WYDZIAŁ FIZYKI I INFORMATYKI STOSOWANEJ AGH

AUTOREFRAT

do celów postępowania o nadanie stopnia naukowego
doktora habilitowanego

Joanna Grażyna Chwiej

Kraków, luty 2014

Spis treści:

I. Dane personalne 2

II. Podsumowanie dorobku naukowego 3

III. Przebieg dotychczasowej pracy badawczej 3

IIIa. Opis działalności naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora 3

IIIb. Opis działalności naukowej po uzyskaniu stopnia doktora 4

IV. Wskazanie osiągnięcia naukowego wynikającego z przebiegu dotychczasowej pracy badawczej 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.) 4

IVa. Osiągnięcie naukowe 5

IVb. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego 5

IVc. Omówienie celu naukowego i wyników prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego 7

V. Plany badawcze 14

VI. Dorobek dydaktyczny i popularyzatorski oraz informacja o współpracy międzynarodowej habilitanta 15

I. Dane personalne

Imię i nazwisko:
Joanna Grażyna Chwiej

Data i miejsce urodzenia:

Edukacja i zatrudnienie:

1997 - 2002	**studentka Akademii Górniczo-Hutniczej** Wydział Fizyki i Techniki Jądrowej kierunek: Fizyka Techniczna specjalność: Fizyka Medyczna i Dozymetria
2002	**mgr inż. fizyki technicznej**
2002 - 2007	Studium doktoranckie Akademia Górniczo-Hutnicza Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
2007	**doktor nauk fizycznych** tytuł rozprawy doktorskiej: „Promieniowanie synchrotronowe w badaniach składu pierwiastkowego oraz związków organicznych w komórkach nerwowych dla wybranych schorzeń neurodegeneracyjnych" promotor: Prof. dr hab. inż. Marek Lankosz
2006 - 2008	**asystent naukowo-dydaktyczny** Akademia Górniczo-Hutnicza Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
od 2008	**adiunkt** Akademia Górniczo-Hutnicza Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej

Dane kontaktowe:

E-mail:	Joanna.Chwiej@fis.agh.edu.pl
Telefon:	12 617 41 55
Adres korespondencyjny:	Akademia Górniczo-Hutnicza Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej al. Mickiewicza 30 30-059 Kraków

II. Podsumowanie dorobku naukowego

Dane bibliometryczne na dzień 17 02 2014, wg *Web of Science, Science Citation Index*

Liczba publikacji w czasopismach z listy filadelfijskiej:	**19**
W tym po doktoracie:	**11**
Indeks Hirsha:	**9**
Liczba cytowań artykułów	**170**
W tym bez autocytowań	**144**
Liczba cytowań/na publikację	**8,95**

III. Przebieg dotychczasowej pracy badawczej

IIIa. Opis działalności naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora

W 2002 roku rozpoczęłam studia doktoranckie na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH. Moim opiekunem naukowym, a następnie promotorem w przewodzie doktorskim, był Prof. dr hab. inż. Marek Lankosz. Pod jego opieką prowadziłam badania dotyczące roli metali śladowych w patogenezie dwóch schorzeń neurodegeneracyjnych, choroby Parkinsona i stwardnienia zanikowego bocznego. Wykorzystywane w nich, pobierane *post mortem*, tkanki ludzkie pozyskiwane były w ramach współpracy z Zakładem Neuropatologii Instytutu Neurologii CMUJ. Wszystkie wykonane dla potrzeb realizacji rozprawy doktorskiej badania prowadzone były z użyciem technik bazujących na promieniowaniu synchrotronowym (rentgenowska mikroskopia fluorescencyjna, spektroskopia absorpcyjna promieniowania X w pobliżu krawędzi absorpcji oraz mikrospektroskopia promieniowania IR z transformatą Fouriera). Ponieważ Polska, jak dotąd, nie dysponuje urządzeniami generującymi ten rodzaj promieniowania, dlatego konieczne do realizacji doktoratu prace doświadczalne prowadzone były poza granicami kraju, w europejskich ośrodkach synchrotronowych: European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Hamburg Synchrotron Radiation Laboratory (HASYLAB) i Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique (LURE).

W oparciu o wyniki badań uzyskane w ramach doktoratu powstało osiem artykułów, które opublikowane zostały w prestiżowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, tj. Analytical Chemistry, Spectrochimica Acta B, X-ray Spectrometry, Journal of Biological Inorganic Chemistry, Archives of Biochemistry and Biophysics (skumulowany IF=21,612). Kilka z manuskryptów tych artykułów przygotowałam samodzielnie (dokładne informacje w wykazie dorobku). Uzyskane rezultaty przedstawione zostały na 9 konferencjach i sympozjach naukowych. Należy zaznaczyć, że 4 z prezentowanych tam referatów wygłosiłam osobiście.

We wrześniu 2007 roku obroniłam na Wydziale Fizyki i Informatyki stosowanej pracę doktorską zatytułowaną: „Promieniowanie synchrotronowe w badaniach składu pierwiastkowego i związków organicznych w komórkach nerwowych dla wybranych schorzeń neurodegeneracyjnych". Rozprawa doktorska została wyróżniona przez Radę Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH, a także otrzymała pierwszą nagrodę w konkursie na najlepszą pracę doktorską przygotowaną z zastosowaniem narzędzi statystyki i analizy danych zawartych w programach z rodziny *STATISTICA*. Konkursowi temu patronuje Polskie Towarzystwo Statystyczne. Na zaproszenie organizatorów konkursu wygłosiłam wykład na seminarium Zastosowania Statystyki i Data Mining w Badaniach Naukowych zatytułowany: „Zastosowanie

rentgenowskiej mikroskopii fluorescencyjnej i technik wielowymiarowej analizy wariancji w badaniach nad rolą metali śladowych w procesach neurodegeneracyjnych". Wykład został bardzo dobrze odebrany przez szerokie gremium słuchaczy reprezentujących różne dziedziny nauki.

W trakcie studiów doktoranckich, w 2005 roku, współorganizowałam Krajowe Sympozjum „Technika Jądrowa w Przemyśle, Medycynie, Rolnictwie i Ochronie Środowiska", a w 2007 XV Konferencję "Nauczanie Fizyki w Uczelniach Technicznych".

