
II. AUTOREFERAT

Autoreferat

1. Imię i Nazwisko: **Magdalena Szczerbowska-Boruchowska**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne

- magister inżynier fizyki technicznej w zakresie fizyki medycznej i dozymetrii;
1997, Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie

- doktor nauk fizycznych; 2003, Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie
Temat rozprawy doktorskiej: "Promieniowanie X w badaniach składu pierwiastkowego tkanki ośrodkowego układu nerwowego człowieka"; promotor: prof. dr hab. inż. Marek Lankosz

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/
artystycznych.

01.10. 2003 – 31.08.2004 asystent; Wydział Fizyki i Techniki Jądrowej,
Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie.

01.09.2004 – obecnie: adiunkt, Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej,
Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie.

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego: Cykl publikacji pt.
„**Rozwój metod jakościowego i ilościowego mikro-obrazowania chemicznego tkanek z zastosowaniem promieniowania X i ich wykorzystanie dla potrzeb neuropatologii**”.

b) Na ww. cykl publikacji składają się następujące artykuły naukowe:

H-1. **M. Szczerbowska-Boruchowska**. X-ray fluorescence spectrometry, an analytical tool in neurochemical research. *X-Ray Spectrometry*. 2008, 37, 21–31. (IF 1.390)

H-2. M. Z. Kastyak, **M. Szczerbowska-Boruchowska**, D. Adamek, B. Tomik, M. Lankosz, K. M. Gough. Pigmented creatine deposits in amyotrophic lateral sclerosis central nervous system tissues identified by synchrotron Fourier Transform Infrared microspectroscopy and X-ray fluorescence spectromicroscopy. *Neuroscience*. 2010, 166, 1119–1128. (IF 3.215)

H-3. **M. Szczerbowska-Boruchowska**, M. Lankosz, M. Czyzycki, D. Adamek. An integrated experimental and analytical approach to the chemical state imaging of iron in brain gliomas using X-ray absorption near edge structure spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 699, 153-160. (IF 4.555)

H-4. **M. Szczerbowska-Boruchowska**, M. Lankosz, D. Adamek. First step toward the “fingerprinting” of brain tumors based on synchrotron radiation X-ray fluorescence and multiple discriminant analysis. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2011, 6, 1217–1226 (IF 3.289)

H-5. **M. Szczerbowska-Boruchowska**, Z. Stegowski, M. Lankosz, M. Szpak, D. Adamek. A synchrotron radiation micro-X-ray absorption near edge structure study of sulfur

speciation in human brain tumors - a methodological approach – *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 2012, 27 (2), 239 - 247 (IF 3.220)

- H-6. **M. Szczerbowska-Boruchowska**. Sample thickness considerations for quantitative X-ray fluorescence analysis of the soft and skeletal tissues of the human body. *X-Ray Spectrometry* 2012, 41, 328-337; DOI 10.1002/xrs.2407 (IF 1.445)
- H-7. **M. Szczerbowska-Boruchowska**, A. Krygowska-Wajs, D. Adamek - Elemental micro-imaging and quantification of human substantia nigra using synchrotron radiation based X-ray fluorescence - in relation to Parkinson's disease. *Journal of Physics: Condensed Matter* 24 (2012) 244104 (11pp). (IF 2.546)
- H-8. **M. Szczerbowska-Boruchowska**, A. Krygowska-Wajs, A. Ziomber, P. Thor, P. Wrobel, M. Bukowczan, I. Zizak. The influence of electrical stimulation of vagus nerve on elemental composition of dopamine related brain structures in rats. *Neurochemistry International* 61 (2012) 156–165. (IF 2.857)

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie

Rentgenowska analiza fluorescencyjna (XRF) jest jedną z technik analitycznych, charakteryzujących się możliwością jakościowej i ilościowej analizy wielu pierwiastków równocześnie z zachowaniem wysokiej precyzji i dokładności. Na przestrzeni lat stosowane były / są różne formy wzbudzenia promienia charakterystycznego pierwiastków w materiale badawczym. Jednak współcześnie, nieporównywalne możliwości otwiera przed techniką XRF wykorzystanie, jako źródła fotonów wiązki wzbudzającej, promieniowania synchrotronowego (SR). Wśród głównych zalet stosowania tego typu wzbudzenia należy niewątpliwie wymienić polepszenie wykrywalności pierwiastków, poprawę przestrzennej zdolności rozdzielczej, skrócenie czasu analizy, możliwość dostosowania energii promieniowania wzbudzającego do potrzeb eksperymentu. Czynniki te sprawiły, że coraz częściej stosuje się rentgenowską (mikro)analizę fluorescencyjną dla potrzeb biologii i medycyny. W dziedzinach tych rośnie zapotrzebowanie na techniki analityczne, charakteryzujące się dobrą wykrywalnością m. in. pierwiastków śladowych i umożliwiające prowadzenie jakościowej i ilościowej analizy na poziomie komórkowym. Niejednokrotnie, ocena składu pierwiastkowego tkanek czy komórek jest niewystarczająca i wymagane jest dodatkowo oznaczenie formy chemicznej badanego pierwiastka. Zagadnienie to może być realizowane przy zastosowaniu spektroskopii absorpcyjnej promienia X w pobliżu krawędzi absorpcji (z ang. X-Ray Absorption Near Edge Structure Spectroscopy – XANES). Wykonanie analizy składu pierwiastkowego materiału biologicznego z wykorzystaniem rentgenowskiej analizy fluorescencyjnej, jak również badanie stopni utlenienia pierwiastków w oparciu o technikę XANES wymaga opracowania szeregu procedur, związanych z przygotowaniem materiału badawczego, zaplanowaniem warunków pomiarowych, opracowaniem jakościowym i ilościowym wyników badań. Specyfika materiału biologicznego, a zwłaszcza klinicznego pociąga za sobą również konieczność wspomaganie opracowywania wyników pomiarowych odpowiednimi metodami analizy statystycznej. Cykl artykułów naukowych, przedłożonych, jako podstawa mojego postępowania habilitacyjnego obejmuje szereg aspektów związanych z jakościową, topograficzną i ilościową analizą składu pierwiastkowego i stopni utlenienia pierwiastków, z wykorzystaniem technik odpowiednio XRF i XANES, w zastosowaniu do badań tkanki ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Zaproponowane w ww. publikacjach metody, wspomagające obrazowanie chemiczne tkanek mogą służyć, jako zbiór wskazówek / wytycznych, umożliwiających potencjalnemu badaczowi wykonanie kompleksowej analizy ilościowej

składu pierwiastkowego i stopni utlenienia pierwiastków w materiale biologicznym / klinicznym.

Wśród publikacji, przedłożonych jako podstawa mojego postępowania habilitacyjnego znajdują się artykuły naukowe, które oprócz aspektów metodologicznych przedstawiają konkretne wykorzystanie technik opartych na promieniowaniu X dla potrzeb neuropatologii. Zastosowanie tych niekonwencjonalnych technik w praktyce histopatologicznej ma dwa zasadnicze cele. Pierwszy z nich, to uzupełnienie badań nad patogenezą wybranych chorób neurologicznych (schorzenia neurodegeneracyjne, nowotwory mózgu) i ocena potencjalnego udziału pierwiastków chemicznych w procesach biochemicznych, towarzyszących zmianom patologicznym. Drugim zasadniczym celem prowadzonych prac jest możliwość wykorzystania rentgenowskiej mikroanalizy fluorescencyjnej w diagnostyce medycznej. Wiąże się to zarówno z poszukiwaniem markerów biochemicznych w schorzeniach neurologicznych jak również ze wspomaganiem rutynowej diagnostyki histopatologicznej. Istotnym czynnikiem badań histologicznych jest udział subiektywnej oceny histopatologa. Niejednokrotnie, w przypadkach wątpliwych i dyskusyjnych użytecznym byłoby włącznie do rozpoznania również dodatkowych metod analitycznych, w dużym stopniu eliminujących wątpliwości w postawieniu ostatecznej diagnozy. Jest to istotny czynnik w dalszym postępowaniu klinicznym i terapeutycznym. Przedstawione prace ukierunkowane były, zatem na ocenę możliwości wykorzystania techniki XRF w ujęciu mikroskopowym, do monitorowania zmian pierwiastkowych w tkankach zmienionych patologicznie a tym samym ocenę możliwości wykorzystania tej techniki analitycznej, jako narzędzia wspomagającego współczesną diagnostykę medyczną.

Wpływ fizycznych własności próbki na efekty oddziaływania promieniowania X z materią – skutki dla ilościowych oznaczeń w technice XRF

Własności fizyczne próbki, takie jak jej gęstość czy grubość odgrywają istotną rolę w oznaczeniach ilościowych składu pierwiastkowego przy wykorzystaniu rentgenowskiej analizy fluorescencyjnej. Jest to następstwem wpływu ww. własności na efekty oddziaływania promieniowania X z atomami badanego materiału. Istotny czynnik w tym zagadnieniu stanowi masa powierzchniowa próbki. Warunkuje ona odmienne podejście w analizie ilościowej w przypadku, gdy materiał badawczy stanowi dla analizowanych pierwiastków próbkę cienką, grubą czy też o tzw. pośredniej grubości. W celu uniknięcia nieprawidłowości i błędnych rezultatów, przed przystąpieniem do oznaczeń ilościowych, zachodzi więc bezwzględna konieczność oceny, z którą z ww. form próbki mamy do czynienia. W odniesieniu do materiału biologicznego dodatkowy problem, jaki się pojawia to obecność tzw. ciemnej matrycy, złożonej z pierwiastków H, C, N i O. Stanowią one dominujący składnik tkanek, istotnie wpływają na intensywność promieniowania charakterystycznego pierwiastków próbki, poprzez efekty absorpcji promieniowania pierwotnego i wtórnego, zaś natężenie ich własnego promieniowania charakterystycznego jest niewystarczające do zarejestrowania techniką XRF. Dodatkowym utrudnieniem jest fakt zmienności składu ciemnej matrycy w zależności od tkanki / narządu jak również zróżnicowana zawartość wody w tych strukturach. W związku z tym, w zastosowaniach biologiczno-medycznych różnorodność składu biochemicznego tkanek warunkuje konieczność przeprowadzenia stosowanych obliczeń z wykorzystaniem współczynników fundamentalnych (obejmujących przekroje czynne na oddziaływanie promieniowania X z materią i inne dane fizyczne, w sposób ścisły wiążące natężenie rejestrowanego promieniowania ze składem chemicznym próbki) indywidualnie dla każdego organu / tkanki. Mój oryginalny wkład w problematykę wpływu składu biochemicznego tkanek miękkich i kostnych na oddziaływanie promieniowania X z atomami próbki i związane z tym aspekty analizy ilościowej w technice XRF zostały przedstawione w pracy [H-6].

Współcześnie, materiał do analizy XRF przygotowany jest głównie w postaci jednej z następujących form:

- tkanka zliofilizowana, po homogenizacji prasowana w pastylki – przeznaczona głównie do analizy w skali makroskopowej;
- tkanka zamrożona, cięta na skrawki i suszona w niskiej temperaturze – forma dedykowana głównie analizie w skali mikroskopowej;
- tkanka zamrożona i mierzona w swojej naturalnej postaci w niskiej temperaturze – wykorzystywana zarówno w badaniach w skali makro- jak i mikroskopowej.

