



UNIwersytet Jagielloński

Wydział Chemii

Zakład Fizyki Chemicznej

Zespół Spektroskopii Oscylacyjnej

STRESZCZENIE

SPEKTROSKOPOWE BADANIA MÓZGU W ZABURZENIACH NEUROLOGICZNYCH

mgr inż. Julia Sacharz

Promotor: dr. hab Aleksandra Wesełucha – Birczyńska, prof. UJ

Kraków, 2017

Celem pracy doktorskiej było poznanie na poziomie molekularnym wybranych struktur mózgowia, które wydają się być odpowiedzialne za występowanie określonych dysfunkcji układu nerwowego. Do badań zostały wybrane postępujące zaburzenia neurologiczne, takie jak epilepsja oraz stwardnienie rozsiane. Rozpoznanie wpływu dysfunkcji neurologicznych na strukturę biochemiczną odpowiednich obszarów przeprowadzono poprzez porównanie wybranych obszarów zaburzonego mózgu ze zdrową tkanką wykorzystując nowoczesne techniki spektroskopii wibracyjnej. Metody spektroskopowe dostarczają informacji o strukturze molekularnej i oddziaływaniach molekularnych w tkankach, jak również o ich zmianach związanych ze zmianami chorobowymi.

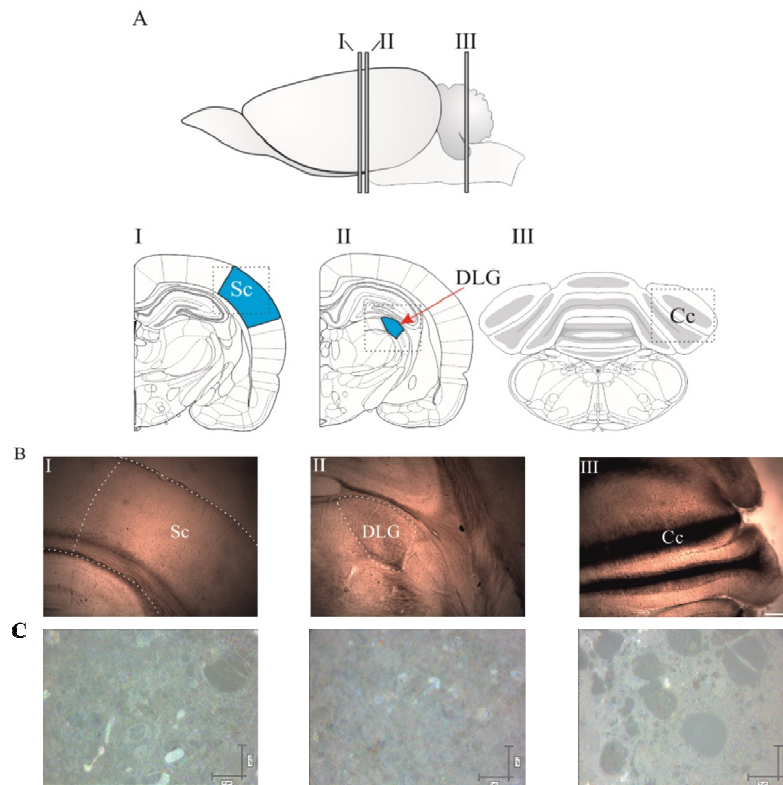
Epilepsja, jest jedną z najczęściej występujących chorób układu nerwowego. Charakteryzuje się nieprzewidywalnymi nawracającymi napadami, które przejawiają się jako drgawki, ale mogą też prowadzić do utraty przytomności o różnym czasie trwania. Spowodowane są asynchroniczną, nieprawidłową bądź nadmierną aktywnością neuronalnych sieci mózgu.

Drugie z analizowanych przewlekłych patologii układu nerwowego, stwardnienie rozsiane (SM), jest wynikiem ataku autoimmunologicznego skierowanego przeciwko składnikom osłonki mieliny, co powoduje demielinizację, a następnie uszkodzenie aksonów w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Zdmielinizowane aksony mogą mieć tendencje do zanikania i odnawiania się, jednak w chorobie SM nie zdarza się, aby jako pierwsza wystąpiła degeneracja aksonów, a następnie degradacja mieliny.

Mimo wielu badań w czołowych ośrodkach naukowych, mechanizm większości chorób neurodegeneracyjnych jest wciąż nieznan.