IIIb. Opis działalności naukowej po uzyskaniu stopnia doktora

W 2007 roku podjęłam współpracę z Zakładem Neuroanatomii Instytutu Zoologii UJ, której celem były pierwsze regularne studia nad rolą metali w patogenezie i przebiegu padaczki w wybranych zwierzęcych modelach tego schorzenia. W badaniach tych skupiono się przede wszystkim na szczurzym modelu pilokarpinowym, ale zmiany pierwiastkowe i biochemiczne tkanki nerwowej badano także w modelu mechanicznego uszkodzenia mózgu oraz drgawek wywołanych elektroszokami.

Studia prowadzono z wykorzystaniem technik bazujących na unikatowych własnościach promieniowania synchrotronowego, w europejskich ośrodkach synchrotronowych: HASYLAB, ANKA, SOLEIL i ELETTRA. Realizowano je w ramach czternastu grantów pomiarowych i trzech grantów badawczych (dwa granty MNiSW oraz jeden grant NCN). Należy zaznaczyć, że we wszystkich tych projektach pełniłam funkcję głównego wykonawcy, a większość z nich przygotowałam i kierowałam ich realizacją (szczegóły w wykazie dorobku).

Efektem badań prowadzonych wspólnie z Zakładem Neuroanatomii jest 12 prac opublikowanych w ostatnich 8 latach w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej. Moja działalność publikacyjna była wielokrotnie nagradzana. W latach 2006-2012 pięciokrotnie wyróżniona zostałam Nagrodą Zespołową Rektora Akademii Górniczo-Hutniczej. Dwukrotnie (edycja 17 i 18) byłam laureatką stypendium START Fundacji na rzecz Nauki Polskiej. W 2012 roku otrzymałam ponadto Nagrodę im. Prof. Zbigniewa Engela, stanowiącą wyróżnienie aktywnej działalności naukowej młodych pracowników naukowo-dydaktycznym, a także Stypendium MNiSW dla wybitnych młodych naukowców.

Do moich największych osiągnięć dydaktycznych w tym okresie należy udział w powołaniu do życia Studenckiego Koła Naukowego Fizyków Medycznych „KERMA", którego opiekunem jestem do dnia dzisiejszego.

Całokształt mojej działalności w okresie po uzyskaniu stopnia doktora został wyróżniony w 2011 roku powołaniem na członka Rady Młodych Naukowców, która jest organem pomocniczym Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego, reprezentującym młodych naukowców.

IV. Wskazanie osiągnięcia naukowego wynikającego z przebiegu dotychczasowej pracy badawczej 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.)

IVa. Jako osiągnięcie naukowe zgodnie z powyższą ustawą, wskazuję jednotematyczny cykl publikacji pt.:

„Wykorzystanie nowoczesnych metod spektroskopowych w badaniach nad patogenezą i przebiegiem epilepsji w pilokarpinowym modelu drgawek"

IVb. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

H1. **Chwiej** J, Winiarski W, Ciarach M, Janeczko K, Lankosz M, Janeczko K, Rickers-Appel K, Setkowicz Z, 2008, The role of trace elements in the pathogenesis and progress of pilocarpine-induced epileptic seizures, Journal of Biological Inorganic Chemistry, 13, 1267-1274, IF: 3,6.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- przygotowaniu i kierowaniu realizowanym w HASYLAB projektem badawczym nr I-20070053 EC oraz koordynowaniu (ze strony AGH) międzynarodowego projektu badawczego niewspółfinansowanego nr 82/N-IA-SFS/2007, które umożliwiły powstanie tej pracy;
- zaplanowaniu i wykonaniu pomiarów próbek tkanki metodą rentgenowskiej mikroskopii fluorescencyjnej, optymalizacji stosowanych warunków pomiarowych, doborze wykorzystywanych w badaniach materiałów wzorcowych;
- analizie uzyskanych danych pomiarowych, doborze metod statystycznej ewaluacji wyników badań;
- interpretacji uzyskanych rezultatów, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu wraz z dyskusją wyników.

Mój udział procentowy szacuję na 50%.

H2. **Chwiej** J, Dulinska J, Janeczko K, Dumas P, Eichert D, Dudala J, Setkowicz Z, 2010, Synchrotron FTIR micro-spectroscopy study of the rat hippocampal formation after pilocarpine-evoked seizures, Journal of Chemical Neuroanatomy, 40, 140-147, IF: 2,121.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- przygotowaniu i kierowaniu realizowanymi w ośrodkach SOLEIL i ELETTRA projektami badawczymi (odpowiednio: 20060063 oraz 2008127 i 20085318) oraz koordynowaniu (ze strony AGH) międzynarodowego projektu badawczego niewspółfinansowanego nr 82/N-IA-SFS/2007, które umożliwiły powstanie tej pracy;
- zaplanowaniu i wykonaniu pomiarów próbek tkanki metodą mikrospektroskopii promieniowania podczerwonego z transformatą Fouriera, optymalizacji stosowanych warunków pomiarowych,
- udziale w analizie uzyskanych danych pomiarowych i doborze metod statystycznej ewaluacji wyników badań,
- interpretacji uzyskanych rezultatów, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu wraz z dyskusją wyników.

Mój udział procentowy szacuję na 50%.

H3. Dulinska J, Setkowicz Z, Janeczko K, Sandt C, Dumas P, Uram L, Gzielo-Jurek K, **Chwiej J**, 2012, Synchrotron radiation Fourier-transform infrared and Raman microspectroscopy study

showing an increased frequency of creatine inclusions in the rat hippocampal formation following pilocarpine-induced seizures, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 402, 2267-2274, IF: 3,659.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- przygotowaniu i kierowaniu realizowanymi w ośrodku SOLEIL projektami badawczymi 20060063 i 20090749 oraz grantem MNiSW IUVENTUS PLUS nr JP2010005370, które umożliwiły powstanie tej pracy;
- mikroskopowej analizie próbek tkanki po kątem obecności inkluzji;
- opracowaniu metody rejestracji punktowych widm absorpcyjnych inkluzji w dużych obszarach tkanki;
- zaplanowaniu i wykonaniu pomiarów metodą mikrospektroskopii promieniowania podczerwonego z transformatą Fouriera, w tym optymalizacji stosowanych warunków pomiarowych;
- udziale w analizie danych pomiarowych i doborze metod statystycznej ewaluacji wyników badań;
- interpretacji uzyskanych rezultatów, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu wraz z dyskusją wyników.

Mój udział procentowy szacuję na 40%.

