

Wykorzystanie nowoczesnych metod spektroskopowych w badaniach nad patogenezą i przebiegiem epilepsji w zwierzęcych modelach drgawek

Joanna Chwiej

Katedra Fizyki Medycznej i Biofizyki

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH



Współpraca

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej,
Akademia Górniczo-Hutnicza

Instytut Zoologii
Uniwersytet Jagielloński

HASYLAB, Hamburg, Niemcy

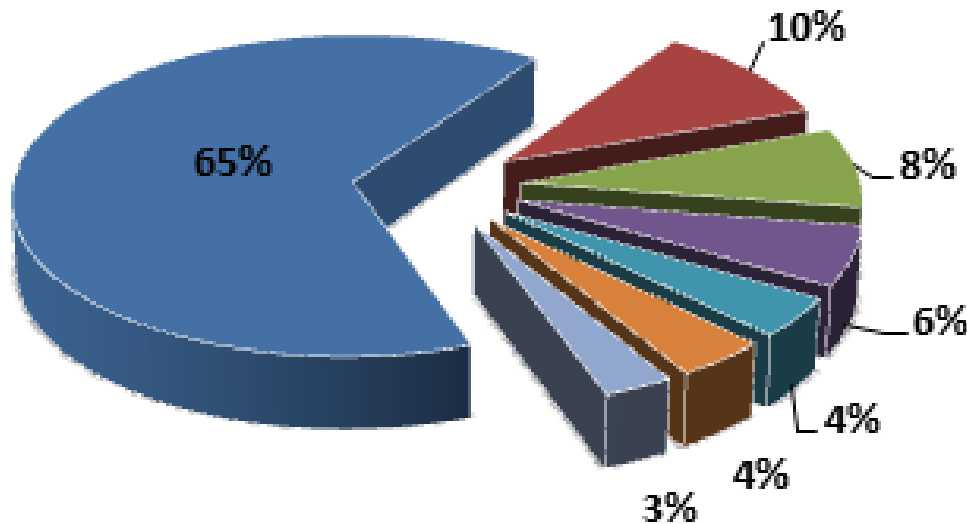
ANKA, Karlsruhe, Niemcy

SOLEIL, Gif-sur-Yvette, Francja

Epilepsja

Padaczka – powszechny i zróżnicowany zespół chronicznych schorzeń neurologicznych, których wspólną cechą są napady drgawkowe wynikające z nadmiernych, gwałtownych i samorzutnych wyładowań w komórkach nerwowych w mózgu.

Przyczyny padaczki



- Padaczki idiopatyczne
- Choroby naczyniowe
- Wady wrodzone
- Uszkodzenia mózgu
- Nowotwory
- Schorzenia neurodegeneracyjne



Epilepsja

Około 50 milionów ludzi na świecie i 400 tysięcy w Polsce cierpi na epilepsję;

30% epileptycznych pacjentów cierpi na **drgawki lekooporne**, które nie mogą być kontrolowane przy użyciu żadnej z aktualnie dostępnych terapii farmakologicznych;

Istnieje poważna konieczność poszukiwania nowych i alternatywnych strategii terapeutycznych!

Nawet krótkotrwały epizod napadów drgawkowych może skutkować lokalnymi lub rozległymi zmianami neurodegeneracyjnymi, a śmierć komórek nerwowych we wrażliwych strukturach mózgu obserwuje się po drgawkach trwających kilkanaście minut;

Minimalizacja uszkodzeń wywoływanych przez rozprzestrzeniające się drgawki jest jednym z istotnych celów współczesnej neurologii klinicznej!

Poszukiwanie nowych leków przeciwdrgawkowych i neuroprotektoryjnych wymaga lepszego zrozumienia procesu epileptogenezy!



Zwierzęce modele padaczki

Ludzkie tkanki do badań nad epilepsją można uzyskać tylko *post mortem* lub podczas chirurgicznej resekcji ogniska padaczkorodnego.

Zwierzęce modele padaczki pomagają lepiej proces epileptogenezy, co jest konieczne do opracowania nowych leków przeciwdrgawkowych i neuroprotekcyjnych.

Znanych jest więcej niż 50 różnych zwierzęcych modeli epilepsji!

Tylko dwie grupy modeli:

- modele *post status epilepticus*
- modele **drgawek rozniecanych**

zalecane są przez **NIH/NINDS** (American National Institute of Health/National Institute of Neurological Disorders and Stroke) do badań nad patogenezą epilepsji i nowymi metodami jej leczenia.

Stan padaczkowy (łac. *status epilepticus*) – sytuacja, kiedy napad padaczkowy utrzymuje się ponad 30 minut lub występuje trwająca tyle seria napadów między którymi chory nie odzyskuje przytomności.

Zwierzęce modele padaczki

Epilepsja płata skroniowego (*ang. temporal lobe epilepsy*) – najczęściej występujący rodzaj padaczki osób dorosłych, w kilkudziesięciu procentach przypadków lekooporna.

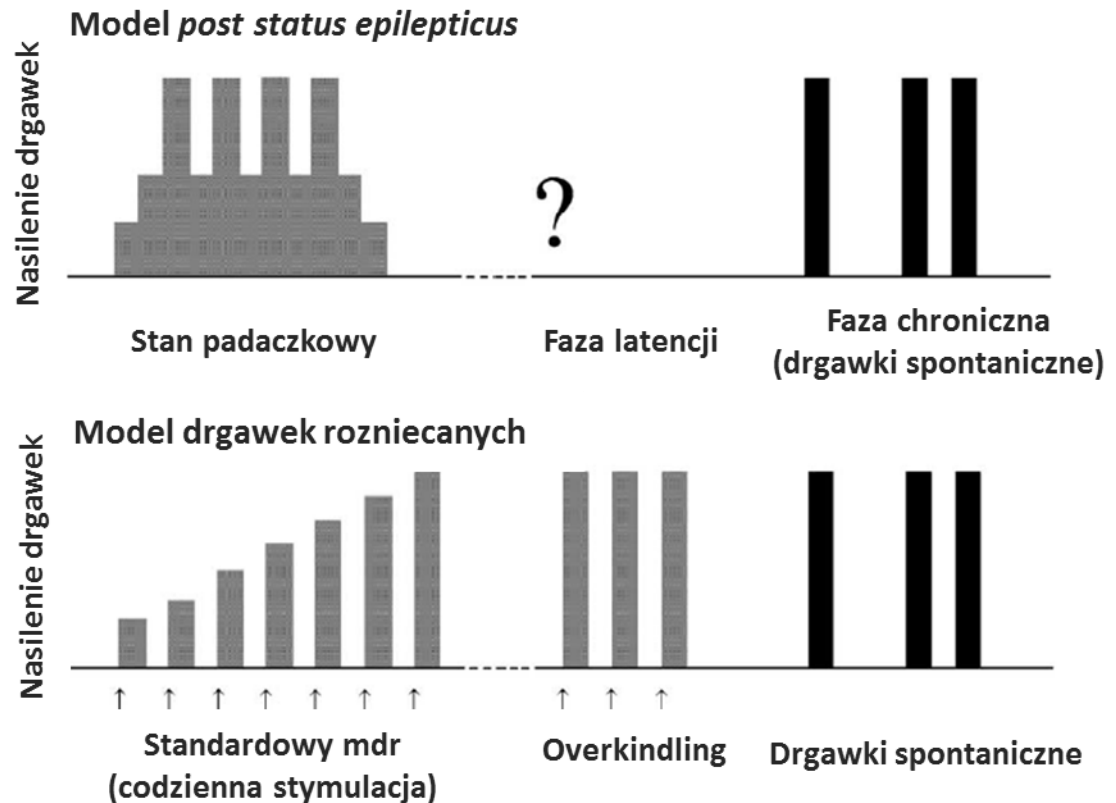
Modele TLE

Modele *post status epilepticus*

- pilokarpinowy
- kwasu kainowego

Modele drgawek rozniecanych

- bodźcem elektrycznym
- bodźcem chemicznym



Cele badawcze

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.



Materiał badawczy

Zwierzęta eksperymentalne

Zwierzęta eksperymentalne – dorosłe samce szczura szczepu Wistar, które hodowane były w warunkach kontrolowanej temperatury i oświetlenia ($20\pm 2^\circ\text{C}$, 12-h cykl jasny:12-h cykl ciemny); dieta Labofeed i woda dostępne *ad libitum*.

Wywołanie stanu padaczkowego u zwierząt 60-dniowych wg metody Covolan i Mello – pilokarpina wstrzykiwana dootrzewnowo (prod. Sigma, 300mg/kg), w celu zmniejszenia objawów wegetatywnych stosowano skopolaminę (prod. Sigma, 1mg/kg); zwierzęta kontrolne otrzymują sól fizjologiczną.

Obserwacja zachowania zwierząt – od czasu podania pilokarpiny, przez okres 6h, zwierzęta są obserwowane przez niezależnego eksperymentatora, zachowanie zwierząt jest protokołowane i oceniane według odpowiedniej skali (0-3).

Materiał badawczy

Zwierzęta eksperymentalne

Trzy okresy pojawiające się w zachowaniu zwierząt poddanych działaniu pilokarpiny:

1. **Faza ostra** trwająca około 24 godziny;
2. **Faza latencji** („cicha”) – stabilizacja zachowania i sygnału bioelektrycznego mózgu, trwa od 4 do 44 dni;
3. **Faza chroniczna** z nawracającymi drgawkami spontanicznymi.

