μια κορυφή μεγάλου εύρους και έντασης μεταξύ 1090 s και 1700 s περίπου (κλάσμα 3). Εξαιρεση αποτελεί το δείγμα του Αθλητή 10, όπου εκτός από την έκλυση του κλάσματος 3 παρατηρείται ποσότητα που αντιστοιχεί στο κλάσμα 2.



Εικόνα 34: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{44}Ca από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος των Αθλητών 2, 10 και 19 (72 ώρες μετά την άσκηση), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε Standard mode.

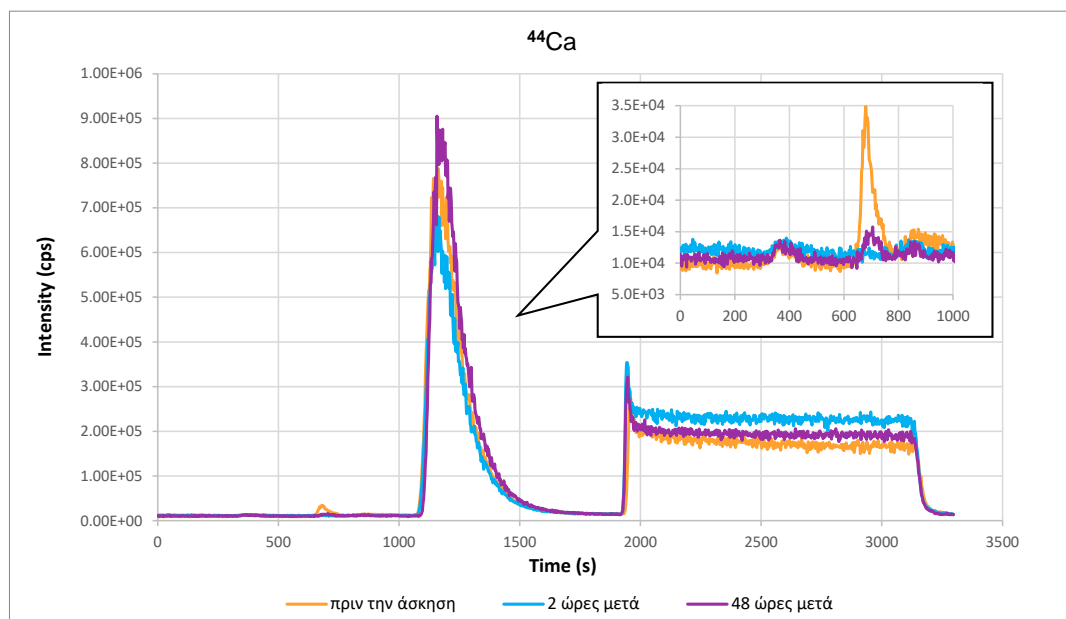
Συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα, των δειγμάτων ορού αίματος, με το αντίστοιχο του πολυστοιχειακού πρότυπου διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης (STD4 : 200 ppm Ca), προκύπτει πως ο χρόνος έκλουσης του κλάσματος 2 συμπίπτει με το χρόνο έκλουσης με τον χρόνο έκλουσης του σύμπλοκου EDTA-Ca (540-1060 s περίπου) επομένως μπορεί να αποδοθεί σε σύμπλοκα του Ca(II) με υποκαταστάτες μικρού μοριακού βάρους, όπως τα αμινοξέα ή το κιτρικό ανιόν. Αντίστοιχα, ο χρόνος έκλουσης του κλάσματος 3 είναι παραπλήσιος του χρόνου έκλουσης του ελεύθερου ιοντικού Ca(II) (1060 – 1700 s). Το ιοντικό Ca αλληλεπιδρά ισχυρά με τις αρνητικά φορτισμένες σουλφονικές ομάδες της στατικής φάσης της στήλης Blue-HP, για αυτό παρουσιάζει αυξημένο χρόνο κατακράτησης στη στήλη. Το κλάσμα 2 ή 3 αναμένεται να περιέχει ποσότητα δεσμευμένου Ca στην β-γλοβουλίνη, εάν δεν έχει λάβει χώρα αποδέσμευση αυτού, όπως στην περίπτωση της αλβουμίνης.

Η μορφή της κορυφής του κλάσματος 2 και 3, πιθανόν να υποδεικνύει την παρουσία περισσότερων του ενός χημικών ειδών σε κάθε κλάσμα. Η υπόθεση αυτή μπορεί να επιβεβαιωθεί με την χρήση χρωματογραφικής στήλης μοριακού αποκλεισμού μεγαλύτερης διαχωριστικής ικανότητας, η οποία θα συμβάλει στον καλύτερο διαχωρισμό των χημικών ουσιών που περιέχονται σε καθένα από τα παραπάνω κλάσματα, ή με την χρήση πρότυπων διαλυμάτων των ουσιών που αναμένεται να περιέχονται στα δείγματα ορού αίματος, για τον προσδιορισμό του χρόνου έκλουσής τους.

Αντίστοιχα με το Mg, δεν παρατηρείται έκλυση ποσότητας του μετάλλου στο χρόνο που αναμένεται η έκλυση της αλβουμίνης. Η μεγάλη ποσότητας ελεύθερου ιοντικού Ca(II), στα δείγματα της ομάδας Β, δύναται να αντιστοιχεί στην ποσότητα Ca που βρίσκονται, υπό φυσιολογικές συνθήκες, δεσμευμένη στα μόρια της αλβουμίνης. Η παρουσία μεγάλης ποσότητας συμπλόκων Ca(II) μικρού μοριακού βάρους, πιθανόν να υποδεικνύει αυξημένη ποσότητα αμινοξέων και άλλων μικρών μορίων στον ορό αίματος των αθλητών της ομάδας Α, τα οποία είτε δέσμευσαν τα μεταλλικά ιόντα όταν

αυτά απομακρύνθηκαν από την αλβουμίνη, είτε είχαν ήδη απομακρυνθεί κατά την παρατεταμένη αποθήκευση και χρήση των δειγμάτων. Η παρουσία διαφορετικών χημικών ειδών Ca στα δείγματα των δύο ομάδων δύναται να αποδοθεί σε διαφορετική διατροφή των αθλητών της κάθε ομάδας ή στην λήψη συμπληρωμάτων διατροφής από τους αθλητές της ομάδας Α. Πολλά συμπληρώματα διατροφής περιλαμβάνουν ποσότητες Ca με την μορφή κιτρικού, ανθρακικού, γλυκονικού ή φωσφορικού Ca.⁹⁰

3.3.2.2 Μελέτη δειγμάτων ορού αίματος του ίδιου αθλητή.



Εικόνα 35: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{44}Ca από την ανάλυση τριών δειγμάτων ορού αίματος του Αθλητή 10, που ελήφθησαν πριν, 2 ώρες μετά και 48 ώρες μετά την άσκηση, αντίστοιχα, με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε He mode (He: 2 ml/min).

Από το παραπάνω συγκεντρωτικό γράφημα (Εικόνα 35) παρατηρείται πως σε όλα τα δείγματα του αθλητή ανιχνεύεται το κλάσμα 1, το οποίο δεν παρουσιάζει μεταβολές στα διαφορετικά δείγματα, επομένως η έντονη άσκηση του αθλητή δεν φαίνεται να επηρεάζει τη συγκέντρωση του μακρομορίου, που αντιστοιχεί σε αυτό το κλάσμα, ή την περιεκτικότητά του σε Ca.

Συγκρίνοντας το κλάσμα 2, στα χρωματογραφήματα του Αθλητή 10, παρατηρείται πως το κλάσμα αυτό υφίσταται σε υψηλές συγκεντρώσεις πριν την άσκηση, όμως δεν ανιχνεύεται 2 ώρες μετά την άσκηση. Οι χημικές ουσίες που αντιστοιχούν στο κλάσμα 2 ανιχνεύονται ξανά, 48 ώρες μετά την άσκηση. Η μείωση του κλάσματος 2, έπειτα από την έντονη άσκηση, μπορεί να αποδοθεί στο φαινόμενο της οξέωσης. Κατά την έντονη άσκηση παράγεται γαλακτικό οξύ στους μυς, με αποτέλεσμα την παρουσία ποσότητας γαλακτικού οξέος στο αίμα και μείωση του pH. Η μείωση του pH προκαλεί εξασθένηση των ιοντικών αλληλεπιδράσεων του Ca(II) με τις πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των ιόντων από τα μόρια της πρωτεΐνης.⁹¹ Το φαινόμενο αυτό, συνοδεύεται από αύξηση του ελεύθερου Ca(II), γεγονός που δεν παρατηρείται στην παρούσα ανάλυση, επομένως είναι απαραίτητη η ταυτοποίηση των

χημικών ουσιών που περιέχονται στο κλάσμα 2 προκειμένου να είναι εφικτή η διεξαγωγή κάποιου συμπεράσματος.

Τέλος, η ένταση της κορυφής που αντιστοιχεί στο κλάσμα 3 του δείγματος, αντίστοιχα με το τρίτο κλάσμα των χρωματογραφημάτων του Mg, παρουσιάζει μείωση 2 ώρες μετά την έντονη άσκηση, ενώ έπειτα από 48 ώρες είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την ένταση της κορυφής που προκύπτει για το δείγμα που λήφθηκε πριν την άσκηση.

Συμπερασματικά, για την ολική συγκέντρωση του Ca σε κάθε δείγμα, προκύπτει πως η συγκέντρωση του Ca μειώνεται σημαντικά 2 ώρες μετά την άσκηση, ενώ 48 ώρες μετά έχει επανέλθει στα επίπεδα που βρισκόταν πριν την άσκηση, αλλά με διαφορετική κατανομή στις διάφορες μορφές του. Η μείωση της συγκέντρωσης του Ca έπειτα από την άσκηση έχει παρατηρηθεί στη βιβλιογραφία έπειτα από μέτριας και μεγάλης έντασης ασκήσεις ενδυνάμωσης σε νεαρές αλλά και σε μεγαλύτερες ηλικίες.⁹²⁻⁹⁴ Όμως, τα αποτελέσματα για τον συγκεκριμένο αθλητή δεν συνάδουν με τα αποτελέσματα που προέκυψαν για το ίδιο δείγμα σε προηγούμενη μελέτη, στα οποία παρατηρήθηκε αυξημένη ποσότητα ολικού Ca 2 ώρες μετά την έντονη άσκηση, σε σχέση με την ποσότητα που ανιχνεύθηκε πριν και 48 ώρες μετά την άσκηση.⁷¹ Το γεγονός θα μπορούσε να αποδοθεί σε ανομοιογένεια του δείγματος λόγω της μη ιδανικής του κατάστασης. Ειδικότερα, λόγω των πολλών κύκλων ψύξης-απόψυξης και του εκτεταμένου χρόνου αποθήκευσης του, είναι πιθανό ποσότητες πρωτεϊνών να έχουν συσσωματωθεί, ή ακόμη και να καταβυθίστηκαν, παρασύροντας μαζί και τις ποσότητες των αλληλεπιδρώντων μετάλλων, απομακρύνοντας τα κατ' αυτόν τον τρόπο από το διάλυμα.

3.3.3 Σελήνιο

3.3.3.1 Μελέτη δειγμάτων ορού αίματος διαφορετικών αθλητών.

Στα χρωματογραφήματα του Se, όλων των αθλητών παρατηρήθηκε η έκλυση τριών κλασμάτων. Το πρώτο κλάσμα (κλάσμα 1) εκλύεται με τον κενό όγκο του χρωματογραφικού συστήματος (από τα 330 s έως τα 520 s, περίπου) επομένως περιλαμβάνει μόρια υψηλού μοριακού βάρους (>5 kDa), τα οποία δεν αλληλεπιδρούν με την στατική φάση της στήλης Blue-HP. Το κλάσμα 2 ανιχνεύεται μεταξύ 820 s και 1000 s περίπου.

Από την ανάλυση πρότυπου δείγματος ορού αίματος Seronorm με την στήλη Blue-HP, κατά την έκλυση της στήλης με την κινητή φάση χαμηλής ιοντικής ισχύς παρατηρήθηκε η εμφάνιση μιας κορυφής, η οποία αντιστοιχεί στον κενό όγκο της στήλης. Επομένως, οι ουσίες που εκλύονται με το Buffer A, δεν αλληλεπιδρούν με την στήλη Blue-HP άρα ο μεγάλος χρόνος κατακράτησης του κλάσματος 2 είναι πιθανότερο να οφείλεται στο μικρό μοριακό του βάρος (<1 kDa) απ'ότι στην αλληλεπίδραση του με την στήλη συγγένειας.

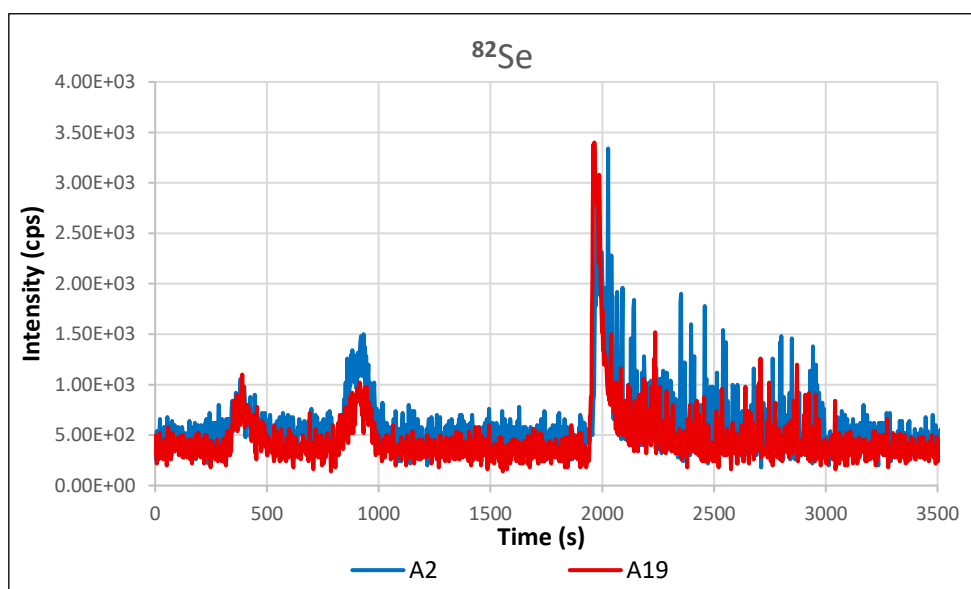
Τέλος, παρατηρείται η παρουσία κορυφής κατά την έκλυση της στήλης Blue-HP με την κινητή φάση μεγαλύτερης ιοντικής ισχύος (1800 – 3000 s). Στο κλάσμα αυτό περιέχονται μόρια που διαθέτουν υψηλή χημική συγγένεια με την Blue-HP.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, το Se ανιχνεύεται στον ορό ανθρώπινου αίματος με την μορφή σεληνοκουστεΐνης, ενταγμένο στις μεταλλοπρωτεΐνες υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (22 kDa), σεληνοπρωτεΐνη-P (41 kDa), και σεληνοαλβουμίνη (66kDa).^{24,95} Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η σεληνοπρωτεΐνη-P, αποτελούν πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους (>5 kDa) οι οποίες δεν αλληλεπιδρούν με την στήλη Blue-HP, επομένως αναμένεται να αντιστοιχούν στο κλάσμα 1.

Κατά την ανάλυση των δειγμάτων ορού αίματος αθλητή στην προηγούμενη μελέτη,⁷¹ η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ανιχνεύεται ως μια κορυφή χαμηλής έντασης, ενώ η σεληνοπρωτεΐνη-P διαθέτει χαρακτηριστικά υψηλή ένταση αφού περιέχει 10 άτομα Se ανά μόριο και διαθέτει περίπου το 60% του Se στον ορό ανθρώπινου αίματος.²⁴ Στην παρούσα μελέτη, η κορυφή του κλάσματος 1, διαθέτει μικρή ένταση, επομένως δεν αντιστοιχεί στην ποσότητα Se που αναμένεται να ανιχνευθεί κατά την έκλυση της σεληνοπρωτεΐνης – P. Το Se βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένο στις σεληνοπρωτεΐνες, επομένως η απομάκρυνση του από τα μόρια της σεληνοπρωτεΐνης – P δεν είναι πιθανή. Αντιθέτως, η απουσία την αναμενόμενης ποσότητας Se στο δείγμα δύναται να αποδοθεί στην απομάκρυνση της σεληνοπρωτεΐνης-P από το δείγμα, λόγω συσσωμάτωσης ή και καταβύθισης της κατά την διαδικασία ψύξης-απόψυξης των δειγμάτων.

Ο χρόνος έκλυσης του κλάσματος 2 (820 – 1000 s) είναι μεγαλύτερος του όγκου της κινητής φάσης στη στήλη μοριακού αποκλεισμού επομένως δύναται να αποδοθεί σε σύμπλοκα μικρού μοριακού βάρους του Se ή σε ποσότητα σεληνοκουστεΐνης.

Τέλος, το κλάσμα 3 δύναται να αποδοθεί στην σεληνοαλβουμίνη, καθώς λόγω της υψηλής συγγένειας της αλβουμίνης με την στήλη Blue-HP απαιτείται κινητή φάση υψηλής ιοντικής ισχύς για την έκλουσή της.



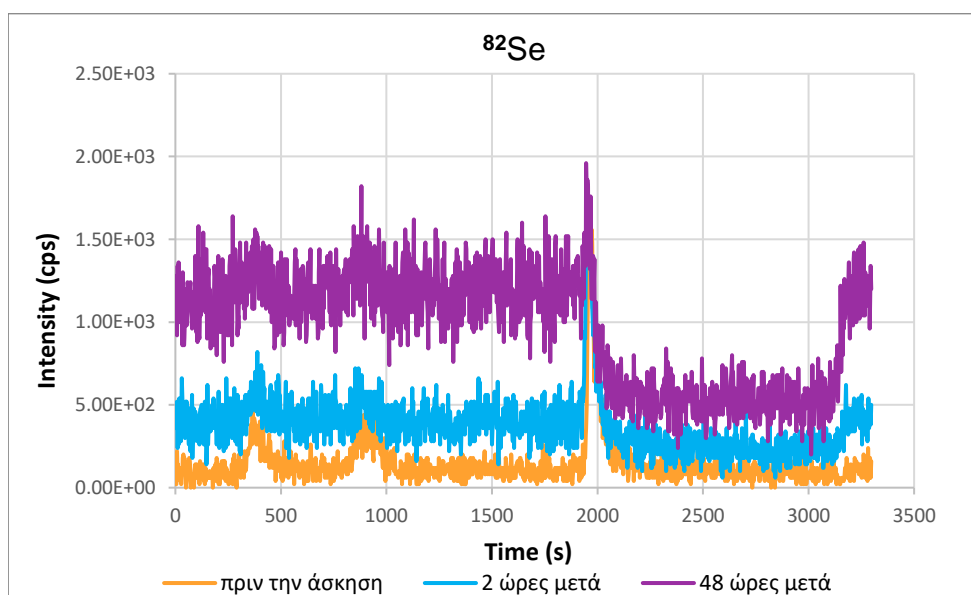
Εικόνα 36: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ⁸²Se από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος των Αθλητών 2 και 19 (72 ώρες μετά την άσκηση), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε Standard mode.

Για την διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου dcSEC-AF-ICP-MS για την μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος, είναι απαραίτητη η ανάλυση δειγμάτων που έχουν ληφθεί πρόσφατα και έχει διασφαλιστεί η σταθερότητα των περιεχόμενων πρωτεϊνών τους. Επιπλέον, για την ορθή ταυτοποίηση των σεηνοπρωτεϊνών που εντοπίζονται στα παραπάνω κλάσματα, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν αναλύσεις πρότυπων διαλυμάτων σεληνοπρωτεϊνών.

3.3.3.2 Μελέτη δειγμάτων ορού αίματος του ίδιου αθλητή.

Στο παρακάτω συγκεντρωτικό γράφημα των χρωματογραφημάτων του Se για τα δείγματα του αθλητή 10 (Εικόνα 37) παρατηρείται σημαντική διαφορά του υποβάθρου, με το δείγμα που λήφθηκε 48 ώρες μετά την άσκηση να παρουσιάζει το υψηλότερης έντασης υπόβαθρο.

Η διεξαγωγή των αναλύσεων των συγκεκριμένων δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές πειραματικές ημέρες. Συγκεκριμένα, τα δείγματα που αντιστοιχούν στις 2 ώρες και 48 ώρες μετά την άσκηση του Αθλητή 10 αναλύθηκαν με την χρήση διαφορετικού dewar αέριου αργού, από το αντίστοιχο που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του δείγματος πριν την άσκηση του αθλητή. Η μεγάλη αύξηση του υποβάθρου μπορεί να αποδοθεί σε πρόσμιξη Kr στο αέριο Ar, διότι το ισότοπο ^{82}Kr αποτελεί ισοβαρική παρεμπόδιση του ^{82}Se . Λόγω της αύξησης του υποβάθρου και της μικρής αφθονίας του Se στα δείγματα, οι κορυφές των κλασμάτων που προκύπτουν από την ανάλυση των δειγμάτων δεν είναι εμφανείς, επομένως δεν είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί η σύγκριση των χρωματογραφικών προφίλ του Se για αυτά τα δείγματα.



Εικόνα 37: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{82}Se από την ανάλυση τριών δειγμάτων ορού αίματος του Αθλητή 10, που ελήφθησαν πριν, 2 ώρες μετά και 48 ώρες μετά την άσκηση, αντίστοιχα, με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε He mode (He: 2 ml/min).

3.3.4 Σίδηρος

3.3.4.1 Μελέτη δειγμάτων ορού αίματος διαφορετικών αθλητών.

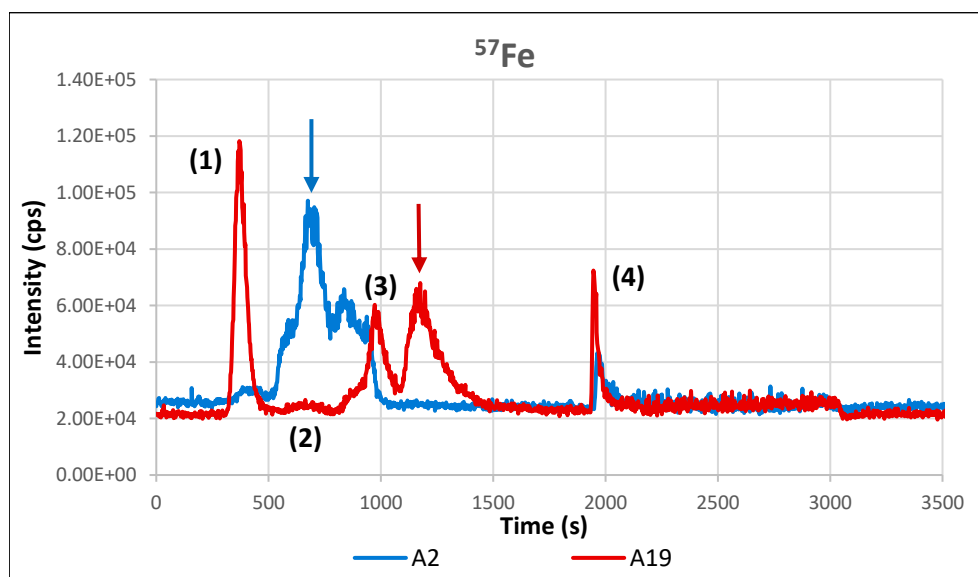
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα δείγματα των αθλητών που χρησιμοποιούνται για την παρούσα μελέτη, αναλύθηκαν με την μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε Standard mode. Στα χρωματογραφήματα του ^{57}Fe , που λαμβάνονται από αναλύσεις σε Standard mode παρατηρείται μια κορυφή, η οποία δεν αντιστοιχεί σε ποσότητες Fe, αλλά οφείλεται σε ισοβαρική παρεμπόδιση του υδροξειδίου του Ca ($^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^{1}\text{H}^+$), το οποίο σχηματίζεται σε ανιχνεύσιμες ποσότητες λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης του δείγματος σε Ca.

Προκειμένου να εντοπιστούν οι κορυφές, στα χρωματογραφήματα του ^{57}Fe που οφείλονται σε ισοβαρική παρεμπόδιση και εφόσον δεν ήταν δυνατή η παρακολούθηση άλλων ισοτόπων του Fe στο Standard mode, για τον έλεγχο της ισοτοπικής αναλογίας, έλαβε χώρα σύγκριση των χρωματογραφημάτων του ^{57}Fe και του ^{44}Ca . Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για τα δείγματα, του οποίου η ποσότητα δεν επαρκούσε προκειμένου να γίνει αντίστοιχη ανάλυση σε He mode.

Από τη σύγκριση προέκυψε ότι, στο χρόνο έκλουσης μεγάλης ποσότητας ^{44}Ca παρατηρείται, αντίστοιχα, μία κορυφή μεγάλης έντασης στο χρωματογράφημα του ^{57}Fe . Ειδικότερα, στα δείγματα των αθλητών της ομάδας A, η κορυφή υψηλής έντασης του ^{44}Ca εμφανίζεται μεταξύ 560 s και 840 s, όπου εντοπίζεται αντίστοιχα μια κορυφή υψηλής έντασης και για το ^{57}Fe (περίπου στα 585 s με 775 s). Αντίστοιχα, στα δείγματα των αθλητών της ομάδας B, η κορυφή υψηλής έντασης ^{44}Ca υφίσταται μεταξύ 1090 s και 1700 s, όπου εντοπίζεται, αντίστοιχα, και μια κορυφή για το ^{57}Fe (περίπου 1090 s και 1550 s).

Στα δείγματα που αναλύθηκαν και σε He mode (A10: 22-BL-0), λόγω της καταστολής των πολυατομικών παρεμποδίσεων, ήταν εφικτή η παρακολούθηση του μεγαλύτερης αφθονίας ισότοπου του Fe, ^{56}Fe (91,75%). Η κορυφή του Fe, που εμφανίζεται στο χρωματογράφημα του ισότοπου ^{57}Fe , μεταξύ 1090 s και 1550 s, δεν ανιχνεύεται για το ισότοπο ^{56}Fe .

Στην ανάλυση των χρωματογραφημάτων που παρατίθεται στη συνέχεια, παραλείπεται η αναφορά των κορυφών που αποδόθηκαν σε ισοβαρική παρεμπόδιση. Οι κορυφές αυτές επισημαίνονται με βέλη στο συγκεντρωτικό γράφημα των χρωματογραφημάτων που ακολουθεί. (Εικόνα 38)



Εικόνα 38: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{57}Fe από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος των Αθλητών 2 και 19 (72 ώρες μετά την άσκηση), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε Standard mode. Βέλη: κορυφές που οφείλονται σε παρεμπόδιση του ^{57}Fe από το $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^{1}\text{H}^+$. (1-4): κλάσματα που περιέχουν ποσότητες Fe.

Στα δείγματα των αθλητών της ομάδας B, παρατηρείται η έκλυση ενός κλάσματος (κλάσμα 1) μεταξύ των 300 s και 500 s, χρόνος που συμπίπτει με το χρόνο έκλυσης του κενού όγκου του χρωματογραφικού συστήματος, επομένως σε αυτό περιλαμβάνονται χημικές ουσίες υψηλού μοριακού βάρους (>5 kDa), οι οποίες δεν αλληλεπιδρούν με την στατική φάση της στήλης Blue-HP. Το κλάσμα 1 δύναται να αποδοθεί στην τρανσφερίνη (78 kDa) και στην φερριτίνη (440 kDa). Η τρανσφερίνη αποτελεί τον κύριο μεταφορέα του Fe στο αίμα, γεγονός που υποστηρίζει την παρουσία της στο κλάσμα που διαθέτει την υψηλότερη ένταση.²⁸ Εν συνεχεία, η κορυφή του κλάσματος 2 διαθέτει μικρή ένταση, εντοπίζεται μεταξύ 520 s και 820 s περίπου, και αντιστοιχεί είτε σε μακρομόρια υψηλού μοριακού βάρους που αλληλεπιδρούν ασθενώς με την στήλη Blue-HP, είτε σε μόρια που δεν αλληλεπιδρούν με την στήλη χημικής συγγένειας και διαθέτουν μοριακό βάρος που κυμαίνεται μεταξύ 1 – 5 kDa.

Η έκλυση μόνο μιας κορυφής Fe, κατά την ανάλυση πρότυπου δείγματος ορού αίματος Seronorm με την στήλη Blue-HP (έκλυση με Buffer A), οδηγεί στο συμπέρασμα πως οι χημικές ουσίες του κλάσματος 2 είναι πιο πιθανόν να μην αλληλεπιδρούν με την στήλη αυτή.

Μία κορυφή μεγαλύτερης έντασης (κλάσμα 3) είναι εμφανής μεταξύ των 820 s και 1020 s, η οποία αντιστοιχεί σε χημικές ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους (<1 kDa) τα οποία εμφανίζουν μικρή αλληλεπίδραση με την στήλη Blue-HP. Τέτοιες ουσίες δύναται να αποτελούν σύμπλοκα των ιόντων Fe(III) ή ελεύθερα ιόντα.

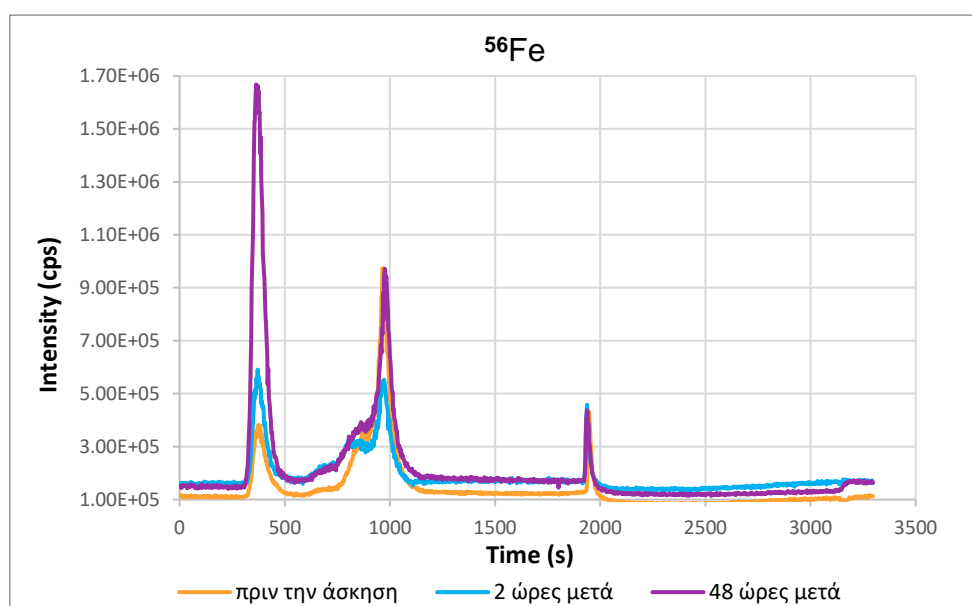
Τέλος, το κλάσμα 4 εκλούεται κατά τη χρήση της κινητής φάσης υψηλής ιοντικής ισχύος (1800 s – 3000 s), επομένως συνδέεται με την παρουσία Fe-αλβουμίνης στον ορό αίματος.

Στα χρωματογραφήματα της ομάδας A, η κορυφή του κλάσματος 1 που αποδόθηκε στην τρανσφερίνη και την φερριτίνη διαθέτει σημαντικά μικρή ένταση, γεγονός που δεν συνάδει με την υψηλή περιεκτικότητα Fe αναμένεται να περιέχεται στην τρανσφερίνη. Η απουσία σημαντικής ποσότητας Fe από το κλάσμα 1 δύναται να αποδοθεί σε αποδιάταξη των πρωτεϊνών, και κατ' επέκταση στην αποδέσμευση του Fe, λόγω της επαναλαμβανόμενης διαδικασίας ψύξης-απόψυξης των δειγμάτων. Σε αντίθετη περίπτωση, η μικρή ποσότητα Fe στο κλάσμα 1, υποδεικνύει σοβαρή έλλειψη Fe, αφού η τρανσφερίνη και η φερριτίνη αποτελούν τον κύριο μεταφορέα και την κύρια αποθήκη Fe στον οργανισμό, αντίστοιχα. Η έλλειψη Fe συσχετίζεται με ασθένειες όπως η αναιμία και δύναται να προκαλέσει ποικίλα προβλήματα υγείας, επομένως σε αυτές τις περιπτώσεις κρίνεται απαραίτητη η ιατρική παρακολούθηση και η λήψη συμπληρωμάτων Fe για την αποκατάσταση των επιπέδων Fe στον οργανισμό.⁹⁶

Επιπροσθέτως, η παραπάνω παρατήρηση δύναται να συνδεθεί με την εμφάνιση κορυφών υψηλότερης έντασης των κλασμάτων 2 και 3, ή την εμφάνιση διαφορετικών κλασμάτων μεταξύ 520 s έως 1060 s. Λόγω της κορυφής που αντιστοιχεί σε ισοβαρική παρεμπόδιση του ^{56}Fe στην περιοχή αυτή, δεν είναι εφικτή η διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για την παρουσία και την ένταση των κορυφών για τα κλάσματα 2 και 3, άρα δεν είναι δυνατή η υποστήριξη της παραπάνω υπόθεσης.

Τέλος, το κλάσμα 4, που αντιστοιχεί στην Fe-αλβουμίνη, ανιχνεύεται και στα δείγματα των αθλητών της ομάδας A.

3.3.4.2 Μελέτη δειγμάτων ορού αίματος του ίδιου αθλητή.



Εικόνα 39: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{56}Fe από την ανάλυση τριών δειγμάτων ορού αίματος του Αθλητή 10, που ελήφθησαν πριν, 2 ώρες μετά και 48 ώρες μετά την άσκηση, αντίστοιχα, με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε He mode (He: 2 ml/min).

Από το παραπάνω γράφημα (Εικόνα 39) παρατηρείται πως σε όλα τα δείγματα περιέχονται τα ίδια κλάσματα, με τη διαφορά να εντοπίζεται στην ένταση των κορυφών. Ειδικότερα, η κορυφή του κλάσματος 1, για τα δείγματα που λήφθηκαν 48 ώρες έπειτα από την άσκηση, διαθέτει σημαντικά μεγαλύτερη ένταση από τις αντίστοιχες που προκύπτουν για τα δείγματα που λήφθηκαν πριν καθώς και δύο ώρες μετά την άσκηση.

Λόγω της διαφορετικής έντασης του υποβάθρου μεταξύ του δείγματος που λήφθηκε πριν την άσκηση και των δειγμάτων που λήφθηκαν 2 και 48 ώρες μετά την άσκηση δεν είναι δυνατή η σύγκριση της έντασης των κορυφών του χρωματογραφήματος αυτού με τα υπόλοιπα. Όμως, λαμβάνοντας υπόψιν την παραπάνω διαφορά, συμπεραίνεται πως η ένταση της κορυφής του κλάσματος 1, πριν και 2 ώρες μετά την άσκηση δεν εμφανίζουν μεγάλη απόκλιση.

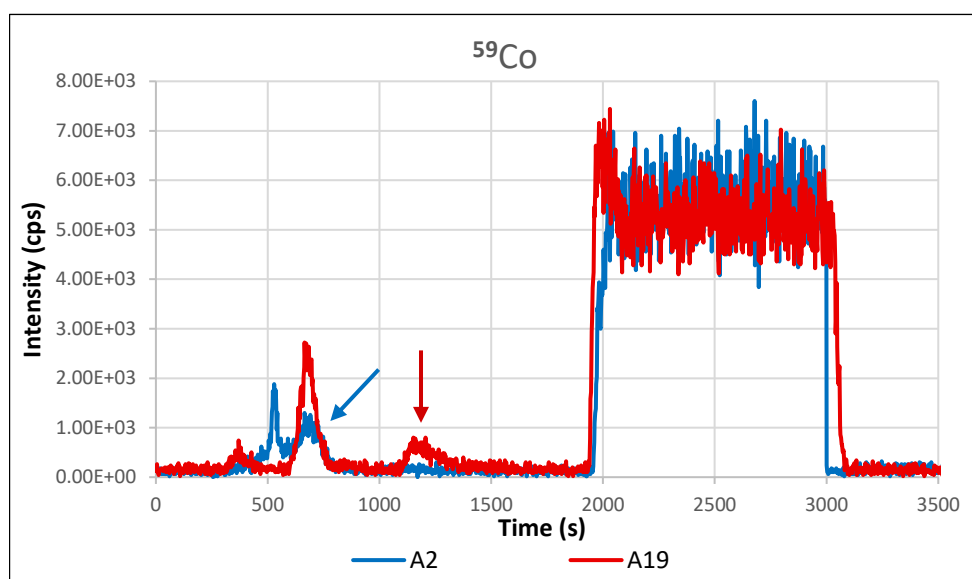
Η μεγάλη αύξηση που παρατηρείται στην ποσότητα Fe που αντιστοιχεί στο κλάσμα 1 είναι πιθανόν να σχετίζεται με τη λήψη τροφής πλούσια σε Fe ή συμπληρωμάτων Fe στο διάστημα των 2 ημερών που μεσολάβησε για την λήψη του δείγματος.

Εν συνεχεία, τα κλάσματα 2 και 3, σε όλα τα χρωματογραφήματα δεν εμφανίζουν σαφή διαχωρισμό, όμως η μορφή και οι εντάσεις των κορυφών που εμφανίζονται μεταξύ των 585 s και 1065 s εμφανίζουν διαφορές μεταξύ των τριών δειγμάτων, επομένως συμπεραίνεται πως η άσκηση καθώς και η διατροφή του αθλητή επηρεάζει αισθητά τις μορφές και την ποσότητα του Fe στο αίμα.

3.3.5 Κοβάλτιο

3.3.5.1 Μελέτη δειγμάτων ορού αίματος διαφορετικών αθλητών.

Αντίστοιχα με τα χρωματογραφήματα του Fe και τα χρωματογραφήματα του Co, που προκύπτουν από την ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος αθλητών σε Standard mode, παρουσιάζουν κορυφές που οφείλονται σε πολυατομικές ισοβαρικές παρεμπόδισεις. Συγκεκριμένα, οι κορυφές που οφείλονται σε οξειδία και υδροξείδια του Ca ($^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$ και $^{42}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$) εμφανίζονται σε χρόνο έκλουσης που αντιστοιχεί στον χρόνο έκλουσης της κορυφής του Ca στο εκάστοτε δείγμα. Το Co διαθέτει μόνο ένα ισότοπο (^{59}Co), επομένως δεν είναι εφικτός ο έλεγχος της ισοτοπικής αναλογίας, ώστε να επαληθευτεί η παραπάνω παρατήρηση, όμως στα δείγματα που ήταν δυνατή η ανάλυση και με He mode, οι κορυφές, που αποδόθηκαν σε πολυατομική ισοβαρική παρεμπόδιση, απουσιάζουν.



Εικόνα 40: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{59}Co από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος των Αθλητών 2 και 19 (72 ώρες μετά την άσκηση), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε Standard mode. Βέλη: κορυφές που οφείλονται σε παρεμπόδιση του ^{59}Co από το $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$ και $^{42}\text{Ca}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$.