H4. Kutorasinska J, Setkowicz Z, Janeczko K, Sandt C, Dumas P, **Chwiej J**, 2013, Differences in the hippocampal frequency of creatine inclusions between the acute and latent phases of pilocarpine model defined using synchrotron radiation-based FTIR microspectroscopy, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 405, 7337-7345, IF: 3,659.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- przygotowaniu i kierowaniu realizowanymi w ośrodku SOLEIL projektami badawczymi 20090749 i 20110130 oraz grantem NCN nr 2921/B/T02/2011/40, które umożliwiły powstanie tej pracy;
- mikroskopowej analizie próbek tkanki pod kątem obecności inkluzji;
- opracowaniu metody rejestracji punktowych widm absorpcyjnych inkluzji w dużych obszarach tkanki;
- zaplanowaniu i wykonaniu pomiarów metodą mikrospektroskopii promieniowania podczerwonego z transformatą Fouriera, w tym optymalizacji stosowanych warunków pomiarowych;
- udziale w analizie danych pomiarowych i doborze metod statystycznej ewaluacji wyników badań;
- interpretacji uzyskanych rezultatów, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu wraz z dyskusją wyników.

Mój udział procentowy szacuję na 40%.

H5. **Chwiej J**, Kutorasinska J, Janeczko K, Gzielo-Jurek K, Uram L, Appel K, Simon R, Setkowicz Z, 2012, Progress of elemental anomalies of hippocampal formation in the pilocarpine model of

temporal lobe epilepsy – X-ray fluorescence microscopy study, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 404, 3071-3080, IF: 3,659.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

– przygotowaniu i kierowaniu realizowanymi w ośrodkach HASYLAB i ANKA projektami badawczymi (odpowiednio I-20110056 EC i BIO-1) oraz grantem MNiSW IUVENTUS PLUS nr JP2010005370, które umożliwiły powstanie tej pracy;

– zaplanowaniu i wykonaniu pomiarów próbek tkanki metodą rentgenowskiej mikroskopii fluorescencyjnej, optymalizacji stosowanych warunków pomiarowych, doborze wykorzystywanych w badaniach materiałów wzorcowych;

– analizie uzyskanych danych pomiarowych, doborze metod statystycznej ewaluacji wyników badań;

– interpretacji uzyskanych rezultatów, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu wraz z dyskusją wyników.

Mój udział procentowy szacuję na 50%.

IVc. Omówienie celu naukowego i wyników prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Wprowadzenie

Epilepsja (padaczka) jest trzecim, co do częstości występowania, schorzeniem neurologicznym. Cierpi na nią ok. 1% populacji, a prawie 30% dotkniętych chorobą pacjentów ma drgawki, których nie da się kontrolować przy wykorzystaniu żadnej z aktualnie dostępnych terapii farmakologicznych. Dlatego też istnieje poważna konieczność poszukiwania nowych leków i terapii alternatywnych, a do tego celu niezbędna jest znajomość procesów, jakie prowadzą do pojawienia się spontanicznej, nawracającej aktywności drgawkowej u epileptycznych pacjentów. Badania nad przyczynami pojawienia się padaczki rzadko prowadzi się w oparciu o tkanki ludzkie, które mogą być pobierane tylko w trakcie chirurgicznej resekcji ogniska padaczkorodnego, co nie jest częstym zabiegiem, lub *post mortem*. Należy zwrócić uwagę na fakt, że w obu przypadkach mamy do czynienia z sytuacją, kiedy doszło już do pełnego rozwoju choroby. Zatem obserwacja zmian związanych z epileptogenezą nie może być prowadzona

Alternatywne rozwiązanie stanowią zwierzęce modele padaczki, dzięki którym zmiany w narządach czy tkankach oceniać możemy na bardzo wczesnych etapach rozwoju choroby, kiedy nie jest jeszcze możliwe jej zdiagnozowanie u ludzi. Analiza materiału biologicznego z okresu epileptogenezy umożliwia, zatem badanie procesów prowadzących do pojawienia się spontanicznej aktywności drgawkowej. Obserwując przebieg i charakter drgawek, możemy z kolei oceniać skuteczność nowych leków przeciwdrgawkowych. W odróżnieniu od tkanek pobieranych od ludzi przyżyciowo, czy też pośmiertnie, w przypadku badań na zwierzętach, na każdym ich etapie, mamy możliwość weryfikacji warunków doświadczalnych. Badane populacje zwierząt pochodzą, bowiem z określonych szczepów, a w okresie przed i w trakcie eksperymentu ich hodowla podlega ścisłej kontroli.

Mimo, że znanych jest kilkadziesiąt modeli epilepsji, to tylko dwie grupy zalecane są przez NIH/NINDS (National Institutes of Health/National Institute of Neurological Disorders and

Stroke) do badań nad mechanizmami patogenezy epilepsji i nowymi terapiami farmakologicznymi. Są to modele *post status epilepticus* (pilokarpinowy i kwasu kainowego) oraz drgawek rozniecanych. Włączone do habilitacji prace dotyczyły właśnie jednego z zalecanych modeli, a mianowicie modelu pilokarpinowego. Opublikowane w nich badania prowadzone były we współpracy z Zakładem Neuroanatomii Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, gdzie za zgodą Komisji Bioetycznej UJ i w zgodzie z międzynarodowymi standardami, wykonywane były wszystkie eksperymenty na zwierzętach.

Głównym celem studiów prowadzonych w ramach habilitacji było określenie mechanizmów, jakie mogą być odpowiedzialne za pojawienie się zmian neurodegeneracyjnych w formacji hipokampa oraz spontaniczną aktywność drgawkową obserwowaną w fazie chronicznej modelu pilokarpinowego. Dla potrzeb realizacji założonych celów wykorzystane zostały nowoczesne metody spektroskopowe bazujące na unikatowych własnościach promieniowania synchrotronowego. Olbrzymia jasność i naturalna kolimacja tego rodzaju promieniowania pozwala na analizę nawet bardzo subtelnych zmian biomolekularnych próbek z przestrzenną zdolnością rozdzielczą sięgająca ułamków mikrometrów. Właśnie, dlatego bazujące na promieniowaniu synchrotronowym techniki badawcze, a wśród nich przede wszystkim krystalografia rentgenowska, rentgenowska mikroskopia fluorescencyjna, spektroskopia absorpcyjna promieniowania X w pobliżu krawędzi absorpcji czy mikrospektroskopia promieniowania podczerwonego z transformatą Fouriera odgrywają coraz większą rolę w badaniach biomedycznych.

