

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ ΑΚΤΙΝΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΫΛΙΚΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΠΙΣΣΑΡΙΔΗ

AOHNA 2012

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

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

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

- Μ. Κουή, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.
- Β. Μπαϊράμη, Λέκτορας Ε.Κ.Π.Α

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ι. Αναστασοπούλου, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π., Επιβλέπουσα
Μ. Κουή, Καθηγητήτρια Ε.Μ.Π.
Β. Μπαϊράμη, Λέκτορα Ε.Κ.Π.Α
Ν.Ψαρουδάκης, Επ. Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.
Κ. Μεθενίτης, Αν. Καθηγητής Ε.Μ.Π.
Π. Παπαγγελόπουλος, Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.
Γ. Παπανικολάου, Καθηγητής Παν/μίου Πατρών

Η διατριβή εγκρίθηκε τη
ν 17^{η} Φεβρουαρίου 2012

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 Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια των Επιστημονικών Ερευνών του Εργαστηρίου Ακτινοχημείας και Βιοφασματοσκοπίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου.

Θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους αυτούς που ήταν κοντά μου όλο αυτό το διάστημα κατά τη διάρκεια αυτού του πονήματος.

Κατ' αρχήν να ευχαριστήσω για την ευκαιρία, την αμέριστη βοήθεια και συμπαράσταση, το κουράγιο, αλλά και για όλα τα άλλα τα οποία αποκόμμησα από την δεύτερη οικογένεια που απέκτησα σε αυτό το εργαστήριο όλα αυτά τα χρόνια. Την Καθηγήτρια κ. Αναστασοπούλου για την εμπιστοσύνη που μου δείχνει όλα αυτά τα χρόνια, καθώς τώρα πια δεν είναι μόνο δασκάλα για μένα αλλά και «πνευματική» μου μητέρα. Τον κ. Θεοφανίδη για την καθημερινή και αδιάλειπτη καθοδήγησή του, αλλά και για την προσπάθεία του να μεταδώσει όλες αυτές τις γνώσεις. Τέλος, την «αδελφή» μου πια, μετά από τόσα χρόνια συνεργασίας και κοινής πορείας, Δρ. Βίκυ Δρίτσα για όλα όσα έχει κάνει για μένα αυτά τα χρόνια.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους Ερευνητές του Κέντρου «Δημόκριτος» Δρς Δ. Τσιούρβα, Ω. Σιδεράτου και Φ. Κατσαρό για την φιλοξενία στο εργαστήριό τους και την συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια.

Επίσης ένα ευχαριστώ και στους φίλους μου, σ' αυτούς που είχα και σε αυτούς που απέκτησα κατά τη διάρκεια αυτής της Διατριβής. Τον ΥΔ Θάνο Πορφύρη, συνοδοιπόρο όλα αυτά τα χρόνια, για την ανεκτίμητη φιλία του. Την Δρ. Ελένη Χειλάκου και τον ΥΔ. Παναγιώτη Θεοδωρακέα για την συμπαράσταση και τη φιλία τους και τον Δρ. Πέτρο Σχοινά που τα "σχόλιά" του ήταν «τονωτική ένεση» αυτά τα χρόνια.

Τελευταία, αλλά σίγουρα όχι λιγότερο σημαντική, άφησα την οικογένειά μου, την μαμά μου, Ευδοξία, τον αδελφό μου, Θανάση και τη θεία μου, Γιώτα, που αποτελούν πηγή έμπνευσης και κατά τη διάρκεια αυτών των ετών μου προσέφεραν απόλυτη οικονομική και ψυχολογική υποστήριξη.

Τους ευχαριστώ όλους από την καρδιά μου αν και πιστεύω ότι τα λόγια δεν μπορούν να εκφράσουν αυτά που νιώθω.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	13
Περίληψη	17
Abstract	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1º	25
Αθηροσκλήρωση	25
1.1. Εισαγωγή	25
1.2. Στάδια εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης	27
1.2.1. Ανάπτυξη λιπωδών γραμμώσεων (Fatty Streak Development)	27
1.2.2. Πρώιμος σχηματισμός αθηρωματικής πλάκας (Early Fibroatheroma)	
1.2.3. Ρήξη της αθηρωματικής πλάκας	
КЕФАЛАЮ 2°	
Λιποπρωτεΐνες	
2.1. Εισαγωγή	
2.2. Χυλομικρά	
2.3. Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDLs)	
2.4. Ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDLs)	
2.5. Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDLs)	
2.6. Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL)	
2.6.1. Δομή LDL	
2.6.2. Εξωτερική επιφάνεια και στοιβάδες αλληλεπιδράσεις	
2.6.2.1. Νανοπεριβάλλον	40
2.6.2.2. Ελεύθερη χοληστερόλη (UC) και φωσφολιπίδια	41
2.6.2.3. Ελεύθερη χοληστερόλη (UC) και σφιγγομυελίνη (SM)	41
2.6.2.4. Ελεύθερη χοληστερόλη και ουδέτερα λιπίδια	42
2.6.2.5. Διευθέτηση της κύριας ομάδας της φωσφατιδυλοχολίνης (PC)	42
2.6.2.6. Λιπίδια (packing lipids)	43
2.6.3. ApoB – 100	43
2.6.3.1. Λειτουργικές περιοχές	44

2.6.3.2. Αλληλεπιδράσεις ΑροΒ-100 και λιπιδίων	44
2.6.4. Τροποποιημένη LDL	44
2.6.4.1. Πρωτεολυτικές τροποποιήσεις	45
2.6.4.2. Σφιγγομυελινάση (SMase)	45
2.6.4.3. Φωσφολιπάση C (PLC)	45
2.6.4.4. Φωσφολιπάση Α2 (PLA2)	45
2.6.4.5. Χολινεστεράση (CEase)	46
2.6.5. Ο μεταβολισμός της LDL	46
2.6.6. Υπεροξείδωση των LDL με Cu^{2+}	46
2.7. Μηχανισμοί καταστροφής του DNA από το οξειδωτικό στρες στην αθηροσκλήρωση	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3°	53
Μολυβδαινοένζυμα	53
3.1. Εισαγωγή	53
3.1. Εισαγωγή	53
3.1. Εισαγωγή ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο	53
3.1. Εισαγωγή ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT–IR)	53
 3.1. Εισαγωγή ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT–IR) 4.1. Ιστορική αναδρομή 	53 59 59 59
 3.1. Εισαγωγή ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT–IR) 4.1. Ιστορική αναδρομή 4.2. Γενικές αρχές FT-IR φασματοσκοπίας 	53 59 59 59 61
 3.1. Εισαγωγή ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT–IR) 4.1. Ιστορική αναδρομή 4.2. Γενικές αρχές FT-IR φασματοσκοπίας	53 59 59 59 61 61
 3.1. Εισαγωγή ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT–IR) 4.1. Ιστορική αναδρομή 4.2. Γενικές αρχές FT-IR φασματοσκοπίας 4.2.1 Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα	53 59 59 59 61 61 62
 3.1. Εισαγωγή ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT–IR) 4.1. Ιστορική αναδρομή 4.2. Γενικές αρχές FT-IR φασματοσκοπίας 4.2.1 Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα	53 59 59 61 61 62 62
 3.1. Εισαγωγή ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT–IR) 4.1. Ιστορική αναδρομή 4.2. Γενικές αρχές FT-IR φασματοσκοπίας	53 59 59 61 61 62 62 64
 3.1. Εισαγωγή ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4° Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT–IR) 4.1. Ιστορική αναδρομή 4.2. Γενικές αρχές FT-IR φασματοσκοπίας	53 59 59 61 61 62 62 62 62
 3.1. Εισαγωγή ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT–IR)	53 59 59 61 61 62 62 62 62 62
 3.1. Εισαγωγή ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT–IR)	53 59 59 61 61 62 62 62 62 62 64 67 67

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 [°]
Ηλεκτρονιακό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM)
5.1. Ιστορική αναδρομή71
5.2. Αρχή λειτουργίας
КЕФАЛАЮ 6 [°]
Υλικό και Μέθοδος77
6.1. Λήψη των δειγμάτων77
6.2. Χαρακτηριστικά ασθενών77
6.3. Προετοιμασία Δειγμάτων78
6.4. Συσκευές
6.4.1. Φασματοφωτόμετρο υπερύθρου, IR
6.4.2. Ηλεκτρονιακό μικροσκόπιο σάρωσης, SEM82
КЕФАЛАЮ 7°85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7°
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 [°]
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7°

Συμπεράσματα	147
Βιβλιογραφία	151
Ευρετήριο Όρων	161

Εικόνες

Κεφάλαιο 1°

Εικόνα 1.1:	Στεφανιαία αρτηρία: Φυσιολογική, με απλή αθηρωματική πλάκα και με	
	θρόμβους αίματος	25
Εικόνα 1.2:	Κύρια συστατικά των αθηρωματικών πλακών: Α: Εξωκυττάρια θεμέλια	
	ουσία, που περιέχει πρωτεογλυκάνες, κολλαγόνες και ελαστικές ίνες, Β:	
	Κρύσταλλοι χοληστερόλης, εστέρες χοληστερόλης και φωσφολιπίδια,	
	C: Κύτταρα όπως μακροφάγα, προερχόμενα από μονοκύτταρα, Τ-	
	λεμφοκύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα, D: Θρομβωτικό υλικό με τη	
	συμμετοχή αιμοπεταλίων και εναποθέσεων ινικής υφής [Insull, 2009]	27
Εικόνα 1.3:	Σχηματισμός μίας προχωρημένης, σύνθετης αθηροσκληρωτικής βλάβης	
	[Ross, 1999]	28
Εικόνα 1.4:	Στάδια της αθηροσκλήρωσης [Cascieri 2002]	29

Κεφάλαιο 2°

Εικόνα 2.1 :]	Σχηματική παράσταση της λιποπρωτεΐνης	31
Εικόνα 2.2:	Αποδόμηση λιποπρωτεϊνών σε εξωηπατικούς ιστούς μετά την έκκρισή	
	τους από το ήπαρ [Nelson & Cox, 2004]	33

Κεφάλαιο 6°

Εικόνα 6.1: Α: Τμήμα στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς, Β: Φαίνονται η εξωτερική	
(Adventitia) και εσωτερική (Intima) μεμβράνη και η αθηρωματική	
πλάκα μετά τη διάνοιξη του θύλακα (ψηφιακή φωτογραφία δειγμάτων)	79
Εικόνα 6.2: Φασματοφωτόμετρο υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier, Nicolet 6700	
thermoscientific, διακριτικής ικανότητας 4 cm ⁻¹	80
Εικόνα 6.3: Στεφανιογραφία του ασθενούς	81
Εικόνα 6.4: Τροφοδοσία SEM σε λειτουργία	82

Κεφάλαιο 7°

Εικόνα	7.1:	SEM αρχιτεκτονική απεικόνιση της επιφάνειας στεφανιαίας αρτηρίας	
		ασθενούς	.90
Εικόνα	7.2:	Α: SEM αρχιτεκτονική απεικόνιση αθηρωματικής πλάκας στεφανιαίας	
		αρτηρίας. Τα βέλη δείχνουν τις περιοχές που είναι πλούσιες σε μόλυβδο	
		και ασβέστιο; B: SEM-EDAX στοιχειακή ανάλυση	.92
Εικόνα	7.3:	Α: SEM αρχιτεκτονική απεικόνιση αθηρωματικής πλάκας στεφανιαίας	
		αρτηρίας, B: SEM-EDAX στοιχειακή ανάλυση	104

Εικόνα 7.4	: SEM-EDAX ανάλυση αθηρωματικής πλάκας ασθενούς. Με το βέλος	
	τονίζεται η θέση ανίχνευσης του χρωμίου. Ανιχνεύονται επίσης νικέλιο,	
	μαγγάνιο και σίδηρος	.117
Εικόνα 7.	5: Ανάλυση SEM της επιφάνειας αθηρωματικής πλάκας στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς (κλίμακα 100 μm)	. 120
Εικόνα 7.6	 Α: SEM τοπολογική απεικόνιση της μεμβράνης στεφανιαίας αρτηρίας. Μεγέθυνση 300 μm. B: SEM τοπολογική εξέταση μεμβράνης καρωτίδας αρτηρίας στην περιοχή των αφρωδών κυττάρων. Μεγέθυνση 	
	1mm	.122
Εικόνα 7	.7: SEM απεικόνιση της αρχιτεκτονικής αθηρωματικής πλάκας υπερουρικαιμικού ασθενούς: Α: Περιοχή πλούσια σε άλατα και ινίδια.	
	Β: Εντοπισμός αλάτων πλούσιων σε Μο (κλίμακα 100 μm)	.128
Εικόνα 7.8	3: EDAX ανάλυση αθηρωματικών πλακών στεφανιαίας αρτηρίας δύο	
	διαφορετικών υπερουρικαιμικών ασθενών	.128
Εικόνα 7.9	: Σχήμα SEM-EDAX αθηρωματικής πλάκας ασθενούς. Διακρίνεται με το	
	βέλος η θέση ανίχνευσης χαλκού (Cu). Πέραν του χαλκού φαίνεται και	
	μολυβδαίνιο (Μο)	. 142

Πίνακες

Κεφάλαιο 1°

Πίνακας 2.1: Φυσικοχημικές ιδιότητες, σύσταση λιπιδίων και απολιποπρωτεϊνών των							
κυριότερων λιποπρωτεϊνών του ανθρώπινου πλάσματος [Gotto et al.,							
1986]	.32						

Κεφάλαιο 3°

Πίνακας	3.1:	Όργανα	που	περιέχουν	Mo	και	η	περιεκτικότητά	του	ανά	μονάδα	
		βάρους	•••••						•••••			53

Κεφάλαιο 7°

Πίνακας 7.1: SEM-EDAX στοιχειακή ανάλυση και η % Wt και κατά At σύσταση	
στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς	90
Πίνακας 7.2: SEM-EDAX στοιχειακή ανάλυση και η % Wt και κατά At σύσταση	
αθηρωματικής πλάκας ασθενούς	117

Σχήματα

Κεφάλαιο 2°

Σχήμα 2.1: Οι υποκατηγορίες των HDL ανάλογα με το σχήμα, το μέγεθος, την
πυκνότητα, τη σύνθεση και το επιφανειακό φορτίο [Barter et al., 2003]36
Σχήμα 2.2: Η ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης [Barter et al., 2003]
Σχήμα 2.3 : Μοριακό μοντέλο ενός σωματιδίου LDL [Hevonoja et al., 2000]39
Σχήμα 2.4: Διαχωρισμός της LDL σε 3 ακτινικές στοιβάδες. apoB-100: γκρι,
Φωσφολιπίδια: μπλέ, Λιπαρά οξέα και χοληστερόλη: Πορτοκαλί
[Hevonoja et al., 2000]40
Σχήμα 2.5: Πιθανές δράσεις του χαλκού στην αθηρογένεση. (1): Διαμορφώνει την
βιοσύνθεση και το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών LDL και HDL. (2):
Διευκολύνει την οξειδωτική τροποποίηση της LDL, με αποτέλεσμα την
αύξηση των αφρώδων κυττάρων (3): Η ανεπάρκεια χαλκού σχετίζεται
με τη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Τ-
λεμφοκύτταρα) (4): Η ανεπάρκεια συνδέεται με την αυξημένη έκφραση
μονοπύρηνων κυττάρων αλλά και τη δημιουργία ανιόντων υπεροξειδίου
(5): Προάγει την παραγωγή του κολλαγόνου μέσω της LDL από τα λεία
μυϊκά κύτταρα (6): Η ανεπάρκεια οδηγεί σε εξωκυττάριες δυσμορφίες
στους ιστούς (7): Ο χαλκός μέσω του σχηματισμού της τροποποιημένης
LDL οδηγεί σε δυσλειτουργίια του ενδοθήλιου, προκαλώντας βλάβες
στη σύνθεση του ΝΟ (8): επιδρά στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και
στην ομοιόσταση [Ferns et al., 1997]51

Κεφάλαιο 3°

Σχήμα 3.1: Μοριακή δομή της θειο-οξειδάσης με το Μο ⁺⁶ , ξανθίνης οξειδάσης με	
Mo ⁺⁴ και του υποκαταστάτη πυρανοπτερίνη	.54
Σχήμα 3.2: Προσανατολισμός του Μο στην ξανθίνη οξειδάση και θειο-οξειδάση ως	
προς την πυρανοπτερίνη [Hille et al., 2011]	.54
Σχήμα 3.3: Δομή βόειας ξανθίνης οξειδορεδουκτάση (oxidoreductase). Τα τμήματα	
που φέρουν Fe-S τονίζονται με μπλε και πράσινο. Το FAD είναι κίτρινο.	
Οι θέσεις του Μο στις πρωτεΐνες είναι γκρι. Α: μερική απεικόνιση του	
διμερούς ενζύμου στην επιφάνεια. Β: απεικόνιση του ενζύμου στην	
επιφάνεια. C: μερική απεικόνιση του διμερούς με μορφή ταινιών. D:	
απεικόνιση του μονομερούς με τα τέσσερα δραστικά κέντρα δυναμικού	
σε σχεδόν ευθύγραμμη διάταξη. [Hille et al., 2011]	.55
Σχήμα 3.4: Λιπαρά οξέα: Η υπεροξείδωση οδηγεί σε ηλεκτρόφιλα λιπαρά οξέα, τα	
οποία ανάλογα με την θέση σύνδεσης οδηγούν σε παρεμπόδιση	
έκφρασης φλεγμονωδών καταστάσεων ή διεγείρουν ένζυμα που	
δραστηριοποιούν γονιδιακές εκφράσεις [Ghouleh et al., 2011]	.56

Κεφάλαιο 4°

Σχήμα 4.1:	Αλλαγή της διπολικής ροπής ενός διατομικού μορίου λόγω περιστροφής	
	(μ _{rot}) και δόνησης (μ _{vibr}) [Θεοφανίδης & Αναστασοπούλου, 1997]	.63
Σχήμα 4.2:	Διαχωρισμός του IR φάσματος σε επί μέρους περιοχές, όπου εμφανίζονται οι ταινίες των χαρακτηριστικών ομάδων οργανικών	
	ενώσεων	.66
Σχήμα 4.3: X	Σχηματική παράσταση φασματοφωτομέτρου διασποράς	.67
Σχήμα 4.4: I	FT – IR φασματοφωτόμετρο	.68
Σχήμα 4.5:	Σχηματική παράσταση συμβολόμετρου Michelson. Π = πηγή, M1 =	
	κάτοπτρο μίξης, Μ1΄ = είδωλο του Μ1 όπως φαίνεται από τη θέση Α,	
	M2 = κινητό κάτοπτρο, B = διαιρέτης δέσμης (chopper) και A =	
	αναλυτής [Θεοφανίδης & Αναστασοπούλου, 1997]	.69

Κεφάλαιο 5°

Σχήμα 5.1: Παραγωγή δευτερογενών ηλεκτρονίων κατά την πρόσπτωση πρωτογενών	,
στην ύλη [Αναστασοπούλου, 2003]	72
Σχήμα 5.2: Αρχή λειτουργίας SEM	74
Σχήμα 5.3: Σχηματική παράσταση παραγωγής ακτινών Χ, χαρακτηριστική του κάθε	;
ατόμου	75

Κεφάλαιο 6°

Σχήμα (6.1:Σ	Σχηματική παράσταση της ΑΤR τεχνικής	81
Σχήμα	6.2:	: Σχηματική παράσταση της πορεία της υπέρυθρης δέσμης στ	σν
		κρύσταλλο και το δείγμα. Η γωνία πρόσπτωσης είναι 45° για τ	ην
		επίτευξη πολλαπλής ανάκλασης	81

Κεφάλαιο 7°

Σχήμα	7.1:	FT-IR φάσμα αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς στην περιοχή
		4000-400 cm ⁻¹
Σχήμα	7.2:	A: FT-IR φάσμα αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς στην
		περιοχή 3000-2850 cm ⁻¹ και B : μαθηματική ανάλυση του φάσματος87
Σχήμα	7.3:	A. FT-IR φάσμα αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς στην
		περιοχή 3100-2600 cm ⁻¹ ; a: ασθενής με φυσιολογικά όρια LDL
		χοληστερόλη στον ορό του αίματος, b: Ασθενής με αυξημένη
		συγκέντρωση χοληστερόλης και c: Ασθενής με αρκετά υψηλά επίπεδα
		χοληστερόλης B. Σχηματική παράσταση των κάμψεων (kinks) των
		ανθρακικών αλυσίδων των λιπιδίων που σχηματίζουν την μεμβράνη και

επηρεάζουν την λιποφιλικότητα του περιβάλλοντος μέσου, φαίνεται το
Σχήμα 7.4: Δ : ET IP, φάσμα αθροώματος στεφαγμαίας αστροίας ασθευρός στην
π εριοχή 1800-1500 cm ⁻¹ ; B : μαθηματική ανάλυση του ιδίου φάσματος91
Σχήμα 7.5: Χημικοί τύποι των βασικών μορίων των απολιποπρωτεϊνών
Σχήμα 7.6: Σχηματισμός αλδεϋδών από υπεροξείδωση λιπιδίων
Σχήμα 7.7: Σχηματική παράσταση παράλληλης και αντιπαράλληλης δομής πρωτεϊνών
Σχήμα 7.8: Σχηματική παράσταση διαμόρφωσης τυχαίας περιέλιξης και α-έλικας
πρωτεϊνών97
Σχήμα 7.9: 1:FT-IR φάσμα στεφανιαίας αρτηρίας στην περιοχή 1700-1600 cm ⁻¹ . 2:
μαθηματική ανάλυση του ιδίου φάσματος. Διακρίνονται οι ταινίες που αντιστοιχούν στις μεταβολές των δευτερογενών δομών των πρωτεϊνών99
Σχήμα 7.10: FT-IR φάσμα στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς 1: λιποειδή
συσσωματώματα του αθηρώματος, 2: Αθηρωματική πλάκα, 3:
Αθηρωματική πλάκα μετά την τοποθέτησή της σε οργανικό διαλύτη, 4:
Διαφορά φασμάτων 1 και 2, 5: Μαθηματική ανάλυση του φάσματος 1100
Σχήμα 7.11: Σχηματική παράσταση της δομής των απολιποπρωτεϊνών: ABCA1
τρανσφεράσες που περιέχουν ΑΤΡ-δεσμευτές και τρανσφεράσες
λιπιδίων (λεκιθίνες) LCAT
Σχήμα 7.12: A: FT-IR φάσμα αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς στην
περιοχή 1700-1600 cm ⁻¹ , B: μαθηματική ανάλυση του ιδίου φάσματος 102
Σχήμα 7.13: A: FT-IR φάσμα αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς στην
περιοχή 1500-1250 cm ⁻¹ , B : μαθηματική ανάλυση του φάσματος
Σχήμα 7.14: A: FT-IR φάσμα αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς στην
περιοχή 1250-900 cm ⁻¹ B: μαθηματική ανάλυση του φάσματος
Σχήμα 7.15: A: FT-IR φάσμα αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς στην
περιοχή 950-400 cm ⁻¹ ; B : μαθηματική ανάλυση του φάσματος
Σχήμα 7.16: FT-IR φάσμα αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς, στην
περιοχή 4000-700 cm ⁻¹ 1: πριν τη δευτερίωση 2: μετά την δευτερίωση 107
Σχήμα 7.17: 1: FT-IR φάσμα δευτεριωμένου αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας
ασθενούς, στην περιοχή 2200- 2750 cm ⁻¹ 2: μαθηματική ανάλυση του
ιδίου φάσματος
Σγήμα 7.18: FT-IR φάσμα αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς στην
περιογή 1500-1300 cm ⁻¹ 1 : πριν τη δευτερίωση 2 : μετά την δευτερίωση 110
Σχήμα 7.19: FT-IR φάσματα αθηρωματικής πλάκας ασθενούς στην περιοχή 1275-
$-\chi_{1}$ μα $(12)^{-1}$ 11 με φασματά ασηρωματικής πρακτάς ασσστους στην ποριοχή $(12)^{-1}$ 1140 cm ⁻¹ 1: ποιν την δευτερίωση και 2: μετά την δευτερίωση 111
Σχήμα 7.20: Σχηματική παράσταση της περιορισμένης ηλεκτοργιακής δομής του
πεπτιδικού δεσμού
Σχήμα 7.21. Σχηματική παράσταση των αλυσιδωτών αντιδράσεων οξειδρανανωνής
που λαμβάνουν νώρα στον ρονανισμό παρουσία μεταλλικών ιόντων
$[\Delta \nu \alpha \sigma \tau \alpha \sigma \sigma \sigma \sigma \dot{\nu} \dot{\lambda} \alpha \nu 2003]$

Σχήμα	7.22: Παράσταση σχηματισμού ενδο-ϋπεροξειδίου και υπερ-ενδο-ϋπερόξυ ελευθέρων ριζών	118
Σχήμα	7.23: Σχηματική παράσταση των προϊόντων οξείδωσης των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων, που αναπτύσσουν την περιοχή των αφρωδών κυττάρων	120
Σχήμα	7.24: FT-IR φάσματα 1: στεφανιαίας αρτηρίας και 2: καρωτίδας αρτηρίας στην περιοχή 4000-900 cm ⁻¹	121
Σχήμα	7.25: Περιοχές του FT-IR φάσματος που λαμβάνονται υπόψη για την εκτίμηση της αθηρωματικής εξέλιξης του ασθενούς 1: στεφανιαία αρτηρία και 2: καρωτίδα αρτηρία	123
Σχήμα	7.26: Παράσταση του μηχανισμού της καταλυτικής αντίδρασης της υποξανθίνης σε ξανθίνη και τελικά προϊόντα ουρικό οξύ και ROS	125
Σχήμα	7.27: Καταβολισμός της ΑΤΡ κατά την διάρκεια ισγαιμικού συμβάματος	127
Σχήμα	7.28 : FT-IR φάσματα αθηρωμάτων στεφανιαίας αρτηρίας ασθενών; A : υπερουρικαιμικός ασθενής και B : ασθενής με φυσιολογικά όρια ουρικού οξέος στον ορό του αίματος	130
Σχήμα	7.29: Προτεινόμενο σχήμα για το ρόλο της ξανθίνης οξειδάσης ως κυκλοφορικός διαμεσολαβητής που δεσμεύεται στην επιφάνεια των αγγειακών κυττάρων του ενδοθηλίου, παράγει δραστικά σωμάτια οξυγόνου, αλληλεπιδρά με μόρια μονοξειδίου του αζώτου (NO [•]) και άμεσα ή έμμεσα καταλήγει σε πολυοργανική δυσλειτουργία	
Σχήμα	(multisystem organ dysfunction) [Parks, 1998]	133
-λ.ιμα	μαθηματική ανάλυσή τους; A : υπερουρικαιμικός ασθενής A ': ανάλυση του ιδίου φάσματος και B : ασθενής με φυσιολογικά όρια ουρικού οξέος στον ορό του αίματος, B ': ανάλυση του ιδίου φάσματος	136 138
-λ·ιμα Σνήμα	7 32· 1· FT-IR φάσμα ασθενούς στου οποίου ανιννεύθηκε ναλκός. Στην	150
–չվրս	π_{E010} $3000-2800 \text{ cm}^{-1}$ or γ_{E010} γ	
	Ασθενής που δεν εμφάνισε χαλκό	143

Πρόλογος

Η αθηρωμάτωση αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου στον πληθυσμό του Δυτικού κόσμου και επηρεάζει άνδρες και γυναίκες ηλικίας άνω των 45 και 65 ετών, αντίστοιχα [Cannon, 2007]. Τα παθογενετικά αίτια της νόσου αποτελούν αντικείμενο συστηματικής έρευνας, χωρίς όμως ακόμα να έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί, ενώ η νόσος, επί δεκαετίες, διαδράμει ασυμπτωματική και η εμφάνιση κλινικών εκδηλώσεων σηματοδοτεί το προχωρημένο και συχνά μη αναστρέψιμο στάδιό της.

Η αθηρωμάτωση φαίνεται να είναι νόσος πολυπαραγοντικής αιτιολογίας, με σοβαρότατες συνέπειες για τα διάφορα οργανικά συστήματα και υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα στην εποχή μας. Η αντιμετώπιση της αθηρωμάτωσης αποτέλεσε και συνεχίζει να αποτελεί αντικείμενο εντατικής έρευνας και μελέτης από την διεθνή επιστημονική κοινότητα, ενώ ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα της αθηρωμάτωσης συνεχίζει να αποτελεί η αδυναμία πρόβλεψης και πρόληψης των αιμορραγικών αθηρωματικών πλακών.

Η αθηρωμάτωση αποτελεί μία διάχυτη, σιωπηρά εξελισσόμενη νόσο, με εστιακές κλινικές εκδηλώσεις αυξημένης νοσηρότητας και θνητότητας, οι οποίες εμφανίζονται συνήθως ως αποτέλεσμα θρομβωτικών επιπλοκών σε διαβρωμένες ή διαρρηγμένες αθηρωματικές πλάκες. Επομένως, η αρτιότερη, κατά το δυνατόν, αντιμετώπιση του ασθενούς στον οποίο έχει καταδειχθεί και τεκμηριωθεί αθηρωματική προσβολή ενός αρτηριακού δικτύου (π.χ. στεφανιαία νόσος ή νόσος καρωτίδων), πέρα από την επικέντρωση στο αντίστοιχο όργανο που αιματώνει, θα πρέπει πάντα να συμπεριλαμβάνει και την καταπολέμηση των παραγόντων που προάγουν την αθηρωμάτωση. Η τελική εκτίμηση του βαθμού και των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της προσβολής ενός αρτηριακού δικτύου, ιδανικότερα σε ένα πρώιμο ασυμπτωματικό στάδιο, αποτελεί αντικείμενο διαφόρων σύγχρονων εφαρμοζόμενων απεικονιστικών μεθόδων όπως η κλασσική υπερηχογραφία, η ενδαγγειακή υπερηχογραφία, η υπολογιστική αξονική τομογραφία, η μαγνητική τομογραφία και η κλασσική (συμβατική) αγγειογραφία. Οι τεχνικές όμως αυτές αν και δείχνουν την ταχύτητα της ανάπτυξης της νόσου δεν απαντούν στο βασικό ερώτημα των αιτίων αθηρογένεσης.

Αν και τα τελευταία χρόνια η έρευνα για την αθηρογένεση και τις αθηρωματικές βλάβες στο αρτηριακό δίκτυο των διαφόρων οργάνων και συστημάτων είναι συστηματική, το φαινόμενο δεν έχει ακόμα πλήρως αποσαφηνιστεί. Όποιος και αν είναι ο κοινός παθογενετικός μηχανισμός εμφάνισης των αθηρωματικών πλακών, η τελική τους διαμόρφωση εμφανίζει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των ανθρώπων που προσβάλλονται, μεταξύ των αρτηριακών δικτύων διαφορετικών οργάνων και συστημάτων, αλλά και μεταξύ των διαφόρων τμημάτων του ίδιου αρτηριακού δικτύου. Η καλύτερη κατανόηση της φύσης και της αιτιολογίας αυτών των διαφορών είναι σημαντική για την αποτελεσματικότερη πρόληψη και θεραπεία της αθηρωμάτωσης και των επιπλοκών της. Απαραίτητη προϋπόθεση για την κατανόηση της παθογένειας της αθηρωμάτωσης, αποτελεί η γνώση της φυσιολογίας του αρτηριακού τοιχώματος και της δομής του σε μοριακό επίπεδο.

Τα τελευταία περίπου 10 χρόνια η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared, FT-IR) χρησιμοποιείται συστηματικά στην μελέτη της μοριακής δομής των ανθρωπίνων ιστών, τείνει δε να καθιερωθεί στην κλινική μελέτη για την ανάδειξη και προδιάγνωση διαφόρων ασθενειών σε μοριακό επίπεδο [Anastassopoulou et al., 2009; 2008, Conti et al., 2008, Kolovou & Anastassopoulou, 2007, Petra et al., 2005; 2000; 1999, Theophanides et al., 1991, Theophanides, 1984, Θεοφανίδης & Αναστασοπούλου, 1998, Πετρά κ.α., 2002].

Η μέθοδος επιτρέπει την μελέτη βιοπολυμερών και σύνθετων βιολογικών συστημάτων, όπως τα κύτταρα και οι ιστοί, ενώ η απαιτούμενη ποσότητα του υλικού είναι πολύ μικρή και χωρίς ιδιαίτερη επεξεργασία σε σχεδόν φυσιολογικές συνθήκες, ενώ παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τις λειτουργικές ομάδες (π.χ. NH₂, C=O, -OH, κλπ), τους χημικούς δεσμούς και τη διαμόρφωση των μορίων [Anastassopoulou et al., 2009; 2008, Conti et al., 2008, Kolovou & Anastassopoulou, 2007, Petra et al., 2005; 2000; 1999, Theophanides et al., 1991, Theophanides, 1984, Theophanides & Sandorfy, 1984, Θεοφανίδης & Αναστασοπούλου, 1998, Πετρά κ.α., 2002].

Η FT-IR φασματοσκοπία καταγράφει τα φάσματα δόνησης που παράγονται από την αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με τα μόρια της ύλης, στις συχνότητες 4000 - 400 cm⁻¹. Επειδή οι ιστοί είναι σύνθετα βιολογικά συστήματα απαιτείται ιδιαίτερη γνώση για την επιλογή της τεχνικής λήψης και ερμηνείας των υπέρυθρων φασμάτων των δειγμάτων. Για τα βιολογικά μόρια και ιστούς η τεχνική

της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (ATR, Attenuated Total Reflectance) είναι η πλέον δυναμική μέθοδος καταγραφής των υπέρυθρων φασμάτων και ιδιαίτερα των βιολογικών μεμβρανών. Παρέχει το μοναδικό πλεονέκτημα να μελετά συγχρόνως την διαμόρφωση των λιπιδίων των μεμβρανών και τον προσανατολισμό των παράπλευρων αλυσίδων των βιολογικών μεγαλομορίων και επί πλέον να παρέχει πληροφορίες για το περιβάλλον του κυττάρου [Goormaghtigh et al., 1999]. Επίσης, στην περίπτωση των μεμβρανών εμφανίζει το πλεονέκτημα να μελετά ταυτόχρονα το περιβάλλον των μεμβρανών ξαση) αλλά και των αλάτων (ανόργανη φάση ή οργανομεταλλική φάση), χωρίς να απαιτείται ιδιαίτερη επεξεργασία του δείγματος [Anastassopoulou et al., 2009; 2008, Conti et al., 2008, Kolovou & Anastassopoulou, 2007, Petra et al., 2005; 2000; 1999, Πετρά κ.α., 2002].

Στην παρούσα διατριβή, προκειμένου να ανευρεθεί ο μηχανισμός σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας και των αιτίων που την δημιουργεί, σε σχέση με τους κυριότερους παράγοντες αγγειακού κινδύνου και το εργασιακό περιβάλλον των ασθενών, μελετήθηκαν αθηρωματικές πλάκες ασθενών της Αγγειοχειρουργικής Κλινικής του 401 Γενικού Στρατιωτικού Νοσοκομείου Αθηνών και του Ιατρικού Κέντρου ΙΑΣΩ, οι οποίοι υποβλήθηκαν είτε σε χειρουργική ενδαρτηρεκτομή των καρωτίδων και στεφανιαίων αρτηριών αρτηριών είτε σε μείζονα καρδιοχειρουργική επέμβαση. Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκε η υπέρυθρη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) με την τεχνική της ATR (Attenuated Total Reflexion, Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση). Η τεχνική είναι μη καταστρεπτική, ταχύτατη και απαιτείται ελάχιστη ποσότητα (μερικά μικρογραμμάρια, μg) βιολογικού αθηρώματος. Η αρχιτεκτονική της επιφάνειας του αθηρώματος και η ποιοτική χημική στοιχειακή ανάλυση έγινε με ηλεκτρονιακό μικροσκόπιο σάρωσης SEM (Scanning Electron Microscopy), συνδεδεμένο με EDAX. Οι παρατηρούμενες επομένως μεταβολές μπορούν να αποδοθούν αποκλειστικά στην επικείμενη νόσο.

Περίληψη

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν με υπέρυθρη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (Fourier transform infrared, FT-IR) σε συνδυασμό με ηλεκτρονιακό μικροσκόπιο σάρωσης συνδεδεμένο με στοιχειακό αναλυτή (SEM, EDAX) αθηρωματικές πλάκες στεφανιαίων και καρωτίδων αρτηριών, ασθενών που υποβλήθηκαν σε bypass επεμβατική αποκατάσταση και ενδαρτηρεκτομή. Σκοπός της εργασίας ήταν η προσέγγιση και πιθανή απάντηση στον μηχανισμό αθηρογένεσης των στεφανιαίων και καρωτίδων αρτηριών, ώστε να αντιμετωπισθεί διατροφικά ή φαρμακευτικά η ασθένεια. Για την μελέτη σχηματίσθηκε κατάλληλο πρωτόκολλο με βάση το ιατρικό ιστορικό των ασθενών. Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την ηλικία, το φύλλο, το βάρος και τα αιματολογικά και βιοχημικά δεδομένα. Σχεδόν το σύνολο των ασθενών ήταν καπνιστές (92%) και υπέρβαροι (94%).

Τα πειραματικά δεδομένα των FT-IR φασμάτων ήταν εντυπωσιακά και έδειξαν ότι η έναρξη και εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας οφείλεται στην υπεροξείδωση των λιπιδίων και πρωτεϊνών των μεμβρανών, σύμφωνα με τις μεταβολές που παρατηρήθηκαν στην περιοχή του φάσματος 1800-1500 cm⁻¹. Η επίδραση των ελευθέρων ριζών προκαλεί αρχικά βλάβη στην δευτεροταγή δομή τους, με αποτέλεσμα την επέκταση της βλάβης και σε άλλα βιολογικά μόρια. Η επίδραση των ελευθέρων ριζών στις μεμβράνες προκαλεί σχάση του μήκους των ανθρακικών αλυσίδων των μεγαλομορίων που σχηματίζουν τις μεμβράνες, καταστρέφοντας την ευκινησία και την ρευστότητα των μεμβρανών με αποτέλεσμα την καταστροφή του κυττάρου.

Η εμφάνιση της νέας ταινίας στα περίπου 3080 cm⁻¹ αποδίδεται στην παραγωγή ελευθέρων ρίζών υδροξυλίου, οι οποίες μετά από απόσπαση ατόμων υδρογόνου από τις ανθρακικές αλυσίδες των λιπιδίων, οδηγεί στο σχηματισμό ένωσης με τερματικό άτομο άνθρακα ολεφινικού χαρακτήρα (=CH). Η ένταση της ταινίας της ολεφινικής ομάδας είναι συνάρτηση της κλινικά υπολογισμένης LDL χοληστερόλης των ασθενών. Η παραπάνω ταινία καθώς και η ταινία στα 1735 cm⁻¹ μπορούν να αποτελέσουν δείκτες για την LDL χοληστερόλη.

Μετά από διάλυση των αθηρωμάτων σε οργανικούς διαλύτες, η FT-IR φασματοσκοπία έδειξε ότι οι apoA πρωτεΐνες διαλύονται στα συσσωματώματα των

λιποειδών ενώσεων με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η φυσιολογική λειτουργία της HDL χοληστερόλης.

Για τους υπερουρικαιμικούς (αυξημένο ουρικό οξύ στον ορό του αίματος) ασθενείς διαπιστώθηκε, από τα προϊόντα των αθηρωματικών πλακών, ότι υπερπαράγονται ελεύθερες υπερόξυ ρίζες (O_2^{-}) με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της λειτουργίας των μολυβδαινοενζύμων. Η παρατήρηση αυτή ενισχύθηκε και από την ανίχνευση μολυβδαινίου στις αθηρωματικές πλάκες των υπερουρικαιμικών ασθενών. Οι ελεύθερες ρίζες O_2^{-} φαίνεται ότι μεταβάλλουν την οξειδωτική κατάσταση του μολυβδαινίου, που αποτελεί το ενεργό κέντρο των μολυβδαινοενζύμων, με αποτέλεσμα την αδρανοποίησή τους.

Η αδρανοποίηση των μολυβδαινοενζύμων συνεπάγεται την κατανάλωση των ενδογενών προστατευτικών ενώσεων, όπως είναι οι γλουταθειόλες. Αυτό επιβεβαιώνεται από την αύξηση της έντασης της ταινίας του φάσματος στην περιοχή 600-400 cm⁻¹ όπου απαντούν οι χαρακτηριστικές ταινίες των C-S ομάδων των θειολών και των S-S ομάδων των δισουλφιδίων, προϊόντα οξείδωσης των θειολών (GSH) κατά την αντίδρασή τους με τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου (HO[•]).

