



10 Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

Χαρακτηρισμός των εναποθέσεων ασβεστίου σε πειραματική στένωση αορτικής βαλβίδας σε κονίκλους.

M. Karnachoriti^{1*}, Nikolaos Anousakis-Vlachochristou^{2,3*}, Dimitra Athanasiadou⁴, Nikos Boukos⁵, Konstantinos Lekkos³,
Konstantinos Toutouzas², Manolis Mavroidis³ and A. G. Kontos¹

*Equal contribution

¹Physics Department, National Technical University of Athens, 15780 Athens, Greece;

²National & Kapodistrian University of Athens Medical School, First Department of Cardiology, Athens, Greece;

³Academy of Athens Biomedical Research Foundation, Center for Basic Research, Athens, Greece;

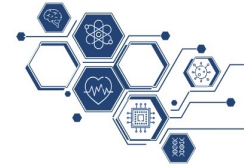
⁴Department of Physics, Chalmers University of Technology, Gothenburg, Sweden;

⁵Institute of Nanoscience and Nanotechnology, National Centre for Scientific Research "Demokritos", GR15310 Athens, Greece.

Διοργανωτές



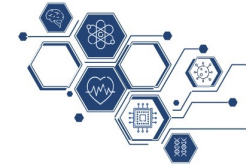
1. Εισαγωγή-Σκοπός



1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

Η Στένωση αορτικής βαλβίδας εκφυλιστικής αιτιολογίας είναι η πιο κοινή βαλβιδοπάθεια με υψηλή θνησιμότητα. Ωστόσο δεν έχουν διερευνηθεί επαρκώς οι παθοφυσιολογικές διεργασίες στα πρώιμα στάδια. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι ο χαρακτηρισμός των εναποθέσεων ασβεστίου σε πειραματική στένωση αορτικής βαλβίδας .^[1]

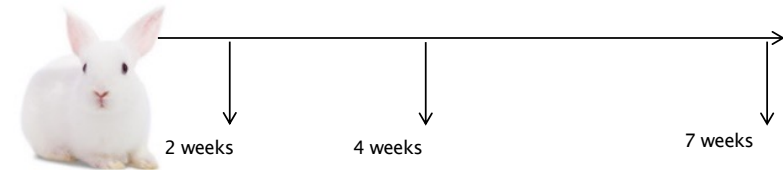
2. Μέθοδοι και Υλικά



1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

ΔΕΙΓΜΑΤΑ:

- Προκλήθηκε στένωση αορτικής βαλβίδας σε κονίκλους New Zealand χορηγώντας τροφή εμπλουτισμένη με 1% χοληστερόλη και 3.500 I.U.s. εργοκαλσιφερόλης/kg ημερησίως για 7 εβδομάδες.
- Για την φασματοσκοπία Raman χρησιμοποιήθηκαν κρουτομές βαλβίδων 2 mm επί υποστρωμάτων ανοξειδωτού χάλυβα.
- Για την φασματοσκοπία υπερύθρου χρησιμοποιήθηκαν λεπτές τομές μονιμοποιημένες με φορμαλίνη 4% και ακολούθως αιθανόλη 70%.
- Για την ηλεκτρονική μικροσκοπία έγινε μονιμοποίηση με OsO₄, έγκλειση σε ρητίνη και μικροτόμηση.



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ:



Τα δείγματα μελετήθηκαν τόσο φασματοσκοπικά όσο και με τεχνικές μικροσκοπίας:

