

## Podsumowanie osiągnięć naukowych (Autoreferat)

1. Imię i Nazwisko: **Marzena Kastyak-Ibrahim**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe (artystyczne)

- Dyplom Ukończenia Programu CHET (Certification in Higher Education Teaching) 2011; The University of Manitoba, Winnipeg, MB, Kanada Canada
- doktor nauk fizycznych; 2009, Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie, temat rozprawy doktorskiej: "Chemical characterization and imaging of creatine deposits in human central nervous system tissue with infrared and X-Ray fluorescence spectromicroscopy"; promotor: prof. dr hab. inż. Marek Lankosz i dr Kathleen Gough (University of Manitoba)
- magister chemii w zakresie chemii biologicznej; 2009, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie; promotor: prof. dr hab. Grażyna Stochel
- magister inżynier fizyki technicznej w zakresie fizyki medycznej i dozymetrii; 2005, Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie, pomotor: dr hab inż. Magdalena Szczerbowska-Boruchowska

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych (artystycznych):

08/2015 – obecnie: Koordynator Studiów Licencjackich, Uniwersytet Calgary, Wydział Fizyki i Astronomi, Calgary, Alberta, Kanada

09/2013 –07/2015: Kierownik Pracowni; Uniwersytet Manitoba, Wydział Fizyki i Astronomi, Winnipeg, Manitoba, Kanada

01/2013 – 08/2014: Wykładowca Fizyki; International College of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Kanada

09/2011 – 08/2013: Staż Postdoktorancki (finansowany przez Kanadyjskie Stowarzyszenie na rzecz choroby Alzheimera; Alzheimer Society of Canada), Uniwersytet Winnipeg, Wydział Fizyki i Astronomi, Winnipeg, Manitoba, Kanada

07/2010 – 08/2011: Wykładowca Biochemii, Uniwersytet Manitoba, Wydział Chemii, Winnipeg, Manitoba, Kanada

06/2009 – 04/2011: Asystent/ Staż Postdoktorancki; Uniwersytet Manitoba, Wydział Chemii, Winnipeg, Manitoba, Kanada

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.

**“Testowanie granic mikro-obrazowania: Rozwój i zastosowanie wybranych metod mikro-obrazowania zmian w ośrodkowym układzie nerwowym związanych z procesami neurodegeneracyjnymi.”**

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

- H-1. **Kastyak, M.Z.**, Szczerbowska-Boruchowska, M., Adamek, D., Tomik, B., Lankosz, M. and Gough, K.M. (2010) Pigmented creatine deposits in Amyotrophic Lateral Sclerosis central nervous system tissues identified by synchrotron FTIR and X-Ray Fluorescence spectromicroscopy. *Neuroscience* 166: 1119–1128.
- H-2. Kuzyk, A., **Kastyak, M.Z. (co-first author)**, Agrawal, V., Gallant, M., Sivakumar, G., Rak, M., Del Bigio, M.R., Westaway, D., Julian, R., and Gough, K.M. (2010) Association between amyloid plaque, lipid, and creatine in hippocampus of TgCRND8 mouse model for Alzheimer disease, *Journal of Biological Chemistry* 285(41): 31202-31207
- H-3. Gough, K.M., Tzadu, L., **Kastyak, M.Z.**, Kuzyk, A.C., and Julian, R.L. (2010) Theoretical and Experimental Considerations for Interpretation of Amide I Bands in Tissue, *Vibrational Spectroscopy*, 53(1): 71-76
- H-4. **Kastyak-Ibrahim M.Z.**, Nasse M.J., Rak M., Hirschmugl C., Del Bigio M.R., Albensi B.C., and Gough K.M. (2012) Biochemical label-free tissue imaging with subcellular-resolution synchrotron FTIR-FPA. *NeuroImage* 60(1):376-83
- H-5. Stitt D., **Kastyak-Ibrahim M. Z.**, Liao C. R., Morrison J., Albensi B. C., Gough K.M. (2012) Tissue acquisition and storage associated oxidation considerations for FTIR microspectroscopic imaging of polyunsaturated fatty acids. *Vibrational Spectroscopy* 60:16-22, 2012
- H-6. **Marzena Kastyak-Ibrahim**, Domenico Di Curzio, Sheryl Herrera, Richard Buist, Marc R Del Bigio, Benedict C Albensi, Melanie Martin (2013) Neurofibrillary tangles and plaques are not accompanied by white matter pathology in aged triple transgenic-Alzheimer disease mice. *Magnetic Resonance Imaging* 31(9):1515-21. doi: 10.1016/j.mri.2013.06.013

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

## Wprowadzenie

Choroby neurodegeneracyjne wywierają coraz większy wpływ nie tylko na poszczególnych ludzi, ale na całe społeczeństwa, zwłaszcza w krajach rozwiniętych. Coraz więcej osób ma w gronie rodziny czy przyjaciół osobę dotkniętą przez chorobę Alzheimera. Choroby neurodegeneracyjne nie dają się wyleczyć, dlatego poszukiwanie sposobu wczesnego ich wykrywania a jeszcze lepiej zapobiegania jest bardzo ważne. Nie będzie to jednak możliwe dopóki nie poznamy i nie zrozumiemy lepiej jakie są przyczyny procesów powodujących umieranie neuronów. Choroby neurodegeneracyjne stanowią bardzo różnorodną grupę schorzeń. Wiemy tylko o niektórych czynnikach, które mogą być u podstaw ich rozwoju, należą do nich na przykład stres oksydacyjny, ekscytotoksyczność, powstawanie złogów białek, czy zaburzenia pracy mitochondriów, ale co naprawdę sprawia, że neurony zanikają pozostaje tajemnicą. Metody obrazowania mogą służyć jako narzędzie do badania zmian w Óśrodkowym Układzie Nerwowym (OUN). Obrazowanie może być wykonane na poziomie tkanek ludzkich (pochodzących z autopsji) lub zwierzęcych (pochodzących z organizmów modelowych dla danego schorzenia). Niektóre metody, na przykład obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (RM) pozwalają na monitorowanie zmian w organizmach żywych (łac. *in vivo*).

Zmiany w chorobach neurodegeneracyjnych nie są łatwe do wykrycia gdyż zwykle są nieznaczne, szczególnie w początkowych stadiach, a każda metoda obrazowania ma swoje ograniczenia związane z przygotowaniem i przechowywaniem próbek, wielkością obszaru obrazowania, rozdzielczością, czasem potrzebnym na wykonanie badania i rodzajem analizy danych pomiarowych.

Cykl artykułów naukowych, przedłożonych, jako podstawa mojego postępowania habilitacyjnego skupia się na testowaniu granic metod obrazowania na poziomie mikroskopowym (mikro-obrazowania) w celu badania zmian leżących u źródeł chorób neurodegeneracyjnych.

### **Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) i jej wykorzystanie do badania próbek biologicznych**

Spektroskopia oscylacyjna (podczerwieni i ramanowska) dostarcza informacji o wibracjach cząsteczek i na tej podstawie pozwala zidentyfikować grupy funkcyjne i strukturę molekularną. Jest to metoda coraz częściej wykorzystywana w badaniach naukowych mających zastosowanie w medycynie. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) pozwala na dwuwymiarowe obrazowanie grup funkcyjnych występujących w makrocząsteczkach biologicznych zawartych w tkankach, z rozdzielczością na poziomie komórkowym a nawet wewnątrz komórek<sup>1</sup>. FTIR pozwala także na badanie zmian w drugorzędowej strukturze molekularnej białek, co stanowi ważny element w diagnozowaniu zmian chorobowych. Każde widmo w podczerwieni zawiera informacje o różnych typach makrocząsteczek (tłuszczach, białkach, cukrach).

Synchrotronowa spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (sFTIR) łączy w sobie zalety spektroskopii w podczerwieni (FTIR) oraz promieniowania synchrotronowego o wysokiej jasności i intensywności. sFTIR pozwala na badanie tkanek z wyższą rozdzielczością,

---

<sup>1</sup> Dumas P, Miller L (2003) The use of synchrotron infrared microspectroscopy in biological and biomedical investigations. *Vib Spectrosc* 32: 3–21.

nawet na poziomie poniżej pięciu mikrometrów. Wszystkie rodzaje makrocząsteczek posiadają swoje charakterystyczne piki w podczerwieni. Pasma amidowe ( I i II ) przypisywane są licznym oscylacjom szkieletu białkowego i są wykorzystywane do badania zmian w strukturze drugorzędowej białek. Zmiany w budowie lub otoczeniu białka powodują zmiany w położeniu, wysokości i kształcie pasm amidowych.

W Tabeli.1 zestawiono pasma w podczerwieni najczęściej wykorzystywane do analizy w publikacjach H-1 do H-5.

Tabela.1 Pasma w podczerwieni najczęściej wykorzystywane do analizy próbek biologicznych

Analiza piku pokazuje rozkład:	Pik wykorzystany do obrazowania:	Nazwa piku	Położenie maksimum [cm <sup>-1</sup> ]	Zakres [cm <sup>-1</sup> ]	Lina podstawowa [cm <sup>-1</sup> ]	Publikacja
Tłuszczów (nasyconych kwasów tłuszczowych)	Istoty szarej i białej	Symetryczne drganie grupy CH <sub>2</sub>	2850	2860-2840	3012-2750	H-1, H-2, H-4
	Warstw siatkówki	Pasmo grupy karboksylowej tłuszczów	1735	1750-1720	1760-1710	H-4, H-5
Tłuszczów (wielonienasyconych kwasów tłuszczowych)	Błon komórkowych	Pasmo grupy olefinowej	3012	3026-3000	3026-3000	H-4, H-6
Białek	Białek	Pasmo amidowe α – helisa	1655	1662-1652	1806-900	H-1, H-2, H-3, H-4
Złogów amyloidowych	Złogów amyloidowych	Pasmo amidowe arkusze β -	1630	1630-1620	1806-900	H-1, H-2, H-3, H-4
Kreatyny	Złogów kreatyny	Pasmo kreatyny 1390	1390	1410-1384	1410-1384	H-1, H-2
		Pasmo kreatyny 1304	1304	1309-1298	1317-1282	H-1
		Pasmo kreatyny 2800	2800	2809-2787	2820-2760	H-1
Kwasów nukleinowych	Neuronów	Pasmo kwasów nukleinowych	1712	1725-1700	1725-1700	H-4
Kolagenu	Warstw siatkówki	Pasmo kolagenowe 1204	1204	1214-1197	1214-1197	H-4

Analiza widm podczerwieni przedstawionych w publikacjach została wykonana na oryginalnych widmach w podczerwieni w celu uniknięcia wprowadzenia możliwych zniekształceń na skutek przetwarzania widm (na przykład wygładzania).

Liczne zastosowania spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera zostały szczegółowo opisane w cyklu publikacji, między innymi: badanie złogów amyloidowych (H-2, H-3, H-4, H-3), opis warstw neuronów w siatkówce oka na podstawie analizy zawartości nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych (H-4, H-5) i obrazowanie komórek neuronów w hipokampie (H-4).

### **Zastosowanie FTIR do badań nad chorobami neurodegeneracyjnymi**

Badania naukowe z wykorzystaniem FTIR, wykonane przeze mnie, skupiają się na analizie rozkładu trzech rodzajów związków: tłuszczów, złogów kreatyny i złogów amyloidowych.

