

**ΜΑΡΙΑ ΚΥΡΙΑΚΙΔΟΥ**  
**ΧΗΜΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ, ΕΜΠ**

**Φασματοσκοπική μελέτη καρκινικών οστών**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΑΘΗΝΑ 2014**



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΥΛΙΚΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΚΤΙΝΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

Ι. Αναστασοπούλου, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π., Επιβλέπουσα

Δ. Υφαντής, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Θ. Θεοφανίδης, Ομ. Καθ. Ε.Μ.Π.

### **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Ι. Αναστασοπούλου, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Δ. Υφαντής, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Θ. Θεοφανίδης, Ομ. Καθ. ΕΜΠ

Μ. Κουή, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π

Δ. Δημοστίκαλη, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Π. Παπαγγελόπουλος, Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.

Μ. Ράλλης, Καθηγητής, Ε.Κ.Π.Α

Β. Μπαϊράμη, Επ.Καθ. Ε.Κ.Π.Α.

Η διατριβή εγκρίθηκε την

*Η έγκριση της Διδακτορικής διατριβής από την Ανώτατη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ. Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (Ν. 5343/1932, αρ.202).*



## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια των Επιστημονικών Ερευνών που πραγματοποιείται το Εργαστήριο Ακτινοχημείας και Βιοφασματοσκοπίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου.

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια Ιωάννα Αναστασοπούλου για την ανάθεση του θέματος και την συνεχή συμπαράσταση και καθοδήγηση σε όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Δρ. Θ. Θεοφανίδη, Ομότιμο Καθηγητή του ΕΜΠ και Πανεπιστημίου Montreal, Επίτιμο Δρ του Πανεπιστημίου της Reims για την πολύτιμη βοήθειά του, τις παρατηρήσεις και την αμέριστη συμπαράστασή του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Δ. Τσιούρβα και την Δρ. Ωρ. Σιδεράτου για την φιλοξενία και βοήθεια στο Εργαστήριο Οργανωμένων Υπερμοριακών Νανοϋλικών, όπου διεκπεραιώθηκε το μεγαλύτερο τμήμα της διατριβής.

Τους Καθηγητές Θ. Κορμά, Δ/ντή της Α' Ορθοπαιδικής Κλινικής του Νοσοκομείου «Αγ Σάββας,» και Π. Παπαγγελόπουλο Δ/ντή της Α' Ορθοπαιδικής Κλινικής «ΠΓΝ ΑΤΤΙΚΟΝ» για την διάθεση των δειγμάτων και την συνεχή συμπαράσταση και εκπαίδευση σε θέματα μετάστασης του καρκίνου των οστών.

Επίσης ευχαριστώ την Δρ. Β. Δρίτσα για την λήψη των απεικονίσεων των δειγμάτων με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning Electron Microscope, SEM).



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος .....	11
Περίληψη .....	13
Abstract .....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 <sup>ο</sup> .....	19
ΚΑΡΚΙΝΟΣ .....	19
1.1. Εισαγωγή.....	19
1.2. Νεοπλασματικές παθήσεις των οστών .....	20
1.2.1. Χονδροσάρκωμα .....	20
1.2.2. Ινοσάρκωμα .....	21
1.2.3. Γιγαντοκυτταρικός όγκος.....	21
1.2.4. Ανευρυσματικές κύστεις.....	22
1.2.5. Χόρδωμα .....	22
1.2.6. Σάρκωμα Ewing.....	22
1.2.7. Πολλαπλούν μυέλωμα .....	23
1.3. Οστικές μεταστάσεις.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 <sup>ο</sup> .....	25
ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΕΣ.....	25
2.1. Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, X και γ .....	25
2.2. Ακτινοθεραπεία.....	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 <sup>ο</sup> .....	27
ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ .....	27
3.1. Ιστορική Αναδρομή.....	27
3.2. Γενικές αρχές FT-IR Φασματοσκοπίας .....	29
3.3. Φάσματα δόνησης πολυατομικών μορίων .....	31
3.4. Φασματοφωτόμετρα Υπερύθρου .....	33
3.5. Εφαρμογές της φασματοσκοπίας στην ιατρική-μελέτη παθολογικών ιστών .....	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 <sup>ο</sup> .....	37
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΣΑΡΩΣΗΣ (SEM).....	37
4.1. Ιστορική αναδρομή .....	37
4.2. Αρχή λειτουργίας .....	38

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 <sup>ο</sup> .....	42
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	42
5.1. Αντιδραστήρια .....	42
5.2. Λήψη υπέρυθρων FT-IR φασμάτων ομογενοποιημένων δειγμάτων .....	42
5.3. SEM μικροσκόπιο .....	42
5.4. Λήψη δειγμάτων ανθρώπινου οστού .....	44
5.5. Κατεργασία των οστικών δειγμάτων .....	45
α. Προετοιμασία δειγμάτων και συλλογή δεδομένων .....	45
β. Κατεργασία δειγμάτων οστού με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) και ακετόνη .....	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 <sup>ο</sup> .....	47
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	47
6.1. Υπέρυθρα φάσματα υγιών οστών .....	47
6.2. FT-IR φάσματα καρκινικού οστού από πρωτοπαθή εστία μαστού .....	54
6.3. Σύγκριση FT-IR φασμάτων καρκινικών ιστών μαστού και οστών με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία μαστού.....	66
6.4. FT-IR φάσμα καρκινικού οστού με πρωτοπαθή εστία το αυτί.....	69
6.5. FT-IR φάσματα καρκινικών οστών από πρωτοπαθή εστία του ουρηθρηλίου.....	78
6.6. Μεταστατικός καρκίνος οστού από πρωτοπαθή εστία ήπατος.....	80
6.7. Μεταστατικός καρκίνος οστού από πρωτοπαθή εστία νεφρό .....	86
6.8. Μεταστατικός καρκίνος οστού από πρωτοπαθή εστία πνεύμονα.....	89
6.9. FT-IR φάσματα καρκινικών οστών ασθενών οι οποίοι δέχθηκαν ακτινοθεραπεία..	91
6.10 . Επίδραση του μεταστατικού καρκίνου στον υδροξυαπατίτη.....	101
Συμπεράσματα .....	105
Βιβλιογραφία .....	107
ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ .....	116



## Εικόνες

### Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup>

- Εικόνα 5. 1:** Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Fei Co, The Netherlands.)..... 43
- Εικόνα 5. 2:** Τμήμα κεφαλής μηριαίου οστού. Α: Χόνδρος, Β: Συμπαγές, Γ: Σπογγώδες. Μεγέθυνση μικροσκοπίου x150. Κλίμακα 500 μm. .... 43

### Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup>

- Εικόνα 6. 1:** Σχηματική παράσταση της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών. Παρατηρούνται η α-έλικα, η β-αναδίπλωση (β-turn), β-επίπεδο (β-sheet) και η τυχαία περιέλιξη ..... 58
- Εικόνα 6. 2:** SEM απεικόνιση οστού ασθενούς με μετάταση από πρωτοπαθή εστία μαστού. Τα βέλη δείχνουν τα συσσωματώματα των αμυλοειδούς τύπου πρωτεϊνών ..... 65
- Εικόνα 6. 3:** Σχηματική παράσταση της αλλαγής της στερεοδομής του κολλαγόνου που προκαλείται με την ακτινοβολήση, από α-έλικα (Α) σε β-έλικα (Β) και τυχαίος σχηματισμός με αλυσίδες μικρότερου μήκους (C)..... 71
- Εικόνα 6. 4:** SEM εικόνηση της επιφάνειας καρκινικού οστού από ασθενή ηλικίας 82 ετών με παθολογικό κάταγμα άνω άκρου κερκίδας. Α μεγέθυνση 200x, κλίμακα 300 μm και Β μεγέθυνση 400x, κλίμακα 100 μm ..... 72
- Εικόνα 6. 5:** SEM απεικόνιση της επιφάνειας καρκινικού οστού από ασθενή ηλικίας 82 ετών με παθολογικό κάταγμα άνω άκρου κερκίδας. Μεγέθυνση 500 μm. Α και Β είναι η ηλεκτρονική πυκνότητα στις περιγεγραμμένες θέσεις, όπως αναλύθηκαν με ImageJ για την ανάλυση των pixels..... 73
- Εικόνα 6. 6:** ImageJ ανάλυση της πρωτεΐνης (Α) με διαστάσεις 204x41,8 μm. Η κόκκινη περιοχή (Β) δηλώνει την παρουσία αλάτων ασβεστίου, τα οποία προσδίδουν την αγωγιμότητα ..... 74
- Εικόνα 6. 7:** SEM μορφολογική απεικόνιση Α,καρκινικού οστού ασθενούς με πρωτοπαθή εστία ήπατος και Β; μετά από την διάλυσή του σε εξάνιο .. 82
- Εικόνα 6.8:** ImageJ ψηφιακή ανάλυση της πυκνότητας ηλεκτρονίων των περιγεγραμμένων περιοχών Α και Β της Εικόνας 6.7, αντίστοιχα, εκφρασμένης σε pixel. .... 83



## Πίνακες

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>

Πίνακας 3.1: Ενεργειακό φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ..... 29

### Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup>

Πίνακας 5. 1: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών 44

### Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup>

Πίνακας 6. 1: Θέσεις απορρόφησης των χαρακτηριστικών ομάδων υγιών οστών σε κυματαριθμούς (cm-1) και χαρακτηρισμός ..... 48

Πίνακας 6. 2: Σύγκριση χαρακτηριστικών ταινιών ως προς την επεξεργασία με εξάνιο και δευτεριωμένο νερό ..... 62

Πίνακας 6. 3. Σχετικές συγκεντρώσεις των συστατικών καρκινικού οστού ..... 84

Πίνακας 6. 4. Μεταβολή των λόγων [Amide I]:[Amide II] σε συνάρηση με..... 93

Πίνακας 6. 5: Πίνακας FT-IR φάσματα ασθενών οι οποίοι υποβλήθηκαν ή όχι σε ραδιοθεραπεία ..... 103



## Σχήματα

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>

- Σχήμα 3.1:** Περιοχές διαίρεσης του IR φάσματος. Διακρίνονται τα όρια του εγγύς, μέσου και άπω υπερύθρου και οι αντίστοιχες ενέργειές τους..... 30
- Σχήμα 3.2 :** Μεταβολή της διπολικής ροπής ενός διατομικού μορίου λόγω περιστροφής ( $\mu_{rot}$ ) και δόνησης ( $\mu_{vibr}$ )..... 31
- Σχήμα 3.3:** Σχηματική παράσταση συμβολομέτρου Michelson. Π=πηγή, M1= κάτοπτρο μίξης, M1´=είδωλο του M1 όπως φαίνεται από τη θέση A, M2=κινητό κάτοπτρο, B=διαιρέτης δέσμης (chopper) και A=αναλυτής. 34

### Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup>

- Σχήμα 4. 1:** Αρχή λειτουργίας SEM ..... 39
- Σχήμα 4. 2:** Σχηματική παράσταση παραγωγής ακτινών X, χαρακτηριστική του κάθε ατόμου ..... 40

### Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup>

- Σχήμα 6. 1:** FT-IR φάσματα υγιούς οστού προερχόμενο από κεφαλή ισχύου χωρίς οστική και μεταβολική νόσο. .... 47
- Σχήμα 6. 2:** Χημικοί τύποι των αμινοξέων του κολλαγόνου: a:προλίνη, b: υδροξυπρολίνη και c: γλυκίνη..... 49
- Σχήμα 6. 3:** Υπέρυθρο φάσμα του καλσίτη και η κρυσταλλική δομή [55,56]. ..... 51
- Σχήμα 6. 4:** Υπέρυθρο φάσμα του βατερίτη και η κρυσταλλική δομή του. .... 52
- Σχήμα 6. 5:** Σχηματική απεικόνιση των βημάτων δημιουργίας της τριπλής έλικας του κολλαγόνου στα οστά. Παρουσιάζονται οι ελεύθερες ομάδες  $\text{NH}_3^+$  [61], ..... 52
- Σχήμα 6. 6:** A: Τριπλή α-έλικα του κολλαγόνου, B: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των βάσεων που σχηματίζουν την τριπλή έλικα ..... 53
- Σχήμα 6. 7:** FT-IR φάσματα a: οστού βραχίονα ασθενούς με δευτεροπαθή καρκίνο από πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού και b: υγιούς οστού στην περιοχή του φάσματος  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ . ..... 55
- Σχήμα 6. 8:** XRD διαγράμματα 1; σπογγώδους οστού από βραχίονα ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο των οστών από πρωτοπαθή εστία μαστού και 2; Υδροξυαπατίτη ..... 59
- Σχήμα 6. 9:** XRD διαγράμματα 1; φλοιώδους οστού από βραχίονα ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο των οστών από πρωτοπαθή εστία μαστού και 2; Υδροξυαπατίτη ..... 60
- Σχήμα 6. 10:** FT-IR φάσματα οστού ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία μαστού: a; Καρκινικό οστό, b; Μετά από πλήση με εξάνιο και c; Μετά από δευτερίωση. Περιοχή  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  ..... 61

- Σχήμα 6. 11:** FT-IR φάσματα οστού ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία μαστού: a; Καρκινικό οστό, b; Μετά από εξάνιο και c; Μετά από δευτερίωση. Περιοχή  $1700-400\text{ cm}^{-1}$  ..... 63
- Σχήμα 6. 12:** Δευτεροταγής δομή αμυλοειδούς τύπου πρωτεϊνών. Α: αντιπαράλληλη διάταξη, Β: παράλληλη διάταξη σε β-επίπεδα και Γ: Σχηματισμός β-έλικας..... 64
- Σχήμα 6. 13:** FT-IR φάσματα. 1; Καρκινικού οστού βραχίονα με μεταστατικό καρκίνο μαστού grade II, 2 ; Ιστού μαστού με πρωτοπαθή καρκίνο grade II και 3; Από το οστό της ίδιας ασθενούς μετά από πλύση με εξάνιο..... 67
- Σχήμα 6. 14:** Σχηματική παράσταση της μεθύλιωσης της βάσης της γουανίνης ..... 68
- Σχήμα 6. 15:** FT-IR φάσματα 1: φλοιώδους οστού 2: σπογγώδους οστού ασθενούς ηλικίας 82 ετών με παθολογικό κάταγμα άνω άκρου κερκίδας, 3 FT-IR φάσμα υγιούς οστού ..... 69
- Σχήμα 6. 16:** FTIR-φάσμα καρκινικού οστού ασθενούς ηλικίας 82 ετών με παθολογικό κάταγμα άνω άκρου κερκίδας 1: πριν την επεξεργασία με εξάνιο, και 2: μετά την επεξεργασία με οργανικό διαλύτη ..... 75
- Σχήμα 6. 17:** FT-IR φάσματα καρκινικού οστού άνω άκρου κερκίδας ασθενούς ηλικίας 82 ετών με παθολογικό κάταγμα από πρωτοπαθή εστία το αυτί. 1; Πριν από δευτερίο και 2; Μετά την δευτερίωση..... 77
- Σχήμα 6. 18:** FT-IR φάσματα ασθενούς 1: με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία εκ του ουρηθηλίου με αδενικού τύπου διαφοροποίηση και 2: υγιούς οστού. .... 79
- Σχήμα 6. 19:** FT-IR φάσματα ασθενούς 1: με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία εκ του ουρηθηλίου με αδενικού τύπου διαφοροποίηση και 2: υγιούς οστού στην περιοχή  $1800-400\text{ cm}^{-1}$ . Ο κύκλος δείχνει την χαρακτηριστική περιοχή των ταινιωνών των A-,B- και Z-DNA..... 80
- Σχήμα 6. 20:** FT-IR φάσματα. 1; Καρκινικού οστού ισχίου με πρωτογενές ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα 2 μετά την επεξεργασία με οργανικό διαλύτη ..... 81
- Σχήμα 6. 21:** Στοιχειακή EDX ανάλυση καρκινικού οστού ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία το ήπαρ (Α) και (Β) μετά από επεξεργασία με εξάνιο..... 84
- Σχήμα 6. 22:** FT-IR φάσμα καρκινικού οστού ισχίου από πρωτογενές ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα στην περιοχή  $700-600\text{ cm}^{-1}$ . ..... 86
- Σχήμα 6. 23:** FT-IR φάσματα μηριαίου οστού ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία το νεφρό (1) και υγιούς οστού (2) στην περιοχή  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  ..... 87
- Σχήμα 6. 24:** FT-IR φάσματα μηριαίου οστού ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία το νεφρό (1) και υγιούς οστού (2). ..... 88
- Σχήμα 6. 25:** FT-IR φάσματα οστού ασθενούς με πρωτοπαθή εστία νεφρό 1: οστό μηριαίου, 2: δευτεριωμένο οστό μηριαίου. .... 89

- Σχήμα 6. 26:** FT-IR φάσματα μηριαίου οστού ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία πνεύμονα. 1. όπως λήφθηκε από τον ασθενή, 2: μετά από την τοποθέτησή του στο εξάνιο 3: των διαλυμένων συστατικών του οστού στο εξάνιο ..... 90
- Σχήμα 6. 27:** FT-IR φάσματα μηριαίων οστών. 1 Ασθενών με μεταστατικό καρκίνο χωρίς ακτινοθεραπεία, 2,3 Ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε ακτινοθεραπεία, 4 υγιούς οστού και 5 ακτινοβολημένου in situ υγιούς οστού με δόση 1 Gy. Περιοχή 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . ..... 91
- Σχήμα 6. 28:** FT-IR φάσματα μηριαίων οστών. 1 Ασθενών με μεταστατικό καρκίνο χωρίς ακτινοθεραπεία, 2,3 Ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε ακτινοθεραπεία, 4 υγιούς οστού και 5 ακτινοβολημένου in situ υγιούς οστού με δόση 1 Gy. Περιοχή 1800-400  $\text{cm}^{-1}$ . ..... 92
- Σχήμα 6. 29:** FT-IR φάσματα μηριαίων οστών. 1 Ασθενών με μεταστατικό καρκίνο χωρίς ακτινοθεραπεία, 2,3 Ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε ακτινοθεραπεία, 4 υγιούς οστού και 5 ακτινοβολημένου in situ υγιούς οστού με δόση 1 Gy. Περιοχή 1300-400  $\text{cm}^{-1}$ . ..... 93
- Σχήμα 6. 30:** Σχηματική παράσταση της αλλαγής της στερεοδομής του κολλαγόνου που προκαλείται με την ακτινοβολήση, από α-έλικα (A) σε β-έλικα (B) και τυχαίος σχηματισμός με αλυσίδες μικρότερου μήκους (C) ..... 99
- Σχήμα 6. 31:** Δυνατές "βλάβες" του DNA από τις ιοντίζουσες ακτινοβολίες 1: βλάβη βάσης, 2: βλάβη σακχάρου, σχάση της μιας έλικας (ssb, single strand break), 3: βλάβη βάσης ή σακχάρου, 4: σχάση της διπλής ζέλικας (dsb, double strand break), 5: βλάβη βάσης και σχάση της απέναντι έλικας (ssb), 6: βλάβη βάσεων στις δύο έλικες [63]..... 100
- Σχήμα 6. 32:** FT-IR φάσματα ασθενών στην περιοχή 1200-800  $\text{cm}^{-1}$ . 1: Υγιές, 2: πρωτοπαθής μαστός, 3: πρωτοπαθής πολλαπλούν μυέλωμα, 4: αδενοκαρκίνωμα, 5: από νεφρό και 6: από ήπαρ ..... 102





## Πρόλογος

Η διασπορά και μετανάστευση (μετάσταση) των καρκινικών κυττάρων από την πρωτοπαθή εστία σε άλλες θέσεις όπως στα οστά, τον εγκέφαλο, το ήπαρ, τον πνεύμονα κ.ά. είναι πολύ συνηθισμένο φαινόμενο[1] και γνωστό ακόμη από την αρχαιότητα, αφού ο Ιπποκράτης ήταν ο πρώτος που ονόμασε την ασθένεια «καρκίνος» από το σχήμα του κάβουρα, σχήμα το οποίο αποκτούσε συνήθως ο καρκίνος του μαστού. Αν και η θέση μετάστασης δεν είναι πάντα επιλεκτική και από ασθενή σε ασθενή διαφέρει σημαντικά, όμως παρατηρήθηκε ότι οι καρκίνοι του μαστού, του προστάτη και του πνεύμονα πολύ συχνά δίνουν μεταστάσεις στα οστά. Οι μεταστάσεις γενικά και ιδιαίτερα στα οστά μειώνουν τόσο την ποιότητα της ζωής, λόγω των έντονων πόνων, όσο και το προσδόκιμο της επιβίωσης του ασθενούς.

Η απλή ακτινογραφία (α/α), η αξονική τομογραφία (CT), το σπινθηρογράφημα ( $^{99m}\text{Tc}$ ) και τελευταία η PET (Positron Emission Tomography) είναι από τις σημαντικότερες μεθόδους απεικόνισης των οστών, ενώ η ακτινοβολία των όγκων με ιοντίζουσες ακτινοβολίες κατέχει αξιόλογη θέση στην θεραπευτική τους αντιμετώπιση [2-9]. Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι οι όγκοι των οστών είναι συνήθως εντοπισμένοι, οπότε η εφαρμογή των ιοντιζουσών ακτινοβολιών, ως μέσον θεραπείας, είναι εφικτή. Συχνά μάλιστα, είναι η μόνη επιλογή, επειδή λόγω της θέσεως που εμφανίζονται μπορεί να μην επιδέχονται χειρουργική αφαίρεση και η χημειοθεραπεία να μην επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα.

Τόσο η μετάσταση όσο και η θεραπεία προκαλούν θραυστότητα των οστών και οι ασθενείς εμφανίζουν πολλές φορές πολλαπλά κατάγματα. Αν και οι σημερινές μέθοδοι διευκολύνουν την αποκατάσταση των οστών, όμως ελάχιστοι ασθενείς προσφεύγουν σε ένα επόμενο χειρουργείο, επειδή συνήθως είναι σωματικά και ψυχικά κουρασμένοι από την ασθένεια, αλλά και λόγω της αύξησης της θνησιμότητας των ασθενών στο στάδιο αυτό.

Τα τελευταία χρόνια η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared, FT-IR) χρησιμοποιείται συστηματικά στην μελέτη των ανθρωπίνων ιστών, τείνει δε να εφαρμοσθεί στην ανάδειξη και

προδιάγνωση διαφόρων ασθενειών σε μοριακό επίπεδο [10-29]. Στην περίπτωση των οστών πλεονεκτεί έναντι των άλλων μεθόδων επειδή επιτρέπει την ταυτόχρονη μελέτη της οργανικής και ανόργανης φάσης, χωρίς να απαιτείται αφαλάτωση ή αποπρωτεΐνωση των ιστών [10-19], ενώ παράλληλα παρέχει πληροφορίες για την κρυσταλλική και άμορφη κατάσταση του υδροξυαπατίτη των οστών. Η FT-IR φασματοσκοπία καταγράφει τα φάσματα ταλαντώσεως τα οποία παράγονται από την αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με τα μόρια της ύλης, στις συχνότητες  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  [26,27]. Η μέθοδος επιτρέπει την μελέτη βιοπολυμερών και σύνθετων βιολογικών συστημάτων σε πολύ μικρή ποσότητα υλικού και σε σχεδόν φυσιολογικές συνθήκες, ενώ παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τις λειτουργικές ομάδες (π.χ.  $\text{NH}_2$ ,  $\text{C=O}$ ,  $\text{-OH}$ , κλπ), τους χημικούς δεσμούς και τη διαμόρφωση και χαρακτηρισμό των μορίων [10-27].

Για αντιληφθούμε την μετάσταση του καρκίνου στα οστά και τις μεταβολές τις οποίες προκαλεί η ασθένεια στην μοριακή δομή και αρχιτεκτονική της ανόργανης και οργανικής φάσης των οστών χρησιμοποιήθηκε η υπέρυθη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared, FT-IR). Τα δείγματα προήλθαν από ασθενείς οι οποίοι εμφάνισαν μεταστάσεις στα οστά από διαφορετικές όμως πρωτοπαθείς εστίες. Από τις χαρακτηριστικές ταινίες των φασμάτων πιστοποιήθηκαν κατά το δυνατόν τα προϊόντα, τα οποία παράγονται λόγω της ασθένειας, ώστε να προσεγγίσουμε τον μηχανισμό σχηματισμού των.

Παράλληλα, χρησιμοποιείται η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM, Scanning Electron Microscopy) για την μακροσκοπική απεικόνιση και αρχιτεκτονική της επιφάνειας των δειγμάτων και περίθλαση ακτίνων X (XRD, X-ray Diffraction) για την μελέτη της κρυσταλλικότητας του υδροξυαπατίτη του οστού ή των αλάτων ασβεστίου.

## Περίληψη

Η μετάσταση του καρκίνου των οστών είναι ένα από τα βασικά προβλήματα θεραπείας των καρκινοπαθών, δεδομένου ότι μειώνει την ποιότητα ζωής και αυξάνει την θνητότητα. Οι φυσικοχημικές μέθοδοι της υπέρυθρης φασματοσκοπίας με μετασχηματισμό Fourier, FT-IR και ανάλυση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο SEM, εφαρμόστηκαν για την μελέτη των μεταβολών στην μοριακή δομή και την μορφολογία των οστών τις οποίες προκαλεί ο μεταστατικός καρκίνος.

Η μελέτη περιλαμβάνει δείγματα από το μηριαίο οστό ή κερκίδας, ενηλίκων ασθενών ηλικίας 31 έως 82 ετών, οι οποίοι έπασχαν από μεταστατικό καρκίνο των οστών, κατόπιν ιστολογικής εξετάσεως με χρώση κατά GoldamTrichrome. Για την ανάλυση SEM, προκειμένου να μη χαθούν χρήσιμες πληροφορίες τα δείγματα δεν επικαλύφθηκαν με χρυσό ή άνθρακα. Ο αριθμός των δειγμάτων είναι περιορισμένος επειδή τα κατάγματα συμβαίνουν κυρίως στα τελευταία στάδια της ασθένειας και οι περισσότεροι ασθενείς δεν φθάνουν ποτέ στο χειρουργείο για αποκατάσταση.

Από την συγκριτική μελέτη των υπέρυθρων φασμάτων μεταξύ υγιών και καρκινικών οστών διαπιστώθηκαν σημαντικές μεταβολές, οι οποίες αποδόθηκαν στο στάδιο και το είδους του καρκίνου. Γενικά, αποδείχθηκε ότι τα πλέον ευαίσθητα συστατικά των οστών στην επίδραση της ασθένειας είναι οι κολλαγονούχες πρωτεΐνες και τα λιπίδια των μεμβρανών. Από την μεταβολή της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών και την παραγωγή αλδευδών φαίνεται ότι σε κάποιο από τα στάδια της ασθένειας επιδρούν οι ελεύθερες ρίζες, οι οποίες παράγονται κατά τον μεταβολισμό ή το οξειδωτικό στρες με αποτέλεσμα την υπεροξειδωση των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων. Η αύξηση της γλυκοζυλίωσης και οστεοπενίας συνδέθηκαν με βασικά χαρακτηριστικά της ασθένειας και το στάδιο εξέλιξης.

Από την μείωση της ταινίας περίπου στα  $3500\text{ cm}^{-1}$  στο υπέρυθρο φάσμα του δείγματος η οποία αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης των ομάδων υδροξυλίου ( $\nu\text{OH}$ ) του υδροξυαπατίτη, επιβεβαιώνεται η καταστροφή του βιολογικού υδροξυαπατίτη. Η αύξηση των εντάσεων των ταινιών στην περιοχή μεταξύ  $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ , η οφειλόμενη στις αντισυμμετρικές και συμμετρικές δονήσεις τάσης των μεθυλ ( $\nu\text{CH}_3$ )

και μεθυλεν ( $\nu\text{CH}_2$ ) ομάδων αποδίδεται στην καταστροφή των μεμβρανών των καρκινικών κυττάρων. Η ταινία στα  $1742\text{ cm}^{-1}$ , η οποία αποδίδεται στην δόνηση τάσης του καρβονυλίου ( $\nu\text{CO}$ ) εστερικού χαρακτήρα, συνδέεται με την παραγωγή αλδευδών κατά την ανάπτυξη της ασθένειας και μπορεί να αποτελέσει δείκτη της πορείας της ασθένειας. Η ταινία αυτή συνδέεται με την υπεροξείδωση των βιολογικών μακρομορίων της μεμβράνης και δείχνει ότι οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν σε κάποιο στάδιο της ασθένειας. Επιβεβαίωση του φαινομένου αποτελεί το γεγονός ότι η ένταση της ταινίας είναι αυξημένη στους ασθενείς που δέχθηκαν ραδιοθεραπεία.

Η μεταβολή των ταινιών των δονήσεων κάμψης των ομάδων Amide I και Amide II των πρωτεϊνών στην περιοχή  $1650\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ , αναδεικνύει ότι η ασθένεια επιδρά στην δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών μεταβάλλοντας την δομή από  $\alpha$ -έλικα σε αναδίπλωση  $\beta$ -έλικας και σε προχωρημένο στάδιο σε τυχαία περιέλιξη καταλήγοντας σε σχηματισμό ινιδίων και αμυλοειδών πρωτεϊνών. Ο λόγος των εντάσεων των ταινιών  $[\text{Amide I}_{1650}]:[\text{Amide II}_{1550}]$  αυξάνει σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο, η δε αύξηση είναι μεγαλύτερη σε όσους έχουν υποβληθεί σε ακτινοθεραπεία.

Από τις μεταβολές του φάσματος στην περιοχή  $1250\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ , διαπιστώνεται αφενός μεν η αυξημένη παραγωγή πολυγλυκανών (πολυσακχαρίτες) των καρκινικών οστών, αφετέρου η μείωση της ανόργανης φάσης του υδροξυαπατίτη. Τα υπέρυθρα φάσματα έδειξαν ότι η ανόργανη φάση των καρκινικών οστών δεν περιέχει βιολογικό υδροξυαπατίτη, αλλά αποτελείται από άλατα φωσφορικού ασβεστίου  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2, \text{CaHPO}_4]$ , τα οποία μειώνουν την μηχανική αντοχή των οστών. Η αντικατάσταση των φωσφορικών ομάδων του υδροξυαπατίτη με ανθρακικά ιόντα ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) δείχνει την επιταχυνόμενη γήρανση των οστών.

Οι μεταβολές στο DNA φαίνονται από την εμφάνιση των ταινιών στα  $830, 820$  και  $805\text{ cm}^{-1}$  που δείχνει ότι στα καρκινικά οστά επικρατεί το Z-DNA με την παρουσία της ταινίας,  $820\text{ cm}^{-1}$ . Το B-DNA ( $830\text{ cm}^{-1}$ ) είναι το φυσιολογικό, το A-DNA ( $805\text{ cm}^{-1}$ ) αντιστοιχεί στο μη φυσιολογικό και το Z-DNA ( $820\text{ cm}^{-1}$ ) καρκινικό.

## Abstract

Bone cancer metastasis is one of the major problems during cancer treatment because it decreases quality of life and increases mortality. Our experiments have shown that infrared spectroscopy is a very sensitive technique for the characterization of the products resulting from cancer of bones and the surrounding tissues. The powerful technique of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and the SEM (Scanning Electron microscopy) analysis were used to investigate cancer related changes to the molecular structure and the morphology of the bones.

This study includes samples from femoral and radius bones from adult patients of ages from 31 to 82 who were suffering from bone cancer metastasis, following the histological examination with stained Goldam Trichrome. The samples were not coated with carbon or gold in order to avoid losing useful information and ensure better SEM analysis. The number of samples is restricted because fractures usually mainly occur in the latter stages of the disease and the majority of the patients do not have restorative surgery. Comparison between FT-IR spectra of healthy and cancerous bones shows considerable changes, which were attributed to the advanced stage and type of cancer. Generally, it was demonstrated that the most sensitive components of the bones that are affected from the cancer are collagenous and non collagenous proteins and the lipids of cell membranes. The change of the secondary structure of the proteins and the formation of aldehydes shows that free radicals are involved in a pathway of the disease. The free radicals which are produced during metabolism or oxidative stress results to the peroxidation of lipids and phospholipids. The finding of the increase of glycosylation and osteopenia were connected with basic features of the disease and its developmental stage.

The decrease of the absorption band at about  $3500\text{ cm}^{-1}$ , due to the stretching vibration of the hydroxyl group (OH) of hydroxyapatite, confirms the destruction of biological hydroxyapatite. The increase of the intensities of the absorption bands in the region between  $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$  that are linked to antisymmetric and symmetric stretching vibrations of methyl and methylen groups are caused by the destruction of cell membranes of cancerous cells. The characteristic band in the spectra at  $1742\text{ cm}^{-1}$ , due to  $\nu\text{CO}$ , which is assigned to stretching vibration of carbonyl-ester or aldehydes, is a "marker band" of the presence and progression of the disease. This band is connected with peroxidation of the biological macromolecules of membrane and shows that free radicals are involved in the pathway of the disease. This is confirmed with the observation that the intensity of this band increases in the patients who received radiotherapy.

This band changes and shifts assigned to bending vibrations of Amide I and Amide II groups of proteins in the region  $1650\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$  reveal that the disease influences the secondary structure of proteins by altering them from  $\alpha$ -helical to cross  $\beta$ -sheet and in advanced stages converting them to random coil with the formation of

fibrils and amyloid type proteins. The ratio of the band [Amide I<sub>1650</sub>]:[Amide II<sub>1550</sub>] increases in patients with metastasis, and it is higher in the patients that underwent radiotherapy.

The observed changes of the spectra in the region 1200-900 cm<sup>-1</sup> conclude the increase in the formation of polyglycans (polysaccharides) in the cancerous bones, where the inorganic mass of hydroxyapatite is reduced. The infrared spectra showed that the inorganic mass of cancerous bones do not contain biological hydroxyapatite and is consistent with calcium phosphate salts [Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, CaHPO<sub>4</sub>], which decrease the bones' mechanical properties. The substitution of phosphate groups of hydroxyapatite with carbonate (CO<sub>3</sub>) shows that cancerous bones undergo an accelerated aging.

The appearance of the bands at 830, 805 and 820 cm<sup>-1</sup> suggests that all three types of DNA, are present, corresponding to B-, A-, and Z-DNA, respectively. B-DNA is the native state, A-DNA the denatured and Z-DNA (820 cm<sup>-1</sup>) the cancerous state that predominates in the spectra of samples of patients with cancer.

## **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**





# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

## ΚΑΡΚΙΝΟΣ

### 1.1. Εισαγωγή

Η καρκινογένεση θεωρείται το αποτέλεσμα γονιδιακών μεταλλάξεων, οι οποίες προκαλούνται είτε άμεσα από λάθη κατά την αντιγραφή του DNA είτε από εξωγενείς παράγοντες, όπως οι χημικοί ρύποι και οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες [30]. Πέραν του γεγονότος προέλευσής τους επηρεάζουν τις δύο τάξεις των γονιδίων ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια. Οι παράγοντες αυτοί επιδρούν άμεσα στο γονιδίωμα είτε έμμεσα, αφού μετατραπούν σε ενεργά παράγωγα από τη δράση των κυτταρικών ενζύμων.

Οι ενδογενείς μεταλλάξεις είναι μεταβολές, οι οποίες λαμβάνουν χώρα στην αλληλουχία των βάσεων του DNA. Οι μεταλλάξεις αυτές προκαλούνται συνήθως από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βάσεων του DNA και των μορίων του νερού ενυδάτωσης [31,32]. Η υδρόλυση του DNA οδηγεί σε αποπουρίνωση του DNA, δηλαδή απώλεια μιας βάσης συνήθως αδενίνη ή γουανίνη. Παρόμοιες μεταβολές παρατηρούνται από τις ακτινοβολίες υψηλής ενέργειας [33]. Στην δεύτερη περίπτωση οι σχάσεις των δεσμών υδρογόνου οι οποίοι συγκρατούν τις έλικες του DNA, αλλά και τις βάσεις μεταξύ των είτε μειώνουν το μήκος της έλικας είτε σχηματίζουν διμερή, τροποποιώντας τη διαμόρφωση της δομής του DNA με τελικό αποτέλεσμα την λανθασμένη εισαγωγή νουκλεοτιδίων κατά την αντιγραφή.

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ιδιότητα να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και να διαχέονται στο σώμα, χωρίς να μπορούν τα φυσιολογικά σήματα ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου να ασκούν οποιαδήποτε επίδραση. Αν και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων θεωρείται χαρακτηριστικό της ασθένειας δεν σημαίνει όμως ότι κάθε ανάπτυξη ενός ιστού θεωρείται καρκίνος. Τα καρκινικά κύτταρα διαιρούνται πιο γρήγορα από τα υγιή, και η αναλογία του ποσοστού των κυττάρων που διαιρούνται και των κυττάρων που διαφοροποιούνται διαφέρει σημαντικά. Στα μεν υγιή κύτταρα,

η αναλογία των κυττάρων που διαιρούνται και εκείνων που διαφοροποιούνται βρίσκονται σε ισορροπία, ενώ αντίθετα στον καρκίνο τα κύτταρα όταν διαφοροποιούνται δεν αποκτούν τις ιδιότητες των ιστών όπου αναπτύσσονται.

Οι καρκίνοι διαχωρίζονται σε *καλοήθεις*, οι οποίοι αναπτύσσονται σε συγκεκριμένη περιοχή με ευδιάκριτα όρια και *κακοήθεις*, οι οποίοι εισχωρούν στους περιβάλλοντες ιστούς. Τα κύτταρα ενός κακοήθους όγκου λόγω των αλλοιώσεων που εμφανίζουν στην κυτταρική τους επιφάνεια χάνουν την ικανότητα προσκόλλησης στα γειτονικά κύτταρα ή στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία με αποτέλεσμα να διεισδύουν στους γειτονικούς ιστούς. Διαμέσου των αιμοφόρων και λεμφοφόρων αγγείων μεταφέρονται σε άλλα σημεία του σώματος, δημιουργώντας δευτερογενείς εστίες καρκίνου, τις μεταστάσεις, παρεμποδίζοντας την λειτουργία ενός ή περισσότερων οργάνων [34].

Η μετάσταση στα οστά είναι η πλέον συχνή επιπλοκή του καρκίνου η οποία παρατηρείται στο 70% των ασθενών με πρωτοπαθή καρκίνο μαστού ή προστάτη και σε περίπου 15%-30% σε ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα, εντέρου, στομάχου, μήτρας, κύστης, πρωκτού, ήπατος ή νεφρού. Οι συνήθεις επιπλοκές περιλαμβάνουν σοβαρά παθολογικά κατάγματα, υψηλή υπερασβεσταιμία και συμπίεση του νωτιαίου μυελού.

## **1.2. Νεοπλασματικές παθήσεις των οστών**

Τα νεοπλάσματα των οστών διακρίνονται σε δύο κύριες ομάδες, ήτοι στα πρωτοπαθή και δευτεροπαθή ή μεταστατικά. Τα πρωτοπαθή νεοπλάσματα, υποδιαιρούνται περαιτέρω στα καλοήθη και στα κακοήθη. Στα οστά τα συχνότερα απαντώμενα νεοπλάσματα είναι τα δευτεροπαθή ή μεταστατικά, ενώ τα πρωτοπαθή σπανίζουν και η ταξινόμηση των πρωτοπαθών όγκων είναι δύσκολη, και οφείλεται στις πολλές οι παραμέτρους προσδιορισμού των [34].

### **1.2.1. Χονδροσάρκωμα**

Τα χονδροσάρκωμα προέρχονται από τα χόνδρινα στοιχεία του οστού, διακρίνονται στα πρωτοπαθή και στα δευτεροπαθή. Τα δευτεροπαθή

χονδροσαρκώματα προέρχονται από προϋπάρχουσες βλάβες των οστών, οι συχνότερες εκ των οποίων είναι τα εγχοχondρώματα και τα οστεοχondρώματα, κυρίως δε όταν είναι οικογενή και πολλαπλά. Το μεγαλύτερο ποσοστό των χονδροσαρκωμάτων εντοπίζονται στα οστά της λεκάνης και το άνω τμήμα του μηριαίου και του βραχιονίου οστού [34-36]. Η θεραπεία επιλογής είναι η πλήρης χειρουργική αφαίρεση με διατήρηση του μέλους όποτε αυτό είναι εφικτό. Οι όγκοι αυτοί είναι αρκετά ακτινοανθεκτικοί σε ορισμένες περιπτώσεις με πολύ κακό ιστολογικό τύπο (π.χ. μεσεγχυματικός τύπος) ή με εντοπίσεις στον κεντρικό σκελετό. Η μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία (ΑΚΘ) έδωσε καλά αποτελέσματα, ακόμη και σε περιπτώσεις ανεγχείρητων όγκων [34-36].

### **1.2.2. Ινοσάρκωμα**

Πρόκειται για τον σπανιότερο κακοήγη όγκο των πρωτοπαθών σαρκωμάτων του συνδετικού ιστού. Το ινοσάρκωμα των οστών θεωρείται ότι είναι σπάνια νεοπλασία. Κυρίως εντοπίζεται στα μακρά οστά, ειδικά στις μεταφύσεις του μηριαίου και της κνήμης [35-37]. Θεραπευτικά αντιμετωπίζεται με ριζική χειρουργική αφαίρεση. Η ακτινοθεραπεία έχει θέση, επί ανεγχείρητων όγκων, επί υπολειμματικής νόσου για μετεγχειρητικούς και για ανακουφιστικούς λόγους. [34].