1. Φασματοσκοπία micro- Raman

Renishaw Invia Spectrometer, 785 nm

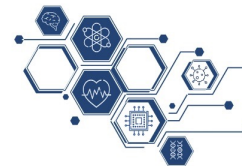
2. Φασματοσκοπία FT-IR

Cary 630 FTIR Spectrometer, Agilent, resolution: 2 cm⁻¹

3. Ηλεκτρονική μικροσκοπία S/TEM & EDX

Talos F200i

3. Αποτελέσματα



Φασματοσκοπία micro- Raman

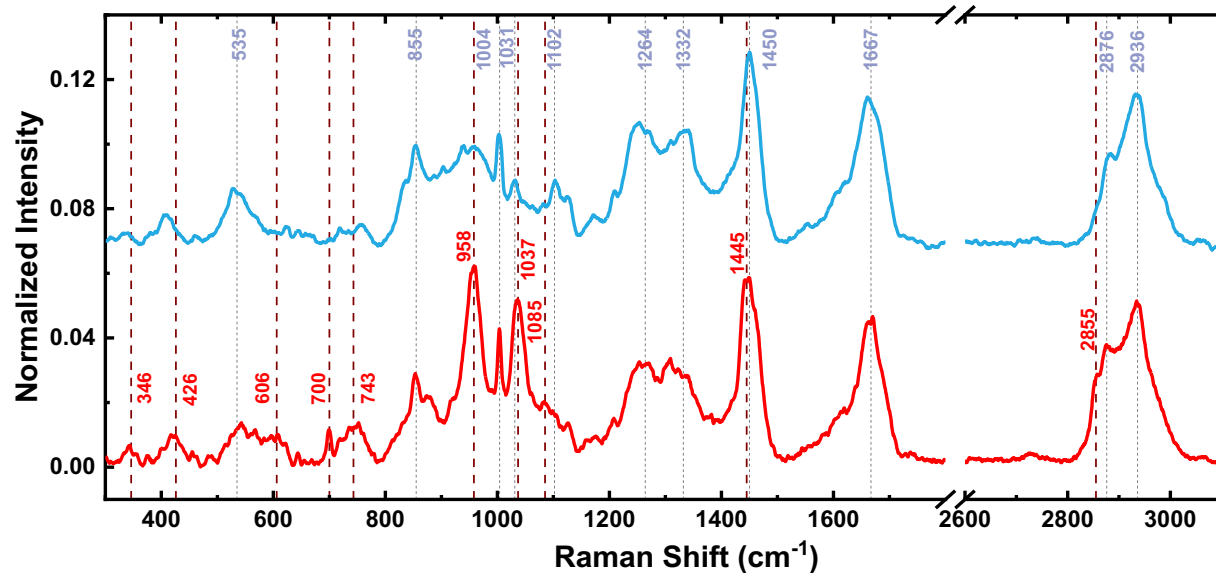
Λήφθηκαν φάσματα Raman από δείγματα φυσιολογικών ιστών (**Control: μπλε διάγραμμα**) και από δείγματα με στένωση αορτικής βαλβίδας (**ΑΣ: κόκκινο διάγραμμα**). Τα φάσματα Raman αποτυπώνουν τις δονήσεις των μορίων που συντελούν τους ιστούς.

Φάσματα Control:

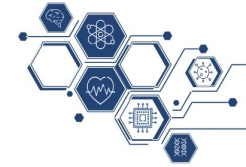
- Πλούσιο σε τρόπους Raman που προέρχονται κυρίως από λιπίδια, πρωτεΐνες και αμινοξέα.
- Χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος αυτές της προλίνης (855 cm^{-1}) και της ελαστίνης (1102 cm^{-1})

Φάσματα στένωσης:

- Σημαντικές διαφορές από το φασματικό προφίλ των controls κυρίως λόγω εμφάνισης νέων κορυφών.
- Οι κορυφές στις συχνότητες the 426, 606, 958 and 1085 cm^{-1} υποδηλώνουν την ύπαρξη των ανθρακικών απατίτων.^[2]
- Οι κορυφές στις συχνότητες 743 and 1037 cm^{-1} προέρχονται από πυροφωσφορικό ασβέστιο.^[3]