Wczesna faza ostra

Wczesna faza latencji

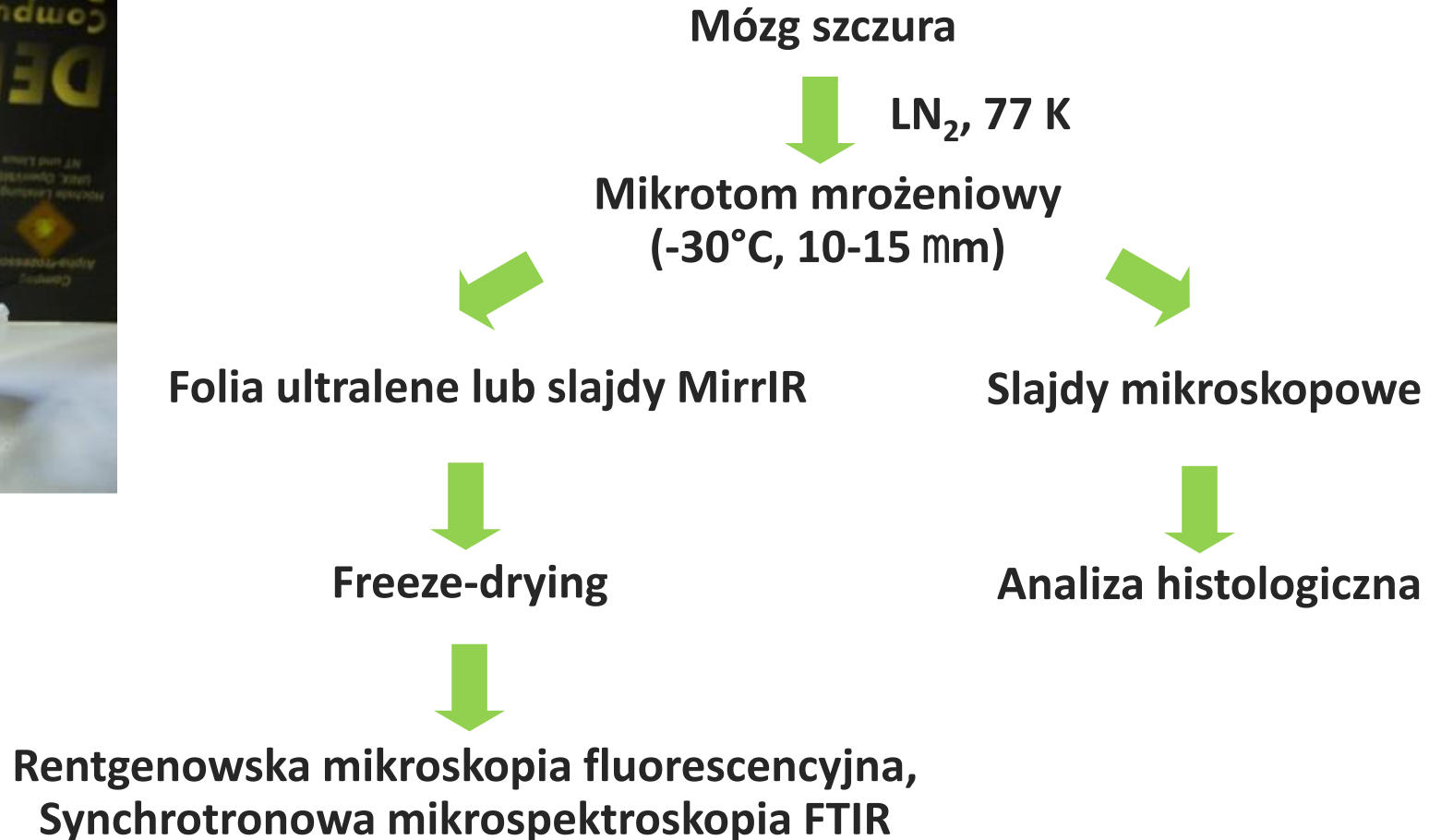
Zwierzęta kontrolne

Późna faza ostra

Rozwinięta faza latencji

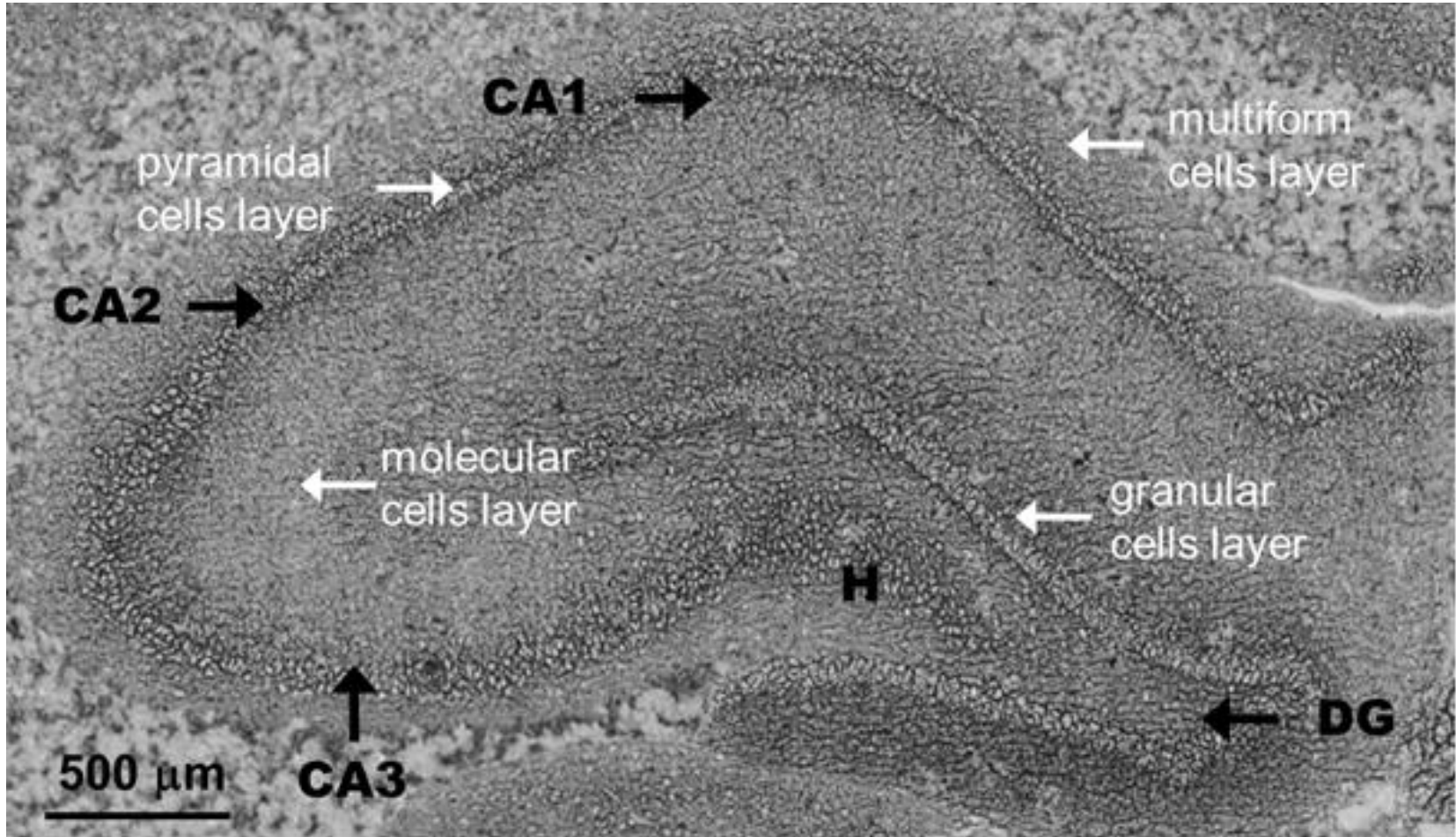
Materiał badawczy

Preparatyka próbek



Materiał badawczy

Formacja hipokampa



Obraz mikroskopowy części grzbietowej formacji hipokampa.

Rentgenowska mikroskopia fluorescencyjna:

- Jakościowa, topograficzna i ilościowa analiza pierwiastkowa

Mikrospektroskopia FTIR :

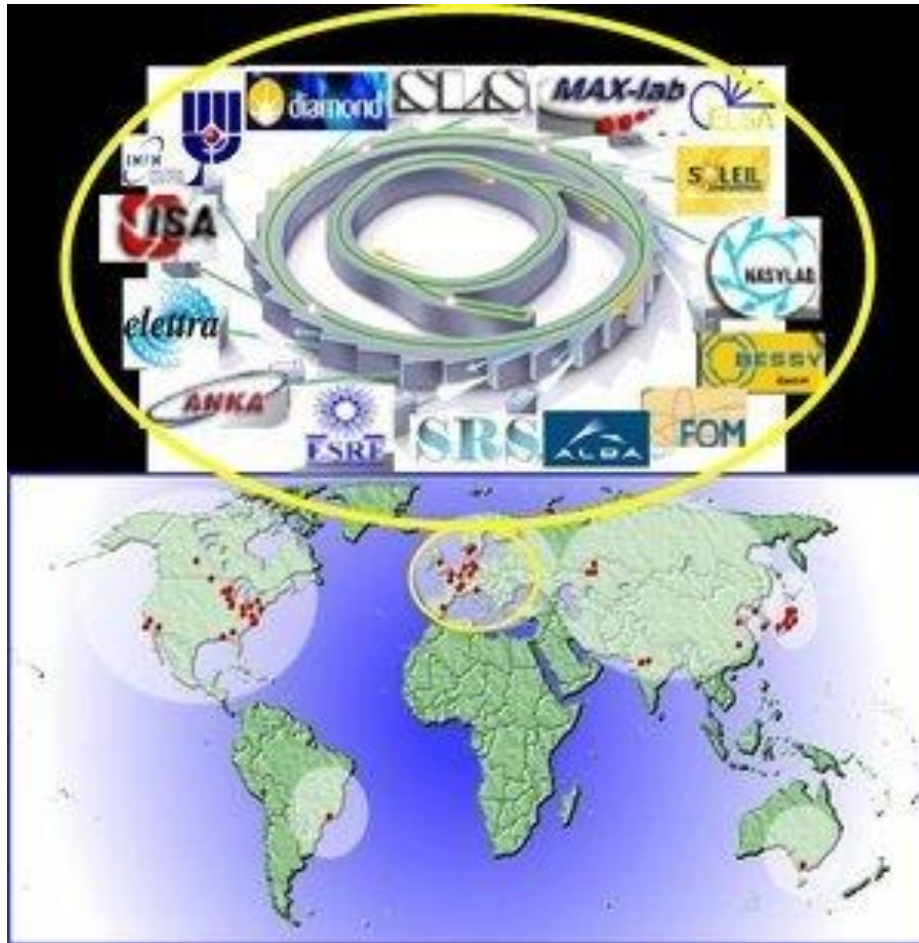
- Badania rozkładów białek, lipidów, związków zawierających grupy fosforanowe, etc.
- Zmiany strukturalne białek i lipidów
- Detekcja kreatyny

Mikrospektroskopia Ramana:

- Komplementarna do mikrospektroskopii FTIR
- Potwierdzenie obecności kreatyny
- Lokalizacja depozytów kreatynowych w tkance

Metody badawcze

Promieniowanie synchrotronowe



- szeroki zakres widmowy
- duża moc emisji
- silna kolimacja wiązki
- duża jasność
- polaryzacja
- struktura czasowa

Metody badawcze

Rentgenowska mikroskopia fluorescencyjna

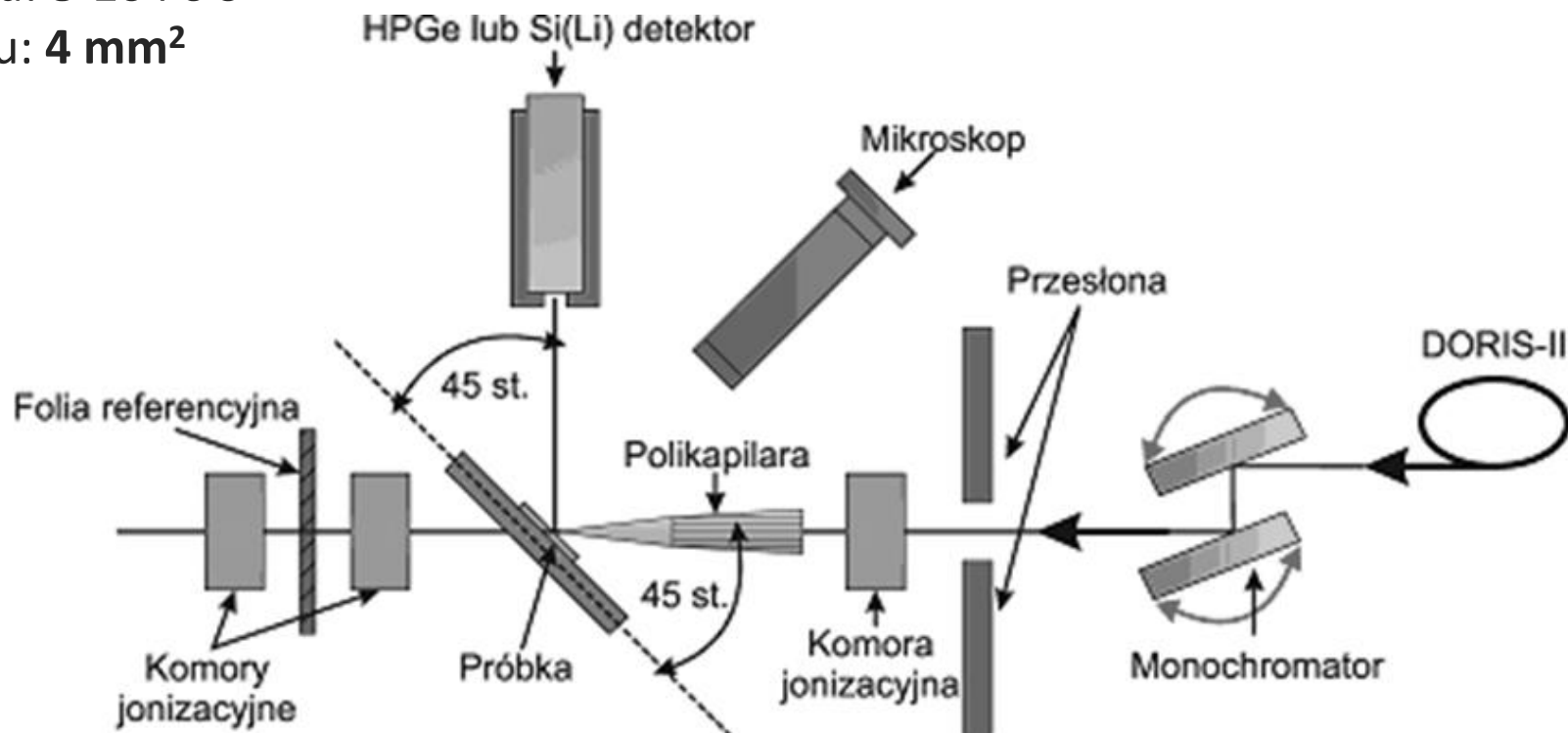
Pomiary na linii L w **HASYLAB** oraz linii **FLUO** w **ANKA**

Energia wiązki: **17 keV**

Rozmiar wiązki: średnica odpowiednio **15 i 12 mm**

Czas pomiaru: **8-10 i 6 s**

Obszar skanu: **4 mm²**



Aparatura pomiarowa linii L w HASYLAB.