### **1.2.3. Γιγαντοκυτταρικός όγκος**

Ο γιγαντοκυτταρικός όγκος προέρχεται από τους οστεοκλάστες, είναι ο πέμπτος ή ο έκτος συχνότερος πρωτοπαθής όγκος των οστών. Πρόκειται για ένα καλοήγη όγκο, ο οποίος σε ένα μικρό ποσοστό είναι κακοήθης και μεταστατικός. Κυρίως εντοπίζεται στις επιφύσεις των μακρών οστών ιδιαίτερα πέριξ της κατά γόνυ αρθρώσεως [34]. Σ' αυτές τις περιπτώσεις με τη χειρουργική αφαίρεση μπορεί να θεραπευτεί το 90% των καλοηθών όγκων. Εκτεταμένες αλλοιώσεις ή μαζικές υποτροπές ενδέχεται να απαιτήσουν ακόμα και τον ακρωτηριασμό του μέλους. Η ακτινοθεραπεία μπορεί να εφαρμοστεί είτε μετεγχειρητικά επί υπολειμματικής νόσου, είτε ως ριζική αγωγή σε ανεγχείρητους όγκους. Η εφαρμογή της ΑΚΘ στους καλοήθεις όγκους θεωρείται πιθανόν, ότι μπορεί να

προκαλέσει κακοήθη εξαλλαγή, αν και το θέμα παραμένει ακόμη αμφιλεγόμενο [34,35].

#### **1.2.4. Ανευρυσματικές κύστεις**

Στην περίπτωση αυτή δεν πρόκειται για πραγματικό νεόπλασμα, αλλά πιθανόν να είναι καλοήθης αντιδραστική αγγειακή βλάβη. Ένα ποσοστό απαντάται σε συνδυασμό με άλλους καλοήθεις ή κακοήθεις όγκους. Συνήθως εντοπίζονται στους σπονδύλους και στα μακρά οστά [38]. Η χειρουργική αφαίρεση είναι η θεραπεία επιλογής. Οι τοπικές υποτροπές φαίνεται ότι μπορούν να ελαττωθούν με μετεγχειρητικές δόσεις ακτινοβολίας.

#### **1.2.5. Χόρδωμα**

Πρόκειται για ένα βραδέως εξελισσόμενο όγκο, ο οποίος πολλές φορές γίνεται συμπτωματικός επειδή διηθεί τους πέριξ ιστούς. Περίπου το 50% των χορδωμάτων εντοπίζονται στην ιεροκοκκυγική περιοχή και το 40% στο κρανίο και ειδικότερα στην περιοχή του αποκλίματος [37]. Η χειρουργική αφαίρεση, ακολουθούμενη από μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία, αποτελεί την θεραπεία επιλογής για τα χειρουργήσιμα χορδώματα.

#### **1.2.6. Σάρκωμα Ewing**

Είναι ένα σπάνιο κακόηθες πρωτοπαθές νεόπλασμα των οστών, το οποίο προέρχεται από τον ερυθρό μυελό. Εμφανίζεται κυρίως σε άτομα κάτω των 30 ετών και ιδίως σε παιδιά μεταξύ 5-15 ετών. Εντοπίζεται συνήθως σε οστά πλούσια σε μυελό, όπως στο μηριαίο, στην κνήμη, στο βραχιόνιο, στα οστά της λεκάνης και στις πλευρές [34,37].

### 1.2.7. Πολλαπλούν μυέλωμα

Πρόκειται για το συχνότερο πρωτοπαθές νεόπλασμα των οστών, προέρχεται από τον μυελό και ειδικότερα από τα πλασμοκύτταρα, όταν κυριαρχούν τα δυσκρασικά. Κυρίως εντοπίζονται στον κεντρικό σκελετό και στο εγγύς τμήμα των άκρων. Η πρόγνωση ποικίλει, με επιβίωση περισσότερο των 5 έτων στο 20% των περιπτώσεων [34,37].

### 1.3. Οστικές μεταστάσεις

Τα δευτεροπαθή νεοπλάσματα είναι οι συχνότεροι κακοήθεις όγκοι των οστών. Οι πλέον συχνοί όγκοι στους ενήλικες, οι οποίοι μεθίστανται στα οστά είναι ο καρκίνος του προστάτη, των βρόγχων, του μαστού, των νεφρών και του θυρεοειδούς αδένος. Κυρίως εντοπίζονται εκεί όπου υπάρχει άφθονος ερυθρός μυελός. Ειδικότερα στον κεντρικό σκελετό, όπως στους σπονδύλους και στα οστά της πύελου, στο εγγύς τμήμα των μηριαίων, στα οστά του κρανίου, στις πλευρές και στο εγγύς τμήμα των βραχιονίων [34,37]. Η μετάσταση στα οστά χαρακτηρίζεται ως οστεολυτική και οστεοβλαστική ανάλογα με την δραστηριότητα την οποία διεγείρει ο κάθε καρκίνος στο οστό [39].

**Οστεοβλαστική** είναι η διαδικασία κατά την οποία η απορρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας των οστεοβλαστών οδηγεί στην παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας οστίτη ιστού. Οι οστεοβλαστικές μεταστάσεις είναι ο κυρίαρχος τύπος οστικής μετάστασης στον καρκίνο του προστάτη, ενώ απαντώνται σε μικρότερη συχνότητα σε καρκίνο του μαστού (15-20%), του παχέος εντέρου, του παγκρέατος και του τραχήλου της μήτρας. Χαρακτηρίζονται από διαταραχή της φυσιολογικής ισορροπίας του οστίτη ιστού, με επικράτηση της οστεοβλαστικής διαδικασίας. Ωστόσο το οστό που συντίθεται δεν έχει φυσιολογική αρχιτεκτονική με αποτέλεσμα την αυξημένη θραυστότητα σε συνδυασμό με έντονο πόνο.

Οι **οστεολυτικές** μεταστάσεις προκαλούν υπερλειτουργία των οστεοκλαστών και επικρατούν στο σύνολο σχεδόν των νεοπλασιών. Εμφανίζονται σε συμπαγείς καρκίνους (μαστού, προστάτη, θυρεοειδή, πνεύμονα, νεφρού) και σε αιματολογικούς (πολλαπλούν μυέλωμα). Αν και υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για την διέγερση των οστεοκλαστών, όμως ο μηχανισμός της ενεργοποίησής των δεν

είναι γνωστός και ποικίλει με τον τύπο του καρκίνου. Στο πολλαπλούν μυελώμα για παράδειγμα οι οστεοκλάστες συσσωρεύονται μόνο σε επιφάνειες δίπλα στα κύτταρα του μυελώματος, ενώ τα επίπεδα τους δεν είναι αυξημένα σε περιοχές απομακρυσμένες από τον όγκο. Τα καρκινικά κύτταρα στο καρκίνο του μαστού προκαλούν την διέγερση των βιολογικών μορίων τα οποία εμμέσα ή άμεσα επάγουν τον σχηματισμό των οστεοκλάστων. Αυτές οι αμοιβαίες αλληλεπιδράσεις, μεταξύ καρκινικών κυττάρων του μαστού και το μικροπεριβάλλον του οστού προκαλεί ένα φαύλο κύκλο ο οποίος οδηγεί στην τελική καταστροφή του οστού και την ανάπτυξη του όγκου.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

### ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΕΣ

#### 2.1. Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, X και γ

Οι ακτίνες X παράγονται όταν ταχεία ηλεκτρόνια επιβραδύνονται ταχύτατα καθώς διέρχονται μέσα από το ηλεκτρικό πεδίο ενός ατομικού πυρήνα. Η ενέργεια των ακτίνων X κυμαίνεται από μηδέν έως μια μέγιστη τιμή, χαρακτηριστική του τρόπου επιβράδυνσης των ηλεκτρονίων από τα οποία προέρχεται. Οι ακτίνες γ εκπέμπονται από ραδιενεργά ισότοπα, κυρίως από την πηγή Co(60). Τόσο οι ακτίνες X όσο και οι γ είναι ηλεκτρομαγνητικής φύσεως.

#### 2.2. Ακτινοθεραπεία

Ακτινοθεραπεία (ακτινοβόληση) είναι η μέθοδος με την οποία επιδιώκεται η αντιμετώπιση καλοηθών ή κακοηθών όγκων με χρήση ιοντιζουσών ακτινοβολιών [37]. Η ακτινοβόληση εφαρμόζεται στην περιοχή του όγκου του ασθενούς, ωστόσο πολλές φορές η ακτινοβολία καταστρέφει και τους υγιείς γειτονικούς ιστούς [38-41]. Σκοπός αυτής της μεθόδου είναι η ίαση του ασθενούς ή η ανακούφισή του από τα συμπτώματα της νόσου. Η χορηγούμενη δόση ακτινοβολίας είναι τόση ώστε να προκληθεί η ελάχιστη δυνατή βλάβη στους γειτονικούς υγιείς ιστούς.

Ο σχεδιασμός της ακτινοθεραπείας για την αντιμετώπιση των όγκων των οστών γίνεται με βάση το είδος και το ποσό της ακτινοβολίας, το οποίο απαιτείται για τις πρωτοπαθείς βλάβες οι οποίες εξορμούνται από τα μακρά οστά.

- **Ριζική:** Εφαρμόζεται ως μοναδική θεραπευτική μέθοδος με στόχο την ίαση του ασθενούς.

- **Προεγχειρητική:** Προηγείται της χειρουργικής εκτομής του όγκου, ώστε να μειωθούν οι διαστάσεις του και να μετατραπεί από μη εξαιρεσίμο σε εξαιρεσίμο όγκο.
- **Μεταγχειρητική:** Ακολουθεί την χειρουργική επέμβαση προς αποφυγή της τοπικής υποτροπής της νόσου.
- **Παρηγορητική:** Η ακτινοθεραπεία κατέχει πολύ σημαντική θέση όσον αφορά την αντιμετώπιση των ανεγχείρητων όγκων και την ανακούφιση του ασθενούς στο τελικό στάδιο της νόσου.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

### ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ

#### 3.1. Ιστορική Αναδρομή

Ο Sir William Herschel ανακάλυψε την υπέρυθρη (Infrared–IR) ακτινοβολία στα 1800, όταν ερευνούσε τις θερμικές ιδιότητες του φωτός και διαπίστωσε ότι η περιοχή του φάσματος μετά το ερυθρό του ορατού εμφάνιζε υψηλότερη θερμοκρασία από τα χρώματα της ίριδος ενώ στην αμέσως επόμενη μη ορατή περιοχή η θερμοκρασία ήταν υψηλότερη απ’ όλες τις προηγούμενες. Ο Herschel ονόμασε τις αόρατες ακτίνες αυτές “θερμικές” (calorific rays) και κατά τα άλλα είχαν τις ίδιες ιδιότητες με τις ορατές [25,26,42].

Αργότερα, εξελίχθηκε η υπέρυθρη φασματοσκοπία και διαδόθηκε ταχύτατα, χάρη στη συμβολή διάσημων φασματοσκόπων όπως οι Fraunhofer και Angstrom, οι οποίοι με τις πρωτοποριακές εργασίες τους κατά τις δεκαετίες μεταξύ 1850 και 1900 καθιέρωσαν την υπέρυθρη φασματοσκοπία ως σημαντικό εργαλείο για τον χαρακτηρισμό χημικών ενώσεων και διαφόρων ουσιών ακόμα και στην αστρονομία και αστροφυσική.

Η εφαρμογή της υπέρυθρης φασματοσκοπίας στην βιολογία σε μακρινόρια αρχίζει με τις μελέτες της δομής των πρωτεϊνών από τους Elliot και Ambrose, το 1950, οι οποίοι απέδειξαν ότι η υπέρυθρη φασματοσκοπία μπορούσε να εφαρμοσθεί και για την μελέτη της δευτεροταγούς και τριτοταγούς διαμόρφωσης ενός πολυπεπτιδίου ή πρωτεΐνης. Περίπου την ίδια εποχή οι Blout, Mellors και Woernley προσπαθούσαν να μελετήσουν ανθρώπινους και ζωϊκούς ιστούς για να διακρίνουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, τα οποία να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως «δακτυλικά αποτυπώματα» για κάθε είδος ιστού. Οι προσπάθειες αυτές απέτυχαν αφενός μεν λόγω της τεχνολογίας των τότε φασματοφωτομέτρων, αλλά και επειδή τα προς

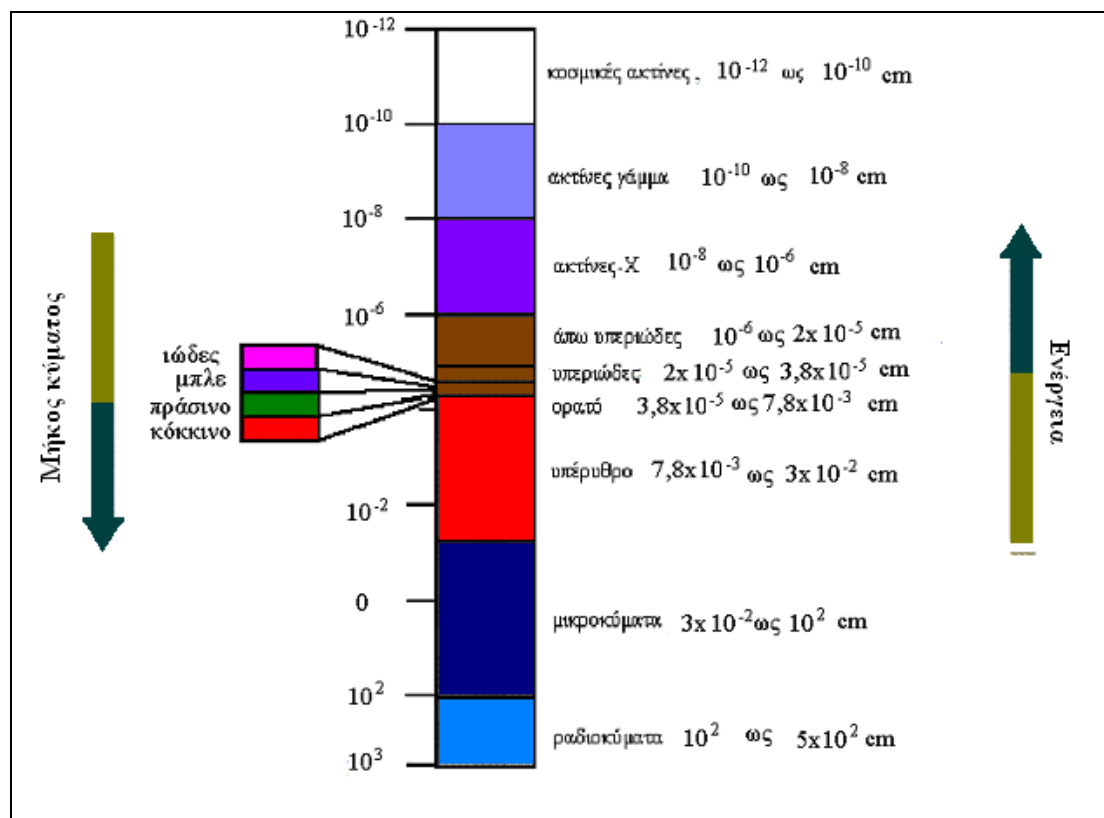
ανάλυση δείγματα είχαν υποστεί κατεργασία με σταθεροποιητικές ουσίες (fixatives) και είχαν ομογενοποιηθεί.

Παρόλα αυτά η εφαρμογή της υπέρυθρης φασματοσκοπίας στην μελέτη βιολογικών δειγμάτων καθυστέρησε λόγω τεχνικών δυσκολιών για τις επόμενες τρεις δεκαετίες. Η κατασκευή των φασματοφωτομέτρων υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared, FT-IR) έδωσε τη δυνατότητα να μελετηθούν και βιολογικά μόρια [25,26,42,43].

### 3.2. Γενικές αρχές FT-IR Φασματοσκοπίας

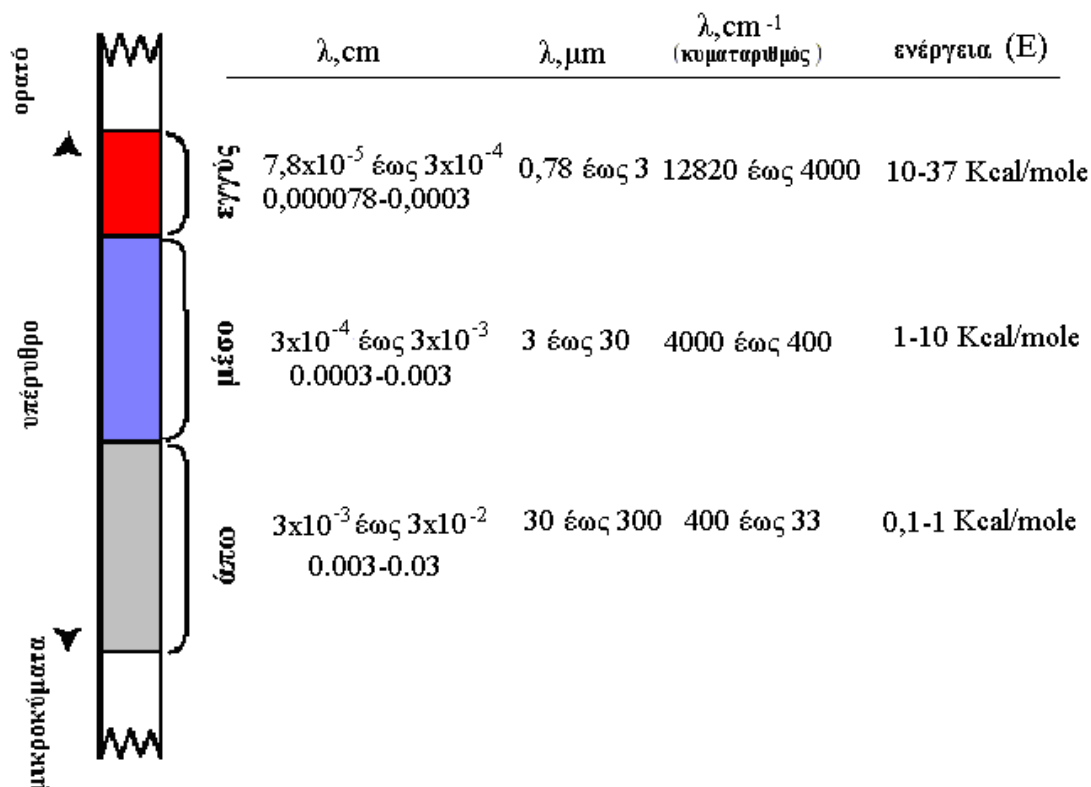
*Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα:* Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα προέρχονται από την κοσμική ακτινοβολία ή από διάφορες πηγές. Οι μεταξύ τους διαφορές συνίστανται στα μήκη κύματος ή στην ενέργεια των παραγομένων ακτινοβολιών και στα χημικά αποτελέσματα που προκαλούν στην ύλη, στην οποία προσπίπτουν.

**Πίνακας 3.1:** Ενεργειακό φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας



Στον Πίνακα 3.1 δίδονται τα όρια συχνοτήτων της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Στην περιοχή των ραδιοκυμάτων επηρεάζονται οι περιστροφικές κινήσεις των μορίων, το πυρηνικό spin (NMR) και το spin του ηλεκτρονίου (ESR). Στην υπέρυθρη περιοχή του φάσματος διεγείρονται οι ταλαντώσεις των ατόμων εντός των δεσμών των μορίων, ενώ στην ορατή και υπεριώδη περιοχή λαμβάνουμε τις ηλεκτρονικές μεταπτώσεις. Τέλος στην περιοχή των ακτίνων X και γ προκαλούνται σχάσεις των δεσμών των μορίων.

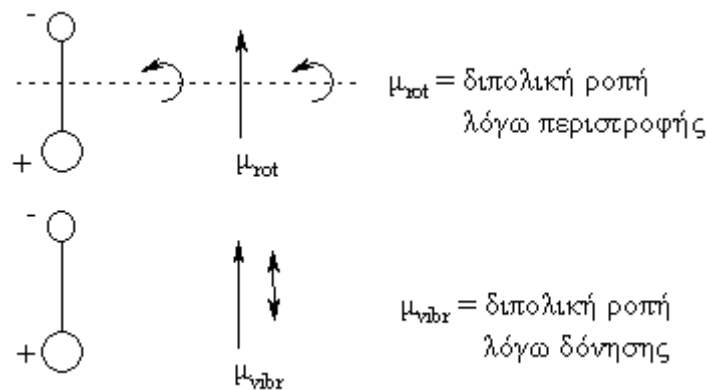
Η υπέρυθρη περιοχή του φάσματος, η οποία εκτείνεται μεταξύ 0,8-300  $\mu\text{m}$ , υποδιαιρείται σε τρεις περιοχές: 1) το εγγύς IR (800 nm έως 2,5  $\mu\text{m}$ ), 2) το μέσο IR (2,5  $\mu\text{m}$  έως 50  $\mu\text{m}$ ) και 3) το άπω IR (50  $\mu\text{m}$  έως 300  $\mu\text{m}$ ), όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.1. Η υπέρυθρη περιοχή του φάσματος, η οποία εκτείνεται μεταξύ 0,8-300  $\mu\text{m}$ , υποδιαιρείται σε τρεις περιοχές: 1) το εγγύς IR (800 nm έως 2,5  $\mu\text{m}$ ), 2) το μέσο IR (2,5  $\mu\text{m}$  έως 50  $\mu\text{m}$ ) και 3) το άπω IR (50  $\mu\text{m}$  έως 300  $\mu\text{m}$ ).



**Σχήμα 3.1:** Περιοχές διαίρεσης του IR φάσματος. Διακρίνονται τα όρια του εγγύς, μέσου και άπω υπέρυθρου και οι αντίστοιχες ενέργειές τους.

Για τα φασματοφωτόμετρα υπέρυθρου χρησιμοποιείται συνήθως η περιοχή του φάσματος με μήκος κύματος από 2  $\mu\text{m}$  έως 50  $\mu\text{m}$ , δηλαδή εκείνη η περιοχή που αντιστοιχεί στους 4000-200 (κυματαριθμούς)  $\text{cm}^{-1}$  και επομένως ανήκουν στο μέσο IR. Στην περιοχή αυτή παρατηρούνται οι βασικές μεταβολές στην δόνηση των μορίων λόγω απορρόφησης ακτινοβολίας, ενώ στο άπω IR παρατηρούνται μεταβολές στην περιστροφή τους. Η φασματοσκοπία υπέρυθρου βασίζεται στην διέγερση των μορίων μιας ένωσης σε υψηλότερες στάθμες δόνησης όταν απορροφήσουν υπέρυθρη ακτινοβολία. Ενεργά υπέρυθρες ενώσεις (IR-active) είναι μόνο αυτές στις οποίες η απορρόφηση της ενέργειας προκαλεί διαρκή μεταβολή της διπολικής ροπής. Στην

κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται τα μόρια που αποτελούνται από δύο ετεροάτομα και τα μόρια στα οποία αλλάζει η διπολική ροπή κατά την διάρκεια της περιστροφικής και δονητικής διαδικασίας (Σχήμα 3.2).



**Σχήμα 3.2 :** Μεταβολή της διπολικής ροπής ενός διατομικού μορίου λόγω περιστροφής ( $\mu_{rot}$ ) και δόνησης ( $\mu_{vibr}$ ).

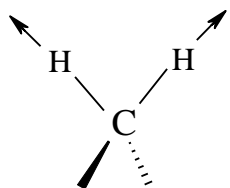
Η περιοδική μεταβολή της διπολικής ροπής επιτυγχάνεται μόνο στις συχνότητες συντονισμού. Ο δεύτερος κανόνας επιλογής ώστε να δώσει ένα μόριο υπέρυθρο φάσμα επιβάλλει το μόριο να μην είναι συμμετρικό. Έτσι διατομικά ομοατομικά μόρια, όπως είναι το  $H_2$ ,  $N_2$  κ.λ.π. δεν δίδουν υπέρυθρο φάσμα (IR-inactive). Γενικά το φάσμα απορρόφησης υπέρυθρου αποτελεί μία θεμελιώδη ιδιότητα κάθε μορίου, χρησιμεύει ως δακτυλικό αποτύπωμα (fingerprint) της ένωσης και της διαμόρφωσης των χαρακτηριστικών της ομάδων. Από την άλλη πλευρά επειδή το ποσό της απορροφούμενης ενέργειας είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του προς μέτρηση υλικού είναι δυνατόν μετά από βαθμονόμηση να υπολογίσουμε την συγκέντρωση ενός δείγματος. Αυτό γίνεται συγκρίνοντας το μέγεθος μιας χαρακτηριστικής ταινίας με αυτό ενός φάσματος που περιέχει γνωστή συγκέντρωση του εν λόγω συστατικού.

### 3.3. Φάσματα δόνησης πολυατομικών μορίων

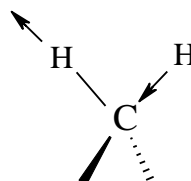
Η περιγραφή των τρόπων δόνησης των πολυατομικών μορίων γίνεται με διάφορους τρόπους. Συνήθως περιγράφονται οι περιοδικές κινήσεις των ατόμων οι οποίες λαμβάνουν χώρα ακριβώς στην ίδια συχνότητα. Οι δονήσεις αυτές του μορίου ονομάζονται κανονικές δονήσεις (normal vibrations ή normal modes). Στις κανονικές

δονήσεις όλα τα άτομα περνούν συγχρόνως από την θέση ισορροπίας τους και φθάνουν στις ακραίες θέσεις τους την ίδια στιγμή, κατά την διάρκεια της ταλάντωσης. Οι τρόποι δόνησης ενός μορίου χαρακτηρίζονται ως εξής [25]:

➤ **Δονήσεις τάσης** (stretching vibrations). Στην περίπτωση αυτή δύο άτομα πάλλονται με τρόπο ώστε να μεταβάλλεται η μεταξύ τους απόσταση ( $\leftarrow\text{C-H}\rightarrow$ ). Η ενέργεια τάσης είναι η μεγαλύτερη των δονήσεων.

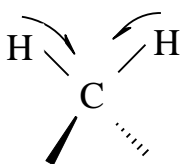


$\sim 2854 \text{ cm}^{-1}$



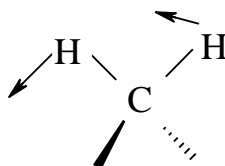
$\sim 2925 \text{ cm}^{-1}$

➤ **Δονήσεις κάμψης ή ψαλλίδισης** (bending ή scissoring vibrations). Στην περίπτωση η γωνία την οποία σχηματίζουν δύο δεσμοί μεταβάλλεται συνεχώς.



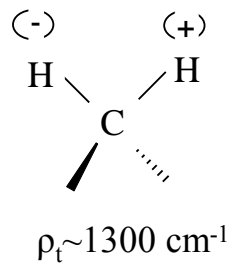
$\delta \sim 1460 \text{ cm}^{-1}$

➤ **Δονήσεις αιώρησης** (rocking vibrations). Εμφανίζονται όταν η ομάδα των ατόμων  $-\text{CH}_2-$  δονείται εντός του επιπέδου H-C-H (in-plane).



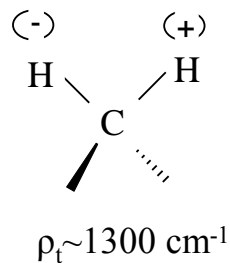
$\rho_r \sim 720 \text{ cm}^{-1}$

➤ **Δονήσεις συστροφής** (twisting vibrations). Λαμβάνουν χώρα όταν μία ομάδα τριών ατόμων συστρέφεται γύρω από το δεσμό σύνδεσης με το υπόλοιπο μόριο.



Σύμφωνα με τον συμβολισμό, το (+) σημαίνει κίνηση πάνω από το επίπεδο της σελίδας ενώ το (-) σημαίνει κίνηση έξω από αυτό (out-of-plane).

➤ **Δονήσεις σείσης** (wagging vibrations). Παρατηρούνται όταν τα άτομα που είναι συνδεδεμένα μέσω τρίτου μορίου να παλινδρομούν εκτός επιπέδου σε φάση.

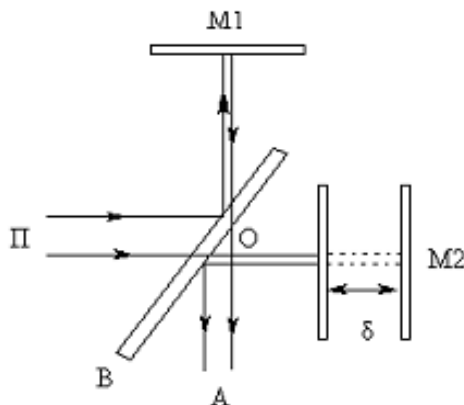


### 3.4. Φασματοφωτόμετρα Υπερύθρου

Τα φασματοφωτόμετρα υπερύθρου απορρόφησης διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

- i. Στα φασματοφωτόμετρα διασποράς (dispersive spectrometers) και
- ii. Στα φασματοφωτόμετρα μη – διασποράς (non dispersive spectrometers).

Στα φασματοφωτόμετρα διασποράς χρησιμοποιείται συνήθως πρίσμα, ενώ στα μη διασποράς χρησιμοποιείται κάτοπτρο, όπως στα φασματοφωτόμετρα με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR, Fourier Transform Infrared Spectrometers). Στα φασματοφωτόμετρα υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier η χρήση ενός συμβολόμετρου αντί ενός κλασσικού μονοχρωμάτορα δίδει σημαντικά πλεονεκτήματα στην καταγραφή του IR φάσματος. Το βασικό τμήμα ενός φασματοφωτόμετρου Fourier αποτελεί το συμβολόμετρο Michelson (Σχήμα 3.3).



**Σχήμα 3.3:** Σχηματική παράσταση συμβολομέτρου Michelson.  $\Pi$ =πηγή,  $M1$ =κάτοπτρο μίξης,  $M1'$ =είδωλο του  $M1$  όπως φαίνεται από τη θέση  $A$ ,  $M2$ =κινητό κάτοπτρο,  $B$ =διαιρέτης δέσμης (chopper) και  $A$ =αναλυτής

Το συμβολόμετρο αποτελείται από δύο κάτοπτρα  $M1$  και  $M2$  το ένα εκ των οποίων παραμένει σταθερό (Fixed Mirror), το άλλο είτε κινείται με σταθερή ταχύτητα, είτε σταματά περιοδικά και για μικρά χρονικά διαστήματα (Moving Mirror). Τα επίπεδα των δύο κατόπτρων είναι κάθετα μεταξύ τους. Ανάμεσα στο σταθερό και στο κινούμενο κάτοπτρο υπάρχει ένα ημιδιαφανές κάτοπτρο που λειτουργεί ως διαχωριστής δέσμης (beam splitter) με ανακλαστικότητα και διαπερατότητα 50% αντίστοιχα.

Η διαφορά ( $\delta$ ) της διαδρομής των δύο φωτεινών δεσμών είναι  $2(OM1-OM2)$ . Όταν το κινούμενο κάτοπτρο κινείται βηματικά και η διαφορά διαδρομής  $\delta$  είναι μηδέν ή ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της φωτεινής ακτίνας ( $\delta = n\lambda$ , όπου  $n = 0,1,2,3,\dots$ ), τότε παρατηρείται ενίσχυση της ακτινοβολίας. Αν όμως η διαφορά διαδρομής είναι  $\delta = (n+1/2)\lambda$ , όπου  $n = 0,1,2,3,\dots$ , τότε παρατηρείται απόσβεση και η ακτινοβολία επιστρέφει στην πηγή. Στην περίπτωση που το κινητό κάτοπτρο κινείται με σταθερή ταχύτητα, το σήμα στον ανιχνευτή μεταβάλλεται ημιτονοειδώς. Στην περίπτωση αυτή η ένταση του σήματος ως συνάρτηση της καθυστέρησης  $I'(\delta)$  δίδεται από την σχέση [3.1]:

$$I'(\delta) = 0,5I (1 + \cos 2\pi n\delta) \quad [3.1]$$



Στην οποία εμφανίζεται ότι η ένταση  $I(\delta)$  αποτελεί το γινόμενο ενός σταθερού παράγοντα  $0,51(\nu)$  και ενός μεταβλητού  $(1+\cos 2\pi\nu\delta)$ , ο οποίος ονομάζεται συμβολογράφημα (interferogram).

### **3.5. Εφαρμογές της φασματοσκοπίας στην ιατρική-μελέτη παθολογικών ιστών**

Τελευταία έγινε σημαντική προσπάθεια να χρησιμοποιηθεί η υπέρυθη φασματοσκοπία για διαγνωστικούς σκοπούς. Η ανάλυση κυττάρων τόσο των ιστών, όσων και των βιολογικών υγρών με υπέρυθη φασματοσκοπία έδωσε αισιόδοξα μηνύματα επειδή οι μεταβολές του φάσματος ενός συγκεκριμένου ιστού δεν δίδουν απλά και μόνον την εμφάνιση επικείμενης νόσου σε μοριακό επίπεδο, αλλά μπορούν να δώσουν πληροφορίες ακόμη και για την πρόβλεψη του μηχανισμού των χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα [10-27].

Επειδή οι ιστοί είναι σύνθετα βιολογικά συστήματα απαιτείται ιδιαίτερη γνώση για την επιλογή της τεχνικής λήψης των υπέρυθρων φασμάτων των δειγμάτων. Έτσι ιστοί που περιέχουν μεγάλο ποσοστό νερού μελετώνται με ATR (Attenuated Total Reflectance) τεχνική, η οποία επιτρέπει την εξάτμιση του νερού, χωρίς να καταστραφεί η διαμόρφωση των πρωτεϊνών στον χώρο, όπως αυτή υφίσταται στο βιολογικό περιβάλλον [44].



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>

### ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΣΑΡΩΣΗΣ (SEM)

#### 4.1. Ιστορική αναδρομή

Το SEM αποτελεί παραλλαγή του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και παρέχει τον συνδυασμό εικόνας υψηλής ανάλυσης, στοιχειακής ανάλυσης και πρόσφατα κρυσταλλογραφικής ανάλυσης. Με το SEM μπορεί να γίνει ανάλυση δειγμάτων μεγέθους έως και 10 nm ή και λιγότερο, επίσης να εντοπισθούν κρυσταλλικοί δεσμοί και να προσδιορισθεί ακόμη και το σύστημα κρυστάλλωσης δειγμάτων [45] σε τάξη μεγέθους 1 nm.

Με την συνεχιζόμενη έρευνα οι Zworykin, Hillier, Snyder (1942) πέτυχαν να υπερσκελήσουν πολλά προβλήματα του προηγούμενου SEM. Το πρώτο SEM χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση της επιφάνειας ενός στερεού δείγματος και περιγράφηκε από τον Zworykin. Η ανάλυση που επιτεύχθηκε ήταν της τάξεως των 50nm, χωρίς όμως εντυπωσιακά αποτελέσματα.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1940 ο C. W. Oatley, από το Πανεπιστήμιο του Cambridge, ενδιαφέρθηκε για την διεξαγωγή ερευνών στον τομέα της ηλεκτρονικής οπτικής και αποφάσισε να ανακατασκευάσει το SEM. Ο Ken Sander, φοιτητής του Oatley, ξεκίνησε να εργάζεται σε μια στήλη μικροσκοπίου μεταφοράς ηλεκτρονίου χρησιμοποιώντας ηλεκτροστατικούς φακούς. Λίγο αργότερα το έργο του Sander συνέχισε ο Dennis McMullan (1948) όπου μαζί με τον Oatley κατασκεύασαν το πρώτο τους SEM. Έως το 1952 με την συσκευή αυτή είχαν επιτύχει ανάλυση εικόνας της τάξεως των 50 nm.

Ο Ken Smith (1952) επεμβαίνοντας στο SEM που πρότεινε ο Dennis McMullan, βελτίωσε περισσότερο το οπτικό σύστημα βελτιστοποιώντας παράλληλα την αποτελεσματικότητα της δευτερογενούς συλλογής ηλεκτρονίων, επιτυγχάνοντας, για πρώτη φορά, λήψη σταθερής εικόνας με χαμηλή ενέργεια της ολικής δευτερογενούς εκπομπής. Ο O.C. Wells (1953), υπό την εποπτεία του Oatley,

κατασκεύασε συσκευή SEM, χρησιμοποιώντας επίσης ηλεκτροστατικούς φακούς. Η πρωτοτυπία της συσκευής αυτής SEM αφορά την χρήση εκνεφωτή ηλεκτρονίων στη βάση της στήλης, διαμόρφωση η οποία συνέβαλε σημαντικά στην πειραματική διεργασία.

Αργότερα, ο Everhart (1959) βελτίωσε τον ανιχνευτή δευτερογενών ηλεκτρονίων (Secondary Electrons, SE) χρησιμοποιώντας σπινθηριστή για την μετατροπή των ηλεκτρονίων σε φωτόνια, τα οποία μετά εκπέμπονταν από λεπτό αγωγό κατευθείαν στον φωτοπολλαπλασιαστή. Στο Σχήμα 5.1 φαίνεται σχηματικά ο τρόπος αλληλεπίδρασης των ηλεκτρονίων του εκνεφωτή με τα ηλεκτρόνια του δείγματος. Συνεχίζοντας ο Thornley (1957) αντικατέστησε τον ηλεκτρονικό πολλαπλασιαστή με έναν νέο συνδυασμό σπινθηριστή/ φωτοπολλαπλασιαστή επιτυγχάνοντας την αύξηση του σήματος με αποτέλεσμα την μείωση του θορύβου.

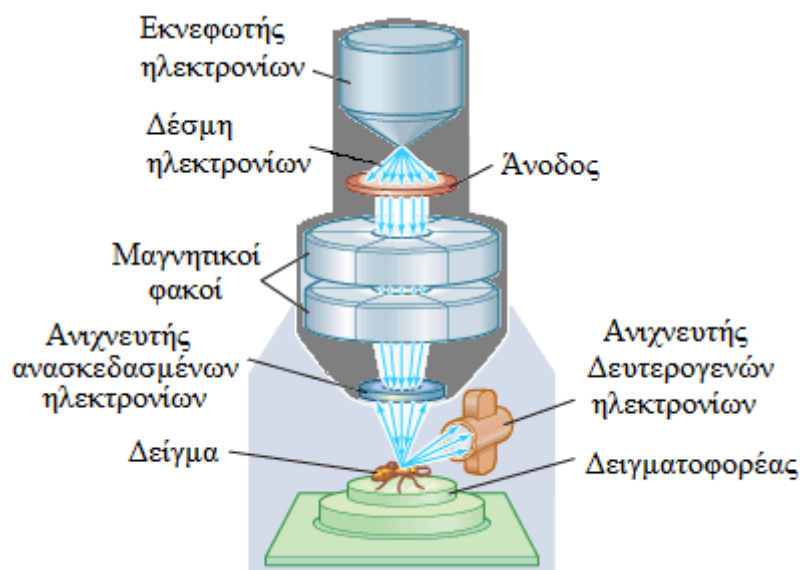
Στις φιλοδοξίες του Oatley ήταν η παραγωγή και πώληση ενός απλού χαμηλού κόστους SEM. Για την επίτευξη της ιδέας αυτής ο Peter Spreadbury, ο πέμπτος κατά σειρά συνεργάτης του (1956), κατασκεύασε ένα απλό SEM χρησιμοποιώντας μια λυχνία καθοδικών ακτίνων (Cathode Ray Tube-CRT) ως πηγή εκπομπής. Έτσι ξεκίνησε μια νέα εποχή από τον Gary Stewart (1958), ο οποίος προσάρμοσε έναν εκνεφωτή ιόντων στον θάλαμο του δείγματος του SEM, το οποίο επέτρεψε τον βομβαρδισμό του δείγματος με ιόντα. Το έργο πάνω στην ιοντική δέσμη διευρύνθηκε αργότερα από τον Alec Broers (1961), ο οποίος βελτίωσε την δέσμη ιόντων, που αποτελούν το οπτικό σύστημα του οργάνου και προσέθεσε ένα μαγνητικό αντικειμενικό φακό για την βελτίωση της ανάλυσης της εικόνας. Άλλη μια καινοτομία επετεύχθη από τον Haroon Ahmed (1959), ο οποίος τροποποίησε το SEM του Wells για να επιτραπεί η εξέταση των θερμικών εκπομπών σε θερμοκρασίες που ξεπερνούν τους 1000K. Το πρώτο SEM στο οποίο επετεύχθη ανάλυση 10 nm φτιάχτηκε από τον Fabian Pease (1960).

## 4.2. Αρχή λειτουργίας

Το SEM αποτελεί μια παραλλαγή του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και παρέχει ένα πολύτιμο συνδυασμό εικόνας υψηλής ανάλυσης, στοιχειακής ανάλυσης και πρόσφατα κρυσταλλογραφικής ανάλυσης της δομής του δείγματος. Μπορεί να

δώσει ανάλυση δειγμάτων 10 nm ή λιγότερο, να χρησιμοποιηθεί σε σκληρές επιφάνειες, προσφέρει ποσοτική και ημιποσοτική ανάλυση στοιχείων, εντοπίζει κρυστάλλους και προσδιορίζει το σύστημα κρυστάλλωσης δειγμάτων της τάξης μεγέθους 1nm.

Τα ηλεκτρόνια που παράγονται από τον εκνεφωτή του μικροσκοπίου (Σχήμα 4.1) επιταχύνονται με εφαρμογή τάσης και σχηματίζουν δέσμη ηλεκτρονίων, η οποία εστιάζεται πάνω στο δείγμα με σύστημα ισχυρών ηλεκτρομαγνητικών φακών. Η αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων οδηγεί στην διέγερση των ατόμων του δείγματος, τα οποία κατά την μετάπτωση συνοδεύεται με εκπομπή ακτίνων X (φωτονίων) ενέργειας ίσης με ενεργειακή διαφορά της βασικής και διηγερμένης κατάστασης. Στο Σχήμα 4.1 δίνεται παραστατικά η παραγωγή ακτίνων X από τις στιβάδες K και L. Η μονοχρωματική ενέργεια των εκπεμπόμενων ακτίνων X είναι μοναδιαία και καθορίζει το στοιχείο από όπου εκπέμπεται, επιτρέποντας έτσι την χημική ανάλυση αυτού (EDX).

