



## ZASTOSOWANIE RENTGENOWSKIEJ MIKROSKOPII FLUORESCENCYJNEJ I TECHNIK WIELOWYMIAROWEJ ANALIZY WARIANCJI W BADANIACH NAD ROLĄ METALI ŚLADOWYCH W PROCESACH NEURODEGENERACYJNYCH

*Joanna Chwiej, Akademia Górniczo-Hutnicza, Katedra Zastosowań Fizyki Jądrowej*

### Wprowadzenie

Choroba Parkinsona (PD) i stwardnienie boczne zanikowe (SBZ) należą do grupy schorzeń neurodegeneracyjnych, których wspólną cechą jest zanik komórek nerwowych w określonych obszarach ośrodkowego układu nerwowego (OUN) [1, 2]. Oba schorzenia określa się mianem idiopatycznych, czyli takich, których przyczyny nie zostały jak dotąd poznane. Istnieje jednak grupa ściśle ze sobą powiązanych i wzajemnie oddziałujących procesów, które prowadzić mogą do atrofii i zaniku neuronów w przypadku badanych chorób [3-5]. We wszystkich tych procesach istotną rolę odgrywają metale, dlatego topograficzna i ilościowa analiza pierwiastkowa określonych obszarów OUN może rzucić nowe światło na problem patogenezy choroby Parkinsona i stwardnienia bocznego zanikowego.

Intensywny rozwój medycyny i nauk biologicznych pociąga za sobą konieczność znajdowania narzędzi badawczych dostarczających coraz bardziej szczegółowych informacji na temat budowy biochemicznej materiałów. Do takich narzędzi należy niewątpliwie zaliczyć metody oparte na promieniowaniu synchrotronowym, których zastosowanie pozwala badać nawet te najbardziej subtelne zmiany w składzie biochemicznym próbki [6]. Jedną z takich metod jest rentgenowska mikroskopia fluorescencyjna stanowiąca doskonałe narzędzie do topograficznej i ilościowej analizy pierwiastkowej [7-9]. Zastosowanie III-generacji (synchrotronowych) źródeł promieniowania X, a także postęp w dziedzinie optyki i detekcji tego promieniowania pozwala na badania zawartości pierwiastków śladowych z przestrzenną zdolnością rozdzielczą nawet poniżej mikrometra [10].

W ramach niniejszej pracy metoda rentgenowskiej mikroskopii fluorescencyjnej wykorzystana została w badaniach nad rolą pierwiastków metalicznych w dwóch schorzeniach neurodegeneracyjnych: chorobie Parkinsona i stwardnieniu bocznym zanikowym. Uzyskane dane o akumulacji i dystrybucji metali poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem technik wielowymiarowej analizy wariacji (analiza skupień i analiza dyskryminacyjna). Metody te zastosowano przede wszystkim do identyfikacji podobieństw pomiędzy strukturami biologicznymi reprezentującymi badane przypadki oraz klasyfikacji tych



struktur do wyodrębnionych w czasie analizy (podejście analizy klastrowej) bądź z góry zdefiniowanych grup (podejście analizy dyskryminacyjnej). Dodatkowo, co przyczyniło się znacznie do uproszczenia struktury danych, możliwe było wyodrębnienie pierwiastków, których znaczenie w procesie klasyfikacji obiektów jest największe. Podjęto również próbę stworzenia modeli, które w przyszłości mogłyby ułatwić identyfikację przypadku w oparciu o analizę pierwiastkową określonych obszarów tkanki.

## **Materiał i metody**

### ***Próbki***

W badaniach wykorzystano próbki tkanki nerwowej pacjentów zmarłych z chorobą Parkinsona, stwardnieniem bocznym zanikowym oraz kontrolnych (bez schorzeń neurodegeneracyjnych).

Analizy biochemiczne prowadzono dla obszarów OUN, w których obserwuje się zmiany neurodegeneracyjne w przypadku badanych schorzeń. Badano istoty czarne reprezentujące przypadki PD i kontrolne oraz rogi przednie rdzenia kręgowego dla przypadków SBZ oraz kontrolnych.