Metody badawcze

Mikrospektroskopia FTIR

Pomiary na linii **SMIS** synchrotronu **SOLEIL**

Rozmiar wiązki: **10x10mm²**

Zakres spektralny: **800-4000 cm⁻¹**

Rozdzielczość spektralna: **6 cm⁻¹**

Liczba skanów na widmo: **32(64)**

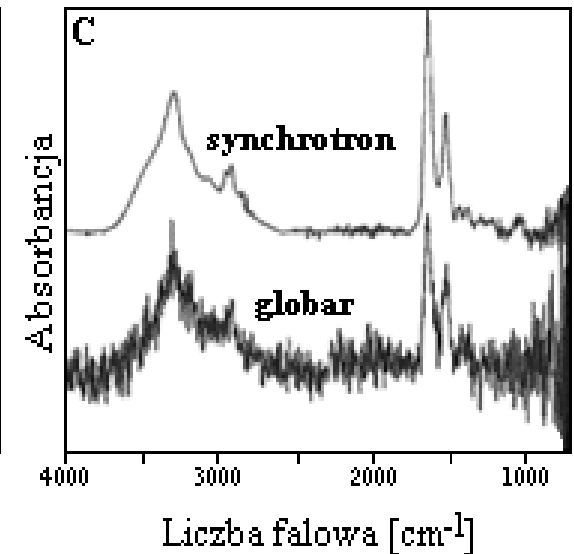
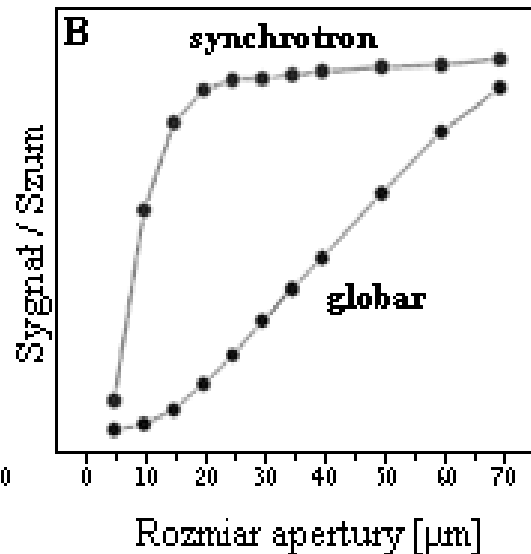
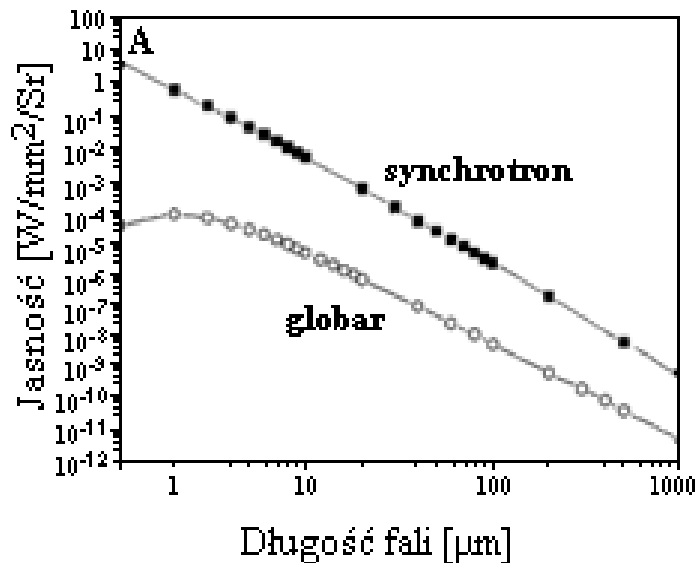


Mikroskop Continuum XL ze spektrometrem FTIR ThermoNicolet.

Metody badawcze

Mikrospektroskopia FTIR

Ograniczona dyfrakcją przestrzenna zdolność rozdzielcza!
 ok. $2\lambda/3$ dla pojedynczej apertury
 ok. $\lambda/2$ dla układów konfokalnych (dwie apertury)



Porównanie źródła synchrotronowego i globaru: A – zależność jasności źródła od długości fali; B – zależność wartości stosunków sygnału do szumu od rozmiaru zastosowanej apertury; C – porównanie widm absorpcyjnych dla apertury 10 mm.

Metody badawcze

Mikrospektroskopia Ramana

Pomiary na linii **SMIS** synchrotronu **SOLEIL**

Laser: **780 nm, 14 mW**

Rozmiar wiązki: **0,9 μm dla 780 nm**

Zakres spektralny: **50-3400 cm^{-1}**

Rozdzielczość spektralna: od **10,1** do **18,5 cm^{-1}**

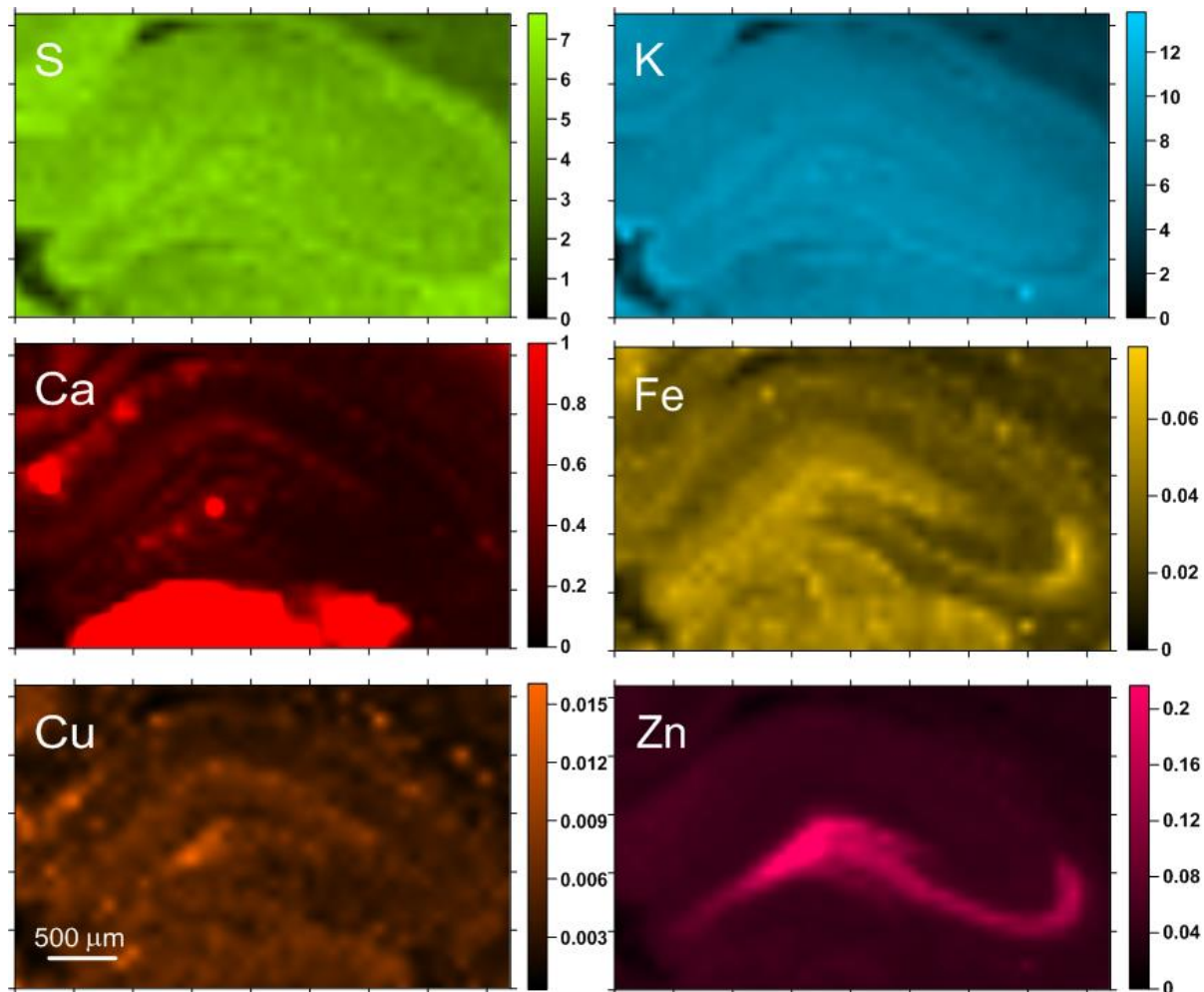
Krok: **2,5 μm (H), 2 mm (V)**



Mikroskop Ramana DXR (ThermoNicolet).

Wyniki badań pierwiastkowych

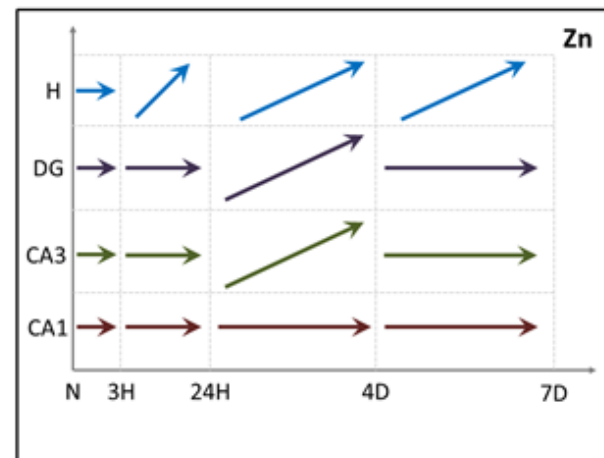
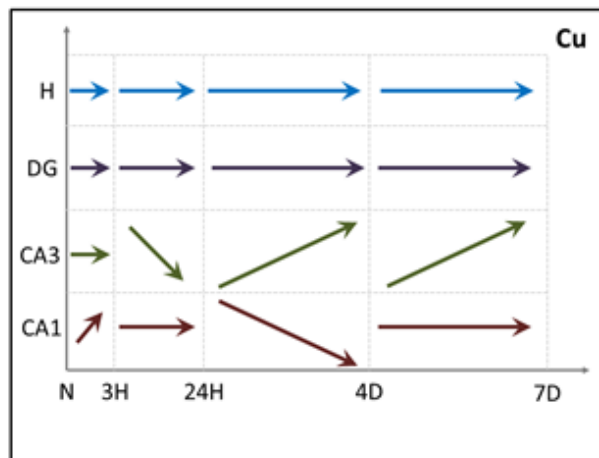
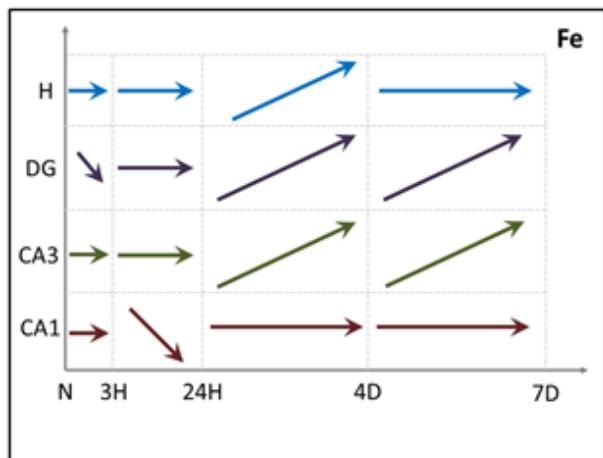
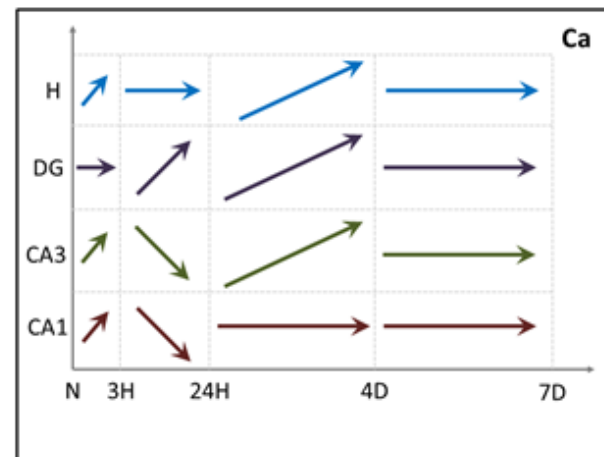
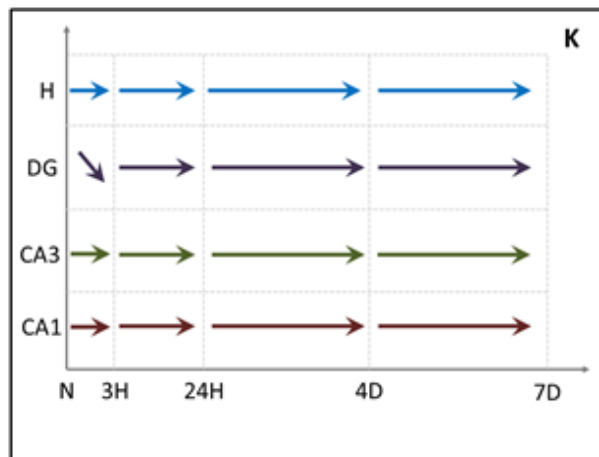
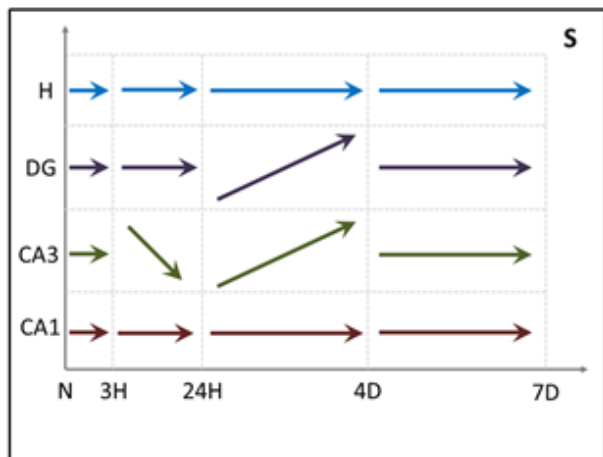
Analiza topograficzna