Badania epilepsji skupiły się na trzech istotnych obszarach mózgu. Pierwszą analizowaną strukturą była kora somatosensoryczna – Sc (*somatosensory cortex*), która jest odpowiedzialna za przetwarzanie informacji sensorycznych z całego ciała. Drugi z obszarów odpowiada za przekaz informacji impulsu wzrokowego, jest to grzbietowa część ciała kolankowatego bocznego wzgórza – DLG (*dorsal lateral geniculate nucleus of the thalamus*). Te dwie struktury mózgu, DLG i Sc, były szczególnie interesujące ze względu na swoją funkcjonalną zależność. Trzecia badana struktura to kora mózdzku – Cc (*cerebellar cortex*), odpowiedzialna za poruszanie się ciała, która potencjalnie nie bierze żadnego udziału

w przebiegu epilepsji (ryc. 1). Badania wykonano na dwóch szczepach szczurów: Wistar - jako grupę kontrolną oraz WAG/Rij - reprezentujących grupę epileptyczną.



Rycina 1. Schemat przekrojów mózgu szczura z uwzględnieniem wybranych struktur mózgowia: DLG, Sc oraz Cc; (A) na podstawie atlasu Paxinos i Watson (2006); (B) mikrofotografie odpowiednich przekrojów tkanki (skala: 100 μ m); (C) mikrofotografie skrawków tkanki pobranych z odpowiednich obszarów kory mózgowej, obiektyw 50x, (skala 10 μ m)

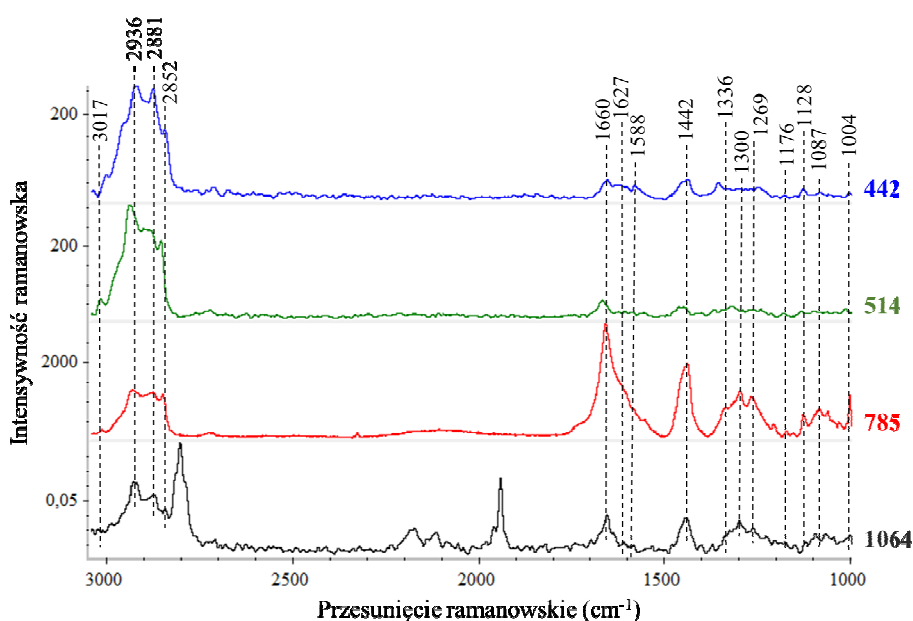
W badaniach epilepsji wykorzystano technikę mikrospektroskopii Ramana, opracowanie widm Ramana obejmowało:

- (1) analizę stosunków intensywności integralnych pasm markerowych;
- (2) analizę głównych składowych (Principal Component Analysis, PCA);
- (3) analizę metodą dwuwymiarowej spektroskopii korelacyjnej (2D).

W epilepsji obserwuje się zaburzenia funkcjonowania grupy neuronów, które prowadzą do samorzutnego pojawiania się nadmiernych wyładowań bioelektrycznych,

niszczących dla tkanek. Stąd zaplanowano nietradycyjne badania mózgowia szczura na tyle młodego, jeszcze przed atakami padaczki, aby uniknąć degradacji tkanki w badanych obszarach mózgu. Każdy z ataków padaczki prowadzi bowiem do sukcesywnego uszkodzenia bądź obumierania komórek nerwowych. Kolejnym nowatorskim założeniem było takie przygotowanie badanych skrawków tkanki do pomiarów, aby maksymalnie ograniczyć ingerencję w ich skład chemiczny podczas tego procesu. Dlatego utrzymywane były w trakcie pomiaru w sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym.