Z uwagi na taką różnorodność form próbek stosowanych w preparatyce materiału biologicznego, szczególny nacisk w pracy [H-6] został położony na wyznaczenie mas powierzchniowych, przy jakich dana próbka może być traktowana, jako cienka, gruba lub o pośredniej grubości w zależności od typu tkanki, rodzaju próbki (wysuszona lub w naturalnej postaci) i pierwiastków poddanych analizie. Jest to niezbędne, aby zastosować odpowiednią metodę korekcji w analizie ilościowej. W obliczeniach wykorzystano dane publikowane (głównie stosowane dla potrzeb ochrony radiologicznej), dotyczące zawartości C, H, O, N i wody w różnych tkankach / narządach organizmu człowieka. Ze względu na przeprowadzenie analiz i zestawienie ich wyników dla głównych narządów i tkanek organizmu ludzkiego takich jak: mózg (z rozróżnieniem na istotę białą i szarą), serce, wątroba, nerki, płuca, macica, jajniki, jądra, prostata, pęcherz moczowy, tkanka łączna piersi, mięśnie szkieletowe, skóra, kości (część zbita), zęby, praca może być wykorzystywana przez szerokie grono potencjalnych badaczy, stosujących technikę XRF dla potrzeb medycyny. Dla każdego rodzaju próbek (cienkiej, grubej i o pośredniej grubości) została zaproponowana relatywnie prosta metoda pozwalająca na wykonanie analizy ilościowej, w oparciu o metodę wzorca zewnętrznego. Jak wiadomo, w przypadku, gdy masa powierzchniowa próbki nie przekracza wartości krytycznej, przy której próbka może być traktowana, jako cienka, zarejestrowana liczba zliczeń promieniowania fluorescencyjnego danego pierwiastka zależy liniowo od napromienionej masy powierzchniowej pierwiastka w próbce jak również od wydajności fluorescencji (przy danej energii wzbudzenia). Zatem, współczynniki wydajności dla poszczególnych pierwiastków chemicznych mogą być wyznaczone eksperymentalnie w oparciu o pomiar materiałów wzorcowych w postaci próbki cienkiej. Ostatecznie, masa powierzchniowa (lub udział wagowy) pierwiastka w próbce nieznaną może być obliczona z prostej zależności, wyrażonej stosunkiem znormalizowanej liczby zliczeń danego pierwiastka w widmie XRF do współczynnika wydajności fluorescencji dla oznaczanego pierwiastka, wyznaczonego w pomiarze materiału wzorcowego. Wszystkie procedury obliczeniowe oraz ich podstawy teoretyczne zostały szczegółowo przedstawione w pracy [H-6].

W praktyce jednak, materiał poddany badaniom nie zawsze spełnia kryterium próbki cienkiej dla wszystkich oznaczanych pierwiastków. Niejednokrotnie, materiał badawczy stanowi próbkę o pośredniej grubości lub nawet próbkę grubą. W pracy [H-6] zaproponowane zostały metody obliczeniowe, umożliwiające wykonanie analizy ilościowej dla obydwu ww. form próbek. Obejmują one stosowanie odpowiednich „poprawek” fluorescencyjnych, umożliwiających implementację ww. prostej metody analizy ilościowej z zastosowaniem cienkich materiałów wzorcowych do oznaczeń ilościowych techniką XRF w przypadku próbki o pośredniej grubości i próbki grubej. Poprawność i użyteczność zaproponowanych w pracy metod obliczeniowych zweryfikowano eksperymentalnie. W tym celu wykorzystywałam wyniki analizy XRF wybranych tkanek, którą wykonywałam w ramach swojej pracy doktorskiej. Miało to na celu ocenę użyteczności dla potrzeb techniki XRF danych publikowanych, dotyczących zawartości pierwiastków głównych tj. H, C, N, O oraz wody w poszczególnych narządach organizmu człowieka. Ponadto, weryfikacja eksperymentalna była niezbędna do oceny dokładności i przydatności proponowanych w pracy [H-6] metod analizy ilościowej różnych form próbek materiału biologicznego. W badaniach posłużono się próbkami liofilizowanej tkanki istoty białej i szarej mózgu oraz materiałem referencyjnym NIST SRM 1577b (wątroba wołowa). W oparciu o wykonane obliczenia teoretyczne stwierdzono, że próbki, w postaci pastylek, stanowiły dla pierwiastków takich jak Fe, Cu, Zn, Br, Rb i Sr próbkę o pośredniej grubości, natomiast dla K i Ca spełniały

kryterium próbki grubej. W pomiarach wykorzystano rentgenowski spektrometr fluorescencyjny z dyspersją energii (EDXRF) z anodą Mo oraz molibdenową tarczą wtórną. Kalibracja spektrometryczna wykonana została w oparciu o cienkie wzorce jedno- i wielopierwiastkowe o znanych masach powierzchniowych pierwiastków. Rezultaty pomiarów próbek posłużyły do dalszej analizy ilościowej, wykonanej w oparciu o zaproponowane w pracy [H-6] metody obliczeniowe, uwzględniające odpowiednie „poprawki” fluorescencyjne i skład lekkiej matrycy zgodny z danymi literaturowymi. Wyniki zostały porównane z rezultatami obliczeń składu pierwiastkowego badanych tkanek, w których wykorzystano metodę współczynników fundamentalnych i skład lekkiej matrycy, oszacowany na podstawie stosunku koherentnego i niekoherentnego rozproszenia promieniowania pierwotnego. Dodatkowo, wyniki analizy ilościowej XRF porównano z rezultatami oznaczeń składu pierwiastkowego tych samych próbek tkanek mózgu, uzyskanymi przy wykorzystaniu techniki PIXE (z ang. Particle Induced X-ray Emission). Zarówno w przypadku pierwiastków, dla których materiał badawczy stanowił próbkę grubą jak i dla tych, dla których należało zastosować podejście typowe dla próbki o pośredniej grubości uzyskano wysoką zgodność rezultatów. Jedynie w przypadku Fe, oznaczanego w próbkach istoty białej mózgu stwierdzono rozbieżność pomiędzy wynikami analizy „teoretycznej” i eksperymentalnej, nieprzekraczającą jednak 15%. Eksperymentalna walidacja procedur, opisanych w pracy [H-6] potwierdza wysoką dokładność a tym samym użyteczność zaproponowanego podejścia w analizie ilościowej materiału biologicznego techniką XRF (z uwzględnieniem metod mikroanalizy).

W pracy [H-6] pokazano również, jak duży błąd w wyniki analizy ilościowej różnych typów tkanek / narządów może wnosić pomijanie ww. „poprawek” fluorescencyjnych, tam gdzie powinny być one stosowane. Potwierdza to konieczność weryfikacji, przed przystąpieniem do oznaczeń ilościowych, czy materiał badawczy, przeznaczony do analizy stanowi próbkę cieką, grubą czy też o pośredniej grubości.

Próbki tkanek mózgu i nowotworów mózgu, stosowane w pracach [H-2, H-4, H-7, H-8] dla pierwiastków istotnych z punktu widzenia prowadzonych badań spełniały kryterium próbki cienkiej, dlatego takie podejście zostało zastosowane w analizie ilościowej. W ujęciu teoretycznym stosowane próbki dla P i S powinny być traktowane jak próbki o pośredniej grubości. Jednak, ze względu na relatywnie mały błąd (< 10 %), jaki wnosi wyznaczenie zawartości tych pierwiastków stosując metodę, odpowiednią dla próbki cienkiej nie stosowano obliczeń wskazanych dla próbek o pośredniej grubości. Związane jest to również z faktem, że w przypadku badań prowadzonych skali mikroskopowej tak jak w pracach [H-2, H-4, H-7, H-8] należy liczyć się z lokalnym zróżnicowaniem masy powierzchniowej próbek, związanym m. in. z różnicami gęstości tkanki i stopnia jej uwodnienia.

Nowe materiały wzorcowe dedykowane do analizy ilościowej XRF tkanek miękkich metodą wzorca zewnętrznego

Jednym z problemów, jaki towarzyszy pierwiastkowej analizie ilościowej tkanek przy wykorzystaniu rentgenowskiej mikroanalizy fluorescencyjnej jest dobór odpowiednich materiałów wzorcowych. Typowa grubość próbek tkanek wykorzystywana w tej technice wynosi kilka mikrometrów, dlatego stosowane jest podejście typowe dla próbek cienkich. Należy wspomnieć, że efekty samoabsorpcji promieniowania X zarówno pierwotnego jak i wtórnego są zaniedbywane małe i mogą być pominięte w takim podejściu. Szczegółowe obliczenia, dotyczące absorpcji linii $K\alpha$ promieniowania charakterystycznego Fe oraz S w cienkich skrawkach tkanki mózgu zostały zamieszczone w pracach [H-3 i H-5]. Niezwykle ważną cechą, jaką muszą charakteryzować się materiały wzorcowe przeznaczone do analizy pierwiastkowej w skali mikroskopowej jest wysoki stopień jednorodności. Materiały referencyjne np. NIST SRM 1832, NIST SRM 1833, czy próbki kalibracyjne do techniki XRF np. firmy MICROMATTER™ umożliwiają oznaczenie mas powierzchniowych pierwiastków. Materiały referencyjne pochodzenia biologicznego o certyfikowanych udziałach wagowych

pierwiastków dostępne są głównie w postaci liofilizowanego proszku. Dlatego, ze względu na dużą niejednorodność takiego materiału nie są odpowiednie do badań na poziomie mikroskopowym. W pracach [H-7 i H-8] zaprezentowano wyniki badań składu pierwiastkowego cienkich skrawków mózgu z wykorzystaniem opracowanych przeze mnie nowych materiałów wzorcowych. Próbkki wzorcowe, w postaci cienkich filmów o znanych udziałach wagowych pierwiastków przygotowane zostały w taki sposób, aby ich struktura w jak największym stopniu była zbliżona do materiału badawczego (skrawków tkanki). W tym celu azotany wybranych pierwiastków (Cl, K, Sc, Ti, Mn, Fe, Cu, Zn, Se, Rb, Sr i Y) zostały rozpuszczone w medium, stosowanym do zamrażania tkanki np. podczas cięcia na kriomikrotomie (z ang. Tissue Freezing Medium, Jung Leica). W celu uzyskania cienkiej, gładkiej i jednorodnej powierzchni próbki wzorcowej, mieszaninę zamrażano w temperaturze $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ i cięto na skrawki o takiej samej grubości, jaką stosowano w preparatyce próbek tkanki. Podobnie jak w przypadku próbek tkanki materiały wzorcowe poddano suszeniu w niskiej temperaturze. Dokładny skład pierwiastkowy i procedura preparatyki nowego rodzaju wzorców zostały zamieszczone w pracy [H-7]. W celu oceny przydatności tak opracowanych materiałów wzorcowych dla potrzeb rentgenowskiej mikroanalizy fluorescencyjnej zbadano jednorodność przygotowanych próbek wzorcowych przy wykorzystaniu techniki synchrotronowej rentgenowskiej mikroanalizy fluorescencyjnej (SRXRF). Pomiary prowadzone z zastosowaniem wiązki SR o średnicy $10\text{ }\mu\text{m}$ w 100 różnych punktach próbki dla każdego wzorca wykazały bardzo wysoki stopień jednorodności (nie mniejszy niż 97% dla wszystkich analizowanych pierwiastków) a tym samym użyteczność w badaniach z wykorzystaniem rentgenowskiej mikroanalizy fluorescencyjnej. Ze względu na brak materiałów pochodzenia tkankowego w postaci cienkich skrawków o certyfikowanych zawartościach pierwiastków nie ma możliwości precyzyjnej oceny dokładności wyników analizy ilościowej prowadzonej przy wykorzystaniu nowo opracowanych materiałów wzorcowych. Udziały pierwiastkowe wyznaczone w istocie czarnej mózgu i zaprezentowane w pracy [H-7] wykazują jednak dużą zgodność z wynikami analiz pierwiastkowych tkanek mózgu, zamieszczanymi w literaturze. Na tej podstawie można wnioskować również o dobrej dokładności wyników analiz, prowadzonych z wykorzystaniem opracowanych materiałów wzorcowych.

