



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

DZIEDZINA NAUK ŚCISŁYCH I PRZYRODNICZYCH

DYSCYPLINA NAUKI FIZYCZNE

ROZPRAWA DOKTORSKA

Spektroskopia molekularna i atomowa w badaniach wpływu diety ketogenicznej na rozwój blizny glejowej w modelu in vivo uszkodzenia mózgu

Autor: mgr Kamil Kawoń

Promotor rozprawy: dr hab. inż. Joanna Chwiej, prof. AGH

Promotor pomocniczy: dr inż. Agnieszka Drózdź

Praca wykonana: Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej

Katedra Fizyki Medycznej i Biofizyki

Kraków, 2026

Oświadczenie autora rozprawy:

Oświadczam, świadomy odpowiedzialności karnej za poświadczenie nieprawdy, że niniejszą pracę doktorską wykonałem osobiście i samodzielnie i nie korzystałem ze źródeł innych niż wymienione w pracy.

data, podpis autora

Oświadczenie promotorów rozprawy:

Niniejsza rozprawa jest gotowa do oceny przez recenzentów.

data, podpis pierwszego promotora rozprawy

data, podpis promotora pomocniczego rozprawy

Podziękowania

Chciałbym złożyć serdeczne podziękowania dr hab. inż. Joannie Chwiej, prof. uczelni za pomoc w rozwiązywaniu problemów, dobre słowo w trudniejszych momentach i motywację do ukończenia niniejszej pracy. Dziękuję również za zaangażowanie mnie w różnorodne inicjatywy, projekty i współprace naukowe, które zaowocowały nie tylko poszerzeniem wiedzy, ale pozwoliły poznać grono znakomitych osób.

Składam podziękowania prof. dr hab. Zuzannie Setkowicz-Janeczko za pomoc w części eksperymentu realizowanej z udziałem zwierząt oraz umożliwienie mi towarzyszenia i obserwacji z bliska tego kluczowego etapu prac.

Pragnę wielce podziękować Marzenie Rugieł i Zuzannie Rauk, które wniosły wiele pracy, poświęconego czasu i cennych uwag do niniejszej pracy oraz za to, że wspólnie spędzony czas w laboratoriach przerodził się nie tylko we współautorstwo publikacji, lecz we wspólną realizację pasji i zainteresowań.

Dziękuję dr inż. Mateuszowi Czyżyckiemu i Aleksandrze Wilk za pomoc, rady i ciekawe rozmowy w trakcie realizacji pomiarów XRF oraz przy okazji późniejszych analiz.

Pracownikom i Kolegom z Katedry Fizyki Medycznej i Biofizyki za gotowość do pomocy i stworzenie przestrzeni do rozwoju w trakcie realizacji badań i spotkań.

Szczególne wyrazy podziękowania i wdzięczności kieruję do całej mojej Rodziny i Przyjaciół, którzy wspierali mnie od samego początku doktoratu, podnosili na duchu w momentach zwątpienia oraz służyli dobrym słowem i czasem, który urozmaicał chwile po opuszczeniu murów Uczelni

Weronice, mojej ukochanej Narzeczonej, dziękuję za wszystkie słowa wsparcia i motywację, która doprowadziła mnie do tego gdzie dzisiaj jestem. Dziękuję Ci za każdy uśmiech i wyrazy zrozumienia w trakcie realizacji doktoratu i pisania pracy.

Spis treści

Streszczenie	5
Abstract	7
Układ rozprawy	8
1. Wprowadzenie.....	9
2. Cele i zakres pracy	14
3. Materiały i metody	15
4. Streszczenia artykułów.....	17
5. Dyskusja	21
6. Podsumowanie	28
Literatura	30
Lista wystąpień konferencyjnych.....	37
Publikacje spoza rozprawy.....	38
Zagraniczne wyjazdy naukowe	39
Granty i stypendia naukowe	39
Oświadczenia współautorów publikacji oraz manuskryptów	40
Oryginalne wersje publikacji i manuskryptów stanowiących podstawę rozprawy.....	58

Streszczenie

Urazowe uszkodzenie mózgu (ang. traumatic brain injury, TBI) stanowi poważne wyzwanie socjoekonomiczne. Z tego względu intensywnie poszukuje się terapii, które mogłyby minimalizować długofalowe następstwa TBI. Jednym z proponowanych podejść jest wykorzystanie diety ketogenicznej (ang. ketogenic diet, KD), która znajduje kliniczne zastosowanie w leczeniu padaczki lekoopornej. Skuteczność leczenia w TBI może być zależna od wielu czynników, w tym od płci oraz momentu wdrożenia terapii. W związku z tym w niniejszej pracy zbadano wpływ KD oraz płci badanych zwierząt na rozwój blizny glejowej po TBI.

Oprócz metod terapeutycznych istotne jest również rozwijanie i poszukiwanie nowych narzędzi diagnostycznych, umożliwiających szybką i precyzyjną ocenę zmian zachodzących w przebiegu TBI, w tym identyfikację markerów procesu chorobowego oraz zmian indukowanych przez zastosowanie KD. W pracy oceniono potencjał instrumentalnych metod spektroskopii atomowej i molekularnej jako narzędzi do badań nad procesem formowania się blizny glejowej. Analizie poddano próbki pochodzące od zwierząt doświadczalnych, obejmujące skrawki mózgu oraz mineralizaty wybranych narządów wewnętrznych. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem mikrospektroskopii w podczerwieni z transformatą Fouriera (ang. Fourier transform infrared microspectroscopy, FTIRM), spektroskopii Ramana (ang. Raman spectroscopy, RS), fluorescencji rentgenowskiej całkowitego odbicia (ang. total reflection X-ray fluorescence, TXRF) oraz fluorescencji rentgenowskiej ze wzbudzeniem synchrotronowym (ang. synchrotron X-ray fluorescence, SR-XRF).

Jednym z głównych celów badań była identyfikacja molekuł i pierwiastków, których akumulacja w tkance zmienia się w wyniku TBI oraz modyfikacji, jakie wprowadza w tym zakresie KD, w zależności od płci badanych zwierząt. Analizy prowadzone z wykorzystaniem techniki FTIRM wykazały, że rozwój blizny glejowej powoduje wyraźne zmiany w składzie biomolekularnym kory mózgowej. Obserwowano spadek zawartości związków zawierających grupy fosforanowe, cholesterolu i jego estrów, związków zawierających grupy karbonyłowe oraz lipidów, szczególnie nienasyconych. Odwrotne tendencje zaobserwowano w przypadku drugorzędowej struktury białek – na wczesnym etapie rozwoju blizny glejowej stwierdzono wzrost względnej zawartości białek o strukturze β -kartki. Dane uzyskane za pomocą RS okazały się przydatne w ocenie wpływu KD na rejon kory mózgowej niezwiązany bezpośrednio z uszkodzeniem pierwotnym. Efekty KD były szczególnie wyraźne u samic, u których odnotowano wzrost poziomu cytochromu C/DNA, estryfikacji lipidów, amidu III oraz stopnia nienasycenia lipidów – podobne, choć mniej intensywne zmiany, obserwowano również u samców. Analizy skrawków mózgowych przeprowadzono także z wykorzystaniem techniki SR-XRF, co pozwoliło szczegółowo ocenić fizjologię rozwoju blizny glejowej w czasie. Najistotniejsze obserwacje dotyczyły zmian w rozkładzie pierwiastków takich jak wapń, żelazo i miedź. Nie stwierdzono, natomiast istotnego modyfikującego wpływu KD w tym zakresie. Ze względu na potencjalnie plejotropowe działanie KD, oceniono również wpływ diety na narządy wewnętrzne. Analizie poddano wątrobę, nerki i śledzionę, a ich mineralizaty zbadano za pomocą metody TXRF. Uzyskane wyniki potwierdziły obciążający wpływ KD na organy wewnętrzne, przy czym szczególnie wrażliwe na dietę okazały się nerki, w których stwierdzono znaczące odchylenia poziomów wapnia i fosforu w porównaniu z grupą kontrolną.

Zastosowanie metod spektroskopowych dostarczyło nowego wglądu w odpowiedź organizmu szczurów na KD w warunkach TBI. Każda z wykorzystanych technik spektroskopowych okazała się przydatna w charakteryzowaniu profilu obserwowanych zmian. FTIRM umożliwiła precyzyjne wyznaczenie granic obszaru powstałego uszkodzenia. Wpływ diety ketogenicznej na przebieg TBI oraz skład molekularny kory mózgowej został zobrazowany przy użyciu RS. Natomiast technika TXRF dostarczyła informacji na temat zmian w składzie pierwiastkowym narządów wewnętrznych. Z kolei analizy przeprowadzone z wykorzystaniem SR-XRF

zwróciły uwagę na dynamikę zmian w akumulacji pierwiastków w obrębie formującej się blizny glejowej, co przyczynia się do lepszego zrozumienia procesu pourazowej reakcji glejowej.

Abstract

Traumatic brain injury (TBI) poses a significant socioeconomic challenge. Consequently, there is an intensive search for therapies that could minimize the long-term sequelae of TBI. One proposed approach is the application of the ketogenic diet (KD), which finds clinical use in the management of drug-resistant epilepsy. Therapeutic efficacy in TBI may depend on numerous factors, including sex and the timing of intervention. Therefore, this study investigated the impact of KD and the sex of the subjects on glial scar formation following TBI.

Beyond therapeutic strategies, it is crucial to develop and explore novel diagnostic tools that enable rapid and precise assessment of TBI-associated changes, including the identification of disease markers and alterations induced by KD administration. This study evaluated the potential of instrumental atomic and molecular spectroscopy methods as tools for investigating glial scar formation. Analysis was performed on samples from experimental animals, comprising brain sections and mineralizates of selected internal organs. The research employed Fourier transform infrared microspectroscopy (FTIRM), Raman spectroscopy (RS), total reflection X-ray fluorescence (TXRF), and synchrotron radiation X-ray fluorescence (SR-XRF).

A primary objective was to identify molecules and elements whose tissue accumulation changes due to TBI and to determine how KD modifies these alterations depending on the sex of the subjects. FTIRM analyses demonstrated that glial scar development induces distinct changes in the biomolecular composition of the cerebral cortex. A decrease was observed in the content of compounds containing phosphate groups, cholesterol and its esters, compounds containing carbonyl groups, and lipids, particularly unsaturated ones. Conversely, regarding protein secondary structure, an increase in the relative content of β -sheet structures was observed during the early stage of glial scar formation. Data obtained via RS proved valuable in assessing the impact of KD on cortical regions not directly involved in the primary injury. KD effects were particularly pronounced in females, who exhibited increased cytochrome C/DNA ratios, lipid esterification, amide III levels, and lipid unsaturation degrees; similar, albeit less intense, changes were also observed in males. Brain section analyses were also conducted using SR-XRF, allowing for a detailed temporal assessment of glial scar physiology. The most significant observations concerned changes in the distribution of elements such as calcium, iron, and copper. However, no significant modifying effect of KD was found in this regard. Given the potentially pleiotropic effects of KD, the diet's impact on internal organs was also evaluated. The liver, kidneys, and spleen were analysed, and their mineralizates were examined using TXRF. The results confirmed the burdening effect of KD on internal organs; the kidneys appeared particularly sensitive, showing significant deviations in calcium and phosphorus levels compared to the control group.

The application of spectroscopic methods provided new insights into the systemic response of rats to KD under TBI conditions. Each of the employed spectroscopic techniques proved useful in characterizing the profile of observed changes. FTIRM enabled the precise delineation of the injury boundaries. The impact of the ketogenic diet on TBI progression and the molecular composition of the cerebral cortex was elucidated using RS. Meanwhile, TXRF provided information regarding changes in the elemental composition of internal organs. Finally, SR-XRF analyses highlighted the dynamics of elemental accumulation within the forming glial scar, contributing to a better understanding of the post-traumatic glial response.

Układ rozprawy

Na niniejszą rozprawę doktorską składają się trzy publikacje [A1-A3] oraz jeden manuskrypt przesłany do publikacji [S1] dotyczące wykorzystania zaawansowanych metod spektroskopowych w badaniach wpływu diety ketogenicznej na rozwój blizny glejowej oraz homeostazę organizmu. Artykuły [A1] i [A3] skupiają się na użyteczności metod spektroskopii wibracyjnej do oceny zmian molekularnych, jakie wywołuje uszkodzenie pierwotne mózgu oraz zbadania zmian towarzyszących rozwojowi blizny glejowej w zależności od płci zwierząt. Artykuł [A2] dotyczy wykorzystania fluorescencji rentgenowskiej całkowitego odbicia (ang. total reflection X-ray fluorescence, TXRF) w analizie wpływu badanej diety wysokotłuszczowej na homeostazę pierwiastkową organów wewnętrznych, podejmuje również temat zawartości analizowanych pierwiastków w stosowanej karmie.

Manuskrypt artykułu [S1], który w momencie przygotowywania rozprawy znajduje się w recenzji w czasopiśmie *Spectrochimica Acta A*, zawiera wyniki uzyskane za pomocą metod mikrospektroskopii w podczerwieni z transformatą Fouriera (ang. Fourier transform infrared microspectroscopy, FTIRM), spektroskopii Ramana (ang. Raman spectroscopy, RS) oraz fluorescencji rentgenowskiej ze wzbudzeniem synchrotronowym (ang. synchrotron X-ray fluorescence, SR-XRF), które ukazują wpływ diety ketogenicznej (ang. ketogenic diet, KD) na rozwój blizny glejowej.

[A1] **Kamil Kawoń**, Zuzanna Setkowicz, Agnieszka Dróżdź, Krzysztof Janeczko, Joanna Chwiej, *The methods of vibrational microspectroscopy reveals long-term biochemical anomalies within the region of mechanical injury within the rat brain*, *Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2021; 263, 120214. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2021.120214>.

[A2] **Kamil Kawoń**, Marzena Rugieł, Zuzanna Setkowicz, Katarzyna Matusiak, Aldona Kubala-Kukuś, Ilona Stabrawa, Karol Szary, Zuzanna Rauk, Joanna Chwiej, *Ketogenic diet influence on the elemental homeostasis of internal organs is gender dependent*, *Scientific Reports* 2023 13:1 13 (2023) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45611-4>.

[A3] **Kamil Kawoń**, Zuzanna Setkowicz, Zuzanna Rauk, Joanna Chwiej, *Vibrational spectroscopy methods reveal biochemical changes associated with the glial scar formation after traumatic brain injury*, *Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2025; 345, 126782. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2025.126782>.

[S1] **Kamil Kawoń**, Zuzanna Setkowicz, Zuzanna Rauk, Mateusz Czyżycki, Aleksandra Wilk, Anna Sławek, Jakub Cieślak, Giuliana Aquilanti, Ilaria Carlomagno, Agnieszka Dróżdź, Joanna Chwiej, *Modulatory role of the ketogenic diet in glial scar formation after traumatic brain injury - FTIR, Raman and X-ray fluorescence microscopy study*, (W recenzji w *Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc*)

1. Wprowadzenie

Urazowe uszkodzenie mózgu (ang. traumatic brain injury, TBI) jest rodzajem urazu, który powstaje w wyniku działania zewnętrznych sił powodujących czasowe lub stałe, funkcjonalne lub strukturalne uszkodzenie mózgu [1,2]. TBI stanowi wyzwanie dla służby zdrowia oraz ze względów społeczno-ekonomicznych, gdyż każdego roku odnotowuje się ok. 50 milionów jego nowych przypadków [3]. Większość z nich to przypadki łagodne, które nie zmieniają przewidywanej długości życia, natomiast mogą prowadzić do pojawiających się w późniejszym czasie niepełnosprawności [4].

TBI możemy podzielić na dwa rodzaje, w zależności od czasu mijającego od uszkodzenia oraz następujących po sobie mechanizmów. Pierwotne TBI wywoływane jest w momencie wystąpienia sił zewnętrznych i może obejmować złamania czaszki, stłuczenie, wstrząśnienie mózgu i rozdarcie tkanek [5]. Wtórne TBI następuje w wyniku odpowiedzi komórkowych, zmian tkankowych i/lub behawioralnych, które mają miejsce w ciągu godzin, dni lub nawet lat po wystąpieniu urazu pierwotnego [6]. Powstające okno czasowe, w zależności od zachodzących procesów, umożliwia zastosowanie terapii, która może zminimalizować lub nawet wyeliminować negatywne skutki nieleczonego wtórnego urazu mózgu.

W poszukiwaniu terapii, która wywołałaby pożądane złagodzenie lub zahamowanie szkodliwych zmian w mózgu po wystąpieniu urazu pierwotnego, skierowaliśmy swoją uwagę na KD, która od lat stosowana jest w leczeniu padaczki lekoopornej [7]. Wystąpienie padaczki może być następstwem udarów oraz TBI, ponadto 30% procent cierpiących na to schorzenie osób jest diagnozowane jako oporni na dotychczas stosowane lub dostępne leczenie [8,9]. Jako podejście alternatywne do operacji chirurgicznych mających na celu usunięcie obszarów mózgu odpowiedzialnych za wywoływanie ataków padaczkowych stosuje się KD. Mechanizm działania tej diety jest plejotropowy, jednak w kontekście padaczki lekoopornej zidentyfikowano kilka obszarów, które potwierdzają jej kliniczne działanie i skuteczność [10]. Ciała ketonowe, takie jak β -hydroksymaślan (ang. β -hydroxybutyrate, BHB) i acetoocetan (ang. acetoacetate, AcAc), wykazują wieloaspektowy wpływ na funkcjonowanie mózgu, wykraczający poza ich tradycyjną rolę jako źródła energii. W kontekście padaczki, ich działanie obejmuje modulację licznych kanałów jonowych oraz szlaków sygnalizacyjnych, co przekłada się na obniżenie pobudliwości neuronalnej. Mechanizm przeciwdrgawkowy ciał ketonowych wynika między innymi z aktywacji kanałów potasowych (K-ATP) [11]. W warunkach, gdy metabolizm glukozy generuje cytoplazmatyczne rezerwy ATP, przejście na ketolizę powoduje względny spadek ATP w cytoplazmie, co sprzyja otwarciu tych kanałów [11]. Otwarcie K-ATP prowadzi do hiperpolaryzacji neuronów i stabilizacji ich potencjału spoczynkowego, zmniejszając ryzyko nadmiernego wyładowania. Ponadto, BHB bezpośrednio oddziałuje z tryptofanem na jednostkę KCNQ3 (kanał potasowy bramkowany napięciem), prowadzi do hiperpolaryzacji komórki i redukuje częstotliwość wyładowań [12,13]. W obszarze transmisji synaptycznej ciała ketonowe wpływają na transport glutaminianu do pęcherzyków synaptycznych – AcAc konkuruje z jonami chlorkowymi o miejsce allosteryczne na transporterach VGLUT, co skutkuje ograniczeniem ilości uwalnianego glutaminianu, głównego neuroprzekaźnika pobudzającego [14,15]. Dodatkowo, modyfikacja metabolizmu cyklu Krebsa przez ketony sprzyja zwiększeniu syntezy GABA, kluczowego neuroprzekaźnika hamującego, co może tłumaczyć obserwowany wzrost jego stężenia u pacjentów stosujących KD [16,17]. Warto także podkreślić, że ciała ketonowe wpływają na funkcjonowanie kanałów ASIC1a, które reagują na zmiany pH. Choć mechanizm ich interakcji z ketonami pozostaje przedmiotem badań, sugeruje się, że modulacja tych kanałów może przyczyniać się do terminacji napadów padaczkowych [18,19]. BHB zwiększa próg otwarcia mitochondrialnych porów przejściowych (mPT), co stabilizuje poziomy wapnia w cytoplazmie i zapobiega nadmiernemu pobudzeniu neuronów [20–22]. Omówione powyżej mechanizmy tłumaczą, dlaczego KD, przez zwiększenie stężenia ciał ketonowych, znajduje zastosowanie w leczeniu