Mapy rozkładu dla danego związku uzyskiwane są poprzez analizę obszaru pod wybranym pikiem charakterystycznym. Na podstawie danych dostępnych w literaturze i wiedzy osoby przeprowadzającej analizę danych, dobierane i testowane są zakresy dla linii podstawowej i obszaru piku. Ocenę trafności doboru parametrów dokonuje się poprzez testowanie map rozkładów dla danego pasma. Widma o większej intensywności pasma powinny znajdować się w obszarze gdzie skala kolorów na to wskazuje. W przypadku rozbieżności pomiędzy skalą kolorów i wybranymi widmami FTIR w danym obszarze próbki, parametry dobiera się ponownie. Dobór parametrów jest czasochłonny, ale tylko prawidłowo dobrane parametry pozwalają na prawidłową analizę danych. Do doboru parametrów i analizy jakościowej pików opisanych w publikacjach przedstawionych w tym wniosku, wykorzystałam program Omnic/Atłµs (H1-H-5) i Bruker (H4). Mapy rozkładu uzyskane poprzez analizę pasm w podczerwieni charakterystycznych dla tłuszczu nasyconych (maksimum piku:  $2850\text{ cm}^{-1}$ ) pokazują morfologię tkanki centralnego układu nerwowego. Obszar zawierający neurony posiada niską zawartość tłuszczów, natomiast istota biała (wypustki neuronów) jest dużo bogatsza w tłuszcze. Mapy rozkładu dostarczają informacji porównywalnych z tymi, które można otrzymać w wyniku barwień stosowanych do obrazowania istoty białej, na przykład barwienia na mielinę: Luxor Fast Blue (H-1, H-6). Zanik mieliny często towarzyszy procesom neurodegeneracyjnym.

Kreatyna jest małą molekułą, odgrywającą istotną rolę w regulacji metabolizmu. W widmie podczerwieni tkanki zawierającej kreatynę, występują bardzo wyraźne, szpiczaste piki (kreatyna jest w postaci kryształków), które wyróżniają się na tle szerokich pasm pochodzących od makrocząsteczek. Widmo podczerwieni monohydratu kreatyny zostało wykorzystane jako wzorzec w badaniu występowania i rozkładu przestrzennego złogów kreatyny w tkankach OUN (korze ruchowej, rdzeniu kręgowym: korzeniach brzusznych, pniu mózgu) pobranych w czasie autopsji od pacjentów zmarłych na Stwardnienie Zanikowe Boczne i pacjentów nie dotkniętych chorobą neurodegeneracyjną (H-1). Stwardnienie Zanikowe Boczne (SLA) jest nieuleczalnym schorzeniem neurodegeneracyjnym atakującym neurony ruchowe w korzeniach brzusznych rdzenia kregowego, korze i pniu mózgu i powodujące zanik mieliny w drogach korowo-jądrowych. Złogi kreatyny występują w tkankach OUN pochodzących od pacjentów z SLA. Podwyższone miejscowo stężenie kreatyny może być wyznacznikiem chorobowym, wskazującym na zaburzenia metabolizmu lub stan zapalny będący reakcją organizmu na proces chorobowy. W celu zbadania czy złogi kreatyny wykazują brązowe zabarwienie na skutek obecności metali lub ich związków, próbki poddano analizie z wykorzystaniem techniki synchrotronowej rentgenowskiej mikroanalizy fluoroscencyjnej (SRXRF). W tej metodzie w celu uzyskania informacji o ilości i rozkładzie pierwiastków w próbce jest ona przesuwana w polu wiązki wzbudzającej i dla każdego badanego punktu rejestruje się widmo fluorescencyjne. Dla każdego punktu skanu

wyznacza się masy powierzchniowe pierwiastków. W oparciu o wyniki analizy spektralnej i informację o położeniu próbki względem wiązki można sporządzić mapę rozkładu zmierzonych pierwiastków w badanym obszarze. Rozkład podwyższonej zawartości wybranych metali (wapnia, potasu, żelaza, miedzi i cynku) uzyskany w wyniku szczegółowej analizy topograficznej i ilościowej przy wykorzystaniu techniki SRXRF nie pokrywał się z obszarem występowania złogów kreatyny. Korelację wykluczono poprzez nałożenie map rozkładu metali dla wybranego i widocznego pod mikroskopem złogu kreatyny z obrazem mikroskopowym dla badanego obszaru.

Złogi amyloidowe są charakterystyczne dla choroby Alzheimera (AD), która jest schorzeniem neurodegeneracyjnym objawiającym się zaburzeniami i utratą pamięci. Zmiany na poziomie komórkowych obejmują tworzenie się złogów amyloidowych poza ciałem komórek neuronowych i splotków neurofibrilarnych wewnątrz neuronów. Znaczące zmiany zachodzą w obrębie hipocampu już we wczesnych stadiach choroby, dlatego też tkanki pochodzące z hipokampu zostały wybrane do badań nad chorobą Alzheimera (H-2, H-3). Przemiany biochemiczne towarzyszące chorobie Alzheimera są skomplikowane i nie do końca poznane. Wyniki badań opisanych w publikacjach skupiają się na zmianach biochemicznych zachodzących w tkankach mózgowych myszy modelowych dla choroby Alzheimera.

W badaniach wykorzystano dwa modele myszy:

- Myszy typu TgCRND8 (H-2 - H-4), które na skutek dwóch mutacji (Swedish K67ON/M671L in APP i Indiana V717F) wykazują zmiany chorobowe w postaci licznych złogów amyloidowych już w młodym wieku
- Myszy typu 3xTg mice (H-4 – H-6), które na skutek trzech mutacji (Swedish K67ON/M671L in APP, preselin mutation PS1 (M146V) i human four-repeat Tau harboring the P301L) wykazują zmiany chorobowe w postaci złogów amyloidowych i splotków neurofibrilarnych. Ten rodzaj myszy jest wykorzystywany do badań nad metodami leczenia AD.

Dwuwymiarowa analiza FTIR została wykonana w celu wykazania czy zachodzi korelacja przestrzenna pomiędzy złogami amyloidowymi, złogami kreatyny i rozkładem tłuszczów w tkankach OUN myszy modelowych dla choroby Alzheimera (H-2). Analiza wybranych grup funkcyjnych dla tkanek myszy typu TgCRND8 i myszy kontrolnych (bez mutacji) wykazała, że rozkład tłuszczów w obszarze hipokampa nie ulega zmianie w wyniku AD, jako, że nie znaleziono różnic pomiędzy rozkładem uzyskanych w wyniku analizy obszaru pików map rozkładu pomiędzy tkankami pobranymi od zmodyfikowanych genetycznie i kontrolnych myszy na przestrzeni od pięciu do siedemnastu miesięcy. Analiza przekroju głębokościowego została wykonana dla wybranych i bardzo wyraźnie widocznych pod mikroskopem złogów amyloidowych. Podczas przygotowania skrawków tkanki do analizy, skrawki zostały cięte w tej samej płaszczyźnie (równoległe) i ponumerowane w kolejności ich uzyskiwania. Grubość skrawków była znacznie mniejsza niż grubość złogów, dlatego też ten sam złóg występował w kilku kolejnych skrawkach. Mapy FTIR zostały wykonane dla złogów występujących w tym samym obszarze kolejnych skrawków. Obrazy mikroskopowe zostały wykorzystane do wyboru tego samego złogu do obrazowania FTIR w kolejnych skrawkach. Dla każdej mapy rozkładu została przeprowadzona analiza podstawowych pasm w podczerwieni. Obrazy uzyskane w wyniku analizy zostały na siebie nałożone w celu określenia korelacji pomiędzy wybranymi do analizy charakterystycznymi pasmami. Analiza obszaru tkanki zawierającej złogi amyloidowe pokazała, że złogi amyloidowe są otoczone cienką warstwą tłuszczów (o grubości od 30-50 mikrometrów), co może wskazywać na proces zapalny. Położenie złogów

amyloidowych nie pokrywało się z położeniem złogów kreatyny (korelacja obrazów uzyskanych w wyniku analizy rozkładu pików charakterystycznych dla złogów amyloidowych i kreatyny). Liczba złogów kreatyny wzrasta z wiekiem myszy modelowych dla choroby Alzheimera. W przypadku myszy kontrolnych, wykryto tylko nieliczne i mniejsze złogi u starszych osobników, co sugeruje, że nieznacznie podwyższony poziom kreatyny może być związany z normalnym procesem starzenia.

Podwyższony poziom kreatyny, powodujący powstawanie złogów może pochodzić z wnętrza komórek lub z ich otoczenia. Jest możliwe, że kreatyna zostaje uwolniona podczas gdy tkanka ulega zamrożeniu lub/i jest cięta na skrawki. Wydłużone i rozgałęzione złogi kryształków kreatyny mogą się tworzyć w trakcie wysychania skrawków tkanki po przygotowaniu. U myszy modelowych, złogi kreatyny znajdują się głównie w istocie szarej, natomiast w tkankach pochodzących z autopsji (SLA) większe złogi znajdują się w istocie szarej, ale istota biała także je zawiera (H-1). Duże złogi kreatyny występują w tkankach z obszarów gdzie znajdują się neurony ruchowe zanikające w SLA (rdzeniu kregowym, pniu i korze mózgu), ale nie w innych badanych obszarach (hipokamp i substancja czarna) czy w tkankach kontrolnych. Tylko nieliczne, małe (jak kropki) złogi zostały znalezione w tkankach kontrolnych.

Obecność złogów kreatyny została potwierdzona w próbkach pobranych w czasie autopsji od pacjentów zmarłych na Stwardnienie Zanikowe Boczne jak również w tkankach mózgow myszy modelowych dla choroby Alzheimera (H-1, H-2), co wskazuje na to, że podwyższony poziom kreatyny może być markerem procesów neurodegeneracyjnych.

### **Uwzględnienie złożoności pasm w podczerwieni**

Zrozumienie pochodzenia pasm w widmie spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera ma kluczowe znaczenie dla analizy danych. Pasma amidowe I jest obecne w większości widm próbek biologicznych wykonanych techniką FTIR lub Ramana. To szerokie i złożone pasmo przypisuje się różnym drganiom szkieletu białkowego. Zawiera ono informacje o konformacji białka i jego otoczeniu zapisaną w położeniu pików związanych z różnymi strukturami drugorzędowymi białka. Przy analizie widm tkanek biologicznych ważne jest, aby pamiętać, że pasmo amidowe jest sumą pików pochodzących z oscylacji każdej grupy amidowej, w polu widzenia mikroskopu w podczerwieni, pochodzącej od każdego białka oraz innych makromolekuł zawierających tą grupę funkcyjną.