Przykłady zastosowań rentgenowskiej mikroanalizy fluorescencyjnej dla potrzeb neuropatologii

Szereg aspektów metodologicznych rentgenowskiej mikroanalizy fluorescencyjnej, poruszanych w pracach [H-2 - H-5, H-7, H-8], wiązał się zawsze z konkretnymi zastosowaniami tej techniki dla potrzeb neurobiologii czy neuroonkologii. Potrzeba poznania procesów biochemicznych zachodzących na poziomie tkankowym czy komórkowym pociąga za sobą konieczność wspomaganie rutynowych metod diagnostycznych, również metodami niekonwencjonalnymi, np. wykorzystującymi techniki współczesnej fizyki.

Zapoczątkowane w ramach mojej pracy doktorskiej badania nad dwoma ważnymi schorzeniami neurodegeneracyjnymi tj. chorobą Parkinsona (ChP) i stwardnieniem zanikowym bocznym (SLA) kontynuowałam również w późniejszym okresie mojej działalności naukowej. Wybrane aspekty tego nurtu badań zostały przedstawione w pracach [H-2, H-7, H-8]. Ponadto, kilka publikacji, których jestem współautorem a dotyczących wspomnianej tematyki nie zostało włączone do cyklu prac stanowiących podstawę mojego postępowania habilitacyjnego. Praca [H-2] poświęcona jest badaniom złogów kreatyny w ośrodkowym układzie nerwowym człowieka w odniesieniu do SLA. Przedstawia ona możliwość wykorzystania rentgenowskiej mikroanalizy fluorescencyjnej, jako techniki pozwalającej na wzbogacenie informacji o składzie biochemicznym struktur występujących w tkankach układu nerwowego. Obrazowanie składu biochemicznego złogów, obserwowanych w skrawkach tkanek zostało wykonane przy wykorzystaniu synchrotronowej mikrospektroskopii w podczerwieni (SRFTIR) oraz rentgenowskiej mikroanalizy fluorescencyjnej również z zastosowaniem promieniowania synchrotronowego. Niezwykle

cennym dla potrzeb zastosowań nie tylko biologicznych czy medycznych jest możliwość realizacji pomiarów tego samego materiału badawczego technikami dostarczającymi komplementarnych informacji. Dlatego w swoich badaniach oprócz technik, pozwalających na badanie składu pierwiastkowego czy form chemicznych pierwiastków w tkankach, wykorzystuję również mikrospektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera dostarczającą m. in. informacji o grupach funkcyjnych molekuł biologicznych. Realizacja badań przy wykorzystaniu techniki SRXRF i SRFTIR na dokładnie tym samym materiale wymaga m. in., aby sporządzone próbki były odpowiednie do badań każdą z technik. Niezbędne jest więc stosowanie podkładek na próbki, które będą transparentne (lub odbijające) dla promieniowania podczerwonego a jednocześnie będą spełniać warunki pozwalające na realizację pomiarów techniką SRXRF. Drugą ważną cechą, na którą należy zwrócić uwagę w takich badaniach to grubość próbki, która musi spełniać wymagania obu technik badawczych. W technice mikrospektroskopii w podczerwieni grubość próbki jest jednym z krytycznych parametrów decydujących o sukcesie / porażce takiej analizy. Zgromadzenie materiału badawczego jak i opracowanie odpowiedniej metody jego preparatyki do badań technikami SRXRF i SRFTIR było częścią mojego osobistego wkładu w pracę [H-2]. O użyteczności wyników analiz wykonanych obydwoma technikami decyduje również precyzja w lokalizacji badanych obszarów próbek. Badania depozytów kreatyny z wykorzystaniem techniki SRFTIR (zapoczątkowane przeze mnie jeszcze przed realizacją prac opisanych w publikacji [H-2]) jednoznacznie potwierdziły obecność tego związku w brunatnych złogach, obserwowanych w skrawkach tkanek mózgu dla przypadków SLA. Zastosowanie techniki SRXRF miało na celu stwierdzenie czy kreatyna w obserwowanych złogach występuje w połączeniu z metalami czy też innymi pierwiastkami chemicznymi. Należy zwrócić uwagę na obecność brunatnego zabarwienia, które nie jest typowe dla kreatyny. Zastosowanie techniki SRXRF, pozwoliło na precyzyjne obrazowanie obszarów zawierających depozyty kreatyny. Szczegółowa analiza topograficzna i ilościowa przy wykorzystaniu techniki SRXRF, która również jest moim udziałem w pracy [H-2] nie wykazała zwiększonej akumulacji w obrębie złogów kreatyny żadnego z pierwiastków oznaczanych tą techniką, zwłaszcza Fe. Wyklucza to związek brunatnego zabarwienia z obecnością neuromelaniny czy erytrocytów i potwierdza udział jedynie komponentów organicznych.

Jako kontynuacja dotychczasowych prac nad rolą pierwiastków śladowych w chorobie Parkinsona realizowałam badania neuronów dopaminergicznych istoty czarnej i ich otocznia przy wykorzystaniu synchrotronowej rentgenowskiej mikroanalizy fluorescencyjnej [H-7]. Analiza wykonana była dla czterech mózgów osób zmarłych z ChP jak również czterech przypadków kontrolnych. Technika SRXRF umożliwiła oznaczenie topografii i zawartości P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br i Rb w cienkich skrawkach pobranych z istoty czarnej. Warunki pomiarowe dostosowano w ten sposób, aby umożliwić obrazowanie składu pierwiastkowego na poziomie komórkowym. Analiza ilościowa, jak wspomniano uprzednio, zrealizowana została przy wykorzystaniu metody wzorca zewnętrznego z użyciem specjalnie opracowanych materiałów wzorcowych. Pozwoliło to na poznanie zawartości pierwiastków w ciałach komórek nerwowych jak i w ich otoczeniu. Wyniki badań poddano szczegółowej analizie statystycznej, obejmującej oprócz testu porównań badanych grup również wielowymiarowe techniki eksploracyjne, tj. analizę dyskryminacyjną i analizę skupień. Rezultaty analizy pokazały, że w ciałach neuronów istoty czarnej zawartość S, Cl, Ca, Fe i Zn są istotnie wyższe w przypadku ChP w porównaniu z grupą kontrolną. Analiza dyskryminacyjna również wskazała Cl, Fe, Ca i Zn jako pierwiastki w największym stopniu różnicujące neurony dopaminergiczne badanych grup. Zwiększenie liczebności grupy, reprezentującej chorobę Parkinsona potwierdziło nasze wstępne obserwacje na temat różnic pierwiastkowych w ChP, równocześnie wykazując zgodność z istniejącymi hipotezami o udziale ww. pierwiastków w procesach patologicznych, towarzyszących chorobie Parkinsona. Analiza skupień przeprowadzona na podstawie całkowitego składu pierwiastkowego wyraźnie pogrupowała przypadki pochodzące z grupy kontrolnej i te reprezentujące ChP do dwóch oddzielnych skupień. Dotyczyło to zarówno perykarionów jak

i ich otoczenia. Uzyskany rezultat również świadczy o obecności zmian pierwiastkowych w istocie czarnej mózgu, towarzyszących temu schorzeniu neurodegeneracyjnemu.

Jeden z przykładów wykorzystania technik współczesnej fizyki dla potrzeb neurobiologii, w którym moim oryginalnym wkładem jest zaprojektowanie i realizacja eksperymentu pozwalającego na poznanie zmian pierwiastkowych w strukturach dopaminozależnych mózgu szczurów, dotyczy bezpośrednio badań nad wczesnym stadium choroby Parkinsona. Objawy kliniczne tego schorzenia neurodegeneracyjnego pojawiają się relatywnie późno, dlatego wiedza na temat wczesnego etapu tej choroby jest niewystarczająca do podjęcia odpowiedniej terapii czy działania o charakterze neuroprotektynym. Zachodzi więc konieczność zgłębienia stanu wiedzy na temat procesów biochemicznych towarzyszących początkom rozwoju ChP. Stwierdzono, że grzbietowe jądro ruchowe nerwu błędnego jest jednym z obszarów mózgu, w którym najwcześniej stwierdza się patologie alfa-synukleiny i ciał Lewiego. Ponadto, liczne prace literaturowe jak również rezultaty badań własnych (np. zaprezentowane w pracy [H-7]) wskazują na udział pierwiastków chemicznych w procesach neurodegeneracyjnych w ChP. Dlatego też eksperyment realizowany przy współpracy z jednostkami Wydziału Lekarskiego UJ (Klinika Neurologii, Katedra Patofizjologii, Klinika Neurochirurgii) miał na celu odpowiedź na pytanie czy dysfunkcja nerwu błędnego powoduje zmiany biochemiczne (z uwzględnieniem metabolizmu dopaminy, serotoniny oraz składu pierwiastkowego) w strukturach dopaminozależnych mózgu szczurów. Jak wspomniano, zakres prac związany z oznaczeniem składu pierwiastkowego w mikroobszarach próbek mózgu zwierząt doświadczalnych był moim autorskim wkładem w tą tematykę. Należy zaznaczyć, że rozmiary badanych struktur mózgu (badania składu pierwiastkowego wykonano w obszarach kory ruchowej, prążkowiu, jądrze półleżącym, istocie czarnej, brzusznej części nakrywki śródmózgowia oraz w jądrze grzbietowym ruchowym nerwu błędnego), jak również ich morfologia wymagają stosowania techniki analitycznej, pozwalającej na prowadzenie badań w skali mikroskopowej na skrawkach stanowiących przekroje poprzeczne mózgu. W związku z tym, jako technikę badawczą zastosowano rentgenowską analizę fluorescencyjną ze wzbudzeniem wiązką promieniowania synchrotronowego. Dodatkowym, utrudnieniem w tego typu badaniach jest konieczność pracy na materiale niebarwionym (ze względu na możliwość modyfikacji składu pierwiastkowego w trakcie preparatyki próbek), w przypadku którego sąsiadujące struktury mózgu nie są od siebie wyraźnie odseparowane. Wymaga to, nabycia względnie trudnej umiejętności identyfikacji struktur anatomicznych mózgu w tego rodzaju próbkach, a następnie wykorzystania jej na linii pomiarowej, gdzie typowo nie dysponuje się metodami, wspomagającymi obrazowanie w mikroskopii świetlnej (np. kontrastem fazowym). Zastosowanie techniki SRXRF pozwoliło na poznanie dystrybucji i udziałów wagowych szeregu pierwiastków w badanych obszarach mózgu. W oparciu o wyniki oznaczeń ilościowych przeprowadzono odpowiednie analizy statystyczne. Miały one na celu weryfikację i ocenę istotności zmian pierwiastkowych stwierdzonych w strukturach układu dopaminergicznego, jako efekt dysfunkcji nerwu błędnego zwierząt doświadczalnych. Zarówno test U Mann'a-Whitney'a jak i analiza skupień wskazały jednoznacznie na zmiany składu pierwiastkowego w prążkowiu, wywołane procesem elektrostymulacji lewego nerwu błędnego. Ponadto, istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi grupami zwierząt stwierdzono dla Ca, Zn i Rb w istocie czarnej prawej półkuli. Biorąc pod uwagę fakt, że jako efekt dysfunkcji nerwu błędnego zaobserwowano również hamowanie układu dopaminergicznego (nie zaś serotoninergicznego), co jest typowe dla choroby Parkinsona, można stwierdzić, że udział pierwiastków w procesach patologicznych wczesnego stadium tego schorzenia jest wysoce prawdopodobny. Szereg potencjalnych procesów, za pośrednictwem których pierwiastki, wykazujące anomalie mogą uczestniczyć w przemianach biochemicznych towarzyszących chorobie Parkinsona został szczegółowo przedstawiony w pracy [H-8]. Uzyskane rezultaty pokazują unikatową użyteczność techniki SRXRF do zagadnień, w których konieczne jest zastosowanie metody analitycznej charakteryzującej się przestrzenną zdolnością rozdzielczą rzędu pojedynczych mikrometrów przy zachowaniu wykrywalności pierwiastków śladowych na poziomie mg/kg i niższym.