Mapy pierwiastkowe uzyskane dla formacji hipokampa; na skalach gęstości powierzchniowe w mg/cm^2 .

Wyniki badań pierwiastkowych

Analiza ilościowa



Statystycznie istotne zmiany w akumulacji pierwiastków pomiędzy badanymi momentami czasowymi mierzonymi od podania pilokarpiny. Nieparametryczny test U Manna-Whitney'a, poziom istotności 0,05.

Wyniki badań pierwiastkowych

Analiza korelacji z zachowaniem zwierząt

Sample code	TL [min]	MAX	T [min]
NS070	360	0	0
NS071	30	3	220
NS072	300	0.5	80
NS074	360	0	0
NS075	20	2.5	340
NS076	60	1	310
NS079	30	1.5	340
NS0710	30	2.5	310
NS0711	30	1.5	320
NS0712	80	0.5	10
NS0713	360	0	0
NS0714	20	2.5	330
NS0716	210	3	10
NS0717	60	0.5	20
NS0718	360	0	0
NS0719	30	1.5	340

TL – czas od podania pilokarpiny do pierwszych przejawów aktywności drgawkowej;

MAX – intensywność maksymalnych drgawek, skala 6-cio stopniowa, od 0 do 3;

T – całkowity czas aktywności drgawkowej.

Wyniki badań pierwiastkowych

Analiza korelacji z zachowaniem zwierząt

Współczynniki korelacji rang Spearmana, poziom ufności 95%

Area	Parameter	S	K	Ca	Fe	Cu	Zn
CA1	TL	0.54	0.71	-0.50	0.27	0.51	0.43
	MAX	-0.67	-0.64	0.29	-0.47	-0.50	-0.31
	T	-0.30	-0.63	0.73	-0.18	-0.38	-0.46
CA3	TL	0.30	0.64	-0.55	-0.13	0.26	-0.06
	MAX	-0.38	-0.51	0.35	-0.16	-0.37	-0.19
	T	-0.15	-0.62	0.71	0.31	-0.26	0.32
DG	TL	-0.10	0.53	-0.53	-0.38	-0.11	-0.30
	MAX	0.06	-0.26	0.30	0.29	0.14	0.19
	T	0.30	-0.49	0.74	0.49	0.15	0.50
H	TL	-0.21	0.62	-0.58	-0.24	0.08	-0.23
	MAX	0.17	-0.37	0.45	0.22	0.10	0.22
	T	0.37	-0.70	0.62	0.12	-0.11	0.22

7 dni po podaniu pilokarpiny poziom niektórych pierwiastków w hipokampie wciąż silnie zależy od przebiegu ostrej fazy stanu padaczkowego!



Wyniki badań pierwiastkowych

Analiza korelacji z zachowaniem zwierząt

Statystycznie istotne korelacje pomiędzy zmianami pierwiastkowymi obserwowanymi w fazie latencji i parametrami behawioralnymi:

Dla wszystkich badanych obszarów poziom $\text{Ca}\uparrow$, gdy $\text{TL}\downarrow$ i $\text{T}\uparrow$;

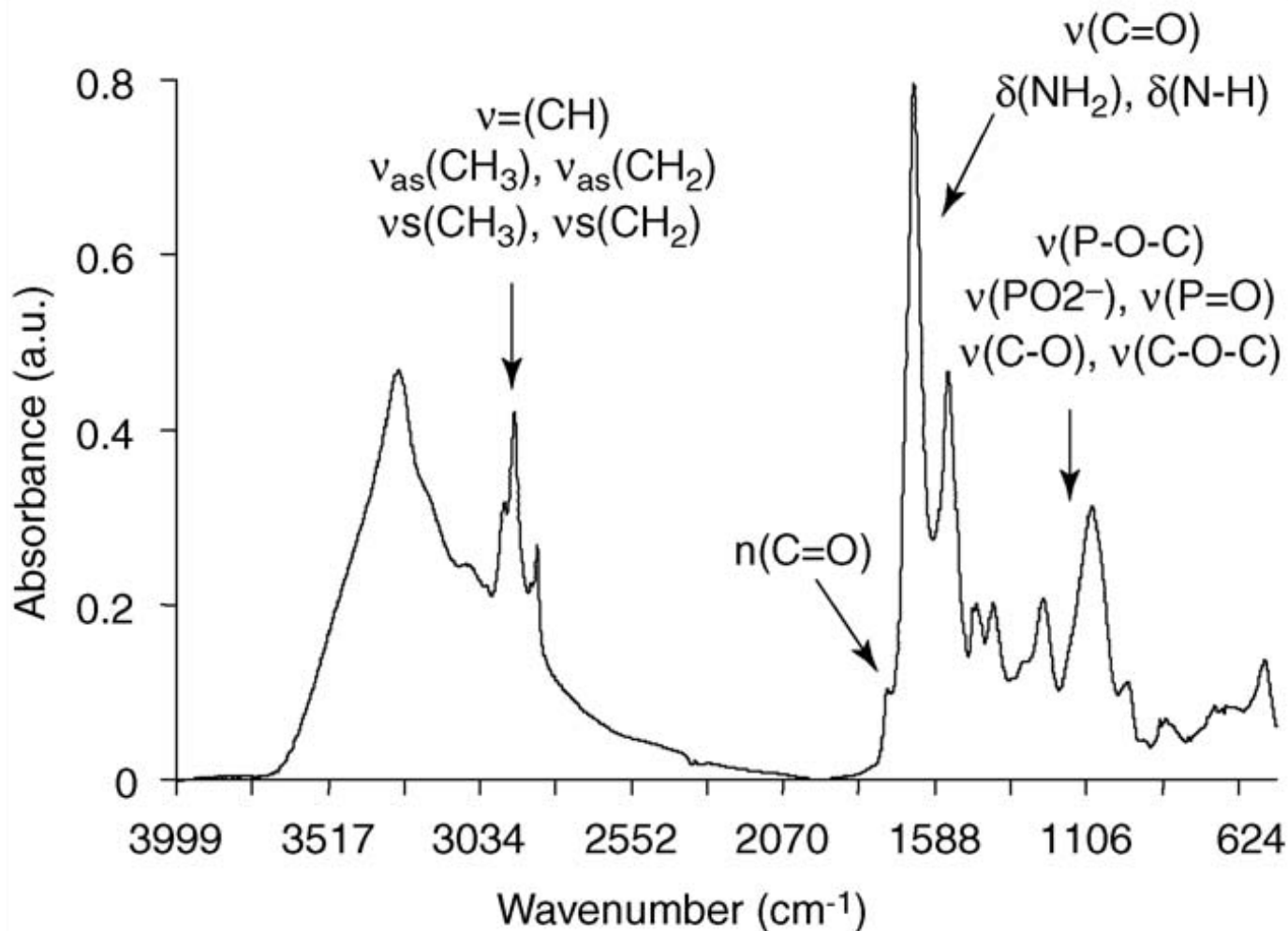
Dokładnie odwrotne relacje zaobserwowano dla K , dodatkowo $\text{K}\downarrow$ w **CA1** i **CA3**, gdy $\text{MAX}\uparrow$;

Poziom Cu i $\text{S}\uparrow$, gdy $\text{TL}\uparrow$ i $\text{MAX}\downarrow$;

Zn w **DG** wykazywał ponadto dodatnią korelację z T .

Wyniki badań

Analiza akumulacji biomolekuł



Typowe widmo rejestrowane dla tkanki nerwowej w zakresie średniej podczerwieni.



Wyniki badań biochemicznych

Analiza akumulacji biomolekuł

Dystrybucja związków zawierających grupy fosforanowe (kwasy nukleinowe, fosfolipidy, ...) – pasma około 1084 cm^{-1} i 1224 cm^{-1} , do których główny wkład dają symetryczne i antysymetryczne drgania rozciągające grupy PO^{2-} ;

Akumulacja protein – intensywność pasma amidu I; główny wkład drgania rozciągające grupy C=O ;

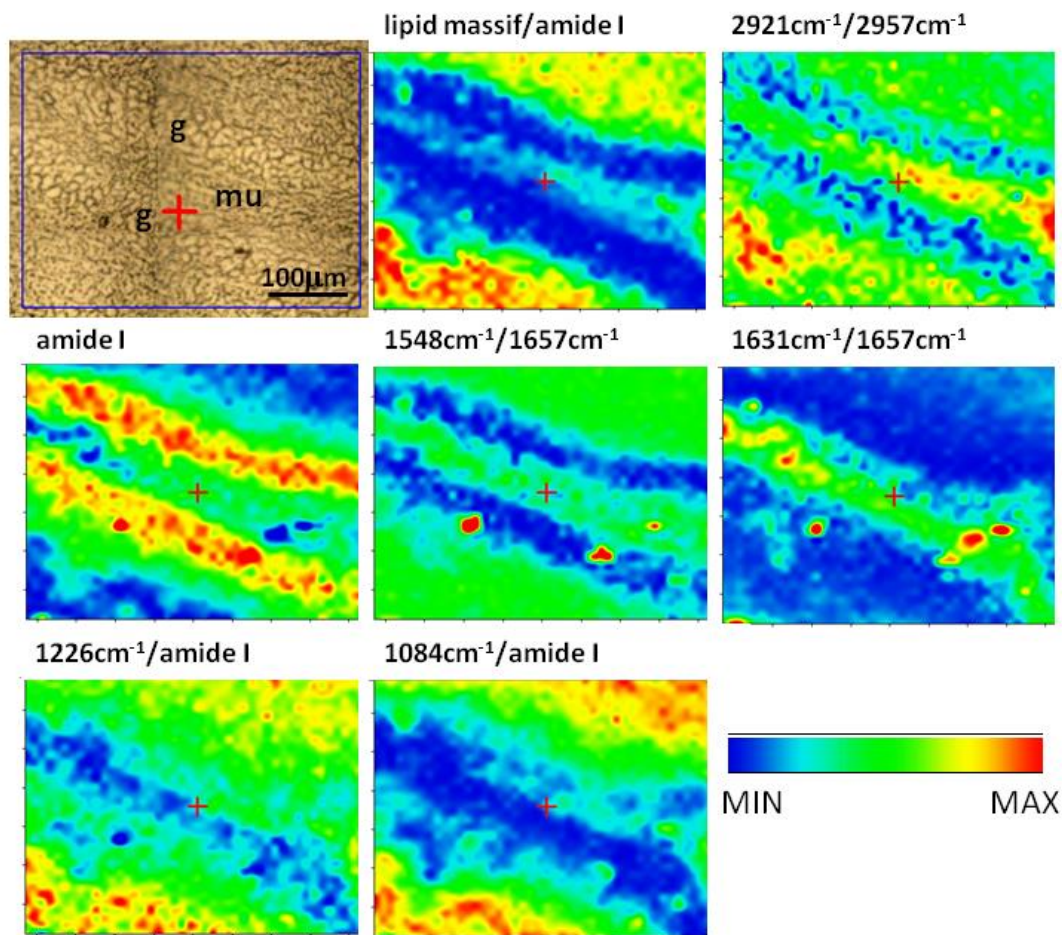
Zmiany w zakresie względnej drugorzędowej str. białek – stosunek absorbancji przy 1548 i 1657 cm^{-1} oraz przy częstotliwościach 1631 i 1658 cm^{-1} ;

Dystrybucja lipidów – masyw lipidów (od około 2820 to 2996 cm^{-1});

Zmiany w strukturze lipidów (poziomie nasycenia fosfolipidów, długości łańcuchów lipidowych) – stosunek intensywności pasm absorpcji około 2921 i 2958 cm^{-1} , 3012 i 2958 cm^{-1} .

