

# «Σχηματισμός αμυλοειδούς-τύπου πρωτεϊνών και επασβέστωση της αορτικής βαλβίδας»

Ιωάννης Μαμαρέλης<sup>1</sup>, Ε. Κουτουλάκης<sup>2</sup>, Χρ. Κωτούλας<sup>3</sup>, Β. Δρίτσα<sup>4</sup>,  
Β. Μαμαρέλη<sup>5</sup>, Ι. Αναστασοπούλου<sup>4,6</sup>

<sup>1</sup>Καρδιολογική Κλινική, Νοσηλευτικό Ίδρυμα Μετοχικού Ταμείου Στρατού (ΝΙΜΤΣ), Αθήνα

<sup>2</sup>Καρδιολογική Κλινική, 401 Γενικό Στρατιωτικό Νοσοκομείο Αθηνών, Αθήνα

<sup>3</sup>Διακλαδική Καρδιοχειρουργική Κλινική, 401 Γενικό Στρατιωτικό Νοσοκομείο Αθηνών, Αθήνα

<sup>4</sup>Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Ακτινοχημεία & Βιοφασματοσκοπία, Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου, 15780 Αθήνα

<sup>5</sup>Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών, Πάτρα

<sup>6</sup>Διεθνές Αντικαρκινικό Ερευνητικό Ινστιτούτο, 1<sup>ο</sup> km Καπανδριτίου-Καλάμου, P.O. Box 22, Καπανδρίτι, Αττική 19014

# Εισαγωγή

- Η επασβέστωση και ίνωση της αορτικής βαλβίδας οδηγούν στην στένωση και τελικά στην χειρουργική αντικατάσταση της.
- Οι αμυλοειδείς πρωτεΐνες αναφέρονται στην καταστροφή της δομής κυρίως του κολλαγόνου και σχηματισμό πρωτεϊνών με τυχαία αλληλουχία.

# Εισαγωγή

- Σκοπός της μελέτης είναι η ανεύρεση "διαγνωστικών ταινιών" του υπερύθρου φάσματος που να σχετίζονται με την παθολογική ανάπτυξη αμυλοειδούς τύπου πρωτεϊνών και την επασβέστωση της αορτικής βαλβίδας.



# Υλικό και Μέθοδος

- 55 επασβεστωμένες αορτικές βαλβίδες ασθενών ηλικίας 45-87 ετών, με σοβαρού βαθμού στένωση που υποβλήθηκαν σε χειρουργική αντικατάσταση
- Χρησιμοποιήθηκαν φασματοφωτόμετρο υπερύθρου FT-IR και SEM μικροσκόπιο για την μελέτη της μοριακής δομής.

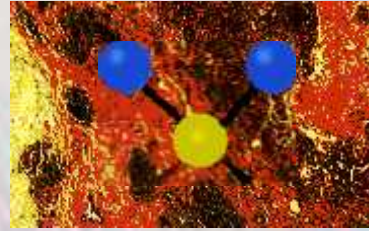
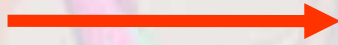
# FT-IR ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ

Βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ένωσης ,τα οποία διεγείρονται .