padaczki odpornej na standardową farmakoterapię, oferując nowatorskie perspektywy terapeutyczne oparte na precyzyjnym modulowaniu różnych obszarów funkcjonowania mózgu. Myśląc o zastosowaniu KD jako terapii zapobiegania negatywnym skutkom TBI należy omówić powszechnie stosowane modele uszkodzenia mózgu. Do celów badawczych wykorzystuje się modele zwierzęce, które umożliwiają precyzyjną kontrolę parametrów uszkodzenia oraz pozwalają na dogłębne analizy mechanizmów na poziomie tkankowym, komórkowym i molekularnym. Modele eksperymentalne obejmują między innymi: model symulowanego uderzenia, model kontrolowanego uszkodzenia kory, model rotacyjny oraz model wywołania uszkodzenia przez impuls płynu. W modelu symulowanego uderzenia stosuje się specjalistyczne urządzenie, które generuje kontrolowany cios w głowę zwierzęcia, cios ten może być uzyskany np. poprzez swobodny spadek ciężarka [23]. Wśród najczęściej wykorzystywanych modeli, które symulują uszkodzenia spowodowane spadkiem ciężarka, wyróżnia się modele Feeneya, Marmarou oraz Shohami. Model Feeneya polega na upuszczeniu ciężarka na odsłoniętą oponę twardą (łac. dura mater) po wykonanej kraniotomii [24], podczas gdy w modelu opracowanym przez Marmarou, ciężarek spada na płytkę przymocowaną do głowy zwierzęcia [25], oraz model Shohami, powodujący odpowiednio rozproszone lub miejscowe uszkodzenia. Wspomniane metody umożliwiają odtworzenie różnorodnych scenariuszy mechanicznych zaburzeń [26]. Model kontrolowanego uszkodzenia kory (ang. controlled cortical injury, CCI) polega na precyzyjnym oddziaływaniu na korę mózgową, gdzie zarówno wielkość, jak i głębokość ingerencji są ściśle określone [23]. Taki model pozwala na zachowanie wysokiej powtarzalności eksperymentu oraz kontrolę nad intensywnością wywołanego zaburzenia, co jest niezwykle istotne dla badań nad mechanizmami naprawczymi i neuroprotektoryjnymi. Model rotacyjny, opracowany przez Namjoshi, symuluje przypadki uszkodzeń głowy typowych dla kolizji samochodowych i innych sytuacji, w których w wyniku uderzenia następuje gwałtowna rotacja lub przemieszczenie głowy [27]. W tym modelu zwierzę umieszczane jest w urządzeniu, które stosuje kontrolowane siły rotacyjne na głowę, umożliwiając tym samym odtworzenie dynamicznych mechanizmów zaburzeń. Natomiast model wywołania uszkodzenia przez impuls płynu (ang. fluid percussion injury, FPI) polega na działaniu impulsu płynu o odpowiednio dobranej sile, który uderza w odsłoniętą oponę twardą [28]. Taki impuls powoduje przemieszczenie i deformację tkanki mózgowej, a stopień nasilenia zaburzenia zależy od głębokości ugięcia opony twardej oraz prędkości oraz siły impulsu. W niniejszym badaniu zastosowano model penetracyjnego uszkodzenia kory u szczurów. Model ten, z powodzeniem wykorzystany w badaniach dotyczących reakcji gwałtownej na zaburzenia oraz ich epileptogennych efektów, charakteryzuje się stosunkowo niewielkim stopniem mechanicznego uszkodzenia mózgu, ale jednocześnie powoduje naruszenie bariery krew-mózg [29–33]. Taki model umożliwia precyzyjne badanie mechanizmów patofizjologicznych oraz procesów naprawczych zachodzących po incydencie, stanowiąc cenne narzędzie w badaniach nad konsekwencjami mechanicznych zakłóceń funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego.

Oprócz poszukiwań terapii zdolnych do minimalizowania skutków ubocznych TBI, równie ważne jest poszukiwanie metod diagnostycznych, które będą w stanie zapewnić szybką i trafną diagnozę, co jest kluczowe dla podjęcia odpowiedniego leczenia. W przypadku eksperymentu będącego podstawą badań niniejszej rozprawy stosowano diagnostykę *post mortem*, która cechuje się tym, że możemy zajrzeć w głąb tkanek, do których w trakcie diagnostyki prowadzonej przyżyciowo nie mielibyśmy dostępu. Diagnostyka TBI opiera się na badaniu przekrojów mózgu po resekcji, analizie płynu mózgowo-rdzeniowego, analizie surowicy krwi lub obrazowaniu z wykorzystaniem tomografii komputerowej i magnetycznego rezonansu jądrowego. Pierwsze z przedstawionych podejść dotyczy zwierzęcych modeli TBI, gdzie mamy dostęp do szerokiego wachlarza technik od metod instrumentalnych po barwienie immunohistochemiczne i histochemiczne. Biorąc pod uwagę charakter niniejszej rozprawy szczególnie interesujące jest zastosowanie technik spektroskopowych, w tym FTIRM [34,35],

RS [36,37] i SR-XRF [38,39] w badaniach nad TBI. Jednak patologie i schorzenia układu nerwowego, jakie można badać przy wykorzystaniu tych technik nie ograniczają się do badań nad urazem mózgu, jak również nie ograniczają się do stosowania skrawków tkanek jako próbek badawczych. W diagnostyce medycznej ceniona jest możliwość identyfikacji schorzeń z łatwo dostępnych materiałów biologicznych, do których zaliczamy krew i jej składniki, ślinę, czy trochę trudniej pozyskiwany płyn mózgowo-rdzeniowy [40]. Największą zaletą w wykorzystaniu płynu mózgowo-rdzeniowego i surowicy krwi w celu identyfikacji zmian lub markerów TBI jest możliwość ich przyżyciowego pobrania oraz sposobność do badania zachodzących zmian w czasie na materiale pochodzącym od tego samego osobnika. Analiza płynu mózgowo-rdzeniowego przy wykorzystaniu FTIRM ma swoje zastosowanie w badaniach nad chorobami neurodegeneracyjnymi [41–43], natomiast surowicę krwi bada się w kontekście TBI [44]. Również RS jest z powodzeniem stosowana do badania płynu mózgowo-rdzeniowego w przypadku TBI i chorób neurodegeneracyjnych [45,46]. Anomalie w składzie pierwiastkowym płynów ustrojowych analizowane z wykorzystaniem zjawiska fluorescencji rentgenowskiej, niezależnie od finalnie zastosowanego układu aparaturowego, zostały wykorzystane w badaniach nad powiązaniem metali ciężkich w płynie mózgowo rdzeniowym z markerami choroby Alzheimera [47]. Powyższe przykłady zastosowań biomedycznych FTIRM, RS i XRF potwierdzają ich użyteczność w badaniach nad patologiami układu nerwowego. Możliwość badania szerokiego spektrum próbek, względna łatwość w pozyskiwaniu materiału badawczego oraz podkreślana przez badaczy, stosujących te techniki, specyficzność wykrywanych zmian zachodzących pod wpływem czynników patologicznych i schorzeń potwierdza słuszność wyboru FTIRM, RS i XRF do badania wpływu KD na rozwój blizny glejowej.

Spektroskopia, jako narzędzie analityczne polegające na interpretacji widm będących efektem oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z materią próbki, znajduje szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach nauki. Jednym z podstawowych kryteriów klasyfikacji metod spektroskopowych jest rodzaj informacji, jakiej dostarczają, a w szczególności poziom organizacji materii, którego dotyczą. Na tej podstawie wyróżnia się m.in. spektroskopię molekularną oraz spektroskopię atomową. Metody molekularne dostarczają informacji o budowie chemicznej związków, rodzaju wiązań oraz zmianach strukturalnych cząsteczek. Do tej grupy należą m.in. spektroskopia FTIRM oraz RS, które umożliwiają analizę drgań molekularnych i dlatego stanowią czułe narzędzie do badania zmian biochemicznych w białkach, lipidach czy kwasach nukleinowych [48–50]. Z kolei spektroskopia atomowa koncentruje się na oznaczaniu składu pierwiastkowego oraz stężeń poszczególnych pierwiastków, niezależnie od ich formy chemicznej. Przykładem takiej techniki jest fluorescencja rentgenowska (ang. X-ray fluorescence, XRF), w tym metoda TXRF, która umożliwia ilościową analizę pierwiastków śladowych w próbkach ciekłych, oraz SR-XRF, zapewniająca wysoką czułość i rozdzielczość przestrzenną pomiarów [51,52].

W niniejszej pracy do analizy zmian molekularnych w tkance mózgowej zastosowano metody spektroskopii wibracyjnej: FTIRM oraz RS, które dostarczają komplementarnych informacji wynikających z odmiennych mechanizmów oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z materią. Spektroskopia FTIRM opiera się na zjawisku absorpcji promieniowania podczerwonego przez drgające molekule, prowadzącej do wzbudzeń oscylacyjnych aktywnych w podczerwieni. Warunkiem obserwacji pasma jest zmiana momentu dipolowego cząsteczki w trakcie drgania. W efekcie metoda ta jest szczególnie czuła na drgania ugrupowań polarnych i asymetrycznych [53,54]. W pracy wykorzystano FTIRM do topograficznej i półilościowej oceny intensywności pasm odpowiadających białkom, lipidom, cholesterolowi i jego estrom oraz grupom fosforanowym, co umożliwiło ocenę zmian składu molekularnego tkanki mózgu oraz modyfikacji strukturalnych białek i tłuszczów wywołanych urazem i KD.

RS bazuje na nieelastycznym rozpraszaniu promieniowania, w którym przesunięcie częstotliwości promieniowania rozproszonego względem padającego wynika z wymiany energii z drgającymi cząsteczkami. Aktywność Ramana jest związana ze zmianą polaryzowalności cząsteczki podczas drgania, co sprawia, że technika ta jest szczególnie wrażliwa na symetryczne ugrupowania chemiczne oraz wiązania bogate w elektrony [55–57]. W niniejszej pracy RS została wykorzystana do analizy zmian w strukturze lipidów, w szczególności stopnia ich nienasycenia, oraz do oceny modyfikacji wybranych składników molekularnych, słabiej widocznych w widmach FTIRM.

Zastosowanie obu technik pozwoliło na uzyskanie komplementarnego opisu zmian biochemicznych zachodzących w tkance mózgowej, wynikających z lokalnego urazu oraz interwencji dietetycznej, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej czułości na różne klasy drgań molekularnych.

W niniejszej pracy do analizy składu pierwiastkowego zastosowano dwie techniki spektroskopii atomowej: TXRF oraz SR-XRF. Obie metody bazują na tym samym mechanizmie fizycznym, czyli zjawisku fluorescencji rentgenowskiej, ale różnią się geometrią pomiaru, wymaganiami aparaturowymi oraz zakresem uzyskiwanej informacji.

Fluorescencja rentgenowska polega na wzbudzeniu atomów próbki poprzez jonizację wewnętrznych powłok elektronowych, najczęściej powłoki K lub L. W wyniku oddziaływania z promieniowaniem pierwotnym dochodzi do wybicia elektronu z powłoki o niskiej energii wiązania, a powstała luka jest wypełniana przez elektron przechodzący z powłoki o wyższej energii. Procesowi temu towarzyszy emisja fotonu o energii charakterystycznej dla danego pierwiastka. Rejestrowane linie emisyjne odpowiadają konkretnym przejściom elektronowym: linia $K\alpha$ związana jest z przejściem elektronu z powłoki L na K, linia $K\beta$ z przejściem z powłoki M na K, natomiast linie serii L odpowiadają przejściom z powłoki M na L. Analiza energii i intensywności tych linii umożliwia jakościowe i ilościowe oznaczenie pierwiastków obecnych w próbce [58].

Technika SR-XRF opiera się na wzbudzaniu atomów próbki przy użyciu intensywnej wiązki promieniowania rentgenowskiego generowanej w źródle synchrotronowym. Promieniowanie to charakteryzuje się nie tylko bardzo wysoką intensywnością, lecz także dużym stopniem naturalnej kolimacji oraz możliwością precyzyjnego doboru energii wiązki dzięki zastosowaniu układów monochromatyzujących. Odpowiednia konfiguracja optyczna linii synchrotronowej, obejmująca m.in. monochromatory, kolimatory i optykę rentgenowską, pozwala na prowadzenie pomiarów z rozdzielczością przestrzenną sięgającą nawet ułamków mikrometra. Duża intensywność promieniowania przekłada się na uzyskiwane granice detekcji pierwiastków oraz czas pomiaru, a precyzyjne systemy pozycjonowania próbki pozwalają na mapowanie składu pierwiastkowego w dwóch i trzech wymiarach [59–61]. W niniejszej pracy technikę SR-XRF wykorzystano do dwuwymiarowego mapowania rozkładu pierwiastków w obszarze uszkodzenia pierwotnego mózgu. Uzyskane wyniki porównano pomiędzy osobnikami obu płci, w różnych punktach czasowych od wywołania uszkodzenia kory mózgowej oraz w zależności od stosowanej diety.

Technika TXRF opiera się na zjawisku całkowitego odbicia promieniowania rentgenowskiego od gładkiego podłoża przy bardzo małych kątach padania. W metodzie wiązka pierwotna promieniowania X jest kierowana na nośnik próbki pod kątem mniejszym niż kąt krytyczny φ_{crit} , którego wartość jest ściśle określona dla danej energii promieniowania oraz rodzaju materiału nośnika. Dla kątów $\varphi < \varphi_{crit}$ współczynnik odbicia osiąga wartość bliską jedności ($R \approx 1$), co oznacza niemal całkowite odbicie wiązki od powierzchni podłoża. W tych warunkach głębokość penetracji promieniowania X w materiał jest bardzo mała i wynosi zaledwie kilka nanometrów. Taka geometria pomiaru powoduje, że promieniowanie pierwotne praktycznie nie wnika w podłoże, co prowadzi do istotnej redukcji promieniowania rozproszonego oraz minimalizacji efektów matrycowych. Dodatkowo próbka, naniesiona w postaci cienkiej warstwy lub mikrokropli na reflektor, znajduje się w polu interferencyjnym

wiązki padającej i odbitej, co skutkuje jej wzmocnieniem sygnału fluorescencji w porównaniu do tradycyjnych układów pomiarowych XRF. W konsekwencji metoda TXRF charakteryzuje się bardzo niskimi granicami wykrywalności pierwiastków, sięgającymi poziomu śladowego [51,62,63]. Analizy TXRF prowadzi się zazwyczaj dla całkowicie zmineralizowanych próbek, najczęściej trawionych mikrofalowo w kwasie azotowym, co w przypadku niniejszej rozprawy pozwoliło uzyskać globalną informację o zmianach w homeostazie pierwiastkowej badanych narządów [64,65]. Istotną zaletą metody jest również fakt, że do uzyskania wiarygodnych wyników wystarczają bardzo małe objętości próbek, które po naniesieniu na nośnik wymagają jedynie wysuszenia przed pomiarem [65]. Detekcja promieniowania fluorescencyjnego odbywa się pod kątem 90° względem wiązki pierwotnej, co dodatkowo ogranicza rejestrację promieniowania rozproszonego i minimalizuje tło pomiaru [66].

Metoda TXRF znalazła szerokie zastosowanie w analizie próbek środowiskowych, w szczególności w oznaczaniu zanieczyszczeń metalami ciężkimi [67]. W ostatnich latach obserwuje się jednak rosnące zainteresowanie wykorzystaniem TXRF również w badaniach próbek biologicznych, gdzie kluczowe znaczenie mają wysoka czułość, niewielka ilość materiału oraz możliwość ilościowej analizy wielu pierwiastków jednocześnie [65]. W niniejszej pracy technikę TXRF zastosowano do ilościowego porównania stężeń wybranych pierwiastków w próbkach narządów pobranych od osobników obu płci, żywionych paszą wysokotłuszczową (dla diety ketogenicznej) oraz standardową.

Zarówno technika SR-XRF, jak i TXRF umożliwiają ilościowe oznaczanie pierwiastków, jednak w obu przypadkach stosuje się odmienne podejścia kalibracyjne. W metodzie SR-XRF analiza ilościowa opiera się na wykorzystaniu odpowiednich materiałów referencyjnych, które zawierają znaną masę powierzchniową danego pierwiastka. Takie podejście jest szczególnie istotne w pomiarach cienkich warstw oraz podczas mapowania rozkładu pierwiastków w cienkich skrawkach tkanki, gdzie rejestrowany sygnał fluorescencji rentgenowskiej jest proporcjonalny do ilości pierwiastka przypadającej na jednostkę powierzchni [68]. W technice TXRF ilościowa analiza pierwiastkowa realizowana jest natomiast poprzez zastosowanie standardu wewnętrznego, którym jest roztwór pierwiastka nieobecnego naturalnie w badanej próbce. Standard ten dodawany jest do próbki w ściśle określonej ilości przed wykonaniem pomiaru i pełni rolę odniesienia umożliwiającego przeliczenie intensywności linii fluorescencyjnych na bezwzględne stężenia pierwiastków [69]. Zastosowanie standardu wewnętrznego pozwala jednocześnie skompensować ewentualne różnice wynikające z niejednorodności próbki, zmiennej grubości osadu czy fluktuacji intensywności wiązki pierwotnej, co przekłada się na wysoką dokładność i powtarzalność oznaczeń ilościowych.

2. Cele i zakres pracy

Nadrzędnym celem niniejszej pracy było określenie wpływu KD na proces formowania się blizny gwałtownej w mózgu poprzez analizę zmian w składzie molekularnym tkanki oraz w zawartości biologicznie istotnych pierwiastków. Do realizacji tego celu zastosowano zaawansowane metody spektroskopowe: FTIRM i RS do charakterystyki zmian molekularnych oraz SR-XRF i TXRF do jakościowej, ilościowej i topograficznej oraz globalnej analizy składu pierwiastkowego.

Szczegółowe cele badawcze

1. Ocena przydatności i zakresu stosowalności metod FTIRM, RS, SR-XRF oraz TXRF w analizie próbek biologicznych pochodzących z modeli doświadczalnych uszkodzenia mózgu.
2. Określenie zmian w dystrybucji biomolekuł w tkance mózgowej szczurów zachodzących w odpowiedzi na uraz oraz KD, z uwzględnieniem różnic międzypłciowych, z wykorzystaniem FTIRM i RS.
3. Analiza zmian w dystrybucji pierwiastków istotnych biologicznie w tkance mózgowej szczurów zachodzących po urazie i w warunkach KD, z uwzględnieniem płci zwierząt, z zastosowaniem metody SR-XRF.
4. Ocena zmian w akumulacji pierwiastków istotnych biologicznie w narządach wewnętrznych szczurów (wątroba, nerki, śledziona) zachodzących na skutek KD w zależności od płci zwierząt, z wykorzystaniem metody TXRF.
5. Identyfikacja modyfikacji molekularnych i pierwiastkowych wprowadzonych przez KD w procesie formowania blizny gwałtownej, wskazanie potencjalnego znaczenia biologicznego obserwowanych zmian i możliwego efektu klinicznego diety.

Zakres rozprawy doktorskiej:

1. Przegląd literatury obejmujący aktualne doniesienia dotyczące mechanizmów powstawania uszkodzeń mózgu, zwierzęcych modeli TBI wykorzystywanych w badaniach naukowych oraz zastosowania KD w leczeniu schorzeń i urazów neurologicznych.
2. Udział w eksperymencie *in vivo* wykonania kontrolowanego uszkodzenia mózgu u szczurów obu płci, żywionych dietą standardową i ketogeniczną, w sposób umożliwiający analizę dynamiki zachodzących zmian w tkance mózgowej oraz różnic płciowych w procesie formowania blizny gwałtownej.
3. Wykonanie pomiarów metodami FTIRM i RS w celu zbadania rozkładu molekuł biologicznych w skrawkach mózgow szcurek, w obszarze pierwotnego uszkodzenia.
4. Analiza wyników uzyskanych metodą TXRF mająca na celu ustalenie wpływu KD na homeostazę pierwiastków w narządach wewnętrznych szczurów (nerki, wątroba, śledziona).
5. Udział w eksperymencie na linii XRF synchrotronu ELETTRA oraz analiza danych z pomiarów SR-XRF mających na celu określenie zmian w rozkładzie pierwiastków w rejonie pierwotnego uszkodzenia mózgu.