Η SEM ανάλυση έδειξε ότι η αρχιτεκτονική των αθηρωματικών πλακών είναι πλούσια σε μεταλλικά άλατα και ινίδια. Οι αθηρωματικές πλάκες είναι πλούσιες σε ανθρακικό ασβέστιο, όπως φαίνεται από τις ταινίες στα 1460 cm⁻¹, 874 cm⁻¹ και 710 cm⁻¹ (δεν διακρίνεται επειδή είναι ασθενής) οι οποίες αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης και κάμψης των ανθρακικών ιόντων CO₃²⁻. Η EDAX ανάλυση έδειξε την παρουσία τοξικών μεταλλικών ιόντων, όπως χρώμιο, νικέλιο, κ.ά, τα οποία συνδέθηκαν με το εργασιακό περιβάλλον των ασθενών.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η υπέρυθρη φασματοσκοπία μπορεί να αποτελέσει μια ακριβή μέθοδο μελέτης της εξέλιξης της νόσου και να δώσει σημαντικές πληροφορίες για το εκάστοτε στάδιο, σε συνάρτηση με την κλινική εικόνα του ασθενούς. Από τις μεταβολές των ταινιών τόσο ως προς την ένταση, την μορφή και τις μετατοπίσεις γίνεται εμφανές ότι το οξειδωτικό στρες του οργανισμού και οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και υδροξυλίων (δραστικά σωματίδια οξυγόνου, Reactive oxygen speices, ROS) ευθύνονται για την έναρξη της υπεροξείδωσης των μεμβρανών και την περαιτέρω βλάβη του κυττάρου. Σε αντίθεση με τις άλλες ισχύουσες μέχρι σήμερα διαγνωστικές μεθόδους, οι οποίες δίνουν πληροφορίες μόνο για την στένωση και το ρυθμό ανάπτυξης των αθηρωμάτων στις αρτηρίες, η υπέρυθρη φασματοσκοπία δίνει πληροφορίες για το είδος της βλάβης και θα μπορούσε να απαντήσει στην πρόβλεψη για πιθανή αιμορραγική κατάληξη.

Abstract

Atherosclerosis and its attendant morbidity and mortality remain a global health issue in our society. There are more than 17.5 million deaths worldwide attributable to the cardiovascular complications of this disease. In the present thesis, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and Scanning Electron Microscopy (SEM) with EDAX equipment were used to study atheromatic plaques of coronary and carotid arteries from patients who underwent endarterectomy and bypass surgery. The aim of this work was the study of atheromatic plaques at a molecular level in order to answer some of the questions about the mechanism of atherogenesis of coronary arteries leading to better treatment of the disease. A suitable protocol was made relative to the clinical history of the patients. The patients were grouped according to age, sex, weight, hematological and biochemical data. Almost all of the patients were smokers (92%) and hyperlipidemic (94%).

The experimental data from FT-IR spectra were remarkable suggesting that the initial steps of atheromatic plaque formation depends on hyperoxidation of lipids, phospholipids and proteins of membranes. The changes in the spectral range of 4000-2850 cm⁻¹ showed a decrease of hydrophobicity and increase permeability of membranes. The spectra in the region of 1800-1500 cm⁻¹ describes the changes of secondary structure of proteins. From the shift of several bands to lower frequencies it was suggested that the protein helices change their structure from a-helix to random coil depending on the clinical history of the patients.

The appearance in the spectra of the band at 3080 cm⁻¹ assigned to v(=CH) indicates that the produced free hydroxyl radicals reacted by hydrogen abstraction with lipids leading to the generation of one terminal double bond (=CH). The intensity of this olefinic bond was strongly associated with the LDL cholesterol in the serum of the patients and with the band at 1735 cm⁻¹, which could be used as marker for LDL cholesterol.

FT-IR spectra of atheromas, after dilution in organic solvents showed that apolipiproteins-A (apoA) are diluted in the debris of lipids resulting in the inhibition of the physiological protective role of HDL cholesterol.

In the case of hyperuricaemic patients, it was suggested that free hydrogen peroxide and superoxide anion radicals were overproduced, inhibiting the function of molybdoenzymes, as it is shown from the products on atheromatic plaques. This observation was also confirmed from the detection of molybdenum only in the atheromatic plaques of hyperuricaemic patients. It seems that the overproduction of free O_2^{-} anion radicals alter the oxidation state of molybdenum the active site of molybdoenzymes resulting to inactivation of the cycle of hypoxanthine to xanthine with uric acid as final product. The inactivation of molybdoenzymes entails the consumption of natural protection factors of humans, such as glutathioles (GSH). This is evidenced from the increase in intensity of the bands in the region 600-400 cm⁻¹, where the characteristic groups of C-S of thiols and S-S of disulfides absorb. Disulfides are the oxidation products of thiols during their reaction with free hydroxyl radicals (HO⁻).

SEM analysis showed that the architecture of atheromatic plaques is rich in mineral salts and fibrils. Atheromatic plaques are rich in calcium carbonate, as it is suggested from the bands at 1460, 874 cm⁻¹ and 710 cm⁻¹ (very weak) which are attributed to stretching and bending vibrations of carbonyl ions $vCO_3^{2^-}$, respectively. Furthermore, EDAX analysis showed the presence of heavy metals such as chromium (Cr), lead (Pb), nickel (Ni), which were present in the working environment of the patient, showing the effect of environment on public health.

In conclusion, infrared spectroscopy is a promising and accurate method for the study of biological molecules (Biospectroscopy) and the development of the disease, since it provides valuable information for the current state of health and in accordance with patient's condition. The variations in the intensity, the shape and shifting of the bands indicate that oxidative stress in the organism produced free radicals of oxygen (Reactive Oxyzen Speices, ROS), which are responsible for the initiation of peroxidation of membrane and further damage of the cell.

Oxidant stress broadly defines the redox state of the patient achieved when there is an imbalance between antioxidant capacity and reactive oxidant species (ROS), such as reactive oxygen, nitrogen, or halogenating species, and free radical species such as thiyl, tyrosyl, or protein radicals.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1°

Αθηροσκλήρωση

1.1. Εισαγωγή

Η αθηροσκλήρωση είναι μια νόσος γνωστή εδώ και 3500 χρόνια. Εντοπίστηκε σε αιγυπτιακές μούμιες, με ανάλογα παθολογικά ευρήματα με εκείνα που παρατηρούνται και στη σημερινή εποχή [Shattok, 1909]. Είναι ασθένεια του αρτηριακού τοιχώματος και απαντάται σε ευαίσθητα σημεία στις μεγάλες αρτηρίες. Είναι η πλέον συνηθισμένη νόσος του καρδιαγγειακού συστήματος η οποία, ανάλογα με το αγγείο που επηρεάζει, προκαλεί αλλοιώσεις στην αορτή, τις στεφανιαίες αρτηρίες, τις καρωτίδες και τα αγγεία του εγκεφάλου. Κατά την διαδικασία αθηρογένεσης λιπαρά οξέα, χοληστερόλη, κυτταρικά μεγαλομόρια, ασβέστιο και άλλες ενώσεις εναποτίθενται στην εσωτερική πλευρά των αρτηριών δημιουργώντας μια στοιβάδα, που ονομάζεται αθηρωματική πλάκα.





Οι σχηματιζόμενες αθηρωματικές πλάκες αυξάνουν σταδιακά σε μέγεθος με αποτέλεσμα να μειώνουν σημαντικά τη ροή του αίματος στις αρτηρίες. Ο ρυθμός ανάπτυξης της πλάκας είναι μεγαλύτερος σε άτομα με προδιαθεσικούς παράγοντες, όπως η υπέρταση, το κάπνισμα, η παχυσαρκία, οι δυσλιπιδαιμίες, ο διαβήτης, η ηλικία, και η κληρονομικότητα. Ωστόσο, οι πλάκες γίνονται σημαντικά επικίνδυνες όταν το τοίχωμά τους γίνει εύθραυστο και διαρραγούν. Η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας και ο σχηματισμός θρόμβων αίματος προκαλούν αιφνίδια απόφραξη της αρτηρίας με συνέπεια την μη επαρκή αιμάτωση (ισχαιμία) σημαντικών οργάνωνστόχων όπως το μυοκάρδιο, ο εγκέφαλος και τα περιφερικά αγγεία [Insull, 2009].

Πολλοί είναι οι παράγοντες κινδύνου οι οποίοι προκαλούν ή επιτείνουν την αθηροσκλήρωση μέσω της επίδρασής τους στα μόρια της χαμηλής πυκνότητας χοληστερόλης (LDL) και στην φλεγμονή. Αυτοί οι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν πιο συχνά την υπέρταση, το κάπνισμα, τον σακχαρώδη διαβήτη, την παχυσαρκία και την γενετική προδιάθεση, αλλά ο μηχανισμός δράσης σε μοριακό επίπεδο δεν έχει γίνει ακόμα πλήρως κατανοητός.

Η γνώση των κυριότερων χαρακτηριστικών της αθηροσκλήρωσης βασίζεται κυρίως σε μελέτες των βλαβών του έσω γιτώνα των αρτηριών, συμπεριλαμβανομένων των καρωτίδων, των στεφανιαίων και περιφερικών αρτηριών. Πέραν αυτών, πειραματικές μελέτες σε ζώα και σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια (genetically manipulated) έδειξαν ότι στοιχεία του μεταβολισμού των λιπιδίων, της φλεγμονώδους απόκρισης και άλλοι τύποι κυττάρων φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στις βλάβες που προκαλεί η αθηροσκλήρωση [Deguchi et al., 2006, Rosenfeld et al., 2007, Sun et al., 2007]. Αυτές οι μελέτες απέδειξαν ότι φλεγμονώδεις διαδικασίες είναι αυτές που ενισχύουν την ανάπτυξη της βλάβης, όπως και ενδογενείς και εξωγενείς άνοσες διεργασίες [Hansson, 2001, Libby & Theroux, 2005, Paoletti et al., 2004, Willerson & Ridker, 2004]. Κατά την ανάπτυξη της πλάκας με την συνεγή εναπόθεση λιπιδίων και αλάτων οι προκαλούμενες ιστολογικές αλλαγές είναι πολύπλοκες και διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των ασθενών ακόμα και στον ίδιο ασθενή. Η φυσική διαφοροποίηση στο ρυθμό και στην έκταση της σχηματιζόμενης πλάκας παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.2 [Insull, 2009].



Εικόνα 1.2: Κύρια συστατικά των αθηρωματικών πλακών: Α: Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, που περιέχει πρωτεογλυκάνες, κολλαγόνες και ελαστικές ίνες, Β: Κρύσταλλοι χοληστερόλης, εστέρες χοληστερόλης και φωσφολιπίδια, C: Κύτταρα όπως μακροφάγα, προερχόμενα από μονοκύτταρα, Τ-λεμφοκύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα, D: Θρομβωτικό υλικό με τη συμμετοχή αιμοπεταλίων και εναποθέσεων ινικής υφής [Insull, 2009].

1.2. Στάδια εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης

Μέχρι σήμερα έχει επικρατήσει η θεωρία ότι στη θέση της ενδοθηλιακής βλάβης αρχικά προκαλείται δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και επομένως για κάθε χαρακτηριστική βλάβη της αρτηρίας η αθηροσκλήρωση παριστά και ένα διαφορετικό στάδιο μιας χρόνιας φλεγμονώδους διαδικασίας στο αρτηριακό τοίχωμα, με τελικό αποτέλεσμα τον σχηματισμό μόνιμης βλάβης στα αγγεία. Οι αθηροσκληρωτικές αλλαγές στο αρτηριακό τοίχωμα διαχωρίζονται στα παρακάτω στάδια.

1.2.1. Ανάπτυξη λιπωδών γραμμώσεων (Fatty Streak Development)

Η αθηροσκλήρωση αρχίζει τυπικά από την παιδική ηλικία και σταδιακά εξελίσσεται με αύξηση της ηλικίας του ανθρώπου. Η πρώτη κάκωση των αρτηριακών τοιχωμάτων λόγω αθηροσκλήρωσης εμφανίζεται με τον σχηματισμό λιπωδών γραμμώσεων. Οι γραμμώσεις είναι μικρές, λεπτές, ελαφρώς υπερυψωμένες και διακρίνονται από τον κίτρινο αποχρωματισμό της επιφάνειας της εσωτερικής στοιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος. Αρχικά προκαλείται δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και αύξηση του αριθμού των μορίων προσκόλλησης στην κυτταρική επιφάνεια. Περιλαμβάνει την εναπόθεση συσσωματωμάτων LDL (Low Density Lipoproteins) χοληστερόλης από το αίμα στο εσωτερικό τοίχωμα των αρτηριών. Στη συνέχεια τα κύτταρα που παίζουν τον κύριο ρόλο στη διαδικασία είναι τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα [Moreno et al., 1994]. Ένας μεγάλος αριθμός διαμεσολαβητών περιλαμβάνεται στο μηχανισμό της φλεγμονής. Η είσοδος των LDL στον υπενδοθηλιακό χώρο, στις παραπάνω περιοχές, οδηγεί σε οξείδωση αυτών και στο σχηματισμό των οξειδωμένων μορφών λιπιδίων που είναι σε θέση να προκαλέσουν φλεγμονή. Οι LDL στον υπενδοθηλιακό χώρο, όπως αναφέρθηκε, προσλαμβάνονται από τα μακροφάγα κύτταρα μέσω των ειδικών υποδοχέων τους και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Τα αφρώδη κύτταρα, πλούσια σε λιποειδή, αποτελούν το πρώτο στάδιο δημιουργίας της αθηρωματικής πλάκας (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3: Σχηματισμός μίας προχωρημένης, σύνθετης αθηροσκληρωτικής βλάβης [Ross, 1999]

1.2.2. Πρώιμος σχηματισμός αθηρωματικής πλάκας (Early Fibroatheroma)

Ο σχηματισμός της αθηρωματικής πλάκας εμφανίζεται κυρίως στην εφηβική ηλικία. Οι λιπώδεις ραβδώσεις μπορούν να εξελιχθούν σε πιο σύνθετες μορφές αθηροσκλήρωσης, όπως είναι η ινώδης πλάκα. Αυτό επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση και μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων της έσω στοιβάδας

στον έσω χιτώνα, μέσω του ελαστικού πετάλου, και με την απελευθέρωση από αυτά μακρομοριακών εξωκυττάριων ουσιών, όπως κολλαγόνου, ελαστίνης και διαφόρων πρωτεογλυκανικών μορίων. Η μετανάστευση των μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων από το αίμα μέσα στις βλάβες ενεργοποιεί την απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων, κυτταροκινών, χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων, αύξηση των λείων μυϊκών κυττάρων και δημιουργία ινιδίων (Εικόνα 1.4). Τελικό αποτέλεσμα της μετανάστευσης είναι η δημιουργία μιας αθηρωματικής πλάκας που καλύπτεται από ινώδη κάψα, γύρω από ένα πυρήνα αποτελούμενο από λιπίδια, νεκρωμένους ιστούς και άλατα [Insull, 2009].



Εικόνα 1.4: Στάδια της αθηροσκλήρωσης [Cascieri 2002]

1.2.3. Ρήξη της αθηρωματικής πλάκας

Λαμβάνει χώρα κυρίως σε άτομα μεγαλύτερα των 55 ετών. Στο στάδιο αυτό γίνεται λέπτυνση της ινώδους κάψας, λόγω της ελαττωμένης σύνθεσης αλλά και της αυξημένης καταστροφής του κολλαγόνου. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εκκρίνουν διάφορες πρωτεϊνάσες (κολλαγενάση, μεταλλοπρωτεϊνάσες, λυσοσσωμιακά ένζυμα) που καταστρέφουν τις εξωκυττάριες μεγαλομοριακές ενώσεις που είναι υπεύθυνες για την ακεραιότητα την ινώδους κάψας. Η ινώδης πλάκα σταδιακά ασβεστοποιείται (calcification) προκαλώντας με αυτό τον τρόπο μείωση της ελαστικότητας του αγγείου. Η φλεγμονή προκαλεί λέπτυνση της ινώδους κάψας, με αποτέλεσμα τη θρόμβωση και τη ρήξη της πλάκας. Η διάρρηξη του αγγείου παρασύρει το αγγείου, στηθάγχη και τελικά έμφραγμα του μυοκαρδίου ή εγκεφαλικό επεισόδιο [Fernandez-Ortiz et al., 1994, Insull, 2009].
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2°

Λιποπρωτεΐνες

2.1. Εισαγωγή

Οι κυριότερες λιπαρές ενώσεις ή λιπίδια στο πλάσμα του αίματος είναι τα λιπαρά οξέα, τα τριγλυκερίδια (TGs), η χοληστερόλη (ελεύθερη και εστεροποιημένη) και τα φωσφολιπίδια. Οι παραπάνω ενώσεις είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της κυτταρικής δομής (χοληστερόλη, φωσφολιπίδια) και αποτελούν υποστρώματα για τη σύνθεση των στεροειδών ορμονών (χοληστερόλη) και τον ενεργειακό μεταβολισμό (τριγλυκερίδια, λιπαρά οξέα). Τα λιπίδια είναι αδιάλυτα στο υδατικό περιβάλλον του αίματος, οπότε δημιουργούν συμπλέγματα που ονομάζονται λιποπρωτεΐνες. Οι λιποπρωτεΐνες είναι μακρομόρια, που αποτελούνται από ένα υδρόφοβο πυρήνα εστέρων χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων και περιβάλλονται από μια υδρόφοβη επιφάνεια ελεύθερης χοληστερόλης, φωσφολιπίδια και απολιποπρωτεΐνες (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1: Σχηματική παράσταση της λιποπρωτεΐνης.

Απολιποπρωτεΐνες (Apo) ονομάζονται οι πρωτεΐνες των λιποπρωτεϊνών και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της δομής τους. Λαμβάνουν μέρος στις μεταβολικές αλληλεπιδράσεις των λιποπρωτεϊνών με τους υποδοχείς των ιστών, αποτελούν συμπαράγοντες ενζύμων και λειτουργούν ως μεταφορείς λιπιδίων [Jonas, 2002].

	Εξωγενή λιπίδια	Ενδογενή λιπίδια				
	Χυλομικρά	VLDL	IDL	LDL	HDL	
Πυκνότητα (g/ml)	< 0.96	0.96-1.006	1.006-1.019	1.019-1.063	1.064-1.210	
Μέγεθος σωματιδίου (διάμετρος, mm)	75-1200	30-80	25-35	18-25	5-12	
Ρυθμός επίπλευσης (Sf)	400-10000	20-400	12-20	0-10		
Σύσταση (%)						
Τριγλυκερίδια	86	55	23	6	5	
Φωσφολιπίδια	7	18	19	22	33	
Εστεροποιημένη χοληστερόλη	4	12	29	42	17	
Ελεύθερη χοληστερόλη	2	7	9	8	5	
Πρωτεΐνες	2	8	19	22	40-55	
Κύρια συστατικά απολιποπρωτεϊνών	A-I, A-II, A- IV, B-48, C- I, C-II, C- III, E	B-100, C- I, C-II, C- III, E	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100	A-I, A-II, A-III, C-I, C-II, C-III	
Πηγή	Έντερο	Ήπαρ	Λιπόλυση της VLDL	Λιπόλυση της VLDL μέσω της IDL	Έντερο, ήπαρ, λιπόλυση των χυλομικρών και VLDL	

Πίνακας 2.1: Φυσικοχημικές ιδιότητες, σύσταση λιπιδίων και απολιποπρωτεϊνών των κυριότερων λιποπρωτεϊνών του ανθρώπινου πλάσματος [Gotto et al., 1986].

Sf: Svedberg flotation rate at 26° C and d 1.063g/ml (not applicable for HDL)

Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος κατατάσσονται, ανάλογα με την πυκνότητα που επιπλέουν κατά την υπερφυγοκέντρηση, σε πέντε κατηγορίες:

- χυλομικρά (CM),
- πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDLs),
- ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDLs),
- > χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDLs) και
- > υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDLs).



Εικόνα 2.2: Αποδόμηση λιποπρωτεϊνών σε εξωηπατικούς ιστούς μετά την έκκρισή τους από το ήπαρ [Nelson & Cox, 2004].

Οι λιποπρωτεΐνες διαχωρίζονται σε υποκατηγορίες βάσει του σωματιδιακού μεγέθους, την ηλεκτροφορητική κινητικότητα και την περιεκτικότητα της απολιποπρωτεΐνης.

2.2. Χυλομικρά

Η χοληστερόλη που προσλαμβάνεται από την τροφή πέπτεται στο λεπτό έντερο και απορροφάται στα εντεροκύτταρα (enterocytes). Μέσα στα εντεροκύτταρα, τα εξωγενή ελεύθερα λιπαρά οξέα, γλυκερόλες και μονοακυλογλυκερόλες μαζί με τους εστέρες της χοληστερόλης, τα φωσφολιπίδια και τις πρωτεΐνες σχηματίζουν συμπλέγματα που ονομάζονται χυλομικρά. Ο κυριότερος ρόλος των χυλομικρών είναι να μεταφέρουν τα λιπαρά οξέα των τριγλυκεριδίων και τη χοληστερόλη από το έντερο στον λιπώδη ιστό και στο ήπαρ καθώς και σε άλλους περιφεριακούς ιστούς.

Τα χυλομικρά εκκρίνονται στην εντερική λέμφο και αλληλεπιδρούν με της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDLs), απελευθερώνοντας apoA-I, apoA-II, apoA-IV και φωσφολιπίδια και προσλαμβάνουν apoC-I, apoC-II, apoC-IIIκαι apoE

[Gotto et al., 1986]. Η apoB-48, που αποτελεί σημαντική απολιποπρωτεΐνη των χυλομικρών, παραμένει σε όλη της διάρκεια ζωής τους. Η λιπάση της λιποπρωτεΐνης (LPL) είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται πάνω στο ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων και υδρολύει τα τριγλυκερίδια. Τα κατάλοιπα των χυλομικρών προσλαμβάνονται από τα ηπατικά κύτταρα μέσω των αλληλεπιδράσεων της apoE και της λιπάσης της λιποπρωτεΐνης με τις πρωτεογλυκάνες, τους υποδοχείς της LDL και τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με τους υποδοχείς της LDL.

2.3. Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDLs)

Οι πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDLs) εκκρίνονται στο ήπαρ και περιέχουν χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, apoB-100, apo-E και apo-C. Η apo-E και μερικές από τις λιποπρωτεΐνες apo-C μεταφέρονται από την HDL στη VLDL. Όπως και στα χυλομικρά, η λιπάση της λιποπρωτεΐνης υδρολύει τα τριγλυκερίδα των VLDL. Τα κατάλοιπα των VLDL μεταφέρονται στο ήπαρ ή μετατρέπονται σε σωματίδια IDL (Intermediate Density Lipoproteins). Οι IDLs υδρολύονται από την ηπατική λιπάση και λιπάση της λιποπρωτεΐνης σε LDL. Ο κυριότερος ρόλος των VLDL είναι η μεταφορά των τριγλυκεριδίων από το ήπαρ στους περιφεριακούς ιστούς και κυρίως τον λιπώδη ιστό. Οι σημαντικότερες απολιποπρωτεΐνες των VLDL είναι οι apoB-100, apoC-II και apoE.

Η απολιποπρωτεΐνη αροΒ σχηματίζεται στα ριβοσωμάτια του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου των ηπατικών κυττάρων και ενσωματώνεται στις λιποπρωτεΐνες στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου σχηματίζεται η χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια. Οι VLDL απελευθερώνονται από τα ηπατικά κύτταρα και αποτελούνται από χοληστερόλη, τριγλυκερίδια και αροΒ-100. Εμπλουτίζονται στη συνέχεια με τις apoC-II και apoE, τις οποίες προσλαμβάνουν από τις HDL. Τα τριγλυκερίδια των VLDL υδρολύονται, απελευθερώνοντας τις apoC, που με τη σειρά τους επιστρέφουν στις HDL. Με την υδρολυτική διάσπαση των τριγλυκεριδίων σχηματίζονται τα κατάλοιπα των VLDL, που ονομάζονται ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDLs).

2.4. Ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDLs)

Οι ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες IDLs σχηματίζονται από τη δράση της λιπάσης της λιποπρωτεΐνης στις VLDL και αποτελούνται από ίσα ποσά τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης. Οι σημαντικότερες απολιποπρωτεΐνες τους είναι οι apoB και apoE. Οι IDLs κατευθύνονται από το ήπαρ προς τους υποδοχείς της LDL ή μετατρέπονται σε LDL.

2.5. Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDLs)

Οι HDLs είναι οι μικρότερες λιποπρωτεΐνες του πλάσματος με διάμετρο 7-12 nm και πυκνότητα 1.063<d<1.25 g/ml. Παράγονται στο ήπαρ, στο έντερο αλλά και στην περιφέρεια από τον καταβολισμό της VLDL και των χυλομικρών. Αποτελούνται από έναν υδρόφοβο πυρήνα (κυρίως εστέρες χοληστερόλης και μικροποσά τριγλυκεριδίων και μη εστεροποιημένης χοληστερόλης) που περιβάλλεται από μια στοιβάδα φωσφολιπιδίων, απλή μη εστεροποιημένης χοληστερόλης και απολιποπρωτεΐνες. Οι κύριες απολιποπρωτεΐνες της HDL είναι apoA-I και apoA-II και μικρά ποσά apoA-IV, apoA-V, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoD, apoE, apoJ και apoL. Οι HDLs αποτελούν μέσο μεταφοράς άλλων πρωτεϊνών του πλάσματος που παίζουν ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων, όπως η πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης (CETP), η λεκιθινοχοληστερολ-ακυλοτρανσφεράση (LCAT) και η πρωτεΐνη μεταφοράς φωσφολιπιδίων (PLTP). Η HDL του πλάσματος διαφέρει σε σχήμα, μέγεθος, πυκνότητα, σύνθεση και φορτίο επιφάνειας. Οι HDL παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια και κυκλοφορούν στο πλάσμα είτε ως δισκοειδή μόρια (πρωτογενείς HDL) είτε ως σφαιρικά (ώριμες HDL). Ανάλογα με τη μέθοδο διαχωρισμού τους, οι HDLs διακρίνονται στα εξής κύρια υποκλάσματα: σε HDL_{2b}, HDL_{2a} (μεγάλα μόρια), και σε HDL_{3a} , HDL_{3b} , HDL_{3c} (μικρά μόρια), σύμφωνα με την ηλεκτροφόρηση βαθμίδωσης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, και σε α-, προ-α, προ-β-HDL και γ-HDL, με βάση την ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη . Οι α-HDL αντιστοιχούν στις HDL₂ και HDL₃ και αποτελούν την πλειοψηφία των HDL σε σφαιρική μορφή, ενώ οι προ-β (pre-β-HDL) είναι τα πρωτογενή κλάσματα και έχουν κυρίως δισκοειδή μορφή. Οι γ-HDL είναι δισκοειδή μόρια μικρής συγκέντρωσης στο αίμα. Επίσης, ανάλογα με την περιεκτικότητα των HDL σε apoA, διακρίνουμε τις πλούσιες σε

apoA-I αλλά χωρίς apoA-II (A-I HDLs), και τις περιέχουσες ταυτόχρονα apoA-I και apoA-II (A-I/A-II HDLs). Οι HDL₂, πλούσιες σε apoA-I, είναι αυτές που μεταφέρουν όλο και μεγαλύτερες ποσότητες εστεροποιημένης χοληστερόλης προς το ήπαρ και είναι πιθανόν ότι είναι οι κατ' εξοχήν αντιαθηρογόνες λιποπρωτεΐνες [Barter et al., 2003, Gotto et al., 1986].



Σχήμα 2.1: Οι υποκατηγορίες των HDL ανάλογα με το σχήμα, το μέγεθος, την πυκνότητα, τη σύνθεση και το επιφανειακό φορτίο [Barter et al., 2003].

Οι HDLs έχουν σημαντική αντιαθηρογόνο δράση γιατί λειτουργούν ως μεταφορείς της χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ είτε για ανακύκλωση ή για απέκκριση από το σώμα στη χολή. Η ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης αποτελεί τη μόνη δυνατότητα του οργανισμού να ελαττώνει την περίσσεια χοληστερόλης από τα κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος και κατά συνέπεια, να περιορίζει το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και την έναρξη αθηροσκλήρωσης, καθόσον η χοληστερόλη δεν καταβολίζεται.

Η λειτουργία περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

- (1) Μεταφορά των φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης από τα κύτταρα των μεμβρανών σε φτωχές σε λιπίδια απολιποπρωτεϊνες, στον εξωκυττάριο χώρο που καταλήγει στο σχηματισμό δισκοειδών μορίων HDLs
- (2) Εστεροποίηση της χοληστερόλης στα δισκοειδή μόρια, τα οποία μετατρέπονται σε σφαιρικά
- (3) Αλληλεπίδραση των σφαιρικών HDLs με τα CETP, τα οποία μεταφέρουν τους εστέρες της χοληστερόλης σε υπομονάδες VLDL/LDL

(4) Μεταφορά των εστέρων της χοληστερόλης στο ήπαρ και πρόσληψη από τα μόρια της LDL ή της εστεροποιημένης χοληστερόλης της HDL.



Σχήμα 2.2: Η ανάστροφη μεταφορά της χοληστερόλης [Barter et al., 2003]

Επίσης, οι HDLs έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν λιποπολυσακχαρίτες, διεγείροντας την κίνηση των ενδοθήλιων κυττάρων να εμποδίζουν τη σύνθεση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (platelet-activating factor) τα ενδοθηλιακά κύτταρα και να προστατεύουν τα ερυθροκύτταρα από την πηκτική τους δραστηριότητα. Οι HDLs διεγείρουν τη σύνθεση της προστακυκλίνης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επίσης, δεσμεύουν την προστακυκλίνη και παρατείνουν το χρόνο ημιζωής της. Βελτιώνουν την ανώμαλη αγγειοσυστολή, το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό της πρώιμης νόσου. Η προστακυκλίνη και το μονοξείδιο του αζώτου (NO) αναστέλλουν την ενεργοποίηση, την προστατευτικές ιδιότητες χάνονται όταν καταστρέφεται το ενδοθήλιο.

2.6. Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL)

2.6.1. Δομή LDL

Η μοριακή δομή της LDL χοληστερόλης είναι σφαιρική και αποτελείται από έναν κεντρικό πυρήνα, που περιέχει τους εστέρες της χοληστερόλης (CE, 1600 μόρια) και τριγλυκερίδια (TG, περίπου 170) και περιβάλλεται από μια πολική επιφάνεια ελεύθερης χοληστερόλης (UC, 600 μόρια), φωσφολιπίδια (περίπου 700 μόρια) και απολιποπρωτεΐνης apoB-100 [Esterbauer et al., 1992, Hevonoja et al., 2000]. Τα κυριότερα φωσφολιπίδια είναι η φωσφατιδυλοχολίνη (PC, περίπου 450 μόρια/σωματίδιο LDL) και σφιγγομυελίνη (SM, περίπου 185 μόρια/σωματίδιο LDL). Τα σωματίδια LDL περιέγουν λυσοφωσφατιδυλογολίνη (lyso-PC, περίπου 80 μόρια/σωματίδιο LDL), φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE, περίπου 10 μόρια/σωματίδιο LDL), διακυλογλυκερόλη (diacylglycerol (DAG), περίπου 7 μόρια/σωματίδιο LDL), κεραμίδιο (ceramide (CER), 2 μόρια/σωματίδιο περίπου LDL) και φωσφατιδυλινοσιτόλη (phosphatidylinositol) [Ravandi et al., 1999]. Λόγω της διαφορετικής περιεκτικότητας σε λιπίδια, οι LDL παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ως προς την πυκνότητα, το μέγεθος και το μοριακό βάρος. Η apoB-100 δεσμεύεται στον υποδοχέα της LDL και αποτελεί σημαντικό σύνδεσμο για την απομάκρυνση της LDL από το πλάσμα. Πάνω από το 50% των λιπαρών οξέων είναι πολυακόρεστα, κυρίως λινολεϊκό και σε μικρότερο ποσοστό αραχιδονικό και δοκοσαεξανοϊκό οξύ Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) (docosahexanoic acid, DHA). προστατεύονται από την επίδραση των ελευθέρων ριζών και την οξείδωση με αντιοξειδωτικά, κυρίως από την α-τοκοφερόλη και λιγότερο από τη γ-τοκοφερόλη, τα καροτενοειδή, την κρυπτοξανθίνη και ουμπικινόλη-10 (ubiquinol-10). Η περικετικότητα των PUFAs και αντιοξειδωτικών ποικίλλει από άτομο σε άτομο, καταλήγοντας σε σημαντικές διαφορές κατά την οξείδωση της LDL [Mertens & Holvoet, 2001]. Χαρακτηριστικό φαινόμενο της πρώιμης αθηρογένεσης είναι η εξωκυτταρική συσσώρευση λιπιδίων προερχόμενα από την LDL σε μορφή σταγονιδίων και φυσαλίδων, τα οποία οδηγούν στη δημιουργία αθηρωματικών βλαβών στο εσωτερικό τοίχωμα των αρτηριών.



Σχήμα 2.3 : Μοριακό μοντέλο ενός σωματιδίου LDL [Hevonoja et al., 2000]

2.6.2. Εξωτερική επιφάνεια και στοιβάδες αλληλεπιδράσεις

Το σωματίδιο της LDL διαχωρίζεται βάσει της δομής στον τον πυρήνα και την επιφάνεια (Σχήμα 2.4). Σύμφωνα με το μοντέλο τριών ζωνών (three-layer model) η επιφάνεια περιλαμβάνει δύο στοιβάδες, τη στοιβάδα αλληλεπίδρασης που αποτελείται από τα λιπίδια της επιφάνειας και τον διεισδυτικό πυρήνα και την εξωτερική στοιβάδα που αποτελείται κυρίως από ομάδες φωσφολιπιδίων. Η καθαρή στοιβάδα του πυρήνα αποτελείται κυρίως από μόρια που δεν είναι σε άμεση επαφή με τα μόρια της επιφανειακής στοιβάδας. Κάθε στοιβάδα χαρακτηρίζεται από μια διακριτή διαμόρφωση: τα φωσφολιπίδια της εξωτερικής στοιβάδας είναι παράλληλα προς την επιφάνεια, τα λιπαρά οξέα της ενδοεπιφανεικής στοιβάδας είναι ακτινωτά και τα λιπίδια του πυρήνα ταξινομούνται τυχαία [Hevonoja et al., 2000].



Σχήμα 2.4: Διαχωρισμός της LDL σε 3 ακτινικές στοιβάδες. apoB-100: γκρι, Φωσφολιπίδια: μπλέ, Λιπαρά οξέα και χοληστερόλη: Πορτοκαλί [Hevonoja et al., 2000]

2.6.2.1. Νανοπεριβάλλον

Η ενδοεπιφανεική στοιβάδα παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των μοριακών ιδιοτήτων των LDL και στην αλληλεπίδραση με άλλα μόρια. Τα συστατικά των λιπιδίων στις LDL δεν είναι αρμονικά κατανεμημένα στην ενδοεπιφανειακή στοιβάδα αλλά κατά τόπους δημιουργούν διαφορετικό μοριακό περιβάλλον. Τα περιβάλλοντα αυτά περιλαμβάνουν διαφορετικό αριθμό λιπιδίων και έχουν διαφορετικές μοριακές ιδιότητες που σχετίζονται με τη διαμόρφωση. Στα σωματίδια της LDL, το περιβάλλον είναι μεγέθους νανομορίου και γι αυτό ονομάζεται νανοπεριβάλλον. Το περιβάλλον των apoB-100 διακρίνεται σε δύο τύπους, το ένα είναι πλούσιο σε φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και φτωχό σε ελεύθερη χοληστερόλη (UC), ενώ στο άλλο επικρατούν τα μόρια σφιγγομυελίνης (SM) και ελεύθερης χοληστερόλης (UC). Στα συγκεκριμένα περιβάλλοντα, ο συνδυασμός των λιπιδίων παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη μεταφορά των λιπιδίων και στη λιπόλυση, στην αναγνώριση και ενεργοποίηση των λιπιδίων που μεταφέρουν πρωτεΐνες και των ενζύμων που υδρολύουν τα λιπίδια. Στο πλούσιο σε φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και φτωχό σε ελεύθερη χοληστερόλη (UC) περιβάλλον, ευνοείται η διείσδυση των λιπιδίων του πυρήνα προς το υδρόφιλο περιβάλλον, οπότε τα υδατοδιαλυτά ένζυμα προσεγγίζουν τα υδροφοβικά λιπίδια του πυρήνα σε σχέση με το περιβάλλον πλούσιο σε μόρια σφιγγομυελίνης (SM) και ελεύθερης χοληστερόλης (UC) [Hevonoja et al., 2000].

2.6.2.2. Ελεύθερη χοληστερόλη (UC) και φωσφολιπίδια

Η επίδραση της ελεύθερης χοληστερόλης στη δομή των φωσφολιπιδίων είναι ουσιαστική. Μελέτες με ³¹P-NMR έδειξαν ότι τα μόρια της ελεύθερης χοληστερόλης δεν συνδέονται με τις πολικές ομάδες των φωσφολιπιδίων αλλά οι υδροξυλομάδες (-OH) της ελεύθερης χοληστερόλης βρίσκονται κοντά στο οξυγόνο του καρβονυλίου της εστερομάδας των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης. Τα μόρια της ελεύθερης γοληστερόλης δεν διαμορφώνουν ένα ισχυρό σύμπλοκο με τα φωσφολιπίδια, αφού ο ρυθμός περιστροφής των μορίων της ελεύθερης χοληστερόλης κατά τον μακρύ άξονα είναι μεγαλύτερος από εκείνον των φωσφολιπιδίων. Οι αλληλεπιδράσεις των ομάδων των φωσφολιπιδίων μειώνονται παρουσία της ελεύθερης χοληστερόλης εξαιτίας των ενδομοριακών αποστάσεων μεταξύ των φωσφολιπιδίων. Μελέτες με ²D-NMR με τις πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL), LDL και μικροκολλοειδή έδειξαν ότι τα φωσφολιπίδια υπάρχουν σε δυο διαφορετικά περιβάλλοντα, σε ένα υψηλής και ένα χαμηλής κατανομής (higher and lower order), στη μονοστρωματική επιφάνεια των σωματιδίων. Η ύπαρξη των διαφορετικών περιβάλλοντων δεν εξαρτάται από τα συστατικά των πρωτεϊνών και αποτελούν ένδειξη για ανεπαρκή χοληστερόλη [Hevonoja et al., 2000].

2.6.2.3. Ελεύθερη χοληστερόλη (UC) και σφιγγομυελίνη (SM)

Από πειράματα για την ομοιοστασία της ελεύθερης χοληστερόλης σε μεμβράνες του πλάσματος, φάνηκε ότι υπάρχει ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ της ελεύθερης χοληστερόλης με την σφιγγομυελίνη παρά με την φωσφατιδυλοχολίνη. Παρατηρήθηκε ότι κατά την μείωση της σφιγγομυελίνης με σφιγγομυελινάση (SMase) από την επιφάνεια του κυττάρου, η εκροή ελεύθερης χοληστερόλης σε ένα εξωκυττάριο αποδέκτη της αυξάνεται δραματικά ενώ η υδρόλυση της φωσφατιδυλοχολίνης δεν είχε καμιά επίδραση στην εκροή. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η επανασύνθεση της σφιγγομυελίνης μειώνει την εκροή ελεύθερης χοληστερόλης σε ελεγχόμενα επίπεδα. Έχει αποδειχθεί ότι η αλληλεπίδραση της ελεύθερης χοληστερόλης με την σφιγγομυελίνη βασίζεται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο λιπιδίων, όπως δυνάμεις Van der Walls μεταξύ του δακτυλίου της χοληστερόλης και τις αλυσίδες των κορεσμένων λιπαρών οξέων της σφιγγομυελίνης. Επίσης, είναι πιθανό να σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του υδρογόνου της ελεύθερης χοληστερόλης και της ομάδας του αμιδίου [Hevonoja et al., 2000].

2.6.2.4. Ελεύθερη χοληστερόλη και ουδέτερα λιπίδια

Η ελεύθερη χοληστερόλη (UC) μειώνει τη διαλυτότητα των ουδέτερων λιπιδίων στις στοιβάδες των φωσφολιπιδίων. Εφόσον η επιφάνεια των σωματιδίων της LDL είναι πλούσια σε μόρια ελεύθερης χοληστερόλης, τα οποία αλληλεπιδρούν με τη σφιγγομυελίνη, είναι πιθανό η διείσδυση των τριγλυκεριδίων και των εστέρων της χοληστερόλης να υπερισχύουν στις πλούσιες περιοχές σε φωσφατιδυλοχολίνη και χαμηλές σε ελεύθερη χοληστερόλη. Με τη χρήση της φασματοσκοπίας φθορισμού των κολλοειδών σωματιδίων αποδείχθηκε ότι η σύσταση των λιπιδίων του πυρήνα επιδρά στη διασπορά των μορίων ελεύθερης χοληστερόλης. Σε κολλοειδή τριγλυκεριδίων-φωσφατιδυλοχολίνης, πάνω από 80% των μορίων ελεύθερης χοληστερόλης συνδέθηκαν με τα μόρια της φωσφατιδυλοχολίνης, ενώ σε κολλοειδή εστεροποιημένης χοληστερόλης – φωσφατιδυλοχολίνης η σύνδεση δεν ξεπέρασε το 50% [Hevonoja et al., 2000].