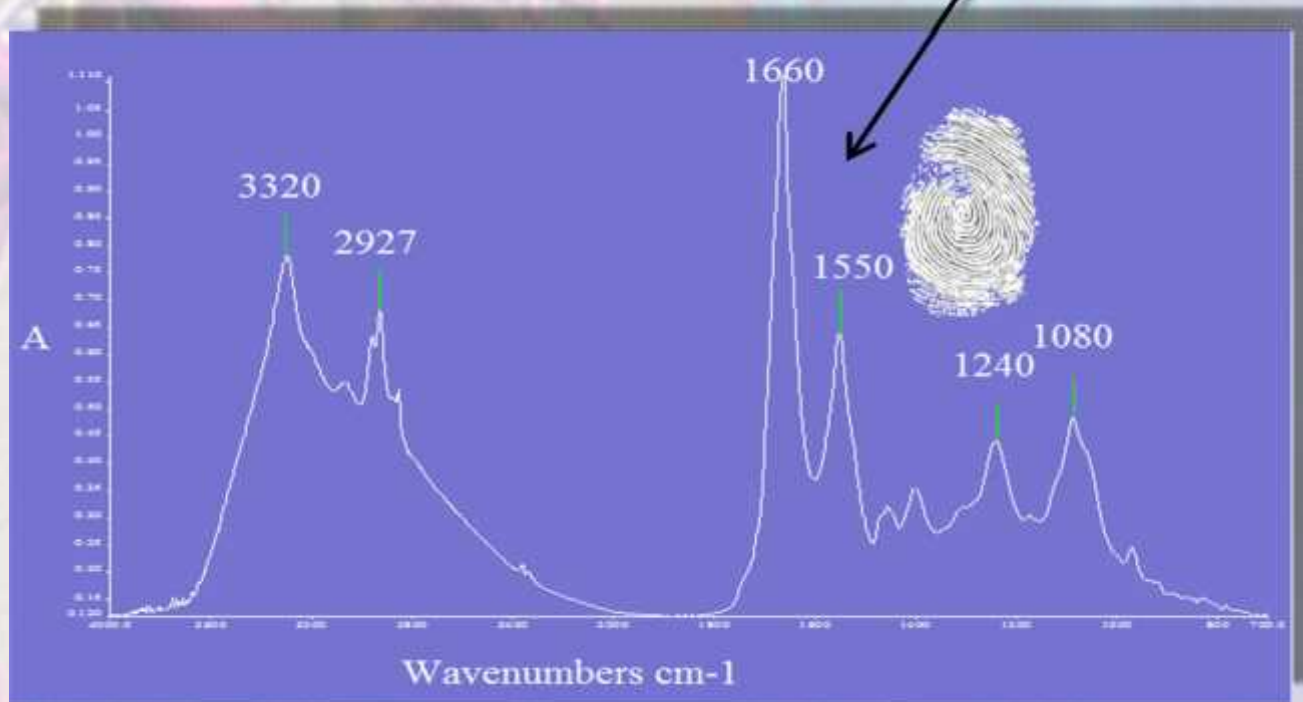
IR ακτίνα



Infrared  
radiation



Radiation  
Absorbance



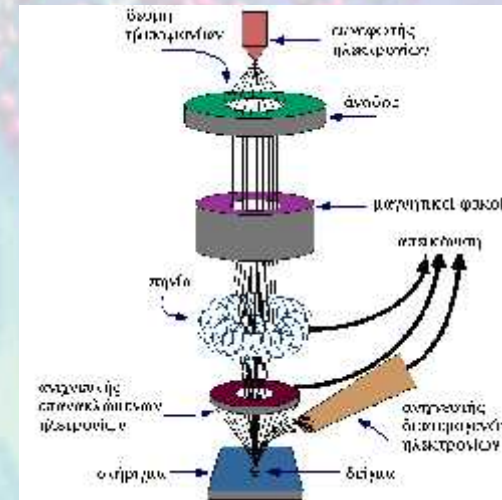
- Δίνει τις χαρακτηριστικές ταινίες κάθε χημικής ομάδας ( $\text{NH}_2$ ,  $-\text{NH}-\text{CO}-$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $\text{OH}$ , κτλ.).
- Οι συχνότητες της απορροφούμενης ενέργειας είναι μοναδικές για κάθε μόριο και εκφράζουν το δακτυλικό αποτύπωμα του μορίου
- Παρέχει πληροφορίες για την αρχιτεκτονική και δομή των βιολογικών συστημάτων σε μοριακό επίπεδο.



# ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΣΑΡΩΣΗΣ, SEM



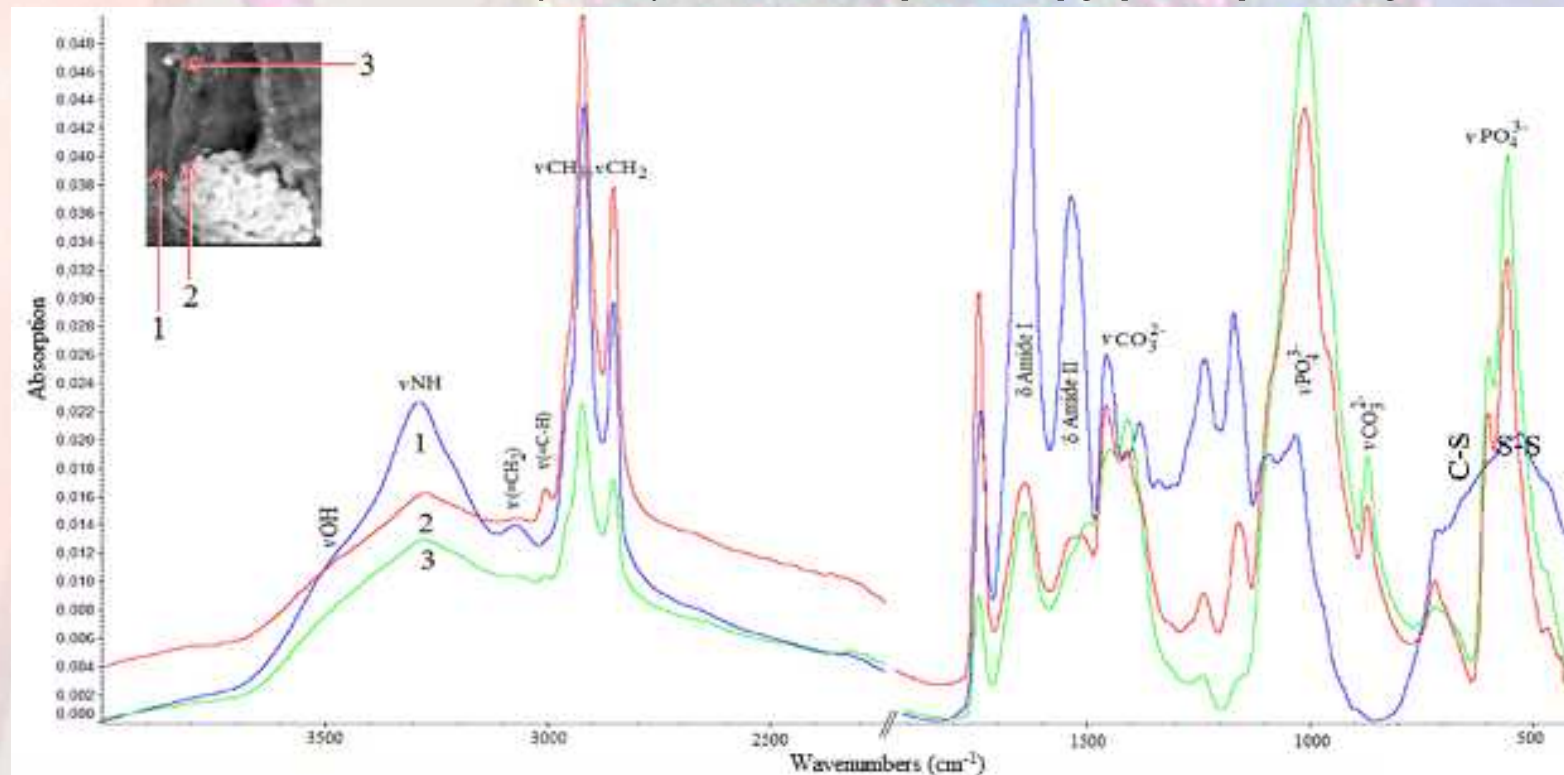
*Διάταξη SEM*



*Αρχή λειτουργίας του SEM*

- Παραλλαγή του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου
- Συνδυάζει την υψηλής ανάλυσης απεικόνιση με την στοιχειακή ανάλυση καθώς και κρυσταλλογραφική ανάλυση με τις συσκευές τελευταίου τύπου
- Χρησιμοποιείται για ανάλυση δειγμάτων μεγέθους 10nm ή λιγότερο