(Ad. 1) Mózg jest stosunkowo ubogi w białka (szczególnie we wczesnym okresie rozwoju szczura), ale bogaty w lipidy. Kształt widma Ramana dla tkanki mózgowej przedstawia zatem pasma typowe dla lipidów [ryc. 2]. Podwyższone tło widma, wynikające zapewne z fluorescencji, jest obserwowane dla epileptycznej tkanki mózgu wzbudzonej linią 785 nm, i może być wskaźnikiem zmian w genetycznej padaczce u szczurów WAG/Rij.



Rycina.23. Widma ramanowskie szczepu Wistar (zdrowy) struktury DLG przy użyciu linii wzbudzającej 442 nm, 514.5 nm, 785 nm oraz 1064 nm.

Analiza stosunków integralnych pasm markerowych wykazała różnice pomiędzy mózgiem zdrowym (Wistar) a epileptycznym (WAG/Rij): analiza amidu I i struktury drugorzędowej białek wykazała najwyższą zawartość białka o strukturze helikalnej zarówno w grupie epileptycznej jak i zdrowej. W grupie epileptycznej, w stosunku do grupy kontrolnej,

zaobserwowano wzrost konformacji α -helisy, spadek konformacji β -kartki oraz spadek konformacji nieuporządkowanej kłęбка statystycznego. Największe zmiany występowały w strukturze Cc. Analiza stosunku intensywności integralnych pasm markerowych A_{1660}/A_{1440} pochodzących od drgań rozciągających C=C oraz zginających CH_2 , wykazała najwyższą wartość dla struktury Sc mózgu dla obu: grup epileptycznej oraz zdrowej, co oznacza, że struktura Sc charakteryzuje się większą ilością podwójnych wiązań C=C i stąd większym stopniem nienasylenia w porównaniu do struktur DLG i Cc. Zaobserwowano wzrost intensywności integralnych pasm markerowych A_{1660}/A_{1440} w grupie epileptycznej dla Sc i Cc, oraz spadek wartości w grupie epileptycznej dla DLG. Stosunek intensywności integralnych pasm A_{1440}/A_{1450} (drgania zginające CH_2 i CH_3 (SM); drgania nożycowe CH_2 (PE) w stosunku do drgań zginających CH_2 (DLPE)) wskazuje na największą zawartość SM (1439 cm^{-1} – drgania zginające CH_2 i CH_3) w zdrowej strukturze DLG mózgu. Stosunek intensywności integralnych pasm A_{1460}/A_{1450} (drgania deformacyjne CH_2 i CH_3 (SM) w stosunku do drgań zginających CH_2 (DLPE) oraz drgań deformacyjnych CH_2 (PC)), może wskazywać na wzrost zaangażowania drgań deformacyjnych grup metylowych CH_3 i metylenowych CH_2 z obszaru Sc w tkance patologicznej, niezmienny poziom w DLG i spadek ich zawartości w obszarze Cc. Analiza stosunków intensywności pasm markerowych z zakresu widmowego $3050\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ wykazała różnice w organizacji bocznych łańcuchów lipidowych pomiędzy strukturami mózgu.