2.6.2.5. Διευθέτηση της κύριας ομάδας της φωσφατιδυλοχολίνης (PC)

Οι κύριες ομάδες της φωσφατιδυλοχολίνης είναι προσαρμοσμένες παράλληλα στην επιφάνεια του σωματιδίου, με τρόπο ανάλογο προς τις διπλοστοιβάδες της PC. Οι ομάδες αυτές συμπεριφέρονται διαφορετικά στο υδατικό περιβάλλον και το εσωτερικό των διπλοστοιβάδων, ενώ προσδίδουν τραχύτητα στην εξωτερική στοιβάδα. Σε καθαρά συστήματα φωσφολιπιδίων, τα άτομα αζώτου και φωσφόρου των κύριων ομάδων βρίσκονται σε κατάλληλη απόσταση αλληλεπίδρασης. Επομένως, η διείσδυση άλλων μορίων ή αλλαγών επιδρά στη διευθέτησή τους. Στις μικρές λιποπρωτεΐνες, η επιφάνεια είναι κυρτή με αποτέλεσμα να διαταράσσονται οι αλληλεπιδράσεις των κυρίων ομάδων της PC [Hevonoja et al., 2000].

2.6.2.6. Λιπίδια (packing lipids)

Ο πυρήνας των σωματιδίων LDL αποτελείται από μόρια εστέρων χοληστερόλης και μικρά ποσά τριγλυκεριδίων και ελεύθερης αλκοόλης. Η διείσδυση των λιπιδίων του πυρήνα (τριγλυκερίδια και εστέρες χοληστερόλης) και των αλυσίδων των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων αυξάνουν την κατανομή στην ενδοεπιφανειακή στοιβάδα τη φωσφατιδυλοχολίνης. Η ελεύθερη χοληστερόλη που βρίσκεται στα σωματίδια της LDL και HDL, σε αντίθεση με τις κυτταρικές μεμβράνες, είναι πιο ευάλωτη στην οξείδωση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η συσσωμάτωση των λιπιδίων στις μονοστοιβάδες των LDL και HDL να χάνεται σε σύγκριση πάντα με τη συμπεριφορά τους στις διπλοστοιβάδες, πιθανών λόγω της σφαιρικής φύσης και της καμπυλωτής επιφάνειας της μεμβράνης των σωματιδίων. Η στοιβάδα των φωφολιπιδίων στην LDL είναι πιο συμπαγής εξαιτίας της υψηλότερης συγκέντρωσης ελεύθερης χοληστερόλης και σφιγγομυελίνης. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι το στοίβαγμα (packing) και η διείσδυση των λιπιδίων στις λιποπρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες, όπως ο έλεγχος σύνδεσης των απολιποπρωτεϊνών και η ενζυμική δραστικότητα [Hevonoja et al., 2000].

2.6.3. ApoB - 100

Η apoB-100 είναι μια από τις μεγαλύτερες μονομερείς πρωτεΐνες, αποτελούμενη από 4536 αμινοξέα. Στην οικογένεια των απολιποπρωτεΐνων, οι apoB-100 και apoB-48 είναι τα μόνα μέλη που δεν ανταλλάσσονται. Η apoB-100 βρίσκεται στην LDL και προέρχεται από τον μεταβολισμό της VLDL. Η apoB-100 πρέπει να προσαρμόζεται στις μεταβολές της δομής και σύστασης που λαμβάνουν χώρα στο μόριο μεταφορέας (carrier particle), π.χ. βρίσκεται σε μια VLDL διαμέτρου από 80-200 nm και καταλήγει σε μια LDL διαμέτρου 22 nm. Η apoB-100 παίζει ρόλο στην ακεραιότητα της δομής και ελέγχει τις αλληλεπιδράσεις των σωματιδίων της LDL [Hevonoja et al., 2000].

2.6.3.1. Λειτουργικές περιοχές

Το Ν-τελικό της apo B-100 δεσμεύει το ένζυμο λιποπρωτεϊνική λιπάση και το C-τελικό άκρο μεσολαβεί στη σύνδεση του ενεργοποιητικού παράγοντα του ενζύμου ακετυλουδρολάση με τα σωματίδια της LDL. Τα θετικά φορτισμένα κατάλοιπα της αργινίνης και της λυσίνης της apoB-100 αλληλεπιδρούν με τις γλυκοζαμινογλυκάνες και μεσολαβούν στις αλληλεπεδράσεις LDL-υλικού [Hevonoja et al., 2000].

2.6.3.2. Αλληλεπιδράσεις ΑροΒ-100 και λιπιδίων

Οι περιοχές της β-διαμόρφωσης (β-sheet) της apoB-100 αποτελούν τη βάση για τη διατήρηση της ακεραιότητας της δομής της LDL και σύνδεσης των λιπιδίων. Από πειράματα με υπέρυθρη φασματοσκοπία επιβεβαιώθηκε ότι στα πεπτίδια apoB-100 που απέμειναν στα σωματίδια της LDL μετά την έκθεση σε διαφορετικές πρωτεάσες κυριαρχούσε η β-διαμόρφωση. Μελέτες NMR της LDL και HDL έδειξαν ότι στην LDL (αλλά όχι στην HDL, που όλα τα apo συστατικά στερούνται βδιαμόρφωσης), ένα μέρος της φωσφατιδυλοχολίνης έχει ακινητοποιημένες τις κύριες ομάδες. Επίσης, έχει βρεθεί ότι το ποσό των τριγλυκεριδίων στα σωματίδια LDL επηρεάζει τη δομή των apoB-100 [Hevonoja et al., 2000].

2.6.4. Τροποποιημένη LDL

Πολλά υδρολυτικά ένζυμα και προ-οξειδωτικοί παράγοντες υπάρχουν στο αρτηριακό τοίχωμα. Το αρτηριακό τοίχωμα περιέχει πρωτεάσες όπως χυμάση και τρυπτάση, πλασμίνη, μεταλλοπρωτεϊνάσες και λυσοσωμικές πρωτεάσες, λιπάσες όπως εκκριτικές σφιγγομυελάση, φωσφολιπάση A2 και εστεράση της χοληστερόλης (100). Επιπλέον, η μυεολυπεροξειδάση και 15-λιποξυγενάση συμβάλλουν στην οξείδωση των λιποπρωτεϊνών στο αρτηριακό τοίχωμα. Αυτά τα συστατικά παίζουν ρόλο στη μετατροπή των σωματιδίων LDL σε εξωκυτταρικά σταγονιδία λιπιδίων και κυστίδια που βρίσκονται στο εσωτερικό τοίχωμα στα πρώτα στάδια της αθηρογένεσης [Hevonoja et al., 2000].

2.6.4.1. Πρωτεολυτικές τροποποιήσεις

Η πρωτεόλυση της LDL έχει μελετηθεί με διάφορες πρωτεάσες, όπως την πλασμίνη, καλλικρεΐνη (kallikrein) και θρομβίνη που πορκαλεί σχάση της apoB-100, ενώ με τη θρυψίνη, α-χυμοθρυψίνη και προνάση αποδομείται πλήρως η apoB-100. Η χαλάρωση της σύνδεσης των λιπιδίων στην επιφάνεια καταλήγει σε αυξημένη διείσδυση των υδρόφοβων μορίων του πυρήνα προς την επιφάνεια, αυξάνοντας την υδροφοβικότητα των πρωτεολυμένων σωματιδίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσωμάτωση και δημιουργία αμφιαλειφατικών λιπιδίων με πολυστοιβάδες ενωμένες στα σωματίδια της LDL [Hevonoja et al., 2000].

2.6.4.2. Σφιγγομυελινάση (SMase)

Η επεξεργασία των σωματιδίων με την SMase επιφέρει συνένωση των σωματιδίων. Η σφιγγομυελινάση διαχωρίζει ένα μόριο σφιγγομυελίνης σε δυο κύριες ομάδες, ένα CER και φωσφοχολίνη. Στους 15° C, η σφιγγομυελινάση δεν οδηγεί στη συνένωση και τήξη των LDL σωματιδίων γιατί τα λιπίδια του πυρήνα της LDL είναι διατεταγμένα ακτινικά σε υγρή κρυσταλλική φάση. Στους 37° C, τα σωματίδια LDL είναι σε ανάλογη κατάσταση με την υγρή [Hevonoja et al., 2000].

2.6.4.3. Φωσφολιπάση C (PLC)

Η φωσφολιπάση υδρολύει το μόριο της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) σε μια ομάδα DAG και Φωσφοχολίνης. Ελευθερώνονται οι υδρόφιλες ομάδες ενώ τα υδρόφοβα μόρια DAG συσσωρεύονται και κατανέμονται στις ενδοεπιφανειακές στοιβάδες και στον πυρήνα όπως οι λιποπρωτεΐνες [Hevonoja et al., 2000].

2.6.4.4. Φωσφολιπάση Α2 (PLA2)

Η φωσφολιπάση A2 είναι ειδική στην υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης [Hevonoja et al., 2000].

2.6.4.5. Χολινεστεράση (CEase)

Η χολινεστεράση προκαλεί ενζυμική υδρόλυση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη. Η χολινεστεράση συντίθεται στο ήπαρ και είναι παρούσα στο πλάσμα [Hevonoja et al., 2000].

2.6.5. Ο μεταβολισμός της LDL

Τα σωματίδια LDL προέρχονται από τον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών πλούσιων σε τριγλυκερίδια. Η παραγωγή των LDL γίνεται μέσω του καταβολισμού των VLDL ενώ μια πολύ μικρή ποσότητα παράγεται απευθείας στο ήπαρ. Μετά τη λιπόλυση των VLDL, μέσω της δράσης της LPL (lipoprotein lipase) και στη συνέχεια της HL (hepatic lipase), σχηματίζονται οι LDL που αποτελούνται κυρίως από apoB-100 και εστέρες χοληστερόλης [Gotto et al., 1986].

2.6.6. Υπεροξείδωση των LDL με Cu^{2+}

Τα μεταβατικά μεταλλικά ιόντα, ως βασικά στοιχεία ή ιχνοστοιχεία, παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλά βιολογικά συστήματα και βιολογικές διεργασίες. Σύμφωνα με πρόσφατες εκτιμήσεις, το ένα τρίτο των πρωτεϊνών, στα οποία έγινε χαρακτηρισμός της δομής, περιέχει μεταβατικά μεταλλικά ιόντα. Τα μεταλλικά ιόντα συμμετέχουν στη διατήρηση της δομής του DNA ή των πρωτεϊνών, ως καταλύτες ή ως δραστικά κέντρα, κ.α. [Finney & O'Halloran, 2003].

Ο ρόλος των μεταβατικών μετάλλων στους ζώντες οργανισμούς είναι πράγματι σημαντικός κυρίως λόγω των οξειδοαναγωγικών τους ιδιοτήτων επειδή μπορούν να συμμετέχουν σε βιολογικές διαδικασίες μεταφοράς ηλεκτρονίων, μεταφοράς οξυγόνου καθώς και σε μεγάλο αριθμό καταλυτικών διεργασιών.

Ένα από τα μεταβατικά μέταλλα που απαντάται σε πολλές πρωτεΐνες, είναι ο χαλκός. Ιστορικά, αναφέρεται ότι ο χαλκός δεν ήταν απαραίτητος στην λειτουργία των κυττάρων μέχρι την εμφάνιση του οξυγόνου [Crichton & Pierre, 2001]. Πιστεύεται, μάλιστα, ότι πριν από την εμφάνιση του οξυγόνου με τις τότε επικρατούσες αναγωγικές συνθήκες, ο χαλκός ευρίσκετο ως ισχυρά αδιάλυτο θειούχο άλας του Cu(I) και έτσι δεν ήταν διαθέσιμος για τις βιοχημικές αντιδράσεις. Επίσης θεωρείται ότι στα κυανοβακτήρια οφείλεται η έναρξη της παραγωγής μοριακού οξυγόνου, το οποίο εμφανίζεται πριν από περίπου ένα δισεκατομμύριο χρόνια. Υπολογίστηκε ότι για την παραγωγή σημαντικής ποσότητας O₂ στην ατμόσφαιρα απαιτήθηκαν επιπλέον 200-300 × 10⁶ χρόνια, επειδή το αρχικά παραγμένο οξυγόνο καταναλώθηκε στην οξείδωση του σίδηρου των ωκεανών και του εδάφους της γης. Η εμφάνιση του οξυγόνου ήταν θανατηφόρα για τους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς, ενώ πιστεύεται ότι επηρέασε μη αναστρέψιμα την ζωή στη γη.

Ενώ η οξείδωση του σιδήρου οδηγεί προς αδιάλυτο και σπάνιο τρισθενή σίδηρο, η οξείδωση του μονοσθενούς χαλκού οδήγησε στην παραγωγή υδατοδιαλυτών αλάτων του δισθενούς χαλκού. Στον κλάδο της βιολογίας διαπιστώθηκε ότι τα ένζυμα που συμμετείχαν σε διεργασίες αναερόβιου μεταβολισμού ήταν έτσι σχεδιασμένα ώστε να λειτουργούν στη «χαμηλότερη» οξειδοαναγωγική βαθμίδα. Η δημιουργία όμως του μοριακού οξυγόνου προκάλεσε στους οργανισμούς την ανάγκη παρουσίας δραστικών μετάλλων που θα ήταν ικανά να αποκτήσουν υψηλότερα δυναμικά αναγωγής. Ο χαλκός, προσιτός πλέον στα βιολογικά συστήματα, ήταν ιδανικός για την αξιοποίηση του μοριακού οξυγόνου. Ο χαλκός άρχισε να χρησιμοποιείται από βιολογικά συστήματα όπως η κυτοχρωμική οξειδάση c. Πιστεύεται ότι η εμφάνιση του χαλκού συμπίπτει με την εξέλιξη πολυκυτταρικών οργανισμών, που ανέπτυξαν εξωκυτταρικά πλαίσια ανάπτυξης, τα οποία λειτούργησαν προστατευτικά έναντι των ελεύθερων ριζών οξυγόνου [Crichton & Pierre, 2001] ως συμπαράγοντες των ενζύμων υπεροξειδική δισμουτάση χαλκούψευδαργύρου (Superoxide dismutase SOD) και σερουλοπλασμίνη (ceruloplasmin) που αποτελούν την αντιοξειδωτική ασπίδα του κυττάρου. Τα ιόντα χαλκού είναι απαραίτητα για την απορρόφηση και μεταφορά σιδήρου καθώς και για την παραγωγή μελανίνης. Συμμετέχουν στο σχηματισμό ελαστίνης και κολλαγόνου, συνιστώντας μέρη του συνδετικού ιστού και των οστών και προστατεύουν τον άνθρωπο από την οστεοπόρωση.

Οι πρωτεΐνες χαλκού δρουν είτε για μεταφορά ηλεκτρονίων και μοριακού οξυγόνου είτε για την ενεργοποίηση του οξυγόνου [Crichton & Pierre, 2001]. Τα ιόντα χαλκού έχουν τη δυνατότητα να επικρατούν σε δύο οξειδοαναγωγικές καταστάσεις, οξειδωμένα ως Cu(II) ή ανηγμένα ως Cu(I). Ο Cu(II) κατανέμει τα ηλεκτρόνια στα τροχιακά 3d9 (γι αυτό έχει συμπεριφορά μεταβατικών μετάλλων) και προτιμά αριθμούς σύνταξης 4 (επίπεδη τετράγωνη διαμόρφωση-square planar), 5 (τριγωνική διπυραμίδα-trigonal bipyramidal ή τετραγωνική πυραμίδα-square pyramid) ή 6 (οκταεδρική γεωμετρία-octahedral) ή 4 (τετραεδρική γεωμετρίαtetrahedral geometry) και σταθεροποιείται με μαλακούς κατά Lewis υποκαταστάτες. Οι σταθεροί δεσμοί μεταξύ Cu(II)–N είναι συχνά αδρανείς ενώ οι δεσμοί με δότες άτομα οξυγόνου είναι περισσότερο ασταθείς. Ο Cu(I) με πλήρως συμπληρωμένη την εξωτερική του στοιβάδα (3d10 τροχιακά), προτιμά αριθμούς σύνταξης 2, 3.

Οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις των μετάλλων στο εσωτερικό του κυττάρου είναι χαμηλές, τα δε κύτταρα ανέπτυξαν τους απαραίτητους μηχανισμούς ώστε τα μεταλλικά ιόντα να συνδέονται με τις κατάλληλες πρωτεΐνες. Η σύμπλεξη των πρωτεϊνών με τα κατάλληλα μέταλλα είναι σημαντική διότι διαφορετικά η κατάληψη του ενεργού κέντρου από άλλο μέταλλο μπορεί να παρεμποδίσει τις λειτουργίες τους. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα τα μεταλλοένζυμα χαλκού βρίσκονται σε αρκετά κυτταρικά διαμερίσματα όπως στα μιτοχόνδρια και στην κυτταρική επιφάνεια. Έτσι οι οργανισμοί από τα βακτήρια μέχρι τα θηλαστικά έχουν αναπτύξει διάφορους, πολλές φορές πολύπλοκους μηχανισμούς ελέγχου ομοιόστασης στοιχείων [Theophanides & Anastassopoulou, 2002].

Μέχρι το 1997 πίστευαν ότι για τον σχηματισμό ενός μεταλλοενζύμου αρκούσε απλή αντίδραση μεταξύ του ενζύμου και του ελεύθερου μεταλλικού ιόντος. Σήμερα, δέχονται ότι τα μεταλλικά ιόντα δεν αντιδρούν άμεσα με τα ένζυμα, αλλά μέσω ειδικών πρωτεϊνών-συνοδών. Με τον τρόπο αυτό ρυθμίζεται η συγκέντρωση των μεταλλικών ιόντων στον οργανισμό [O'Halloran & Culotta, 2000]. Σε ευκαριωτικά και προκαρυωτικά κύτταρα έχουν διαπιστωθεί μηχανισμοί που διατηρούν τα επίπεδα της συγκέντρωσης μεταλλικών στοιχείων σταθερά. Οι συγκεντρώσεις του ενδοκυτταρικού χαλκού πρέπει να ελέγχονται και η ομοιοστασία του χαλκού φαίνεται να εξαρτάται από ομάδα πρωτεϊνών μεμβράνης και μικρότερες υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες (πρωτεΐνες-συνοδοί χαλκού-copper chaperones), οι οποίες ανταλλάσσουν χαλκό με τα κανάλια μεταφοράς χαλκού ή ενσωματώνουν το χαλκό κατευθείαν σε εξαρτώμενα από το χαλκό ένζυμα.

Έχει αποδειχθεί ότι η οξείδωση των LDL από τα ιόντα Cu²⁺ χωρίζεται σε τρεις φάσεις: υστέρηση, διάδοση και διάσπαση. Κατά τη φάση υστέρησης, τα μόρια της LDL καταναλώνονται σταδιακά από τα αντιοξειδωτικά τους, α-τοκοφερόλη και β-καροτένιο. Σε αυτή τη φάση, πραγματοποιείται στα μόρια των LDL μικρή λιπιδική υπεροξείδωση όπως αποδεικνύεται από την μέτρηση των PUFAS, τα δραστικά συστατικά του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS), υπεροξείδια των λιπιδίων, το φθορισμό και τα συζευγμένα διένια. Η οξείδωση των μορίων LDL μέσω των μακροφάγων ακολουθεί την ίδια αλληλουχία. Όταν τα μόρια των LDL μειώνονται από τα αντιοξειδωτικά τους, η λιπιδική υπεροξείδωση επιταχύνεται με ρυθμό που αγγίζει τα όρια της αυθόρμητης ανάπτυξης (uninhibited process) σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση (1):

$$v_{\text{max}} = \frac{d[\text{LOOH}]}{dt} \tag{1}$$

Ο μηχανισμός με τον οποίο τα ιόντα Cu^{2+} επιδρούν στη λιπιδική υπεροξείδωση δεν είναι πλήρως κατανοητός. Είναι πιθανόν τα ιόντα Cu^{2+} να δεσμεύονται σε διαφορετικά σημεία της apoB που δημιουργούν θέσεις κέντρα για συνεχή παραγωγή ελευθέρων ριζών. Ο αριθμός και οι θέσεις των σημείων δέσμευσης δεν είναι ακριβώς γνωστός (κυμαίνεται από 3-10). Μετά το σχηματισμό του συμπλόκου Cu^{2+} -LDL και την αναγωγή του Cu^{2+} σε Cu^+ , αρχίζει η παραγωγή των ελευθέρων ριζών. Η σταθερά ταχύτητας παραγωγής των ριζών εξαρτάται από την συγκέντρωση των ιόντων χαλκού και των μορίων LDL. Η αύξηση της συγκέντρωσης του χαλκού οδηγεί σε αύξηση της ταχύτητας και της υπεροξείδωσης. Κάθε συστατικό που αποσπά το χαλκό από τα σημεία δέσμευσης με την apoB (π.χ. EDTA, ιστιδίνη, συγκεκριμένες πρωτεΐνες και άλλα συστατικά), φαίνεται να παρεμποδίζει την οξείδωση της LDL.

Μέχρι σήμερα δέχονται ότι η αντίδραση της λιπιδικής υπεροξείδωσης ξεκινά είτε με μεταφορά ηλεκτρονίων και αναγωγή των μεταλλικών ιόντων μεταβατικών μετάλλων και χαλκού:

$$Cu^{+2} + e^{-} \rightarrow Cu^{+}$$
^[1]

είτε με άμεση αναγωγή των μεταλλικών ιόντων από ενδογενείς αναγωγικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, τα ιόντα χαλκού αντιδρούν άμεσα με τις θειόλες προς τελικά προϊόντα δισουλφιδίων

$$\operatorname{Cu}^{2+} + \operatorname{RSH} \to \operatorname{Cu}^{+} + \operatorname{RS}^{\bullet} \to \operatorname{Cu}^{+} + \frac{1}{2}\operatorname{RSSR}$$
 [2]

Σε κάθε περίπτωση ο προκύπτων μονοσθενής χαλκός μπορεί να αντιδράσει περαιτέρω με αντιδράσεις Haber-Weiss, παράγοντας ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου.

$$Cu^{+} + H_2O_2 \rightarrow Cu^{2+} + OH^{-} + OH^{\bullet}$$
[3]

Τα ιόντα μονοσθενούς χαλκού (Cu⁺) είναι ισχυρά προοξειδωτικά (prooxidants), που πιθανόν να αντιδρούν με λιπαρά οξέα παράγοντας τις αντίστοιχες ελεύθερες ρίζες των λιπιδίων (LO⁻) σύμφωνα με την αντίδραση [4]:

$$Cu^{+} + LOOH \rightarrow Cu^{2+} + OH^{-} + LO^{\bullet}$$
^[4]

Τα παραγόμενα δισθενή ιόντα μπορούν με τη σειρά τους να σχηματίσουν ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίων των λιπιδίων:

$$Cu^{2+} + LOOH \rightarrow Cu^{+} + H^{+} + LOO^{\bullet}$$
^[5]

Τα μονοσθενή ιόντα χαλκού μπορούν να οξειδωθούν προς δισθενή χαλκό και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Η αντίδραση γίνεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο σχηματίζεται το ενδιάμεσο σύμπλοκο (transition complex) Cu-O. Η μορφή αυτή του οξειδίου δεν είναι σταθερή και διασπάται ταχύτατα προς το ανιόν της υπερόξυ ελεύθερης ρίζας του οξυγόνου. Η αντίδραση [6] δίνει τα δύο στάδια.

$$\operatorname{Cu}^{+} + \operatorname{O}_{2} \to \operatorname{Cu}^{2+} - \operatorname{O}_{2}^{\bullet} \to \operatorname{Cu}^{2+} + \operatorname{O}_{2}^{\bullet}$$
[6]

Η κυριότερη διαφορά της οξείδωσης από τις αζωενώσεις, όπως το AAPH (2, 2'-azobis-2-methyl-propanimidamide, dihydrochloride), και των ιόντων χαλκού Cu²⁺ είναι ότι η παραγωγή των ελευθέρων ριζών από το AAPH είναι σταθερή ενώ στη δεύτερη περίπτωση η παραγωγή των ελευθέρων ριζών στην επιφάνεια των λιποπρωτεϊνών είναι συνεχής [Esterbauer & Ramos, 1996].

Επομένως, ο χαλκός παίζει σημαντικό ρόλο στην αθηρογένεση μέσω της δράσης στα στοιχεία των κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος, στα λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια καθώς και στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.5. Η σχέση του χαλκού με την πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακού νοσήματος είναι διφασική. Η έλλειψη ή η περίσσεια χαλκού μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη αθηροσκληρωτικής πλάκας μέσω διαφορετικών μηχανισμών.



Σχήμα 2.5: Πιθανές δράσεις του χαλκού στην αθηρογένεση. (1): Διαμορφώνει την βιοσύνθεση και το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών LDL και HDL. (2): Διευκολύνει την οξειδωτική τροποποίηση της LDL, με αποτέλεσμα την αύξηση των αφρώδων κυττάρων (3): Η ανεπάρκεια χαλκού σχετίζεται με τη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Τ-λεμφοκύτταρα) (4): Η ανεπάρκεια συνδέεται με την αυξημένη έκφραση μονοπύρηνων κυττάρων αλλά και τη δημιουργία ανιόντων υπεροξειδίου (5): Προάγει την παραγωγή του κολλαγόνου μέσω της LDL από τα λεία μυϊκά κύτταρα (6): Η ανεπάρκεια οδηγεί σε εξωκυττάριες δυσμορφίες στους ιστούς (7): Ο χαλκός μέσω του σχηματισμού της τροποποιημένης LDL οδηγεί σε δυσλειτουργία του ενδοθήλιου, προκαλώντας βλάβες στη σύνθεση του NO (8): επιδρά στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και στην ομοιόσταση [Ferns et al., 1997].

Το οξειδωτικό στρες (η παραγωγή ελευθέρων ριζών) δημιουργεί βλάβες σε μοριακό επίπεδο που ενδέχεται να προκαλέσουν διακοπή βιολογικών λειτουργιών και τελικά ο οργανισμός να οδηγηθεί σε κυτταρικό θάνατο. Εξ' άλλου, σε αναγωγικές συνθήκες ο χαλκός είναι δυνατόν να αναχθεί από Cu(II) σε Cu(I) οπότε γίνεται πιο τοξικός, πιθανόν επειδή ο Cu(I) μπορεί να αντιδρά ταχύτερα και να διαχέεται μέσω της κυτοπλασματικής μεμβράνης. Η τοξικότητα του Cu(I) προκύπτει επίσης από τη δυνατότητα του Cu(I) να σχηματίζει ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου (·OH) σύμφωνα με αντιδράσεις τύπου Haber-Weiss [Theophanides & Anastassopoulou 2002]:

$$Cu^{+} + H_2O_2 \rightarrow Cu^{2+} + OH^{-} + ^{\bullet}OH$$
^[7]

$$O_2^- + H_2O_2 \xrightarrow{Cu} OH^- + OH + O_2$$
 [8]

Οι σχηματιζόμενες ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια και άλλα σημαντικής σημασίας βιολογικά μόρια με αντιδράσεις προσθήκης ή απόσπασης ατόμων υδρογόνου προκαλώντας μια σειρά από σχάσεις και υπεροξειδώσεις με αποτέλεσμα την εμφάνιση σειράς ασθενειών όπως ασθένειες του νευρικού συστήματος, τον καρκίνο και τη γήρανση [Britton & Bacon, 1994. Kennedy et al., 1984, Vistnes et al., 1983]. Μια από τις πιο σημαντικές δράσεις των ελεύθερων ριζών είναι η καταστροφή των αλυσίδων των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών του κυττάρου, ιδιαίτερα αυτών που βρίσκονται στις μιτοχονδριακές μεμβράνες, οι οποίες βρίσκονται εκτεθειμένες σε ανιόντα υδροϋπεροξυλίου που παράγονται κατά την αναπνοή του κυττάρου [Yoshida et al., 1993].

2.7. Μηχανισμοί καταστροφής του DNA από το οξειδωτικό στρες στην αθηροσκλήρωση

Οι οξειδωτικές αντιδράσεις αποτελούν το κέντρο έρευνας της διαδικασίας της αθηροσκλήρωσης. Η οξείδωση των μορίων LDL παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης. Το οξειδωτικό στρες προκαλεί καταστροφή του DNA των στεφανιαίων αρτηριών που οφείλονται σε περιβαλλοντικούς και μεταβολικούς παράγοντες.

Στους πιθανούς παράγοντες κινδύνου, που παίζουν ρόλο στην οξειδωτική καταστροφή βιολογικών μορίων και οδηγούν στην αθηρωσκλήρωση είναι μεταξύ άλλων ο σακχαρώδης διαβήτης, η παχυσαρκία, το κάπνισμα κ.ά..

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3°

Μολυβδαινοένζυμα

3.1. Εισαγωγή

Τα μολυβδαινοένζυμα είναι γνωστά από το 1954 και απαντώνται σε όλα τα ευκαριωτικά κύτταρα. Τα μολυβδαινοένζυμα απαντώνται σε διάφορα όργανα του ανθρωπίνου σώματος. Στον Πίνακα 3.1. δίνονται τα όργανα και οι συγκεντρώσεις του μολυβδαινίου που αντιστοιχούν ανά βάρος του οργάνου:

Πίνακας 3.1: Όργανα που περιέχουν Μο και η περιεκτικότητά του ανά μονάδα βάρους

Όργανο	Βάρος οργάνου g	Περιεκτικότητα μg	Συγκέντρωση μg/g wet wt.
Μύες	28 000	< 1300	
Λίπος	12 500	69	0.0055 ± 0.0008
Οστά	10000	< 4800	
Αίμα	5500	226	0.041
Δέρμα	4900	< 140	
Συνδετικοί ιστοί	2000	< 27	
Συκώτι	1800	1980	1.1 ± 0.057
Εγκέφαλος	1400	< 90	
Πνεύμονες	1000	< 31	0.016 ± 0.0031
Καρδιά	350	< 15	0.017 ± 0.0033
Νεφρά	310	11	0.375 ± 0.014

Αμέσως μετά την ανακάλυψή τους διαπιστώθηκε ότι η σειρά των μολυβδαινοενζύμων συμπεριλαμβάνει την ξανθίνη-οξειδάση (ΧΟ), αλδεΰδηοξειδάση, νιτρορεντουκτάση (nitrate reductase) και θειο-οξειδάσες. Το παρακάτω Σχήμα 3.1 δίνει τις δομές των μολυβδαινοενζύμων της σουλφιδικής οξειδάσης και της ξανθίνης οξειδάσης, μαζί με την πτερίνη, τον κύριο υποκαταστάτη του μολυβδαινίου.





Στα ένζυμα τις ξανθίνης οξειδάσης το Mo (Σχήμα 3.2) το άτομο του οξυγόνου που είναι σε κάθετη διάταξη ως προς το Mo φέρει αστερίσκο.



Σχήμα 3.2: Προσανατολισμός του Μο στην ξανθίνη οξειδάση και θειο-οξειδάση ως προς την πυρανοπτερίνη [Hille et al., 2011]



Σχήμα 3.3: Δομή βόειας ξανθίνης οξειδορεδουκτάση (oxidoreductase). Τα τμήματα που φέρουν Fe-S τονίζονται με μπλε και πράσινο. Το FAD είναι κίτρινο. Οι θέσεις του Μο στις πρωτεΐνες είναι γκρι. Α: μερική απεικόνιση του διμερούς ενζύμου στην επιφάνεια. Β: απεικόνιση του ενζύμου στην επιφάνεια. C: μερική απεικόνιση του διμερούς με τα τέσσερα δραστικά κέντρα δυναμικού σε σχεδόν ευθύγραμμη διάταξη. [Hille et al., 2011]

Τα μολυβδαινοένζυμα θεωρούνται πηγές ελευθέρων ριζών παραγώγων του οξυγόνου, οι οποίες προκύπτουν από μια σειρά βιοχημικές αντιδράσεις με ιδιαίτερες χημικές ιδιότητες και που συμπεριλαμβάνουν τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου (HO⁻), τα υπερόξυ ιόντα οξυγόνου (O₂⁻⁻), υπερόξυλ ελεύθερες ρίζες (HO₂-) αλκόξυ (alkOO⁻), οξυγόνο πολλαπλότητας spin 1 (singlet) (¹O₂). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου αν και δεν είναι ελεύθερη ρίζα, όμως επειδή οδηγεί στον σχηματισμό ελευθέρων ριζών, συμπεριλαμβάνεται στα δραστικά σωμάτια οξυγόνου. Ο ρόλος του ενζύμου εντοπίζεται στον καταβολισμό της πουρίνης και στην ενζυματική οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ.

Οι νιτρογενάσες είναι μεταλλοένζυμα που περιέχουν σίδηρο και μολυβδαίνιο, τα οποία αποτελούν το δραστικό κέντρο της καταλυτικής δράσης. Η αναγωγή του αζώτου (azide) γίνεται με μεταφορά δύο ηλεκτρονίων μέσω ενδιάμεσων προϊόντων των δραστικών κέντρων του Μο και Fe, προς αμμωνία.

$$N_3^- + 2e^- + 3H^+ \rightarrow N_2 + NH_3$$
^[9]

Όπως απέδειξαν οι Al Ghouleh και συνεργάτες [Ghouleh et al., 2011] τα νιτρο-λιπαρά οξέα (nitro faty acids) μπορούν να δράσουν ως αντιφλεγμονώδεις παράγοντες, και με τα ηλεκτρόφιλα¹ λιπαρά οξέα να διεγείρουν προστατευτικούς μηχανισμούς παρεμπόδισης ή επιδιόρθωσης της υπεροξείδωσης των λιπαρών οξέων και γι αυτό θεωρούνται εν δυνάμει αντιφλεγμονώδη.



Σχήμα 3.4: Λιπαρά οξέα: Η υπεροξείδωση οδηγεί σε ηλεκτρόφιλα λιπαρά οξέα, τα οποία ανάλογα με την θέση σύνδεσης οδηγούν σε παρεμπόδιση έκφρασης φλεγμονωδών καταστάσεων ή διεγείρουν ένζυμα που δραστηριοποιούν γονιδιακές εκφράσεις [Ghouleh et al., 2011].

¹ Ηλεκτρόφιλα λιπαρά οξέα χαρακτηρίζονται τα λιπαρά οξέα που συμμετέχουν στην δέσμευση ηλεκτρονίων και δρουν ως διαβιβαστές σημάτων που διεγείρουν προ-αντιφλεγμονώδη ένζυμα

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4[°]

Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

4.1. Ιστορική αναδρομή

Η υπέρυθρη ακτινοβολία (Infrared–IR) έχει μια μακρά ιστορία στον χώρο της επιστήμης. Ανακαλύφθηκε από τον Ισαάκ Νεύτωνα με την ανάλυση του ηλιακού φωτός με απλό πρίσμα [Newton, 1675]. Αργότερα, ο Sir William Herschel (επαγγελματίας μουσικός) ασχολούμενος με τις ιδιότητες των χρωμάτων του «Νεύτωνα», στα 1800, διαπίστωσε ότι η κάτω του ερυθρού μη ορατή ακτινοβολία αυξάνει την θερμοκρασία του καθαρού νερού, όπως βεβαίωσε με την χρήση θερμομέτρου [Herschel, 1800]. Την περιοχή αυτή την ονόμασε «θερμικές ακτίνες» (calorific rays) και μπορούσαν να ανακλαστούν, να διαθλαστούν, να απορροφηθούν και να μεταδοθούν διαμέσου των υλικών, όπως ακριβώς και το ορατό φως. Οι «θερμικές ακτίνες» αργότερα μετονομάσθηκαν σε υπέρυθρες ακτινοβολίες, επειδή βρίσκονται κάτω της ερυθρής ακτινοβολίας.

Τα πειράματα με το υπέρυθρο φως συνεχίσθηκαν και οδήγησαν στην κατασκευή του πρώτου φασματοφωτόμετρου υπερύθρου το 1835. Οι W.deW. Abney και Ε.Ρ. Festing πρότειναν το 1881 συγκεκριμένες περιοχές του φάσματος που επηρέαζαν χαρακτηριστικούς χημικούς δεσμούς και αναγνωρίστηκε η δυνατότητα εφαρμογής του φασματοφωτομέτρου στην Οργανική Χημεία. Το 1892 ο W.H. Julius παρατήρησε ότι οι μεθυλ και μεθυλενομάδες των οργανικών ενώσεων απορροφούν περίπου στα 3,45 μm (2900 cm⁻¹). Από τότε η υπέρυθρη φασματοσκοπία, μέσω των πρωτοποριακών εργασιών των Coblentz και Angstrom μεταξύ 1850 και 1900, διαδόθηκε και καθιερώθηκε ως σημαντικό εργαλείο κυρίως για την ταυτοποίηση χημικών ενώσεων και στην αστρονομία. Οι εφαρμογές της νέας τεχνικής στο χώρο της βιολογίας αρχικά ήταν περιορισμένες. Αρκετά αργότερα, το 1950, οι Elliot και Ambrose έδειξαν ότι η διαμόρφωση των πρωτεϊνών είναι δυνατόν να μελετηθεί με

υπέρυθρη φασματοσκοπία [Elliott & Ambrose, 1950]. Περίπου την ίδια εποχή οι Blout, Mellors και Woernley, ξεκινούσαν να αναλύσουν ανθρώπινους και ζωικούς ιστούς για να διερευνήσουν αν θα μπορούσαν να ταυτοποιήσουν χαρακτηριστικές ταινίες που θα αποτελούσαν τα «δακτυλικά αποτυπώματα» κάθε είδους ιστού [Blout & Mellor, 1949, Woernley, 1952]. Η εφαρμογή όμως της υπέρυθρης φασματοσκοπίας σε βιολογικά δείγματα δεν ήταν ευρεία λόγω τεχνικών προβλημάτων.

Στο ίδιο χρονικό διάστημα, κατασκευάστηκε ένα νέο μηχάνημα, το οποίο στη συνέχεια θα έφερνε επανάσταση στις βιολογικές εφαρμογές της υπέρυθρης φασματοσκοπίας. Η ομάδα του Thompson (1949) έδειξε ότι ήταν δυνατό να γίνει σύζευξη ενός μικροσκοπίου ανάκλασης (reflecting microscope) με το φασματοσκόπιο υπερύθρου και να ληφθούν φάσματα μικρών σωματιδίων (κρυστάλλων και ινιδίων). Το πλεονέκτημα της νέας τεχνικής σε βιολογικές εφαρμογές ήταν προφανές: καθιστούσε δυνατή τη μελέτη των ιστών με πολύ υψηλή τοπολογική ανάλυση.

Όμως η πραγματική επανάσταση στην υπέρυθρη φασματοσκοπία ήταν η υπερύθρου ανακάλυψη του υψηλής απόδοσης φασματοφωτόμετρου με μετασχηματισμό Fourier, στην καρδιά του οποίου βρίσκεται το συμβολόμετρο Michelson. Το 1887 ο Πολωνικής καταγωγής φυσικός Albert A. Michelson στην προσπάθεια να υπολογίσει την ταχύτητα του φωτός με μεγάλη ακρίβεια *χρησιμοποίησε* ένα σύστημα κάτοπτρων διαφανών και ημι-διαφανών (semitransparent mirrors or beam splitters/ $\delta i \alpha \chi \omega \rho i \sigma \tau \epsilon \zeta \delta \epsilon \sigma \mu \eta \zeta$) yia va πετύχει τη σύγκλιση των αποκλινουσών ακτινών φωτός που προέρχονταν από την ίδια πηγή. Τα οπτικά στοιχεία ήταν διατεταγμένα κατά τρόπο ώστε οι κατευθύνσεις και οι αποστάσεις των ακτινών φωτός να βρίσκονται πολύ κοντά ευθυγραμμισμένες η καθεμιά με τις γειτονικές της, με αποτέλεσμα οι δέσμες να αλληλεπιδρούν η μια με την άλλη. Ο Michelson εργάσθηκε μαζί με τον Edward W. Morley στη διερεύνηση της ύπαρξης του "αιθέρα", ενός υποθετικού μέσου/υλικού διαμέσου του οποίου πιστευόταν την εποχή εκείνη ότι διαδίδεται το φως. Παρόλο που τα αποτελέσματα των πειραμάτων ήταν αρνητικά, ο Michelson κατάφερε να μετρήσει την ταχύτητα του φωτός με εξαιρετική ακρίβεια. Του απονεμήθηκε το βραβείο Nobel το 1907 για την δουλειά του πάνω στις μετρήσεις της ταχύτητας του φωτός με συμβολόμετρο (interferometer).