Udział pierwiastków chemicznych w licznych procesach patologicznych sugeruje, że mogą one również uczestniczyć pośrednio bądź bezpośrednio w procesach nowotworzenia. Różnorodność typów glejowych nowotworów mózgu (glejaków) nasuwa pytanie, czy zróżnicowanie morfologiczne tego rodzaju nowotworów wiąże się ze swoistym, unikatowym składem pierwiastkowym poszczególnych typów tkanek nowotworowych. Co więcej, rutynowe badania diagnostyczne niejednokrotnie pozostawiają wątpliwości odnośnie poprawnej klasyfikacji danego przypadku. Dlatego też, wskazane jest stosowanie technik, wspomagających współczesną diagnostykę medyczną. W ramach możliwości aplikacyjnych rentgenowskiej mikroanalizy fluorescencyjnej podjęto próbę odpowiedzi na pytanie odnośnie swoistości składu pierwiastkowego glejowych nowotworów mózgu jak również opracowano model pozwalający na klasyfikację glejaków w oparciu o skład pierwiastkowy tkanki nowotworowej [H-4]. Synchrononowa rentgenowska mikroanaliza fluorescencyjna posłużyła do stworzenia charakterystyki pierwiastkowej 7 typów nowotworów mózgu (6 pochodzenia glejowego, 1 oponiaka) oraz obszaru otaczającego nowotwór, nieobjętego naciekiem. Ze względu na fakt, że technika SRXRF dostarcza informacji równocześnie o wielu pierwiastkach warto tą informację niejako „w całości” poddać dalszej analizie. Dlatego użyteczne w tym celu są wielowymiarowe analizy statystyczne. W pracy [H-4] wykorzystano analizę dyskryminacyjną, aby z pośród szeregu oznaczanych pierwiastków wyłonić te, które najbardziej różnicują badane typy nowotworów mózgu. Ponadto, metoda ta została zastosowana do stworzenia klasyfikatora nowotworów mózgu mogącego wspomagać rutynowe badania histopatologiczne w kontrowersyjnych, niejasnych przypadkach. Stwierdzono, że S, Cl, Cu, Fe, K, Br i Zn w największym stopniu różnicują nowotwory mózgu, poddane analizie. Badania pokazały, że opracowany model funkcji dyskryminacyjnych pozwala na jednoznaczne rozdzielanie grup przynależnych do różnych typów nowotworów mózgu i grupy kontrolnej. Ponadto, sprawdzone zostały możliwości wykorzystania opracowanego modelu do celów klasyfikacyjnych. Stwierdzono blisko 100 % zgodność klasyfikacji przypadków z diagnozą histopatologiczną, dla próbek wykorzystanych w budowie modelu. Dla 10 nowych przypadków poddanych klasyfikacji w oparciu o opracowany model zgodność z rozpoznaniem histopatologicznym wyniosła ponad 87 %. Rezultaty opisane w pracy [H-4] wyraźnie wskazują, na użyteczność rentgenowskiej mikroanalizy fluorescencyjnej w obrazowaniu składu pierwiastkowego nowotworów mózgu. Jak pokazano, przydatność ta może być istotnie podniesiona poprzez stosowanie odpowiednich metod analizy statystycznej. Należy dodać, że ze względu na wymaganą rozdzielczość przestrzenną analizy, wynoszącą ok. 20 ÷ 30 μm badania takie mogą być realizowane w warunkach laboratoryjnych, niewymagających źródła synchrononowego. Poszerza to istotnie możliwości aplikacyjne tego rodzaju badań dla potrzeb różnicowania / klasyfikacji tkanek nowotworowych.

Jestem ponadto, autorką artykułu naukowego o charakterze przeglądowym [H-1], popularyzującym wykorzystanie rentgenowskiej analizy fluorescencyjnej, techniki XANES jak i innych metod analitycznych współczesnej fizyki w badaniach tkanki ośrodkowego układu nerwowego. Publikacja, zawiera zarówno przegląd prac z dziedziny neurochemii, realizowanych przez innych badaczy, jak również wyniki moich własnych badań, również tych, które nie zostały ujęte w cyklu artykułów stanowiących podstawę mojego postępowania habilitacyjnego. Dotyczy to głównie wykorzystania synchrononowej rentgenowskiej mikroanalizy fluorescencyjnej do badań składu pierwiastkowego mózgu i rdzenia kręgowego w odniesieniu do stwardnienia zanikowego bocznego, wstępnej fazy prac nad chorobą Parkinsona, jak również badań próbek mózgu człowieka w skali makroskopowej z wykorzystaniem techniki EDXRF i PIXE.

Metodologia badań form chemicznych S i Fe w tkankach z zastosowaniem spektroskopii absorpcji promieniowania X w pobliżu krawędzi absorpcji

Jak wskazują wyniki badań zaprezentowane w pracy [H-4], wśród pierwiastków o największym znaczeniu dla różnicowania typów nowotworów mózgu znajdują się siarka

i żelazo. Jak wiadomo, w procesach zarówno fizjologicznych jak i patologicznych uczestniczyć mogą tylko wybrane formy chemiczne pierwiastków. Do pełniejszego poznania mechanizmów biochemicznych, zachodzących w tkankach, istotnym jest zatem oprócz oznaczeń całkowitej zawartości danego pierwiastka w badanym materiale poznanie również jego formy chemicznej. Ze względu na zróżnicowanie morfologiczne tkanek niezbędne jest wykorzystanie techniki badawczej pozwalającej na ocenę stopni utlenienia pierwiastków na poziomie mikroskopowym. Do technik najczęściej stosowanych do oceny form chemicznych pierwiastków należy spektroskopia absorpcji promieniowania X w pobliżu krawędzi absorpcji. Podobnie jak w przypadku rentgenowskiej mikroanalizy fluorescencyjnej, wykorzystanie techniki XANES w badaniach materiałów biologicznych pociąga za sobą konieczność opracowania odpowiednich procedur, pozwalających na obrazowanie i ilościowe oznaczenie form chemicznych pierwiastków w skrawkach tkanek.

W pracy [H-5] przedstawione zostały eksperymentalne i metodologiczne aspekty związane z obrazowaniem stopni utlenienia siarki w tkankach nowotworów mózgu przy wykorzystaniu techniki XANES. Pomiary realizowano metodą fluorescencyjną, wykorzystując proporcjonalność masowego współczynnika absorpcji do natężenia linii $K\alpha$ promieniowania charakterystycznego siarki. Badanie pełnych widm XANES siarki przeprowadzono w obrębie komórek nowotworowych, na ich obrzeżu oraz w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. W celu oceny dominujących form chemicznych S w badanych strukturach tkanek, analizie poddano również materiały referencyjne, stanowiące organiczne i nieorganiczne związki siarki. Wyniki pomiarów materiałów referencyjnych zostały dodatkowo wykorzystane do opracowania bazy danych widm XANES siarki na linii pomiarowej ID 21 / ESRF (European Synchrotron Radiation Facility). Analiza porównawcza widm XANES S zmierzonych w tkankach i dla materiałów referencyjnych realizowana była poprzez wyznaczenie energii dla maksimum białej linii. Ze względu jednak na fakt, że wartość ta może ulegać zmianie w zależności od otoczenia chemicznego absorbującego atomu (tu: siarki) zastosowano również podejście bazujące na metodzie pierwszego punktu przegięcia krawędzi głównej. Obydwie metody wykazały dominującą zawartość siarki na -2 stopniu utlenienia w analizowanych lokalnych strukturach tkanki nowotworowej. Stwierdzono jednak, różnice w kształtach widm XANES, zmierzonych w różnych obszarach tkanki. W szczególności, widma pochodzące z obrębu komórek nowotworowych wykazały największą złożoność, co świadczy o udziale różnych form siarki w tym obszarze. Ponadto, widma te cechuje również obecność pików przedkrawędziowych. Własność ta jest typowa dla metali przejściowych jak również pierwiastków połączonych wiązaniem kowalencyjnym absorbujących przy niskich energiach. W przypadku pomiarów XANES przy krawędzi K siarki obecność pików przedkrawędziowych może wiązać się ze wzbudzeniem elektronów 1s do nieobsadzonych orbitali walencyjnych, tworzonych przez oddziaływanie orbitali d metali przejściowych z formalnie wypełnionymi orbitalami 3p siarki. W badaniach tkanek obecność pików przedkrawędziowych może zatem odzwierciedlać obecność klastrow Fe-S białek. Widma XANES siarki zmierzone w obszarach poza komórkami nowotworowymi, wykazały dość wąski pik przy krawędzi głównej, co sugeruje obecność tylko jednej formy chemicznej siarki.

Do uzyskania pełniejszego obrazu dystrybucji siarki na określonym stopniu utlenienia w większych obszarach tkanek, w pracy [H-5] po raz pierwszy wykonano selektywne, dwuwymiarowe obrazowanie form chemicznych siarki w skrawkach tkanek nowotworowych. W zaproponowanym przeze mnie podejściu eksperymentalnym wykorzystano zależność różnic wydajności fluorescencji dla różnych stopni utlenienia siarki przy określonej energii wzbudzenia. Jest to bezpośrednio związane z faktem, że prawdopodobieństwo wzbudzenia siarki na wyższym stopniu utlenienia wzrasta ze wzrostem energii wiązki wzbudzającej. Podstawy fizyczne tego efektu również zostały omówione w pracy [H-5]. Na podstawie pomiaru materiałów referencyjnych wyznaczono wartości energii promieniowania pierwotnego, pozwalające na selektywne wzbudzanie siarki na określonym stopniu utlenienia tj. -2, +4, +6. Jak wiadomo, zastosowanie energii odpowiedniej do wzbudzenia siarki na jednym z wyższych stopni utlenienia powoduje równoczesne wzbudzanie form bardziej zredukowanych. Dlatego, w celu zobrazowania dystrybucji wyłącznie jednej formy

chemicznej siarki (S^{4+} lub S^{6+}) konieczne jest każdorazowe odejmowanie udziałów form siarki na niższym stopniu utlenienia. Z tą procedurą wiążą się dwa ważne aspekty analityczne. Pierwszy z nich obejmuje wyznaczenie wartości współczynników natężenia promieniowania fluorescencyjnego dla siarki na danym stopniu utlenienia w zależności od stosowanej energii promieniowania wzbudzającego. Współczynniki te zostały wyznaczone w oparciu o zmierzone uprzednio widma XANES siarki dla wybranych materiałów referencyjnych. Drugi aspekt, dotyczący tworzenia map różnicowych form chemicznych siarki wiąże się ze zmianą pozycji wiązki promieniowania synchrotronowego na powierzchni próbki przy zmianie energii wiązki. Efekt taki jest typowy w przypadku stosowania strefowych soczewek Fresnel'a jako elementu ogniskującego, tak jak w eksperymencie, opisanym w pracy [H-5]. Jednak, pomimo stosowania w trakcie realizacji pomiarów procedur zapobiegających temu efektowi, mapy dystrybucji siarki, uzyskane przy różnych energiach wzbudzenia wykazywały obecność względnego przemieszczenia. Co więcej, po szczegółowych analizach otrzymanych obrazów, stwierdzono, że zaobserwowany efekt wskazuje na obecność nie tylko translacji w płaszczyźnie XY, ale również zmiany kąta pomiędzy płaszczyzną próbki a kierunkiem wiązki promieniowania wzbudzającego. Choć przyczyna takiego efektu nie została poznana, w pracy [H-5] opracowano odpowiedni algorytm, umożliwiający poprawne wyznaczanie map różnicowych dystrybucji form chemicznych siarki.