Από τα χρωματογραφήματα του Co παρατηρείται πως κατά την ανάλυση δείγματος ορού αίματος με την παρούσα μέθοδο, δύναται να ανιχνευθούν τρία διαφορετικά κλάσματα. Ειδικότερα, στα δείγματα των αθλητών της ομάδας B, παρατηρείται η έκλυση ενός κλάσματος (κλάσμα 1) μεταξύ των 300 s και 545 s. Από τον χρόνο έκλυσης συμπεραίνεται πως το κλάσμα 1 περιλαμβάνει χημικές ουσίες υψηλού μοριακού βάρους (>5 kDa), οι οποίες δεν αλληλεπιδρούν με την στατική φάση της στήλης Blue-HP. Έπειτα, παρατηρείται μια κορυφή μεταξύ των 585 s και 920 s, υψηλότερης έντασης, η οποία αντιστοιχεί στο κλάσμα 3 και περιλαμβάνει είτε μακρομόρια υψηλού μοριακού βάρους που αλληλεπιδρούν ασθενώς με την στήλη Blue-HP, είτε σε μόρια που δεν αλληλεπιδρούν με την στήλη χημικής συγγένειας και διαθέτουν μοριακό βάρος που κυμαίνεται μεταξύ 1-5 kDa περίπου. Τέλος, παρατηρείται η έκλυση μικρής ποσότητας Co κατά την έκλυση της στήλης Blue-HP με κινητή φάση υψηλής ιοντικής ισχύος (1800 – 3000 s).

Αντίθετα, στα δείγματα της ομάδας B παρατηρείται η έκλυση ενός κλάσματος με χρόνο έκλυσης από 370 s έως 600 s, περίπου. Το κλάσμα 2 εκλύεται μεταξύ των κλασμάτων 1 και 3, επομένως, αντίστοιχα με το κλάσμα 3, αναμένεται να περιλαμβάνει ουσίες, οι οποίες εάν δεν αλληλεπιδρούν με τη στήλη Blue-HP, διαθέτουν μοριακό βάρος από 1 έως 5 kDa. Επιπλέον, στα δείγματα της ομάδας A, εμφανίζεται κορυφή που αντιστοιχεί στο κλάσμα 3, όμως ο χρόνος έκλυσης της κορυφής (585 s - 920 s) συμπίπτει με τον χρόνο έκλυσης του κλάσματος του Ca (540 s – 960 s), με αποτέλεσμα να μην είναι γνωστό εάν η κορυφή οφείλεται αποκλειστικά στην παρουσία ισοβαρικής παρεμπόδισης ή περιλαμβάνει και ποσότητες των ενώσεων του κλάσματος 3.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, το Co υφίσταται στον ορό αίματος κυρίως συνδεδεμένο στα μόρια της αλβουμίνης, ενώ μικρότερες ποσότητες αλληλεπιδρούν με τα μόρια της κυανοκοβαλαμίνης και με αμινοξέα.³³ Η Co-αλβουμίνη λόγω της μεγάλης χημικής συγγένειας που διαθέτει με την στήλη Blue-HP αναμένεται να αντιστοιχεί στο κλάσμα 4. Η κυανοκοβαλαμίνη διαθέτει μοριακό βάρος 1,3 kDa, επομένως αναμένεται να εκλουστεί σε μικρότερο χρόνο από τα αμινοξέα. Συμπερασματικά, το κλάσμα 2 δύναται να αποδοθεί στην κυανοκοβαλαμίνη, ενώ το κλάσμα 3 στα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με τα ιόντα Co(II).

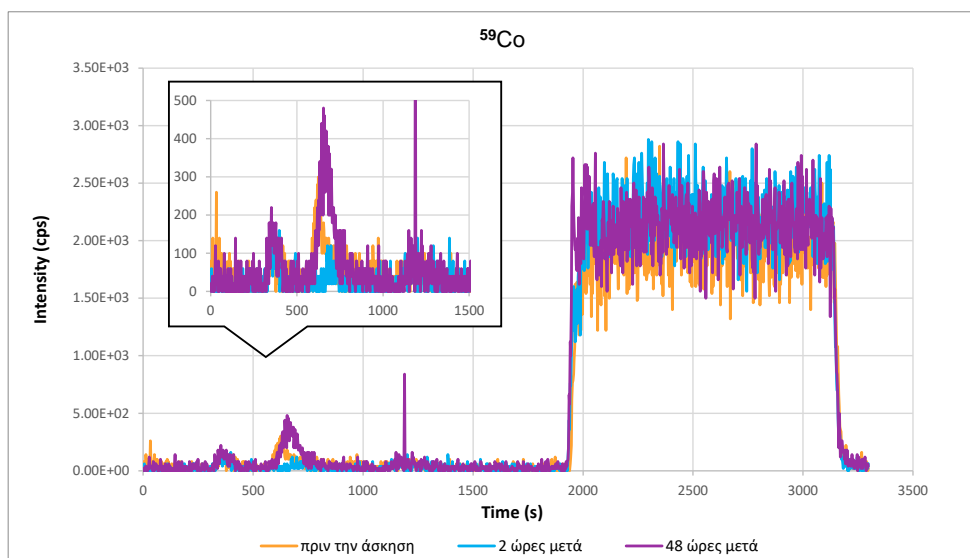
Η ακριβής απόδοση του κλάσματος 2 και 3 στα αντίστοιχα χημικά είδη δεν είναι εφικτή, διότι η πρωτεΐνη μεταφορέας της κυανοκοβαλαμίνης στο αίμα (transcobalamin II) αλληλεπιδρά με την στατική φάση της στήλης Blue-HP.^{61,97} Επομένως, εάν η κυανοκοβαλαμίνη βρίσκεται προσδεμένη στην αντίστοιχη πρωτεΐνη, το μοριακό βάρος του συμπλόκου αλλά και η κατακράτηση του από την Blue-HP είναι μεγαλύτερα και πλέον δεν μπορεί να αποδοθεί με βεβαιότητα στο κλάσμα 2.

Η απουσία κορυφής που αντιστοιχεί σε Co-αλβουμίνη στα δείγματα της ομάδας A, καθώς και η μικρή ένταση της στα δείγματα της ομάδας B, δεν συνάδει με το γεγονός ότι περίπου το 80% Co στα δείγματα ορού αίματος αλληλεπιδρά με την αλβουμίνη.³³

Κατά την έκχυση διαλύματος 2 mM EDTA, 0.05 M CH₃COONH₄, pH 7.0, στο χρωματογραφικό σύστημα έπειτα από την ανάλυση των δειγμάτων παρατηρείται έκλυση σημαντικής ποσότητας Co. Επομένως συμπεραίνεται πως ποσότητα των ιόντων Co(II) που αλληλεπιδρούν με την αλβουμίνη, κατακρατείται από το χρωματογραφικό σύστημα. Τα ιόντα του Co(II), είτε απομακρύνθηκαν από την αλβουμίνη κατά τη διαδικασία της χρωματογραφικής ανάλυσης λόγω ισχυρής αλληλεπίδρασης του με τις αρνητικά φορτισμένες σουλφονικές ομάδες της στήλης Blue-HP, είτε είχαν αποδεσμευθεί από την πρωτεΐνη πριν την ανάλυση, κατά την αποθήκευση ή την προετοιμασία των δειγμάτων.

3.3.5.2 Μελέτη δειγμάτων ορού αίματος του ίδιου αθλητή.

Στα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων ορού του Αθλητή 10, παρατηρείται η παρουσία του κλάσματος 1 και 3 (300 s - 545 s και 585 s - 920 s, αντίστοιχα), ενώ παρατηρείται και η παρουσία κορυφής μεταξύ 1130 s και 1340 s, η οποία αποδίδεται σε πολυατομική ισοβαρική παρεμπόδιση από το Ca, το οποίο εκλούεται στον ίδιο χρόνο. Οι διαφορές που διακρίνονται μεταξύ των δειγμάτων είναι η ένταση της κορυφής του κλάσματος 3, η οποία εμφανίζεται σημαντικά μειωμένη 2 ώρες μετά την άσκηση του αθλητή. Η μείωση των επιπέδων του Co στον ορό αίματος έπειτα από έντονη άσκηση, έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία και αποδίδεται σε απώλειες του μετάλλου από τον οργανισμό λόγω της εφίδρωσης, αλλά και σε ανακατανομή της ποσότητας του στους διάφορους ιστούς.⁹⁸ Η ποσότητα του Co που αντιστοιχεί στο κλάσμα 3, επανέρχεται σε επίπεδα παραπλήσια με αυτά που ανιχνεύονται πριν την άσκηση.



Εικόνα 41: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{59}Co από την ανάλυση τριών δειγμάτων ορού αίματος του Αθλητή 10, που ελήφθησαν πριν, 2 ώρες μετά και 48 ώρες μετά την άσκηση, αντίστοιχα, με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε He mode (He: 2 ml/min).

Κατά την έγχυση διαλύματος EDTA 2 mM, 0.05 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 7.0, για την απομάκρυνση των ιόντων Co(II) που έχουν κατακρατηθεί στο σύστημα, ανιχνεύεται ποσότητα Co, η οποία πιθανόν να αντιστοιχεί στα ιόντα Co που βρίσκονταν προσδεμένα στην αλβουμίνη, αφού σε κανένα από τα δείγματα του Αθλητή 10, δεν ανιχνεύθηκε το κλάσμα 4 που αντιστοιχεί στην Co-αλβουμίνη. Η απομάκρυνση των ιόντων Co από την αλβουμίνη και η κατακράτησή τους από το χρωματογραφικό σύστημα, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

3.3.6 Χαλκός

3.3.6.1 Μελέτη δειγμάτων ορού αίματος διαφορετικών αθλητών.

Στα χρωματογραφήματα Cu των αθλητών ανιχνεύθηκαν 4 διαφορετικές κορυφές κατά την έκλουση του συστήματος με την κινητή φάση χαμηλής ιοντικής ισχύος (0 – 1800 s). Συγκεκριμένα, στα δείγματα και των δύο ομάδων ανιχνεύεται μια κορυφή (κλάσμα 1) παραπλήσιας έντασης στην περιοχή των 320 s με 545 s. Επομένως, στη κορυφή αυτή αντιστοιχούν χημικές ουσίες υψηλού μοριακού βάρους (>5 kDa), οι οποίες δεν αλληλεπιδρούν με την στατική φάση της στήλης Blue-HP, όπως η Ceruloplasmin (150 kDa).

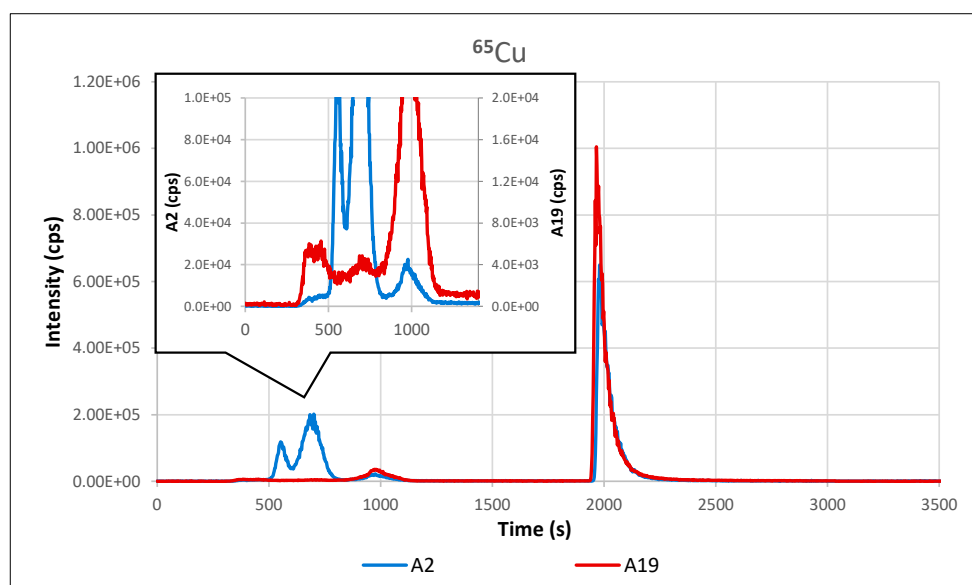
Εν συνεχεία, στα δείγματα της ομάδας A παρατηρείται η έκλουση 2 κορυφών υψηλής έντασης από τα 455 s έως τα 850 s (κλάσματα 2 και 3). Ενδεικτική αντιστοιχία των κλασμάτων με τον χρόνο έκλουσης τους είναι η εξής: 455 – 610 s (κλάσμα 2) και 610 – 850 s (κλάσμα 3).

Στα δείγματα της ομάδας B, στην περιοχή αυτή ανιχνεύεται ποσότητα Cu, όμως λόγω της μεγάλης αλληλεπικάλυψης των κορυφών, δεν είναι δυνατή η ανίχνευσή τους

ως διακριτές κορυφές. Τα κλάσματα αυτά δύνανται να περιλαμβάνουν μακρομόρια υψηλού μοριακού βάρους που αλληλεπιδρούν ασθενώς με την στήλη Blue-HP, όπως τα μόρια της *transcurrein*, ή και χημικές ουσίες μικρότερου μοριακού βάρους (< 5 kDa), οι οποίες εμφανίζουν μικρή ή καθόλου αλληλεπίδραση με την Blue-HP, όπως τα σύμπλοκα του Cu με αμινοξέα.

Επιπροσθέτως, από τα 850 s έως τα 1170 s, περίπου, παρατηρείται η έκλυση ενός ακόμη κλάσματος Cu (κλάσμα 4). Η κορυφή του κλάσματος 4 είναι υψηλότερης έντασης στα δείγματα της ομάδας Β και δύνανται να αποδοθεί στην παρουσία χημικών ειδών του Cu με χαμηλό μοριακό βάρος (<1 kDa) ή και στα ελεύθερα ιόντα Cu(II).

Τέλος, στο χρόνο έκλυσης του χρωματογραφικού συστήματος με κινητή φάση υψηλής ιοντικής ισχύος (1800 – 3000 s), ανιχνεύονται μεγάλες ποσότητες Cu (κλάσμα 5), οι οποίες μπορούν να αποδοθούν στα ιόντα Cu που αλληλεπιδρούν με τα μόρια της αλβουμίνης.



Εικόνα 42: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{65}Cu από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος των Αθλητών 2 και 19 (72 ώρες μετά την άσκηση), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε Standard mode.

Η Ceruloplasmin αποτελεί πρωτεΐνη μεταφοράς και αποθήκευσης του Cu και αναμένεται να περιλαμβάνει την πλειονότητα της ποσότητας του Cu στα δείγματα ορού, γεγονός που δεν αντικατοπτρίζεται στην ένταση της κορυφής του κλάσματος 1.^{11,35} Η χαμηλή ποσότητα ceruloplasmin μπορεί να συσχετιστεί με την μεγαλύτερη ποσότητα ελεύθερων ιόντων Cu που εντοπίζονται στο κλάσμα 4 και στην υψηλή συγκέντρωση *transcurrein*, για την ομάδα Α, ή αντίστοιχα στην υψηλή συγκέντρωση Cu-αλβουμίνης, για την ομάδα Β. Η αλβουμίνη και η *transcurrein* εμφανίζουν υψηλή χημική συγγένεια για το χαλκό και εκτελούν τις λειτουργίες της ceruloplasmin όταν τα επίπεδα της είναι χαμηλά.⁹⁹

Λόγω της απουσίας πρότυπων διαλυμάτων και της αλληλεπικάλυψης των κορυφών δεν είναι δυνατή η ακριβής αντιστοίχιση των πρωτεϊνών με τις κορυφές

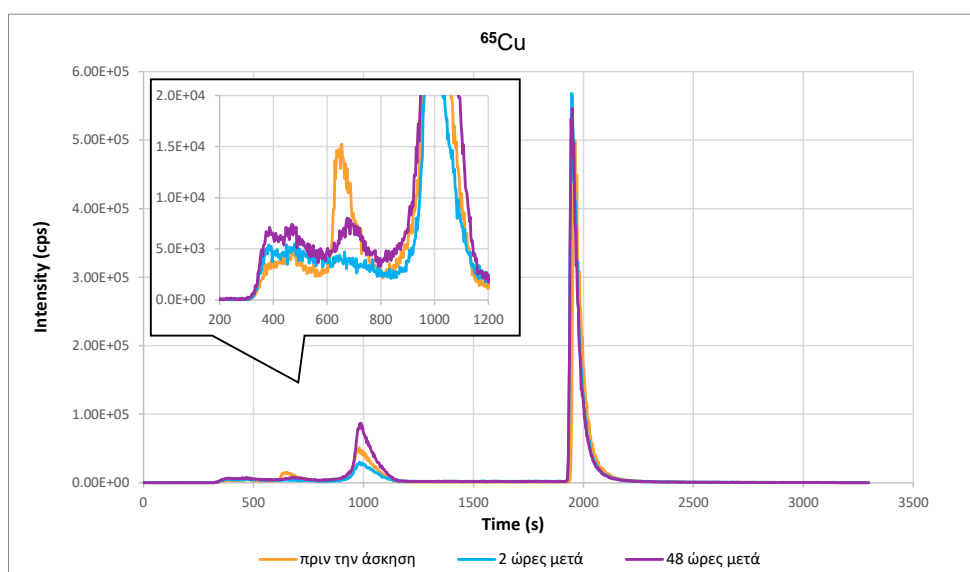
προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παραπάνω συσχέτιση, ενώ λόγω της κατάστασης των δειγμάτων δεν γνωρίζουμε εάν τα επίπεδα της ceruloplasmin (με δεσμευμένη ποσότητα Cu) είναι χαμηλά λόγω της κατάστασης του οργανισμού των αθλητών, ή μειώθηκαν λόγω αποδιάταξης της πρωτεΐνης κατά την συντήρηση ή προετοιμασία των δειγμάτων.

Ο αριθμός των κλασμάτων, που προκύπτουν στα δείγματα ορού ανθρώπινου αίματος, είναι μεγαλύτερος σε σχέση με την προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο ίδιο εργαστήριο, όμως η αλληλεπικάλυψη των κορυφών είναι εκτενής, γεγονός που θα προκαλέσει σημαντικά σφάλματα στην ταυτοποίηση αλλά και την ποσοτικοποίηση των κλασμάτων. Ο διαχωρισμός των κορυφών αναμένεται να γίνει πιο αποτελεσματικός με την χρήση στήλης μοριακού αποκλεισμού μεγαλύτερης διαχωριστικής ικανότητας.

3.3.6.2 Μελέτη δειγμάτων ορού αίματος του ίδιου αθλητή.

Από τη σύγκριση των χρωματογραφημάτων των δειγμάτων του Αθλητή 10, που ελήφθησαν διαφορετικές χρονικές στιγμές σε σχέση με την στιγμή εκγύμνασης, εντοπίζονται διαφορές που σχετίζονται με την ένταση των κορυφών ορισμένων κλασμάτων. Συγκεκριμένα, στο δείγμα που λήφθηκε πριν την άσκηση παρατηρείται η παρουσία υψηλής ποσότητας του κλάσματος 2 (ή και 3), η οποία έχει μειωθεί 2 ώρες μετά την άσκηση και εμφανίζεται αυξημένη 48 ώρες μετά την άσκηση. Παρόμοια διακύμανση παρατηρείται και για το κλάσμα 4, όμως η ποσότητα του κλάσματος στο δείγμα των 48 ωρών μετά την άσκηση είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την ποσότητα που ανιχνεύθηκε πριν την άσκηση.

Η μείωση της συγκέντρωσης του Cu στον ορό αίματος έπεται από έντονη αερόβια ή μη αερόβια άσκηση έχει αναφερθεί σε αρκετές μελέτες και αποδόθηκε στην αυξημένη εφίδρωση και στην έντονη λειτουργία του αντιοξειδωτικού μηχανισμού στον οργανισμό, η οποία απαιτεί υψηλή ποσότητα Cu για τον σχηματισμό των αντιοξειδωτικών ενζύμων.¹⁰⁰⁻¹⁰² Αντιθέτως, σε ορισμένες μελέτες έχει παρατηρηθεί αύξηση της ποσότητας του Cu στον ορό αίματος, λόγω της άσκησης, ή και καμία μεταβολή, ενώ συμπεραίνεται πως η επίδραση της άσκησης στα επίπεδα του Cu σχετίζεται με το είδος και την ένταση των ασκήσεων που εκτελούνται.⁹⁸



Εικόνα 43: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφήματων ^{65}Cu από την ανάλυση τριών δειγμάτων ορού αίματος του Αθλητή 10, που ελήφθησαν πριν, 2 ώρες μετά και 48 ώρες μετά την άσκηση, αντίστοιχα, με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε He mode. (He: 2 ml/min).

Η ολική ποσότητα Cu που ανιχνεύεται 2 ώρες μετά την άσκηση φαίνεται πως είναι μικρότερη από την αντίστοιχη των άλλων δύο δειγμάτων. Αντιθέτως, στην προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε για τα ίδια δείγματα παρατηρήθηκε μείωση της ολικής συγκέντρωσης του Cu με την πάροδο του χρόνου, έπειτα από την άθληση. Οι παρατηρούμενες διαφορές, πέραν της κατάστασης των δειγμάτων, δύναται να αποδοθούν και στην μέθοδο ανάλυσης. Ειδικότερα, οι αναλύσεις της προηγούμενης μελέτης πραγματοποιήθηκαν σε Standard mode, όπου η ισοβαρική παρεμπόδιση του ^{65}Cu από το $^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$ δύναται να ανιχνευθεί στα αντίστοιχα χρωματογραφήματα. Τα επίπεδα του Ca στο δείγμα που λήφθηκε 2 ώρες μετά την άθληση είναι υψηλότερα από τα υπόλοιπα, επομένως είναι δυνατόν να οδηγεί στη λανθασμένη ανίχνευση αυξημένης ποσότητας του ^{65}Cu .

3.3.7 Νικέλιο

Στην περίπτωση των γραφημάτων του Ni, το προφίλ των δύο ομάδων είναι σημαντικά διαφορετικό. Κατά την έκλυση του χρωματογραφικού συστήματος με την κινητή φάση χαμηλής ιοντικής ισχύος (0 – 1800 s), στα δείγματα της ομάδας A παρατηρείται μία χρωματογραφική κορυφή υψηλής έντασης (κλάσμα 1), η οποία εκλύεται από τα 500 s έως τα 800 s. Το κλάσμα αυτό δύναται να περιλαμβάνει ποσότητες χημικών ειδών χαμηλού μοριακού βάρους (<1 kDa), που δεν αλληλεπιδρούν με τη στήλη Blue-HP, όπως τα σύμπλοκα του Ni με τα αμινοξέα.

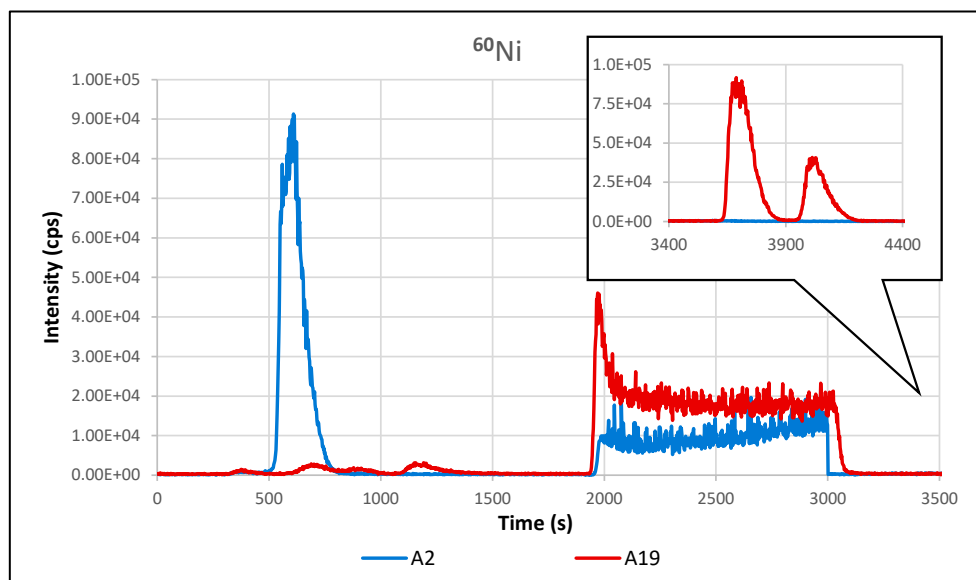
Είναι γνωστό πως το Ni στο ορό ανθρώπινου αίματος δύναται να αλληλεπιδρά με μια πρωτεΐνη υψηλού μοριακού βάρους, τη νικελοπλάσμινη.⁴² Στα πλαίσια της βιβλιογραφικής αναζήτησης για την παρούσα εργασία, δεν εντοπίστηκε μελέτη για την αλληλεπίδραση της νικελοπλάσμινης με την στήλη Blue-HP ή χρωματογραφικές

στήλης που να φέρουν παρόμοιο υποκαταστάτη. Εάν η νικελοπλασμίνη αλληλεπιδρά με την στήλη Blue-HP, ποσότητα της πρωτεΐνης αυτής δύναται να περιλαμβάνεται στο κλάσμα 1.

Στα δείγματα της ομάδας Β παρατηρούνται αρκετές κορυφές μικρής έντασης. Οι κορυφές αυτές, έπειτα από έλεγχο της ισοτοπικής αναλογίας $^{58}\text{Ni}/^{60}\text{Ni}$, προέκυψε πως δεν αντιστοιχούν σε ποσότητες Ni. Ποσότητες ανιχνεύεται κατά την έκλουση του χρωματογραφικού συστήματος με την κινητή φάση υψηλής ιοντικής ισχύος (1800 – 3000 s) (κλάσμα 2). Το κλάσμα αυτό δύναται να αποδοθεί σε μόρια της αλβουμίνης που φέρουν ιόντα Ni(II).⁴²

Κατά την ανάλυση των δειγμάτων της ομάδας Β, έπειτα από την εξισορρόπηση του συστήματος με Buffer A (μετά τα 3140 s της ανάλυσης) πραγματοποιήθηκαν 2 εγχύσεις διαλύματος 2 mM EDTA, 0.05 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 7.0 (σε διάστημα 300 s) για την απομάκρυνση των ιόντων του δείγματος που είχαν κατακρατηθεί στη στήλη. Από την διαφορά της έντασης των δύο κορυφών που προέκυψαν, συμπεραίνεται πως τα μόρια του EDTA συμπλοκοποίησαν και παρέσυραν από το χρωματογραφικό σύστημα σημαντική ποσότητα Ni(II).

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται πως στα δείγματα των αθλητών της ομάδας Β, η πλειονότητα της ποσότητας του Ni βρίσκεται σε ελεύθερη ιοντική μορφή ή και ενταγμένο σε πρωτεΐνες όπου αλληλεπιδρά ασθενώς, με αποτέλεσμα κατά την χρωματογραφία να απομακρύνεται από αυτές.



Εικόνα 44: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{60}Ni από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος των Αθλητών 2 και 19 (72 ώρες μετά την άσκηση), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε Standard mode.

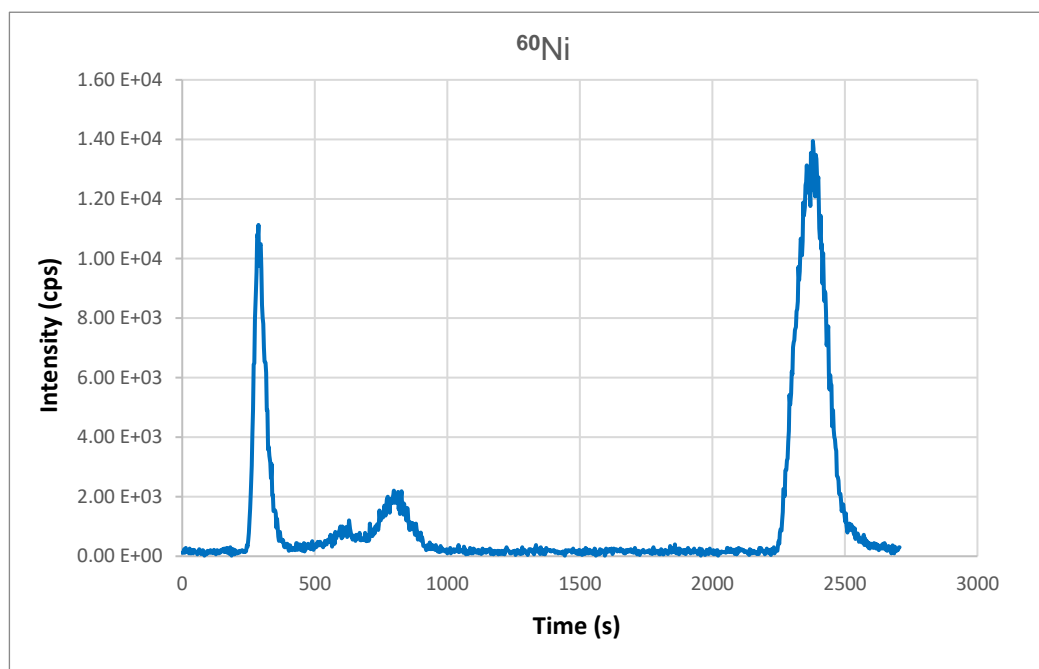
3.3.7.1 Διερεύνηση κατακράτησης ιόντων νικελίου από τη διπλή στήλη μοριακού αποκλεισμού HiTrap Desalting και την στήλη χημικής συγγένειας Blue – HP.

Για την διερεύνηση της κατακράτησης των ιόντων Ni(II) στα δείγματα ορού ανθρώπινου αίματος από το χρωματογραφικό σύστημα (dcSEC-AF), πραγματοποιήθηκε ανάλυση δυο παρόμοιων δειγμάτων του ίδιου αθλητή, με τη χρήση της διπλής στήλης HiTrap Desalting (dcSEC-ICP-MS) και με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS, αντίστοιχα.

Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε ανάλυση του δείγματος ορού αίματος του αθλητή 9 72 ώρες μετά την άσκηση, με την μέθοδο dcSEC-ICP-MS, και εν συνεχεία του δείγματος που λήφθηκε πριν την άσκηση, με την μέθοδο dcSEC-ICP-MS. Στην πρώτη μέθοδο, έπειτα από την έκλυση των κορυφών του δείγματος πραγματοποιήθηκε ένα injection διαλύματος 8 mM EDTA, 0.05 M CH₃COONH₄, pH 7.0, για την απομάκρυνση της ποσότητας του Ni(II) που κατακρατήθηκε στη στήλη, ενώ στην δεύτερη πραγματοποιήθηκαν δύο εγχύσεις διαλύματος 2 mM EDTA, 0.05 M CH₃COONH₄, pH 7.0.

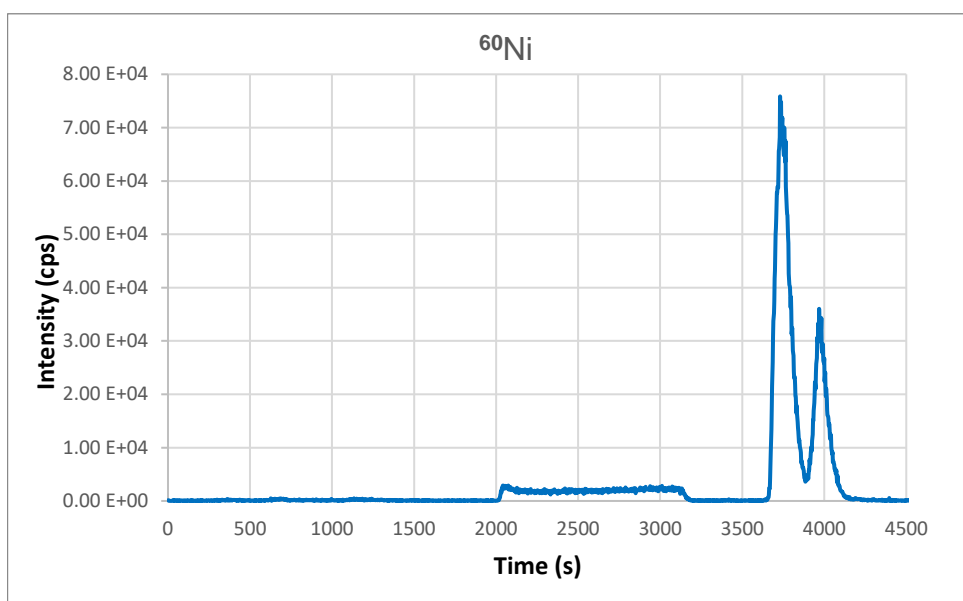
Για την καλύτερη σύγκριση των αποτελεσμάτων των παραπάνω αναλύσεων, θα έπρεπε να γίνει χρήση ίδιας συγκέντρωσης διαλύματος EDTA και ίδιος αριθμός εγχύσεων, όμως οι αναλύσεις των παραπάνω δειγμάτων αποτελούν μέρος άλλων πειραμάτων και λόγω των περιορισμένων δειγμάτων δεν ήταν εφικτό να πραγματοποιηθούν νέες αναλύσεις.

Κατά την ανάλυση του δείγματος ορού με τη διπλή στήλη μοριακού αποκλεισμού (Εικόνα 45), παρατηρείται η έκλυση ενός κλάσματος από τα 240 s έως τα 400 s (κλάσμα Α) που αντιστοιχεί σε μακρομόρια υψηλού μοριακού βάρους (>5 kDa) και δύναται να περιλαμβάνει την νικελοπλασμίνη και την Ni-αλβουμίνη. Στην συνέχεια, μεταξύ των 500 s και 800 s παρατηρείται η έκλυση δύο κορυφών χαμηλότερης έντασης (κλάσμα Β και Γ), οι οποίες αντιστοιχούν σε χημικά είδη του Ni με μικρότερο μοριακό βάρος. Ειδικότερα, το κλάσμα Β περιλαμβάνει ουσίες με μοριακό βάρος μεταξύ 1-5 kDa όπως τα σύμπλοκα του Ni με τα αμινοξέα και το κλάσμα Γ περιλαμβάνει ουσίες χαμηλότερου μοριακού βάρους (<1 kDa), όπως τα ιόντα Ni(II).



Εικόνα 45: Χρωματογράφημα ^{60}Ni από την ανάλυση του δείγματος ορού αίματος του Αθλητή 9 (72 ώρες μετά την άσκηση), με τη μέθοδο dcSEC – ICP - MS, σε He mode. (He: 2 ml/min). (2240 - 2695 s : Έγχυση διαλύματος 8 mM EDTA, 0.05 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 7.0)

Από την ανάλυση του δείγματος ορού με τη διπλή στήλη μοριακού αποκλεισμού ακολουθούμενη από την στήλη χημικής συγγένειας Blue-HP, και έπειτα από έλεγχο της ισοτοπικής αναλογίας $^{58}\text{Ni}/^{60}\text{Ni}$ προκύπτει πως δεν εκλούεται ποσότητα Ni κατά την έκλουση του χρωματογραφικού συστήματος με το Buffer A (0 – 1800 s). Μικρή ποσότητα ανιχνεύεται κατά την έκλουση του χρωματογραφικού συστήματος με το Buffer B (1800 - 3000 s), η οποία αντιστοιχεί στην Ni-αλβουμίνη. Η πλειονότητα του Ni εκλούεται έπειτα από τις εγχύσεις του διαλύματος EDTA. Το γεγονός αυτό, υποδεικνύει πως υφίσταται ισχυρή κατακράτηση των ιόντων Ni από την στήλη Blue-HP, πιθανόν λόγω των αρνητικά φορισμένων σουλφονικών ομάδων που περιέχει, η οποία δύναται να προκαλεί και απομάκρυνση του Ni από τις αντίστοιχες μεταλλοπρωτεΐνες.⁵⁸

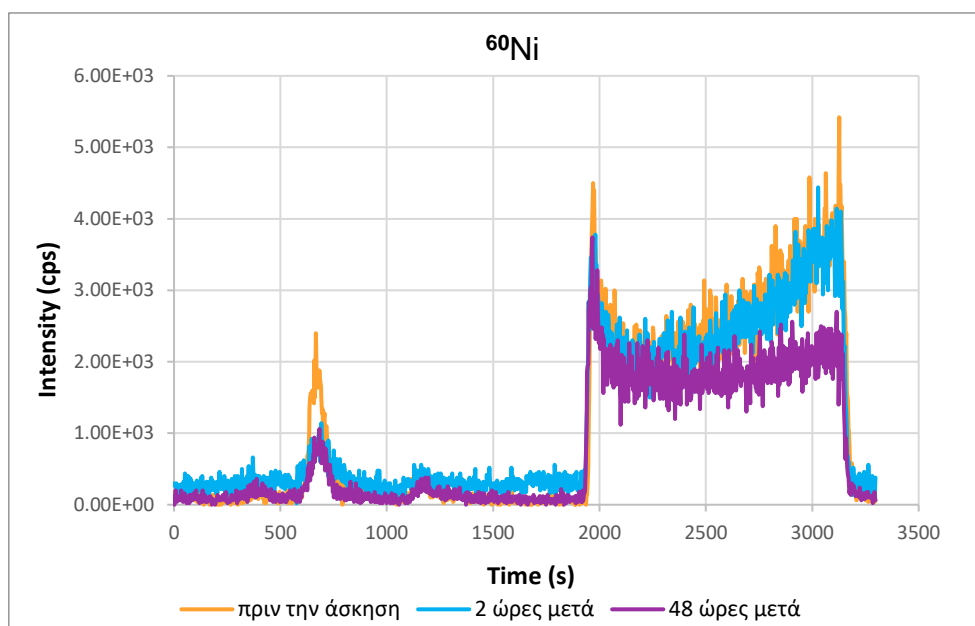


Εικόνα 46: Χρωματογράφημα ^{60}Ni από την ανάλυση του δείγματος ορού αίματος του Αθλητή 9 (πριν την άσκηση), με τη μέθοδο dcSEC-AF - ICP- MS, σε He mode (He: 2 ml/min). (3650 - 4200 s: Δύο εγχύσεις διαλύματος 2 mM EDTA, 0.05 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 7.0)

Συμπερασματικά από τα παραπάνω προκύπτει πως η χρήση της στήλης Blue-HP δεν ενδείκνυται για την ανάλυση μεταλλοπρωτεϊνών που περιέχουν Ni, ενώ κρίνεται απαραίτητος ο περαιτέρω έλεγχος της κατακράτησης ιόντων Ni από τη στήλη SEC.

3.3.7.2 Μελέτη δειγμάτων ορού αίματος του ίδιου αθλητή.

Από την ανάλυση των δειγμάτων του Αθλητή 10, με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS, σε He mode παρατηρούνται 3 κλάσματα στο χρόνο έκλουσης του χρωματογραφικού συστήματος με την κινητή φάση χαμηλής ιοντικής ισχύος (0 – 1800 s). Από τον έλεγχο της ισοτοπικής αναλογίας παρατηρείται πως μόνο η κορυφή που εκλύεται μεταξύ των 590 και 810 s αντιστοιχεί σε ποσότητες Ni και αποτελεί το κλάσμα 1, επομένως οι κορυφές που εμφανίζεται στα 300-450 s και στα 1100-1340 s οφείλονται σε πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις. Επιπλέον, και στα τρία δείγματα ορού αίματος παρατηρείται παραπλήσια ποσότητα Ni-αλβουμίνης, γεγονός που υποδεικνύει πως η έντονη άσκηση δεν επηρεάζει αισθητά τα επίπεδα του Ni που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη αυτή.

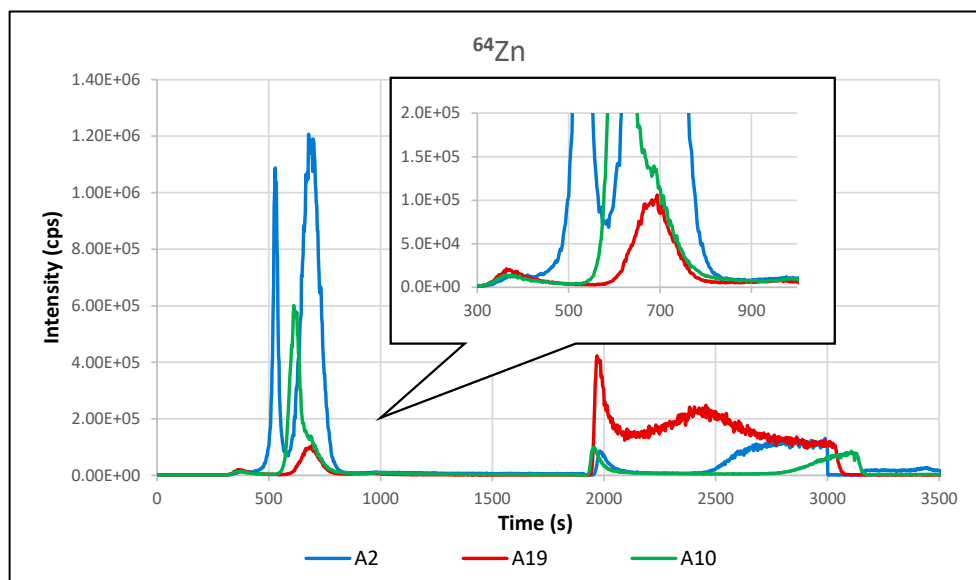


Εικόνα 47: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{60}Ni από την ανάλυση τριών δειγμάτων ορού αίματος του Αθλητή 10, που ελήφθησαν πριν, 2 ώρες μετά και 48 ώρες μετά την άσκηση, αντίστοιχα, με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε He mode (He: 2 ml/min).

