

Streszczenie pracy

Celem przedstawionej pracy doktorskiej było opracowanie procedur metodologicznych dla współcześnie stosowanych technik fizycznych, które w znaczącym stopniu mogą wspomagać badania biofizyczne układów biologicznych. Szczególny nacisk położono na mikroobrazowanie składu chemicznego tkanki ośrodkowego układu nerwowego człowieka z wykorzystaniem dwóch technik spektroskopowych: rentgenowskiej mikroanalizy fluorescencyjnej (ang. *X-ray fluorescence* - XRF) i mikrospektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. *Fourier transform infrared micro-spectroscopy* - FTIR). Pierwsza z metod, umożliwiająca określenie składu pierwiastkowego, jest szczególnie czuła na różnice w masie powierzchniowej próbki, co powszechnie stanowi znaczące utrudnienie w przypadku badań ilościowych cienkich skrawków tkanek. Tym samym, jednym z podstawowych zadań niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie metodologii pozwalających na realizację tego typu prac, poprzez przeprowadzenie eksperymentów spektroskopowych, umożliwiających jednoczesną lub prawie jednoczesną rejestrację sygnału czułego na różnice w masie powierzchniowej struktur badanych próbek tkanki. W tym celu zaproponowano dwa podejścia. W pierwszym z nich zastosowano korektę efektów masy powierzchniowej w oparciu o względną intensywność promieniowania X rozproszonego niekoherentnie - rozproszenie Comptona - dla tkanki istoty czarnej mózgu. Niewątpliwą zaletą tego rozwiązania jest fakt równoczesnej rejestracji promieniowania rozproszonego wraz z sygnałem fluorescencyjnym. Metoda ta pozwoliła na wyznaczenie mas powierzchniowych struktur tkanki istoty czarnej: ciał komórek nerwowych jak również otaczającego je neuropilu. Ponadto, zademonstrowano potencjalną użyteczność pół-ilościowych metod korekty wykorzystujących sygnał transmisyjny linii $Si-K_{\alpha}$ pochodzący z membran stosowanych jako podkładki dla skrawków tkanki. Drugie z zastosowanych podejść metodologicznych polegało na przeprowadzeniu badań z wykorzystaniem obrazowania rentgenowskim kontrastem fazowym, użytym do wyznaczenia wielkości proporcjonalnej do masy powierzchniowej próbki. Prace te pokazały, że efekt masy powierzchniowej ma istotny wpływ na obrazy dystrybucji pierwiastków w projekcjach dwuwymiarowych. W celu eliminacji takiego efektu zaproponowano procedurę korekty na potrzeby pół-ilościowego obrazowania topografii pierwiastków w tkance na przykładzie istoty czarnej mózgu. W celu pogłębienia informacji nad własnościami strukturalnymi tkanki istoty czarnej mózgu, obrazowanie pierwiastkowe zostało połączone z eksperymentem przy użyciu skaningowej

mikroskopii z wykorzystaniem promieniowania X (ang. *scanning transmission X-ray microscopy* - STXM) z jednoczesną akwizycją sygnału niskokątowego rozpraszania fotonów X (ang. *Small Angle X-ray scattering* - SAXS). Ponadto, w ramach przeprowadzonych badań wykonane zostały pionierskie analizy topografii próbek biologicznych przygotowywanych według rutynowo używanej metody opierającej się na ich suszeniu w niskiej temperaturze (tzw. ang. *freeze-drying*). Pozwoliło to na ocenę realnej grubości skrawków tkanki po procesie suszenia.

Równolegle prowadzono drugi nurt badań z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni. Celem prac była identyfikacja potencjalnych efektów przeszkadzających, związanych z niejednorodnością tkanki ośrodkowego układu nerwowego człowieka, jak również rozwój procedur analitycznych na potrzeby dokładnej oceny struktury drugorzędowej białek i składu lipidowego tkanek. W toku badań określono zasadnicze efekty związane z rozproszeniem Mie i artefaktami fal stojących, które okazały się być istotnym utrudnieniem w przypadku badań struktur tkankowych o znacząco wysokim współczynniku załamania. Stwierdzono, że w obrębie tkanki istoty czarnej mózgu efekt ten był szczególnie duży w neuronach, a w obszarze neuropilu był w pełni pomijalny. W pracy skupiono się ponadto, na ocenie użyteczności dwóch metod analizy danych: fitowania widm absorpcyjnych i sztucznych sieci neuronowych. Pierwsza z metod została użyta do oceny zmian w strukturze drugorzędowej białek w przypadku obrazowania lokalnego rozkładu tych molekuł wokół blaszek starczych w modelu zwierzęcym choroby Alzheimera i badaniach nad modelem wczesnej formy choroby Parkinsona. Druga z metod pozwoliła na ocenę różnic w strukturze drugorzędowej białek w przypadku nowotworów mózgu pochodzenia glejowego.

Ukoronowaniem analiz przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej była ocena użyteczności stworzonych narzędzi analitycznych na potrzeby badań składu pierwiastkowego i molekularnego tkanki istoty czarnej, przeprowadzonych dla dużej liczby mózgów starczych.

Zrealizowane badania wskazują na znaczące utrudnienia analityczne, wynikające z niejednorodności strukturalnej próbek pochodzenia biologicznego, co ma istotny wpływ na ilościowe i pół-ilościowe wyniki badań spektroskopowych z wykorzystaniem promieniowania X i podczerwonego. Zaproponowane w ramach rozprawy doktorskiej rozwiązania metodologiczne poszerzają stosowalność ww. technik analitycznych na potrzeby potencjalnych badań biofizycznych, mających na celu zarówno zrozumienie mechanizmów fizjologicznego starzenia mózgu jak również chorób ośrodkowego układu nerwowego.