Należy wspomnieć, że zastosowana w pracy metoda pomiarowa polegająca na skanowaniu próbki w płaszczyźnie XY, przy rozmiarze wiązki wzbudzającej wynoszącym 0.5 μm i relatywnie krótkim czasie pomiaru pojedynczego punktu (0.5 s) w dużym stopniu minimalizuje uszkodzenia radiacyjne, wywoływane przez promieniowanie synchrotronowe w materiale biologicznym. Zaobserwowana w badaniach obecność wszystkich trzech form siarki (S^{2-} , S^{4+} , S^{6+}) jest cenną informacją w odniesieniu do istniejącej kontrowersji na temat wpływu preparatyki i przechowywania próbek, czy też promieniowania synchrotronowego na zmianę stopni utlenienia analizowanych pierwiastków w tkankach.

Ważną obserwacją od strony medycznej, jaką stwierdzono w oparciu o przeprowadzone badania jest silna akumulacja siarki sulfanowej (S^{2-}) w komórkach nowotworowych, gdzie poziom tej formy siarki jest ok. dziesięciokrotnie wyższy w porównaniu z tkanką otaczającą. Zaobserwowano, że siarka na -2 stopniu utlenienia jest dominującą i praktycznie jedyną formą tego pierwiastka w obrębie komórek badanych nowotworów mózgu. Stanowi to potwierdzenie dotychczasowych hipotez, że siarka sulfanowa odgrywa rolę w proliferacji komórek nowotworowych. Wzrost poziomu tej formy siarki wraz ze wzrostem stopnia złośliwości glejaków w homogenatach tkanek był już uprzednio publikowany. Unikatowym rezultatem tej pracy [H-5], jest natomiast precyzyjne wskazanie struktur tkanki (tu: komórek nowotworowych), w których silnie gromadzi się siarka na -2 stopniu utlenienia. Rezultat taki był możliwy do osiągnięcia jedynie przy wykorzystaniu mikro-obrazowania chemicznego z zastosowaniem techniki XANES.

Eksperymentalne i analityczne aspekty topograficznego i ilościowego obrazowania żelaza na różnych stopniach utlenienia w skrawkach tkanek nowotworów mózgu zostały opisane w pracy [H-3]. Podobnie jak w przypadku badań form chemicznych siarki w nowotworach mózgu [H-5] ocenę stopni utlenienia Fe w tkankach przeprowadzono metodą fluorescencyjną, na dwa sposoby. Pierwszy z nich obejmował pomiar pełnych widm XANES w wybranych strukturach tkanki oraz materiałach referencyjnych (Fe^{2+} , Fe^{3+}), drugi natomiast, stanowiło dwuwymiarowe obrazowanie form chemicznych Fe w obszarach tkanek nowotworów mózgu. Analiza porównawcza widm XANES Fe zmierzonych w próbkach tkanek i materiałach referencyjnych wykazała, że w badanych punktach próbek żelazo utlenione jest dominującą formą w nowotworach o wysokim stopniu złośliwości (III i IV wg Światowej Organizacji Zdrowia). W przypadku nowotworu mózgu, zdiagnozowanego jako nowotwór I stopnia położenie krawędzi absorpcji w widmie XANES jednoznacznie wykazało obecność obydwu form żelaza. Ze względu na naturalną niejednorodność tkanek pomiary w wybranych punktach próbek nie mogą być traktowane jako w pełni reprezentatywne dla

całego nowotworu. Zachodzi konieczność uzyskania informacji z odpowiednio większych obszarów guza. W tym celu wykorzystano metodę dwuwymiarowego skanowania próbki w obszarze kilkaset na kilkaset μm^2 . Podobnie jak w przypadku badań form chemicznych siarki zastosowano selektywne wzbudzenia żelaza na określonym stopniu utlenienia. Na podstawie pomiarów materiałów referencyjnych oznaczone zostały energie, przy których wzbudzane jest żelazo odpowiednio na +2 i +3 stopniu utlenienia. W doborze energii, wykorzystanej do wzbudzenia zredukowanej formy Fe (7.1225 keV) uwzględniono dodatkowo warunek, aby w jak najmniejszym stopniu wzbudzane było żelazo na +3 stopniu utlenienia. Dodatkowo, w związku z prowadzeniem w tych badaniach również pełnej analizy ilościowej pomiarów realizowano z wykorzystaniem promieniowania o energii w porównywalnym stopniu wzbudzającej obydwie formy Fe, tj. 7.240 keV. Metodyka opracowywania map dystrybucji Fe na danym stopniu utlenienia była analogiczna do tej, jaką zastosowano w przypadku pomiarów siarki w pracy [H-5]. W szczególności, obrazowanie rozkładu powierzchniowego zredukowanej formy żelaza było bezpośrednim rezultatem pomiarów prowadzonych z użyciem energii promieniowania wzbudzającego, wynoszącej 7.1225 keV. Zastosowanie promieniowania o energii 7.135 keV prowadzi do wzbudzenia zarówno Fe^{3+} jak i Fe^{2+} . W celu poznania dystrybucji wyłącznie utlenionej formy Fe konieczne było odjęcie udziału żelaza na +2 stopniu utlenienia w każdym punkcie mierzonego obszaru próbki. W procedurze odejmowania uwzględniono współczynniki wzbudzenia Fe^{2+} przy energiach 7.1225 keV i 7.135 keV, wyznaczone na podstawie pomiarów materiału referencyjnego. Uzyskana metoda pozwoliła na poznanie mikroobszarów tkanki, w których dominującą było żelazo w formie zredukowanej, jak i tych, charakteryzujących się przeważającym udziałem żelaza na +3 stopniu utlenienia. W odróżnieniu do prac literaturowych dotyczących analizy XANES Fe w tkankach, w pracy [H-3] zaproponowano metodę w pełni ilościowej analizy, pozwalającej na wyznaczenie masy powierzchniowej żelaza na danym stopniu utlenienia. Wykorzystując fakt, że wysuszone skrawki tkanki nowotworów mózgu spełniają dla Fe kryterium próbki cienkiej posłużono się metodą wzorca zewnętrznego. W obliczeniach, przedstawionych szczegółowo w pracy [H-3], wykorzystano współczynniki wydajności dla żelaza przy odpowiednich energiach wzbudzenia, wyznaczone w oparciu o widma XANES materiałów referencyjnych. W odniesieniu do glejowych nowotworów mózgu, przeprowadzona analiza pozwoliła na wyznaczenie mas powierzchniowych Fe^{2+} i Fe^{3+} dla różnych typów nowotworów i tkanki kontrolnej jak i udziałów poszczególnych form żelaza w całkowitej zawartości Fe w tkankach badanych grup. W oparciu o nieparametryczny test Kruskal'a-Wallis'a zbadano, pomiędzy którymi typami nowotworów mózgu występują istotne statystycznie różnice w zawartościach poszczególnych form chemicznych żelaza, a które typy nowotworów wykazują między sobą podobieństwa pod tym względem. Stwierdzono, że we wszystkich przypadkach poziom utlenionej formy Fe jest znacząco wyższy w odniesieniu do Fe^{2+} . Ponadto, wykazano, że najwyższe zawartości Fe^{3+} występują w tkance kontrolnej oraz nowotworach o niskim stopniu złośliwości. Najniższy poziom utlenionej formy Fe zaobserwowano natomiast, w nowotworach o najwyższym stopniu złośliwości. Zaproponowana i szczegółowo opisana w pracy metoda ilościowego oznaczania form chemicznych żelaza ma charakter uniwersalny i może być wykorzystana przez potencjalnych badaczy, zajmujących się podobną tematyką.

Zakres mojego osobistego wkładu w publikacje, przedłożone jako podstawa postępowania habilitacyjnego

Prace H-1 i H-6 są mojego wyłącznego autorstwa. Pozostałe sześć artykułów, powstało przy moim znaczącym udziale. Mój wkład w powstanie poszczególnych publikacji był następujący (w nawiasach, pogrubioną czcionką podano procentową ocenę mojego wkładu w powstanie artykułów):

- H-2 – *artykuł powstał w oparciu o wyniki badań, realizowanych w ramach specjalnego projektu badawczego MNiSW, którym kierowałam (Promieniowanie synchrotronowe w badaniach akumulacji i środowiska chemicznego żelaza w strukturach tkanki mózgu*

w wybranych schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego człowieka. (DESY/304/2006) 2007-2010);

zainicjowanie badań nad obecnością kreatyny w tkankach układu nerwowego człowieka w stwardnieniu zanikowym bocznym i nawiązanie współpracy z prof. K. Gough; opracowanie metod preparatyki cienkich próbek tkanek odpowiednich do badań metodami rentgenowskiej mikroanalizy fluorescencyjnej oraz badań komplementarnych z wykorzystaniem mikrospektroskopii w podczerwieni; zgromadzenie materiału badawczego; wykonanie pomiarów, analizy jakościowej i ilościowej techniką SRXRF (dot. pomiarów realizowanych w laboratorium HASYLAB / DESY); uczestnictwo w dyskusjach i ocenie wyników badań nad złogami kreatyny realizowanymi techniką mikrospektroskopii w podczerwieni; współuczestnictwo w przygotowaniu manuskryptu publikacji. **(35 %)**

- H-3 – artykuł powstał w oparciu o wyniki badań, realizowanych w ramach specjalnego projektu badawczego MNiSW, którym kierowałam (Promieniowanie synchrotronowe w badaniach akumulacji i środowiska chemicznego żelaza w strukturach tkanki mózgu w wybranych schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego człowieka. (DESY/304/2006) 2007-2010);

wyselekcjonowanie materiału badawczego i uczestnictwo w przygotowaniu próbek; przygotowanie eksperymentu do realizacji techniką XANES na synchrotronie; dobór i optymalizacja warunków pomiarowych; współuczestnictwo w pomiarach próbek techniką XANES; analiza spektralna XANES dla próbek biologicznych i materiałów wzorcowych wraz z wyznaczeniem wartości współczynników natężenia promieniowania fluorescencyjnego dla Fe^{2+} i Fe^{3+} w zależności od stosowanej energii promieniowania wzbudzającego; opracowanie metody dwuwymiarowego obrazowania form chemicznych Fe i wykonanie map dystrybucji Fe na danym stopniu utlenienia; opracowanie i wykonanie analizy ilościowej dotyczącej wyznaczenia mas powierzchniowych żelaza na danym stopniu utlenienia; analiza statystyczna wyników badań; interpretacja wyników badań w odniesieniu do teoretycznych aspektów techniki XANES Fe; wyciągnięcie i sformułowanie wniosków płynących z przeprowadzonych badań; przygotowanie manuskryptu pracy. **(75 %)**