# FT-IR φάσματα αορτικής βαλβίδας

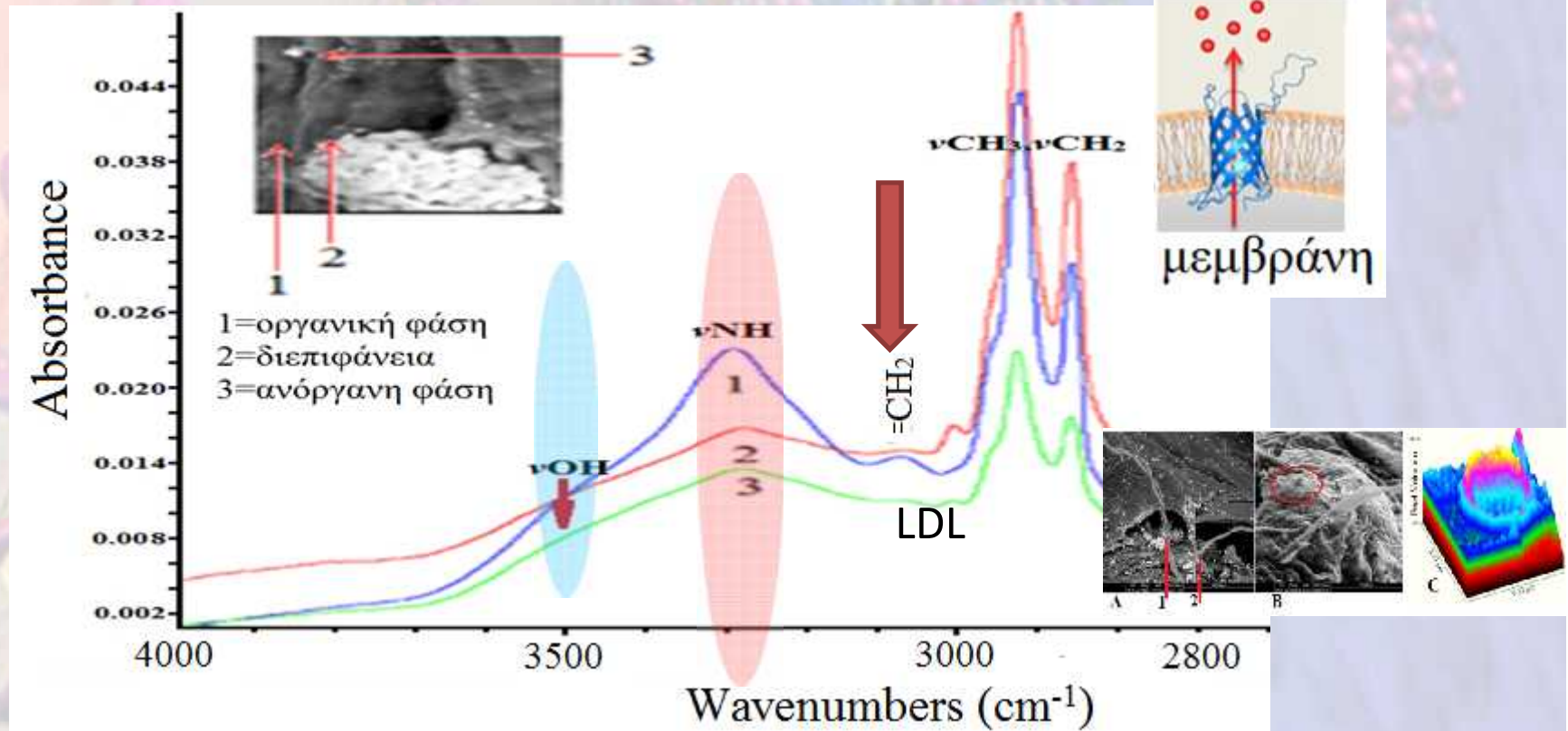


1= Οργανική φάση, 2=διεπιφάνεια , 3= ανόργανη φάση

- Τα φάσματα διαφέρουν μεταξύ τους στις διάφορες θέσεις της αορτικής βαλβίδας.
- Οι μεταβολές εξαρτώνται από τις επασβεστώσεις