W pracach wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego wykorzystane zostały dwie metody badawcze bazujące na promieniowaniu synchrotronowym, a mianowicie rentgenowska mikroskopia fluorescencyjna oraz mikrospektroskopia promieniowania podczerwonego z transformatą Fouriera. Pierwsza z nich użyta została do oceny topograficznych i ilościowych zmian pierwiastkowych, jakie zachodzą w formacji hipokampa na skutek wywołanych pilokarpiną drgawek epileptycznych (prace **H1** i **H5**). Przy użyciu drugiej analizowano natomiast anomalia w zakresie gromadzenia i struktury głównych biomolekuł oraz gromadzenia kreatyny (prace **H2**, **H3** oraz **H4**).

Badania opublikowane w pracach **H1-H5** realizowane były we współpracy z czterema europejskimi ośrodkami synchrotronowymi (HASYLAB, ANKA, SOLEIL i ELETTRA) w ramach ośmiu zrealizowanych w nich projektów badawczych, którymi kierowałam. Należy wspomnieć, że akceptacja każdego z takich projektów poprzedzona była procesem recenzji dokonywanym przez międzynarodowe gremia specjalistów z danej dziedziny.

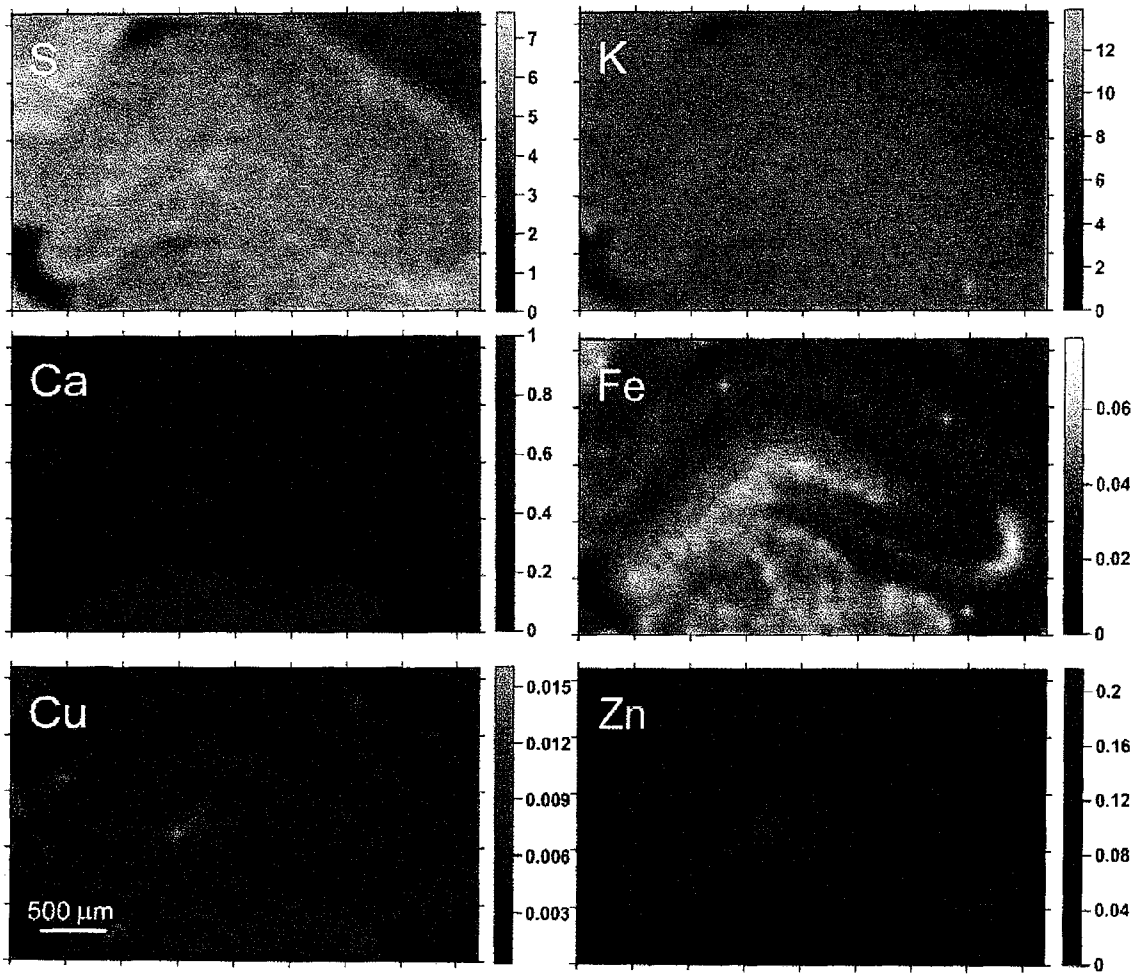
Cel badań

1. Zbadanie użyteczności technik bazujących na promieniowaniu synchrotronowym w badaniach procesu epileptogenezy.
2. Określenie roli metali w patogenezie i przebiegu epilepsji w pilokarpinowym modelu drgawek.
3. Ocena zmian w zakresie akumulacji i struktury głównych biomolekuł oraz gromadzenia kreatyny występujących na skutek aktywności drgawkowej.
4. Określenie grupy procesów zaangażowanych w powstanie zmian neurodegeneracyjnych formacji hipokampa oraz spontaniczną aktywność drgawkową w modelu pilokarpinowym.

5. Rozwój metodologii mikroobrazowania tkanek z użyciem technik bazujących na promieniowaniu synchrotronowym dla potrzeb neurologii i neuropatologii.

