

Ενδιαφέρουσα Περίπτωση

Υπεροξειδωση των Καρωτίδων Αρτηριών Κατά το Οξειδωτικό Στρες. FT-IR Φασματοσκοπική Μελέτη

ΙΩΑΝΝΗΣ ΜΑΜΑΡΕΛΗΣ^{1,2}, ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΚΟΤΙΛΕΑΣ², ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΤΣΙΛΙΓΓΙΡΗΣ³,
ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΤΖΙΛΑΛΗΣ³, ΚΑΤΕΡΙΝΑ ΠΙΣΣΑΡΙΑΗ¹, ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΔΡΙΤΣΑ¹, ΙΩΑΝΝΑ ΑΝΑΣΤΑΣΟΠΟΥΛΟΥ¹

¹Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Ακτινοχημεία & Βιοφασματοσκοπία,
²Καρδιολογική Κλινική, ³Αγγειοχειρουργική Κλινική, 401 Γενικό Στρατιωτικό Νοσοκομείο Αθηνών

Λέξεις ευρετηρίου:
Καρωτίδα αρτηρία,
ελεύθερες
ρίζες, υπέρυθη
φασματοσκοπία,
FT-IR, ηλεκτρονικό
μικροσκόπιο
σάρωσης.

Ημερ. παραλαβής
εργασίας:
6 Ιανουαρίου 2010
Ημερ. αποδοχής:
5 Οκτωβρίου 2010

Διεύθυνση
Επικοινωνίας:
Ιωάννα
Αναστασιπούλου

Εθνικό Μετσόβιο
Πολυτεχνείο, Σχολή
Χημικών Μηχανικών,
Ακτινοχημεία &
Βιοφασματοσκοπία,
Πολυτεχνειούπολη
Ζωγράφου,
157 80 Ζωγράφου
e-mail: [ianastas@central.
ntua.gr](mailto:ianastas@central.ntua.gr)

Εισαγωγή: Η αθηροσκλήρωση αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες θανάτου στις αναπτυγμένες βιομηχανικά χώρες, χωρίς όμως ο μηχανισμός σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας να είναι απόλυτα γνωστός μέχρι σήμερα. Η υπέρυθη φασματοσκοπία μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες σε μοριακό επίπεδο για μεταβολές των πολυσύνθετων βιολογικών συστημάτων, όπως είναι οι καρωτίδες αρτηρίες.

Μέθοδος: Η υπέρυθη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier (Fourier Transform Infrared, FT-IR) σε συνδυασμό με ανάλυση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη του μηχανισμού αθηρογένεσης, σε δείγματα καρωτίδων αρτηριών ασθενών που υποβλήθηκαν σε χειρουργική ενδαρτηρεκτομή.

Αποτελέσματα: Τα FT-IR φάσματα των καρωτίδων αρτηριών των ασθενών στην περιοχή 4000 μέχρι 400 cm^{-1} έδειξαν κοινά χαρακτηριστικά ως προς τη νόσο, τα οποία αποδόθηκαν στην υπεροξειδωση των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων από τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου. Οι εντάσεις και οι μετατοπίσεις των ταινιών στο φάσμα ήταν ανάλογες της κλινικής εικόνας των ασθενών. Η αύξηση των εντάσεων των ταινιών στην περιοχή 3000-2870 cm^{-1} ήταν περισσότερο εμφανής σε ασθενείς με αυξημένα επίπεδα σακχάρου και ουρικού οξέος στο αίμα. Οι ταινίες στα 3080 και 1740 cm^{-1} μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες μέτρησης της LDL χοληστερόλης. Η SEM (Scanning Electron Microscope) ανάλυση έδειξε ότι η περιοχή των αφρωδών κυττάρων είναι πλούσια σε αποτιτανώσεις. Η ανίχνευση τιτανίου (Ti) σε αθήρωμα ασθενούς αποδόθηκε στην τοποθέτηση μεταλλικών ραμμάτων συγκλείσεως στέρνου μετά από στερνοτομή λόγω αορτοστεφανιαίας παράκαμψης (bypass) που είχε υποβληθεί ο ασθενής. Η ανίχνευση σε ασθενείς αργύρου (Ag), μολύβδου (Pb) και χαλκού (Cu) συνδέθηκε άμεσα με την επαγγελματική ενασχόληση των ασθενών.

Συμπέρασμα: Από τη φασματοσκοπική μελέτη με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) και την ανάλυση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) αθηρωμάτων καρωτίδων αρτηριών διαπιστώνεται ότι η υπεροξειδωση των λιπιδίων, φωσφολιπιδίων και μεμβρανών προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου, ενώ η ανίχνευση βαρέων μετάλλων επιβεβαιώνει την πρόκληση οξειδωτικού στρες και μπορεί να συσχετισθεί ακόμη και με την επαγγελματική ενασχόληση των ασθενών.