Wszystkie analizowane tkanki zostały pobrane, przygotowane i poddane ocenie histopatologicznej w Zakładzie Neuropatologii Instytutu Neurologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Próbki pobierano w czasie autopsji i cięto przy użyciu mikrotomu mroźniowego na skrawki o grubości 20  $\mu\text{m}$ . Jeden ze skrawków tkanki umieszczano na szkiełku mikroskopowym i wybarwiano, w celu dalszej oceny histopatologicznej. Skrawek dedykowany do badań biochemicznych umieszczano na ultraczystej (nie zawierającej pierwiastków śladowych), transparentnej dla stosowanego promieniowania X oraz ultracienkiej folii AP1 lub Ultralene i poddawano suszeniu w niskiej temperaturze ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) przez czas nie krótszy niż 24 h.

### ***Analiza pierwiastkowa***

Zmiany w akumulacji i dystrybucji metali śladowych w tkance nerwowej badano, stosując rentgenowską mikroskopię fluorescencyjną. Studia pierwiastkowe prowadzono w wiodących europejskich ośrodkach synchrotronowych, a mianowicie w European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) we Francji oraz w Hamburger Synchrotronstrahlungslabor (HASYLAB) w Niemczech. Stosowano aparaturę linii ID22 ESRF oraz linii L HASYLAB. Wykorzystywane na tych liniach pomiarowych systemy ogniskowania wiązki pozwoliły prowadzić analizy pierwiastkowe z przestrzenną zdolnością rozdzielczą odpowiednio kilku i kilkunastu mikrometrów.

Przy energii promieniowania wzbudzającego 15 keV możliwa była równoczesna analiza w próbce pierwiastków o liczbie atomowej od 15 do 35, a zatem od fosforu do bromu. W wyniku takiej analizy, po kalibracji z wykorzystaniem wzorca zewnętrznego,



uzyskiwano dwuwymiarowe mapy rozkładu mas powierzchniowych pierwiastków rejestrowanych w tkance OUN.

### ***Analizy statystyczne***

W ramach niniejszej pracy przeprowadzona została, przy zastosowaniu dwóch technik wielowymiarowej analizy wariancji (WAW) – analizy klastrowej i dyskryminacyjnej, statystyczna analiza wyników badań pierwiastkowych tkanek OUN.

W trakcie analizy danych dla potrzeb niniejszego opracowania posłużono się zakupionym w ramach grantu KBN (3T11E01029) programem *STATISTICA* (grupa modułów: *Wielowymiarowe techniki eksploracyjne*).

Przy doborze metod statystycznej analizy danych kierowano się kilkoma przesłankami. Przede wszystkim techniki WAW doskonale nadają się do analizy danych wielowymiarowych, z jakimi niewątpliwie mamy tutaj do czynienia. Po drugie wpływ na rejestrowane masy powierzchniowe pierwiastków mają fluktuacje grubości próbki. Wykorzystanie technik statystycznych, w których analizowane są nie pojedyncze zmienne, ale cały zespół zmiennych, z uwzględnieniem struktury powiązań i współzależności występujących między nimi, pozwala, przynajmniej częściowo, uwolnić się od wpływu grubości próbki na uzyskiwane masy powierzchniowe.

Podstawowym celem prowadzonych badań była:

- ◆ identyfikacja podobieństw pomiędzy strukturami biologicznymi reprezentującymi badane przypadki,
- ◆ klasyfikacja badanych struktur tkankowych (zwanymi dalej obserwacjami) do wyodrębnionych w czasie analizy (podejście analizy klastrowej) bądź z góry zdefiniowanych grup (podejście analizy dyskryminacyjnej),
- ◆ próba stworzenia modelu, który w przyszłości mógłby ułatwić identyfikację przypadku w oparciu o analizę pierwiastkową określonych obszarów tkanki,
- ◆ wyodrębnienie pierwiastków, których znaczenie w procesie klasyfikacji obiektów jest największe.