Rezultaty

Praca H1 jest pierwszą z publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego i inicjuje cykl prowadzonych przeze mnie badań nad mechanizmami patogenezy epilepsji w różnych zwierzęcych modelach tego schorzenia. W pracy tej analizowano wpływ aktywności drgawkowej wywołanej pilokarpiną na skład pierwiastkowy szczurzej formacji hipokampa. Badania prowadzono dla ostrej fazy stanu padaczkowego. Po raz pierwszy, dla pilokarpinowego modelu drgawek, przeprowadzona została topograficzna i ilościowa analiza wielopierwiastkowa formacji hipokampa ze zdolnością rozdzielczą sięgająca kilkunastu mikrometrów. Taka równoczesna analiza wielu pierwiastków w tkance ma kluczowe znaczenie, kiedy weźmie się pod uwagę fakt współdziałania niektórych pierwiastków w procesach prowadzących do uszkodzenia mózgu, jak na przykład kooperację jonów cynku i wapnia w promocji zjawiska ekscytotoksyczności. Należy wspomnieć, że również sama metoda analizy wielopierwiastkowej – rentgenowska mikroskopia fluorescencyjna – została po raz pierwszy zastosowana w badaniach nad procesem epileptogenezy. Uzyskane w ramach pracy wyniki potwierdziły, że nawet krótkotrwały napad drgawkowy może wywoływać zmiany w hipokampalnej akumulacji metali. Wykazany wzrost poziomu wapnia w sektorach 1 i 3 rogu Ammona (CA1 i CA3) potwierdził, że procesem zaangażowanym w epileptogenezę, już na bardzo wczesnym jego etapie, jest ekscytotoksyczność. Poza zmianami w akumulacji wapnia u zwierząt poddanych działaniu pilokarpiny wykazano spadek gęstości powierzchniowej cynku w rejonach CA3 i w zakręcie zębatym (DG) oraz miedzi w CA3.



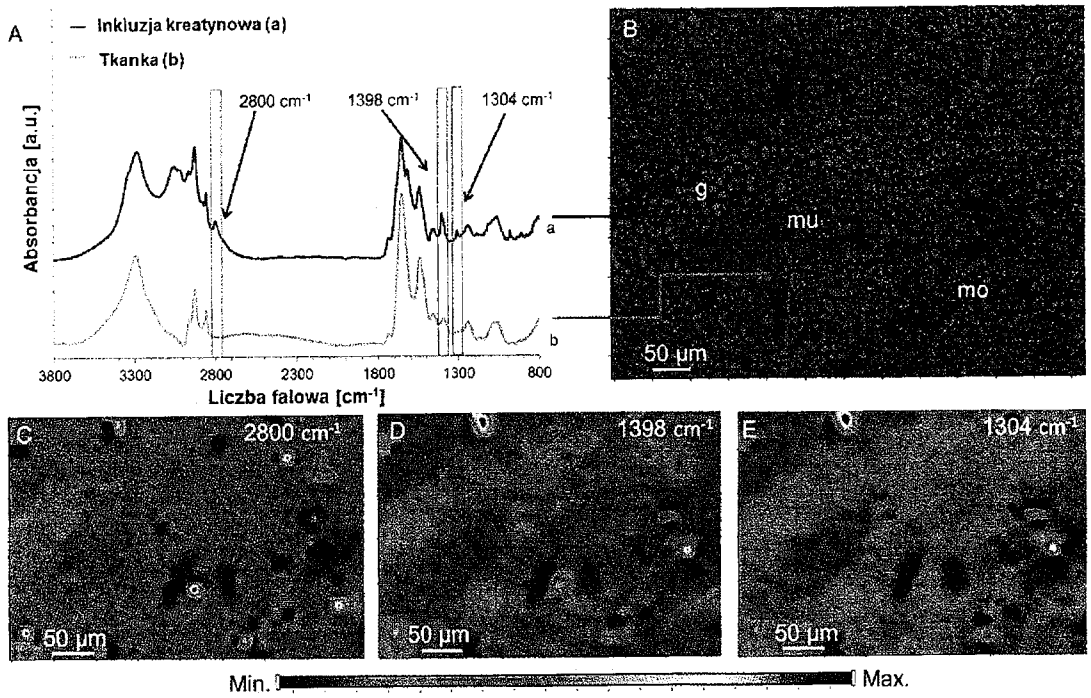
Rysunek 1. Przykładowe mapy pierwiastkowe uzyskane dla szczurzej formacji hipokampa przy wykorzystaniu rentgenowskiej mikroskopii fluorescencyjnej, na skalach gęstości powierzchniowe w $\mu g/cm^2$.

Wiadomo, że metale praktycznie nie występują w organizmie w stanie wolnym, ale w formie związanej, głównie z białkami, tworząc metaloproteiny. Z kolei napady epileptyczne wywołują w mózgu wtórne zmiany neurodegeneracyjne, a jednym z mechanizmów prowadzących do atrofii i śmierci komórek nerwowych są patologie białek. Dlatego też w dalszym etapie prowadzonych studiów sprawdzano, czy obserwowanym w fazie ostrej stanu padaczkowego zmianom w akumulacji metali towarzyszą anomalia w zakresie gromadzenia głównych makromolekuł biologicznych (białek, lipidów, związków zawierających grupy fosforanowe) i ich struktury. Wyniki tych badań, uzyskane metodą mikrospektroskopii promieniowania podczerwonego z transformatą Fouriera, przedstawiono w **pracy H2**. Zastosowanie w badaniach synchrotronowego źródła promieniowania podczerwonego, pozwoliło na analizę zmian biochemicznych tkanki nerwowej z ograniczoną zjawiskiem dyfrakcji zdolnością rozdzielczą. Analiza spektralna zarejestrowanych widm absorpcyjnych potwierdziła, że zmianom pierwiastkowym, występującym na skutek drgawek padaczkowych wywołanych

pilokarpiną, towarzyszą zmiany w zakresie struktury biomolekuł. Anomalia te występują selektywnie, tylko w niektórych warstwach komórkowych formacji hipokampa (w warstwie piramidowej sektora 3 rogu Ammona oraz warstwie komórek wielokształtnych i molekularnej zakrętu zębatego), co potwierdza konieczność użycia w badaniach techniki badawczej, charakteryzującej się wysoką rozdzielczością przestrzenną.

Dla zwierząt poddanych działaniu pilokarpiny zaobserwowano wzrost stosunku absorbancji przy liczbach falowych 1631 i 1657 cm^{-1} oraz 1548 i 1657 cm^{-1}, który może wskazywać na podwyższoną zawartość w tkance białek o drugorzędowej strukturze typu beta. Ponadto, stwierdzono wzrost stosunku intensywności pasm lipidowych występujących przy liczbach falowych 2921 i 2957 cm^{-1}. Zaburzenie w tym zakresie widma absorpcyjnego może z kolei wynikać ze zmian strukturalnych tłuszczów, w tym zmian długości łańcuchów lipidowych i poziomu nasycenia fosfolipidów.