Η αθηροσκλήρωση αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες θανάτου στις αναπτυγμένες βιομηχανικά χώρες.¹ Η επιστημονική κοινότητα, προκειμένου να αντιμετωπίσει την ασθένεια έχει στραφεί σήμερα στην ανεύρεση

του αιτίου που την προκαλεί σε μοριακό επίπεδο, δεδομένου ότι και οι σύγχρονες μορφές θεραπείας εμφανίζουν ανεπιθύμητες ενέργειες. Η υπέρυθη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier (Fourier Transform Infrared, FT-IR) και ιδι-

αίτερα η τεχνική της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (attenuated total reflection, ATR) επιτρέπει τη σημειακή λήψη πολλαπλών φασμάτων σε όλη την έκταση του αθηρώματος και στις διεπιφάνειες, ενώ το δείγμα δεν υφίσταται καμία κατεργασία και επομένως είναι μη καταστρεπτική.²⁻⁹ Η FT-IR φασματοσκοπία διαπιστώθηκε ότι μπορεί να αναγνωρίσει τους σημαντικότερους βιολογικούς δείκτες, όπως το DNA, τις πρωτεΐνες, τα σάκχαρα, τις φωσφορικές ομάδες, αλλά και το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται τα βιολογικά μόρια. Η FT-IR φασματοσκοπία προσφέρεται για τη μελέτη της δομής πολύπλοκων συστημάτων σε μοριακό επίπεδο και των μεταβολών που προκαλεί σε αυτά η επικείμενη νόσος.²⁻⁹ Η ATR-FT-IR φασματοσκοπία σε συνδυασμό με την SEM (Scanning Electron Microscope) ανάλυση χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των βλαβών σε μοριακό επίπεδο και στη μακροσκοπική αρχιτεκτονική και τοπολογική μεταβολή των χημικών ενώσεων των εφάλατωμένων ζωνών (calcified tissues).

Ασθενείς και Μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκαν αθηρωματικές πλάκες, από υλικό που ελήφθη από 50 ασθενείς ηλικίας 60 μέχρι 85 ετών, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε χειρουργική ενδαρτηρεκτομή καρωτίδων αρτηριών. Οι ασθενείς ανάλογα με τα κλινικά τους χαρακτηριστικά ταξινομήθηκαν σε υποομάδες. Τα αθηρώματα δεν παρουσίαζαν άλλες παθολογικές μεταβολές. Ο Πίνακας 1 παρέχει τα χαρακτηριστικά των ασθενών.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν αρχικά σε φορμόλη και στη συνέχεια έγινε έκπλυση με H₂O₂ και ακετόνη για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αίματος και των θραυσμάτων του. Στην Εικόνα 1 απεικονίζεται δείγμα καρωτίδας αρτηρίας ασθενούς μετά ενδαρτηρεκτομή. Διακρίνονται τόσο η εξωτερική (όριο μεταξύ μυϊκού και έξω ελαστικού χιτώνα) όσο και η εσωτερική (ενδοθηλιακή στοιβάδα) επιφάνεια του υλικού της ενδαρτηρεκτομής καθώς και η αθηρωματική

πλάκα, μετά από διάνοιξη της ινώδους κάψας του λιπώδους πυρήνα της βλάβης.

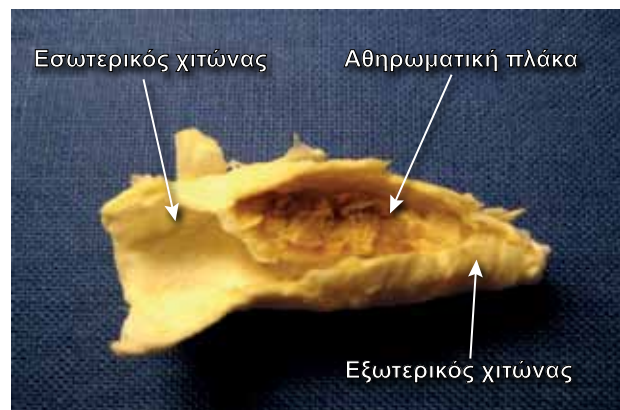
Τα FT-IR φάσματα καταγράφηκαν με φασματοφωτόμετρο Nicolet 6700 thermoscientific και λήφθηκαν με την τεχνική της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR). Πλεονέκτημα της ATR τεχνικής είναι η σημειακή λήψη των φασμάτων σε διάφορες θέσεις του δείγματος και της διεπιφάνειας των μεμβρανών. Το κάθε FT-IR φάσμα προήλθε από 120 φάσματα με διακριτική ικανότητα 4 cm⁻¹. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Electron Scanning Microscope, SEM) και το εξάρτημα στοιχειακής ανάλυσης ήταν της Εταιρείας Fei, και δεν έγινε επικάλυψη των δειγμάτων με άνθρακα ή χρυσό, προς αποφυγή πιθανών αλλοιώσεων.