Biocząsteczki są trudne do modelowania ze względu na ich rozmiar. Zrozumienie, w jaki sposób pasmo amidowe I wygląda dla prostego białka o strukturze drugorzędowej alfa czy beta jest potrzebne w celu poprawnej analizy widm i określenia struktury drugorzędowej bardziej złożonych białek. Cząsteczki posiadają energię, która jest sumą energii wynikających z różnych form ruchu molekuly i podlega ograniczeniom kwantowym. W przypadku spektroskopii w podczerwieni energie rotacji i oscylacji odgrywają główną rolę. Dla próbek stałych wykorzystanych w opisanych badaniach rotacje molekuł są zahamowane przez wzajemne oddziaływania cząsteczek. Absorpcja promieniowania IR przez drgające cząsteczki powoduje wzbudzenie stanów oscylacyjnych w wyniku czego otrzymujemy widmo oscylacyjne. W celu obliczenia częstotliwości drgań wykorzystuje się model molekularnego oscylatora harmonicznego lub anharmonicznego. W modelu oscylatora anharmonicznego zmiany ulegają reguły wyboru. Możliwa jest zmiana kwantowej liczby oscylacji nie tylko o  $\Delta v = \pm 1$ , ale również przejścia, dla których  $\Delta v$  zmienia się o  $\pm 2$ ,  $\pm 3$ ,  $\pm 4$  itd. Przejścia absorpcyjne z poziomu 0, przy którym kwantowa liczba oscylacji zmienia się o 1, nosi nazwę tonu podstawowego. Przejścia, dla których  $\Delta v$  zmienia się o 2, 3, 4 itd., noszą nazwę,

odpowiednio, pierwszego, drugiego i trzeciego nadtonu. Dozwolone wartości energii skwantowanych poziomów oscylacyjnych wynikają z rozwiązania równania Schrödingera. Metoda obliczeń Hartree-Focka jest wykorzystywana do przybliżonego rozwiązywania równania Schrödingera dla układów wielu ciał (tutaj cząsteczek składających się z wielu atomów). Oblicza się w niej energię i funkcję falową stanu podstawowego układu wykorzystując model oscylatora harmonicznego i metody iteracyjne. Wygląd i zachowanie pasma amidowego przy wykorzystaniu modelowania komputerowego (obliczeń Hartree-Focka B3LYP / 6-31) zostało zbadane dla aminokwasów złożonych z 2-9 peptydów glicyny ułożonych w łańcuchu prostym,  $\alpha$ -helisy, równoległe i anty-równoległych arkuszy  $\beta$  (H-3). Obliczenia wykonano przy pomocy programu Gaussian03, wybierając B3LYP / 6-31 w celu dobrania optymalnych parametrów geometrii i obliczenia położenia i intensywności pasm w podczerwieni. W celu uwzględnienia polaryzacji w obliczeniach, dodatkowy orbital d został dodany dla cięższych atomów (węgla, azotu i tlenu). Parametry początkowe cząsteczek dobrano dla geometrii charakterystycznych dla poszczególnych struktur drugorzędowych nie nakładając ograniczeń na długości wiązań, kąty pomiędzy wiązaniami i kąty torsyjne. Ze względu na dużą liczbę stopni swobody dla cząsteczek zdudowanych z licznych atomów obliczenia były czasochłonne, ale brak urojonych częstotliwości (ang. imaginary frequencies) potwierdził, że obliczenia doprowadziły do uzyskania modelowych cząsteczek w stanie podstawowym. Widma modelowe uzyskano w programie Mathcad 13. Każda częstotliwość została przybliżona krzywą Lorentza, z maksimum dla obliczanej według równania poniżej częstotliwości:

$$Lor(x, y) = \frac{y}{4 \left( \frac{x}{w} \right)^2 + 1}$$

gdzie,  $y$  = intensywność pasma w  $\text{km} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,  $x$  = energia w  $\text{cm}^{-1}$  i  $w = 20 \text{ cm}^{-1}$  szerokość połowkowa piku. Obliczone wartości energii były wyższe niż wartości uzyskane eksperymentalnie dla próbek biologicznych ze względu na wykorzystanie w modelu oscylatora harmonicznego (tylko przejścia podstawowe są brane pod uwagę). Oscylator anharmoniczny lepiej przybliża poziomy energetyczne, uwzględniając nadtony, ale obliczenia byłyby bardziej skomplikowane i jeszcze bardziej czasochłonne. Poszczególne piki dodano w celu uzyskania modelowego pasma amidu I. Każdy peptyd o liczbie aminokwasów równej  $n$ , posiada  $n$  drgań podstawowych. Drgania amidu I zostały wyizolowane na podstawie energii drgania i przemieszczenia. Intensywność drgań uzyskuje się poprzez różniczkowanie funkcji falowej.

Zmiana momentu dipolowego całej cząsteczki daje początek drganiom w podczerwieni. Dla prostego łańcucha aminokwasów najbardziej intensywne drganie jest zawsze asymetryczne i powstaje w wyniku drgań rozciągających grupy karbonylowej. Wszystkie atomy tlenu przemieszczają się w tym samym kierunku, powodując największą zmianę w momencie dipolowym cząsteczki. Intensywność tego drgania zwiększa się dla peptydów o większej liczbie aminokwasów (a tym samym grup karbonylowych). Drganie o najmniejszej intensywności jest drganiem symetrycznym i powstaje, gdy atomy tlenu przemieszczają się w przeciwnych kierunkach (zmiana momentu dipolowego jest mniejsza). Dla struktury drugorzędowej beta, położenie grup karbonylowych w poszczególnych łańcuchach jest podobne jak w łańcuchu prostym i dlatego najintensywniejsze pasmo jest asymetryczne. Dla alfa helisy najintensywniejsze drganie jest symetryczne, ponieważ tlenu grup karbonylowych są odchylone i wykonują ruch precesyjny wokół głównej osi cząsteczki. Intensywność pików zależy nie tylko od liczby aminokwasów ale od rozkładu przestrzennego atomów w cząsteczce i stabilizujących je wiązań (w przypadku białek wiązania wodorowe odgrywają znaczną rolę).



Widma w podczerwieni tkanek są o wiele bardziej skomplikowane a kształt i intensywność pasma amidu I zależy od struktury drugorzędowej białka. Stosując wiele uproszczeń, przy analizie widm tkanek biologicznych, pasmo o maksimum przy  $1662-1650\text{ cm}^{-1}$  jest przypisywane helisie alfa a pasmo przy  $1640-1620\text{ cm}^{-1}$  jest przypisywane arkuszom beta. Teoretyczne (obliczona dla peptydów glicyny) i eksperymentalne (dane zebrane dla tkanek OUN metodą FTIR i FTP-FTIR) wyniki zostały porównywane. Do analizy wykorzystano tylko dobrej jakości FTIR widma tkanek (bez zniekształcenia widm na skutek rozpraszania). Z punktu widzenia moich badań, dyskusja na temat drugorzędowej struktury białka w złożach amyloidowych w modelu myszy TgCRND8 jest najbardziej interesująca. Trzeba być bardzo ostrożnym podczas analizy próbek biologicznych i brać pod uwagę z jaką rozdzielczością (wielkością piksela) widma zostały zarejestrowane. Zbyt niska rozdzielczość może spowodować rozmycie informacji o strukturze drugorzędowej białka (na przykład dla arkuszy  $\beta$ ), gdy obrazowany obszar jest większy i tym samym zawiera większą ilość białek.

### **Osiągnięcie rozdzielczości przestrzennej pozwalającej na badanie pojedynczych komórek**

Czynniki, które wpływają na jakość analizy danych obejmują: fizyczny rozmiar próbki, heterogeniczność tkanek, skład chemiczny i molekularne różnice konformacji między różnymi regionami próbki lub pomiędzy próbkami patologicznych i kontrolnymi oraz obecność w widmie wyraźnych, charakterystycznych pików. Każde widmo FTIR tkanki ludzkiej lub zwierzęcej OUN jest sumą widm niezliczonej ilości składników. Im większy rozmiar pikseli, tym większy obszar, z którego widmo zebrano, dlatego większy rozmiar piksela zwiększa prawdopodobieństwo, że widmo będzie zawierać informację pochodzącą z większej liczby struktur komórkowych. Detektor ogniskowej matrycy (ang. Focal Plane Array, FPA) to detektor pozycjoczuły, który pozwala na szybkie zbieranie danych przy użyciu matrycy zbudowanej z  $64 \times 64$  pikseli o rozmiarze piksela od 8 do 25 mikrometrów kwadratowych. W przypadku gdy obrazy mikroskopowe tkanek nie są wystarczające, aby ustalić, który obszar próbki tkanki zawiera żądane informacje, analiza większego obszaru próbki przy użyciu detektora ogniskowej matrycy jest zalecana w celu wybrania obszaru do szczegółowej analizy. Ze względu na dłuższy czas potrzebny na obrazowanie próbki z większą rozdzielczością, obszar do szczegółowej analizy powinien być starannie wybrany.

Spektrometry FTIR wykorzystujące promieniowanie synchrotronowe jako źródło promieniowania podczerwonego (sFTIR) umożliwiają obrazowanie przy użyciu mniejszych pikseli (zwykle rzędu 5 do 8 mikrometrów kwadratowych). Wyższa rozdzielczość przestrzenna dla sFTIR jest możliwa, ponieważ promieniowanie synchrotronowe jest dużo jaśniejsze i intensywniejsze, dlatego jego wykorzystanie pozwala na gromadzenie danych z mniejszego obszaru (określonego przez wielkość przysłony/ piksela) przy zachowaniu wystarczającej intensywności widma (signal- to-noise ratio) bez zbytecznego wydłużenia czasu obrazowania.

Linia podczerwieni wybudowana w Centrum Synchrotronowym w Madison, Wisconsin i nazwana IRENI (InfraRed ENvironmental Imaging) jest pierwszym urządzeniem do obrazowania, które łączy dwanaście wiązek promieniowania synchrotronowego w celu równomiernego oświetlenia dużego obszaru próbki. Umożliwia ono obrazowanie przy użyciu detektora ogniskowej matrycy zawierającego  $128 \times 128$  pikseli o wielkości piksela  $0,54 \times 0,54$  mikrometrów kwadratowych (H -4). W tym wypadku, rozmiar piksela jest mniejszy niż rozmiar większości komórek w tkance ośrodkowego układu nerwowego, co oznacza, że IRENI stwarza możliwość obrazowania z rozdzielczością przestrzenną pozwalającą na badanie pojedynczych komórek. Czas pomiaru IRENI jest  $10^4$  krótszy niż można osiągnąć z wykorzystaniem detektora ogniskowej matrycy w spektrometrach wykorzystujących nie

synchrotronowe źródła promieniowania w podczerwieni. Charakterystyczne widma absorpcji w podczerwieni pochodzące ze wszystkich składników tkanki są wykrywane jednocześnie dla każdego piksela i dostarczają informacji o tkance bez konieczności jej wybarwienia.

Widma podczerwieni zostały zarejestrowane z rozdzielczością 0,54 na 0,54 mikrometrów kwadratowych tkanek hipokampu i kory mózgowej dwóch modeli myszy (3xTg i TgCRND8) a także siatkówki myszy kontrolnej. Po raz pierwszy, można było określić położenie pojedynczych ciał komórek nerwowych. Dane zebrane przy użyciu innych spektrometrów wyposażonych w detektor ogniskowej matrycy mogą określić tylko ogólną lokalizację grupy neuronów. Nowy, wcześniej niewidoczny, pik z maksimum przy  $1390\text{ cm}^{-1}$ , został odkryty z wykorzystaniem IRENI. Ten pik jest charakterystyczny dla złogów amyloidowych. Pasma amidu, tradycyjnie wykorzystywane do obrazowania złogów amyloidowych posiada maksimum przy  $1630\text{ cm}^{-1}$ , i jest często zniekształcone gdyż złogi amyloidowe mają dużą gęstość i powodują rozpraszanie w tym obszarze widma, zaś pik przy  $1390\text{ cm}^{-1}$ , znajduje się w obszarze widmowym, który nie jest tak wrażliwy na rozpraszanie. Na skutek zwiększenia rozdzielczości przestrzennej, charakterystyczna otoczka tłuszczowa została wykryta wokół złogów amyloidowych (jak wcześniej pokazano w H-2), lecz tym razem potwierdzono, także obecność niewielkiej ilości tłuszczów wewnątrz złogów amyloidowych. Pasma w podczerwieni charakterystyczne dla kwasów nukleinowych ( $1712\text{ cm}^{-1}$ ) było wyraźnie widoczne w indywidualnych widmach zarejestrowanych wewnątrz ciał neuronów.

Wybór detektora i rozdzielczości przestrzennej zależy od rodzaju badań a często także od ich etapu. Mapy rozkładu dla większych obszarów są wykonywane przy pomocy detektora ogniskowej matrycy (rozmiar piksela około  $20 \times 20$  mikrometrów kwadratowych) i są bardzo użyteczne na początkowym etapie badań lub kiedy całościowy rozkład przestrzenny danego związku (piku) jest ważny. Po wstępnej analizie, bardziej szczegółowe informacje są uzyskiwane dla mniejszych obszarów próbki przy lepszej rozdzielczości przestrzennej (rozmiar piksela od  $5 \times 5$  mikrometrów kwadratowych do  $10 \times 10$  mikrometrów kwadratowych). Wykorzystanie detektora ogniskowej matrycy pozwala na skrócenie czasu pomiarów. W przypadku gdy celem badań jest wykrywanie różnic na poziomie komórkowym lub wewnątrz komórki, rozmiar piksela nie powinien być większy niż  $1 \times 1$  mikrometrów kwadratowych, co umożliwia linia pomiarowa IRENI. Obrazowania przy użyciu wielu różnych, uzupełniających się metod, zazwyczaj przynosi najlepsze efekty.