### **Wyniki i dyskusja**

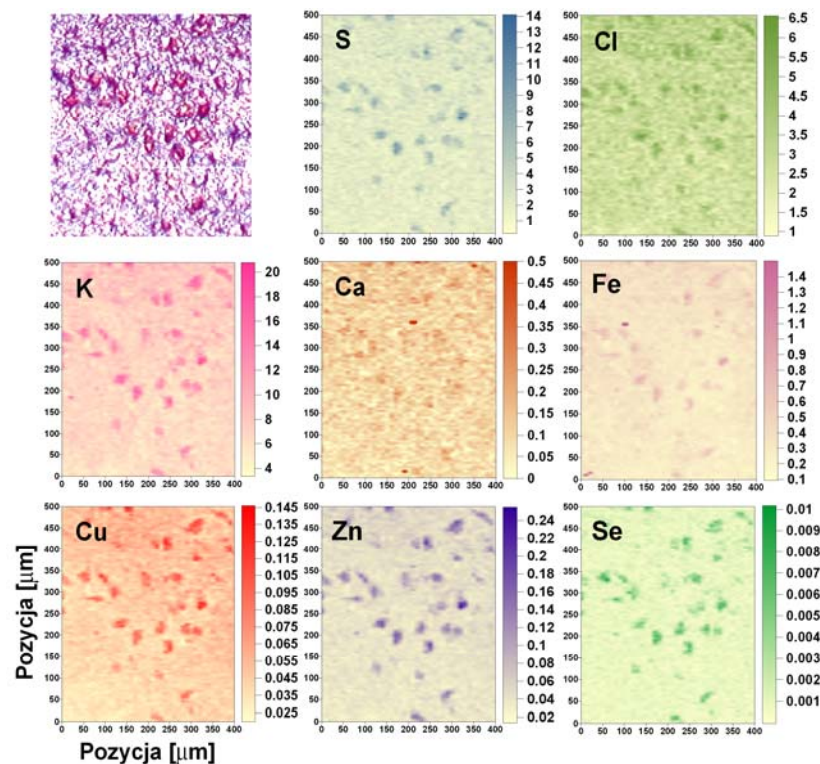
W niniejszej publikacji przedstawione zostały jedynie wybrane wyniki analiz statystycznych, uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej Joanny Chwiej. Główna uwaga poświęcona została zastosowaniu rentgenowskiej mikroskopii fluorescencyjnej i technik WAW w badaniach dotyczących roli metali w chorobie Parkinsona.

### ***Topograficzna i ilościowa analiza pierwiastkowa***

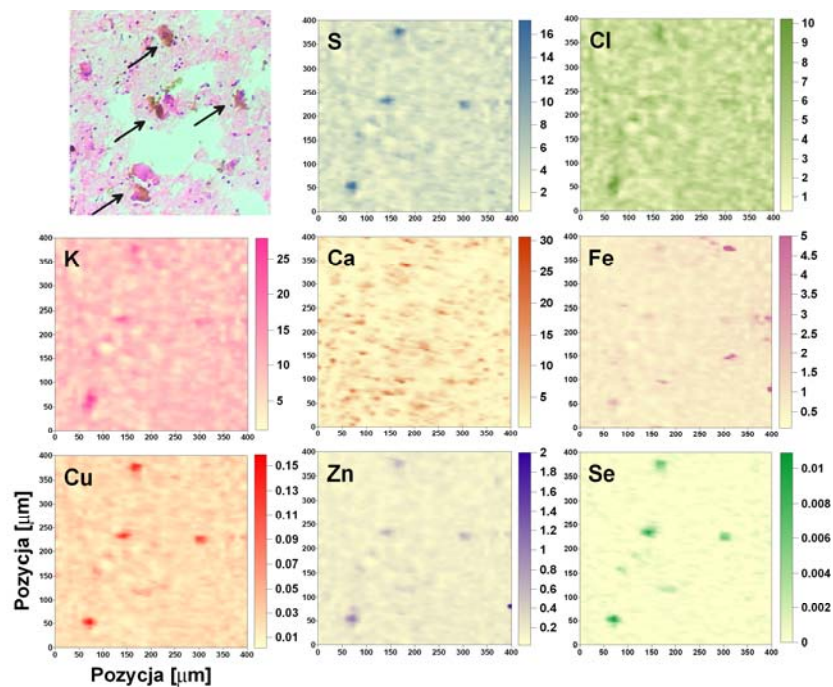
Wykorzystując rentgenowską mikroskopię fluorescencyjną przeprowadzono analizę pierwiastkową tkanki istoty czarnej, która wykazała istnienie różnic zarówno w akumulacji, jak