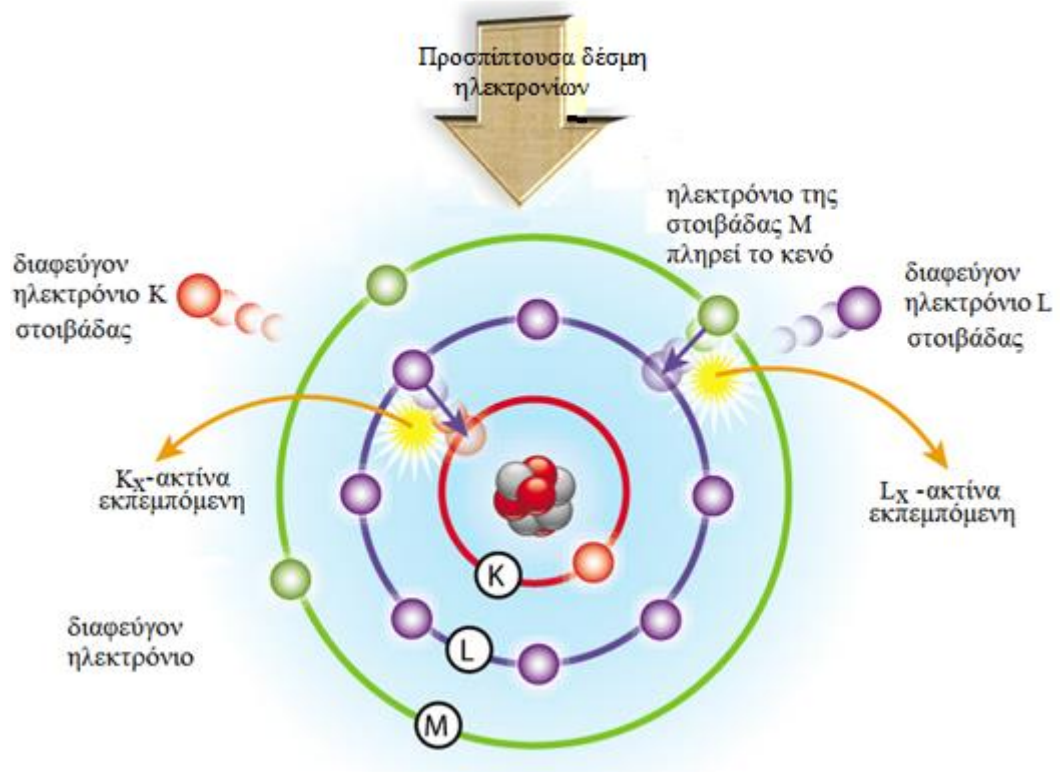


*Σχήμα 4. 1: Αρχή λειτουργίας SEM*

Η αλληλεπίδραση της προσπίπτουσας δέσμης ηλεκτρονίων με το δείγμα παρέχει επιπλέον πληροφορίες σχετικά με την τοπολογική κατάσταση του δείγματος.

Τα ηλεκτρόνια δεσμεύονται από ανιχνευτή όπου καταμετρούνται. Επειδή ο αριθμός των ηλεκτρονίων εξαρτάται από τη γεωμετρία της επιφάνειας στο σημείο

πρόσπτωσης της δέσμης, η ανίχνευσή τους προσφέρει σαφείς εικόνες της επιφανειακής δομής του δείγματος [46].



**Σχήμα 4. 2:** Σχηματική παράσταση παραγωγής ακτινών X, χαρακτηριστική του κάθε ατόμου

Αυτή η παραλλαγή του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου έχει αρκετά πλεονεκτήματα. Το δείγμα μπορεί να είναι παχύ, αφού η δέσμη δεν χρειάζεται να περάσει δια μέσου αυτού. Επίσης η παραγωγή των ανακρουόμενων ηλεκτρονίων εξαρτάται από τη γωνία πρόσπτωσης της δέσμης στην επιφάνεια. Συνεπώς οι μικρογραφίες του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης έχουν πολύ καλύτερη τρισδιάστατη εμφάνιση από τις συνήθεις. Η διακριτική ικανότητα στα σημερινά SEM είναι της τάξης μερικών nm, πολύ μεγαλύτερη από εκείνη των καλύτερων οπτικών μικροσκοπίων [47]

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 5.1. Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια DMSO (Dimethyl sulfoxide), ακετόνη, εξάνιο και υπεροξείδιο του υδρογόνου ήταν της εταιρίας Aldrich.

#### 5.2. Λήψη υπερόθρων FT-IR φασμάτων ομογενοποιημένων δειγμάτων

Τα δείγματα μελετήθηκαν με φασματοφωτόμετρο Nicolet 6700, όπου το κάθε φάσμα προέκυψε από 120 φάσματα (scans) και resolution  $4\text{ cm}^{-1}$ . Για την FT-IR ανάλυση απαιτείται ελάχιστη ποσότητας δείγματος, μόνο μερικά μγρ, χωρίς αφαλάτωση και χρωστική. Με τον τρόπο αυτό το δείγμα διατηρεί την φυσιολογική παθολογική του κατάσταση. Η φασματοσκοπική ανάλυση βασίζεται μόνο στις δονήσεις των χαρακτηριστικών ομάδων των κύριων βιολογικών μορίων.

#### 5.3. SEM μικροσκόπιο

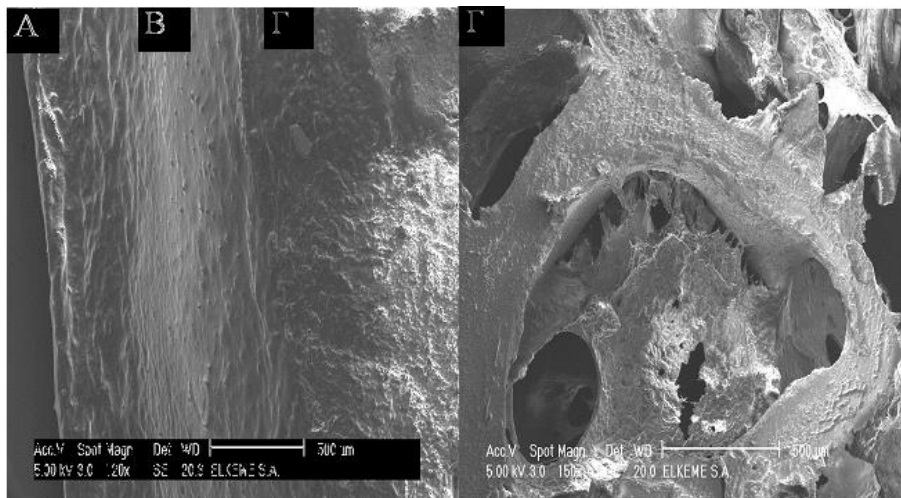
Η μελέτη της μορφολογίας των οστών έγινε με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Scanning Electron Microscopy, SEM) της εταιρείας Fei Co, The Netherlands. Στην Εικόνα 5. 9 παρουσιάζεται η τομή τμήματος κεφαλής μηριαίου υγιούς οστού, όπως αυτή λήφθηκε με το οπτικό μικροσκόπιο Nikon Eclipse ME 600 και μεγέθυνση x150. Το πάχος του οστού ήταν 5  $\mu\text{m}$ .





**Εικόνα 5. 1:** Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Fei Co, The Netherlands.)

Σε τομή υγιούς οστού πραγματοποιήθηκε εξέταση με οπτικό μικροσκόπιο NikonEclipse ME 600. Χρησιμοποιήθηκε κάμερα NikonNetCameraDN 100 για τη λήψη φωτογραφιών. Το λογισμικό πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας (imageanalysissoftware) για την επεξεργασία των φωτογραφιών ήταν το ImageProAnalysis.



**Εικόνα 5. 2:** Τμήμα κεφαλής μηριαίου οστού. Α: Χόνδρος, Β: Συμπαγές, Γ: Σπογγώδες. Μεγέθυνση μικροσκοπίου x150. Κλίμακα 500 μm.

Η Εικόνα 5.2 απεικονίζει με λεπτομέρεια τη μακροσκοπική δομή του οστού. Στο σπογγώδες οστούν (Γ) απεικονίζονται τα αβερσιανά κανάλια. Η όλη εικόνα έδωσε τη δυνατότητα αντίληψης της μακρομοριακής δομής του οστού και την αξιολόγηση των δειγμάτων των ασθενών, τα οποία όχι μόνον ήταν πολύ μικρά σε ποσότητα, αλλά κυρίως επειδή παρουσίαζαν έντονες απασβεστώσεις.

#### 5.4. Λήψη δειγμάτων ανθρώπινου οστού

Ελήφθησαν δείγματα από δώδεκα ασθενείς ηλικίας 39 έως 76 ετών, οι οποίοι υπεβλήθησαν σε χειρουργική αποκατάσταση παθολογικών καταγμάτων οστών με μεταστατικό καρκίνο. Τα δείγματα προέρχονται από διαφορετικούς τύπους οστών και από άτομα με διαφορετικό πρωτοπαθές καρκίνωμα, όπως φαίνεται και από το ατομικό ιατρικό ιστορικό του κάθε ασθενούς (Πίνακας 5.1).

**Πίνακας 5. 2:** Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Φύλο	Ηλικία	Ακτινοθεραπεία	Τύπος καρκίνου	Τύπος οστού
Γυναίκα	60	Όχι	Μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα αδενοκαρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης	Έγγυς κεφαλή βραχίονα
Άντρας	82	Όχι	Μέτριας διαφοροποίησης πλακωδών κυττάρων, στο δέρμα αυτιού	Άνω άκρο κερκίδας
Γυναίκα	60	Όχι	ca μαστού	Κάτω πέρασ μετάφυση μηριαίου
Γυναίκα	60	Όχι	Πρωτοπαθής πνεύμονα	Βραχίονας
Άντρας	52	Ναι	Διηθητό αδενοκαρκίνωμα νεφρού	Μηριαίο
Άντρας	72	Ναι	Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα	Μηριαίο διατροχαντήριο
Γυναίκα	65	Ναι	ca μαστού	Βραχιόνιο
Άντρας	60		Έκ του ουρηθηλίου ή γαστρεντερικού με αδενικού τύπου διαφοροποίηση	Βραχιόνιο
Γυναίκα	39	Ναι	ca μαστού	Μηριαίο
Άντρας	45	Ναι	Πολλαπλούν μύελωμα	Βραχίονας
Γυναίκα			ca μαστού	Κεφαλή μηριαίου
Γυναίκα	65		Διηθητό αδενοκαρκίνωμα μαστού σταδιο II	Ισχίο

## **5.5. Κατεργασία των οστικών δειγμάτων**

### **α. Προετοιμασία δειγμάτων και συλλογή δεδομένων**

Η προετοιμασία του δείγματος είναι ίσως το πιο σημαντικό μέρος ενός επιτυχημένου πειράματος υπέρυθρου φασματοσκοπίας. Ιδιαίτερα για τους ιστούς, όπου η ποσότητα η οποία μας χορηγείται κυμαίνεται μεταξύ μερικών mm<sup>2</sup> ή mg θα πρέπει να είμαστε προσεκτικοί, ώστε να μη χάσουν την αρχική τους μοριακή δομή και τα συμπεράσματα να είναι ασφαλή.

### **β. Κατεργασία δειγμάτων οστού με υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και ακετόνη**

Για την φασματοσκοπική μελέτη των οστών έπρεπε να απομακρυνθεί το αίμα και ο λιπώδης ιστός. Για τον λόγο αυτό τα δείγματα «πλύθηκαν» διαδοχικά με διαλύματα 30% υπεροξειδίου του υδρογόνου για διάστημα 8 ωρών και ακετόνης επί 30 λεπτά. Με τον τρόπο αυτό απομακρύνεται το μεγαλύτερο ποσοστό των ανεπιθύμητων οργανικών συστατικών και ιδιαίτερα των χρωμοφόρων του αίματος και του λιπώδους ιστού, ενώ δεν επηρεάζεται το τελικό φάσμα [10-18]. Για την απομάκρυνση της υγρασίας τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φούρνο κενού θερμοκρασίας 30 °C, για τουλάχιστον 1 ώρα.

### **γ. Απομάκρυνση των οργανικών συστατικών**

Στην περίπτωση που απαιτήθηκε η μελέτη των σταθερών συστατικών της ανόργανης φάσης των οστών η απομάκρυνση των οργανικών ευδιάλυτων ουσιών από τα οστικά δείγματα έγινε με DMSO (Dimethyl sulfoxide) και εξάνιο. Λήφθηκαν επίσης τα υπέρυθρα φάσματα των διαλυμένων συστατικών μετά την απομάκρυνση του διαλύτη. Ας σημειωθεί ότι δεν υπήρξαν διαφορές στη συμπεριφορά των ιστών στους διαλύτες, μεταξύ των διαλυτών και για τον λόγο αυτόν στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το εξάνιο, επειδή απομακρύνεται πιο εύκολα από το δείγμα [19-24].

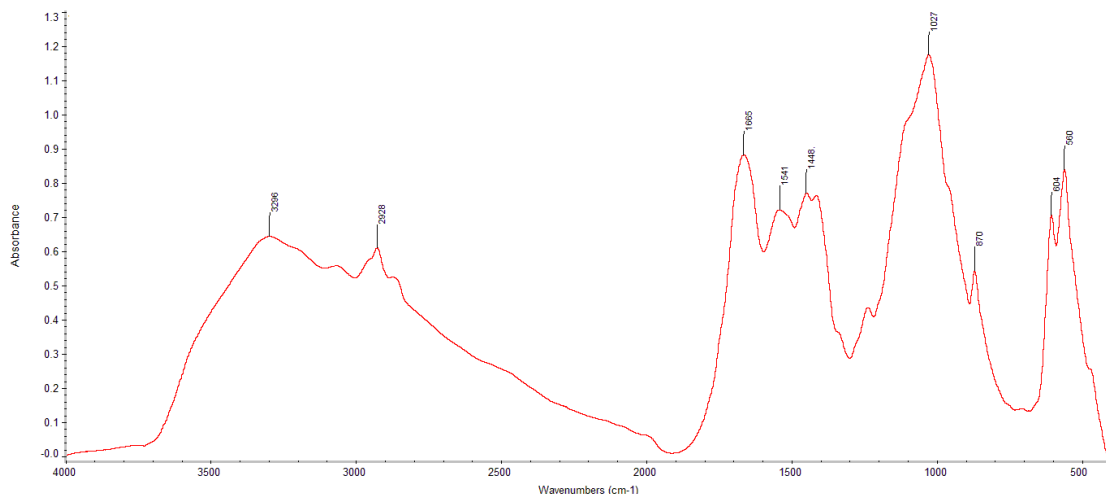
**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup>

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 6.1. Υπέρυθρα φάσματα υγιών οστών

Προκειμένου να κατανοήσουμε τις βλάβες τις οποίες προκαλεί η ασθένεια της μετάστασης του καρκίνου στα οστά μελετήθηκε αρχικά το υγιές οστό. Στο Σχήμα 6.1 και τον Πίνακα 6.1 δίνονται το FT-IR φάσμα και ο χαρακτηρισμός των ταινιών απορρόφησης, αντίστοιχα, υγιούς οστού το οποίο λήφθηκε από κεφαλή ισχύου για αρθροπλαστική. Το οστό δεν παρουσίαζε οστική ή μεταβολική νόσο, σύμφωνα με τα ιστοπαθολογικά δεδομένα με χρώση κατά Goldner ευρήματα Trichrome.



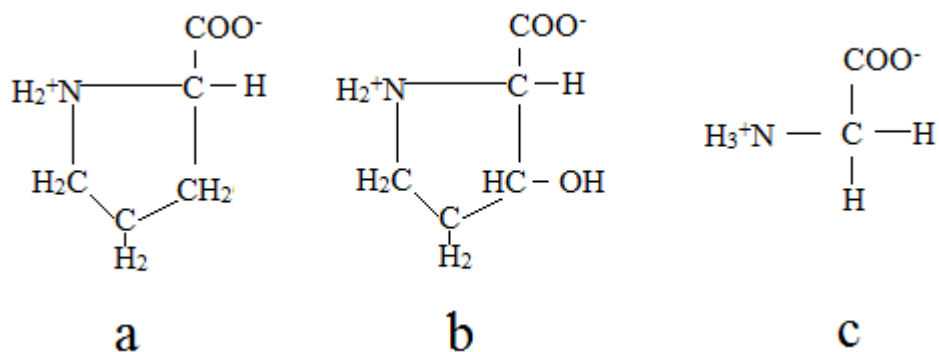
**Σχήμα 6. 1:** FT-IR φάσματα υγιούς οστού προερχόμενο από κεφαλή ισχύου χωρίς οστική και μεταβολική νόσο.

Στην περιοχή του φάσματος από 3500-2700  $\text{cm}^{-1}$  εμφανίζονται κορυφές που οφείλονται στην παρουσία κυρίως των οργανικών συστατικών του οστού, καθώς και οι ταινίες δόνησης τάσης των ομάδων νΟΗ του νερού και του υδροξυαπατίτη που περιέχουν τα οστά παράλληλα με τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζουν οι πρωτεΐνες [10-29, 48,49].

**Πίνακας 6. 1:** Θέσεις απορρόφησης των χαρακτηριστικών ομάδων υγίων οστών σε κυματαριθμούς (cm<sup>-1</sup>) και χαρακτηρισμούς

Κυματάριθμοι (cm <sup>-1</sup> )	Χαρακτηρισμός ταινιών [10-27]
3569	H <sub>2</sub> O και OH υδροξυαπατίτη
3307	νNH
3296	νNH Hb πρωτεϊνών
3006	=C-H, αρωματικό
2925	ν <sub>as</sub> CH <sub>2</sub>
2853	ν <sub>sym</sub> CH <sub>2</sub>
1665	νC=O (80%) και νC-N (10%), δN-H (10%) (Amide I)
1643	δH-O-H
1557	ν <sub>as</sub> COO <sup>-</sup> και Amide II
1541	δN-H εντός επιπέδου (40%) & νC-N (40%) (Amide I)
1506	ν <sub>as</sub> COO <sup>-</sup> & ν <sub>3</sub> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , απατίτης τύπου AB
1465	ν <sub>3</sub> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , ανθρακικός απατίτης τύπου A
1448	δCH <sub>2</sub> & ν <sub>3</sub> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , ανθρακικός απατίτης τύπου B
1416	νCOO <sup>-</sup> & ν <sub>3</sub> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , ανθρακικός απατίτης τύπου AB
1377	δCH <sub>3</sub> λιπαρών οξέων, πρωτεϊνών
1240	νC-N, δN-H (Amide III), C-OH
1163	ρ <sub>r</sub> CH <sub>2</sub> & ρ <sub>l</sub> CH <sub>2</sub>
1118	ν <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , στοιχειομετρικός HA
1098	ν <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , στοιχειομετρικός HA
1027	ν <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , στοιχειομετρικός HA
966	ν <sub>1</sub> PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , στοιχειομετρικός HA
870	ν <sub>3</sub> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>
792	N <sup>+</sup> H <sub>3</sub>
722	CH <sub>2</sub> , εκτός επιπέδου
604	ν <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> bend
560	ν <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> bend

Η ταινία στα  $3296\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των ομάδων  $\nu\text{NH}$  των πρωτεϊνών. Η ευδιάκριτη ταινία στα  $3007\text{ cm}^{-1}$  προκύπτει από τη δόνηση τάσης της ομάδας  $\nu=\text{C}-\text{H}$ , με τον αρωματικό χαρακτήρα των πρωτεϊνών [10-29]. Οι δύο έντονες κορυφές που εμφανίζονται περίπου στα  $2928\text{ cm}^{-1}$  και  $2854\text{ cm}^{-1}$ , από τις οποίες η πρώτη είναι αρκετά πιο ισχυρή από τη δεύτερη, αποδίδονται στην αντισυμμετρική και συμμετρική δόνηση τάσης της ομάδας  $\nu\text{CH}_2$ , αντίστοιχα [10-29]. Οι ταινίες αυτές μαρτυρούν την παρουσία οργανικής φάσης στον οστίτη ιστό. Η οργανική φάση του οστίτη ιστού αποτελείται από κολλαγόνο, κυρίως τύπου I (μαζί με μικρές ποσότητες κολλαγόνου τύπου V και XII), το οποίο συνιστά το  $\sim 90\%$  της οργανικής φάσεως [50]. Το υπόλοιπο 10% αποτελείται από μη-κολλαγονούχες γλυκοπρωτεΐνες και ειδικές πρωτεογλυκάνες. Επίσης η απουσία των ταινιών της αντισυμμετρικής και συμμετρικής δόνησης τάσης των ομάδων  $\nu\text{CH}_3$  οι οποίες αναμένονται στα  $2953\text{ cm}^{-1}$  και  $2870\text{ cm}^{-1}$ , αντίστοιχα, δείχνει ότι οι ομάδες αυτές δεν υπάρχουν στα μόρια των κολλαγονούχων πρωτεϊνών. Πράγματι, οι παρατηρήσεις αυτές συμβαδίζουν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [51], σύμφωνα με τα οποία τα αμινοξέα που σχηματίζουν την έλικα του κολλαγόνου δεν φέρουν μεθυλομάδες ( $-\text{CH}_3$ ) ως τερματικές ομάδες (Σχήμα 6.2).



**Σχήμα 6. 2:** Χημικοί τύποι των αμινοξέων του κολλαγόνου: *a*: προλίνη, *b*: υδροξυπρολίνη και *c*: γλυκίνη

Τα φάσματα στο διάστημα από  $2700-1800\text{ cm}^{-1}$  δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί στην περιοχή αυτή δεν εμφανίζονται χαρακτηριστικές ταινίες των ομάδων του οστού, ώστε οι αντίστοιχες κορυφές να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες. Στην περιοχή του φάσματος από  $1800-400\text{ cm}^{-1}$ , όπως φαίνεται, το φάσμα είναι περισσότερο πολύπλοκο. Η ομάδα στην θέση περίπου  $1665\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στην

παρουσία της πεπτιδικής ομάδας NH πρωτεϊνών (Amide I). Στην ταινία αυτή συμμετέχει και η δόνηση τάσης  $\nu\text{C-N}$  και κάμψης  $\delta\text{N-H}$  εντός επιπέδου [10-29, 52-54].

Η ταινία που παρουσιάζεται στα  $1643\text{ cm}^{-1}$ , αποδίδεται στην δόνηση κάμψης της ομάδας  $\text{H}_2\text{O}$  των μορίων του συμπλεγμένου νερού. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η κορυφή αυτή παρουσιάζεται στα  $1640\text{ cm}^{-1}$  [52]. Η κορυφή αυτή επιβεβαιώνει ότι, ορθώς αποδόθηκε και στην δόνηση τάσης των μορίων νερού  $-\text{OH}$  η ταινία που εμφανίζεται στα  $3569\text{ cm}^{-1}$  [52-55]. Τα μόρια του νερού συμμετέχουν στην δομή των πρωτεϊνών του οστού. Η ταινία τάσης και κάμψης των μορίων του συμπλεγμένου νερού εξαφανίζεται στα καρκινικά κύτταρα, λόγω της ασθένειας, όπως θα δούμε πιο κάτω.

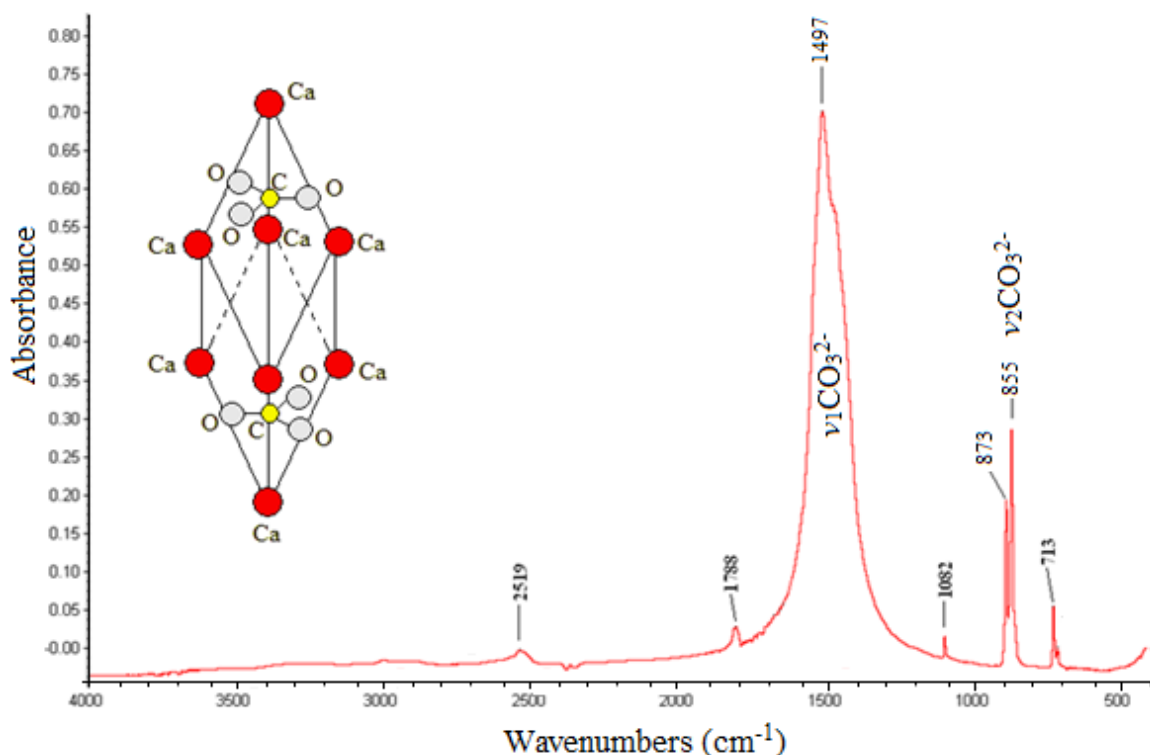
Η δεύτερη κορυφή του πεπτιδικού δεσμού (Amide II), που βρίσκεται στα  $1557\text{ cm}^{-1}$  είναι πολύπλοκη και οφείλεται κατά 60% στην δόνηση κάμψης εντός επιπέδου (in-plane) της ομάδας  $-\text{NH}$  και κατά 40% στην δόνηση τάσεως της ομάδας  $-\text{CN}$ . Η ταινία αυτή αποδίδεται στο κολλαγόνο με διαμόρφωση  $\alpha$ -έλικας [10-29,52-56] και ενισχύει την άποψη ότι η δομή του κολλαγόνου είναι σε  $\alpha$ -έλικα, όπως αναμένεται βιβλιογραφικά. Όπως αναφέρει ο Kan-Zhi Liu με τους συνεργάτες του [55] όταν η κορυφή αυτή βρίσκεται στα  $1550\text{ cm}^{-1}$  οι πρωτεΐνες εμφανίζουν  $\beta$ -ελικοειδή σχηματισμό ( $\beta$ -turn), ενώ αντίθετα όταν βρίσκεται στα  $1530\text{ cm}^{-1}$  αποκτά τυχαία σπειροειδή διαμόρφωση. Στην περίπτωση αυτή εμφανίζονται παράλληλα και δευτερεύουσες κορυφές σε χαμηλότερες συχνότητες [10-29]. Από τα παραπάνω γίνεται εμφανές ότι στο οστό η δομή του κολλαγόνου επηρεάζεται σημαντικά από την μορφή και τη σύσταση του υδροξυαπατίτη του οστού, με αποτέλεσμα οι δονήσεις του υπέρυθρου φάσματος να μην ανταποκρίνονται απόλυτα με τις δονήσεις του καθαρού κολλαγόνου.

Οι ταινίες μεταξύ  $1500-1416\text{ cm}^{-1}$  περιέχουν τις δονήσεις τάσης των ανθρακικών ιόντων  $\nu\text{CO}_3^{2-}$  του ανθρακικού ασβεστίου του υδροξυαπατίτη. Οι θέσεις των ταινιών καθορίζουν αν είναι τύπου AB ή B. Είναι γνωστό ότι στον υδροξυαπατίτη τύπου B φωσφορικά ιόντα έχουν αντικατασταθεί μερικώς από ισάριθμα φορτία με ανθρακικά (π.χ.  $2\text{PO}_4^{3-}$  με  $3\text{CO}_3^{2-}$ ) [10-29]. Επίσης, η ταινία που εμφανίζεται στα  $870\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται και αυτή στην δόνηση τάσης των ανθρακικών ιόντων  $\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$ . Γνωρίζουμε ότι όταν η δόνηση τάσης των ανθρακικών ιόντων  $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$  εμφανίζεται στα  $879\text{ cm}^{-1}$  έχουμε υδροξυαπατίτη τύπου A, δηλαδή τα ανθρακικά ιόντα έχουν αντικαταστήσει μερικώς τα



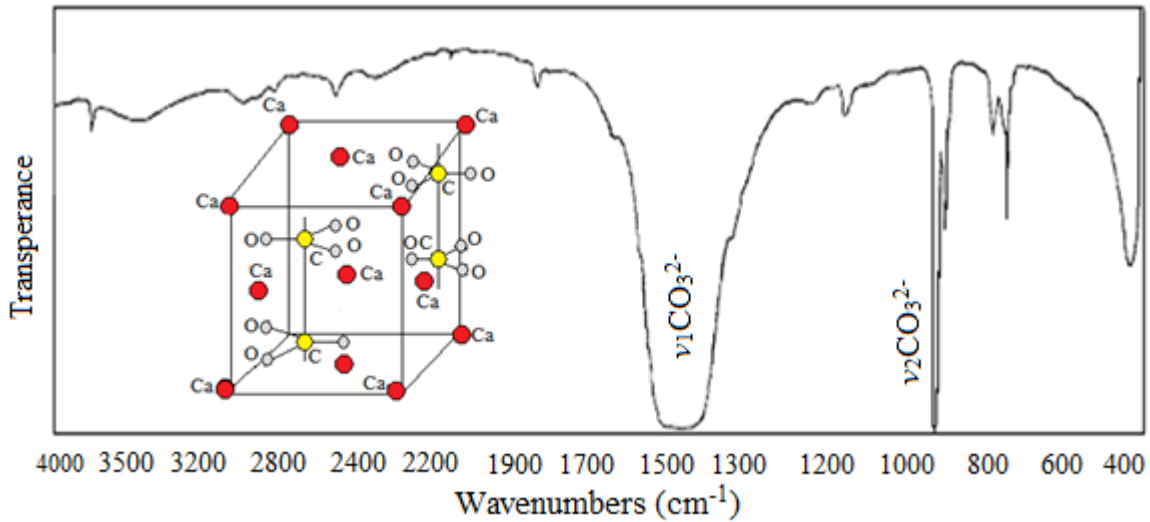
υδροξυλιόντα του υδροξυαπατίτη [10-29]. Εάν όμως η ταινία μετατοπίζεται προς μικρότερους κυματαριθμούς και εμφανίζεται στα  $872-868\text{ cm}^{-1}$ , τότε επικρατεί ο υδροξυαπατίτης τύπου Β, όπου, όπως προαναφέρθηκε, τα ανθρακικά ιόντα έχουν αντικαταστήσει μερικώς τα φωσφορικά του υδροξυαπατίτη. Τέλος στην περίπτωση όπου η κορυφή αυτή δεν εμφανίζεται καθόλου στο φάσμα, αλλά εμφανίζονται μόνο οι κορυφές στους  $1098, 1027$  και  $966\text{ cm}^{-1}$ , τότε ο υδροξυαπατίτης δεν περιέχει ανθρακικά ιόντα. Συμπερασματικά μπορεί να αναφερθεί ότι το σύνολο των ταινιών που χαρακτηρίζουν τις δονήσεις των ανθρακικών ιόντων εμφανίζονται στους  $1461, 1413, 868$  και  $870\text{ cm}^{-1}$ .

Μετά τα παραπάνω συμπεράσματα και προκειμένου να εντάξουμε τα ανθρακικά άλατα σε αντίστοιχη κρυσταλλική δομή συγκρίναμε τα φάσματα του οστού με τα αντίστοιχα φάσματα του καλσίτη. Από τη σύγκριση του φάσματος του δείγματος με το αντίστοιχο φάσμα του καλσίτη (Σχήμα 6.3) παρατηρείται ότι στο φάσμα του οστού εμφανίζονται όλες οι σημαντικές κορυφές του φάσματος του καλσίτη [57,58].



**Σχήμα 6. 3:** Υπέρυθρο φάσμα του καλσίτη και η κρυσταλλική δομή [55,56].

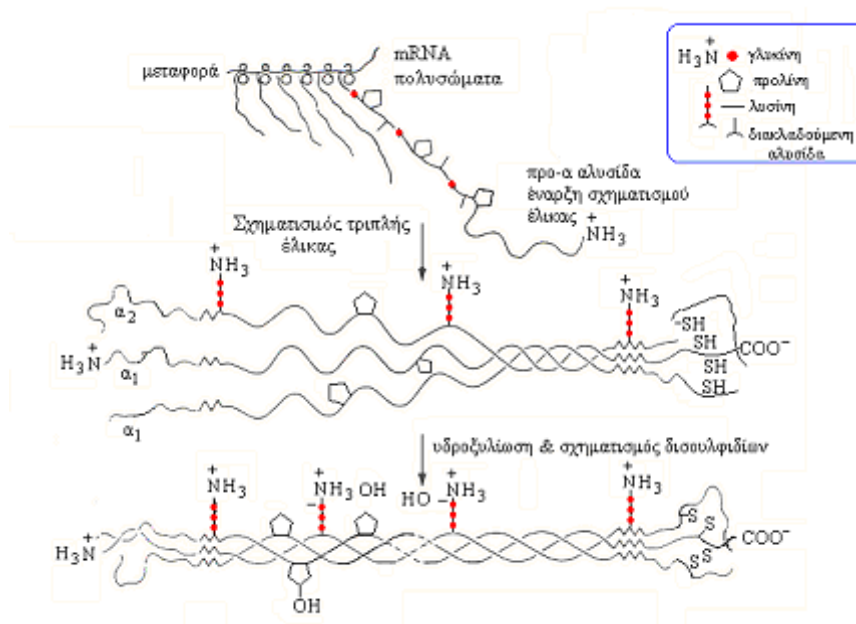
Αντίθετα, συγκρίνοντας το φάσμα του οστού του ασθενούς με το φάσμα του βατερίτη (Σχήμα 6.4) [58] διαπιστώνεται έλλειψη αντιστοιχίας.



**Σχήμα 6. 4:** Υπέρευθο φάσμα του βατερίτη και η κρυσταλλική δομή του.

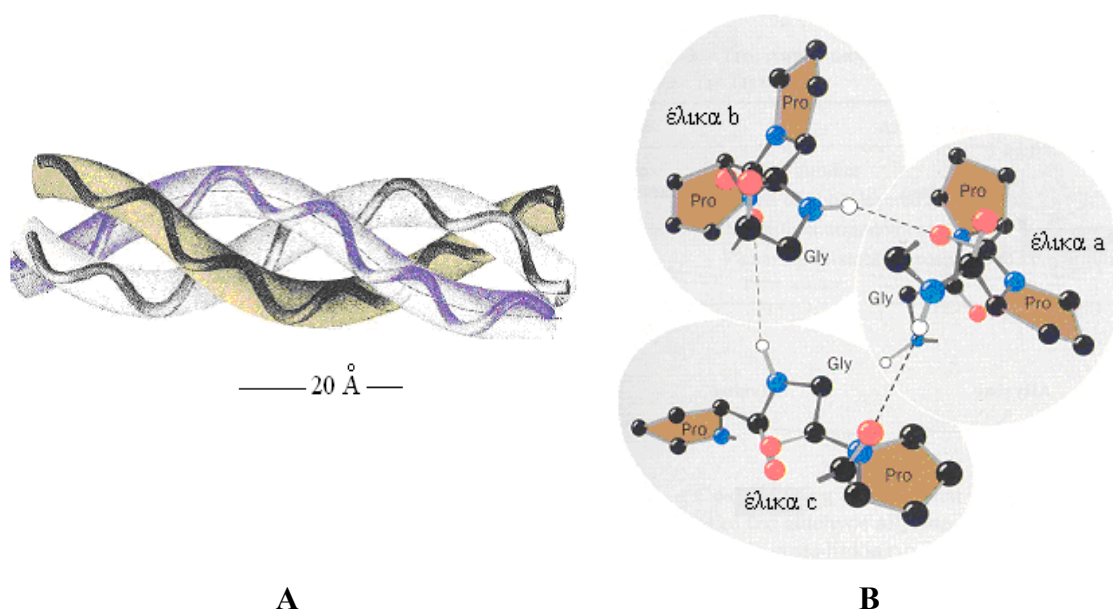
Η σύγκριση των φασμάτων του οστού με τα αντίστοιχα φάσματα του καλσίτη και βατερίτη μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το ανθρακικό ασβέστιο του οστού κρυσταλλώνεται σε δομή καλσίτη και όχι βατερίτη.

Τέλος η ταινία στα  $792\text{ cm}^{-1}$  οφείλεται στην ιοντική ομάδα  $\text{NH}_3^+$  του κολλαγόνου [51,60], η οποία διατηρείται ακόμη και μετά την υδροξυλίωση (Σχήμα 6.5).



**Σχήμα 6. 5:** Σχηματική απεικόνιση των βημάτων δημιουργίας της τριπλής έλικας του κολλαγόνου στα οστά. Παρουσιάζονται οι ελεύθερες ομάδες  $\text{NH}_3^+$  [61],

Από τα βήματα δημιουργίας των αλυσίδων (κλώνων) και της έλικας του κολλαγόνου διακρίνεται, ότι οι ομάδες  $\text{NH}_3^+$  στο μόριο του κολλαγόνου είναι ελεύθερες κατά μήκος της αλυσίδας, από τον τρόπο της βιοσύνθεσής του (Σχήμα 6.6).



**Σχήμα 6. 6:** A: Τριπλή α-έλικα του κολλαγόνου, B: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των βάσεων που σχηματίζουν την τριπλή έλικα

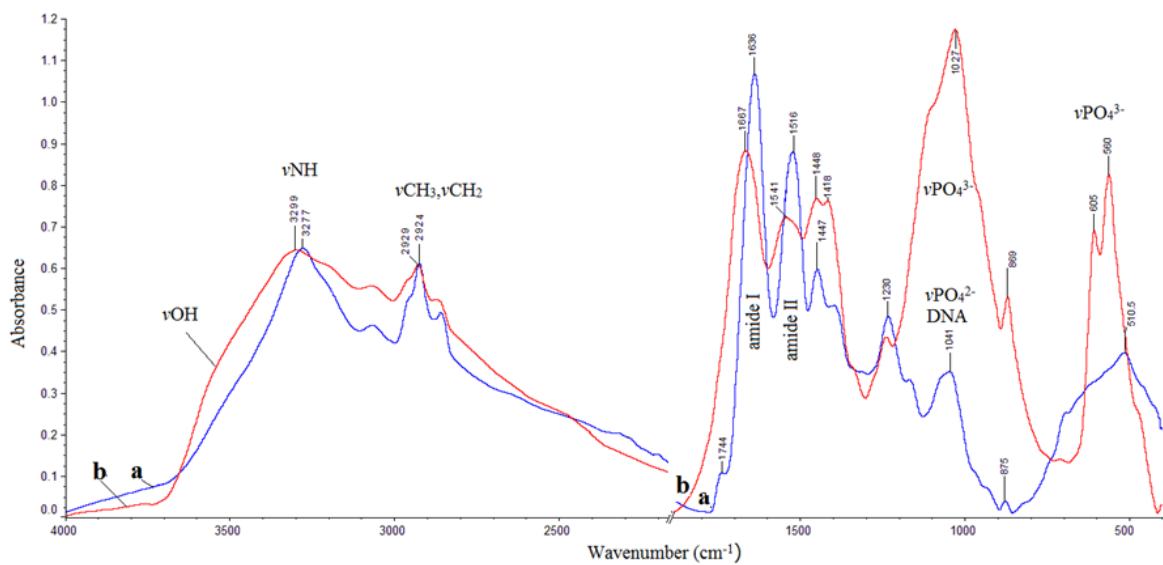
Η περιοχή του φάσματος  $1500\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$  γίνεται περισσότερο σύνθετη. Στην περιοχή αυτή συνυπάρχουν οι κορυφές οι οποίες οφείλονται τόσο στα οργανικά, όσο και στα ανόργανα συστατικά του οστού. Η κορυφή που εμφανίζεται στα  $1465\text{ cm}^{-1}$  προκύπτει από την δόνηση τάσης των ανθρακικών ιόντων του οστού  $\nu_3(\text{CO}_3^{2-})$ . Η παρουσία της δόνησης αυτής στο φάσμα δηλώνει ότι ο ανθρακικός απατίτης είναι τύπου A. Η ταινία αυτή σε συνδυασμό με την ταινία στα  $1416\text{ cm}^{-1}$  δείχνει ότι τμήμα του ανθρακικού απατίτη αποκτά δομή AB.

Η κορυφή που εμφανίζεται στα  $1239\text{ cm}^{-1}$  δεν είναι απλή. Εκτιμάται ότι στην περιοχή αυτή αντιστοιχούν οι δονήσεις, οι οποίες οφείλονται στην δόνηση τάσης της ομάδας  $\text{-C-N}$  σε συνδυασμό με την δόνηση κάμψης της ομάδας  $\delta\text{C-NH}$  του πεπτιδικού δεσμού του Amide III των πρωτεϊνών. Στην ίδια περιοχή συνυπάρχουν και οι ταινίες των ομάδων  $\text{C-OH}$  των σακχάρων (γλυκάνες) των οστών. Πρέπει να σημειωθεί εδώ, ότι δεν εμφανίζονται ταινίες στα  $1123\text{ cm}^{-1}$ ,  $1143\text{ cm}^{-1}$  και  $1145\text{ cm}^{-1}$  που σημαίνει ότι το συγκεκριμένο δείγμα μας δεν περιέχει όξινα φωσφορικά ιόντα ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) [62].