Wyniki badań biochemicznych

Analiza akumulacji biomolekuł



Mapy chemiczne uzyskane dla obszaru DG w porównaniu z obrazem mikroskopowym tkanki.



Wyniki badań biochemicznych

Analiza akumulacji biomolekuł

Dla zwierząt w fazie ostrej stanu padaczkowego zaobserwowano:

↑ stosunku intensywności pasm 2921 i 2958 cm^{-1} w komórkach piramidowych obszaru CA3 oraz warstwie molekularnej i wewnętrznej obszaru DG – zmiany poziomu nasycenia lipidów lub długości łańcuchów lipidowych;

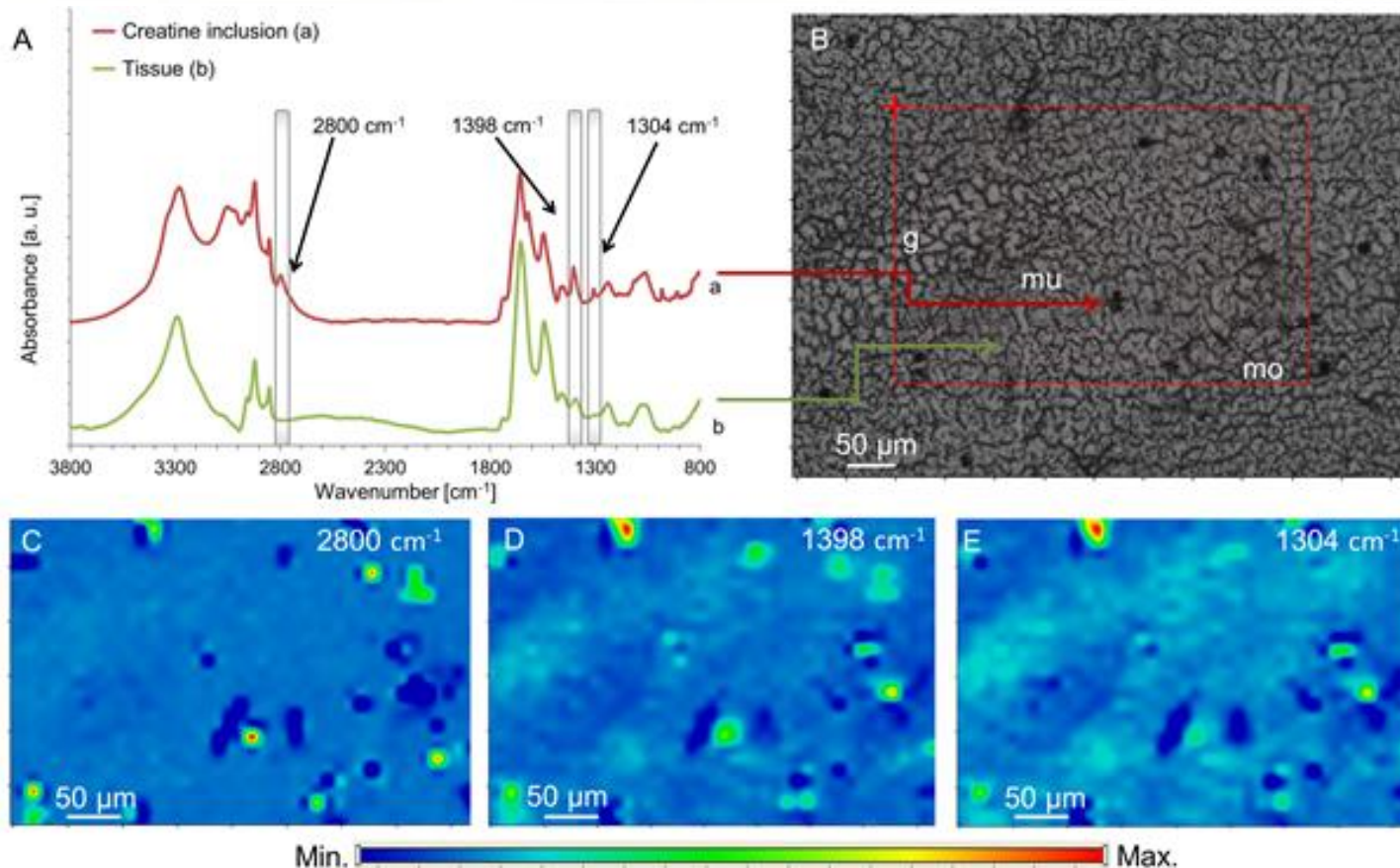
Względna zawartość lipidów (w stosunku do białek) **pozytywnie skorelowana z czasem trwania aktywności drgawkowej** i negatywnie z czasem pojawienia się pierwszych drgawek;

↑ stosunku absorbancji przy 1548 i 1657 cm^{-1} oraz przy **1631 i 1658 cm^{-1}** w tych samych obszarach – zmiany we względnej drugorzędowej strukturze białek w kierunku struktury typu b;

Zmiany strukturalne białek skorelowane dodatnio z nasileniem maksymalnych drgawek.

Wyniki badań biochemicznych

Badania depozytów kreatynowych



Porównanie widm zarejestrowanych dla inkluzji kreatynowej i tkanki nerwowej (A). Obraz mikroskopowy obszaru DG formacji hipokampa (B). Rozkłady wybranych pasm kreatyny w skanowanym obszarze tkanki: 2800 cm⁻¹ (C), 1398 cm⁻¹ (D) and 1304 cm⁻¹ (E).



Wyniki badań biochemicznych

Badania depozytów kreatynowych

Mózg stanowi zaledwie **2% masy ciała**, a jego zapotrzebowanie energetyczne stanowi aż **20% zapotrzebowania energetycznego organizmu**;

Większość tej energii stanowi wytwarzane w mitochondriach **ATP**;

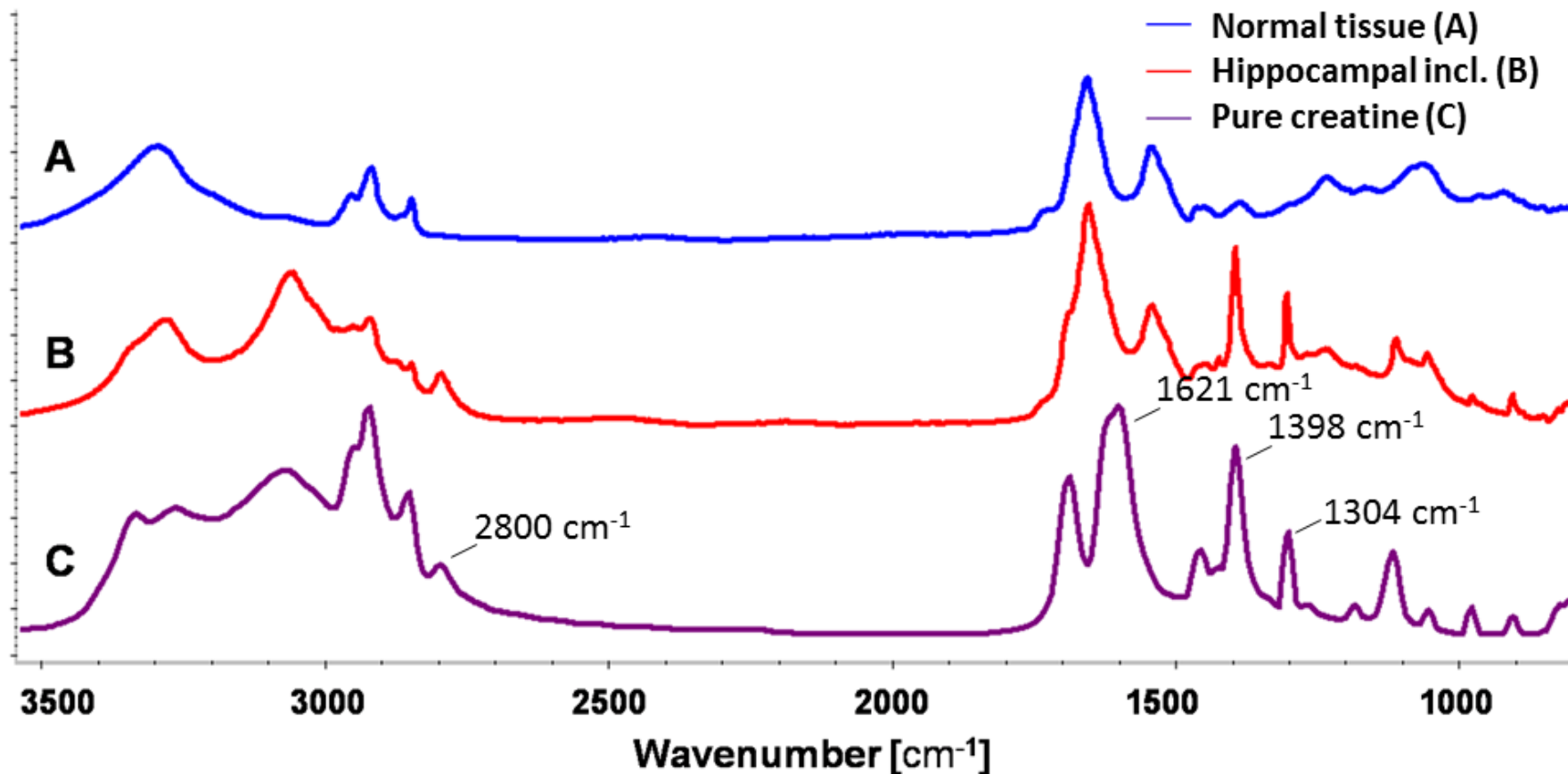
Kreatyna - kwas β -metyloguanidynoowy, syntetyzowany w organizmie z glicyny i argininy:

- **czasowy i przestrzenny bufor energetyczny (Cr/PCr/CK)**
- synteza białek
- stabilizacja błon komórkowych (jako fosfokreatyna)
- modyfikacja działania receptorów postsynaptycznych (**neuromodulator** lub **kotransmitter**)

Podobne depozyty zaobserwowane zostały w próbkach OUN pobranych od ludzi zmarłych ze schorzeniami neurodegeneracyjnymi (choroba Alzheimera, Parkinsona, stwardnienie zanikowe boczne, etc.)