Για τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές μέθοδοι απομάκρυνσης των ιόντων Ni(II) που είχαν κατακρατηθεί από τις στήλες, γεγονός που δεν επιτρέπει την σύγκριση της ποσότητας τους για την διεξαγωγή συμπερασμάτων.

3.3.8 Ψευδάργυρος

Στα χρωματογραφήματα Zn, που προέκυψαν από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος των αθλητών, παρατηρήθηκε η έκλυση πολλαπλών κορυφών μεταξύ των 320 s και 850 s περίπου. Συγκεκριμένα στα δείγματα όλων των αθλητών παρατηρήθηκε η έκλυση μίας κορυφής, μικρής έντασης, μεταξύ των 320 s και 480 s (κλάσμα 1). Ο χρόνος έκλυσης του κλάσματος 1 αντιστοιχεί στο κενό όγκο του χρωματογραφικού συστήματος, επομένως περιλαμβάνει ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους (>5 kDa), οι οποίες δεν αλληλεπιδρούν με την στήλη Blue-HP.



Εικόνα 48: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{64}Zn από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος των Αθλητών 2, 10 και 19 (72 ώρες μετά την άσκηση), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε Standard mode.

Εν συνεχεία, στα δείγματα της ομάδας A ανιχνεύεται, μεταξύ 450 s και 570 s, μία κορυφή υψηλής έντασης (κλάσμα 2), η οποία δύναται να αντιστοιχεί σε ουσίες με μοριακό βάρος που κυμαίνεται μεταξύ 1 έως 5 kDa ή σε μακρομόρια, που αλληλεπιδρούν ασθενώς με τη στήλη Blue-HP. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία το 20% του Zn στον ορό αίματος αλληλεπιδρά ισχυρά με την α_2 -μακρογλοβουλίνη (700 kDa), η οποία αναμένεται να αλληλεπιδρά ασθενώς με τη στήλη Blue-HP.^{35,58} Επομένως, το κλάσμα 2 πιθανόν να περιλαμβάνει την α_2 -μακρογλοβουλίνη.

Έπειτα, παρατηρείται η έκλουση ενός κλάσματος που αντιστοιχεί σε μεγάλη ποσότητα Zn και εκλύεται από τα 570 s έως τα 850 s (κλάσμα 3). Ποσότητα του κλάσματος 3 ανιχνεύεται και στα δείγματα της ομάδας B, και δύναται να περιέχει σύμπλοκα του Zn με ενώσεις μικρού μοριακού βάρους (<1 kDa), όπως είναι τα αμινοξέα ή τα ανιόντα του κιτρικού.

Επιπλέον, παρατηρείται η παρουσία ενός κλάσματος χαμηλής έντασης (κλάσμα 4), με χρόνο έκλουσης από 850 s έως 1150 s. Το κλάσμα αυτό αντιστοιχεί σε χημικά είδη χαμηλού μοριακού βάρους (<1 kDa), τα οποία αλληλεπιδρούν σημαντικά με τη Blue-HP. Συνεπώς, το κλάσμα 4 πιθανόν να περιλαμβάνει, τα ελεύθερα ιόντα Zn(II), τα οποία ανιχνεύονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στον ορό αίματος.³⁵

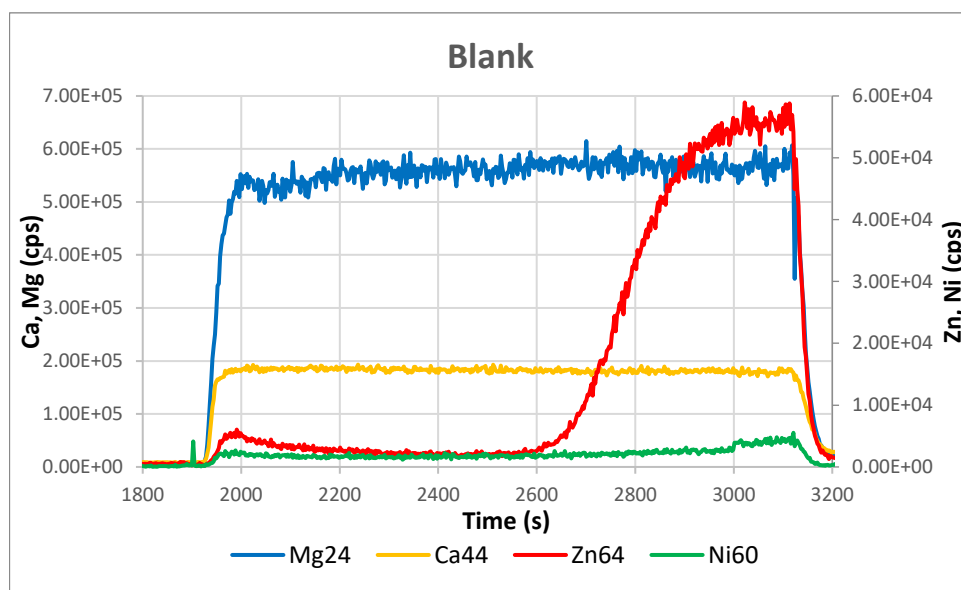
Στο χρωματογράφημα του δείγματος του αθλητή 10, παρατηρείται μια κορυφή η οποία εκλύεται σε χρόνο ενδιάμεσο των κλασμάτων 2 και 3 (540 – 850s). Η κορυφή αυτή εμφανίζει έναν ώμο, που δύναται να αποτελεί ποσότητα του κλάσματος 3. Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από το χρωματογράφημα, δεν επαρκούν για την διεξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το εάν η παρατηρούμενη κορυφή αποτελεί ένα διαφορετικό κλάσμα, ή αποτελεί έναν συνδυασμό των κλασμάτων 2 και 3.

Τέλος, σε όλα τα χρωματογραφήματα των αθλητών ανιχνεύεται ποσότητα Zn (κλάσμα 4) κατά την έκλυση του χρωματογραφικού συστήματος με την κινητή φάση υψηλής ιοντικής ισχύος, Buffer B (1800 – 3000 s), η οποία αντιστοιχεί στην Zn-αλβουμίνη.

Κατά την έκλυση του δείγματος του Αθλητή 19 με το Buffer B, παρατηρείται η παρουσία μιας δεύτερης κορυφής , η οποία υποδεικνύει την παρουσία χημικών ειδών που αλληλεπιδρούν με τη στατική φάση της στήλης Blue-HP σε μεγαλύτερο βαθμό από την αλβουμίνη. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η συγκεκριμένη στατική φάση εμφανίζει την υψηλή χημική συγγένεια με την αλβουμίνη, την οποία και απομακρύνει επιλεκτικά από πολύπλοκα δείγματα πρωτεϊνών, ενώ κατακρατεί σημαντικά ορισμένες λιποπρωτεΐνες και την γ-γλοβουλίνη.¹⁰³ Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το διαφορετικό προφίλ του υποβάθρου του Zn στο Buffer B, το οποίο ερμηνεύεται παρακάτω (Παράγραφος 3.3.8.1), δεν επιτρέπει την αντιστοίχιση του κλάσματος αυτού με συγκεκριμένα χημικά είδη.

Η αλβουμίνη, στον ορό ανθρώπινου αίματος περιλαμβάνει περίπου το 80% της συνολικής ποσότητας του Zn.³⁵ Στον Αθλητή 19 παρατηρείται αυξημένη ποσότητα Zn στο κλάσμα που περιλαμβάνεται η αλβουμίνη. Αντιθέτως, στους αθλητές της ομάδας A αλλά και στον Αθλητή 10 διαπιστώνεται πως το κλάσμα 4 αντιστοιχεί σε κορυφή σημαντικά χαμηλότερης έντασης σε σχέση με τα υπόλοιπα κλάσματα. Το διαφορετικό χρωματογραφικό προφίλ θα μπορούσε να αποδοθεί στην λήψη συμπληρωμάτων διατροφής, στα οποία ο Zn περιέχεται με την μορφή οξικού, θειικού ή και γλυκονικού Zn.¹⁰⁴ Εναλλακτικά, οι παρατηρούμενες διαφορές μπορούν να είναι αποτέλεσμα της κατάστασης το δειγμάτων, αφού ο Zn αλληλεπιδρά ασθενώς με την αλβουμίνη και μεταβολές στην δομή της πρωτεΐνης ή στο περιβάλλον του δείγματος οδηγούν σε αποδεύσμευσή του.

3.3.8.1 Υπόβαθρο ψευδαργύρου (Κινητή φάση υψηλής ιοντικής ισχύος)



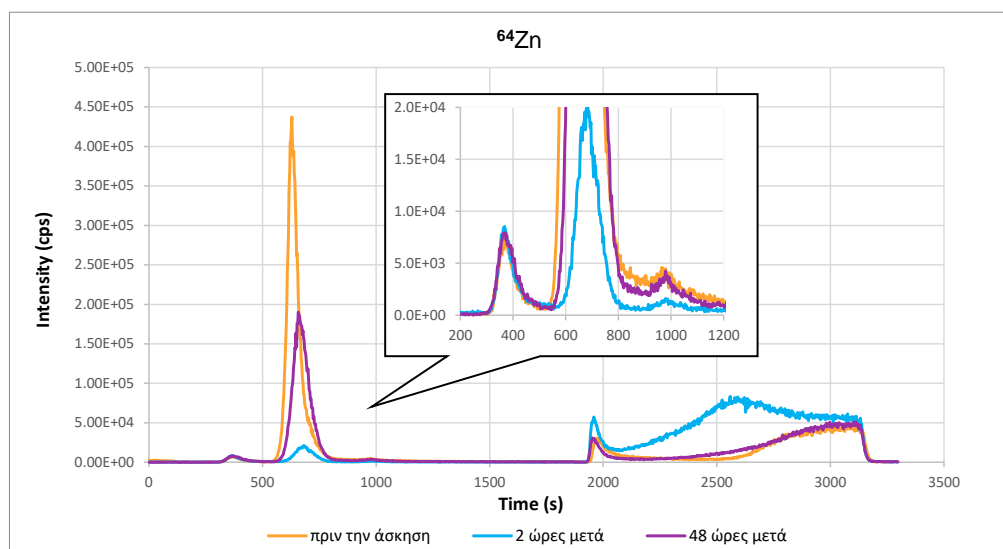
Εικόνα 49: Συγκεντρωτικό γράφημα προφίλ έκλουσης της στήλης Blue-HP με Buffer B (1.5 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH = 7) κατά την ανάλυση τυφλού διαλύματος (Buffer A) με την μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε He mode, για τα στοιχεία Ca, Mg, Zn και Ni.

Όπως διαπιστώνεται στην Εικόνα 49, κατά την έκλουση της στήλης Blue-HP με Buffer B, δεν παρατηρείται άμεση αύξηση του υποβάθρου για το Zn, όπως παρατηρείται στα υπόλοιπα στοιχεία. Αντιθέτως, αρχικά, παρατηρείται η εμφάνιση μιας κορυφής χαμηλής έντασης και έπειτα υφίσταται σταδιακή αύξηση του υποβάθρου και σταθεροποίηση του σε ορισμένη ένταση.

Στα δείγματα του ορού αίματος, η αρχική κορυφή διαθέτει σημαντικά μεγαλύτερη ένταση σε σχέση με την αντίστοιχη που εμφανίζεται στο χρωματογράφημα του τυφλού διαλύματος, επομένως δύναται να συσχετιστεί με την έκλουση μεταλλοπρωτεϊνών.

Να σημειωθεί πως παρότι παραπάνω παρατίθεται το χρωματογράφημα που προέκυψε από την ανάλυση του τυφλού διαλύματος σε He mode (Εικόνα 49), η σύγκριση της έντασης της κορυφής των εκάστοτε δειγμάτων πραγματοποιείται με τυφλό διάλυμα που αναλύθηκε στις ίδιες συνθήκες.

Το προφίλ του υποβάθρου που αντιστοιχεί στο Buffer B, μπορεί να αποδοθεί στην ισχυρή αλληλεπίδραση της στήλης Blue-HP με τα ιόντα Zn(II) . Με την εισαγωγή του Buffer B, στη στήλη, μεγάλη ποσότητα ιόντων Zn(II) που υφίστανται στην κινητή φάση κατακρατούνται από την στήλη, με αποτέλεσμα το υπόβαθρο να μην εμφανίζει την αναμενόμενη αύξηση. Στις περιπτώσεις όπου με την εισαγωγή του Buffer B εκλούνται πρωτεΐνες, που περιέχουν ισχυρά δεσμευμένο Zn(II) , τα ιόντα Zn(II) απομακρύνονται από τη στήλη μαζί με την πρωτεΐνη και ανιχνεύονται ως κορυφή. Έπειτα από ένα χρονικό διάστημα (10-15 λεπτά ανάλογα με την ποσότητα των ιόντων που προϋπήρχαν στη στήλη), επέρχεται κορεσμός της στήλης σε ιόντα Zn(II) , με αποτέλεσμα να παρατηρείται αύξηση του υποβάθρου.

3.3.8.2 Μελέτη δειγμάτων ορού αίματος του ίδιου αθλητή.

Εικόνα 50: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{64}Zn από την ανάλυση τριών δειγμάτων ορού αίματος του Αθλητή 10, που ελήφθησαν πριν, 2 ώρες μετά και 48 ώρες μετά την άσκηση, αντίστοιχα, με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε He mode (He: 2 ml/min).

Στα δείγματα του αθλητή 10, παρατηρείται η παρουσία των κλασμάτων 1, 3, 4 και 5. Αναλυτικότερα, η συγκέντρωση του κλάσματος 1 (320 – 530 s) παραμένει σταθερή ανεξάρτητα από το χρόνο λήψης του δείγματος, ενώ παρατηρείται σημαντική μείωση στη συγκέντρωση του κλάσματος 3 (530 – 820 s) του δείγματος που ελήφθη 2 ώρες μετά την άσκηση. Η ποσότητα Zn που αντιστοιχεί στο κλάσμα 3 παρουσιάζει αύξηση 48 ώρες μετά την άσκηση. Επιπλέον, παρατηρείται πως η κορυφή που αντιστοιχεί στο κλάσμα 4 (885 -1150 s) εμφανίζει ίδια ένταση στα δείγματα που λήφθηκαν πριν την άσκηση και 48 ώρες μετά, ενώ εμφανίζεται σημαντικά μειωμένη 2 ώρες μετά την άσκηση. Η κορυφή που αντιστοιχεί στην έκλυση της στήλης Blue-HP με το Buffer B (1800-3000 s) και συσχετίστηκε με την παρουσία της Zn-αλβουμίνης, παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με την αντίστοιχη του κλάσματος 4, όμως στο δείγμα που λήφθηκε 2 ώρες μετά την άσκηση εμφανίζει σημαντικά υψηλότερη ένταση και ακολουθείται από μια επιπλέον κορυφή σε μεγαλύτερο χρόνο έκλυσης.

Η μείωση στη ολική ποσότητα του Zn 2 ώρες μετά την έντονη άσκηση, συνάδει με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των ίδιων δειγμάτων σε προηγούμενη μελέτη.⁷¹ Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η μείωση αυτή αποδίδεται στην αυξημένη εφίδρωση καθώς και στην αυξημένες απαιτήσεις του οργανισμού για παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD).¹⁰¹ Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η μείωση εντοπίζεται στα κλάσματα του Zn που αντιστοιχούν στα ελεύθερα ιόντα Zn(II) και στα σύμπλοκα χαμηλού μοριακού βάρους, γεγονός που δύναται να υποδεικνύει πως αυτές οι μορφές του Zn μπορούν να αξιοποιηθούν πιο άμεσα για την παραγωγή των ενζύμων, σε σχέση με τον δεσμευμένο Zn.

Η κλασμάτωση που επιτυγχάνεται στα δείγματα ορού ανθρώπινου αίματος με την παρούσα μέθοδο είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη που προκύπτει από την μέθοδο που αναπτύχθηκε στην προηγούμενη μελέτη. Όμως η αλληλεπικάλυψη των κορυφών που προκύπτουν δεν επιτρέπει την ταυτοποίηση και την ακριβή ποσοτικοποίηση του Zn που αντιστοιχεί σε κάθε κλάσμα, επομένως κρίνεται απαραίτητη η βελτίωση του διαχωρισμού των κορυφών. Αυτό δύναται να επιτευχθεί με την χρήση στήλης μοριακού αποκλεισμού μεγαλύτερης διαχωριστικής ικανότητας.

Τέλος, η παρουσία της δεύτερης κορυφής κατά την έκλυση της στήλης Blue-HP με την κινητή φάση μεγαλύτερης ιοντικής ισχύς, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

3.4 Πρότυπα διαλύματα και καμπύλες βαθμονόμησης

3.4.1 Προβλήματα χρήσης πρότυπων πολυστοιχειακών ιοντικών διαλυμάτων.

Κατά την ανάλυση πρότυπων πολυστοιχειακών διαλυμάτων με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε He mode, διαπιστώθηκε η κατακράτηση σημαντικής ποσότητας ιόντων από το χρωματογραφικό σύστημα. Συγκεκριμένα, το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε για τα ιόντα των στοιχείων Se, Fe, Co, Ni και Zn. Για την επίλυση του προβλήματος αυτού κρίθηκε απαραίτητη η χρήση διαφορετικών πρότυπων διαλυμάτων, στα οποία να παρεμποδίζεται η αλληλεπίδραση των περιεχόμενων ιόντων με τις χρωματογραφικές στήλες.

Ειδικότερα, επιλέχθηκε η χρήση ποσότητας EDTA, το οποίο αποτελεί χηλικό υποκαταστάτη με μεγάλη χημική συγγένεια για δισθενή ιόντα.¹⁰⁵ Η δέσμευση των ιόντων από τα μόρια του EDTA αποτελεί μια αντίδραση ισορροπίας, επομένως κρίθηκε απαραίτητη η διερεύνηση της συγκέντρωσης EDTA που πρέπει να χρησιμοποιηθεί προκειμένου η ποσότητα των ιόντων, που παραμένουν στο διάλυμα σε ελεύθερη μορφή, να μην ευνοεί την πρόσδεσή τους στη στατική φάση της χρωματογραφικής στήλης.

Για την μελέτη αυτή παρασκευάστηκαν τρία πρότυπα πολυστοιχειακά διαλύματα (STD 4) μέσω κατάλληλης αραίωσης των πυκνών μονοστοιχειακών πρότυπων διαλυμάτων σε Buffer A και συγκεντρώσεις 2 mM EDTA, 4 mM και 8 mM, αντίστοιχα. Τα πρότυπα διαλύματα χαμηλότερων συγκεντρώσεων παρασκευάστηκαν με αραίωση του πρότυπου διαλύματος STD 4 σε κατάλληλη ποσότητα Buffer A. Η αραίωση δεν πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα EDTA, προκειμένου να αποφευχθεί η μεγάλη περίσσεια ποσότητας EDTA. Στις χρωματογραφικές στήλες περιέχεται ποσότητα κατακρατημένων μεταλλικών ιόντων λόγω της παρουσίας του στις κινητές φάσεις. Η περίσσεια EDTA, θα είχε ως αποτέλεσμα την δέσμευση των ιόντων κατά την διέλευση του πρότυπου διαλύματος από την στήλη και την ανίχνευση αυξημένης ποσότητας μεταλλικών ιόντων. Αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της κλίσης της καμπύλης βαθμονόμησης και κατ' επέκταση αρνητικό σφάλμα κατά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του μετάλλου.

Έπειτα από την ανάλυση κάθε πρότυπου διαλύματος, πραγματοποιούνταν έγχυση διαλύματος 2 mM EDTA, 0.05 M CH₃COONH₄, pH 7.0, για τον έλεγχο της

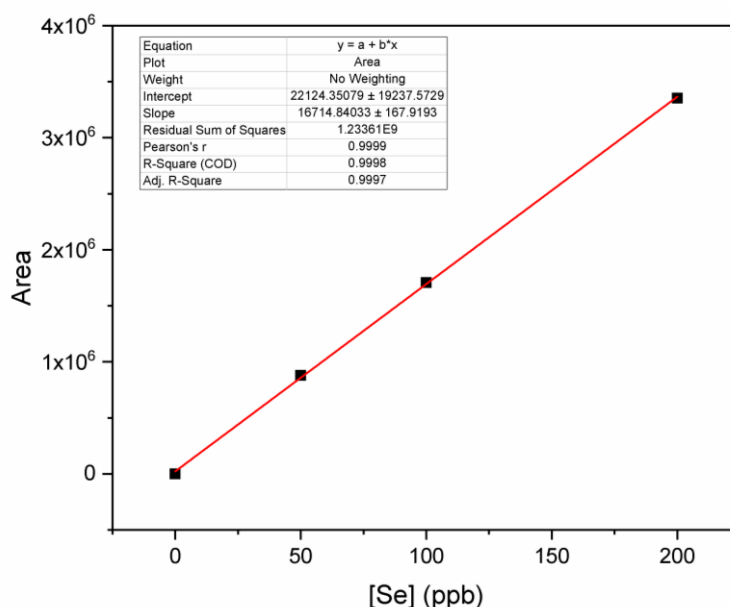
ποσότητας των ιόντων κάθε στοιχείο που κατακρατήθηκαν στο σύστημα χρωματογραφίας. Η συγκέντρωση EDTA που κρίθηκε καταλληλότερη για το πρότυπο διάλυμα υψηλότερης συγκέντρωσης (STD4) είναι τα 8 mM, διότι στις αντίστοιχες αναλύσεις δεν παρατηρήθηκαν φαινόμενα κατακράτησης των μεταλλικών ιόντων. Επομένως για την δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης για κάθε στοιχείο παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα STD 4, STD 3, STD 2 και STD 1 με συγκεντρώσεις EDTA 8 mM, 4 mM, 2 mM και 0 mM, αντίστοιχα και αναλύθηκαν με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε He mode (ροή He 2 ml/min).

Οι κορυφές που προέκυψαν στα αντίστοιχα χρωματογραφήματα των πρότυπων διαλυμάτων, για κάθε στοιχείο, ολοκληρώθηκαν με την βοήθεια του λογισμικού OriginPro 2018. Εν συνεχεία, μέσω του ίδιου λογισμικού, βάσει της αρχής ελαχίστων τετραγώνων, πραγματοποιήθηκε γραμμική προσαρμογή (linear fit) των σημείων που προκύπτουν από τις ολοκληρώσεις των κορυφών συναρτήσει της συγκέντρωσης του εκάστοτε στοιχείου στο αντίστοιχο πρότυπο διάλυμα. Η απόκλιση των σημείων από την γραμμική προσαρμογή υποδεικνύεται από την απόκλιση του συντελεστή συσχέτισης (r^2) από την μονάδα.

Οι καμπύλες βαθμονόμησης που προέκυψαν για τα στοιχεία Ca, Mg, Ni, Zn, Co, Cu και Se δύνανται να κατηγοριοποιηθούν σε δύο ομάδες, βάσει της απόκλισης των σημείων τους από την γραμμική προσαρμογή καθώς και άλλων παρατηρήσεων που αναφέρονται στη συνέχεια. Παρακάτω, παρατίθενται οι καμπύλες βαθμονόμησης ορισμένων στοιχείων για κάθε ομάδα, καθώς και οι αντίστοιχες παρατηρήσεις.

3.4.2 Καμπύλες βαθμονόμησης: Mg, Ca, Se, Fe και Cu

Τα σημεία που προέκυψαν από την ανάλυση των πρότυπων διαλυμάτων για το Se, δεν εμφανίζουν σημαντική απόκλιση από την γραμμική προσαρμογή με τον συντελεστή συσχέτισης (r^2) να πλησιάζει την μονάδα. Αντιστοίχως, για τις καμπύλες βαθμονόμησης των στοιχείων Mg, Ca, Fe και Cu, οι οποίες παρατίθενται στο Παράρτημα 6.10.



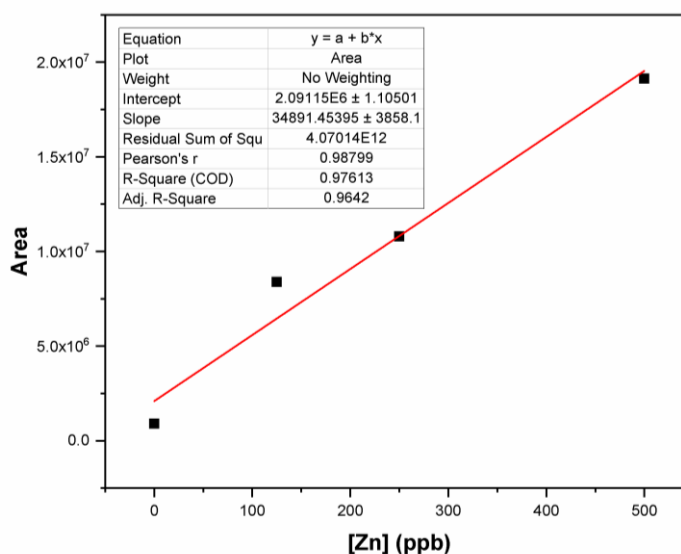
Εικόνα 51: Καμπύλη βαθμονόμησης του ^{82}Se .

Τα στοιχεία Se, Fe και Cu εμφάνισαν έντονα φαινόμενα κατακράτησης κατά την ανάλυση πρότυπων πολυστοιχειακών διαλυμάτων χωρίς την παρουσία EDTA. Επομένως, η γραμμικότητα, που εμφανίζεται στα σημεία της καμπύλης βαθμονόμησης καμπύλης τους, επιβεβαιώνει πως η συγκέντρωση του EDTA, που επιλέχθηκε για κάθε πρότυπο διάλυμα, επαρκεί για την παρεμπόδιση της κατακράτησης των ιόντων, του εκάστοτε στοιχείου, στο σύστημα χρωματογραφίας.

3.4.3 Καμπύλες βαθμονόμησης: Zn, Co και Ni.

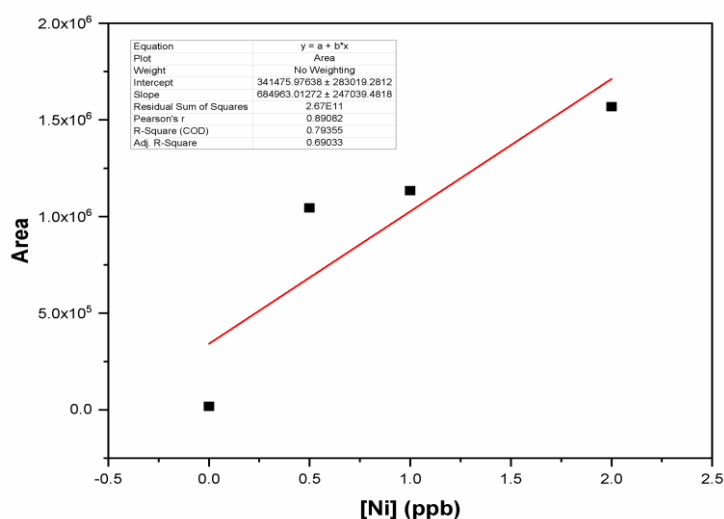
Στην καμπύλη βαθμονόμησης των στοιχείων Ni, Co και Zn παρατηρείται σημαντική απόκλιση των σημείων από την γραμμική προσαρμογή.

Ειδικότερα, στην καμπύλη βαθμονόμησης του ^{64}Zn , παρατηρείται πως το σημείο αποκλίνει σημαντικά από την ευθεία, αντιστοιχεί στο πρότυπο διάλυμα χαμηλότερης συγκέντρωσης (STD2). Το αντίστοιχο παρατηρείται και στην καμπύλη βαθμονόμησης του ^{60}Co .



Εικόνα 52: Καμπύλη βαθμονόμησης του ^{64}Zn .

Αντίθετα, στην καμπύλη βαθμονόμησης του ^{60}Ni , παρατηρείται η τιμές του ολοκληρώματος των κορυφών που προκύπτουν από την ανάλυση των πρότυπων διαλυμάτων STD 2 και STD 3, είναι παραπλήσιες, ενώ δεν εμφανίζουν μεγάλη απόκλιση από την τιμή που προκύπτει για το πρότυπο διάλυμα STD 4.



Εικόνα 53: Καμπύλη βαθμονόμησης του ^{60}Ni .

Κατά τη ανάλυση δείγματος ορού αίματος σε διαφορετικές λειτουργίες του universal cell (Παράγραφος 3.2.1), με τη χρήση αερίου ηλίου δεν παρατηρείται η εμφάνιση κορυφής στο χρωματογράφημα των στοιχείων Zn, Co και Ni που οφείλεται στην παρεμπόδιση των οξειδίων και των υδροξειδίων του Ca. Ο σχηματισμός των παραπάνω ισοβαρικών παρεμποδίσεων όμως εξαρτάται άμεσα από την συγκέντρωση του Ca. Η συγκέντρωση του Ca στο συγκεκριμένο δείγμα δύναται να είναι μικρότερη, σε σχέση με την αντίστοιχη των πρότυπων διαλυμάτων. Επομένως, είναι πιθανόν κατά την ανάλυση των προτύπων διαλυμάτων, παρά τη χρήση ροής 2 ml/min αερίου He, λόγω των μεγάλων συγκεντρώσεων Ca, να παράγονται σημαντικές ποσότητες των αντίστοιχων οξειδίων.

Όπως παρατηρείται και από τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 16), η κορυφή του Ca εκκλύεται σε χρόνο παραπλήσιο της αντίστοιχης κορυφής των στοιχείων Zn, Co και Ni. Κατά συνέπεια, είναι πιθανόν τα οξείδια και τα υδροξείδια του Ca, να συμβάλλουν στην αύξησή του ολοκληρώματος της κορυφής των στοιχείων αυτών με αποτέλεσμα να την απόκλιση των σημείων από τη γραμμικότητα, στις αντίστοιχες καμπύλες βαθμονόμησης.

Πίνακας 16: Χρόνος έκλυσης κορυφής Ca, Zn, Co και Ni κατά την ανάλυση του πρότυπου διαλύματος χαμηλότερης συγκέντρωσης (STD2).

Ισότοπο	Χρόνος έκλυσης (s)
^{44}Ca	545 - 960
^{64}Zn	525 - 825
^{59}Co	535 - 880
^{60}Ni	545 - 835

Το σφάλμα, που προκαλείται από την ισοβαρική παρεμπόδιση, αναμένεται να είναι σημαντικότερο σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις των στοιχείων. Παρότι στο πρότυπο διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης υφίστανται και μικρότερες συγκεντρώσεις Ca, η ποσότητα του παραμένει σημαντικά υψηλή (50 ppm).

Όπως αναφέρθηκε και στην Παράγραφο 3.2.1, το οξείδιο του Ca ($^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$) που αποτελεί ισοβαρική παρεμπόδιση του ^{60}Ni , περιλαμβάνει το δεύτερο σε αφθονία ισότοπο του Ca (^{44}Ca : 2,09 %) επομένως θα παράγονται σε μεγαλύτερη ποσότητα από τις αντίστοιχες παρεμποδίσσεις των στοιχείων Zn και Co. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τις μικρές συγκεντρώσεις του Ni στα πρότυπα διαλύματα (0,5 ppm στο STD 2), οδηγεί στις παρατηρούμενες αποκλίσεις των σημείων της καμπύλης βαθμονόμησης του Ni από τη γραμμική προσαρμογή.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται πως η κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης για τα στοιχεία Zn, Co και Ni, δεν είναι εφικτή λόγω της υψηλής συγκέντρωσης Ca στα πρότυπα διαλύματα, η οποία οδηγεί σε σχηματισμό υψηλής ποσότητας ισοβαρικών παρεμποδίσεων. Για την αποφυγή των παρατηρούμενων φαινομένων ισοβαρικής παρεμπόδισης, προτείνεται η χρήση ξεχωριστών πρότυπων διαλυμάτων για το ασβέστιο και τα υπόλοιπα στοιχεία.

3.5 *Chlamydomonas reinhardtii*

Ο μεταβολισμός του Se από τον μονοκύτταρο οργανισμό *Chlamydomonas reinhardtii*, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς ο οργανισμός αυτός έχει την ικανότητα παραγωγής τουλάχιστον 10 διαφορετικών ειδών σεληνοπρωτεΐνης ενώ το είδος των μορφών του Se που υφίσταται στα κύτταρα εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση του Se στο περιβάλλον καλλιέργειάς τους.⁵¹ Για την μελέτη των μορφών του Se στα κύτταρα συναρτήσεως της συγκέντρωσης του Se(VI) της καλλιέργειας, πραγματοποιήθηκε ανάλυση δειγμάτων λύσης κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* που επωάστηκαν παρουσία 0, 20, 50, 100 και 150 μM Se(VI).

Η κλασμάτωση σεληνοπρωτεΐνων των *Chlamydomonas reinhardtii* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της χρωματογραφικής στήλης Desalting HiTrap-HP με κινητή φάση 0,05 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 7.0 (Buffer A).

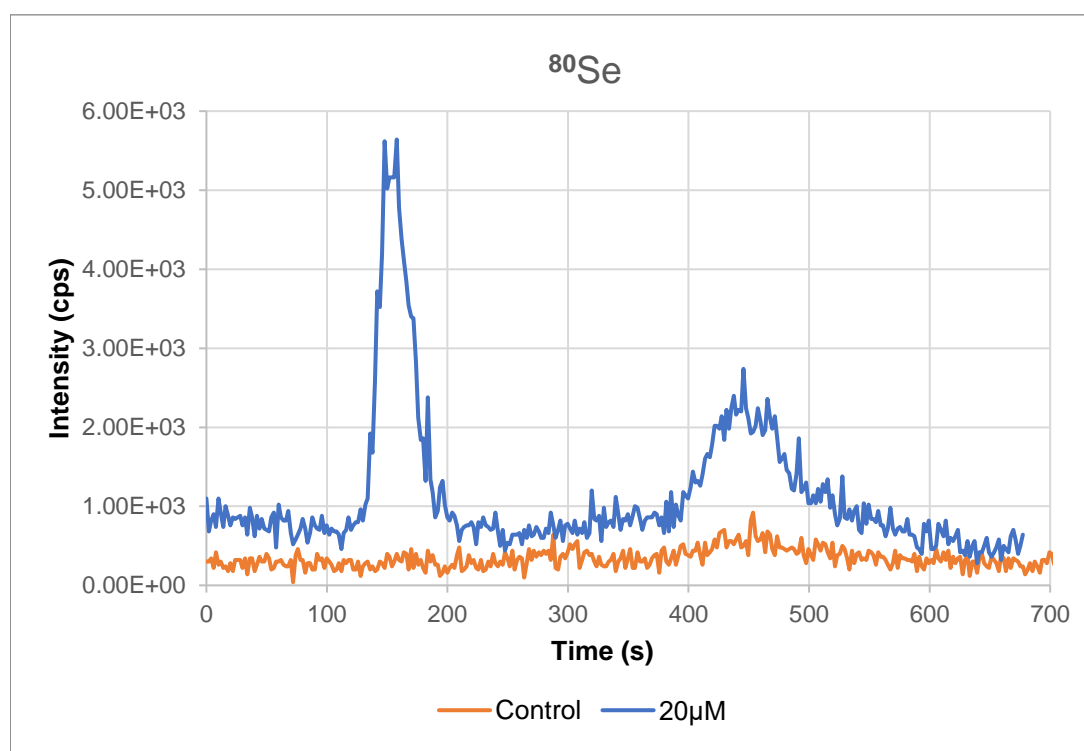
Για την ανάλυση έγινε χρήση του universal cell σε O_2 mode (ροή αερίου: 1,5 ml/min), προκειμένου να είναι δυνατή η ταυτόχρονη παρακολούθηση της έκλουσης των πρωτεϊνών μέσω του ^{48}SO . Επιπλέον, χρήση της κυψελίδας αντίδρασης με αέριο O_2 , επιτρέπει την ανίχνευση του πιο άφθονου ισότοπου του σεληνίου (^{80}Se), διότι συμβάλλει στην διάσπαση του $^{40}\text{Ar}_2^+$, το οποίο αποτελεί την κύρια πολυατομική ισοβαρική παρεμπόδισή του.

3.5.1 Ποιοτική μελέτη μορφών σεληνίου συναρτήσεως της συγκέντρωσης Se(VI) στο περιβάλλον καλλιέργειας.

Από το χρωματογράφημα της ανάλυσης του κυτταρικού περιεχομένου των *C. reinhardtii* από την καλλιέργεια-Control ("Control"), παρατηρείται μια ευρεία κορυφή πολύ μικρής έντασης μεταξύ των 355 s και 555 s, η οποία αντιστοιχεί σε χημικά είδη

Se μοριακού βάρους μικρότερου των 1000 Da. Το κλάσμα αυτό (κλάσμα 3), δύναται να αποδοθεί σε σύμπλοκα του Se μικρού μοριακού βάρους ή ακόμη και σε ιόντα Se (Se(IV) ή Se(VI))⁵¹. Στο χρωματογράφημα του Control δεν ανιχνεύονται ποσότητες Se, οι οποίες να αντιστοιχούν σε μόρια υψηλού μοριακού βάρους όπως είναι οι σεληνοπρωτεΐνες.

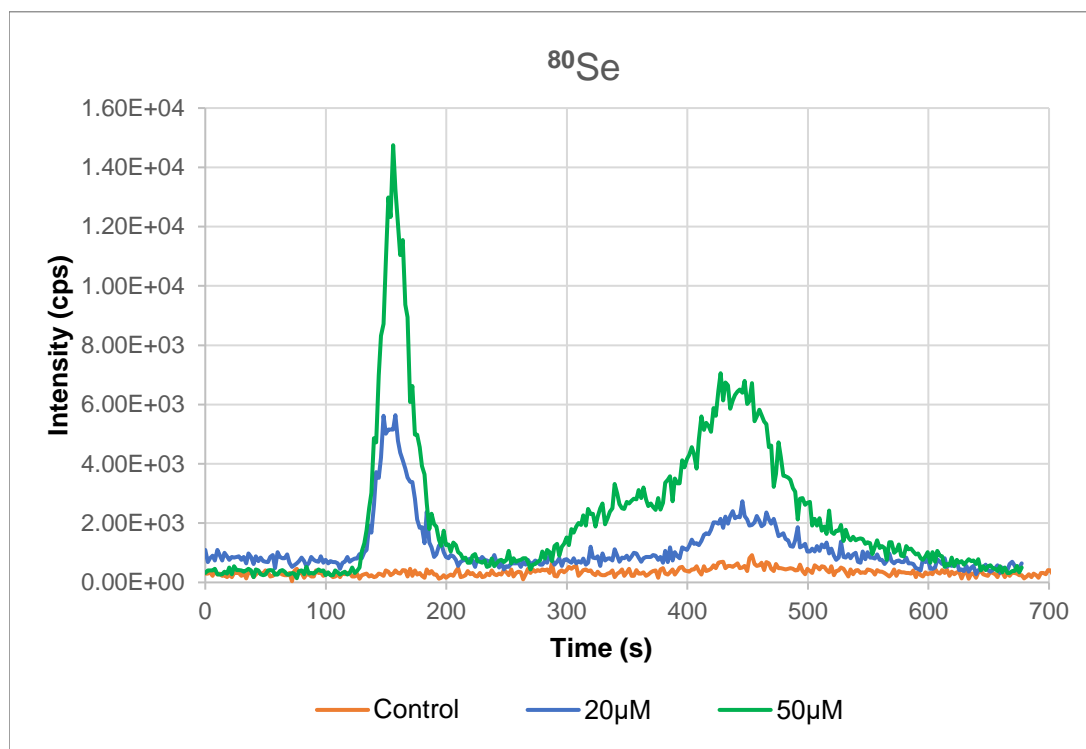
Αντιθέτως, στο χρωματογράφημα της ανάλυσης του κυτταρικού περιεχομένου των *C. reinhardtii* από την καλλιέργεια που περιείχε 20 μM Se(VI), παρατηρείται η έκλυση ενός κλάσματος (κλάσμα 1) μεταξύ 120 s και 210 s. Το κλάσμα αυτό εκλύεται με τον κενό όγκο της στήλης επομένως περιλαμβάνει χημικά είδη μοριακού βάρους υψηλότερο των 5 kDa, τα οποία πιθανόν αποτελούν τις σεληνοπρωτεΐνες των κυττάρων. Επιπλέον, παρατηρείται η έκλυση κορυφής από τα 380 έως τα 600 s περίπου, η οποία αντιστοιχεί στο κλάσμα 3 που ανιχνεύθηκε και στο Control.