3. Αποτελέσματα

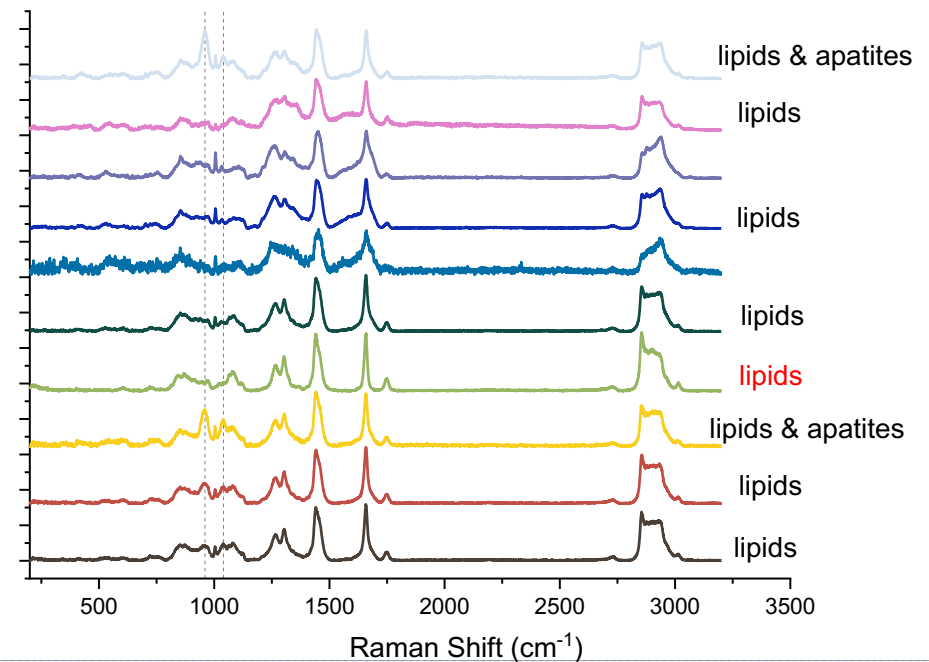


Φασματοσκοπία micro- Raman

- Τα φάσματα στένωσης ξεχωρίζουν κυρίως από τις ζώνες Raman ανθρακικών απατίτων και πυροφωσφορικού ασβεστίου σε χαμηλές συχνότητες κάτω από τα 1200 cm^{-1} .
- Ωστόσο το φασματικό τους προφίλ αλλά και η ύπαρξη κορυφών όπως αυτή της δόνησης της χοληστερόλης στα 700 cm^{-1} και των η χαρακτηριστική κορυφή των λιπιδίων στα 2855 cm^{-1} , φανερώνουν την έντονη ύπαρξη λιπώδους ιστού στα δείγματα της στένωσης.^[4]

Πολλαπλές μετρήσεις Raman σε διαφορετικά σημεία του ιστού με στένωση.

Τα περισσότερα φάσματα αναδεικνύουν την ύπαρξη λιπιδίων ή λιπώδους ιστού σε αντίθεση με τα controls δείγματα.



3. Αποτελέσματα



1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

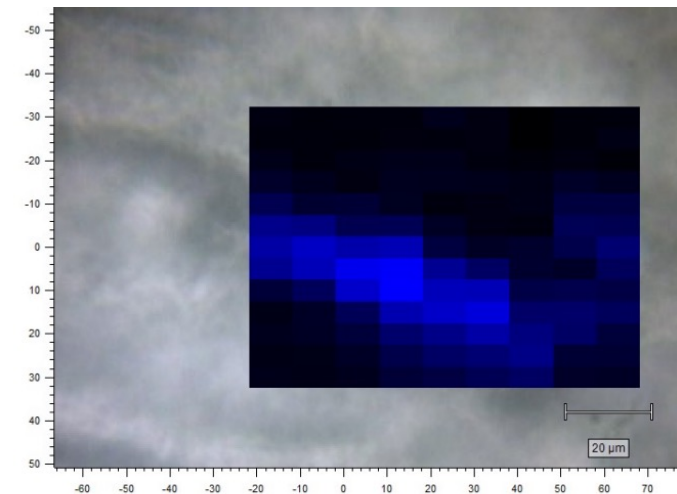
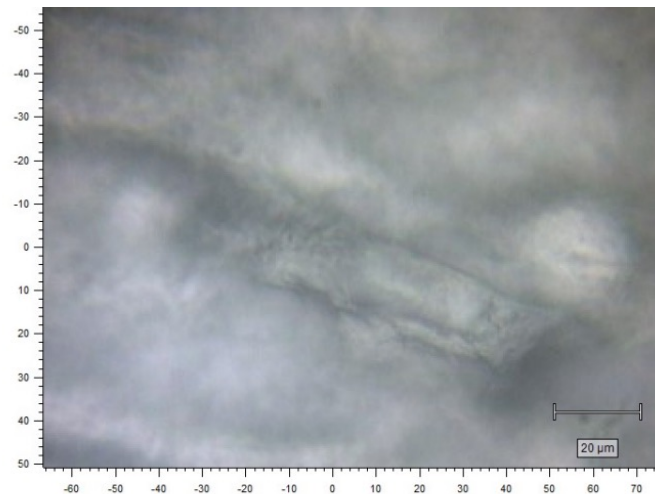
Χαρτογράφηση επιφάνειας με micro-Raman