### **Przygotowywanie i przechowywanie próbek do analizy w wykorzystaniem FTIR**

Jakość widma FTIR zawsze zależy od jakości próbki, a rozdzielczość przestrzenną należy dobrać zależnie od celu doświadczenia. Przygotowanie próbki zmienia się w zależności od celu doświadczenia i zastosowanej techniki. Zbieranie danych z wykorzystaniem FTIR odbywa się na nieutralizowanych, zamrożonych natychmiast po pobraniu skrawkach tkanek, co pozwala na jednoczesne wykrywanie wielu składników tkanek, w tym metabolitów, które byłyby wymyte z tkanki w trakcie przygotowania do barwienia lub utrwalenia próbki. Próbki przeznaczone do mikro-obrazowania są pobierane podczas sekcji zwłok (w przypadku ludzkich tkanek). W przypadku mysich modeli choroby Alzheimera mózgi są pobierane po uśpieniu myszy. W obu przypadkach tkanki zostają zamrożone natychmiast po pobraniu, przechowywane w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ , cięte na skrawki, które są umieszczane na odpowiednim podłożu. Dla próbek do obrazowania w trybie transmitancji, podłoże musi być przepuszczalne dla promieniowania podczerwonego. Dla próbek do obrazowania w trybie transreflektancji są używane pokryte złotem szkiełka mikroskopowe lub odbijające promieniowanie podczerwone slajdy. Skrawki tkanek nie mogą być zbyt grube lub zbyt cienkie. W pierwszym przypadku, tkanka silnie pochłania promieniowanie IR. Poza tym widma nie byłyby zebrane wyłącznie w

obszaru widocznego na powierzchni tkanki (rozmiar pikseli byłby znacznie mniejszy od grubości próbki). W drugim przypadku natężenie widma byłoby zbyt niskie. Gdy skrawek jest bardzo cienki, bardzo trudno jest umieścić go na podłożu bez przerwania lub pofałdowania. Z mojego doświadczenia optymalna grubość skrawka powinna wynosić od ośmiu do dziesięciu mikrometrów.

Przy badaniu próbek biologicznych trzeba zdawać sobie sprawę, że przechowywanie próbek może mieć wpływ na wyniki pomiarowe, zwłaszcza kiedy tkanki przeznaczane do badań zawierają związki biologiczne, które mogą być łatwo utlenione, takie jak wielonienasycone kwasy tłuszczowe (zawierające olefinową grupę funkcyjną  $C = C - H$ ). Seria eksperymentów (H-5) została przeprowadzona w celu oceny wpływu przygotowywania i przechowywania próbki na obrazowanie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Nienasycone kwasy tłuszczowe występują na przykład w błonach komórkowych siatkówki i mózgu. Próbki tkanek mysich mózgow i siatkówki przechowywano w trzech różnych warunkach:

- 1) Próbki przechowywano w  $-70^{\circ}C$  przez krótki okres czasu (tydzień) oraz dłuższy okres czasu (8 miesięcy)
- 2) Świeżo przygotowane próbki obrazowano przed, w trakcie i po ekspozycji na 4 cykle (24h) światła słonecznego
- 3) Świeżo przygotowane próbki obrazowano przed, w trakcie i po przechowywaniu w ciemności w temperaturze pokojowej przez 12 h, 3, 7, 15, 31 i 72 dni.

Dwuwymiarowe mapy rozkładów dla piksu z maksimum przy  $3012\text{ cm}^{-1}$  i piksu grupy karbonylowej z maksimum przy  $1750\text{ cm}^{-1}$  (Tabela.1) zostały przygotowane w celu oceny wpływu utlenienia na tkankę. Zgodnie z oczekiwaniami, pozostawienie próbek w świetle słonecznym (nawet przez szybę i bez promieniowania UV) spowodowało utlenienie tkanki po 24 godzinach. Po czterech dniach, pik z maksimum przy  $3012\text{ cm}^{-1}$  nie był już widoczny a wysokość piksu grupy karbonylowej uległa zmniejszeniu. Próbki przechowywane w temperaturze  $-70^{\circ}C$  przez dłuższy okres czasu i próbki przechowywane w ciemności w temperaturze pokojowej, zostały utlenione, ale w znacznie mniejszym stopniu. Na podstawie obserwacji opisanych w H-5, zaleca się obrazowanie próbek tak szybko jak to możliwe po ich przygotowaniu. Jeśli próbki muszą być przechowane, powinny być przechowane w ciemności przez okres czasu nie dłuższy niż miesiąc. Wyżej opisane metody przygotowania i przechowywanie próbek umożliwiają dokładniejszą ocenę zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w tkankach biologicznych z wykorzystaniem FTIR.

### **Obrazowanie mózgow *in vivo* w porównaniu z obrazowaniem tkanek *ex vivo*.**

Obrazowanie z wykorzystaniem FTIR posiada liczne zalety i jest bardzo wydajne w badaniach wyglądu i rozkładu zmienionych strukturalnie białek lub klasyfikacji stadium chorobowego, ale można je stosować tylko w próbkach tkanki pochodzących z biopsji lub autopsji. Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (MRI) jest techniką nieinwazyjną i umożliwia obrazowanie żywych organizmów (łac. *in vivo*).

Większość aparatów do MRI wykorzystuje do obrazowania sygnał pochodzący z jąder atomu wodoru ( $^1H$ , spin =  $\frac{1}{2}$ ). Ruch obrotowy protonu wokół własnej osi powoduje powstanie magnetycznego momentu dipolowego. W obecności silnego zewnętrznego pola magnetycznego o natężeniu  $B_0$  momenty magnetyczne jąder wodoru ustawiają się równolegle do linii pola, zgodnie z jego kierunkiem (niższy poziom energetyczny) lub w przeciwnym kierunku (wyższy

poziom energetyczny). Własności spinów są zwykle opisywane przez mechanikę kwantową, jednak w wypadku opisu zachowania dużej liczby protonów, jak w przypadku rezonansu magnetycznego, opis z punktu widzenia klasycznej mechaniki jest stosowany. Ruch wektora momentu magnetycznego protonu w silnym polu magnetycznym jest ruchem precesyjnym wokół linii pola z częstotliwością  $\omega_0$ , nazywaną częstotliwością Larmora ( $\vec{\omega}_0 = -\gamma\vec{B}_0$ , gdzie  $\gamma$  jest współczynnikiem giromagnetycznym, charakterystycznym dla danego jądra a  $\vec{B}_0$  indukcją zewnętrznego pola magnetycznego). Współczynnik giromagnetyczny może być też wyrażony w Hz/s·T zamiast w radianach/s·T ( $\bar{\gamma} = \frac{\gamma}{2\pi}$ ). Dla atomu wodoru wynosi on  $\bar{\gamma} = 42,58 \frac{\text{MHz}}{\text{s}} \cdot T$ , co przy wielkości indukcji magnetycznej wykorzystanej w badaniach mózgowi myszy 7T daje częstotliwość Larmora równą 300 MHz. Rozkład Boltzmana opisuje prawdopodobieństwo dwóch ustawień spinów w polu magnetycznym. W temperaturze pokojowej liczba spinów na niższym poziomie energetycznym jest nieznacznie większa i wektor namagnesowania układu (suma wektorów magnetycznego momentu dipolowego)  $\vec{M}$  jest różny od zera. W opisie rezonansu magnetycznego stosuje się trójwymiarowy układ odniesienia obracający się z częstotliwością Larmora, w którym precesja wektora namagnesowania układu odbywa się wokół osi z. Wprowadzenie dodatkowego słabszego pola magnetycznego (radioimpulsu,  $\vec{B}_1$ ) o częstotliwości równej częstotliwości Larmora i prostopadłego do linii silnego pola  $\vec{B}_0$ , powoduje odchylenie wektora namagnesowania o kąt  $\alpha$  (kąt pomiędzy osią z i kierunkiem wektora namagnesowania). Powracające do pierwotnego położenia spiny powodują zmianę natężenia pola magnetycznego w czasie. Zmiana strumienia indukcji magnetycznej w cewce rejestrującej sygnał, powoduje indukcyjnie sinusoidalnie zmieniającego się w czasie napięcia, zgodnie z prawem Faradaya. Rejestrowany sygnał zaniku swobodnej precesji (ang. Free Induction Decay, FID) zanika na skutek procesów relaksacyjnych. Przebieg procesów relaksacyjnych zależy od otoczenia, w którym atomy wodoru się znajdują i ich liczby a tym samym od rodzaju tkanki, jej składu i struktury. Sygnał jest zwykle silniejszy w tkankach zawierających większą ilość wody, dlatego też MRI jest techniką posiadającą przewagę nad innymi metodami obrazowania przy uzyskiwaniu kontrastu dla tkanek miękkich. W obrazowaniu mózgu rozróżnienie pomiędzy istotą szarą, białą i płynem mózgowo rdzeniowym jest możliwe dzięki różnicy w ich zawartości wody i składzie chemicznym. Wyróżniamy dwa typy relaksacji. Relaksacja podłużna, zachodząca na skutek przekazania energii pomiędzy spinami i otoczeniem (ang. spin-lattice), charakteryzuje się stałą czasową  $T_1$ . Relaksacja poprzeczna, zachodząca na skutek oddziaływania pomiędzy spinami (ang. spin-spin), charakteryzuje się stałą czasową  $T_1$  i  $T_2$ . Stałe czasowe są charakterystyczne dla danego rodzaju tkanki. Płyn mózgowo-rdzeniowy zawierający duże ilości wody, ma długą stałą czasową  $T_1$  (tony podstawowe, ang. natural motional frequencies mają częstotliwości wyższe niż częstotliwość Larmora) i długą stałą czasową  $T_2$  (odległości między protonami nie sprzyjają oddziaływaniom pomiędzy spinami). Istota biała, bogata w tłuszcze posiadające liczne atomy wodoru blisko położone ma krótką stałą czasową  $T_1$  (tony podstawowe, mają częstotliwości niższe niż częstotliwość Larmora) i krótką stałą czasową  $T_2$  (odległości między protonami sprzyjają oddziaływaniom między spinami). W zależności od doboru metody obrazowania, w tym czasu zastosowania i rodzaju radioimpulsów, kontrast może być uzyskany na kilka różnych sposobów. Wyróżniamy na przykład obrazy  $T_1$ - zależne (ang.  $T_1$  weighted),  $T_2$ - zależne (ang.  $T_2$  weighted), obrazowanie dyfuzyjne (ang. Diffusion tensor imaging). W zależności od czasu trwania radioimpulsu i natężenia pola  $\vec{B}_1$ , może on powodować odchylenie

$\vec{M}$  o różny kąt  $\alpha$ . Najczęściej wykorzystywane są radioimpulsy o kącie  $\alpha = 90^\circ$  ( $\pi/2$ , spiny są całkowicie odchylone w płaszczyźnie x, y, poprzeczna składowa wektora magnetyzacji jest największa) lub  $\alpha = 180^\circ$  ( $\pi$ , wykorzystywany do przywrócenia spójności w fazie, ang. refocusing pulse). W sekwencji impulsowej echa, stosuje się najpierw impuls  $\pi/2$ . Z powodu niejednorodności pola magnetycznego pojawiają się różnice w fazie (FID zanika szybciej, stała czasowa  $T_2^*$  słabszy sygnał). Po opóźnieniu czasowym  $\tau$  stosuje się impuls  $\pi$ , który odwraca fazę spinów i powoduje zwiększenie ich spójności. Sygnał echa rejestrowany po czasie TE, ang. echo time ma intensywność zależną od stałej czasowej  $T_2$  nie  $T_2^*$ . Sekwencję powtarza się po czasie TR (ang. repetition time). Dobór czasu TR wpływa na zależność obrazu od  $T_1$ , natomiast TE na zależność od stałej czasowej  $T_2$ . Dla krótkich stałych czasowych TR i TE, kontrast jest  $T_1$ - zależny, dla długich stałych czasowych TR i TE kontrast jest  $T_2$ - zależny. W obrazie z kontrastem  $T_1$ - zależnym, czas TE jest krótki a istota biała ma najkrótszą stałą czasową  $T_1$  i najintensywniejszy sygnał. Istota szara ma dłuższą stałą czasową  $T_1$  i jest ciemniejsza, płyn mózgowo-rdzeniowy na najdłuższą stałą czasową  $T_1$  i jest prawie czarny na obrazach. Jeśli największy kontrast wymagany jest pomiędzy istotą białą i szarą, wartość TR powinna być tak dobrana by była większa niż  $T_1$  dla istoty białej i mniejsza niż  $T_1$  dla istoty szarej. W obrazie z kontrastem  $T_2$ - zależnym, czas TR jest długi a istota biała ma najkrótszą stałą czasową  $T_2$  i jest najciemniejsza. Istota szara ma dłuższą stałą czasową  $T_2$  i jest jaśniejsza, płyn mózgowo-rdzeniowy na najdłuższą stałą czasową  $T_2$  i jest prawie biały na obrazach. Jeśli największy kontrast wymagany jest pomiędzy istotą białą i szarą, wartość TE powinna być tak dobrana by była większa niż  $T_2$  dla istoty białej i mniejsza niż  $T_2$  dla istoty szarej.