Wyniki badań biochemicznych

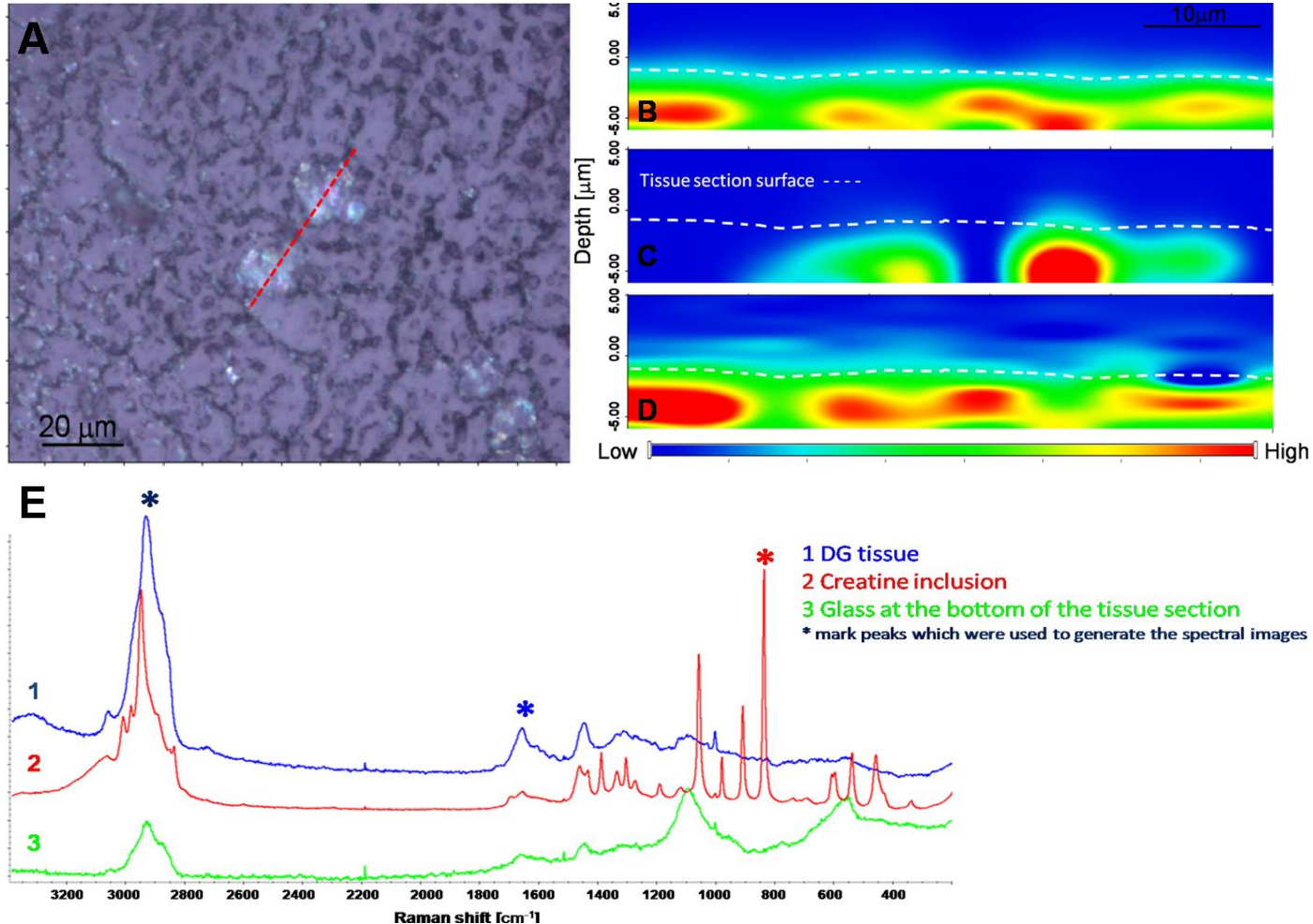
Badania depozytów kreatynowych



Porównanie widm absorpcyjnych (po korekcje linii bazowej) zarejestrowanych dla inkluzji hipokampalnej (B), czystej kreatyny (C) i tkanki nerwowej (A).

Wyniki badań biochemicznych

Anomalia w gromadzeniu kreatyny



Profil głębokościowy uzyskany metodą mikrospektroskopii Ramana.



Wyniki badań biochemicznych

Anomalia w gromadzeniu kreatyny

Inkluzje kreatynowe zaobserwowano dla **1 z 6 kontroli** (25 inkluzji) oraz **8 spośród 10 zwierząt** w fazie ostrej stanu padaczkowego;

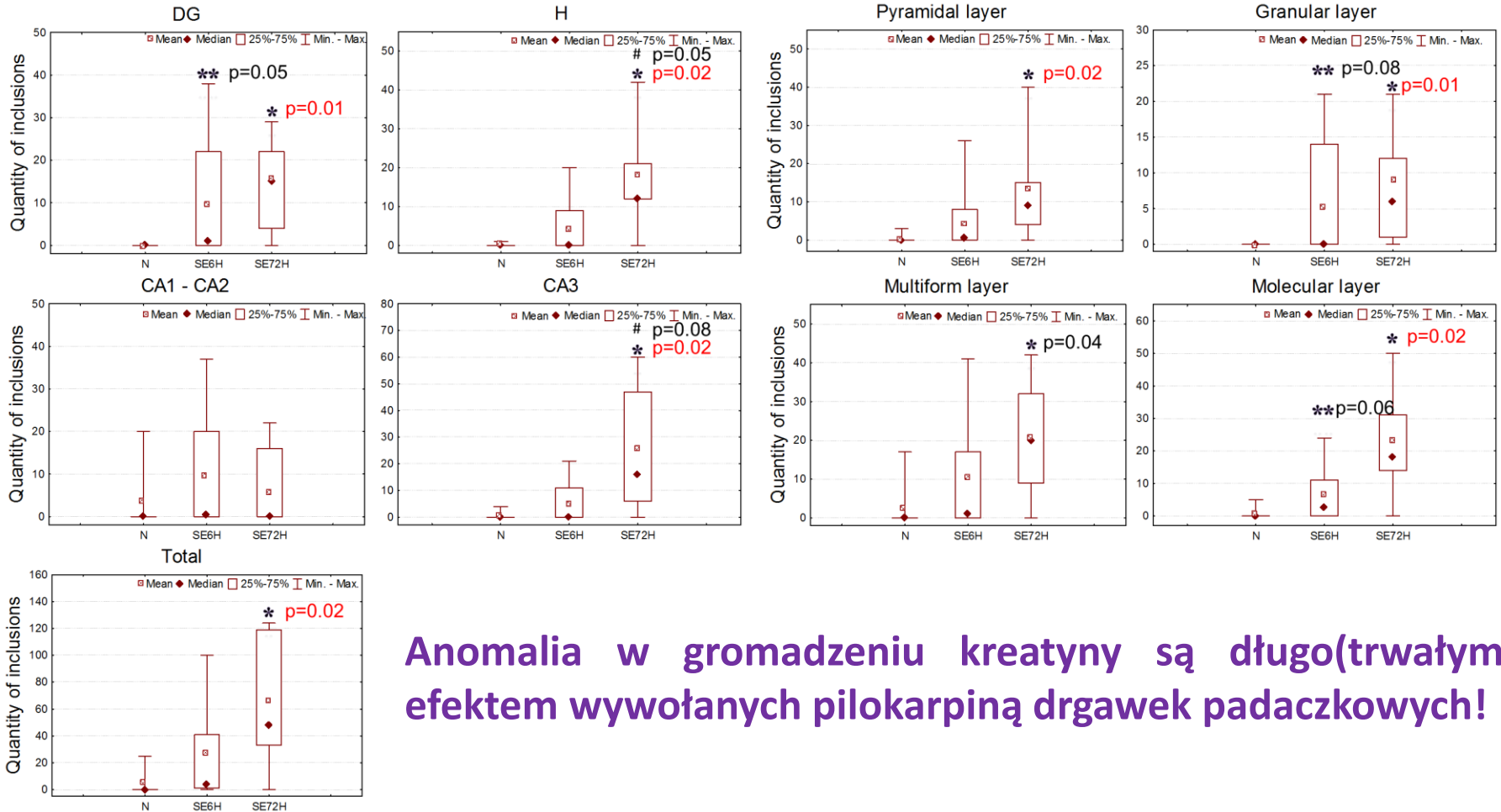
Większość inkluzji zlokalizowana była w **warstwie komórek wielokształtnych** oraz obszarze **DG**;

Liczba inkluzji obserwowana w fazie ostrej dodatkowo **skorelowana z czasem trwania aktywności drgawkowej** oraz ujemnie z **czasem pojawienia się pierwszych drgawek**;

Obecność depozytów kreatynowych jest efektem przejściowym czy trwałym drgawek padaczkowych?

Wyniki badań biochemicznych

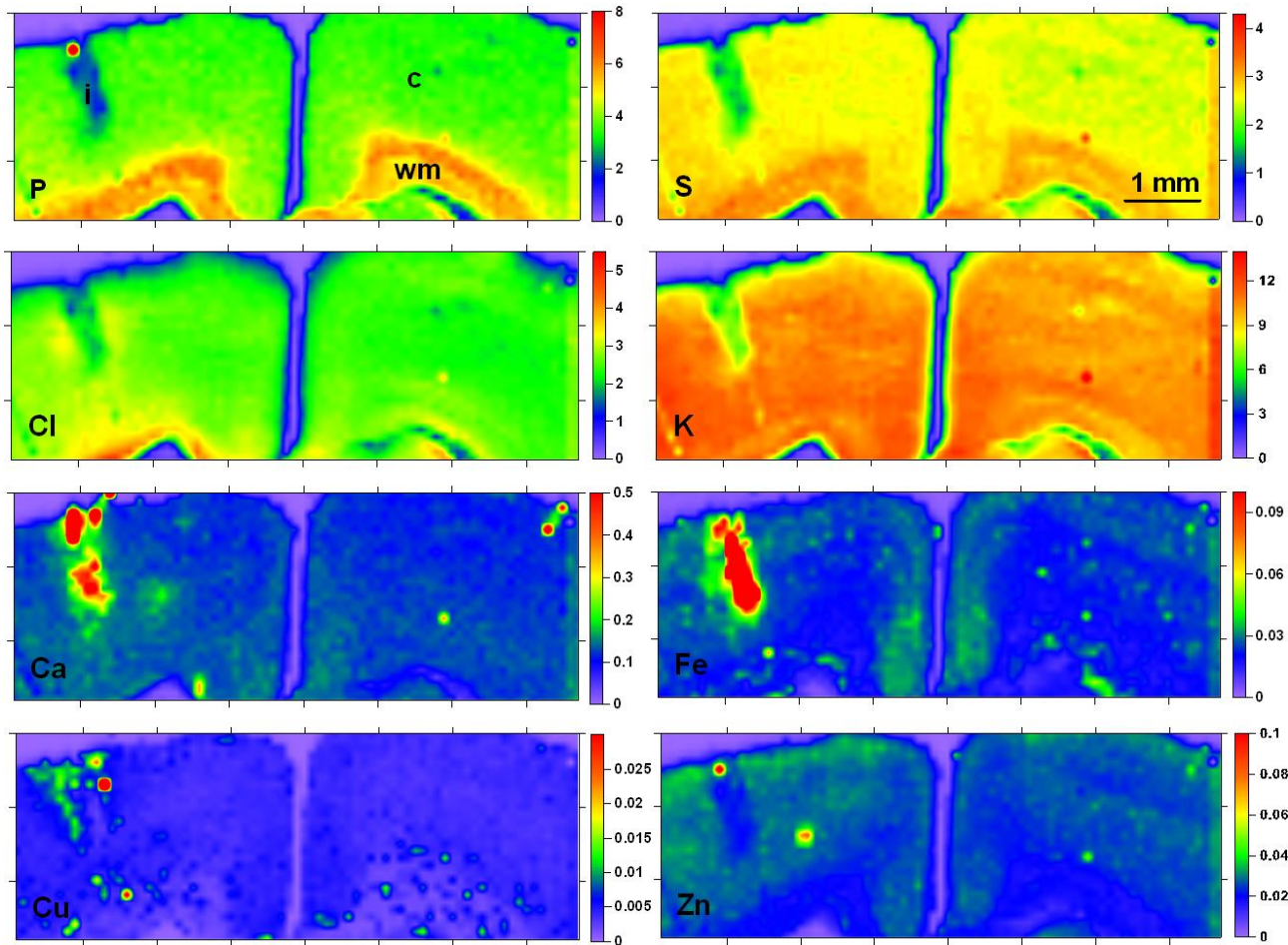
Anomalia w gromadzeniu kreatyny



Anomalia w gromadzeniu kreatyny są długo(trwałym) efektem wywołanych pilokarpiną drgawek padaczkowych!