Οι πιο ισχυρές κορυφές του φάσματος στένωσης (958 cm^{-1} , $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ υδροξυαπατίτης & 1037 cm^{-1} , $\nu_s(\text{PO}_3)$, πυροφωσφορικό ασβέστιο) χρησιμοποιήθηκαν για την χαρτογράφηση με φασματοσκοπία Raman της επιφάνειας του δείγματος.

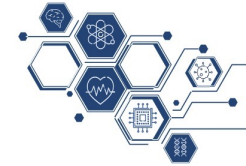
- Ανάγλυφα τμήματα της επιφάνειας του ιστού φαίνεται να παρουσιάζουν υψηλότερες εντάσεις των αντίστοιχων ζωνών (φωτεινό μπλε \rightarrow ισχυρό σήμα Raman/ σκοτεινό χρώμα \rightarrow χαμηλό σήμα).
- Η φασματοσκοπική χαρτογράφηση των ιστών με στένωση απέδειξε την ύπαρξη όζων φωσφορικού ασβεστίου στην επιφάνεια του ιστού

Εικόνα λευκού φωτός οπτικού μικροσκοπίου (αριστερά) της επιφάνειας του ιστού.

Εικόνα χαρτογράφησης Raman με χρωματική κλίμακα σχετικά με την ένταση του σήματος (δεξιά).



3. Αποτελέσματα

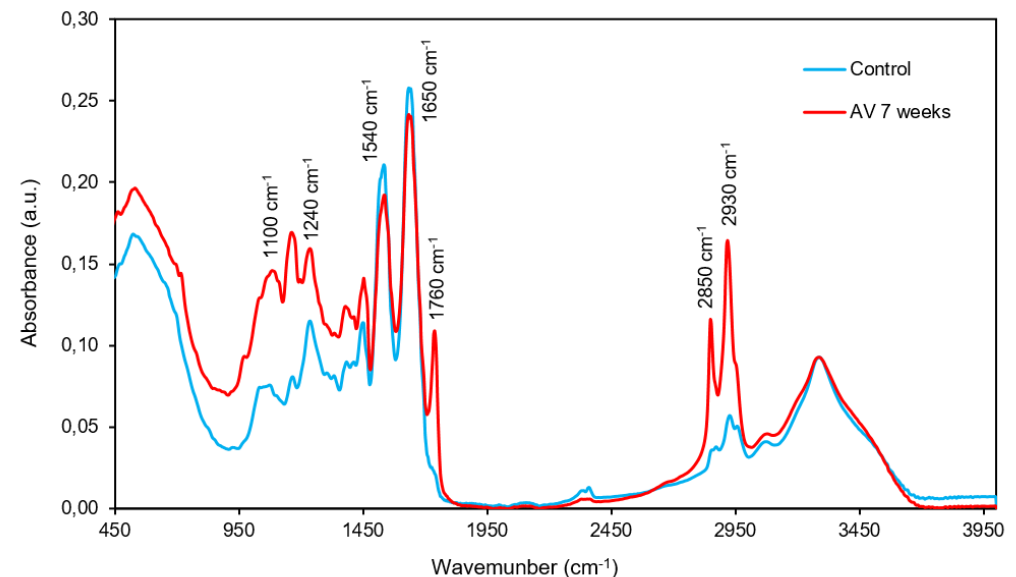


1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

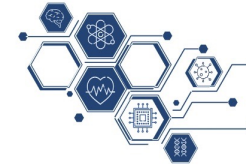
Φασματοσκοπία FT-IR

Λήφθηκαν φάσματα FT-IR από δείγματα φυσιολογικών ιστών (**Control: μπλε διάγραμμα**) και από δείγματα με στένωση αορτικής βαλβίδας (**ΑΣ: κόκκινο διάγραμμα**).