W celu określenia z którego obszaru w mózgu pochodzi sygnał, stosuje się pola magnetyczne w trzech prostopadłych kierunkach (x, y, z) dla których natężenie pola zmieniają się liniowo w zależności od pozycji w danym kierunku. Pola te nazywa się gradientami ( $G_x$ ,  $G_y$  i  $G_z$ ). Zwykle gradient  $G_z$  jest wykorzystywany do wyboru płaszczyzny obrazowania a gradienty  $G_y$  i  $G_x$  do kodowania fazy i częstotliwości w przestrzeni k. Po zarejestrowaniu sygnału powstaje obraz zapisany w przestrzeni k (osie odpowiadają częstotliwości i fazie). Za pomocą transformacji Fouriera uzyskuje się obraz w przestrzeni dwuwymiarowej (xy). Niejednorodność pola magnetycznego powoduje asymetrię w przestrzeni k. W celu poprawienia jakości obrazów wykorzystuje się sekwencję spinową echa opisaną powyżej.

MRI jest metodą powszechnie stosowaną w obrazowaniu diagnostycznym u ludzi, ale istnieje także zapotrzebowanie na metody obrazowania MRI przeznaczone dla mysich modeli, stosowanych do badania chorób człowieka. MRI daje możliwość wielokrotnych pomiarów tego samego zwierzęcia w różnych stadiach choroby, co umożliwia śledzenie charakterystycznych zmian w czasie postępu choroby i testowanie nowych metod leczenia. Badania nad modelem myszy dla choroby Alzheimera (3xTg) kontynuowałam z wykorzystaniem MRI.

Złogi amyloidowe, charakterystyczne dla choroby Alzheimera, nie są obecne u wszystkich pacjentów, a ich pojawienie może też nastąpić w późnym stadium choroby, kiedy żadne leki nie będą już skuteczne. Ponadto złogi amyloidowe są trudne do wykrycia w badaniu, ze względu na ograniczoną rozdzielczość przestrzenną tej metody obrazowania. Dlatego też ważne są badania mające na celu znalezienie wczesnych zmian chorobowych, które będą łatwiejsze do wykrycia. Celem badań opisanych w publikacji H- 6 były pomiary zmiany w

istocie białej mózgu u modelu myszy (3xTg) w celu ustalenia, czy zmiany w istocie białej poprzedzają zmiany w istocie szarej, jak to było wcześniej sugerowane<sup>2</sup>.

Zastosowano dwie metody obrazowania rezonansu magnetycznego: Obrazowanie Tensora Dyfuzji (ang. Diffusion Tensor Imaging – DTI) z wykorzystaniem sekwencji MRI umożliwiającej szybsze rejestrowanie sygnału (ang. Echo Planar Imaging) i obrazy sekwencją RARE (Rapid Imaging with Refocused Echoes, podobną do sekwencji impulsowej echa, ale wykorzystującej liczne impulsy  $\pi$  w celu szybszej rejestracji sygnału, ponieważ dana dla licznych przestrzeni  $k$  mogą być rejestrowane w tym samym czasie) dla uzyskania obrazów  $T_2$ -zależnych. Metoda obrazowania Tensora Dyfuzji jest wrażliwa na ograniczenie dyfuzji i służy do obrazowania połączeń (pasm istoty białej) w różnych regionach mózgu, podczas gdy obrazy  $T_2$ -zależne pokazują gęstość lipidów, która jest proporcjonalna do gęstości atomów wodoru. Im większa gęstość atomów wodoru, tym krótsza stała czasowa  $T_2$ ).

Obrazowanie Tensora Dyfuzji (DTI) pokazuje gdzie dyfuzja wody jest ograniczona. W tkankach, dyfuzja jest ograniczona ze względu na zgrupowanie komórek i składników pozakomórkowych. Dyfuzja w tkankach, takich jak istota biała jest anizotropowa, w związku z ograniczającą dyfuzję wody orientacją aksonów i otaczającą je wielowarstwą osłonką mielinową. Anizotropia dyfuzji oznacza, że każdy element obrazu z obszaru zawierającego istotę białą ma różne szybkości dyfuzji wzdłuż różnych kierunków w przestrzeni. W związku z anizotropią, natężenie sygnału danego elementu będzie różne w zależności od kierunku, w którym zadziała pole magnetyczne wzbudzające sygnał rezonansu (gradient). W celu określenia stopnia i kierunku dyfuzji stosuje się następujące parametry: średni współczynnik dyfuzji (ang. mean diffusivity ( $\langle D \rangle$ )), który jest czuły na globalne zmiany w dyfuzji wody i zmiany w przestrzeni pozakomórkowej; podłużny współczynnik dyfuzji (ang. axial diffusivity ( $\lambda_{\parallel}$ )), poprzeczny współczynnik dyfuzji (ang. radial diffusivity ( $\lambda_{\perp}$ )), i współczynnik określający stopień dyfuzji (ang. fractional anisotropy (FA)) równy zero dla układów izotropowych (dyfuzja zachodzi we wszystkich kierunkach) i jedności dla układów anizotropowych (dyfuzja zachodzi w jednym kierunku). Matematycznie, anizotropia dyfuzji jest opisywana przez symetryczny tensor o wymiarach 3 na 3. Dogodnym uproszczeniem matematycznej postaci jest obliczenie anizotropii dyfuzji na podstawie stosunku szybkości dyfuzji równoległej ( $\lambda_{\parallel}$ ) i prostopadłej ( $\lambda_{\perp}$ ) do orientacji włókien mielinowych. W pasmach substancji białej, ten stosunek powinien wynosić od około 2 do 10. Na podstawie badań, stwierdzono, że anizotropia dyfuzji w istocie białej ludzkiego mózgu wynosi około 3, natomiast w istocie szarej około 1 (istota szara jest prawie izotropowa).

Obrazowanie Tensora Dyfuzji (DTI) umożliwia wizualizację pasm istoty białej w dwóch i trzech wymiarach. Metoda ta może też być stosowana do badania integralności tkanki. W istocie białej ze zdrowymi aksonami, dyfuzja zachodzi głównie równoległe do włókien aksonów i dlatego wartości  $\lambda_{\parallel}$  i FA są większe niż dla istoty szarej a wartości  $\lambda_{\perp}$  mniejsze niż dla istoty szarej. W wyniku zaniku mieliny, ograniczenie dyfuzji do kierunku równoległego do aksonów jest mniejsze. W związku z tym następuje zmniejszenie wartości  $\lambda_{\parallel}$  i FA i zwiększenie wartości  $\lambda_{\perp}$ . W przypadku badania *in vivo* małych mózgow myszy i wymaganej wysokiej rozdzielczości, pomiary DTI mogą być zbyt powolne. Wykorzystanie sekwencji MRI

---

<sup>2</sup> Desai MK et al. (2009) Triple-transgenic Alzheimer's disease mice exhibit region-specific abnormalities in brain myelination patterns prior to appearance of amyloid and tau pathology. *Glia* 57(1):54-65

umożliwiającej szybsze rejestrowanie sygnału (ang. Echo Planar Imaging) pozwala na szybsze pomiary i umożliwia zastosowanie co najmniej siedmiu kierunków pola magnetycznego wzbudzającego sygnał rezonansu i tym samym możliwym staje się obliczenie tensora dyfuzji.

Obie techniki (RARE i DTI, szczegóły w H-6) wykorzystano do cyklicznego obrazowania mózgow myszy co dwa tygodnie (łac. *in vivo*) oraz analizy utrwalonych mózgu (łac. *ex vivo*). Do obrazowania wybrano pasma istoty białej, łatwe do wyróżnienia na obrazach MRI ze względu na swój rozmiar: ciało modzelowate (łac. *corpus callosum*) i sklepienie (łac. *fornix*).

Uzyskane metodą MRI obrazy są analizowane za pomocą różnych metod analitycznych. W moim przypadku obliczane były objętości ciała modzelowatego i sklepienia (metody T<sub>2</sub>-zależne) a w przypadku DTI współczynniki charakteryzujące dyfuzję opisane powyżej dla każdego voksela. Wykorzystano programy Matlab® i Amira. Obliczono średnie wartości i ich odchylenia standardowe współczynników dla vokseli w obszarze ciała modzelowatego i sklepienia.

Wykorzystano standardowe barwienia i barwienia z użyciem przeciwciał (do wykrywania zmian w konformacji białek, obecności złogów amyloidowych i skrętek białkowych) w celu zapewnienia, że jakiegokolwiek zmiany istoty białej zostaną wykryte, nawet jeśli nie byłyby widoczne na obrazie MRI. Po szczegółowej analizie wyników uzyskanych za pomocą metody DTI i T<sub>2</sub> opisanych powyżej nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian pomiędzy modelowymi myszami i grupą kontrolną. Testy statystyczne wykonano przy pomocy programu SAS® 9.3. Przy pomocy analizy dwuskładnikowej ANOVA testowano zależność objętości, stosunek sygnału do szumu i parametry tensora dyfuzji dla wybranych obszarów mózgu dla myszy w różnym wieku od 11 – 17 miesięcy. Poziom istotności wynosił 0,05. Stwierdzono, że model myszy 3xTg nie wykazuje wykrywalnych za pomocą rezonansu magnetycznego *in vivo* zmian w istocie białej przed lub po pojawieniu się złogów amyloidowych (voxel o wymiarach 98 x 98 x 250 mikrometrów sześciennych dla RARE i voxel o wymiarach 195 x 195 x 500 mikrometrów dla DTI). Brak zmian w istocie białej stwierdzono także przy użyciu metod MRI o wyższej rozdzielczości (voxel o wymiarach 49 x 49 x 250 mikrometrów sześciennych dla RARE i voxel o wymiarach 98 x 98 x 500 mikrometrów dla DTI) w badaniach przeprowadzonych na utrwalonych mózgow (*ex vivo*). Wyniki histologiczne były zgodne z wynikami analizy danych MRI.

### **Testowanie granic**

Opracowanie i optymalizacja metod i protokołów obrazowania, wykorzystywanych do badania zmian leżących u podstaw neurodegeneracji, wymaga zrozumienia ograniczeń metod obrazowania. Warto czasem sprawdzić jak daleko da się wyjść poza te wytyczone granice.