3. Materiały i metody

Eksperymenty niezbędne do realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej przeprowadzono w Pracowni Neuropatologii Eksperymentalnej Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego. Hodowla i użytkowanie zwierząt laboratoryjnych (szczury Wistar albino, obie płcie) odbywały się zgodnie z pozwoleniem nr 316/2020 wydanym przez II Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie. Wszystkie procedury eksperymentalne realizowano z zachowaniem zasad dobrostanu zwierząt, zgodnie z obowiązującymi przepisami krajowymi oraz międzynarodowymi standardami etycznymi dotyczącymi badań na zwierzętach. Wszelkie procedury przeprowadzane z udziałem żywych zwierząt i preparatyką próbek były możliwe dzięki wsparciu i przy bezpośrednim udziale prof. dr hab. Zuzanny Setkowicz.

Badane próbki:

Praca A1 obejmowała analizę skrawków mózgu pobranych z rejonu uszkodzenia pierwotnego od ośmiu osobników płci męskiej, u których uraz mózgu wykonano w 60. dniu życia. Skrawki umieszczono na szkiełkach MirrIR (Kevley, USA). Materiał do badań pobrano 30 dni po zabiegu, co umożliwiło ocenę zmian w składzie oraz strukturze molekuł biologicznych charakterystycznych dla w pełni rozwiniętej blizny glejowej. Należy podkreślić, że sąsiednie skrawki tej samej tkanki, umieszczone na folii Ultralene, zostały wcześniej wykorzystane do analizy zmian w akumulacji i dystrybucji pierwiastków związanych z lokalnym uszkodzeniem mózgu (Chwiej, 2011) [38].

W pracy A2 analizowano narządy wewnętrzne (nerki, wątrobę i śledzionę) pobrane od 60-dniowych szczurów obu płci, które przez 33 dni były karmione dietą ketogeniczną lub standardową paszą laboratoryjną. Po mineralizacji próbek narządów przeprowadzono analizę ich składu pierwiastkowego metodą TXRF w celu oceny wpływu diety wysokotłuszczowej na narządową homeostazę pierwiastkową.

W ramach prac A3 i S1 badano skrawki mózgow pobrane w eksperymencie mającym na celu ocenę wpływu diety ketogenicznej na rozwój blizny glejowej. Skrawki o grubości 12 μm nanoszono na szkiełka CaF_2 (Crytran, Wielka Brytania) i analizowano metodami spektroskopii wibracyjnej (FTIRM i RS). Natomiast skrawki o grubości 20 μm , przeznaczone do analizy pierwiastkowej metodą SR-XRF, umieszczano na ultracienkiej folii Ultralene pozbawionej pierwiastków śladowych.

Metody badawcze, aparatura i warunki pomiarowe:

W pracach A1, A3 oraz S1, w celu identyfikacji molekuł biologicznych, których ilość i/lub właściwości strukturalne ulegają zmianie w wyniku rozwoju blizny glejowej oraz zastosowania KD, zastosowano dwie komplementarne techniki spektroskopii wibracyjnej: FTIRM oraz RS. Badania z wykorzystaniem obu metod przeprowadzono w Laboratorium Biospektroskopii Atomowej i Molekularnej na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie.

Pomiary techniką FTIRM realizowano z użyciem mikroskopu Nicolet iN10 MX (Thermo Fisher Scientific). Widma absorpcyjne rejestrowano w zakresie liczby falowej 900-4000 cm^{-1} przy rozdzielczości spektralnej 8 cm^{-1} . Detekcję sygnału prowadzono za pomocą detektora MCT-A chłodzonego ciekłym azotem, uśredniając 32 skany na każde widmo.

Badania Ramanowskie wykonano przy użyciu konfokalnego mikroskopu WITec Alpha 300R, wyposażonego w lasery o długościach fali 488 i 532 nm, przy czym w niniejszej pracy wykorzystywano wyłącznie linię wzbudzenia 532 nm. Pomiary prowadzono z zastosowaniem obiektywu 100 \times o aperturze numerycznej $\text{NA}=0,9$ (Zeiss EC Epiplan-Neofluar), spektrometru UHTS 300 z siatką dyfrakcyjną 600 linii/mm oraz wysokosprawnej, chłodzonej termoelektrycznie kamery CCD. Moc lasera na próbce wynosiła 10 mW, a czas integracji pojedynczego widma 2,5 s.

W pracy A2 do analizy składu pierwiastkowego zastosowano spektroskopię TXRF. Próbkę przeznaczoną do badań przygotowano poprzez mikrofalową mineralizację w kwasie azotowym (V), prowadzącą do całkowitego usunięcia materii organicznej, z wykorzystaniem mineralizatora SpeedWave4. Analizy przygotowanych mineralizatów wykonano w Laboratorium Metod Rentgenowskich Instytutu Fizyki Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, przy użyciu spektrometru Picofox™ S2 (Bruker). Ilościową analizę pierwiastkową przeprowadzono metodą wzorca wewnętrznego z wykorzystaniem roztworu galu. W tym celu do próbek o objętości 1,5 ml dodano 50 µl roztworu tego pierwiastka o stężeniu 1000 mg/L. Następnie na szkiełka kwarcowe nanoszono po 6 µl badanego roztworu w trzech replikatach i suszono na płycie grzejnej. Pomiary wykonano przy napięciu lampy rentgenowskiej 50 kV i natężeniu prądu 0,6 mA, a czas integracji widma wynosił 1000 s.

W pracy S1 do analizy zmian w przestrzennym rozkładzie pierwiastków indukowanych urazem mózgu oraz zastosowaniem KD wykorzystano technikę SR-XRF. Pomiary przeprowadzono na linii pomiarowej XRF synchrotronu Elettra w Trieste. Linia ta, o długości około 23 m, wykorzystuje jako źródło promieniowania rentgenowskiego magnes zakrzywiający (ang. bending magnet). W przeciwieństwie do linii wyposażonych w urządzenia wstawkowe (undulatory lub wiggler), promieniowanie na tej linii generowane jest jako efekt uboczny stabilizacji orbity elektronów.

Znajdująca się obecnie w przebudowie, linia XRF umożliwiła prowadzenie pomiarów w szerokim zakresie energii promieniowania, od 0,7 do 14 keV. W ramach badań skrawki mózgu obejmujące obszar uszkodzenia pierwotnego poddawano dwuwymiarowemu skanowaniu wiązką promieniowania X o energii 10 keV. Rozmiar plamki padającej na próbkę wynosił $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$. Podczas pomiarów próbki umieszczano w komorze pomiarowej pracującej w warunkach próżni ($\approx 10^{-7}$ mbar). Widma fluorescencji rentgenowskiej rejestrowano za pomocą detektora krzemowego Bruker XFlash SDD, przy czasie integracji pojedynczego widma wynoszącym 15 s w ramach grantu badawczego nr 20230125 oraz z wykorzystaniem trzejelementowego detektora krzemowego RaySpec SIRIUS SDD przy czasie integracji pojedynczego widma wynoszącym 5 s w ramach grantu badawczego nr 20240069. Uzyskane dane umożliwiły analizę zmian w dystrybucji fosforu, siarki, potasu, wapnia, żelaza, miedzi oraz cynku w badanych obszarach tkanki mózgowej.

4. Streszczenia artykułów

A1: „The methods of vibrational microspectroscopy reveals long-term biochemical anomalies within the region of mechanical injury within the rat brain”

TBI stanowi istotny problem społeczno-ekonomiczny ze względu na wysoką częstość występowania oraz długofalowe konsekwencje neurologiczne. Jednym z kluczowych następstw TBI jest rozwój blizny glejowej, której molekularne podłoże pozostaje wciąż nie w pełni poznane. Celem badań przedstawionych w publikacji [A1] była identyfikacja anomalii w składzie i strukturze molekularnej tkanki mózgowej powstających w wyniku lokalnego uszkodzenia kory mózgowej i charakterystycznych dla w pełni uformowanej blizny glejowej.

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem dobrze scharakteryzowanego i powtarzalnego modelu TBI, którego istotną zaletą jest ograniczenie cierpienia zwierząt, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej powtarzalności uszkodzenia pod względem lokalizacji i objętości urazu. Do analizy zmian biochemicznych zastosowano komplementarne techniki spektroskopii wibracyjnej: FTIRM oraz RS. Analizie poddano liczne obszary mózgu, w tym korę mózgową półkuli uszkodzonej i nieuszkodzonej oraz formację hipokampa po obu stronach mózgu.

Analiza widm IR umożliwiła identyfikację grup funkcyjnych i klas biomolekuł ulegających największym zmianom w obrębie uszkodzenia pierwotnego i uformowanej blizny glejowej. Zaobserwowano istotny spadek zawartości grup fosforanowych związanych z fosfolipidami i kwasami nukleinowymi, zmniejszenie udziału łańcuchów alifatycznych pochodzących głównie od lipidów oraz obniżenie zawartości cholesterolu i jego estrów. Jednocześnie stwierdzono wzrost całkowitej zawartości białek w obszarze blizny glejowej w porównaniu z nieuszkodzoną korą. Zaobserwowane zmiany strukturalne obejmowały, natomiast, zwiększenie udziału struktur β w drugorzędowej strukturze białek oraz zmniejszenie stopnia rozgałęzienia łańcuchów alifatycznych lipidów.

Analizy półilościowe oraz wielowymiarowa analiza statystyczna otrzymanych widm, w tym analiza głównych składowych (ang. principal components analysis, PCA), wykazały brak istotnych zmian w składzie molekularnym półkuli mózgu nieobjętej urazem. Na podstawie danych literaturowych opracowano protokół obróbki widm IR, który obejmował korekcję linii bazowej, usunięcie zakresu nieanalitycznego, normalizację wektorową oraz, na potrzeby analizy PCA, obliczenie drugiej pochodnej widm absorpcyjnych. Zastosowanie drugiej pochodnej umożliwiło lepsze uwidocznienie i identyfikację pasm nakładających się w widmach absorpcyjnych.

Spektroskopia Ramana potwierdziła obserwowane przy użyciu techniki FTIRM zmiany molekularne oraz umożliwiła wizualizację zmian morfologicznych, w tym lokalnych różnic w grubości kory mózgowej w obszarze rozwiniętej blizny glejowej. Zastosowanie analizy klastrowej pozwoliło na wyraźne rozróżnienie obszarów tkanki o odmiennym składzie molekularnym w obrębie badanego wycinka kory.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że techniki spektroskopii wibracyjnej, takie jak FTIRM oraz spektroskopia i obrazowanie Ramanowskie stanowią skuteczne narzędzia do wykrywania długofalowych zmian biochemicznych zachodzących w mózgu po urazie. Przeprowadzone badania dostarczają istotnych informacji na temat molekularnych mechanizmów towarzyszących procesowi bliznowacenia glejowego oraz wskazują grupy biomolekuł najbardziej podatne na zmiany po TBI. Stanowi to istotny punkt wyjścia do dalszych badań nad nowymi strategiami terapeutycznymi i metodami monitorowania skutków urazowego uszkodzenia mózgu.

A2: „Ketogenic diet influence on the elemental homeostasis of internal organs is gender dependent”

KD, charakteryzująca się niską podażą węglowodanów i wysoką zawartością tłuszczów, od ponad wieku stosowana jest w leczeniu m.in. padaczki, niektórych nowotworów mózgu oraz cukrzycy typu 2. Jednocześnie jej długotrwałe stosowanie wiąże się z ryzykiem wystąpienia licznych skutków ubocznych, takich jak niedobory składników odżywczych, kamica nerkowa czy zaburzenia hormonalne. W związku z tym istnieje potrzeba zrozumienia mechanizmów zmian pierwiastkowych zachodzących w narządach wewnętrznych (wątroba, nerki, śledziona) w odpowiedzi na długotrwałe stosowanie KD.

Celem niniejszych badań było ustalenie wpływu długotrwałego stosowania KD na homeostazę pierwiastkową narządów wewnętrznych oraz określenie, czy efekty te różnią się w zależności od płci zwierząt.

Badania przeprowadzono na szczurach szczepu Wistar, które przez 33 dni otrzymywały KD (grupa eksperymentalna) lub standardową paszę laboratoryjną (grupa kontrolna). W trakcie eksperymentu monitorowano poziom glukozy i ciał ketonowych we krwi; w grupie KD poziom ciał ketonowych utrzymywał się powyżej 1 mmol/l, co potwierdzało utrzymanie stanu ketozy. W 60. dniu życia od zwierząt pobrano narządy do dalszych analiz. Stężenia pierwiastków (P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn i Se) oznaczono przy użyciu techniki TXRF, stosując jako standard wewnętrzny gal, pierwiastek naturalnie nieobecny w organizmach żywych.

Analiza wyników wykazała, że KD wywołuje istotne zmiany w składzie pierwiastkowym narządów, przy czym efekty te były wyraźnie zależne od płci. W wątrobie samców dieta prowadziła do obniżenia stężeń niemal wszystkich analizowanych pierwiastków (z wyjątkiem Fe), natomiast u samic zmiany dotyczyły głównie pierwiastków o wyższych liczbach atomowych, takich jak Cu, Zn i Se. W nerkach samców KD wiązała się ze wzrostem stężeń Fe, Zn i Ca, podczas gdy u samic obserwowano podwyższone poziomy P i Ca. Najmniej zmian odnotowano w śledzionie – u obu płci dieta skutkowała jedynie zwiększeniem zawartości Fe i S.

Wnioski z badań wskazują, że długotrwałe stosowanie restrykcyjnej KD znacząco wpływa na homeostazę pierwiastkową narządów wewnętrznych, a reakcja organizmu jest zależna od płci. Nie wszystkie obserwowane zmiany można wyjaśnić wyłącznie różnicami w składzie pokarmu, co sugeruje istotną rolę procesów metabolicznych i regulacji hormonalnej w kształtowaniu zmian pierwiastkowych. Zaobserwowany wzrost stężenia wapnia i fosforu w nerkach (szczególnie u samic) może być związany z mechanizmem hiperkalciurii sprzyjającym powstawaniu kamieni nerkowych. Z kolei stwierdzona u samców zwiększona akumulacja żelaza w śledzionie może wynikać z działania hepcydyny blokującej uwalnianie tego pierwiastka w odpowiedzi na indukowaną dietą anemię. W odniesieniu do zmian w wątrobie, obniżony poziom potasu można wiązać ze zmniejszoną dostępnością glikogenu, natomiast spadek stężenia wapnia i fosforu u samców może wynikać z obniżonego poziomu insuliny, który zaburza wchłanianie tych pierwiastków regulowane przez witaminę D.

A3: „Vibrational spectroscopy methods reveal biochemical changes associated with the glial scar formation after traumatic brain injury”

TBI stanowi istotny problem zdrowotny i społeczny, prowadząc do wtórnych uszkodzeń mózgu i długotrwałych zmian w strukturze oraz funkcji tkanki nerwowej. Zrozumienie mechanizmów formowania się blizny glejowej po TBI oraz wpływu płci na te procesy jest kluczowe dla identyfikacji potencjalnych celów terapeutycznych i opracowania strategii leczenia. Dlatego celem badań przeprowadzonych w pracy [A3] było monitorowanie dynamiki zmian molekularnych w korze mózgowej szczurów po TBI oraz ocena, czy procesy te przebiegają różnie u samców i samic.

Eksperyment wykonano wykorzystując szczurzy model penetrującego uszkodzenia kory mózgowej, przeprowadzonego w 30. dniu życia zwierząt. Punkty czasowe pobierania próbek ustalono na 2., 8., 16. i 30. dzień po urazie. Analizowano zarówno fragmenty tkanki w obrębie miejsca urazu pierwotnego, jak i morfologicznie nienaruszoną korę w tej samej półkuli. Do oceny zmian molekularnych zastosowano komplementarne techniki spektroskopii wibracyjnej: FTIRM oraz RS.

Uzyskane wyniki wykazały, że w obszarze uszkodzenia występują istotne zmiany w składzie i strukturze molekularnej tkanki w porównaniu z otaczającą korą nie wykazującą zmian morfologicznych. Zaobserwowano znaczące obniżenie poziomu związków zawierających grupy fosforanowe oraz cholesterolu i jego estrów, co wskazuje na uszkodzenie błon komórkowych i zmiany w składzie lipidowym w miejscu urazu. Potwierdzono również zmiany konformacyjne białek, a mianowicie wzrost względnej zawartości białek o strukturze drugorzędowej β , szczególnie na początkowych etapach formowania się blizny, z tendencją do normalizacji po 30 dniach od urazu. Obniżona zawartość nienasyconych lipidów w bliźnie, szczególnie u samic, sugeruje subtelne różnice płciowe w przebiegu procesów naprawczych. RS potwierdziła większą wrażliwość samic na pojawienie się uszkodzenia, zwłaszcza w zakresie parametrów dotyczących estryfikacji i stopnia nienasylenia lipidów.

Wnioski z badań potwierdzają, że techniki FTIRM i RS są skutecznymi narzędziami do śledzenia dynamiki zmian molekularnych zachodzących podczas formowania się blizny glejowej po TBI. Uraz mózgu prowadzi do utrzymujących się zaburzeń w składzie biomolekularnym tkanki, przy czym zmiany w strukturze białek ulegają stopniowej normalizacji. Subtelne różnice między płciami, w tym obniżony stopień nienasylenia lipidów u samic, mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań nad mechanizmami regeneracji mózgu z uwzględnieniem wpływu płci.

S1: „Modulatory role of the ketogenic diet in glial scar formation after traumatic brain injury - FTIR, Raman and X-ray fluorescence microscopy study”

Praca S1 stanowi rozwinięcie badań przedstawionych w pracy A3, rozszerzając analizę molekularną o wpływ KD na rozwój blizny glejowej po TBI w zależności od płci zwierząt. Znaczenie tych badań jest istotne klinicznie, gdyż TBI prowadzi do długotrwałych zmian w tkance mózgowej, a dieta i czynniki biologiczne, takie jak płeć, mogą modulować procesy regeneracyjne i formowanie się blizny.

Celem pracy było określenie, w jaki sposób KD oraz płeć wpływają na dynamikę zmian molekularnych i pierwiastkowych zachodzących w obrębie blizny glejowej. Badania prowadzono wykorzystując ten sam model uszkodzenia mózgu, co w pracy [A3] oraz techniki FTIRM i RS do analizy zmian molekularnych, a SR-XRF do oceny rozkładu pierwiastków w tkance mózgowej.

Analizy spektroskopowe wykazały wpływ diety wysokotłuszczowej na skład biomolekularny regionów kory sąsiadujących z miejscem urazu. Spektroskopia FTIRM ujawniła zmniejszoną

akumulację związków zawierających grupy fosforanowe oraz cholesterolu i jego estrów w rejonie uszkodzenia u samic na KD. RS wykazała, natomiast, istotny wpływ KD na nienaruszoną korę mózgową objawiający się podwyższonym poziomem cytochromu C, estryfikacji lipidów i amidu III u samic oraz stopnia nienasycenia lipidów u zwierząt obojga płci. Zaobserwowane u samic zmiany wykazywały tendencję do normalizacji do 30. dnia po urazie.