Εικόνα 54: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ⁸⁰Se από την ανάλυση κυττάρων *C. reinhardtii* που έχουν υποστεί λύση, με την μέθοδο SEC - ICP - MS σε O₂ mode (O₂: 1.5 ml/min). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία 0 μM (Control) και 20 μM Se(VI), αντίστοιχα.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται πως η παρουσία ποσότητας Se(VI) στο περιβάλλον καλλιέργειας των *C. reinhardtii*, έχει ως αποτέλεσμα την απορρόφηση ποσότητας Se από τα κύτταρα. Μέρος της ποσότητας του Se που εισάγεται στα κύτταρα εντάσσεται σε οντότητες υψηλού μοριακού βάρους, πιθανόν σε πρωτεΐνες, ενώ από την αύξηση της έντασης της κορυφής του κλάσματος 3, σε σχέση με το Control, συμπεραίνεται πως μέρος της ποσότητας του Se στο κύτταρο παραμένει σε ιοντική μορφή ή σχηματίζει σύμπλοκα χαμηλού μοριακού βάρους (Ανόργανο Se).

Γενικά, η ποσότητα του Se(VI) που εισάγεται στο κύτταρο δύναται να εκκινεί την διαδικασία παραγωγής σεληνοπρωτεϊνών του κυττάρου, με στόχο την μείωση του ιοντικού Se στο κυτταρόπλασμα (ομοιόσταση). Η εισαγωγή Se στις πρωτεΐνες είναι πιθανόν να λαμβάνει χώρα μέσω της μετατροπής του ανόργανου Se σε οργανική μορφή και συγκεκριμένα σε σεληνοκυστεΐνη και σεληνομεθειονίνη, τα οποία στη συνέχεια χρησιμοποιούνται σε πρωτεΐνες.⁵¹ Τέλος, το Se σε υψηλές συγκεντρώσεις δύναται να αντικαταστήσει το θείο στις πρωτεΐνες του κυττάρου.¹⁰⁶



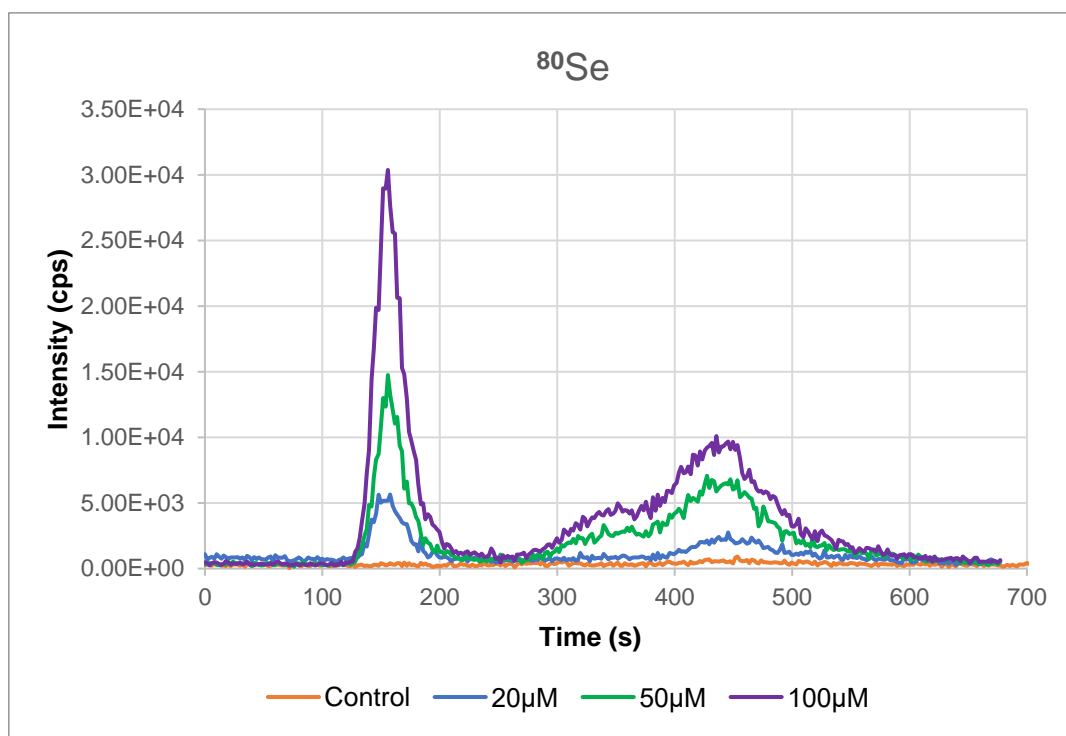
Εικόνα 55: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφμάτων ^{80}Se από την ανάλυση κυττάρων *C. reinhardtii* που έχουν υποστεί λύση, με την μέθοδο SEC - ICP - MS σε O2 mode (O2: 1.5 ml/min). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία 0 μM (Control), 20 μM και 50 μM Se(VI), αντίστοιχα.

Με την παρουσία υψηλότερης συγκέντρωσης Se(VI) στην καλλιέργεια των *C. reinhardtii*, παρατηρείται περεταίρω αύξηση της ποσότητας του Se που αντιστοιχεί στο κλάσμα των σεληνοπρωτεϊνών (κλάσμα 1) καθώς και στα χαμηλού μοριακού βάρους είδη του Se (κλάσμα 3). Παράλληλα, παρατηρείται η εμφάνιση ενός νέου κλάσματος (κλάσμα 2) μεταξύ των κλασμάτων 1 και 3, το οποίο αρχίζει να εκλύεται από την στήλη στα 270 s. Η κορυφή αυτού του κλάσματος εμφανίζει εκτενή αλληλεπικάλυψη με την αντίστοιχη του κλάσματος 3.

Τα είδη του Se, που περιλαμβάνονται στο κλάσμα 2, εκλύονται στον όγκο της κινητής φάσης της χρησιμοποιούμενης στήλης, επομένως αναμένεται να διαθέτουν μοριακό βάρος μικρότερο των 1000 Da. Ο μεγαλύτερος χρόνος κατακράτησης του κλάσματος 2 σε σχέση με το κλάσμα 3 υποδεικνύει την παρουσία χημικών ειδών μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Σε αυτό το κλάσμα δύναται να περιέχονται ποσότητες

σεληνοκυστεΐνης ή σεληνομεθειονίνης, ενώ είναι πιθανή και η παρουσία ολιγοπεπτιδίων, όπως οι φυτοχελατίνες.

Οι φυτοχελατίνες αποτελούν ολιγοπεπτίδια που παράγονται στα ανώτερα φυτά και σε ορισμένους μύκητες, όταν αυτά βρεθούν σε συνθήκες υψηλών συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων. Οι φυτοχελατίνες αποτελούν μέρος του μηχανισμού άμυνας των κυττάρων δεσμεύοντας τα ιόντα των βαρέων μετάλλων που εισήχθησαν στο κύτταρο και μειώνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη συγκέντρωσή τους στο κυτταρόπλασμα. Για την παραγωγή των φυτοχελατινών απαιτείται η ενεργοποίηση του ενζύμου συνθάσης της φυτοχελατίνης, η οποία πραγματοποιείται μέσω της πρόσδεσης ενός μεταλλικού ιόντος όπως το Cd^{2+} , το Pb^{2+} κ.α.^{16,46,50} Στα πλαίσια της βιβλιογραφικής έρευνας για την παρούσα εργασία, δεν βρέθηκε μελέτη η οποία να αναφέρει την ενεργοποίηση της συνθάσης της φυτοχελατίνης από το σελήνιο, ή την εκκίνηση παραγωγής των φυτοχελατινών από το σελήνιο μέσω κάποιου άλλου μηχανισμού. Η παρουσία φυτοχελατινών στα κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί υπό συνθήκες παρουσίας υψηλών συγκεντρώσεων $Se(VI)$ απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

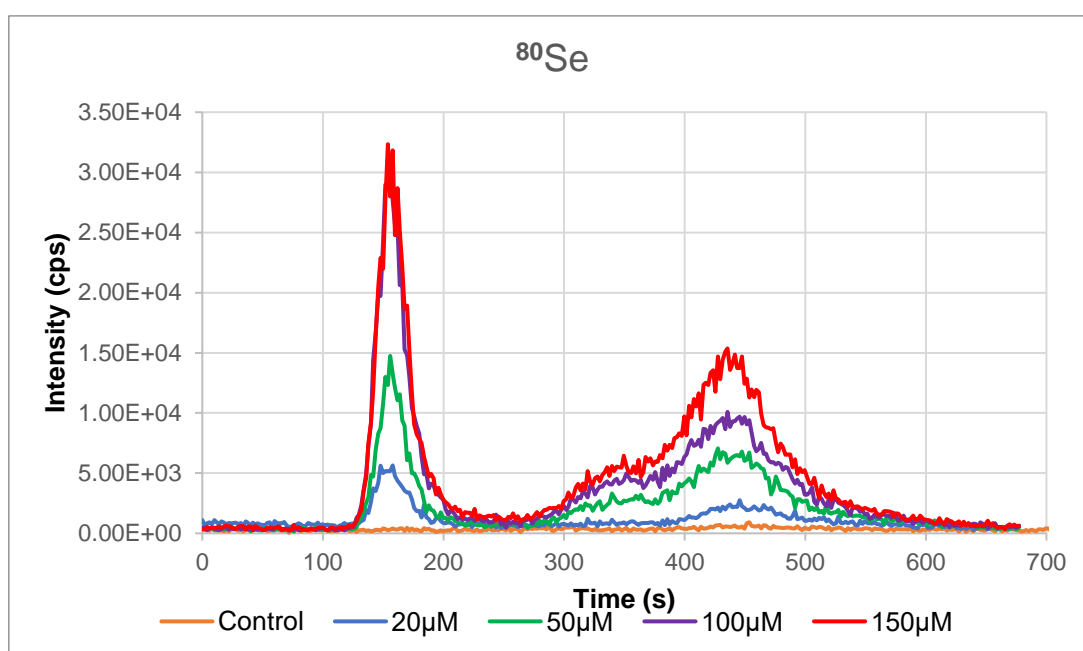


Εικόνα 56: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{80}Se από την ανάλυση κυττάρων *C. reinhardtii* που έχουν υποστεί λύση, με την μέθοδο SEC - ICP - MS σε O_2 mode (O_2 : 1.5 ml/min). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία 0 μM (Control), 20 μM , 50 μM και 100 μM $Se(VI)$, αντίστοιχα.

Στο χρωματογράφημα της ανάλυσης του κυτταρικού περιεχομένου των *C. reinhardtii* από την καλλιέργεια που περιείχε 100 μM $Se(VI)$, παρατηρείται μεγάλη αύξηση της συγκέντρωσης του κλάσματος 1 ενώ διαπιστώνεται αύξηση και στα κλάσματα 2 και 3. Είναι πιθανό, να μην αυξάνεται η ποσότητα του Se στο κλάσμα 2, αλλά η παρατηρούμενη αύξηση να οφείλεται στην αύξηση του κλάσματος 3. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται πως και σε αυτή τη συγκέντρωση, η ποσότητα Se που

εισάγεται στα κύτταρα δεν συσσωρεύεται αποκλειστικά με την μορφή ανόργανου Se αλλά συνεχίζει να εντάσσεται σε μακρομόρια.

Τέλος, από την ανάλυση του κυτταρικού περιεχομένου των *C. reinhardtii*, που αναπτύχθηκαν παρουσία 150 μM Se(VI), προκύπτει σημαντική αύξηση στην ποσότητα του Se που αντιστοιχεί στο κλάσμα 3, ενώ τα κλάσματα 1 και 2 βρίσκονται σε παραπλήσιες συγκεντρώσεις με τα κύτταρα της καλλιέργειας των 100 μM Se(VI). Επομένως, η περίσσεια ποσότητα Se στα κύτταρα παρέμεινε σε ανόργανες μορφές χαμηλού μοριακού βάρους. Το γεγονός αυτό δύναται να αποδοθεί σε κορεσμό των μακρομορίων του κυττάρου σε σελήνιο και σε δημιουργία προβλημάτων στις φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου λόγω τοξικότητας της περίσσειας ποσότητας Se στο εσωτερικό του.



Εικόνα 57: Συγκεντρωτικό γράφημα χρωματογραφημάτων ^{80}Se από την ανάλυση κυττάρων *C. reinhardtii* που έχουν υποστεί λύση, με την μέθοδο SEC - ICP - MS σε O_2 mode (O_2 : 1.5 ml/min). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία 0 μM (Control), 20 μM , 50 μM , 100 μM και 150 μM Se(VI), αντίστοιχα.

Συμπερασματικά από τα παραπάνω προκύπτει πως τα *Chlamydomonas reinhardtii* όταν αναπτύσσονται παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων Se(VI), αρχικά προσλαμβάνουν ποσότητα Se μέρος της οποίας εντάσσεται σε χημικά είδη υψηλού μοριακού βάρους (>5 kDa). Τα είδη αυτά πιθανόν να αποτελούν σεληνοπρωτεΐνες, στις οποίες το Se εισάγεται με την μορφή σεληνοκυστεΐνης ή σεληνομεθειονίνη. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του Se, συνεχίζει να πραγματοποιείται ενσωμάτωση ποσότητας Se σε μακρομόρια ενώ σχηματίζονται και οργανικά ή ανόργανα είδη Se μικρότερου μοριακού βάρους (<5 kDa). Όταν η συγκέντρωση του Se στο περιβάλλον ανάπτυξης των κυττάρων αυξηθεί σημαντικά (150 μM) η μετατροπή του ανόργανου Se σε οργανικές μορφές σταματά και αυτό συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα. Οι μεγάλες ποσότητες ανόργανου Se στο κύτταρο οδηγούν σε τοξικότητα.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως δεν έχει πραγματοποιηθεί βαθμονόμηση της στήλης μοριακού αποκλεισμού που χρησιμοποιείται, επομένως η συσχέτιση του χρόνου έκλουσης των κλασμάτων με το μοριακό βάρος των αντίστοιχων ουσιών πραγματοποιείται με βάση τον κενό όγκο της στήλης και τον συνολικό όγκο της κινητής φάσης στη στήλη όπως παρατίθενται από την εταιρία παραγωγής της.⁵⁶ Επομένως, είναι πιθανή η απόκλιση του πραγματικού μοριακού βάρους των ουσιών, που αντιστοιχούν σε κάθε κλάσμα, από αυτό που αναφέρεται στην παρούσα εργασία.

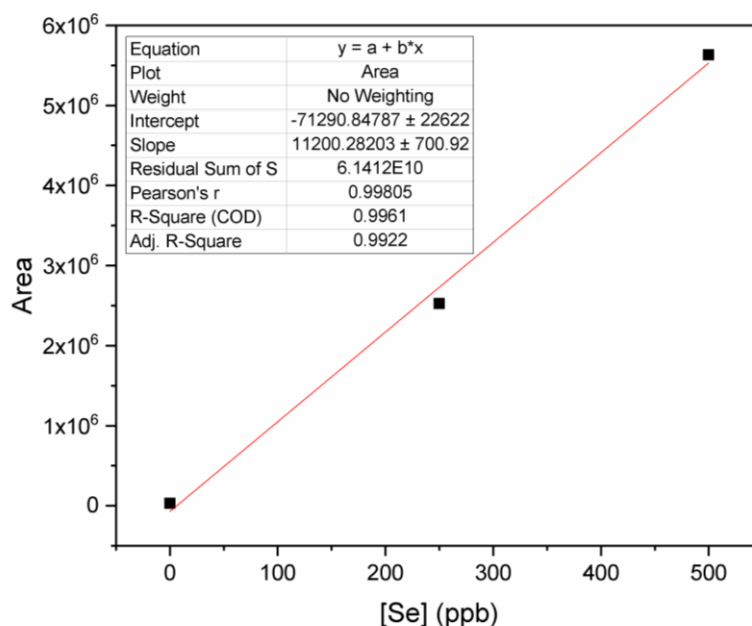
Η ανίχνευση των πρωτεϊνών μέσω της παρακολούθησης του ^{48}SO δεν ήταν εφικτή διότι στο διάλυμα λύσης των κυττάρων περιέχονται μεγάλες ποσότητες DTT και PMSF. Το DTT διαθέτει 2 άτομα S ανά μόριο, ενώ το PMSF διαθέτει 1 άτομο S ανά μόριο, επομένως η συγκέντρωση του θείου στο διάλυμα λύσης των κυττάρων είναι ίση με 11 mM. Η μεγάλη ποσότητα S δεν επιτρέπει την επιβεβαίωση της παρουσίας πρωτεϊνών ή ολιγοπεπτιδίων στα κλάσματα που εμφανίζονται στα χρωματογραφήματα του ^{80}Se .

Σε επόμενες μελέτες κρίνεται απαραίτητη η χρήση χρωματογραφικής στήλης μοριακού αποκλεισμού μεγαλύτερης διαχωριστικής ικανότητας προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη κλασμάτωση του κυτταρικού περιεχομένου και σε συνδυασμό με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων σεληνοπρωτεϊνών να καταστεί δυνατή η ταυτοποίηση των περιεχόμενων σεληνοπρωτεϊνών. Επιπλέον, η επιλογή διαφορετικής σύστασης διαλύματος λύσης των κυττάρων, η οποία δεν περιλαμβάνει ποσότητες S θα επιτρέψει την ανίχνευση των πρωτεϊνών στα διάφορα δείγματα.

3.5.2 Ποσοτικοποίηση κλασμάτων σεληνίου.

Για την ποσοτικοποίηση της ποσότητας του Se που περιέχεται σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων Se συγκέντρωσης 250 ppb και 500 ppb. Η μήτρα των πρότυπων διαλυμάτων καθώς και το τυφλό διάλυμα αντιστοιχεί σε ποσότητα κυττάρων της καλλιέργειας – Control (μετά την λύση τους).

Οι κορυφές που προέκυψαν από την ανάλυση των πρότυπων διαλυμάτων, ολοκληρώθηκαν με την βοήθεια του λογισμικού OriginPro 2018 και λήφθηκε η γραμμική προσαρμογή των σημείων της ολοκλήρωσης συναρτήσεως της συγκέντρωσης του Se.



Εικόνα 58: Καμπύλη βαθμονόμησης ^{80}Se .

Ο συντελεστής συσχέτισης της παραπάνω ευθείας ($r^2 = 0.998$) βρίσκεται κοντά στην μονάδα, επομένως η γραμμικότητα των σημείων είναι ικανοποιητική.

Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης που προέκυψαν για τα δείγματα των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες διαφορετικών συγκεντρώσεων Se παρατίθενται στον Πίνακα 17. Λόγω της μεγάλης αλληλεπικάλυψης των κορυφών που αντιστοιχούν στα κλάσματα 2 και 3 πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση του Se αθροιστικά και στα δύο κλάσματα.

Πίνακας 17: Συγκέντρωση Se σε ppb που αντιστοιχεί σε κάθε κλάσμα που προέκυψε από την ανάλυση των δειγμάτων λύσης των κυττάρων *C. reinhardtii* που αναπτύχθηκαν παρουσία συγκεντρώσεων 20 μM , 50 μM , 100 μM και 150 μM Se(VI), αντίστοιχα.

Δείγμα	Συγκέντρωση Se (ppb)	
	Κλάσμα 1 (οργανικές μορφές Se)	Κλάσμα 2 – 3 (κυρίως ανόργανες μορφές Se)
20 μM	21.2	21.9
50 μM	43.3	79.7
100 μM	88.9	119.6
150 μM	90.7	149.3

Από τον Πίνακα 17 παρατηρείται πως με την αύξηση της συγκέντρωσης του Se(VI) στο περιβάλλον καλλιέργειας των κυττάρων αυξάνεται η ποσότητα της οργανικής και της ανόργανης μορφής του Se στο εσωτερικό τους. Σε συγκεντρώσεις Se(VI) μεγαλύτερες των 100 μM , ο σχηματισμός των οργανικών μορφών του Se δεν φαίνεται να αυξάνεται, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μεγάλη αύξηση στη συγκέντρωση του ανόργανου Se.

Σε μελέτη που έλαβε χώρα ταυτοποίηση των μορφών του Se σε κύτταρα του οργανισμού *Chlamydomonas reinhardtii*, τα οποία είχαν επωαστεί παρουσία 30 μM και 75 μM Se(VI), αντίστοιχα, για 15 ώρες προέκυψε πως το 86%, περίπου, της ποσότητας του περιεχόμενου Se βρίσκονταν σε οργανική μορφή.⁵¹ Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, όμως δεν δύναται να συγκριθούν με τα αντίστοιχα της προαναφερθείσας μελέτης, διότι δεν έχει πραγματοποιηθεί ταυτοποίηση των ειδών του κλάσματος 2 και 3 επομένως δεν είναι γνωστή η ποσότητα του συνολικού οργανικού Se στα κύτταρα.

3.5.3 % Ανάκτηση σεληνίου.

Για τον προσδιορισμό της ανάκτησης του Se από την διαδικασία λύσης των κυττάρων και το χρωματογραφικό σύστημα πραγματοποιήθηκε σύγκριση των ολικών συγκεντρώσεων Se που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο SEC-ICP-MS με τις συγκεντρώσεις ολικού Se, όπως προέκυψαν από την ανάλυση αντίστοιχου αριθμού χωνευμένων κυττάρων, με το Conventional ICP-MS. Οι ανακτήσεις για κάθε δείγμα κυττάρων παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 18).

Πίνακας 18: Ολική συγκέντρωση Se σε ppb όπως προκύπτει από την μέθοδο SEC-ICP-MS και Conventional ICP-MS, αντίστοιχα, και η % ανάκτηση Se.

Δείγμα	Ολική συγκέντρωση Se (ppb)		Ανάκτηση (%)
	SEC-ICP-MS	Conventional	
20 μM	43.1	33.00	130.6
50 μM	122.9	127.1	96.7
100 μM	208.5	201.9	103.3
150 μM	240.0	244.3	98.2

Από τις ανακτήσεις του Se συμπεραίνεται πως η διαδικασία λύσης των κυττάρων δεν οδηγεί σε σημαντικές απώλειες Se. Παράλληλα προκύπτει πως ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις Se δεν λαμβάνουν χώρα έντονα φαινόμενα κατακράτησης του από το χρησιμοποιούμενο σύστημα χρωματογραφίας. Τα παραπάνω συμπεράσματα είναι απαραίτητο να επαληθευτούν μέσω του ελέγχου της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων που αφορούν την ανάκτηση του Se.

Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα

Στην παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη δύο μεθόδων υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος για την μεταλλοπρωτεϊνική ανάλυση βιολογικών δειγμάτων. Ειδικότερα, η πρώτη μέθοδος dcSEC – AF – ICP-MS χρησιμοποιήθηκε για την πολυστοιχειακή μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος, ενώ η δεύτερη για την ανάλυση σεληνοπρωτεϊνών σε δείγματα λύσης των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii*. Τα συμπεράσματα που διεξήχθησαν κατά τη διαδικασία ανάπτυξης κάθε μεθόδου, καθώς και τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τις αναλύσεις των δειγμάτων με την εκάστοτε μέθοδο, παρατίθενται στη συνέχεια.

- Ο συνδυασμός της στήλης χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού (διπλή στήλη HiTrap Desalting HP) και της στήλης χημικής συγγένειας (Blue-HP) επιτρέπει τον διαχωρισμό των μεταλλοπρωτεϊνών, των χαμηλότερου μοριακού βάρους χημικών ειδών και των ελεύθερων ιόντων των μετάλλων Mg, Ca, Se, Fe, Co, Cu και Zn σε κλάσματα.
- Συγκρίνοντας τη μέθοδο dcSEC – AF – ICP – MS, που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία, με την μέθοδο dcAF – ICP – MS, που αναπτύχθηκε στο ίδιο εργαστήριο, για την ανάλυση ορού αίματος προκύπτει πως η dcSEC – AF – ICP – MS επιτυγχάνει μεγαλύτερη κλασμάτωση για τα στοιχεία Ca, Cu, Zn και Fe, ενώ επιτρέπει την ανίχνευση και την κλασμάτωση ειδών του Co και του Ni.
- Σε δείγματα με πολύ υψηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου, τα οξειδία και τα υδροξείδια του αποτελούν σημαντική ισοβαρική παρεμπόδιση για άλλα στοιχεία όπως το ^{60}Ni , ο ^{57}Fe , το ^{59}Co , ο ^{65}Cu και ο ^{64}Zn .
- Η χρήση του universal cell ως κυψελίδα συγκρούσεων με ροή αέριου He 2 ml/min κρίθηκε η πιο κατάλληλη λειτουργία για την πολυστοιχειακή μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση των δειγμάτων ορού αίματος. Η ροή He 2 ml/min, όμως, δεν επαρκεί για την καταστολή των ισοβαρικών παρεμποδισμών σε υψηλές συγκεντρώσεις Ca.
- Η χρήση του universal cell ως κυψελίδα αντίδρασης με αέριο O₂ (1.5 ml/min) επιτρέπει την ανίχνευση των πρωτεϊνών που περιέχουν κυστεΐνη ή μεθειονίνη, όμως αυξάνει σημαντικά το σχηματισμό των οξειδίων και των υδροξειδίων του Ca, που αποτελούν ισοβαρικές παρεμποδίσεις για άλλα στοιχεία. Επομένως, η λειτουργία αυτή, με ροή O₂ 1,5 ml/min, δεν ενδείκνυται για την πολυστοιχειακή μεταλλοπρωτεωμική ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος.
- Η ανίχνευση των πρωτεϊνών που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία ή έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε άτομα S, δύναται να πραγματοποιηθεί και σε συνθήκες Standard mode, λόγω της ποσότητας των οξειδίων που σχηματίζονται στο πλάσμα.
- Ελεύθερα ιόντα των στοιχείων Se, Fe, Co, Ni και Zn κατακρατούνται από το σύστημα χρωματογραφίας και ιδιαίτερα από τη στήλη Blue-HP. Επομένως, η έγχυση ποσότητας διαλύματος EDTA ή αντίστοιχων χημικών ενώσεων, κρίνεται απαραίτητη για την απομάκρυνση τους. Επιπλέον, τα πολυστοιχειακά ιοντικά πρότυπα διαλύματα δεν είναι συμβατά με τις παραπάνω στήλες.

- Η χρήση διαλύματος 8 mM EDTA, 0.05 M CH₃COONH₄, pH 7.0 για την παρασκευή του πολυστοιχειακού πρότυπου διαλύματος υψηλότερης συγκέντρωσης (STD4) περιορίζει την κατακράτηση των ιόντων Se, Fe και Cu, επιτρέποντας την ικανοποιητική γραμμική προσαρμογή των σημείων της καμπύλης βαθμονόμησης.
- Λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης του Ca στα πρότυπα διαλύματα, ο σχηματισμός των οξειδίων του προκαλεί αύξηση του σήματος των ⁶⁴Zn, του ⁵⁹Co και του ⁶⁰Ni, με αποτέλεσμα οι καμπύλες βαθμονόμησης τους να αποκλίνουν σημαντικά από τη γραμμική προσαρμογή. Επομένως προτείνεται η χρήση ξεχωριστών πρότυπων διαλυμάτων για το Ca.
- Η ανάκτηση των στοιχείων από την στήλη HiTrap Desalting HP και Blue-HP, χρήζει περεταίρω διερεύνησης.
- Η απουσία Mg και Ca στο κλάσμα της αλβουμίνης που παρατηρήθηκε και με τη μέθοδο dcAF – ICP – MS για τα ίδια δείγματα ορού αίματος, πιθανόν να οφείλεται στην κατάσταση των δειγμάτων ή στην ιοντική ισχύ του διαλύματος έκλουσης.
- Η πλειονότητα των κλασμάτων εκλούεται με διάλυμα οξικού αμμωνίου χαμηλής συγκέντρωσης (0,05 M) γεγονός που επιτρέπει την σύζευξη της χρωματογραφικής μεθόδου με το ESI-MS για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών κάθε κλάσματος.
- Η έντονη άσκηση προκαλεί μεταβολή του χρωματογραφικού προφίλ του ορού αίματος των αθλητών, με τις μεγαλύτερες μεταβολές να εντοπίζονται δύο ώρες έπειτα από την άσκηση. Όμως, λόγω του μικρού αριθμού και της κατάστασης των δειγμάτων που αναλύθηκαν για κάθε αθλητή, δεν είναι εφικτή η διεξαγωγή συγκεκριμένων συμπερασμάτων για τη επίδραση της έντονης άσκησης στα αντίστοιχα κλάσματα των μετάλλων.
- Με τη μέθοδο dcSEC – AF – ICP – MS, ανιχνεύθηκαν δύο κλάσματα Mg τα οποία αντιστοιχούν σε χημικά είδη χαμηλού μοριακού βάρους (<1 kDa) και σε ελεύθερα ιόντα. Η έντονη άσκηση προκαλεί εμφανή μείωση στη συγκέντρωση του Mg στο αίμα, η οποία έπειτα από 2 ημέρες έχει αποκατασταθεί.
- Στην περίπτωση του Ca, μικρή ποσότητα ανιχνεύθηκε προσδεμένη σε μακρομόρια, ενώ παρατηρήθηκε η παρουσία δυο ακόμη κλασμάτων, τα οποία αντιστοιχούν σε χημικά είδη χαμηλού μοριακού βάρους (<1 kDa) και σε ελεύθερα ιόντα Ca(II).
- Στα δείγματα ορού αίματος, ανιχνεύθηκαν 3 διαφορετικά κλάσματα Se, όμως δεν εντοπίστηκε ποσότητα Se που να αντιστοιχεί στην σεληνοπρωτεΐνη-P, γεγονός που απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.
- Στα χρωματογραφήματα του Fe εντοπίζονται τουλάχιστον 4 διαφορετικά κλάσματα, στα οποία περιλαμβάνονται ποσότητες που αντιστοιχούν σε μακρομόρια. Η χρήση της κυψελίδας συγκρούσεων επιτρέπει την ανίχνευση του πιο άφθονου ισotόπου του Fe (⁵⁶Fe), όπου δεν παρατηρούνται κορυφές λόγω ισοβαρικής παρεμπόδισης.
- Από την ανάλυση του Co σε δείγματα ορού αίματος αθλητών ανιχνεύεται ποσότητα Co που αλληλεπιδρά με μακρομόρια ενώ παρατηρείται η παρουσία

χημικών ειδών Co μικρού μοριακού βάρους.

- Η ισχυρή αλληλεπίδραση των Ni(II) με την στήλη Blue-HP προκαλεί αποδεύσμευσή τους από τις πρωτεΐνες, όμως σε ορισμένα δείγματα ορού αίματος ανιχνεύθηκε ένα κλάσμα που δεν αντιστοιχεί στα ελεύθερα ιόντα που κατακρατήθηκαν στη στήλη. Επομένως είναι πιθανό η μέθοδος dcSEC – AF – ICP – MS να μπορεί να αξιοποιηθεί για τις αναλύσεις Ni-πρωτεϊνών.
- Παρότι τα ιόντα Zn(II) αλληλεπιδρούν πολύ ισχυρά με την στήλη Blue-HP, είναι εφικτή η ανίχνευση κλασμάτων που αντιστοιχούν σε μεταλλοπρωτεΐνες καθώς και χαμηλού μοριακού βάρους σύμπλοκα του Zn.
- Η αλληλεπικάλυψη των κορυφών στα χρωματογραφήματα των στοιχείων Mg, Cu, Zn και Fe δεν επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του εκάστοτε μετάλλου στα επιμέρους
- Η μέθοδος SEC-ICP-MS επιτρέπει την γρήγορη ανάλυση των μορφών του Se σε δείγματα λύσης των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii*.
- Τα *Chlamydomonas reinhardtii* που επωάζονται παρουσία 20, 50 και 100 μM Se(VI) εντάσσουν μέρος της ποσότητας του Se που προσλαμβάνουν σε μακρομόρια (>5 kDa), όπως οι πρωτεΐνες. Η υπόλοιπη ποσότητα παραμένει σε ανόργανες μορφές ή και οργανικές μορφές χαμηλού μοριακού βάρους.
- Η ποσότητα του Se που προσλαμβάνεται από τα κύτταρα παραμένει σε ανόργανη μορφή, όταν η επώαση τους λαμβάνει χώρα παρουσία Se(VI) σε συγκεντρώσεις άνω των 100 μM.
- Η ανίχνευση των κλασμάτων των πρωτεϊνών μέσω ανίχνευσης του S που περιέχουν δεν ήταν εφικτή λόγω της υψηλής συγκέντρωσης S στο διάλυμα λύσης των κυττάρων.
- Από τις υψηλές ανακτήσεις (>96%) που προέκυψαν έπειτα από σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεθόδου SEC-ICP-MS και του Conventional ICP-MS, συμπεραίνεται πως η μέθοδος λύσης των κυττάρων είναι αποτελεσματική και δεν υφίστανται φαινόμενα ισχυρής κατακράτησης των ιοντικών μορφών του Se από τη στήλη HiTrap Desalting HP.

Κεφάλαιο 5: Βιβλιογραφικές αναφορές

1. Shi, W. & Chance, M. R. Metallomics and metalloproteomics. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3040–3048 (2008).
2. Fu, D. & Finney, L. Metalloproteomics: Challenges and prospective for clinical research applications. *Expert Rev. Proteomics* **11**, 13–19 (2014).
3. Szpunar, J. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis : metallomics , metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. (2005) doi:10.1039/b418265k.
4. Barnett, J. P., Scanlan, D. J. & Blindauer, C. A. Protein fractionation and detection for metalloproteomics: Challenges and approaches. *Anal. Bioanal. Chem.* **402**, 3311–3322 (2012).
5. Mounicou, S., Szpunar, J. & Lobinski, R. Metallomics: The concept and methodology. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 1119–1138 (2009).
6. Garcia, J. S., De Magalhães, C. S. & Arruda, M. A. Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta* **69**, 1–15 (2006).
7. Lothian, A. *et al.* Metalloproteomics: Principles, challenges, and applications to neurodegeneration. *Front. Aging Neurosci.* **5**, 1–7 (2013).
8. Hauser-Davis, R. A., Lopes, R. M., Mota, F. B. & Moreira, J. C. The evolution of environmental metalloproteomics over the last 15 years through bibliometric techniques. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **140**, 279–287 (2017).
9. Barber-Zucker, S., Shaanan, B. & Zarivach, R. Transition metal binding selectivity in proteins and its correlation with the phylogenomic classification of the cation diffusion facilitator protein family. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
10. Migocka, M. Critical Review Copper-Transporting ATPases : The Evolutionarily Conserved Machineries for Balancing Copper in Living Systems. 737–745 doi:10.1002/iub.1437.
11. Calle, M. B. De & Bordin, G. G. Identification , characterization and determination of metal-binding proteins by liquid chromatography . A review. 369–378 (2002) doi:10.1007/s00216-002-1508-3.
12. Holliday, G. L. & Thornton, A. E. J. M. Metal ions in biological catalysis : from enzyme databases to general principles. 1205–1218 (2008) doi:10.1007/s00775-008-0404-5.
13. Imai, K. The haemoglobin enzyme. **401**, (1999).
14. Keele, S. W. *et al.* Characterization of Mammalian Selenoproteomes. **300**, 1439–1444 (2003).
15. Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C. & Rofe, A. M. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 627–647 (2002).
16. Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.-L. & Zenk, M. H. Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 6838–6842 (1989).
17. Koutroukides, T. A. *et al.* Chapter 18 Identification of Protein Biomarkers in

- Human Serum Using iTRAQ and Shotgun Mass Spectrometry. **1061**, 291–307.
18. Waidely, E., Al-Yuobi, A.-R. O., Bashammakh, A. S., El-Shahawi, M. S. & Leblanc, R. M. Serum protein biomarkers relevant to hepatocellular carcinoma and their detection. *Analyst* **141**, 36–44 (2016).
 19. Di Girolamo, F. *et al.* Human serum proteome analysis: new source of markers in metabolic disorders. *Biomark. Med.* **6**, 759–773 (2012).
 20. Schroeter, M., Sacher, J., Steiner, J., Schoenknecht, P. & Mueller, K. Serum S100B Represents a New Biomarker for Mood Disorders. *Curr. Drug Targets* **14**, 1237–1248 (2013).
 21. Bazydlo, L. A. L., Needham, M. & Harris, N. S. Calcium, Magnesium, and Phosphate. *Lab. Med.* **45**, e44–e50 (2014).
 22. Dreyer, M. Serum total calcium, ionised calcium and corrected total calcium concentrations in Kwashiorkor and nephrotic syndrome patients: peer reviewed original article. *Med. Technol. SA* **25**, 29–32 (2011).
 23. Sava, L., Pillai, S., More, U. & Sontakke, A. Serum calcium measurement: Total versus free (ionized) calcium. *Indian J. Clin. Biochem.* **20**, 158–161 (2005).
 24. Letsiou, S. *et al.* High-throughput quantification of selenium in individual serum proteins from a healthy human population using HPLC on-line with isotope dilution inductively coupled plasma-MS. *Proteomics* **10**, 3447–3457 (2010).
 25. Ha, H. Y., Alfulajj, N., Berry, M. J. & Seale, L. A. From Selenium Absorption to Selenoprotein Degradation. *Biol. Trace Elem. Res.* **192**, 26–37 (2019).
 26. Hou, Q. *et al.* Selenoprotein-transgenic *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nutrients* **5**, 624–636 (2013).
 27. Gozzelino, R. & Arosio, P. Iron homeostasis in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 2–14 (2016).
 28. Tóthová, C., Mihajlovičová, X. & Nagy, O. The Use of Serum Proteins in the Laboratory Diagnosis of Health Disorders in Ruminants. *Ruminants - Husbandry, Econ. Heal. Asp.* (2018) doi:10.5772/intechopen.72154.
 29. Silva, A. M. N. & Hider, R. C. Influence of non-enzymatic post-translation modifications on the ability of human serum albumin to bind iron. Implications for non-transferrin-bound iron speciation. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1794**, 1449–1458 (2009).
 30. Camaschella, C. Iron-Deficiency Anemia. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1832–1843 (2015).
 31. Shan, Y., Lambrecht, R. W. & Bonkovsky, H. L. Association of Hepatitis C Virus Infection with Serum Iron Status: Analysis of Data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 834–841 (2005).
 32. Alonso García, J. *et al.* Iron speciation, ferritin concentrations and Fe:ferritin ratios in different malignant breast cancer cell lines: On the search for cancer biomarkers. *Metallomics* **8**, 1090–1096 (2016).
 33. Kerger, B. D. *et al.* Cobalt speciation assay for human serum, Part I. Method for measuring large and small molecular cobalt and protein-binding capacity using size exclusion chromatography with inductively coupled plasma-mass spectroscopy detection. *Toxicol. Environ. Chem.* **95**, 687–708 (2013).