- H-4 – artykuł powstał w oparciu o wyniki badań, realizowanych w ramach specjalnego projektu badawczego MNiSW, którym kierowałam (Promieniowanie synchrotronowe w badaniach akumulacji i środowiska chemicznego żelaza w strukturach tkanki mózgu w wybranych schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego człowieka. (DESY/304/2006) 2007-2010);

wyselekcjonowanie materiału badawczego i uczestnictwo w przygotowaniu próbek; przygotowanie eksperymentu do realizacji techniką SRXRF; dobór i optymalizacja warunków pomiarowych; współuczestnictwo w pomiarach próbek techniką SRXRF; analiza spektralna próbek tkanek i materiałów referencyjnych; przeprowadzenie analizy topograficznej i ilościowej w odniesieniu do składu pierwiastkowego próbek tkanek; dobór metody analizy statystycznej wyników badań wraz z wykonaniem analizy; wyciągnięcie i sformułowanie wniosków płynących z przeprowadzonych badań; interpretacja wyników badań; przygotowanie manuskryptu pracy. **(80 %)**

- H-5 – artykuł powstał w oparciu o wyniki badań, kierowanego przeze mnie projektu badawczego pt. *Investigation of sulfur oxidation states and biological molecules in brain glioma tissue. (MD-228), ESRF, Grenoble, France, 2006;*

przygotowanie założeń i metodologii badań; wyselekcjonowanie materiału badawczego i uczestnictwo w przygotowaniu próbek; dobór materiałów wzorcowych; przygotowanie eksperymentu do realizacji techniką XANES na synchrotronie; dobór i optymalizacja warunków pomiarowych; współuczestnictwo w pomiarach próbek techniką XANES siarki; analiza spektralna próbek biologicznych i materiałów wzorcowych wraz z wyznaczeniem wartości współczynników natężenia promieniowania fluorescencyjnego dla siarki na danym stopniu utlenienia w zależności od stosowanej energii promieniowania

wzbudzającego; współuczestnictwo w opracowaniu metody dwuwymiarowego obrazowania form chemicznych S i metodzie eliminacji efektu przemieszczenia map dystrybucji form chemicznych siarki przy zmianach energii promieniowania wzbudzającego; interpretacja wyników badań w odniesieniu do podstaw teoretycznych XANES S; wyznaczenie absorpcji promieniowania fluorescencyjnego linii S-K α w tkance próbek mózgu o różnych grubościach w ramach oceny wpływu efektu samoabsorpcji; wyciągnięcie i sformułowanie wniosków płynących z przeprowadzonych badań; przygotowanie manuskryptu pracy w zakresie aspektów teoretycznych i eksperymentalnych techniki XANES S. **(70%)**

- H-7 – artykuł powstał w oparciu o wyniki badań, kierowanych przeze mnie projektów: specjalnego projektu badawczego MNiSW (Promieniowanie synchrotronowe w badaniach akumulacji i środowiska chemicznego żelaza w strukturach tkanki mózgu w wybranych schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego człowieka. (DESY/304/2006) 2007-2010) jak również projektu badawczego pt. Synchrotron radiation - based chemical micro-imaging of human brain tissue in Parkinson's disease. (2010_1_91200) BESSY II, Berlin, Niemcy, 2010.

wyselekcjonowanie materiału badawczego i uczestnictwo w przygotowaniu próbek; opracowanie i przygotowanie materiałów wzorcowych do pierwiastkowej analizy ilościowej skrawków tkanki metodą wzorca zewnętrznego; przygotowanie eksperymentu do realizacji techniką SRXRF; dobór i optymalizacja warunków pomiarowych; pomiar próbek techniką SRXRF; analiza spektralna próbek tkanek i materiałów wzorcowych; ocena jednorodności opracowanych materiałów wzorcowych; przeprowadzenie analizy topograficznej i ilościowej w odniesieniu do składu pierwiastkowego tkanek istoty czarnej; dobór metod analizy statystycznej wyników badań wraz w wykonaniem analizy; wyciągnięcie i sformułowanie wniosków płynących z przeprowadzonych badań; interpretacja wyników badań; przygotowanie manuskryptu pracy. **(80 %)**

- H-8 – artykuł powstał w oparciu o wyniki badań, kierowanego przeze mnie projektu badawczego pt. Synchrotron radiation based investigation on biochemical changes of rat brain tissue in experimental model of Parkinson's disease. (2010_2_100175) BESSY II, Berlin, Niemcy, 2010.

przygotowanie założeń i metodologii badań próbek mózgu szczurów techniką SRXRF; wyselekcjonowanie materiału badawczego i przygotowanie próbek; przygotowanie eksperymentu do realizacji techniką SRXRF; dobór i optymalizacja warunków pomiarowych; współuczestnictwo w pomiarach próbek techniką SRXRF; opracowanie i przygotowanie materiałów wzorcowych do analizy ilościowej skrawków tkanki metodą wzorca zewnętrznego; analiza spektralna próbek tkanek i materiałów referencyjnych; przeprowadzenie analizy topograficznej i ilościowej w badanych obszarach mózgu szczurów; dobór metod analizy statystycznej wyników badań wraz w wykonaniem analiz; wyciągnięcie i sformułowanie wniosków płynących z przeprowadzonych badań; interpretacja wyników badań; przygotowanie manuskryptu pracy z wykluczeniem opisu części fizjologicznej eksperymentu i podstaw związanych z chorobą Parkinsona. **(60%)**

Odpowiednie oświadczenia współautorów artykułów, wchodzących w skład przedłożonego cyklu publikacji stanowią załącznik do niniejszego wniosku.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

5_1. Okres przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Działalność badawczo-naukową rozpoczęłam w ramach pracy magisterskiej, będąc studentem Wydziału Fizyki i Techniki Jądrowej AGH (aktualnie Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH), na kierunku Fizyka Techniczna, specjalność Fizyka Medyczna i Dozymetria. Pracę magisterską pt. „Badanie liczby i aktywności makrofagów w biopsjach z guzów przed leczeniem”, wykonywałam przy współpracy z Zakładem Biofizyki Instytutu Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod kierunkiem prof. dr hab. S. Łukiewicza. Po obronie pracy magisterskiej rozpoczęłam studia doktoranckie na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ. W Instytucie Biologii Molekularnej kontynuowałam tematykę badawczą rozpoczętą w trakcie realizacji pracy magisterskiej. W badaniach wykorzystywałam technikę Elektronowego Rezonansu Paramagnetycznego do monitorowania sygnału tlenu azotu, stanowiący źródło informacji o odpowiedzi immunologicznej organizmu w chorobie nowotworowej. Po roku studiów doktoranckich na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ zdecydowałam się na zmianę tematyki badawczej i powrót na Wydział Fizyki i Techniki Jądrowej AGH, również jako słuchacz studiów doktoranckich.

W 1998 roku rozpoczęłam badania, dotyczące wykorzystania promieniowania X do analizy składu pierwiastkowego tkanek mózgu dla potrzeb neuropatologii. Moim opiekunem naukowym był prof. dr hab. Marek Lankosz. W 1998 r. nawiązałam współpracę z Zakładem Neuropatologii Instytutu Neurologii UJ, który nadal jest głównym ośrodkiem, z jakim współpracuję w ramach realizowanej tematyki badawczej. Tematyka, rozwijana w badaniach prowadzonych przy współpracy z Instytutem Neurologii UJ w ramach mojego doktoratu objęła m.in. analizę pierwiastkową próbek reprezentujących względnie duże obszary mózgu. Badania miały na celu porównanie zawartości pierwiastków w wybranych obszarach anatomicznych mózgu, ocenę różnic zawartości pierwiastków w istocie białej i korze mózgowej, sprawdzenie wpływu czynnika wieku na akumulację pierwiastków w mózgu człowieka. Jako techniki badawcze stosowałam rentgenowską analizę fluorescencyjną (XRF) ze wzbudzeniem z lampy rentgenowskiej jak również wzbudzenie wiązką protonową (Particle Induced X-Ray Emission – PIXE). Badania techniką PIXE prowadziłam we współpracy z Instytutem Problemów Jądrowych w Warszawie. Rezultaty badań realizowanych techniką XRF i PIXE pokazały, że Ca, Fe, Cu oraz Zn są silniej akumulowane w istocie szarej mózgu w porównaniu z istotą białą, co wskazuje, że ww. pierwiastki śladowe są związane z funkcjonowaniem głównie ciał komórek nerwowych. W mniejszym stopniu wiążą się one natomiast z aksonami komórek nerwowych. Stwierdzono ponadto, istotny wzrost zawartości cynku z wiekiem w istocie białej mózgu, co może wskazywać na udział tego pierwiastka w procesach starzenia fizjologicznego. Dla potrzeb realizacji wybranych zagadnień dla potrzeb neurologii przygotowane zostały metody umożliwiające analizę względnie dużych obszarów anatomicznych ośrodkowego układu nerwowego (OUN) człowieka technikami XRF i PIXE. Ze względu na fakt, że badanie materiałów pochodzenia biomedycznego pod względem ilościowego oznaczania pierwiastków wiąże się z koniecznością eliminacji efektów matrycy w przypadku każdej z technik sprawdzone zostały odmienne metody analizy ilościowej umożliwiające usuwanie efektów przeszkadzających, związanych z obecnością lekkiej, niemierzalnej matrycy organicznej. Wyniki badań tkanki mózgu na poziomie makroskopowym zostały opisane w pracach [1.1., 2.3., 2.6., 2.7.] (numeracja publikacji podana zgodnie z wykazem prac zamieszczonych jako załącznik do niniejszego wniosku).

W ramach pracy doktorskiej rozpoczęłam przy współpracy z Instytutem Neurologii Collegium Medicum UJ badania ukierunkowane na poznanie roli pierwiastków śladowych w patogenezie dwóch schorzeń neurodegeneracyjnych, tj. choroby Parkinsona (ChP) i stwardnienia zanikowego bocznego (SLA). Wspólną cechą obu schorzeń jest zanik komórek nerwowych w pewnych obszarach ośrodkowego układu nerwowego. W chorobie

Parkinsona degeneracja i atrofia obejmuje głównie bogate w neuromelaninę neurony istoty czarnej (SN) śródmózgowia. W SLA natomiast, neurodegeneracja dotyczy głównie neuronów motorycznych w rogach przednich rdzenia kręgowego jak również kory ruchowej. Etiologia obu schorzeń nie została dotychczas poznana. Zwraca się jednak uwagę na pewne ściśle ze sobą powiązane procesy biochemiczne, towarzyszące procesowi zaniku komórek nerwowych. Wśród ważniejszych należy wymienić stres oksydacyjny, ekscytotoksyczność, agregacja zdegenerowanych białek, dysfunkcja mitochondriów. Dodatkowo, w przypadku SLA pewien procent zachorowań związany jest z mutacją genu kodującego miedziowo-cynkową dysmutazę nadlenową. Ważnym jest, że we wszystkich tych procesach pierwiastki śladowe takie jak Fe, Cu, Zn, Mn, Ca odgrywają istotną rolę. Dlatego też, w celu lepszego poznania patogenezы schorzeń neurodegeneracyjnych i podjęcia odpowiedniej terapii o charakterze neuroprotekcynym badania, obejmujące m. in. ocenę zmian pierwiastkowych (z uwzględnieniem form chemicznych pierwiastków) są niezwykle istotne. Ważnym aspektem jest w tym zakresie ocena składu pierwiastkowego tkanki na poziomie mikroskopowym. Możliwość wykorzystania techniki XRF z kolimacją wiązki wzbudzającej przy pomocy kapilary szklanej, dla celów mikro- i makroanalizy tkanek mózgu były również tematem poruszonym w mojej pracy doktorskiej. Przygotowałam w ramach tych zagadnień procedury umożliwiające analizę ilościową próbek o masie kilkuset mg jak również analizę topograficzną cienkich skrawków tkanek. Wyniki dotyczące tej tematyki zostały opisane w artykułach naukowych [2.2., 2.4.].