Cel projektu badawczego określa rodzaj próbek, które mogą być używane. Muszą one być reprezentatywne względem zaburzeń neurodegeneracyjnych, w tym obszarze OUN. Na przykład tkanki hipokampa są wykorzystywane w badaniach związanych z chorobą Alzheimera, jako że hipokamp jest regionem objętym procesem neurodegeneracji. Przygotowanie próbki do obrazowania wymaga natychmiastowego zamrażania bloku próbek pobranego z autopsji lub części OUN myszy (na przykład połowy mózgu) po jej uśpieniu. Na krótko przed obrazowaniem próbki są cięte na skrawki i montowane na odpowiednim podłożu. Przechowywanie próbek może znacząco wpływać na wyniki badania, dlatego też zaleca się,

przygotowanie skrawków tkanki w jak najkrótszym okresie czasu poprzedzającym badania z wykorzystaniem obrazowania.

Próbki tkanki są zwykle wielkości około jednego centymetra kwadratowego. W celu wybrania obszarów próbek do obrazowania do pomiarów synchrotronowych, wykonane są liczne zdjęcia przy użyciu mikroskopu. W wielu przypadkach fotografie są wystarczające do wyboru obszarów do analizy, ale nie zawsze. Decyzja podjęta na bardzo wczesnym etapie mojej działalności naukowej znacząco wpłynęła na dalszy przebieg moich badań. W czasie obrazowania tkanek, liczne złogi kreatyny były widoczne na fotografiach, ze względu na ciemniejsze zabarwienie, ale nie byłam pewna, ile dodatkowych złogów (nie posiadających zabarwienia) może jeszcze istnieć. Tylko obrazowanie obszaru całej próbki mogło pokazać ile ich jest. Pomimo, że powiedziano mi, że przy użyciu spektrometru nie wykorzystującego promieniowania synchrotronowego, nie uzyskam wyników o dobrej jakości, zdecydowałam się wypróbować spektrometr z szesnastoma detektorami ułożonymi w linii prostej, znajdujący się w obiekcie synchrotronowym (NSLS). Wiedząc, że złogi kreatyny, które do tej pory zobrazowałam były duże (powyżej 50 mikrometrów długości), i miały bardzo charakterystyczne piki, zdecydowałam się przetestować granice wykrywalności kreatyny dla urządzenia zwiększając poprzez zmniejszenie rozdzielczości przestrzennej do 25 na 25 mikrometrów kwadratowych i zmniejszając liczby skanów do 4/ widmo. Z trzema nowymi parametrami: liczbą pikseli obrazowana w tym samym czasie: 16 (zamiast jednego); większymi pikselami (25 mikronów do kwadratu w stosunku do 8 mikrometrów kwadratowych ( $25/8 = 3,125$ ) i mniejszą liczbę skanów ( $128/4 = 32$ ) czas obrazowania zmniejszył się o 1600 razy. Umożliwiło to zobrazowanie 26 całych próbek i znalezieniu w nich wiele dodatkowych złogów kreatyny (H-1). Moja metoda szybko znalazła zastosowanie w grupie badawczej, w której pracowałam. Od tamtego czasu obrazowania z wykorzystaniem spektrometru z matryca detektorów poprzedza obrazowanie metodą sFTIR o wyższej rozdzielczości (H-2 - H-4).

Każde widmo podczerwieni zawiera informacje o różnych składnikach tkanek. Informacje na poziomie cząsteczkowym są zapisane w nakładających się pasmach podczerwieni, dla których rozdzielczość widmowa często jest mniejsza niż rozdzielczości przestrzennej. Dlatego należy zachować ostrożność przy interpretacji z pozoru prostych widm tkanek. Producenci spektrometrów dają możliwość korzystania z algorytmów, które mogą na przykład wygładzić widma, ale, z mojego doświadczenia wynika, że najlepiej jest wykonywać analizę na oryginalnych widmach (nie zawierających artefaktów przypadkowo wprowadzanych przez algorytmy).

Na typ analizy dla danego zestawu danych, wpływa jakość widma, dostępność danych i cel badania. Widma FTIR tkanki biologicznej poddawane analizie zawierają informacje na poziomie molekularnym, ale typowa rozdzielczość przestrzenna jest rzędu kilku mikronów. Zmniejszenie rozmiaru pikseli może dostrzec bardziej szczegółowych informacji na temat wybranego obszaru tkanki. Optymalne parametry dla obrazowania tkanek, mogą się różnić gdy dane pochodzą z różnych spektrometrów i należy zachować ostrożność przy doborze parametrów do analizy.

Nowe wyzwanie, związane z obrazowaniem organizmów żywych a nie tkanek, dotyczy czasu obrazowania. Czas obrazowania jest ograniczony do około dwóch godzin (maksymalny czas, jaki zwierzę powinno pozostać pod narkozą) dlatego protokoły obrazowania muszą być optymalizowane w celu możliwości zakończenia obrazowania w dostępnym czasie z



wymaganą rozdzielczością przestrzenną. Dodatkowy problem stanowi monitorowanie procesów fizjologicznych (na przykład oddychania) i wyeliminowanie ich wpływu na obrazowanie. Obrazy w rezonansie magnetycznym są bardzo czułe na wszelkie poruszenia się obiektu w czasie obrazowania. W celu uniknięcia artefaktów, stosuje się uchwyty, które utrzymują mysz w jednej pozycji i zmniejszają prawdopodobieństwo ruchu wewnątrz cewki rejestrującej sygnał pochodzący z wybranego obszaru mózgu.

Kolejne wyzwanie związane z zastosowaniem rezonansu magnetycznego do obrazowania istoty białej w mózgu myszy stanowi fakt, że mózg myszy zawiera tylko 10% substancji białej i 90% szarej. Ze względu na rozdzielczość przestrzenną MRI i niską zawartość substancji białej u myszy, w badaniach opisanych w publikacji (H- 6) tylko duże pasma istoty białej (ciało modzelowate i sklepienie) zostały wybrane do obrazowania i analizy.

Obrazowanie MRI mózgu myszy wymaga wyższej rozdzielczości przestrzennej i w związku z tym wyższego niż w urządzeniach wykorzystywanych do celów klinicznych natężenia pola magnetycznego (7 Tesli w porównaniu do 1,5 Tesli). Metody opracowane dla urządzeń wykorzystujących natężenie pola 1,5 T, mogą nie mieć zastosowania dla urządzeń o wyższych natężeniach pól magnetycznych, niezbędnych do badania modeli zwierzęcych. Często nowe, odpowiednie metody muszą być opracowane i /lub dopasowane do potrzeb. Wyższe natężenia pola magnetycznego w badaniach z myszami jest niezbędne w celu uzyskania obrazów o wyższej rozdzielczości, która pozwala na rozróżnienie struktur w małym mózgu myszy.

W standardowym badaniu MRI z wykorzystaniem pola o natężeniu 1,5 Tesli, rozmiar voxela wynosi 1 x 1 x 1 centymetrów sześciennych, co pozwala na obrazowanie mózgu człowieka o średniej objętości około 1350 cm sześciennych. Średnia objętość mózgu myszy to kilka centymetrów sześciennych. W urządzeniu z natężeniem pola wielkości 7 Tesli, rozmiar voxela *in vivo* można ograniczyć do 98 x 98 x 250 mikrometrów sześciennych dla metody T<sub>2</sub> i i 195 x 195 x 500 mikrometrów sześciennych dla DTI. Wyższą rozdzielczość można otrzymać dla badań utrwalonych mózgow *in vitro*, 49 x 49 x 250 mikrometrów sześciennych dla metody T<sub>2</sub> i i 98 x 98 x 500 mikrometrów sześciennych dla DTI. Czas pomiaru zostaje jednak znacząco wydłużony.

## Podsumowanie

Złożoności chorób neurodegeneracyjnych sprawia, że badanie zmian zachodzących podczas procesu chorobowego jest bardzo wymagające. W zależności od podejścia i wybranej techniki, można uzyskać różnego rodzaju informacje. Tabela.2 przedstawia zestawienie możliwości i ograniczeń technik wykorzystanych w opisanych powyżej badaniach.

Tabela. 2. Zestawienie możliwości i ograniczeń technik [H-1 – H-6]

Technika/ możliwości badań	sFTIR	FTIR- FPA	sFTIR -FPA	SRXRF	MRI T2 in vivo	MRI T2 ex vivo	MRI DTI in vivo	MRI DTI ex vivo
Badanie tkanek	tak	tak	tak	tak	nie	tak	nie	tak
Badanie organizmów żywych	nie	nie	nie	nie	tak	nie	tak	nie
Rodzielczość [ $\mu\text{m}^2$ lub $\mu\text{m}^3$ ]	5 × 5 - 10 × 10	5 × 5 - 25 × 25	0.54 × 0.54	5 × 5 -10 × 10	98 × 98 × 250	49 × 49 × 250	195 × 195 × 500	98 × 98 × 500
Możliwość potorzenia identycznego pomiaru	tak	tak	tak	tak	nie	tak	nie	tak
Badanie związków organicznych	tak	tak	tak	nie	tak	tak	tak	tak
Badanie metali	nie	nie	nie	tak	nie	nie	nie	nie
Wykrywanie złogów kreatyny	tak	tak	tak	nie	nie	nie	nie	nie
Wykrywanie złogów amyloidowych	tak	tak	tak	nie	nie*	nie*	nie	nie
Badanie rozkładu tłuszczów	tak	tak	tak	nie	tak	tak	tak	tak
Obrazowanie dyfuzji	nie	nie	nie	nie	nie	nie	tak	tak
Obrazowanie struktur na poziomie komórkowym	tak	tak	tak	tak	nie	nie	nie	nie

Technika/ możliwości badań	sFTIR	FTIR- FPA	sFTIR -FPA	SRXRF	MRI T2 in vivo	MRI T2 ex vivo	MRI DTI in vivo	MRI DTI ex vivo
Obrazowanie struktur wewnątrz komórek	nie	nie	tak	nie	nie	nie	nie	nie
Badanie objętości struktur mózgu	nie	nie	nie	nie	tak	tak	tak	tak
Możliwa tylko jedna interpretacja danych	nie	nie	nie	nie	nie	nie	nie	nie
Interpretacja danych ułatwiona przez badania histologiczne	tak	tak	tak	tak	nie	tak	nie	tak
Dostępność w badaniach diagnostycznych dla pacjentów	nie	nie*	nie	nie	tak	nie	tak	nie

\* zbyt mała rozdzielczość przestrzenna

\*\* metoda wykorzystywana w celu analizy tkanek w salach operacyjnych

Zrozumienie podstaw fizycznych, możliwości i ograniczeń metod obrazowania (FTIR, MRI) staje się ważniejsze w miarę jak zwiększa się liczba ich zastosowań i są one coraz częściej wykorzystywane w badaniach, w których interpretacja danych opiera się na analizie obrazu (na przykład w rutynowych badaniach medycznych). Firmy produkujące urządzenia dostarczają również oprogramowania, które pozwala na uzyskanie obrazów bez konieczności zrozumienia podstaw fizycznych lub/i zagłębiania się w analizę sygnału/ widma. Myślę, że istotna jest współpraca pomiędzy specjalistami z różnych dziedzin w celu upewnienia się, że analiza danych jest wykonana prawidłowo i że płynące z niej zrozumienie zmian zachodzących w schorzeniach neurodegeneracyjnych stanie się podstawą ich zapobiegania/ leczenia.