34. ARAYA, M. *et al.* Understanding copper homeostasis in humans and copper effects on health. *Biol. Res.* **39**, (2006).
35. Inagaki, K. *et al.* Speciation of protein-binding zinc and copper in human blood serum by chelating resin pre-treatment and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analyst* **125**, 197–203 (2000).
36. Balkhi, S. El *et al.* Human plasma copper proteins speciation by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. Solutions for columns calibration by sulfur detection. *Anal. Chem.* **82**, 6904–6910 (2010).
37. de Bie, P., Muller, P., Wijmenga, C. & Klomp, L. W. J. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J. Med. Genet.* **44**, 673–688 (2007).
38. Chaturvedi, U. C. & Shrivastava, R. Interaction of viral proteins with metal ions: Role in maintaining the structure and functions of viruses. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **43**, 105–114 (2005).
39. Al-Harhi, S., Lachowicz, J. I., Nowakowski, M. E., Jaremko, M. & Jaremko, Ł. Towards the functional high-resolution coordination chemistry of blood plasma human serum albumin. *J. Inorg. Biochem.* **198**, 110716 (2019).
40. Watt, N. T., Whitehouse, I. J. & Hooper, N. M. The Role of Zinc in Alzheimer's Disease. *Int. J. Alzheimers. Dis.* **2011**, 1–10 (2011).
41. Rashed, M. N., Ahmed, M. M., Al-Hossainy, A. F. & Abd, S. M. Trends in speciation analysis of some heavy metals in serum of patients with chronic hepatitis C and chronic hepatitis B using differential pulse adsorptive stripping voltammetric measurement and atomic absorption spectrophotometry. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **24**, 138–145 (2010).
42. Glennon, J. D. & Sarkar, B. Nickel(II) transport in human blood serum. Studies of nickel(II) binding to human albumin and to native-sequence peptide, and ternary-complex formation with l-histidine. *Biochem. J.* **203**, 15–23 (1982).
43. Denkhau, E. & Salnikow, K. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **42**, 35–56 (2002).
44. Sasso, S., Stibo, H., Mittag, M. & R, G. A. THE NATURAL HISTORY OF MODEL ORGANISMS: From molecular manipulation of domesticated *Chlamydomonas reinhardtii* to survival in nature. *eLife Sci. Publ.* 1–14 (2018) doi:<https://doi.org/10.7554/eLife.39233.001>.
45. Hanikenne, M. *Chlamydomonas reinhardtii* as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance. *New Phytol.* **159**, 331–340 (2003).
46. Bräutigam, A., Schaumlöffel, D., Preud'Homme, H., Thondorf, I. & Wesenberg, D. Physiological characterization of cadmium-exposed *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant, Cell Environ.* **34**, 2071–2082 (2011).
47. Flouty, R. & Estephane, G. Bioaccumulation and biosorption of copper and lead by a unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii* in single and binary metal systems: A comparative study. *J. Environ. Manage.* **111**, 106–114 (2012).
48. Flouty, R. & Khalaf, G. Role of Cu and pb on Ni bioaccumulation by *Chlamydomonas reinhardtii*: Validation of the biotic ligand model in binary metal Mixtures. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **113**, 79–86 (2015).

49. Novoselov, S. V. *et al.* Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.* **21**, 3681–3693 (2002).
50. Scheidegger, C., Sigg, L. & Behra, R. Characterization of lead induced metal-phytochelatin complexes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Toxicol. Chem.* **30**, 2546–2552 (2011).
51. Vriens, B., Behra, R., Voegelin, A., Zupanic, A. & Winkel, L. H. E. Selenium Uptake and Methylation by the Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.* **50**, 711–720 (2016).
52. Mavrakis, E., Mavroudakis, L., Lydakakis-Simantiris, N. & Pergantis, S. A. Investigating the uptake of arsenate by *chlamydomonas reinhardtii* cells and its effect on their lipid profile using single cell ICP-MS and Easy Ambient Sonic-Spray Ionization-MS. *Anal. Chem.* **91**, 9590–9598 (2019).
53. Clark, L. C. Effects of Selenium Supplementation for Cancer Prevention in Patients With Carcinoma of the Skin. *JAMA* **276**, 1957 (1996).
54. Tamtaji, O. R. *et al.* Probiotic and selenium co-supplementation, and the effects on clinical, metabolic and genetic status in Alzheimer's disease: A randomized, double-blind, controlled trial. *Clin. Nutr.* **38**, 2569–2575 (2019).
55. Khan, M. I., Shin, J. H. & Kim, J. D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb. Cell Fact.* **17**, 1–21 (2018).
56. Cytiva. *Handbook: Size Exclusion Chromatography - Principles and Methods*.
57. Harris, D. *Ποσοτική Χημική Ανάλυση, Τόμος Β'*. (Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης).
58. Cytiva. *Handbook: Affinity Chromatography- Specific Groups of Biomolecules*. vol. 3.
59. Kopperschliiger, G. & Hofmann, E. Cibacron Blue F3G-A and Related Dyes as Ligands in Affinity Chromatography. in.
60. GE Healthcare. *Affinity Chromatography: Principles and Methods*.
61. Subramanian, S. & Ross, P. D. Dye-ligand affinity chromatography: The interaction of cibacron blue f3GA® with proteins and enzyme. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **16**, 169–205 (1984).
62. SigmaAldrich. Performing a Separation or Removal of Albumin with HiTrap® Blue HP and Blue Sepharose 6 Fast Flow. <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-purification/purification-removal-albumin>.
63. Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R. *Principles of instrumental analysis*. (2007).
64. PerkinElmer. The 30-Minute Guide to ICP-MS. 1–8.
65. Thomas, R. *Practical Guide to ICP-MS*. (CRC Press, 2013). doi:10.1201/b14923.
66. Acosta, M., Torres, S., Mariño-Repizo, L., Martinez, L. D. & Gil, R. A. Novel method for metalloproteins determination in human breast milk by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *J.*

- Pharm. Biomed. Anal.* **158**, 209–213 (2018).
67. Kodali, P., Chitta, K. R., Landero Figueroa, J. A., Caruso, J. A. & Adeoye, O. Detection of metals and metalloproteins in the plasma of stroke patients by mass spectrometry methods. *Metallomics* **4**, 1077–1087 (2012).
 68. Manley, S. A., Byrns, S., Lyon, A. W., Brown, P. & Gailer, J. Simultaneous Cu-, Fe-, and Zn-specific detection of metalloproteins contained in rabbit plasma by size-exclusion chromatography-inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. *J. Biol. Inorg. Chem.* **14**, 61–74 (2009).
 69. Michalke, B., Berthele, A., Mistriotis, P., Ochsenkühn-Petropoulou, M. & Halbach, S. Manganese species from human serum, cerebrospinal fluid analyzed by size exclusion chromatography-, capillary electrophoresis coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **21**, 4–9 (2007).
 70. Santos Júnior, J. C. *et al.* Metals and (metallo)proteins identification in vitreous humor focusing on post-mortem biochemistry. *Metallomics* **6**, 1801–1807 (2014).
 71. Τρασσανίδου, Λ. Ανάπτυξη Μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Συγγένειας Συζευγμένη Με Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος Με Σκοπό Την Πολυστοιχειακή Μεταλλοπρωτεωμική Ανάλυση Ορού Ανθρώπινου Αίματος. (University of Crete, 2018).
 72. Kotsis, Y. *et al.* A low-dose, 6-week bovine colostrum supplementation maintains performance and attenuates inflammatory indices following a Loughborough Intermittent Shuttle Test in soccer players. *Eur. J. Nutr.* **57**, 1181–1195 (2018).
 73. Lago, L., Thomas, O. R. B. & Roberts, B. R. Choice of mobile phase: Implications for size exclusion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry analyses of copper, zinc and iron metalloproteins. *J. Chromatogr. A* **1616**, 460806 (2020).
 74. Laur, N. *et al.* ICP-MS trace element analysis in serum and whole blood. *PLoS One* **15**, e0233357 (2020).
 75. Mohammed Nawi, A., Chin, S.-F. & Jamal, R. Simultaneous analysis of 25 trace elements in micro volume of human serum by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Pract. Lab. Med.* **18**, e00142 (2020).
 76. European Molecular Biology Laboratory. Protein Expression and Purification Core Facility: Choice of lysis buffer additives. (2021).
 77. Guillaume, Y. C., Guinchard, C. & Berthelot, A. Affinity chromatography study of magnesium and calcium binding to human serum albumin: pH and temperature variations. *Talanta* **53**, 561–569 (2000).
 78. Talley, K. & Alexov, E. On the pH-optimum of activity and stability of proteins. *Proteins* **78**, 2069–2076 (2010).
 79. May, T. W., Wiedmeyer, R. H., Survey, U. S. G. & Division, B. R. A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS. **19**, 150–155 (1998).
 80. Friel, J. K., Skinner, C. S., Jackson, S. E. & Longerich, H. P. Analysis of biological reference materials, prepared by microwave dissolution, using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analyst* **115**, 269 (1990).

81. Wilschefski, S. C. & Baxter, M. R. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clin. Biochem. Rev.* **40**, 115–133 (2019).
82. Suzuki, Y., Nobusawa, A. & Furuta, N. Quantification of proteins by measuring the sulfur content of their constituent peptides by means of nano HPLC-ICPMS. *Anal. Sci.* **30**, 551–559 (2014).
83. Copeland, B. E. & Sunderman, F. W. STUDIES IN SERUM ELECTROLYTES. *J. Biol. Chem.* **197**, 331–341 (1952).
84. Magnesium. *National Institutes of Diet - Office of Dietary Supplements* <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Magnesium-Consumer/> (2021).
85. Hobbs, C. A., Saigo, K., Koyanagi, M. & Hayashi, S. Magnesium stearate, a widely-used food additive, exhibits a lack of in vitro and in vivo genotoxic potential. *Toxicol. Reports* **4**, 554–559 (2017).
86. Malliaropoulos, N. *et al.* Blood Phosphorus and Magnesium Levels in 130 Elite Track and Field Athletes. *Asian J. Sports Med.* **4**, (2012).
87. Franz, K. B. *et al.* Physiologic changes during a marathon, with special reference to magnesium. *J. Am. Coll. Nutr.* **4**, 187–194 (1985).
88. PRASAD, A. S. & FLINK, E. B. The base binding property of the serum proteins with respect to calcium. *J. Lab. Clin. Med.* **51**, 345–50 (1958).
89. Gianazza, E. & Arnaud, P. Chromatography of plasma proteins on immobilized Cibacron Blue F3-GA. Mechanism of the molecular interaction. *Biochem. J.* **203**, 637–641 (1982).
90. Calcium. *National Institutes of Diet - Office of Dietary Supplements* <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Calcium-Consumer/> (2021).
91. LJUNGHALL, S. *et al.* Effects of physical exercise on serum calcium and parathyroid hormone. *Eur. J. Clin. Invest.* **14**, 469–473 (1984).
92. Thorsen, K., Kristoffersson, A., Hultdin, J. & Lorentzon, R. Effects of moderate endurance exercise on calcium, parathyroid hormone, and markers of bone metabolism in young women. *Calcif. Tissue Int.* **60**, 16–20 (1997).
93. Maimoun, L. Response of bone metabolism related hormones to a single session of strenuous exercise in active elderly subjects. *Br. J. Sports Med.* **39**, 497–502 (2005).
94. Maïmoun, L. *et al.* Response of calciotropic hormones and bone turnover to brisk walking according to age and fitness level. *J. Sci. Med. Sport* **12**, 463–467 (2009).
95. Lamarche, J., Ronga, L., Szpunar, J. & Lobinski, R. Characterization and quantification of selenoprotein p: Challenges to mass spectrometry. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–23 (2021).
96. Iron. *National Institutes of Diet - Office of Dietary Supplements* <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Iron-HealthProfessional/> (2021).
97. Lässer, U., Kierat, L., Grob, P. J., Hitzig, W. H. & Fráter-Schröder, M. Transcobalamin II, a serum protein reflecting autoimmune disease activity, its plasma dynamics, and the relationship to established serum parameters in systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **36**, 345–357

- (1985).
98. Muñoz, D. *et al.* Effect of an Acute Exercise Until Exhaustion on the Serum and Urinary Concentrations of Cobalt, Copper, and Manganese Among Well-Trained Athletes. *Biol. Trace Elem. Res.* **189**, 387–394 (2019).
 99. Ramos, D. *et al.* Mechanism of copper uptake from blood plasma ceruloplasmin by mammalian cells. *PLoS One* **11**, 1–23 (2016).
 100. Toro-román, V. *et al.* Copper concentration in erythrocytes , platelets , plasma , serum and urine : influence of physical training. 1–8 (2021).
 101. Sc, G. R. M. *et al.* Effect of physical activity and age on plasma copper , zinc , iron , and magnesium concentration in physically active healthy males. *Nutrition* **43–44**, 75–82 (2017).
 102. Lukaski, H. C., Hoverson, B. S., Gallagher, S. K. & Bolonchuk, W. W. Physical training and copper, iron, and zinc status of swimmers. *Am. J. Clin. Nutr.* **51**, 1093–1099 (1990).
 103. Virca, G. D., Travis, J., Hall, P. K. & Roberts, R. C. Purification of human α -2-macroglobulin by chromatography on Cibacron Blue Sepharose. *Anal. Biochem.* **89**, 274–278 (1978).
 104. Zinc - Fact Sheets for Health Professionals. *National Institutes of Diet - Office of Dietary Supplements* (2021).
 105. Mitchell, P. C. H. Metal complexes of EDTA: An exercise in data interpretation. *J. Chem. Educ.* **74**, 1235–1237 (1997).
 106. Fournier, E., Adam-guillermin, C., Potin-gautier, M. & Pannier, F. Selenate bioaccumulation and toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*: Influence of ambient sulphate ion concentration. *Aquat. Toxicol.* **97**, 51–57 (2010).
 107. Compounds, P. on D. A. and R. *et al.* Selenium. in *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids* (National Academies Press (US), 2000).
 108. CytivaLifeSciences(Shop). HiTrap Desalting columns with Sephadex G-25 resin.
<https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/chromatography/prepacked-columns/desalting-and-buffer-exchange/hitrapp-desalting-columns-with-sephadex-g-25-resin-p-05853>.

Κεφάλαιο 6: Παραρτήματα

6.1 Παράμετροι λειτουργίας ICP-MS

1.Dwell time: Ο απαιτούμενος χρόνος για τη μέτρηση του κάθε αναλύτη κατά τη διάρκεια μιας ανάγνωσης (reading), σε ms.

2.Sweeps/Reading: Ο αριθμός των σαρώσεων που εκτελεί το όργανο στο φάσμα μάζας, των οποίων ο μέσος όρος αποδίδει το κάθε data point. Στη συγκεκριμένη περίπτωση εφαρμόζεται μία σάρωση ανά ανάγνωση.

3.Readings/Replicate: Ο αριθμός των μεμονωμένων αναγνώσεων για κάθε ξεχωριστό αναλύτη, κατά τη διάρκεια μιας ανάλυσης.

4. Replicates: Ο αριθμός των επαναλήψεων της μέτρησης του κάθε δείγματος από το όργανο. Στις μεθόδους της παρούσας εργασίας πραγματοποιείται μία μόνο ανάλυση ανά δείγμα, χωρίς επανάληψη.

5.Estimated sample time: Ο εκτιμώμενος χρόνος για την ολοκλήρωση κάθε ανάγνωσης, βάσει των παραμέτρων που καθορίστηκαν παραπάνω. Στην περίπτωση αυτή συμπίπτει με τη διάρκεια ανάλυσης για το κάθε δείγμα.

6.2 Ισοβαρικές παρεμποδίσεις

Πίνακας 19: Πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις των ισοτόπων νικελίου.

Ισότοπο	Πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις	
	Οξείδια	Άλλα χημικά είδη
⁵⁸ Ni	⁴⁰ Ar ¹⁸ O ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁸ O ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁷ O ¹ H ⁺ ⁴² Ca ¹⁶ O ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁷ O ¹ H ⁺ ,	²⁹ Si ²⁺ , ²³ Na ³⁵ Cl ⁺ ,
⁶⁰ Ni	⁴⁴ Ca ¹⁶ O ⁺ , ⁴³ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺	²³ Na ³⁷ Cl ⁺

Πίνακας 20: Πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις των ισοτόπων χαλκού.

Ισότοπο	Πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις	
	Οξείδια / Υδροξείδια	Άλλα χημικά είδη
⁶³ Cu	³¹ P ¹⁶ O ₂ ⁺ , ⁴⁷ Ti ¹⁶ O ⁺ , ⁴⁶ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺	⁴⁰ Ar ²³ Na ⁺ , ²³ Na ⁴⁰ Ca ⁺ , ³⁶ Ar ¹² C ¹⁴ N ¹ H ⁺ , ¹⁴ N ¹² C ³⁷ Cl ⁺ , ¹⁶ O ¹² C ³⁵ Cl ⁺
⁶⁵ Cu	⁴⁹ Ti ¹⁶ O ⁺ , ³² S ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ³² S ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ , ³³ S ¹⁶ O ₂ ⁺	⁴⁰ Ar ²⁵ Mg ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁴ N ₂ ¹ H ⁺ , ³² S ³³ S ⁺ , ¹² C ¹⁶ O ³⁷ Cl ⁺ , ¹² C ¹⁸ O ³⁵ Cl ⁺

Πίνακας 21: Πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις των ισοτόπων ψευδαργύρου με την μεγαλύτερη αφθονία.

Ισότοπο	Πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις	
	Οξείδια / Υδροξείδια	Άλλα χημικά είδη
⁶⁴ Zn	³² S ¹⁶ O ₂ ⁺ , ⁴⁸ Ti ¹⁶ O ⁺ , ³¹ P ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ , ⁴⁸ Ca ¹⁶ O ⁺ , ³¹ P ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ , ³⁴ S ¹⁶ O ₂ ⁺ ,	³² S ₂ ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁴ N ₂ ⁺
⁶⁶ Zn	⁵⁰ Ti ¹⁶ O ⁺ , ³⁴ S ¹⁶ O ₂ ⁺ , ³³ S ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ , ³² S ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺ , ³² S ¹⁷ O ₂ ⁺ , ³³ S ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ ,	³² S ³⁴ S ⁺ , ³³ S ₂ ⁺

Πίνακας 22: Πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις των ισοτόπων σιδήρου.

Ισότοπο	Πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις	
	Οξείδια / Υδροξείδια	Άλλα χημικά είδη
⁵⁴ Fe	³⁷ Cl ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁸ O ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁶ O ⁺ , ³⁶ Ar ¹⁷ O ¹ H ⁺ , ³⁶ S ¹⁸ O ⁺ , ³⁵ Cl ¹⁸ O ¹ H ⁺ , ³⁷ Cl ¹⁷ O ⁺	⁴⁰ Ar ¹⁴ N ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁵ N ¹ H ⁺
⁵⁶ Fe	⁴⁰ Ar ¹⁶ O ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁶ O ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁸ O ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁷ O ¹ H ⁺ , ³⁷ Cl ¹⁸ O ¹ H ⁺	⁴⁰ Ar ¹⁵ N ¹ H ⁺
⁵⁷ Fe	⁴⁰ Ar ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁷ O ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁸ O ¹ H ⁺	³⁸ Ar ¹⁹ F ⁺
⁵⁸ Fe	⁴⁰ Ar ¹⁸ O ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁷ O ¹ H ⁺	-

Πίνακας 23: Πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις των ισοτόπων σεληνίου.

Ισότοπο	Πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις	
	Οξείδια / Υδροξείδια	Άλλα χημικά είδη
⁷⁶ Se	-	⁴⁰ Ar ³⁶ Ar ⁺ , ³⁸ Ar ³⁸ Ar ⁺
⁷⁷ Se	-	⁴⁰ Ar ³⁷ Cl ⁺ , ³⁶ Ar ⁴⁰ Ar ¹ H ⁺ , ³⁸ Ar ₂ ¹ H ⁺ , ¹² C ¹⁹ F ¹⁴ N ¹⁶ O ₂ ⁺
⁷⁸ Se	-	⁴⁰ Ar ³⁸ Ar ⁺ , ³⁸ Ar ⁴⁰ Ca ⁺
⁸⁰ Se	³² S ¹⁶ O ₃ ⁺	⁴⁰ Ar ₂ ⁺
⁸² Se	³⁴ S ¹⁶ O ₃ ⁺	¹² C ³⁵ Cl ₂ ⁺ , ⁴⁰ Ar ₂ ¹ H ₂ ⁺

Πίνακας 24: Πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις των ισοτόπων ασβεστίου με την μεγαλύτερη αφθονία.

Ισότοπο	Πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις	
	Οξείδια / Υδροξείδια	Άλλα χημικά είδη
⁴⁰ Ca	-	⁴⁰ Ar ⁺
⁴² Ca	-	⁴⁰ Ar ¹ H ₂ ⁺
⁴³ Ca	²⁷ Al ¹⁶ O ⁺	-
⁴⁴ Ca	¹² C ¹⁶ O ₂ , ¹⁴ N ₂ ¹⁶ O ⁺ , ²⁸ Si ¹⁶ O ⁺	-
⁴⁸ Ca	³² S ¹⁶ O ⁺	³³ S ¹⁵ N ⁺ , ³⁴ S ¹⁴ N ⁺

Πίνακας 25: Πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις των ισοτόπων μαγνησίου.

Ισότοπο	Πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις	
	Οξείδια / Υδροξείδια	Άλλα χημικά είδη
^{24}Mg	-	$^{12}\text{C}_2^+$
^{25}Mg	-	$^{12}\text{C}_2\ ^1\text{H}^+$
^{26}Mg	-	$^{12}\text{C}^{14}\text{N}^+$, $^{12}\text{C}_2\ ^1\text{H}_2^+$, $^{12}\text{C}^{13}\text{C}^1\text{H}^+$

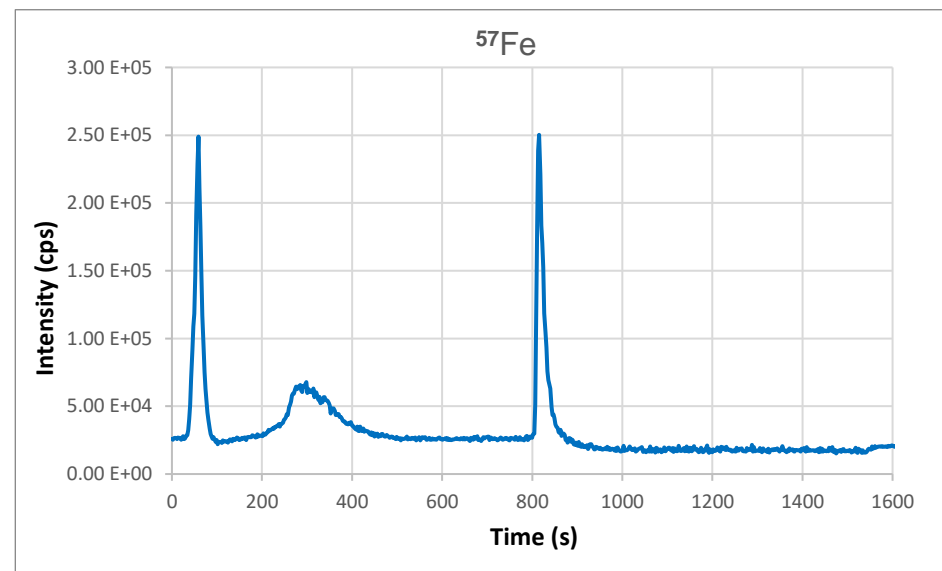
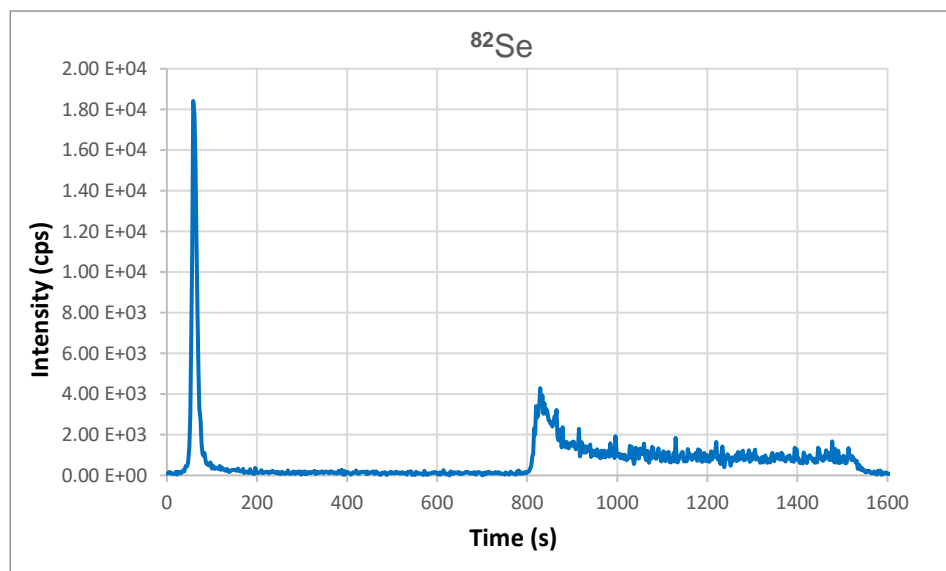
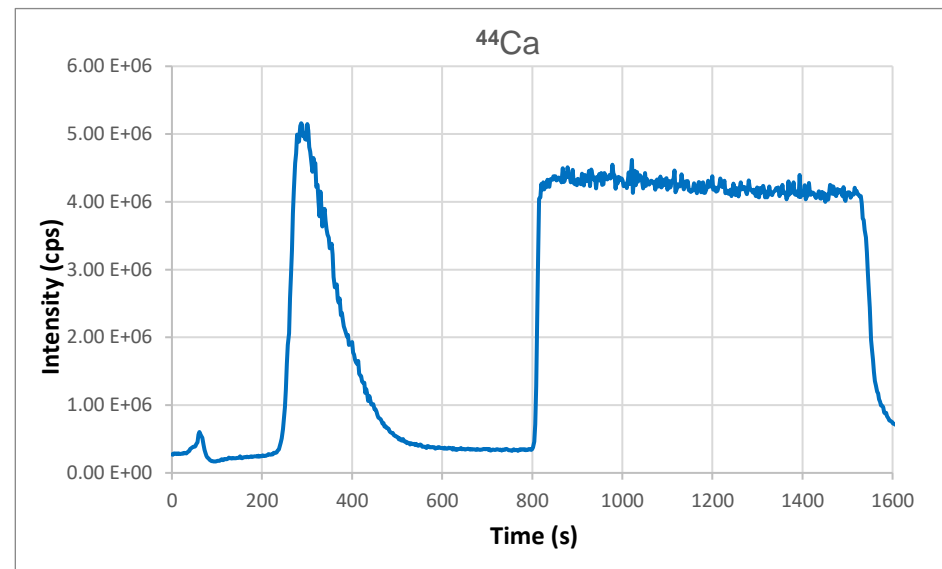
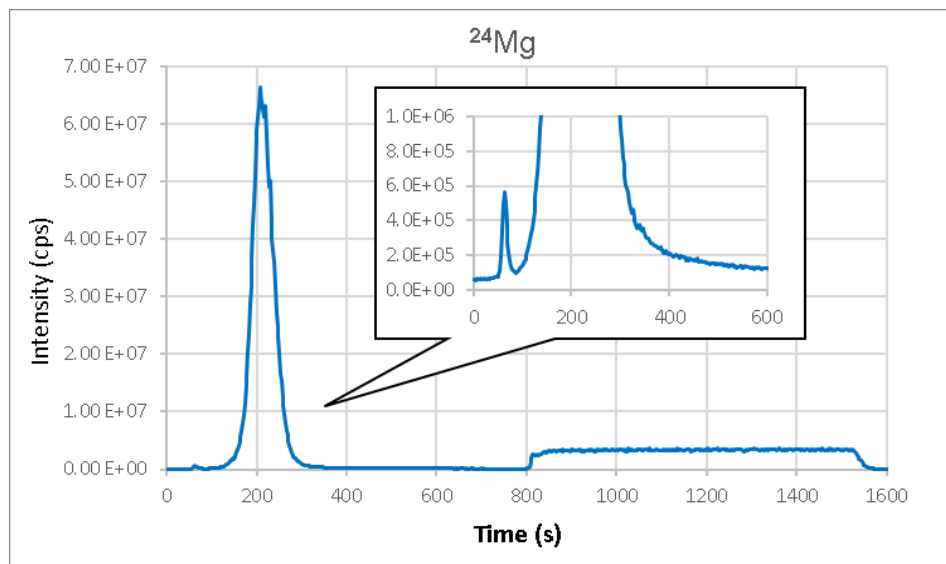
Πίνακας 26: Πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις των μαγγανίου.

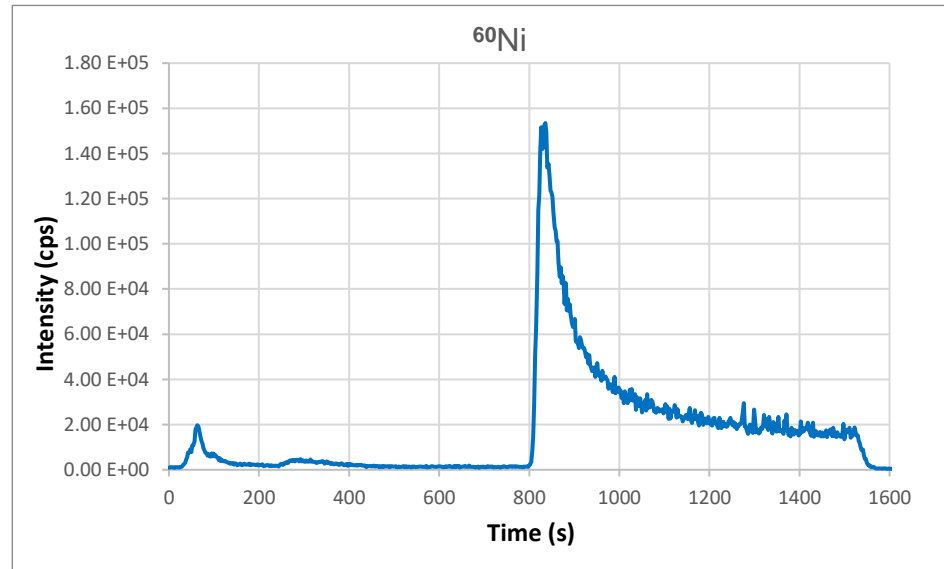
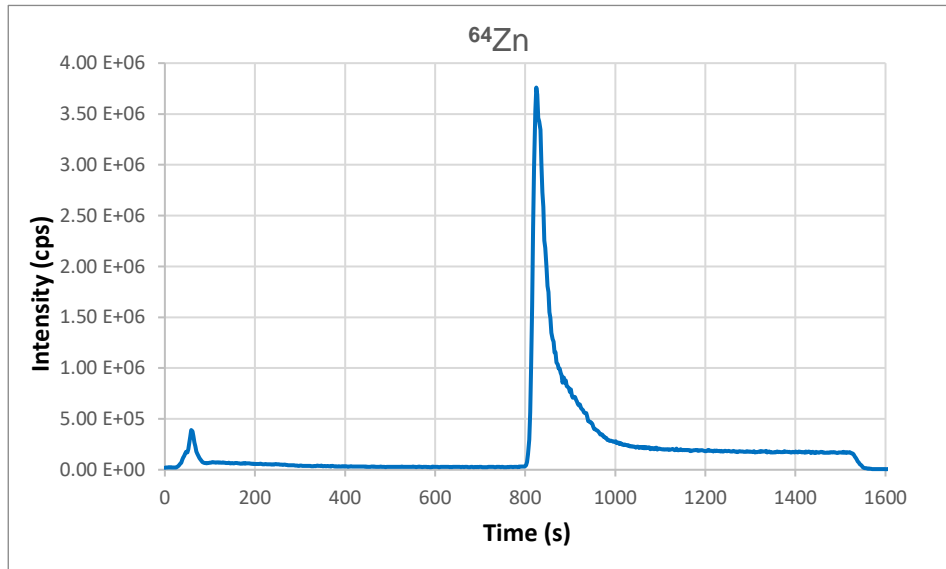
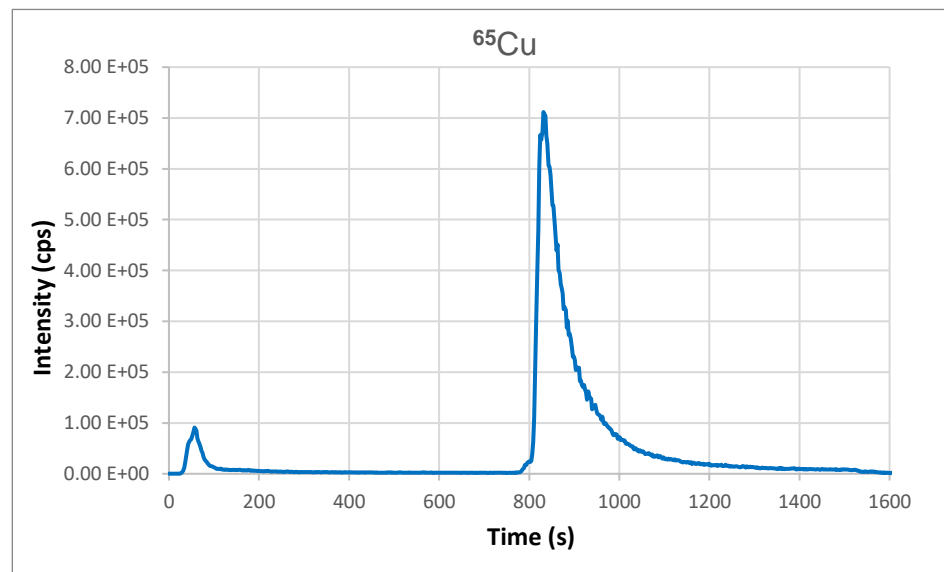
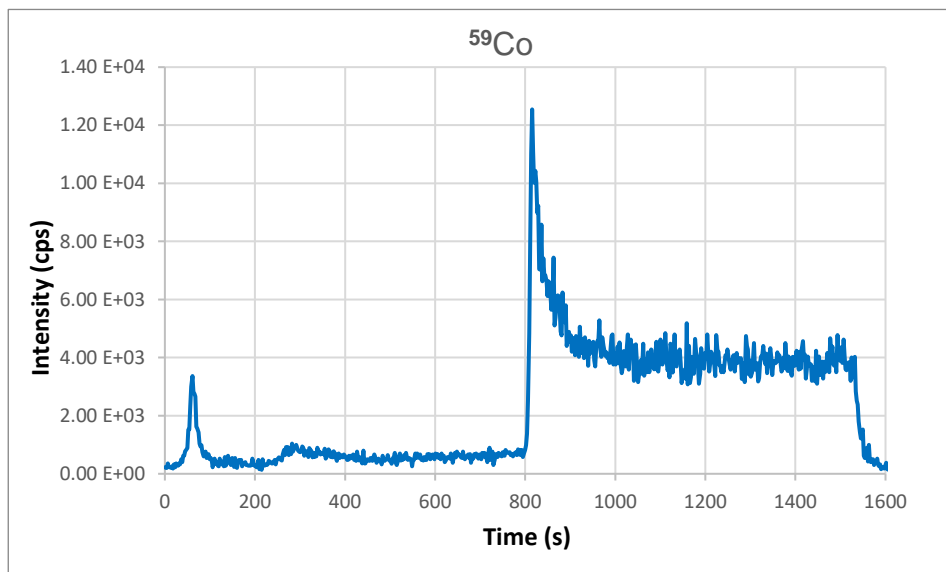
Στοιχείο	Πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις	
	Οξείδια / Υδροξείδια	Άλλα χημικά είδη
^{55}Mn	$^{39}\text{K}^{16}\text{O}^+$, $^{37}\text{Cl}^{18}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^+$, $^{38}\text{Ar}^{17}\text{O}^+$, $^{36}\text{Ar}^{18}\text{O}^1\text{H}^+$ $^{38}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{37}\text{Cl}^{17}\text{O}^1\text{H}^+$	$^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^1\text{H}^+$, $^{23}\text{Na}^{32}\text{S}^+$, $^{36}\text{Ar}^{19}\text{F}^+$

Πίνακας 27: Πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις κοβαλτίου.