Αποτελέσματα και Συζήτηση

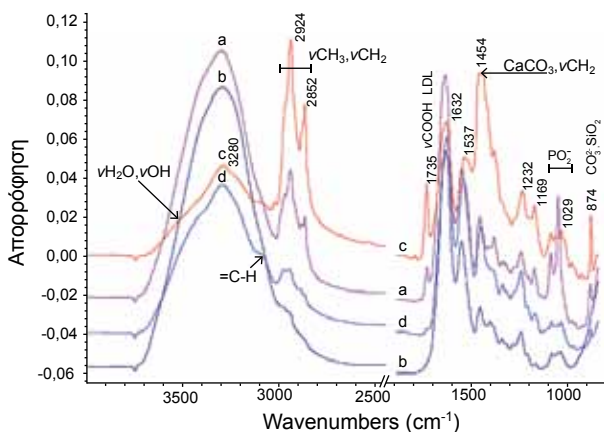
Στο Σχήμα 2 δίνονται τα χαρακτηριστικά FT-IR φάσματα απορροφήσεως της εξωτερικής επιφάνειας της καρωτίδας στην υπέρυθρη περιοχή 4000-400 cm⁻¹ για τους ασθενείς με κωδικό a) (ινσουλινοεξαρτώμενος ασθενής), b) (ασθενής με φυσιολογικά όρια σακχάρου και ουρικού οξέος στο αίμα), c) (ασθενής με αυξημένο ουρικό οξύ στο αίμα) και d) (διαβητικός σε υπογλυκαιμική αγωγή με αντιδιαβητικά δισκία). Από τη σύγκριση των φασμάτων διαπιστώνονται σημαντικές διαφορές μεταξύ των ασθενών σχεδόν σε όλο το εύρος του φάσματος. Ο όμως στα 3527 cm⁻¹ αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των ομάδων υδροξυλίου OH,²⁻¹⁰ που προέκυψαν από την υπεροξειδωση των λιπιδίων και πρωτεϊνών, αλλά και τις αντιδράσεις προσθήκης των ελευθέρων ριζών υδροξυλίου (HO·) στους

Πίνακας 1. Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών.

Φύλο	47 άρρενες, 3 θήλεις
Ηλικία	60-85 ετών
Αρτηριακή υπέρταση	92%
Κάπνισμα	95%
Υπερλιπιδαιμία	95%
Σακχαρώδης διαβήτης	33%
Υπερουριχαιμία	59%
Στεφανιαία νόσος ή/και Περιφερική αρτηριοπάθεια	65%



Εικόνα 1. Τμήμα καρωτίδας αρτηρίας ασθενούς μετά από ενδαρτηρεκτομή. Διακρίνονται ο εξωτερικός και ο εσωτερικός χιτώνας καθώς και η αθηρωματική πλάκα μετά τη διάνοιξη της ινώδους κάψας.



Σχήμα 2. ATR-FT-IR φάσματα καρωτίδας στην περιοχή 4000-400 cm^{-1} για τους ασθενείς με κωδικό a: ινσουλινοεξαρτώμενος ασθενής, b: ασθενής με φυσιολογικές τιμές σακχάρου και ουρικού οξέος στο αίμα, c: ασθενής με αυξημένο ουρικό οξύ στο αίμα και d: Διαβητικός σε υπογλυκαιμική αγωγή με αντιδιαβητικά διακία.

διπλούς δεσμούς.¹¹ Στο συμπέρασμα αυτό οδηγεί και η μεταβολή της έντασης της ταινίας του εκάστοτε φάσματος, η οποία εξαρτάται από τα κλινικά χαρακτηριστικά του κάθε ασθενούς. Έτσι, η έντονη μείωση της έντασης της αντίστοιχης ταινίας που παρατηρείται στο φάσμα του ασθενούς με κωδικό d αποδίδεται στο ότι ο ασθενής καταναλώνει αλκοόλ. Εξ άλλου, η εμφάνιση ταινίας προς χαμηλότερους κυματαριθμούς (cm^{-1}) συνεπάγεται την αύξηση των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζουν οι ομάδες υδροξυλίου.

Η ταινία στα 3281 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση τάσης της πεπτιδικής ομάδας νNH των πρωτεϊνών και διαπιστώνεται ότι επίσης επηρεάζεται σημαντικά από την κλινική εικόνα του κάθε ασθενούς. Μείωση της ταινίας αυτής συνεπάγεται μείωση του αριθμού των δεσμών υδρογόνου που συμμετέχουν στη διατήρηση της έλικας των πρωτεϊνών. Σημαντικές μεταβολές παρατηρούνται και στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 2970 cm^{-1} και 2850 cm^{-1} , όπου απορροφούν οι αντισυμμετρικές και συμμετρικές δονήσεις τάσεις των μεθυλ (νCH_3) και μεθυλεν (νCH_2) ομάδων, αντίστοιχα. Η μείωση της έντασης των ταινιών αυτών για τους ασθενείς b και d (Σχήμα 2) δείχνει ότι το περιβάλλον είναι περισσότερο λιπόφιλο σε αντίθεση με τους άλλους δύο ασθενείς. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου αναφέρεται ότι η ένταση των ταινιών αυτών εξαρτάται από το λιπόφιλο ή υδρόφιλο περιβάλλον, στο οποίο δονούνται τα μόρια.^{12,13}