Technika SR-XRF umożliwiła śledzenie zmian pierwiastkowych zachodzących w trakcie formowania blizny glejowej. Najbardziej wyraźne zmiany dotyczyły Ca, którego stężenie gwałtownie wzrastało już od drugiego dnia po urazie, a następnie malało pod koniec obserwacji. Stężenia Fe i Cu wykazywały opóźnioną dynamikę – niskie poziomy na wczesnych etapach formowania blizny, z istotnym wzrostem od ósmego dnia po TBI, utrzymującym się do końca eksperymentu.

Analizy wykazały, że wszystkie zastosowane techniki – FTIRM, RS i SR-XRF – były użyteczne w badaniu wpływu KD i rozwoju urazu na kompozycję molekularną i pierwiastkową tkanki mózgowej. Na podstawie analizowanych parametrów, największą czułość w ocenie wpływu KD wykazała RS. Dzięki metodzie RS stwierdzono znacznie większą podatność samic na zastosowaną dietę. Technika SR-XRF pozwoliła zaobserwować dynamikę zmian w rozkładzie pierwiastków w bliźnie, nie wykazała jednak wpływu płci ani diety na te anomalie.

Wnioski z pracy S1 potwierdzają, że wpływ KD na rozwój blizny glejowej jest zależny od płci i obejmuje zarówno zmiany molekularne, jak i pierwiastkowe w tkance mózgowej. Dane te stanowią istotny punkt wyjścia do dalszych badań nad mechanizmami regeneracji mózgu po urazach z uwzględnieniem wpływu diety i czynników biologicznych.

5. Dyskusja

Przystępując do realizacji niniejszej pracy postawiono hipotezę, że wszelkie stany patologiczne w organizmie powinny znaleźć odzwierciedlenie w zaburzeniach składu molekularnego i pierwiastkowego tkanek. Identyfikacja kluczowych anomalii, które można powiązać z zaburzeniem fizjologicznej równowagi, w tym przypadku TBI, pozwala lepiej zrozumieć patogenezę schorzenia i wskazać obszary wymagające szczególnej uwagi w opracowywaniu nowych strategii terapeutycznych.

Analiza próbek biologicznych wiąże się z dwoma głównymi wyzwaniami: ograniczoną ilością materiału do badań oraz dużą złożonością chemiczną matrycy biologicznej, obejmującą różnorodne związki organiczne i pierwiastki. W związku z tym stosowanie metod możliwie specyficznych i precyzyjnych jest kluczowe w badaniach biomedycznych. Do takich metod należą wykorzystane w rozprawie techniki spektroskopii molekularnej i atomowej, które dostarczają informacji o składzie biochemicznym i pierwiastkowym próbek bez konieczności stosowania dodatkowych znaczników czy barwników. Wyjątkiem jest tutaj RS, w której dla bardziej precyzyjnej wizualizacji struktur subkomórkowych stosuje się czasem znaczniki ramanowskie (ang. Raman tags). Są one wykorzystywane głównie w badaniach mających na celu śledzenie wybranych związków w żywych komórkach lub tkankach, pozwalając ominąć ograniczenia typowe dla immunohistochemii, takie jak ograniczona liczba kolorów czy wpływ barwników fluorescencyjnych na aktywność komórkową [70,71]. W przypadku metody TXRF, do ilościowej analizy pierwiastkowej stosuje się standard wewnętrzny – do próbki dodaje się roztwór pierwiastka, który naturalnie nie występuje w analizowanej próbce, co pozwala na dokładne wyznaczenie stężenia pierwiastka badanego [69,72,73]. Pozostałe techniki stosowane w pracy (FTIRM oraz SR-XRF) pozwalają na analizę próbki bez jakiegokolwiek wcześniejszej ingerencji chemicznej, przy wykorzystaniu jedynie właściwości fizycznych badanego materiału.

Poza TXRF, wszystkie zastosowane w pracy metody operują na mapach hiperspektralnych, w których każdy piksel (lub voxel) próbki odpowiada indywidualnemu lub uśrednionemu widmu. Rekonstrukcja obrazów polega na integracji wybranych fragmentów widma po ich wcześniejszym wstępnym przetworzeniu, zachowującym istotną informację fizykochemiczną. W przypadku FTIRM przygotowanie widma obejmuje korekcję atmosferyczną (usuwającą pasma charakterystyczne dla CO₂), korekcję linii bazowej oraz wybór zakresu liczb falowych do integracji, co pozwala uzyskać mapę rozkładu wybranych grup funkcyjnych lub biomolekuł. W RS procedura jest analogiczna, z tym że usuwa się wkład pochodzący od promieniowania kosmicznego zamiast CO₂. W przypadku SR-XRF konieczna jest kalibracja energetyczna uzyskanych widm, umożliwiająca jakościową identyfikację pierwiastków w próbkach, opracowanie modeli dopasowania widm badanych próbek i materiałów referencyjnych oraz sporządzenie krzywej kalibracji czułościowej, pokazującej zależność czułości pomiaru od liczby atomowej pierwiastka. Kroki te są niezbędne do przeprowadzenia wiarygodnej analizy ilościowej. Jak widać wszystkie omawiane techniki wymagają solidnej wiedzy teoretycznej i praktycznej dotyczącej specyfiki danej metody, aparatury pomiarowej i uzyskiwanych danych, aby uzyskać wyniki dokładne, powtarzalne i interpretowalne.

Głównym celem badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy było poznanie zmian biomolekularnych towarzyszących formowaniu się blizny glejowej w wyniku miejscowego uszkodzenia kory mózgowej z naruszeniem integralności bariery krew-mózg. A w dalszej kolejności, zbadanie wpływu KD oraz płci zwierząt na anomalia w tkance wywołane TBI.

Do realizacji tych celów zastosowano uzupełniające się techniki spektroskopii wibracyjnej: FTIRM i RS. Obie metody zastosowano do analizy dokładnie tych samych próbek dzięki spójnym protokołom preparatyki skrawków mózgu, stosowaniu tych samych nośników oraz nieniszczącemu charakterowi pomiaru. Przydatność FTIRM i RS została wykazana w pracach A1, A3 i S1, gdzie zidentyfikowano grupy biomolekuł, których rozmieszczenie w korze mózgowej ulegało istotnym zmianom w odpowiedzi na TBI.

Kluczową rolę w identyfikacji istotnych z punktu widzenia TBI biomolekuł odegrało mapowanie chemiczne wybranych pasm IR. Umożliwiło ono zarówno wizualną, jak i ilościową ocenę zmian w ich rozmieszczeniu w korze mózgowej zachodzących podczas rozwoju blizny gлевой. Badania techniką FTIRM przeprowadzone w pracy A1 wykazały, że TBI prowadzi do istotnych zmian w akumulacji i dystrybucji: grup fosforanowych charakterystycznych dla fosfolipidów i kwasów nukleinowych (pasma $\sim 1080\text{ cm}^{-1}$ i $\sim 1240\text{ cm}^{-1}$), cholesterolu i jego estrów (pasma $\sim 1360\text{ cm}^{-1}$ i $\sim 1480\text{ cm}^{-1}$), związków zawierających grupy karbonylowe (pasmo $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$), białek (pasmo $\sim 1658\text{ cm}^{-1}$) oraz lipidów (pasmo $\sim 2924\text{ cm}^{-1}$). Ponadto, odnotowano modyfikacje w strukturze drugorzędowej białek (stosunek absorbancji $1635/1658\text{ cm}^{-1}$) oraz zmiany w stopniu rozgałęzienia i nienasyceń łańcuchów kwasów tłuszczowych (odpowiednio stosunek intensywności pasm $2924/2955\text{ cm}^{-1}$ i pasmo $\sim 3012\text{ cm}^{-1}$).

W obszarze uszkodzenia stwierdzono wzrost poziomu protein oraz względnego udziału białek o strukturze drugorzędowej β . Taki wynik odzwierciedla procesy fizjologiczne zachodzące w trakcie rozwoju blizny gлевой, w których wydzielane są białka macierzy zewnątrzkomórkowej, stanowiące szkielet dla odbudowywanej tkanki, a także białka produkowane przez astrocyty w odpowiedzi na uraz [74]. Należy do nich metaloproteinaza MMP-9, która wykazuje zwiększoną ekspresję po TBI i zawiera w swojej strukturze jony Zn^{2+} [75]. Wzrost gęstości powierzchniowej cynku w bezpośrednim otoczeniu blizny został potwierdzony w badaniach techniką SR-XRF (praca S1).

Zwiększenie stosunku intensywności pasm $1635/1658\text{ cm}^{-1}$ koreluje z obecnością proteoglikanu siarczanu chondroityny (CSPG), którego część białkowa zbudowana jest głównie ze struktur β [76]. CSPG, a w szczególności proteoglikan NG2, występujący w centralnym układzie nerwowym, odgrywa istotną rolę w opóźnianiu odrostu wypustek nerwowych, co wpływa na regenerację tkanki mózgu i stanowi potencjalny cel terapeutyczny w kontekście TBI [77].

FTIRM jest techniką absorpcyjną, w której promieniowanie podczerwone wzbudza drgania dipolowe w cząsteczkach. W biologii jest to metoda pierwszego wyboru do analizy globalnego składu biochemicznego tkanek i komórek, pozwalająca na identyfikację markerów chorobowych poprzez analizę zmian w pasmach białek, lipidów i kwasów nukleinowych. Jej zasada działania opiera się na absorpcji fotonów o energiach odpowiadających różnicom energii między poziomami wibracyjnymi cząsteczki. Aby drganie było aktywne w podczerwieni, musi wiązać się ze zmianą momentu dipolowego [48].

Jednym z najbardziej krytycznych problemów w badaniach pojedynczych komórek i tkanek wykorzystujących FTIRM jest zjawisko rezonansowego rozpraszania Mie (ang. resonant Mie scattering, RMieS). Wynika on z faktu, że długość fali stosowanego promieniowania z zakresu średniej podczerwieni ($2,5\text{-}25\ \mu\text{m}$) jest porównywalna z rozmiarami typowych struktur komórkowych (jądra, mitochondria, całe komórki: $10\text{-}30\ \mu\text{m}$) [78,79]. Zgodnie z teorią Mie, gdy fala elektromagnetyczna napotyka sferyczną niejednorodność o rozmiarze zbliżonym do długości fali, dochodzi do silnego rozpraszania. W spektroskopii absorpcyjnej jest to szczególnie skomplikowane przez tzw. anomalną dyspersję. Współczynnik załamania światła próbki biologicznej (n) nie jest stały, lecz zmienia się gwałtownie w pobliżu pasma absorpcji zgodnie z relacjami Kramersa-Kroniga. W obszarze silnej absorpcji (np. pasmo Amid I), część rzeczywista współczynnika załamania ulega silnej fluktuacji, co powoduje, że efektywność rozpraszania zmienia się drastycznie w obrębie samego pasma absorpcji [79,80]. Aby ograniczyć wpływ zjawiska RMieS na rejestrowane widma IR, z analizy wykluczono obszary zlokalizowane na skraju skrawków mózgu, gdzie efekty rozpraszania są szczególnie nasilone ze względu na niejednorodności grubości próbki oraz silne gradienty współczynnika załamania światła. Analizie poddawano wyłącznie regiony centralne, charakteryzujące się równomierną grubością skrawków i stabilnym kontaktem z podłożem. W powiększeniu mikroskopowym

badana tkanka wykazywała wysoki stopień jednorodności strukturalnej, co w praktyce sprzyjało ograniczeniu efektów rozpraszania i pozwalało na rejestrację widm o stabilnej linii bazowej. Takie podejście, oparte na selekcji jednorodnych obszarów próbek, umożliwiło zminimalizowanie negatywnego wpływu RMieS na kształt pasm absorpcyjnych, choć nie eliminuje całkowicie tego zjawiska.

Praca w modzie transmisyjno-odbiciowym, gdzie promieniowanie przechodzi przez próbkę, odbija się od podłoża i wraca do detektora, prowadzi do powstania fali stojącej pola elektrycznego (ang. electric field standing wave - EFSW) [48,81]. Przy powierzchni idealnego przewodnika (podłoża), wektor pola elektrycznego fali świetlnej musi się zerować (węzeł fali). W odległości $\lambda/4$ od powierzchni powstaje maksimum fali. Próbki biologiczne (skrawki tkanek, komórki) mają zazwyczaj grubość rzędu kilku-kilkunastu mm, więc różne warstwy próbki są eksponowane na drastycznie różne natężenie pola elektrycznego [82]. W konsekwencji zjawiska EFSW, prawo Beera-Lamberta przestaje obowiązywać i absorpcja przestaje być liniową funkcją grubości próbki. Badania na modelach białkowych wykazały, że zmiany grubości próbki mogą generować widmowe różnice łudząco podobne do zmian chemicznych. Jest to szczególnie niebezpieczne w diagnostyce nowotworów, gdzie komórki rakowe często różnią się morfologią (w tym grubością/objętością cytoplazmy) od komórek zdrowych. Obserwowane różnice w widmach transfleksyjnych mogą zatem wynikać z czystej fizyki interferencji (grubość próbki), a nie z rzeczywistych zmian metabolizmu [82]. Zastosowanie szkiełek z CaF_2 , które są transparentne w zakresie promieniowania podczerwonego, jako nośników próbek oraz prowadzenie pomiarów w trybie transmisji pozwoliło na wyeliminowanie wpływu zjawiska EFSW na uzyskiwane wyniki. Należy jednak zaznaczyć, że pomiary prowadzone w trybie transmisji, w połączeniu z wykorzystaniem szkiełek CaF_2 , wiążą się z pewnym ograniczeniem metody FTIRM, jakim jest obniżona czułość na drgania wybranych wiązań cząsteczek biochemicznych [83].

W FTIRM rozdzielczość przestrzenna jest ograniczona fundamentalnym limitem dyfrakcyjnym Abbego. Rozdzielczość ta jest proporcjonalna do długości fali λ i odwrotnie proporcjonalna do apertury numerycznej (NA) obiektywu. Dla zastosowanego mikroskopu Nicolet iN10MX (Thermo Fischer Scientific) wyposażonego w obiektyw typu Schwarzschilda teoretyczna rozdzielczość przestrzenna jest możliwa do wyliczenia wg poniższego wzoru:

$$d = \frac{2\lambda}{3}$$

W praktyce oznacza to, że FTIRM pozwala na badanie pojedynczych komórek ssaczych (ok. 20 μm), ale nie jest w stanie obrazować organelli komórkowych, co jest możliwe w mikroskopii optycznej czy ramanowskiej [80]. Badania prowadzone na potrzeby niniejszej rozprawy z wykorzystaniem FTIRM nie wymagały obrazowania pojedynczych komórek ani struktur subkomórkowych. W tym przypadku uzyskana efektywna rozdzielczość przestrzenna na poziomie 25 $\mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$ była wystarczająca do dokładnego zobrazowania rejonu uszkodzenia [A3,S1] oraz do zebrania reprezentatywnej kolekcji widm z wybranych warstw komórkowych formacji hipokampa [A1].

Spektroskopia Ramana, choć również jest techniką wibracyjną, opiera się na zupełnie innym mechanizmie fizycznym niż FTIRM. Zjawisko Ramana polega na nieelastycznym rozpraszaniu fotonów, modulowanym zmianą polaryzowalności chmury elektronowej cząsteczki [84]. Rozpraszanie Ramana jest procesem dwufotonowym. Padający foton wzbudza cząsteczkę do wirtualnego stanu energetycznego (krótkotrwałego stanu pośredniego), po czym następuje natychmiastowa emisja fotonu rozproszonego. Różnica energii między fotonem padającym a rozproszonym odpowiada kwantowi energii drgań molekularnych (przesunięcie Stokesa) [85]. Fundamentalnym wyzwaniem jest skrajnie małe prawdopodobieństwo tego procesu. Typowy przekrój czynny na rozpraszanie Ramana wynosi około $10^{-30} \text{ cm}^2/\text{cząsteczkę}$. Dla porównania, przekrój czynny na fluorescencję wynosi około $10^{-16} \text{ cm}^2/\text{cząsteczkę}$, a na absorpcję IR około

10^{-18} - 10^{-20} $\text{cm}^2/\text{cząsteczkę}$. Oznacza to, że sygnał Ramanowski jest miliardy razy słabszy od fluorescencji, co definiuje główne problemy techniczne metody [86]. W analizie próbek biologicznych, największym ograniczeniem spektroskopii Ramana jest autofluorescencja. Tkanki i komórki zawierają liczne endogenne fluorofory, takie jak flawiny (FAD), NADH, porfiryny, kolagen, elastyna czy melanina. Fluorescencja jest procesem rezonansowym (rzeczywiste przejścia elektronowe) o znacznie większym przekroju czynnym w porównaniu do efektu Ramana, nawet śladowe ilości fluoroforów mogą wygenerować szerokopasmowe tło, które całkowicie przesłania słabe, ostre pasma ramanowskie [87]. Jedną ze strategii mitygacji jest fotowysbielanie (ang. photobleaching), czyli wstępne naświetlanie próbki laserem przed właściwym pomiarem w celu degradacji fluoroforów. W trakcie prowadzonych pomiarów nie zaobserwowano istotnych efektów widmowych związanych z autofluorescencją endogennych fluoroforów. Ograniczenie tego zjawiska można przypisać zastosowanej perfuzji solą fizjologiczną, która umożliwia usunięcie znacznej części hemoglobiny z organizmu oraz redukcję obecności innych śródtkankowych fluoroforów, takich jak porfiryny i flawiny.

Woda, będąca silnym dipolem intensywnie absorbującym promieniowanie w zakresie podczerwieni, charakteryzuje się jednocześnie niską polaryzowalnością, co sprawia, że jest praktycznie „przezroczysta” dla RS. Ponieważ RS wykorzystuje promieniowanie z zakresu światła widzialnego lub bliskiej podczerwieni, obowiązujący limit dyfrakcyjny jest również znacznie korzystniejszy niż w przypadku FTIRM.

Teoretyczna rozdzielczość boczna dla obrazowania Ramanowskiego wynosi:

$$d \approx \frac{\lambda}{2NA}$$

Dla lasera 532 nm i obiektywu o wysokiej aperturze ($NA=0,9$), rozdzielczość osiąga ok. 300 nm. Pozwala to na obrazowanie subkomórkowe, np. rozróżnianie mitochondriów, kropli lipidowych czy kondensacji chromatyny w jądrze, co jest niemożliwe w klasycznej FTIRM [86,88].

Istotną wartością dodaną badań przeprowadzonych na potrzeby niniejszej rozprawy była możliwość śledzenia przemian zachodzących w rejonie uszkodzonej kory mózgowej. Większość dostępnych w literaturze badań koncentruje się na początkowej lub końcowej fazie TBI, pomijając zmiany zachodzące w okresach przejściowych. W niniejszej pracy materiał biologiczny pobierano w 2., 8., 16. oraz 30. dniu po TBI, co umożliwiło analizę zmian charakterystycznych dla wszystkich trzech faz rozwoju urazu: ostrej (acute), podostrej (sub-acute) oraz przewlekłej (chronic) [89]. Zainicjowanie KD na trzy dni przed wykonaniem uszkodzenia miało wprowadzić badane zwierzęta w stan ketozy, czyli utrzymującego się stężenia ketonów we krwi na poziomie co najmniej 1 mmol/l, już w momencie indukcji uszkodzenia pierwotnego [A2].