Οι επόμενες κορυφές που εμφανίζονται στα  $1096\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1028\text{ cm}^{-1}$ , αποδίδονται αντίστοιχα στην αντισυμμετρική δόνηση τάσης  $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$  και στην συμμετρική δόνηση τάσης  $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$  της ομάδας  $-\text{PO}_4^{3-}$ , των φωσφορικών ιόντων του υδροξυαπατίτη. Σύμφωνα με τους Gadaletaetal η μικρή κορυφή που παρουσιάζεται στα  $1118\text{ cm}^{-1}$ , [56,59,60] έχει βρεθεί σε ώριμους υδροξυαπατίτες με μικρό βαθμό κρυσταλλικότητας. Η κορυφή στα  $1027\text{ cm}^{-1}$  οφείλεται στην συμμετρική δόνηση τάσης των φωσφορικών ιόντων  $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ . Η δόνηση αυτή σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα [11-18, 58-62] δεν είναι απλή, αλλά αποτελείται από δύο κορυφές πολύ κοντινές μεταξύ τους, στα  $1020\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1030\text{ cm}^{-1}$ . Ο λόγος των δύο αυτών κορυφών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του μέτρου κρυσταλλικότητας του υδροξυαπατίτη. Ιδιαίτερα, η κορυφή στα  $1020\text{ cm}^{-1}$  είναι χαρακτηριστική του μη στοιχειομετρικού και με μικρό βαθμό κρυσταλλικότητας βιολογικού απατίτη που περιέχει όξινα φωσφορικά και ανθρακικά ιόντα ενώ η κορυφή στα  $1030\text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχεί σε στοιχειομετρικό υδροξυαπατίτη με μεγάλο βαθμό κρυσταλλικότητας. Στην περιοχή  $600\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  απεικονίζονται οι χαρακτηριστικές ταινίες που οφείλονται στις δονήσεις κάμψης των φωσφορικών ιόντων του υδροξυαπατίτη ( $\nu_3, \nu_4\text{PO}_4^{3-}$ ). Από τις κορυφές του φάσματος (Σχήμα 6.1) οι ταινίες στα  $603\text{ cm}^{-1}$  και στα  $560\text{ cm}^{-1}$  αποδίδονται στην τριπλά εκφυλισμένη δόνηση κάμψης  $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ .

## 6.2. FT-IR φάσματα καρκινικού οστού από πρωτοπαθή εστία μαστού

Η μετάσταση του καρκίνου από τον μαστό στα οστά των ασθενών είναι συνήθης και οδηγώντας συχνά μικροθραύσματα (microfractures) των οστών, προκαλώντας σημαντικά προβλήματα στην ποιότητα της ζωής τους. Το Σχήμα (6.7) δείχνει τα FT-IR φάσματα υγιούς οστού (α) και οστού με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία μαστού, το οποίο έχει ληφθεί από βραχίονα ασθενούς.

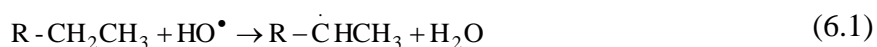


**Σχήμα 6. 7:** FT-IR φάσματα *a*: οστού βραχίονα ασθενούς με δευτεροπαθή καρκίνο από πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού και *b*: υγιούς οστού στην περιοχή του φάσματος 4000-400  $cm^{-1}$ .

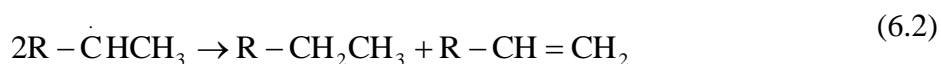
Η σύγκριση μεταξύ των φασμάτων δείχνει σημαντικές διαφορές σε όλη την έκταση του φάσματος από 4000-400  $cm^{-1}$ . Η ένταση της ταινίας στα 3550  $cm^{-1}$  περίπου, όπου εμφανίζεται ως ώμος για το υγιές οστό, στο καρκινικό οστό είτε είναι μειωμένη είτε εξαφανίζεται πλήρως, ανάλογα με το κλινικό ιστορικό του ασθενούς. Η μαθηματική επεξεργασία της χαρακτηριστικής αυτής ταινίας δείχνει ότι είναι διπλή με δύο μέγιστα στις θέσεις 3570  $cm^{-1}$  και 3450  $cm^{-1}$ , οι οποίες αποδίδονται στην δόνηση τάσης των ομάδων  $\nu OH$  του νερού και του υδροξυαπατίτη, αντίστοιχα [10-29]. Η μείωση της έντασης των ταινιών αυτών εξαρτάται από την απασβέστωση (αφαλάτωση) των οστών λόγω της ασθένειας, η οποία τελικά οδηγεί στην οστεόλυση. Η πλατειά ταινία στην περιοχή μεταξύ 3300-3000  $cm^{-1}$  αποτελείται επίσης από τις ταινίες 3299  $cm^{-1}$  και 3187  $cm^{-1}$ , οι οποίες αποδίδονται στις δονήσεις τάσης των  $\nu NH$  ομάδων με δεσμό υδρογόνου. Στα καρκινικά οστά η ταινία από τα 3299  $cm^{-1}$  μετατοπίζεται προς μικρότερους κυματάρθμους και βρίσκεται στα 3277  $cm^{-1}$  ενώ η ένταση της δεύτερης ταινίας στα 3187  $cm^{-1}$  μειώνεται σημαντικά. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι στον μεταστατικό καρκίνο η δομή των πρωτεϊνών μεταβάλλεται σημαντικά από την ασθένεια. Η μετατόπιση προς μικρότερους κυματάρθμους δείχνει την αύξηση των ελευθέρων τερματικών ομάδων  $-NH_2$  καθώς και την μείωση των ομάδων  $-NH$  οι οποίες σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου. Η αύξηση του αριθμού των  $NH_2$  ομάδων δείχνει επίσης ότι η ασθένεια προκαλεί σχάσεις

των κλώνων των πρωτεϊνών σε θέσεις πεπτιδικών δεσμών. Η σχάση των κλώνων έχει ως αποτέλεσμα τα θραύσματα των πρωτεϊνών να μη σχηματίζουν πλέον ούτε διαμοριακούς ούτε ενδομοριακούς δεσμούς μέσω δεσμού υδρογόνου. Από τα παραπάνω δεδομένα συμπεραίνεται ότι η απασβέστωση των οστών επηρεάζει την δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών. Δεν μπορεί να απαντηθεί άμεσα αν η απασβέστωση προκαλεί την καταστροφή της δομής των πρωτεϊνών ή αν πρώτα καταστρέφεται η πρωτεΐνη και ακολουθεί η απασβέστωση.

Η πλατειά ταινία στα  $3060\text{ cm}^{-1}$ , αποδίδεται στην δόνηση  $\nu\text{CH}$  τερματικής ολεφινικού τύπου ( $\nu\text{C}=\text{CH}_2$ ) ομάδας [19-21]. Οι ταινίες των δονήσεων τάσης των αντισυμμετρικών  $\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$  και  $\nu_{\text{s}}\text{CH}_3$  μεθυλομάδων βρίσκονται στα  $2965\text{ cm}^{-1}$  και  $2880\text{ cm}^{-1}$ , αντίστοιχα, ενώ οι αντίστοιχες δονήσεις των μεθυλομάδων  $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$  και  $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$  εμφανίζονται στους  $2924\text{ cm}^{-1}$  και  $2854\text{ cm}^{-1}$  κυματαριθμούς, αντίστοιχα [10-29]. Οι θέσεις των ταινιών απορρόφησης δεν μεταβάλλονται, αλλά στα καρκινικά οστά η έντασή τους αυξάνει σημαντικά. Οι αυξήσεις αυτές δείχνουν την μεταβολή του περιβάλλοντος των κυττάρων, οι οποίες προέρχονται από τις βιοχημικές διαφοροποιήσεις των βιολογικών μακρομορίων (λιπίδια, φωσφολιπίδια) τα οποία σχηματίζουν την μεμβράνη των κυττάρων [64,65]. Η αύξηση της έντασης συνδέεται επίσης με την μείωση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας των μακρομορίων, λόγω της ασθένειας [10,19-21]. Το εύρημα αυτό δείχνει ότι για να μειώνεται το μήκος των ανθρακικών αλυσίδων πρέπει να σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου κατά τον μεταβολισμό και το οξειδωτικό στρες του ασθενούς [19-21,44,65]. Η αντίδραση αρχίζει με απόσπαση από τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου ατόμου υδρογόνου από τις ανθρακικές αλυσίδες των λιπιδίων:



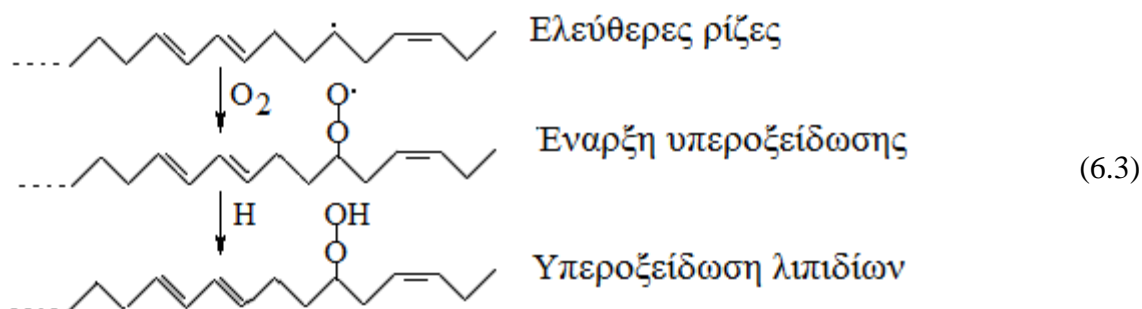
Η παραγόμενη ελεύθερη ρίζα δεν είναι σταθερή και διασπάται σε δύο μικρότερα μόρια (αντίδραση δυσαναλόγησης, dismutase).



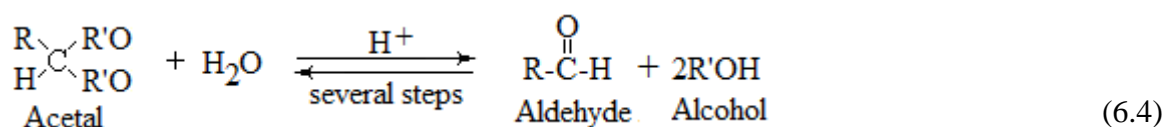
Με τον τρόπο αυτό μειώνεται το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας, όπως συμπεραίνεται από τα υπέρυθρα φάσματα. Οι αντιδράσεις αυτές ερμηνεύουν ικανοποιητικά την

εμφάνιση της ταινίας στα  $3060\text{ cm}^{-1}$ . Η ένταση της ταινίας εξαρτάται από την εξέλιξη της αντίδρασης (6.1) και της ανάπτυξης της ασθένειας.

Ενδιαφέρον εμφανίζει η νέα ταινία στα  $1744\text{ cm}^{-1}$ , η οποία αποδίδεται στις δονήσεις τάσης της ομάδας του καρβονυλίου  $\nu\text{C}=\text{O}$  αλδεϋδικού (-CHO) και κετονικού (CO) χαρακτήρα. Η ταινία αυτή εμφανίζεται σε όλα τα φάσματα των καρκινικών οστών και δηλώνει την υπεροξειδωση των λιπιδίων λόγω της ασθένειας. Προκειμένου να ερμηνευτεί ο σχηματισμός των αλδεϋδικών ομάδων πρέπει να γίνει δεκτό ότι γίνεται υπεροξειδωση των πρωτεϊνών [59,65]. Πράγματι, ο ανθρώπινος οργανισμός ως αερόβιος διαθέτει οξυγόνο και επομένως οι σχηματιζόμενες ελεύθερες ρίζες των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων των μεμβρανών αντιδρούν ταχύτατα με το οξυγόνο του οργανισμού σχηματίζοντας υπερόξυλ ελεύθερες ρίζες ( $-\text{O}-\text{O}\cdot$ ) και τελικά υπεροξείδια (COOH) [19-21].



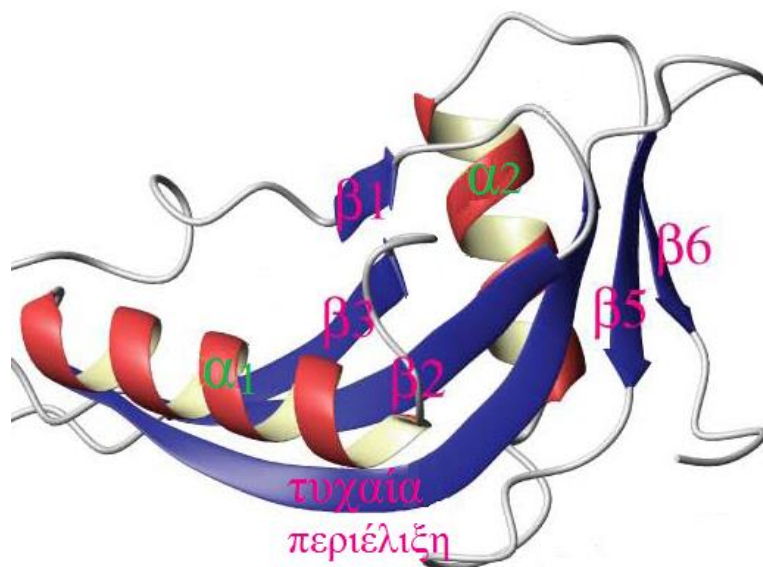
Οι παραγόμενες υπεροξυλ ελεύθερες ρίζες σύμφωνα με την παρακάτω γενική αντίδραση παρέχουν τελικά αλδεϋδες.



Είναι γνωστό ότι ο σχηματισμός των αλδεϋδών έχει ανιχνευθεί στην ανάπτυξη του καρκίνου και αποτελεί δείκτη της εξέλιξης της ασθένειας. Η χαρακτηριστική ταινία στα  $1740\text{ cm}^{-1}$  μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως «διαγνωστική» ταινία επισήμανσης του καρκίνου με την υπέρυθη φασματοσκοπία [19-21]. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι για να σχηματισθεί η χαρακτηριστική αυτή εστερική ομάδα ( $\text{RO}-\text{C}=\text{O}$ ) πρέπει η υπεροξειδωση των λιπιδίων να αποτελούν ένα από τα μονοπάτια ανάπτυξης της μετάστασης του

καρκίνου στα οστά [10]. Η υπόθεση αυτή οδηγεί στην παραδοχή ότι απαιτείται ανοσοποιητικού τύπου (μη αντιγονική) διαδικασία για την ανάπτυξη του καρκίνου.

Σημαντικές επίσης είναι οι μεταβολές του φάσματος των καρκινικών οστών ως προς τα υγιή στην περιοχή  $1700-1500\text{ cm}^{-1}$ . Στην περιοχή αυτή, όπως προαναφέρθηκε απορροφούν οι δονήσεις κάμψης των ομάδων NH των πρωτεϊνών. Από την μετατόπιση της ταινίας από τα  $1655\text{ cm}^{-1}$  περίπου της απορρόφησης των δονήσεων των Amide I των πρωτεϊνών προς μικρότερους κυματαριθμούς, στα  $1630\text{ cm}^{-1}$ , συνεπάγεται ότι το κολλαγόνο και οι μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες των οστών έχουν αλλάξει δευτεροταγή διαμόρφωση και η μοριακή τους δομή από  $\alpha$ -έλικα μετατράπηκε σε τυχαία ελικοειδή περιέλιξη (Εικόνα 6.1) [19,21,48].



**Εικόνα 6. 1:** Σχηματική παράσταση της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών. Παρατηρούνται η  $\alpha$ -έλικα, η  $\beta$ -αναδίπλωση ( $\beta$ -turn),  $\beta$ -επίπεδο ( $\beta$ -sheet) και η τυχαία περιέλιξη

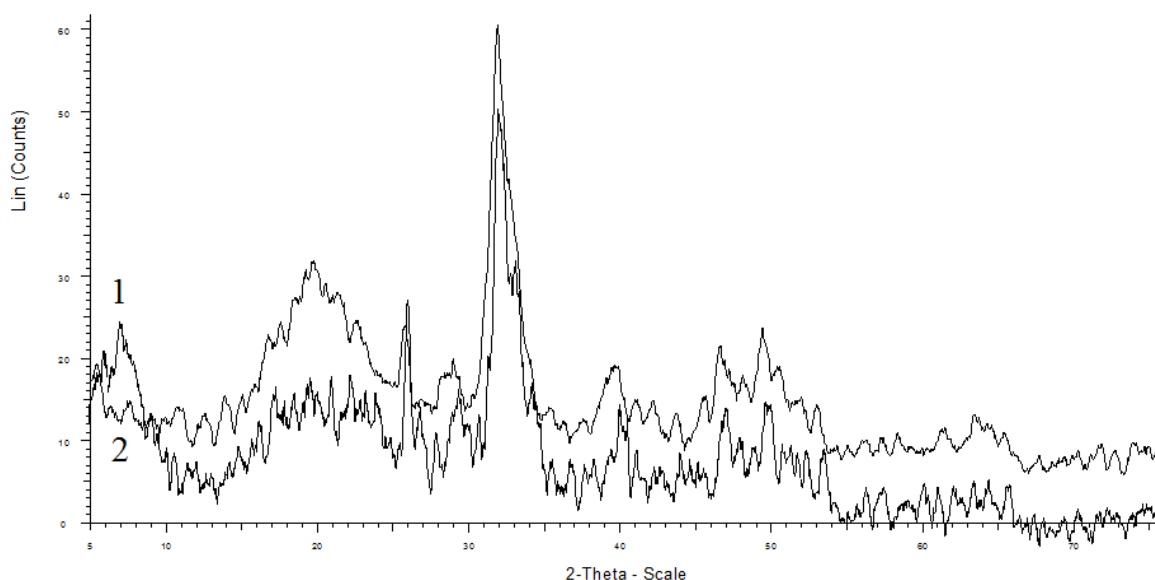
Υπολογίζοντας τους λόγους των ταινιών των [Amide I]:[Amide II] στις θέσεις των μεγίστων παρατηρήθηκε ότι οι τιμές των λόγων μειώνονται από 1,3 που ισχύει για τα υγιή οστά [15-18,59] στα 1.1 για τα καρκινικά [10]. Αν και η διαφορά είναι μικρή, όμως είναι συστηματική σε όλα τα δείγματα. Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε πρωτοπαθείς καρκινικούς ιστούς του μαστού και του εντέρου [68-70].

Σημαντική είναι και η μείωση των ταινιών μεταξύ  $1450-850\text{ cm}^{-1}$ , όπου απορροφούν οι χαρακτηριστικές ομάδες των ανόργανων συστατικών του οστίτη ιστού. Η

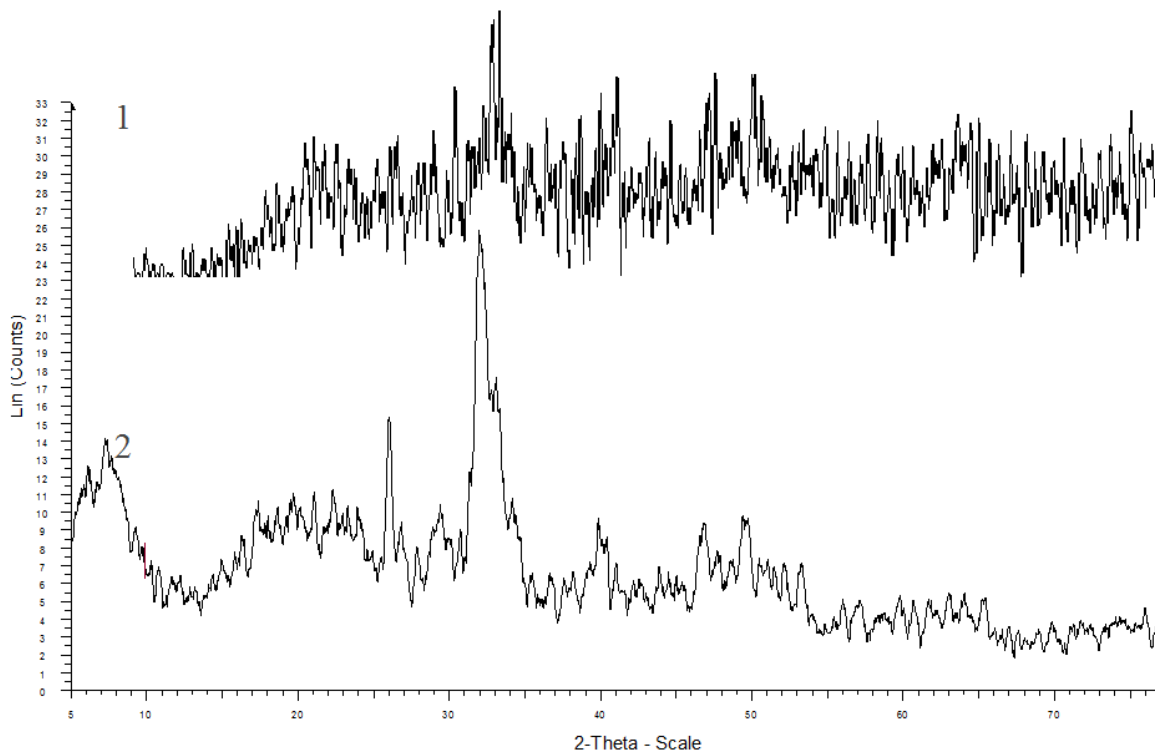


μείωση ερμηνεύει την παρατηρούμενη οστεόλυση των οστών των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο στα οστά και τα κλινικά δεδομένα. Ιδιαίτερα οι ταινίες των αντισυμμετρικών και συμμετρικών δονήσεων τάσης των φωσφορικών ομάδων  $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$  στα  $1096\text{ cm}^{-1}$  και  $1028\text{ cm}^{-1}$  σχεδόν εξαφανίζονται, ενώ η ταινία γίνεται πιο πλατειά. Από την μορφή της ταινίας συνάγεται το συμπέρασμα ότι το οστό δεν φαίνεται να αποτελείται από υγιή βιολογικό υδροξυαπατίτη, αλλά από μη κολλαγονούχα φωσφορικά άλατα [58].

Για να διαπιστώσουμε τις βλάβες τις οποίες προκαλεί η ασθένεια στην μοριακή δομή του υδροξυαπατίτη, χρησιμοποιήσαμε την τεχνική των ακτίνων περίθλασης X, XRD (X-Ray Diffraction) ανάλυσης. Στο Σχήμα 6.8 δίνεται το XRD φάσμα σπογγώδους μοίρας καρκινικού οστού της ασθενούς με πρωτοπαθή εστία μαστού (Σχήμα 6.8,1) και για σύγκριση του βιολογικού υδροξυαπατίτη (Σχήμα 6.8,2). Από την σύγκριση φαίνεται ότι στο οστό υπάρχει βιολογικός υδροξυαπατίτης μικρής κρυσταλλικότητας. Στο συμπέρασμα αυτό οδηγούμαστε λόγω της πλατειάς ταινίας περίπου στα  $2\theta=20$  η οποία αντιστοιχεί στο κολλαγόνο, ενώ ανιχνεύεται δομή καλσίτη και αλάτων  $\text{CaHPO}_4$ , σε συμφωνία με τα φαστοσκοποπικά μας δεδομένα και την βιβλιογραφία [71,72]. Η πλατειά ταινία, στο  $2\theta=20$  δείχνει την επικράτηση του κολλαγόνου, επιβεβαιώνοντας κρατούσα οστεοπενία, λόγω της ασθένειας.



**Σχήμα 6. 8:** XRD διαγράμματα 1; σπογγώδους οστού από βραχίονα ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο των οστών από πρωτοπαθή εστία μαστού και 2; Υδροξυαπατίτη



**Σχήμα 6. 9:** XRD διαγράμματα 1; φλοιώδους οστού από βραχίονα ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο των οστών από πρωτοπαθή εστία μαστού και 2; Υδροξυαπατίτη

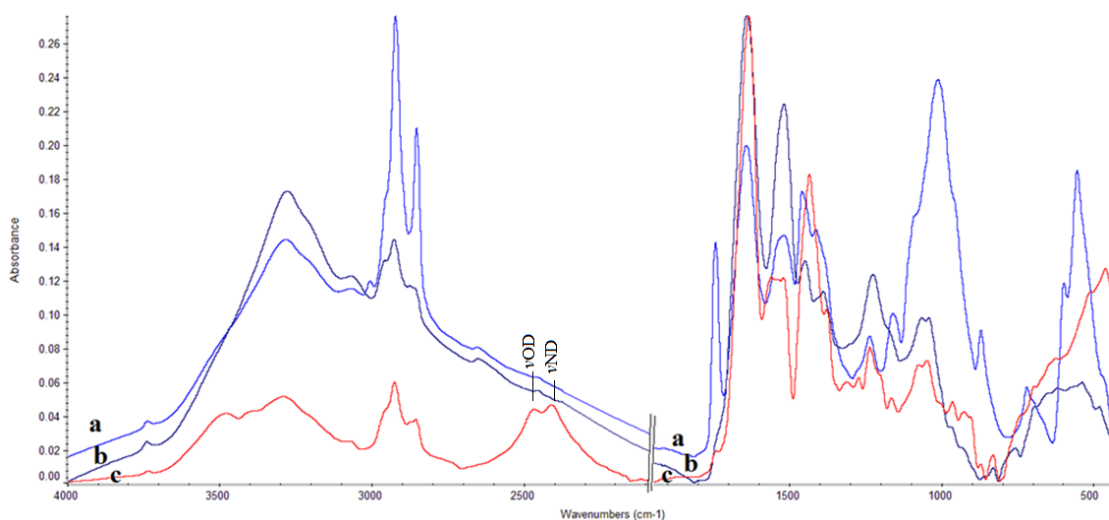
Εφαρμόζοντας την εξίσωση των Debye-Scherrer και από τις τιμές  $\beta$  υπολογίστηκε το μέγεθος των απατιτικών κρυστάλλων για τα δείγματα:

$$D = \frac{0,9\lambda}{\beta \cos\theta}$$

Όπου  $D$  είναι το μέγεθος του κρυστάλλου σε  $\text{\AA}$ ,  $\lambda$  το μήκος κύματος των προσπίπτουσών ακτίνων  $X=1,54 \text{ \AA}$ ,  $\beta$  το εύρος στο ήμισυ του ύψους της ανάκλασης και  $\cos\theta$  είναι το συνημίτονο της προσπίπτουσας γωνίας των ακτίνων  $X$  ( $25,85^\circ$ ). Με τον τρόπο αυτό υπολογίστηκε ότι το μέγεθος των κρυστάλλων είναι περίπου  $15 \text{ \AA}$ . Οι τιμές αυτές είναι πολύ μικρότερες των  $20\text{-}25 \text{ nm}$  των φυσιολογικών οστών [59].

### 6.2.1. Επεξεργασία οστών με εξάνιο και δευτεριωμένο νερό

Επειδή τα φάσματα ήταν πολύπλοκα, για ευρύτερη μελέτη και κατανόηση της ασθένειας, τμήμα του δείγματος των οστών τοποθετήθηκε σε διάλυμα εξανίου και το υπόλοιπο τμήμα σε διάλυμα δευτερίου. Με τον τρόπο αυτό επιδιώχθηκε αφενός μεν η απομάκρυνση των μικρού μοριακού βάρους οργανικών θραυσμάτων των ιστών λόγω της ασθένειας, αφετέρου η αντικατάσταση των ευκίνητων ατόμων υδρογόνου από άτομα δευτερίου ( $^2\text{H}$ , ή D) [25] τα οποία επηρεάζουν τους δεσμούς υδρογόνου. Στο Σχήμα 6.10a και στον Πίνακα 6.2 δίνονται τα υπέρυθρα φάσματα οστού και ο χαρακτηρισμός τους, αντίστοιχα, τα οποία προήλθαν από ασθενή με δευτεροπαθή (μετάσταση) καρκίνο από πρωτοπαθή εστία μαστού πριν την επεξεργασία (Σχήμα 6.10a) μετά την επεξεργασία με εξάνιο (Σχήμα 6.10b) και μετά την δευτερίωση (Σχήμα 6.10c). Παρατηρείται ότι μετά την επεξεργασία με εξάνιο (Σχήμα 6.10b) οι ταινίες οι οποίες αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσεις των μεθυλ και μεθυλενομάδων στην περιοχή  $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$  μειώνονται σημαντικά. Η μείωση των ταινιών αποδίδεται στην απομάκρυνση των μικρού μοριακού βάρους αλειφατικών αλυσίδων οι οποίες προέκυψαν από την σχάση των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων. Η άποψη αυτή ενισχύεται από την μείωση των αντίστοιχων ταινιών στα  $1463\text{ cm}^{-1}$  περίπου, όπου απορροφούν οι δονήσεις κάμψης των ταινιών των μεθυλομάδων.

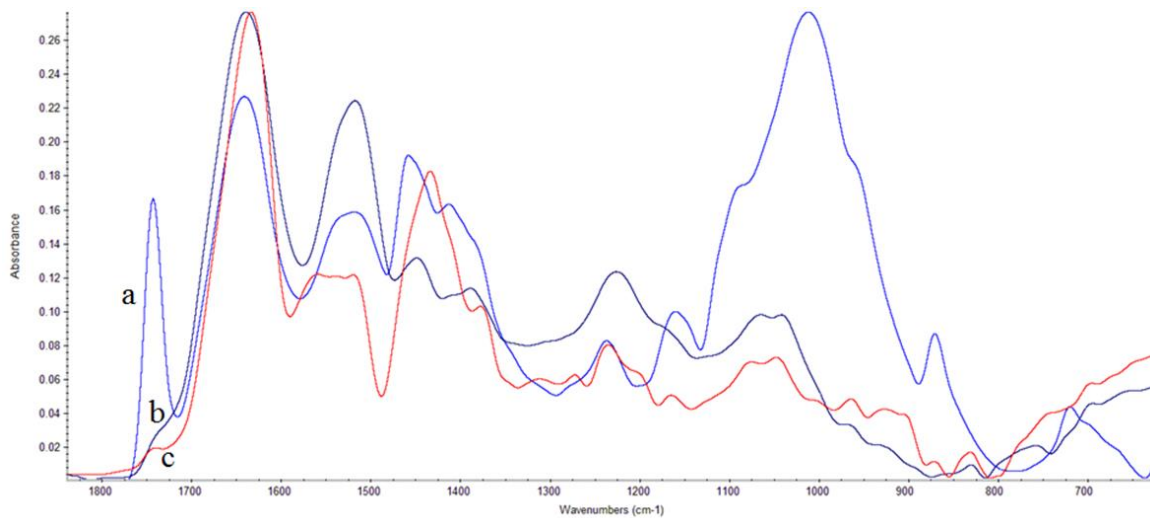


**Σχήμα 6. 10:** FT-IR φάσματα οστού ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία μαστού: a; Καρκινικό οστό, b; Μετά από πλήση με εξάνιο και c; Μετά από δευτερίωση. Περιοχή  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$

**Πίνακας 6. 2:** Σύγκριση χαρακτηριστικών ταινιών ως προς την επεξεργασία με εξάνιο και δευτεριωμένο νερό

οστό cm <sup>-1</sup>	Εξάνιο cm <sup>-1</sup>	D <sub>2</sub> O cm <sup>-1</sup>	Χαρακτηρισμός
3570	3569		Ελεύθερο νOH του H <sub>2</sub> O και του υδροξυαπατίτη
		3400	νNH
3280	3278	3290	νNH, Hb
3072	3072		Ολεφινικός δεσμόςC=CH
3006			=CH αρωματικό
2921	2927	2925	ν <sub>ασυμ</sub> CH <sub>2</sub>
2855	2855	2855	ν <sub>συμ</sub> CH <sub>2</sub>
		2469	νOD
		2428	νND
1735	1740	1738	C=O μη-ιοντισμένο, εστέρας λιπιδίων
	1670	1663	β-αντιπαράλληλη αμυλοειδούς τύπου
1650			Amide I, α-έλικα, νC=O & δC-N(I)
1635	1631	1633	Κολλαγόνο σε τυχαία έλικα
1593		1588	AmideII
1548	1552	1548	AmideII, α-έλικα
		1510	ν <sub>as</sub> COO <sup>-</sup> & τυχαία δομή
1461			δ <sub>as</sub> CH <sub>3</sub> , ν <sub>3</sub> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> αραγωνίτης
1448	1444	1450	δCH <sub>3</sub>
1430			C-OH του HA
	1410		ν <sub>3</sub> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> καλσίτης
1400		1400	νCOO <sup>2-</sup>
1379			δ <sub>s</sub> CH <sub>3</sub> των λιπιδίων και πρωτεϊνών
		1278	AmideIII, α-έλικα
1234	1237	1235	AmideIII, β-αναδίπλωση
1151		1160	σακχαρίτες
1145			δεσοξυριβόζη του DNA
	1113	1115	ν <sub>1</sub> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> καλσίτης
1080		1060	σακχαρίτες
		1016	Γλυκοζιλύωση
968	960	953	δεσοξυριβόζη του DNA
	874	869	ν <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> καλσίτης
		792	<sup>+</sup> NH <sub>3</sub>
719			CH <sub>2</sub> , o-o-p
600			δO-P-O <sup>-</sup>
553			δO-P-O <sup>-</sup>

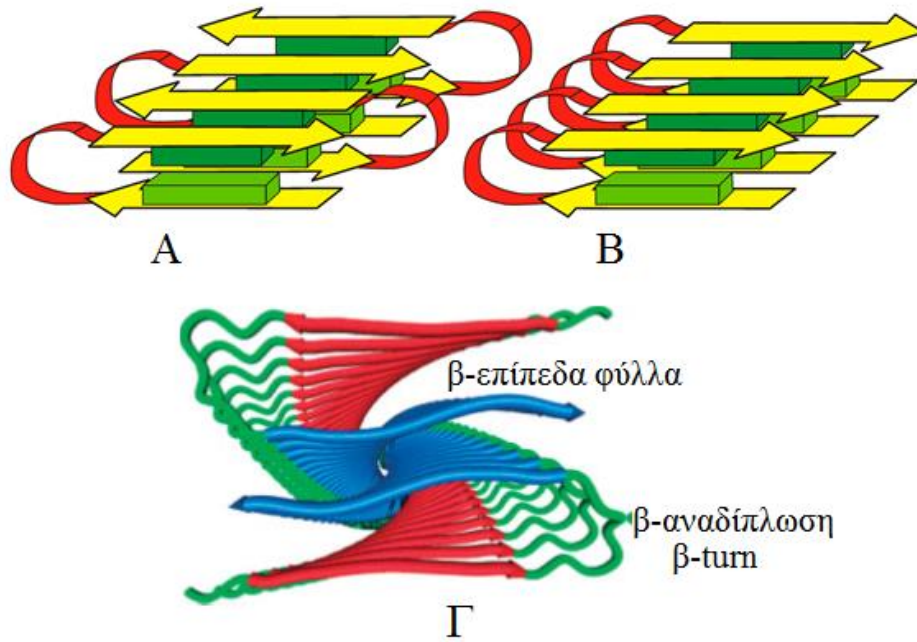
Επίσης, στην περιοχή του υπέρυθρου φάσματος 1700-400 cm<sup>-1</sup> (Σχήμα 6.10) διαπιστώνεται ότι μετά την επεξεργασία με εξάνιο μειώνεται δραστικά η ταινία στα 1744 cm<sup>-1</sup>, η οποία έχει αποδοθεί στον σχηματισμό εστερικού καρβοξυλίου [19-21].



**Σχήμα 6. 11:** FT-IR φάσματα οστού ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία μαστού: a; Καρκινικό οστό, b; Μετά από εξάνιο και c; Μετά από δευτερίωση. Περιοχή  $1700-400\text{ cm}^{-1}$

Η μείωση της έντασης και αύξηση του πλάτους της ταινίας στα  $1510\text{ cm}^{-1}$  η οποία αποδίδεται στην ταινία κάμψης των Amide II, μετά την επεξεργασία με εξάνιο δείχνει ότι είναι μικτή και αποτελείται από πρωτεΐνες του κυττάρου και πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους αμυλοειδούς τύπου, ως προϊόντα της σχάσης των πρωτεϊνών και σακχάρων, λόγω της ασθένειας [73,74]. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και από την μείωση της έντασης των ταινιών στην περιοχή  $1300-1100\text{ cm}^{-1}$  [10,19-21].

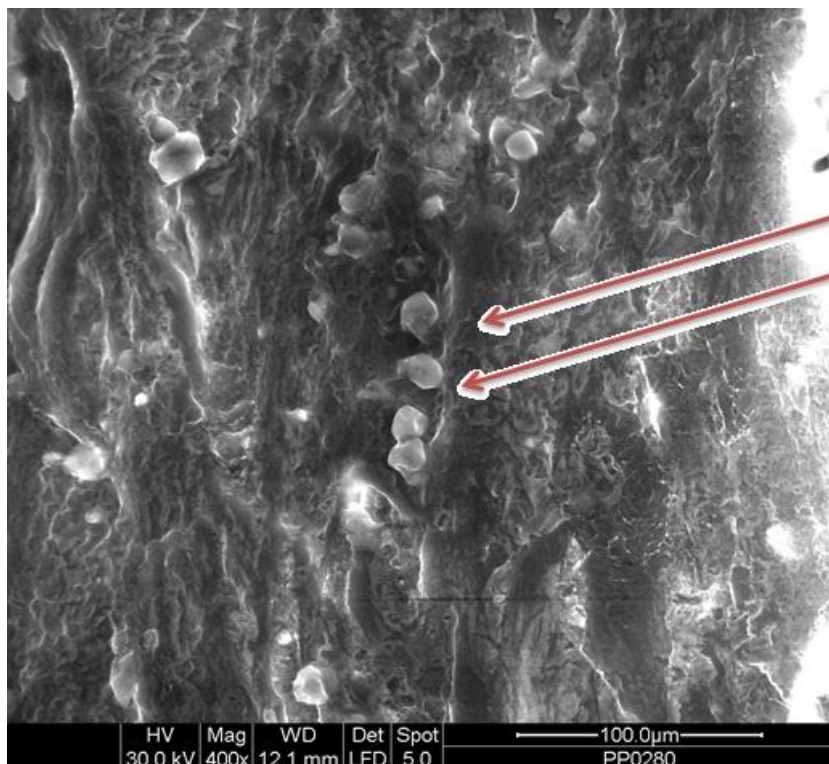
Το Σχήμα 6.12 δείχνει την διαμόρφωση την οποία αποκτούν οι αμυλοειδούς τύπου πρωτεΐνες σε αντιπαράλληλη ( $1690\text{ cm}^{-1}$ ) και παράλληλη διαμόρφωση ( $1510\text{ cm}^{-1}$ ).



**Σχήμα 6. 12:** Δευτεροταγής δομή αμυλοειδούς τύπου πρωτεϊνών. *A:* αντιπαράλληλη διάταξη, *B:* παράλληλη διάταξη σε β-επίπεδα και *Γ:* Σχηματισμός β-έλικας

Ο σχηματισμός αμυλοειδών πρωτεϊνών ευνοείται από τις αντιδράσεις ελευθέρων ριζών κατά την εξέλιξη της ασθένειας. Ενισχύει δε την παραδοχή ότι κατά την ανάπτυξη του καρκίνου παράγονται ελεύθερες ρίζες, οι οποίες οδηγούν σε προϊόντα σπάσης των αλυσίδων των πρωτεϊνών. Τα θραύσματα των πρωτεϊνών αντιδρούν με τα παραγόμενα σάκχαρα σχηματίζοντας τελικά πολυμερή αμυλοειδούς τύπου. Για τον λόγο αυτόν η πρωτοταγής δομή (αλληλουχία βάσεων) των αμυλοειδών πρωτεϊνών δεν είναι σταθερή αλλά τυχαία. Εξ άλλου, οι αμυλοειδούς τύπου πρωτεΐνες σχηματίζονται σε πολλές ασθένειες πέραν των Parkinson και Alzheimer [73,74].

Ανάλυση του δείγματος με SEM μικροσκόπιο έδειξε σημαντικές μεταβολές της μορφολογίας του οστού (Εικ. 6.2).



**Εικόνα 6. 2:** SEM απεικόνιση οστού ασθενούς με μετάταση από πρωτοπαθή εστία μαστού. Τα βέλη δείχνουν τα συσσωματώματα των αμυλοειδούς τύπου πρωτεϊνών

Στην Εικόνα 6.2 δίνεται η SEM απεικόνιση της μορφολογίας οστού ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο από πρωπαθή εστία μαστού. Η αρχιτεκτονική και μορφολογία της επιφάνειας του δείγματος προσομοιάζει με την απεικόνιση αμυλοειδούς τύπου πρωτεϊνών, όπως συμπεραίνεται από τους μικρούς κύκλους οι οποίοι επισημαίνονται με τα βέλη. Είναι γνωστό ότι οι αμυλοειδούς τύπου πρωτεΐνες αυτοοργανώνονται και σχηματίζουν συσσωματώματα και ινίδια [68,69]. Η απεικόνιση των αμυλοειδών πρωτεϊνών επιβεβαιώνει τα ευρήματα των υπερύθρων φασμάτων στις περιοχές του φάσματος μεταξύ  $1700-1500\text{ cm}^{-1}$  και  $1200-900\text{ cm}^{-1}$ , όπου απορροφούν οι πρωτεΐνες και τα σάκχαρα, αντίστοιχα. Επίσης επιβεβαιώνεται και η συμμετοχή των ελευθέρων ριζών σε ένα από τα στάδια της ασθένειας. Ο σχηματισμός των προϊόντων πρέπει να προκύπτει από την αντίδραση των θραυσμάτων των πρωτεϊνών με τους παραγόμενους πολυσακχαρίτες και να σχηματίζουν πολυμερή τα οποία δεν έχουν σταθερή αλληλουχία, αλλά τυχαία.