Η συμβολομετρία όμως δεν επρόκειτο να επιφέρει κάποια αλλαγή στην υπέρυθρη φασματοσκοπία παρά μόνο μετά την εφεύρεση του laser και των

υπολογιστών υψηλής τεχνολογίας. Η ακτίνα laser HeNe σε συντονισμό με την προσπίπτουσα στο συμβολόμετρο Michelson υπέρυθρη ακτινοβολία, παρέχει την δυνατότητα ακριβούς καταγραφής της μετατόπισης του κινούμενου κάτοπτρου, ενώ παράλληλα καθορίζει τον αριθμό των επαναλαμβανόμενων φασμάτων. Η ανάπτυξη των ηλεκτρονικών υπολογιστών επέτρεψε την ταχύτατη μετατροπή του σύνθετου και πολύπλοκου συμβολογραφήματος σε φάσμα [Θεοφανίδης & Αναστασοπούλου, 1997].

4.2. Γενικές αρχές FT-IR φασματοσκοπίας

4.2.1 Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα ονομάζεται η ευρεία ενέργεια των ακτινοβολιών οι οποίες εκτείνονται από τις κοσμικές ακτίνες με μήκη κύματος από 10^{-9} nm μέχρι τα ραδιοκύματα με μήκη κύματος μεγαλύτερα των 1000 km. Ανάμεσα σε αυτά τα όρια συναντώνται οι ακτίνες γ, οι ακτίνες X, το άπω, μέσω και εγγύς υπεριώδες, το ορατό, το υπέρυθρο φως και τα μικροκύματα [Θεοφανίδης & Αναστασοπούλου, 1997]. Η φύση αυτών των ακτινοβολιών είναι ίδια και όλες κινούνται με την ταχύτητα του φωτός. Η διαφορά συνίσταται στα μήκη κύματος ή την ενέργεια των παραγόμενων ακτινοβολιών και στα αποτελέσματα που προκαλούν στην ύλη, στην οποία προσπίπτουν. Οι συχνότητες των ηλεκτρομαγνητικών ακτινοβολιών περιλαμβάνουν από τα ραδιοφωνικά κύματα με συχνότητα ν= 10^5 Hz μέχρι τις ακτίνες γ των ιοντιζουσών ακτινοβολιών, που η συχνότητά τους φτάνει τα 10^{20} Hz.

Στην υπέρυθρη περιοχή του φάσματος διεγείρονται οι ενεργειακές στάθμες που αντιστοιχούν στις δονήσεις των ατόμων και μορίων, ενώ στην ορατή και υπεριώδη περιοχή διεγείρονται οι ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις. Τέλος στην περιοχή των ακτίνων Χ και γ προκαλούνται ιοντισμοί και σχάσεις των μορίων [Αναστασοπούλου, 2003].

4.2.2 Υπέρυθρη περιοχή

Η υπέρυθρη περιοχή του φάσματος εκτείνεται από το τέλος της ορατής περιοχής έως την περιοχή των μικροκυμάτων, δηλαδή μεταξύ 0,8 έως 300 μm, διακρίνεται σε τρεις περιοχές :

- i. το εγγύς IR (800 nm έως 2,5 μm)
- ii. το μέσο IR (2,5 μm έως 50 μm)
- iii. το άπω IR (50μm έως 300 μm).

Για τα φασματοφωτόμετρα υπερύθρου χρησιμοποιείται συνήθως η περιοχή του φάσματος με μήκος κύματος από 2 μέχρι 50 μm, δηλαδή εκείνη η περιοχή που αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς 4000 μέχρι 200 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 των μορίων και δονήσεις βαρέων ατόμων και των δεσμών μετάλλου – υποκαταστάτη (M-L).

4.2.3 Αρχές της υπέρυθρης φασματοσκοπίας

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία βασίζεται στην διέγερση των μορίων σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή περιστροφής. Ενεργές στο υπέρυθρο (IR–active) είναι μόνο εκείνες οι χημικές ενώσεις στις οποίες οι δονήσεις και οι περιστροφές των ατόμων επιφέρουν διαρκή μεταβολή της διπολικής ροπής, όπως συμβαίνει στα μόρια που αποτελούνται από δυο ετεροάτομα, π.χ. στα μόρια CO, HCl, NO (Σχήμα 4.1), ενώ αντίθετα οι ομοδιατομικές ενώσεις (O₂, H₂) είναι ανενεργές (IR-inactive).

Η περιοδική μεταβολή της διπολικής ροπής, λόγω περιστροφής ή δόνησης, επιτυγχάνεται μόνο σε ορισμένες συχνότητες και συμβαίνει όταν η προσπίπτουσα ακτινοβολία έχει την ίδια συχνότητα με τη συχνότητα του διπόλου.



Σχήμα 4.1: Αλλαγή της διπολικής ροπής ενός διατομικού μορίου λόγω περιστροφής (μ_{rot}) και δόνησης (μ_{vibr}) [Θεοφανίδης & Αναστασοπούλου, 1997].

Γενικά το φάσμα απορρόφησης υπέρυθρου αποτελεί θεμελιώδη ιδιότητα κάθε μορίου και χρησιμεύει ως δακτυλικό αποτύπωμα (fingerprint) της ένωσης και της διαμόρφωσης των χαρακτηριστικών ομάδων της. Από την άλλη πλευρά επειδή το ποσό της απορροφούμενης ενέργειας είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του προς μέτρηση υλικού είναι δυνατόν μετά από βαθμονόμηση να υπολογισθεί η συγκέντρωση ενός δείγματος. Αυτό γίνεται συγκρίνοντας την ένταση και πλάτος μιας χαρακτηριστικής ταινίας με αυτό ενός φάσματος που περιέχει γνωστή συγκέντρωση του εν λόγω συστατικού, με την προϋπόθεση ότι ισχύει ο νόμος των Lambert-Beer, που περιγράφεται κάτωθι.

Στη φασματοσκοπία ένα υλικό ακτινοβολείται με φως και μετράται η ποσότητα που απορροφήθηκε συναρτήσει της ενέργειας του φωτός. Η διαπερατότητα Τ εκφράζει την απορροφημένη ποσότητα φωτός και ισούται με το λόγο της έντασης της εξερχόμενης από το υλικό ακτινοβολίας (Ι) προς την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (Ι_o):

$$T = \frac{I}{I_o}$$
(2)

Κυρίως χρησιμοποιείται η επί τοις εκατό διαπερατότητα (%T). Αρκετά συχνά χρησιμοποιείται η απορρόφηση ή απορροφητικότητα, Α, η οποία ορίζεται ως ο δεκαδικός λογάριθμος του λόγου I₀/I :

$$A = \log_{10} \left(\frac{I}{I_o} \right) = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right)$$
(3)

Η απορροφητικότητα ονομάζεται και οπτική πυκνότητα. Ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιείται η απορροφητικότητα είναι επειδή το μέγεθος αυτό είναι ανάλογο προς τη συγκέντρωση του προς μελέτη δείγματος και μπορεί να εφαρμοσθεί ο νόμος των Lambert-Beer:

$$\mathbf{A} = \boldsymbol{\varepsilon} \cdot \mathbf{l} \cdot \mathbf{c} \tag{4}$$

όπου : $\varepsilon = συντελεστής γραμμομοριακής απορροφητικότητας (M⁻¹cm⁻¹)$

- 1 = μήκος διαδρομής (cm) της φωτεινής ακτίνας, που συμπίπτει με το μήκος
 της κυψελίδας που περιέχει το δείγμα.
- c = συγκέντρωση του δείγματος.

4.2.4 Φάσματα δόνησης πολυατομικών μορίων

Ο αριθμός των ταινιών που δίνει ένα μόριο υπολογίζεται με βάση τους βαθμούς ελευθερίας των ατόμων. Σε ένα μόριο Ν ατόμων οι βαθμοί ελευθερίας είναι 3Ν εκ των οποίων οι 6 είναι εξωτερικές, μεταφοράς και περιστροφής, και δεν λαμβάνονται υπόψη, άρα αφαιρούνται από τους 3Ν. Αυτό επιτρέπει 3Ν-6 βαθμούς ελευθερίας, τις εσωτερικές δονήσεις. Για τα γραμμικά μόρια ο αριθμός των ταινιών υπολογίζεται με τη σχέση 3Ν-5, διότι υπάρχουν μόνο 2 περιστροφές στα γραμμικά μόρια. Στην πράξη ο αριθμός μειώνεται σημαντικά και λαμβάνονται υπόψη μόνον οι χαρακτηριστικές δονήσεις των ομάδων των μορίων. Η περιγραφή των τρόπων δόνησης των πολυατομικών μορίων μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Συνήθως χρησιμοποιείται εκείνη η περιγραφή κατά την οποία η απορρόφηση της ενέργειας επιτρέπει την διέγερση στην πρώτη ανώτερη ενεργειακή κατάσταση δόνησης. Οι δονήσεις αυτές του μορίου ονομάζονται κανονικές δονήσεις (normal vibrations ή normal modes). Οι τρόποι δόνησης ενός μορίου χαρακτηρίζονται ως εξής [Θεοφανίδης & Αναστασοπούλου, 1997]:

1. Δονήσεις τάσης (stretching vibrations)

Εμφανίζονται όταν δύο άτομα πάλλονται μεταξύ τους, έτσι ώστε να μεταβάλλεται η μεταξύ τους απόσταση (-C-H-). Η απαιτούμενη ενέργεια είναι μεγαλύτερη εκείνης των δονήσεων κάμψης και εξαρτάται από την ένταση του δεσμού.



2. Δονήσεις κάμψης ή ψαλίδισης (bending ή scissoring vibrations)

Χαρακτηρίζονται από συνεχείς μεταβολές της γωνίας που σχηματίζουν δύο δεσμοί.

3. Δονήσεις αιώρησης (rocking vibrations)

Εμφανίζονται όταν η ομάδα των ατόμων –CH₂ δονείται εντός του επιπέδου H-C-H (in-plane).

- 4. Δονήσεις συστροφής (twisting vibrations) Λαμβάνουν χώρα όταν μία ομάδα τριών ατόμων συστρέφεται γύρω από το δεσμό σύνδεσης με το υπόλοιπο μόριο. Κατά τον συμβολισμό, το + σημαίνει κίνηση πάνω από το επίπεδο της σελίδας ενώ το – σημαίνει κίνηση έξω από αυτό (out-ofplane).
- **5.** Δονήσεις σείσης (wagging vibrations)

Παρατηρούνται όταν τα άτομα που είναι συνδεδεμένα μέσω τρίτου ατόμου παλινδρομούν εκτός επιπέδου σε φάση.



Από τα παραπάνω φαίνεται ότι όσο αυξάνει ο αριθμός των ατόμων ενός μορίου αυξάνει και ο αριθμός των δονήσεων, με αποτέλεσμα η φυσική ερμηνεία κάθε ταινίας του φάσματος να καθίσταται πολύπλοκη. Στην πράξη δεν απαιτείται η ερμηνεία όλων των δονήσεων. Διαπιστώθηκε ότι η δόνηση των δεσμών ενός ζεύγους ατόμων απορροφά σε παραπλήσια πάντα περιοχή και ότι η συχνότητα απορρόφησης πολλές φορές είναι ανεξάρτητη από το υπόλοιπο μόριο [Αναστασοπούλου & Θεοφανίδης, 2010].

Το φάσμα απορρόφησης υπερύθρου αποτελεί θεμελιώδη ιδιότητα κάθε μορίου και χρησιμεύει κυρίως στην ποιοτική ανάλυση και για την απόδοση της μοριακής δομής μιας ένωσης, δηλαδή για τη φύση των ατόμων που βρίσκονται στο μόριο και τη διάταξή τους στο χώρο, δίνοντας ουσιαστικά το δακτυλικό αποτύπωμα της δεδομένης ένωσης. Επειδή το IR φάσμα λειτουργεί σαν το "δακτυλικό αποτύπωμα" της δεδομένης ένωσης, γι αυτό και η περιοχή του φάσματος μεταξύ 1500 cm⁻¹ και 400 cm⁻¹ ονομάζεται περιοχή "δακτυλικό αποτυπώματος". Επιπλέον, κατά την ερμηνεία ενός φάσματος λαμβάνονται πάντα υπόψη συγκεκριμένες ταινίες, στις οποίες αναμένεται να απορροφούν οι χαρακτηριστικές ομάδες που απαρτίζουν το μόριο της ένωσης και οι οποίες δεν διαφέρουν σε θέση σημαντικά από ένωση σε ένωση. Έτσι, το υπέρυθρο φάσμα υποδιαιρείται, για λόγους ευκολίας, σε επιμέρους περιοχές ανάλογα με τις χαρακτηριστικές ομάδες του μορίου. Στο Σχήμα 4.2 δίνονται οι συχνότητες στις οποίες εμφανίζονται στο IR φάσμα οι χαρακτηριστικές ομάδες οργανικών ενώσεων ή βιολογικών μορίων.



Σχήμα 4.2: Διαχωρισμός του IR φάσματος σε επί μέρους περιοχές, όπου εμφανίζονται οι ταινίες των χαρακτηριστικών ομάδων οργανικών ενώσεων

Επειδή το ποσό της απορροφούμενης ενέργειας είναι συνάρτηση του αριθμού των υπαρχόντων μορίων (συγκέντρωση), είναι προφανές ότι το IR φάσμα παρέχει πληροφορίες για την συγκέντρωση ενός συστατικού στο δείγμα, συγκρίνοντας την ένταση μιας χαρακτηριστικής ταινίας απορρόφησης προς την ένταση της ίδιας ταινίας ενός φάσματος που περιέχει γνωστή συγκέντρωση του προς ανάλυση συστατικού. Επίσης η σχετική μεταβολή των εντάσεων των χαρακτηριστικών ταινιών δίνει πληροφορίες και για το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται το εξεταζόμενο μόριο.
4.3. Φασματοφωτόμετρα υπερύθρου

Τα φασματοφωτόμετρα υπέρυθρης ακτινοβολίας χωρίζονται σε δύο κατηγορίες :

- i. Στα φασματοφωτόμετρα διασποράς (dispersive spectrometers)
- Στα φασματοφωτόμετρα με μετασχηματισμό Fourier (FT–IR, Fourier Transform Infrared Spectrometers)

4.3.1. Φασματοφωτόμετρα υπέρυθρου διασποράς

Τα φασματοφωτόμετρα του τύπου αυτού τείνουν να εξαφανισθούν από το εμπόριο. Τα φασματοφωτόμετρα διασποράς ή κλασσικά αποτελούνται από την πηγή της υπέρυθρης ακτινοβολίας, τον χώρο του δείγματος και τον μονοχρωμάτορα που αναλύει την ακτινοβολία στα μήκη κύματος από τα οποία αποτελείται και τον ανιχνευτή ακτινοβολίας.

Στο Σχήμα 4.3 δίνεται σχηματικά η αρχή λειτουργίας του φασματοφωτομέτρου διασποράς. Η παραγόμενη από την πηγή ακτινοβολία με σύστημα επιπέδων κατόπτρων, που βρίσκονται σε μικρή απόσταση μεταξύ τους, διαχωρίζεται σε δύο δέσμες εκ των οποίων η μία διέργεται μέσω του συστήματος αναφοράς (τυφλό), η δε άλλη διέρχεται από το δείγμα. Ένα σύστημα παλλομένων κατόπτρων ή διακόπτου (chopper) επιτρέπει την περιοδική διέλευση της δέσμης μέσω του δείγματος και της αναφοράς για να προσπέσει τελικά στο μονοχρωμάτορα. Τέλος η δέσμη διέρχεται από έναν πολλαπλασιαστή και καταλήγει στο καταγραφικό ως κύμανση.



Σχήμα 4.3: Σχηματική παράσταση φασματοφωτομέτρου διασποράς

4.3.2. Φασματοφωτόμετρα υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier. Συμβολόμετρο Michelson

Η διάταξη ενός φασματοφωτομέτρου Fourier δίνεται στο Σχήμα 4.4, όπου διακρίνονται η πηγή της υπέρυθρης ακτινοβολίας, το συμβολόμετρο, ο χώρος του δείγματος και ο ανιχνευτής υπερύθρου.

Η πηγή laser χρησιμοποιείται για τη δημιουργία εσωτερικής αναφοράς, της μέτρησης των κυματαριθμών και τη ρύθμιση της διάρκειας των παλμών.



Σχήμα 4.4: FT – IR φασματοφωτόμετρο Michelson

Η χρήση ενός συμβολόμετρου αντί ενός μονοχρωμάτορα δίνει σημαντικά πλεονεκτήματα στην καταγραφή του IR φάσματος. Το βασικό τμήμα ενός φασματοφωτόμετρου Fourier αποτελεί το συμβολόμετρο Michelson (Σχήμα 4.5). Όπως φαίνεται, το συμβολόμετρο αποτελείται από δύο κάτοπτρα M1 και M2, από τα οποία το ένα παραμένει σταθερό (Fixed Mirror), ενώ το άλλο είτε κινείται με σταθερή ταχύτητα, είτε σταματά περιοδικά και για μικρά χρονικά διαστήματα (Moving Mirror). Τα επίπεδα των δύο κάτοπτρων είναι κάθετα μεταξύ τους. Ανάμεσα στο σταθερό και στο κινούμενο κάτοπτρο υπάρχει ένας διαχωριστής δέσμης 50/50 (beam splitter). Ο διαχωριστής δέσμης είναι ένα ημιδιαφανές κάτοπτρο, το οποίο αποτελείται από υλικό που δεν απορροφά στην υπέρυθρη περιοχή, με ανακλαστικότητα και διαπερατότητα 50% αντίστοιχα. Η μια δέσμη προσπίπτει στο σταθερό κάτοπτρο, ενώ η άλλη στο κινητό και στην συνέχεια αφού αντανακλαστούν επιστρέφουν στον διαχωριστή δέσμης όπου συμβάλλουν. Μετά την συμβολή ένα τμήμα της ακτινοβολίας οδηγείται στο χώρο του δείγματος, ενώ το υπόλοιπο τμήμα επιστρέφει στην πηγή ακτινοβολίας. Το αποτέλεσμα είναι ότι περίπου το μισό κάθε δέσμης καταλήγει στον ανιχνευτή, παρ' όλο που διέσχισαν διαφορετικές διαδρομές (Σχήμα 4.5) [Currell, 2007, Griffiths, 1972]. Η διαφορά (δ) της διαδρομής των δύο φωτεινών δεσμών είναι 2(OM2-OM2').



Σχήμα 4.5: Σχηματική παράσταση συμβολόμετρου Michelson. $\Pi = \pi\eta\gamma\eta$, M1 = κάτοπτρο μίξης, M1' = είδωλο του M1 όπως φαίνεται από τη θέση A, M2 = κινητό κάτοπτρο, B = διαιρέτης δέσμης (chopper) και A = αναλυτής [Θεοφανίδης & Αναστασοπούλου, 1997].

Όταν το κινούμενο κάτοπτρο κινείται βηματικά και η διαφορά διαδρομής δ είναι μηδέν ή ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της φωτεινής ακτίνας (δ = nλ, όπου n = 0,1,2,3,...), τότε παρατηρείται ενίσχυση της ακτινοβολίας. Αν όμως η διαφορά διαδρομής είναι δ = (n=1/2λ), όπου n = 0,1,2,3,..., 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 Ι'(δ) δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$I'(\delta) = 0.51(v) (1 + \cos 2\pi v \delta)$$
 (5)

από όπου φαίνεται ότι η ένταση Ι'(δ) αποτελεί το γινόμενο ενός σταθερού παράγοντα 0,51(v) και ενός μεταβλητού (1 + cos2πνδ), ο οποίος ονομάζεται συμβολογράφημα (interferogram).

Σήμερα, η χρήση του αδάμαντα για την κατασκευή των φακών μειώνει σημαντικά την διάμετρο της φωτεινής δέσμης που προσπίπτει στο δείγμα και επομένως να λαμβάνουμε φάσματα σε μικρότερες διαστάσεις δείγματος. Η τεχνολογία των φασματοφωτομέτρων υπερύθρου με δέσμη προερχόμενη από επιταχυντές σύγχροτρον συνδυασμένες με μικροσκόπιο (micro synchrotron FT-IR) επιτρέπουν την ανάλυση των δειγμάτων τοπολογικά. Η ένταση και η λαμπρότητα της προσπίπτουσας δέσμης ακτινοβολίας αυξάνει σημαντικά τον λόγο σήμα προς θόρυβο, με αποτέλεσμα την λεπτομερή ανάλυση για πολύ μικρές ποσότητες δείγματος.

4.4. Εφαρμογές της φασματοσκοπίας δονήσεων στην ιατρική και τη μελέτη παθολογικών ιστών

Τα τελευταία χρόνια γίνεται σημαντική προσπάθεια να χρησιμοποιηθεί η υπέρυθρη φασματοσκοπία για διαγνωστικούς σκοπούς. Η ανάλυση κυττάρων τόσο των ιστών, όσων και των βιολογικών υγρών με υπέρυθρη φασματοσκοπία έδωσε αισιόδοξα μηνύματα επειδή οι μεταβολές του φάσματος ενός συγκεκριμένου ιστού δεν δίδουν απλά και μόνον την εμφάνιση μεταβολών λόγω της επικείμενης νόσου σε μοριακό επίπεδο, αλλά μπορούν να δώσουν πληροφορίες ακόμη και για την πρόβλεψη του μηχανισμού γένεσης της νόσου [Anastassopoulou et al., 2009; 2008, Anastassopoulou & Theophanides, 2009, Conti et al., 2008, Kolovou & Anastassopoulou, 2007, Petra et al., 2005, Theophanides, 1978].

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 δηλαδή με ολική ανάκλαση που ελέγχεται από την διάχυση, η οποία επιτρέπει την εξάτμιση του νερού, χωρίς να καταστραφεί η διαμόρφωση των πρωτεϊνών στον χώρο, όπως αυτή υφίσταται στο βιολογικό περιβάλλον [Αναστασοπούλου, 1986].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5°

Ηλεκτρονιακό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM)

5.1. Ιστορική αναδρομή

Το πρώτο όργανο το οποίο λειτούργησε σύμφωνα με τη βασική αρχή λειτουργίας του ηλεκτρονιακού μικροσκοπίου σάρωσης κατασκευάστηκε από τον Knoll (1935), ο οποίος εργαζόταν στη Γερμανία μαζί με ειδικούς στον τομέα της ηλεκτρονικής οπτικής. Όμως το πρώτο πραγματικά SEM κατασκευάστηκε από τον von Ardenne (1938) με μικροδιαφοροποιήσεις, το οποίο όμως δεν χρησιμοποιήθηκε, επειδή σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους ηλεκτρονικού μικροσκοπίου υστερούσε σε αρκετά σημεία. Μερικά μειονεκτήματα αναφέρονται στον χρόνο καταγραφής, τη ρύθμιση του οργάνου, την τελική ανάλυση της εικόνας.

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 o C. W. Oatley, από το Πανεπιστήμιο του Cambridge, ενδιαφέρθηκε για την διεξαγωγή ερευνών στον τομέα της ηλεκτρονιακής οπτικής και αποφάσισε να ανακατασκευάσει το SEM. O 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 ηλεκτρονιακό πολλαπλασιαστή με έναν νέο συνδυασμό σπινθηριστή/ φωτοπολλαπλασιαστή επιτυγχάνοντας την αύξηση του σήματος με αποτέλεσμα την μείωση του θορύβου.



Σχήμα 5.1: Παραγωγή δευτερογενών ηλεκτρονίων κατά την πρόσπτωση πρωτογενών στην ύλη [Αναστασοπούλου, 2003]

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 (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).

5.2. 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 5.2) επιταχύνονται με εφαρμογή διαφοράς δυναμικού και σχηματίζουν δέσμη ηλεκτρονίων, η οποία εστιάζεται από σύστημα ισχυρών ηλεκτρομαγνητικών φακών πάνω στο δείγμα. Η αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων οδηγεί στην απομάκρυνση των ηλεκτρονίων των ατόμων του δείγματος, τα οποία συγκεντρώνονται στον ανιχνευτή, παρέχοντας την χημική σύσταση και τοπογραφία του δείγματος.



Σχήμα 5.2: Αρχή λειτουργίας SEM

Τα άτομα, λόγω της απομάκρυνσης των ηλεκτρονίων, βρίσκονται σε διεγερμένη ενεργειακά κατάσταση και ηλεκτρόνια υψηλότερης ενεργειακής στάθμης καταλαμβάνουν την κενή στοιβάδα. Η μετάπτωση αυτή συνοδεύεται με εκπομπή ακτινών X (φωτονίων) ενέργειας ίσης με ενεργειακή διαφορά των δύο σταθμών. Στο Σχήμα 5.3 δίνεται παραστατικά η παραγωγή ακτινών X από τις στιβάδες K και L. Η μονοχρωματική ενέργεια των εκπεμπόμενων ακτινών X καθορίζει το στοιχείο από όπου εκπέμπεται, επιτρέποντας έτσι την χημική ταυτοποίηση αυτού (EDAX). Τα ηλεκτρόνια που απομακρύνονται από τα άτομα του δείγματος λόγω της σύγκρουσης με τα ηλεκτρόνια της προσπίπτουσας δέσμης παρέχουν επιπλέον πληροφορίες σχετικά με την τοπολογική κατάσταση του δείγματος.

Τα ηλεκτρόνια δεσμεύονται από ανιχνευτή και επειδή έχουν σχετικά χαμηλή κινητική ενέργεια, ένα μεγάλο ποσοστό αυτών καταλήγει στον ανιχνευτή και καταμετρούνται. Επειδή ο αριθμός των ηλεκτρονίων εξαρτάται από τη γεωμετρία της επιφάνειας στο σημείο που προσπίπτει η δέσμη, η ανίχνευσή τους προσφέρει σαφείς εικόνες της επιφανειακής δομής του δείγματος [Davis, 1998].



Σχήμα 5.3: Σχηματική παράσταση παραγωγής ακτινών Χ, χαρακτηριστική του κάθε ατόμου

Αυτή η παραλλαγή του ηλεκτρονιακού 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 [Young, 1992].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6°

Υλικό και Μέθοδος

6.1. Λήψη των δειγμάτων

Όλα τα δείγματα προήλθαν από ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε χειρουργική ενδαρτηρεκτομή καρωτίδων αρτηριών και από ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε μείζονα καρδιοχειρουργική επέμβαση.

6.2. Χαρακτηριστικά ασθενών

Χρησιμοποιήθηκαν αθηρωματικές πλάκες, από υλικό που ελήφθη από 70 άρρενες και 15 γυναίκες ασθενείς, ηλικίας από 60 μέχρι 85 ετών, οι οποίοι υπεβλήθησαν σε χειρουργική ενδαρτηρεκτομή καρωτίδων και στεφανιαίων αρτηριών. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν στεφανιαίες αρτηρίες και τμήματα του ωτίου του δεξιού κόλπου από 90 ασθενείς (53-85 ετών) που υπεβλήθησαν σε μείζονα καρδιοχειρουργική επέμβαση.

Η διάρκεια της μελέτης ήταν τρία έτη (Μάρτιος 2008 – Μάρτιος 2011). Το ερευνητικό πρωτόκολλο της μελέτης υποβλήθηκε και εγκρίθηκε από την Επιστημονική Επιτροπή του 401 Γενικού Στρατιωτικού Νοσοκομείου Αθηνών.

Για κάθε έναν από τους ασθενείς σχηματίσθηκε ιατρικό πρωτόκολλο όπου κατεγράφησαν και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία τα εξής στοιχεία:

- Φύλο
- 2. Ηλικία
- 3. Επαγγελματική σταδιοδρομία
- 4. Παρουσία στεφανιαίας νόσου
- 5. Παρουσία ή όχι περιφερικής αρτηριοπάθειας

- Παρουσία ή όχι άλλης συνυπάρχουσας αγγειακής νόσου (αορτικό ανεύρυσμα, εγκεφαλική αγγειακή νόσος)
- 7. Παρουσία ή όχι υπερλιπιδαιμίας
- 8. Παρουσία ή όχι σακχαρώδους διαβήτη
- 9. Παρουσία ή όχι υπερουριχαιμίας
- 10. Παρουσία ή όχι χρήσης καπνού (καπνίσματος).
- 11. Παρουσία ή όχι παχυσαρκίας
- 12. Παρουσία ή όχι αρτηριακής υπέρτασης
- 13. Παρουσία ή όχι χρήσης αλκοόλ
- 14. Συνοδά νοσήματα ή γενικότερα προβλήματα υγείας
- 15. Λαμβανομένη φαρμακευτική αγωγή
- 16. Βιοχημικά-αιματολογικά ευρήματα εργαστηριακών εξετάσεων
- 17. Άλλες διαγνωστικές εξετάσεις (υπερηχογραφήματα, κ.ά)

Το 92% των ασθενών ήταν υπερτασικοί ενώ το 95% ήταν καπνιστές ή/και υπερλιπιδαιμικοί. Ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών (33%) έπασχε από σακχαρώδη διαβήτη και το 59% παρουσίαζε αυξημένες τιμές ουρικού οξέος στο αίμα. Στην πλειονότητα τους (65%) οι ασθενείς έπασχαν από πολυαγγειοπάθεια, καθόσον συνυπήρχε η στεφανιαία νόσος ή/και με περιφερική αρτηριοπάθεια ή καρωτιδική νόσο.

Από το σύνολο των διαθέσιμων αθηρωμάτων οι ασθενείς κατατάχθηκαν σε κατηγορίες με βάση τα κοινά χαρακτηριστικά, όπως σάκχαρο και ουρικό οξύ και τα υπέρυθρα φάσματα συγκρίθηκαν με αντίστοιχα φάσματα ασθενών που εμφάνιζαν φυσιολογικό σάκχαρο ή ουρικό οξύ στο αίμα τους.

6.3. Προετοιμασία Δειγμάτων

Τα δείγματα αμέσως μετά την επέμβαση τοποθετήθηκαν σε φορμόλη και στη συνέχεια έγιναν διαδοχικές εκπλύσεις με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) και ακετόνη για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αίματος και πηγμάτων. Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε κλίβανο υψηλού κενού. Διαπιστώθηκε φασματοσκοπικά ότι η διαδικασία αυτή δεν προκαλεί βλάβες ή μεταβολές στην σύσταση και μοριακή δομή των ιστών [Anastassopoulou et al., 2009; 2008, Conti et

al., 2008, Kolovou & Anastassopoulou, 2007, Petra et al., 2005, Theophanides, 1978]. Στην Εικόνα 6.1 δίνεται το τμήμα της αθηρωματικής πλάκας ασθενούς. Στην Εικόνα 6.1Α φαίνεται φωτογραφία του αθηρώματος, ενώ στην Εικόνα 6.1Β φαίνεται η αθηρωματική πλάκα μετά από διάνοιξη του θύλακα.



Εικόνα 6.1: Α: Τμήμα στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς, **Β**: Φαίνονται η εξωτερική (Adventitia) και εσωτερική (Intima) μεμβράνη και η αθηρωματική πλάκα μετά τη διάνοιξη του θύλακα (ψηφιακή φωτογραφία δειγμάτων).

Στο αθήρωμα διακρίνονται λευκού και κίτρινου χρώματος περιοχές. Οι κίτρινες περιοχές διαπιστώθηκε και με SEM ότι αντιστοιχούν στις ζώνες αφρωδών κυττάρων (foam cells).

6.4. Συσκευές

6.4.1. Φασματοφωτόμετρο υπερύθρου, IR

Για την λήψη των FT-IR φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμερο Nicolet 6700 thermoscientific, του οίκου Thermo Electron Corporation με διακριτική ικανότητα 4 cm⁻¹ (Εικόνα 6.2). Το κάθε φάσμα προέκυπτε από τον μέσο όρο 120 φασμάτων (scans), αν και το φάσμα δεν παρουσίαζε μεταβολές με μικρότερο αριθμό σαρώσεων. Τα φάσματα καταγράφηκαν στην περιοχή του φάσματος του μέσου υπέρυθρου μεταξύ 4000-400 cm⁻¹. Ιδιαίτερα χρησιμοποιήθηκε εξάρτημα ATR (Attenuated Total Reflexion, αποσβένουσα ολική ανάκλαση) τεχνικής, οπότε τα δείγματα δεν υπέστησαν καμμία επεξεργασία ούτε ομογενοποιήθηκαν, ώστε να σχηματισθούν δισκία του δείγματος με σκόνη KBr. Επίσης υπήρχε η διαδικασία επιλογής και κατά κάποιον τρόπο σάρωσης των θέσεων λήψης των φασμάτων.



Εικόνα 6.2: Φασματοφωτόμετρο υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier, Nicolet 6700 thermoscientific, διακριτικής ικανότητας 4 cm⁻¹

Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης, ATR (Attenuated Total Reflectance). Σύμφωνα με την τεχνική αυτή (Σχήμα 6.1), η δέσμη της υπέρυθρης ακτινοβολίας, μέσω φακών από αδάμαντα, προσπίπτει στο δείγμα. Η υπέρυθρη ακτινοβολία διαπερνά τον κρύσταλλο και το δείγμα με γωνία 45° και μετά από πολλαπλές διαδοχικές ολικές ανακλάσεις διατρέχει το δείγμα αρκετές φορές (Σχήμα 6.2). Ας τονισθεί ότι οι πολλαπλές ανακλάσεις της ΙR ακτινοβολίας στο δείγμα έχουν ως αποτέλεσμα να αυξάνουν το λόγο του σήματος προς τον θόρυβο και επομένως να αυξάνει με τον τρόπο αυτό η ένταση των ταινιών του φάσματος ακόμα και για πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Για τον λόγο αυτό η ATR μεθοδολογία προσφέρεται για την μελέτη βιολογικών συστημάτων, όπου οι συγκεντρώσεις του ίδιου του δείγματος, αλλά και μερικών συστατικών του είναι πάρα πολύ μικρές.



Σχήμα 6.1: Σχηματική παράσταση της ATR τεχνικής



Σχήμα 6.2: Σχηματική παράσταση της πορεία της υπέρυθρης δέσμης στον κρύσταλλο και το δείγμα. Η γωνία πρόσπτωσης είναι 45° για την επίτευξη πολλαπλής ανάκλασης.



Εικόνα 6.3: Στεφανιογραφία του ασθενούς

Για την επεξεργασία των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα Omnic, που έφερε το φασματοφωτόμετρο.

6.4.2. Ηλεκτρονιακό μικροσκόπιο σάρωσης, SEM

Τα δείγματα στη συνέχεια εξετάστηκαν με ηλεκτρονιακό μικροσκόπιο σάρωσης. Ως βιολογικά δείγματα, δεν επικαλύφθηκαν με άνθρακα ή χρυσό, ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε επίδραση δευτερογενών ηλεκτρονίων που θα προέρχονταν από τις επιστρώσεις (Εικόνα 6.4), αλλά και επειδή είχε παρατηρηθεί ότι μερικοί επικαλυμμένοι ιστοί μεταβάλονταν κατά την διάρκεια του πειράματος.



Εικόνα 6.4: Τροφοδοσία SEM σε λειτουργία

Η μη επικάλυψη του δείγματος έδινε την ευχέρεια να χρησιμοποιηθούν τα ίδια δείγματα και για άλλες διαφορετικές αναλύσεις, αλλά κυρίως παρείχε τη δυνατότητα να συσχετισθούν τα υπέρυθρα φάσματα με την αρχιτεκτονική της εικόνας του δείγματος στο ίδιο σημείο.

Το SEM ήταν της Εταιρείας Fei Co και έφερε αναλυτή στοιχειακής ανάλυσης (EDAX) του ίδιου Οίκου.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7[°]

Αποτελέσματα-Συζήτηση

7.1. FT-IR φάσματα στεφανιαίων αρτηριών

Στο Σχήμα 7.1 δίνεται το υπέρυθρο φάσμα απορροφήσεως στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς στην υπέρυθρη περιοχή μεταξύ 4000 και 400 cm⁻¹. Το φάσμα περιέχει ένα πλήθος ταινιών, οι οποίες λόγω του μεγάλου αριθμού των ασθενών και της εμπειρίας που αποκτήθηκε κατά την μελέτη, διαπιστώθηκε, όπως θα φανεί και παρακάτω, ότι η ένταση, η μορφολογία και η μετατόπιση των ταινιών συνδέονται άμεσα με τα κλινικά χαρακτηριστικά του κάθε ασθενούς, σε σύγκριση πάντα με τις αιματολογικές αναλύσεις και το ιατρικό ιστορικό.



Σχήμα 7.1: FT-IR φάσμα αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς στην περιοχή 4000-400 cm⁻¹.

Στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 4000-2500 cm⁻¹ διακρίνονται οι χαρακτηριστικές ταινίες των δονήσεων τάσης των ομάδων vOH, vNH καθώς και οι συμμετρικές και αντισυμμετρικές δονήσεις τάσης των μεθυλ ($v_{s,as}$ CH₃) και μεθυλενομάδων ($v_{s,as}$ CH₂). Αρχίζοντας από τις μεγαλύτερες προς τις μικρότερες συχνότητες φαίνεται στο FT-IR φάσμα ένας ώμος στην περιοχή των 3527 cm⁻¹, ο οποίος αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των ομάδων υδροξυλίου (vHO). [Anastassopoulou et al., 2009; 2008, Conti et al., 2008, Kolovou & Anastassopoulou, 2007, Petra et al., 2005; 2002; 1999; 2000]

Για να ερμηνευθεί η παρουσία ομάδων ΟΗ στο δείγμα θα πρέπει να γίνει δεκτό ότι κατά την γένεση της αθηρωματικής πλάκας πρέπει να έλαβε χώρα παραγωγή ελευθέρων ριζών υδροξυλίου (·OH), οι οποίες έδωσαν σειρά αντιδράσεων προσθήκης στους διπλούς δεσμούς των πρωτεϊνών και ακόρεστων λιπιδίων [Θεοφανίδης & Αναστασοπούλου, 1998] σύμφωνα με την αντίδραση [10]:



Η αντίδραση [10] γίνεται σε δύο στάδια:

- α) στο αρχικό λαμβάνει χώρα προσθήκη των ριζών ·OH στους διπλούς
 δεσμούς, οπότε παράγεται η ελεύθερη ρίζα του λιπιδίου (L·) και
- β) η παραγόμενη ρίζα L· προσλαμβάνει ευκίνητο άτομο υδρογόνου από γειτονικά μόρια ή από τις ενδογενείς γλουταθειόλες και σχηματίζουν τελικά σταθερά μόρια.

Οι ταινίες που εμφανίζονται στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 3300-3200 cm⁻¹ αποδίδονται στις δονήσεις τάσης των αμινομάδων (vNH). Στις υψηλότερες ενέργειες απαντώνται οι ελεύθερες τερματικές ομάδες NH των πρωτεϊνών, ενώ σε μικρότερους κυματαριθμούς απαντώνται οι αμινομάδες που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου. Οι δεσμοί υδρογόνου μπορούν να είναι ενδομοριακοί ή διαμοριακοί μεταξύ άλλων μορίων των κυττάρων. Η ταινία που εμφανίζεται ως ώμος στα 3080 cm⁻¹ είναι χαρακτηριστική της αντισυμμετρικής δόνησης εντός επιπέδου του ατόμου υδρογόνου του τερματικού ατόμου άνθρακα [Bellamy, 1975] που συνδέεται με διπλό δεσμό με το γειτονικό του άτομο άνθρακα (ολεφινικός δεσμός, =CH₂) [Mamarelis et

al, 2010]. Η ένταση της ταινίας αυτής διαπιστώθηκε από την ομάδα μας ότι εξαρτάται από τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης στον ορό του αίματος των ασθενών και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την κατάσταση του ασθενούς [Mamarelis et al, 2010].

Στην περιοχή 3000 cm⁻¹ μέχρι 2850 cm⁻¹ αναμένονται οι ταινίες των αντισυμμετρικών και συμμετρικών δονήσεων τάσης των μεθυλ και μεθυλενομάδων νCH₃ και νCH₂. Η περιοχή αυτή παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την λιποφιλικότητα του περιβάλλοντος μέσου των μεμβρανών. Σημαντική είναι η μεταβολή των εντάσεων των ταινιών των συμμετρικών και αντισυμμετρικών τάσεων των μεθυλ και μεθυλενομάδων νCH₃ και νCH₂, συγκρινόμενες με φάσματα άλλων ασθενών. Η παρατηρούμενη αύξηση των εντάσεων των ταινιών δηλώνει την μείωση του λιπόφιλου περιβάλλοντος των μεμβρανών [Theophanides, 1984, Theophanides et al., 1991] και την αύξηση της ευκινησίας των λιπιδίων (mobility) και της διεισδυτικότητας (permeability) των μεμβρανών. Για λεπτομερέστερη μελέτη το φάσμα διαχωρίστηκε σε στενότερες περιοχές. Στο Σχήμα 7.2.Α δίνεται το φάσμα στην περιοχή 3000-2850 cm⁻¹ μαζί με την μαθηματική ανάλυση (deconvolution) (Σχήμα 7.2.B), η οποία συμπίπτει με την δεύτερη παράγωγο της καμπύλης (για λόγους απλοποίησης και ανάγνωσης δεν δίνεται στο Σχήμα 7.2).