KD znana z zastosowania klinicznego w leczeniu padaczki lekoopornej nie ma określonego mechanizmu działania, za to wiadomo o jej plejotropowym działaniu na cały organizm. W pracy [A2] przedstawiono wyniki badań dotyczących zmian homeostazy pierwiastkowej wątroby, śledziony i nerek po KD, uzyskane metodą TXRF. Najmniej podatnym narządem na działanie KD okazała się śledziona, w której stwierdzono jedynie zmianę stężenia siarki u samic oraz żelaza u samców. Wpływ KD na homeostazę pierwiastkową wątroby i nerek można było częściowo tłumaczyć mniejszą podażą fosforu, siarki, wapnia, żelaza, miedzi i selenu w diecie wysokotłuszczowej. KD w wątrobie wpływała w największym stopniu na stężenie pierwiastków o wyższych liczbach atomowych, tj. miedzi, cynku i selenu, a obserwowane zmiany były bardziej wyraźne u samców. W przypadku nerek zaobserwowano wyraźny wzrost poziomu wapnia i fosforu u samic, co może sugerować, że długotrwałe stosowanie restrykcyjnej, wysokotłuszczowej KD u szczurów zwiększa ryzyko zaburzeń mineralnych sprzyjających tworzeniu się kamieni nerkowych i przewlekłemu zapaleniu nerek.

Podsumowując, w pracy [A2] wykazana została użyteczność metody TXRF w analizie pierwiastkowej próbek biologicznych. Potwierdzono w niej wpływ restrykcyjnej KD na homeostazę pierwiastkową narządów wewnętrznych oraz konieczność prowadzenia badań *in vivo* na zwierzętach obu płci, co widać w przypadku różnych poziomów zaburzeń w wątrobie i nerkach u samców i samic.

TXRF jest wariantem spektroskopii XRF, zoptymalizowanym pod kątem śladowej analizy pierwiastkowej próbek ciekłych i cienkowarstwowych. Wykorzystuje ona zjawisko całkowitego odbicia promieniowania rentgenowskiego, co pozwala na drastyczną redukcję tła rozproszeniowego. Współczynnik załamania dla promieniowania rentgenowskiego w materii jest nieco mniejszy od jedności ($n = 1 - \delta - i\beta$). Oznacza to, że przy przejściu z próżni/powietrza do materii, promieniowanie może ulec całkowitemu odbiciu zewnętrznemu, jeśli kąt padania jest mniejszy od kąta krytycznego (φ_{crit}). Dla typowych energii promieniowania wzbudzającego i podłoża kwarcowego, kąt ten jest bardzo mały, rzędu 0.1° (ok. 1.8 mrad) [90]. W konfiguracji TXRF, wiązka pada na idealnie płaski reflektor pod kątem mniejszym od φ_{crit} i odbija się w niemal 100%, praktycznie nie wnikając w podłoże. Dzięki temu matryca podłoża nie jest wzbudzana, co minimalizuje w widmie tło, które w klasycznej XRF jest głównym źródłem szumu. Nad powierzchnią reflektora, w wyniku interferencji wiązki padającej i odbitej, powstaje fala stojąca promieniowania rentgenowskiego (ang. X-ray standing wave, XSW). Pole to charakteryzuje się periodycznym układem węzłów (minima natężenia) i strzałek (maksima) równoległych do powierzchni. Okres tej fali (XSW) D wynosi:

$$D = \frac{\lambda}{2 \varphi_0}$$

Dla typowych warunków TXRF, okres ten mieści się w zakresie 10-100 nm [91]. Intensywność XSW jest zależna od wysokości analizatu nad powierzchnią reflektora, kąta padania pierwotnej wiązki (I_0) i może się wahać od zera do czterokrotności intensywności I_0 . W TXRF problem mogą stanowić ziarnistości, o średnicy mniejszej niż D , zdeponowane na powierzchni reflektora, gdyż mogą powodować fluktuacje intensywności fluorescencji. W próbkach homogennych, w których występuje wiele minimów i maksimów związanych z grubością próbki efekt wystąpienia ziarnistości uśrednia się i nie ma ostatecznie wpływu na końcowy wynik. [92] Wykorzystanie zjawiska XSW i naświetlanie próbki pod kątem poniżej φ_{crit} powoduje średnio dwukrotny wzrost intensywności fluorescencji w porównaniu do klasycznej geometrii XRF [72], co pozwala na osiągnięcie limitów detekcji rzędu pg lub pomiar stężeń mniejszych niż ng/g [72]. TXRF nie jest całkowicie wolna od efektów matrycowych, jest to właściwość, która funkcjonuje jedynie dla idealnie cienkich warstw lub mikro-osadów, gdzie absorpcja promieniowania w samej próbce jest pomijalna. Próbki biologiczne (np. krew, osocze, lizaty komórkowe) zawierają dużą ilość matrycy organicznej (białka, cukry, sole). Po wysuszeniu kropli na reflektorze, powstaje osad o skończonej grubości. Jeśli masa osadu przekroczy pewien próg (rzędu mg), pojawiają się klasyczne efekty matrycowe (samoabsorpcja) [93]. Dlatego kluczowym elementem metodyki badań z wykorzystaniem TXRF jest dobór odpowiedniej preparatyki próbek, uwzględniającej rodzaj i pochodzenie analizowanego materiału. Jak wskazuje R. Fernández-Ruiz [94], najskuteczniejszą metodą ograniczania wpływu materii organicznej i związanych z nią efektów matrycowych jest mineralizacja mikrofalowa pod ciśnieniem z użyciem kwasu. Dzięki takiemu podejściu możliwe było zminimalizowanie efektów matrycowych w badaniach prowadzonych w niniejszej pracy, co miało szczególne znaczenie w analizie lekkich pierwiastków, takich jak fosfor, siarka, potas i wapń.

Ocena wpływu płci i KD na proces formowania blizny glejowej nie byłaby możliwa bez przeprowadzenia analizy próbek pobranych w czterech punktach czasowych po urazie. W pracach [A3] i [S1] do badania dynamiki zmian zachodzących w gromadzeniu biomolekuł w mózgu po uszkodzeniu wykorzystano FTIRM oraz RS. Wyniki uzyskane za pomocą FTIRM sugerują, że samice mogą lepiej tolerować pojawienie się i skutki TBI. Wskazywał na to

większy rozrzut wartości analizowanych parametrów biochemicznych, szczególnie związanych z zawartością związków zawierających grupy fosforanowe (pasma $\sim 1080\text{ cm}^{-1}$ i $\sim 1240\text{ cm}^{-1}$) oraz cholesterolu i jego estrów ($\sim 1360\text{ cm}^{-1}$ i $\sim 1480\text{ cm}^{-1}$), a także akumulacja białek w miejscu pierwotnego urazu ($\sim 1658\text{ cm}^{-1}$) [A3]. Zjawisko to można tłumaczyć większą neuroplastycznością mózgu u samic [95], która może wynikać z wyższego poziomu estrogenów aktywujących szlaki związane z neurotroficznym czynnikiem pochodzenia mózgowego (ang. brain-derived neurotrophic factor, BDNF), odgrywającym ważną rolę w regeneracji neuronów [96–98].

Zależny od płci wpływ KD na zmiany zachodzące w mózgu po urazie szczególnie dobrze uwidoczniły wyniki uzyskane przy użyciu spektroskopii Ramana. U samic traktowanych KD stwierdzono podwyższony poziom cytochromu C/DNA, wzrost intensywności pasma amidu III oraz zwiększoną estryfikację i stopień nienasycenia lipidów w nieuszkodzonej korze mózgowej. U samców karmionych paszą wysokotłuszczową zaobserwowano w tym obszarze przede wszystkim wzrost stopnia nienasycenia lipidów. Zmiana ta wydaje się zgodna z obserwacjami prowadzonymi u dzieci leczonych KD z powodu padaczki lekoopornej, u których w surowicy stwierdzano podwyższone stężenie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (ang. polyunsaturated fatty acids, PUFAs) [99]. Dodatkowo, u myszy poddanych TBI suplementacja PUFAs pozwalała ograniczyć deficyty motoryczne i emocjonalne związane z urazem [100]. W literaturze opisuje się również rolę PUFAs w regulacji procesów zapalnych i regeneracji tkanek [101].

Wyniki badań przeprowadzonych techniką FTIRM ujawniły natomiast u samic wpływ KD na zawartość związków zawierających grupy fosforanowe oraz cholesterolu i jego estrów w rejonie uszkodzenia w 8. i 16. dniu po urazie. Może to sugerować, że samice są bardziej podatne na działanie KD skutkujące molekularnym przemodelowaniem uszkodzonej tkanki kory [S1].

Technika SR-XRF umożliwiła szczegółowe zbadanie przebiegu procesów zachodzących w trakcie formowania się blizny glejowej [S1]. Z jej wykorzystaniem zwiualizowano rozkład fosforu, siarki, potasu, wapnia, żelaza, miedzi oraz cynku w obszarze pierwotnego uszkodzenia mózgu w różnych punktach czasowych, z uwzględnieniem płci zwierząt oraz zastosowanej diety. W rejonie uszkodzenia stwierdzono obniżenie masy powierzchniowej fosforu, co można wiązać z degradacją błon biologicznych i DNA w momencie urazu oraz ich stopniowym zastępowaniem przez składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, zdominowanej przez białka.

Proces przebudowy tkanki i wzrost poziomu białek w bliźnie glejowej i jej okolicy można też powiązać z zaobserwowanym wyraźnym wzrostem poziomu cynku. Pierwiastek ten wchodzi w skład metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej MMP-9 [75] oraz dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1) [102], enzymu odpowiedzialnego za neutralizację reaktywnych form tlenu, a tym samym za ograniczanie stanu zapalnego. Liczne doniesienia literaturowe wskazują, że cynk odgrywa istotną rolę w procesach regeneracyjnych po TBI. U pacjentów po ciężkim urazie mózgu suplementacja siarczanem cynku wiązała się z poprawą wyników w skali Glasgow po miesiącu terapii, natomiast w modelach zwierzęcych obserwowano korzystny wpływ na zachowania lękowe, uczenie przestrzenne oraz pamięć [103].

Kluczowych informacji na temat dynamiki procesów towarzyszących formowaniu się blizny glejowej dostarczyły mapy dystrybucji wapnia, żelaza i miedzi. Spośród tych pierwiastków szczególnie wyraźne zmiany czasowe zaobserwowano dla wapnia, którego masa powierzchniowa w obszarze uszkodzenia osiągała maksimum w 2. dniu po urazie, a następnie systematycznie malała. Przejściowy wzrost poziomu wapnia można wiązać z jego gwałtownym uwolnieniem z retikulum endoplazmatycznego oraz mitochondriów w wyniku uszkodzeń mechanicznych. Zjawisko to inicjuje kaskadę wtórnych mechanizmów uszkodzeń i może prowadzić do długotrwałych zaburzeń homeostazy wapniowej w neuronach [104].

Zmiany poziomu żelaza wykazywały przebieg odwrotny do obserwowanego dla wapnia. Masa powierzchniowa żelaza w rejonie uszkodzenia rosła stopniowo wraz z postępem procesów

naprawczych i rozwojem blizny gлевой. Podwyższonego poziomu żelaza nie można tłumaczyć wyłącznie przerwaniem bariery krew-mózg i napływem krwi. Jak się okazuje w przypadku TBI, w których doszło do przerwania bariery-krew mózg obserwuje się zwiększoną obecność czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), głównego czynnika promującego powstawanie nowych naczyń krwionośnych [105–107]. Podwyższony poziom żelaza w 8. i 16. dniu po TBI można, dodatkowo, tłumaczyć zwiększoną depozycją żelaza w oligodendrocytach i komórkach mikrogleju, która osiąga najwyższy poziom między 7. i 14. dniem [108].

Pomiędzy 2. a 8. dniem po urazie odnotowano istotny wzrost masy powierzchniowej miedzi w obszarze uszkodzenia. W kolejnych punktach czasowych poziom tego pierwiastka nie wykazywał istotnych zmian, a jego najwyższe zawartości obserwowano w bezpośrednim sąsiedztwie uszkodzenia pierwotnego. Zwiększona akumulacja miedzi w tym obszarze może być związana z napływem ceruloplazminy w następstwie przerwania bariery krew-mózg. Ceruloplazmina pełni funkcję głównego białka transportującego miedź w osoczu i jest zdolna do wiązania od sześciu do ośmiu atomów miedzi na jedną cząsteczkę, ale w warunkach fizjologicznych przenika barierę krew-mózg w ograniczonym stopniu [109].

6. Podsumowanie

Niniejsza rozprawa doktorska stanowi studium procesów przebudowy strukturalnej i kompozycyjnej tkanki nerwowej, indukowanych TBI w modelu KD. Zasadniczym celem pracy była wieloparametrowa charakterystyka fizykochemiczna obszaru blizny glejowej oraz systemowa ocena wpływu KD na homeostazę pierwiastkową. Do realizacji tego celu wykorzystano komplementarne podejście oparte na zaawansowanych metodach spektroskopowych wykorzystujących oddziaływanie promieniowania elektromagnetycznego z materią biologiczną. Zastosowanie spektroskopii oscylacyjnej (FTIRM i RS) pozwoliło na identyfikację zmian w zakresie akumulacji i struktury biomolekuł w mózgu po TBI. Natomiast techniki oparte na fluorescencji rentgenowskiej (SR-XRF i TXRF) umożliwiły określenie anomalii w rozmieszczeniu wybranych pierwiastków w rejonie uszkodzenia oraz ocenę wpływu KD na homeostazę pierwiastkową narządów wewnętrznych (wątroba, nerki, śledziona). Tak skonstruowany model badawczy pozwolił na powiązanie subtelnych zmian w sygnaturach widmowych z biologicznymi zmiennymi, takimi jak płeć czy stan metaboliczny organizmu.

1. Przegląd literatury pozwolił zidentyfikować kluczowe molekuly, których zmiany mogą odgrywać istotną rolę w procesie bliznowacenia glejowego oraz wskazać obszary mózgu najbardziej podatne na lokalne TBI. Na tej podstawie ustalono parametry pomiarów oraz metodologię przetwarzania widm, co umożliwiło ich dalszą analizę. Analiza map hiperspektralnych pozwoliła wyodrębnić grupy funkcyjne i związane z nimi molekuly, które wykazywały największe zmiany w miejscu urazu. Jednocześnie nie potwierdzono wpływu lokalnego TBI na skład molekularny nieuszkodzonej półkuli mózgu oraz regionu hipokampa [A1].

2. Badania wpływu KD na homeostazę pierwiastkową wątroby, nerek i śledziony potwierdziły, że dieta ta wpływa na gospodarkę pierwiastkową organizmu. Najbardziej wrażliwym narządem okazały się nerki, gdzie zaobserwowano najwięcej zmian. Stwierdzono również wpływ płci na obserwowane anomalie. U samców najwięcej istotnych zmian pierwiastkowych zanotowano w wątrobie, natomiast u samic największą wrażliwość na restrykcyjną KD wykazały nerki. Wyniki uzyskane metodą TXRF wskazują, że jest to technika pozwalająca na szybką i precyzyjną ocenę zaburzeń homeostazy pierwiastkowej zachodzących w wyniku stosowania restrykcyjnej KD [A2].

3. FTIRM pozwoliła na wykrycie subtelnych różnic płciowych w procesie rozwoju blizny glejowej. Zidentyfikowano grupy funkcyjne oraz molekuly, które najlepiej odzwierciedlają różnice w molekularnej kompozycji blizny. Wyniki przeprowadzonych badań, wspierane danymi z literatury, sugerują, że samice mogą lepiej tolerować lokalne uszkodzenie mózgu [A3].

4. RS umożliwiła wykazanie wpływu KD na kompozycję molekularną kory mózgowej w warunkach lokalnego uszkodzenia. U zwierząt obu płci zaobserwowano wzrost stopnia nienasyceń łańcuchów alifatycznych, co może mieć charakter korzystny. Analiza pozostałych parametrów biochemicznych wskazała na większą podatność samic na działanie KD [S1].

5. SR-XRF umożliwiła monitorowanie postępu zmian pierwiastkowych zachodzących na skutek lokalnego uszkodzenia kory mózgowej. Analiza rozkładów oraz dynamiki zmian akumulacji wapnia, żelaza i miedzi pozwoliła uwidocznić i lepiej zrozumieć procesy zachodzące na kolejnych etapach formowania się blizny glejowej [S1].

6. Zidentyfikowano oraz zminimalizowano wpływ fizycznych ograniczeń charakterystycznych dla spektroskopii oscylacyjnej, które mogłyby prowadzić do niejednoznacznej interpretacji widm. W pomiarach FTIRM wyeliminowano efekt EFSW oraz ograniczono wpływ RMieS poprzez zastosowanie transparentnych dla IR podłoży z fluorku wapnia i prowadzenie pomiarów w trybie transmisyjnym. Ze względu na ograniczenia

rozdzielczości przestrzennej narzucone przez limit dyfrakcyjny FTIRM, analizę uzupełniono o spektroskopię Ramana. W obu technikach zrezygnowano ze stosowania zewnętrznych znaczników, opierając analizę na naturalnym kontraście biochemicznym tkanek.

7. W technikach wykorzystujących promieniowanie rentgenowskie kluczowe znaczenie miało dostosowanie procedur preparatyki próbek w celu ograniczenia artefaktów pomiarowych. W analizach TXRF wpływ matrycy organicznej zredukowano poprzez zastosowanie mineralizacji mikrofalowej w środowisku kwasowym, co umożliwiło precyzyjne oznaczanie stężeń lekkich pierwiastków. Natomiast w badaniach SR-XRF ryzyko uszkodzeń radiacyjnych próbek, wynikających z wysokiej jasności wiązki synchrotronowej, ograniczono dzięki odpowiedniemu suszeniu skrawków oraz eliminacji efektów radiolizy wody. Dodatkowo zastosowanie właściwej geometrii detekcji pozwoliło na skuteczną redukcję tła rozproszeniowego.

Literatura

- [1] R. Crupi, M. Cordaro, S. Cuzzocrea, D. Impellizzeri, Management of Traumatic Brain Injury: From Present to Future, *Antioxidants* 2020, Vol. 9, Page 297 9 (2020) 297. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9040297>.
- [2] D. Lerouet, C. Marchand-Leroux, V.C. Besson, Neuropharmacology in traumatic brain injury: from preclinical to clinical neuroprotection?, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 35 (2021) 524–538. <https://doi.org/10.1111/FCP.12656>.
- [3] A.I.R. Maas, et al., Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research, *Lancet Neurol.* 16 (2017) 987–1048. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30371-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30371-X).
- [4] K.J. Dixon, Pathophysiology of Traumatic Brain Injury, *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 28 (2017) 215–225. <https://doi.org/10.1016/J.PMR.2016.12.001>.
- [5] M. Prins, T. Greco, D. Alexander, C.C. Giza, The pathophysiology of traumatic brain injury at a glance, *Dis. Model. Mech.* 6 (2013) 1307–1315. <https://doi.org/10.1242/DMM.011585>.
- [6] S.Y. Ng, A.Y.W. Lee, Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets, *Front. Cell. Neurosci.* 13 (2019) 484040. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2019.00528>.
- [7] M. Ułamek-Kozioł, S.J. Czuczwar, R. Pluta, S. Januszewski, Ketogenic Diet and Epilepsy, *Nutrients* 2019, Vol. 11, Page 2510 11 (2019) 2510. <https://doi.org/10.3390/NU11102510>.
- [8] P. Kwan, M.J. Brodie, Early Identification of Refractory Epilepsy, *New England Journal of Medicine* 342 (2000) 314–319. <https://doi.org/10.1056/NEJM200002033420503>.
- [9] C. Panayiotopoulos, Old versus new antiepileptic drugs: the SANAD study, *The Lancet* 370 (2007) 313–314. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)61150-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(07)61150-7).
- [10] D. García-Rodríguez, A. Giménez-Cassina, Ketone Bodies in the Brain Beyond Fuel Metabolism: From Excitability to Gene Expression and Cell Signaling, *Front. Mol. Neurosci.* 14 (2021) 732120. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2021.732120>.
- [11] W. Ma, J. Berg, G. Yellen, Ketogenic Diet Metabolites Reduce Firing in Central Neurons by Opening KATP Channels, *Journal of Neuroscience* 27 (2007) 3618–3625. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0132-07.2007>.
- [12] R.W. Manville, M. Papanikolaou, G.W. Abbott, M-channel activation contributes to the anticonvulsant action of the ketone body b-hydroxybutyrate, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 372 (2020) 148–156. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.263350>.
- [13] H.S. Wang, Z. Pan, W. Shi, B.S. Brown, R.S. Wymore, I.S. Cohen, J.E. Dixon, D. McKinnon, KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: Molecular correlates of the M-channel, *Science* (1979). 282 (1998) 1890–1893. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.282.5395.1890>.
- [14] N. Juge, J.A. Gray, H. Omote, T. Miyaji, T. Inoue, C. Hara, H. Uneyama, R.H. Edwards, R.A. Nicoll, Y. Moriyama, Metabolic Control of Vesicular Glutamate Transport and Release, *Neuron* 68 (2010) 99–112. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2010.09.002>.
- [15] S. Naito, T. Ueda, Characterization of Glutamate Uptake into Synaptic Vesicles, *J. Neurochem.* 44 (1985) 99–109. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.1985.TB07118.X>.
- [16] M. Dahlin, Å. Elfving, U. Ungerstedt, P. Åmark, The ketogenic diet influences the levels of excitatory and inhibitory amino acids in the CSF in children with refractory epilepsy, *Epilepsy Res.* 64 (2005) 115–125. <https://doi.org/10.1016/J.EPLEPSYRES.2005.03.008>.
- [17] M. Erecińska, D. Nelson, Y. Daikhin, M. Yudkoff, Regulation of GABA Level in Rat Brain Synaptosomes: Fluxes Through Enzymes of the GABA Shunt and Effects of Glutamate, Calcium, and Ketone Bodies, *J. Neurochem.* 67 (1996) 2325–2334. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1996.67062325.X>.
- [18] G.G. Somjen, Acidification of interstitial fluid in hippocampal formation caused by seizures and by spreading depression, *Brain Res.* 311 (1984) 186–188. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)91416-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)91416-1).
- [19] F. Zhu, W. Shan, Q. Xu, A. Guo, J. Wu, Q. Wang, Ketone Bodies Inhibit the Opening of Acid-Sensing Ion Channels (ASICs) in Rat Hippocampal Excitatory Neurons in vitro, *Front. Neurol.* 10 (2019) 419269. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2019.00155>.