i dystrybucji metali pomiędzy neuronami parkinsonowskimi i reprezentującymi przypadki kontrolne. Wynik takiej dwuwymiarowej analizy dla wybranej próbki kontrolnej i reprezentującej przypadek PD przedstawiono odpowiednio na rys. 1 i 2.



Rys. 1. Dwuwymiarowe mapy rozkładu wybranych pierwiastków uzyskane dla wybranej kontrolnej próbki istoty czarnej; na skali masa powierzchniowa w  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .



Rys. 2. Dwuwymiarowe mapy rozkładu wybranych pierwiastków uzyskane dla próbki istoty czarnej pacjenta zmarłego z PD; na skali masa powierzchniowa w  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .



Analiza map pierwiastkowych tkanki istoty czarnej ujawniła topograficzne różnice w gromadzeniu się żelaza i wapnia w próbce reprezentującej przypadek choroby Parkinsona. W odróżnieniu od próbek kontrolnych i reprezentujących wczesne stadium choroby, próbka ta wykazywała silną, wielokrotnie wyższą w porównaniu z komórką nerwową, akumulację Fe w niewielkich rozmiarów obszarach, których niezidentyfikowano histopatologicznie. Zaobserwowane dla próbki PD silne zwapnienie dotyczyło za to praktycznie całego skanowanego obszaru tkanki.

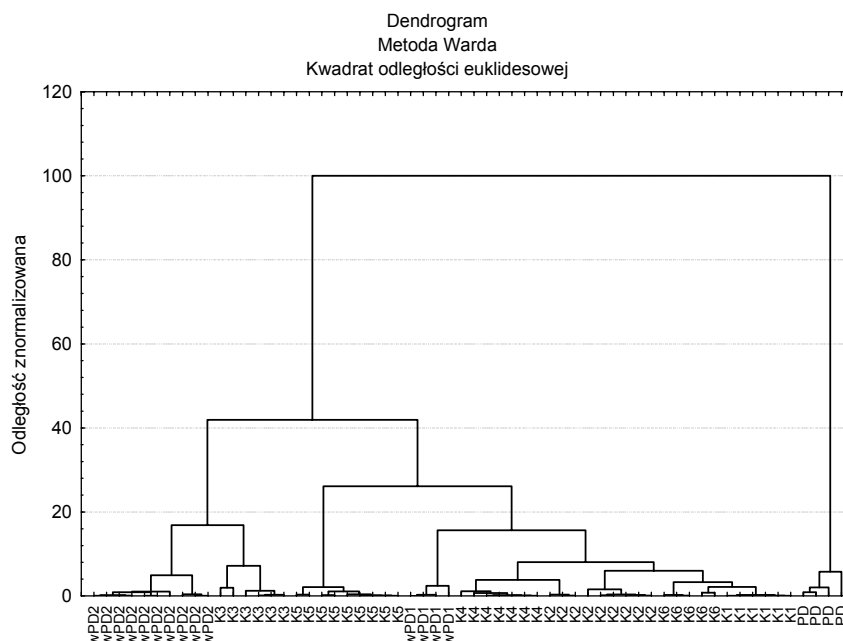
Przeprowadzona analiza ilościowa wykazała dla neuronów istoty czarnej z próbki PD podwyższone masy powierzchniowe żelaza, wapnia i cynku w porównaniu z próbkami kontrolnymi. Dla próbek wczesnego stadium PD nie zaobserwowano ani topograficznych, ani ilościowych różnic w składzie pierwiastkowym tkanki istoty czarnej.