Ze względu na fakt, że warunki laboratoryjne nie zapewniają dostatecznej wykrywalności pierwiastków w tkankach mózgu przy zadawalającej przestrzennej zdolności rozdzielczej w swoich badaniach zaczęłam wykorzystywać promieniowanie synchrotronowe. Niezastąpionym narzędziem, pozwalającym na obrazowanie składu pierwiastkowego tkanek na poziomie komórkowym jest technika rentgenowskiej analizy fluorescencyjnej z wykorzystaniem promieniowania synchrotronowego (SRXRF). W 2000 roku nawiązałam współpracę naukową z European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) w Grenoble, a rok później odbyłam pierwszą sesję pomiarową na linii pomiarowej ID 22 (ESRF) dotyczącą jakościowej i ilościowej oceny zmian składu pierwiastkowego, z wykorzystaniem techniki SRXRF, w obszarach mózgu w chorobie Parkinsona i stwardnieniu bocznym zanikowym w odniesieniu do grupy kontrolnej. Zastosowana w badaniach wiązka promieniowania synchrotronowego o rozmiarach kilku mikrometrów umożliwiła poznanie dystrybucji pierwiastków na poziomie komórkowym. Wysokie natężenie wiązki znacząco poprawia wykrywalność pierwiastków umożliwiając tym samym oznaczenie pierwiastków, których nie można rejestrować w warunkach laboratoryjnych. Uzyskiwane dwuwymiarowe mapy dystrybucji pierwiastków w tkance pozwoliły na stwierdzenie czy dany pierwiastek silniej gromadzi się w komórce nerwowej czy też w strukturach tkanki otaczającej. Oznaczenie takie jest pomocne w określeniu komórkowego bądź np. glejowego pochodzenia obserwowanych anomalii pierwiastkowych. Przeprowadzone wstępne badania porównawcze dla przypadku kontrolnego i wybranych schorzeń neurodegeneracyjnych pozwoliły na stwierdzenie istotnych różnic w akumulacji wybranych pierwiastków w analizowanych obszarach mózgu. Wynik taki stanowi potwierdzenie istniejących hipotez na temat udziału pierwiastków śladowych w patogenezы schorzeń neurodegeneracyjnych, dostarczając informacji o lokalizacji obserwowanych zaburzeń pierwiastkowych w strukturach tkanki. Rezultaty wstępnych badań, dotyczące zaobserwowanych zmian pierwiastkowych w tkankach ośrodkowego układu nerwowego w chorobie Parkinsona i stwardnieniu bocznym zanikowym przedstawiono w pracach [1.2., 1.4., 1.5., 2.5.]. Praca [1.5] przez długi okres czasu znajdowała się na pierwszym miejscu w rankingu X-Ray Spektrometrii prac najczęściej cytowanych. W celu rozszerzenia badań składu pierwiastkowego tkanki mózgu na poziomie mikroskopowym w 2002 roku nawiązałam dodatkowo współpracę naukową z Laboratorium Synchrotronowym HASYLAB / DESY w Hamburgu, gdzie kontynuowałam prace pomiarowe po ukończeniu pracy doktorskiej. Podsumowując, w latach 2000 – 2003 przygotowałam i brałam udział w czterech projektach badawczych realizowanych w ESRF

(LS-2111, MD-32, MD-60, MD-103) oraz jednym trzyletnim projekcie realizowanym do roku 2005 we współpracy z HASYLAB / DESY(II-02-092).

W tym samym czasie zaczęłam przygotowania do włączenia do mojej działalności naukowo-badawczej nowej techniki tj. mikrospektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR-MS), umożliwiającej m. in. oznaczenia molekuł biologicznych w mikroobszarach tkanek OUN. Nawiązałam współpracę z ośrodkiem LURE przy synchrotronie Super-ACO w Orsay i przygotowałam projekt badawczy (IM 017-03) realizowany w 2003 r. W latach 2001 – 2004 uczestniczyłam, jako główny wykonawca w dwóch projektach badawczych (7T11E02021, 4T11E02022 – promotorski) finansowanych odpowiednio w latach 2001-2004 raz 2002-2003 przez Komitet Badań Naukowych w Warszawie. Projekty te dotyczyły wykorzystania promieniowania synchrotronowego w badaniach procesów neurodegeneracyjnych oraz przygotowania procedur analitycznych dla potrzeb rentgenowskiej analizy fluorescencyjnej (w ujęciu makroskopowym) materiałów pochodzenia biologicznego.

W ramach badań, mających na celu znalezienie markera biochemicznego dla stwierdzenia bocznego zanikowego uczestniczyłam w badaniach składu pierwiastkowego płynów ustrojowych (płyn mózgowo-rdzeniowy, surowica, pełna krew) z wykorzystaniem techniki XRF opartej na zjawisku całkowitego odbicia promieniowania X, TXRF (Total Reflection X-Ray Fluorescence). Przeprowadzone analizy nie wykazały istotnych, jednoznacznych różnic w składzie pierwiastkowym pomiędzy grupą SLA a kontrolą. Wyniki badań zostały opisane w pracach [1.3., 2.4., 2.6.].

W maju 2003 roku obroniłam pracę doktorską pt. "Promieniowanie X w badaniach składu pierwiastkowego tkanki ośrodkowego układu nerwowego człowieka" na Wydziale Fizyki i Techniki Jądrowej AGH. Promotorem pracy był prof. dr hab. inż. Marek Lankosz. Po obronie doktoratu i urodzeniu pierwszego dziecka w czerwcu 2003 r. do września 2003 r. nastąpiła krótka, formalna przerwa w mojej działalności naukowo-badawczej.

5_2. Okres po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

W październiku 2003 r. zostałam zatrudniona na Wydz. Fizyki i Techniki Jądrowej AGH, na stanowisku asystenta a we wrześniu 2004 r. na stanowisku adiunkta. Od 2003 r. kontynuowałam działalność naukową rozpoczętą w ramach pracy doktorskiej. W celu weryfikacji wstępnych rezultatów dotyczących anomalii składu pierwiastkowego tkanek OUN, uzyskanych dla pojedynczych przypadków reprezentujących ChP i SLA rozszerzono badane grupy o kolejne przypadki, prowadząc dla nich dalsze badania z wykorzystaniem techniki SRXRF. W latach 2003-2005 uczestniczyłam w realizacji specjalnego projektu badawczego (SPB/DESY/P-05/DWM 728) finansowanego przez KBN. Niezwykle istotnym osiągnięciem z tego okresu było stwierdzenie istotnie wyższych poziomów Ca, Fe oraz Zn w neuronach istoty czarnej oraz w istocie białej dla przypadków ChP w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto, w obszarach kory mózgowej stwierdzono wyższy poziom Ca i Zn dla ChP. Wyniki badań, wykonanych dla próbek rdzenia kręgowego, reprezentujących SLA wykazały natomiast, znaczące różnice w akumulacji pierwiastków pomiędzy analizowanymi przypadkami z tej grupy. Nie stwierdzono anomalii w gromadzeniu określonego pierwiastka (lub pierwiastków) dla wszystkich przebadanych przypadków patologicznych ani dla neuronów ani też dla obszarów istoty białej rdzenia kręgowego. Zaobserwowano jedynie indywidualne rozbieżności pomiędzy zawartościami pierwiastków w próbkach reprezentujących SLA i grupę kontrolną. Wyniki badań zostały opublikowane w cyklu publikacji naukowych [1.6., 1.7., 1.8., 1.10., 1.13,1.15]. W oparciu o rezultaty pracy naukowo-badawczej, dotyczącej wykorzystania promieniowania X w neurobiologii w 2006 r. uzyskałam Nagrodę im. Prof. Zbigniewa Engela za najlepszą pracę w dziedzinie badań podstawowych. Mikroobrazowanie składu pierwiastkowego tkanek mózgu człowieka w odniesieniu do choroby Parkinsona kontynuowałam w latach 2009 – 2011 w ramach kierowanego przeze mnie specjalnego projektu badawczego (DESY/304/2006), finansowanego przez

Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz trzech projektów badawczych realizowanych na synchrotronie BESSY II przy Helmholtz-Zentrum w Berlinie (2009_2_90056, 2010_1_91200, 2010_2_100136). Wynikiem prac z tego okresu jest m.in. artykuł naukowy [1.22.], załączony do cyklu publikacji, przedłożonych jako podstawa postępowania habilitacyjnego.

Oprócz obrazowania składu pierwiastkowego istotnym dla prowadzonych badań jest również poznanie form chemicznych niektórych pierwiastków (np. S, Fe, Cu). W związku z tym do prac, jakie prowadziłam w odniesieniu do schorzeń neurodegeneracyjnych włączyłam również spektroskopię absorpcji promieniowania w pobliżu krawędzi absorpcji (XANES), umożliwiającą m. in. poznanie form chemicznych pierwiastków. Dla przypadku choroby Parkinsona przeprowadzono, ocenę stopni utlenienia Fe i Cu w pigmentowanych neuronach istoty czarnej. Badania prowadzono w wybranych punktach tkanki. W badaniach nie stwierdzono jednak istotnych różnic pomiędzy stopniem utlenienia wymienionych pierwiastków dla przypadku choroby Parkinsona i grupy kontrolnej [1.12., 1.14.]. Ze względu na to, że pomiary stopni utlenienia Fe na tym etapie prac realizowane były tylko w wybranych punktach tkanki, w późniejszej działalności powróciłam do tego zagadnienia wykorzystując metodę dwuwymiarowego obrazowania dystrybucji form chemicznych Fe w całych obszarach tkanek. Badania prowadzone były w ramach kierowanych przeze mnie projektów badawczych: specjalnego projektu badawczego MNiSW (DESY/304/2006) w latach 2007-2010 oraz projektu badawczego realizowanego na synchrotronie BESSY II przy Helmholtz-Zentrum w Berlinie (2009_2_90056). W badaniach wykorzystano próbki zmarłych z chorobą Parkinsona, materiał reprezentujący idiopatyczną formę choroby Parkinsona (wczesne stadium) oraz grupę kontrolną. Stwierdzono, że w przypadku ChP w neuronach istoty czarnej zlokalizowane są obydwie formy chemiczne Fe. Maksymalny poziom utlenionej formy Fe jest jednak prawie dziesięciokrotnie wyższy w porównaniu z żelazem w postaci zredukowanej. Dodatkowo, żelazo o niższym stopniu utlenienia zlokalizowane jest w przestrzeniach międzyneuralnych. Odmienny charakter rozkładu był zauważalny w przypadku wczesnej formy choroby Parkinsona. W ciałach komórek nerwowych gromadziła się głównie zredukowana forma Fe. Dystrybucja Fe 3+ była natomiast jednorodna w całym obszarze tkanki, bez tendencji do gromadzenia w komórce nerwowej. Zaobserwowano istotnie niższy poziom tej formy Fe w istocie czarnej stosunku do choroby Parkinsona. Dla przypadku kontrolnego stwierdzono, że dominującą formą w neuronach istoty czarnej jest utleniona forma żelaza. Jakkolwiek było tam wykrywane również Fe na niższym stopniu utlenienia. Poziom Fe 2+ w istocie czarnej grupy kontrolnej był ok. 3,4-krotnie niższy w porównaniu z chorobą Parkinsona oraz jej wczesnym stadium. Zawartości Fe 3+ były natomiast ok. 3-krotnie niższe w odniesieniu do choroby Parkinsona. Uzyskane rezultaty analizy ilościowej wskazują, że wyższy udział procentowy zredukowanej formy żelaza (a tym samym najniższy formy utlenionej) w stosunku do całkowitego żelaza zawartego w próbce występuje dla choroby Parkinsona. Udziały procentowe form Fe dla wczesnego stadium choroby Parkinsona były porównywalne w granicy niepewności pomiarowej z przypadkami grupy kontrolnej.