- [20] P. Bernardi, A. Rasola, M. Forte, G. Lippe, The mitochondrial permeability transition pore: Channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology, *Physiol. Rev.* 95 (2015) 1111–1155. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00001.2015>.
- [21] V. Giorgio, L. Guo, C. Bassot, V. Petronilli, P. Bernardi, Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition, *Cell Calcium* 70 (2018) 56–63. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2017.05.004>.
- [22] D.Y. Kim, K.A. Simeone, T.A. Simeone, J.D. Pandya, J.C. Wilke, Y. Ahn, J.W. Geddes, P.G. Sullivan, J.M. Rho, Ketone bodies mediate antiseizure effects through mitochondrial permeability transition, *Ann. Neurol.* 78 (2015) 77–87. <https://doi.org/10.1002/ANA.24424>.
- [23] A. Petersen, M. Soderstrom, B. Saha, P. Sharma, Animal models of traumatic brain injury: a review of pathophysiology to biomarkers and treatments, *Exp. Brain Res.* 239 (2021) 2939–2950. <https://doi.org/10.1007/S00221-021-06178-6>.
- [24] D.M. Feeney, M.G. Boyeson, R.T. Linn, H.M. Murray, W.G. Dail, Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat, *Brain Res.* 211 (1981) 67–77. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90067-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90067-6).
- [25] M.A. Abd-Elfattah Foda, A. Marmarou, A new model of diffuse brain injury in rats: Part II: Morphological characterization, *J. Neurosurg.* 80 (1994) 301–313. <https://doi.org/10.3171/JNS.1994.80.2.0301>.
- [26] Y. Shapira, E. Shohami, A. Sidi, D. Soffer, S. Freeman, S. Cotev, Experimental closed head injury in rats: mechanical, pathophysiologic, and neurologic properties, *Crit. Care Med.* 16 (1988) 258–265. <https://doi.org/10.1097/00003246-198803000-00010>.
- [27] E.H. McNamara, A.A. Grillakis, L.B. Tucker, J.T. McCabe, The closed-head impact model of engineered rotational acceleration (CHIMERA) as an application for traumatic brain injury pre-clinical research: A status report, *Exp. Neurol.* 333 (2020) 113409. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2020.113409>.
- [28] X. Ma, A. Aravind, B.J. Pfister, N. Chandra, J. Haorah, Animal Models of Traumatic Brain Injury and Assessment of Injury Severity, *Molecular Neurobiology* 2019 56:8 56 (2019) 5332–5345. <https://doi.org/10.1007/S12035-018-1454-5>.
- [29] K. Janeczko, Spatiotemporal patterns of the astroglial proliferation in rat brain injured at the postmitotic stage of postnatal development: a combined immunocytochemical and autoradiographic study, *Brain Res.* 485 (1989) 236–243. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90566-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90566-0).
- [30] K. Janeczko, Age-dependent changes in the proliferative response of S-100 protein-positive glial cells to injury in the rat brain, *International Journal of Developmental Neuroscience* 12 (1994) 431–440. [https://doi.org/10.1016/0736-5748\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0736-5748(94)90027-2).
- [31] K. Kawon, Z. Setkowicz, A. Drozd, K. Janeczko, J. Chwiej, The methods of vibrational microspectroscopy reveals long-term biochemical anomalies within the region of mechanical injury within the rat brain, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 263 (2021) 120214. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2021.120214>.
- [32] Z. Setkowicz, M. Ciarach, R.X. Guzik, K. Janeczko, Different effects of neuroprotectants FK-506 and cyclosporin A on susceptibility to pilocarpine-induced seizures in rats with brain injured at different developmental stages, *Epilepsy Res.* 61 (2004) 63–72. <https://doi.org/10.1016/J.EPLEPSYRES.2004.06.001>.
- [33] Z. Setkowicz, K. Janeczko, Long-term changes in susceptibility to pilocarpine-induced status epilepticus following neocortical injuries in the rat at different developmental stages, *Epilepsy Res.* 53 (2003) 216–224. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(03\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(03)00029-9).
- [34] F. Rakib, K. Al-Saad, T. Ahmed, E. Ullah, G.E. Barreto, G. Md Ashraf, M.H.M. Ali, Biomolecular alterations in acute traumatic brain injury (TBI) using Fourier transform infrared (FTIR) imaging spectroscopy, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 248 (2021) 119189. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2020.119189>.
- [35] W. Cai, G. Wang, H. Wu, H. Li, C. Shen, X. Wei, K. Yu, Q. Sun, Z. Wang, Identifying traumatic brain injury (TBI) by ATR-FTIR spectroscopy in a mouse model, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 274 (2022) 121099. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2022.121099>.

- [36] J.M. Surmacki, L. Ansel-Bollepalli, F. Pischiutta, E.R. Zanier, A. Ercole, S.E. Bohndiek, Label-free monitoring of tissue biochemistry following traumatic brain injury using Raman spectroscopy, *Analyst* 142 (2016) 132–139. <https://doi.org/10.1039/C6AN02238C>.
- [37] G. Harris, C.A. Stickland, M. Lim, P. Goldberg Oppenheimer, Raman Spectroscopy Spectral Fingerprints of Biomarkers of Traumatic Brain Injury, *Cells* 12 (2023) 2589. <https://doi.org/10.3390/CELLS12222589>.
- [38] J. Chwiej, A. Sarapata, K. Janeczko, Z. Stegowski, K. Appel, Z. Setkowicz, 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 (2011) 275–283. <https://doi.org/10.1007/S00775-010-0724-0>.
- [39] S.M.A. Juan, M. Daglas, A.P. Gunn, L. Lago, P.A. Adlard, Characterization of the spatial distribution of metals and profile of metalloprotein complexes in a mouse model of repetitive mild traumatic brain injury, *Metallomics* 14 (2022) 92. <https://doi.org/10.1093/MTOMCS/MFAC092>.
- [40] M. Edalatfar, S.M. Piri, M.M. Mehrabinejad, M.S. Mousavi, S. Meknatkhah, M.R. Fattahi, Z. Kavyani, A. Hajighadery, M. Kaveh, A. Aryannejad, M. Ghafouri, E. Jamshidi, M.M. Rezwaniifar, M. Sadeghi-Naini, A. Bari, M. Sharif-Alhoseini, Biofluid Biomarkers in Traumatic Brain Injury: A Systematic Scoping Review, *Neurocrit. Care* 35 (2021) 559–572. <https://doi.org/10.1007/S12028-020-01173-1>.
- [41] J. Depciuch, I. Zawlik, M. Skrzypa, J. Pajak, N. Potocka, K. Łach, H. Bartosik-Psujek, A. Koziorowska, E. Kaznowska, J. Cebulski, FTIR Spectroscopy of Cerebrospinal Fluid Reveals Variations in the Lipid: Protein Ratio at Different Stages of Alzheimer’s Disease, *Journal of Alzheimer’s Disease* 68 (2019) 281–293. <https://doi.org/10.3233/JAD-181008>.
- [42] A. Sevinc, D. Yonar, F. Severcan, Investigation of neurodegenerative diseases from body fluid samples using Fourier transform infrared spectroscopy, *Biomed. Spectrosc. Imaging* 4 (2015) 341–357. <https://doi.org/10.3233/BSI-150123>.
- [43] T. Dučić, J.C. Koch, Synchrotron-Based Fourier-Transform Infrared Micro-Spectroscopy of Cerebrospinal Fluid from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients Reveals a Unique Biomolecular Profile, *Cells* 12 (2023) 1451. <https://doi.org/10.3390/CELLS12111451>.
- [44] A.G. Theakstone, P.M. Brennan, K. Ashton, E. Czeiter, M.D. Jenkinson, K. Syed, M.J. Reed, C.-T. Participants, M.J. Baker, Vibrational Spectroscopy for the Triage of Traumatic Brain Injury Computed Tomography Priority and Hospital Admissions, (n.d.). <https://doi.org/10.1089/neu.2021.0410>.
- [45] J.J.S. Rickard, V. Di-Pietro, D.J. Smith, D.J. Davies, A. Belli, P.G. Oppenheimer, Rapid optofluidic detection of biomarkers for traumatic brain injury via surface-enhanced Raman spectroscopy, *Nature Biomedical Engineering* 2020 4:6 4 (2020) 610–623. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0510-4>.
- [46] J.C. Ranasinghe, Z. Wang, S. Huang, Unveiling brain disorders using liquid biopsy and Raman spectroscopy, *Nanoscale* 16 (2024) 11879–11913. <https://doi.org/10.1039/D4NR01413H>.
- [47] M. Babić Leko, M. Mihelčić, J. Jurasović, M. Nikolac Perković, E. Španić, A. Sekovanić, T. Orct, K. Zubčić, L. Langer Horvat, N. Pleić, S. Kidemet-Piskač, Ž. Vogrinc, N. Pivac, A. Diana, F. Borovečki, P.R. Hof, G. Šimić, Heavy Metals and Essential Metals Are Associated with Cerebrospinal Fluid Biomarkers of Alzheimer’s Disease, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023) 467. <https://doi.org/10.3390/IJMS24010467>.
- [48] M.J. Baker, J. Trevisan, P. Bassan, R. Bhargava, H.J. Butler, K.M. Dorling, P.R. Fielden, S.W. Fogarty, N.J. Fullwood, K.A. Heys, C. Hughes, P. Lasch, P.L. Martin-Hirsch, B. Obinaju, G.D. Sockalingum, J. Sulé-Suso, R.J. Strong, M.J. Walsh, B.R. Wood, P. Gardner, F.L. Martin, Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials, *Nat. Protoc.* 9 (2014) 1771. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2014.110>.
- [49] Z. Movasaghi, S. Rehman, I.U. Rehman, Raman Spectroscopy of Biological Tissues, *Appl. Spectrosc. Rev.* 42 (2007) 493–541. <https://doi.org/10.1080/05704920701551530>.
- [50] M. Diem, A. Mazur, K. Lenau, J. Schubert, B. Bird, M. Miljković, C. Krafft, J. Popp, Molecular pathology via IR and Raman spectral imaging, *J. Biophotonics* 6 (2013) 855–886. <https://doi.org/10.1002/JBIO.201300131>.

- [51] P. Wobrauschek, Total reflection x-ray fluorescence analysis—a review, *X-Ray Spectrometry* 36 (2007) 289–300. <https://doi.org/10.1002/XRS.985>.
- [52] A. Iida, Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence Spectrometry, *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (2000) 1–23. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.A9329>.
- [53] A. Barth, Infrared spectroscopy of proteins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767 (2007) 1073–1101. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2007.06.004>.
- [54] S. Wartewig, R.H.H. Neubert, Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1144–1170. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2005.01.022>.
- [55] H.J. Butler, L. Ashton, B. Bird, G. Cinque, K. Curtis, J. Dorney, K. Esmonde-White, N.J. Fullwood, B. Gardner, P.L. Martin-Hirsch, M.J. Walsh, M.R. McAinsh, N. Stone, F.L. Martin, Using Raman spectroscopy to characterize biological materials, *Nature Protocols* 2016 11:4 11 (2016) 664–687. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.036>.
- [56] R.S. Das, Y.K. Agrawal, Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications, *Vib. Spectrosc.* 57 (2011) 163–176. <https://doi.org/10.1016/J.VIBSPEC.2011.08.003>.
- [57] R. Tuma, Raman spectroscopy of proteins: from peptides to large assemblies, *Journal of Raman Spectroscopy* 36 (2005) 307–319. <https://doi.org/10.1002/JRS.1323>.
- [58] R.D. Deslattes, E.G. Kassler, P. Indelicato, L. De Billy, E. Lindroth, J. Anton, X-ray transition energies: new approach to a comprehensive evaluation, *Rev. Mod. Phys.* 75 (2003) 35. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.75.35>.
- [59] D.H. Bilderback, P. Elleaume, E. Weckert, Review of third and next generation synchrotron light sources, *Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics* 38 (2005) S773. <https://doi.org/10.1088/0953-4075/38/9/022>.
- [60] G.E. Ice, J.D. Budai, J.W.L. Pang, The race to X-ray microbeam and nanobeam science, *Science* (1979). 334 (2011) 1234–1239. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1202366>.
- [61] L. Vincze, B. Vekemans, F.E. Brenker, G. Falkenberg, K. Rickers, A. Somogyi, M. Kersten, F. Adams, Three-Dimensional Trace Element Analysis by Confocal X-ray Microfluorescence Imaging, *Anal. Chem.* 76 (2004) 6786–6791. <https://doi.org/10.1021/AC049274L>.
- [62] Y. Yoneda, T. Horiuchi, Optical Flats for Use in X-Ray Spectrochemical Microanalysis, *Review of Scientific Instruments* 42 (1971) 1069–1070. <https://doi.org/10.1063/1.1685282>.
- [63] R. Klockenkämper, A. Von Bohlen, Total reflection X-ray fluorescence—an efficient method for micro-, trace and surface layer analysis. Invited lecture, *J. Anal. At. Spectrom.* 7 (1992) 273–279. <https://doi.org/10.1039/JA9920700273>.
- [64] I. De La Calle, N. Cabaleiro, V. Romero, I. Lavilla, C. Bendicho, Sample pretreatment strategies for total reflection X-ray fluorescence analysis: A tutorial review, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 90 (2013) 23–54. <https://doi.org/10.1016/J.SAB.2013.10.001>.
- [65] R. Fernández-Ruiz, R. Fernández-Ruiz, Bioanalytical Application of the Total-Reflection X-Ray Fluorescence Spectrometry, *International Journal of Molecular Sciences* 2025, Vol. 26, 26 (2025). <https://doi.org/10.3390/IJMS26031049>.
- [66] A. Prange, H. Schwenke, Trace Element Analysis using Total-Reflection X-Ray Fluorescence Spectrometry, *Advances in X-Ray Analysis* 35 (1991) 899–923. <https://doi.org/10.1154/S0376030800013100>.
- [67] L. Borgese, A. Zacco, E. Bontempi, P. Colombi, R. Bertuzzi, E. Ferretti, S. Tenini, L.E. Depero, Total reflection of x-ray fluorescence (TXRF): a mature technique for environmental chemical nanoscale metrology, *Meas. Sci. Technol.* 20 (2009) 084027. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/20/8/084027>.
- [68] M.J. Pushie, I.J. Pickering, M. Korbas, M.J. Hackett, G.N. George, Elemental and chemically specific x-ray fluorescence imaging of biological systems, *Chem. Rev.* 114 (2014) 8499–8541. <https://doi.org/10.1021/CR4007297>.
- [69] A. Kubala-Kukuś, E. Marguś, D. Banaś, J. Wudarczyk-Moćko, S. Gózdź, I. Stabrawa, K. Szary, S. Świerczyńska, G. Wesołowski, T. Milićević, D. Relić, F. Bilo, L. Borgese, Importance of internal standard selection in direct routine determination of L series elements concentration in water samples by application of the total reflection X-ray fluorescence

- technique, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 215 (2024) 106922. <https://doi.org/10.1016/J.SAB.2024.106922>.
- [70] K. Dodo, K. Fujita, M. Sodeoka, Raman Spectroscopy for Chemical Biology Research, *J. Am. Chem. Soc.* 144 (2022) 19651–19667. <https://doi.org/10.1021/JACS.2C05359>.
- [71] Y. Li, Z. Wang, X. Mu, A. Ma, S. Guo, Raman tags: Novel optical probes for intracellular sensing and imaging, *Biotechnol. Adv.* 35 (2017) 168–177. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2016.12.004>.
- [72] R. Fernández-Ruiz, TXRF Spectrometry as a Powerful Tool for the Study of Metallic Traces in Biological Systems, *Development in Analytical Chemistry* 1 (2014).
- [73] A. Gruber, R. Müller, A. Wagner, S. Colucci, M.V. Spasić, K. Leopold, Total reflection X-ray fluorescence spectrometry for trace determination of iron and some additional elements in biological samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 6419. <https://doi.org/10.1007/S00216-020-02614-8>.
- [74] E. V. Jones, D.S. Bouvier, Astrocyte-Secreted Matricellular Proteins in CNS Remodelling during Development and Disease, *Neural Plast.* 2014 (2014) 321209. <https://doi.org/10.1155/2014/321209>.
- [75] J.Y.C. Hsu, L.Y.W. Bourguignon, C.M. Adams, K. Peyrollier, H. Zhang, T. Fandel, C.L. Cun, Z. Werb, L.J. Noble-Haesslein, Matrix Metalloproteinase-9 Facilitates Glial Scar Formation in the Injured Spinal Cord, *Journal of Neuroscience* 28 (2008) 13467–13477. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2287-08.2008>.
- [76] E. Tamburini, A. Dallatomasina, J. Quartararo, B. Cortelazzi, D. Mangieri, M. Lazzaretti, R. Perris, Structural deciphering of the NG2/CSPG4 proteoglycan multifunctionality, *The FASEB Journal* 33 (2019) 3112–3128. <https://doi.org/10.1096/FJ.201801670R>.
- [77] S.A. Busch, J. Silver, The role of extracellular matrix in CNS regeneration, *Curr. Opin. Neurobiol.* 17 (2007) 120–127. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2006.09.004>.
- [78] S. Hariri, S. Barzegari, K. Keshavarz, N. Nikounezhad, B. Safaei, G. Farnam, F.H. Shirazi, FTIR bio-spectroscopy scattering correction using natural biological characteristics of different cell lines, *Analyst* 144 (2019) 5810–5828. <https://doi.org/10.1039/C9AN00811J>.
- [79] P. Bassan, A. Sachdeva, A. Kohler, C. Hughes, A. Henderson, J. Boyle, J.H. Shanks, M. Brown, N.W. Clarke, P. Gardner, FTIR microscopy of biological cells and tissue: data analysis using resonant Mie scattering (RMieS) EMSC algorithm, *Analyst* 137 (2012) 1370–1377. <https://doi.org/10.1039/C2AN16088A>.
- [80] L.M. Miller, P. Dumas, From structure to cellular mechanism with infrared microspectroscopy, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20 (2010) 649. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2010.07.007>.
- [81] B.R. Shakya, H.R. Teppo, L. Rieppo, Optimization of measurement mode and sample processing for FTIR microspectroscopy in skin cancer research, *Analyst* 147 (2022) 851–861. <https://doi.org/10.1039/D1AN01999F>.
- [82] J. Filik, M.D. Frogley, J.K. Pijanka, K. Wehbe, G. Cinque, Electric field standing wave artefacts in FTIR micro-spectroscopy of biological materials, *Analyst* 137 (2012) 853–861. <https://doi.org/10.1039/C2AN15995C>.
- [83] A. Wilk, A. Drozd, K. Olbrich, N. Janik-Olchawa, Z. Setkiewicz, J. Chwiej, Influence of measurement mode on the results of glioblastoma multiforme analysis with the FTIR microspectroscopy, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 287 (2023) 122086. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2022.122086>.
- [84] S. Pimenta, J.H. Correia, S. Pimenta, J.H. Correia, Biomedical Applications of Raman Spectroscopy: A Review, *Photochem* 2025, Vol. 5, 5 (2025) 29. <https://doi.org/10.3390/PHOTOCHEM5040029>.
- [85] E.S. Allakhverdiev, V. V. Khabatova, B.D. Kossalbayev, E. V. Zadneprovskaya, O. V. Rodnenkov, T. V. Martynyuk, G. V. Maksimov, S. Alwasel, T. Tomo, S.I. Allakhverdiev, E.S. Allakhverdiev, V. V. Khabatova, B.D. Kossalbayev, E. V. Zadneprovskaya, O. V. Rodnenkov, T. V. Martynyuk, G. V. Maksimov, S. Alwasel, T. Tomo, S.I. Allakhverdiev, Raman Spectroscopy and Its Modifications Applied to Biological and Medical Research, *Cells* 2022, Vol. 11, 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/CELLS11030386>.