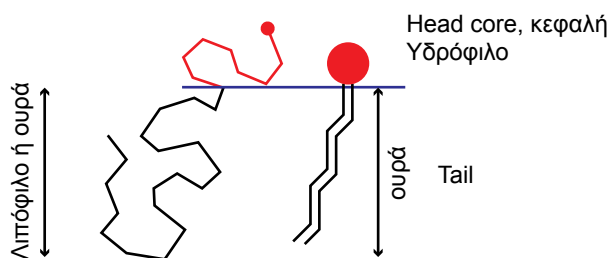
Όπως είναι γνωστό, τα μακρομόρια που σχημα-

τίζουν τις μεμβράνες φέρουν ένα υδρόφιλο τμήμα “head core, κεφαλή” και ένα λιπόφιλο ή υδρόφοβο “tail, ουρά”, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.¹⁴ Η ουρά του μακρομορίου σε λιπόφιλο περιβάλλον αυτοδιαλύεται στο μόριό της, με αποτέλεσμα το τμήμα αυτό να μη γίνεται ορατό στο υπέρυθρο φάσμα, λόγω πολλαπλών ανακλάσεων της υπέρυθρης ακτινοβολίας.¹²⁻¹⁴ Στην περίπτωση όμως που το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας μειώνεται ή το περιβάλλον γίνεται λιγότερο λιπόφιλο, τότε οι εντάσεις των ταινιών που οφείλονται στις δονήσεις των μεθυλ- και μεθυλενομάδων της “ουράς” αυξάνουν σημαντικά στο υπέρυθρο φάσμα.

Σημαντική αύξηση της έντασης των ταινιών αυτών (Σχήμα 2, καμπύλες a & c) παρατηρήθηκε σε διαβητικούς και υπερούριχαιμικούς ασθενείς. Αυτό επιβεβαιώνει τη μείωση του υδρόφοβου περιβάλλοντος, ως αποτέλεσμα της σχάσης του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας των λιπιδίων και πρωτεϊνών, αλλά και της μεταβολής της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών.

Η ταινία στα 3082 cm^{-1} είναι χαρακτηριστική του ολεφινικού χαρακτήρα της ομάδας $=\text{C}-\text{H}$ και διαπιστώθηκε ότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστική ταινία για την πρόβλεψη της υπεροξειδωσής των λιπιδίων.²⁻⁹ Η παρουσία της ταινίας στα 1735 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στην παρουσία μη ιοντικού καρβοξυλίου ($-\text{COOH}$) και αλδευδών, επιβεβαιώνει την παραδοχή ότι έγινε υπεροξειδωση των λιπιδίων, ενώ παράλληλα η αύξηση της έντασης δείχνει ότι η LDL χοληστερόλη είναι σε αυξημένα επίπεδα, αποτέλεσμα που συμφωνεί και με τις βιοχημικές αναλύσεις αίματος των ασθενών.

Είναι γνωστό ότι στον ανθρώπινο οργανισμό κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού ή του οξειδωτικού στρες παράγονται ελεύθερες ρίζες, οι οποίες οδηγούν στην καταστροφή πολλών ζωτικών βιολογικών μορίων.^{15,16} Ως ενδιάμεσο προϊόν του καταλυτικού



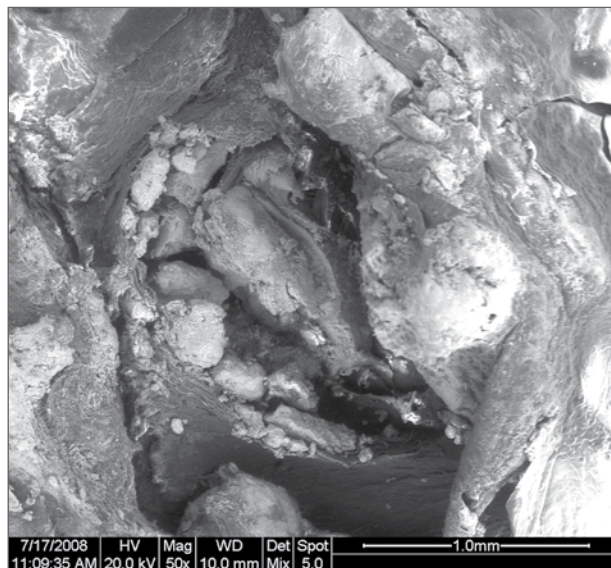
Σχήμα 3. Σχηματική παράσταση αμφίφιλου βιολογικού μορίου. Φαίνονται η κεφαλή (υδρόφιλο) και η ουρά (λιπόφιλο ή υδρόφοβο) του μορίου.¹⁴

Η προσθήκη αυτή δικαιολογεί την αύξηση της έντασης και του πλάτους του ώμου στους 3527 περίπου κυματαριθμούς. Ο μηχανισμός αυτός πιστεύεται ότι λαμβάνει χώρα στον οργανισμό κατά την πρώτη φάση οξείδωσης του αραχιδονικού οξέος από την προσταγλανδίνη Η συνθεσάση.