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

Mój wkład w powstanie poszczególnych publikacji (z procentową oceną mojego wkładu w powstanie artykułów) był następujący:

- H-1 – przygotowałam fotografię próbek spod mikroskopu, wybrałam obszary do analizy, dobrałam i zoptymalizowałam warunki pomiarowe, wykonałam pomiary techniką FTIR, sFTIR i sXRF (Synchrotron radiation Center (SRC), Wisconsin and National Synchrotron Light Source (NSLS), Brookhaven National Laboratories, Upton, NY), dobrałam parametry do analizy danych, przygotowałam manuskrypt publikacji i ilustracje, byłam łącznikiem w czasie dyskusji na temat oceny wyników badań nad złoгами kreatyny realizowanymi techniką mikrospektroskopii i sXRF, wysłałam manuskrypt do publikacji, korespondowałam z recenzentami. Mój udział procentowy szacuję na 65%.
- H-2 – Sprawowałam opiekę i pomagałam studentce (Aleskandrze Kuzyk) pracującej nad projektem badawczym w okresie letnim w grupie Dr. Gough w czasie: wyboru obszarów tkanki do pomiarów, optymalizacji warunków pomiarowych, wykonania pomiarów techniką FTIR i sFTIR (FTP-FTIR (University of Manitoba) i sFTIR (Synchrotron radiation Center (SRC), Wisconsin) i przygotowania pierwszej wersji publikacji. Przygotowałam końcową wersję publikacji, wysłałam manuskrypt do publikacji, korespondowałam z recenzentami. Mój udział procentowy szacuję na 75%.
- H-3 – Sprawowałam opiekę i pomagałam studentce (Aleksandrze Kuzyk) pracującej nad projektem badawczym w okresie letnim w grupie Dr. Gough w czasie wyboru obszarów tkanki do pomiarów, optymalizacji warunków pomiarowych i wykonania pomiarów, przygotowałam eksperymentalną część publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 40%.
- H-4 – Uczestniczyłam w usypianiu myszy, rozdzielaniu półkuli mózgu i ich zamrażaniu; Przygotowałam próbki, wybrałam obszary do analizy, uczestniczyłam w doborze i optymalizacji warunków pomiarowych i wykonaniu pomiarów techniką sFTIR (Synchrotron radiation Center (SRC), Wisconsin). Dla nowego typu widm otrzymanych z użyciem IRENI, znalazłam najlepsze parametry do analizy danych. Wykonałam barwienie tkanek, przygotowałam manuskrypt publikacji i ilustracje, wysłałam manuskrypt do publikacji, korespondowałam z recenzentami. Mój udział procentowy szacuję na 65%.
- H-5 – Sprawowałam opiekę i pomagałam studentowi (Davidowi Stitt) pracującemu nad projektem badawczym w okresie letnim w grupie Dr. Gough w czasie przygotowania próbek, wyboru obszarów tkanki do pomiarów, optymalizacji warunków pomiarowych i wykonania pomiarów techniką FTP-FTIR data (University of Manitoba) i sFTIR (Synchrotron radiation Center (SRC), Wisconsin), Przygotowałam końcową wersję publikacji do druku. Mój udział procentowy szacuję na 50%.
- H-6 – Przygotowałam projekt i wnioski o dofinansowanie badań z Kanadyjskiego Stowarzyszenia Alzheimer. Po konsultacji z neuropatologiem dr DelBigio, wybrałam model myszy, dobrałam parametry obrazowania i ustaliłam protokół obrazowania MRI, wykonałam wszystkie obrazowania i zajmowałam się przygotowaniem i monitorowaniem zwierząt w czasie narkozy, uczestniczyłam w usypianiu myszy i przygotowaniu ich mózgów do obrazowania *ex vivo*. Przygotowałam skrawki tkanek do analizy histopatologicznej, wykonałam podstawowe barwienia histologiczne (H & E, SC), uczestniczyłam w barwieniach z przeciwciałami (amyloid beta). Przygotowałam manuskrypt publikacji i ilustracje, wysłałam manuskrypt do publikacji, korespondowałam z recenzentami. Mój udział procentowy szacuję na 90 %.

Odpowiednie oświadczenia współautorów artykułów (w porządku alfabetycznym ich nazwisk), wchodzących w skład przedłożonego cyklu publikacji stanowią załącznik (Załącznik 5) do niniejszego wniosku.

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

#### Podsumowanie publikacji

Rok	Czasopismo	Impact factor (w roku publikacji)	Liczba cytowań (2 lipca 2016 r. Scholar Google)	Publikacje ogółem
2005	X-Ray Spectrometry	1.372	25	1
2007	Arch Biochem Biophys	2.578	45	1
2010	JBC	5.328	30	1
2010	Neuroscience	3.357	19	1
2010	Vibrational Spectroscopy	1.747	15	1
2011	Vibrational Spectroscopy	1.747	13	1
2012	NeuroImage	6.132	33	1
2013	Magnetic Resonance Imaging	2.788	3	1
<b>Ogółem</b>			183	8
<b>Indeks Hircha</b>				<b>7</b>

#### Okres przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Moje zainteresowania zawsze były szerokie, interdyscyplinarne i miały zastosowanie w medycynie. Wybrałem studia na kierunku fizyki medycznej i dozymetrii (najpierw magisterskie, potem doktoranckie), a później na kierunku chemii biologicznej. Moje wykształcenie w kierunkach ścisłych, zostało wzbogacone zajęciami i praktycznym zastosowaniem anatomii, fizjologii, patologii, histologii, biologii komórki, biochemii, neurobiologii i radiologii. Wspólnym mianownikiem dla wszystkich moich zainteresowań jest obrazowanie ośrodkowego układu nerwowego, które pozwala mi wykorzystać moje różnorodne umiejętności.

Działalność badawczo-naukową rozpocząłem w jeszcze w szkole średniej w ramach przygotowania do Olimpiady Biologicznej. Patrząc z perspektywy czasu, mój projekt już wtedy miał coś wspólnego o „obrazowaniu”, ponieważ skupiał się na określeniu lokalizacji stanowisk mieczyka dachówkowatego (*Gladiolus imbricatus*) w okolicy Białki Tatrzańskiej i zbadaniu warunków sprzyjających jego występowaniu an przykład profilu gleby i nasłonecznienia.

Będąc studentką Wydziału Fizyki i Techniki Jądrowej AGH (aktualnie Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH), na kierunku Fizyka Techniczna, specjalność Fizyka Medyczna

i Dozymetria, pod koniec czwartego roku studiów rozpoczęłam prowadzenie badań do pracy magisterską pt. "Analiza biochemiczna tkanki ośrodkowego układu nerwowego człowieka z wykorzystaniem synchrotronowej mikroskopii w podczerwieni" pod kierunkiem mgr inż, Magdaleny Szczerbowskiej- Boruchowskiej przy współpracy z Zakładem Neuropatologii Instytutu Neurologii UJ. Byłam już wtedy studentką Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, co pozwoliło mi na lepsze zrozumienie podstaw spektroskopii w

podczerwieni. Kilka miesięcy później, w ramach programu Socrates- Erasmus, wyjechałam na Uniwersytet Bordeaux I, gdzie kontynuowałam pogłębianie wiedzy na temat spektroskopii w podczerwieni w ramach zajęć dydaktycznych i projektu badawczego zatytułowanego „Imaging alamathicin-phospholipids bilayers with Attenuated total reflectance FTIR”.

Po powrocie z Francji, zakończyłam analizę widm sFTIR i obroniłam pracę magisterską w lipcu 2005. W rok później, otrzymałam nagrodę za moją pracę w Konkursie na najlepszą pracę magisterską (w kategorii stosowanej: Diamenty AGH).

To właśnie podczas analizy danych dla mojej pracy magisterskiej, zobserwowałam nieznaną szpiczaste piki w podczerwieni na tle znanego mi widma próbek biologicznych. Dopiero znacznie później w trakcie moich badań do pracy doktorskiej, okazało się, że te piki są charakterystyczne do kreatyny.

Po obronie pracy magisterskiej rozpoczęłam studia doktoranckie na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH z wykorzystaniem synchrotronowej spektroskopii w podczerwieni. Latem 2006 roku odbyłam moją pierwszą sesję badawczą w ośrodku synchrotronowym w Grenoble (ESRF) we Francji.

Od września 2006 do grudnia 2007 roku przebywałam na Uniwersytecie Manitoba w Winnipeg, w Kanadzie jako „visiting PhD student”. Stamtąd też odbyłam liczne wyjazdy do dwóch ośrodków synchrotronowych (SRC, Synchrotron Radiation Center w Madison, Wisconsin i NSLS, National Synchrotron Light Source, Brookhaven national Laboratories, Upton, NY) gdzie kontynuowałam badania nad złogami kreatyny, które zaowocowały pracą doktorską obronioną w październiku 2009 roku zatytułowaną: „Chemical characterization and imaging of creatine deposits in human central nervous system tissue with infrared and X-Ray fluorescence spectromicroscopy”.

Z powodu licznych wyjazdów, studia magisterskie, na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, kontynuowałam w trybie indywidualnym. Pracę magisterską pod tytułem „Analiza wpływu wybranych jonów metali na strukturę i zdolności agregacyjne białka ataksyny-3” obroniłam w maju 2009 roku.

W okresie przed obroną doktoratu, poniższe publikacje powstały z moim udziałem:

- Szczerbowska-Boruchowska, M., Dumas, P., Kastyak, M.Z., Chwiej, J., Lankosz, M., Adamek, D., and Krygowska-Wajs, A. (2007) Bimolecular investigation of human substantia nigra in Parkinson's disease by synchrotron radiation Fourier transform infrared microspectroscopy. *Arch Biochem Biophys* 459(2): 241-248.
- Szczerbowska-Boruchowska, M., Chwiej, J., Lankosz, M., Adamek, D., Wojcik, S., Krygowska-Wajs, A., Tomik, B., Bohic, S., Susini, J., Simionovici, A., Dumas, P., and Kastyak, M. (2005) Intraneuronal investigations of organic components and trace elements with the use of synchrotron radiation. *X-Ray Spectrom.* 34(6), 514-520.

W tym okresie, uczestniczyłam też w poniższych konferencjach i zjazdach naukowych:

- Kastyak, M.Z., Szczerbowska-Boruchowska, M., Lankosz, M., Adamek, D., Tomik, B., and Gough, K.M.: Study of Amyotrophic Lateral Sclerosis brain tissue with FTIR Microspectroscopy, Synchrotron Radiation Center Users Meeting, Stoughton, WI, October 12-13, 2007

- Agrawal, V., Gallant, M., Wiens, R., Kastyak, M., and Gough, K.M.: Evaluation of Creatine Deposits In TgCRND8 Mouse Brain Tissue By Synchrotron FTIR Spectromicroscopy, Synchrotron Radiation Center Users Meeting, Stoughton, WI, October 12-13, 2007
- Kastyak, M.Z., Szczerbowska-Boruchowska, M., Lankosz, M., Adamek, D., Tomik, B., and Gough K.M.: Study of Amyotrophic Lateral Sclerosis brain tissue with FTIR Microspectroscopy and X-Ray Fluorescence, 1st International Workshop on Spectral Diagnosis (SD-1), Northeastern University, Boston, MA, June 21– 23, 2007
- Gallant, M., Rak, M., Kastyak, M., Del Bigio, M.R., Westaway, D., and Gough, K.M.: Imaging Focally Elevated Creatine in APP Transgenic Mice, Biophysical Chemistry Symposium, Toronto, April 21-23, 2007
- Kastyak, M.Z.: SR-FTIR microscopy studies of biological macromolecules changes in neurodegenerative disorders, Conference SPEC2006, Optical Diagnosis for the New Millennium at the German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany, May 20- 24 2006

### **Okres po uzyskaniu stopnia naukowego doktora**

Po uzyskaniu stopnia doktora, kontynuowałam moją działalność naukową, rozpoczętą w ramach pracy doktorskiej, na Uniwersytecie Manitoba w Winnipegu w ramach stażu postdoktoranckiego. Zajmowałam się badaniem tkanek OUN myszy i kontynuowałam analizę w podczerwieni licznych obszarów tkanek uzyskanych jeszcze przed obroną doktoratu. Opiekowałam się studentami przygotowującymi projekty naukowe w okresie letnim (summer students): Aleksandrą Kuzyk i Davidem Stitt. Odbyłam też dwuletni staż postdoktorancki na Uniwersytecie Winnipeg. Fundusze na moje badania naukowe zostały przyznane (po złożeniu wniosku projektu naukowego, który przygotowałam) w konkursie organizowanym przez Kanadyjską Fundację na rzecz choroby Alzheimerera (Postdoctoral Fellowship: Alzheimer Society of Canada).