Από τις μετατοπίσεις των ταινιών οι οποίες παρατηρούνται στο φάσμα των οστών μετά την δευτερίωση (Σχήμα 6.10c) διαπιστώνεται ότι στον οστίτη ιστό επικρατούν

αρκετοί δεσμοί υδρογόνου. Οι νέες ταινίες στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 2500-2800  $\text{cm}^{-1}$ , οφείλονται στις δονήσεις των νOD και νND ομάδων των πρωτεϊνών, όπως προκύπτει από την εφαρμογή της σχέσης:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{\kappa}{\mu}}$$

Όπου  $\tilde{\nu}$  η συχνότητα σε κυματαριθμούς,  $\kappa$  η σταθερά δεσμού και  $\mu$  η ανηγμένη μάζα

$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{m_H} + \frac{1}{m_D}$  και  $m_H$  και  $m_D$  οι μάζες των ατόμων υδρογόνου και δευτερίου, αντίστοιχα

[25].

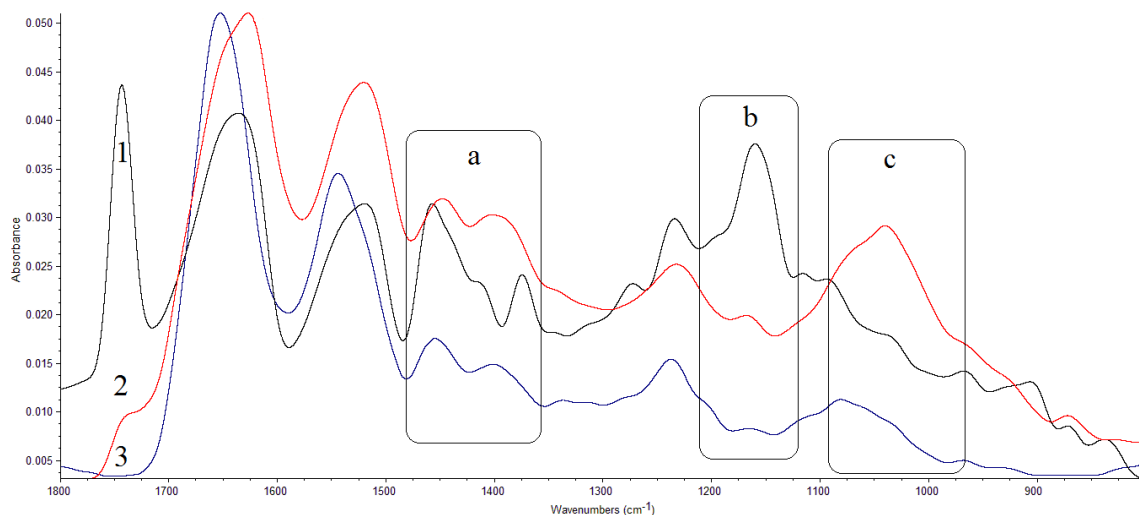
Οι μετατοπίσεις προς μικρότερους κυματαριθμούς στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 1800-900  $\text{cm}^{-1}$ , δείχνουν ότι οι δεσμοί υδρογόνου επηρεάζονται από την αντικατάσταση του υδρογόνου με δευτέριο και είναι πιο ισχυροί. Το ίδιο συμβαίνει και με τις ταινίες οι οποίες αποδίδονται στους σακχαρίτες (Πίνακας 6.2). Οι μετατοπίσεις κυρίως στην περιοχή του φάσματος 1200-900  $\text{cm}^{-1}$ , όπου αναμένονται οι χαρακτηριστικές ταινίες του υδροξυαπατίτη, επιβεβαιώνουν την οστεοπενία του οστού του ασθενούς, δεδομένου ότι η δευτερίωση δεν θα επηρέαζε την δομή του υδροξυαπατίτη και επομένως θα έπρεπε να εμφανίζονται στο φάσμα (Σχήμα 6.11).

### **6.3. Σύγκριση FT-IR φασμάτων καρκινικών ιστών μαστού και οστών με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία μαστού**

Ένα από τα προβλήματα στην έρευνά μας ήταν η ανεύρεση ιστών από τους ίδιους ασθενείς σε πολλές φάσεις της ασθένειας, όπως σε μη μεταστατική κατάσταση και με μετάσταση, αλλά πριν και μετά την χορήγηση χημειοθεραπείας. Παρ όλες τις δυσκολίες από την εμπειρία του εργαστηρίου και τον μεγάλο σχετικά αριθμό ασθενών, διαπιστώθηκε ότι η σύγκριση των φασμάτων ήταν δυνατή, επειδή τα φάσματα εμφάνιζαν κοινή συμπεριφορά στις χαρακτηριστικές περιοχές των φασμάτων. Στο Σχ. 6.12 δίνονται για σύγκριση τα υπέρυθρα φάσματα οστού βραχίονα (1) από ασθενή με μετάσταση από διηθητό αδενοκαρκίνωμα μαστού ασθενούς με grade II στάδιο IV με πολλαπλές οστεολύσεις, από το οστό της ίδιας ασθενούς μετά από επεξεργασία με εξάνιο (2) και ιστό μαστού καρκίνου grade II (3), προερχόμενο από άλλη ασθενή. Η επεξεργασία με



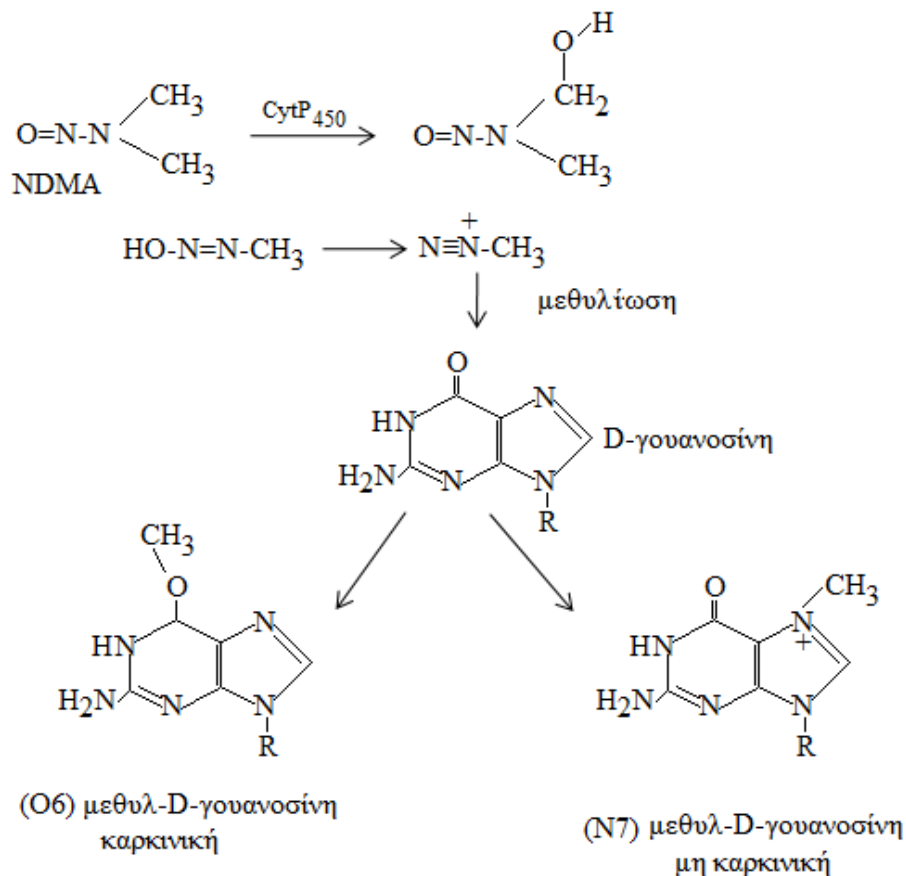
εξάνιο θεωρήθηκε απαραίτητη τόσο επειδή θέλαμε να μελετήσουμε το φάσμα μετά την απομάκρυνση των υπεροξειδωμένων οργανικών συστατικών στην περιοχή των 1740 περίπου κυματαριθμών, αλλά και επειδή τα δείγματα του μαστού ήταν από πλακίδια παραφίνης, όπου για την απομάκρυνσή της χρησιμοποιήθηκε εξάνιο και επομένως θα απομάκρυνε μαζί με την παραφίνη τα διαλυτά συστατικά του καρκινικού ιστού.



**Σχήμα 6. 13:** FT-IR φάσματα. 1; Καρκινικού οστού βραχίονα με μεταστατικό καρκίνο μαστού grade II, 2 ; Από το οστό της ίδιας ασθενούς μετά από πλύση με εξάνιο. και 3; Ιστού μαστού με πρωτοπαθή καρκίνο grade II.

Από τη σύγκριση των υπέρυθρων φασμάτων των ασθενών παρατηρείται ότι τα υπέρυθρα φάσματα εμφανίζουν κοινά χαρακτηριστικά, ιδιαίτερα μετά την επεξεργασία του οστού με εξάνιο. Διαπιστώνεται ότι μετά την επεξεργασία με εξάνιο του οστού δεν εμφανίζεται η ταινία στα  $1743\text{ cm}^{-1}$ , όπως ήταν αναμενόμενο αφού το είχαμε ήδη παρατηρήσει και σε άλλους ιστούς [19-21]. Το γεγονός ότι στο φάσμα του πρωτοπαθούς καρκινικού ιστού του μαστού δεν φαίνεται η ταινία αυτή αποδίδεται στο γεγονός ότι απομακρύνεται μετά την απομάκρυνση της παραφίνης με εξάνιο. Οι μετατοπίσεις των ταινιών των Amide I αποδίδονται στα προϊόντα τα οποία παράγονται κατά την ανάπτυξη της ασθένειας. Από την εμφάνιση στο φάσμα του καρκινικού οστού μετά την πλύση με εξάνιο (Σχ. 6.11) της ταινίας στα  $1662\text{ cm}^{-1}$  φαίνεται καθαρά η έναρξη της βλάβης κατά την οποία οι πρωτεΐνες αποκτούν αντιπαράλληλη διάταξη στον χώρο και μετά τυχαία περιέλιξη. Η εμφάνιση της αντιπαράλληλης διαμόρφωσης συνδέεται επίσης και με την γλυκοζυλίωση η οποία λαμβάνει χώρα στις πρωτεΐνες των ασθενών [73,74].

Στην περιοχή a φαίνεται η μεθυλίωση των ιστών. Είναι γνωστό ότι σε πολλούς καρκίνους κατά την καρκινογένεση γίνεται μεθυλίωση του DNA [74]. Η μεθυλίωση γίνεται με μηχανισμό ανάλογο με αυτόν της αντίδρασης της γουανίνης (βάσης του DNA) με την N-νιτροζοδιμεθυλ αμίνη (NDMA) σύμφωνα με το Σχήμα 6.14 [74-76]:



**Σχήμα 6. 14:** Σχηματική παράσταση της μεθυλίωσης της βάσης της γουανίνης

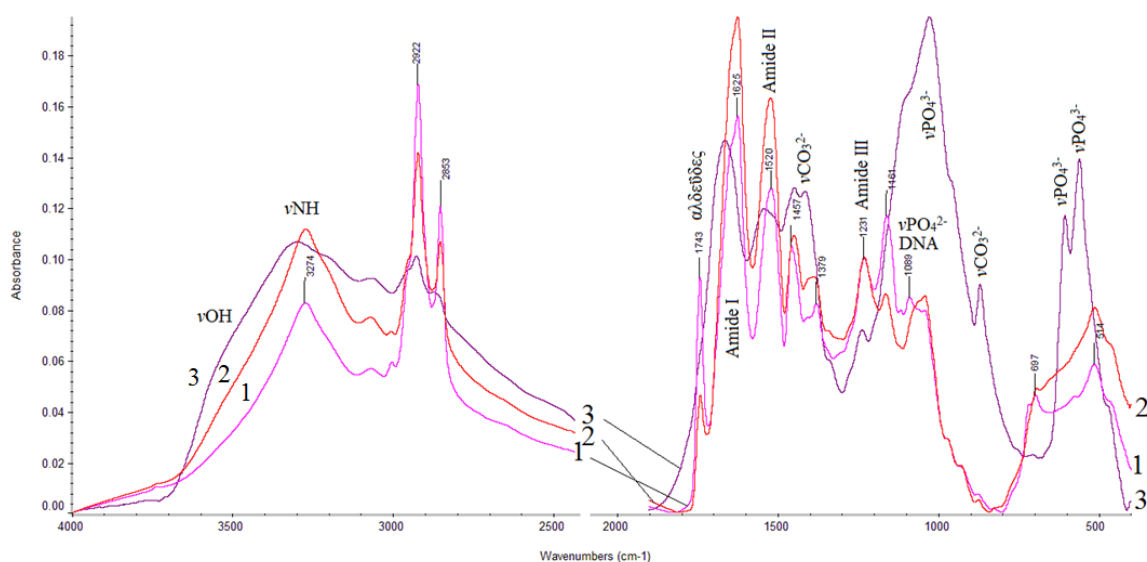
Η μεθυλίωση μπορεί να γίνει είτε στην θέση N7 είτε στην θέση O6 της βάσης της γουανίνης. Στην πρώτη περίπτωση το προϊόν δεν προκαλεί μεταλλάξεις ενώ στην δεύτερη περίπτωση οδηγεί σε καρκινογένεση. Η παρουσία του μεθυλίου στην θέση O6 της βάσης καταστρέφει τον δεσμό υδρογόνου στις θέσεις GpC (G=γουανίνη, C=κυτοσίνη) με αποτέλεσμα να χάνεται η ισορροπία της διπλής έλικας [75].

Η ίδια συμπεριφορά εμφανίζεται και στην περιοχή των γλυκανών (περιοχή b, Σχ.6.13). Οι εντάσεις των δονήσεων των ομάδων C–OH αυξάνουν στους καρκινικούς ιστούς και η μικρή μετατόπιση προς μικρότερους κυματάριθμους δείχνει την επίδραση της φωσφορυλίωσης του DNA στις ομάδες C–OP της ριβόζης. Σημαντική είναι η

ομοιότητα στην περιοχή  $c$ , όπου απορροφούν οι φωσφορικές ομάδες του DNA. Ιδιαίτερα μετά την επεξεργασία με εξάνιο το φάσμα του μαστού και του οστού δείχνουν σημαντική ομοιότητα και οι ταινίες στην περιοχή  $1100-900\text{ cm}^{-1}$  αποδίδονται αποκλειστικά στις δονήσεις κάμψης των ομάδων O-P-O του DNA [76]. Η πλατειά ταινία στα  $960\text{ cm}^{-1}$  συνδέεται με τον σχηματισμό μονοεστέρος, λόγω των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών και του DNA. [66-68,78,79]. Οι παρατηρούμενες αλλαγές δείχνουν ότι τα υπέρυθρα φάσματα δεν επηρεάζονται μόνον από την μεταβολή της μοριακής δομής των βιολογικών, αλλά και από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται.

#### 6.4. FT-IR φάσμα καρκινικού οστού με πρωτοπαθή εστία το αυτί

Ένας από τους σπάνια απαντώμενους μεταστατικούς καρκίνους στα οστά είναι ο προερχόμενος από πρωτοπαθή καρκίνο μέτριας διαφοροποίησης πλακωδών κυττάρων στο αυτί. Ο ασθενής, ηλικίας 82 ετών, είχε υποστεί από δεκαετίας χειρουργικό ακρωτηριασμό, λόγω της μετάστασης, αλλά δεν είχε υποβληθεί σε ακτινοθεραπεία, δεδομένου ότι οι καρκίνοι αυτού του τύπου εμφανίζουν αντοχή στην ακτινοβολία (radioresistant).



**Σχήμα 6. 15:** FT-IR φάσματα 1: φλοιώδους οστού 2: σπογγώδους οστού ασθενούς ηλικίας 82 ετών με παθολογικό κάταγμα άνω άκρου κερκίδας, 3 FT-IR φάσμα υγιούς οστού

Στο Σχήμα 6.15 τα FT-IR φάσματα 1 και 2 αντιστοιχούν στο φλοιώδες και πορώδες τμήμα του οστού ασθενούς με παθολογικό κάταγμα άνω άκρου κερκίδας, λόγω της

μετάστασης του καρκίνου και το φάσμα 3 είναι υγιούς οστού για σύγκριση. Από τη σύγκριση των FT-IR φασμάτων προκύπτουν σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ των διαφορετικών θέσεων του οστού του ασθενούς, όσο κυρίως μεταξύ παθολογικού και υγιούς οστού σε όλο το εύρος από  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ . Σημαντική είναι η εξοφάνιση της ταινίας στα  $3500\text{ cm}^{-1}$ , η οποία αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των ομάδων  $\nu\text{OH}$  των υδροξυλίων των κρυσταλλικών μορίων του νερού και του υδροξυαπατίτη. Η ταινία αυτή δείχνει την οστεόλυση την οποία έχει προκαλέσει η ασθένεια. Σημαντική είναι η μεταβολή της μορφής της ταινίας στα  $3274\text{ cm}^{-1}$ , η οποία μετατοπίζεται προς μικρότερους κυματριθμούς στο παθολογικό οστό. Η ταινία αυτή αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των ομάδων  $\nu\text{NH}$  των πρωτεϊνών. Από τις μεταβολές αυτές συνεπάγεται ότι οι πρωτεΐνες μετέβαλαν την δευτεροταγή τους δομή και ότι θα πρέπει να μεταβλήθηκε το είδος των δεσμών υδρογόνου του πεπτιδικού δεσμού, ο οποίος συγκρατεί την έλικα των πρωτεϊνών, αλλά και ο αριθμός των ελεύθερων ομάδων NH.

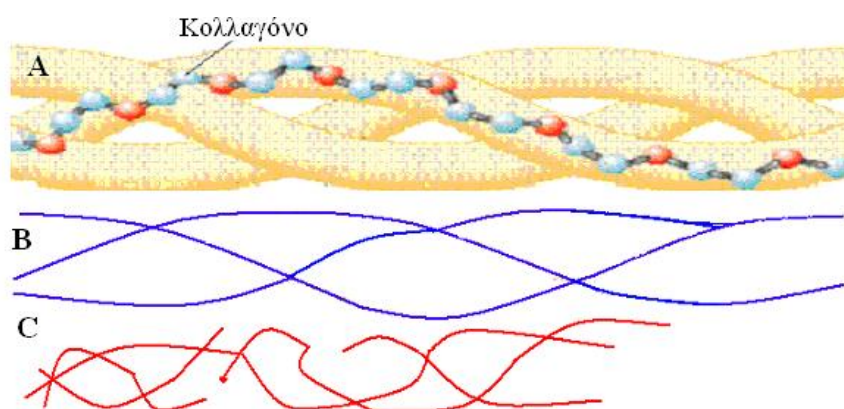
Σημαντική επίσης είναι η παρατηρούμενη αύξηση της έντασης των ταινιών στην περιοχή  $3000-2850\text{ cm}^{-1}$  στα φάσματα του σθενούς ως προς το υγιές οστό. Οι ταινίες αυτές αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης των ομάδων  $\nu\text{CH}_3$  και  $\nu\text{CH}_2$  των ανθρακικών αλυσίδων των λιπιδίων και φωσφορολιπιδίων, των δομικών δηλαδή μακρομορίων της κυτταρική μεμβράνης. Η ένταση των ταινιών αυτών εξαρτάται έντονα από το λιπόφιλο ή υδρόφιλο περιβάλλον στο οποίο δονούνται, αλλά και από το μήκος των ανθρακικών αλυσίδων. Η αύξηση των εντάσεων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το περιβάλλον του κύτταρου έγινε λιγότερο λιπόφιλο ενώ η μεταβολή αυτή παράλληλα μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το μήκος των ανθρακικών αλυσίδων μειώθηκε. Τα ευρήματα αυτά οδηγούν στο γενικότερο συμπέρασμα ότι το κλασσικό μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού, το οποίο χαρακτηρίζει την κυτταρική μεμβράνη, έχει πάψει να υφίσταται και οι ιδιότητες όπως εκλεκτική διαπερατότητα και δυναμική σταθερότητα έχουν πλέον χαθεί.

Η νέα ταινία η οποία εμφανίζεται στα  $1743\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στην δόνηση τάσης  $\nu\text{C}=\text{O}$  με εστερικό χαρακτήρα ( $\text{RO}-\text{C}=\text{O}$ ) και συνδέεται με τον σχηματισμό αλδεϋδών, οι οποίες αποτελούν δείκτη αναγνώρισης του καρκίνου [19, 10-14], ως αποτέλεσμα της υπεροξειδωσής των πρωτεϊνών και λιπιδίων. Η ένταση της ταινίας είναι αρκετά αυξημένη, λόγω της ασθένειας. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι σε κάποιο από τα στάδια της ασθένειας λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις υπεροξειδωσής των μεμβρανών ως αποτέλεσμα των αντιδράσεων των ελεύθερων ριζών. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν και

με βιβλιογραφικά  $\nu\text{C}=\text{O}$  δεδομένα, στα οποία αναφέρεται ο σχηματισμός αλδευδών σε καρκινικούς ιστούς.

Οι ταινίες οι οποίες εμφανίζονται στην περιοχή  $1700\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$  οφείλονται στις δονήσεις κάμψης των ομάδων Amide I και Amide II των πεπτιδικών δεσμών των πρωτεϊνών. Παρατηρείται ότι οι απορροφήσεις των δονήσεων των Amide I και Amide II του παθολογικού οστού μετατοπίζεται προς μικρότερους κυματαριθμούς ως προς τα μέγιστα των υγιών οστών. Οι δονήσεις κάμψης των αμιδίων παρέχουν πληροφορίες για τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών και τα ποσοστά συμμετοχής δόνησης των μορίων των πεπτιδικών δεσμών.

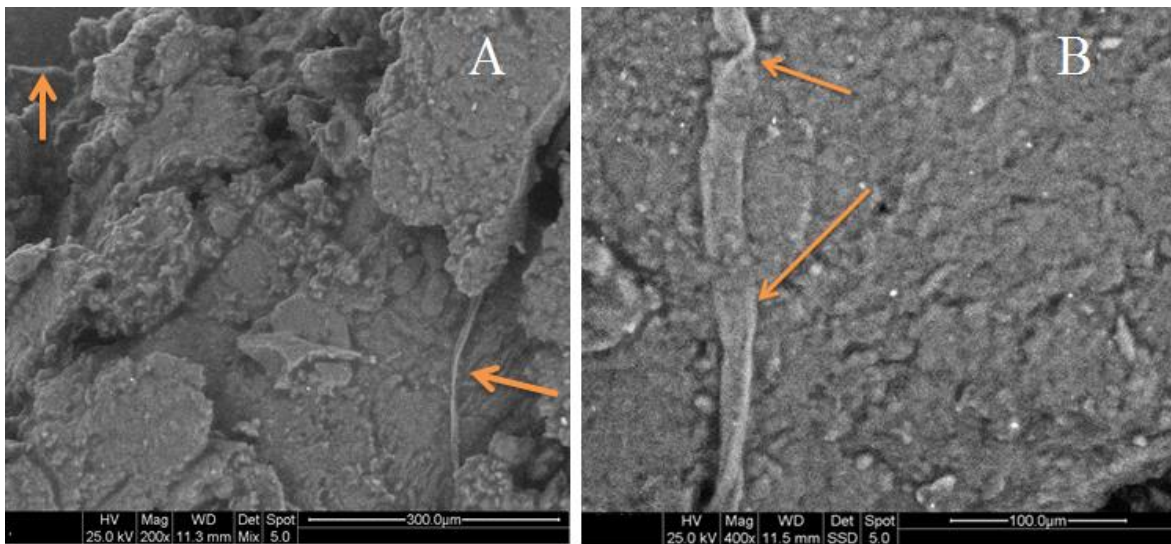
Όπως είναι γνωστό, η δευτεροταγής δομή καθορίζεται από την πολυπεπτιδική αλυσίδα των πρωτεϊνών οι οποίες σχηματίζουν επαναλαμβανόμενες πτυχές ή έλικες οι οποίες διαμορφώνουν σε μεγάλο βαθμό την τελική μορφή τους στο χώρο. Οι πτυχές ή έλικες οφείλονται στους δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των επαναλαμβανόμενων συστατικών του πολυπεπτιδικού σκελετού. Αν και ο δεσμός υδρογόνου είναι πολύ ασθενής, η συνολική του ισχύς του στην πολυπεπτιδική αλυσίδα είναι αρκετή για να υποστηρίξει την όποια μορφή αποκτά το συγκεκριμένο τμήμα της αλυσίδας.



**Εικόνα 6. 3:** Σχηματική παράσταση της αλλαγής της στερεοδομής του κολλαγόνου που προκαλείται με την ακτινοβολία, από  $\alpha$ -έλικα (A) σε  $\beta$ -έλικα (B) και τυχαίος σχηματισμός με αλυσίδες μικρότερου μήκους (C)

Στα φάσματα του καρκινικού οστού παρατηρείται μετατόπιση των ταινιών των Amide I και Amide II σε χαμηλότερες συχνότητες σε σχέση με τις αντίστοιχες συχνότητες των ταινιών των ιδίων ομάδων στο υγιές οστό. Αυτό υποδεικνύει, όπως προαναφέρθηκε, ότι καταστρέφεται η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών και από δομή α-έλικας αποκτούν σταδιακά τυχαία περιέλιξη (Εικόνα 6.3).

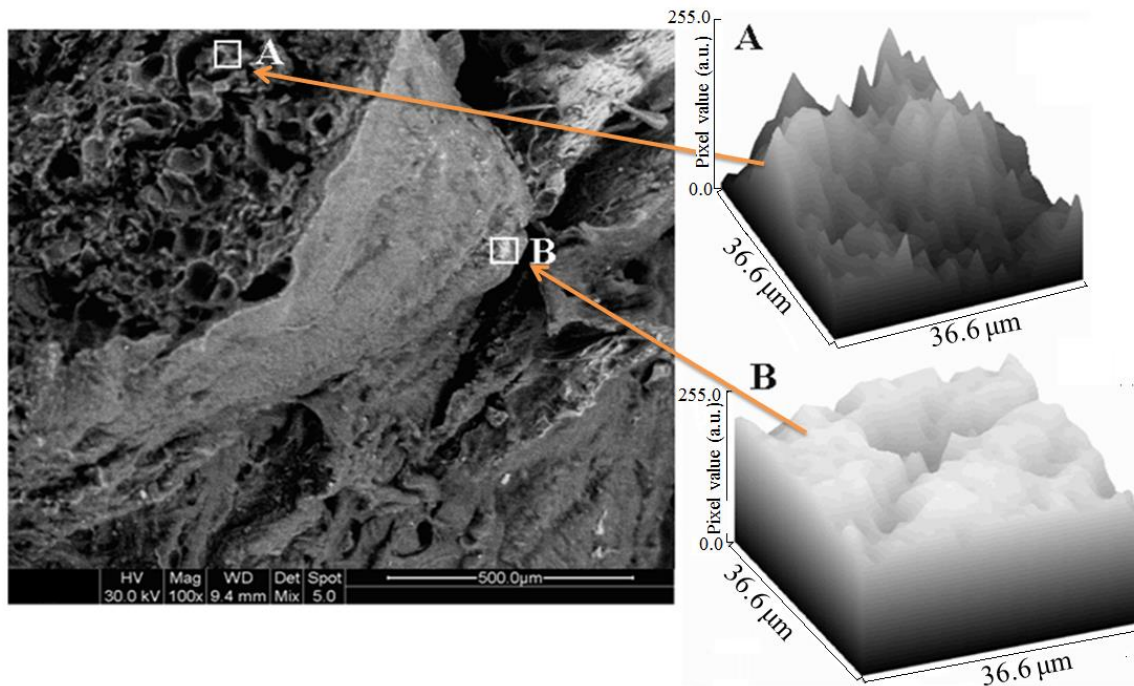
Η Εικόνα 6.4A λήφθηκε με μεγέθυνση 200x και κλίμακα 300  $\mu\text{m}$  και η Εικόνα 6.4B με μεγέθυνση 400x και κλίμακα 100  $\mu\text{m}$ . Τα βέλη δείχνουν την πρωτεΐνη, η οποία έχει τυχαία διαμόρφωση, αλλά και τα σημεία βλάβης της.



**Εικόνα 6. 4:** SEM εικόνιση της επιφάνειας καρκινικού οστού από ασθενή ηλικίας 82 ετών με παθολογικό κάταγμα άνω άκρου κερκίδας. A μεγέθυνση 200x, κλίμακα 300  $\mu\text{m}$  και B μεγέθυνση 400x, κλίμακα 100  $\mu\text{m}$

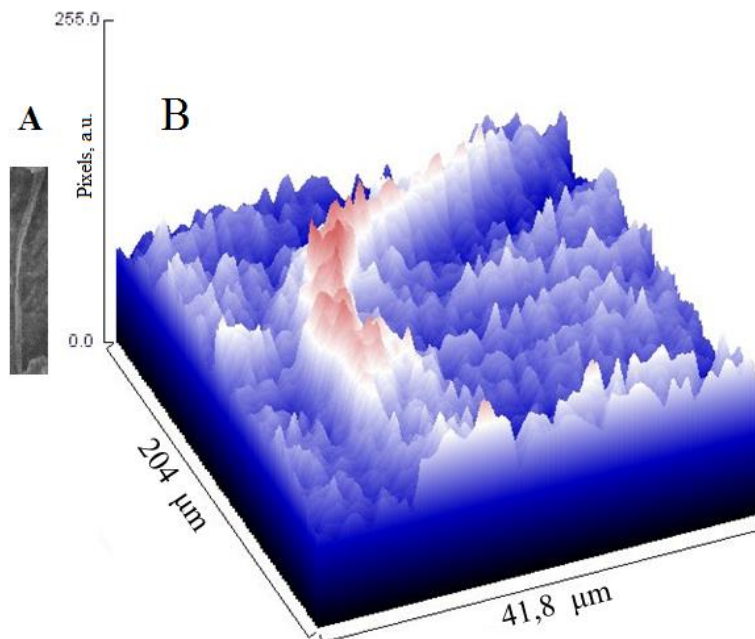
Στην Εικόνα 6.5 φαίνεται η μορφολογία του καρκινικού οστού σε κλίμακα 500  $\mu\text{m}$ . Είναι εμφανές ότι η μορφολογία δεν είναι ομοιογενής, όπως παρατηρείται στα υγιή οστά, αλλά το οστό είναι περισσότερο πορώδες, ως αποτέλεσμα της εξέλιξης της ασθένειας. Επίσης είναι ορατός ο σχηματισμός ινιδίων, οποίος οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πράγματι οι κολλαγονούχες και οι μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες πρέπει να παράγουν προϊόντα πολυμερισμού. Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ImageJ για την ανάλυση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας της επιφάνειας, διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση του ασβεστίου στις περισσότερες περιοχές του οστού είναι πάρα πολύ μικρή (Εικόνα A και B).





**Εικόνα 6. 5:** SEM απεικόνιση της επιφάνειας καρκινικού οστού από ασθενή ηλικίας 82 ετών με παθολογικό κάταγμα άνω άκρου κερκίδας. Μεγέθυνση 500  $\mu\text{m}$ . A και B είναι η ηλεκτρονιοακή πυκνότητα στις περιγεγραμμένες θέσεις, όπως αναλύθηκαν με ImageJ για την ανάλυση των pixels.

Μεγαλύτερη ανάλυση του περιγεγραμμένου τμήματος της πρωτεΐνης (Εικόνα 6.6,A), χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ImageJ, το οποίο μας παρέχει την πυκνότητα των pixels και εκφράζει την αγωγιμη περιοχή της πρωτεΐνης, δείχνει την πορεία και την μορφή της σπείρας της έλικας (Εικόνα 6.6B). Από το πάχος της κόκκινης περιοχής η οποία προσδιορίζει την ποσότητα του ασβεστίου, φαίνεται ότι η πρωτεΐνη δεν συνδέεται σε όλα τα σημεία με υδροξυαπατίτη, γεγονός που ερμηνεύει την οστεόλυση οποία παρατηρείται στους ασθενείς με καρκίνο στα οστά. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα τα οποία λήφθηκαν τόσο με την υπέρυθη φασματοσκοπία όσο και με την SEM ανάλυση παρατηρούμε σύμπτωση των πειραματικών δεδομένων των διάφορων τεχνικών.



**Εικόνα 6. 6:** ImageJ ανάλυση της πρωτεΐνης (A) με διαστάσεις 204x41,8  $\mu\text{m}$ . Η κόκκινη περιοχή (B) δηλώνει την παρουσία αλάτων ασβεστίου, τα οποία προσδίδουν την αγωγιμότητα

Αναλύοντας περαιτέρω το υπέρυθρο φάσμα παρατηρούμε την ταινία στα  $1230\text{ cm}^{-1}$  η οποία αντιστοιχεί στα Amide III και συναποτελείται από τις δονήσεις  $\nu\text{C-N}$  (60%) και  $\delta\text{NH}$  (40%). Η ταινία αυτή συνήθως δεν είναι πολύ ευαίσθητη σε μεταβολές γι αυτό και σπάνια λαμβάνεται υπόψη. Παρ'όλα αυτά διαπιστώθηκε ότι στα καρκινικά κύτταρα εμφανίζεται πιο πλατειά από ότι στα υγιή.

Αξιοσημείωτη είναι η περιοχή του υπέρυθρου φάσματος μεταξύ  $1164\text{ cm}^{-1}$  και  $1040\text{ cm}^{-1}$ . Οι ταινίες της περιοχής αυτής αποδίδονται στον σχηματισμό πολυγλυκανών. Αν και οι ταινίες αυτές εμφανίζονται και στα υγιή οστά, όμως η ένταση των ταινιών αυτών είναι πολύ μεγαλύτερη στα καρκινικά οστά. Μάλιστα σε μερικές περιπτώσεις οι εντάσεις στα καρκινικά κύτταρα είναι διπλάσιες από ότι στα υγιή. Οι πολυσακχαρίτες αποδίδονται κυρίως σε σχάσεις των αλυσίδων του DNA και γλυκοζυλίωση των φωσφο-ριβοζικών ομάδων. Επίσης η γλυκοζυλίωση προέρχεται και από την διαταραχή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) της μεμβράνης των κυττάρων, η οποία διεγείρει τους μηχανισμούς γλυκοζυλίωσης [79]. Ιδιαίτερα σημαντική είναι επίσης η μείωση των εντάσεων των ταινιών στα φάσματα του ασθενούς στην περιοχή του φάσματος  $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$  και  $650\text{-}500\text{ cm}^{-1}$  όπου απορροφούν οι φωσφορικές ομάδες ( $\nu\text{PO}_4^{3-}$ ) του υδροξυαπατίτη. Οι

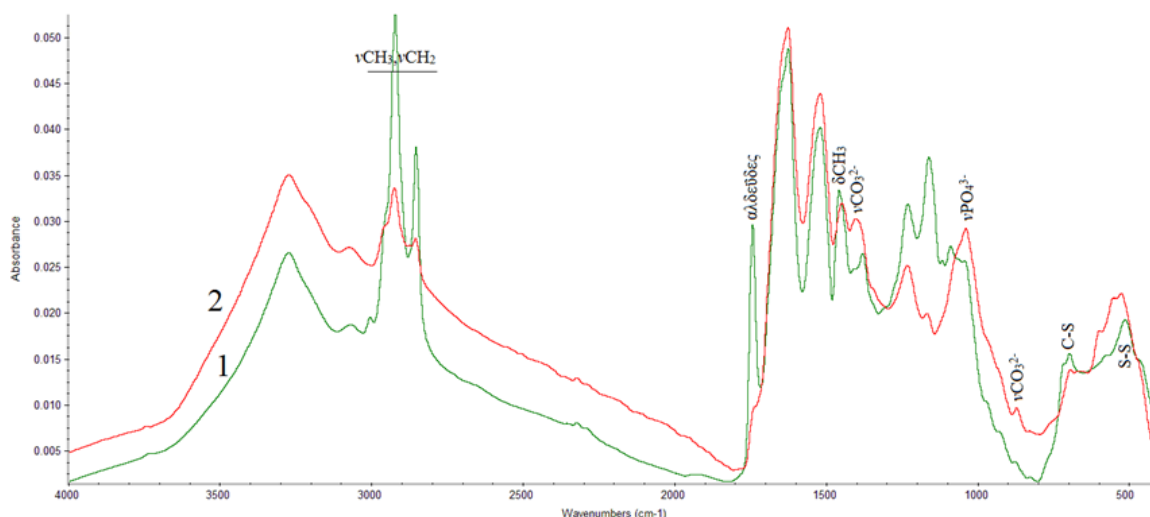


μειώσεις των εντάσεων συνδέονται με το αποτέλεσμα της ασθένειας, όπου οδηγεί σε οστεόλυση, μειώνοντας την μηχανική αντοχή των καρκινικών οστών.

Στην περιοχή του φάσματος μεταξύ  $700\text{ cm}^{-1}$  και  $400\text{ cm}^{-1}$  οι ταινίες των φασμάτων του φλοιώδους και σπογγώδους οστού του ασθενούς δεν μπορούν να αποδοθούν σε μετατοπίσεις των ταινιών του υδροξυαπατίτη. Η μορφή και οι θέσεις των απορροφήσεων αποδίδονται κυρίως στις ομάδες C-S των S-S των θειολών. Φαίνεται δηλαδή ότι οι θειούχες βάσεις των πρωτεϊνών (κυστεΐνη) και οι γλουταθειόλες (GSH) έχουν οξειδωθεί. Οι ενώσεις αυτές αντιδρούν πολύ εύκολα με τις παραγόμενες οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες των υδροξυλίων παρέχοντας το ευκίνητο υδρογόνο σύμφωνα με τις αντιδράσεις:



Η γλουταθειόνη είναι τριπεπτίδιο που αποτελείται από L-κυστεΐνη, L-γλουταμινικό οξύ και γλυκίνη και αποτελεί ένα από τα ενδοπροστατευτικά ένζυμα του οργανισμού, το οποίο σε καταστάσεις έντονου οξειδωτικού στρες καταναλώνεται.



**Σχήμα 6. 16:** FTIR-φάσμα καρκινικού οστού ασθενούς ηλικίας 82 ετών με παθολογικό κάταγμα άνω άκρου κερκίδας 1: πριν την επεξεργασία με εξάνιο, και 2: μετά την επεξεργασία με οργανικό διαλύτη

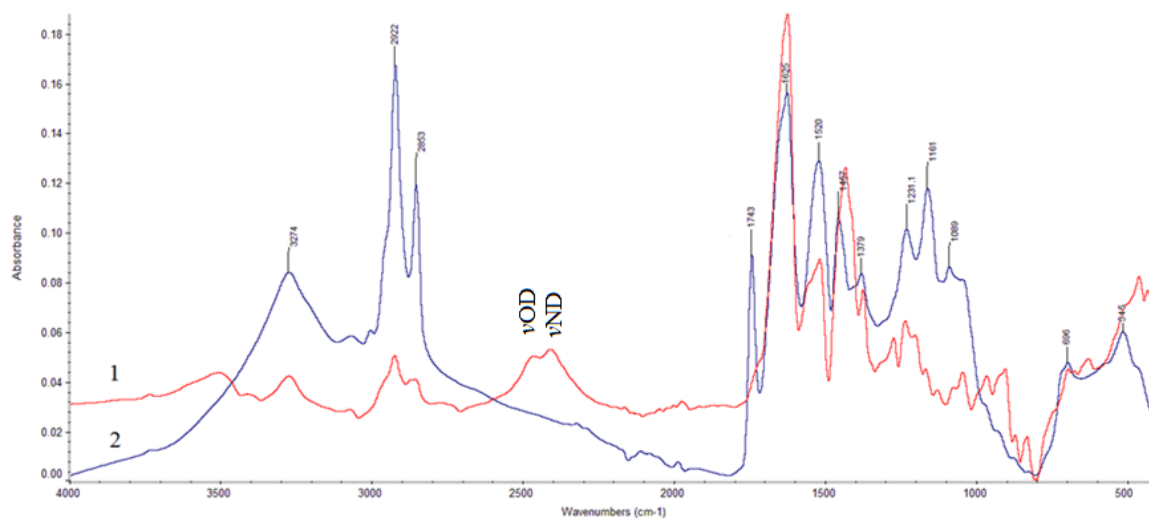
Η αύξηση της έντασης της ταινίας απορρόφησης των ομάδων S-S δείχνει και την εξέλιξη της ασθένειας, αποτελεί δε αποδεικτικό κριτήριο ότι σε κάποιο από τα στάδια της

ασθένειας αναπτύσσεται οξειδωτικό στρες [10-21]. Επίσης δείχνει ότι τα θειούχα αμινοξέα είναι τα πλέον ευάλωτα, λόγω του ευκίνητου υδρογόνου.

Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, επεξεργασθήκαμε το δείγμα με εξάνιο για να δούμε την συμπεριφορά του οστού. Όπως προκύπτει από τα φάσματα του Σχήματος 6.16 υπάρχουν σημαντικές διαφορές σε όλο το εύρος από  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ , οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στις απορροφήσεις των οργανικών συστατικών. Παρατηρείται και στην περίπτωση αυτή μείωση των εντάσεων των ταινιών στην περιοχή  $3000-2800\text{ cm}^{-1}$  όπου, όπως προαναφέρθηκε, απορροφούν οι δονήσεις τάσης των ομάδων  $\nu\text{CH}_3$  και  $\nu\text{CH}_2$  των μεθυλ και μεθυλενομάδων των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων επιβεβαιώνοντας ότι η ασθένεια προκαλεί σχάση των ανθρακικών αλυσίδων της μεμβράνης των κυττάρων. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για την ταινία στα  $1744\text{ cm}^{-1}$ , ως αποτέλεσμα της απομάκρυνσης των αλδευδών καθώς και των χοληστερικών λιπιδίων. Στην περιοχή των πρωτεϊνών Amide I, Amide II, Amide III δεν παρατηρείται κάποια αλλαγή στις εντάσεις των ταινιών λόγω της μη διαλυτότητάς τους. Παρ'όλα αυτά στην ταινία των Amide I εμφανίζεται ένας νέος ώμος προς τους μεγαλύτερους κυματαριθμούς δείχνοντας ότι στο οστό που απέμεινε υπάρχουν πρωτεΐνες στις οποίες η διαμόρφωση τείνει να πάρει διαμόρφωση β-αντιπαράλληλης διάταξης (Σχ. 6.12), με συνέπεια την σταδιακή επίδραση της ασθένειας στην δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών και τον σχηματισμό αμυλοειδούς τύπου πρωτεϊνών.

Η αύξηση της έντασης της ταινίας στα  $1400\text{ cm}^{-1}$  περίπου σε συνδυασμό με την μικρή επίσης αύξηση της έντασης της ταινίας στα  $876\text{ cm}^{-1}$  οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχει κάποιο ποσοστό υδροξυαπατίτη, στον οποίο όμως έχουν αντικατασταθεί τα φωσφορικά ιόντα με ανθρακικά ιόντα [16-18,69]. Στο ίδιο εργαστήριο είχε αποδειχθεί ότι με την γήρανση των οστών γίνεται αντικατάσταση των φωσφορικών ιόντων με ανθρακικά [12,18]. Φαίνεται δηλαδή ότι η ασθένεια του καρκίνου προκαλεί επιταχυνόμενη γήρανση των οστών [12-18]. Η αύξηση της έντασης των ταινιών στην περιοχή των  $900-1150\text{ cm}^{-1}$  δηλώνει ότι με την απομάκρυνση των οργανικών συστατικών αυξήθηκε η συγκέντρωση της ανόργανης μάζας του οστού στο δείγμα. Από την εξαφάνιση των ταινιών του υδροξυαπατίτη μετά την επεξεργασία με εξάνιο προκύπτει ότι το καρκινικό οστό δεν αποτελείται από βιολογικό υδροξυαπατίτη, αλλά περιέχει μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες επιμεταλλωμένων ιστών, οι οποίες εμφανίζουν χημική συγγένεια με τον υδροξυαπατίτη [58].

Επειδή τα βιολογικά συστήματα και κυρίως οι καρκινικοί ιστοί είναι περισσότερο σύνθετα βιολογικά υλικά, τοποθετήθηκαν τα δείγματα σε δευτεριωμένο νερό ( $D_2O$ ). Όπως είναι γνωστό το δευτέριο αναμένεται να αντικαταστήσει τα ευκίνητα άτομα υδρογόνου και επομένως να προκαλέσει μείωση των εντάσεων των αντίστοιχων ταινιών απορρόφησης στο υπέρυθρο φάσμα. Παράλληλα, λόγω της αντικατάστασης και της μεταβολής των εντάσεων των δεσμών από το δευτέριο θα παρατηρηθούν τετοπίσεις των απορροφήσεων. Στο Σχήμα 6.16 δίνεται το FT-IR φάσμα οστού από κερκίδα πριν (Σχήμα 16.1) και μετά την δευτερίωση (Σχήμ 16.2).



**Σχήμα 6. 17:** FT-IR φάσματα καρκινικού οστού άνω άκρου κερκίδας ασθενούς ηλικίας 82 ετών με παθολογικό κάταγμα από πρωτοπαθή εστία το αυτί. 1; Πριν από δευτέριο και 2; Μετά την δευτερίωση.

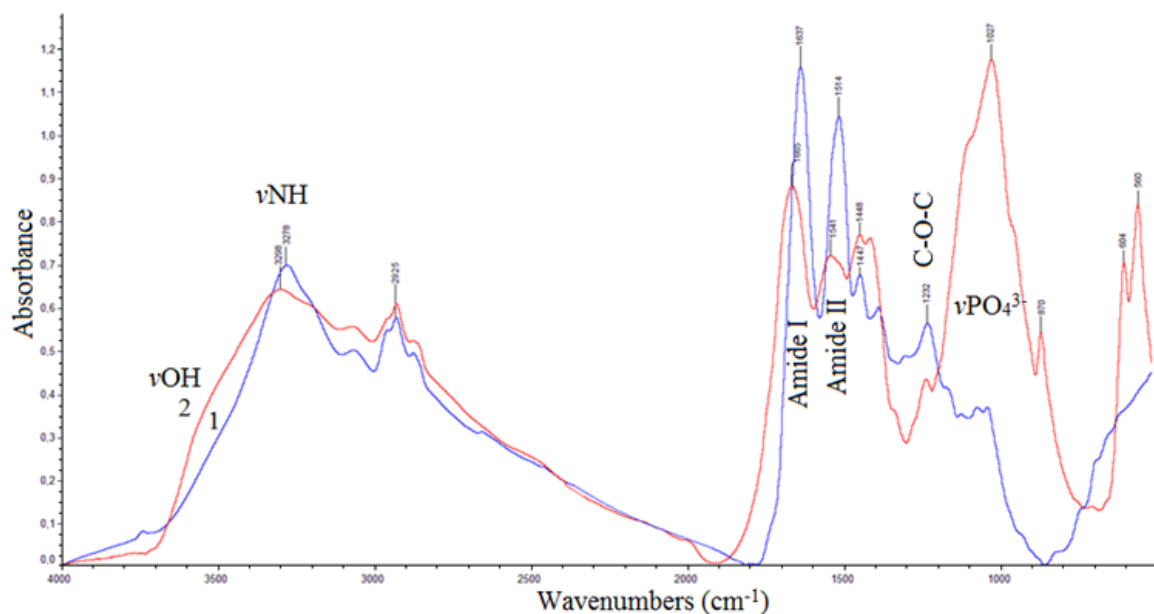
Η εμφάνιση των ταινιών στην περιοχή μεταξύ 2500 και 2300  $cm^{-1}$ , αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των ομάδων  $\nu OD$  και  $\nu ND$  των μορίων του νερού και αμινών, στα οποία αντικαταστάθηκε το άτομο του υδρογόνου με δευτέριο (ισοτοπικό φαινόμενο). Η εμφάνιση των ταινιών συνδέεται με την μείωση των αντίστοιχων ταινιών των δονήσεων τάσης  $\nu OH$  και  $\nu NH$ . Το γεγονός ότι δεν παρατηρείται εξαφάνιση των ταινιών αλλά μείωση των εντάσεων αποδίδεται στην μερική και όχι πλήρη (100%) αντικατάσταση των ατόμων υδρογόνου από δευτέριο.

Αξιοσημείωτη είναι η περιοχή του υπέρυθρου φάσματος μεταξύ 1164  $cm^{-1}$  και 1040  $cm^{-1}$ , όπου εμφανίζονται οι ταινίες των σχηματιζόμενων πολυσακχαριτών (πολυγλυκανών). Αν και οι ταινίες αυτές εμφανίζονται και στα υγιή οστά, όμως η έντασή τους είναι πολύ μεγαλύτερη στα καρκινικά οστά. Μάλιστα σε μερικές περιπτώσεις

βρέθηκε ότι οι εντάσεις στα καρκινικά κύτταρα είναι διπλάσιες από τα υγιή. Οι πολυσακχαρίτες αποδίδονται κυρίως σε σχάσεις των αλυσίδων του DNA και γλυκοζυλίωση των φωσφο-ριβοζικών ομάδων. Ιδιαίτερα σημαντική είναι επίσης η μείωση των εντάσεων των ταινιών στα φάσματα του ασθενούς στην περιοχή του φάσματος  $1200-900\text{ cm}^{-1}$  και  $650-500\text{ cm}^{-1}$  όπου απορροφούν οι φωσφορικές ομάδες ( $\nu\text{PO}_4^{3-}$ ) του υδροξυαπατίτη. Οι μειώσεις των εντάσεων συνδέονται με το αποτέλεσμα της ασθένειας, όπου οδηγεί σε οστεόλυση, μειώνοντας την μηχανική αντοχή των καρκινικών οστών. Στην περιοχή του φάσματος μεταξύ  $700\text{ cm}^{-1}$  και  $400\text{ cm}^{-1}$  οι ταινίες των απορροφήσεων του φλοιώδους και σπογγώδους οστού του ασθενούς δεν μπορούν να αποδοθούν σε μετατοπίσεις των ταινιών του υδροξυαπατίτη. Η μορφή και οι θέσεις των απορροφήσεων αποδίδονται κυρίως στις ομάδες C-S των S-S των θειολών [10-21]. Φαίνεται δηλαδή ότι οι θειούχες βάσεις των πρωτεϊνών (κυστεΐνη) και οι γλουταθειόλες (GSH) έχουν οξειδωθεί. Οι ενώσεις αυτές, όπως προαναφέρθηκε, αντιδρούν πολύ εύκολα με τις παραγόμενες οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες των υδροξυλίων παρέχοντας το ευκίνητο υδρογόνο σύμφωνα με τις αντιδράσεις (6.5) και (6.6).

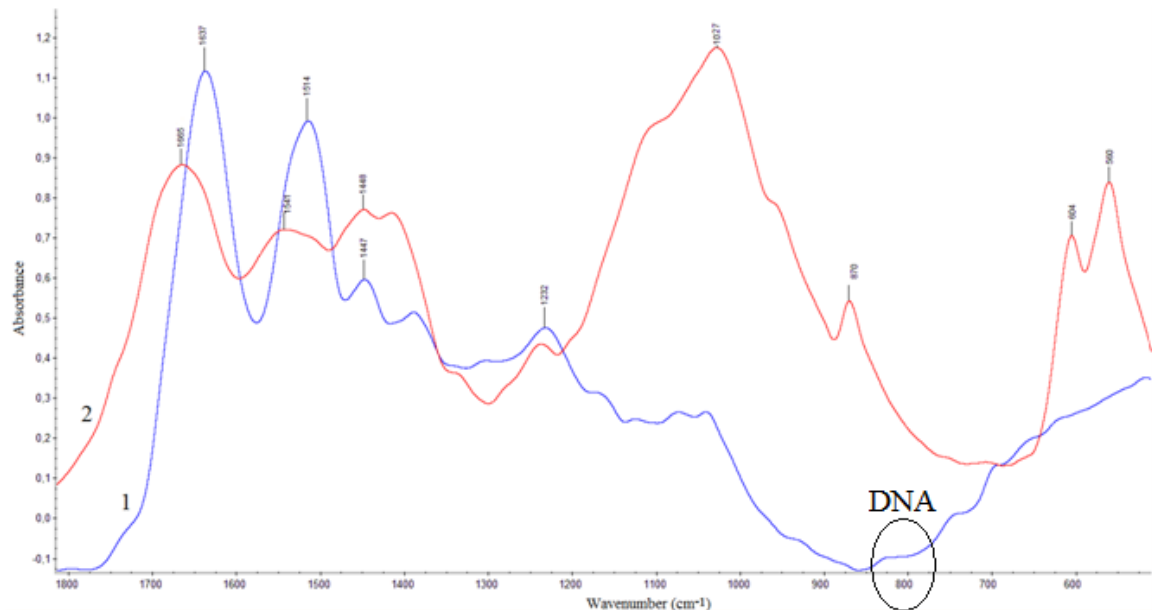
### **6.5. FT-IRφάσματα καρκινικών οστών από πρωτοπαθή εστία του ουρηθελίου**

Τα υπέρυθρα φάσματα των οστών του ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία του ουρηθελίου, ο οποίος χαρακτηρίστηκε από τους ιστοπαθολόγους ως αδενικού τύπου διαφοροποίηση φαίνονται στο Σχήμα 6.17. Στην περιοχή του φάσματος μεταξύ  $4000-2500\text{ cm}^{-1}$  διακρίνονται οι χαρακτηριστικές ταινίες δονήσεων τάσης των ομάδων  $\nu\text{OH}$ ,  $\nu\text{NH}$  καθώς και οι συμμετρικές και αντισυμμετρικές δονήσεις τάσης των μέθυλ και μεθυλενομάδων. Παρατηρείται, όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις ότι όλες οι ταινίες οι οποίες εμφανίζονται στην περιοχή μεταξύ  $4000-2850\text{ cm}^{-1}$  εμφανίζουν τις ίδιες μεταβολές. Η αύξηση όμως των ελεύθερων NH ομάδων δείχνει μεγαλύτερη βλάβη των οστών από την ασθένεια. Φαίνεται δε ότι οι δεσμοί υδρογόνου οι οποίοι συνδέουν τις έλικες των πρωτεϊνών έχουν σπάσει.



**Σχήμα 6. 18:** FT-IR φάσματα ασθενούς 1: με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία εκ του ουρηθρηλίου με αδενικού τύπου διαφοροποίηση και 2: υγιούς οστού.

Στην περιοχή μεταξύ  $1800-1500\text{ cm}^{-1}$  (Σχήμα 6.19) όπου απορροφούν οι ομάδες των Amide I και Amide II των πρωτεϊνών εμφανίζεται στους  $1515\text{ cm}^{-1}$  ο δεσμός C=N της βάσης της γουανοζίνης του DNA υποδηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο την καταστροφή του μορίου του DNA εξαιτίας της ασθένειας [78,79]. Για να συμβαίνει αυτό θα πρέπει οι ελεύθερες ρίζες να συμμετέχουν στην διαδικασία σχάσης της έλικας του DNA. Στη συνέχεια επεξεργαζόμενοι το φάσμα και προχωρώντας στις ταινίες του DNA μεταξύ  $1100-900$  κυματαριθμούς, όπου απορροφούν οι ομάδες  $\nu\text{PO}_2^{-2}$  του σκελετού της διπλής έλικας, παρατηρούμε σημαντικές διαφορές.

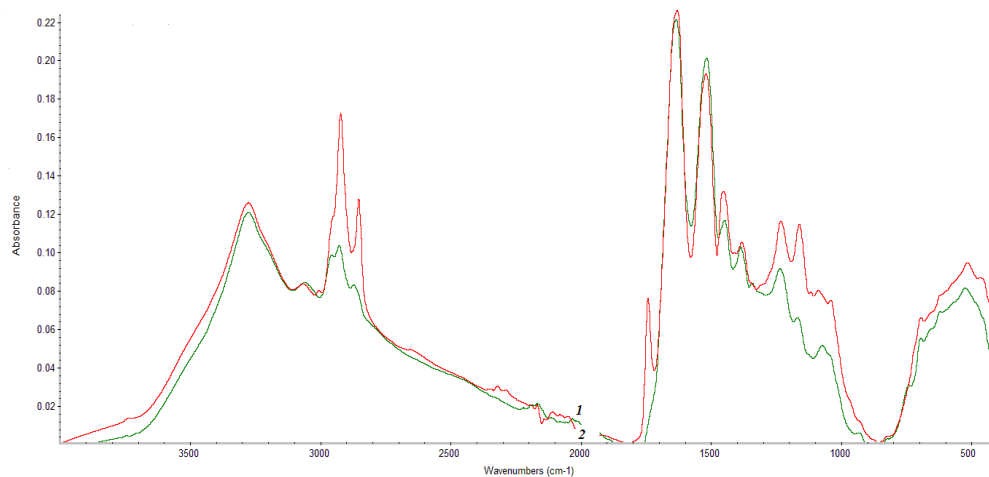


**Σχήμα 6. 19:** FT-IR φάσματα ασθενούς 1: με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία εκ του ουρηθηλίου με αδενικού τύπου διαφοροποίηση και 2: υγιούς οστού στην περιοχή  $1800-400\text{ cm}^{-1}$ . Ο κύκλος δείχνει την χαρακτηριστική περιοχή των ταινιών των A-,B- και Z-DNA

Από την κλίση της ταινίας του DNA περίπου στα  $1000\text{ cm}^{-1}$  συνάγεται το συμπέρασμα ότι ο καρκίνος είναι διηθητός [66,67]. Τα αποτελέσματα των φασματοσκοπικών δεδομένων συμφωνούν με τα κλινικά δεδομένα του καρκίνου του ουρουθηλίου. Πράγματι, οι περισσότεροι επιστήμονες συμφωνούν ότι οι καρκίνοι του ουρουθηλίου με αδενικό τύπο διαφοροποίησης οδηγεί σε κακοήγη μετασχηματισμό και μεταστάσεις. Επίσης, από τις ταινίες μεταξύ  $800-830\text{ cm}^{-1}$  φαίνεται ότι το DNA του ασθενούς έχει μετατραπεί από B-DNA, όπου είναι το φυσιολογικό σε A-DNA παθολογική κατάσταση και Z-DNA στην τελική καρκινική κατάσταση [78,79,81].

## 6.6. Μεταστατικός καρκίνος οστού από πρωτοπαθή εστία ήπατος

Ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος είναι ο πέμπτος συχνότερος καρκίνος παγκοσμίως. Ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος στα τελικά στάδια μεθίσταται συνήθως στους πνεύμονες (55%) και τους λεμφαδένες (30%) [82] και πίο σπάνια στα οστά.

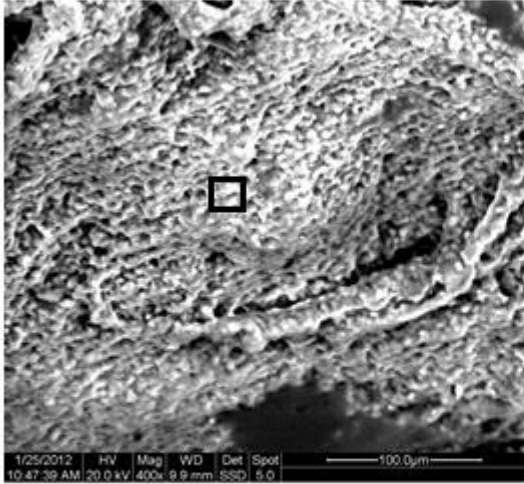


**Σχήμα 6. 20:** FT-IR φάσματα. 1; Καρκινικού οστού ισχίου με πρωτογενές ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα 2 μετά την επεξεργασία με οργανικό διαλύτη

Τα υπέρυθρα φάσματα του Σχήματος 6.20 προέρχονται από ασθενή με μεταστατικό καρκίνο στο ισχίο, από πρωτογενές ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (1), και από οστό του ίδιου ασθενούς μετά από κατεργασία με οργανικό διαλύτη. Τα φάσματα δείχνουν τις ίδιες μεταβολές όπως και στις άλλες μεταστάσεις από διαφορετική πρωτοπαθή εστία. Οι βλάβες τις οποίες προκαλεί η ασθένεια στην μεμβράνη των κυττάρων επιβεβαιώνεται από την αύξηση των εντάσεων των ταινιών στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 3000-2500  $\text{cm}^{-1}$ . Παρατηρείται, ότι οι ταινίες απορροφήσεων των μέθυλ και μεθυλενομάδων εμφανίζονται και στην περίπτωση αυτή με αυξημένη ένταση ως προς το υγιές, επιβεβαιώνοντας ότι η ασθένεια επηρεάζει την μεμβράνη των κυττάρων. Το γεγονός ότι μετά την επεξεργασία με εξάνιο μειώνονται οι εντάσεις των αναφερόμενων ταινιών δείχνει την σχάση των μακροβιολογικών μορίων, τα οποία απαρτίζουν την μεμβράνη. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και για την ταινία στα 1743  $\text{cm}^{-1}$ . Η ένταση της ταινίας αυτής είναι πολύ μεγαλύτερη στην περίπτωση μετάστασης από το ήπαρ. Αξιοσημείωτη είναι η μείωση των ταινιών μετά την επεξεργασία με οργανικό διαλύτη (Σχήμα 6.20,2) και ιδιαίτερα της ταινίας στα 1167  $\text{cm}^{-1}$  όπου απορροφούν οι πολυγλυκάνες οι οποίες σχηματίστηκαν μέσω μηχανισμού ελευθέρων ριζών, οι οποίες φαίνεται ότι είναι μικρού μοριακού βάρους. Οι δονήσεις των φωσφορικών ομάδων του υδροξυαπατίτη φαίνεται να έχουν μειωθεί και στα δύο φάσματα.

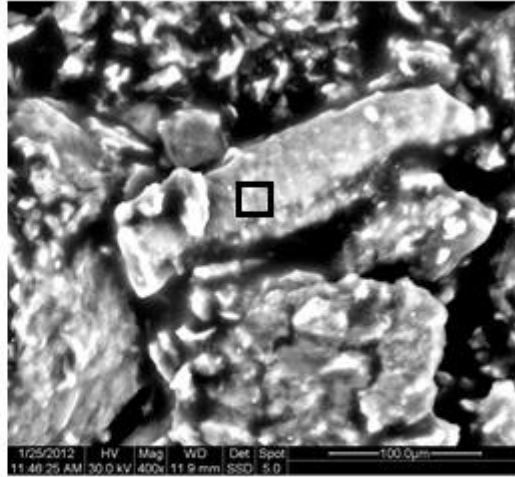
Για πληρέστερη μελέτη των οστών λάβαμε τις SEM-EDX απεικονίσεις των δειγμάτων. Στην Εικόνα 6.8Α δίνεται η μορφολογία του οστού πριν την επεξεργασία με

εξάνιο και στην Εικόνα 6.7B δίνεται η μορφολογία μετά την επεξεργασία. Συγκρίνοντας τις δύο εικόνες φαίνεται πολύ καθαρά η διαφορά τους, λόγω της απομάκρυνσης της οργανικής φάσης.



Χωρίς επεξεργασία

**A**



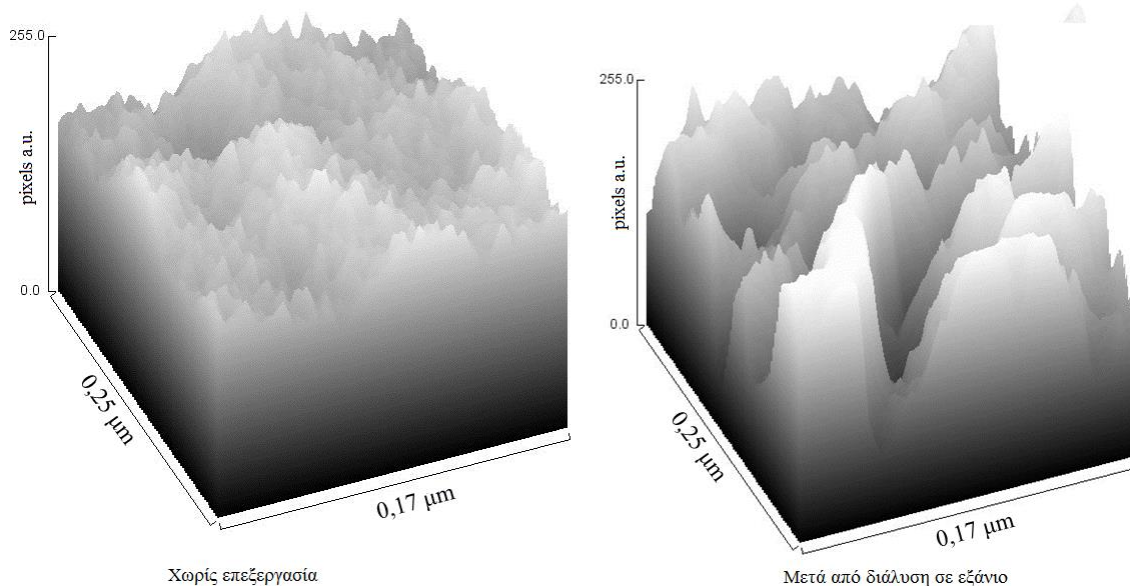
Μετά την διάλυση σε εξάνιο

**B**

**Εικόνα 6. 7:** SEM μορφολογική απεικόνιση A; καρκινικού οστού ασθενούς με πρωτοπαθή εστία ήπατος και B; μετά από την διάλυσή του σε εξάνιο

Περαιτέρω ανάλυση της μορφολογίας των περιγγραμμένων περιοχών της Εικόνας με ImageJ υπολογιστικό πρόγραμμα λαμβάνονται Εικόνες 6.8A και 6.8B πριν και μετά την επεξεργασία με εξάνιο, αντίστοιχα.



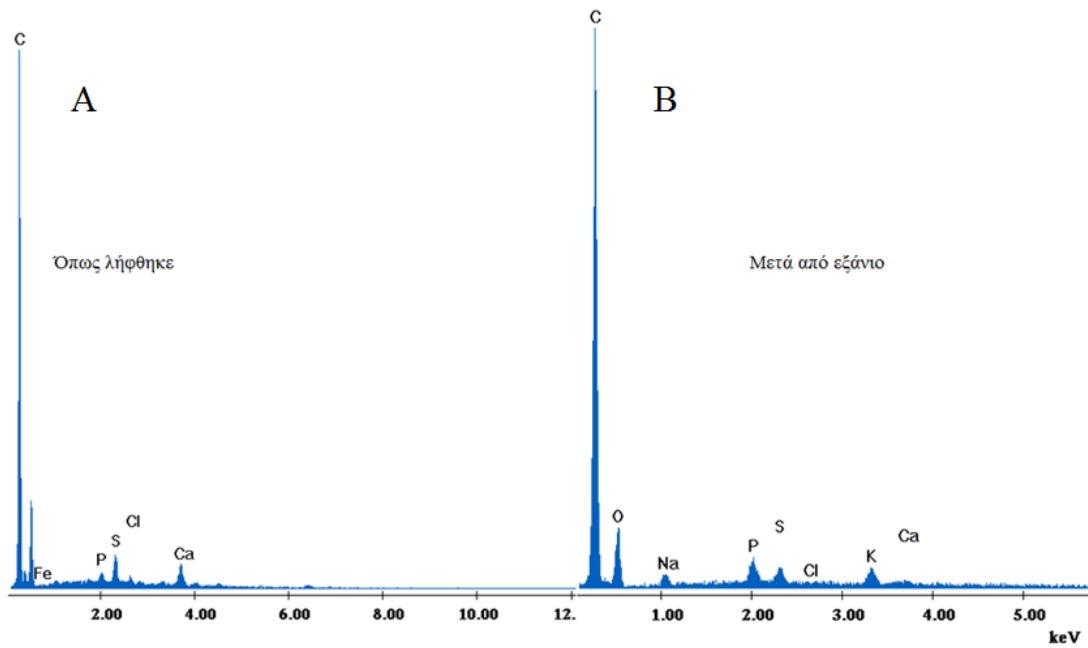


**A**

**B**

**Εικόνα 6.8:** ImageJ ψηφιακή ανάλυση της πυκνότητας ηλεκτρονίων των περιγεγραμμένων περιοχών A και B της Εικόνας 6.7, αντίστοιχα, εκφρασμένης σε pixel.

Από τα κενά και την ασυνέχεια της πυκνότητας των αγωγιμων περιοχών τα οποία δείχνει η ανάλυση μετά την τοποθέτηση του δείγματος στον οργανικό διαλύτη, συμπεραίνεται ότι το καρκινικό οστό περιέχει φωσφορικά άλατα του ασβεστίου τα οποία είναι συνδεδεμένα σε μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες, αφού διαφορετικά δεν θα μπορούσαν να διαλυθούν στον οργανικό διαλύτη. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με την EDX ανάλυση. Στο Σχήμα 6.20 δίνονται τα γραφήματα των σχετικών συγκεντώσεων των συστατικών των οστών πριν (Σχήμα 6.20A) και μετά (Σχήμα 6.20B) την διάλυση του οστού σε οργανικό διαλύτη.



**Σχήμα 6. 21:** Στοιχειακή EDX ανάλυση καρκινικού οστού ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία το ήπαρ (A) και (B) μετά από επεξεργασία με εξάνιο

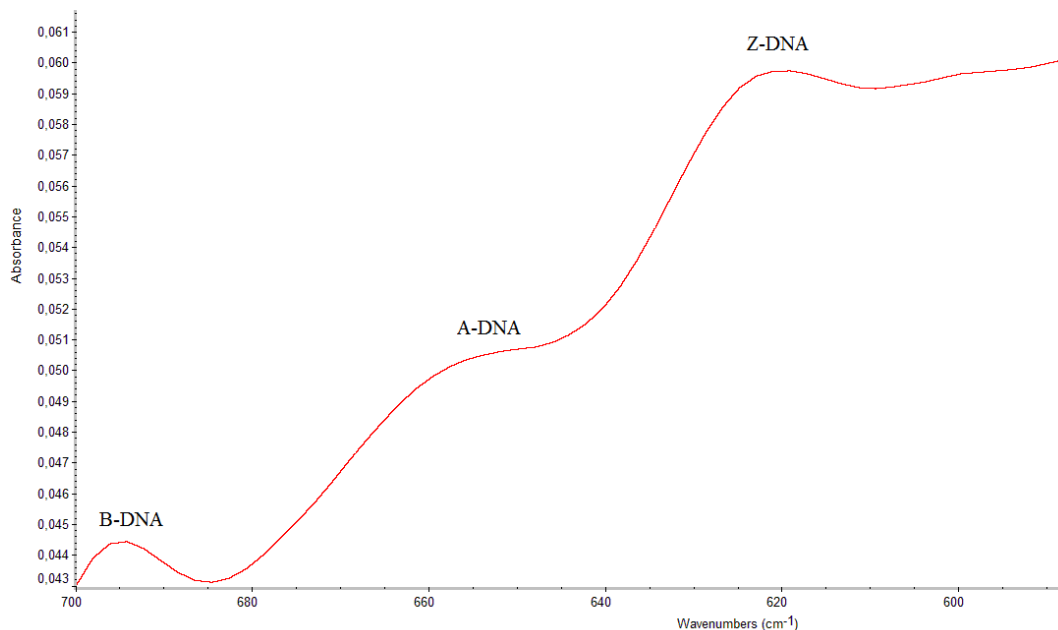
**Πίνακας 6. 3.** Σχετικές συγκεντρώσεις των συστατικών καρκινικού οστού από πρωτοπαθή εστία ήπατος, πριν και μετά την επεξεργασία με εξάνιο.

Χωρίς επεξεργασία				Μετά από εξάνιο	
Elem	K	Wt %	At %	Wt %	At %
CK		73.27	90.52	75.52	81.50
O K				20.94	16.97
NaK				1.00	0.56
P K				0.95	0.40
SiK		0.51	0.0039		
S K		0.98	0.0091	0.59	0.24
ClK		0.55	0.0050	0.07	0.03
K K				0.72	0.24
CaK		18.81	0.1838	0.21	0.07
FeK		5.89	0.0506		
<b>Total</b>		<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>

Ο Πίνακας 6.3 παρέχει τις σχετικές συγκεντρώσεις των στοιχείων του καρκινικού οστού. Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 6.3 οι συγκεντρώσεις όλων των συστατικών του οστού μειώνονται μετά την τοποθέτηση του οστού στον οργανικό διαλύτη. Η μικρή αύξηση στην Wt% συγκέντρωση του οξυγόνου, νατρίου και φωσφόρου αποδίδεται στο γεγονός ότι μετά την απομάκρυνση των οργανικών θραυσμάτων έγιναν μετρήσιμες οι σχετικές τους συγκεντρώσεις. Επιπλέον, από τον Πίνακα 6.3 επιβεβαιώνεται ότι τα ανθρακικά ιόντα έχουν αντικαταστήσει μερικώς τα φωσφορικά ιόντα, ενώ ασβέστιο πρέπει να είναι ως χλωριούχο ασβέστιο. Είναι γνωστό, όπως αποδείχθηκε από το ίδιο εργαστήριο, ότι κατά την γήρανση των οστών τα ανθρακικά ιόντα αντικαθιστούν τα φωσφορικά [11-17, 61,62]. Επομένως ο καρκίνος των οστών μπορεί να θεωρηθεί ως μια μορφή γήρανσης. Μετά την επεξεργασία με εξάνιο τα φωσφορικά ιόντα αυξάνουν, αλλά η αύξηση δεν μπορεί να αποδοθεί αποκλειστικά στην παρουσία υδροξυαπατίτη επειδή ο λόγος των ατόμων φωσφόρου ως προς τα άτομα ασβεστίου δεν αντιστοιχεί στην αναλογία η οποία απαιτείται στον υδροξυαπατίτη.

Οι ταινίες στην περιοχή  $1100-950\text{ cm}^{-1}$  πρέπει να αποδοθούν στις φωσφορικές ομάδες  $\text{PO}_2^-$  του DNA, αφού η μορφολογία τους διαφέρει των αντίστοιχων ταινιών του υδροξυαπατίτη. Στην περίπτωση της μετάστασης του καρκίνου του ήπατος ο ασθενής εκφράζει περισσότερο την ασθένεια, αφού η ταινία στα  $810\text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχεί στην παρουσία του Z-DNA, δηλαδή καρκινικού DNA.

Η περιοχή του φάσματος μεταξύ  $700-600\text{ cm}^{-1}$  παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον δεδομένου ότι στην ως άνω περιοχή φαίνονται οι δονήσεις διαμόρφωσης των σακχάρων του DNA (Σχήμα 6.22).

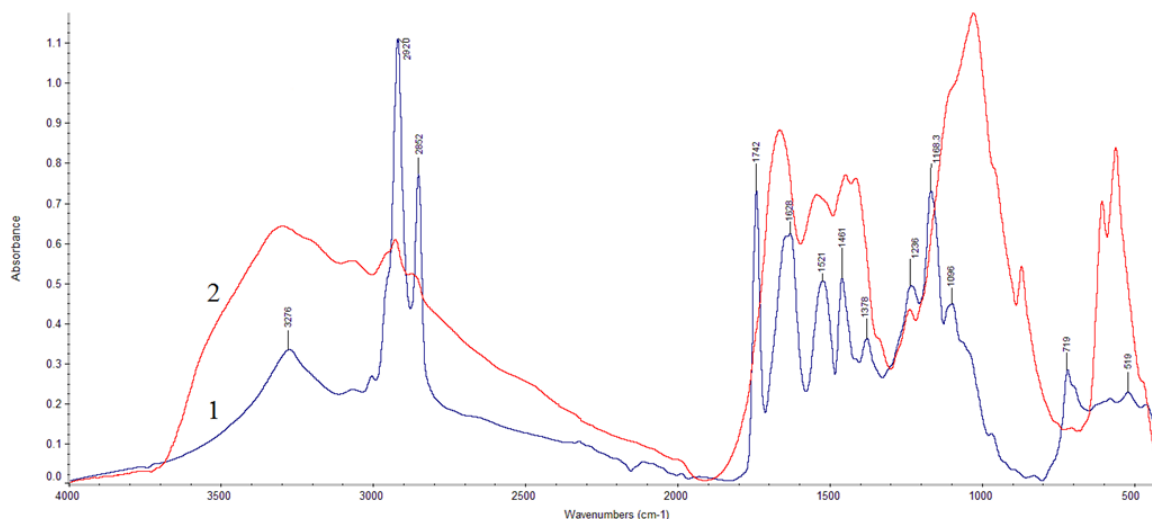


**Σχήμα 6. 22:** FT-IR φάσμα καρκινικού οστού ισχίου από πρωτογενές ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα στην περιοχή  $700-600\text{ cm}^{-1}$ .

Η ταινία στα  $694\text{cm}^{-1}$  αντιστοιχεί στην διαμόρφωση C2'-endo/anti του σακχάρου του δεξιόστροφου υγιούς B-DNA. Η ταινία στα  $670\text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχεί σε διαμόρφωση C3'-endo/anti του A-DNA και τέλος η ταινία στα  $620\text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχεί στην διαμόρφωση C3'-endo/syn την οποία λαμβάνει η ριβόζη στο αριστερόστροφο καρκινικό Z-DNA [84]. Η παρουσία των ταινιών αυτών σε συνδυασμό με τις ταινίες στην περιοχή του φάσματος  $800-850\text{ cm}^{-1}$  επιβεβαιώνουν την εξέλιξη του καρκίνου στα οστά.

## 6.7. Μεταστατικός καρκίνος οστού από πρωτοπαθή εστία νεφρό

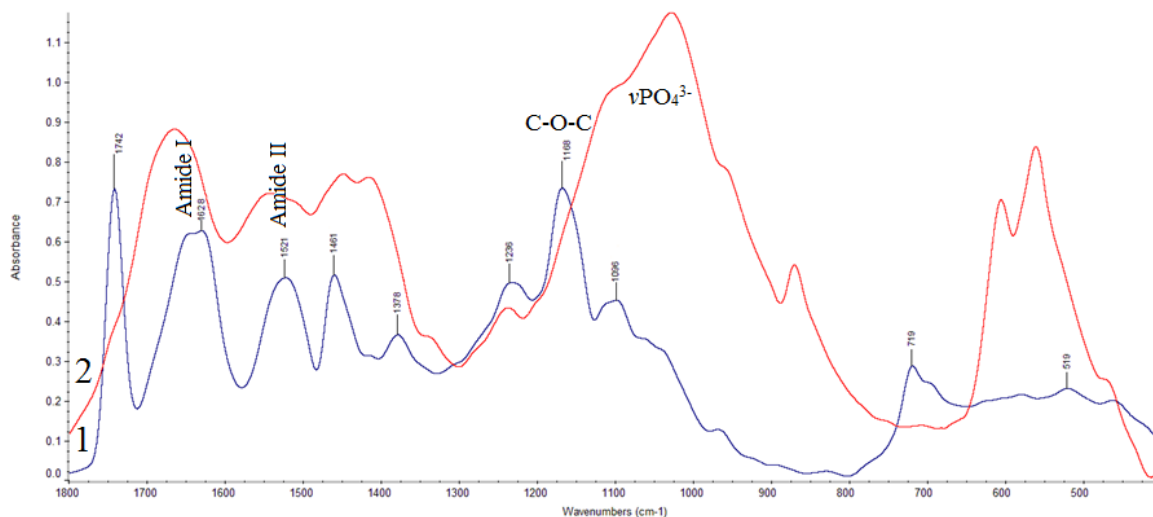
Στο Σχήμα 6.23 φαίνονται τα υπέρυθρα φάσματα μηριαίου οστού ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία το νεφρό (1). Παρατηρείται ότι η ασθένεια εμφανίζει τα ίδια χαρακτηριστικά, επιβεβαιώνοντας ότι η ασθένεια έχει κοινή συμπεριφορά, όσον αφορά το τελικό αποτέλεσμα στον ασθενή.



**Σχήμα 6. 23:** FT-IR φάσματα μηριαίου οστού ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία το νεφρό (1) και υγιούς οστού (2) στην περιοχή 4000-400  $\text{cm}^{-1}$

Συγκρίνοντας τα φάσματα μεταξύ υγιούς οστούς και καρκινικού διαπιστώνεται ότι οι εντάσεις των ταινιών των δονήσεων τάσης των ομάδων νNH των πρωτεϊνών στην περιοχή 4000-3100  $\text{cm}^{-1}$  μεταβάλλεται σημαντικά. Το ίδιο παρατηρείται στην περιοχή 3000-2850  $\text{cm}^{-1}$  όπου εμφανίζονται οι δονήσεις τάσης των μεθυλ- και μεθυλεν ομάδων των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων τα οποία αποτελούν την μεμβράνη των κυττάρων.

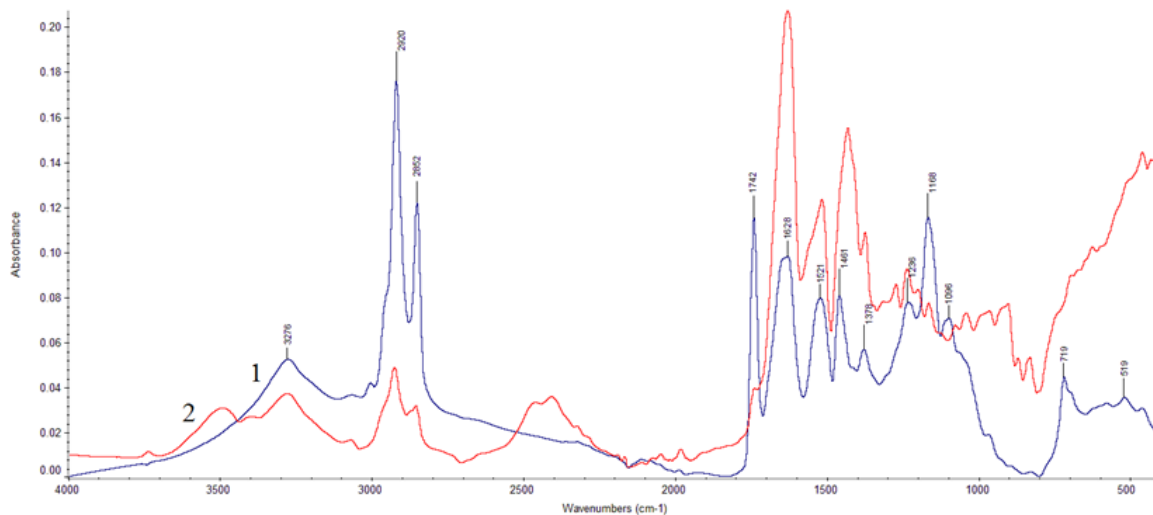
Στην περιοχή του φάσματος 1800-400  $\text{cm}^{-1}$  (Σχήμα 6.24) φαίνονται τα FT-IR των ίδιων δειγμάτων για μεγαλύτερη ακρίβεια στην ανάλυση. Η έντονη αύξηση της ταινίας στα 1742  $\text{cm}^{-1}$  δείχνει την πρόοδο της ασθένειας, η οποία δείχνει την κλινική κατάσταση του ασθενούς. Η αύξηση της ταινίας στα 1742  $\text{cm}^{-1}$  σε συνδυασμό με τις έντονες μετατοπίσεις των μεγίστων απορρόφησης προς μικρότερους κυματαριθμούς των Amide I και Amide II επιβεβαιώνει την κακή κλινική κατάσταση του ασθενούς και επί πλέον ότι η μετάσταση από τα νεφρά στα οστά προκαλεί περισσότερο έντονες βλάβες σε μοριακό επίπεδο.