- Έντονα διακριτό το φάσμα της βαλβίδας με στένωση σε σύγκριση με το control.
- Ισχυρότερες διαφορές στις θέσεις:
 - a. $1100\text{ cm}^{-1} \rightarrow \nu_3(\text{PO}_4)$:PO δόνηση
 - b. $1760\text{ cm}^{-1} \rightarrow \nu(\text{CO})$ δόνηση λιπιδίων / νουκλεϊκών οξέων
 - c. $2850\text{ cm}^{-1} \rightarrow \nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ δόνηση λιπιδίων & $\nu(\text{CH}_2)$ νουκλεϊκών οξέων
 - d. $2930\text{ cm}^{-1} \rightarrow \nu_{\text{asym}}(\text{CH}_2)$ δόνηση λιπιδίων / υδατανθράκων & $\nu(\text{CH}_2)$ νουκλεϊκών οξέων
- Συμφωνία με τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας Raman.



3. Αποτελέσματα



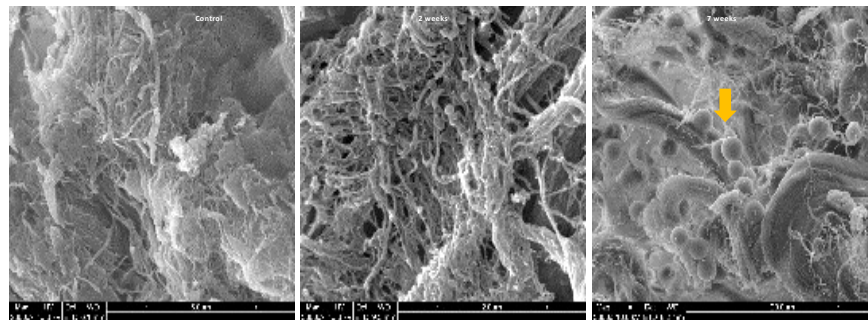
1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

Ηλεκτρονική Μικροσκοπία S/TEM & EDX

SEM-EDX

(Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης με στοιχειακή ανάλυση)

Σφαιρικά σωματίδια φωσφορικού ασβεστίου στις πειραματικές βαλβίδες.