### ***Analiza statystyczna z wykorzystaniem technik WAW***

Analizie statystycznej z wykorzystaniem technik WAW poddano średnie masy powierzchniowe wybranych pierwiastków w obszarze neuronów istoty czarnej. Średnią wyznaczano dla obszaru neuronu o powierzchni  $15 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$ . Wszystkie analizy prowadzono dla zmiennych wystandaryzowanych.

### **Analiza klastrowa**

Grupowanie obserwacji w klastry przeprowadzono, stosując hierarchiczną metodę Warda. Wyniki aglomeracji uzyskane tą metodą, przy zastosowaniu kwadratu odległości Euklidesowej jako miary odległości między obserwacjami, przedstawiono w formie dendrogramu na rys. 3.



Rys. 3. Dendrogram uzyskany dla neuronów pochodzących z próbek istoty czarnej: kontrolnej (K1÷K6), reprezentującej przypadek PD (PD), oraz wczesne stadium choroby Parkinsona (wPD1÷wPD2); metoda Warda; kwadrat odległości euklidesowej.

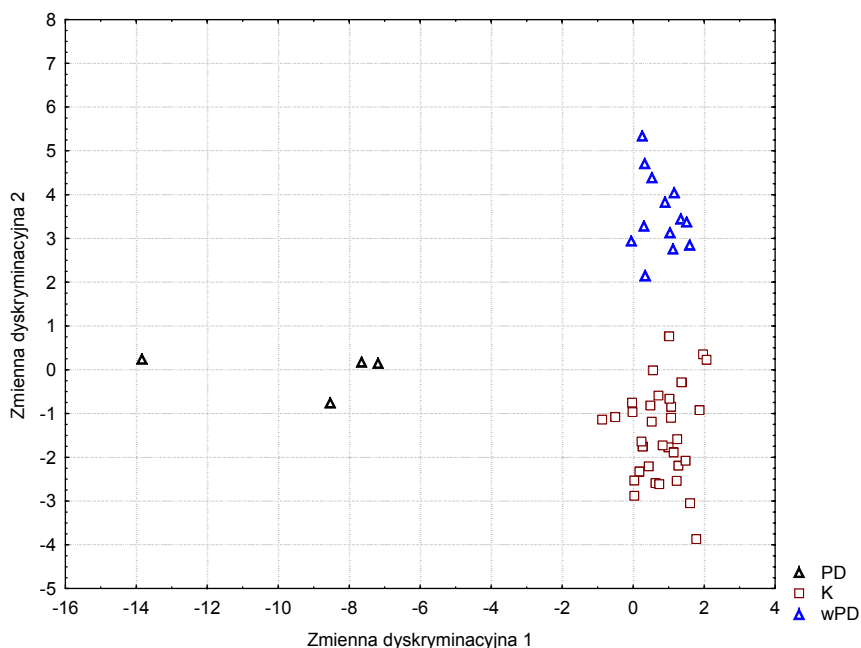
Wyniki analizy skupień potwierdziły statystyczną istotność różnic w składzie pierwiastkowym pomiędzy neuronami z próbki reprezentującej przypadek PD i grupą kontrolną. Analiza kształtu dendrogramów nie wykazała natomiast występowania różnic w zawartości wybranych pierwiastków pomiędzy próbkami wczesnego stadium choroby Parkinsona i próbkami kontrolnymi.