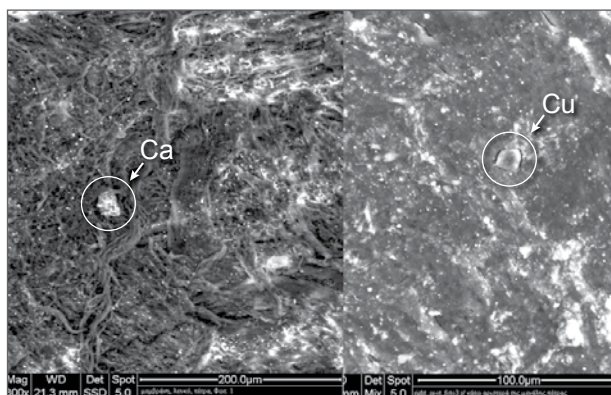
Σημαντικές είναι και οι μεταβολές που παρατηρούνται στα φάσματα των ασθενών στην περιοχή 1800 cm^{-1} μέχρι 700 cm^{-1} . Από τις μετατοπίσεις των ταινιών που αποδίδονται στις ομάδες Amide I προς μικρότερους κυματαριθμούς, διαπιστώνεται ότι μειώνεται το λιπόφιλο περιβάλλον, ενώ επικρατεί η β-διαμόρφωση με αντιπαράλληλη αναδίπλωση.^{2-5,19} Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα μαθηματικής ανάλυσης (deconvolution) διαπιστώνεται από την ταινία που εμφανίζεται περίπου στα 1694 cm^{-1} ότι οι λιποπρωτεΐνες (LDL) λόγω του λιπόφιλου περιβάλλοντος βρίσκονται με τη δομή της β-έλικας. Μάλιστα ο ασθενής c εμφανίζει μεγαλύτερες μεταβολές, δεδομένου ότι υφίσταται έντονη απολιποπρωτεΐνωση.¹⁷ Η ταινία στα 1537 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις των ομάδων Amide II, ενώ οι ομάδες Amide III απαντώνται στα 1243 cm^{-1} . Οι ταινίες αυτές υπερχαλύπτονται κυρίως στον ασθενή με κωδικό a, ο οποίος πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη και είναι ινσουλινοεξαρτώμενος, από τις ταινίες των σακχάρων. Επίσης, ο ασθενής c εμφανίζει στο φάσμα (Σχήμα 2c) μια έντονη ταινία περίπου στα 1454 cm^{-1} . Η ταινία αυτή από τη μορφή της δείχνει ότι δεν είναι απλή, αλλά οφείλεται τόσο στις δονήσεις κάμψης των ομάδων CH_2 , όσο και στη δόνηση νCO_3^{2-} των ανθρακικών ιόντων. Η ταινία αυτή σε συνδυασμό με την ταινία στα 874 cm^{-1} συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι η αθηρωματική πλάκα του ασθενούς αποτελείται κυρίως από ανθρακικό ασβέστιο.²⁻⁷

Στις Εικόνες 2A και 2B φαίνονται οι εικόνες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης SEM στην περιοχή των αφρωδών κυττάρων.

Η εικόνα A δείχνει την αρχιτεκτονική που παρουσιάζουν τα αφρώδη κύτταρα στη μεμβράνη της καρωτίδας. Διαπιστώνεται ότι η περιοχή είναι αυξημένη σε φωσφολιπίδια (Σχήμα 5A) και πλούσια σε άλατα. Η περιοχή αυτή της καρωτίδας από την ανάλυση φαίνεται να αποτελεί τον πυρήνα για την έναρξη της αθηρωματικής πλάκας,²¹ δεδομένου ότι είναι πλούσια σε αποτιτανώσεις. Στο Σχήμα 5B φαίνονται οι θέσεις όπου ανιχνεύθηκε ασβέστιο (Ca) και χαλκός (Cu) σε αρκετά υψηλή σχετική συγκέντρωση. Οι θέσεις αυτές σημειώνονται ιδιαίτερα για να αποδειχθεί ότι οι χημικοί δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ του ασβεστίου και της μεμβράνης διαφέρουν ση-



Εικόνα 2A. SEM τοπολογική απεικόνιση των αφρωδών κυττάρων της μεμβράνης των καρωτίδων. Μεγέθυνση 1 mm.