W ramach współpracy z Kliniką Neurologii Wydz. Lekarskiego UJ, Katedrą Patofizjologii Wydz. Lekarskiego UJ oraz Helmholtz-Zentrum w Berlinie realizowałam również badania nad zmianami pierwiastkowymi zachodzącymi w dopaminozależnych obszarach mózgu szczurów pod wpływem elektrostymulacji nerwu błędnego. Prace stanowią jeden z elementów badań nad wczesnym stadium choroby Parkinsona i zostały opisane w artykule naukowym [1.20.], opublikowanym w tym roku. Kierowana przeze mnie część eksperymentu, dotycząca analizy pierwiastkowej realizowana była w ramach trzech projektów badawczych (2009_2_90184, 2010_1_91201, 2010_2_100175) na synchrotronie BESSY II w Berlinie. Badania pozwoliły na stwierdzenie wpływu dysfunkcji nerwu błędnego na zmiany składu pierwiastkowego zachodzące w strukturach dopaminergicznych, co sugeruje udział niektórych pierwiastków w procesach towarzyszących wczesnemu stadium choroby Parkinsona.

W 2006 roku rozszerzyłam tematykę badawczą, wykorzystując zdobyte dotychczas doświadczenie do badań nowotworów mózgu, ze szczególnym uwzględnieniem tych pochodzenia glejowego. Prace realizowane w tej tematyce mają dwa zasadnicze cele. Pierwszy z nich to wspomaganie diagnostyki medycznej, drugi natomiast wiąże się z uzyskaniem dodatkowych informacji na temat procesu kancerogenezy. W latach 2007 – 2010 byłam kierownikiem specjalnego projektu badawczego (DESY/304/2006), finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, w ramach którego zrealizowałam znaczną część badań dotyczących glejowych nowotworów mózgu. Dodatkowo, badania prowadzone były w ramach trzyletniego projektu (2006-2009) we współpracy z HASYLAB / DESY (II-20060029 EC) oraz projektu badawczego ESRF (MD 228) w 2006 r. Prace objęły m. in. poznanie dystrybucji i zawartości pierwiastków w tkankach nowotworów mózgu zróżnicowanych pod względem typu i stopnia złośliwości, opracowanie modelu pozwalającego na klasyfikację różnych typów glejowych nowotworów mózgu, wyznaczenie pierwiastków w największym stopniu różnicujących nowotwory mózgu, badanie dystrybucji form chemicznych Fe i S w nowotworach mózgu. Rezultaty badań zostały opublikowane w cyklu artykułów naukowych [1.15., 1.17., 1.18., 1.19., 2.20.]. Bardziej szczegółowo tematyka ta została opisana w części autoreferatu, dotyczącej cyklu prac, przedłożonych jako podstawa postępowania habilitacyjnego.

Jak wspominałam uprzednio, w 2002 r. włączyłam do realizowanej przeze mnie działalności naukowo-badawczej badania wykorzystujące mikrospektroskopię w podczerwieni. Tematyka ta stanowi drugi, główny obszar mojej działalności obok obrazowania chemicznego tkanek mózgu z wykorzystaniem promieniowania X. Ze względu na fakt, że widmo absorpcyjne z zakresu podczerwieni niesie jednoznacznie informację o związkach organicznych (w tym molekułach biologicznych) czy też strukturze drugorzędowej białek FTIR-MS stanowi cenne uzupełnienie dla badań składu pierwiastkowego. Dodatkowo, może być użyteczna w obrazowaniu zmian w obrębie grup funkcyjnych głównych makromolekuł biologicznych towarzyszących procesom patologicznym. Dlatego też wykorzystałam w swych pracach technikę FTIR-MS do badań tkanek mózgu w schorzeniach neurodegeneracyjnych (początkowo, jako projekt badawczy na synchrotronie Super-ACO, LURE w Orsay). Bardzo ważnym dla realizowanych badań była realizacja pomiarów technikami FTIR-MS i SRXRF na dokładnie tym samym materiale badawczym. Wiązało się to z koniecznością doboru preparatyki próbek z uwzględnieniem podłoża pomiarowego odpowiedniego dla obu technik. W odniesieniu do choroby Parkinsona technika FTIR-MS pozwoliła na stwierdzenie zmian w obrębie lipidów, kwasów nukleinowych, jak również struktury drugorzędowej białek [1.8., 1.11., 1.13.]. Uzyskane rezultaty potwierdzają multietologiczny charakter choroby Parkinsona. Stwierdzono ponadto, że zmiany biochemiczne w komórce nerwowej obserwowane są pomimo braku różnic morfologicznych, co może świadczyć o tym, że zaburzenia funkcjonowania pojawiają się przed wystąpieniem morfologicznej degeneracji komórki. W odniesieniu do stwardnienia zanikowego bocznego jednym z celów, dla których stosowałam mikrospektroskopię w podczerwieni było mikroobrazowanie złogów kreatyny w tkankach OUN. Tematyka ta została opisana w pracy [1.16] włączonej do cyklu prac, złożonych jako podstawa postępowania habilitacyjnego i jest przedstawiona szerzej we wcześniejszej części autoreferatu, jak również w artykule [2.18.]. Badania zmian składu makromolekularnego tkanek OUN człowieka w schorzeniach neurodegeneracyjnych były tematem pracy magisterskiej mgr inż. Marzeny Kastyak, której byłam promotorem. Praca ta została uznana za najlepszą pracę magisterską w dziedzinie prac aplikacyjnych w konkursie Diamenty AGH w roku 2006. Stanowi to jeden z moich największych sukcesów dydaktycznych. W późniejszym okresie działalności naukowo-badawczej obrazowanie makromolekularne włączyłam również do cyklu badań tkanek nowotworów mózgu. Po zamknięciu synchrotronu Super-ACO kontynuowałam nawiązaną współpracę realizując badania na nowouruchomionym synchrotronie SOLEIL w St. Aubin, gdzie w latach 2008 – 2009 kierowałam dwoma projektami badawczymi (20080145, 20090103), dotyczącymi badań składu molekularnego glejowych nowotworów mózgu. Badania budowy biochemicznej

nowotworów mózgu realizowałam również na linii pomiarowej ID 21 w ESRF. Uzyskane dotychczas wyniki pozwoliły na stworzenie charakterystyki pierwiastkowo-biomolekularnej poszczególnych typów glejowych nowotworów mózgu. W odróżnieniu od całkowitego składu pierwiastkowego, którego odmienność wykazują różne typy nowotworów mózgu, w przypadku składu makromolekularnego tkanek nowotworowych nie stwierdzono występowania unikatowych cech wyróżniających badane tkanki.

W latach 2005-2008 byłam członkiem międzynarodowego konsorcjum utworzonego w ramach projektu DASIM (Diagnostic Applications of Synchrotron Infrared Microspectroscopy), finansowanego ze środków Unii Europejskiej (6 PR). Współpraca pomiędzy biologami, klinicystami i naukowcami, wykorzystującymi mikrospektroskopię w podczerwieni opartą na promieniowaniu synchrotronowym ukierunkowana była na osiągnięcie postępu w możliwościach diagnostycznych zastosowań mikrospektroskopii w podczerwieni.

Jak wspomniałam, początkowo prace pomiarowe z wykorzystaniem techniki FTIR-MS prowadziłam w ośrodkach synchrotronowych LURE, ESRF, oraz SOLEIL. W roku 2009, przy wsparciu finansowym, jakie uzyskałam z Funduszu Nauki i Technologii Polskiej stworzyłam na Wydz. Fizyki i Informatyki AGH specjalistyczną pracownię mikrospektroskopii w podczerwieni. Wysokiej klasy aparatura umożliwia realizację pomiarów w ujęciu makro- i mikroskopowym, z uwzględnieniem metod pomiarowych takich jak ATR-FTIR (attenuated total reflection), wzbudzenia niskokątowego (z ang. grazing angle) i in. Aparatura wykorzystywana jest zarówno do badań naukowych jak i dydaktycznych (zajęcia laboratoryjne, badania wykorzystywane w pracach dyplomowych, realizowanych pod moją opieką naukową). Stworzenie pracowni mikrospektroskopii w podczerwieni i nieograniczony dostęp do dobrej klasy aparatury badawczej znacząco wpłynęło na ilość materiału badawczego, jaki może być poddany analizie. Ma to istotne znaczenie w przypadku prac realizowanych na materiale klinicznym.

W 2011 roku do realizowanych przeze mnie tematów z zakresu neurologii włączyłam również zagadnienia związane z mikroobrazowaniem zmian biochemicznych w tkankach mózgu w procesach starzenia fizjologicznego. W dotychczasowych badaniach skupiłam się na istocie czarnej mózgu. Zniszczenie neuronów części zbitej istoty czarnej śródmózgowia, towarzyszące procesom starzenia mózgu, prowadzi do znaczącego spadku poziomu dopaminy głównie na drodze nigrostriatalnej. Upośledzenie fizjologii komórek nerwowych układu dopaminergicznego prowadzi w efekcie do zaburzeń motorycznych, stanowiących istotny problem w życiu człowieka, a w nasilonych przypadkach do schorzeń takich jak choroba Parkinsona czy Alzheimer. Procesom starzenia fizjologicznego towarzyszą często bardzo liczne manifestacje histopatologiczne, które najczęściej związane są z zanikiem neuronów. Wiele czynników może przyczyniać się do atrofii neuronów zarówno w wyniku starzenia fizjologicznego jak i w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych. Wśród najważniejszych wymienia się istotną rolę agregacji białek o nieprawidłowej konformacji, stres oksydacyjny czy czynniki genetyczno-środowiskowe. Zapoczątkowane przeze mnie prace badawcze mają na celu poznanie potencjalnych odstępstw w budowie pierwiastkowo-biomolekularnej tkanki mózgu, towarzyszących manifestacjom histopatologicznym w procesach starzenia fizjologicznego. Badania, którymi kieruję realizowane są przy współpracy z Katedrą Patomorfologii Wydz. Lekarskiego UJ oraz Helmholtz-Zentrum w Berlinie, gdzie realizuję prace pomiarowe. Zapoczątkowana tematyka, będzie przeze mnie kontynuowana w nadchodzącym czasie.

Podsumowując, wyniki moich prac naukowo-badawczych, zostały opublikowane w 43 artykułach naukowych, jak również były prezentowane na 54 konferencjach naukowych. Trzy razy wygłaszałam referaty zaproszone na prestiżowych spotkaniach naukowych. Moje publikacje znalazły uznanie w międzynarodowym środowisku naukowym, czego efektem jest m. in. międzynarodowa współpraca nawiązana z naukowcami z Department of Neurology - University Medicine, Göttingen, CNRS - University of Bordeaux, DESY (PETRA III), Department of Physics - Institute for X-Ray Physics, Göttingen, z którymi wspólnie

przygotowałam projekt dotyczący wykorzystania technik opartych na promieniowaniu X i podczerwieni w badaniach nad chorobą Parkinsona. Tematyka ta obok procesów starzenia mózgu stanowić będzie jeden z głównych nurtów mojej działalności naukowo-badawczej w najbliższej przyszłości.

Szczegółowy wykaz moich osiągnięć naukowo-badawczych, dydaktycznych i działalności organizacyjnej został przedstawiony w odrębnych załącznikach.

M. Szorucka-Bonclowska