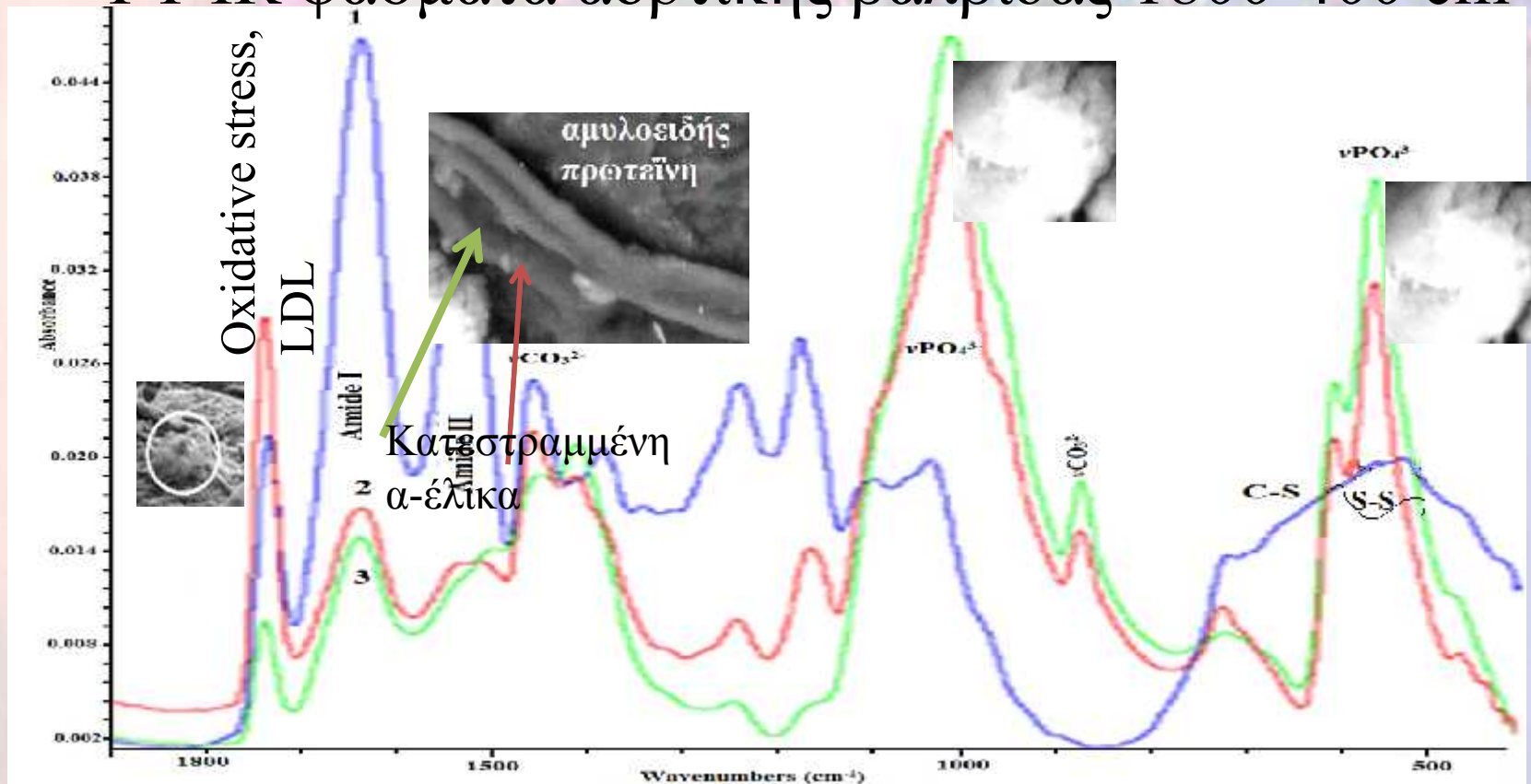


# FT-IR φάσματα αορτικής βαλβίδας 4000-2800 $\text{cm}^{-1}$



- Η ένταση των δονήσεων των OH ομάδων συνδέεται με αύξηση της επασβέστωσης και σχηματισμό υδροξυαπατίτη [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] (OH/ανθρακικά ιόντα)
- Μείωση των δονήσεων των NH ομάδων σημαίνει μεταβολή της δομής των πρωτεϊνών, διάσπαση της α-έλικας και πολυμερισμός συνεπεία αντίδρασης με τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου
- Η ένταση των δονήσεων της ολεφινικής ομάδας ( $=\text{CH}_2$ ) ωφείλονται στην αντίδραση των ελευθέρων ριζών με τις ανθρακικές αλυσίδες των λιπιδίων που οδηγούν τελικά σε αύξηση της LDL
- Αύξηση των δονήσεων των  $\nu\text{CH}_3$  και  $\nu\text{CH}_2$  σημαίνει μεταβολή της λιποφιλικότητας στις κυτταρικές μεμβράνες λόγω του σχηματισμού αμυλοειδών πρωτεϊνών σε συσσωματώματα με βαρελοειδή διαμόρφωση που οδηγούν σε ίνωση