Badania opisane są w cyklu publikacji przedstawionej jako podstawa postępowania habilitacyjnego: H-1 – H-6. Moja rozprawa doktorska została też opublikowana w formie książki:

- **Kastyak M.Z.:** Imaging of creatine deposits in human CNS tissues with FTIR and XRF microspectroscopy. LAP Lambert Academic Publishing AG & Co. KG. ISBN: 978-3-8383-8483-2

W okresie po uzyskaniu stopnia naukowego doktora uczestniczyłam w następujących konferencjach i wydarzeniach naukowych:

- Kastyak-Ibrahim, M.Z., Richard Buist, Domenico L Di Curzio, Marc R Del Bigio, Benedict C Albeni, Melanie Martin: Neurofibrillary tangles and plaques are not accompanied by white matter pathology in older 3xTg-AD mice. Manitoba Neuroscience Network Meeting, Winnipeg, MB, June 10, 2013

- Kastyak-Ibrahim, M.Z., Richard Buist, Domenico L Di Curzio, Sheryl L. Herrera, Benedict C Albensi, Marc R Del Bigio, Melanie Martin: Region specific changes in 3xTg Alzheimer's disease mouse model evaluated by volume and DTI metric values. Canadian Association of Physicist Meeting, Montreal, QC, May 27-31, 2013
- Kastyak-Ibrahim, M.Z., Richard Buist, Domenico L Di Curzio, Sheryl L. Herrera, Benedict C Albensi, Marc R Del Bigio, Melanie Martin Imaging of selected brain regions in 3xTg Alzheimer's mouse model by Magnetic Resonance Microscopy. Alzheimer's Society of Manitoba Meeting, Winnipeg, MB, Jan 24, 2013
- Kastyak-Ibrahim, M.Z. Imaging of white matter changes in AD mice by MR microscopy - a continuous challenge. Pharmacology Seminar Series, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Oct 5, 2012.
- Kastyak-Ibrahim, M.Z., Richard Buist, Domenico L Di Curzio, Marc R Del Bigio, Benedict C Albensi, Melanie Martin Imaging of selected brain regions in 3xTg Alzheimer's mouse model by Magnetic Resonance Microscopy. Manitoba Neuroscience Network Meeting, Winnipeg, MB, June 4, 2012
- Kastyak-Ibrahim, M.Z., M.J. Nasse, M. Rak, C. Hirschmugl, M.R. Del Bigio, B. C. Albensi and K.M. Gough: Biochemical Label-Free Tissue Imaging with Subcellular-Resolution Synchrotron FTIR-FPA, Synchrotron Radiation Center Users Meeting, Stoughton, WI, Sep 16-17, 2011
- Stitt D., Kastyak-Ibrahim M.Z., Suh M, Albensi B., Gough K.M.: FTIR Microspectroscopic Imaging of Polyunsaturated Fatty Acids in Biological Tissues, Undergraduate Life Science Research Conference, Winnipeg, MB, November 20, 2010
- Kastyak, M.Z., Nasse, M.J., Albensi, B.C., Del Bigio M., Hirschmugl, C., and Gough, K.M.: High definition sFTIR imaging of tissue from Alzheimer disease mouse models, Manitoba Neuroscience Network Meeting, Winnipeg, MB, June 14, 2010
- Kastyak, M.Z., Szczerbowska-Boruchowska, M., Lankosz, M., Adamek, D., Tomik, B., and Gough, K.M.: Study of Amyotrophic Lateral Sclerosis brain tissue with FTIR Microspectroscopy, Synchrotron Radiation Center Users Meeting, Stoughton, WI, October 12-13, 2007
- Agrawal, V., Gallant, M., Wiens, R., Kastyak, M., and Gough, K.M.: Evaluation of Creatine Deposits In TgCRND8 Mouse Brain Tissue By Synchrotron FTIR Spectromicroscopy, Synchrotron Radiation Center Users Meeting, Stoughton, WI, October 12-13, 2007



## Działalność dydaktyczna i popularyzujące naukę

Wierzę, że nauczanie (wykładanie) jest integralną częścią kariery w środowisku akademickim. Nie ma znaczenia czy spotykasz się ze studentami podczas wykładu, w ramach ćwiczeń laboratoryjnych czy jesteś opiekunem projektu badawczego. Te spotkania zawsze owocują w postaci nowych pomysłów, nowego podejścia i zwykle są twórcze.

Nauczanie jest nieodłączną częścią mojego życia. Moje pierwsze doświadczenia pochodzą z dzieciństwa, kiedy miałam możliwość obserwować moją mamę pracującą wówczas w szkole a wieczorami pomagającą mi i mojej siostrze w odkrywaniu własnego sposobu zdobywania wiedzy. Moja mama była pierwszą osobą, która pozwoliła mi zrozumieć, że nauczając nie można skupiać się na sobie, ale na innych i odkrywaniu w jaki sposób przekazać im wiedzę. Zaczęłam stosować jej metody dydaktyczne podczas darmowych korepetycji, które dawałam już pod koniec szkoły podstawowej kolegom i koleżankom, mającymi kłopoty ze zrozumieniem tematu lub zdaniem egzaminu. W czasie studiów korepetycji było coraz więcej. Pod koniec studiów doktoranckich zaczęłam wyklądać i moja przygoda z nauczaniem zaczęła się na dobre.

Zawsze bardzo lubiłam wykłady, ale nie byłam do końca przekonana co do zajęć laboratoryjnych dopóki nie miałam okazji uczestniczyć w rozwoju i wprowadzeniu nowych doświadczeń/ Cwiczeń laboratoryjnych. To wtedy zaczęłam doceniać wartość doświadczeń laboratoryjnych, ponieważ dają one studentom możliwość odkrywania i uczyć samodzielnego myślenia. Doświadczenia, przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych, jak również w formie demonstracji w czasie wykładów, są niezastąpione w nauczaniu przedmiotów ścisłych.

Miałam okazję zaangażować się w nauczanie w następujących rolach:

- **Wykładowca fizyki** w International College of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Kanada od stycznia 2013 roku do sierpnia 2014 roku miałam okazję wypracować metodę nauczania, która pozwalała studentom z różnych krajów na zrozumienie materiału naukowego. Wprowadziłam nauczanie w grupach (Team Based Learning), które pozwala wykładowcy lepiej poznać sposoby myślenia studentów. Wprowadza ona również element przygotowania przez studentów materiału przed przyjściem na wykłady. Pozwala także na spędzanie większej ilości czasu na pogłębianiu wiedzy, nie tylko na jej powierzchownym zrozumieniu. Wyniki tej metody zostały zaprezentowane na warsztatach.
- Kastyak-Ibrahim, M.Z., Yamchuk A.: Team Based Learning workshop. Centre for the Advancement of Teaching and Learning, University of Manitoba, Winnipeg, MB, March 25, 2015
- **Kierownik pracowni fizycznej** na Uniwersytecie Manitoba, na Wydziale Fizyki i Astronomii, Winnipeg, Manitoba, Canada od września 2013 roku do lipca 2015 roku. W tym czasie przygotowałam zeszyty do ćwiczeń laboratoryjnych, i wprowadzenia (prezentacje w programie Power Point ze zdjęciami i filmikami wideo) oraz dodatkowe materiały wykorzystywane do doświadczeń z fizyki. Zajmowałam się zarządzaniem strony dla studentów, na której znajdowały się materiały laboratoryjne, sprawozdania i oceny (ang. learning management system (Desire2Learn)). Do moich obowiązków należało sporządzenie grafiku, szkolenie i nadzór asystentów, a także upewnienie się, że sprawozdania laboratoryjne zostały sprawiedliwe i poprawnie ocenione. W tym czasie, dwa razy przygotowałam wnioski o dofinansowanie i otrzymałam pieniądze na unowocześnienie laboratoriów (każdy wniosek na ponad sto tysięcy dolarów) i

wprowadzenie nowych doświadczeń. Mój pomysł na wprowadzenie szablonów w programie Excel do elektronicznego przygotowania i analizy danych jak również przygotowania sprawozdań, zmienił sposób w jaki zajęcia laboratoria są prowadzone. Pomysł ten został przedstawiony na konferencji w czerwcu 2015 roku

- Kastyak-Ibrahim, M.Z., Kunkel H., Sharma, K: A New format for Reporting in a First Year Physics Laboratory. Canadian Association of Physicist Meeting, Edmonton, AB, June, 15-19, 2015
- **Koordinator studiów Licencjackich** na Uniwersytecie Calgary na Wydziale Fizyki i Astronomii, Calgary, Alberta, Kanada od sierpnia 2015 roku. Moja praca polega na nadzorowaniu kursów z fizyki (jako koordynator kursów). Jestem odpowiedzialna za opracowanie celów dydaktycznych kursu, metod nauczania i, w porozumieniu z wykładowcami i Dyrektorem Studiów Licencjackich, dobór materiałów naukowych (miedzy innymi podręczników) i pomoc w rozwijaniu innowacyjnych materiałów i metod nauczania. W okresie letnim opracowuję nowe metody nauczania w doświadczeniach laboratoryjnych. Zarządzam programem kształcenia on-line: zamieszczam w nim materiały edukacyjne, oceny studentów w ciągu roku i oceny końcowe. Jestem odpowiedzialna za ocenę roli i skuteczności doświadczeń laboratoryjnych dla kursu i programu. Opracowuję, aktualizuję i wdrażam doświadczenia laboratoryjne. W ciągu roku akademickiego (w semestrze jesiennym i zimowym) odpowiadam za ponad trzy tysiące studentów. Prowadzę szkolenia dla asystentów laboratoryjnych, oceniam ich postępy w pracy. Jestem aktywnie zaangażowana w badania nowych metod nauczania. W trakcie semestru zimowego 2016 w czasie wykładów zostały wprowadzone nowe ćwiczenia pomagające studentom w zrozumieniu materiału. Przedstawiłam tą nową metodę w maju 2016 roku, podczas spotkania wykładowców zainteresowanych ulepszeniem swoich metod nauczania.
- Kastyak-Ibrahim, M.Z.: Increasing student engagement by introducing problem solving activities and modifying TA training. Strategies for Success Event, Toronto, ON, May, 13, 2016

W trakcie mojej kariery miałam również możliwość uczestniczenia w wydarzeniach mających na celu popularyzację nauki, na przykład jako sędzia w konkursie na najlepszy plakat przygotowany przez uczniów szkół średnich (Winnipeg School Division's science fair).

Podczas pracy nad moim projektem post-doktoranckim na Uniwersytecie Winnipeg, zostałam zaproszona do wygłoszenia referatu dla osób starszych na temat choroby Alzheimera i roli rezonansu magnetycznego:

- Kastyak-Ibrahim, M.Z. How can magnetic resonance imaging help to diagnose Alzheimer's disease? Charlswood Senior Center Seminar Series, Winnipeg, MB, Jan 28, 2013

Udzieliłam też wywiadu dla Kanadyjskiego Stowarzyszenia Alzheimera w Winnipegu na temat moich badań naukowych, popularyzującego naukę. wywiad i filmik można znaleźć na stronie: <http://alzheimer.mb.ca/researchmb/marzena.html>

M. Kastyak-Ibrahim

Calgary, Kanada dn. 8 lipca 2016 roku