Σχήμα 7.2: A: FT-IR φάσμα αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς στην περιοχή 3000-2850 cm⁻¹ και B: μαθηματική ανάλυση του φάσματος

Η μαθηματική ανάλυση δείχνει ότι το φάσμα είναι περισσότερο σύνθετο από ότι φαίνεται. Επειδή η ταινία που εμφανίστηκε στους 3080 κυματαριθμούς αποδόθηκε στην LDL χοληστερόλη [Mamarelis et al., 2010], για την απόλυτη ανάλυση και απόδοση των ταινιών του φάσματος στην αναφερόμενη περιοχή λάβαμε το φάσμα της καθαρής χοληστερόλης. Οι ταινίες του φάσματος στα 2958 cm⁻¹, 2934 cm⁻¹, 2899 cm⁻¹ και 2877 cm⁻¹ συμπίπτουν με τις αντίστοιχες χαρακτηριστικές ταινίες της χοληστερόλης, όπως φάνηκε από την σύγκριση των δύο φασμάτων (για λόγους ευανάγνωσης το φάσμα της χοληστερόλης δεν έχει προστεθεί στο Σχήμα 7.2). Οι ταινίες στα 2969 cm⁻¹, 2941 cm⁻¹, 2921 cm⁻¹ και 2879 cm⁻¹ αποδίδονται στις δονήσεις τάσης των ομάδων νCH₂ οι οποίες όμως σχηματίζουν σύνθετες ενώσεις με τις «ουρές» των λιπιδίων στις λιπόφιλες περιοχές. Ο σχηματισμός των συνθέτων ενώσεων πρέπει να οφείλεται στη διάσπαση των ανθρακικών αλυσίδων λόγω της επίδρασης των ελευθέρων ριζών κυρίως υδροξυλίου: ατόμου υδρογόνου από τις ανθρακικές αλυσίδες των λιπιδίων:

$$CH_3(CH_2)_n CH_2L + HO^{\bullet} \rightarrow CH_3(CH_2)_n CHL + H_2O$$
 [11]

Η παραγόμενη ελεύθερη ρίζα δεν είναι σταθερή και διασπάται σε δύο μικρότερα μόρια. Με τον τρόπο αυτό μειώνεται το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας, όπως συμπεραίνεται από τα υπέρυθρα φάσματα, από τις μεταβολές των αντίστοιχων περιοχών.

Είναι γνωστό ότι οι μεμβράνες δεν είναι στατικές αλλά αποτελούν ένα φυσικό δυναμικό σύστημα στο οποίο όχι μόνον τα μεγαλομόρια, αλλά και άλλα συστατικά του κυττάρου εναλλάσσονται εντός και εκτός του κυττάρου. Οι μεμβράνες αποτελούνται από αμφίφιλα μακρομόρια που φέρουν δηλαδή ένα υδρόφιλο τμήμα "head core" και ένα υδρόφοβο τμήμα "tail" (Σχήμα 7.3.B) [Αναστασοπούλου & Θεοφανίδης, 2008]. Οποιαδήποτε επομένως διαταραχή του δυναμικού αυτού συστήματος οδηγεί στην καταστροφή της ισορροπίας των λιπιδίων που σχηματίζουν την μεμβράνη. Αναφέρεται στην βιβλιογραφία ότι η ένταση των ταινιών αυτών εξαρτάται έντονα από το λιπόφιλο ή υδρόφιλο περιβάλλον στο οποίο δονούνται [Anastassopoulou & Theophanides, 1990].



Σχήμα 7.3: A. FT-IR φάσμα αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς στην περιοχή 3100-2600 cm⁻¹; a: ασθενής με φυσιολογικά όρια LDL χοληστερόλη στον ορό του αίματος, b: Ασθενής με αυξημένη συγκέντρωση χοληστερόλης και c: Ασθενής με αρκετά υψηλά επίπεδα χοληστερόλης B. Σχηματική παράσταση των κάμψεων (kinks) των ανθρακικών αλυσίδων των λιπιδίων που σχηματίζουν την μεμβράνη και επηρεάζουν την λιποφιλικότητα του περιβάλλοντος μέσου, φαίνεται το υδρόφιλο και υδρόφοβο τμήμα των μορίων.

Στην περιοχή του υπέρυθρου φάσματος μεταξύ 2890 και 2850 cm⁻¹ παρατηρούνται μικρές μετατοπίσεις στις συχνότητες και αύξηση του αριθμού των εμφανιζόμενων ταινιών που αποδίδονται στις αντισυμμετρικές και συμμετρικές δονήσεις τάσης των vCH₃ και vCH₂. Οι μετατοπίσεις αυτές δείχνουν ότι οι μεθυλ ομάδες συνδέονται άμεσα είτε με άτομα οξυγόνου είτε με άτομα θείου. Η παρουσία θείου στις αθηρωματικές πλάκες έχει επιβεβαιωθεί και από την SEM-EDAX ανάλυση, όπως φαίνεται στον Πίνακα 7.1.



Εικόνα 7.1: SEM αρχιτεκτονική απεικόνιση της επιφάνειας στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς.

Elem	Wt %	At %
СК	44.11	51.15
NK	14.69	14.91
ОК	30.93	27.49
РК	0.42	0.19
SK	0.97	0.43
СаК	6.95	2.47
Total	100.00	100.00

Πίνακας 7.1: SEM-EDAX στοιχειακή ανάλυση και η % Wt και κατά At σύσταση στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς.

Περαιτέρω ανάλυση των φασμάτων στην περιοχή 1800-1500 cm⁻¹ δείχνει ότι οι εντάσεις των ταινιών μεταβάλλονται σημαντικά, ενώ παράλληλα μετατοπίζονται σε μικρότερους κυματαριθμούς. Η περιοχή αυτή του φάσματος χαρακτηρίζει κυρίως την δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών. Είναι αποδεδειγμένο ότι η δομή των βιολογικών μορίων είναι το άθροισμα της πρωτοταγούς δομής, που εξαρτάται από την αλληλουχία των βάσεων, την δευτεροταγή δομή που δείχνει τον τρόπο αναδίπλωσης μέσα στο περιβάλλον και την τεταρτοταγή δομή που δείχνει τον τρόπο



Σχήμα 7.4: A: FT-IR φάσμα αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς στην περιοχή 1800-1500 cm⁻¹; **B**: μαθηματική ανάλυση του ιδίου φάσματος

Στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 1800 και 1700 cm⁻¹ δίνονται οι δονήσεις τάσης της ομάδας νC=Ο (Σχήμα 7.4). Η αναφερόμενη περιοχή μας παρέχει πληροφορίες για την συμπεριφορά της ομάδας CO του πεπτιδικού δεσμού –NH-COτων πρωτεϊνών σχετικά με το ποσοστό συμμετοχής της στους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζουν την έλικα των πρωτεϊνών, αλλά και ως προς την πολικότητα του περιβάλλοντος μέσου στο οποίο βρίσκονται (Σχήμα 7.3). Έτσι, οι ταινίες στα 1783 και 1768 cm⁻¹ αποδίδονται σε εστέρες και στα ιόντα -COO⁻ των αθηρωματικών πλακών. Οι ταινίες αυτές παρατηρήθηκε ότι επηρεάζονται από την απρουσία μεταλλικών ιόντων στις μεμβράνες των κυττάρων [Kamnev et al., 1997]. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται και από την SEM-EDAX ανάλυση, η οποία έδειξε την παρουσία μετάλλων, όπως χαλκού (Cu), αργύρου (Ag), μολύβδου (Pb) και χρωμίου (Cr) στις αθηρωματικές πλάκες μερικών ασθενών (Εικόνα 7.2).



Εικόνα 7.2: A: SEM αρχιτεκτονική απεικόνιση αθηρωματικής πλάκας στεφανιαίας αρτηρίας. Τα βέλη δείχνουν τις περιοχές που είναι πλούσιες σε μόλυβδο και ασβέστιο; B: SEM-EDAX στοιχειακή ανάλυση.

Στην Εικόνα 7.2.Α φαίνεται η αρχιτεκτονική της επιφάνειας της αθηρωματικής πλάκας στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς, ενώ στην Εικόνα 7.2.Β φαίνεται η χημική στοιχειακή ανάλυση. Η στοιχειακή ανάλυση δείχνει την παρουσία άνθρακα, οξυγόνου, νατρίου, μαγνησίου, πυριτίου, φωσφόρου, μολύβδου και ασβεστίου. Οι θέσεις του μολύβδου είναι σκιερές και του ασβεστίου περισσότερο λαμπερές.

Επίσης, στην περιοχή μεταξύ 1800 και 1700 cm⁻¹ εμφανίζονται οι ταινίες των δονήσεων τάσης της ομάδας του καρβοξυλίου –COOH που συμμετέχει σε εστερικούς δεσμούς. Στην παραπάνω περιοχή δεν εμφανίζονται ταινίες απορρόφησης άλλων χαρακτηριστικών ομάδων των πρωτεϊνών [Mendelsohn & Mantsch, 1986] και επομένως η μελέτη γίνεται πιο εύκολη. Η εμφάνιση της ταινίας στα 1735 cm⁻¹ είναι χαρακτηριστική και αποδίδεται στην παρουσία αλδεϋδών. Η παρουσία ως τελικών προϊόντων των αλδεϋδών στο υπέρυθρο φάσμα των αθηρωματικών πλακών οδηγεί στο συμπέρασμα ότι κατά τον σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας πρέπει να λαμβάνει χώρα υπεροξείδωση των λιπιδίων από τις παραγόμενες ενδογενείς ελεύθερες ρίζες ή το οξειδωτικό στρες. Η παρουσία αλδεϋδών ανιχνεύεται στους ασθενείς με ειδικά βιοχημικά αντιδραστήρια.

Στα βιολογικά συστήματα η διάσπαση των υπεροξειδίων των λιπιδίων σε αλδεΰδες γίνεται παράλληλα με την αυτοξείδωση των λιπαρών οξέων και τη λιπιδική υπεροξείδωση (αντιδράσεις [12] και [13]).

LH +OH•
$$\rightarrow$$
 L• + H₂O (απόσπαση ατόμου υδρογόνου) [12]
L• +O₂ \rightarrow LOO• (οξείδωση) [13]

Αυτές οι δευτερογενείς αντιδράσεις ενισχύονται από την παρουσία μεταβατικών μεταλλικών ιόντων, διασπώντας τα λιπιδικά υπεροξείδια σε αλκοξυλικές ρίζες με αντιδράσεις ανάλογες κατά Fenton, σύμφωνα με την γενική αντίδραση [14]:

LOOH + Fe⁺²
$$\xrightarrow{-e}$$
 LOO[•] + Fe⁺³ (γενική αντίδραση Fenton) [14]

Οι παραγόμενες αλκοξυλ ρίζες (LOO[.]) των λιπιδίων, επειδή δεν είναι σταθερές, διασπώνται ομολυτικά, σε οποιαδήποτε πλευρά της αλκοξυλομάδας, σχηματίζοντας αλδεΰδες και ρίζες των λιπιδίων.

$$\begin{array}{c} \stackrel{\bullet OH}{\underset{OOH}{\overset{\bullet}}} R_{1} \stackrel{\bullet CH-R_{2}}{\underset{OOH}{\overset{\bullet}}} R_{1} \stackrel{\bullet CH-R_{2}}{\underset{O}{\overset{\bullet}}} R_{1} \stackrel{\bullet CH-R_{2}}{\underset{O}{\overset{\bullet}}} R_{1} \stackrel{\bullet CH-R_{2}}{\underset{O}{\overset{\bullet}}} R_{1} \stackrel{\bullet CH-R_{2}}{\underset{\bullet}{\overset{\bullet}}} R_{1} \stackrel{\bullet CH-R_{2}}{\underset{\bullet}} R_{1} \stackrel{\bullet CH-R_{2}}{\underset{\bullet}{\overset{\bullet}}} R_{1}$$

Στην περίπτωση των υπεροξειδίων των φωσφολιπίδιων και εστέρων χοληστερόλης που περιέχονται στην οξειδωμένη LDL, η σχάση των δεσμών άνθρακα οδηγεί στο σχηματισμό δύο τύπων αλδεϋδών:



Σχήμα 7.5: Χημικοί τύποι των βασικών μορίων των απολιποπρωτεϊνών

- (α) αλειφατικές αλδεΰδες που προέρχονται από τα τερματικά μεθύλια των αλυσίδων των λιπαρών οξέων (methyl terminus of the fatty acid chain) και
- (β) αλδεΰδες δεσμευμένες σε γειτονικά λιπίδια της ανθρακικής αλυσίδας (corealdehydes) [Kamido et al., 2000].



Σχήμα 7.6: Σχηματισμός αλδεϋδών από υπεροξείδωση λιπιδίων

Τα προϊόντα των αλδεϋδών φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο, δεδομένου ότι ανιχνεύθηκαν σε όλους τους ασθενείς, ανεξάρτητα του πάχους του αθηρώματος, όπως αυτό υπολογίσθηκε με αξονική τομογραφία ή υπέρηχο [Μαμαρέλης, 2010], καθώς και των κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών. Πιθανόν, οι αλδεΰδες να αποτελούν τα πρώτα προϊόντα έναρξης των αφρωδών κυττάρων, δεδομένου ότι είναι σταθερά. Τα παραπάνω προϊόντα εντοπίστηκαν τόσο σε αθηρώματα ασθενών, όσο και σε πειραματόζωα, στα οποία προκλήθηκε υπεροξείδωση των λιπιδίων.

Η αύξηση της έντασης της χαρακτηριστικής ταινίας στα 1735 cm⁻¹ βρέθηκε να είναι ανάλογη με την αύξηση της LDL χοληστερόλης στον ορό του αίματος των ασθενών, όπως απορρέει από τη σύγκριση από τις αιματολογικές αναλύσεις των ασθενών. Οι ταινίες στα 1735 cm⁻¹ και 3082 cm⁻¹ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της LDL χοληστερόλης των ασθενών [Mamarelis et al., 2011; 2010, Pissaridi et al., 2011].

Η οξείδωση της LDL προέρχεται από την αντίδραση των λιπιδίων με τις ελεύθερες ρίζες. Η έναρξη φαίνεται να γίνεται αρχικά με απόσπαση από τις ρίζες υδροξυλίου ενός ατόμου υδρογόνου από τα PUFAs που εμπεριέχονται στα λιπίδια της LDL και τον σχηματισμό ελεύθερης ρίζας L· σύμφωνα με την αντίδραση [12]. Η ταχύτητα της αντίδρασης απόσπασης ατόμων Η καθορίζει το στάδιο έναρξης της οξείδωσης των λιπαρών οξέων και είναι ένα από τα πιο σημαντικά στάδια. Στους αερόβιους οργανισμούς η ελεύθερη ρίζα του λιπιδίου L· αντιδρά ταχύτατα με το μοριακό οξυγόνο, σχηματίζοντας μια την υπερόξυ ρίζα LOO· (αντίδραση [13]). Η ρίζα LOO· δεν είναι σταθερή και προσλαμβάνει άτομο υδρογόνου είτε από γειτονικό λιπαρό οξύ LH είτε από γλουταθειόλες σχηματίζοντας την σταθερή υπεροξειδωμένη ένωση LOOH και μια καινούργια ελεύθερη ρίζα L· ή GS· (αντίδραση [16]).

$$LOO^{\bullet} + LH(GSH) \rightarrow LOOH + L^{\bullet}(GS^{\bullet})$$
 [16]

Η αντίδραση [16] ονομάζεται αλυσιδωτή αντίδραση διάδοσης (chain propagation) των ελευθέρων ριζών και είναι χαρακτηριστική, δεδομένου ότι αν ο οργανισμός με την αυτοάμυνα δεν μπορεί να αντιμετωπίσει την παραγωγή τους, τότε η βλάβη μεταφέρεται πέραν του αρχικού σημείου έναρξης, προκαλώντας βαθύτερη βλάβη στους ιστούς και επομένως αύξηση του πάχους της αθηρωματικής πλάκας.

Η ταινία στα 1690 cm⁻¹ προέρχεται από τις δονήσεις των ομάδων του πεπτιδικού δεσμού -NH-C=O- των πρωτεϊνών και δείχνει την επικρατέστερη συμμετοχή της συχνότητας της ομάδας νC=O έναντι των ομάδων vNH του πεπτιδικού δεσμού. Στην περίπτωση αυτή οι πρωτεΐνες αποκτούν διαμόρφωση βαντιπαράλληλων επιπέδων (β-antiparallel sheets). Στο Σχήμα 7.7 δίνεται σχηματικά ο τρόπος ανάπτυξης των ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου των πεπτιδικών δεσμών σε β-παράλληλη και β-αντπαράλληλη διαμόρφωση. Η θέση της ταινίας, που έχει μετατοπισθεί προς μικρότερους κυματαριθμούς, δηλώνει σημαντική μεταβολή της δομής των πρωτεϊνών [Gordon et al., 2004]. Οι ταινίες αυτές είναι χαρακτηριστικές των apoB [Chehin et al., 2001].



Για την μεταβολή της δομής πρέπει να γίνει αποδεκτό ότι οι ενδομοριακοί δεσμοί δρογόνου της πεπτιδικής α-έλικας έχουν καταστραφεί. Η παραδοχή αυτή επιβεβαιώνεται και με την παρατηρούμενη μετατόπιση προς μικρότερους κυματαριθμούς (1629 cm⁻¹) των ταινιών που οφείλονται στις δονήσεις κάμψης των Amide I (-νCO-δNH-)



Σχήμα 7.8: Σχηματική παράσταση διαμόρφωσης τυχαίας περιέλιξης και α-έλικας πρωτεϊνών

Στα δείγματα των αθηρωματικών πλακών διαπιστώνεται ότι η έλικα των πρωτεϊνών καταστρέφεται τόσο πολύ, ώστε να επικρατεί η διαμόρφωση τυχαίας περιέλιξης και όχι η διαμόρφωση α-έλικας (Σχήμα 7.8).

Οι R Chehin et al (2001), σε *in vitro* πειράματα οξείδωσης των λιπιδίων διαπίστωσαν ότι η μεταβολή από α-έλικα σε β-αναδίπλωση (β-turn) αρχίζει με την πρώτη εμφάνιση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων σε αλδεΰδες. Με τις παρατηρήσεις αυτές βρισκόμαστε σε συμφωνία, δεδομένου ότι στις αθηρωματικές πλάκες των ασθενών μας διαπιστώνεται ο σχηματισμός αλδεϋδών, η δε ένταση των ταινιών απορρόφησης των αντιστοίχων ομάδων είναι συνάρτηση της LDL χοληστερόλης στον ορό του αίματος.

Οι ταινίες στις συχνότητες 1670 cm⁻¹, 1594 cm⁻¹ και 1548 cm⁻¹, οι οποίες αντιστοιχούν στις ομάδες της αργινίνης, του ασπαρτικού οξέος και του γλουταμινικού οξέος των απολιποπρωτεϊνών apoA-I [Barth, 2007, Schneeweis et al., 2005, Shaw et al., 1997] είναι σημαντικά μειωμένες και εμφανίζονται μόνον μετά την μαθηματική επεξεργασία του φάσματος (Σχήμα 7.4). Οι ταινίες 1515 cm⁻¹ και 1495 cm⁻¹ μπορούν να αποδοθούν σε σύμπλοκα μέταλλα με καρβονυλικά οξέα. Φαίνεται δηλαδή ότι στην περίπτωση των ασθενών μειώνονται σημαντικά οι απολιποπρωτεΐνες αροΑ-Ι και apoA-II, που αντιστοιχούν στην HDL και ρυθμίζουν τον μεταβολισμό της, εφόσον για να παρατηρηθούν θραύσματά της πρέπει να ληφθεί η δεύτερη παράγωγος του φάσματος ή deconvolution. Αυτή η παρατήρηση συνδυάζεται με την αύξηση της ταινίας στα 1735 cm⁻¹, η οποία αντιστοιχεί στους χοληστερικούς εστέρες (O=C–O–) και συνδέεται άμεσα με την LDL στο αίμα του ασθενούς.

Ανάλυση του φάσματος στην περιοχή του FT-IR φάσματος 1700-1600 cm⁻¹ στεφανιαίας αρτηρίας (Σχήμα 7.9) δείχνει ότι οι apoA-I και apoA-II μεταβάλλουν την δευτεροταγή δομή τους. Οι ταινίες στα 1670 cm⁻¹ και 1620 cm⁻¹ αποδίδονται στις ενδομοριακές δυνάμεις που συγκρατούν τις apoA-I και apoA-II πρωτεΐνες με τα μόρια της HDL χοληστερόλης. Ας τονισθεί και πάλι ότι οι apoA πρωτεΐνες είναι οι ρυθμιστές της HDL χοληστερόλης και επομένως ο ρόλος τους είναι προστατευτικός.



Σχήμα 7.9: 1:FT-IR φάσμα στεφανιαίας αρτηρίας στην περιοχή 1700-1600 cm⁻¹. 2: μαθηματική ανάλυση του ιδίου φάσματος. Διακρίνονται οι ταινίες που αντιστοιχούν στις μεταβολές των δευτερογενών δομών των πρωτεϊνών

Για ευρύτερη μελέτη της πολυσύνθετης αθηρωματικής πλάκας των στεφανιαίων αρτηριών, διαλύσαμε την αθηρωματική πλάκα σε οργανικό διαλύτη. Στο Σχήμα 7.10 δίνονται τα υπέρυθρα φάσματα των λιποειδών συσσωματωμάτων (Σχήμα 7.10.1), τα οποία περιέβαλαν την αρτηρία, το αθήρωμα πριν από οιαδήποτε άλλη επεξεργασία (Σχήμα 7.10.2) και το δείγμα μετά από την τοποθέτηση της αθηρωματικής πλάκας σε οργανικό διαλύτη και την απομάκρυνση των ευδιάλυτων συστατικών (Σχήμα 7.10.3).

Παρατηρείται από τα φάσματα ότι στην καμπύλη 1 η ένταση της ταινίας στα 1742 cm⁻¹ είναι μέγιστη ως προς τις εντάσεις της ίδιας ταινίας των άλλων φασμάτων και ελαφρώς μετατοπισμένη προς μικρότερους κυματαριθμούς. Η μείωση της έντασης της ταινίας στα 1742 cm⁻¹ εμφανίζεται τόσο στην αρχική αθηρωματική πλάκα (καμπύλη 2), όσο και μετά την τοποθέτησή της στον οργανικό διαλύτη (καμπύλη 3). Η ταινία αυτή, όπως προαναφέρθηκε αποδίδεται στην παρουσία χοληστερικών ενώσεων της LDL.



Σχήμα 7.10: FT-IR φάσμα στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς 1: λιποειδή συσσωματώματα του αθηρώματος, 2: Αθηρωματική πλάκα, 3: Αθηρωματική πλάκα μετά την τοποθέτησή της σε οργανικό διαλύτη, 4: Διαφορά φασμάτων 1 και 2, 5: Μαθηματική ανάλυση του φάσματος 1.

Από την αφαίρεση των φασμάτων των καμπυλών 1 και 2 λαμβάνεται η καμπύλη 4 και διαπιστώνεται ότι η ταινία στα περίπου 1735 cm⁻¹ είναι αρνητική, που σημαίνει ότι η LDL χοληστερόλη και οι αλδεΰδες είναι περισσότερες στο αρχικό δείγμα. Επίσης παρατηρείται ότι μετά την τοποθέτηση σε οργανικό διαλύτη η ένταση της ταινίας που αντιστοιχεί στις δονήσεις των Amide I είναι αυξημένη, που σημαίνει ότι η αθηρωματική πλάκα περιέχει μεγαλύτερο ποσοστό διαμόρφωσης α-έλικας. Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στην παρατήρηση ότι η α-έλικα είναι πιο σταθερή στην επίδραση των διαλυτών, ενώ τα πλέον ευδιάλυτα συστατικά της αθηρωματικής πλάκας είναι θραύσματα ή πρωτεΐνες ή συσσωματώματα (aggregates) που έχουν χάσει την φυσιολογική τους διαμόρφωση.

Μαθηματική ανάλυση του φάσματος 1, όπως φαίνεται από την καμπύλη 5 (Σχήμα 7.10) δείχνει ταινίες οι οποίες αποδίδονται στις apoA πρωτεΐνες. Φαίνεται δηλαδή ότι οι προστατευτικές apoA εκρέουν από τις HDL-πρωτεΐνες και εγκλωβίζονται στα λιπώδη συστατικά του αθηρώματος, παρεμποδίζοντας έτσι την ρύθμιση της HDL χοληστερόλης του αίματος, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη αφρωδών κυττάρων και τη συγκέντρωση αλάτων. Οι συνθήκες αυτές φαίνεται να μεταβάλλουν την φυσική κατάσταση των apoA και να επηρεάζουν μία σειρά από βιοχημικές αντιδράσεις. Οι συνθήκες αυτές φαίνεται να μεταβάλλουν την φυσική κατάσταση των apoA και να επηρεάζουν μία σειρά από βιοχημικές αντιδράσεις.

Γνωρίζουμε ότι οι λιποπρωτεΐνες, ανάλογα με την φυσιολογική κατάσταση στην οποία βρίσκονται, μεταβάλλουν το σχήμα και ότι τα αντιοξειδωτικά, τα αντιφλεγμονώδη σκευάσματα και γενικά οι ρυθμιστές της συμπεριφοράς τους διατηρούν την σφαιρική διάταξη [Tsompanidi et al., 2010], όπως φαίνεται στο Σχήμα 7.11.



Σχήμα 7.11: Σχηματική παράσταση της δομής των απολιποπρωτεϊνών: ABCA1 τρανσφεράσες που περιέχουν ATP-δεσμευτές και τρανσφεράσες λιπιδίων (λεκιθίνες) LCAT

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες πρέπει να είναι οι πρωταρχικές βασικές βιολογικές ενώσεις που λειτουργούν ως αποδέκτες ελευθέρων ριζών, με αποτέλεσμα την καταστροφή αρχικά της μοριακής δομής και στη συνέχεια της σχάσης της αλυσίδας τους. Επομένως, αν δεχθούμε την επίδραση των ελευθέρων ριζών, ως έναρξη των βλαβών, τότε η μεταβολή της δομής των απολιποπρωτεϊνών που παρατηρείται φασματοσκοπικά στις αθηρωματικές πλάκες των ασθενών είναι αναμενόμενη και πράγματι εξαρτάται, όπως διαπιστώθηκε, από το ιατρικό ιστορικό των ασθενών. Η υγιής κατάσταση θα αναφέρεται στην διάταξη εκείνη όπου φυσικοχημικά ανταποκρίνεται στην μικρότερη ενέργεια διαμόρφωσης.

Θα πρέπει να τονισθεί ότι και μετά την μαθηματική ανάλυση του φάσματος (Σχήμα 7.4) η ταινία στα 1548 cm⁻¹ είναι αρκετά διαπλατυσμένη και η μαθηματική ανάλυση στο σημείο αυτό δείχνει ότι είναι σύνθετη και εμπεριέχει την ταινία

1544 cm⁻¹. Η ταινία στα 1544 cm⁻¹ είναι χαρακτηριστική της Amide II απορρόφησης στην οποία συμμετέχει η δόνηση τάσης της ομάδας νC-N με την δόνηση κάμψης της ομάδας δN-H (νC–N+δN–H), λόγω της επίδρασης των λιπιδίων. Από την ανάλυση του φάσματος φαίνεται καθαρά ότι η αυξημένη χοληστερόλη στον ορό του αίματος επηρεάζει σημαντικά τους ενδομοριακούς δεσμούς των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την μεταβολή της δευτεροταγούς δομής των, δεδομένου ότι από διαμόρφωση α-έλικας μεταπίπτουν σε β-διαμόρφωση μέχρι ακόμη και σε τυχαία περιέλιξη, με πολύ αυξημένη χοληστερόλη.



Σχήμα 7.12: A: FT-IR φάσμα αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς στην περιοχή 1700-1600 cm⁻¹, B: μαθηματική ανάλυση του ιδίου φάσματος

Η μαθηματική ανάλυση του φάσματος στην περιοχή 1700-1600 cm⁻¹ δείχνει ότι τα αμινοξέα τυροσίνη, κυστεΐνη και αργινίνη που συμμετέχουν στην πρωτοταγή δομή της HDL και των αποπρωτεϊνών apoA-I και apoA-II παίζουν σημαντικό ρόλο στην δευτερογενή διαμόρφωση της έλικας (Σχήμα 7.12). Αυτό πρέπει να συνδεθεί και με τις παρατηρήσεις ερευνητών [Hevonoja et al., 2000] οι οποίοι διαπίστωσαν ότι οι απολιποπρωτεΐνες επηρεάζουν το μέγεθος των κυττάρων πολύ δε περισσότερο όταν έχουν διαταραχθεί. Επειδή παρατηρήθηκε ότι η δεύτερη παράγωγος δεν συμπίπτει απόλυτα με την deconvolution μαθηματική ανάλυση, συνάγεται το συμπέρασμα ότι στην περιοχή αυτή υπάρχουν περισσότερες δευτεροταγείς διαμορφώσεις των πρωτεϊνών, που συμπεριλαμβάνουν την β-αναδίπλωση και διαμόρφωση τυχαίας περιέλιξης. Ιδιαίτερα η κυστεΐνη συμμετέχει στην περιοχή της αναδίπλωσης της
έλικας. Μείωση της κυστεΐνης οδηγεί σε μετάβαση στην διαμόρφωση τυχαίας περιέλιξης. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και με την μείωση των ταινιών που αντιστοιχούν στις δονήσεις των C-S ομάδων και την παράλληλη αύξηση των S-S, όπως θα αναπτυχθεί παρακάτω.

Στο Σχήμα 7.13 αναλύεται η περιοχή του φάσματος μεταξύ 1500 και 1250 cm⁻¹. Διαπιστώνεται κυρίως από την μαθηματική ανάλυση (Σχήμα 7.13.B) ότι η ταινία στα 1450 cm⁻¹ αποτελείται από τις ταινίες 1469 cm⁻¹, 1453 cm⁻¹ και 1440 cm⁻¹, που αντιστοιχούν στις δονήσεις κάμψης των μεθυλ ομάδων δCH₃ των ανθρακικών αλυσίδων των λιπιδίων, στις δονήσεις τάσης των ομάδων του ανθρακικού ιόντος vCO_3^{-2} και στις δονήσεις κάμψης των μη ιοντικών ομάδων δCOOH. Η ταινία στα 1371 cm⁻¹ αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των συμπλόκων της ομάδας COO⁻ –μέταλλο και κάμψης της ομάδας δCH₂. Από την έντονη αύξηση της ταινίας στα 1469 cm⁻¹, η οποία αντιστοιχεί στην δόνηση κάμψης των δCH₃ ομάδων της ανθρακικής αλυσίδας των λιπιδίων, εξάγεται το συμπέρασμα ότι μειώθηκε το λιπόφιλο περιβάλλον της μεμβράνης.



Σχήμα 7.13: A: FT-IR φάσμα αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς στην περιοχή 1500-1250 cm⁻¹, B: μαθηματική ανάλυση του φάσματος

Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με το συμπέρασμα που εξήχθηκε από την αντίστοιχη αύξηση των ταινιών στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 3000-2870 cm⁻¹, όπου εμφανίζονται οι δονήσεις τάσης των ίδιων ομάδων, καθώς και με την παρουσία της ταινίας στα 1316 cm⁻¹, η οποία αποδίδεται στην δόνηση σείσης wCH₃ των ανθρακικών αλυσίδων. Επίσης, η παρουσία ταινιών που αντιστοιχούν στις απορροφήσεις των ανθρακικών ιόντων δείχνει τον σχηματισμό ανθρακικών αλάτων του ασβεστίου στις αθηρωματικές πλάκες των ασθενών.

Το εύρημα αυτό συμφωνεί και με τα δεδομένα της SEM-EDAX ανάλυσης των δειγμάτων, που δείχνουν μεγάλη συγκέντρωση ασβεστίου (Εικόνα 7.3).



Εικόνα 7.3: A: SEM αρχιτεκτονική απεικόνιση αθηρωματικής πλάκας στεφανιαίας αρτηρίας, **B:** SEM-EDAX στοιχειακή ανάλυση.

Περαιτέρω ανάλυση του φάσματος (Σχήμα 7.14) δείχνει την περιοχή του φάσματος όπου απαντώνται χαρακτηριστικές ταινίες που αποδίδονται σε ομάδες των προϊόντων υπεροξείδωσης. Όπως φαίνεται από το φάσμα η ταινία στα 1238 cm⁻¹ είναι σύνθετη και περικλείει την δόνηση τάσης των Amide III, των φωσφορικών ιόντων $v_{as}PO_2^-$ του DNA, αλλά και των ομάδων O-C(O)-C και O-C-C και των προϊόντων της αθηρωματικής πλάκας της στεφανιαίας αρτηρίας τα οποία απορρέουν από την υπεροξείδωση των μεμβρανών.



Σχήμα 7.14: A: FT-IR φάσμα αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς στην περιοχή 1250-900 cm⁻¹ B: μαθηματική ανάλυση του φάσματος

Η ταινία στα 1153 cm⁻¹ αποδίδεται στην δόνηση κάμψης δC-O των εστέρων. Η ταινία στα 1081 cm⁻¹ οφείλεται στην δόνηση τάσης των φωσφορικών ιόντων $vPO_2^$ του DNA και φωσφολιπιδίων. Η άποψη αυτή ενισχύεται με την παρουσία της ταινίας των δονήσεων αιώρησης ρPO_2^- (rocking vibrations) που εμφανίζεται στα 971 cm⁻¹ (Theophanides, 1984).

Οι Suzuki [Suzuki et al., 1963] και Tsuboi [Tsuboi et al., 1963] διαπίστωσαν ότι οι ταινίες στην περιοχή 1040-1000 cm⁻¹ περιέχουν τις δονήσεις των χαρακτηριστικών ομάδων της γλυκίνης και της δόνησης τάσης των ομάδων vC-N των αμινοξέων.

Στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 700 cm⁻¹ και 500 cm⁻¹ (Σχήμα 7.15) απαντώνται οι ταινίες απορρόφησης των θειολών, αλλά και της οξειδωμένης τους κατάστασης, των δεσμών S–S. Η ταινία στα 655 cm⁻¹ αποδίδεται στον δεσμό vC–S [Compagnini et al., 1996, Theophanides et al., 1988].



Σχήμα 7.15: Α: FT-IR φάσμα αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς στην περιοχή 950-400 cm⁻¹; **B**: μαθηματική ανάλυση του φάσματος

Η παρουσία στο φάσμα (Σχήμα 7.15) των χαρακτηριστικών ομάδων S-S δείχνει ότι οι φυσικές θειόλες του οργανισμού έχουν οξειδωθεί για να αντιμετωπισθεί το οξειδωτικό στρες που προκαλούσε ο οργανισμός του ασθενούς. Εξ άλλου βιβλιογραφικά δεδομένα ενισχύουν την άποψη ότι η κυστεΐνη είναι το πλέον ευαίσθητο αμινοξύ των πρωτεϊνών [D'Alessandro et al., 2011]. Οι θειόλες (GSH) έχουν αποδειχθεί ότι αντιδρούν ως ανταγωνιστές των ελευθέρων ριζών (scavengers) επειδή πολύ εύκολα δίνουν το ευκίνητο υδρογόνο του μορίου τους προκειμένου να αντιμετωπίσουν τις παραγόμενες ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου (αντίδραση [17]).

$$GSH + HO^{\bullet} \rightarrow GS^{\bullet} + H_2O$$
[17]

Η δέσμευση των ελευθέρων ριζών υδροξυλίου από τις θειόλες τις παρεμποδίζει να αντιδράσουν με τα λιπίδια και επομένως δεν αρχίζει η αλυσιδωτή αντίδραση ανάπτυξης των ελευθέρων ριζών των βιολογικών μορίων [Αναστασοπούλου, 1978].

Επίσης επειδή το άτομο του υδρογόνου είναι ευκίνητο μπορεί εύκολα να το διαθέσει στις παραγόμενες ρίζες των λιπιδίων και να επιδιορθώσει την βλάβη που είχε προξενηθεί.

$$GSH + L^{\bullet} \rightarrow LH + GS^{\bullet}$$
^[18]

Οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες των θειολών σε κάθε περίπτωση διμερίζονται και παρέχουν διθειόλες.

$$2GS^{\bullet} \rightarrow GS-SG$$
 [19]

Οι αντιδράσεις [17] μέχρι [19] ερμηνεύουν την εμφάνιση των ταινιών απορρόφησης των ομάδων S-S στο φάσμα των αθηρωματικών πλακών των αρτηριών.

7.2. Ισοτοπικό αποτέλεσμα

Τα ευρήματα των φασματοσκοπικών δεδομένων επέβαλαν την μελέτη των αθηρωματικών πλακών με βάση το ισοτοπικό αποτέλεσμα. Για τον σκοπό αυτό τοποθετήθηκαν τα δείγματα σε δευτεριωμένο νερό (D₂O). Με τον τρόπο αυτό γίνεται ανταλλαγή των ευκίνητων ατόμων υδρογόνου των βιολογικών μορίων από άτομα δευτερίου (D).

Στο Σχήμα 7.16 φαίνεται το FT-IR φάσμα αθηρωματικής πλάκας στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς πριν την επεξεργασία με δευτεριωμένο νερό (Σχήμα 7.16.1) και μετά την δευτερίωση (Σχήμα 7.16.2).



Σχήμα 7.16: FT-IR φάσμα αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς, στην περιοχή 4000-700 cm⁻¹ 1: πριν τη δευτερίωση 2: μετά την δευτερίωση

Συγκρίνοντας τα δύο φάσματα διαπιστώνεται ότι η ένταση των ταινιών του φάσματος στην περιοχή 4000-3000 cm⁻¹ πριν από την επεξεργασία με δευτεριωμένο νερό (καμπύλη 1) μειώνεται σημαντικά μετά την δευτερίωση (καμπύλη 2), αλλά δεν εξαφανίζεται. Αυτό σημαίνει ότι έγινε μερική ανταλλαγή των ατόμων υδρογόνου από τα ισότοπα του δευτερίου. Στο FT-IR φάσμα της αθηρωματικής πλάκας μετά την δευτερίωση (καμπύλη 2) εμφανίζεται μια νέα πλατιά ταινία στην περιοχή 2700-2200 cm⁻¹. Όπως φαίνεται από την καμπύλη 2 του Σχήματος 7.15, διαπιστώνεται ότι οι ταινίες που εμφανίζονται στην πλατιά περιοχή μεταξύ 3600 cm⁻¹ και 2415

$$cm^{-1}$$
 κατά $\frac{vOH}{vOD} = 1,3$ και $\frac{vNH}{vND} = 1,3$.

Για τον υπολογισμό των μετατοπίσεων των συχνοτήτων προς τις μικρότερες συχνότητες των ταινιών μετά την δευτερίωση χρησιμοποιείται η μαθηματική σχέση (6), που εκφράζει την συχνότητα του διατομικού μορίου.

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \tag{6}$$

όπου k: σταθερά του δεσμού (bond constant) και μ: ανοιγμένη μάζα (reduced mass)

Ως διατομικό μόριο θεωρείται στην περίπτωσή μας ο δεσμός OH και OD, ή NH και ND, όπου το δευτέριο και το υδρογόνο είναι ισότοπα του ιδίου στοιχείου και επομένως έχουμε την ισοτοπικό αποτέλεσμα (isotopic effect) [Θεοφανίδης κ.α., 1987, Θεοφανίδης & Αναστασοπούλου, 1998]. Σύμφωνα με την μαθηματική σχέση (6), η μετατόπιση της συχνότητας δόνησης μιας δεδομένης ομάδας, θα πρέπει να αντιστοιχεί στο πηλίκο συχνοτήτων δόνησης της πριν και μετά την δευτερίωση και να ισούται με $\sqrt{2}$. Στην περιοχή αυτή εμφανίζονται οι δονήσεις τάσης των ομάδων vOH τόσο του νερού των ιστών όσο και των ομάδων vOH που προέκυψαν από την προσθήκη των ελευθέρων ριζών υδροξυλίου στους διπλούς δεσμούς των ακόρεστων ομάδων C=C των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Εφαρμόζοντας στην σχέση (6) διαπιστώνεται ότι η κάθε μια από τις μετατοπίσεις αυτές αντιστοιχεί σε πηλίκο:

$$\frac{\text{vOH}}{\text{vOD}} = 1,3\tag{7}$$

που πλησιάζει πολύ την θεωρητική τιμή της τετραγωνικής ρίζας του δύο (√2) της ισοτοπικής μετατόπισης [Θεοφανίδης κ.α., 1987, Θεοφανίδης & Αναστασοπούλου, 1998].