### Analiza dyskryminacyjna

Na wstępie analizę dyskryminacyjną wykonano metodą standardową, uwzględniającą wszystkie zmienne pierwotne (badane pierwiastki). Z analizy wyłączono dane dla losowo wybranej próbki kontrolnej, które w dalszym etapie posłużyły do weryfikacji uzyskanego modelu.

Przeprowadzona dla neuronów z istoty czarnej analiza dyskryminacyjna pozwoliła wyodrębnić dwie istotne funkcje dyskryminacyjne. Standaryzowane współczynniki kanoniczne tych funkcji pozwalają scharakteryzować próbkę (neuron) dwoma zmiennymi dyskryminacyjnymi zamiast dziewięcioma zmiennymi pierwotnymi (średnie masy powierzchniowe pierwiastków w neuronach).

Zastępując pierwotne współrzędne obserwacji współrzędnymi dyskryminacyjnymi, uzyskano wykres rozproszenia obiektów z podziałem na analizowane grupy, co przedstawiono na rys. 4.



Rys. 4. Wykres rozproszenia obserwacji w przestrzeni zmiennych dyskryminacyjnych (wszystkie zmienne uwzględnione w modelu).

W tabeli 1 zestawiono natomiast parametry służące do oceny istotności zmiennych w modelu.

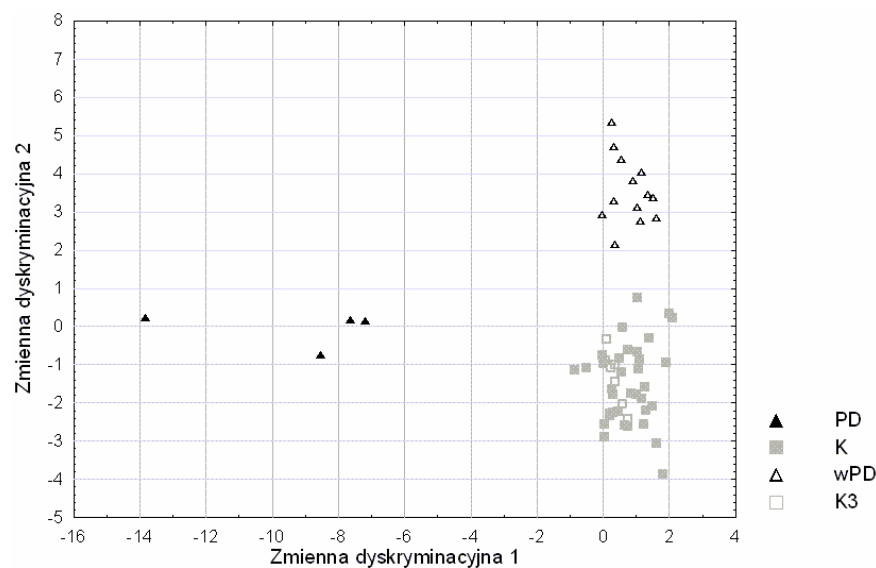


Tabela 1. Parametry oceny istotności zmiennych w modelu.

	Cząstkowa $\Lambda$ Wilksa	Statystyka F-Fishera	p-value
P	0,57	15,0	<0,01
S	0,93	1,6	0,21
Cl	0,59	13,8	<0,01
K	0,83	4,0	0,03
Ca	0,86	3,4	0,04
Fe	0,76	6,2	<0,01
Cu	0,77	5,8	<0,01
Zn	0,66	10,5	<0,01
Se	0,95	0,9	0,40

W oparciu o dane z tabeli 1 stwierdzono, że największe znaczenie w procesie dyskryminacji neuronów istoty czarnej reprezentujących badane przypadki (kontrolne, choroby Parkinsona i wczesnego stadium PD) mają następujące pierwiastki: P, Cl, Fe, Cu i Zn. Dla tych pierwiastków zaobserwowano najniższe wartości cząstkowej  $\Lambda$  Wilksa, największe wartości statystyki testowej F-Fishera oraz najmniejsze i zawsze mniejsze od 0,01 wartości obserwowalnego poziomu istotności.