- [86] B. Manifold, D. Fu, Quantitative Stimulated Raman Scattering Microscopy: Promises and Pitfalls, *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif)*. 15 (2022) 269. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ANCHEM-061020-015110>.
- [87] J. Kostamovaara, J. Tenhunen, M. Kögler, I. Nissinen, J. Nissinen, P. Keränen, E.B. Hanlon, R. Manoharan, T. Koo, K.E. Shafer, J.T. Motz, M. Fitzmaurice, J.R. Kramer, I. Itzkan, R.R. Dasari, M.S. Feld, P. Matousek, M. Towrie, C. Ma, W.M. Kwok, D. Phillips, W.T. Toner, A.W. Parker, Fluorescence suppression in Raman spectroscopy using a time-gated CMOS SPAD, *Optics Express*, Vol. 21, Issue 25, Pp. 31632-31645 21 (2013) 31632–31645. <https://doi.org/10.1364/OE.21.031632>.
- [88] B. Huang, H. Babcock, X. Zhuang, Breaking the Diffraction Barrier: Super-Resolution Imaging of Cells, *Cell* 143 (2010) 1047. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.12.002>.
- [89] G. Harris, C.A. Stickland, M. Lim, P. Goldberg Oppenheimer, Raman Spectroscopy Spectral Fingerprints of Biomarkers of Traumatic Brain Injury, *Cells* 12 (2023) 2589. <https://doi.org/10.3390/CELLS12222589>.
- [90] H. Schwenke, J. Knoth, L. Fabry, al -, H. Fontaine, T. Lardin -, J.L. Rodríguez Alejandre, V.R. Sharma, L.A. Acosta Sánchez, N. Dasgupta-Schubert, Total Reflection X-ray Fluorescence (TXRF) spectrometry as a powerful and broad-spectrum analytical tool in the nuclear sciences, *J. Phys. Conf. Ser.* 2619 (2023) 012014. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2619/1/012014>.
- [91] M.J. Bedzyk, Scattering: X-Ray Standing Wave Techniques, 6 (2005) 330–341.
- [92] N. York, • Basel, R.E. Van Grieken, A.A. Markowicz, *Handbook of X-Ray Spectrometry*, (2001).
- [93] A. von Bohlen, R. Fernández-Ruiz, Experimental evidence of matrix effects in total-reflection X-ray fluorescence analysis: Coke case, *Talanta* 209 (2020). <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2019.120562>.
- [94] R. Fernández-Ruiz, A. von Bohlen, E.J. Friedrich K, M.J. Redrejo, Analysis of coke beverages by total-reflection X-ray fluorescence, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 145 (2018) 99–106. <https://doi.org/10.1016/J.SAB.2018.04.013>.
- [95] R. Gupte, W. Brooks, R. Vukas, J. Pierce, J. Harris, Sex Differences in Traumatic Brain Injury: What We Know and What We Should Know, *J. Neurotrauma* 36 (2019) 3063–3091. <https://doi.org/10.1089/NEU.2018.6171>.
- [96] C.K. Barha, L.A.M. Galea, Influence of different estrogens on neuroplasticity and cognition in the hippocampus, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1800 (2010) 1056–1067. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2010.01.006>.
- [97] H.E. Scharfman, T.C. Mercurio, J.H. Goodman, M.A. Wilson, N.J. MacLusky, Hippocampal Excitability Increases during the Estrous Cycle in the Rat: A Potential Role for Brain-Derived Neurotrophic Factor, *Journal of Neuroscience* 23 (2003) 11641–11652. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-37-11641.2003>.
- [98] N.C. Berchtold, J.P. Kesslak, C.J. Pike, P.A. Adlard, C.W. Cotman, Estrogen and exercise interact to regulate brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein expression in the hippocampus, *European Journal of Neuroscience* 14 (2001) 1992–2002. <https://doi.org/10.1046/J.0953-816X.2001.01825.X>.
- [99] D.D. Fraser, S. Whiting, R.D. Andrew, E.A. Macdonald, K. Musa-Veloso, S.C. Cunnane, Elevated polyunsaturated fatty acids in blood serum obtained from children on the ketogenic diet, *Neurology* 60 (2003) 1026–1029. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000049974.74242.C6>.
- [100] K. Mondal, A.A. Gary, A. Dash, N.A. Del Mar, D.J. Stephenson, C.E. Chalfant, A. Reiner, B. Sears, N. Mandal, Oral Supplementation of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (n-3-PUFA) Can Prevent TBI-Induced Visual, Motor, and Emotional Deficits in Mice, *Mol. Neurobiol.* 62 (2025) 11972–11985. <https://doi.org/10.1007/S12035-025-05019-9>.
- [101] K. Elsamman, Polyunsaturated Fatty Acids and Traumatic Brain Injury, (2024) 215–244. https://doi.org/10.1007/978-981-97-6341-2_11.
- [102] S. Anwar, T. Sarwar, A.A. Khan, A.H. Rahmani, Therapeutic Applications and Mechanisms of Superoxide Dismutase (SOD) in Different Pathogenesis, *Biomolecules* 2025, Vol. 15, Page 1130 15 (2025) 1130. <https://doi.org/10.3390/BIOM15081130>.

- [103] Z. Li, Y. Liu, R. Wei, V.W. Yong, M. Xue, The Important Role of Zinc in Neurological Diseases, *Biomolecules* 2023, Vol. 13, Page 28 13 (2022) 28. <https://doi.org/10.3390/BIOM13010028>.
- [104] D.A. Sun, L.S. Deshpande, S. Sombati, A. Baranova, M.S. Wilson, R.J. Hamm, R.J. DeLorenzo, Traumatic brain injury causes a long-lasting calcium (Ca²⁺)-plateau of elevated intracellular Ca levels and altered Ca²⁺ homeostatic mechanisms in hippocampal neurons surviving brain injury, *European Journal of Neuroscience* 27 (2008) 1659–1672. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2008.06156.X>.
- [105] Z.A. Zhao, L. Yan, J. Wen, S.K. Satyanarayanan, F. Yu, J. Lu, Y.U. Liu, H. Su, Cellular and molecular mechanisms in vascular repair after traumatic brain injury: a narrative review, *Burns Trauma* 11 (2023). <https://doi.org/10.1093/BURNST/TKAD033>.
- [106] P.M. Shore, E.K. Jackson, S.R. Wisniewski, R.S.B. Clark, P.D. Adelson, P.M. Kochanek, C.S. Robertson, M.R. Proctor, R.M. Scott, L.N. Sutton, H.E. Aryan, M.L. Levy, Vascular Endothelial Growth Factor is Increased in Cerebrospinal Fluid after Traumatic Brain Injury in Infants and Children, *Neurosurgery* 54 (2004) 605–612. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000108642.88724.DB>.
- [107] M.K. Sköld, C. Von Gertten, A.C. Sandberg-Nordqvist, T. Mathiesen, S. Holmin, VEGF and VEGF Receptor Expression after Experimental Brain Contusion in Rat, <https://Home.Liebertpub.Com/Neu> 22 (2005) 353–367. <https://doi.org/10.1089/NEU.2005.22.353>.
- [108] H. Cheng, N. Wang, X. Ma, P. Wang, W. Dong, Z. Chen, M. Wu, Z. Wang, L. Wang, D. Guan, R. Zhao, Spatial-temporal changes of iron deposition and iron metabolism after traumatic brain injury in mice, *Front. Mol. Neurosci.* 15 (2022) 949573. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2022.949573>.
- [109] N.K. Isaev, E. V. Stelmashook, E.E. Genrikhs, Role of zinc and copper ions in the pathogenetic mechanisms of traumatic brain injury and Alzheimer’s disease, *Rev. Neurosci.* 31 (2019) 233–243. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO-2019-0052>.

Lista wystąpień konferencyjnych

1. **Kamil Kawoń**, Natalia Wilkosz, Marzena Rugieł, Aleksandra Wilk, Marta Saługa, Katarzyna Bułat, Tetiana Stepanenko, Joanna Chwiej, Katarzyna Marzec. *Raman spectroscopy and associated techniques reveals abnormalities in RBC membranes in diabetic mice*. 28th International Conference on Raman Spectroscopy – ICORS 2024, 28.07.2024 – 02.08.2024, Rzym, Włochy, (plakat)
2. **Kamil Kawoń**, Zuzanna Setkowicz, Marzena Rugieł, Zuzanna Rauk, Mateusz Czyżycki, Ilaria Carlomango, Giuliana Aquilanti, Joanna Chwiej. *Spectroscopic methods in the study of the effect of the ketogenic diet on glial scar development in terms of time and gender*. 5th Jagiellonian Symposium on Advances in particle physics and medicine, 29.07.2024 – 07.07.2024, Kraków, Polska, (plakat)
3. **Kamil Kawoń**, Marzena Rugieł, Aldona Kubala-Kukuś, Katarzyna Matusiak, Ilona Stabrawa, Karol Szary, Zuzanna Setkowicz, Zuzanna Rauk, Joanna Chwiej. *TXRF study of ketogenic diet influence on the elemental composition of selected rat organs*. NUTECH-2023 - international conference on Development and Applications of Nuclear Technologies, 20.09.2023 – 22.09.2023, Kraków, Polska, (plakat)
4. **Kamil Kawoń**, Karolina Olbrich, Zuzanna Setkowicz, Natalia Janik-Olchawa, Joanna Chwiej. *The use of PCA supported Raman microspectroscopy for identification of glioblastoma multiforme brain tissue alterations*. CSI XLII - Colloquium Spectroscopicum Internationale XLII, 30.05.2022 – 03.06.2022, Gijon, Hiszpania, (referat)
5. **Kamil Kawoń**, Zuzanna Rauk, Wojciech Kosiek, Zuzanna Setkowicz, Joanna Chwiej. *FTIR microspectroscopy in identification of brain biochemical changes associated with the development of glial scar*. InterMST 2022 - 1st Interdisciplinary annual PhD conference on Material Science and Innovative Technologies, 19.05.2022 – 20.05.2022, Kraków, Polska, (referat)
6. **Kamil Kawoń**, Zuzanna Setkowicz, Agnieszka Drózdź, Krzysztof Janeczko, Joanna Chwiej. *PCA-supported FTIR analysis of tissues taken from the site of mechanical brain damage*. ICAVS-11 - 11th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, 23.08.2021 – 26.08.2021, Kraków, Polska, (plakat)
7. **Kamil Kawoń**, Zuzanna Setkowicz, Agnieszka Drózdź, Krzysztof Janeczko, Joanna Chwiej. *Biochemical anomalies of nervous tissue resulting from mechanical brain injury can be characterized using the techniques of vibrational microspectroscopy*. XXII Polish Conference on Biocybernetics and Biomedical Engineering (PCBBE), 19.05.2021 – 21.05.2021, Warszawa, Polska, (plakat)

Publikacje spoza rozprawy

1. Aleksandra Wilk, Natalia Wilkosz, Marzena Rugieł, Marta Saługa, **Kamil Kawoń**, Tetiana Stepanenko, Katarzyna Bułat, Aleksandra Wajda, Michał Szuwarzyński, Anna Zajączkowska, Anna Morgunowicz, Grzegorz Chodaczek, Victor Navarro-Esteve, David Perez-Guaita, Joanna Chwiej, Katarzyna M. Marzec. *Next-generation diabetes diagnostics: spectrochemical staging of red blood cells using vibrational spectroscopy*. Journal of Advanced Research. Dostępny online od 19.01.2026; <https://doi.org/10.1016/j.jare.2026.01.052>
2. Agnieszka Drózdź, Dominika Kubera, Alina Olender, Wojciech Dąbrowski, Magdalena Szukała, Sylwia Wosko, Joanna Chwiej, Marzena Rugieł, **Kamil Kawoń**, Mariusz Gogoś. *ATR-FTIR spectroscopic markers indicating drug resistance in selected Candida strains*. Scientific Reports. 2025; 15(1), 18130. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-01428-x>
3. Jagoda Worek, **Kamil Kawoń**, Joanna Chwiej, Katarzyna Berent, Rosa Rego, Katarzyna Styszko. *Assessment of the presence of microplastics in stabilized sewage sludge: analysis methods and environmental impact*. Applied Sciences. 2025; 15(1):1. <https://doi.org/10.3390/app15010001>
4. Jagoda Worek, **Kamil Kawoń**, Joanna Chwiej, Katarzyna Styszko. *Stabilized sewage sludge as fertilizer: risks related to the presence of microplastics*. Applied Sciences. 2025; 15(13):7420. <https://doi.org/10.3390/app15137420>
5. Martyna Durak-Kozica, Ewa Stępień, Jan Swakoń, Benedykt R. Jany, **Kamil Kawoń**, Damian Wróbel, Sebastian Kusyk, Małgorzata Grzesiak, Katarzyna Knapczyk-Stwora, Andrzej Wróbel, Joanna Chwiej, Paweł Moskal. *Short-term response of melanoma spheroids and melanocytes to FLASH proton therapy - colorimetric and FTIR microscopy study*. Polish Journal of Medical Physics and Engineering, Sciendo. 2024; 30(4), 263-268, <https://doi.org/10.2478/pjmpe-2024-0031>
6. Marzena Rugieł, Zuzanna Setkowicz-Janeczko, Wojciech Kosiek, Zuzanna Rauk, **Kamil Kawoń**, Joanna Chwiej. *Does ketogenic diet used in pregnancy affect the nervous system development in offspring? : FTIR microspectroscopy study*. ACS Chemical Neuroscience. 2023; 14(15), 2775-2791, <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.3c00331>
7. Karolina Olbrich, Zuzanna Setkowicz, **Kamil Kawoń**, Mateusz Czyżycki, Natalia Janik-Olchawa, Ilaria Carlomango, Giuliana Aquilanti, Joanna Chwiej. *Vibrational spectroscopy methods for investigation of the animal models of glioblastoma multiforme*. Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2023; 303, 123230, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2023.123230>
8. Jagoda Worek, Xymena Badura, Anna Białas, Joanna Chwiej, **Kamil Kawoń**, Katarzyna Styszko. *Pollution from transport: detection of tyre particles in environmental samples*. Engies. 2022; 15(8), 2816, <https://doi.org/10.3390/en15082816>

Zagraniczne wyjazdy naukowe

1. Staż zagraniczny w ramach HERCULES SCHOOL: Neutrons & Synchrotron Radiation for Science. W terminie 27.02.2023 – 31.03.2023, Grenoble, Francja. Uzyskano wsparcie z projektu STER NAWA - umiędzynarodowienie szkół doktorskich.
2. Wjazd naukowy do Elettra Sincrotrone Trieste w związku z realizacją grantu badawczego nr: 20230125 - X-ray fluorescence microscopy analysis of element anomalies in brain linked to the glial scar development. W terminie 27.11.2023 – 03.12.2023, Triest, Włochy
3. Wjazd naukowy do Elettra Sincrotrone Trieste w związku z realizacją grantu badawczego nr: 20240069 - The influence of dietary treatment on the process of glial scar formation in case of traumatic brain injury. W terminie 26.11.2024 – 03.12.2024, Triest, Włochy

Granty i stypendia naukowe

1. Grant otrzymany w ramach Inicjatywa Doskonałości Uczelnia Badawcza (IDUB) z funduszy na Działanie D4: Minigranty uczelniane na prace badawcze realizowane przez doktorantów AGH - edycja III. Tytuł zagadnienia badawczego: „Metody wielowymiarowej analizy wariancji dla potrzeb eksploracji danych spektralnych z mikrospektroskopii FTIR i Ramana pod kątem obiektywnej diagnostyki glejaka wielopostaciowego.”
2. Stypendium naukowe finansowane z grantu NCN SONATA-BIS „Techniki spektroskopowe i mikroskopowe w nano-sondowaniu, modelowaniu i rozpoznaniu interakcji pomiędzy erytrocytami i komórkami śródbłonna naczyniowego na poziomie molekularnym” (UMO-2020/38/E/ST4/00197) w okresie lipiec 2022 – wrzesień 2025.

Oświadczenia współautorów publikacji oraz manuskryptów

Autorzy (alfabetycznie)	A1	A2	A3	S1	Strona
Aquilanti Giuliana				+	41
Carlomango Ilaria				+	42
Chwiej Joanna	+	+	+	+	43
Cieślak Jakub				+	44
Czyżycki Mateusz				+	45
Drózdź Agnieszka	+			+	46
Janeczko Krzysztof	+				47
Kawoń Kamil	+	+	+	+	48
Kubala-Kukuś Aldona		+			49
Matusiak Katarzyna		+			50
Rauk Zuzanna		+	+	+	51
Rugieł Marzena		+			52
Setkowicz Zuzanna	+	+	+	+	53
Sławek Anna				+	54
Stabrawa Ilona		+			55
Szary Karol		+			56
Wilk Aleksandra				+	57

Trieste, 23.12.2025

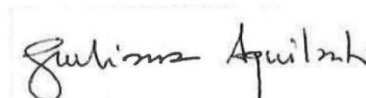
Dr. Giuliana Aquilanti
Elettra Sincrotrone Trieste
SS 14 km 163.5 Basovizza (TS) 34149 Italy

CO-AUTHOR CONFIRMATION

As a co-author of publication entitled: „Modulatory role of the ketogenic diet in glial scar formation after traumatic brain injury - FTIR, Raman and X-ray fluorescence microscopy study”, which is under review in *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, I declare that my contribution to the creation of the above-mentioned work included:

- support for data acquisition,
- review of the manuscript.

I declare that a separate part of the above-mentioned work demonstrates the individual contribution from **Kamil Kawoń** in developing the research concept, conducting the experimental part as well as analyzing and interpreting the results. I give my permission for the above-mentioned work to be submitted by **Kamil Kawoń** as part of a doctoral dissertation in the form of a thematically coherent collection of articles published in scientific journals.