Prowadząc pomiary z wykorzystaniem mikrospektroskopii w podczerwieni, zaobserwowano w tkance pochodzącej od zwierząt epileptycznych obecność depozytów, których wstępna analiza wskazywała na obecność kreatyny. Mając na uwadze funkcje kreatyny w ośrodkowym układzie nerwowym, jak również fakt, iż podobne depozyty zostały w ostatnim czasie zaobserwowane w tkance nerwowej ludzi ze schorzeniami neurodegeneracyjnymi (choroba Alzheimera i stwardnienie boczne zanikowe) oraz w modelach zwierzęcych tych schorzeń, podjęto badania nad rolą kreatyny w patogenezie epilepsji. Wyniki wstępnych badań przedstawione zostały w **pracy H3**, która jest pierwszą publikacją donoszącą o obecności złogów kreatynowych w epileptycznej tkance nerwowej. Ze względu na rozmiary depozytów, które wynosiły kilka-kilkanaście mikrometrów, konieczne było wykorzystanie do ich badania wysokorozdzielczego narzędzia analitycznego. Dla potrzeb identyfikacji obecności kreatyny w depozytach wykorzystana została synchrotronowa mikrospektroskopia promieniowania podczerwonego z transformatą Fouriera. Jako technikę komplementarną do mikrospektroskopii FTIR zastosowano mikrospektroskopię Ramana. Ta druga metoda posłużyła nie tylko weryfikacji wyników, w szczególności w przypadkach wątpliwych, ale również do określenia lokalizacji depozytów w tkance nerwowej, aby wykluczyć możliwość jej ewentualnej kontaminacji. Uzyskane wyniki pokazały, że częstość występowania depozytów keratynowych jest istotnie większa w hipokampach zwierząt poddanych działaniu pilokarpiny w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Dodatkowo, dla zwierząt epileptycznych zaobserwowano silną korelację pomiędzy ilością złogów kreatynowych a czasem trwania aktywności drgawkowej. Uzyskane wyniki wskazywać mogą na zaburzenia funkcji kinazy kreatynowej, która jest enzymem katalizującym fosforylację kreatyny do fosfokreatyny, stanowiącej czasowy i przestrzenny bufor energetyczny. Jest to tym bardziej prawdopodobne, że zjawisko inaktywacji, w szczególności mitochondrialnej kinazy kreatynowej, może być skutkiem jej zmian strukturalnych zachodzących pod wpływem procesów wolnorodnikowych. Zwiększona produkcja wolnych rodników, z jaką mamy do czynienia w czasie aktywności drgawkowej, może bowiem powodować zmianę konformacji kinazy kreatynowej z oktamerycznej na nieaktywną dimeryczną.



Rysunek 2. Porównanie widm IR zarejestrowanych dla wybranej inkluzji kreatynowej i tkanki nerwowej (A). Obraz mikroskopowy obszaru zakrętu zębatego szczura z drgawkami wywołanymi pilokarpiną, depozyty kreatynowe widoczne są jako ciemniejsze punkty (B). Rozkłady wybranych pasm absorpcyjnych kreatyny: 2800 cm^{-1} (C), 1398 cm^{-1} (D) and 1304 cm^{-1} (E) w prostokątnym obszarze tkanki widocznym na zdjęciu (B).

Aby zweryfikować, czy wywołane drgawkami zaburzenia w zakresie akumulacji kreatyny mają charakter trwały czy przejściowy, w kolejnym etapie badań dokonano porównania częstości występowania depozytów keratynowych w formacji hipokampa zwierząt epileptycznych w fazie ostrej oraz w okresie stabilizacji zachowania i zapisu EEG po podaniu pilokarpiny. Wyniki tych badań przedstawiono w **pracy H4**. Podobnie, jak w **pracy H3**, dla potrzeb detekcji depozytów kreatynowych wykorzystana została mikrospektroskopia FTIR ze źródłem synchrotronowym. Uzyskane wyniki potwierdziły, że gromadzenie kreatyny nie jest tylko tymczasowym, ale przynajmniej długotrwałym efektem wywołanych pilokarpiną drgawek. W fazie stabilizacji częstość depozytów kreatynowych w hipokampie była wyższa nie tylko w porównaniu do zwierząt kontrolnych, ale w niektórych przypadkach również w stosunku do zwierząt epileptycznych w ostrej fazie stanu padaczkowego. Uzyskane wyniki mogą zatem wskazywać, że na skutek drgawek dochodzi do długotrwałego lub trwałego spadku aktywności enzymatycznej kinazy kreatynowej.

W **pracy H5** analizowano przebieg czasowy wywołanych drgawkami zmian pierwiastkowych w formacji hipokampa. Ponadto sprawdzano, czy anomalia pierwiastkowe tkanki nerwowej rejestrowane w fazie stabilizacji zachowania i aktywności bioelektrycznej mózgu zależą od parametrów opisujących zachowanie zwierząt w fazie ostrej stanu

padaczkowego. W tym kontekście należy nadmienić, że podanie szczurom pilokarpiny powoduje wystąpienie u nich, pojawiających się w określonej sekwencji czasowej, zmian behawioralnych, którym towarzyszą zmiany w zapisie EEG. I tak wyróżnia się (1) fazę ostrą rozwijającą się w limbiczny stan padaczkowy, (2) fazę latencji („cichą"), w której dochodzi do stabilizacji zachowania zwierząt i ich zapisu EEG oraz (3) fazę chroniczną z pojawiającymi się spontanicznie i nawracającymi drgawkami epileptycznymi. Wyniki uzyskane w **pracy H5** wykazały jednoznacznie, że część zmian rejestrowanych w ostrej fazie stanu padaczkowego ma charakter przejściowy. Tak się dzieje na przykład w przypadku cynku, którego koncentracja w hipokampie początkowo może maleć. Jednak w miarę upływu czasu, kiedy z jednej strony dochodzi do normalizacji zachowania zwierząt, z drugiej jednak trwają procesy, które finalnie mogą prowadzić do spontanicznie nawracających drgawek, gęstość powierzchniowa tego pierwiastka rośnie. Wzrost ten dotyczy tylko niektórych obszarów formacji hipokampa i związany jest ze zjawiskiem rozrostu (sprouting) włókien mszatych, które oznacza reorganizację połączeń synaptycznych zachodzącą w wewnętrznej warstwie molekularnej obszaru DG. W normalnych warunkach włókna mszate (aksony komórek ziarnistych) tworzą połączenia synaptyczne z komórkami piramidowymi obszaru CA3. Na skutek aktywności drgawkowej dochodzi jednak do wytworzenia nowych synaps pobudzających z dendrytami innych komórek ziarnistych i w efekcie do powstania pętli pobudzającej, która może odpowiadać za pojawienie się spontanicznie nawracającej aktywności drgawkowej, czyli epilepsji. Ponieważ zakończenia włókien mszatych stanowią największe w układzie nerwowym rezerwuary cynku, proces ten możemy obserwować jako wzrost zawartości tego pierwiastka w rejonach, gdzie zjawisko to ma miejsce.