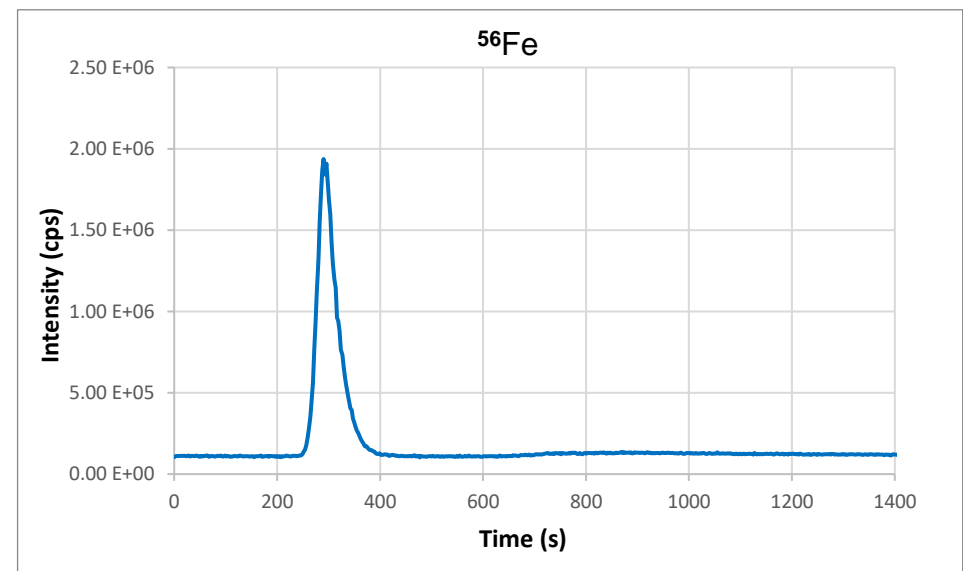
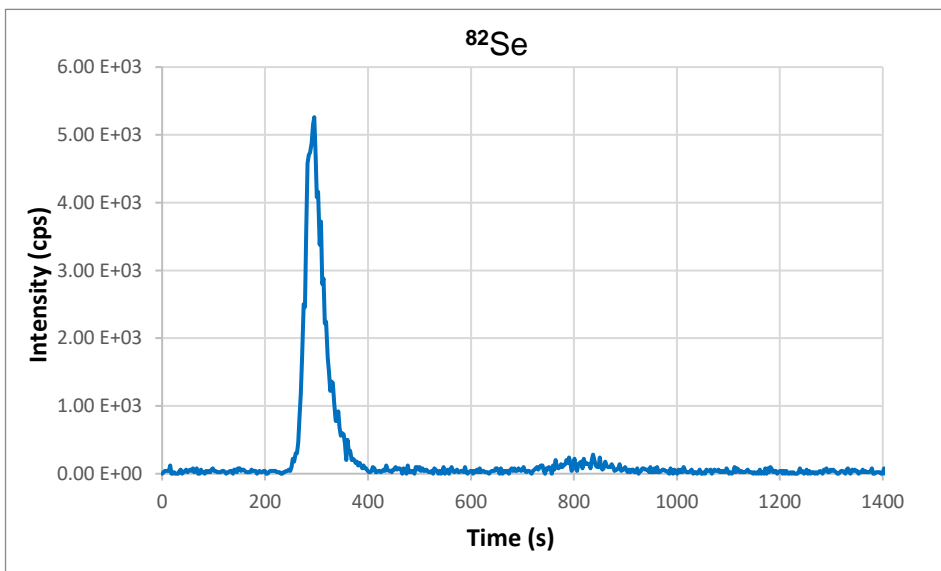
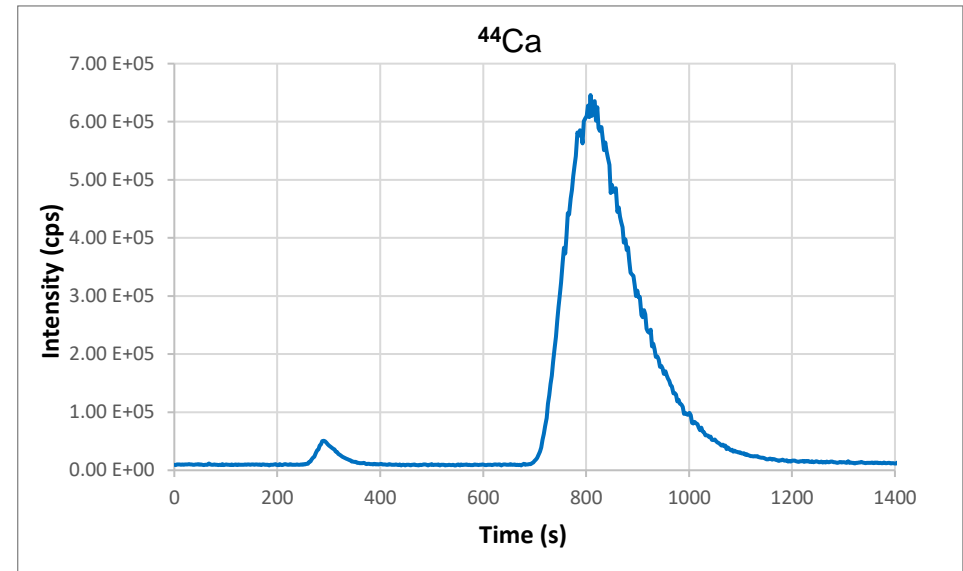
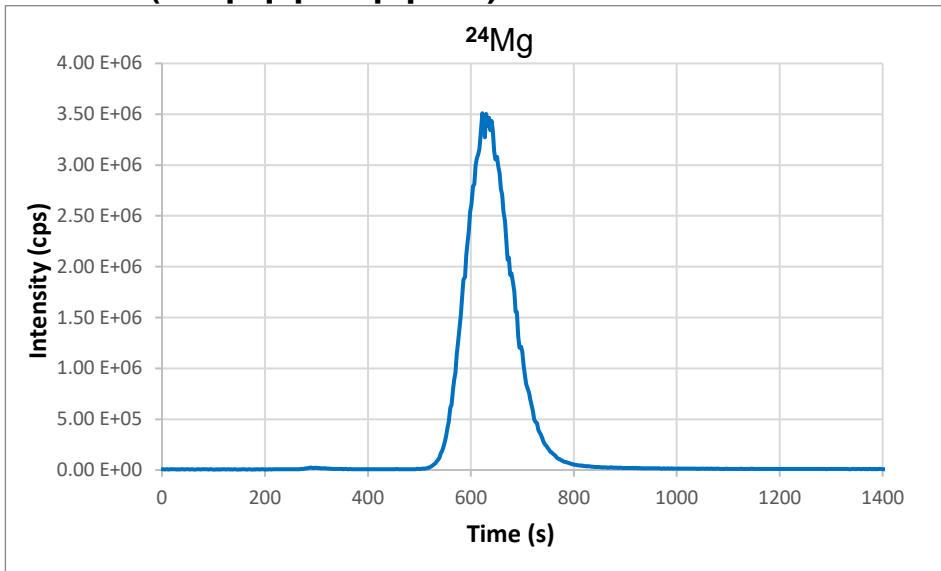
Στοιχείο	Πολυατομικές ισοβαρικές παρεμποδίσεις	
	Οξείδια / Υδροξείδια	Άλλα χημικά είδη
^{59}Co	$^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, $^{42}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{36}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$, $^{40}\text{Ar}^{18}\text{O}^1\text{H}^+$	$^{40}\text{Ar}^{19}\text{F}^+$, $^{24}\text{Mg}^{35}\text{Cl}^+$

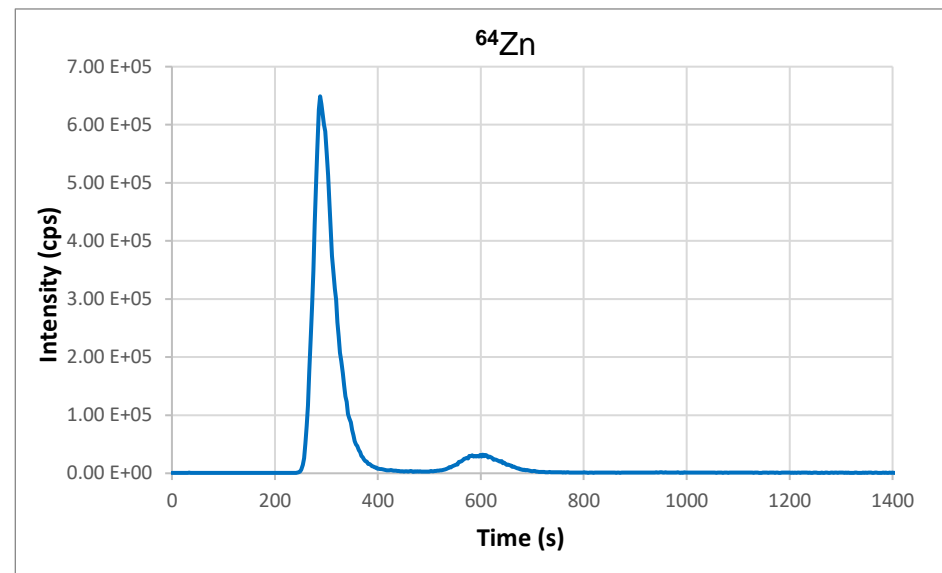
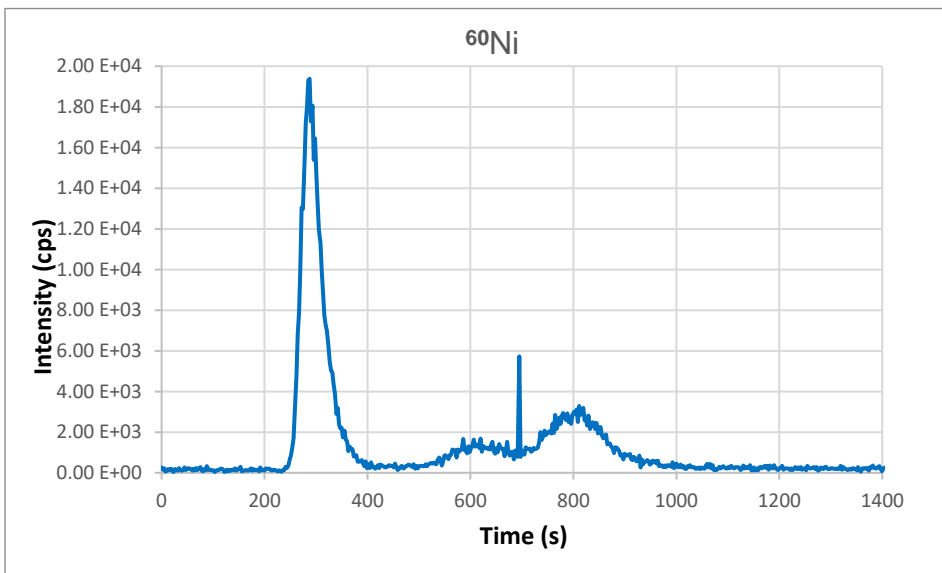
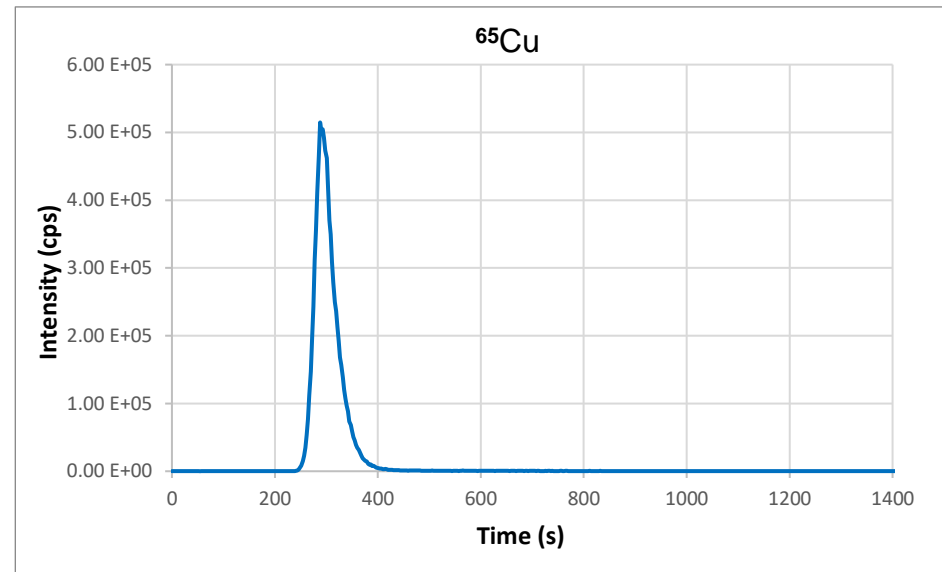
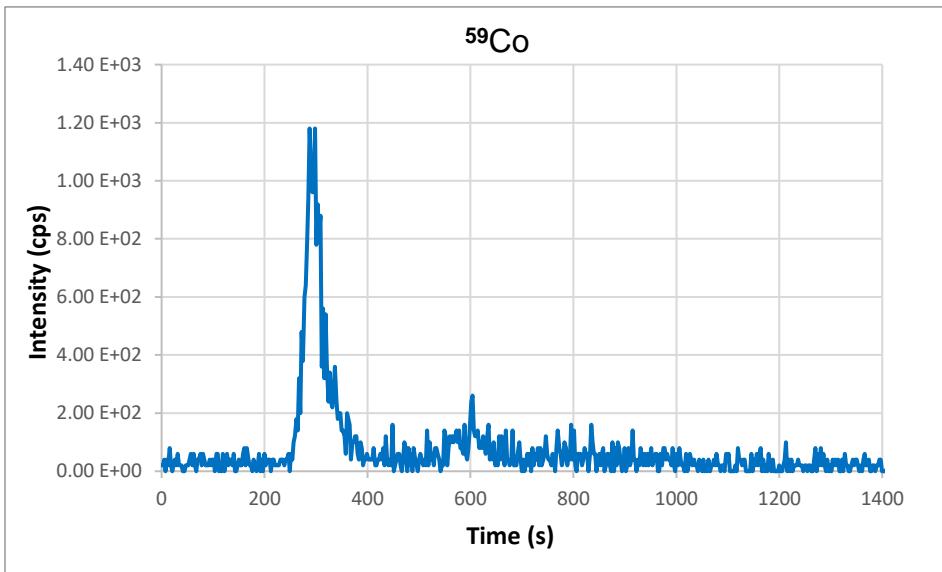
6.3 Χρωματογραφήματα ανάλυσης Seronorm με τη στήλη Blue-HP



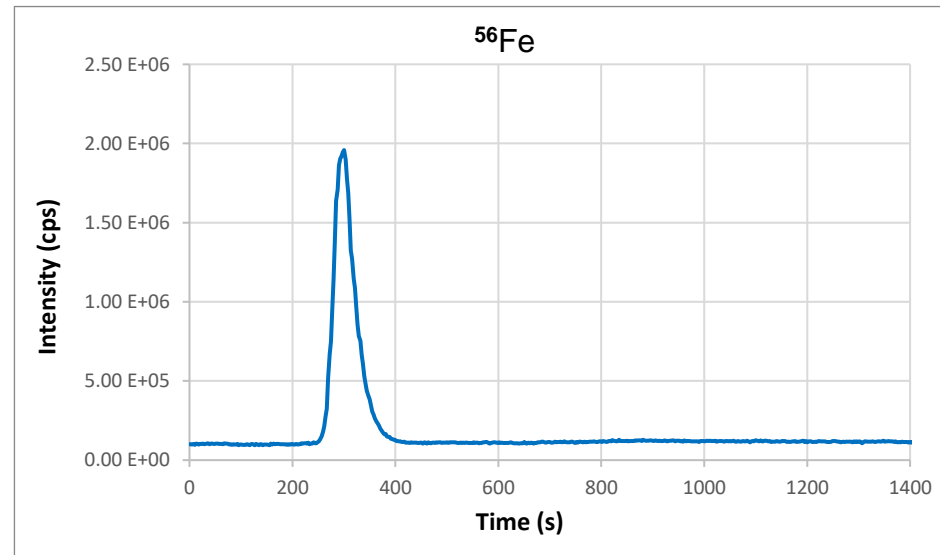
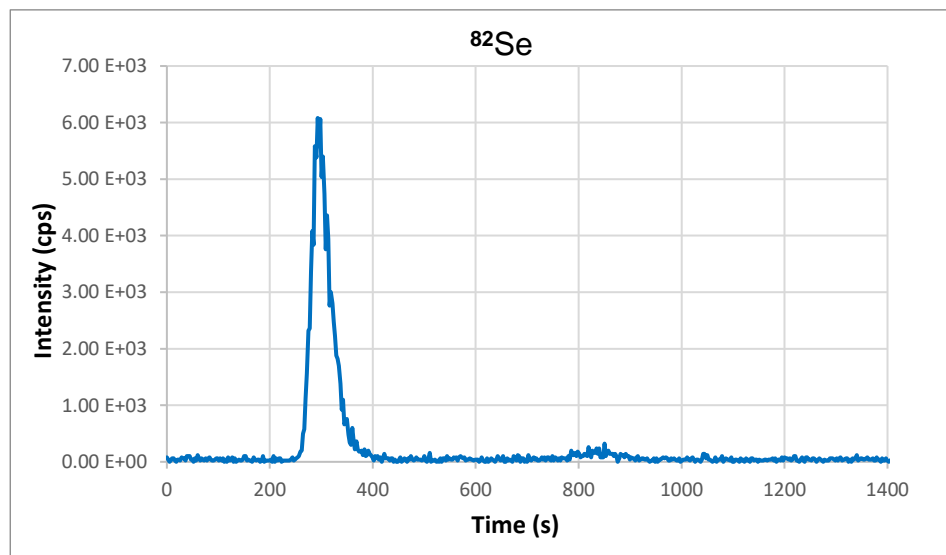
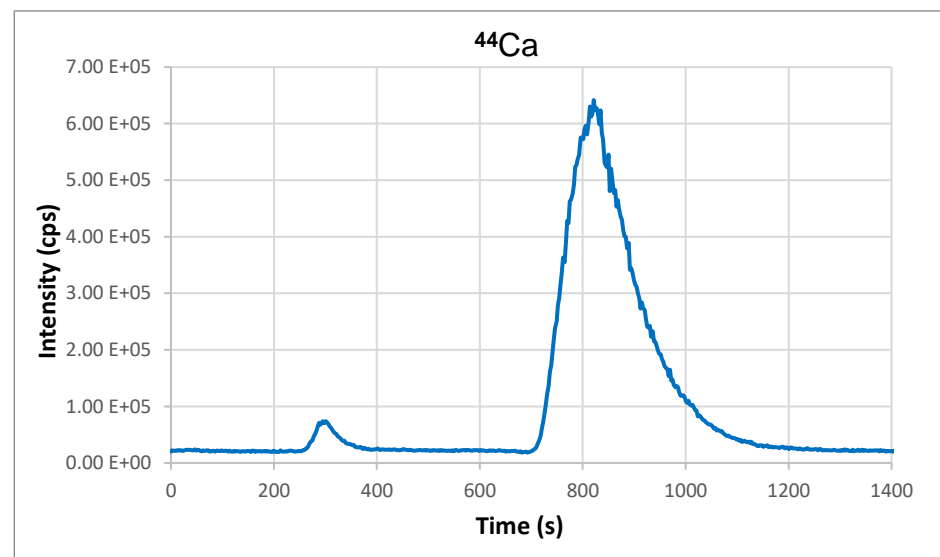
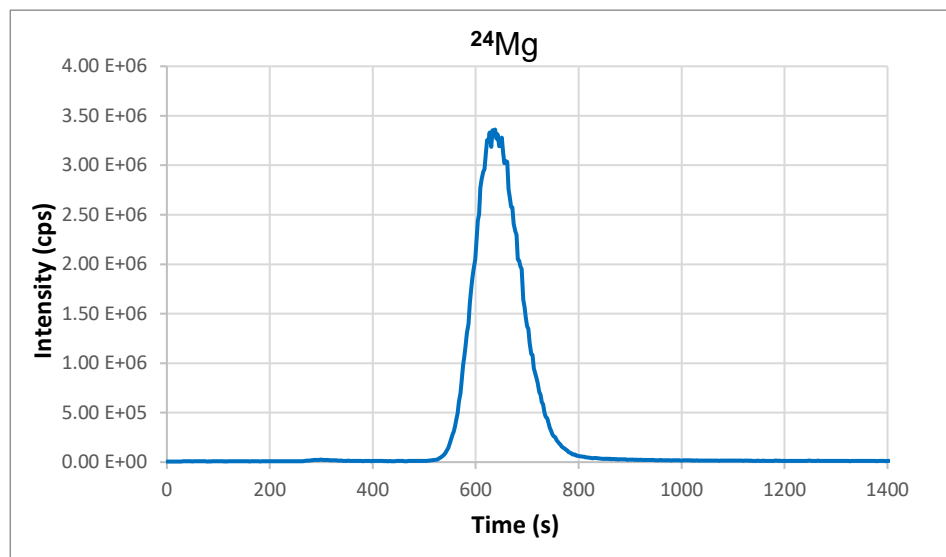


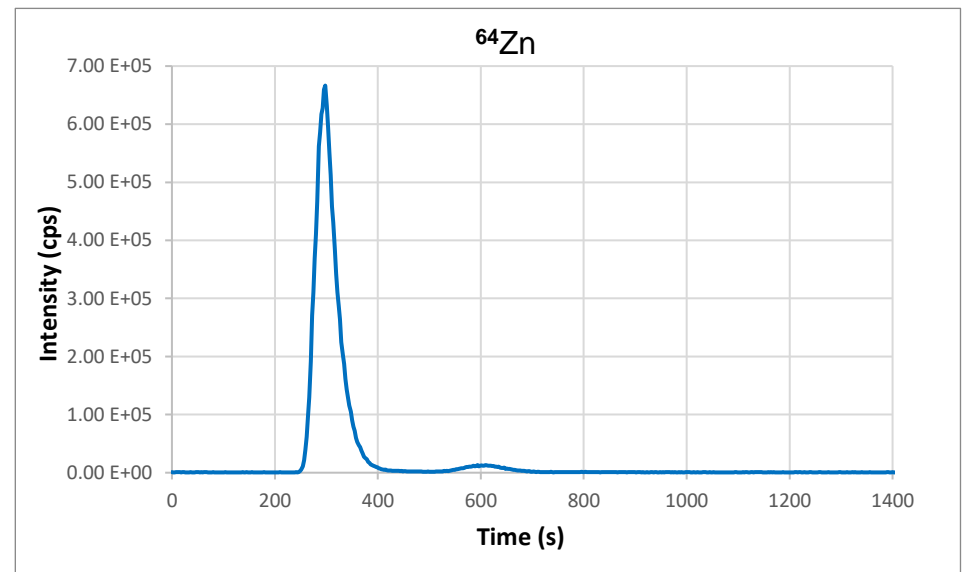
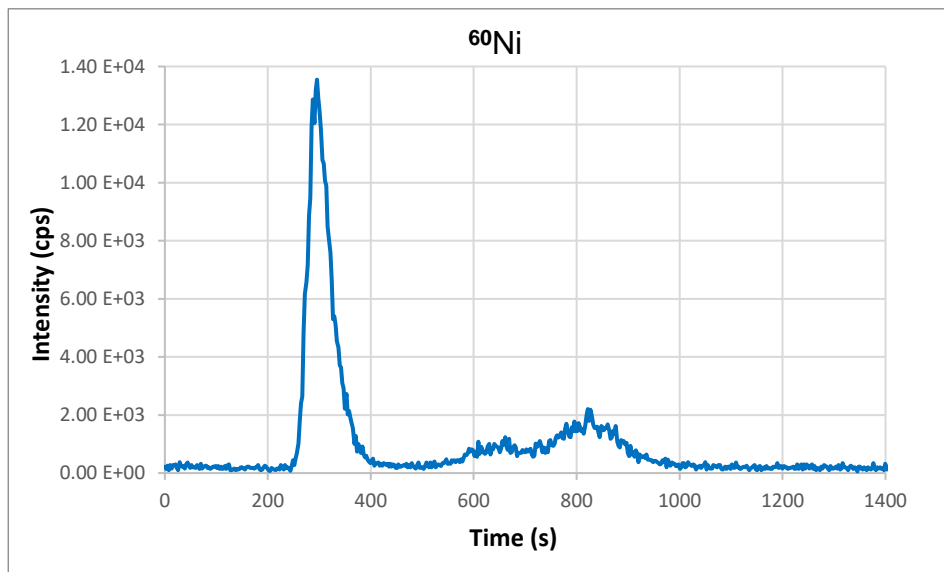
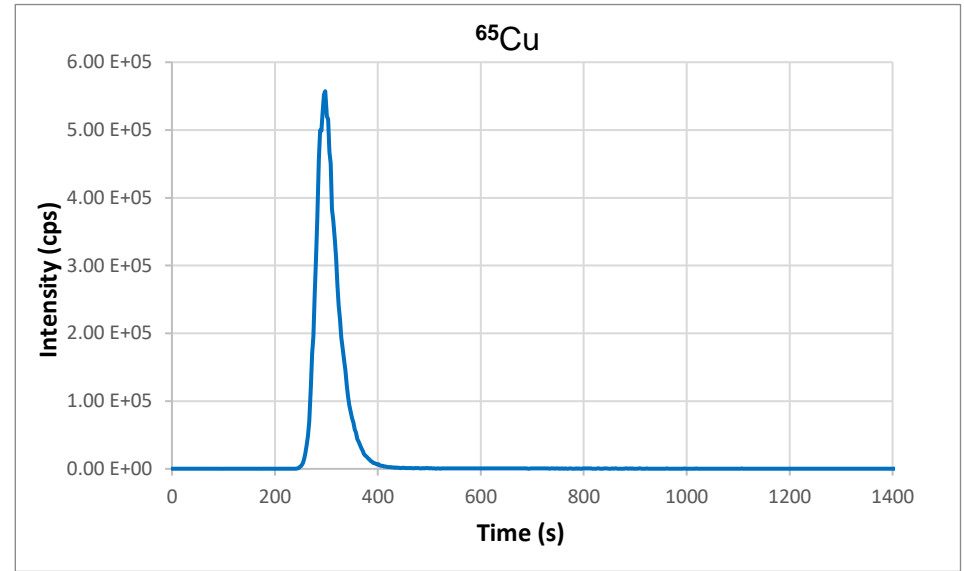
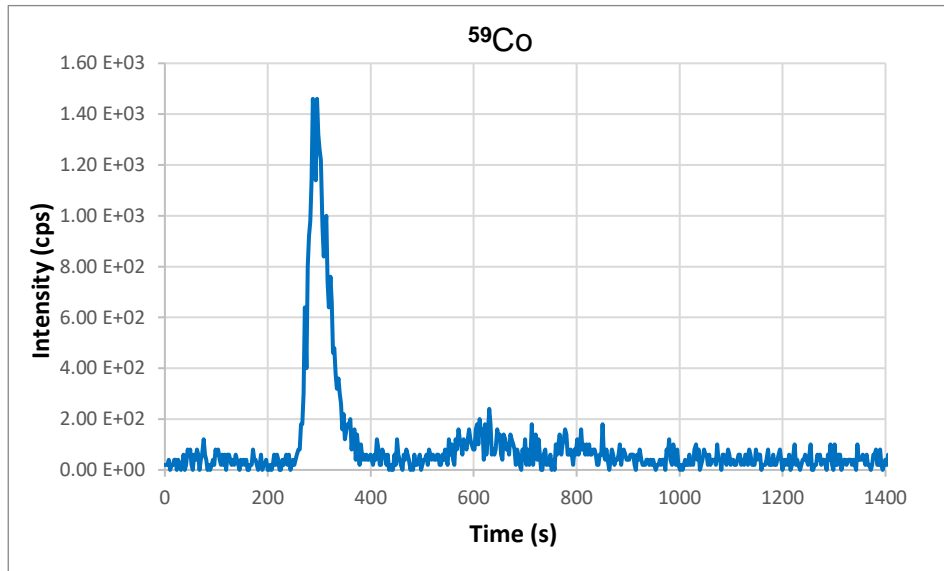
6.4 Χρωματογραφήματα ανάλυσης ορού αίματος του Αθλητή 16 (6-BL-48) με τη διπλή στήλη HiTrap Desalting HP(κινητή φάση: pH 7)



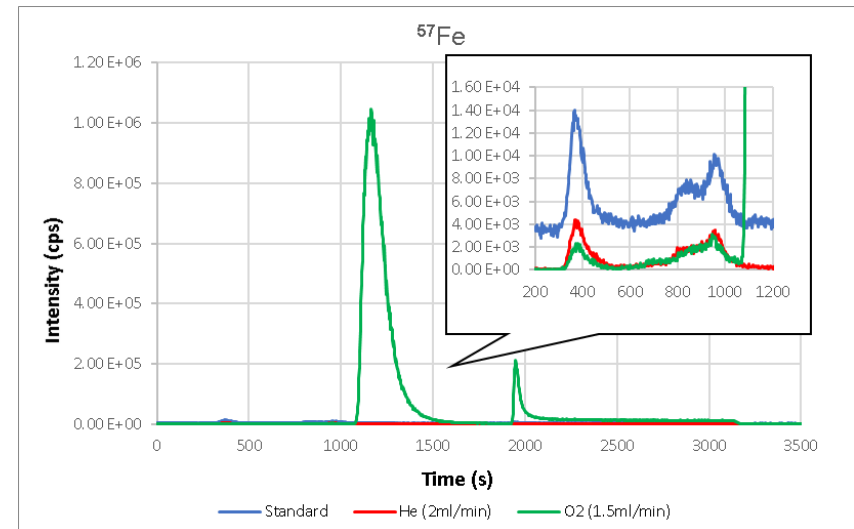
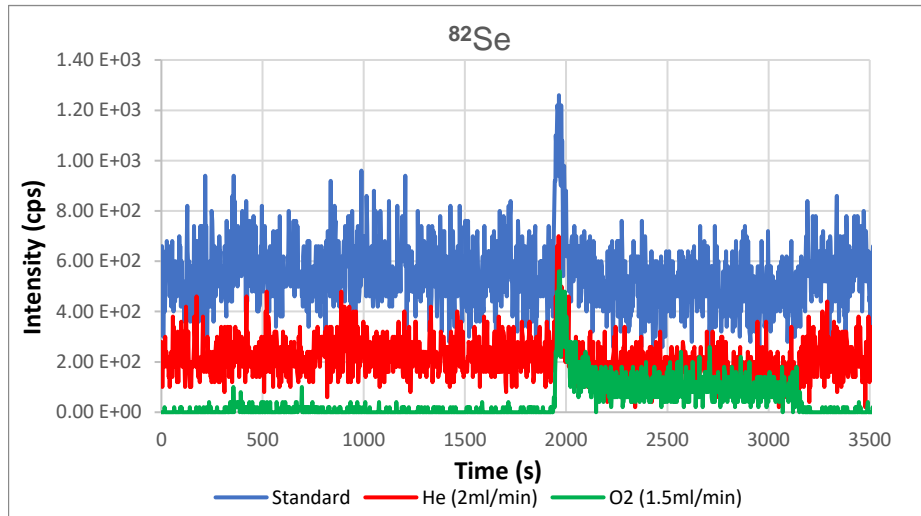
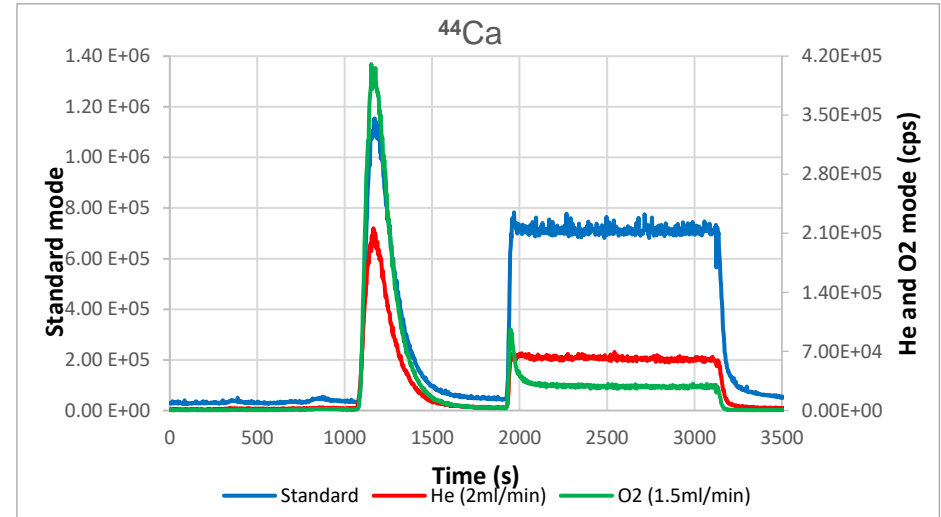
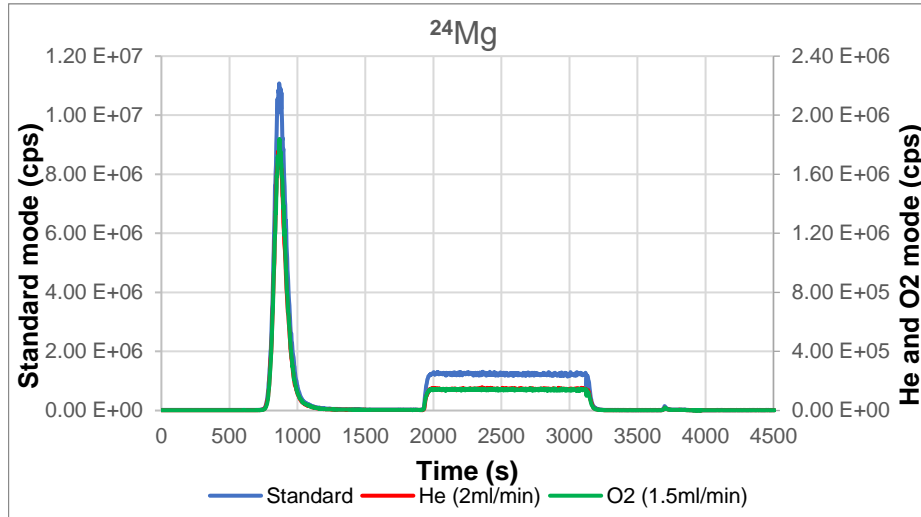


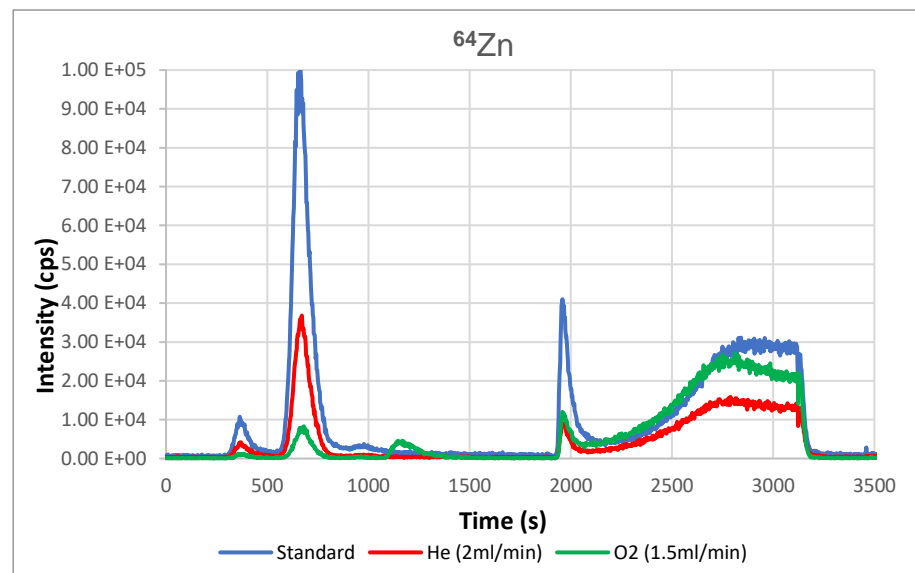
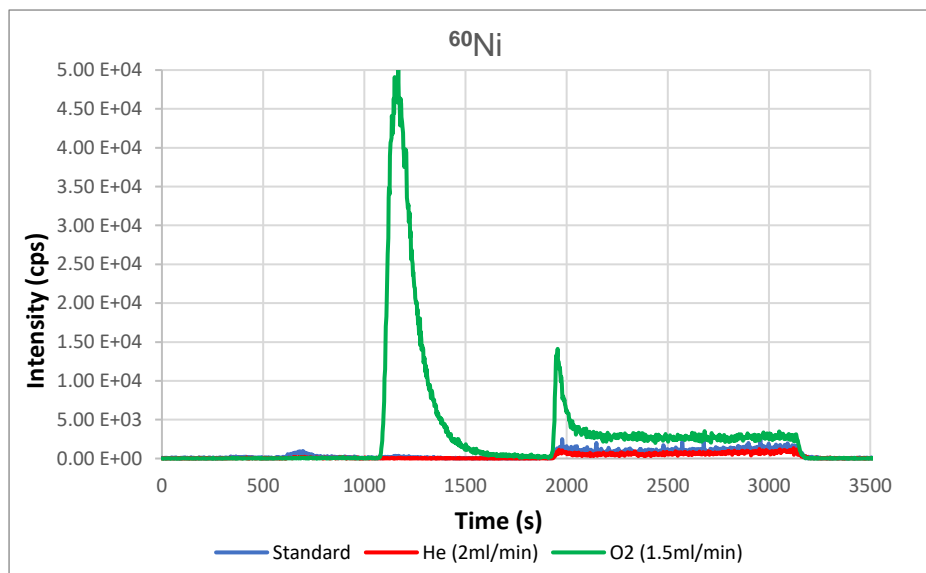
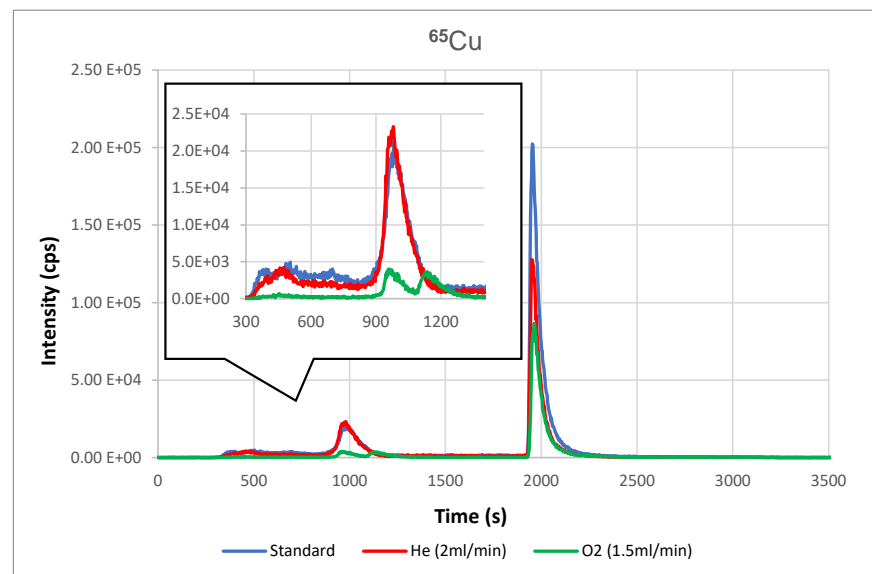
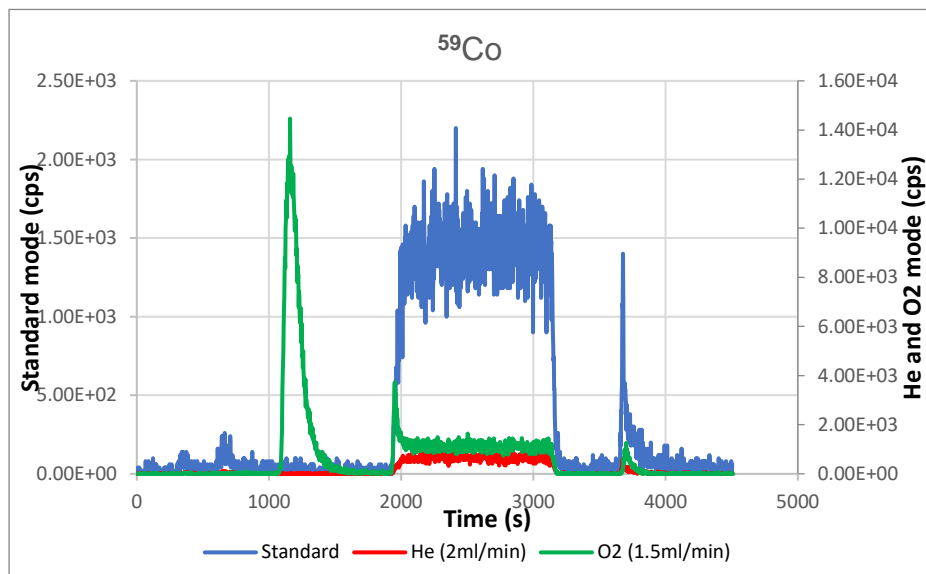
6.5 Χρωματογραφήματα ανάλυσης ορού αίματος του Αθλητή 16 (6-BL-48) με τη διπλή στήλη HiTrap Desalting HP(κινητή φάση: pH 8)