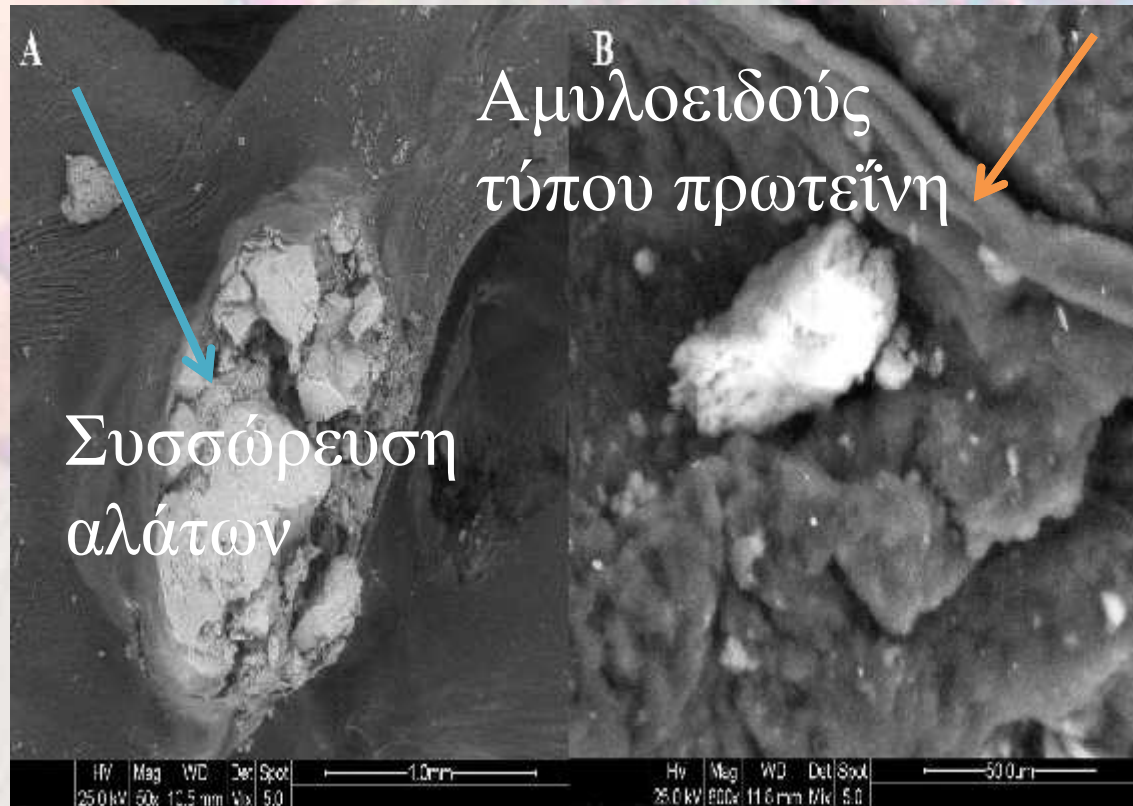
# FT-IR φάσματα αορτικής βαλβίδας 1800-400 $\text{cm}^{-1}$



- Υπεροξείδωση λόγω οξειδωτικού στρες συνεπάγεται αύξηση την φλεγμονής και αύξηση της LDL
- Μεταβολή των δονήσεων των Amide I και Amide II των πρωτεϊνών συνδέεται με μεταβολή της δευτεροταγούς δομής από α-έλικα σε β-διαμόρφωση (β-αναδίπλωση) και σχηματισμό αμυλοειδούς τύπου πρωτεϊνών.
- Περιοχή των δονήσεων ανθρακικών ομάδων, σχηματισμός ανθρακικού ασβεστίου (βιολογικός υδροξυαπατίτης)
- Περιοχή δονήσεων φωσφορικών ομάδων, αύξηση της παραγωγής φωσφορικού ασβεστίου (ανόργανος υδροξυαπατίτης) που είναι τα κύρια άλατα εναπόθεσης στην αορτική βαλβίδα. Σύνδεση ατόμων S-ιόντων Ca