Εφαρμόζοντας την σχέση (6) και για τις ταινίες στα 3386 cm⁻¹ και 3332 cm⁻¹, οι οποίες αποδίδονται στις δονήσεις τάσης των αμινομάδων NH, παρατηρούμε ότι μετατοπίζονται στα 2471 cm⁻¹ και 2415 cm⁻¹, αντίστοιχα. Η κάθε μια από τις μετατοπίσεις αυτές αντιστοιχεί σε πηλίκο:

$$\frac{vNH}{vND} = 1.3$$
(8)

που επίσης πλησιάζει πολύ την θεωρητική τιμή της τετραγωνικής ρίζας του δύο (√2) της ισοτοπικής μετατόπισης [Θεοφανίδης & Αναστασοπούλου, 1998]. Παρατηρείται δηλαδή ότι τα ευκίνητα άτομα υδρογόνου των αμιδίων των πρωτεϊνών των μεμβρανών αντικαταστάθηκαν με άτομα δευτερίου. Η μετατόπιση αυτή διαπιστώνεται ότι ακολουθεί τους θεωρητικούς υπολογισμούς. Οι θέσεις των μετατοπισμένων ταινιών φαίνονται στο Σχήμα 7.17.



Σχήμα 7.17: 1: FT-IR φάσμα δευτεριωμένου αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς, στην περιοχή 2200- 2750 cm⁻¹ 2: μαθηματική ανάλυση του ιδίου φάσματος.

Στην περιοχή του φάσματος 1800 cm⁻¹ μέχρι 700 cm⁻¹ παρατηρούνται επίσης σημαντικές μεταβολές μετά την δευτερίωση. Στην περιοχή όμως αυτή δεν μπορεί να

χρησιμοποιηθεί η σχέση (6). Διαπιστώνεται όμως ότι οι ταινίες που έχουν επηρεαστεί περιέχουν την ομάδα NH και ανήκουν στον πεπτιδικό δεσμό. Διαπιστώνεται ότι η ταινία στα 1735 cm⁻¹ δεν επηρεάζεται από την δευτερίωση. Αυτό σημαίνει ότι οι καρβονυλικές ομάδες C=O δεν επηρεάζονται από την δευτερίωση. Η ταινία των Amide II στα 1559 cm⁻¹ υφίσταται μεγαλύτερη μεταβολή έναντι της ταινίας των Amide I. Αυτό συμβαίνει επειδή στις ομάδες των Amide II το υδρογόνο που συνδέεται με το άτομο του αζώτου (δNH–CO) δονείται εκτός του επιπέδου δNH (bending, κάμψη).

Η εξαφάνιση της πλατιάς ταινίας στα 1700 cm⁻¹ μετά την δευτερίωση δείχνει την μεταβολή της δομής των απολιποπρωτεϊνών, αν και από την μαθηματική ανάλυση επιβεβαιώνεται, όπως προαναφέρθηκε, ότι η αντικατάσταση των ατόμων υδρογόνου από άτομα δευτερίου δεν ήταν πλήρης. Από αυτές τις σημαντικές μεταβολές στα υπέρυθρα φάσματα φαίνεται ότι οι αλλαγές της μοριακής δομής των πρωτεϊνών μεταφέρονται και στις διεπιφάνειες πρωτεϊνών-λιπιδίων.

Η ένταση της ταινίας στα 1453 cm⁻¹ παραμένει μετά την δευτερίωση (Σχήμα 7.18), που συνεπάγεται ότι η ταινία αυτή αποδίδεται στις δονήσεις κάμψης των ομάδων δCH₂, δεδομένου ότι τα άτομα υδρογόνου των αλειφατικών αλυσίδων δεν αντικαθίστανται από άτομα δευτερίου. Η μετατόπιση όμως της ταινίας των 1463 cm⁻¹ δείχνει ότι η ταινία αυτή αποδίδεται στις χαρακτηριστικές ομάδες των Amide II των πεπτιδικών δεσμών.



Σχήμα 7.18: FT-IR φάσμα αθηρώματος στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς στην περιοχή 1500-1300 cm⁻¹ 1: πριν τη δευτερίωση 2: μετά την δευτερίωση

Στο Σχήμα 7.19 φαίνεται η περιοχή του φάσματος από τα 1275 cm⁻¹ έως 1140 cm⁻¹ επειδή ενδιαφέρει η συμπεριφορά των Amide III, δηλαδή η επίδραση της δόνησης των ομάδων N-H και C-N του πεπτιδικού δεσμού. Παρατηρείται μετά την δευτερίωση (Σχήμα 7.19, καμπύλη 2) σημαντική μεταβολή της ταινίας στα 1231 cm⁻¹ περίπου, δείχνοντας και πάλι ότι η ένταση της ταινίας των Amide III μειώνεται σημαντικά.



Σχήμα 7.19: FT-IR φάσματα αθηρωματικής πλάκας ασθενούς στην περιοχή 1275-1140 cm⁻¹, **1:** πριν την δευτερίωση και **2:** μετά την δευτερίωση.

Η μεταβολή της ταινίας απορρόφησης Amide III δίνει σημαντικές πληροφορίες για τον πεπτιδικό δεσμό. Αναφέρεται από την ομάδα Theophanides (1988) [Theophanides et al., 1988] ότι όταν η ένταση της ταινίας των Amide III εμφανίζεται περίπου στις θέσεις 1260 cm⁻¹, 1250 cm⁻¹και 1231 cm⁻¹ οι πρωτεΐνες έχουν διαμόρφωση α-έλικας, δομής τυχαίας περιέλιξης και β-επίπεδο (β-sheet), αντίστοιχα.



Σχήμα 7.20: Σχηματική παράσταση της περιορισμένης ηλεκτρονιακής δομής του πεπτιδικού δεσμού

Από την μείωση της ταινίας στα 1231 cm⁻¹ φαίνεται ότι υπάρχουν πρωτεΐνες με διαμόρφωση β-επιπέδου.

7.3. Μηχανισμός έναρξης αθηρωματικών βλαβών

Για την διαδικασία έναρξης της αθηρωματικής πλάκας έχουν αναπτυχθεί κατά καιρούς διάφορες επιστημονικές απόψεις που αντιστοιχούσαν στην κατάσταση των εκάστοτε μελετώμενων ομάδων ασθενών. Η έναρξη σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας είναι δυνατόν να γίνει λόγω του τραυματισμού του ενδοθηλίου από βιολογικούς, χημικούς ή φυσικούς παράγοντες [Ramos et al., 2007]. Μεταξύ των αιτίων που προκαλούν τραυματισμό συμπεριλαμβάνονται η αύξηση και η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL), οι δημιουργούμενες από το κάπνισμα και το οξειδωτικό στρες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, η αρτηριακή υπέρταση, η μηχανική τάση που ασκείται κατά την καρδιακή συστολή, ο σακχαρώδης διαβήτης, γενετικοί παράγοντες, καθώς επίσης και η αύξηση της ομοκυστεΐνης του πλάσματος. Πρωτεύοντα όμως ρόλο διαδραματίζει η οξειδωμένη LDL και τα παράγωγά της οξειδωμένα φωσφολιπίδια και οξυστερόλες. Άλλοι δευτερεύοντες παράγοντες μπορούν να ευθύνονται για την έναρξη της αθηρογένεσης, είναι όμως αμφίβολο αν μπορούν να την προκαλέσουν, χωρίς την παρουσία υπερχοληστερολαιμίας [Paoletti et al., 2004]. Γενικά όλες αυτές οι οξειδωτικές καταστάσεις εκφράζονται με τον γενικό όρο οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες έχει συνδεθεί επίσης με αστάθεια του DNA και τροποποιήσεις στη μεθυλίωσή του, μεταλλάξεις σε επανορθωτικά γονίδια (repair genes), τροποποίηση διαφόρων μακρομορίων και απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Φαίνεται ότι το οξειδωτικό στρες επάγει την έκφραση πρωτεϊνών, που δεν απαντώνται φυσιολογικά στα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η ενεργοποίηση μίας μιτογόνου πρωτεϊνικής κινάσης της P_{38} (P_{38} mitogen activated protein kinase–MAPK), η οποία με τη σειρά της προάγει την ανεξέλεγκτη κυτταρική μετανάστευση, αύξηση και απόπτωση.

Στον ανθρώπινο οργανισμό κατά την διάρκεια του μεταβολισμού ή του οξειδωτικού στρες παράγονται ελεύθερες ρίζες δηλαδή χημικά είδη (chemical species), τα οποία φέρουν μονήρες ηλεκτρόνιο, όπως (•OH, O₂-•) και τα οποία οδηγούν στην καταστροφή πολλών ζωτικών βιολογικών μορίων με αποτέλεσμα την εμφάνιση σειράς ασθενειών [Britton & Bacon, 1994, Kennedy et al., 1984, Vistnes et al., 1983]. Μία από τις πιο σημαντικές δράσεις των ελεύθερων ριζών είναι η καταστροφή των αλυσίδων των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών του κυττάρου, ιδιαίτερα αυτών που βρίσκονται στις μιτοχονδριακές μεμβράνες, οι οποίες βρίσκονται εκτεθειμένες σε ανιόντα υδροϋπεροξυλίου που παράγονται κατά την αναπνοή του κυττάρου [Yoshida et al., 1993].

Η παρουσία των ιόντων σιδήρου (Fe^{2+} , Fe^{3+}) στο αίμα, του χαλκού (Cu^+ , Cu^{2+}) των χαλκοπρωτεϊνών και τοξικά μεταλλικά ιόντα μεταβατικών μετάλλων αποτελούν τους βασικούς παράγοντες έναρξης σχηματισμού ελευθέρων ριζών σύμφωνα με τις αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss (αντιδράσεις [20]-[22]) [Theophanides & Anastassopoulou, 2002].

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + OH^{-}$$
^[20]

$$O_2^{-\bullet} + Cu^{2+} \rightarrow Cu^+ + O_2$$
[21]

$$Cu^{+} + H_2O_2 \rightarrow Cu^{2+} + OH + OH^{-}$$
[22]

Τόσο οι αφυδρογονάσες (dehydrogenase) όσο και οι παραγόμενες από την αντίδραση ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου αντιδρούν με τα λιπίδια με αντίδραση απόσπασης ατόμων υδρογόνου σύμφωνα με την αντίδραση [23]:



Η παραγόμενη από την αντίδραση [23] ελεύθερη ρίζα ανασχηματίζεται ταχύτατα:



Οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες από την αντίδραση [24] συνήθως είτε διμερίζονται προς σταθερά προϊόντα, σύμφωνα με την αντίδραση [25]:

Είτε παρέχουν αντιδράσεις δυσαναλόγησης, όπου παράγεται το αρχικό μόριο $(R-CH_2-CH_3)$ και ένα μόριο με ένα άτομο υδρογόνου λιγότερο $(R-CH=CH_2)$ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση [26]:

$$2 \xrightarrow{R} R \xrightarrow{R-CH=CH_2+R-CH_2-CH_3} [26]$$

Το παραγόμενο προϊόν (R–CH=CH₂) αντιστοιχεί με την εμφάνιση στο FT-IR φάσμα της χαρακτηριστικής ταινίας στα 3080 cm⁻¹, η οποία αποδίδεται στην τερματική ολεφινική ομάδα, =CH₂.

Επειδή όμως ο ανθρώπινος οργανισμός ζει κάτω από αερόβιες συνθήκες, το οξυγόνο, ως ελεύθερη δίριζα (·O–O·), αντιδρά ταχύτατα με τις σχηματιζόμενες ρίζες των λιπιδίων ή άλλων οργανικών μορίων (κολλαγόνο, ελαστίνη, κλπ) οι οποίες σχηματίζουν υπεροξείδια. Η αντίδραση του οξυγόνου με τις ελεύθερες ρίζες των λιπιδίων ελέγχεται από την αντίδραση διάχυσης (diffusion control reaction), δηλαδή η σταθερά ταχύτητας είναι της τάξεως 10^{10} M⁻¹sec⁻¹.



alkoo•

Οι προκύπτουσες υπερόξυ ελεύθερες ρίζες δεν είναι σταθερές και προσλαμβάνουν ταχύτατα ευκίνητα άτομα υδρογόνου από ενώσεις του οργανισμού (π.χ. διπλανά λιπίδια, θειόλες) και παρέχουν τελικά υδροϋπερόξυ ομάδες (-C-O-OH), οι οποίες δεν είναι ιοντικές και που στο υπέρυθρο φάσμα εντοπίζονται στα 1440 cm⁻¹.



Οι αντιδράσεις των υδροϋπερόξυ ενώσεων διαπιστώθηκε ότι είναι αρκετά σημαντικές για τους ζώντες οργανισμούς, δεδομένου ότι καταλήγουν σε μια σειρά από αλυσιδωτές αντιδράσεις παραγωγής δευτερογενών τοξικών προϊόντων σύμφωνα με την αντίδραση:

$$alk-O-O-H + alk-O-O--H + (alk-O) + (alk-O) + (alk'-O-O) + (alk'-O-O)$$

Ο μηχανισμός αυτός πιστεύεται ότι λαμβάνει χώρα στον οργανισμό κατά την πρώτη φάση οξείδωσης του αραχιδονικού οξέος από την προσταγλανδίνη Η συνθεσάση.



Γενικά, η παραγωγή υδροϋπερόξυ μορίων μπορεί να προκύψει και από άλλα μεταβατικά μέταλλα, σύμφωνα με την γενική αντίδραση όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 7.21):



Σχήμα 7.21: Σχηματική παράσταση των αλυσιδωτών αντιδράσεων οξειδοαναγωγής που λαμβάνουν χώρα στον οργανισμό παρουσία μεταλλικών ιόντων [Αναστασοπούλου, 2003]

Εξ άλλου, όπως φάνηκε από την SEM-EDAX ανάλυση τα αθηρώματα των ασθενών είτε αυτά προέρχονται από καρωτίδες είτε από στεφανιαίες αρτηρίες περιείχαν τοξικά μέταλλα, όπως χρώμιο, χαλκό, μόλυβδο, νικέλιο, άργυρο κ.ά., όπως θα φανεί παρακάτω. Στην Εικόνα 7.4 φαίνεται η αρχιτεκτονική τοπολογική διαμόρφωση της αθηρωματικής πλάκας, όπως καταγράφηκε από την SEM ανάλυση, ενώ η EDAX καταγραφή των στοιχείων (Πίνακας 7.2) δείχνει ότι το αθήρωμα του ασθενούς περιέχει χρώμιο, νικέλιο, μαγγάνιο και σίδηρο. Ο Πίνακας 7.2 δίνει την σύσταση και την επί τοις εκατό αναλογία των βαρών και ατομικών βαρών των στοιχείων του μελετώμενου ασθενούς. Τα μεταλλικά στοιχεία που απαντήθηκαν στα αθηρώματα ανήκουν στην κατηγορία των μεταβατικών μετάλλων και επομένως μπορούν να δώσουν αντιδράσεις τύπου Fenton και Haber-Weiss, οι οποίες οδηγούν σε οξειδωτικό στρες.



Εικόνα 7.4: SEM-EDAX ανάλυση αθηρωματικής πλάκας ασθενούς. Με το βέλος τονίζεται η θέση ανίχνευσης του χρωμίου. Ανιχνεύονται επίσης νικέλιο, μαγγάνιο και σίδηρος

Elem	Wt %	At %
СК	57.70	77.92
O K	8.82	8.94
F K	5.38	4.59
NaK	0.50	0.35
ClK	0.61	0.28
CrK	3.71	1.16
MnK	0.21	0.06
FeK	23.07	6.70
Total	100.00	100.00

Πίνακας 7.2: SEM-EDAX στοιχειακή ανάλυση και η % Wt και κατά At σύσταση αθηρωματικής πλάκας ασθενούς

Οι σχηματιζόμενες ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου μπορούν να αποσπάσουν άτομα υδρογόνου από άλλες θέσεις του τριγλυκεριδίου ή φωσφολιπιδίου και να σχηματισθεί κυκλική ενδο-υπερόξυ ρίζα. Η ρίζα αυτή μπορεί στη συνέχεια να αντιδράσει και πάλι με το μοριακό οξυγόνου του κυττάρου και να δώσει σειρά άλλων προϊόντων (Σχήμα 7.22).



Σχήμα 7.22: Παράσταση σχηματισμού ενδο-ϋπεροξειδίου και υπερ-ενδο-ϋπερόξυ ελευθέρων ριζών

Τα προϊόντα της σειράς των αντιδράσεων (Σχήμα 7.22) αναζητούνται στην περιοχή του υπέρυθρου φάσματος μεταξύ 1070-1230 cm⁻¹.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η μελέτη της επίδρασης των ελευθέρων ριζών στα οιστρογόνα. Είναι γνωστό ότι τα οιστρογόνα επηρεάζουν το επίπεδο της χοληστερόλης του αίματος. Η έναρξη των παραπάνω αντιδράσεων σχηματισμού υπερόξυ ελευθέρων ριζών των φωσφολιπιδίων ή τριγλυκεριδίων ενισχύεται στον οργανισμό από την παρουσία ιόντων σιδήρου (Fe²⁺) ή άλλων μεταβατικών μετάλλων, επειδή, όπως προαναφέρθηκε συμβάλλουν στην έναρξη αντιδράσεων τύπου Fenton.

Από τις μετατοπίσεις των ταινιών που αποδίδονται στις ομάδες Amide I προς μικρότερους κυματαριθμούς, διαπιστώνεται ότι επειδή χάνεται το λιπόφιλο περιβάλλον, οι πρωτεΐνες των στεφανιαίων αρτηριών χάνουν την διαμόρφωση και από α-έλικα αποκτούν δομή τυχαίας περιέλιξης [Mamarelis et al., 2011, Pissaridi et al., 2011, Μαμαρέλης κ.α., 2011]. Με βάση τις ιδιότητες των ελευθέρων ριζών είναι εύκολο να ερμηνευθεί η μεταβολή της μοριακής διαμόρφωσης των πρωτεϊνών από α-έλικα σε διαμόρφωση τυχαίας περιέλιξης. Τόσο η απόσπαση ατόμων υδρογόνου από τις αλυσίδες των πρωτεϊνών αλλά κυρίως η αντίδραση των ηλεκτρονίων στις θέσεις C=O των πεπτιδικών δεσμών καταστρέφει τους δεσμούς υδρογόνου.

Διαπιστώνεται, ότι οι βιολογικοί, χημικοί και φυσικοί τοξικοί παράγοντες συχνά αλληλεπιδρούν με εξειδικευμένες μοριακές λειτουργίες, που επηρεάζουν τις κυτταρικές λειτουργίες του αγγειακού τοιγώματος. Αν ο βαθμός της τραυματικής αυτής διαταραχής των μοριακών και κυτταρικών λειτουργιών είναι μικρός, η προκαλούμενη βλάβη μπορεί να περάσει απαρατήρητη και να μην έχει άμεσες παθολογικές συνέπειες. Ο σοβαρότερος, όμως, τραυματισμός συνοδεύεται από κυτταρικό θάνατο (απόπτωση ή νέκρωση), καταστροφή της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (matrix) και έναρξη της διαδικασίας της αρτηριακής αναδιαμόρφωσης, που γαρακτηρίζει πιο προγωρημένα στάδια αθηρωμάτωσης. Έχει διαπιστωθεί ότι τα συστατικά της θεμέλιας ουσίας που έχουν υποστεί οξειδωτική βλάβη αλληλεπιδρούν με τα λεία μυϊκά κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος, επάγοντας φαινοτυπικές μεταβολές, με τελικό αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους και την αύξηση του μεγέθους των αθηρωματικών βλαβών. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται ότι το τελικό αποτέλεσμα του ενδοθηλιακού τραυματισμού είναι η γενετική και φαινοτυπική τροποποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος, τα οποία μεταπίπτουν από σχετικά αδρανείς σε λιγότερο διαφοροποιημένες μορφές. Έτσι, γίνονται ιδιαίτερα μιτογόνα, αναπαράγονται με αυξημένους ρυθμούς, και αποκτούν τη δυνατότητα μετανάστευσης και παραγωγής κολλαγόνου. Διαπιστώνουμε, επομένως, ότι οι τραυματικοί παράγοντες που βλάπτουν το ενδοθήλιο, όχι μόνο πυροδοτούν την έναρξη, αλλά συντηρούν και την εξέλιξη της αθηρωματικής διαδικασίας, που θα περιγραφεί παρακάτω [Ramos et al., 2007].

Τέλος από τα παραπάνω φασματοσκοπικά δεδομένα φαίνεται ότι τα παραγόμενα προϊόντα οξείδωσης των αθηρωματικών πλακών μπορούν να περιληφθούν στο Σχήμα 7.23. Οι διασταυρούμενοι πολυμερισμοί μπορούν να προέλθουν από τις αντιδράσεις είτε μεταξύ ελευθέρων ριζών λιπιδίου με λιπίδιο, πρωτεΐνης με πρωτεΐνη και πρωτεΐνης-λιπιδίου. Τα προϊόντα αυτά σχηματίζουν τα ινίδια, τα οποία προσδίδουν στην αρτηρία την ακαμψία. Στην κλασσική χημεία και τεχνολογία των πολυμερών αναφέρεται ότι οι διασταυρούμενοι πολυμερισμοί παρέχουν τους πιο ισχυρούς δεσμούς.



Σχήμα 7.23: Σχηματική παράσταση των προϊόντων οξείδωσης των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων, που αναπτύσσουν την περιοχή των αφρωδών κυττάρων

Η σχάση των αλυσίδων των πρωτεϊνών διαπιστώθηκε όχι μόνον έμμεσα από την μεταβολή των υπέρυθρων φασμάτων στην περιοχή 1700-1500 cm⁻¹ αλλά και με SEM ανάλυση, όπως δίνεται στην Εικόνα 7.5.



Εικόνα 7.5: Ανάλυση SEM της επιφάνειας αθηρωματικής πλάκας στεφανιαίας αρτηρίας ασθενούς (κλίμακα 100 μm).

Η esr φασματοσκοπία [Jones et al., 2002] έδειξε ότι οι υπερόξυ ελεύθερες ρίζες και οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου είναι οι κυριότερες ελεύθερες ρίζες που αντιδρούν με τις γλουταθειόλες GSH και παράγουν δισουλφίδια (GS-SG).

$$GSH + O_2^{\bullet} + H^+ \rightarrow GS^{\bullet} + H_2O_2$$
[31]

$$2GS^{\bullet} \rightarrow GS - SG$$
 [32]

7.4. Σύγκριση φασμάτων αθηρωματικών πλακών στεφανιαίων και καρωτίδων αρτηριών

Προκειμένου να δούμε αν τα υπέρυθρα φάσματα των αθηρωματικών πλακών των στεφανιαίων αρτηριών εμφανίζουν κοινά στοιχεία με τα αντίστοιχα υπέρυθρα φάσματα αθηρωματικών πλακών που λήφθηκαν από καρωτίδες αρτηρίες τοποθετήσαμε για σύγκριση τα δύο φάσματα (Σχήμα 7.24).



Σχήμα 7.24: FT-IR φάσματα **1:** στεφανιαίας αρτηρίας και **2:** καρωτίδας αρτηρίας στην περιοχή 4000-900 cm⁻¹.

Από την σύγκριση των δύο φασμάτων διαπιστώνεται ότι εμφανίζουν μεταξύ τους σημαντικές διαφορές σε όλο τους το εύρος. Φαίνεται ότι οι εντάσεις των ταινιών των συμμετρικών και αντισυμμετρικών τάσεων των μεθυλ και μεθυλενομάδων vCH₃ και vCH₂ είναι περισσότερο έντονες στην περίπτωση της στεφανιαίας αρτηρίας, έναντι της καρωτίδας. Η αύξηση της έντασης των ταινιών αυτών για την στεφανιαία αρτηρία δείχνει ότι το περιβάλλον έγινε λιγότερο λιπόφιλο και επομένως η ευκινησία

των μεμβρανών διαταράχθηκε σημαντικά. [Anastassopoulou, 1991, Anastassopoulou & Theophanides, 1990]. Από τις μετατοπίσεις των ταινιών που αποδίδονται στις ομάδες Amide I προς μικρότερους κυματαριθμούς, διαπιστώνεται ότι οι πρωτεΐνες των στεφανιαίων αρτηριών μεταβάλουν την δευτεροταγή δομή τους και από α-έλικα αποκτούν δομή τυχαίας περιέλιξης. [Anastassopoulou et al., 2008, Mamarelis et al., 2010, Kolovou & Anastassopoulou, 2007]. Σημαντικές είναι οι διαφορές των φασμάτων στην περιοχή 1100-900 cm⁻¹. Στην περιοχή αυτή φαίνεται (Σχήμα 7.24) ότι οι στεφανιαίες αρτηρίες έχουν υποστεί έντονη υπεροξείδωση, όπως προκύπτει από τις ταινίες των αλδεϋδικών ομάδων C-O-C. Εξ άλλου αυτό το αποτέλεσμα συμφωνεί και με τα όσα έγιναν αποδεκτά στις άλλες περιοχές του φάσματος. Αντίθετα με τις καρωτίδες αρτηρίες, στις στεφανιαίες αρτηρίες επικρατούν οι δονήσεις των φωσφορικών ομάδων των φωσφολιπιδίων και του DNA [Theophanides & Tajmir-Riahi, 1984].

Στην Εικόνα 7.6.Α και 7.6.Β φαίνονται οι SEM εικόνες της στεφανιαίας και καρωτίδας αρτηρίας, αντίστοιχα. Η Εικόνα 7.6.Α δείχνει την αρχιτεκτονική που παρουσιάζουν οι στεφανιαίες αρτηρίες και είναι πλούσια σε ασβέστιο και σφαιρίδια λίπους. Η Εικόνα 7.6.Β δείχνει την αρχιτεκτονική που παρουσιάζουν τα αφρώδη κύτταρα στην μεμβράνη της καρωτίδας. Διαπιστώνεται ότι η περιοχή είναι αυξημένη σε φωσφολιπίδια και πλούσια σε άλατα. Η περιοχή αυτή της καρωτίδας από την ανάλυση φαίνεται να αποτελεί τον πυρήνα για την έναρξη της αθηρωματικής πλάκας [Ramos et al., 2007].



Εικόνα 7.6: A: SEM τοπολογική απεικόνιση της μεμβράνης στεφανιαίας αρτηρίας. Μεγέθυνση 300 μm. B: SEM τοπολογική εξέταση μεμβράνης καρωτίδας αρτηρίας στην περιοχή των αφρωδών κυττάρων. Μεγέθυνση 1mm.

Η εικόνα αυτή επιβεβαιώνεται και φασματοσκοπικά στις περιοχές 3100-2850 cm⁻¹ όπου εμφανίζονται οι περιοχές που είναι πλούσιες σε συσσωματώματα λιπιδίων και από τις μεταβολές στην περιοχή 1200-900 cm⁻¹, όπου απορροφούν οι δονήσεις τάσης των ομάδων PO_2^- , των φωσφοδιεστέρων και φωσφολιπιδίων (Σχήμα 7.25).



Σχήμα 7.25: Περιοχές του FT-IR φάσματος που λαμβάνονται υπόψη για την εκτίμηση της αθηρωματικής εξέλιξης του ασθενούς 1: στεφανιαία αρτηρία και 2: καρωτίδα αρτηρία

Οι παραπάνω περιοχές του φάσματος εξαρτώνται σημαντικά από την κλινική κατάσταση των ασθενών. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η έναρξη της αθηρωμάτωσης γίνεται στην περιοχή των αφρωδών κυττάρων (foam cells) και επομένως αναμένεται η περιοχή αυτή να αντιστοιχεί σε ζώνη της αθηρωματικής πλάκας, πλούσια δηλαδή σε φωσφολιπάσες (L_p-PLA₂). Το ένζυμο L_p-PLA₂ υδρολύει τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια προς λυσοφωσφατιδυλχολίνη και αποτελεί σημαντικό αίτιο κινδύνου για αθηρογένεση. [Hansson, 2005, Hansson & Libby, 2006, Mahmoudi et al., 2007, Paoletti et al., 2004, Prasad et al., 2002, Ramos et al., 2007, Shaskin et al., 2005, Steinberg, 2002, Ward et al., 2000, Williams et al., 2008]. Οι περιοχές των αφρωδών κυττάρων διαπιστώθηκε ότι είναι πλούσιες σε μέταλλα. Γενικά, τα μέταλλα μπορούν να βρίσκονται ως "ελεύθερα ιόντα" ή να σχηματίζουν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες ή να σχηματίζουν χηλικούς δεσμούς (μεταβολίτες, συνένζυμα) ή να συνδέοντα άμεσα με τα βιομόρια. Σε μερικούς ασθενείς, όπως προαναφέρθηκε βρέθηκαν τοξικά μέταλλα και βαρέα μέταλλα (Pb, Ag, Cu) τα οποία, όπως προέκυψε από το ιατρικό τους ιστορικό, ήταν συνάρτηση του εργασιακού τους περιβάλλοντος.

Τα μεταλλικά ιόντα Pb, Ag, Cu εισερχόμενα στον ανθρώπινο οργανισμό μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες. Τα μεταλλικά ιόντα είναι δυνατόν να προκαλέσουν τις αυτοκαταλυόμενες αντιδράσεις υπεροξείδωσης των λιπιδίων:

$$LHOOH + M^{n+} \rightarrow LHO^{\bullet} + OH^{-} + M^{(n+1)+}$$
[33]

Οι σχηματιζόμενες ελεύθερες ρίζες μπορούν με απόσπαση ατόμου υδρογόνου από γειτονικό λιπίδιο να μεταφέρουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών προς το περιβάλλον.

$$LHO^{\bullet} + L''H \rightarrow LHOH + L''H^{\bullet}$$
[34]

Οι νέες ελεύθερες ρίζες αντιδρώντας με το μοριακό οξυγόνο σχηματίζουν υπεροξείδια,

$$L''H^{\bullet} + O_2 \rightarrow L''HOO^{\bullet}$$
[35]

τα οποία με την σειρά τους διαδίδουν τον ευρύτερο σχηματισμό ελευθέρων ριζών και υπεροξειδώσεων.

$$L''HOO^{\bullet} + L'''H_2 \rightarrow L''HOOH + L'''H^{\bullet}$$
[36]

Ο αριθμός αυτός των διαδιδόμενων αντιδράσεων φαίνεται στα πειράματά μας να εξαρτάται σημαντικά από το ιατρικό ιστορικό του ασθενούς. Ο Fernàntez-Espejo (2006) μελετώντας την ασθένεια Parkinson διαπίστωσε ότι οι αντιδράσεις [32]-[36] ενισχύονται παρουσία ιόντων Fe^{2+} και ότι τα υπεροξείδια των λιπιδίων αποτελούν το πρώιμο στάδιο έναρξης σχηματισμού ινιδίων [Fernàntez-Espejo, 2006].

7.5. Μολυβδαινοένζυμα και αθηρωματικές πλάκες

Κατά την διάρκεια της μελέτης των αθηρωματικών πλακών των ασθενών σε ορισμένους ασθενείς διαπιστώθηκε η παρουσία μολυβδαινίου στις αθηρωματικές πλάκες. Το ιχνοστοιχείο του μολυβδαινίου (Mo) αποτελεί το δραστικό τμήμα των μολυβδαινο-ενζύμων της ξανθίνης οξειδάσης (XO)² και καταλύει την υποξανθίνη σε ξανθίνη ενώ το τελικό στάδιο είναι το ουρικό οξύ (Σχήμα 7.26) [Bray, 1974].

² Η ξανθίνη οξειδάση είναι ένα μεταλλοένζυμο που περιέχει ανά μόριο 2 Mo, 8Fe και 2 φλαβιναδενίνη δινουκλεοτίδιο (FAD). Το μολυβδαίνιο στο ένζυμο δεν φαίνεται να συνδέεται με άτομα αζώτου αλλά με άτομα οξυγόνου και θείου [Bray, 1974]

Παράλληλα όμως, η ξανθίνη οξειδάση XO ενέχεται στον μηχανισμό παραγωγής υπερόξυ ελευθέρων ριζών (O_2^{-}) και υπεροξειδίων του υδρογόνου (H_2O_2):



Σχήμα 7.26: Παράσταση του μηχανισμού της καταλυτικής αντίδρασης της υποξανθίνης σε ξανθίνη και τελικά προϊόντα ουρικό οξύ και ROS

Η συνεχής παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου και υπερόξυ ελευθέρων ριζών οδηγεί, σύμφωνα με τα όσα έχουν λεχθεί παραπάνω, σε μεγαλύτερο αριθμό οξειδωμένων λιπιδίων και επομένως αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας.

Πρόσφατη μελέτη [Rajendra et al., 2011] σε ζώα έδειξε ότι η ξανθίνη οξειδάση, που προκαλεί το οξειδωτικό στρες, αύξησε την κατανάλωση οζυγόνου στο μυοκάρδιο και συνδέθηκε με την πρόκληση ισχαιμικού καρδιακού επεισοδίου. Επίσης, διαπιστώθηκε από άλλη ερευνητική ομάδα, σε πειράματα με ζώα στα οποία προσπάθησαν να προκαλέσουν ισχαιμικό επεισόδιο, ότι αν χορηγηθούν παρεμποδιστές της δράσης της ξανθίνης υπεροξειδάσης, όπως αλλουπρινόλη ή οξυπουρινόλη μειώνεται το οίδημα του εγκεφάλου που θα προκαλούσε το ισχαιμικό επεισόδιο, γεγονός που δείχνει τον ρόλο των ελευθέρων ριζών. [Minka & Johnston, 2007]. Η αλλουπρινόλη δρα επίσης και ως παρεμποδιστής των μεταλλοενζύμων στην μεταφορά ηλεκτρονίων για την καταλυτική τους δράση. Το γεγονός ότι η χορήγηση βιταμίνης Ε δεν μειώνει τον κίνδυνο ισχαιμικού επεισοδίου, [Rajendra et al., 2011] επιβεβαιώνει την υπόθεσή μας, ότι η βλάβη γίνεται στο κέντρο του μεταλλοενζύμου που είναι το μολυβδαίνιο.

Από όλα τα παραπάνω φαίνεται ότι ο ρυθμός μεταφοράς κατά δύο ηλεκτρόνια του μολυβδαινίου κατά την μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ, διαταράσσεται. Αποτέλεσμα της διαταραχής αυτής είναι να μη γίνεται η αντίδραση υποξανθίνηξανθίνη-ουρικό οξύ με μεταφορά 2 ηλεκτρονίων, αλλά η υπερπαραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου και υπερόξυ ελευθέρων ριζών. Επομένως αυτή η υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών οδηγεί στη συνέχεια στην καταστροφή των μεμβρανών, όπως ακριβώς διαπιστώνεται και από τα φασματοσκοπικά δεδομένα που προκύπτουν από την ανάλυση των αθηρωματικών πλακών των ασθενών με αυξημένο ουρικό οξύ στον ορό του αίματος. Επομένως, η βλάβη προκαλείται από αναγωγικούς παράγοντες (ηλεκτρόνια) και όχι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου. Οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου φαίνεται να αντιδρούν περισσότερο με τα μακρομόρια των κυττάρων ή και με τις ενδογενείς προστατευτικές ενώσεις, αυξάνοντας το οξειδωτικό στρες. Αυτό αποδεικνύεται από την μείωση των εντάσεων των ταινιών που αποδίδονται στις απορροφήσεις των ομάδων C-S και την παράλληλη αύξηση των εντάσεων των ταινιών που αντιστοιχούν στις απορροφήσεις των ομάδων S-S (Σχήμα 7.15).

Σε ένα φυσιολογικό οργανισμό οι παραγόμενες τελικά υπερόξυ ελεύθερες ρίζες (O_2^-) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) μέσα από τους καταλυτικούς μηχανισμούς προστασίας μετατρέπονται σε νερό σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις:

$$O_2^{\bullet-} \xrightarrow{e^-} O_2^{\bullet-} \xrightarrow{e^-+2H^+} H_2O_2 \xrightarrow{e^-+H^+} OH^{\bullet} \xrightarrow{e^-+H^+} H_2O$$
[37]

Οι υπεροξειδικές δισμουτάσες καταλύουν τις ελεύθερες υπερόξυ ρίζες σε υπεροξείδιο του υδρογόνου

$$O_2^{\bullet^-} + O_2^{\bullet^-} + 2H^+ \xrightarrow{\quad \upsilon \pi \varepsilon \rho o \xi \varepsilon i \delta \kappa \varepsilon \varsigma \ \delta i \sigma \mu o \upsilon \tau \acute{a} \sigma \varsigma} \rightarrow H_2O_2 + O_2$$
[38]

το οποίο με τις καταλάσες καταλύεται τελικά προς νερό:

$$H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{\kappa \alpha \tau \alpha \lambda \dot{\alpha} \sigma \epsilon \varsigma} 2H_2O + O_2$$
[39]

Η κατάλυση προς παραγωγή νερού μπορεί να γίνει και με υπεροξειδάσες :

$$H_2O_2 + RH_2 \xrightarrow{\upsilon \pi \epsilon \rho o \xi \epsilon \iota \delta \operatorname{ide} \epsilon \varsigma} 2H_2O + R^{\bullet}$$

$$\tag{40}$$

Με τις φυσιολογικές αντιδράσεις [37-40] παρεμποδίζεται να λάβουν χώρα οι αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss που οδηγούν σε υπεροξείδωση των βιολογικών μορίων και καταστροφή των κυττάρων. Εξ άλλου, δεδομένου ότι η ξανθίνη οξειδάση περιέχει άτομα σιδήρου δικαιολογεί και την έναρξη των αντιδράσεων Fenton.

Έχει αποδειχθεί βιοχημικά ότι ο καταβολισμός της ATP κατά την διάρκεια ισχαιμικού συμβάντος έχει ως αποτέλεσμα την εκροή (efflux) της αδενοζίνης και των μεταβολιτών της, ινοζίνη, υποξανθίνη, ξανθίνη και ουρικό οξύ, που καταλύονται από το ένζυμο ξανθίνη οξειδορεδουκτάση (Σχήμα 7.27). Αποδείχθηκε ότι τα προϊόντα αυτά συγκεντρώνονται στον εγκέφαλο [Parks et al., 1998, Phillis et al., 1991]



Σχήμα 7.27: Καταβολισμός της ΑΤΡ κατά την διάρκεια ισχαιμικού συμβάματος

Η ενεργειακή καταβολή της ATP οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης των ενδοκυτταρικών (cytosolic) ιόντων ασβεστίου, με αποτέλεσμα τα ιόντα ασβεστίου να εισέλθουν στην ευρύτερη κυκλοφορία του αίματος και τον κύκλο του διοξειδίου του άνθρακα και να σχηματισθούν ανθρακικά άλατα του ασβεστίου. Αυτό δεν αποκλείει τον σχηματισμό συμπλόκων ενώσεων του ασβεστίου, τα οποία είναι προφανές ότι δεν μπορούν να ανιχνευθούν με την υπέρυθρη φασματοσκοπία, αλλά ούτε με την SEM ανάλυση.

Στην Εικόνα 7.7.Α φαίνεται η αρχιτεκτονική απεικόνιση και διάταξη των αθηρωμάτων στεφανιαίας αρτηρίας. Στην Εικόνα 7.7.Β το βέλος δείχνει την θέση του μολυβδαινίου που εντοπίζεται στο δείγμα αθηρωματικής πλάκας υπερουρικαιμικού ασθενούς. Πρέπει να τονισθεί ιδιαίτερα ότι η παρουσία μολυβδαινίου διαπιστώθηκε στις αθηρωματικές πλάκες στεφανιαίων και καρωτίδων αρτηριών μόνο ασθενών με αυξημένο ουρικό οξύ στο αίμα τους. Αντίθετα, σε καμμία από τις άλλες κατηγορίες ασθενών δεν ανιχνεύθηκε Mo [Mamarelis et al, 2011].



Εικόνα 7.7: SEM απεικόνιση της αρχιτεκτονικής αθηρωματικής πλάκας υπερουρικαιμικού ασθενούς: **Α:** Περιοχή πλούσια σε άλατα και ινίδια. **Β:** Εντοπισμός αλάτων πλούσιων σε Mo (κλίμακα 100 μm)



Εικόνα 7.8: EDAX ανάλυση αθηρωματικών πλακών στεφανιαίας αρτηρίας δύο διαφορετικών υπερουρικαιμικών ασθενών

Διαπιστώνεται ότι το δείγμα είναι πλούσιο σε ινίδια (fibrils). Η εικόνα αυτή συνδέεται με τον σχηματισμό διμερών ή πολυμερών ενώσεων, ως αποτέλεσμα των αντιδράσεων των παραγομένων ελευθέρων ριζών με τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες, σύμφωνα με τις αντιδράσεις [14-16]:

Από το ιατρικό ιστορικό διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς στων οποίων τα αθηρώματα περιείχαν μολυβδαίνιο εμφάνιζαν αυξημένο ουρικό οξύ στον ορό του αίματος. Για να ερμηνευθεί η παρουσία του μολυβδαινίου θα πρέπει να δεχθούμε ότι το μολυβδαίνιο σχηματίζει άλλα σταθερά προϊόντα τα οποία δεν είναι διαλυτά στο υδατικό περιβάλλον και μπορούν να επικάθονται στα τοιχώματα των αρτηριών.