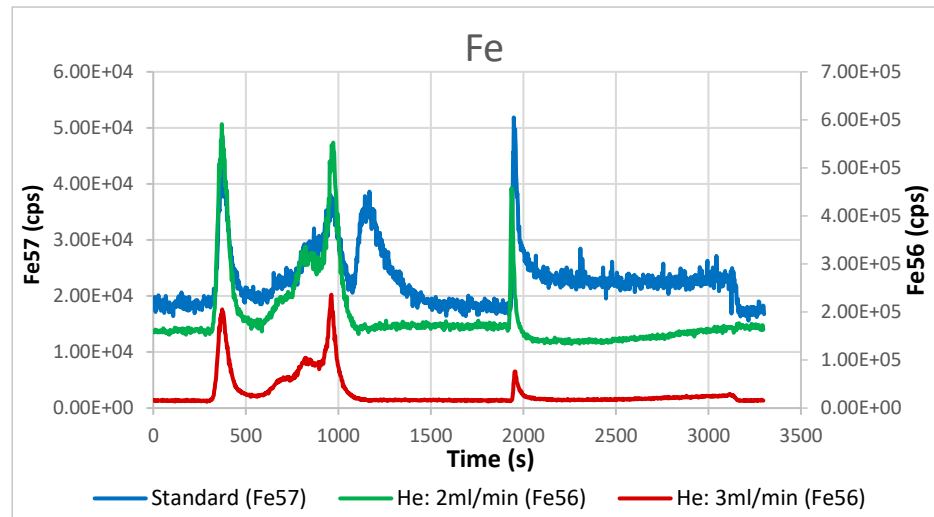
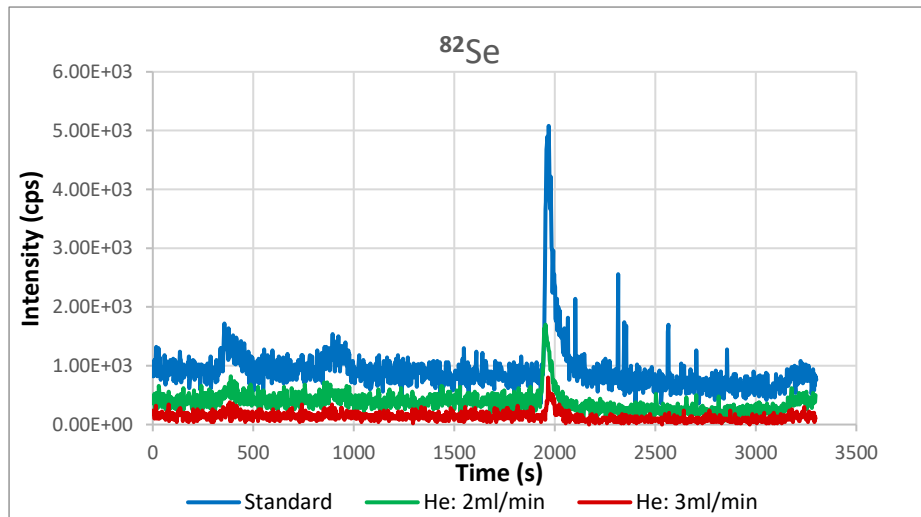
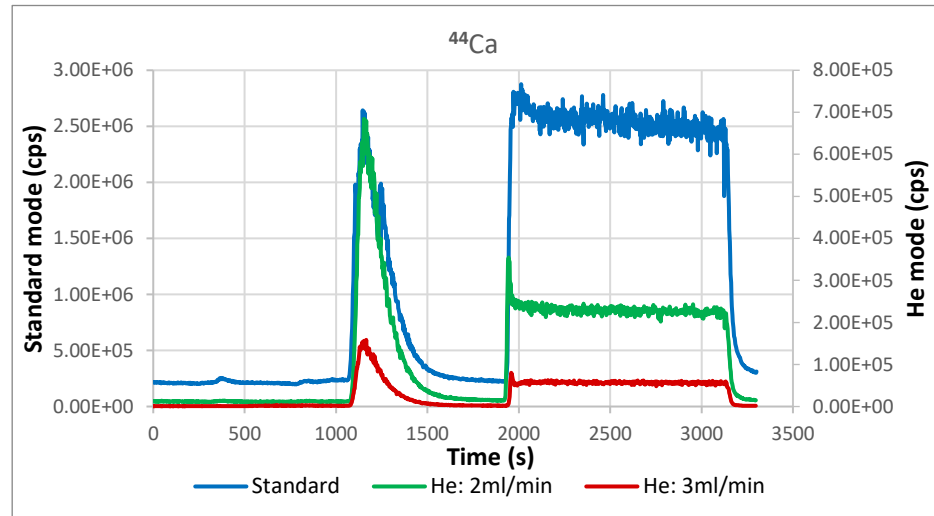
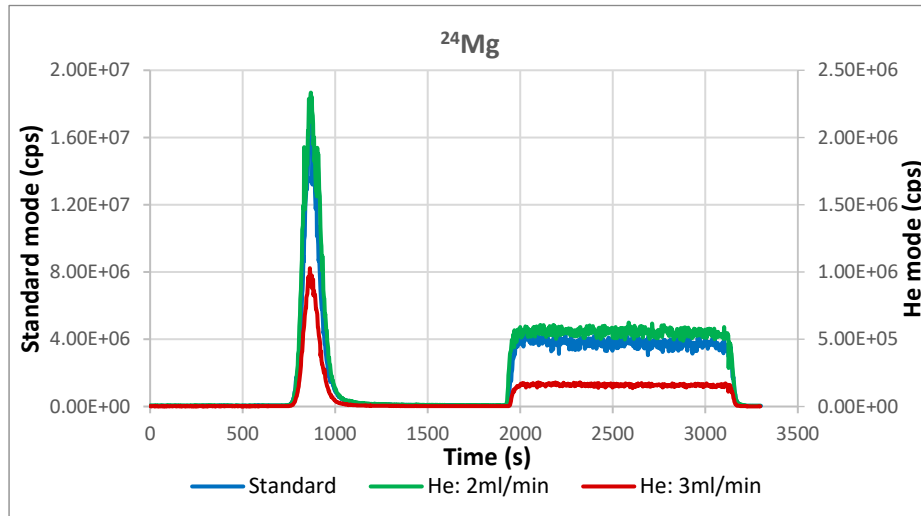


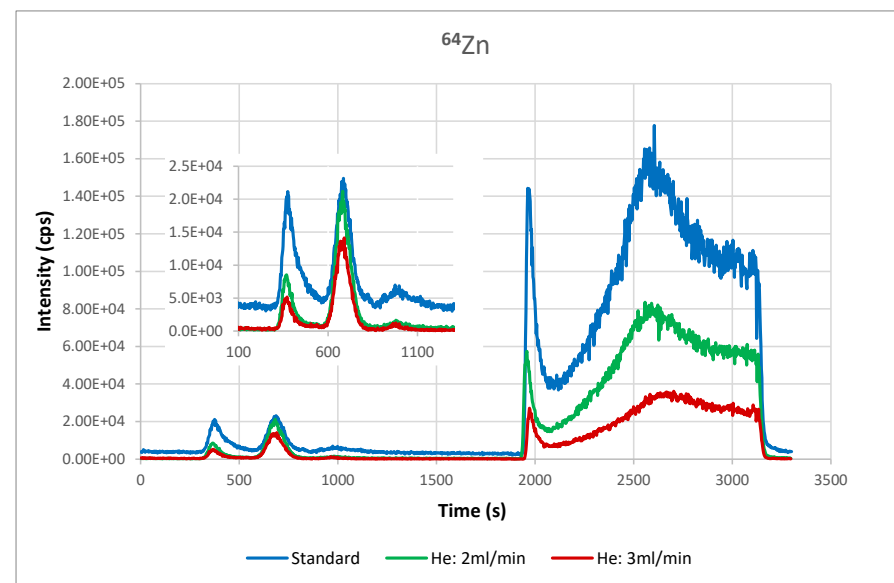
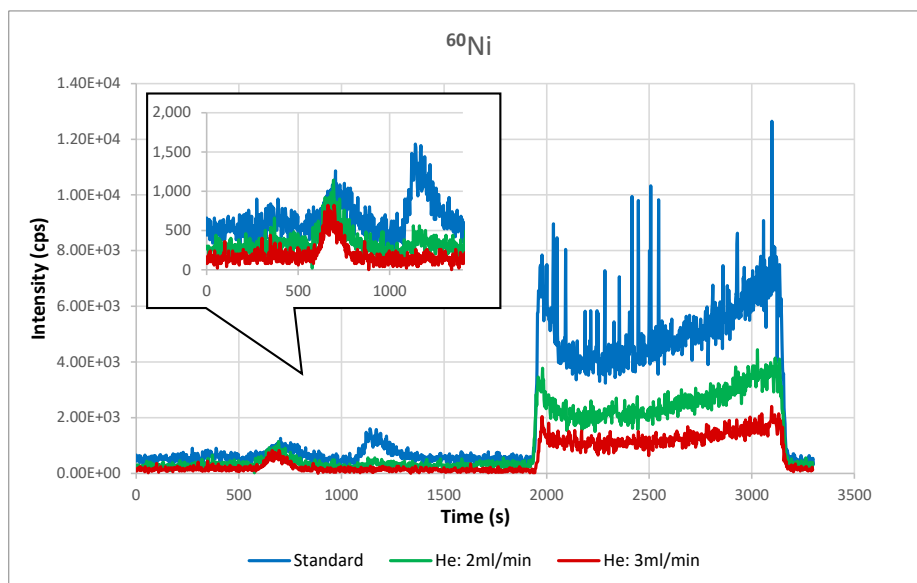
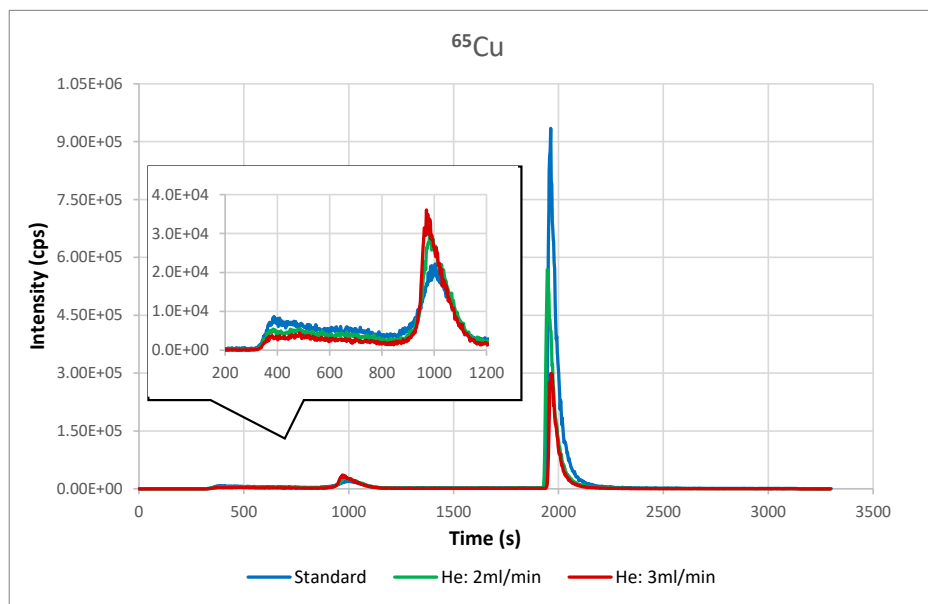
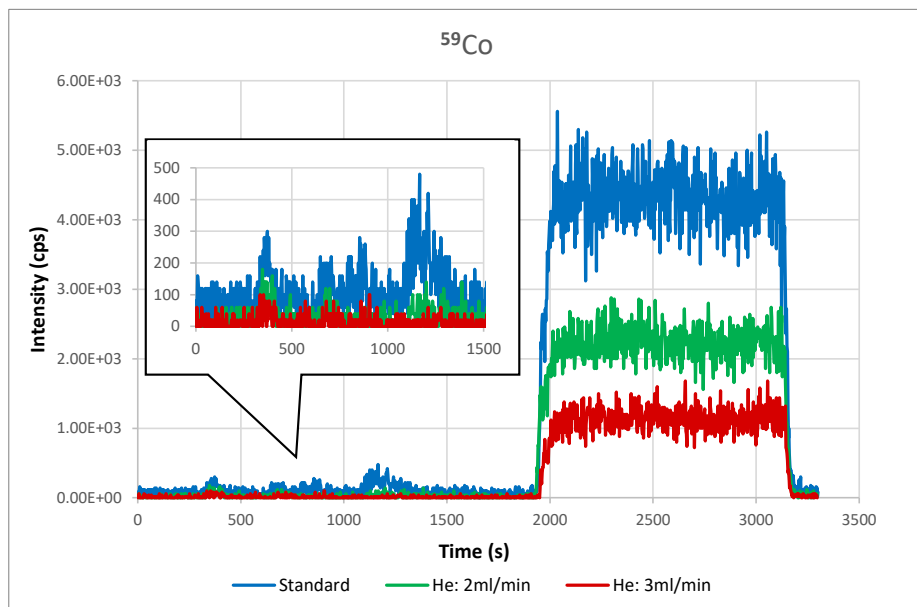
6.6 Συγκεντρωτικά γραφήματα χρωματογραφημάτων από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος του Αθλητή 11 (32-BL-72), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS και τις λειτουργίες universal cell: Standard mode, He mode και O₂ mode



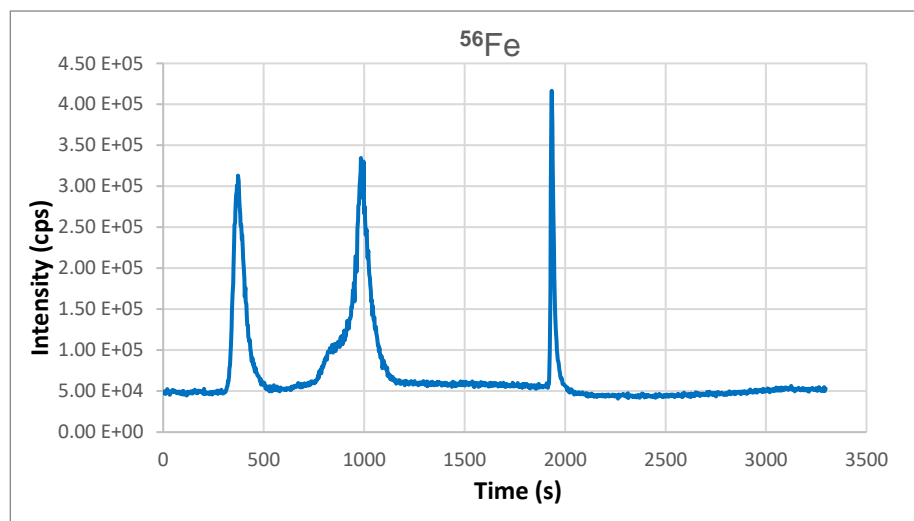
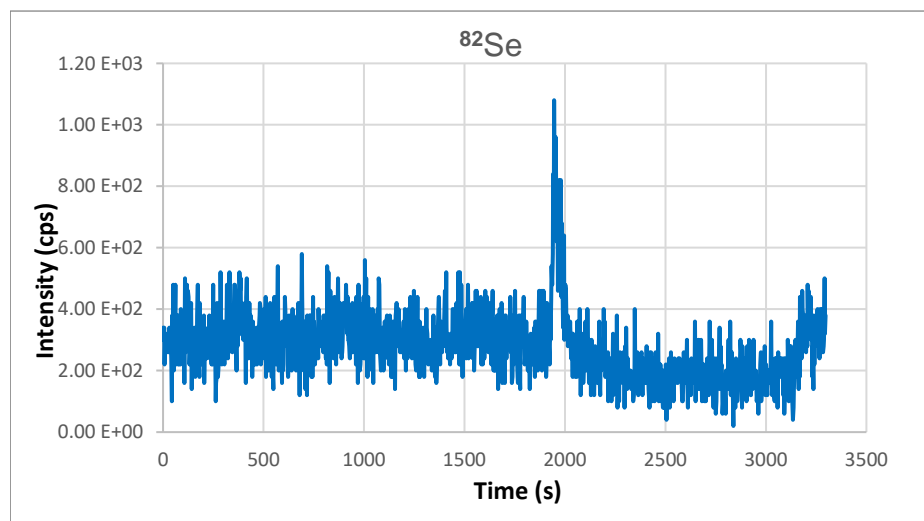
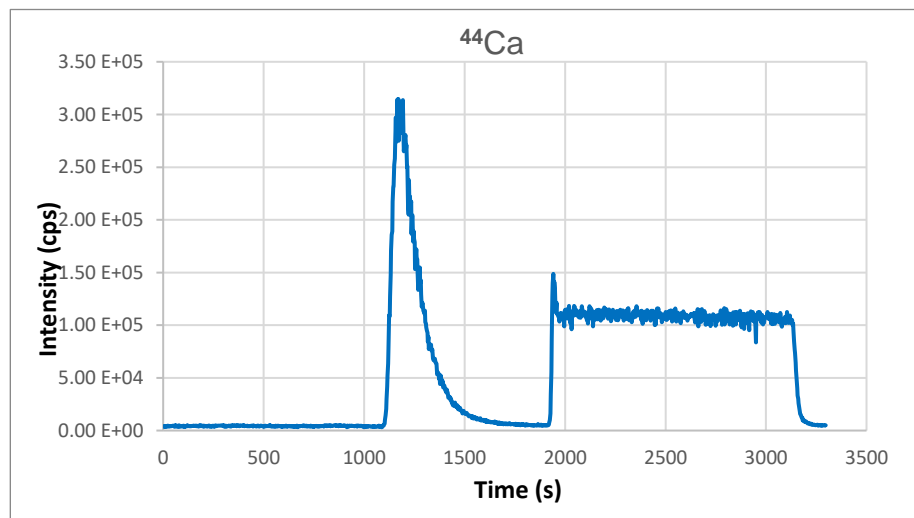
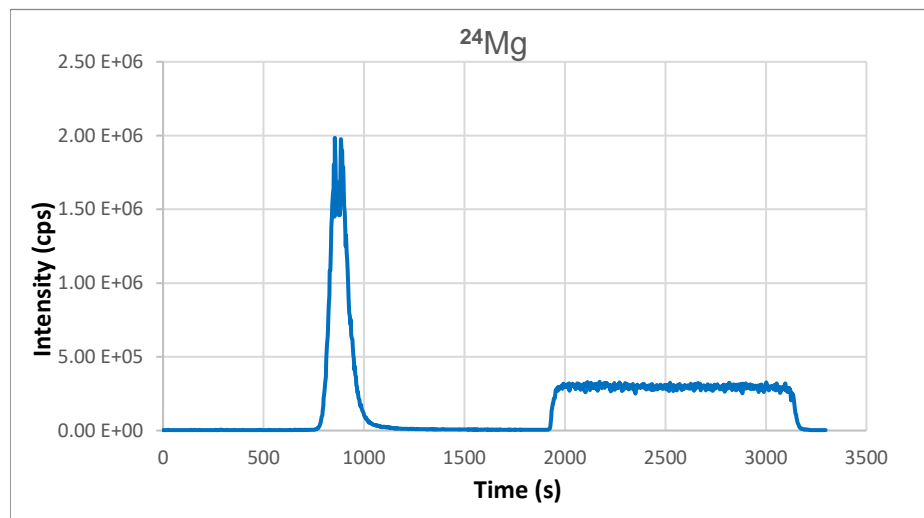


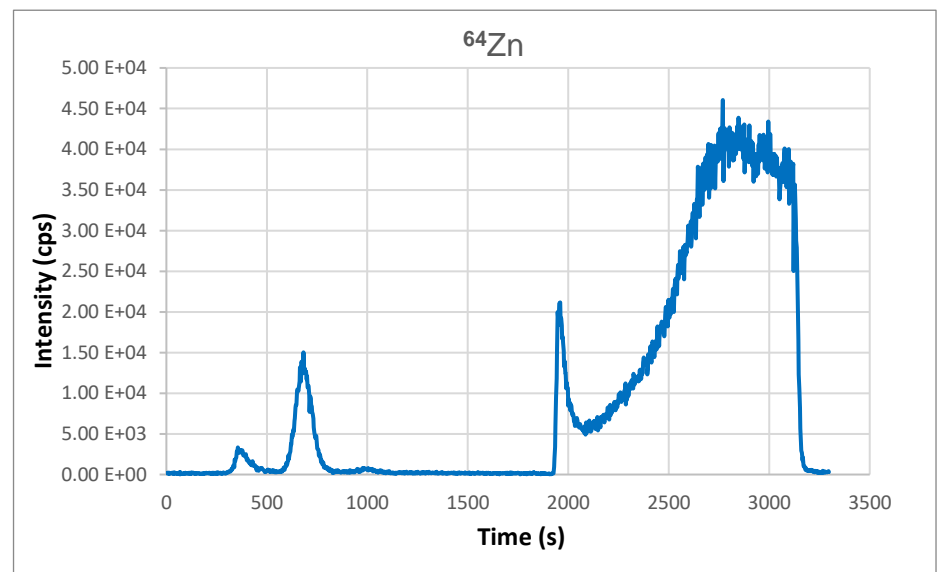
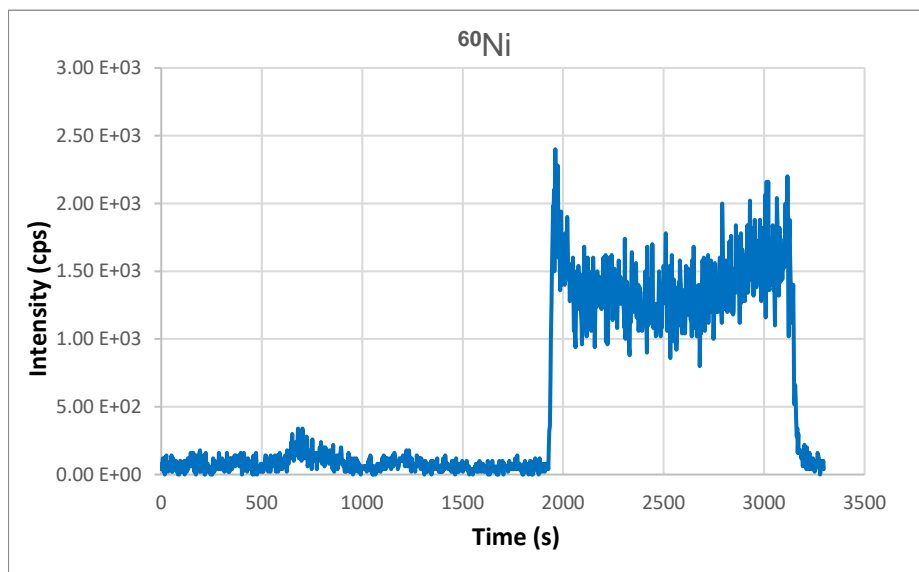
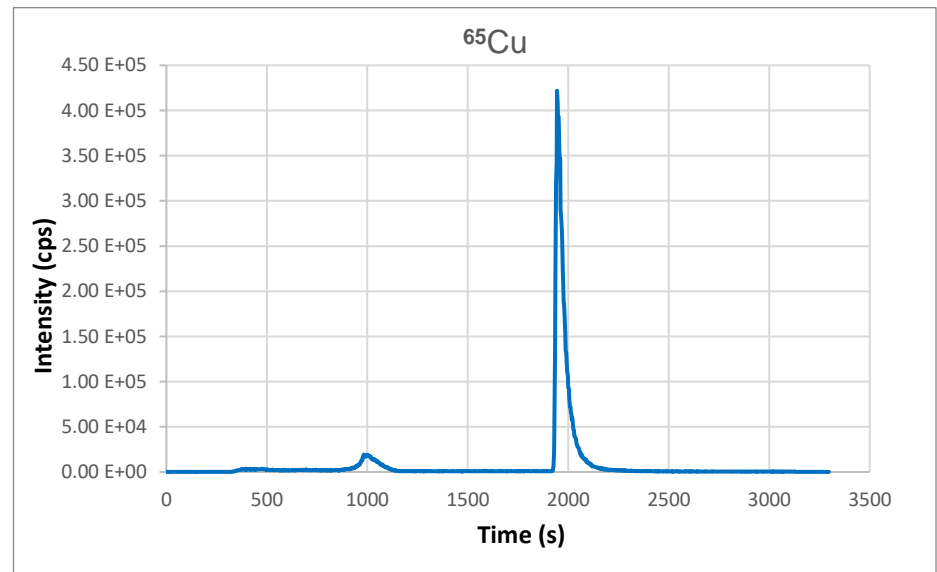
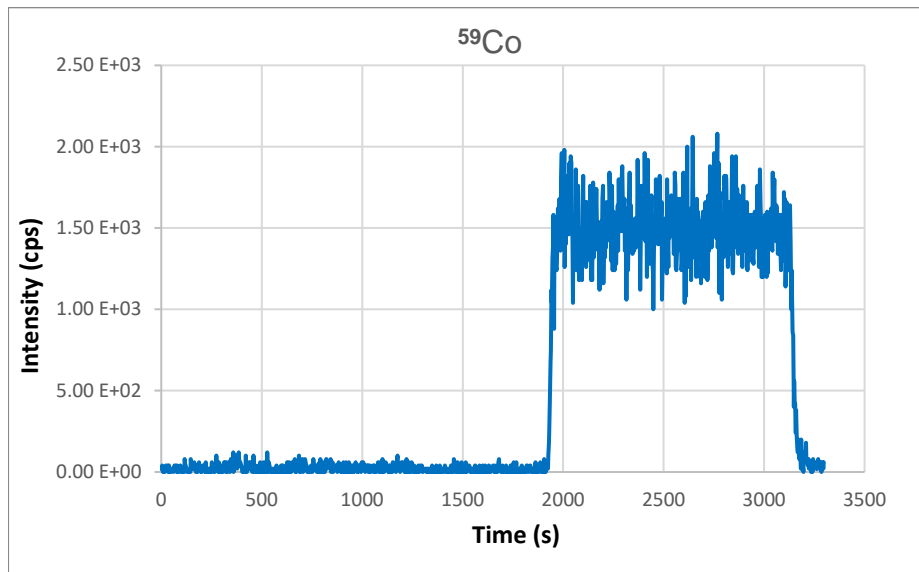
6.7 Συγκεντρωτικά γραφήματα χρωματογραφημάτων από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος του Αθλητή 10 (22-BL-2), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε Standard mode και He mode (ροή He: 2 ml/min και 3 ml/min)





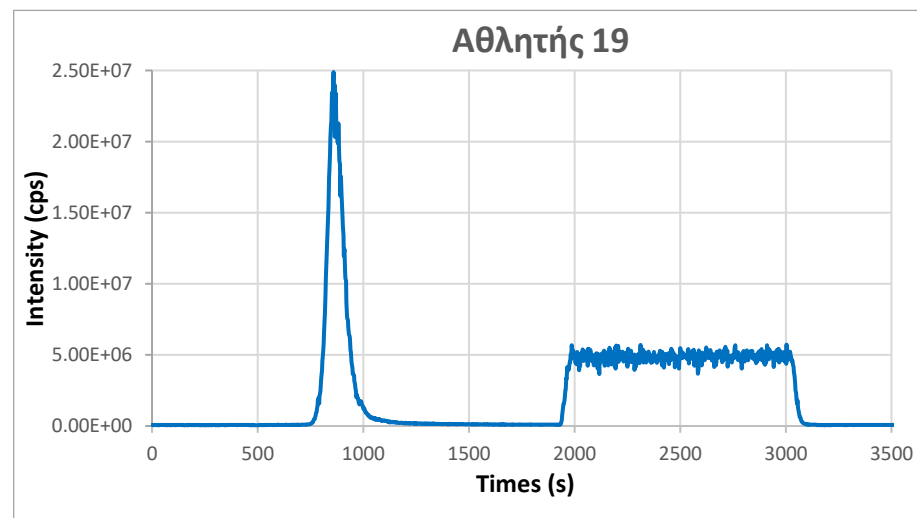
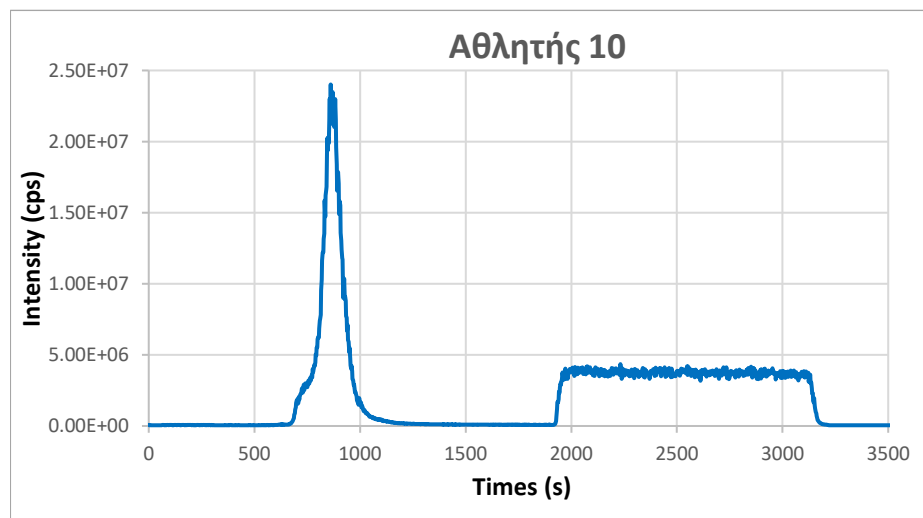
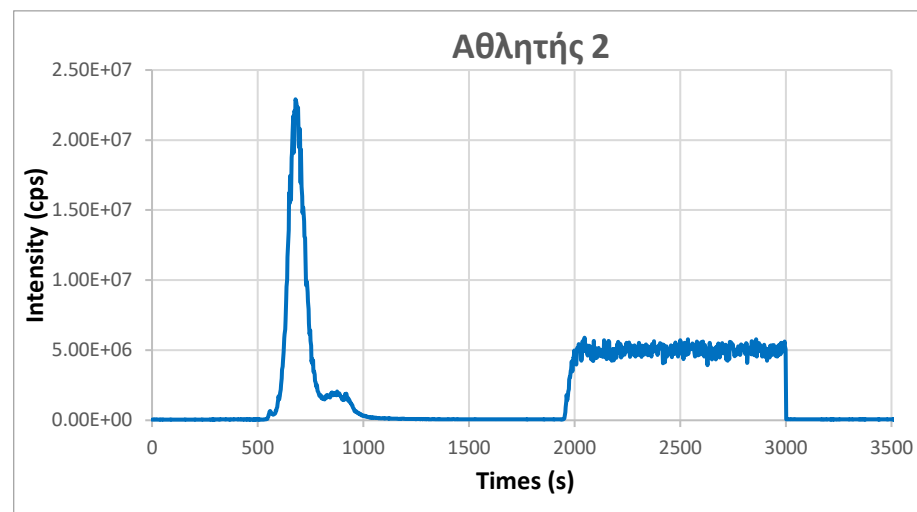
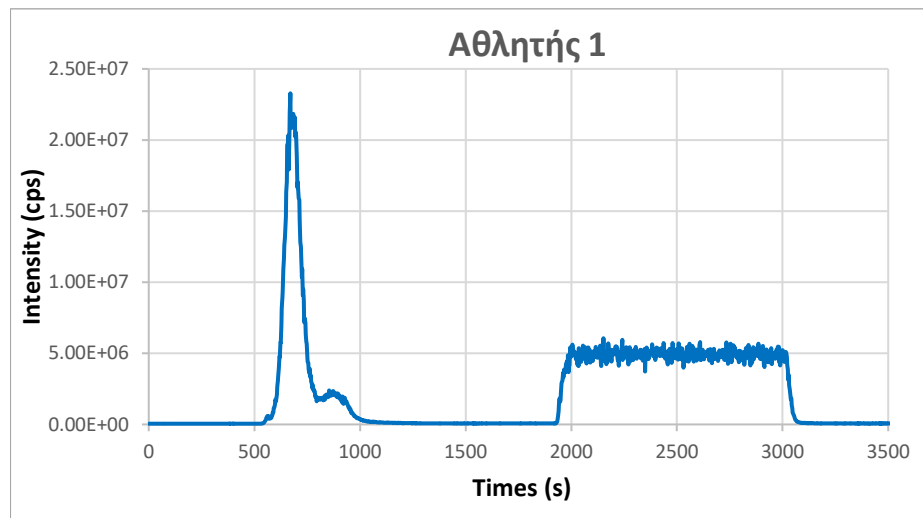
6.8 Χρωματογραφήματα στοιχείων από την ανάλυση δείγματος ορού αίματος του Αθλητή 10 (22-BL-24), με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε He mode (2,5 ml/min)



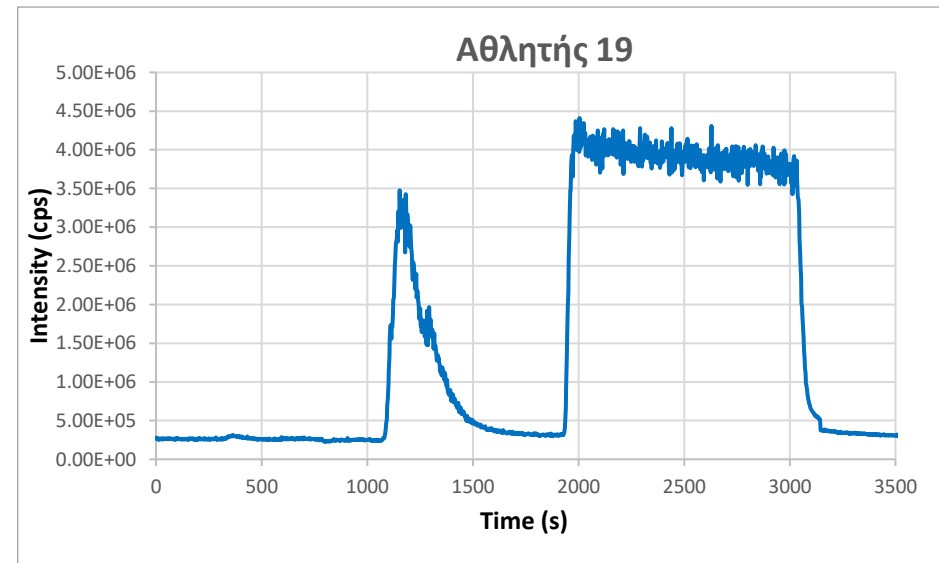
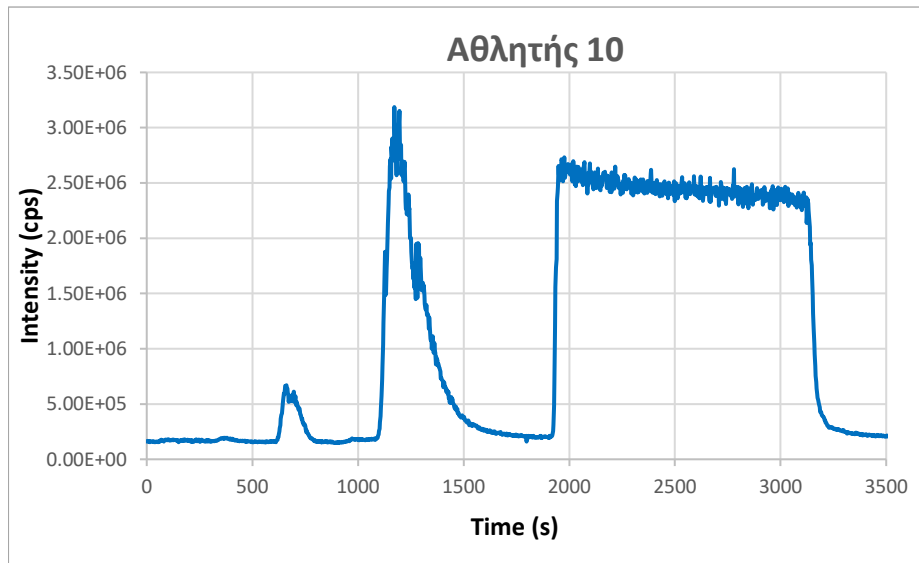
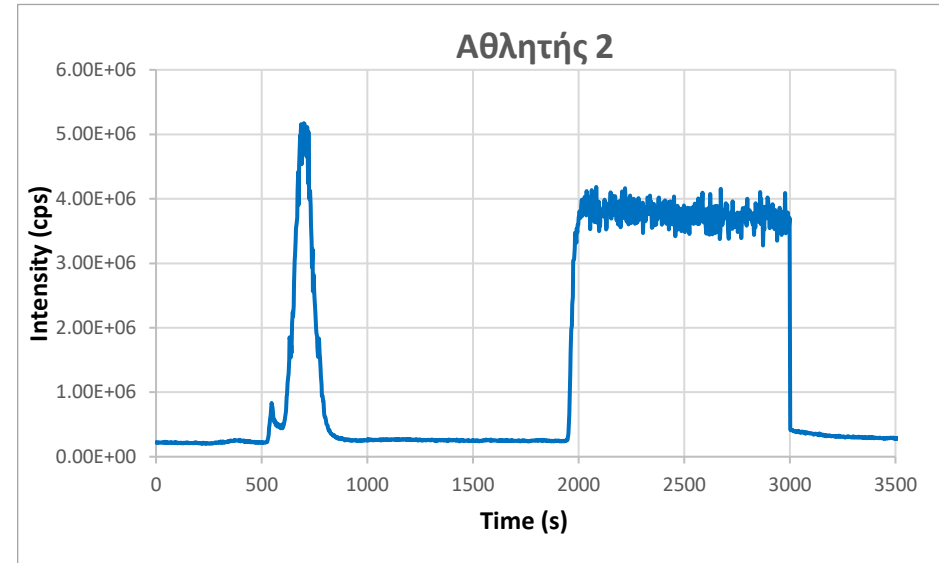
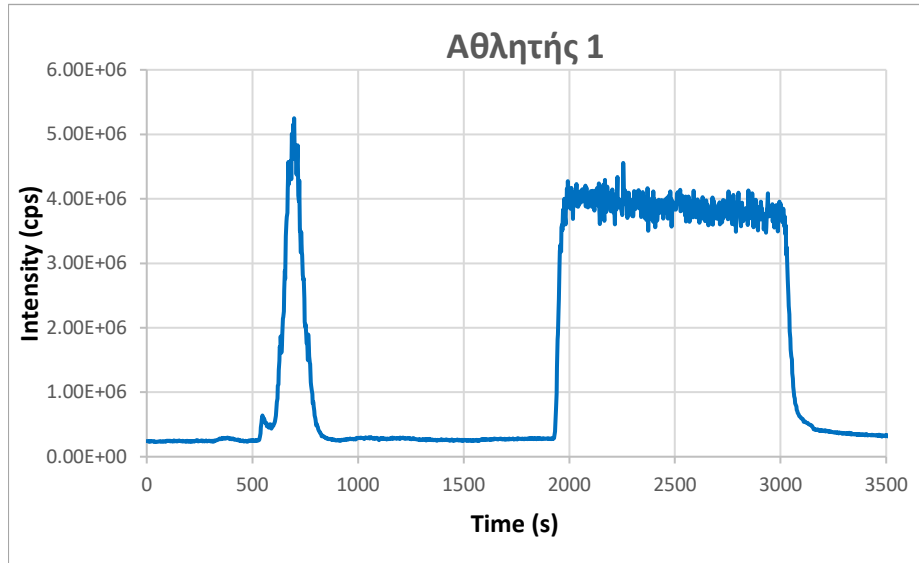


6.9 Χρωματογραφήματα ανάλυσης ορού αίματος αθλητών με τη μέθοδο dcSEC-AF-ICP-MS σε Standard mode

