

Streszczenie rozprawy doktorskiej pt.
Wykorzystanie zaawansowanych metod spektroskopowych w badaniach nad
patogenezą epilepsji na przykładzie modeli zwierzęcych

Już od lat 40-tych XX wieku w analizach próbek biologicznych stosuje się spektroskopię w podczerwieni, należącą do grupy metod spektroskopii wibracyjnej. Pierwsze badania przy użyciu tej techniki polegały na rozpoznawaniu widm wyizolowanych związków organicznych. Dzięki ich wynikom dziś dysponujemy bogatą biblioteką widm umożliwiającą identyfikację biomolekuł oraz rozpoznanie zmian w nich zachodzących. Dynamiczny rozwój instrumentów badawczych, a w szczególności zastosowanie interferometru oraz transformacji Fouriera w analizie rejestrowanego sygnału, pozwolił na znaczne skrócenie czasu pomiaru pojedynczego widma. Skrócenie czasu pomiaru natomiast umożliwiło opracowanie mikrospektroskopii FTIR (ang. *Fourier transform infrared microspectroscopy*), będącej techniką obrazowania chemicznego, łączącą cechy mikroskopii optycznej oraz spektroskopii wibracyjnej. Główną zaletą mikrospektroskopii FTIR jest to, iż zarówno morfologiczne jak i molekularne cechy badanych tkanek mogą być obserwowane bez użycia barwników, znaczników czy utrwalaczy. Dlatego też mikrospektroskopia FTIR znajduje szerokie zastosowanie zarówno w badaniach podstawowych jak i jako narzędzie diagnostyczne.

Rzeczywisty rozwój mikrospektroskopii FTIR przebiegał dwutorowo. Celem pierwszego z podejść było umożliwienie obrazowania struktur biologicznych na poziomie subkomórkowym. Konieczna tu była poprawa jakości widm uzyskiwanych przy niewielkim, rzędu mikrometrów, przekroju poprzecznym wiązki promieniowania podczerwonego. Ten cel udało się osiągnąć dzięki zastosowaniu synchrotronowego źródła IR (metoda μ SRFTIR – ang. *Synchrotron Radiation Fourier Transform Infrared Microspectroscopy*). Wysoka jasność synchrotronowej wiązki IR przyczynia się do uzyskania wyższej, w porównaniu do tradycyjnych źródeł IR, wartości stosunku sygnału do szumu dla rejestrowanych widm. Jest to niezwykle istotne w badaniach subtelnym zmian w strukturze związków biochemicznych. Z kolei tam, gdzie obrazowanie FTIR tkanek ma ułatwić pracę histopatologów i przyspieszyć postawienie diagnozy, nacisk kładzie się na szybkie obrazowanie możliwie dużych fragmentów tkanek. Zastosowanie detektorów FPA (ang. *focal plane array*) umożliwiło rozwój ultraszybkiej mikrospektroskopii FTIR (μ UFFTIR – ang. *Ultrafast Fourier Transform Infrared Microspectroscopy*) z konwencjonalnym źródłem promieniowania IR, pozwalającej na obrazowanie dużych obszarów tkanki w relatywnie krótkim czasie przy zachowaniu zadowalającej rozdzielczości przestrzennej (5-20 μ m) i dobrej jakości rejestrowanych widm IR.

Celem prezentowanej rozprawy była jakościowa oraz ilościowa analiza zmian biochemicznych występujących w hipokampie dorosłych szczurów w różnych modelach drgawek, to jest w pilokarpinowym modelu po stanie epileptycznym (łac. *post status epilepticus*) oraz w modelu drgawek rozniecanych elektrycznie. Jako główne metody pomiarowe zastosowano synchrotronową mikrospektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera oraz ultraszybką mikrospektroskopię FTIR. Dodatkowo wykonano pomiary przy użyciu mikrospektroskopii Ramana. Wszystkie badania przeprowadzono na linii pomiarowej SMIS synchrotronu SOLEIL.

Uzyskane rezultaty pokazały, że na skutek drgawek wywołanych pilokarpiną rośnie liczba inkluzji kreatynowych w hipokampie szczura. Statystyczna analiza korelacji dowodzi, że

liczba tych inkluzji rośnie wraz z całkowitym czasem trwania aktywności drgawkowej. Kolejnym krokiem było przebadanie preparatów pobranych po zakończeniu widocznej aktywności drgawkowej, w tak zwanej fazie latencji po podaniu pilokarpiny. Wyniki tego eksperymentu wskazują, że akumulacja kreatyny jest efektem trwałym. Co więcej, liczba inkluzji zarejestrowanych w okresie latencji jest znacząco większa w porównaniu do fazy ostrej. W przeciwieństwie do modelu pilokarpinowego, w modelu drgawek rozniecanych elektrycznie nie odnotowano występowania agregatów kreatynowych. Jednakże w preparatach pobranych od zwierząt z tej grupy zarejestrowano występowanie licznych inkluzji zawierających cholesterol, a ich liczba była skorelowana ze skumulowanym czasem trwania następczych drgawek tonicznych (w obszarze CA3) i klonicznych (w całym hipokampie). Dla modelu drgawek rozniecanych dowiedziono również występowania zmian drugorzędowej struktury protein oraz zmian strukturalnych lipidów w hipokampie, co zostało już poprzednio zaobserwowane dla pilokarpinowego modelu drgawek.