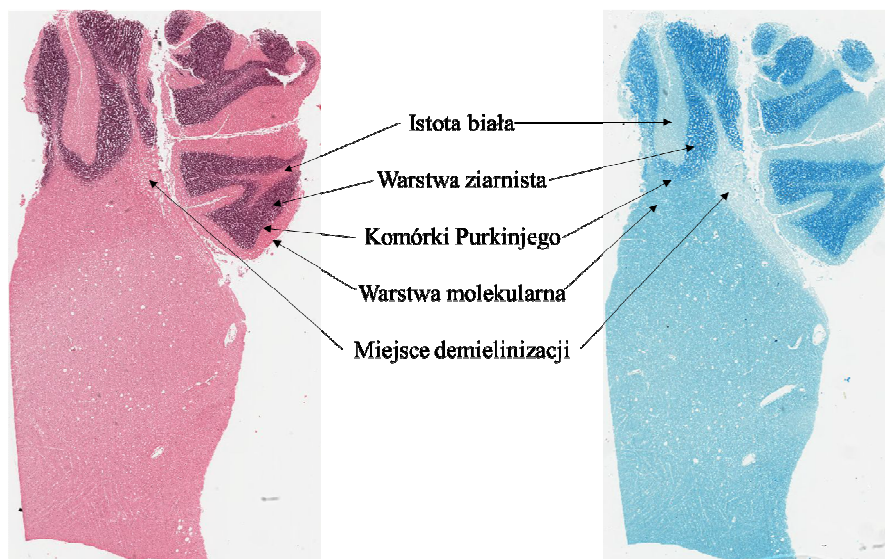
(Ad 2) Analiza głównych składowych (Principal Component Analysis, PCA) pozwoliła na rozróżnienie grup szczurów zdrowych i epileptycznych w poszczególnych zakresach widma. Wykresy współrzędnych czynnikowych dla obserwacji (ang. scores plot), w zakresie $3050\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$, wykazały wyraźną separację wyników opartą na różnicach w uporządkowaniu strukturalnym lipidów w tkance epileptycznej w porównaniu do zdrowej. Może być to potwierdzeniem metylacji struktur białkowo-lipidowych jako patogenezy padaczki.

Zakres widmowy $1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ charakteryzuje inne uporządkowanie lipidów w badanych obszarach mózgu jak również wskazuje na zmiany w konformacji białek oraz aktywację kwaśnego białka włóknikowego (GFAP) w Sc i DLG. Zakres widmowy $1500\text{-}1330\text{ cm}^{-1}$ wskazuje na inne konformację kwasów tłuszczowych oraz odmienną organizację łańcuchów bocznych białek dla struktury Sc i DLG, co prowadziło do separacji wyników na wykresach współrzędnych czynnikowych dla obserwacji. Analiza PCA nie wykazała wyraźnych różnic dla struktury Cc mózgu pomiędzy grupą epileptyczną i zdrową. Wykresy współrzędnych

czynnikowych dla obserwacji wykazują jednak na odmienną organizację lipidów i białek dla badanych grup: zdrowej i epileptycznej.

(Ad 3) Korelacja dwuwymiarowa (2D) pozwoliła na scharakteryzowanie badanych struktur mózgu. Długość fali linii wzbudzających lasera stanowiła zaburzenie badanego układu w tej analizie. Pojawiające się na dwuwymiarowych mapach piki wynikające z korelacji synchronicznych i asynchronicznych pozwoliły zauważyć różnice między mózgiem zdrowym a epileptycznym. Jest to: obecność neurotransmiterów GABA w tkance epileptycznej w obszarze DLG oraz Glu w obszarze Sc dla tkanki zdrowej i epileptycznej; przesunięcie maksimum pasma przy 1659 cm^{-1} (konformacja *cis*) do pozycji 1660 cm^{-1} dla struktury Sc, przesunięcie z 1666 cm^{-1} (konformacja *tras*) do pozycji 1662 cm^{-1} dla DLG, przesunięcie maksimum pasma przy 1440 cm^{-1} w pozycję 1444 cm^{-1} dla struktury Sc oraz przesunięcie z 1450 cm^{-1} w pozycję 1444 cm^{-1} dla DLG świadczy o podobnej tendencji zmian strukturalnych lipidów w obu strukturach mózgu w padaczce. Struktura Cc mózdzku szczura wydaje się posiadać odrębną charakterystyczną dla siebie organizację białek i lipidów. Z przeprowadzonych badań wynika, iż analizowana dysfunkcja mózgu, padaczka z napadami nieświadomości, ogniskowa, w rzeczywistości angażuje w swoim przebiegu cały układ nerwowy, wpływa na skład chemiczny mózgu, struktura białek i lipidów jest zmieniona co stanowi w konsekwencji podstawę do wystąpienia tej patologii.

W badaniach obrazowania spektroskopowego z zastosowaniem absorpcji w podczerwieni wykorzystany został *post mortem* skrawek mózdzku ludzkiego ze stwardnieniem rozsianym. Mózdzek zbudowany jest z szerokiego arkusza komórek, kory mózdzku i grupy jąder głębokich mózdzku wsuniętych w istotę białą. Kora mózdzku składa się z trzech warstw: warstwy komórek Purkinjego (duże ciała komórkowe), relatywnie ubogiej w komórki warstwy drobinowej oraz warstwy ziarnistej - którą tworzą małe komórki ziarniste (ryc. 3).