Το μολυβδαίνιο αν και μπορεί να έχει πολλές οξειδωτικές βαθμίδες, στα βιολογικά συστήματα ενεργοποιείται με μεταφορά μόνον δύο ηλεκτρονίων μεταξύ εξασθενούς και τετρασθενούς μολυβδαινίου:

$$Mo^{4+} \xrightarrow{2e^{-}} Mo^{6+} \xrightarrow{-2e^{-}} Mo^{4+}$$
 [41]

Η μεταφορά αυτή των ηλεκτρονίων, όπως απέδειξαν οι Hille και συνεργάτες, [Hille et al., 2011] γίνεται μέσω των ατόμων σιδήρου και θείου με καταλύτη την γλουταθειόλη, σύμφωνα με την αντίδραση [42]:



Αν όμως λάβουμε υπόψη τον κύκλο καταβολισμού της ATP, τότε φαίνεται ότι η υπερπαραγωγή υπερόξυ ελευθέρων ριζών μεταβάλλει τις οξειδωτικές βαθμίδες σε όλες τις δυνατές βαθμίδες πέραν των Mo⁴⁺ και Mo⁶⁺, που είναι η βιολογική, σε Mo⁵⁺, Mo³⁺, Mo²⁺ και Mo⁺, βαθμίδες δηλαδη οι οποίες δεν συμμετέχουν στο βιολογικό ανθρώπινο σύστημα. Από αυτό συμπεραίνεται ότι η διαταραχή της ισοστασίας του μολυβδαινίου οδηγεί στην παραγωγή περισσότερων ελευθέρων ριζών με τελική επίπτωση στην επιτάχυνση του φαινομένου της υπεροξείδωσης των λιπιδίων.

Από την επεξεργασία και σύγκριση των φασμάτων όλων των ασθενών με αυξημένο ουρικό οξύ στον ορό του αίματος σε σχέση με τους ασθενείς με φυσιολογικό ουρικό οξύ στον ορό του αίματος παρατηρήθηκε ότι τα υπέρυθρα φάσματα εμφάνιζαν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τόσο στην μορφή όσο και τις εντάσεις των ταινιών τους.

Στο Σχήμα 7.28.Α φαίνεται το υπέρυθρο φάσμα αθηρωματικής πλάκας ασθενούς με αυξημένο ουρικό οξύ στον ορό του αίματος, ενώ το Σχήμα 7.28.Β δίνει το φάσμα ασθενούς με φυσιολογικό ουρικό οξύ στον ορό του αίματος.



Σχήμα 7.28: FT-IR φάσματα αθηρωμάτων στεφανιαίας αρτηρίας ασθενών; A: υπερουρικαιμικός ασθενής και B: ασθενής με φυσιολογικά όρια ουρικού οξέος στον ορό του αίματος.

Από την σύγκριση των φασμάτων διαπιστώνεται ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές σε όλο το εύρος του φάσματος σε εντάσεις και συχνότητες. Ιδιαίτερα, διαπιστώνεται ότι στην περιοχή όπου απορροφούν τα υδροξύλια (νOH) και οι αμινομάδες (νNH) των πρωτεϊνών στους υπερουρικαιμικούς ασθενείς (Σχήμα 7.28.Α) οι ταινίες μετατοπίζονται δείχνοντας ότι οι δεσμοί υδρογόνου των πρωτεϊνών μειώνονται σημαντικά. Επίσης, διαπιστώνεται ότι στην περιοχή του φάσματος 3000-2850 cm⁻¹ οι μεταβολές είναι σημαντικές. Στην περιοχή αυτή του φάσματος, όπως προαναφέρθηκε, εμφανίζονται οι αντισυμμετρικές και συμμετρικές δονήσεις τάσης των μεθυλ (νCH₃) και μεθυλενομάδων (νCH₂) των λιπιδίων των μεμβρανών. Από την έντονα αυξημένη ένταση των ταινιών αυτών στο φάσμα των υπερουρικαιμικών ασθενών συμπεραίνεται ότι η μεμβράνη των κυττάρων χάνει σημαντικά την ευκινησία, προφανώς λόγω της μεγαλύτερης καταστροφής του λιποφιλικού περιβάλλοντος, αλλά και επειδή μειώνεται το μήκος των ανθρακικών αλυσίδων των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων των μεμβρανών. Το αποτέλεσμα αυτό συνδέεται με υπεραυξημένη δράση των ελευθέρων ριζών.

Για να ερμηνευθούν οι μεταβολές αυτές θα πρέπει να θεωρηθεί ότι στους υπερουρικαιμικούς ασθενείς πρέπει είτε να διαταράσσεται η δυναμική ισορροπία μεταξύ των μακρομορίων που σχηματίζουν τις μεμβράνες των κυττάρων, είτε να

παράγεται μεγαλύτερος αριθμός ελευθέρων ριζών, οι οποίες κατ' επέκτασην αυξάνουν τον αριθμό των διασπάσεων των ανθρακικών αλυσίδων των λιπιδίων. Οι διασπάσεις των ανθρακικών αλυσίδων μειώνουν το λιπόφιλο περιβάλλον, το οποίο απεικονίζεται με την αύξηση της έντασης των ταινιών στην περιοχή 3000-2850 cm⁻¹.

Στην περιοχή μεταξύ 1700-1500 cm⁻¹, όπου εμφανίζονται οι ταινίες απορρόφησης των αμιδίων AI, AII και που δίδουν πληροφορίες σχετικά με την διαμόρφωση των πρωτεϊνών, διαπιστώνεται στην περίπτωση των υπερουραικιμικών ασθενών ότι οι πρωτεΐνες χάνουν την διαμόρφωση της α-έλικας και αποκτούν διαμόρφωση τυχαίας περιέλιξης. Για να ερμηνευθεί ο μεγαλύτερος βαθμός καταστροφής των δομών των πρωτεϊνών στους υπερουρικαιμικούς ασθενείς σε σχέση με τους ασθενείς με φυσιολογικό ουρικό οξύ στον ορό του αίματος θα πρέπει να αναζητήσουμε την δράση των ηλεκτρονίων που δεν ελέγχονται, λόγω αδράνειας των μολυβδαινοενζύμων.

Τα παραγόμενα ηλεκτρόνια αντιδρούν και μπορούν να δώσουν αντιδράσεις προσθήκης στην ομάδα του καρβονυλίου C=O σύμφωνα με την αντίδραση [43]:

$$\begin{array}{c} & & & & & \\ H \\ R-C-NH_2 + e^- \longrightarrow R-C-NH_2 \end{array}$$

$$[43]$$

Το προϊόν της αντίδρασης [44] επειδή είναι ασταθές μπορεί εύκολα να αντιδράσει με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας δίδοντας υπερόξυ ομάδες.

$$\begin{array}{ccc} & & & & & & \\ R- \dot{C}-NH_2 + O_2 \longrightarrow R- \dot{C}-NH_2 & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ \end{array}$$

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

Οι αντιδράσεις [43] έως [45] έχουν παρατηρηθεί και με φασματομετρία ηλεκτρονικού παραμαγνητισμού, esr (electron spin resonance), σε στερεή κατάσταση πριν από πολλά χρόνια στο πεπτίδιο της γλυκίνης [Hawkins & Davies, 1997].

Μάλιστα διαπιστώθηκε ότι όσο αυξάνει το μήκος της αλυσίδας των πεπτιδίων τόσο αυξάνει και η σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης. Οι αντιδράσεις αυτές οδηγούν στην σχάση των πεπτιδικών δεσμών και επομένως την καταστροφή της δευτεροταγούς μοριακής δομής. Φαίνονται δηλαδή ότι οι οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες που δρουν, αποσπούν εύκολα άτομα υδρογόνου από τις ανθρακικές αλυσίδες. Παρ' όλα αυτά δεν απαντούν στο ερώτημα γιατί μεταβάλλεται το περιβάλλον των C=O ομάδων των βιολογικών μορίων. Αν λάβουμε υπόψη τα αποτελέσματα της ομάδας των Rajendra et al, που όταν χορήγησαν στα πειραματόζωα βιταμίνη Ε παρατήρησαν ότι δεν μειώνεται ο κίνδυνος ισχαιμικού επεισοδίου [Rajendra et al., 2011], διαπιστώνεται ότι επιβεβαιώνεται η υπόθεσή μας, ότι η βλάβη γίνεται στο κέντρο του μεταλλοενζύμου που αποτελεί το μολυβδαίνιο. Φαίνεται καθαρά ότι η διαταραχή του μεταβολισμού των αναγωγικών παραγόντων οδηγεί στην καταστροφή των κυττάρων και την αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας.

Τα μολυβδαινοένζυμα επηρεάζουν επίσης τον κύκλο του μονοξειδίου του αζώτου (NO). Το NO παράγεται από την L-αργινίνη μέσω του ενζύμου συνθετάση NO synthetase–eNOS), (NO παρουσία συνενζύμου του του της τετραϋδροβιοπτερίνης. Η ενδοκυττάρια παραγωγή ΝΟ ακολουθείται από την ενεργοποίηση του αγγελιοφόρου κυκλικού GMP (m-cGMP), το οποίο στο καρδιαγγειακό σύστημα ασκεί τη δράση του μέσω της σχετιζόμενης φωσφοδιεστεράσης και πρωτεϊνικής κινάσης, με τελικό αποτέλεσμα την αγγειοδιαστολή. Πέρα από την αγγειοδιασταλτική του δράση το NO είναι υπεύθυνο και για την αναστολή της προσκόλλησης των λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τη διατήρηση των λείων μυϊκών κυττάρων σε αδρανή (στάσιμη) κατάσταση και την αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Η αυξημένη ενδαγγειακή παραγωγή υπερόξυ ενώσεων, υπό την επίδραση των παραγόντων που προκαλούν τον ενδοθηλιακό τραυματισμό, είναι δυνατόν να οδηγήσει σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, αφού οι συγκεκριμένες ενώσεις αντιδρούν ταχέως με το ΝΟ, οδηγώντας στο σχηματισμό υπερόξυ νιτρικών ανιόντων και, έτσι, σε απώλεια της βιοδραστικότητας του ΝΟ (Σχήμα 7.29). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι οι εν λόγω ενώσεις προάγουν την οξειδωτική σχάση της τετραϋδροβιοπτερίνης, με αποτέλεσμα την ελαττωμένη παραγωγή NO [Mahmoudi et al., 2007].



Σχήμα 7.29: Προτεινόμενο σχήμα για το ρόλο της ξανθίνης οξειδάσης ως κυκλοφορικός διαμεσολαβητής που δεσμεύεται στην επιφάνεια των αγγειακών κυττάρων του ενδοθηλίου, παράγει δραστικά σωμάτια οξυγόνου, αλληλεπιδρά με μόρια μονοξειδίου του αζώτου (NO[•]) και άμεσα ή έμμεσα καταλήγει σε πολυοργανική δυσλειτουργία (multisystem organ dysfunction) [Parks, 1998]

Η αυξημένη διαπερατότητα του ενδοθηλίου, μεσολαβούμενη από το NO, την προστακυκλίνη, τον αιμοπεταλιακό αυξητικό παράγοντα, την αγγειοτασίνη ΙΙ και την ενδοθηλίνη, έχει ως αποτέλεσμα την είσοδο και τον εγκλωβισμό των LDL στο αρτηριακό τοίχωμα. Οι παγιδευμένες LDL οξειδώνονται (τροποποιημένες LDL) και στη συνέχεια προσλαμβάνονται από τα μακροφάγα από ειδικούς υποδοχείς (scavenger receptors), όπως ο SR-A και ο CD36. Η είσοδος των LDL στα μακροφάγα οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίων των λιπιδίων και τη συσσώρευση εστέρων χοληστερόλης και τελικώς την μετατροπή των μακροφάγα αρχικά προστατεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τις λείες μυϊκές ίνες από την τοξική δράση των LDL [Goormaghtigh et al., 1999].

υποξανθίνη +
$$H_2O + O_2 \xrightarrow{XO} \xi$$
ανθίνη + H_2O_2 [46]

$$ξ$$
ανθίνη + H₂O + O₂ \xrightarrow{XO} ουρικό οξύ + H₂O₂ [47]

Είναι επίσης γνωστό ότι η περίσσεια ουρικού οξέος στο αίμα παρεμποδίζει τον μεταβολισμό του ΝΟ αυξάνοντας την παραγωγή του υπεροξυνιτριλίου, ΟΝΟΟ⁻, ενός οξειδωτικού παράγοντα, ο οποίος δεν είναι ελεύθερη ρίζα. Το υπεροξυνιτρίλιο αποδείχθηκε ότι εμπλέκεται σε πολλές παθοφυσιολογικές καρδιακές ασθένειες, μεταξύ των οποίων η αυτοφλεγμονώδη μυοκαρδίτιδα, υπέρταση και καρδιακή ανεπάρκεια [Parks, 1998]. Το υπεροξυνιτρίλιο οξειδώνει τις ενδογενείς προστατευτικές ενώσεις της γλουταθειόλης [Kranner, 2005] προς δισουλφίδια σύμφωνα με την γενική αντίδραση:

$$NO + O_2^{-\bullet} \xrightarrow{\tau \alpha \chi \acute{o} \tau \alpha \tau \sigma \tau \acute{a} \delta \iota \acute{o}} ONOO^{-} \xrightarrow{\pi o \lambda \lambda \acute{a} \beta \acute{\eta} \mu \alpha \tau \alpha} GS - GS$$

$$[48]$$

Η ταχύτατη αντίδραση του NO με τα ιόντα O₂⁻ (αντίδραση ελεγχόμενη από την διάχυση, diffusion-controlled rate) αποτελεί το 85% των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στο μιτοχόνδριο. Η αντίδραση παρέχει ως ενδιάμεσο προϊόν το υπεροξυνιτρικό ανιόν (ONOO⁻), το οποίο σε φυσιολογικό pH, πρωτονιώνεται παρέχοντας το αντίστοιχο οξύ (ONOOH, pKa = 6.8) [Koppenol, 1998]. Το υπεροξυνιτρικό οξύ [HO·····NO₂] διασπάται προς ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου HO· και διοξειδίου του αζώτου NO₂ [Radi et al., 1999]. Είναι προφανές ότι οι ελεύθερες ρίζες θα ακολουθήσουν τις γνωστές αντιδράσεις υπεροξείδωσης των λιπιδίων.

Από την έντονη μείωση των ταινιών του φάσματος των υπερουρικαιμικών ασθενών στην περιοχή 700-500 cm⁻¹ όπου εμφανίζονται οι δονήσεις των ομάδων –SH και S-S φαίνεται ότι το ένζυμο NADPH δεν μπορεί να επανοξειδώσει τα παραγόμενα δισουλφίδια του γλουταθείου GS-GS προς γλουταθειόλη:

Glu-Cys-Gly

$$S$$
 + NADPH + H⁺ \longrightarrow 2 Glu-Cys-Gly + NADP + [49]
Glu-Cys-Gly

Η μη επανοξείδωση δείχνει την καταστροφή των προστατευτικών ενδογενών ενώσεων, οπότε ο οργανισμός δεν είναι σε θέση να αντιμετωπίσει το οξειδωτικό στρες. Είναι γενικά αποδεκτό ότι ενδογενώς ή με εξωτερικούς παράγοντες οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου και υπεροξειδίων παράγονται σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις:

$$\mathrm{HO}_{2}^{\bullet-} + \mathrm{O}_{2}^{\bullet-} + \mathrm{H}^{+} \to \mathrm{H}_{2}\mathrm{O}_{2} + \mathrm{O}_{2}$$

$$[50]$$

$$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\bullet} + OH^{-} + O_2$$
[51]

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\bullet} + OH^{-} + Fe^{3+}$$
[52]

Ο τρισθενής σίδηρος ανάγεται από τα ανιόντα των υπερόξυ ριζών προς δισθενή σίδηρο, διατηρώντας έτσι τον κύκλο οξειδοαναγωγής και επομένως την συνεχιζόμενη παραγωγή ελευθέρων ριζών σύμφωνα με την αντίδραση Fenton:

$$O_2^{\bullet} + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$
[53]

Οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου συνήθως αποσπούν άτομα υδρογόνου από τις ανθρακικές αλυσίδες ή παρέχουν αντιδράσεις προσθήκης στους διπλούς δεσμούς των ακόρεστων λιπαρών οξέων.

$$OH^{\bullet} + LH_2 \rightarrow H_2O + LH^{\bullet}$$
^[54]

Οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες των λιπιδίων αντιδρούν ταχύτατα, όπως προαναφέρθηκε, με το μοριακό οξυγόνο, οδηγώντας στον σχηματισμό υπεροξειδίων.

$$LH^{\bullet} + O_{2} \rightarrow LHOO^{\bullet}$$
[55]

Οι υπερόξυ νέες ελεύθερες ρίζες των λιπιδίων αποσπούν άτομα υδρογόνου από γειτονικά μόρια, μεταβιβάζοντας έτσι τις ελεύθερες ρίζες στο ευρύτερο περιβάλλον.

$$LHOO^{\bullet} + L'H_{2} \rightarrow LHOOH + L'H^{\bullet}$$
[56]

Τα υδροϋπεροξείδια διασπώνται ομολυτικά προς δύο άλλες ελεύθερες ρίζες.

$$LHOOH \rightarrow LHO^{\bullet} + OH^{\bullet}$$
 [57]

Η αλληλουχία αυτή των αντιδράσεων στην πράξη έχει αντίκτυπο την υγεία του ασθενούς. Η αύξηση της αθηρωματικής πλάκας φαίνεται να είναι συνάρτηση του αριθμού των παραγομένων ελευθέρων ριζών, αλλά και της συγκέντρωσης των προστατευτικών ενώσεων του οργανισμού του ασθενούς. Εκείνο που είναι πλέον πολύ εμφανές από τα πειραματικά δεδομένα της μελέτης των αθηρωματικών πλακών των καρωτίδων και στεφανιαίων αρτηριών είναι ότι το εργασιακό περιβάλλον ενισχύει την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Επίσης διαπιστώθηκε ότι παράλληλα καταστρέφονται οι προστατευτικές ουσίες του ανθρώπινου οργανισμού, οι οποίες δεν μπορούν να αντιμετωπίσουν το οξειδωτικό στρες. Το γεγονός ότι οι απολιποπρωτεΐνες αροΑ-Ι και αροΑ-ΙΙ εγκλωβίζονται σε οξειδωμένα λιπίδια και επομένως δεν μπορούν να λειτουργήσουν προστατευτικά φαίνεται και από την επεξεργασία των υπέρυθρων φασμάτων. Μάλιστα, όπως έδειξε η SEM ανάλυση της αρχιτεκτονικής της επιφάνειας των καρωτίδων και στεφανιαίων αρτηριών, οι αθηρωματικές πλάκες αποτελούνται από ινίδια. Η παρουσία των ινιδίων ενισχύει την υπόθεση που αναπτύχθηκε ότι δηλαδή λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις μεταξύ ελευθέρων ριζών, με αποτέλεσμα τον διμερισμό ή και πολυμερισμό των ελευθέρων ριζών των λιπιδίων και των θραυσμάτων τους.

Η μαθηματική ανάλυση του υπερύθρου φάσματος των ασθενών (Σχήμα 7.30) δείχνει ότι η ταινία στα 1454 cm⁻¹ δεν είναι απλή, αλλά άθροισμα της δόνησης κάμψης των ομάδων δCH₂ και της δόνησης τάσης των ομάδων vCO_3^{2-} περίπου στα 1437 cm⁻¹. Στην περίπτωση υπερουραικιμικών ασθενών η ταινία στα 1451 cm⁻¹ σχεδόν εξαφανίζεται επειδή παρατηρείται σχάση των ανθρακικών αλυσίδων.



Σχήμα 7.30: FT-IR φάσματα αθηρωμάτων στεφανιαίας αρτηρίας ασθενών και η μαθηματική ανάλυσή τους; Α: υπερουρικαιμικός ασθενής Α΄: ανάλυση του ιδίου φάσματος και Β: ασθενής με φυσιολογικά όρια ουρικού οξέος στον ορό του αίματος, Β΄: ανάλυση του ιδίου φάσματος.

Η ταινία αυτή σε συνδυασμό με την ταινία στα 874 cm⁻¹ η οποία αντιστοιχεί στην δόνηση κάμψης της ομάδας ($v_4 \text{CO}_3^{2-}$) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το αθήρωμα είναι πλούσιο σε ανθρακικό ασβέστιο (CaCO₃). Από τα αποτελέσματα αυτά και σύμφωνα με τις παραδοχές των Brandes και Bers [Brandes & Bers, 1996] φαίνεται ότι κατά την διάρκεια του οξειδωτικού στρες τα κατιόντα του ασβεστίου Ca²⁺

εμπλέκονται στον κύκλο του διοξειδίου του άνθρακα CO₂ και μετατρεπόμενα σε ανθρακικό ασβέστιο (CaCO₃). Η παραγωγή ανθρακικού ασβεστίου αδρανοποιεί το ένζυμο NADH και επομένως συμβάλλει στην ανάπτυξη καρδιακών ασθενειών.

7.6. Ο Ρόλος των ελευθέρων ριζών στην αθηρογένεση

Ελεύθερες ρίζες είναι μόρια με μονήρες ηλεκτρόνιο στην στοιβάδα σθένους. Οι υπερόξυ ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Ο2.) παράγονται σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς. Στους αερόβιους οργανισμούς περίπου το 2% του οξυγόνου των μιτοχονδρίων ελευθερώνεται ως υπεροξείδιο, ένα προϊόν που παράγεται από την αναγωγή ενός μονήρους ηλεκτρονίου, παρά ως νερό, δηλαδή προϊόν αναγωγής δύο μονήρων ηλεκτρονίων. Οι ανθρώπινοι οργανισμοί πιστεύεται ότι παράγουν κατά την διάρκεια της αναπνοής 0.2-0.4 moles υπεροξειδίων την ημέρα. Τα υπεροξείδια ταχύτατα, με αντιδράσεις δυσαναλόγησης παρέχουν οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται από το υπεροξείδιο της δισμουτάσης (SOD) που το δραστικό κέντρο περιέχει μαγγάνιο (Mn) [Murakami et al., 1998]. Οι ελεύθερες υπερόξυ ρίζες που διαφεύγουν στο βιολογικό περιβάλλον μπορούν να αποτελέσουν το έναυσμα για την έναρξη σχηματισμού ελευθέρων ριζών υδροξυλίου και να οδηγήσουν τελικά στην υπεροξείδωση των λιπιδίων. Η γλουταθειόλη, που βρίσκεται στα κύτταρα σε συγκεντρώσεις μερικών millimolar, λειτουργεί ανταγωνιστικά ως ο αρχικός αναγωγικός παράγοντας και ανάγει μερικώς τα δραστικά ενδιάμεσα σωματίδια του οξυγόνου (O_2^{-}) προς νερό και δεν επιτρέπει τον σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου (αναγωγή κατά 4 ηλεκτρόνια).



Με τον τρόπο αυτό τα τελικά προϊόντα είναι νερό και δισουλφίδιο της γλουταθειόλης (GSSG). Το δισουλφίδιο μέσω του ενζύμου της γλουταθειόλης ρεντουκτάσης μετατρέπεται και πάλι σε γλουταθειόλη, δατηρώντας με τον τρόπο αυτό τη συγκέντρωση των προστατευτικών ενδογενών ενώσεων του οργανισμού.

Η μείωση της έντασης της ταινίας στην περιοχή 1600-1510 cm⁻¹ σχετίζεται άμεσα με την μείωση των apoA-I και apoA-II λιποπρωτεϊνών. Η ταινία στα 1735 cm⁻¹, της οποίας η ένταση αυξάνει με αύξηση της LDL χοληστερόλης των ασθενών, οδηγεί στην παραδοχή σχηματισμού μαλονδιαλδεΰδης, προϊόν που συνδέεται με την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης. Η μαλονδιαλδεΰδη μπορεί εύκολα να υπολογισθεί στα ούρα των ασθενών.

Η αναγνώριση ενδογενούς σχηματισμού οξειδίου του αζώτου (NO) από τα ένζυμα οξειδίου του αζώτου-συνθεσάση (NOS) άνοιξε νέους δρόμους στην βιοχημεία των ελευθέρων ριζών. Αν και το οξειδίου του αζώτου είναι ελεύθερη ρίζα σύμφωνα με τον ορισμό, δεν μπορεί να συμβάλλει στην έναρξη αντιδράσεων. Όμως από τη στιγμή που θα αντιδράσει με τα ανιόντα του οξυγόνου (O_2^{-1}) δίνει μια σειρά από βιοχημικές αντιδράσεις με αποτέλεσμα την εμφάνιση καρδιαγγειακών και άλλων παθήσεων [Dawson & Dawson, 1996, Ignarro, 1989, Moncada et al., 1991, Wink & Mitchell, 1998].

Το οξείδιο του αζώτου παράγεται *in vivo* κατά την διάρκεια της οξείδωσης της L-αργινίνης σε L-κιτρουλίνη που καταλύεται από τα NOS, παρουσία NADPH και O₂ [Griffith & Stuehr, 1995, Moncada et al., 1991]. Όπως είναι γνωστό τα αμινοξέα της αργινίνης και κιτρουλίνης συμμετέχουν στον κύκλο της ουρίας:



Οι δονήσεις των ενώσεων αυτών απαντώνται στα φάσματα των αθηρωματικών πλακών των ασθενών, ένδειξη του ρόλου των υπερόξυ ιόντων (O_2^{2-}) .
7.7. Επίδραση του τσιγάρου

Οι αθηρωματικές πλάκες των στεφανιαίων αρτηριών που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από ασθενείς που ήταν καπνιστές. Η παθοφυσιολογία της προκαλούμενης από τον καπνό του τσιγάρου αγγειακής νόσου είναι περίπλοκη και κάπως συγκεχυμένη, δεδομένης της δυναμικής αλληλεπίδρασης με πολλούς παράγοντες. Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει κατά προσέγγιση 4000 συστατικά. Ένα από αυτά, όπως η ακρολεΐνη, μία ακόρεστη αλδεΰδη, διασπά την ενδοκυττάρια γλουταθειόλη και προάγει την οξείδωση των λιπιδίων, καθώς και την καταστροφή του DNA των ενδοθηλιακών κυττάρων [Ramos et al., 2007]. Επίσης τα προϊόντα του καπνού προάγουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS), οξείδιων του αζώτου, αλκόξυ και υδροϋπερόζυλ ελευθέρων ριζών [Halliwell et al., 2006, Seet et al., 2011, Turner, 1979, Van der Vaart et al., 2004]

Η μεγαλύτερη βλάβη κατά τους Seet et al. (2011) γίνεται στο αραχιδονικό οξύ (αντίδραση [10]). Την βλάβη αυτή την εντοπίσαμε φασματοσκοπικά στην περιοχή του υπέρυθρου φάσματος μεταξύ 4000-3300 cm⁻¹. Όπως προαναφέρθηκε, το αραχιδονικό οξύ αντιδρά με τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου με αντίδραση προσθήκης. Επομένως η μειούμενη συγκέντρωση του αραχιδονικού οξέος που παρατηρήθηκε από τους Seet et al (2011) στους καπνιστές, ερμηνεύεται στο φάσμα μας ικανοποιητικά. Επομένως, η ταινία στα 3527 cm⁻¹ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης προδιάγνωσης ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας στους καπνιστές.

Στα υπέρυθρα φάσματα των ασθενών οι ταινίες στα 1084 cm⁻¹ και 1045 cm⁻¹ που αποδίδονται στις απορροφήσεις των φωσφορικών ομάδων –Ο–Ρ–Ο– του DNA και των φωσφολιπιδίων παρέχουν πληροφορίες για την κατάσταση του DNA των ασθενών [Anastassopoulou, 1990; 1989, Anastassopoulou et al., 1998, Theophanides, 1984, Theophanides & Sandorfy, 1984]. Η μορφή του φάσματος δείχνει ότι οι φωσφορικές ομάδες αποκτούν μεγαλύτερο βαθμό ελευθερίας, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι λαμβάνει χώρα φωσφοριλύωση. Είναι γνωστό ότι οι έλικες του DNA αποτελούνται από νουκλεοτίδια, τα οποία αποτελούνται από την βάση, το σάκχαρο (δεσοξυριβόζη) και την φωσφορική ομάδα. Τα υπέρυθρα φάσματα δείχνουν ότι η ριβόζη-φωσφορική ομάδα αποσπάται από την βάση του DNA και με τον τρόπο αυτό αρχίζει η διάσπαση των φωσφορικών ομάδων με αντίστοιχο σχηματισμό ανθρακικών φωσφορικών αλάτων. Προκειμένου να ερμηνευθούν οι μεταβολές των ταινιών στα

1084 cm⁻¹ και 1045 cm⁻¹, που αποδίδονται στην φωσφοριλύωση του DNA, πρέπει να λάβουμε υπόψη τις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών υδροξυλίου (HO⁻) με το DNA. Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία [Anastassopoulou, 1990; 1989, Anastassopoulou et al., 1998] ότι οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου αντιδρούν με τα νουκλεοτίδια με απόσπαση ατόμου υδρογόνου από την θέση C1' όπου η βάση συνδέεται με το σάκχαρο, σύμφωνα με την αντίδραση [59]:



Εκτός από τις αντιδράσεις απόσπασης ατόμου υδρογόνου από την θέση C1' του σακχάρου του νουκλεοτιδίου έχει διαπιστωθεί ότι απόσπαση ατόμου υδρογόνου από τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου είναι εύκολο να γίνει και από την θέση C5', σύμφωνα με την αντίδραση [60]. Στην περίπτωση αυτή λαμβάνουμε ως προϊόντα την ελεύθερη φωσφορική ομάδα [Anastassopoulou & Dovas, 2007, Bolanos-Garcia & Miguel, 2003].



Οι αντιδράσεις [57] μέχρι και [60] ερμηνεύουν ικανοποιητικά τις μεταβολές που παρατηρούνται στα υπέρυθρα φάσματα των ασθενών. Εφόσον όλοι οι ασθενείς είναι καπνιστές συμπεραίνεται γενικά ότι ο ασθενής υφίσταται πολύ σημαντικές βλάβες στις πρωτεΐνες και τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών από τις ελεύθερες ρίζες, που παράγονται κατά το οξειδωτικό στρες του οργανισμού, οδηγώντας σε σχάσεις των αλειφατικών αλυσίδων των μεμβρανών και υπεροξειδώσεις των κυττάρων, όπως δείχνει η ανάλυση των αθηρωμάτων.

7.8. Επίδραση του χαλκού

Όπως προαναφέρθηκε οι χαλκοπρωτεΐνες δρουν είτε για μεταφορά ηλεκτρονίων και μοριακού οξυγόνου είτε για την ενεργοποίηση του οξυγόνου [Crichton & Pierre, 2001]. Ο χαλκός αν και δεν ανήκει στα μεταβατικά μέταλλα, έχει τη δυνατότητα να επικρατεί σε δύο ξεχωριστές οξειδοαναγωγικές καταστάσεις, οξειδωμένα ως Cu(II) ή ανηγμένα ως Cu(I), λόγω της d ηλεκτρονιακής στάθμης.

Από τους ασθενείς που λάβαμε υπόψη στην μελέτη μας, κανείς από αυτούς δεν εμφάνιζε ασθένεια Wilson ή Menkens και επομένως δεν θα αναμέναμε την διαταραχή των χαλκοπρωτεϊνών στο αίμα τους. Παρ' όλα αυτά, από την SEM-EDAX ανάλυση βρέθηκε στις αθηρωματικές πλάκες ορισμένων ασθενών χαλκός (Εικόνα 7.9). Επομένως, η παρουσία του χαλκού έπρεπε να συνδεθεί άμεσα με το εργασιακό περιβάλλον των ασθενών και όχι με διαταραχή της ομοιοστασίας του χαλκού. Μετά από αυτά πρέπει να τονισθεί ιδιαίτερα ότι σε ασθενείς που το εργασιακό τους περιβάλλον δεν ενείχε παρόγοντες χαλκού, δεν ανιχνεύθηκε χαλκός.



Εικόνα 7.9: Σχήμα SEM-EDAX αθηρωματικής πλάκας ασθενούς. Διακρίνεται με το βέλος η θέση ανίχνευσης χαλκού (Cu). Πέραν του χαλκού φαίνεται και μολυβδαίνιο (Mo)



Σχήμα 7.32: 1: FT-IR φάσμα ασθενούς, στου οποίου ανιχνεύθηκε χαλκός; Στην περιοχή 3000-2800 cm⁻¹ φαίνονται οι ταινίες των ομάδων νCH. 2: Ασθενής που δεν εμφάνισε χαλκό.

Η σημαντική αύξηση των εντάσεων και η μορφή των καμπυλών στα υπέρυθρα φάσματα στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 3000-2800 cm⁻¹, έναντι των υπολοίπων ασθενών, δείχνουν ότι οι ανθρακικές αλυσίδες των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων που σχηματίζουν τις μεμβράνες των κυττάρων χάνουν περισσότερο την λιποφιλικότητά τους, λόγω σχάσης του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας, όπως προαναφέρθηκε. Η κατάσταση αυτή πρέπει να συνδεθεί με αύξηση του αριθμού των παραγωμένων ελευθέρων ρίζών.

Στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 1800 και 1500 cm⁻¹ παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές, ως προς τα φάσματα εκείνων των ασθενών, στους οποίους δεν ανιχνεύθηκε χαλκός στις αθηρωματικές τους πλάκες. Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η αύξηση της έντασης της ταινίας στα 1742 cm⁻¹, η οποία συνδέεται άμεσα με την αύξηση της LDL χοληστερόλης, η οποία διαπιστώθηκε και κλινικά. Τα υπέρυθρα φάσματα των αθηρωματικών πλακών, όπου ανιχνεύθηκε χαλκός, διαπιστώθηκε ότι παρουσίαζαν μεγαλύτερες βλάβες στην μοριακή δομή της α-έλικας των πρωτεϊνών, ενώ παρατηρήθηκε ότι αυξάνει η τάση για διαμόρφωση των αντιπαράλληλων βπτυχώσεων. Επίσης στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 1000 και 1300 cm⁻¹, όπου εμφανίζονται οι απορροφήσεις των ομάδων των φωσφορικών ομάδων των φωσφολιπιδίων και υδρογονανθράκων και πολυσακχαριτών, οι μεταβολές είναι περισσότερο έντονες. Αυτό σημαίνει ότι έχουμε μεγαλύτερη σχάση των φωσφολιπιδίων και φωσφορικών ομάδων του DNA.

Από τα τελικά προϊόντα που ανιχνεύονται με την υπέρυθρη φασματοσκοπία γίνεται δεκτό ότι οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν στην έναρξη και ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας, πιστεύουμε δε ότι ο χαλκός πιθανόν να σχηματίζει σύμπλοκο με τις λιποπρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους Cu²⁺-LDL. Τα δεδομένα αυτά φαίνεται να συμφωνούν και με τα δεδομένα άλλων ερευνητικών ομάδων, οι οποίοι διαπίστωσαν ότι το υπέρυθρο φάσμα εγκεφάλου ασθενών στον εγκέφαλο των οποίων βρέθηκε χαλκός, μεταβάλλεται με τον ίδιο τρόπο [Caine et al., in Press, Miller et al., 2006]

Έμμεση απόδειξη στην παραπάνω υπόθεση απορρέει από βιβλιογραφικά δεδομένα και που συνδέονται με την αντιοξειδωτική δράση της α-τοκοφερόλης (TOH) και του β-καροτενίου.



Β-καροτένιο (Προβιταμίνη Α)

Η χορήγηση στους ασθενείς α-τοκοφερόλης και του β-καροτενίου, οι οποίοι όπως φαίνεται και από τους χημικούς τύπους είναι ανταγωνιστές των ελευθέρων ριζών υδροξυλίου, παρεμποδίζει την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών, δεδομένου ότι μόνο μια μικρή λιπιδική υπεροξείδωση πραγματοποιείται στα μόρια των LDL, όπως αποδεικνύεται από την μέτρηση των προϊόντων οξείδωσης. Το ποσοστό της υπεροξείδωσης εξαρτάται από την συγκέντρωση των λιπόφιλων βιταμινών στο κύτταρο και την θέση τους ως προς το κέντρο παραγωγής των ελευθέρων ριζών.

Από τα πειραματικά δεδομένα θα πρέπει να δεχθούμε ότι επειδή ο χαλκός εντοπίζεται στις περιοχές των αφρωδών κυττάρων, δηλαδή σε μία έντονα λιπόφιλη περιοχή, η α-τοκοφερόλη και το β-καροτένιο, θα πρέπει να καταναλώνονται για την αντιμετώπιση μεγάλου αριθμού παραγομένων ελευθέρων ριζών.

Στην βιβλιογραφία δεν υπάρχουν δεδομένα που να φαίνεται ποιος είναι ο μηχανισμός με τον οποίο τα ιόντα Cu^{2+} επιδρούν στη λιπιδική υπεροξείδωση. Τα πειραματικά μας δεδομένα δείχνουν ότι είναι πιθανό τα ιόντα Cu^{2+} να δεσμεύονται σε ξεχωριστά σημεία της apoB και να σχηματίζουν κέντρα για επαναλαμβανόμενη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Μετά το σχηματισμό του συμπλόκου Cu^{2+} -LDL και την αναγωγή του Cu^{2+} σε Cu^+ , αρχίζει η παραγωγή των ελευθέρων ριζών. Η ταχύτητα παραγωγής των ριζών εξαρτάται από την συγκέντρωση των ιόντων χαλκού και των μορίων LDL. Η αύξηση της συγκέντρωσης του χαλκού οδηγεί σε αύξηση της ταχύτητας και της υπεροξείδωσης.

Τα ιόντα του δισθενούς χαλκού, Cu^{2+} , μπορούν να αναχθούν προς μονοσθενή χαλκό, Cu^+ , από τους αναγωγικούς παράγοντες του οργανισμού, όπως είναι οι θειόλες

$$Cu^{2+} + RSH \rightarrow Cu^{+} + 1/2RS - SR$$
[61]

και τα μολυβδαινοένζυμα, με μεταφορά ηλεκτρονίου:

$$Cu^{+2} + e \to Cu^{+}$$
[62]

Ο παραγόμενος μονοσθενής χαλκός σε κάθε περίπτωση δίνει σειρά αντιδράσεων διατηρώντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών υδροξυλίου κατά την αντίδραση Haber-Weiss:

$$Cu^{+} + H_2O_2 \rightarrow Cu^{2+} + HO^{\bullet} + HO^{-}$$
[63]

Οι παραγόμενες από την αντίδραση Haber-Weiss ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου αρχίζουν με απόσπαση ατόμων υδρογόνου ή προσθήκης στους διπλούς δεσμούς των αρχικών ελευθέρων ριζών των λιπιδίων, οι οποίες στη συνέχεια οδηγούν στην λιπιδική υπεροξείδωση. Τα ιόντα χαλκού (Cu⁺) είναι ισχυρά προοξειδωτικά (prooxidants) και πιθανόν να παράγουν ένα σύμπλοκο (transition complex) με

μοριακό οξυγόνο, αντίστοιχο με εκείνο που σχηματίζει ο σίδηρος με το οξυγόνο στην αιμοσφαιρίνη:

$$Cu^{+} + O_{2} \leftrightarrow Cu^{2+} + O_{2}^{-\bullet}$$
[64]

αντίδραση η οποία οδηγεί στην απελευθέρωση ιόντων υπερόξυ ελευθέρων ριζών $O_2^{-\bullet}$ διατηρώντας την υπεροξείδωση των λιποπρωτεϊνών.

Οι αντιδράσεις [60-63] διακαιολογούν την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών, οι οποίες καταλήγουν σε σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων. Χαρακτηριστικό των αλυσιδωτών αντιδράσεων διάδοσης είναι ότι από την απλή αντίδραση έναρξης στη συνέχεια ένας μεγάλος αριθμός λιπιδίων μετατρέπεται σε λιπιδικά υπεροξείδια. Ο αριθμός των μορίων των λιπιδίων (L) που οξειδώνονται ανά σχηματιζόμενη ρίζα L εξαρτάται από τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών και το ρυθμό της αντίδρασης τερματισμού της ανθρακικής αλυσίδας (chain termination).

Ο τερματισμός των ελευθέρων ριζών των λιπιδίων επιτυγχάνεται είτε με προσφορά ατόμων υδρογόνου από τις ενδοπροστατευτικές ενώσεις, όπως οι θειόλες, είτε με διμερισμούς ή πολυμερισμούς των ελευθέρων ριζών των λιπιδίων.

Συμπεράσματα

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η υπέρυθρη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier (Fourier Transform Infrared, FT-IR) με η τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (ATR, Attenuated Total Reflection).σε συνδυασμό με το ηλεκτρονιακό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) και στοιχειακό αναλυτή (EDAX) για την μελέτη της μοριακής δομής αθηρωματικών πλακών καρωτίδων και στεφανιαίων αρτηριών, ασθενών που υποβλήθηκαν σε χειρουργική ενδαρτηρεκτομή και bypass επεμβατική αποκατάσταση. Με την ATR-FT-IR τεχνική δεν επιβάλλεται η κατασκευή παστίλιας, γεγονός που επιτρέπει την άμεση παρακολούθηση των δειγμάτων και την επιλογή διαφόρων θέσεων στο ίδιο δείγμα, υπό μορφή σάρωσης (mapping). Η σύγκριση των φασμάτων έγινε μεταξύ ατόμων που δεν είχαν παρουσιάσει ποτέ ιατρικές επιπλοκές, όπως π.χ. ισχαιμικό επεισόδιο ή τα όρια σακχάρου ή ουρικού οξέος στον ορό του αίματός τους βρίσκονται σε φυσιολογικά επίπεδα. Οι ασθενείς καταχωρήθηκαν σε κατηγορίες, ανάλογα με το ιατρικό ιστορικό, την ηλικία και την φαρμακευτική αγωγή την οποία ακολουθούσαν.