# SEM αρχιτεκτονικής της αορτικής βαλβίδας



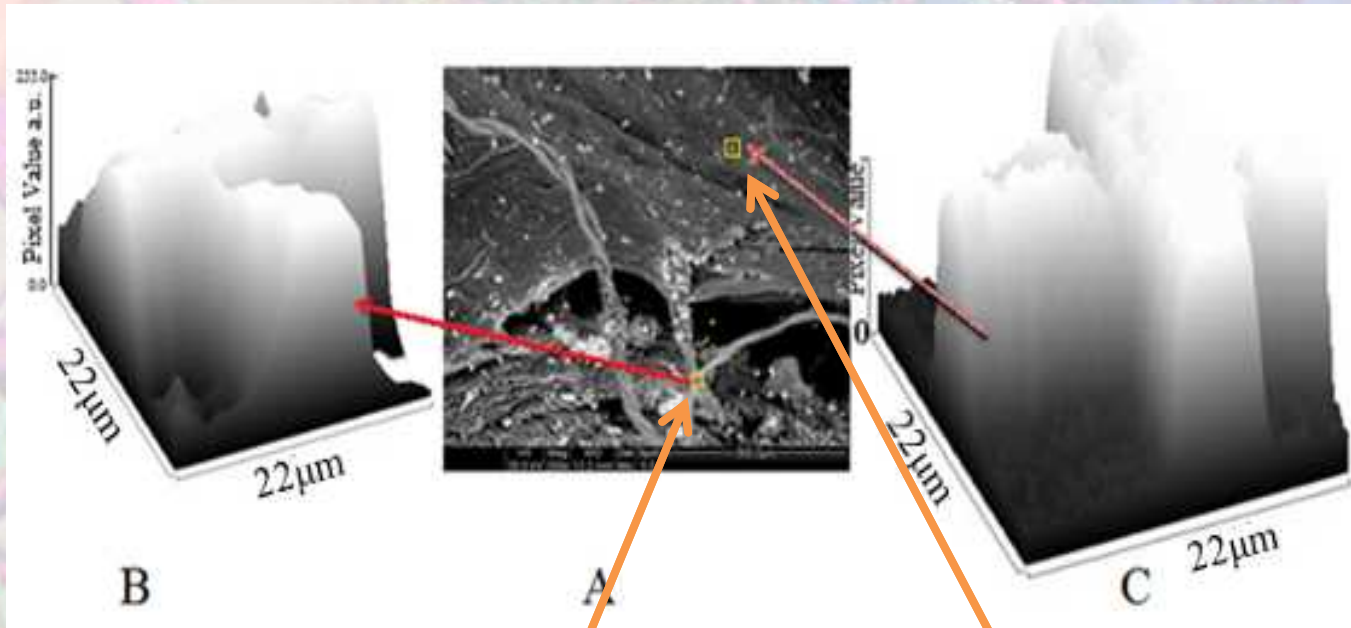
Επασβέστωση της αορτικής βαλβίδας

Περιοχή αμυλοειδούς τύπου πρωτεΐνης (μεταβολή της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών από α-έλικα σε β-διαμόρφωση)

SEM αορτικής βαλβίδας Μεγέθυνση A=1mm  
B=50μm



## SEM αορτικής βαλβίδας



A=SEM,

B=ImageJ ανάλυση σε θέση διακλάδωσης πρωτεϊνών

C=ImageJ σε θέση διασταύρωσης των πρωτεϊνών

Η επασβέστωση αρχίζει σε θέσεις όπου οι πρωτεΐνες σχηματίζουν διακλαδούμενους ή διασταυρούμενους δεσμούς

# Συμπεράσματα

- Τα FT-IR φάσματα έδειξαν ότι το οξειδωτικό στρες συμμετέχει σε κάποιο από τα στάδια ανάπτυξης της επασβέστωσης της αορτικής βαλβίδας.
- Λόγω του οξειδωτικού στρες παράγονται ελεύθερες ρίζες που οδηγούν στον σχηματισμό:
  - αμυλοειδούς τύπου πρωτεϊνών, οι οποίες ενισχύουν την σκλήρυνση των αορτικών βαλβίδων
  - Διακλαδούμενων πολυμερών
  - Τα άτομα θείου (S) των πρωτεϊνών αποτελούν θέσεις έναρξης της επασβέστωσης

# Συμπεράσματα

- Διαπιστώθηκε σχηματισμός ανθρακικού ασβεστίου
- Είναι γνωστό ότι η αντικατάσταση των ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  από ιόντα  $\text{Mg}^{2+}$  οδηγεί σε σχηματισμό άμορφου υδροξυαπατίτη
- Ο άμορφος υδροξυαπατίτης παρεμποδίζει την ανάπτυξη στένωσης
- Χορήγηση μαγνησίου θα μπορούσε να παρεμποδίσει πιθανόν την εξέλιξη της επασβέστωσης σε στένωση της αορτικής βαλβίδας ;;;