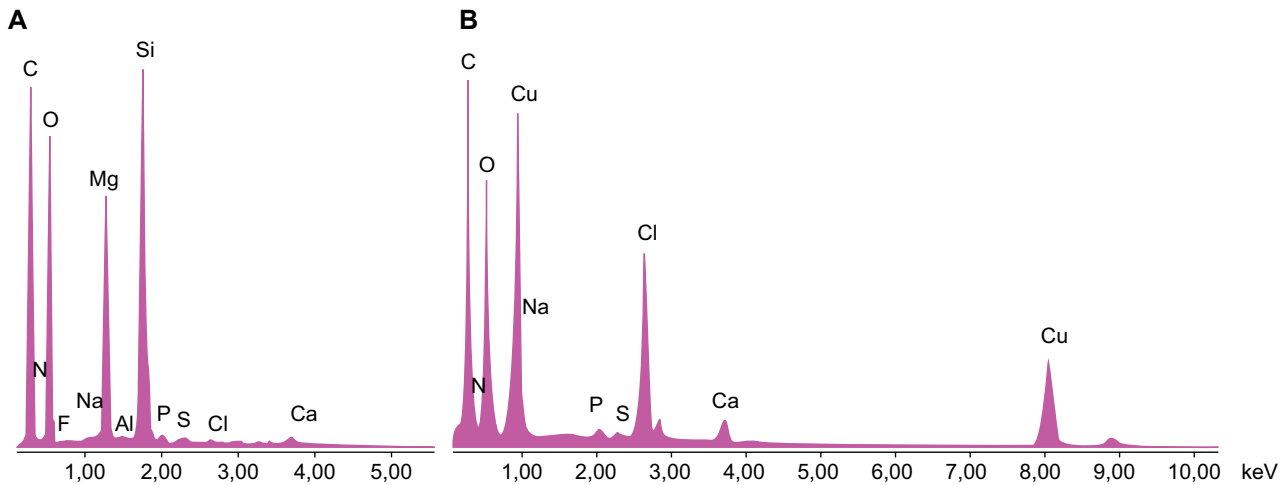
Εικόνα 2B. Θέσεις έντονα αγωγίμες: Σημειώνονται οι θέσεις αντίχνευσης Cu με μεγέθυνση 200 µm, και Cu, μεγέθυνση 100 µm.

μαντικά από τους αντίστοιχους χημικούς δεσμούς που σχηματίζει ο χαλκός με τη μεμβράνη, έστω και αν η μεγέθυνση της εικόνας φθάσει τα 100 µm.

Γενικά, τα μέταλλα στα βιολογικά συστήματα μπορούν να βρίσκονται ως «ελεύθερα ιόντα» ή να σχηματίζουν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες ή να σχηματίζουν χηλικούς δεσμούς (μεταβολίτες, συνένζυμα) ή να συνδέονται άμεσα με τα βιομόρια.¹⁷⁻¹⁹

Στο Σχήμα 4A και B δίνεται η ποιοτική ανάλυση των στοιχείων σε διάφορες θέσεις. Διαπιστώνεται ότι τοπικά μεταβάλλεται η συγκέντρωση των στοιχείων που συγκεντρώνονται στις μεμβράνες και στις αθηρωματικές πλάκες των ασθενών.

Οι περιοχές των αφρωδών κυττάρων διαπιστώθηκε ότι είναι περιοχές πλούσιες σε φωσφόρο. Έχει



Σχήμα 4. SEM ποιοτική ανάλυση των στοιχείων σε μεμβράνες (Α) και αθηρωματικές πλάκες ασθενών (Β).

παρατηρηθεί ότι η έναρξη της αθηρωμάτωσης γίνεται στην περιοχή των αφρώδων κυττάρων (foam cells) και επομένως αναμένεται η περιοχή αυτή να αντιστοιχεί σε ζώνη της αθηρωματικής πλάκας πλούσια σε φωσφολιπάσες (L_p -PLA₂). Το ένζυμο L_p -PLA₂ υδρολύει τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια προς λυσοφωσφατιδυλχολίνη και αποτελεί σημαντικό αίτιο κινδύνου για αθηρογένεση.²⁴⁻²⁸ Η εικόνα αυτή επιβεβαιώνεται και φασματοσκοπικά (Σχήμα 2), από τις μεταβολές στην περιοχή 1200-900 cm^{-1} , όπου εμφανίζονται οι δονήσεις τάσης των ομάδων PO_2^- , των φωσφοδιεστέρων και φωσφολιπιδίων. Η περιοχή αυτή του φάσματος εξαρτάται σημαντικά από τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Η παρουσία χαλκού και μάλιστα σε μεγάλη σχετική συγκέντρωση επιβεβαιώνει την παραδοχή της έναρξης σχηματισμού ελευθέρων ριζών με αντιδράσεις Haber-Weiss (αντ. 4, 5). Η παρουσία του χαλκού στην έναρξη υπεροξειδωσις των LDL είχε αποδοθεί σε αντιδράσεις ανάλογες με τις αντιδράσεις Fenton.²⁵⁻²⁷ Το πυρίτιο (Si) εμφανίστηκε σε όλους τους ασθενείς, σε διαφορετική ποσότητα, η οποία είχε σχέση και με το εργασιακό περιβάλλον τους. Για το λόγο αυτό με βεβαιότητα αποδόθηκε η ταινία στα 874 cm^{-1} και στο δεσμό Si-O και όχι μόνον στα ανθρακικά ιόντα.⁷ Η ταινία αυτή βέβαια επιβεβαιώνει την επικράτηση των ανθρακικών αλάτων ασβεστίου.