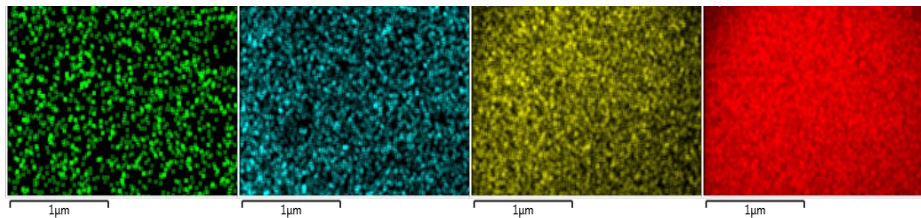


Ca Ka1

P Ka1

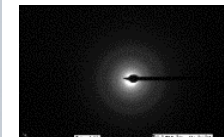
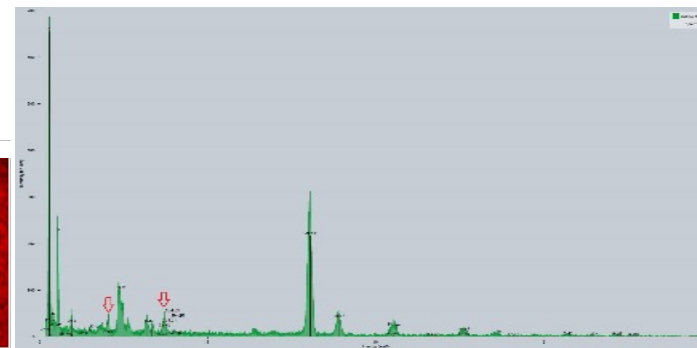
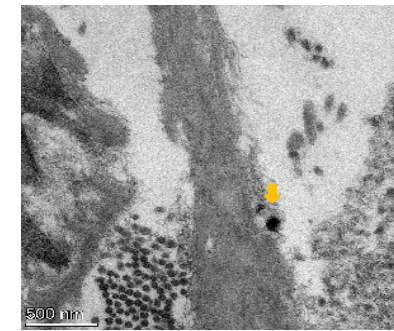
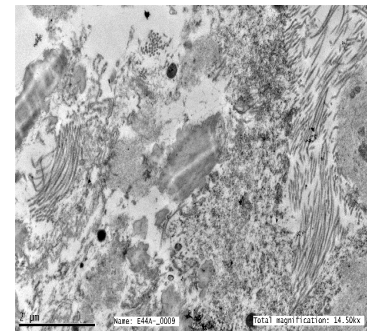
O Ka1

C Ka1_2

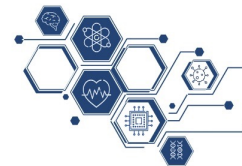


TEM - EDX analysis

(Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης με στοιχειακή ανάλυση)



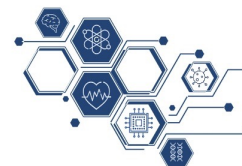
4. Συμπεράσματα



1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

- ✓ Οι δονητικές φασματοσκοπίες, Raman και FT-IR εντοπίζουν με επιτυχία τις εναποθέσεις ασβεστίου στις βαλβίδες κονίκλων με πειραματική στένωση αορτικής βαλβίδας.
- ✓ Οι δονήσεις του φωσφορικό ιόντος (PO_4^{3-}) δίνουν ισχυρά σήματα Raman με χαρακτηριστικές τις ζώνες στις συχνότητες 958 και 1037 cm^{-1} που αντιστοιχούν στον υδροξυαπατίτη και το πυροφωσφορικό ασβέστιο, αντίστοιχα.
- ✓ Η χαρτογράφηση Raman εντοπίζει με ακρίβεια τα όρια των όζων φωσφορικού ασβεστίου που εναποτίθενται στην επιφάνεια του ιστού.
- ✓ Περαιτέρω μελέτη απαιτείται για την σύγκριση των φασμάτων των δειγμάτων στένωσης σε περιοχές πέραν των όζων. Η μέχρι τώρα φασματοσκοπική μελέτη δείχνει ότι υπάρχει προοπτική εύρεσης διαφορών που σχετίζονται με τις ζώνες λιπιδίων και κολλαγόνου.
- ✓ Μελλοντικό αλλά και άμεσο στόχο επίσης αποτελεί η εύρεση φασματικών χαρακτηριστικών σε δείγματα που βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο της νόσου (2 εβδομάδες παρέμβασης).

5. Βιβλιογραφία



1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικών Επιστημών στην Υγεία:
Καινοτομίες και Προοπτικές
22-23 Σεπτεμβρίου 2023

- [1] Nikolaos Anousakis-Vlachochristou et al., **Focusing on the Native Matrix Proteins in Calcific Aortic Valve Stenosis**. JACC: Basic to Translational Science, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2023.01.009>
- [2] Guillaume Penel et al., **Raman Microspectrometry Studies of Calcified Tissues and Related Biomaterials. Raman Studies of Calcium Phosphate Biomaterials**. Dent. Med. Probl. 2003, 40, 1, 37–43.
- [3] Pierre Gras et al., **Synthesis and Characterisation of Hydrated Calcium Pyrophosphate Phases of Biological Interest**. European Journal of Inorganic Chemistry, 2013, 2013 (34), pp.5886-5895. 10.1002/ejic.201300955. hal-03467238
- [4] Krzysztof Czamara et al., **Raman microspectroscopy of human aortic valves: investigation of local and global biochemical changes associated with calcification in the aortic stenosis**. Analyst 2012. DOI: 10.1039/C4AN01856G