Inaczej rzecz ma się z wapniem, którego poziom w większości badanych obszarów formacji hipokampa wzrasta już w kilka godzin po podaniu pilokarpiny, a następnie maleje lub pozostaje stały. Co ciekawe, w fazie latencji obserwuje się kolejny wzrost gęstości powierzchniowej tego pierwiastka, a 7 dni od momentu podania pilokarpiny zawartość Ca w badanych obszarach jest co najmniej dwa razy wyższa niż poziom rejestrowany u zwierząt kontrolnych.

W zdrowym mózgu jony wapnia uczestniczą w szeregu procesów komórkowych, jak różnicowanie i wzrost neuronów, pobudliwość błonowa, egzocytoza czy aktywność synaptyczna. Ze względu na fakt, że zawartość jonów wapnia determinuje stan fizjologiczny komórek nerwowych, podejrzewa się, że zaburzenia ich homeostazy mają związek z indukcją wielu chorób neurodegeneracyjnych. Aktywacja postsynaptycznych receptorów NMDA, wywołana przez nadmierne uwalniane glutaminianiu w czasie drgawek epileptycznych, skutkuje nadmiernym napływem wapnia do neuronów. To właśnie ten proces jest, najprawdopodobniej, odpowiedzialny za wzrost poziomu tego pierwiastka obserwowany w ostrej fazie stanu padaczkowego wywołanego pilokarpiną.

Podwyższona koncentracja jonów wapnia, jaka zachodzi w fazie ostrej, zwiększa uwalnianie glutaminianu. Glutaminian, działając na receptory AMPA/kainowe, umożliwia napływ jonów Na^+ i Ca^{2+} do wnętrza komórki. W konsekwencji tego jony Mg^{2+}, które normalnie blokują receptory NMDA, są usuwane, co umożliwia aktywację tych receptorów przez glutaminian i w efekcie dalszy napływ jonów wapnia do komórek postsynaptycznych.

Prawdopodobnie ten właśnie proces odpowiedzialny jest za ponowny wzrost masy powierzchniowej wapnia w początkowym okresie fazy latencji.

Bardzo ważną część pracy stanowi ocena „późnych" zmian pierwiastkowych w kontekście informacji na temat przebiegu stanu padaczkowego wywołanego pilokarpiną. Wśród parametrów behawioralnych rejestrowanych u zwierząt epileptycznych znalazły się: czas latencji, czyli okres między podaniem pilokarpiny a pojawieniem się pierwszych symptomów aktywności drgawkowej, maksymalne nasilenie ataków oraz całkowity czas trwania aktywności napadowej. Wyniki uzyskane dla zwierząt 7 dni po podaniu pilokarpiny potwierdziły, że poziom niektórych pierwiastków jest wciąż silnie zależny od parametrów opisujących przebieg stanu padaczkowego. Tak dzieje się przede wszystkim w przypadku Ca i K. Poziom wapnia we wszystkich badanych obszarach jest tym niższy im później po podaniu pilokarpiny zarejestrowano aktywność drgawkową i tym wyższy, im dłużej trwały ataki. Dla potasu, również dla wszystkich analizowanych obszarów formacji hipokampa, relacje te są dokładnie odwrotne. Dodatkowo, dla tego pierwiastka zaobserwowano ujemną korelację pomiędzy akumulacją w sektorach hipokampa CA1 i CA3 a nasileniem ataków.

Poziom S i Cu był tym wyższy, im później rozpoczęła się aktywność drgawkowa i tym niższy, im silniejsze były ataki. Z kolei poziom Zn w obszarze zakrętu/zawoju zębatego wykazywał dodatnią korelację z czasem trwania aktywności drgawkowej. Obserwacje poczynione dla Zn oraz Ca wydają się być szczególnie istotne, jeśli weźmie się pod uwagę procesy, poprzez które pierwiastki te mogą uczestniczyć w patogenezie padaczki. Wskazują, bowiem, że nasilenie procesów ekscytotoksyczności i wzrostu włókien mszatych jest silnie zależne od czasu trwania aktywności drgawkowej. Wyniki te, jak również korelacje zaobserwowane dla S, K i Cu potwierdzają, jak wielkie znaczenie ma kontrola intensywności i czasu napadów u epileptycznych pacjentów.

Reasumując, wyniki uzyskane w ramach osiągniecia habilitacyjnego i przedstawione w cyklu publikacji **H1-H5** jednoznacznie wskazują na użyteczność wykorzystania nowoczesnych metod spektroskopowych w badaniach nad patogenezą epilepsji. Analiza pierwiastkowa i biochemiczna tkanek pochodzących z różnych okresów epileptogenezy wykazała ponadto, że u podłoża zmian neurodegeneracyjnych formacji hipokampa i spontanicznej aktywności drgawkowej pojawiającej się w fazie chronicznej modelu pilokarpinowego, mogą stać zjawiska takie, jak ekscytotoksyczność, wzrost włókien mszatych, wzmożona produkcja wolnych rodników pod wpływem jonów żelaza oraz spadek aktywności enzymatycznej kinazy kreatynowej.

Należy zaznaczyć również, że opisane w pracach **H1-H5** procedury przygotowania materiału biologicznego, doboru materiałów referencyjnych, pomiaru próbek i wzorców wnoszą istotny wkład w rozwój metodologii mikroobrazowania tkanek z użyciem technik bazujących na promieniowaniu synchrotronowym. Mogą one z powodzeniem być wykorzystywane w badaniach patogenezy innych schorzeń układu nerwowego o słabo poznanej etiologii.

V. Plany badawcze

Znajomość mechanizmów epileptogenezy w modelu pilokarpinowym pozwala wkroczyć w kolejne etapy badań, a mianowicie badania leków oraz terapii, które mogłyby przyczynić się do redukcji niepożądanych zmian tkanki nerwowej i tym samym zmniejszyć ryzyko pojawienia się

drgawek spontanicznych w fazie chronicznej tego modelu padaczki. Badania te będą miały między innymi na celu analizę mechanizmów oraz skuteczności działania w modelu pilokarpinowym wybranych leków neuroprotekcyjnych (FK-506, cyklosporyna A) zwiększających przeżycie komórek nerwowych w warunkach patologicznych. Badania nad mechanizmami działania FK-506 zostały już rozpoczęte, a ich wstępne wyniki opublikowane [1,2].