Model mechanicznego uszkodzenia mózgu

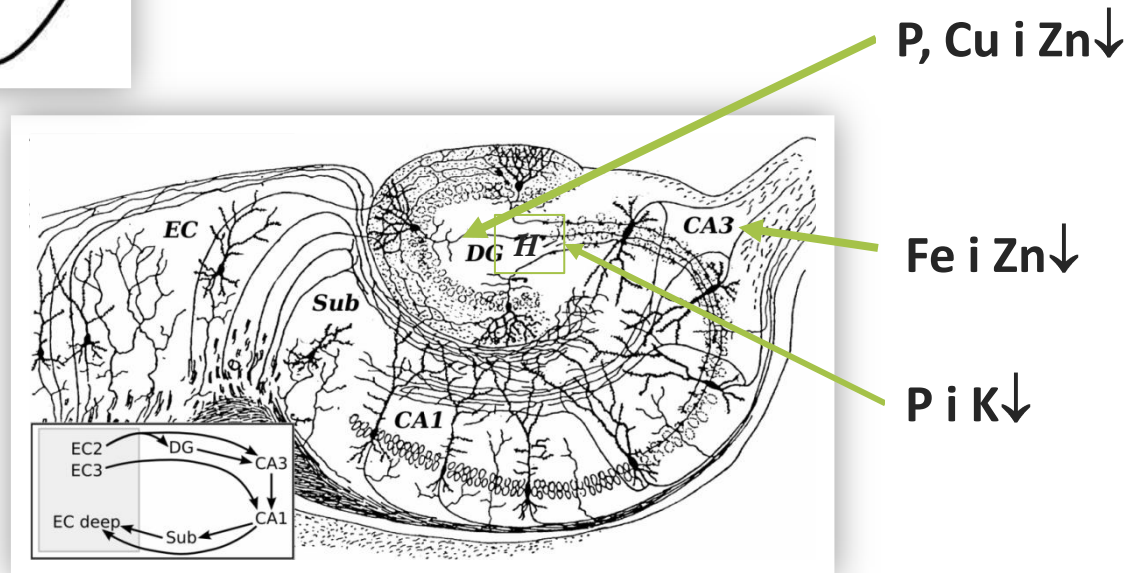
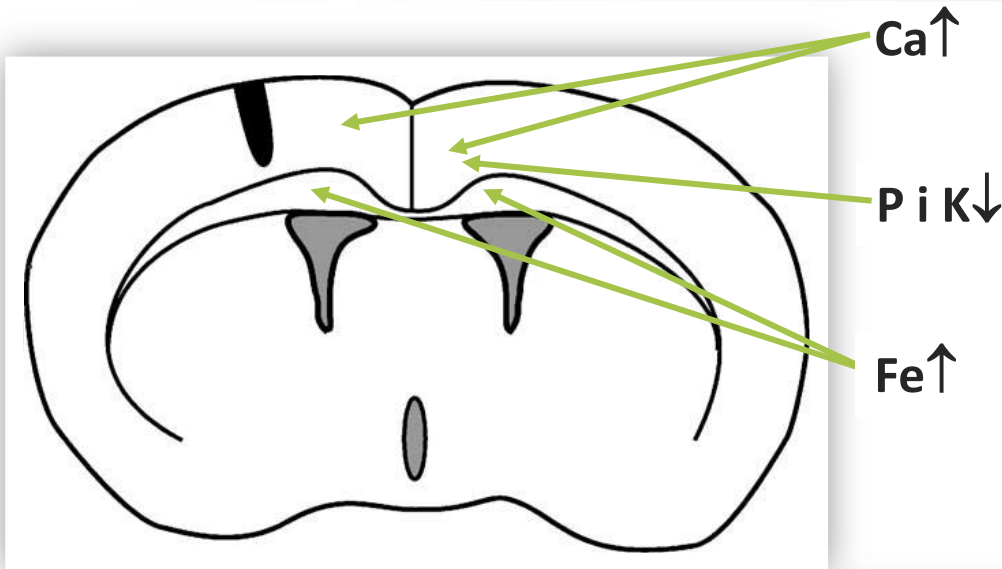
Zmiany pierwiastkowe



Mapy pierwiastkowe uzyskane dla kory mózgowej w miejscu uszkodzenia; na skalach gęstości powierzchniowe w mg/cm^2 .

Model mechanicznego uszkodzenia mózgu

Zmiany pierwiastkowe





Model drgawek rozniecanych

Zwierzęta eksperymentalne

Od 60 dnia życia przez 21 dni szczury poddawane były stymulacji elektrycznej z wykorzystaniem elektrod usznych;

Prąd sinusoidalnie zmienny o częstotliwości 60 Hz (amplituda: **10 mA**, czas stymulacji: **1 s**) wytwarzany w generatorze rodent shocker RS 221;

Zwierzęta były obserwowane do momentu ustąpienia wywołanych elektroszokami zmian behawioralnych, codziennie rejestrowano **czas trwania** i **intensywność drgawek tonicznych i klonicznych**, a następnie dla każdego ze zwierząt wyznaczono **skumulowane** (zsumowane dla 21 dni stymulacji) wartości tych parametrów:

skumulowana intensywność drgawek tonicznych: 0 – 43

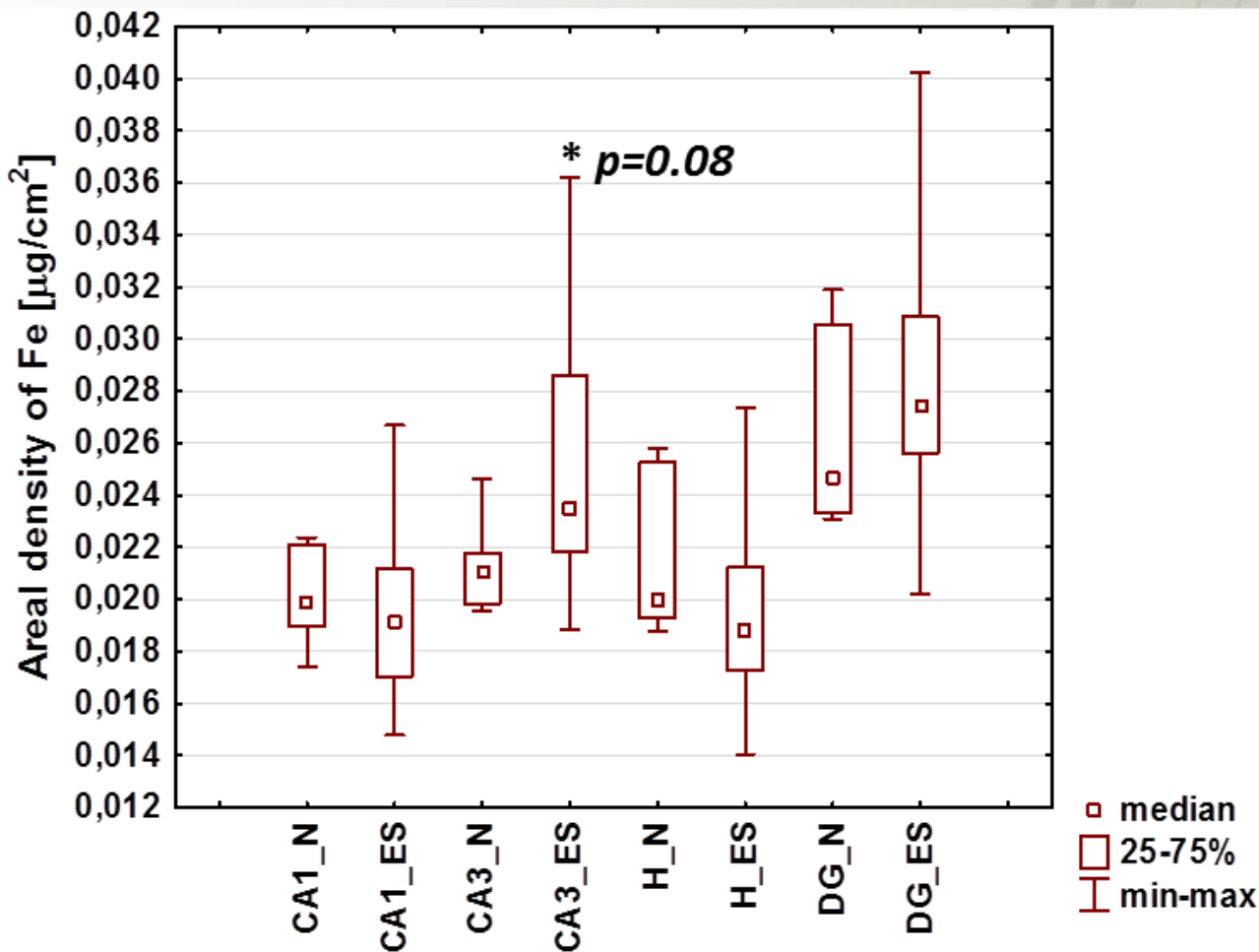
skumulowany czas trwania drgawek tonicznych: 0 – 362 s

skumulowana intensywność drgawek klonicznych: 0 – 15

skumulowany czas trwania drgawek klonicznych: 0 – 313 s

Model drgawek rozniecanych

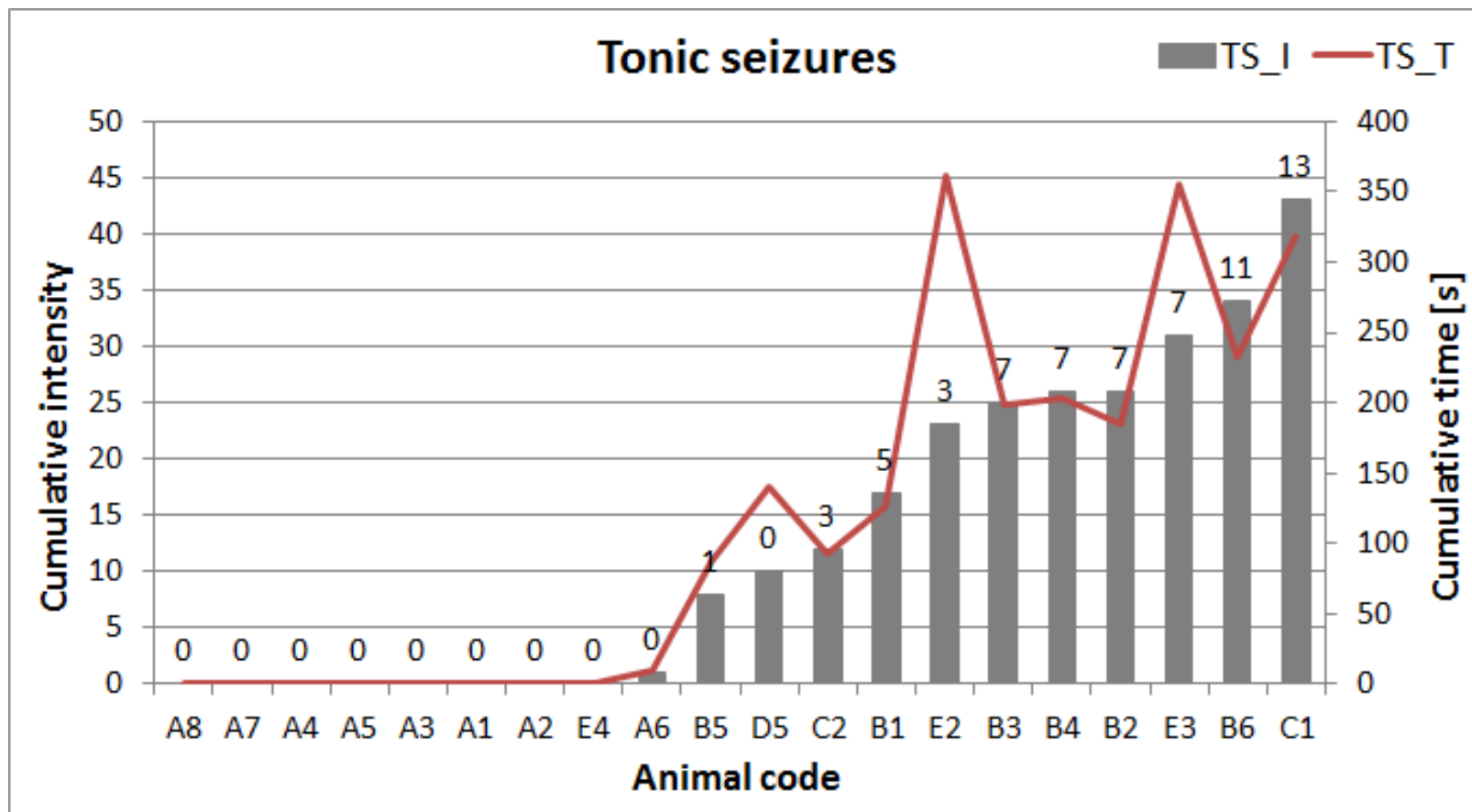
Zmiany pierwiastkowe



Różnica w akumulacji Fe pomiędzy zwierzętami poddanymi symulacji i kontrolnymi.