Η ποσότητα σιδήρου η οποία ανιχνεύθηκε ήταν σχετικά μικρή, γεγονός που αποδόθηκε στην έκπλυση των δειγμάτων για την απομάκρυνση των πηγμάτων αίματος.

Σε ορισμένους ασθενείς ανιχνεύθηκαν βαρέα μέταλλα, όπως άργυρος, μόλυβδος και μολυβδαίνιο.

Η παρουσία των μετάλλων αυτών, όπως και του καπνίσματος, έχει συνδυασθεί με την έναρξη του οξειδωτικού στρες και των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Παρ' όλα αυτά δεν υπάρχουν συστηματικές επιδημιολογικές μελέτες. Πάντως η παρουσία των μετάλλων αυτών σχετίστηκε από το ιστορικό των ασθενών με την εργασιακή τους ενασχόληση.

Υπάρχει αρκετά μεγάλος αριθμός εργασιών, όπου αναφέρεται ότι τα μολυβδοένζυμα διεγείρουν την οξείδωση της ξανθίνης προς υποξανθίνη.^{29,30} Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ομαλής λειτουργίας του κύκλου NO, που τελικά οδηγεί στην έναρξη καρδιαγγειακών παθήσεων.^{31,32} Το γεγονός ότι ο ασθενής με κωδικό d είχε σχετικά υψηλή συγκέντρωση μολυβδαινίου, ενισχύει την έναρξη σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας, μέσω οξείδωσης της ξανθίνης. Στον ίδιο ασθενή διαπιστώθηκε η παρουσία τιτανίου, που συνδέθηκε με το ιστορικό στερνοτομής του ασθενούς και την παρουσία μεταλλικών ραμμάτων τιτανίου λόγω αορτοστεφανιαίας παράκαμψης bypass.

Συμπεράσματα

Από την ATR-FT-IR φασματοσκοπία σε συνδυασμό με την SEM ανάλυση διαπιστώνεται ότι η υπεροξειδωση των λιπιδίων, φωσφολιπιδίων και μεμβρανών προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου, οι οποίες παράγονται στον οργανισμό κατά τις οξειδωαναγωγικές αντιδράσεις και το οξειδωτικό στρες. Το γεγονός ότι σχεδόν όλοι οι ασθενείς ήταν καπνιστές, αλλά και η παρουσία βαρέων μετάλλων επιβεβαιώνουν την πρόκληση οξειδωτικού στρες, που οδηγεί

στην παραγωγή δραστικών οξειδωτικών ενώσεων (Reactive Oxygen Species, ROS). Σημαντικό είναι να τονισθεί ότι στον ασθενή ο οποίος είχε στο παρελθόν υποβληθεί σε στερωτομή με παρουσία μεταλλικών ραμιμάτων, λόγω αορτοστεφανιαίας παράκαμψης bypass, διαπιστώθηκε μετανάστευση ιόντων τιτανίου, το οποίο ανιχνεύθηκε στην αθηρωματική πλάκα της καρωτίδας αρτηρίας. Τέλος, είναι δυνατόν να λεχθεί ότι η μέθοδος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της επίδρασης του εργασιακού περιβάλλοντος στην ανάπτυξη αντίστοιχων ασθενειών.