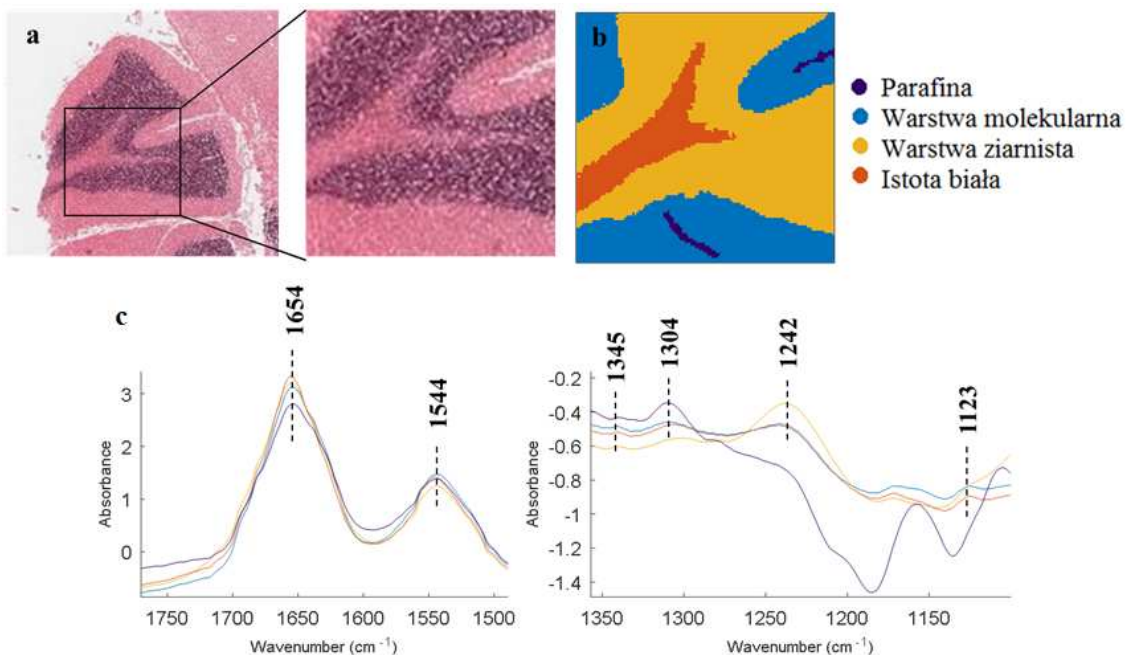
Rycina 3. Przekrój próbki mózdzku ludzkiego poddanej analizie spektroskopowej IR w barwieniu hematoksyliną i eozyną (H&E) – po lewej oraz w barwieniu metodą Klüvera-Barrery – po prawej.

Badania stwardnienia rozsianego przeprowadzono za pomocą spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni, która obejmowała:

- (1) analizę wiązkową (Cluster Analysis) oraz
- (2) analizę głównych składowych PCA.

(Ad 1) Przeprowadzając procedurę identyfikacji zebranych widm IR za pomocą analizy skupień metodą k-średnich (KCA) utworzono mapę klastrową, która dokładnie odpowiadała skrawkowi poddanemu topograficznemu barwieniu przeglądowemu metodą H&E (hematoksyliną i eozyną) (ryc. 4a,b). Wyznaczono 4 skupienia (klastry) odpowiadające trzem różnym typom tkanek: istocie białej (na rycinie kolor czerwony), warstwie ziarnistej (kolor żółty) i warstwie molekularnej (kolor jasnoniebieski). Fioletowy kolor na mapie oznacza obszar zawierający puste przestrzenie w tkance spowodowane pęknięciami w sekcji tkanki. Analiza spektralna tkanki mózdzku ludzkiego ze stwardnieniem rozsianym wykazała różnice w widmach dla poszczególnych warstw kory mózdzku: pasmo 1345 cm^{-1} (drżanie CH_2 wahadłowe fosfolipidów, kwasów tłuszczowych, triglicerydów; drżania łańcuchów bocznych aminokwasów) jest charakterystyczne dla bogatych w lipidy warstwy molekularnej i istoty białej; pasmo przy 1242 cm^{-1} (drżanie rozciągające asymetryczne PO_2 , DNA) charakteryzuje

bogatą w jądra komórkowe warstwę molekularną, wskazując na obecność kwasów nukleinowych w jądrze komórkowym.