**Σχήμα 6. 24:** FT-IR φάσματα μηριαίου οστού ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία το νεφρό (1) και υγιούς οστού (2).

Η αυξημένη γλυκοζυλίωση, όπως φαίνεται από τις μεταβολές στην περιοχή του φάσματος μεταξύ  $1200-1000\text{ cm}^{-1}$  συνηγορεί για το προχωρημένο στάδιο της ασθένειας. Τέλος, από την πλήρη εξαφάνιση των ταινιών του υδροξυαπατίτη στην περιοχή του φάσματος του ασθενούς μεταξύ  $900-1100\text{ cm}^{-1}$  και  $400-600\text{ cm}^{-1}$  επιβεβαιώνει τις διαπιστώσεις για τις βλάβες τις οποίες προκαλεί ο μεταστατικός καρκίνος στην μοριακή δομή των οστών.

Για την απόδοση των ταινιών, λόγω της πολυπλοκότητας του φάσματος τοποθετήσαμε το δείγμα σε δευτεριωμένο νερό ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Στο Σχήμα 6.25 το φάσμα 1 προέρχεται από το μηριαίο οστό του ασθενούς και το φάσμα 2 προέρχεται από το ίδιο οστό, αφού έχει προκληθεί δευτερίωση. Παρατηρείται από τη σύγκριση των φασμάτων ότι οι νέες ταινίες μεταξύ  $2700-2400\text{ cm}^{-1}$  αποδίδονται στις δονήσεις των  $\nu\text{OD}$  και  $\nu\text{ND}$  και αντιστοιχούν στις ταινίες οι οποίες απορροφούν στην περιοχή  $3500-3000\text{ cm}^{-1}$ . Από την μείωση των ταινιών  $\nu\text{OH}$  και  $\nu\text{NH}$  στην περιοχή  $3500-3000\text{ cm}^{-1}$  συμπεραίνεται ότι δεν έγινε πλήρης αντικατάσταση των ευκίνητων υδρογόνων των ομάδων  $\text{NH}$  και  $\text{OH}$  από το δευτέριο.



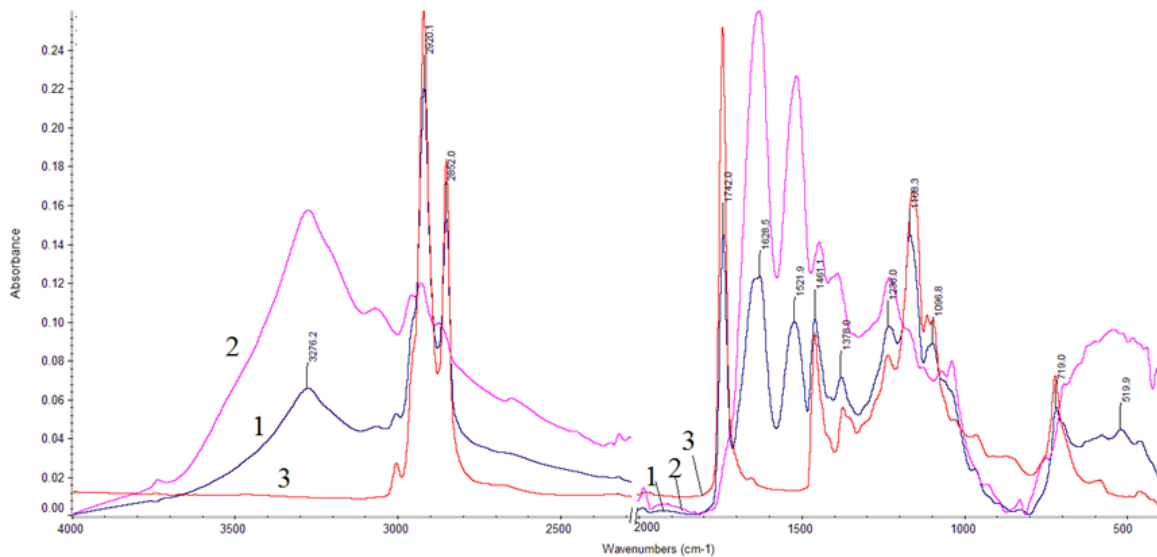
**Σχήμα 6. 25:** FT-IR φάσματα οστού ασθενούς με πρωτοπαθή εστία νεφρό 1: οστό μηριαίου, 2: δευτεριωμένο οστό μηριαίου.

Το γεγονός ότι οι ταινίες στην περιοχή  $900-1100\text{ cm}^{-1}$  οι οποίες αντιστοιχούν στις δονήσεις των φωσφορικών ομάδων του υδροξυαπατίτη δεν εμφανίζονται μετά την δευτερίωση, συνεπάγεται ότι οι ταινίες οφείλονται σε πολυσακχαρίτες.

## 6.8. Μεταστατικός καρκίνος οστού από πρωτοπαθή εστία πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι από τους πλέον θανατηφόρους καρκίνους και στην Ευρώπη οι θάνατοι αριθμούν το 20% όλων των καρκίνων, συνδέεται δε άμεσα με το κάπνισμα [82,83]. Συνήθως δίνει μονήρεις μεταστάσεις, δηλαδή εντοπισμένες σε μια συγκεκριμένη θέση και όχι διάσπαρτες. Στο Σχήμα 6.26 δίνονται για σύγκριση τα υπέρυθρα φάσματα του μηριαίου οστού με καρκίνο από πρωτοπαθή εστία τον πνεύμονα (1) όπως λήφθηκε από τον ασθενή, (2), μετά από την τοποθέτησή του στο εξάνιο και (3) το φάσμα το οποίο προέκυψε από τα διαλελυμένα συστατικά του οστού στο εξάνιο

Από τη σύγκριση των φασμάτων διαπιστώνεται ότι οι ταινίες μεταξύ  $3000-2800\text{ cm}^{-1}$  μειώνονται σημαντικά, ένδειξη ότι οι οργανικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους έχουν απομακρυνθεί. Αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι στο φάσμα των διαλυμένων συστατικών οι εντάσεις των ταινιών αυτών είναι αυξημένες (Σχ. 6.26,3).



**Σχήμα 6. 26:** FT-IR φάσματα μηριαίου οστού ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία πνεύμονα. 1. όπως λήφθηκε από τον ασθενή, 2: μετά από την τοποθέτησή του στο εξάνιο 3: των διαλυμένων συστατικών του οστού στο εξάνιο

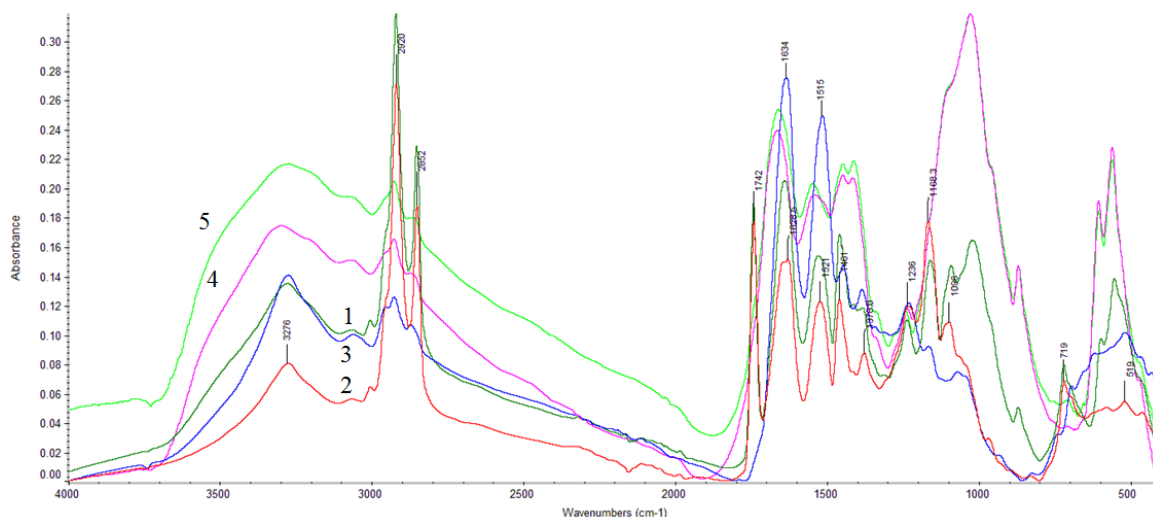
Η χαρακτηριστική ταινία στα  $1740\text{ cm}^{-1}$  μειώνεται δραστικά μετά την διάλυση και τα προϊόντα των οξειδωμένων λιπιδίων και πρωτεϊνών βρίσκεται ως ίζημα στο εξάνιο. Αντίθετα οι ταινίες των Amide I και Amide II δεν επηρεάζονται από τον διαλύτη. Αντίθετα οι εντάσεις των ταινιών των γλυκοζιτών μειώνονται σημαντικά αλλά δεν εξαφανίζονται. Η συμπερφορά αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα παραγόμενα σάκχαρα κατά την εξέλιξη της ασθένειας πρέπει να προσκολλώνται σε θραύσματα πρωτεϊνών και να σχηματίζουν τελικά προϊόντα αμυλοειδούς τύπου πρωτεϊνών, επιβεβαιώνοντας τα προηγούμενα ευρήματα σε άλλους ασθενείς.

Η επαναφορά των ταινιών στο φάσμα του Σχήματος 6.26,3 δείχνει ότι τα συστατικά παρέμειναν στον διαλύτη. Αυτό το συμπέρασμα ερμηνεύει την παραδοχή μας ότι δηλαδή ο καρκίνος προκαλεί όχι μόνον οστεόλυση αλλά και σχάση των αλυσίδων των πρωτεϊνών, λιπιδίων και φωσφολιπιδίων, από τα οποία αποτελείται το κύτταρο.



## 6.9. FT-IR φάσματακαρκινικών οστών ασθενών οι οποίοι δέχθηκαν ακτινοθεραπεία

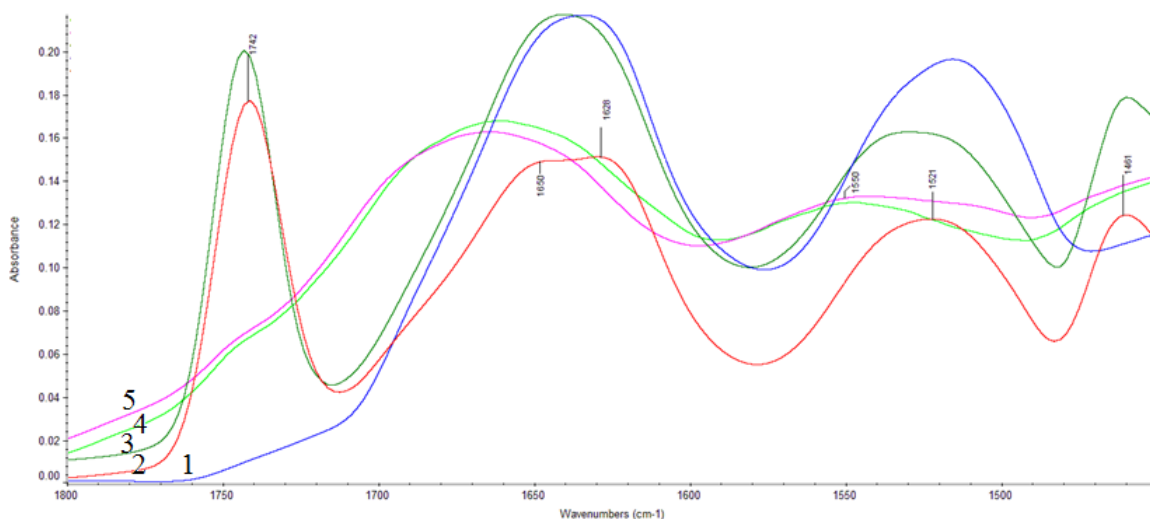
Όπως προαναφέρθηκε η ακτινοθεραπεία αποτελεί συνήθως την μοναδική θεραπεία στην αντιμετώπιση του καρκίνου των οστών. Οι βλάβες όμως τις οποίες προκαλεί στα οστά δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Στο Σχήμα 6.27 δίνονται τα υπέρυθρα φάσματα ασθενών με μεταστατικό καρκίνο των οστών χωρίς ακτινοθεραπεία, να τους έχει χορηγηθεί ακτινοθεραπεία. Για σύγκριση δίνονται τα φάσματα υγιούς οστού και του ίδιου οστού το οποίο έχει ακτινοβοληθεί με δόση ακτινοβολίας 1 Gy, πολύ μικρότερη από αυτή η οποία χρηγείται σε μια συνεδρία.



**Σχήμα 6. 27:** FT-IR φάσματα μηριαίων οστών. 1 Ασθενών με μεταστατικό καρκίνο χωρίς ακτινοθεραπεία, 2,3 Ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε ακτινοθεραπεία, 4 υγιούς οστού και 5 ακτινοβολημένου *in situ* υγιούς οστού με δόση 1 Gy. Περιοχή 4000-400  $cm^{-1}$ .

Παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές, ως αποτέλεσμα τόσο της ασθένειας όσο και της ακτινοθεραπείας. Οι ταινίες των απορροφήσεων των δονήσεων τάσης ομάδων νOH του υδροξυαπατίτη εξαφανίζονται, ενώ των ταινιών νNH των πρωτεϊνών έχουν διαφοροποιηθεί σημαντικά, ως προς το υγιές οστό. Οι μεταβολές αυτές είναι περισσότερο εμφανείς στην περίπτωση των ασθενών οι οποίοι υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία. Σημαντική επίσης είναι η αύξηση των εντάσεων των ταινιών των αντισυμμετρικών και συμμετρικών δονήσεων τάσης των ομάδων νCH<sub>2</sub> στα 2920  $cm^{-1}$  και 2852  $cm^{-1}$ .

Στο Σχήμα 6.28 δίνεται η περιοχή του φάσματος  $1800-1450\text{ cm}^{-1}$ , όπου εμφανίζονται οι δονήσεις κάμψης των αμιδίων των κολλαγονούχων πρωτεϊνών. Από την σύγκριση των ταινιών των ασθενών οι οποίοι έχουν υποβληθεί σε ακτινοθεραπεία με εκείνους οι οποίοι δεν δέχθηκαν αλλά και με τα υγιή οστά παρατηρείται ότι στους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία η ένταση της ταινίας στα  $1742\text{ cm}^{-1}$  αυξάνει περισσότερο. Η αύξηση αυτή επιβεβαιώνει την προηγούμενη παραδοχή ότι σε κάποιο από τα στάδια της ασθένειας συμμετέχουν οι ελεύθερες ρίζες, αφού κατά την ραδιοθεραπεία οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες οδηγούν σαφώς στην παραγωγή ελευθέρων ριζών με συνέπεια την έντονη υπεροξειδωση των μεμβρανών και την παραγωγή αλδευδών. Οι ταινίες των αμιδίων των πρωτεϊνών μετατοπίζονται από τα  $1650\text{ cm}^{-1}$  και  $1550\text{ cm}^{-1}$  προς μικρότερους κυματάρθμους δείχνοντας και πάλι την καταστροφή της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών. Ιδιαίτερα στο φάσμα του ασθενούς 3 εμφανίζονται δύο ταινίες η μια στα  $1650\text{ cm}^{-1}$  και η άλλη στα  $1628\text{ cm}^{-1}$ .



**Σχήμα 6. 28:** FT-IR φάσματα μηριαίων οστών. 1 Ασθενών με μεταστατικό καρκίνο χωρίς ακτινοθεραπεία, 2,3 Ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε ακτινοθεραπεία, 4 υγιούς οστού και 5 ακτινοβολημένου *in situ* υγιούς οστού με δόση 1 Gy. Περιοχή  $1800-400\text{ cm}^{-1}$ .

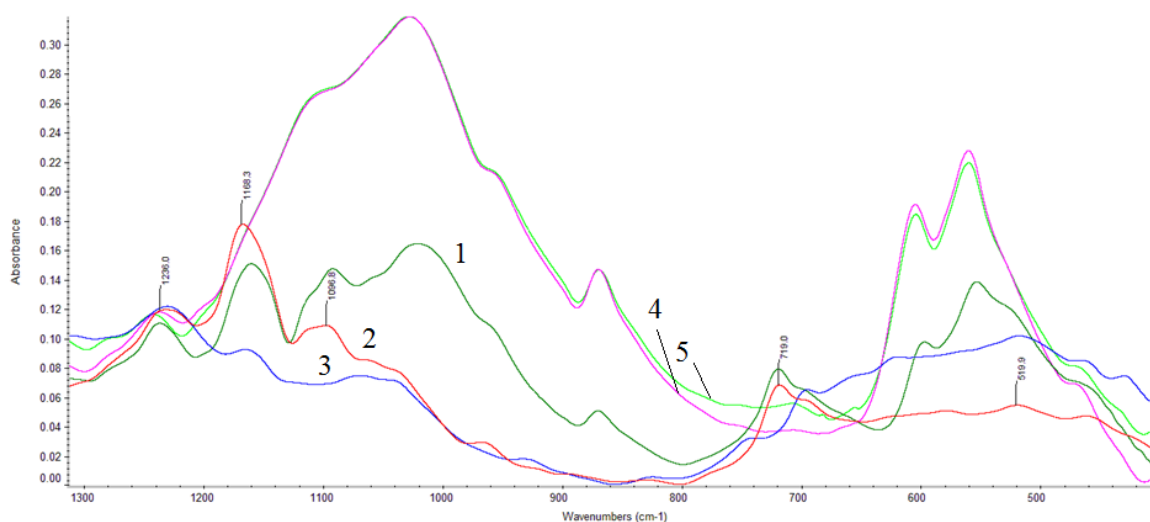
Από τους λόγους των εντάσεων των ταινιών [Amide I]:[Amide II] διαπιστώνεται ότι στην περίπτωση των ασθενών, στους οποίους χορηγήθηκε ραδιοθεραπεία ο λόγος αυξάνει (Πίνακας 6.4). Αντίθετα στους πρωτοπαθείς καρκίνους ο λόγος [Amide I]:[Amide II] μειώνεται. Οι αναλογίες αυτές δείχνουν ότι η ακτινοβολία καταστρέφει επιπλέον την β-έλικα των πρωτεϊνών και την μετατρέπουν σε β-αντιπαράλληλα και β-παράλληλα επίπεδα φύλλα και σε τυχαία διαμόρφωση. Αποτέλεσμα αυτών των

μεταβολών είναι η καταστροφή της ανόργανης φάσης του οστού, η οποία οδηγεί τελικά στην ευθραυστότητα των οστών.

**Πίνακας 6. 4.** Μεταβολή των λόγων [Amide I]:[Amide II] σε συνάρτηση με την ακτινοθεραπεία

Οστό	[Amide I]:[Amide II]
Υγιές	1,19
Υγιές ακτινοβολημένο με δόση 1 Gy	1.23
Μηριαίο οστό ασθενούς χωρίς ραδιοθεραπεία	1,45
Μηριαίο οστό ασθενούς με ραδιοθεραπεία	1,48
Μηριαίο οστό ασθενούς με ραδιοθεραπεία	1,58

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου Ακτινοχημείας και Βιοφασματοσκοπίας έδειξαν τα ίδια αποτελέσματα και σε *in situ* ακτινοβολήσεις των υγιών οστών [12,13]. Παρατηρείται δηλαδή ότι κατά την ανάπτυξη της ασθένειας και την ραδιοθεραπεία λαμβάνουν χώρα παρόμοιες αντιδράσεις με αυτές οι οποίες προκαλούνται από την *in situ* ραδιόλυση των υγιών οστών.



**Σχήμα 6. 29:** FT-IR φάσματα μηριαίων οστών. 1 Ασθενών με μεταστατικό καρκίνο χωρίς ακτινοθεραπεία, 2,3 Ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε ακτινοθεραπεία, 4 υγιούς οστού και 5 ακτινοβολημένου *in situ* υγιούς οστού με δόση 1 Gy. Περιοχή 1300-400  $cm^{-1}$ .

Αν λάβουμε υπόψη ότι κατά την *insitu* ακτινοβόληση η βλάβη οφείλεται στην άμεση και έμμεση επίδραση των ιοντιζουσών ακτινοβολιών μέσω του ιοντισμού και των ελευθέρων ριζών, τότε θα πρέπει να δεχθούμε ότι ανάλογες αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα και στους ασθενείς κατά την ραδιοθεραπεία.

Φαίνεται δηλαδή ότι οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου, οι οποίες παράγονται κατά την ραδιόλυση του νερού των κυττάρων αντιδρούν με τα αμινοξέα καταστρέφοντας τους δεσμούς υδρογόνου οι οποίοι συγκρατούν την έλικα των πρωτεϊνών και στη συνέχεια προκαλείται η οστεόλυση. Για να ερμηνευθούν τα αποτελέσματα πρέπει να λάβουμε υπόψη τα προϊόντα τα παραγόμενα από την επίδραση της ιοντίζουσας ακτινοβολίας.

Είναι γνωστό ότι όταν η ιοντίζουσα ακτινοβολία προσπέσει στην ύλη και στην περίπτωσή μας στο οστό, σε χρόνους της τάξεως του  $10^{-15}$  sec προκαλούνται ιοντισμοί σύμφωνα με την αντίδραση (6.7):

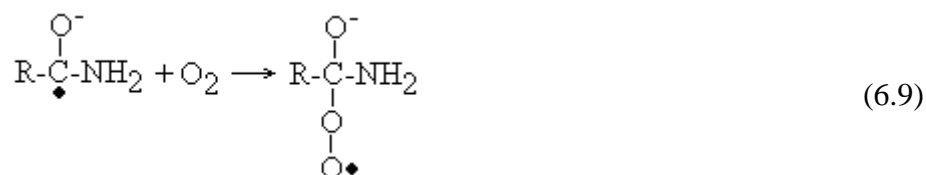


όπου B το οστό.

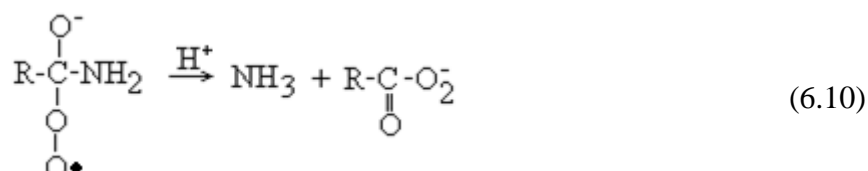
Τα παραγόμενα ηλεκτρόνια αντιδρούν με τα συστατικά του οστού, τα οποία μπορούν να δεχθούν ηλεκτρόνια. Είναι γνωστό ότι η ομάδα C=O δίδει εύκολα αντιδράσεις προσθήκης του ηλεκτρονίου [62,65,85]. Επειδή το κολλαγόνο διαθέτει μεγάλο αριθμό ομάδων -C=O είναι εύκολο το παραγόμενο ηλεκτρόνιο να δώσει αντίδραση προσθήκης στον δεσμό αυτό, σύμφωνα με την αντίδραση:



Το προϊόν της αντίδρασης (6.8) επειδή είναι ασταθές μπορεί εύκολα να αντιδράσει με το οξυγόνο τόσο του οργανισμού όσο και της ατμόσφαιρας (στην περίπτωση της *in situ* ακτινοβόλησης) παράγοντας υπερόξυ ομάδες ως ελεύθερες ρίζες.



Οι υπερόξυ ελεύθερες ρίζες δεν είναι σταθερές και οδηγούν τελικά σε σχάση του υπερόξυ δεσμού.

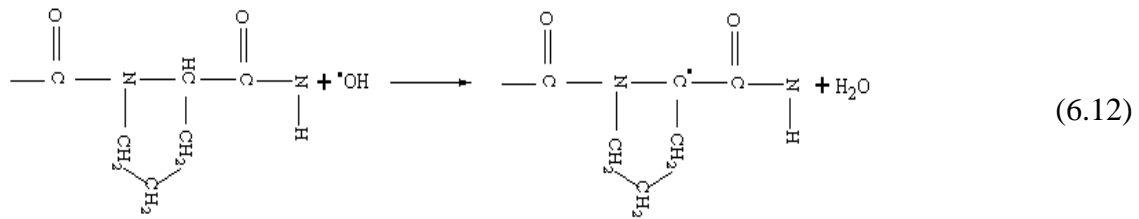


Τα προϊόντα των αντιδράσεων (6.7) έως (6.10) έχουν παρατηρηθεί και με φασματομετρία ηλεκτρονικού παραμαγνητισμού, esr (electron spin resonance), σε στερεή κατάσταση πριν από πολλά χρόνια στο πεπτίδιο της γλυκίνης [85,86]. Μάλιστα διαπιστώθηκε ότι όσο αυξάνει το μήκος της αλυσίδας των πρωτεϊνών τόσο αυξάνει και η σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης. Επίσης, οι αντιδράσεις (6.7) έως (6.10) ερμηνεύουν αρκετά ικανοποιητικά την μείωση της ταινίας στα  $1659 \text{ cm}^{-1}$ , η οποία παρατηρείται στα φάσματα μετά την ακτινοβολία. Τα αποτελέσματα ενισχύονται με την εμφάνιση της ταινίας στα  $1742 \text{ cm}^{-1}$ , η οποία όπως προαναφέρθηκε οφείλεται στον σχηματισμό αλδεϋδών, η ένταση της οποίας αυξάνει με την αύξηση της δόσης ακτινοβολίας [12,13,61]. Είναι γνωστό ότι τα υπεροξειδία των λιπιδίων, που προκύπτουν από την ραδιόλυση οδηγούν στο σχηματισμό ακόρεστων αλδεϋδών, κετονών και υδρογονανθράκων [81]. Η ταινία αυτή του καρβονυλίου έχει προταθεί για τον χαρακτηρισμό των αποπτωτικών κυττάρων [85].

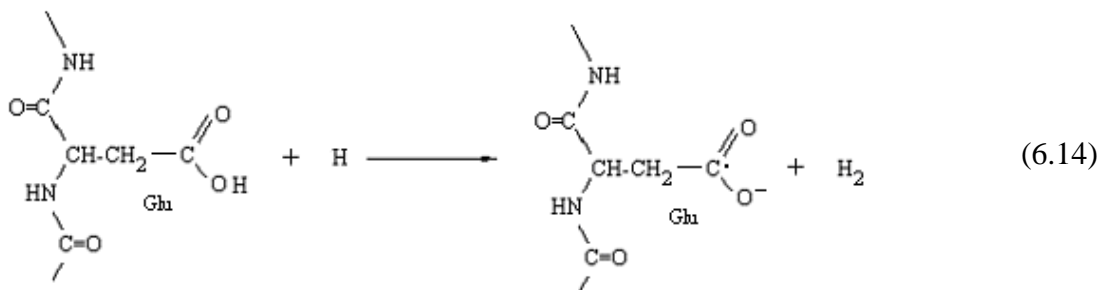
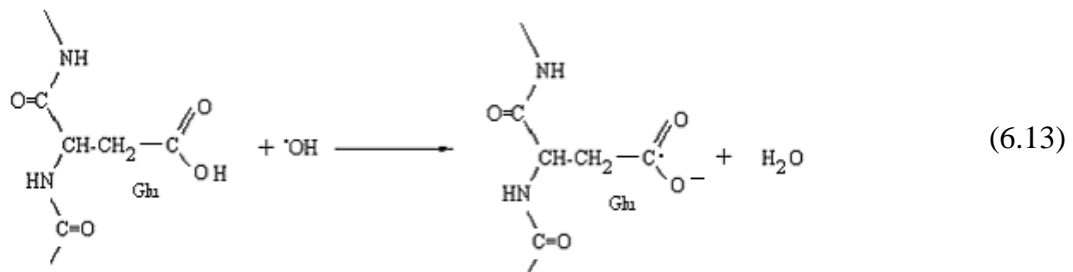
Επίσης από την μείωση των ταινιών που αντιστοιχούν στη δόνηση τάσης του νερού. Είναι γνωστό ότι τα βιολογικά κύτταρα περιέχουν περισσότερο από 70% νερό. Επομένως το νερό των κυττάρων διασπάται από την αντίδραση των ιοντιζουσών ακτινοβολιών σύμφωνα με την αντίδραση [65]:



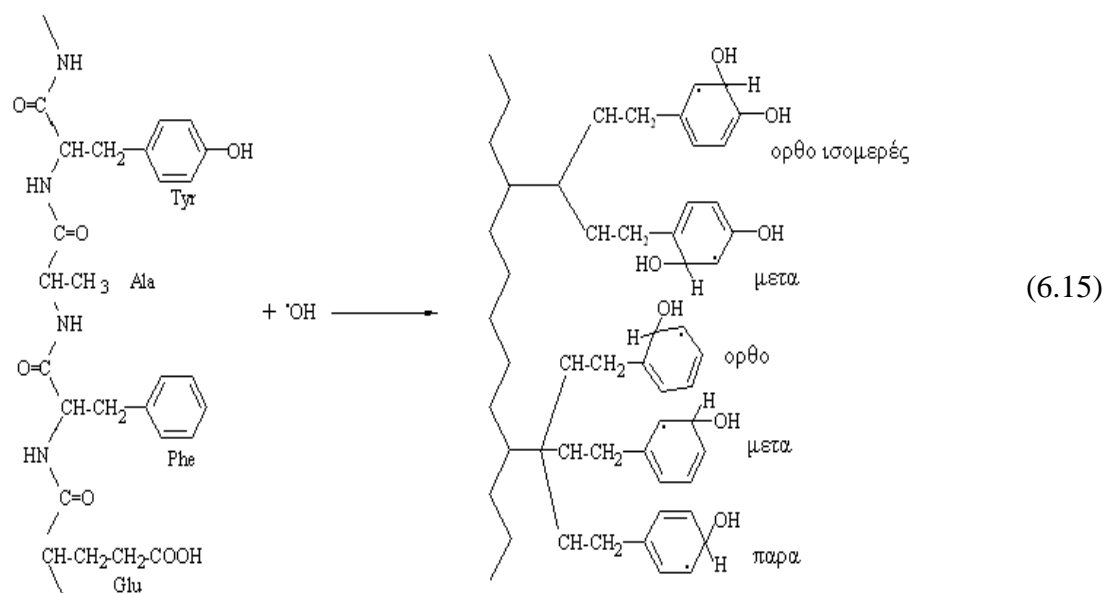
Στα προϊόντα διάσπασης του νερού επικρατούν κυρίως οι οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου ( $\cdot\text{OH}$ ), τα άτομα του υδρογόνου και τα εφυδατωμένα ηλεκτρόνια. Οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου μπορούν να δώσουν αντιδράσεις απόσπασης ατόμων υδρογόνου από τα μόρια των αμινοξέων των πρωτεϊνών [44]:



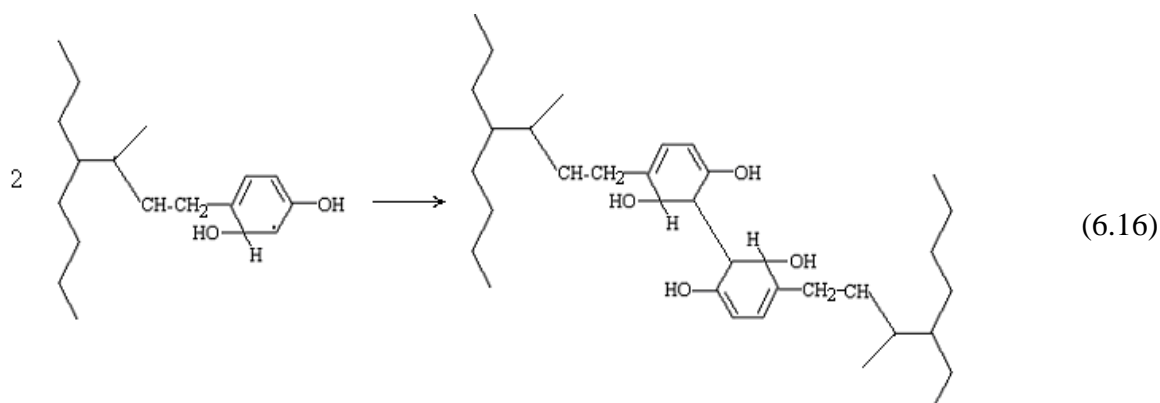
Οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες συνήθως δεν είναι σταθερές και διασπώνται σε μέρια με μικρότερο μήκος αλειφατικής αλυσίδας. Την παρουσία των ελευθέρων αυτών ριζών διαπίστωσε ο Hawkins με τους συνεργάτες του χρησιμοποιώντας esr φασματοσκοπία [86]. Οι εν λόγω ερευνητές διαπίστωσαν σήματα ηλεκτρονικού παραμαγνητισμού από τις παρακάτω ελεύθερες ρίζες:



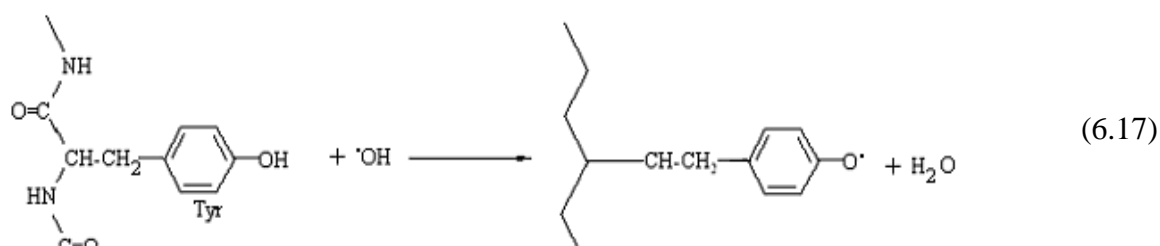
Επίσης οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου αντιδρούν με αντιδράσεις προσθήκης στους διπλούς δεσμούς των κυκλικών ομάδων του κολλαγόνου (τυροσίνη και φαινιλαλανίνη) σύμφωνα με τις αντιδράσεις (6.15):



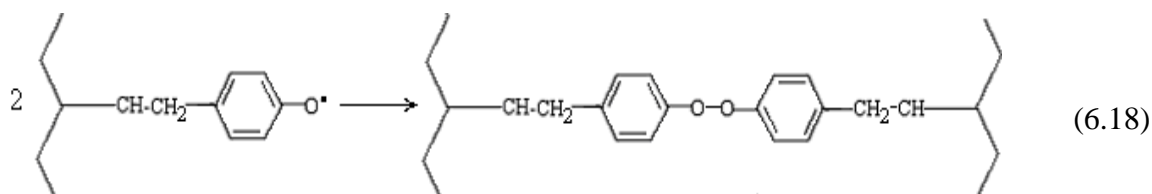
Τα παραπάνω προϊόντα πιστοποιήθηκαν από άλλους ερευνητές με υπεριώδη φασματοσκοπία [84]. Οι παραγόμενες ρίζες μπορούν στη συνέχεια να διμερισθούν και να σχηματίσουν προϊόντα, τα οποία παρεμποδίζουν την ανάπτυξη (επιδιόρθωση) των οστών σύμφωνα με την αντίδραση (6.16):



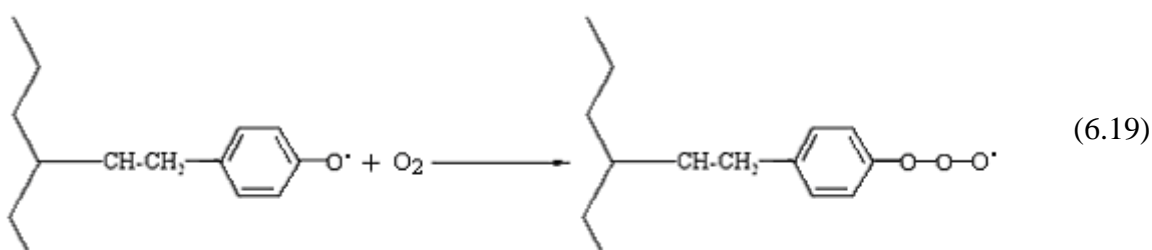
Είναι δυνατόν όμως οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου να αποσπάσουν άτομα υδρογόνου από τις ομάδες υδροξυλίου σύμφωνα με την αντίδραση (6.17):



Οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες από την αντίδραση (6.17) συνήθως διμερίζονται:

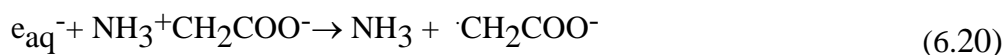


Επειδή όμως στο περιβάλλον υπάρχει τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* οξυγόνο, η ελεύθερη ρίζα αντιδρά με το οξυγόνο οδηγώντας σε υπερόξυ ελεύθερες ρίζες, οι οποίες επειδή δεν είναι σταθερές οδηγούν σε σχάση της ανθρακικής αλυσίδας:

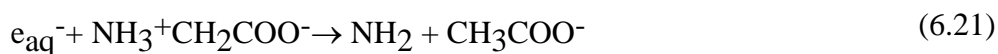


Η αντίδραση (6.19) διακαριοποιεί επαρκώς την εμφάνιση της ταινίας στα περίπου  $1745\text{cm}^{-1}$ .

Τα παραγόμενα εφυδατωμένα ηλεκτρόνια αντιδρούν με τα αμινοξέα, προκαλώντας τελικά την απόσπαση ενός μορίου αμμωνίας και σχηματισμό ελεύθερης ρίζας, σύμφωνα με τις αντιδράσεις (6.20) και (6.21):

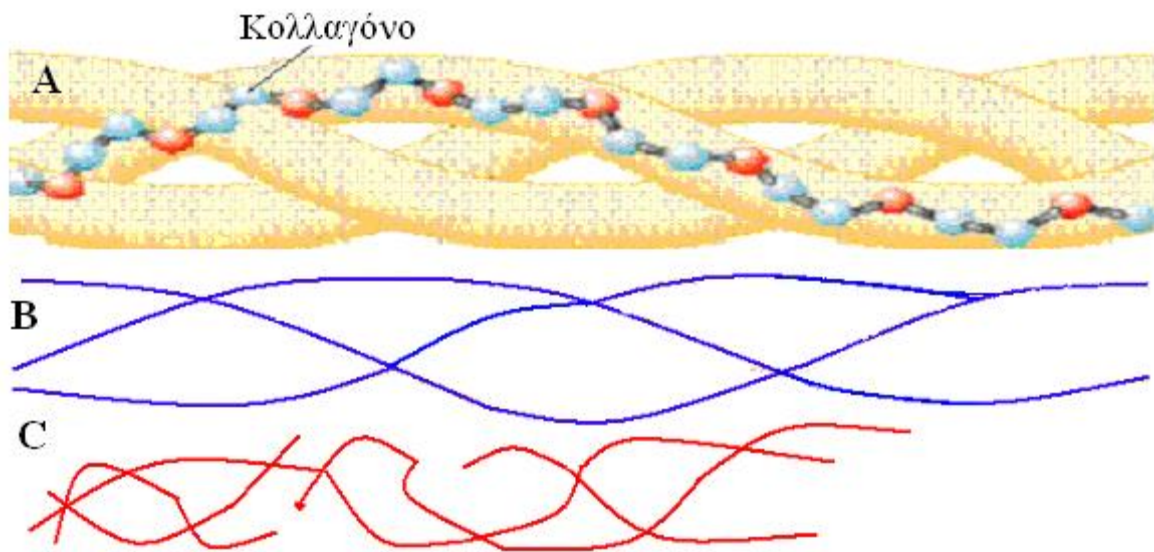


ή



Η σχάση της αλυσίδας της πρωτεΐνης, που περιγράφει παραπάνω, φαίνεται να συνοδεύεται και από τοπική αλλαγή της δευτεροταγούς δομής της, δηλαδή τοπικά κοντά στα σημεία θραύσης της αλυσίδας η πρωτεΐνη χάνει την δομή της α-έλικας που είχε αρχικά και σχηματίζει δομή β-επίπεδων φύλλων και β-αναδίπλωσης και στη συνέχεια τυχαίας διαμόρφωση, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.30 [62].





**Σχήμα 6. 30:** Σχηματική παράσταση της αλλαγής της στερεοδομής του κολλαγόνου που προκαλείται με την ακτινοβολία, από α-έλικα (A) σε β-έλικα (B) και τυχαίος σχηματισμός με αλυσίδες μικρότερου μήκους (C)

Από την αύξηση των λόγων στις συχνότητες  $1692\text{ cm}^{-1}$  όπου απορροφούν τα β-αντιπαράλληλα επίπεδα (Amide II) και  $1550\text{ cm}^{-1}$  της β-αναδίπλωσης (turn) Amide II στους ασθενείς οι οποίοι δέχθηκαν αντινοβολία συμπεραίνεται ότι οι πρωτεΐνες μετατρέπονται σε αμυλοειδούς τύπου. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι οι ελεύθερες ρίζες πρέπει να παράγονται κατά την ανάπτυξη της ασθένειας επηρεάζοντας τα συστατικά των οστών.