Βιβλιογραφία

- Cannon CP: Contemporary Diagnosis and Management of Acute Coronary Syndrome: Daiich Sankyo, Inc and Elli Lilly and Company, 2007.
- Mamarelis I, Pissaridi K, Dritsa V, et al. Oxidative Stress and Atherogenesis. An FT-IR Spectroscopic Study. *In Vivo*. 2010; 24: 883-888.
- Anastassopoulou J, Boukaki E, Conti C, et al. Microimaging FT-IR spectroscopy on pathological breast tissues, *Vibrational Spectroscopy*, 2009; 5: 270-275.
- Conti C, Ferraris P, Giorgini E, et al. FT-IR Microimaging Spectroscopy: Discrimination between healthy and neoplastic human colon tissues. *J Mol Struct*. 2008; 881: 46-51.
- Petra M, Anastassopoulou J, Theologis T, et al. Synchrotron micro-FT-IR spectroscopic evaluation of normal paediatric human bone. *J Mol Struct*. 2005; 78: 101-116.
- Anastassopoulou J, Kolovou P, Mavrogenis A. Bone and Cancer. A synchrotron micro-infrared study. In: Ph Coltery et al, editors. *Metal Ions in Biology and Medicine*. Paris: Eurotext, John Libbey; 2008. p. 210-213.
- Kolovou P, Anastassopoulou J. Synchrotron FT-IR spectroscopy of human bones. In: Tsakanov V, Wiedemann H, editors. *The effect of aging*. Brilliant Light in Life and Material Sciences. Springer. 2007; p. 267-272.
- Theophanides T. Infrared and Raman spectroscopy of biological molecules. NATO Advanced Study Institute. Dordrecht: D Reidel Publishing Co; 1978.
- Θεοφανίδης Θ, Αναστασοπούλου Ι. Φασματοσκοπία-Συμμετρία. Αθήνα, ΕΜΠ. 1998.
- Bellamy LJ (Ed): *The infrared spectra of complex molecules*, 3rd Edition, London, Chapman and Hall, 1975.
- Αναστασοπούλου Ι. Αζπινοχημεία. Χημεία ελευθέρων ριζών. Εφαρμογές στη Βιομηχανία, το Περιβάλλον τη Βιολογία. 3η εκδ. Αθήνα, ΕΜΠ. 2008.
- Anastassopoulou J, Theophanides T. Raman studies of model vesicle systems. *J Appl Spectrosc*. 1990; 44: 523-525.
- Anastassopoulou J. Mass spectrometry and FT-IR spectroscopy of quaternary ammonium salts. In: Rizzarelli E, Theophanides T, editors. *Topics in Molecular Organization and Engineering-Properties and Chemistry of Biomolecular Systems*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic (Publishers) Ltd; 1991. p.1.
- Αναστασοπούλου Ι, Θεοφανίδης Θ. Βιοϋλικά, Χημικός Δεσμός Δότη-Δέκτη. Αθήνα, ΕΜΠ. 2008.
- Roberfruid M, Buc Calderon P. *Free Radicals and Oxidation Phenomena in Biological Systems*. New York, Basel, Hong Kong, Marcel Dekker Ink. 1995.
- Sing K. *Oxidative stress, Diseases and Cancer*. London: Imperial College Press. 2006.
- Anastassopoulou J, Dovas A. Metal ions and cancer, In: S Misailidis, editor. *The cancer Clock*. John Wiley. 2007; p. 27-49.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*, 3rd ed. London: Oxford University Press. 2000.
- Theophanides T, Anastassopoulou J. Copper and carcinogenesis, *Crit Rev Oncology and Hematology*. 2002; 42: 57-64.
- Theophanides T, Anastassopoulou J. Copper and Carcinogenesis. In: Kesav Sing, editor. *Oxidative stress, Diseases and Cancer*. London: Imperial College Press; 2006. p. 807-824.
- Bielski BHJ, Cabell DE: Highlights of Current Research Involving Superoxide and Perhydroxyl Radicals in Aqueous Solutions. *Int J Radiat Biol*. 1991; 59: 291-319.
- Pinchuk I, Schnitzer E, Lichtenberg D. Kinetic analysis of copper-induced peroxidation of LDL. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1389: 155-172.
- Anastassopoulou J. Metal-DNA interactions. *J Mol Structure*. 2003; 19: 651-653.
- Chehin R, Rengel D, Milicua JCG, et al. Early stages of LDL oxidation: apolipoprotein B structural changes monitored by infrared spectroscopy. *J Lipid Res*. 2001; 42: 778-782.
- Gorelick PB. Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 and Risk of Stroke. *Am J Cardiology*. 2008; 101: 34-40.
- Arthasathay S, Litvinov D, Selvarajan K, et al. Lipid peroxidation and decomposition – Conflicting roles in plaque vulnerability and stability, *Biochim et Biophys Acta*. 2008; 1781: 221-231.
- Johar S, MacCarthy PhA, Shah AM. Oxidative stress and cardiovascular disease. In: Kesav S, editor. *Oxidative stress, Diseases and Cancer*. London: Imperial College Press; 2006. p. 519-536.
- Takano T, Itabe H, Yamamoto H, et al. Oxidized phosphatidylcholines that modify proteins: analysis by monoclonal antibody against oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1996; 271: 33.208-33.217.
- Rothery RA, Workun GJ, Weiner JH. The prokaryotic complex iron-sulfur molybdoenzyme family, *Biochim. Biophys. Acta*. 2008; 1778: p. 1897-1929.
- Van Gennip AH, Abeling NG, Stroomer AE. M, Overmars H, Bakker HD. The detection of molybdenum cofactor deficiency: clinical symptomatology and urinary metabolite profile *J. Inherit. Metab. Dis*. 1994; 17: p. 142-145.
- Marinello LE, Frosi B, Ciari I, et al. Nitric oxide levels in patients with atheromatous carotid plaque. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2008; 62: 325-327.
- Gutteridge JMC, Stocks J. Caeruloplasmin: physiological and pathological perspectives. *CRC Crit. Rev Clin Lab Sci*. 1981; 14: 257-260.