Rycina 4. Badany fragment próbki mózgu ludzkiego (a) poddany barwieniu H&E; (b) oraz struktury tego samego obszaru w analizie skupień *k*-średnich. Usrednione widma IR dla każdego z obszarów skupień (istota biała-kolor czerwony, warstwa ziarnista-kolor żółty, warstwa molekularna-kolor jasnoniebieski, pusta przestrzeń w tkance-kolor fioletowy) analizy klastrowej w zakresach 1750 – 1500 cm^{-1} oraz 1350 – 1100 cm^{-1} (c).

(Ad 1) Analiza PCA wykazała różnice w widmach dla dwóch badanych obszarów warstwy molekularnej: w obszarach gdzie nastąpiła widoczna demielinizacja komórek nerwowych oraz w miejscu, w którym zmiany nie były jeszcze widoczne. Bogata w lipidy mielina otaczająca aksony została uszkodzona w efekcie choroby, co spowodowało subtelne zmiany w widmach absorpcyjnych IR w zakresach widma 3600-3000 cm^{-1} zawierającego pasmo drgania rozciągającego N–H białek w pozycji 3300 cm^{-1} oraz w przedziale 1750-1580 cm^{-1} zawierającego pasmo drgania amidu I białek w pozycji ok. 1660 cm^{-1} . Różnice wynikały na zmiany konformacji białek w warstwie objętej demielinizacją (transformacja w kierunku struktury β -kratki) oraz modyfikacji zawartości i organizacji lipidów.

Niniejsza praca doktorska została wykonana we współpracy z Zakładem Neurofizjologii i Chronobiologii, Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych., Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ, Zakładem Kryminalistyki Instytutu Ekspertyz Sądowych im. Prof. Dra Jana Sehna w Krakowie oraz z Centre for Biospectroscopy, School of Chemistry, Monash University, Melbourne w Australii.

Dorobek naukowy doktoranta:

- 1) **Julia Sacharz**, Janina Zięba-Palus, Aleksandra Wesełucha-Birczyńska, Marian H. Lewandowski, Rafał Kowalski, Katarzyna Palus, Łukasz Chrobok, Agnieszka Sozańska, *The Raman examination of healthy rat's brain tissue*, 2015, *ICAVS 8 Abstracts Poster*, str. 404-405, ISBN: 978-3-200-04205-6
- 2) **Julia Sacharz**, Aleksandra Wesełucha-Birczyńska, Czesława Paluszkiewicz, Piotr Chaniecki, Marta Błazewicz, *A 2D correlation Raman spectroscopy analysis of a human cataractous lens*, 2016, *Journal of Molecular Structure*, 1124, 71-77
- 3) Aleksandra Wesełucha-Birczyńska, **Julia Sacharz**, Janina Zięba-Palus, Marian H. Lewandowski, Rafał Kowalski, Katarzyna Palus, Łukasz Chrobok, Malwina Birczyńska, Agnieszka Sozańska, *The application of Raman microspectroscopy for the study of healthy rat brain tissue*, 2016, *Vibrational Spectroscopy*, 85, 48-54
- 4) Janina Zięba-Palus, Aleksandra Wesełucha-Birczyńska, **Julia Sacharz**, Marian H. Lewandowski, Katarzyna Palus, Łukasz Chrobok, Rafał Kowalski, Paulina Moskal, Malwina Birczyńska, Agnieszka Sozańska, *2D correlation Raman microspectroscopy of chosen parts of rat's brain tissue*, 2017, *Journal of Molecular Structure*, 1147, 310-316
- 5) **Julia Sacharz**, Aleksandra Wesełucha-Birczyńska, Janina Zięba-Palus, Marian H. Lewandowski, Rafał Kowalski, Katarzyna Palus, Łukasz Chrobok, Paulina Moskal, Malwina Birczyńska, Agnieszka Sozańska, *Epileptic rat brain tissue analyzed by 2D correlation Raman spectroscopy*, 2018, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 188, 581-588