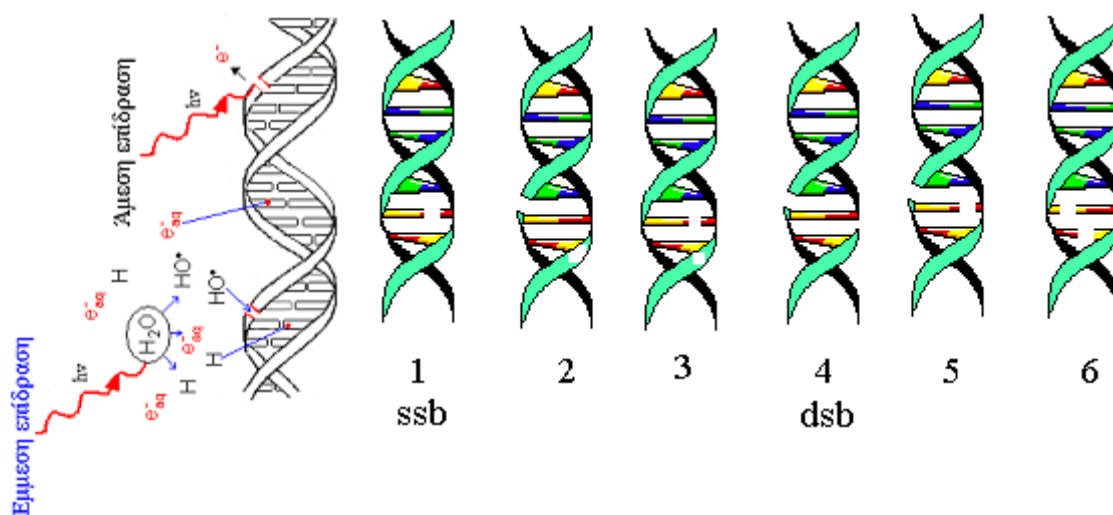
Επίσης μετά την ακτινοβολία παρατηρείται μείωση των ταινιών στην περιοχή  $3000-2850\text{ cm}^{-1}$ , όπου εμφανίζονται οι ταινίες που απορροφούν οι συμμετρικές και αντισυμμετρικές δονήσεις τάσης των ομάδων  $\nu\text{CH}_3$ ,  $\nu\text{CH}_2$  των λιπιδίων. Το συμπέρασμα αυτό συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου αναφέρεται ότι μετά την ακτινοβολία θηλυκών ποντικών Wistar παρατηρείται οξειδωτική βλάβη των λιπιδίων, όπως επίσης και μετά την ακτινοβολία των οστών [87-91]. Ο S.Basu και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι η υπεροξείδωση των πρωτεϊνών επηρεάζει την οστική πυκνότητα [92].

Επίσης οι κορυφές στην περιοχή  $1450-1400\text{ cm}^{-1}$  που αντιστοιχούν στα ανθρακικά ιόντα έχουν αλλάξει σημαντικά. Αυτό δείχνει ότι τα ανθρακικά ιόντα δεν παραμένουν αδρανή στην καταστρεπτική δράση της ακτινοβολίας. Η μικρή μετατόπιση της ταινίας

από τα  $1413\text{ cm}^{-1}$  προς μεγαλύτερους κυματάρθμους κατά  $5\text{ cm}^{-1}$  ( $1418\text{ cm}^{-1}$ ) πιθανόν να οφείλεται σε μεταβολή της δομής του καλσίτη, όπου επικρατούσε το ανθρακικό ασβέστιο και στη συνέχεια εμφανίσθηκε κάποια νέα δομή του καλσίτη. Η κορυφή στα  $1379\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στην δόνηση κάμψης  $\delta\text{CH}_2$  της μεθυλομάδας. Η κορυφή δεν είναι νέα, αλλά αντιστοιχεί στον ώμο τον οποίο εμφανίζει η ταινία του φάσματος στα  $1412\text{ cm}^{-1}$ . Επειδή η ένταση της ταινίας στα  $1413\text{ cm}^{-1}$  μειώθηκε, δόθηκε πλέον η δυνατότητα να εμφανισθεί η κορυφή στα  $1379\text{ cm}^{-1}$ , η οποία επικαλυπτόταν από τις πλατιές κορυφές του ανθρακικού ασβεστίου.

Επιπλέον και η κορυφή που εμφανίζεται στα  $1240\text{ cm}^{-1}$  μειώνεται σημαντικά. Η μείωση προφανώς οφείλεται στην μείωση όλων των χαρακτηριστικών ομάδων που συμμετέχουν στην ταινία αυτή, όπως είναι η ομάδα Amide III. Η μείωση της ταινίας αυτής συμφωνεί και με όλες τις μεταβολές που παρατηρούνται στην περιοχή του φάσματος μεταξύ  $4000\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ , όπου εμφανίζονται οι δονήσεις τάσης των ομάδων νN-H. Η ταινία αυτή επίσης χαρακτηρίζει και την τεταρτοταγή δομή των κολλαγονούχων πρωτεϊνών.

Επίσης, από την μεταβολή των ταινιών των φασμάτων των ασθενών οι οποίοι δέχθηκαν ραδιοθεραπεία στην περιοχή του φάσματος μεταξύ  $800\text{-}850\text{ cm}^{-1}$  φαίνεται ότι η ακτινοβόληση των ιστών προκαλεί περαιτέρω βλάβη του DNA.

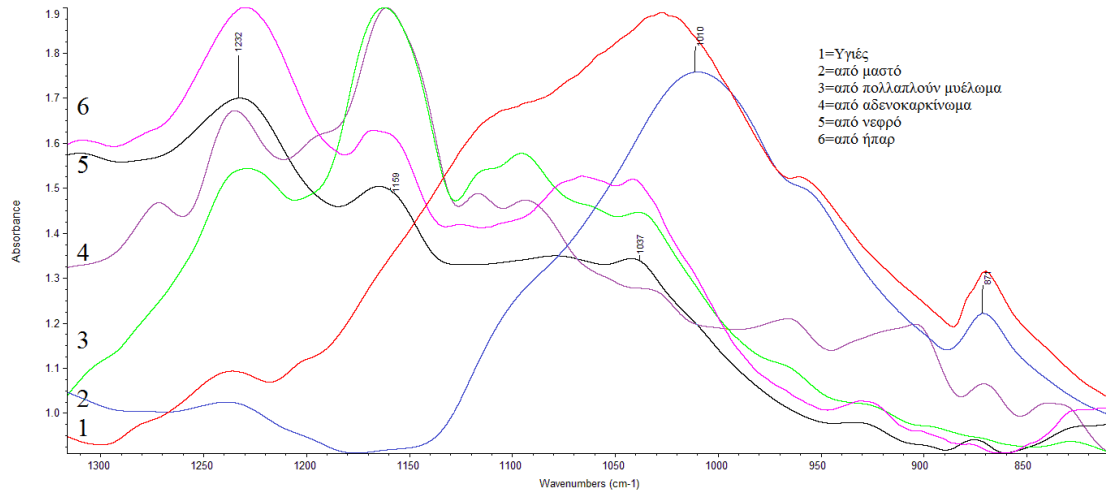


**Σχήμα 6. 31:** Δυνατές "βλάβες" του DNA από τις ιοντίζουσες ακτινοβολίες 1: βλάβη βάσης, 2: βλάβη σακχάρου, σχάση της μιας έλικας (ssb, single strand break), 3: βλάβη βάσης ή σακχάρου, 4: σχάση της διπλή ζέλικας (dsb, double strand break), 5: βλάβη βάσης και σχάση της απέναντι έλικας (ssb), 6: βλάβη βάσεων στις δύο έλικες [63].

Είναι γνωστό ότι οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες επιδρούν άμεσα και έμμεσα στο DNA προκαλώντας βλάβες στην έλικα και στις βάσεις του, με αποτέλεσμα την δευτερογενή ανάπτυξη του καρκίνου (Σχήμα 6.31). Οι προκαλούμενες βλάβες οδηγούν στην μεταβολή της μοριακής δομής του DNA, και κατ'επέκταση την εμφάνιση των νέων ταινιών στην περιοχή  $800-850\text{ cm}^{-1}$ . Βιοστατιστικές προσομοιώσεις για την μέτρηση του αποτελέσματος της επίδρασης της ακτινοβολίας στους ιστούς κατά την ακτινοθεραπεία, απέδειξαν ότι δεν είναι αρκετό να παρατηρούνται μόνο τα αρχικά φαινόμενα. Έτσι, η ακριβής μέτρηση της δόσης της ακτινοβολίας που απαιτείται για κάθε θεραπευτικό σχήμα είναι επιτακτική, επειδή για την ίδια δόση ακτινοβολίας με την πάροδο του χρόνου εκδηλώνονται περισσότερα από ένα συμπτώματα σχετικά με εκείνα που εμφανίζονται στην έναρξη της θεραπείας. Τελικά σήμερα είναι απόλυτα κατανοητό ότι κάθε ασθενής αποτελεί μοναδιαία περίπτωση ως προς την ευαισθησία έναντι των ιοντίζουσών ακτινοβολιών.

## **6.10. Επίδραση του μεταστατικού καρκίνου στον υδροξυαπατίτη**

Για μεγαλύτερη προσέγγιση στις βλάβες τις οποίες προκαλεί ο καρκίνος στην μηχανική αντοχή των οστών και στην οστεόλυση, παραθέσαμε τα υπέρυθρα φάσματα όλων των ασθενών στην περιοχή  $1300-850\text{ cm}^{-1}$ , περιοχή δηλαδή όπου εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές δονήσεις τάσης των φωσφορικών ομάδων του υδροξυαπατίτη. Στο Σχήμα 6.32 δίνονται τα FT-IR φάσματα οστών τα οποία λήφθηκαν από υγιές οστό (1) και από οστά με μεταστατικό καρκίνο από πρωτογενείς εστίες μαστού (2), πολλαπλούν μυέλωμα (3), αδενοκαρκίνωμα (4), νεφρό (5) και ήπαρ (6).



**Σχήμα 6. 32:** FT-IR φάσματα ασθενών στην περιοχή  $1200-800\text{ cm}^{-1}$ . 1: Υγιές, 2: πρωτοπαθής μαστός, 3: πρωτοπαθής πολλαπλούν μυέλωμα, 4: αδενοκαρκίνωμα, 5: από νεφρό και 6: από ήπαρ

Από την σύγκριση των φασμάτων προκύπτει ότι στο οστό με μεταστατικό καρκίνο από πρωτοπαθή εστία τον μαστό, ο υδροξυαπατίτης δεν είναι πλέον βιολογικός αλλά κρυσταλλικό φωσφορικό ασβέστιο. Στο φάσμα της ασθενούς με πρωτοπαθή εστία μαστού (Σχήμα 6.32, φάσμα 2) αν και η μορφή του φάσματος προσεγγίζει αυτήν του υγιούς οστού (Σχήμα 6.32, φάσμα 1), όμως οι χαρακτηριστικές ταινίες των φωσφορικών ιόντων μετατοπίζονται προς μικρότερους κυματάρθμους, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι ο υδροξυαπατίτης δεν είναι πλέον βιολογικός. Εξ άλλου, από τα XRD δεδομένα της ασθενούς, φαίνεται ότι το οστό αποτελείται από μίγμα αλάτων του ασβεστίου. Αυτή η μετατροπή αιτιολογεί την ευθραυστότητα των οστών και την μείωση των μηχανικών ιδιοτήτων τους.

**Πίνακας 6. 5:** Πίνακας FT-IR φάσματα ασθενών οι οποίοι υποβλήθηκαν ή όχι σε ραδιοθεραπεία

Μηριαίο /μαστός	μηριαίομαστός ακτι/πεία 39	ήπαρ μηριαίο ακτι/πεία	πολλαπλούν μνέλωμα $\text{cm}^{-1}$	χαρακτηριστικές ομάδες
3279	3282	3276	3280	$\nu$ NH
3066	3070 $\mu\text{κ}$	3070	3063	$\nu\text{C}=\text{CH}$
	3000	3006	3008	$\nu\text{CH}$ αρωματικό
2924	2923 $\epsilon\text{ντ}$	2925	2922 $\epsilon\text{ν}$	$\nu\text{as CH}_2$
2854	2854 $\epsilon\text{ντ}$	2854	2854 $\epsilon\text{ν}$	$\nu\text{as CH}_3$
1742	1742	1740	1742 $\epsilon\text{ν}$	(RO-C=O) εστερική ομάδα
1639	1641	1629	1644	$\nu\text{C}=\text{O}$ , $\nu\text{C}-\text{N}$ , $\delta\text{NH}$ Amide I, sheet
1519	1522	1517	1514	Amide II
1448	1459	1454	1455	$\delta\text{CH}_2$ & $\nu_3\text{CO}_3^{2-}$ , ανθρακικός απατίτης τύπου B
1416	1414 $\mu$			$\nu\text{COO}^-$ & $\nu_3\text{CO}_3^{2-}$ , ανθρακικός απατίτης τύπου AB
	1386 $\mu$	1378	1378	$\nu_3\text{COO}$ λιπαρών οξέων σε φάση με OH
1233	1236	1233	1235	$\nu$ C-N, $\delta$ NH (Amide III)
			1160	Σάκχαρα, γλυκάνες
			1093	$\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ ,
		1040 $\epsilon$	1040	$\nu\text{C}-\text{O}-\text{C}$
1013	1023			$\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ , στοιχειομετρικός HA, C-O-C
870	870			$\nu_3\text{CO}_3^{2-}$
	720		720	$\text{CH}_2$ tyr
700	600	700	700	
600	553	515	520	
555				$\delta$ O-P-O

Την μεγαλύτερη βλάβη των οστών παρατηρούμε στην περίπτωση των ασθενών οι οποίοι εκδήλωσαν πολλαπλούν μνέλωμα και αδενοσάρκωμα, όπως φαίνεται από τα φάσματα 3 και 4 αντίστοιχα (Πίνακας 6.5). Παρατηρείται ότι όχι μόνον οι ταινίες των φωσφορικών ιόντων έχουν εξαφανισθεί, αλλά και ότι οι εντάσεις των ταινιών στα  $1230 \text{ cm}^{-1}$  και  $1160 \text{ cm}^{-1}$  έχουν αυξηθεί σημαντικά. Οι ταινίες αυτές συνδέονται με τις φωσφορικές ομάδες και τις ριβόζες του DNA, αντίστοιχα. Βιβλιογραφικά είναι γνωστό ότι στην εξέλιξη του καρκίνου υπάρχει έντονη φωσφορυλίωση του DNA καθώς και αύξηση της παραγωγής

των γλυκοζιτών. Οι βλάβες αυτές είναι έντονες στο πολλαπλούν μυέλωμα, ασθένεια η οποία συνδέεται με τον μυελό των οστών, θέση δηλαδή παραγωγής του αίματος και επομένως η έκφραση του DNA είναι περισσότερο έντονη.

## Συμπεράσματα

Από την μελέτη της μοριακής δομής των καρκινικών οστών, από διάφορες πρωτοπαθείς εστίες, διαπιστώθηκε ότι η μετάσταση του καρκίνου στα οστά επιδρά άμεσα στην μεταβολή της χημικής σύστασης και μοριακής δομής των οστών. Η α-έλικα των πρωτεϊνών αποκτά τυχαία διαμόρφωση, ενώ εμφανίζονται αντιπαράλληλες διατάξεις της β-έλικας, οι οποίες αποδίδονται σε υπεροξειδώσεις κατά την ανάπτυξη της ασθένειας και σε προϊόντα πολυμερισμού.

Από την μεταβολή των FT-IR φασμάτων μετά από διάλυση των οστών σε οργανικούς διαλύτες, αποδείχθηκε ότι ο καρκίνος προκαλεί σχάση των ανθρακικών αλυσίδων τόσο των πρωτεϊνών όσο και των λιπιδίων των μεμβρανών μειώθηκε σημαντικά, λόγω της ασθένειας. Η μείωση του μήκους της αλυσίδας, η οποία αποδίδεται σε μηχανισμό ελευθέρων ριζών, οδηγεί στην μετατροπή του υδροξυαπατίτη από βιολογικό σε μη βιολογικό αλλά και σχηματισμό φωσφορικών αλάτων του ασβεστίου αναπτύσσοντας οστεοπόρωση. Στην κατάσταση αυτή αποδίδεται και η εμφανιζόμενη θραυστότητα των οστών. Η μείωση του μεγέθους των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη υπολογίσθηκε με XRD.

Στους ασθενείς οι οποίοι δέχθηκαν ακτινοθεραπεία, πριν την χειρουργική επέμβαση, φάνηκε ότι τα προϊόντα υπεροξειδωσίας είναι αυξημένα. Επί πλέον, φάνηκε ότι στους ασθενείς οι οποίοι δέχθηκαν ακτινοθεραπεία το DNA μετατράπηκε από το φυσιολογικό B-DNA στην καρκινική προκαρκινική κατάσταση A-DNA και Z-DNA, ενισχύοντας την άποψη ότι η εξέλιξη της ασθένειας ακολουθεί τα μονοπάτια φλεγμονής και υπεροξειδωσίας. Στους μεταστατικούς καρκίνους από πολλαπλούν μυέλωμα οι ασθενείς παρουσιάζουν εκτεταμένη βλάβη του DNA.

Τέλος, η FT-IR φασματοσκοπία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστική μέθοδος, η οποία δεν παρέχει μόνον πληροφορίες για την πορεία της ασθένειας, αλλά και το είδος της βλάβης με βάση τις χημικές αντιδράσεις οι οποίες λαμβάνουν χώρα κατά την ανάπτυξη της ασθένειας.





## Βιβλιογραφία

1. Παπαγγελόπουλος, Νεοπλάσματα οστών, Ορθοπαιδική-Τραυματιολογία, Αθήνα, 2001
2. W.P. Levin, H Kooy, JS Loeffler and TF Delaney, Oncology, Conventional Radiation Therapy, International Hospital Federation Reference Book 2006/2007, 107
3. H. Schirrmeister, Radiologic clinics, Detection of bone metastasis in breast cancer by Positron Emission Tomography, 45/6, 669-676 (2007)
4. T, H. Berquis, Oseous and myotendinous injuries about the knee, Radiologic clinics, 45/6, 955-968 (2007)
5. P. J. Hoskin, Bisphosphonates and radiation therapy for palliation of metastatic bone disease, Cancer Treat Rev, 29, 321-327, (2003)
6. J-J. Body, R. Coleman, Ph, Clezardin, C. Ripamonti, R. Rizzoli and M. Aapro, International society of geriatric oncology (SIOG) clinical practice recommendation for the use of bisphosphonates in elderly patients, Eur J Cancer, 45/5, 852-858 (2007).
7. D. E. Roos, S. R. Davis, S. L. Turner, P. C. O'Brien, N. A. Spry, B. H. Burmeister, P. J. Hoskin, D. L. Ball, Quality assurance experience with the randomized neuropathic bone pain trial (Trans-Tasman Radiation Oncology Group, 96.05), Radioth Oncol, 56, 315-322 (2003)
8. P. P. Dendy, Technology in imaging and radiotherapy towards improved workflow and productivity, Br J Radiol, 79, 1-4 (2006)
9. J. S-Y Wu, R. Wong, M. Johnston, A. Bezjak, T. Whelan, Meta-Analysis of Dose-Fractionation Radiotherapy Trials For The Palliation Of Painful Bone Metastases, Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 55, 594-605 (2003)
10. J. Anastassopoulou, M. Kyriakidou, A.E. Mavrogenis, P.J. Papagelopoulos & T. Theophanides, Demineralization of bones due to breast cancer metastasis: an Infrared study, Met. Ions Biol. Med. 11 (2011) 123
11. Π. Κολοβού, Α. Ντόβας, Π. Ευσταθίου, Ι. Αναστασοπούλου, Μελέτη της επίδρασης των ακτινοβολιών στο κολλαγόνο και στην οστική συνοχή οστού με φασματοσκοπία FT-IR, Οστών, 14, 68 (2003).

12. P. Kolovou and J. Anastassopoulou, Synchrotron FT-IR spectroscopy of human bones. The effect of aging. *Brilliant Light in Life and Material Sciences*, Eds. V. Tsakanov and H. Wiedemann, Springer, pp. 267-272, 2007.
13. P. Kolovou, J. Anastassopoulou, The influence of gamma rays on the molecularbone structure. A synchrotron FT-IR study. Recent progress and future perspectives. In: *Infrared Microscopy and Spectroscopy with advanced light sources*, Triest, Italy, 2004, p. 28-30.
14. J. Anastassopoulou, P. Kolovou and A. Pantzayia, Micro-FT-IR Spectroscopy ofIrradiated Human bones, 1<sup>st</sup> DASIM workshop, 19-20 July, 2005, Daresbury, Warrington, UK
15. Μ. Πετρά, Τ. Θεολόγης, Σ. Μισαϊλίδης, Ι. Αναστασοπούλου, Θ. Θεοφανίδης, Μελέτη της σύστασης και δομής παιδικού οστού με υπέρυθρη μικροφασματοσκοπία (micro-FTIR), *Οστών*, **13**, 56-57 (2002).
16. M. Petra, J.Anstassopoulou, D. Yfantis & T. Theophanides, FT-IR spectra of human Bones, in *Spectroscopy of biological molecules: New Directions*, (eds. J. Greve, G.J. Puppels, C. Otto), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999, pp 55.
17. M. Petra, J. Anastassopoulou, A. Dovas, D.Yfantis and T. Theophanides, Aging of human bones. An infrared study, *Metal Ion Biol. Med.* **6**, 736 (2000)
18. M. Petra, J. Anastassopoulou, T. Theologis & T. Theophanides, Synchrotron micro-FT-IR spectroscopic evaluation of normal paediatric human bone, *J. Mol Structure*, **78** (2005) 101-
19. V. Dritsa, K. Pissaridi, E. Koutoulakis, I. Mamarelis, C. Kotoulas, J. Anastassopoulou, An Infrared spectroscopic study of aortic valve. A possible mechanism of calcification and the role of magnesium salts, *In Vivo*, **84**, 91-98 (2014).
20. V. Dritsa, K. Pissaridi, J. Anastassopoulou, E. Koutoulakis, I. Mamarelis, Chr. Kotoulas, Investigating the mechanism of aortic valve stenosis: the role of magnesium salts, *J Cardiothoracic Surgery*, Vo8/sup.1,018,doi:10.1186/1749-8090-8-S1-O18, 2013, <http://www.cardiothoracicsurgery.org/8/S1/018>
21. K Pissaridi, V Dritsa, J Anastassopoulou, E Koutoulakis, I Mamarelis, Chr Kotoulas, Aortic valve calcification—the role of inflammation and fibrosis, *J Cardiothoracic Surgery*, Vo8/sup.1,032, 2013

22. T. Theophanides, J. Anastassopoulou, V. Dritsa, K. Pissaridi, E. Michalis, Metal ions and human diseases, Proceedings of the 12th International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine (Eds.) María H. Torre and Dinorah Gambino, ISBN: 978-9974-0-0911-0
23. J. Anastassopoulou, P. Kolovou, P. Papagelopoulos, T. Theophanides. The role of  $\beta$ -antagonists on the structure of human bone. A spectroscopic study. Infrared Spectroscopy/Book 2, In Ed: T. Theophanides, Intech Publications, 2012.
24. I. Mamarelis,, Chr. Kotoulas, V. Tsiligiris, V. Tzilalis, K. Pissaridi, V. Dritsa, J. Anastassopoulou, The role of free radicals on hyperoxidation of coronary and carotid arteries, In: Current research in cardiothoracic surgery in Greece, Ed. D. Dougenis, University of Patras, Patra, 2011, pp 69-73,
25. Θ. Θεοφανίδης, Ι. Αναστασοπούλου, Φασματοσκοπία Δονήσεων-Συμμετρία, ΕΜΠ Αθήνα, 1998.
26. T. Theophanides, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, D. Reidel Publishing Co. Dodrecht, 1984.
27. T. Theophanides, J. Anastassopoulou and N. Fotopoulos, Fifth International Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, 1991.
28. T. Theophanides, Introduction to infrared spectroscopy, In Infrared Spectroscopy, Materials, science, engineering and technology, Ed. T. Theophanides, InTech, pp. 1-10, 2012
29. T. Theophanides, Introduction to infrared spectroscopy in life and Biomedical sciences, in to infrared spectroscopy Life and Biomedical Sciences .I InTech, pp. 1-2, 2012
30. S. Missailidis, Cancer Clock, Francis & Teylor, 2007.
31. T. Theophanides and H.A. Tajmir-Riahi, Flexibility of DNA and RNA upon binding to different Metal Cations. An Investigation of the B to A to Z Conformational Transition by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, J. Biomol Struc Dynamics **Vo 2**, 995-1004 (1985).
32. Y Yonetani, H Kono, Sequence dependencies of DNA deformability and hydration in the minor groove, Biophysical J, 97(2009) 1138–1147
33. C. von Sonntag, The chemical basis of radiation biology, Taylor & Francis, London, 1987.

34. Γ. Χ. Μιχαηλίδης, Θεραπευτικές Κατευθύνσεις στην Ακτινοθεραπευτική Ογκολογία, Αθήνα 1999.
35. S. A. Leibel and Th. L. Phillips Textbook of Radiation Oncology, SAUNDERS, New York, San Francisco, 2004, 1255.
36. M. L. Van Kempen-Harteveld, H Struikmans, H. B. Kal, I. van der Tweel, M.P. Mourits, L. F. Verdonck, J. Schipper, J.J. Battermann, Cataract After Total Body Irradiation and Bone Marrow, Transplantation: Degree of Visual Impairment, *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 52, 2002, 1375–1380.
37. R.G.Grainger, D.J.Allison, A.Adam, A.K.Dixon, in *Diagnostic Radiology*, 4<sup>th</sup> ed. CHURCILL, LIVINGSTONE, 2001.
38. D.Shier, J.Butler, R.Leulis, Hole's Human Anatomy and Physiology, McGRAW-Hill, 1999.
39. Α. Αγγουλές, Π. Παπαγγελόπουλος, Η διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση των οστικών μεταστάσεων, *Επιστημονικά Θέματα*, 2006, σελ. 42-47, [www.edoeap.gr/wp-content/uploads/](http://www.edoeap.gr/wp-content/uploads/)
40. A. Brederlau, R. Faigle, P. Kaplan, P. Odin and K. Funa, Bone Morphogenetic Proteins but Not Growth Differentiation Factors Induce Dopaminergic Differentiation in Mesencephalic Precursors, *Mol Cell Neuroscience* **21** (2002) 367–378
41. J. A. Buckwalter, T.A. Einhorn and S.R. Simon. Form and function of bone: Bone cell morphology, Bone matrix composition, Bone mineralization, in *Basic Science–Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System*. American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2<sup>nd</sup> edition, Ch. 13, (2000) 320-332.
42. T. Theophanides and C. Sandorfy, *Spectroscopy of Biological Molecules*, NATO Advanced Study Institute, D. Reidel Publishing Co. Dodrecht, 1984.
43. P. Dumas, A synchrotron FT-IR study, Recent progress and future perspectives in Infrared Microscopy and Spectroscopy with advanced light sources, Trieste, Italy, 2004 October 28-30. J Anastassopoulou, Radiolysis of dinucleotides, *Chimica Chronika*, B, (1986) 394C. W. Oatley, *The Scanning Electron Microscope – part 1 The instrument*, Cambridge University Press, 1972, pp: 02 – 11
46. J. R. Davis *Metals Handbook*, Edited by:– The Materials Information Society, 1998, pp: 1422 – 1426

47. H D Young, Physics, Addison – Wesley Publishing Company, 8<sup>th</sup> Edition, 1992, 1151 – 1154 Κατερίνα Παντζάγια, Φασματοσκοπική μελέτη της επίδρασης ιόντων μαγνησίου στη δομή του κολλαγόνου, MS Βιοανόργανης Χημείας, Ε.Μ.Π. 2005.
49. J. Anastassopoulou, P. Kolovou, A. Mavrogenis, Bone and Cancer. A synchrotron micro- infrared study, in Metal Ions Biol Medic, , Eds. Ph Collery, I. Maynard, T. Theophanides, L. Khassanova, T. Collery, John Libbey, Eurotext, Vo10 (2008) 210-213.
50. A. Stevens, J. Lowe Histology, ed. Mosby 1993, Year Book Europe Limited, Μετάφραση –Επιμέλεια, Χ.Κίττας, 1993, σελ. 233
51. D. Voet and J.G. Voet, Biochemistry, 2<sup>nd</sup> edition, John Wiley & Sons, Inc, New York, 1995
52. T. Theophanides, J.P. Angiboust and M. Manfait, Protein and Nucleic Acid Conformational Changes, Spectroscopic and Structural Studies of Biomaterials, I. Proteins, (ed., Twardowski), Sigma Press, Wilmslow, UK, p. 3 (1988).
53. T. Theophanides, Nucleic Acid-Metal Interaction and Helix Inversion In: *Inorganic Biochemistry and Molecular Biophysics*(eds., W.Bal and A.Jeziarski), Wroclaw, p. 114 (1989).
54. T. Theophanides, Metal Ion-Nucleic Acid Interactions as studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy In *Spectroscopy of Inorganic Bioactivators*, ed., T. Theophanides, D. Riedel, 1989, p. 265-272.
55. M. Jackson, L.-P. Choo, P. H.Watson, W. C.Halliday, H. H.Mantsch, Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1270** (1995) 1-6.
56. K.-Zhi Liu, M. Jackson, M. G.Sowa, H. Ju, I. M.C.Dixon, H.Mantsch, Modification of the extracellular matrix following myocardial infarction monitored by FT-IR spectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1315** (1996) 73-77.
57. A. Veis and R.J. Schlueter, The macromolecular Organization of Dentine matrix Collagen I. Characterization of Dentine Collagen, *Biochemistry*, 1964, pp:1650-1657.
58. T. Theophanides, J. Anastassopoulou, Monuments damage from

- environmental pollution of ancient marbles using spectroscopic technologies. In *Monument Damage Hazards and Rehabilitation Technologies*, Eds. M. Kouli, F. Zezza, P. Koutsoukos, Vo 2, p. 31.
59. Μ. Πετρά, Μελέτη της εξέλιξης και γήρανσης των οστών με υπέρυθρη και μικρο-υπέρυθρη φασματοσκοπία. Σύγκριση με παθολογικά οστά και υποκατάστατα οστών, 2003. Διδακτορική διατριβή.
60. R. A. Nyquist and R. O. Kagel, *Infrared spectra of inorganic compounds*, Academic Press, New York, 1971.
61. J. Anastassopoulou, Mass spectrometry and FT-IR spectroscopy of quaternary ammonium salts, in *Topics in Molecular Organization and Engineering- Properties and Chemistry of Biomolecular Systems*, (Eds. E. Rizzarelli and T. Theophanides), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1991, p. 1-5.
62. Π. Κολοβού, Επίδραση των ακτινοβολιών στην γήρανση των οστών-Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών, 2011. Διδακτορική διατριβή.
63. S.J. Gadaleta, E.P. Paschalis, F. Betts, R. Mendelsohn, A.L. Boskey, Fourier transform infrared spectroscopy of the solution-mediated conversion of amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite: new correlations between X-ray diffraction and infrared data, *Calcif. Tissue Int.*, 38 (1996) 9-16.
64. V. Dritsa, K. Pissaridi, E. Koutoulakis, I. Mamarelis, C. Kotoulas, J. Anastassopoulou, An Infrared spectroscopic study of aortic valve. A possible mechanism of calcification and the role of magnesium salts, *In Vivo*, 84, (2014) 91-98.
65. J Anastassopoulou, T Theophanides, Raman studies of model vesicle systems, *J. Appl. Spectrosc.* 44, (1990). 523-526.
66. Ι. Αναστασοπούλου, Ακτινοχημεία. Χημεία ελευθέρων ριζών. Εφαρμογές στην Βιομηχανία, το Περιβάλλον, την Βιολογία.Ε.Μ.Π. Επανεκδοση, 2003.
67. T. Theophanides, Metal Ion-Nucleic Acid Interactions as studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Spectroscopy of Inorganic Bioactivators*, ed., T. Theophanides, D. Riedel, 1989, p. 265-272.
68. C. Conti, P. Ferraris, E. Giorgini, C. Rubini, S. Sabbatini, G. Tosi, J. Anastassopoulou, P. Arapantoni, E. Boukaki, S. Konstadoudakis, T. Theophanides, C. Valavanis, FT-IR Microimaging Spectroscopy: Discrimination

- between healthy and neoplastic human colon tissues, *J. Mol. Struct.*, 881 (2008) 46-51.
- J. Anastassopoulou, E. Boukaki, P. Arapantoni, C. Valavanis, S. Konstadoudakis, C. Conti, P. Ferraris, G. Giorgini, S. Sabbatini, G. Tosi, Micro-FT-IR spectroscopy of breast adenocarcinoma, in: *Brilliant Light in Life and Material Sciences*, Eds. V. Tsakanov and H. Wiedemann, Springer, 2007, pp. 273-278.
70. Ε. Μπουκάκη, Φασματοσκοπική Μελέτη καρκινικών κυττάρων μαστού, Διδακτορική διατριβή, ΕΜΠ, 2012.
71. D Ph Minh, N D Tran, A Nzihou, P Sharrock, Carbonate-containing apatite (CAP) synthesis under moderate conditions starting from calcium carbonate and orthophosphoric acid, *Mater Sci Eng C* 33 (2013) 2971–2980.
72. M S. Sader, V C.A. Martins, S. Gomez, R. Z. LeGeros, G. A. Soares, Production and in vitro characterization of 3D porous scaffolds made of magnesium carbonate apatite (MCA)/anionic collagen using a biomimetic approach, *Materials Science and Engineering C* 33 (2013) 4188–4196.
73. A Lakshmanana, D W. Cheongb, A Accardoc, E Di Fabrizioc, C Riekeld, C A. E. Hausera, Aliphatic peptides show similar self-assembly to amyloid core sequences, challenging the importance of aromatic interactions in amyloidosis, *PNAS*, 110 (2013), 519–524, [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1217742110](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1217742110).
74. Takayasu Kawasaki, Takayuki Imai, Koichi Tsukiyama, Use of a Mid-Infrared Free-Electron Laser, (MIR-FEL) for Dissociation of the Amyloid, Fibril Aggregates of a Peptide, *J Anal Scien Meth Instrum*, 4 (2014) 9-18.
75. Z. Ganim Z, H.Σ. Chung, A.W. Smith, L.P.Deflores, K.C. Jones, A. Tokmakoff. Amide I two-dimensional infrared spectroscopy of proteins. *Acc Chem Res.* 41/3 (2008) 432-41.
76. X Yang, L Yan and N E Davidson, DNA methylation in breast cancer *Endocrine-Related Cancer*, 8 (2001) 115–127.
77. P Metellus , B. Coulibaly, I. Nanni, F Fina, N. Eudes, R. Giorgi, M. Barrie, O. Chinot, S. Fuentes, H. Dufour, L. Ouafik, D. Figarella-Branger. Prognostic impact of O6-methylguanine-DNA methyltransferase silencing in patients with recurrent glioblastoma multiforme who undergo surgery and carmustine wafer implantation: a prospective patient cohort, *Cancer.* 115/20 (2009) 4783-94.

78. T. Theophanides, "Nucleic Acid-Metal Interaction and Helix Inversion", In: *Inorganic Biochemistry and Molecular Biophysics*, (eds., W. Bal and A. Jezierski), Wroclaw, p. 114 (1989).
79. K. Okamoto, V. Behnam, M.T. Viet, M. Polissiou, J.-Y. Gautier, S. Hanessian, T. Theophanides, FT-IR and <sup>1</sup>H-NMR Spectroscopic Studies of C2'-endo, C3'-endo Sugar Ring Conformations in 5'-GMP and 3'-GMP Nucleotides and Their Platinum Complexes, *Inorg. Chim. Acta Lett.*, **123**, L3-L5 (1986).
80. C. Exley, O. V. Korchazhkina, Promotion of formation of amyloid fibrils by aluminium adenosine triphosphate (AlATP), *J Inorg Biochem*, **84** (2001) 215–224.
81. P.K. Ganguli and T. Theophanides, Preferential Interstrand Cross-Linking of DNA Rich in Guanine and Cytidine by cis-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, *J. Europ. Biochem.*, **101**, 377-383 (1979).
82. J. Ferlay, F. Bray, P. Pisani, et al. *GLOBOCAN 2000: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0* (ed 1.0). Lyon IARC Press 2001.
83. M. Malvezzi, P. Bertuccio, F. Levi, C. La Vecchia, E. Negri. European cancer mortality predictions for the year 2013, *Annals Oncology*, **24** (2013) 792-780.
84. T. Theophanides and H.A. Tajmir-Riahi, Flexibility of DNA and RNA upon binding to different Metal Cations. An Investigation of the B to A to Z Conformational Transition by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *J. Biomolecular Structure and Dynamics*, **2**, (1985) 995-1004.
85. C. Ginestier, M.H. Hur, E. Charafe-Jauffret, F. Monville, J. Dutcher, M. Brown, J. Jacquemier, P. Viens, C.G. Kleer, S. Liu, A. Schott, D. Hayes, D. Birnbaum, M.S. Wicha, G. Dontu, *Cell Stem Cell* **1** (2007) 555–567.
86. J.W. Spinks and R.J. Woods, *An Introduction to Radiation Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, London, 2nd ed., 1976.
87. C.L. Hawkins, and M.J. Davies, Oxidative damage to collagen and related substrates by metal/hydrogen peroxide systems: random attack or site-specific damage?, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1360** (1997) 84-96.
88. K. Pietricha and M. Luris, Some reactions of OH radicals with collagen and tyrosine in aqueous solutions, *Radiat. Phys. Chem.*, **36** (1990) 155-160.



89. E. J. Brochmann, M. E. Duarte, H. A. Zaidi, and S. S. Murray, Effects of Dietary Restriction on Total Body, Femoral, and Vertebral Bone in SENCAR, C57BL/6, and DBA/2 Mice , *Metabolism*, 52/10 2003, 1265-1273.
90. M. F. Moreau, Y. Gallois, M.-F. Baslé , D. Chappard, Gamma irradiation of human bone allografts alters medullary lipids and releases toxic compounds for osteoblast-like cells, *Biomaterials* 21 (2000) 369-376.
91. K. Umegaki, A. Sugisawa, S.J. Shin, K. Yamada and M.Sano, Different Onsets of Oxidative Damage to DNDF and Lipids in Bone Marrow and Liver in Rats Given Total Body Irradiation, *Free Radical Biol. Med.* 31 (2001) 1066–1074.
92. S. Basu, K. Michaëlsson, H. Olofsson, S. Johansson and H. Melhus, Association between Oxidative Stress and Bone Mineral Density, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 288, 275–279 (2001).

## ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ

$\alpha/\alpha$	: απλή ακτινογραφία
all field sare treated at each session:	: κάθε θεραπευτική συνεδρία είναι για όλα τα πεδία
ATR (Attenuated Total Reflectance):	: αποβαίνουσα ολική ανάκλαση
$\beta$ -pleated sheet	: $\beta$ -πτυχωτή επιφάνεια
beam splitter	: διαχωριστής δέσμης
bending or scissoring vibrations	: δονήσεις κάμψης ή ψαλλίδισης
bonemineral	: ανόργανη οστική φάση
bone matrix	: οργανική και ανόργανη οστική φάση
calorific rays	: θερμικές ακτίνες (ακτίνες υπερύθρου φωτός)
chopper	: διαιρέτης δέσμης
CT	: αξονική τομογραφία
deconvolution	: λεπτομερέστερη (μαθηματική) ανάλυση
diffraction	: περίθλαση
dispersive spectrometers	: φασματοφωτόμετρα διασποράς
domains	: επικράτεια (τριτοταγής δομή)
dsb, double strand break	: Σχάση της διπλής έλικας
effective	: αποτελεσματικό
electron storage ring	: Δακτύλιος αποθήκευσης ηλεκτρονίων
esr	: spin του ηλεκτρονίου
Finger print	: περιοχή του IR φάσματος που χαρακτηρίζεται “δακτυλικό αποτύπωμα” μίας ένωσης.
Fourier Transform Infrared FT-IR	: φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier
fixatives	: σταθεροποιητικές ουσίες
Fixed Mirror	: σταθερό κάτοπτρο
Image analysis software	: λογισμικό πρόγραμμα ανάλυσης της Εικόνας

interferogram	: συμβολογράφημα
Infrared – IR	: υπέρυθρη ακτινοβολία
in-plane	: εντός επιπέδου
IR-active	: Ενώσεις ενεργές στο υπέρυθρο φως
IR-inactive	: Ενώσεις μη ενεργές στο υπέρυθρο φως
margin	: παρυφή-όριο
modified from WHO classification	: ταξινόμηση με βάση τις αποφάσεις της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας
moving mirror	: κινούμενο κάτοπτρο
MRI, MagneticResonance Imaging	: Μαγνητική τομογραφία
normal vibrations or normal modes	: Κανονικές δονήσεις
non dispersive spectrometers	: φασματοφωτόμετρα μη διασποράς
out-of-plane	: εκτός επιπέδου
PET (Positron Emission Tomography)	: Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίου
protein residue	: πρωτεϊνικό κατάλοιπο
resolution	: διακριτική ικανότητα
rocking vibrations	: Δονήσεις αιώρησης
SEM (Scanning Electron Microscope)	: ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης
signal-to-noise ratio ή S/N	: λόγος σήματος-θορύβου
software	: λογισμικό πρόγραμμα
spatial resolution	: τοπολογική ανάλυση
ssb, single strand break	: απλή σχάση της μίας έλικας
stretching vibrations	: δονήσεις τάσης
synchrotron	: σύγχροτρον
$^{99m}\text{Tc}$	: σπινθηρογράφημα (τεχνητίου 99)
transmission/ reflection	: μετάδοση/αντανάκλασης
turn	: στροφή
twisting vibrations	: δονήσεις συστροφής
wagging vibrations	: δονήσεις σείσης
wave-lengths	: μήκη κύματος
view-thru	: δεδομένα υπέρυθρου