W dalszym etapie analizę dyskryminacyjną przeprowadzono dla zmiennych wyodrębnionych jako istotne z punktu widzenia klasyfikacji obiektów. Uzyskany dla tej analizy wykres rozproszenia obserwacji w przestrzeni zmiennych dyskryminacyjnych przedstawiono na rys. 5. Dodatkowo na rysunku tym zaznaczono współrzędne dyskryminacyjne obliczone dla neuronów z testowej próbki kontrolnej, co służyło weryfikacji uzyskanego modelu.



Rys. 5. Wykres rozproszenia obserwacji w przestrzeni zmiennych dyskryminacyjnych; zmienne włączone do analizy: P, Cl, Fe, Cu, Zn; neurony z kontrolnej próbki testowej oznaczone kwadratami niewypełnionymi.



Pomimo usunięcia części zmiennych z modelu obserwacje należące do trzech badanych grup są wciąż dobrze rozdzielone w przestrzeni zmiennych dyskryminacyjnych. Z kolei właściwa klasyfikacja neuronów z testowej próbki kontrolnej wskazuje na poprawność uzyskanego modelu.

## Wnioski

Wyniki analizy skupień potwierdziły statystyczną istotność różnic w składzie pierwiastkowym pomiędzy neuronami parkinsonowskimi i reprezentującymi przypadki kontrolne. Analiza kształtu dendrogramów nie wykazała natomiast występowania różnic w zawartości wybranych pierwiastków pomiędzy próbkami wczesnego stadium choroby Parkinsona i próbkami kontrolnymi istoty czarnej.

Przeprowadzona dla poszczególnych struktur biologicznych analiza dyskryminacyjna pozwoliła wyodrębnić pierwiastki, których znaczenie w różnicowaniu grup jest największe. W przypadku neuronów istoty czarnej były to: P, Cl, Fe, Cu i Zn.

Wykorzystując analizę dyskryminacyjną podjęto ponadto próbę stworzenia modeli, które mogą być pomocne w identyfikacji przypadku w oparciu o przeprowadzoną dla próbki analizę pierwiastkową. Weryfikacja uzyskanych modeli przeprowadzona w oparciu o dane uzyskane dla wybranych próbek kontrolnych potwierdziła w większości przypadków ich skuteczność.

## Literatura

1. Samii A., Nutt J.G., Ransom B.R. (2004) Parkinson's disease. *Lancet*. 363, 1783-1793.
2. Carri M.T., Ferri A., Cozzolino M., Calabrese L., Rotilio G. (2003) Neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis: the role of oxidative stress and altered homeostasis of metals. *Brain Research Bulletin*. 61, 365-374.
3. Bush A.I. (2000) Metals and neuroscience. *Current Opinion in Chemical Biology*. 4, 184-191.
4. Bains J.S., Shaw C.A. (1997) Neurodegenerative disorders in humans, the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Research Reviews*. 25, 335-358.
5. Cassarino D.S., Bennett J.P. (1999) An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Research Reviews*. 29, 1-25.
6. Hryniewicz A.Z., Rokita E. (1999) *Fizyczne metody badań w biologii, medycynie i ochronie środowiska*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
7. Janssens K. H., Rindby A., Adams F. (2000) *Microscopic X-Ray Fluorescence Analysis*. Chichester New York: Wiley.



8. Szczerbowska-Boruchowska M., Lankosz M., Ostachowicz J. i wsp. (2004) Topographic and quantitative microanalysis of human central nervous system tissue using synchrotron radiation. *X-ray Spectrometry*. 33, 3-11.
9. Tomik B., Chwiej J., Szczerbowska-Boruchowska M. i wsp. (2006) Implementation of X-ray fluorescence microscopy for investigation of elemental abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochemical Research*. 4, 321-331.
10. Snigireva I., Snigirev A.(2006) X-ray microanalytical techniques based on synchrotron radiation. *Journal of Environmental Monitoring*. 8, 33-42.