Model drgawek rozniecanych

Obserwacje behawioralne



Wyniki obserwacji behawioralnych. Skumulowana intensywność (TS_I) i czas trwania (TS_T) drgawek tonicznych. Cyfry nad słupkami oznaczają ilość drgawek o maksymalnej intensywności w 21 dniowym okresie stymulacji.

Model drgawek rozniecanych

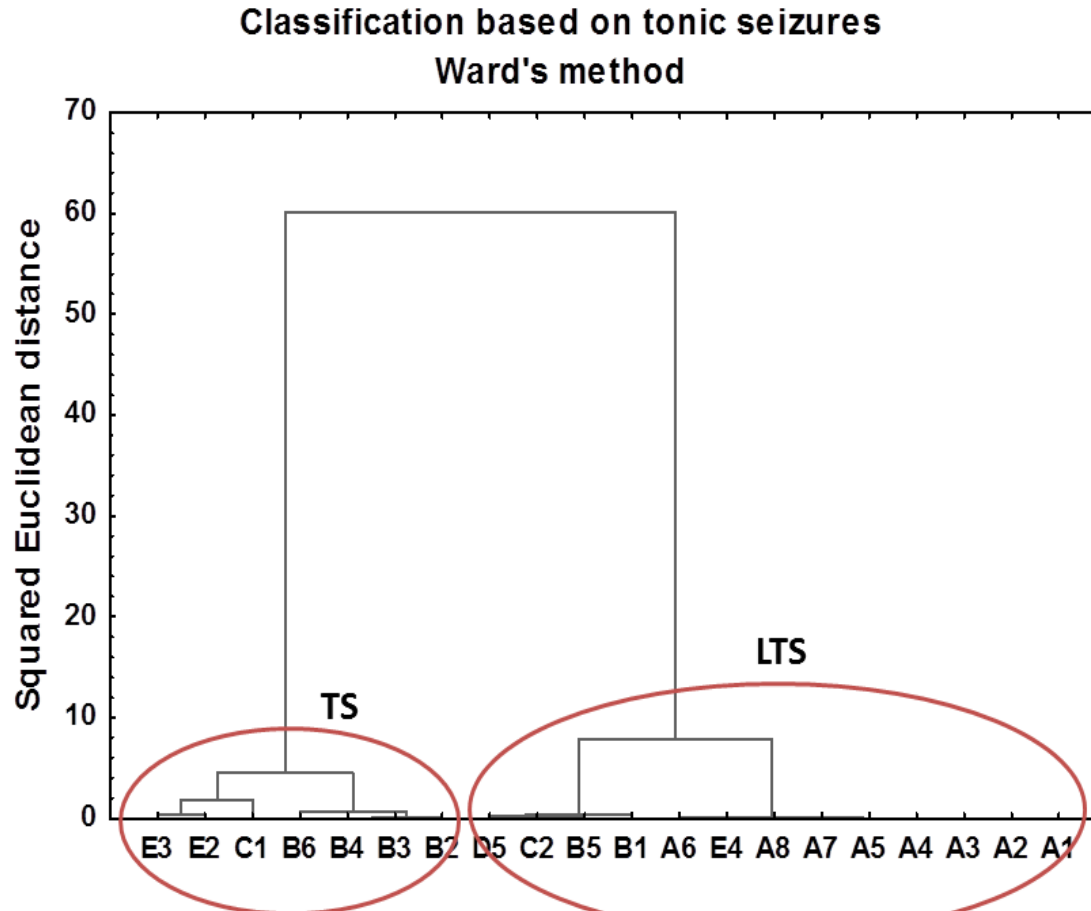
Zmiany pierwiastkowe a zachowanie zwierząt

Współczynniki korelacji rang Spearmana, poziom ufności 95%

Area	Parameter*	P	S	K	Ca	Fe	Cu	Zn	Se
CA1	TS_I	0.25	0.19	0.20	-0.23	-0.19	-0.41**	0.06	0.24
	TS_T	0.13	0.07	0.10	-0.27	-0.21	-0.49	-0.03	0.13
	CS_I	0.25	0.09	0.19	0.01	0.25	0.05	0.02	0.16
	CS_T	0.06	-0.04	0.03	-0.13	0.09	-0.11	-0.10	0.05
CA3	TS_I	0.04	0.13	0.19	-0.31	0.14	0.03	0.04	-0.31
	TS_T	-0.12	-0.04	0.02	-0.39	0.02	-0.11	-0.02	-0.37
	CS_I	-0.18	-0.02	-0.12	0.16	0.14	-0.22	0.00	0.00
	CS_T	-0.20	-0.08	-0.08	0.01	0.15	-0.22	0.13	-0.07
DG	TS_I	-0.21	-0.11	-0.18	-0.2	-0.17	-0.35	0.18	-0.17
	TS_T	-0.25	-0.17	-0.23	-0.25	-0.21	-0.34	0.14	-0.08
	CS_I	0.09	0.07	0.06	0.09	-0.04	-0.09	0.31	-0.30
	CS_T	0.13	0.12	0.07	0.07	0.01	-0.09	0.21	-0.18
H	TS_I	-0.17	0.03	-0.03	-0.20	0.17	0.18	0.43	0.04
	TS_T	-0.24	-0.07	-0.12	-0.26	0.11	0.08	0.48	0.00
	CS_I	0.01	0.07	0.12	0.09	0.17	0.06	0.31	0.11
	CS_T	-0.03	0.04	0.07	0.01	0.23	0.15	0.46	0.13

Model drgawek rozniecanych

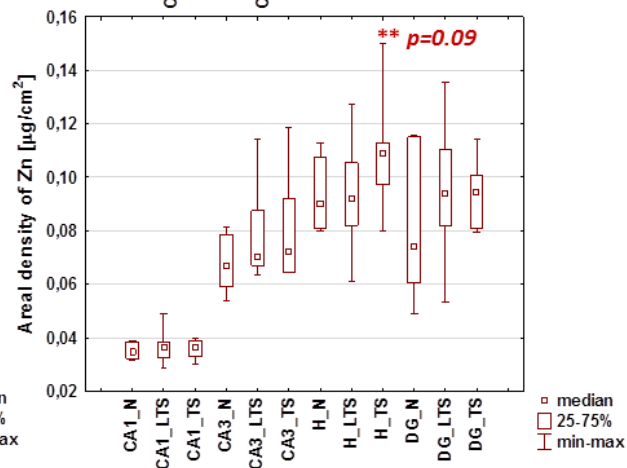
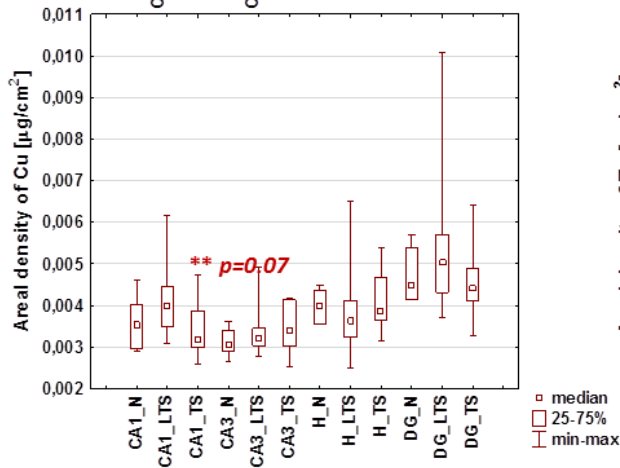
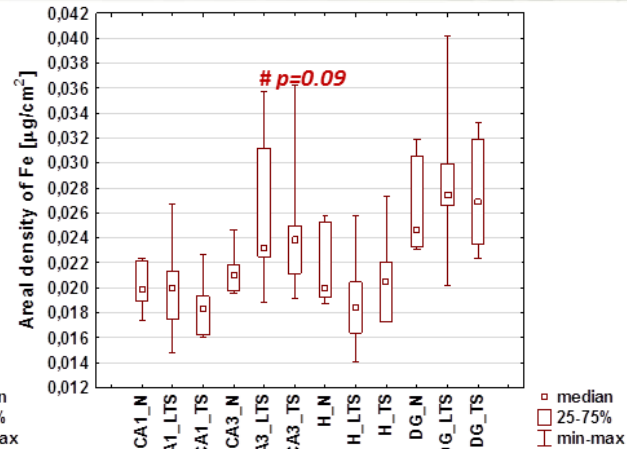
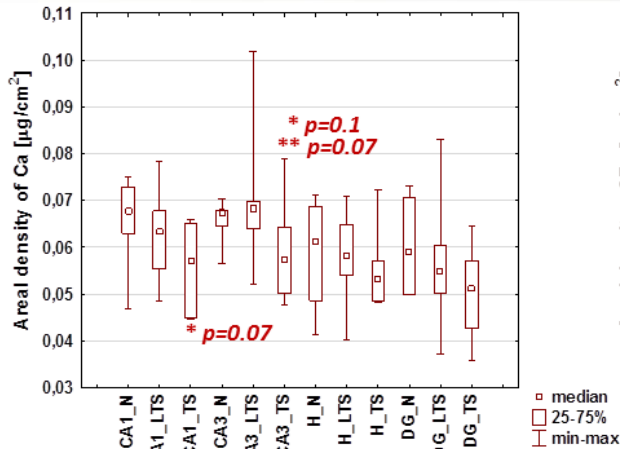
Zmiany pierwiastkowe



Hierarchiczny wykres drzewkowy uzyskany metodą Warda. Kwadrat odległości Euklidesowej użyty jako miara podobieństwa między obserwacjami liczone w oparciu o skumulowane parametry opisujące wywołane elektrozokami drgawki toniczne.

Model drgawek rozniecanych

Zmiany pierwiastkowe



Różnice w akumulacji pierwiastków pomiędzy podgrupami zwierząt poddanych stymulacji (wyodrębnionymi po uwzględnieniu parametrów opisujących drgawki toniczne) i grupą kontrolną.

Wnioski

Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują na **użyteczność nowoczesnych metod spektroskopowych w badaniach nad patogenezą epilepsji.**

Analiza pierwiastkowa tkanek pochodzących z różnych okresów epileptogenezy wykazała, że istotną rolę w patogenezie zmian neurodegeneracyjnych formacji hipokampa odgrywają zaburzenia w akumulacji:

- **Ca (ekscytotoksyczność),**
- **Zn (wzrost włókien mszatych),**
- **Fe (wzmożona produkcja wolnych rodników).**

U zwierząt poddanych działaniu pilokarpiny zaobserwowano zmiany w gromadzeniu kreatyny (**spadek aktywności enzymatycznej kinazy kreatynowej**).

Wykorzystywane procedury przygotowania materiału biologicznego, doboru materiałów referencyjnych, pomiaru próbek i wzorców wnoszą **wkład w rozwój metodologii mikroobrazowania tkanek z użyciem technik bazujących na promieniowaniu synchrotronowym.**



Podziękowania

**Dr hab. Zuzanna Setkowicz-Janeczko, Prof. dr hab. Krzysztof Janeczko,
pracownicy i doktoranci Zakładu Neuroanatomii Instytutu Zoologii UJ**

Mgr inż. Justyna Kutorasińska (Dulińska)

Prof. dr hab. Henryk Figiel

Współpracownicy z ośrodków synchrotronowych:

Dr Paul Dumas, Dr Christophe Sandt, Dr Karen Rickers i Dr Rolf Simon