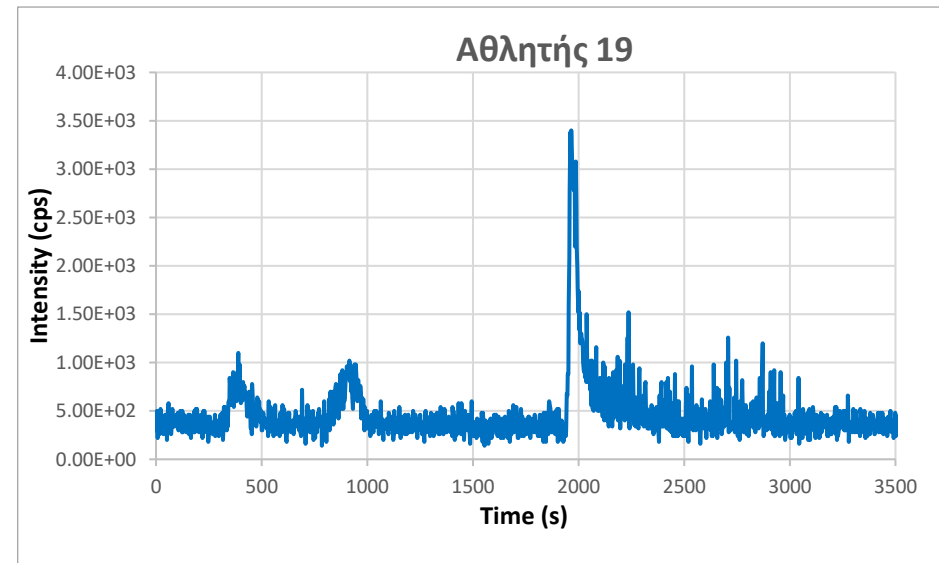
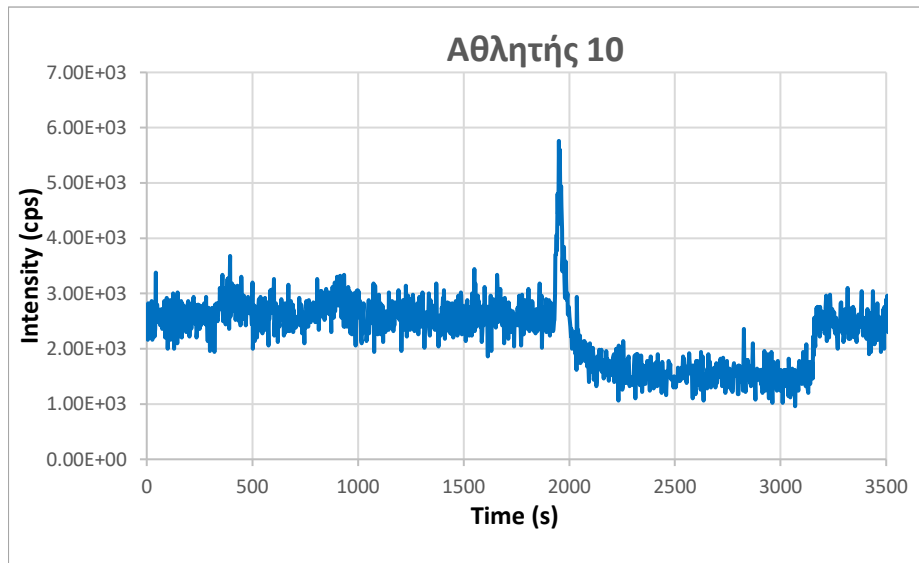
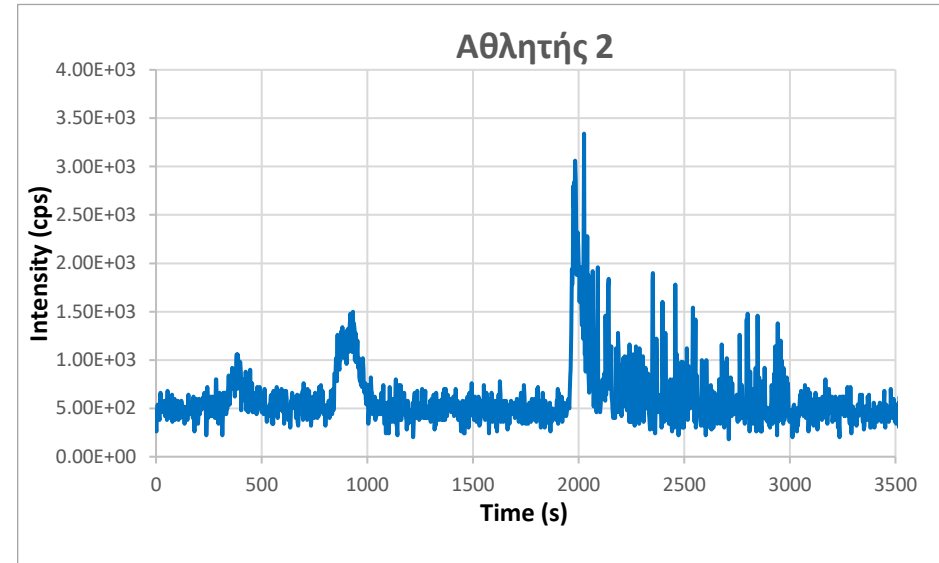
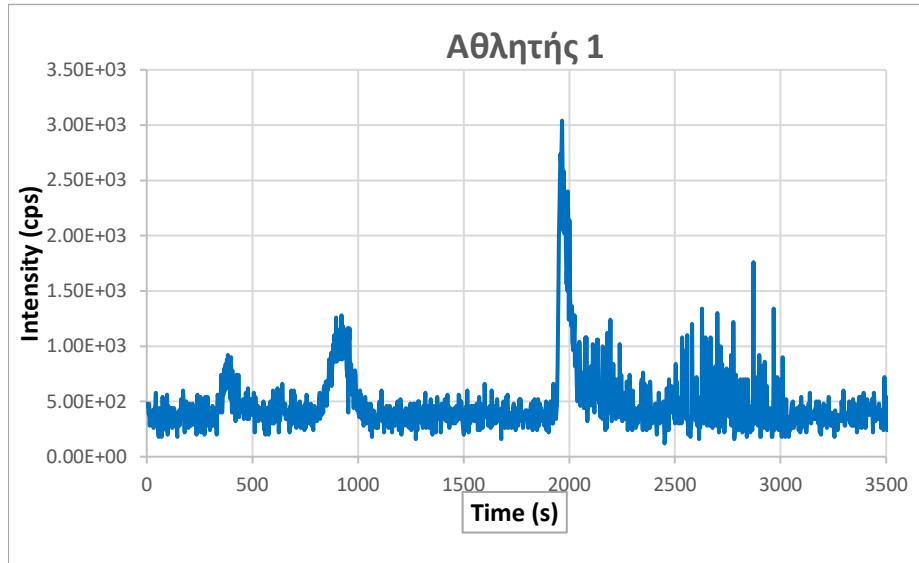
6.9.1 Μαγνήσιο (^{24}Mg)



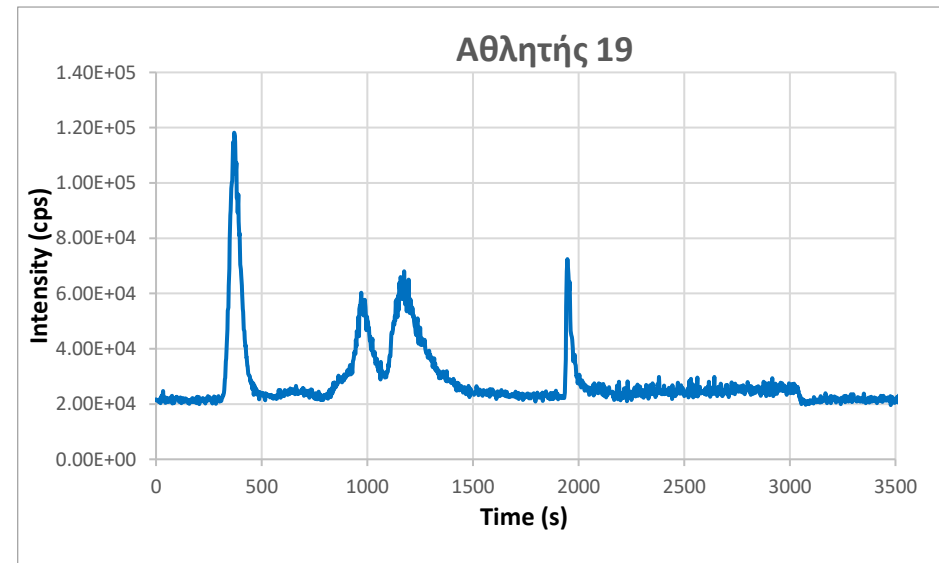
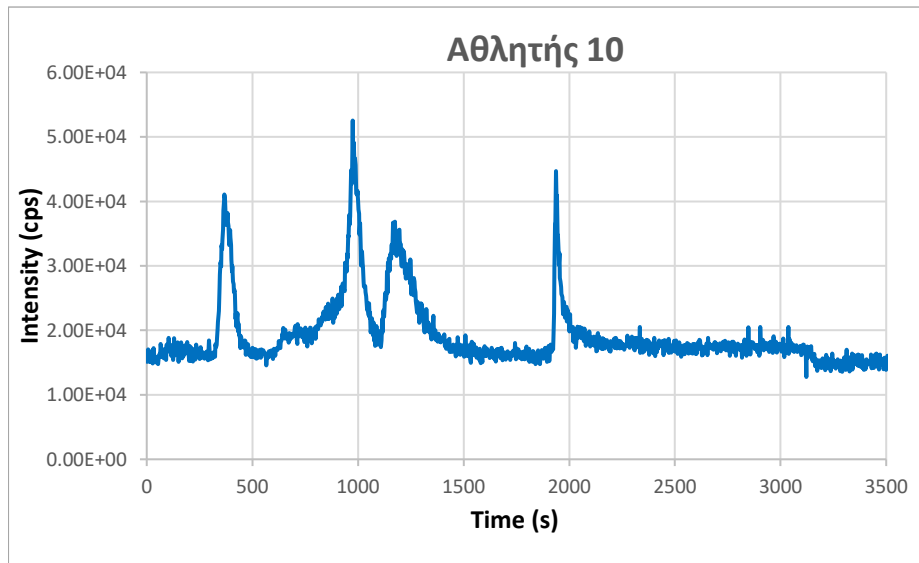
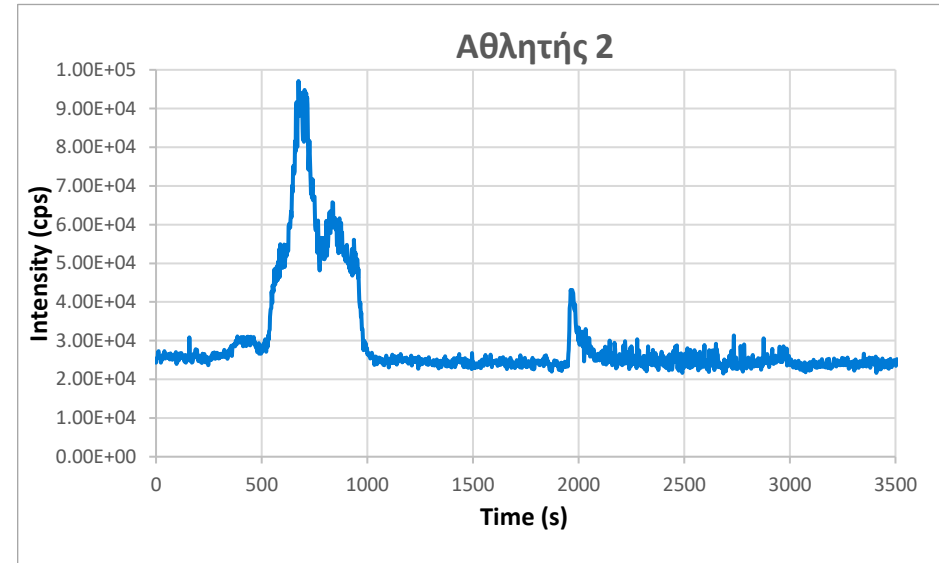
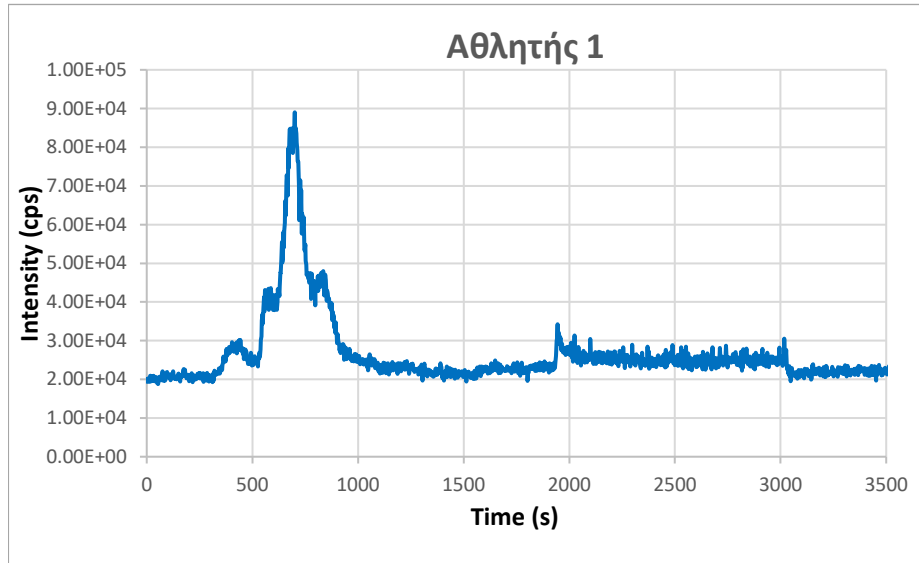
6.9.2 Ασβέστιο (^{44}Ca)



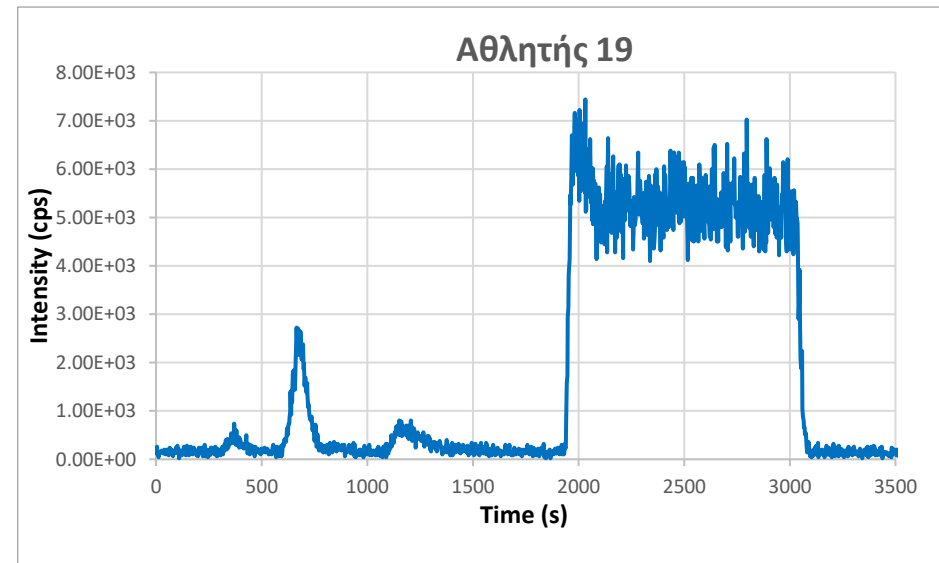
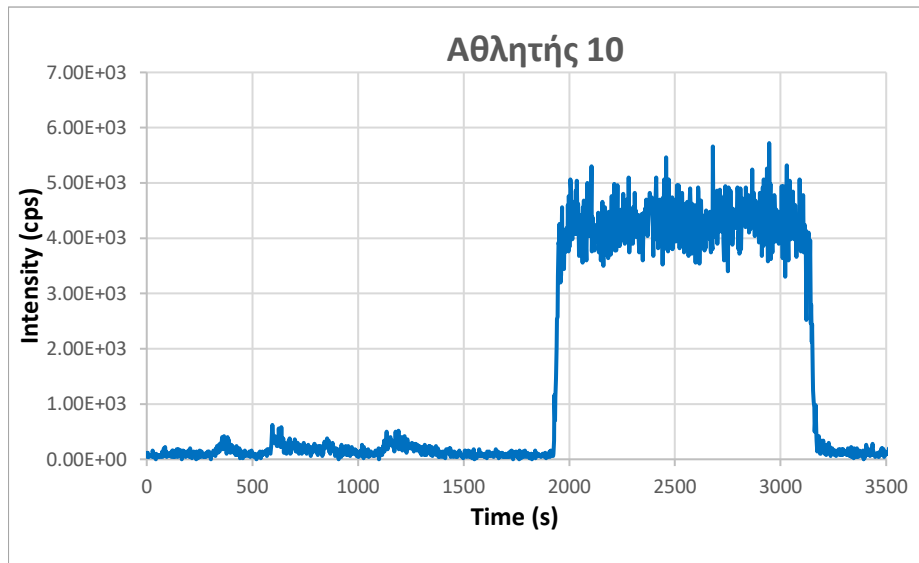
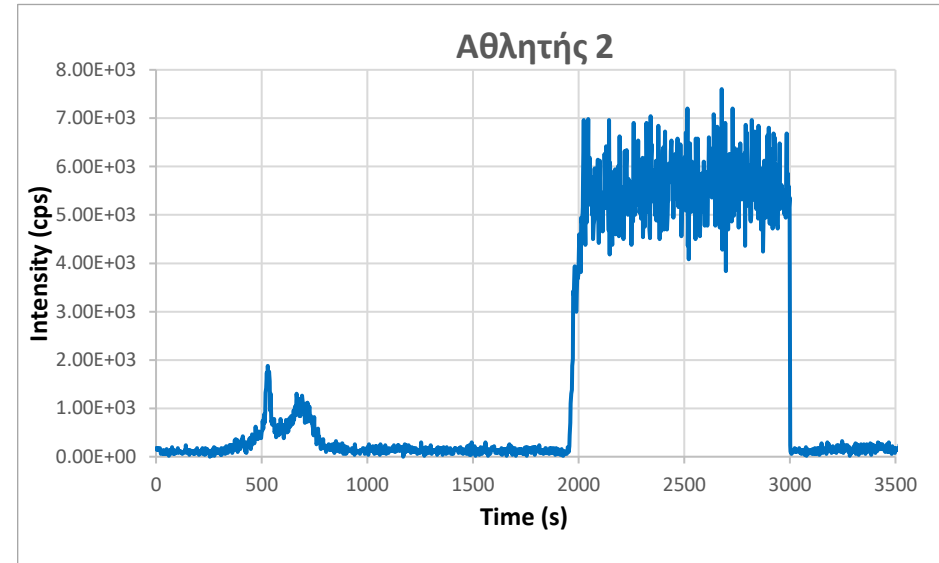
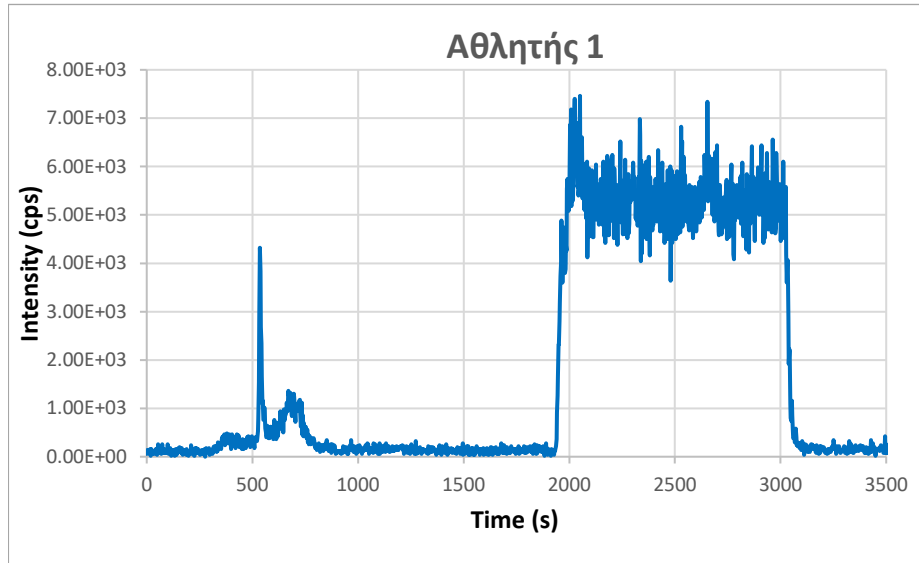
6.9.3 Σελήνιο (^{82}Se)



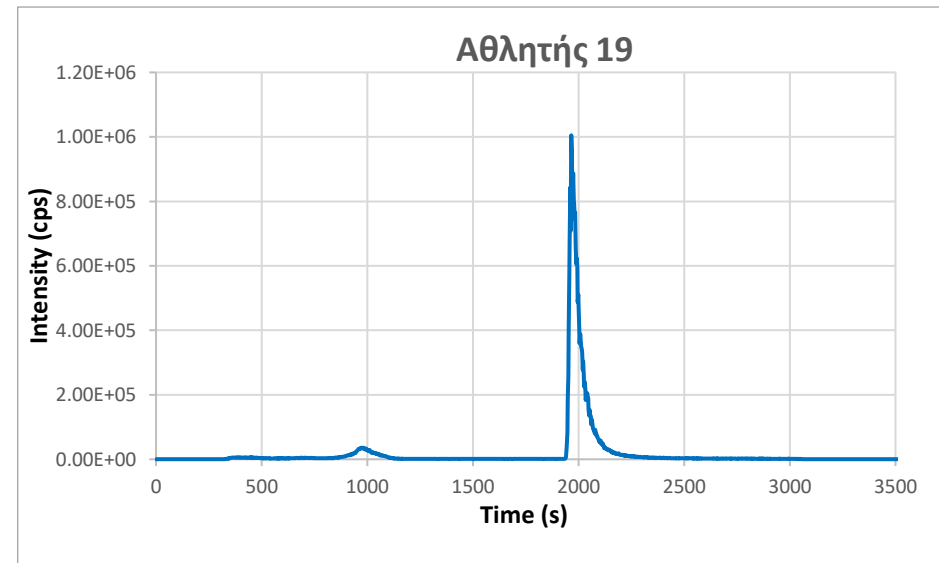
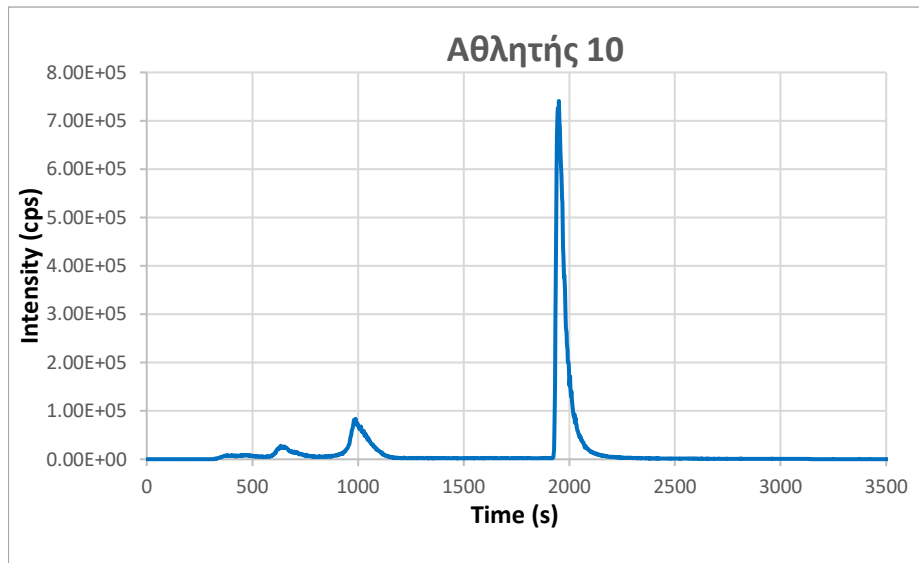
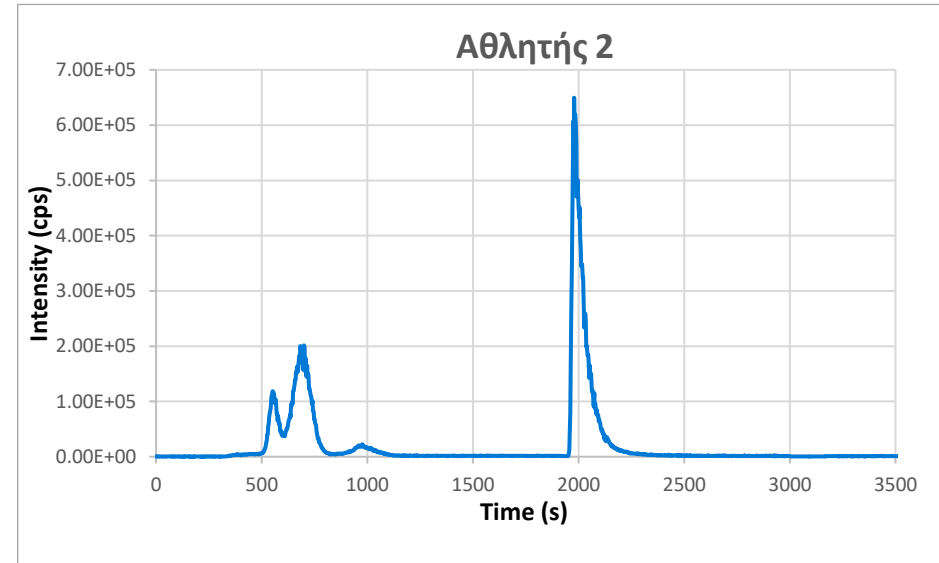
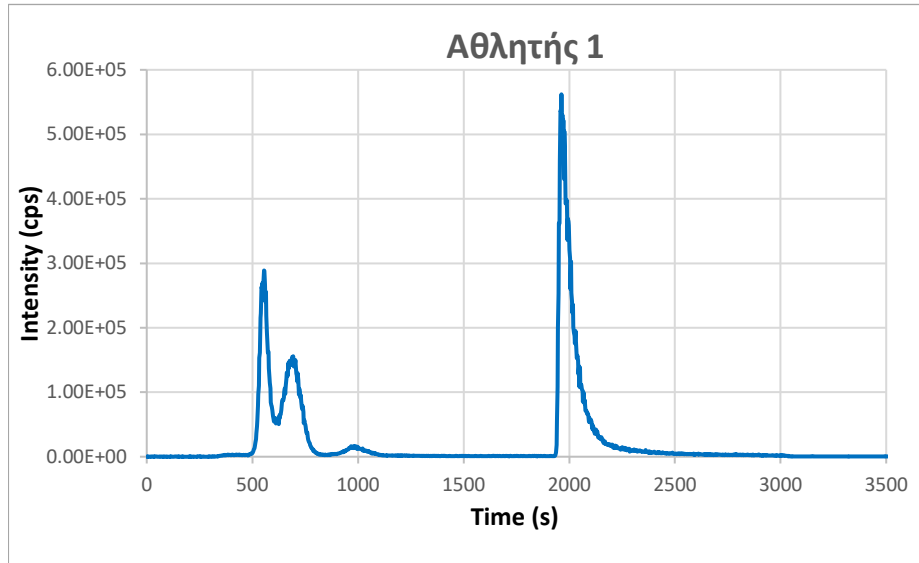
6.9.4 Σίδηρος (^{57}Fe)



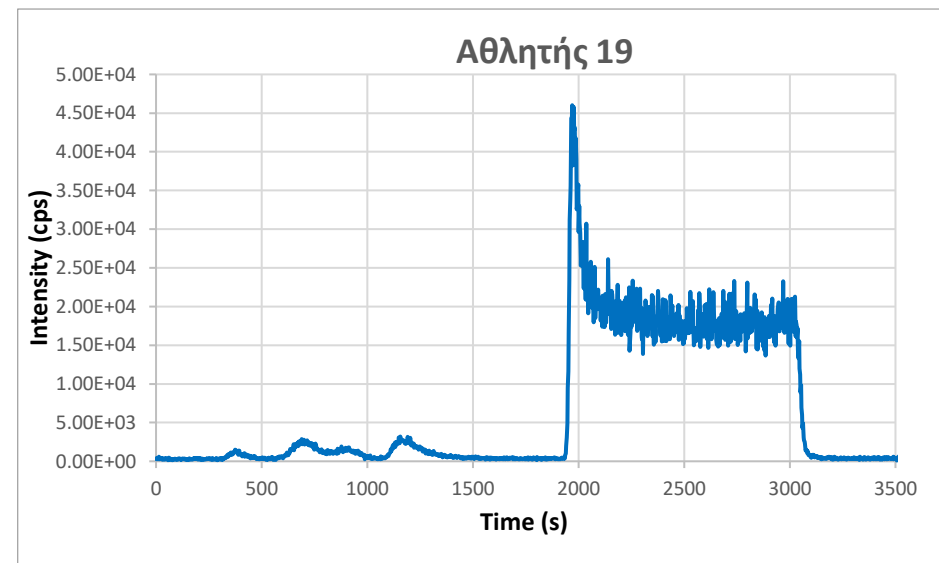
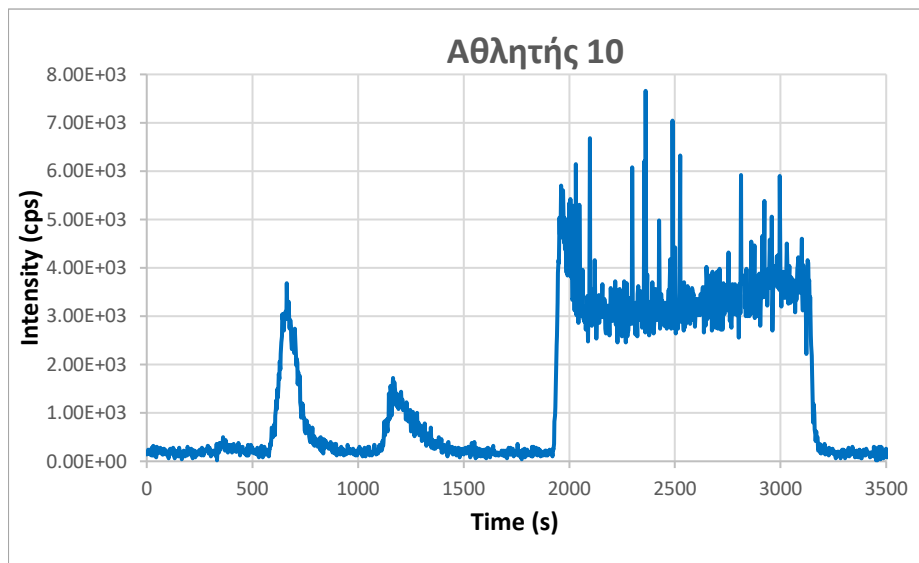
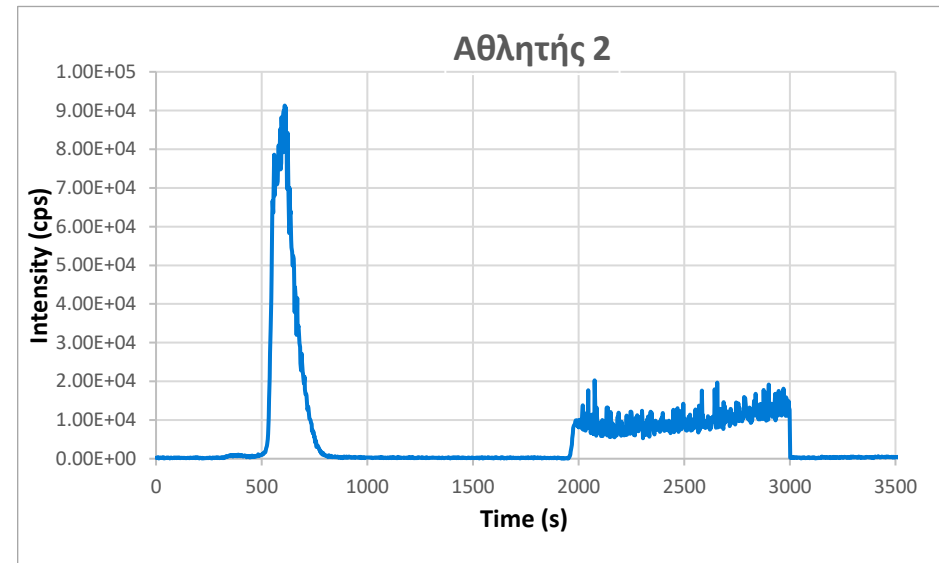
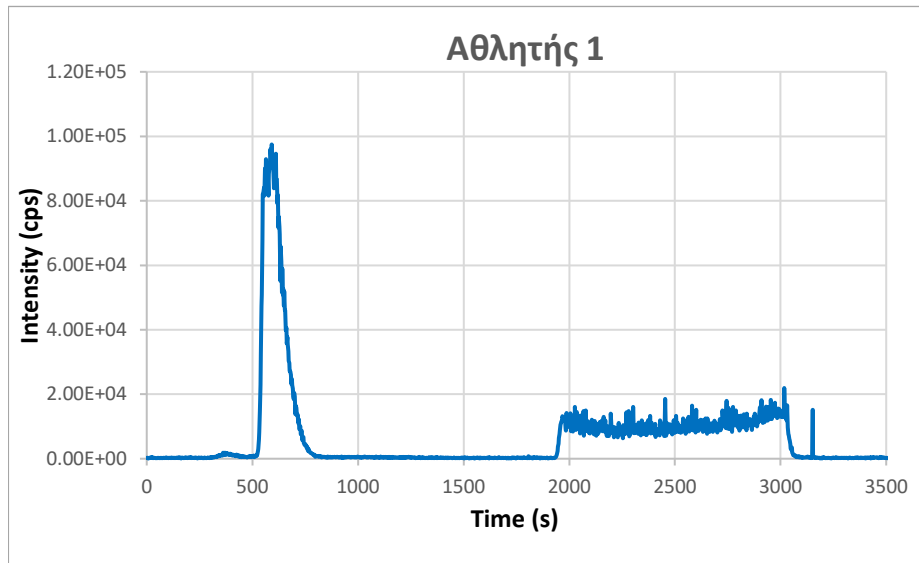
6.9.5 Κοβάλτιο (^{59}Co)



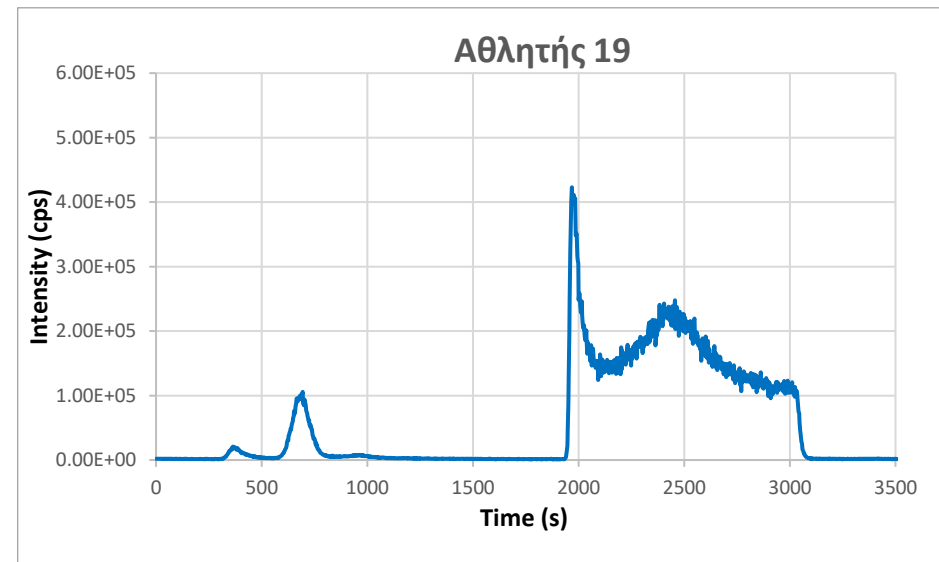
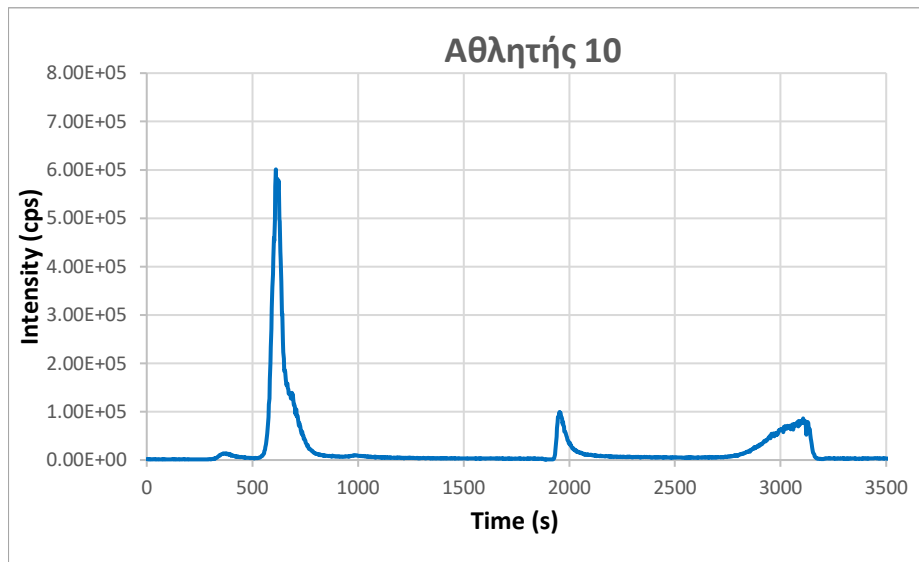
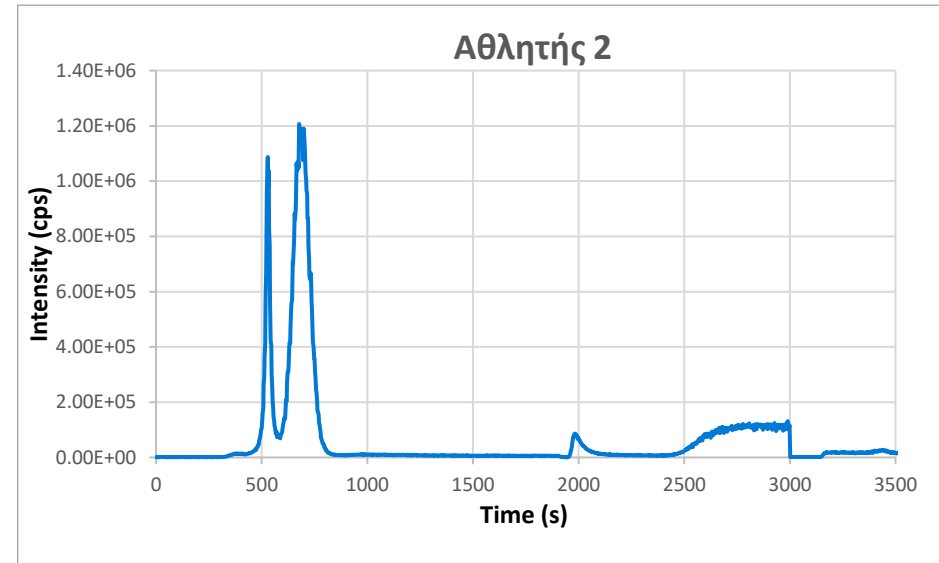
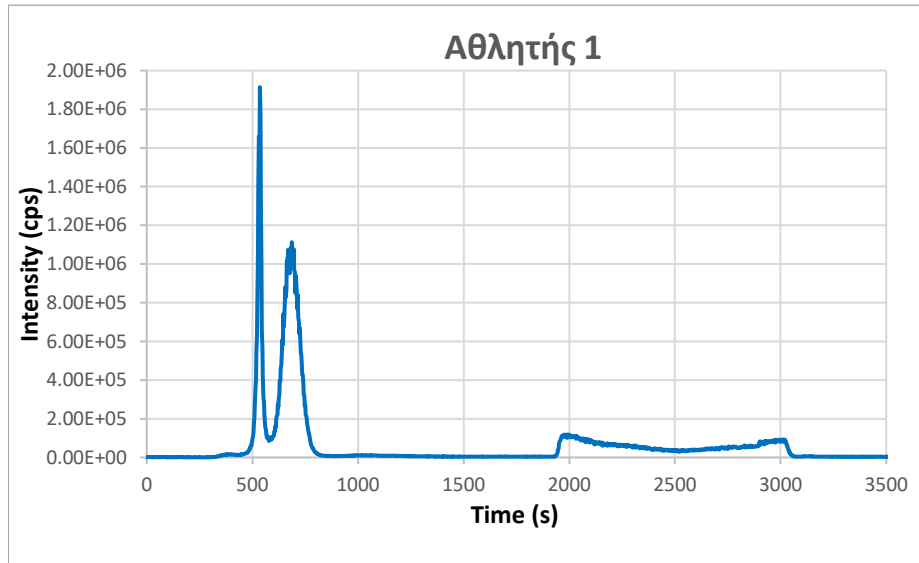
6.9.6 Χαλκός (^{65}Cu)



6.9.7 Νικέλιο (^{60}Ni)



6.9.8 Ψευδάργυρος (^{64}Zn)



6.10 Καμπύλες βαθμονόμησης: Mg, Ca, Fe, Cu, Co, Ni και Zn