Plany badawcze na kolejne lata obejmują również studia nad procesami prowadzącymi do pojawienia się spontanicznej aktywności drgawkowej w innych zwierzęcych modelach padaczki, w których napady drgawkowe wywoływane są kwasem kainowym lub elektroszokami. Modele te, obok pilokarpinowego, należą do grupy zalecanych przez NIH/NINDS dla potrzeb badań nad epileptogenezą i nowymi lekami przeciwdrgawkowymi. Studia dotyczące patogenezy drgawek spontanicznych wywołanych wielokrotnym drażnieniem elektrycznym zostały już rozpoczęte, a ich pierwsze wyniki zamieszczone w manuskrypcie przesłanym do druku w Journal of Biological Inorganic Chemistry [3].

Badane będą ponadto mechanizmy przeciwdrgawkowego i neuroprotekcyjnego działania diety ketogenicznej w mózgu epileptycznym, jak również jej działania regeneracyjnego w różnego typu uszkodzeniach mózgu. Dlatego podjęta zostanie próba określenia procesów, poprzez które dieta ketogeniczna przyczynia się do redukcji częstości i nasilenia ataków epileptycznych w pilokarpinowym modelu drgawek. Przede wszystkim jednak analizowane będzie neuroprotekcyjne działanie diety w przypadku uszkodzenia mózgu, co może przyczynić się do postępu w badaniach nad jej wykorzystaniem u ludzi, jako czynnika zwiększającego przeżycie neuronów i minimalizującego ryzyko pojawienia się epilepsji po urazach mózgu. W tym celu konieczna jest znajomość zmian pierwiastkowych i biochemicznych, jakie indukuje w mózgu samo uszkodzenie. Badania takie zostały już rozpoczęte, a ich wstępne wyniki opublikowane [4].

VI. Dorobek dydaktyczny i popularyzatorski oraz informacja o współpracy międzynarodowej habilitanta

Prowadzone przeze mnie zajęcia dydaktyczne obejmowały *Ćwiczenia rachunkowe z Fizyki Ogólnej* dla studentów Wydziału Matematyki Stosowanej, Wydziału Elektrotechniki, Automatyki, Informatyki i Elektroniki, Wydziału Inżynierii Metali i Informatyki Przemysłowej, Wydziału Górnictwa i Geoinżynierii, Wydziału Geologii, Geofizyki i Ochrony Środowiska oraz

---

[1] Chwiej J, Janeczko K, Marciszko M, Czyzycki M, Rickers K, Setkowicz Z, 2010, Neuroprotective action of FK-506 (tacrolimus) after seizures induced with pilocarpine: quantitative and topographic elemental analysis of brain tissue, Journal of Biological Inorganic Chemistry, 15, 283-289.

[2] Dudała J, Janeczko K, Setkowicz Z, Eichert D, Chwiej J, 2012, The use of SR-FTIR microspectroscopy for a preliminary biochemical study of the rat hippocampal formation tissue in case of pilocarpine induced epilepsy and neutroprotection with FK-506, Nukleonika, 57, 615-619.

[3] Chwiej J, Gabrys H, Janeczko K, Kutorasinska J, Gzielo-Jurek K, Matusiak K, Appel K, Setkowicz Z, Elemental anomalies in the hippocampal formation after repetitive electrical stimulation – an X-ray fluorescence microscopy study, przesłane do druku w Journal of Biological Inorganic Chemistry.

[4] Chwiej J, Sarapata A, Janeczko K, Stegowski Z, Appel K, Setkowicz Z, 2011, X-ray fluorescence analysis of long-term changes in the levels and distributions of trace elements in the rat brain following mechanical injury, Journal of Biological Inorganic Chemistry, 16, 275-283.

Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej, a także specjalistyczne *Laboratoria z Radiochemii* oraz *Ćwiczenia z Zastosowań promieniowania X* dla studentów WFiIS. Obecnie prowadzę ćwiczenia rachunkowe do kursów *Mechanika i fizyka statystyczna* oraz *Elektromagnetyzm i optyka* dla studentów kierunku Fizyka Medyczna WFiIS.

Od 2007 roku do chwili obecnej byłam promotorem 5 prac inżynierskich i 17 magisterskich zrealizowanych na WFiIS. Aktualnie jestem opiekunem 3 prac magisterskich. Od początku 2013 roku pełnię ponadto funkcję opiekuna praktyk studenckich dla kierunku Fizyka Medyczna.

Od 2011 roku jestem promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim mgr inż. Justyny Kutorasińskiej.

Do moich największych osiągnięć dydaktycznych należy udział w powołaniu do życia Studenckiego Koła Naukowego Fizyków Medycznych „KERMA", którego opiekunem jestem od 2010 roku do chwili obecnej. Poprzez swoją działalność w Kole staram się popularyzować fizykę medyczną, zachęcać studentów do rozwoju naukowego i interdyscyplinarnej pracy badawczej, a także rozwijać interdyscyplinarną współpracę z innymi instytucjami, nie tylko naukowo-badawczymi.

W ramach swojej działalności popularyzatorskiej uczestniczyłam w projekcie Gender Day, który jest polską edycją europejskiego projektu „Science: it's a girl thing!" i ma na celu promowanie wśród kobiet wyboru kierunków ścisłych jako drogi kariery zawodowej. Ponadto, w 2012 roku byłam jednym z finalistów konkursu popularyzatorskiego INTER Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.

Praktycznie wszystkie prowadzone przeze mnie dotychczas prace badawcze realizowane były poza granicami kraju, w ośrodkach synchrotronowych znajdujących się w Niemczech, Francji, i we Włoszech. Uzyskanie dostępu do znajdującej się w nich aparatury badawczej poprzedza zawsze przygotowanie projektu badawczego, który musi być pozytywnie zaopiniowany przez międzynarodowe gremium specjalistów. Dla potrzeb realizacji badań prowadzonych po doktoracie (2007 rok) przygotowałam z sukcesem kilkanaście takich projektów. Należy wspomnieć, że we wszystkich pełniłam funkcję głównego wykonawcy, a większością, w toku ich realizacji, również kierowałam.