Από την μελέτη των αθηρωματικών πλακών των καρωτίδων και στεφανιαίων αρτηριών διαπιστώθηκε ότι

- Τα ATR-FT-IR φάσματα των ασθενών παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές σε όλο τους το εύρος (4000-400 cm⁻¹). Παρατηρήθηκαν μεταβολές στην περιοχή περίπου των 3600-3400 cm⁻¹, όπου εμφανίζονται οι δονήσεις τάσης των vOH ομάδων του νερού και υδροξυλίων. Αύξηση της έντασης συνεπάγεται προσθήκη ελευθέρων ριζών υδροξυλίου στους διπλούς δεσμούς C=C των ακόρεστων λιπαρών οξέων.
- Η ταινία περίπου στα 3080 cm⁻¹ καθώς και η ταινία στα 1734 cm⁻¹ συνδέθηκαν άμεσα με την LDL χοληστερόλη των ασθενών. Οι εντάσεις των ταινιών αυτών βρέθηκε να αυξάνουν με αύξηση της LDL χοληστερόλης των ασθενών. Σε ασθενείς που ακολουθούσαν την ενδεδειγμένη φαρμακευτική αγωγή, η ένταση των ταινιών αυτών μειώθηκε σημαντικά. Για τον λόγο αυτό οι συγκεκριμένες ταινίες θα μπορούσαν να αποτελέσουν δείκτη προδιάγνωσης.

- Οι μεταβολές στην περιοχή 3000-2800 cm⁻¹ έδειξαν την μεταβολή της ευκινησίας και λιποφιλικότητας των μεμβρανών. Η αύξηση των εντάσεων των ταινιών του φάσματος στην αναφερόμενη περιοχή ήταν ανάλογη της κλινικής κατάστασης του ασθενούς. Οι μεταβολές αυτές συνδυάστηκαν με τις αντίστοιχες μεταβολές στην περιοχή των περίπου 1450 cm⁻¹, που έδειξαν παρόμοια συμπεριφορά, δηλαδή αύξηση της έντασης των ταινιών.
- Οι μεταβολές στην περιοχή 1700-1500 cm⁻¹ και οι μετατοπίσεις προς μικρότερους κυματαριθμούς έδειξαν ότι η μοριακή δομή των πρωτεϊνών έχει καταστραφεί και ιδιαίτερα η δευτεροταγής δομή από α-έλικα έχει μετατραπεί σε αντιπαράλληλη β-διαμόρφωση μέχρι και τυχαία περιέλιξη.
- Τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και με SEM χαρτογράφηση της αρχιτεκτονικής των αθηρωματικών πλακών. Οι ληφθείσες εικόνες έδειξαν τμήματα θραυσμένων πρωτεϊνών, τα οποία δεν είχαν διαμόρφωση α-έλικας.
- Σημαντικό ήταν ότι οι απολιποπρωτεΐνες (apoA) που συνδέονται με την HDL χοληστερόλη, εντοπίσθηκαν σε λιποειδή συσσωματώματα και θραύσματα των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων των μεμβρανών.
- Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν αποδόθηκαν στην επίδραση των ελευθέρων ριζών λόγω ενδογενών ή εξωγενών παραγόντων. Σε αρκετούς ασθενείς οι εξωγενείς παράγοντες συνδέθηκαν με το εργασιακό τους περιβάλλον.
- Οι αθηρωματικές πλάκες είναι πλούσιες σε ανθρακικό ασβέστιο, όπως φαίνεται από τις ταινίες στα 1460 cm⁻¹ και 874 cm⁻¹, οι οποίες αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης των ανθρακικών ιόντων CO₃²⁻.
- Τα βαρέα μέταλλα που ανιχνεύθηκαν με SEM-EDAX στοιχειακή χημική ανάλυση ήταν Ag, Pb, Cr, Fe, Ni, Mn, Mo. Όλα αυτά τα μέταλλα προκαλούν οξειδωτικό στρες και επομένως την υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών. Τα ευρήματα αυτά ενισχύθηκαν και με την μεταβολή των ταινιών στην περιοχή 700-400 cm⁻¹, οι οποίες αντιστοιχούν στην απορρόφηση των χαρακτηριστικών δισουλφιδικών ομάδων S-S. Τα δισουλφίδια παράγονται είτε επειδή οι ενδογενείς γλουταθειόλες ανταγωνίζονται τις ελεύθερες ρίζες είτε επειδή παρέχουν τα ευκίνητα άτομα υδρογόνου για επιδιόρθωση των προκληθέντων βλαβών.

- Σε ασθενείς με αυξημένο ουρικό οξύ οι παραγόμενες υπερόξυ ελεύθερες ρίζες προκαλούν μεγαλύτερες βλάβες στα λιπίδια και τις πρωτεΐνες των ιστών. Η ανίχνευση Μο μόνο στα αθηρώματα των υπερουρικαιμικών ασθενών συνδέεται με την αδυναμία των μολυβδαινοενζύμων να καταλύσουν τον κύκλο της υποξανθίνης προς ξανθίνη και τελικό προϊόν ουρικό οξύ. Το φαινόμενο ήταν περισσότερο έντονο στους ασθενείς με ισχαιμικό επεισόδιο.
- Οι μεταβολές της μορφής, της έντασης και των μετατοπίσεων των ταινιών των ATR-FT-IR φασμάτων δείχνουν ότι το οξειδωτικό στρες του οργανισμού και οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxyzen Speices, ROS) ευθύνονται για την έναρξη της υπεροξείδωσης των μεμβρανών και την περαιτέρω βλάβη του κυττάρου, που οδηγεί στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να οφείλεται τόσο σε ενδογενείς όσο και σε εξωγενείς παράγοντες.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η υπέρυθρη φασματοσκοπία υπερτερεί σε σχέση με τις άλλες διαγνωστικές μεθόδους, που δίνουν πληροφορίες μόνο σχετικά με το μέγεθος της βλάβης και τον ρυθμό της πορείας της ασθένειας, επειδή δεν δίνει απλά το μέγεθος της βλάβης, αλλά παράλληλα παρέχει πληροφορίες σχετικά με τα προϊόντα των αθηρωματικών πλακών και τις βλάβες, σε μοριακό επίπεδο των λιπιδίων, φωσφολιπιδίων και επομένως μια καλύτερη προσέγγιση στον μηχανισμό της αθηρωγένεσης.

Βιβλιογραφία

Anastassopoulou J, Mass spectrometry and FT-IR spectroscopy of quaternary ammonium salts, in: *Topics in Molecular Organization and Engineering-Properties and Chemistry of Biomolecular Systems*, Eds. Rizzarelli E. and Theophanides T., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1991, pp. 1-10

Anastassopoulou J & Theophanides T, "Raman studies of model vesicle systems", J. Appl. Spectrosc., 44 (1990) 523

Anastassopoulou J., Theophanides T., Aquation of metal ions and infrared and raman spectra of metal complexes and their interaction with DNA components- A vibrational study of metal-DNA interactions, in: *Inshights into vibrational spectroscopy of nucleic acids and their complexes*, Eds, Muntean C.M. and Bratu J., Transworld Research Network Publishers, Chapter 3, 2009, pp 47-65

Anastassopoulou J., Boukaki E., Conti C., Ferraris P., Giorgini E., Rubini C., Sabbatini S., Theophanides T., Tosi G., Microimaging FT-IR spectroscopy on pathological breast tissues, *Vib Spectrosc*, 51 (2009) 270-275

Anastassopoulou J., Kolovou P., Mavrogenis A., Bone and Cancer. A synchrotron micro- infrared study, *Metal Ions Biol Med*, 10 (2008) 210-213

Barth A., Infrared spectroscopy of proteins, *BBA - Bioenergetics*, 1767/9 (2007) 1073-1101

Barter P., Kastelein J., Nunn Al., Hobbs R., Future Forum Editorial Board, High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions, *Atherosclerosis* 168 (2003) 195-211

Bellamy.J. L. The infrared spectroscopy of complex molecules, 3^{rd} Edition, Chapman and Hall, London, 1975

Blout E. R. and Mellor R. C., Infrared Spectra of Tissues, Science, 110/2849 (1949) 137-138

Bolanos-Garcia V. M., Miguel R. N., On the structure and function of apolipoproteins: more than a family of lipid-binding proteins, *Progress in Bioph Mol Biology*, 83 (2003) 47–68

Brandes R., Bers D M, Increased work in cardiac trabeculae causes decreased mitochondrial NADH fluorescence followed by slow recovery, *Biophys J.*, 71 (1996) 1024–1035

Bray R.C., problem in studing the role of molybdenum in xanthine oxidase, J. Less-Common Met, 36/1-2 (1974) 413-427

*B*ritton R.S, Bacon B.R, Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis, *Hepato-gastroenterol*, 41/4 (1994) 343-348

Caine S., Heraud P, Tobin M J., McNaughton D, Bernard C C.A., The application of Fourier transform infrared microspectroscopy for the study of diseased central nervous system tissue, *Neuroimage*, 2011, in Press

Cannon C.P., Contemporary Diagnosis and Management of Acute coronary Syndrome, Daiich Sankyo, Inc and Elli Lilly and Company, 2007

Cascieri M. A., The potential for novel anti-inflammatory therapies for coronary artery disease, *Nat Rev Drug Discov*, ¹/₂ (2002) 122-130

Chehin R, Rengel D, Milicua J CG., Goñi F M., Arrondo J LR. And Pifat G, Early stages of LDL oxidation: apolipoprotein B structural changes monitored by infrared spectroscopy, *J Lipid Res*, 42 (2001) 778-782

Compagnini G., Licciardello A., Roman L., Puglisi O, A combined Raman and XPS study of the effects induced on glutathione by ion beam irradiation, *Nuclear Instumr*. *Meth. B*, 116/1-4 (1996) 242-245

Conti C., Ferraris P., Giorgini E., Rubini C., Sabbatini S., Tosi G., Anastassopoulou J., Arapantoni P., Boukaki E., Theophanides T., Valavanis C., FT-IR Microimaging Spectroscopy: Discrimination between healthy and neoplastic human colon tissues, *J. Mol Struct.* 881 (2008) 46-51

Crichton, R.R. and Pierre J.L., Old iron, young copper: from Mars to Venus, *Biometals*, 14/2 (2001) 99-112.

Currell Gr., Analytical Instrumentation–Performance, Characteristics and Quality, John Wiley & sons Ltd, 2007, England.

D'Alessandro A, Rinalducci S, Zolla L, Redox proteomics and drug development, J Proteomics, 74/12 (2011) 2575–2595

Davis J. R., Metals Handbook–The Materials Information Society, 1998, pp: 1422 – 1426

*D*awson V. L., Dawson T. M., Pathologic roles of nitric oxide in the central nervous system. In: Free Radicals in Brain Physiology and Disorders, Eds, Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T., San Diego, CA: Academic Press, Inc., 1996, pp 83-100

Deguchi JO, Aikawa M, Tung CH, Aikawa E., Kim D.E., Ntziachristos V., Weissleder R., Libby P., Inflammation in atherosclerosis: visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages in vivo, *Circulation*, 114 (2006) 55-62

*E*lliott A. and Ambrose E. J., Structure of Synthetic Polypeptides, *Nature*, 165/4206 (1950) 921-922

*E*sterbauer H, Gebicki J., Puhl H., Gunther J, The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL, *Free Radical Bio. Med.*, 13/4 (1992) 341-390

Esterbauer H., Ramos P., Chemistry and pathophysiology of oxidation of LDL, Rev Physiol Bioch P, 127 (1996) 31-64

Fernàntez-Espejo E., Pathogenesis of Oxidative Stress and the Destructive Cycle in the Substantia Nigra in Parkinson's Disease, in: *Cortico-Subcortical dynamics in Parkinson's disease*, Ed. K-Y. Tseng, Humana Press, Chap.16, 2006, pp.261-280.

*F*ernandez-Ortiz A., Badimon JJ, Falk E., Fuster V., Meyer B., Mailhac A., Weng D., Shah P.K. and Badimon L, Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture, *J Am Coll Cardiol*, 23 (1994) 1562-1569

*F*erns G. A., Lamb D. J., Taylor A., The possible role of copper ions in atherogenesis: the Blue Janus, *Atherosclerosis*, 133/2 (1997) 139–152

*F*inney L.A., O'Halloran T.V., Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors, *Science*, 300/5621 (2003) 931-936

*G*houleh Al, Khoo NK.H., Knaus U G., Griendling K K., Touyz R M., Thannickal V J., Barchowsky A, Nauseef WM., Kelley E E., Bauer P M., Darley-Usmar V, Shiva S, Cifuentes-Pagano E, Freeman B A., Gladwin M T., Pagano P J., Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: New concepts in reactive oxygen species signaling, *Free Radical Bio. Med*, 51/7 (2011) 1271–1288

Goormaghtigh E., Raussens V., Ruysschaert J.-M., Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes, *BBA-Rev Biomembranes*, 1422/2 (1999) 105-185

*G*ordon L M., Mobley P W., Lee W, Eskandari S, Kaznessis YN., Sherman M A. and Waring Al. J., Conformational mapping of the N-terminal peptide of HIV-1 gp41 in lipid detergent and aqueous environments using ¹³C-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy, *Protein Sci.*, 13/4 (2004) 1012-1030

Gotto A. M. Jr., Pownall H. J., Havel R J., Introduction to the plasma lipoproteins, *Method Enzymol*, 128 (1986) 3-41, and references there in

*G*riffith O. W., Stuehr D. J., Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanisms, *Ann Rev Physiol*, 57 (1995) 707-736

*G*riffiths PR., Fourier Transform Spectroscopy, in *Laboratory Methods in Infrared Spectroscopy*, 2nd Edition, Eds. R. G. J. Miller and B. C. Stace, Heyden & son Ltd., London, Chapter 7, 1972

*H*alliwell B., Poulsen H. E., Cigarette Smoke and Oxidative Stress, Springer, New York, 2006.

Hansson GK., Immune mechanisms in atherosclerosis. Arterioscl Throm Vas., 21 (2001) 1876-1890.

*H*ansson GK., Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New Engl J Med*, 352/16 (2005) 1685-1695

Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a doubled-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 6/7 (2006) 508-519

*H*awkins CL, Davies MJ., Oxidative damage to collagen and related substrates by metal/hydrogen peroxide systems: random attack or site-specific damage?, *BBA-Mol Basis Dis*, 1360/1 (1997) 84-96

*H*erschel W., Investigation of the powers of the prismatic colours to heat and illuminate objects; with remarks, that prove the different refrangibility of radiant heat. To which is added, an inquiry into the method of viewing the sun advantageously, with telescopes of large apertures and high magnifying powers., *Phil Trans R Soc London*, January 1, 90 (1800) 255-283

*H*evonoja T, Pentikäinen M.O., Hyvönen M.T., Kovanen P.T., Ala-Korpela M., Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL, *BBA-Mol Cell Biol L*, 1488/3 (2000) 189-210, and references there in

*H*ille R, Nishimo T, Bittnerc F., Molybdenum enzymes in higher organisms, *Coordin Chem Rev*, 255/9-10 (2011) 1179-1205

*I*gnarro L.J., Endothelium-derived nitric oxide: Pharmacology and relationship to the actions of organic esters, *Pharm Res*, 6 (1989) 651-659

Insull W., The pathology of atherosclerosis: Plaque development and plaque responses to medical treatment, *Am J Med.*, 122(1 Suppl) (2009) S3-S14, and references there in

Jonas A., Lipoprotein structure, in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (4th Edn.), Eds. Vance D.E. and Vance J.E., Elsevier Science B.V., Chapter 18, 2002, pp. 483-504

Jones C. M., Lawrence A., Wardman P., Burkitt M. J., Electron paramagnetic resonance spin trapping Investigation into the kinetics of glutathione oxidation by the superoxide radical: re-evaluation of the rate constant, *Free Radical Bio Med*, 32/10 (2002) 982–990

*K*amido H, Eguchi H, Ikeda H, Imaizumi T, Yamana K, Hartvigsen K, Ravandi A and Kuksis As, Core aldehydes of alkyl glycerophosphocholines in atheroma induce platelet aggregation and inhibit endothelium-dependent arterial relaxation, *J Lipid Res*, 43 (2000) 158-166

*K*amnev A.A., Ristic M., Colina M., Antonyuk L.P., Chernyshev A.V., Ignatov V.V. Comparative spectroscopic study of intact cells and cell membranes of the bacterium *Azospirillum brasilense*. In: *Spectroscopy of Biological Molecules: Modern Trends*, Eds., Carmona P., Navarro R., Hernanz A., Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1997, pp. 313-314.

Kennedy A.R., Troll W., Little J.B., Role of free radicals in the initiation and promotion of radiation transformation in vitro. *Carcinogenesis*, 5/10 (1984) 1213-1218

*K*olovou P., Anastassopoulou J., Synchrotron FT-IR spectroscopy of human bones. The effect of aging. In *Brilliant Light in Life and Material Sciences*, Eds. V. Tsakanov and H. Wiedemann, Springer, 2007, pp.267-272

Koppenol Wh., The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite, *Free Radical Bio Med*, 25/4-5 (1998) 385-391

*K*oui M., Nikokavoura A., Anastassopoulou J., Theophanides T. FT-IR spectroscopic studies of supramolecular liquid crystals obtained from multi cationic piperazinium and aza macrocyclic alkylsulfates, *Asian Chem. Letters*, 11 (2007) 93-104

Kranner II., Birtić S., A Modulating Role for Antioxidants in Desiccation Tolerance, *Integr. Comp. Biol.*, 45/5 (2005) 734–740

*Li*bby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease, *Circulation*, 111 (2005) 3481-3488

*M*ahmoudi M, Curzen N and Gallagher PJ. Atherogenesis: the role of inflammation and infection. *Histopathology*, 50 (2007) 535-546

*M*amarelis I., Pissaridi K., Dritsa V., Kotileas P., Tsiligiris V., Tzilalis V. and Anastassopoulou J., Oxidative Stress and Atherogenesis. An FT-IR Spectroscopic Study, *In Vivo*, 24 (2010) 883-888

*M*amarelis I., Pissaridi K., Dritsa V., Koutoulakis E., Cotoulas C., Kotileas P., Tsiliggiris V., Tzilalis V., Xaplanteris P., Lazaridis K., Anastassopoulou J., The effect of molybdenoenzymes on atherosclerotic hyperuricaemic patients, In *Coronary Artery*

Disease: Up 2011, Eds. B.S. Lewis, M.Y. Flugelman, D. A. Halon, Medimond, International Proceedings, Bologna, Italy 2011, pp.83-90

*M*endelsohn, R., Mantsch, H.H., Fourier transform infrared studies of lipid–protein interaction, in: *Progress in Protein–Lipid Interactions*, Eds. Watts, A., DePont, J.J.H.H.M., vol. 2. Elsevier, Amsterdam, 1986, pp. 103–146

*M*ertens A, Holvoet P., Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J*, 15 (2001) 2073-2084

*M*iller L.M., Wang Q., Telivala T.P., Smith R.J., Lanzirotti A., Miklossy J., Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with β -amyloid deposits in Alzheimer's disease. *J. Struct. Biol.*, 155/1 (2006). 30–37

*M*inka R, Johnston J, The effect of infusing hypoxanthine or xanthine on hypoxicischemic brain injury in rabbits, *Brain Res.*, 1147 (2007) 256-264

*M*oncada S., Palmer R. M., Higgs E. A., Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology, *Pharmacol Rev*, 43 (1991) 109-142

*M*oreno P. R., Falk E., Palacios I. F., Newell J. B., Fuster V., Fallon J. T., Macrophage Infiltration in Acute Coronary Syndromes, Implications for Plaque Rupture, *Circulation* 90 (1994) 775-778

*M*urakami K., Kondo T., Kawase M., Li Y., Sato S., Chen S.F., Chan P.H., Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with Manganese Superoxide Dismutase deficiency, *J. Neurosci*, 18/1 (1998) 205–213

Nelson D., Cox M., Lehninger, *The Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman Publishing, 4th Edition (2004)

*N*ewton I., Mr. Isaac Newton's Considerations on the Former Reply; together with Further Directions, How to Make the Experiments Controverted Aright: Written to the Publisher from Cambridge, Novemb. 13. 1675, *Phil Trans, January 1, 10 (1675) 500-504*

O'Halloran T.V, Culotta V.C., Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions, *J Biol Chem*, 275/33 (2000) 25057-25060

*P*aoletti R, Gotto AM Jr, Hajjar DP. Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy, *Circulation*, 109(suppl 1) (2004) III20- III26

*P*arks D. A., Skinner K. A., Skinner H. B., Tan S., Multiple organ dysfunction syndrome: Role of xanthine oxidase and nitric oxide, *Pathophysiology*, 5/1 (1998) 49–66

*P*etra M., Anastassopoulou J., Dovas A., Yfantis D.and Theophanides T., Aging of human bones. An infrared study, *Metal Ions Biol Med*, 6 (2000) 736-737

Petra M., Anastassopoulou J., Theologis T., Theophanides T., Synchrotron micro-FT-IR spectroscopic evaluation of normal paediatric human bone, *J. Mol Struct*, 78 (2005) 101-116

*P*etra M., Anstassopoulou J., Yfantis D., Theophanides T., 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.

Phillis J. W., Walter G. A. and Simpson R. E., Release of purines and neurotransmitter amino acids into cerebral cortical perfusates during and following transient ischemia, *Int. J. Purine Pyrimidine Res.*, 2 (1991) 41-48.

*P*issaridi K., Dritsa V., Mamarelis I., Koutoulakis E., Kotulas Ch., Anastassopoulou J., The role of Molybdenum on atheromatic plaque formation, *Metal Ions Biol. Med*, 11 (2011) 219-224.

*P*rasad Ab., Zhu J., Halcox J., Predisposition to Atherosclerosis by Infections: Role of Endothelial Dysfunction. *Circulation*, 106 (2002) 184-190

Radi R, Denicola A, Freeman B, Peroxynitrite reactions with carbon dioxidebicarbonate, *Method Enzymol*, 301 (1999) 353-367

Rajendra N. S., Ireland S, George J., Belch J. J. F., Lang C.C., Struthers A. D., Mechanistic Insights Into the Therapeutic Use of High-Dose Allopurinol in Angina Pectoris, *J. Am Coll Cardiology*, 58 (2011) 820-828

Ramos K S, Partridge Ch. R, Teneng I., Genetic and molecular mechanisms of chemical atherogenesis. *Mutat Res*, 621 (2007), 18-30

Ravandi A., Kuksis A., Shaikh N.A., Glycated phosphatidylethanolamine promotes macrophage uptake of low density lipoprotein and accumulation of cholesteryl esters and triacylglycerols, *J. Biol. Chem.*, 274/23 (1999) 16494-16500.

Rosenfeld ME, Schwartz SM., Murine models of advanced atherosclerosis. In Virmani R, Narula J, Leon MB, Willerson JT, eds. *The Vulnerable Atherosclerotic Plaque: Strategies for Diagnosis and Management*. Malden, MA: Blackwell Publishing (2007) 105-127.

Ross R., Atherosclerosis — An Inflammatory Disease, *New Engl J Med*, 340/2 (1999) 115-126

Schneeweis LA., Koppaka V, Lund-Katz S, Phillips M C., Axelsen P.H., Structural Analysis of Lipoprotein E Particles, *Biochemistry*, 44 (2005) 12525-12534

Shattock SG., A report upon the pathological condition of the aorta of King Menephtah, traditionally regarded as the Pharaoh of the Exodus., *Proc R Soc Med.* 2 (Pathol Sect) (1909) 122-127.

Shaw RA, Buchko GW, Wang G, Rozek A, Treleaven WD, Mantsch HH, Cushley RJ. Infrared spectroscopy of human apolipoprotein fragments in SDS/D2O: relative lipid-binding affinities and a novel amide I assignment, *Biochemistry*, 36/47 (1997) 14531-14538

Seet R C.S., Lee C-Y J., Loke W M, Huang S H, Huang H., Looi W F, Chew E. S., Quek A.M.L., Lim E C.H., Halliwell B, Biomarkers of oxidative damage in cigarette smokers: Which biomarkers might reflect acute versus chronic oxidative stress? *Free Radical Bio Med*, 50 (2011) 1787–1793

Steinberg D., Atherogenesis in perspective: Hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime, *Nature*, 8 (2002) 1211-1217

Sun J, Sukhova GK, Wolters PJ, Yang M., Kitamoto S., Libby P., MacFarlane L. A, Mallen-St Clair J. and Shi G.P., Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines, *Nat Med*, 13 (2007) 719 – 724.

Suzuki Sh., Shimanouchi T., Tsuboi M., Normal vibrations of glycine and deuterated glycine molecules, *Spectrochim Acta*, 19/7 (1963) 1195-1208

*T*heophanides T., *Infrared and Raman spectroscopy of biological molecules*, NATO Advanced Study Institute, D Reidel Publishing Co, Dodrecht, 1978.

Theophanides T., Fourier Transform Infrared Spectroscopy, D. Reidel Publishing Co. Dodrecht, 1984.

Theophanides T. and Sandorfy C., *Spectroscopy of Biological Molecules*, NATO Advanced Study Institute, D. Reidel Publishing Co., Dodrecht, 1984

*T*heophanides T and Tajmir-Riahi HA., Spectroscopic properties of metalnucleotide and metal-nucleic acid interactions, in *Spectroscopy of biological molecules*, Eds Sandorfy C. & Theophanides T., Reidel Publishing Co, 1984, pp. 137-152

Theophanides T., Angiboust J.P. and Manfait M., Protein and Nucleic Acid Conformational Changes, in *Spectroscopic and Structural Studies of Biomaterials, I. Proteins*, Eds., Twardowski J., Sigma Press, Wilmslow, UK, 1988, pp. 3

*T*heophanides T., Anastassopoulou J. and Fotopoulos N., Fifth International Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, 1991

Theophanides T., Anastassopoulou J., Copper and carcinogenesis, Crit Rev Oncol Hemat, 42/1 (2002) 57-64

*T*sompanidi E. M., Brinkmeier M. S., Fotiadou E. H., Giakoumi S. M., Kypreos K. E., HDL biogenesis and functions: Role of HDL quality and quantity in atherosclerosis, *Atherosclerosis*, 208 (2010) 3–9

Tsuboi M., Takenishi T., Nakamuba As., Some characteristic frequencies of amino acids, *Spectrochim Acta*, 19/1 (1963) 271-284

*T*urner D.M., Carbon monoxide, tobacco smoking, and the pathogenesis of atherosclerosis. *Prev. Med.*, 8/3 (1979) 303–309

Van der Vaart H., Postma D. S., Timens W., Ten Hacken N. H., Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review, *Thorax*, 59 (2004) 713–721

Vistnes A.I., Henriksen T, Nicolaissen B, Armstrong D., Free radicals and aging. Electron spin resonance studies on neuronal lipopigments and cells grown in vitro, *Mech Ageing Dev*, 22/3-4 (1983) 335-345

Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC, Borst C. Arterial remodeling: Mechanisms and clinical implications. *Circulation*, 102 (2000) 1186-1191

*W*illerson JT, Ridker PM., Inflammation as a cardiovascular risk factor, *Circulation*, 109 (suppl 1) (2004) II2-II10

*W*illiams KJ, Feig JE, Fisher EA. Rapid regression of atherosclerosis: insights from the clinical and experimental literature. *Nat Clin Pract Card*, 5/2 (2008) 91-102

Wink D. A., Mitchell J. B., Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Bio Med*, 25 (1998) 434-456

Woernley D. L., Infrared Absorption Curves for Normal and Neoplastic Tissues and Related Biological Substances, *Cancer Res.*, 12/7 (1952) 516-523

Yoshida Y., Furuta S., Niki E., Effects of metal chelating agents on the oxidation of lipids induced by copper and iron, *BBA Lipid Lipid Met*, 1210/1 (1993) 81-88

Young H D., Physics, Addison – Wesley Publishing Company, 8th Edition, 1992, 1151 – 1154

Ελληνική Βιβλιογραφία

Αναστασοπούλου Ι. Δ., Ραδιόλυση υδατικών διαλυμάτων 2,2,6,6-τετραμεθυ λοπιπεριδινοζυλίου-1 δι' ακτίνων γ. Ραδιοευαισθητοποίησις χημικών συστημάτων, Διδακτορική διατριβή, Αθήνα, 1978

Αναστασοπούλου Ι., Ακτινοχημική μελέτη δινουκλεοτιδίων, Χημικά Χρονικά Β, Πρακτικά, Αθήνα, 1986, σελ. 394

Αναστασοπούλου Ι., Ακτινοχημεία, Χημεία ελευθέρων ριζών, Εφαρμογές στην Βιομηχανία, Περιβάλλον, Βιολογία, Αθήνα, 2003

Αναστασοπούλου Ι., Θεοφανίδης Θ.,. Βιοϋλικά, Χημικός δεσμός δότη – δέκτη , Μακρομόρια – Υπερμόρια, ΕΜΠ, Αθήνα, 2010

Θεοφανίδης Θ., Αναστασοπούλου Ι., *Φασματοσκοπία Δονήσεων – Συμμετρία*, ΕΜΠ, Αθήνα, 1997

Θεοφανίδης Θ., Ιατρίδης Β., Φτίκος Χ., Παπασπυρίδης Κ., Καραγεώργος Α., Δομή και Ιδιότητες των υλικών, Αθήνα, 1987

Μαμαρέλης Ι., Φασματοσκοπική μελέτη του μηχανισμού γένεσης της αθηρωματικής πλάκας, Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα, 2010

Μαμαρέλης Ι., Κοτιλέας Π., Τσιλιγγίρης Β., Τζιλαλής Β., Πισσαρίδη Κ., Δρίτσα Β. Και Αναστασοπούλου Ι., Υπεροξείδωση των καρωτίδων αρτηριών κατά το οξειδωτικό στρες. FT-IR φασματοσκοπική μελέτη, Ελληνική Καρδιολογική Επιθεώρηση, 52 (2011) 117-123

Πετρά Μ., Θεολόγης Τ., Μισαϊλίδης Σ., Αναστασοπούλου Ι., Θεοφανίδης Θ., Μελέτη της σύστασης και δομής παιδικού οστού με μικρο-υπέρυθρη φασματοσκοπία (micro-FTIR), Οστούν, 13 (2002) 56-57

http://www2.eng.cam.ac.uk/~bcb/history.htm

Ευρετήριο Όρων

AAPH (2, 2'-azobis-2-methyl- propanimidamide, dihydrochloride)	Διυδροχλωρικό 2,2΄-αζω-δις-μεθυλ- προπαναμίδιο
Advanced glycation end products, AGEs	Τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης
Adventitia	Εξωτερική μεμβράνη
Adeonosine Triphosphate, ATP	Τριφωσφορική αδενοζίνη
Aggregates	Συσσωματώματα
Apolipoprotein, Apo	Απολιποπρωτεΐνη
Attenuated Total Reflectance, ATR	Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση
Azide	Αζίδιο
Beam splitter	Διαχωριστής δέσμης
Bending vibration	Δονήση κάμψης ή ψαλλίδισης
Bond constant	Σταθερά του δεσμού
Calcification	Ασβεστοποίηση
Calorific rays	Θερμικές ακτίνες
Cathode Ray Tube, CRT	Αυχνία καθοδικών ακτίνων
Ceramide, CER	Κεραμίδιο
Ceruloplasmin	Σερουλοπλασμίνη
Chain propagation	Αλυσιδωτή αντίδραση διάδοσης
Chain termination	Τερματισμός της ανθρακικής αλυσίδας
Chemical species	Χημικά σωματίδια
Cholesterol Esterase, CEase	Χοληνεστεράση
Cholesteryl ester transfer protein, CETP	Πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης
Cholesteryl Esters, CE	Εστέρες της χοληστερόλης
Chopper	Διακόπτης

Cofactor deficiency	Συντελεστής ανεπάρκειας
Copper chaperones	Πρωτεΐνες-συνοδοί χαλκού
Core-aldehydes	Αλδεΰδες δεσμευμένες σε γειτονικά λιπίδια της ανθρακικής αλυσίδας
Cytosolic	Ενδοκυτταρικός
Debris	Υπολειμματικά προϊόντα κυτταρικής αποδόμησης
Deconvolution	Λεπτομερής ανάλυση με μαθηματικό διαχωρισμό των ταινιών απορρόφησης
Dehydrogenase	Αφυδρογονάση
Diacylglycerol, DAG	Διακυλογλυκερόλη
Diffusion	Διάχυση
Dispersive spectrometers	Φασματοφωτόμετρα διασποράς
DNA	Δισόξυ νουκλεϊνικό οξύ
Docosahexanoic acid, DHA	Δοκοσαεξανοϊκό οξύ
Early fibroatheroma	Αθηρωματική πλάκα
Efflux	Εκροή
Electron spin resonance, esr	Φασματομετρία ηλεκτρονικού παραμαγνητισμού
Energy-dispersive Analysis X-Ray, EDAX	Ανάλυση με Ενέργεια Κατανομής Ακτινών Χ
Enterocyte	Εντεροκύτταρο
Fatty Streak Development	Ανάπτυξη λιπωδών γραμμώσεων
Fibrils	Ινίδια
Fingerprint	Δακτυλικό αποτύπωμα
Fixative	Σταθεροποιητική ουσία
Foam cell	Αφρώδες κύτταρο
Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR	Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier
Genetically manipulated	Γεννετικά τροποποιημένα

Glutathione, GSH	Γλουταθειόλη
Head core	Υδρόφιλο τμήμα
High density lipoprotein, HDL	Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
Higher and lower order	Υψηλή και χαμηλή κατανομή
Infrared–IR	Υπέρυθρη (ακτινοβολία)
Interferogram	Συμβολογράφημα
Interferometer	Συμβολόμετρο
Intermediate density lipoprotein, IDL	Ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
Intima	Εσωτερική μεμβράνη
IR-active	Ενεργός στο υπέρυθρο
IR-inactive	Ανενεργός στο υπέρυθρο
Isotopic substitution	Ισοτοπική αντικατάσταση
Kinks	Κάμψεις
LDL receptors, LDLR	Υποδοχείς LDL
Lecithin cholesterol acyltransferase, LCAT	Λεκιθινοχοληστερολ- ακυλοτρανσφεραση
Lipid peroxidation, LPO	Λιπιδική υπεροξείδωση
Lipid peroxidation, LPO Lipo-oxygenase, LO	Λιπιδική υπεροξείδωση Λιποξυγενάση
Lipid peroxidation, LPO Lipo-oxygenase, LO Lipoprotein lipase, LPL	Λιπιδική υπεροξείδωση Λιποξυγενάση Λιπάση της λιποπρωτεΐνης
Lipid peroxidation, LPO Lipo-oxygenase, LO Lipoprotein lipase, LPL Low density lipoprotein LDL	Λιπιδική υπεροξείδωση Λιποξυγενάση Λιπάση της λιποπρωτεΐνης Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
Lipid peroxidation, LPO Lipo-oxygenase, LO Lipoprotein lipase, LPL Low density lipoprotein LDL Lysophosphatidylcholine, Lyso-PC	Λιπιδική υπεροξείδωση Λιποξυγενάση Λιπάση της λιποπρωτεΐνης Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη
Lipid peroxidation, LPO Lipo-oxygenase, LO Lipoprotein lipase, LPL Low density lipoprotein LDL Lysophosphatidylcholine, Lyso-PC Matrix	Λιπιδική υπεροξείδωση Λιποξυγενάση Λιπάση της λιποπρωτεΐνης Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη Θεμέλιος ουσία
Lipid peroxidation, LPO Lipo-oxygenase, LO Lipoprotein lipase, LPL Low density lipoprotein LDL Lysophosphatidylcholine, Lyso-PC Matrix Methyl terminus of the fatty acid chain	Λιπιδική υπεροξείδωση Λιποξυγενάση Λιπάση της λιποπρωτεΐνης Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη Θεμέλιος ουσία Τερματικά μεθύλια των αλυσίδων των λιπαρών οξέων
Lipid peroxidation, LPO Lipo-oxygenase, LO Lipoprotein lipase, LPL Low density lipoprotein LDL Lysophosphatidylcholine, Lyso-PC Matrix Methyl terminus of the fatty acid chain Minimally modified LDL, mmLDL	Λιπιδική υπεροξείδωση Λιποξυγενάση Λιπάση της λιποπρωτεΐνης Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη Θεμέλιος ουσία Τερματικά μεθύλια των αλυσίδων των λιπαρών οξέων
Lipid peroxidation, LPO Lipo-oxygenase, LO Lipoprotein lipase, LPL Low density lipoprotein LDL Lysophosphatidylcholine, Lyso-PC Matrix Methyl terminus of the fatty acid chain Minimally modified LDL, mmLDL Mitogen activated protein kinase–MAPK	Λιπιδική υπεροξείδωση Λιποξυγενάση Λιπάση της λιποπρωτεΐνης Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη Θεμέλιος ουσία Τερματικά μεθύλια των αλυσίδων των λιπαρών οξέων Ελάχιστα τροποποιημένη LDL

Multisystem organ dysfunction	Πολυοργανική δυσλειτουργία
Nitrate reductase	Νιτρορεντουκτάση
Nitro faty acids	Νιτρο-λιπαρά οξέα
NO synthetase, eNOS	Συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου
Normal vibrations	Κανονικές δονήσεις
Octahedral	Οκταεδρική διαμόρφωση
Hydroxyl radicals ('OH)	Ρίζες υδροξυλίου ('OH)
Oxidized low density lipoproteins, oxLDL	Οξειδωμένα μόρια των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών
Packing	Στοίβαγμα
Permeability	Διεισδυτικότητα
Phosphatidylcholine, PC	Φωσφατιδυλοχολίνη
Phosphatidylethanolamine, PE	Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη
Phosphatidylinositol	Φωσφατιδυλινοσιτόλη
Phospholipase A ₂ , PLA ₂	Φωσφολιπάση Α2
Phospholipase C, PLC	Φωσφολιπάση C
Phospholipid transfer protein, PLTP	Πρωτεΐνη μεταφοράς φωσφολιπιδίων
Platelet-activating factor	Παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
Polyunsaturated fatty acids, PUFAS	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
Prooxidants	Προοξειδωτικά
Reactive oxygen species, ROS	Δραστικά σωμάτια οξυγόνου
Reduced mass	Ανοιγμένη μάζα
Reflecting microscope	Μικροσκόπιο ανάκλασης
Repair genes	Επανορθωτικά γονίδια
Rocking vibration	Δονήση αιώρησης
Scan	Φάσμα

Scanning Electron Microscopy, SEM	Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης
Scavenger receptors	Ειδικούς υποδοχείς
Scavengers	Ανταγωνιστές
Scissoring vibration	Δονήση ψαλλίδισης
Secondary Electron, SE	Δευτερογενές ηλεκτρόνιο
Semitransparent mirrors	Σύστημα διαφανών και ημι-διαφανών κάτοπτρων
Sphingomyelin, SM	Σφιγγομυελίνη
Square planar	Επίπεδη τετράγωνη διαμόρφωση
Square pyramid	Τετραγωνική πυραμίδα
Stretching vibration	Δονήση τάσης
Superoxide dismutase, SOD	Υπεροξειδική δισμουτάση
Tail	Υδρόφοβο τμήμα
Tetrahedral geometry	Τετραεδρική γεωμετρία
Three-layer model	Μοντέλο τριών ζωνών
Transition complex	Ενδιάμεσο σύμπλοκο
Triglycerides, TGs	Τριγλυκερίδια
Trigonal bipyramidal	Τριγωνική διπυραμίδα
Twisting vibration	Δονήση συστροφής
Ubiquinol-10	Ουμπικινόλη-10
Ultra violet, UV	Υπεριώδες φως
Unesterified cholesterol, UC	Ελεύθερη χοληστερόλη
Uninhibited process	Αυθόρμητη ανάπτυξη
Very low density lipoprotein, VLDL	Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
Visible, Vis	Ορατή περιοχή
Wagging vibration	Δονήση σείσης
Xanthine oxidase, XO	Ξανθίνη-οξειδάση

Xanthine oxidoreductase, xo	Ξανθίνη οξειδορεδουκτάση
α-Tocopherol, TOH	α-Τοκοφερόλη
β-antiparallel sheets	διαμόρφωση β-αντιπαράλληλων επιπέδων
β-parallel sheets	διαμόρφωση β-παράλληλων επιπέδων
β-sheet	β-διαμόρφω σ η
β-turn	β-αναδίπλωση