.....
(signature)

Trieste, 05/12/2025


Dr. Ilaria Carlomango
Elettra Sincrotrone Trieste
SS 14 km 163.5 Basovizza (TS) 34149 Italy

CO-AUTHOR CONFIRMATION

As a co-author of publication entitled: „Modulatory role of the ketogenic diet in glial scar formation after traumatic brain injury - FTIR, Raman and X-ray fluorescence microscopy study”, which is under review in Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, I declare that my contribution to the creation of the above-mentioned work included:

- support for data acquisition,
- review of the manuscript.

I declare that a separate part of the above-mentioned work demonstrates the individual contribution from **Kamil Kawoń** in developing the research concept, conducting the experimental part as well as analyzing and interpreting the results. I give my permission for the above-mentioned work to be submitted by **Kamil Kawoń** as part of a doctoral dissertation in the form of a thematically coherent collection of articles published in scientific journals.


(signature)

Kraków, dn. 08.12.2025

Dr hab. Joanna Chwiej, prof. AGH
Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie
al. Adama Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

OŚWIADCZENIE

Jako współautor prac pod tytułem:

1. "The methods of vibrational microspectroscopy reveals long-term biochemical anomalies within the region of mechanical injury within the rat brain", *Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2021
2. "Ketogenic diet influence on the elemental homeostasis of internal organs is gender dependent", *Scientific Reports* 2023
3. "Vibrational spectroscopy methods reveal biochemical changes associated with the glial scar formation after traumatic brain injury", *Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2026
4. „Modulatory role of the ketogenic diet in glial scar formation after traumatic brain injury - FTIR, Raman and X-ray fluorescence microscopy study”, (w recenzji w *Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc*)

oświadczam, że mój wkład w powstanie ww. prac obejmował:

- udział w opracowaniu koncepcji i metodologii badań,
- nadzór nad realizacją badań,
- krytyczną recenzję manuskryptów publikacji oraz udział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzję.

Oświadczam, że samodzielna oraz możliwa do wyodrębnienia część ww. prac wykazuje indywidualny wkład mgr **Kamila Kawonia** przy opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części eksperymentalnej, analizie i interpretacji wyników niniejszej pracy. Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. prac przez mgr **Kamila Kawonia** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.


.....
(podpis współautora)

KRAKÓW 05.12.25
(miejsowość, data)

prof. dr hab. Jakub Cieślak

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
Akademia Górniczo-Hutnicza
im. Stanisława Staszica w Krakowie
al. Adama Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

OŚWIADCZENIE

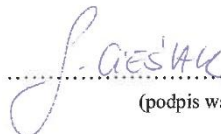
Jako współautor pracy pod tytułem:

„Modulatory role of the ketogenic diet in glial scar formation after traumatic brain injury - FTIR, Raman and X-ray fluorescence microscopy study”, (w recenzji)

oświadczam, że mój wkład w powstanie ww. pracy obejmował:

- wykonanie eksperymentu w Elettra Sincrotrone w Trieście we Włoszech na linii pomiarowej XRF/IAEA,
- recenzja manuskryptu.

Oświadczam, że samodzielna oraz możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr **Kamila Kawonia** przy opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części eksperymentalnej, analizie i interpretacji wyników niniejszej pracy. Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr **Kamila Kawonia** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.


(podpis współautora)

Hamburg, dnia 08 grudnia 2025
(miejsowość, data)

Dr inż. Mateusz Czyżycki

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
Akademia Górniczo-Hutnicza
im. Stanisława Staszica w Krakowie
al. Adama Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

Karlsruhe Institute of Technology
Institute for Photon Science and Synchrotron Radiation
KIT Synchrotron Laboratory at PETRA III, DESY in Hamburg
Notkestrasse 85, 22607 Hamburg, Niemcy

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pod tytułem:

„Modulatory role of the ketogenic diet in glial scar formation after traumatic brain injury - FTIR, Raman and X-ray fluorescence microscopy study”, (w recenzji)

oświadczam, że mój wkład w powstanie ww. pracy obejmował:

- wykonanie eksperymentu w Elettra Sincrotrone w Trieście we Włoszech na linii pomiarowej XRF/IAEA,
- pomoc merytoryczna w analizie uzyskanych wyników,
- recenzja manuskryptu.

Oświadczam, że samodzielna oraz możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr **Kamila Kawonia** przy opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części eksperymentalnej, analizie i interpretacji wyników niniejszej pracy. Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr **Kamila Kawonia** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

.....
(podpis współautora)



Kraków, 12.12.2025

(miejsowość, data)

Dr inż. Agnieszka Dróżdż

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
Akademia Górniczo-Hutnicza
im. Stanisława Staszica w Krakowie
al. Adama Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pod tytułem:

1. "The methods of vibrational microspectroscopy reveals long-term biochemical anomalies within the region of mechanical injury within the rat brain", Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc (2021)
2. „Modulatory role of the ketogenic diet in glial scar formation after traumatic brain injury - FTIR, Raman and X-ray fluorescence microscopy study”, (w recenzji)

oświadczam, że mój wkład w powstanie ww. pracy obejmował:

- współdział w opracowaniu metodologii badań,
- recenzja i redakcja manuskryptu.

Oświadczam, że samodzielna oraz możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr **Kamila Kawonia** przy opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części eksperymentalnej, analizie i interpretacji wyników niniejszej pracy. Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr **Kamila Kawonia** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Agnieszka Dróżdż

(podpis współautora)

Prof. dr hab. Krzysztof Janeczko
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków

Kraków, 5. 12. 2025.

OŚWIADCZENIE

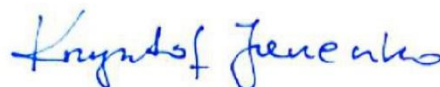
Jako współautor pracy pod tytułem:

“The methods of vibrational microspectroscopy reveals long-term biochemical anomalies within the region of mechanical injury within the rat brain”, *Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc* (2021)

oświadczam, że mój wkład w powstanie ww. pracy obejmował:

- recenzję i dyskusję manuskryptu.

Oświadczam, że samodzielna oraz możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr **Kamila Kawonia** przy opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części eksperymentalnej, analizie i interpretacji wyników niniejszej pracy. Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr **Kamila Kawonia** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.



(podpis współautora)

Kraków, 05.12.2025

Mgr Kamil Kawoń

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
Akademia Górniczo-Hutnicza
im. Stanisława Staszica w Krakowie
al. Adama Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

OŚWIADCZENIE

Jako współautor prac pod tytułem:

1. "The methods of vibrational microspectroscopy reveals long-term biochemical anomalies within the region of mechanical injury within the rat brain", *Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc* (2021),
2. "Ketogenic diet influence on the elemental homeostasis of internal organs is gender dependent", *Scientific Reports* (2023),
3. "Vibrational spectroscopy methods reveal biochemical changes associated with the glial scar formation after traumatic brain injury", *Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc* (2025),
4. „Modulatory role of the ketogenic diet in glial scar formation after traumatic brain injury - FTIR, Raman and X-ray fluorescence microscopy study”, (w recenzji)

oświadczam, że mój wkład w powstanie ww. prac obejmował:

- opracowanie koncepcji i metodologii badań,
- udział w eksperymencie ze zwierzętami,
- przygotowanie próbek,
- wykonanie pomiarów technikami FTIR, spektroskopia Ramana, SR-XRF,
- analiza i dyskusja wyników,
- przygotowanie manuskryptów publikacji.

Oświadczam także, że samodzielna oraz możliwa do wyodrębnienia część ww. prac wykazuje mój indywidualny wkład przy opracowywaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części eksperymentalnej, analizie i interpretacji wyników niniejszych prac.

Kamil Kawoń

(podpis współautora)

.....Kielce, 05.12.2025.....
(miejsowość, data)

Dr hab. Aldona Kubala-Kukuś, prof. UJK

Instytut Fizyki
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
ul. Uniwersytecka 7, 25-435 Kielce

OŚWIADCZENIE

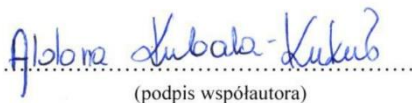
Jako współautor pracy pod tytułem:

“Ketogenic diet influence on the elemental homeostasis of internal organs is gender dependent”,
Scientific Reports (2023),

oświadczam, że mój wkład w powstanie ww. pracy obejmował:

- recenzję i redakcję manuskryptu.

Oświadczam, że samodzielna oraz możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr **Kamila Kawonia** przy opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części eksperymentalnej, analizie i interpretacji wyników niniejszej pracy. Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr **Kamila Kawonia** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.


.....
(podpis współautora)

KRAKÓW, 05.12.2025
(miejsowość, data)

Dr inż. Katarzyna Matusiak

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
Akademia Górniczo-Hutnicza
im. Stanisława Staszica w Krakowie
al. Adama Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pod tytułem:

“Ketogenic diet influence on the elemental homeostasis of internal organs is gender dependent”, Scientific Reports (2023),

oświadczam, że mój wkład w powstanie ww. pracy obejmował:

- przygotowanie materiału badawczego,
- recenzję i redakcję manuskryptu.

Oświadczam, że samodzielna oraz możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr **Kamila Kawonia** przy opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części eksperymentalnej, analizie i interpretacji wyników niniejszej pracy. Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr **Kamila Kawonia** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

K. Kawonia
.....
(podpis współautora)

Kraków, 08.12.2025
(miejsowość, data)

Mgr Zuzanna Rauk
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków

OŚWIADCZENIE

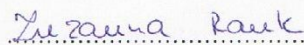
Jako współautor pracy pod tytułem:

1. "Ketogenic diet influence on the elemental homeostasis of internal organs is gender dependent", Scientific Reports (2023)
2. "Vibrational spectroscopy methods reveal biochemical changes associated with the glial scar formation after traumatic brain injury", Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc (2025)
3. „Modulatory role of the ketogenic diet in glial scar formation after traumatic brain injury - FTIR, Raman and X-ray fluorescence microscopy study”, (w recenzji)

oświadczam, że mój wkład w powstanie ww. prac obejmował:

- przeprowadzenie części eksperymentu obejmującą pracę przy zwierzętach,
- przygotowanie materiału badawczego do wykorzystania w badaniach.

Oświadczam, że samodzielna oraz możliwa do wyodrębnienia część ww. prac wykazuje indywidualny wkład mgr **Kamila Kawonia** przy opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części eksperymentalnej, analizie i interpretacji wyników niniejszej pracy. Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. prac przez mgr **Kamila Kawonia** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.


.....
(podpis współautora)

Kraków, 11.12.25 r.
(miejsowość, data)

Mgr inż. Marzena Ruziel

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
Akademia Górniczo-Hutnicza
im. Stanisława Staszica w Krakowie
al. Adama Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pod tytułem:

1. "Ketogenic diet influence on the elemental homeostasis of internal organs is gender dependent", Scientific Reports (2023),

oświadczam, że mój wkład w powstanie ww. prac obejmował:

- przygotowanie materiału badawczego,
- wsparcie w analizie,
- rewizja pierwotnej wersji manuskryptu.

Oświadczam, że samodzielna oraz możliwa do wyodrębnienia część ww. prac wykazuje indywidualny wkład mgr **Kamila Kawonia** przy opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części eksperymentalnej, analizie i interpretacji wyników niniejszej pracy. Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. prac przez mgr **Kamila Kawonia** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Marzena Ruziel
.....
(podpis współautora)

.....8 12 2025
(miejsowość, data)

Prof. dr hab. Zuzanna Setkowicz-Janeczko
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pod tytułem:

1. "The methods of vibrational microspectroscopy reveals long-term biochemical anomalies within the region of mechanical injury within the rat brain", *Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc* (2021)
2. "Ketogenic diet influence on the elemental homeostasis of internal organs is gender dependent", *Scientific Reports* (2023)
3. "Vibrational spectroscopy methods reveal biochemical changes associated with the glial scar formation after traumatic brain injury", *Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc* (2025)
4. „Modulatory role of the ketogenic diet in glial scar formation after traumatic brain injury - FTIR, Raman and X-ray fluorescence microscopy study”, (w recenzji)

oświadczam, że mój wkład w powstanie ww. prac obejmował:

- przeprowadzenie części eksperymentu obejmującą pracę przy zwierzętach,
- przygotowanie materiału badawczego do wykorzystania w badaniach,
- recenzję i dyskusję manuskryptu.

Oświadczam, że samodzielna oraz możliwa do wyodrębnienia część ww. prac wykazuje indywidualny wkład mgr **Kamila Kawonia** przy opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części eksperymentalnej, analizie i interpretacji wyników niniejszej pracy. Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. prac przez mgr **Kamila Kawonia** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Z. Setkowicz-Janeczko

.....
(podpis współautora)

Kraków, 05.12.2025
.....
(miejsowość, data)

mgr inż. Anna Sławek

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
Akademia Górniczo-Hutnicza
im. Stanisława Staszica w Krakowie
al. Adama Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pod tytułem:

„Modulatory role of the ketogenic diet in glial scar formation after traumatic brain injury - FTIR, Raman and X-ray fluorescence microscopy study”, (w recenzji)

oświadczam, że mój wkład w powstanie ww. pracy obejmował:

- pomoc przy eksperymencie w Elettra Sincrotrone w Trieście we Włoszech na linii pomiarowej XRF/IAEA.

Oświadczam, że samodzielna oraz możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr **Kamila Kawonia** przy opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części eksperymentalnej, analizie i interpretacji wyników niniejszej pracy. Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr **Kamila Kawonia** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Anna Sławek
.....
(podpis współautora)

Kielce, 09.12.2025r.
(miejsowość, data)

Dr Ilona Stabrawa
Instytut Fizyki
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
ul. Uniwersytecka 7, 25-435 Kielce

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pod tytułem:

“Ketogenic diet influence on the elemental homeostasis of internal organs is gender dependent”,
Scientific Reports (2023),

oświadczam, że mój wkład w powstanie ww. pracy obejmował:

- uzyskanie i walidację otrzymanych wyników pomiarów.

Oświadczam, że samodzielna oraz możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr **Kamila Kawonia** przy opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części eksperymentalnej, analizie i interpretacji wyników niniejszej pracy. Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr **Kamila Kawonia** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Ilona Stabrawa
(podpis współautora)

Kielce, 08.12.2025
(miejsowość, data)

mgr Karol Szary
Instytut Fizyki
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
ul. Uniwersytecka 7, 25-435 Kielce

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pod tytułem:

“Ketogenic diet influence on the elemental homeostasis of internal organs is gender dependent”,
Scientific Reports (2023),

oświadczam, że mój wkład w powstanie ww. pracy obejmował:

- uzyskanie i walidację otrzymanych wyników pomiarów.

Oświadczam, że samodzielna oraz możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr **Kamila Kawonia** przy opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części eksperymentalnej, analizie i interpretacji wyników niniejszej pracy. Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr **Kamila Kawonia** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.



(podpis współautora)

Kraków, 09/12/2025r.
(miejsowość, data)

mgr inż. Aleksandra Wilk

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
Akademia Górniczo-Hutnicza
im. Stanisława Staszica w Krakowie
al. Adama Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pod tytułem:

„Modulatory role of the ketogenic diet in glial scar formation after traumatic brain injury - FTIR, Raman and X-ray fluorescence microscopy study”. (w recenzji)

oświadczam, że mój wkład w powstanie ww. pracy obejmował:

- pomoc przy przeprowadzeniu eksperymentu w Elettra Sincrotrone w Trieście we Włoszech na linii pomiarowej XRF/IAEA.

Oświadczam, że samodzielna oraz możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład mgr **Kamila Kawonia** przy opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części eksperymentalnej, analizie i interpretacji wyników niniejszej pracy. Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez mgr **Kamila Kawonia** jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.


(podpis współautora)

Oryginalne wersje publikacji i manuskryptów stanowiących podstawę rozprawy

A1: Kamil Kawoń, Zuzanna Setkowicz, Agnieszka Drózdź, Krzysztof Janeczko, Joanna Chwiej, *The methods of vibrational microspectroscopy reveals long-term biochemical anomalies within the region of mechanical injury within the rat brain*, Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc 2021; 263, 120214. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2021.120214>.

Strony 59-67

A2: Kamil Kawoń, Marzena Rugieł, Zuzanna Setkowicz, Katarzyna Matusiak, Aldona Kubala-Kukuś, Ilona Stabrawa, Karol Szary, Zuzanna Rauk, Joanna Chwiej, *Ketogenic diet influence on the elemental homeostasis of internal organs is gender dependent*, Scientific Reports 2023 13:1 13 (2023) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45611-4>.

Strony 68-78

Suplement do pracy A2: strony 79-80

A3: Kamil Kawoń, Zuzanna Setkowicz, Zuzanna Rauk, Joanna Chwiej, *Vibrational spectroscopy methods reveal biochemical changes associated with the glial scar formation after traumatic brain injury*, Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc 2025; 345, 126782. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2025.126782>.

Strony 81-95

Suplement do pracy A3: strony 96-102

S1: Kamil Kawoń, Zuzanna Setkowicz, Zuzanna Rauk, Mateusz Czyżycki, Aleksandra Wilk, Anna Sławek, Jakub Cieślak, Giuliana Aquilanti, Ilaria Carlomagno, Agnieszka Drózdź, Joanna Chwiej, *Modulatory role of the ketogenic diet in glial scar formation after traumatic brain injury - FTIR, Raman and X-ray fluorescence microscopy study*, (W recenzji w Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc)

Strony 103-133

Suplement do pracy S1: strony 134-138



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/saa

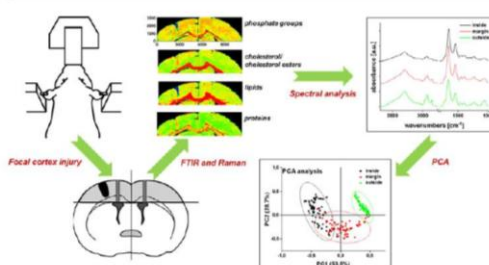
The methods of vibrational microspectroscopy reveals long-term biochemical anomalies within the region of mechanical injury within the rat brain

Kamil Kawon^{a,1}, Zuzanna Setkowicz^{b,1}, Agnieszka Drozd^a, Krzysztof Janeczko^b, Joanna Chwiej^{a,*}^a AGH University of Science and Technology, Faculty of Physics and Applied Computer Science, Krakow, Poland^b Jagiellonian University, Institute of Zoology and Biomedical Research, Krakow, Poland

HIGHLIGHTS

- Understanding of local and remote biochemical changes induced by traumatic brain injury can help to prevent its later pathological effects.
- Analysis of brain tissue using the methods of vibrational spectroscopy allowed to detect significant biomolecular anomalies resulting from the process of glial scarring.
- Significantly decreased accumulation of lipids as well as compounds containing phosphate and carbonyl groups and the elevated levels of proteins and cholesterol/cholesterol esters were found within the injury site.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 April 2021
 Received in revised form 12 July 2021
 Accepted 17 July 2021
 Available online 22 July 2021

Keywords:

Traumatic brain injury
 Animal models
 Fourier transform infrared microspectroscopy
 Raman microscopy
 Principal component analysis (PCA)

ABSTRACT

Traumatic brain injury (TBI), meaning functional or structural brain damage which appear as a result of the application of the external physical force, constitutes the main cause of death and disability of individuals and a great socioeconomic problem. To search for the new therapeutic strategies for TBI, better knowledge about posttraumatic pathological changes occurring in the brain is necessary. Therefore in the present paper the Fourier transform infrared microspectroscopy and Raman microscopy were used to examine local and remote biochemical changes occurring in the rat brain as a result of focal cortex injury. The site of the injury and the dorsal part of the hippocampal formation together with the above situated cortex and white matter were the subject of the study. The topographic and quantitative biochemical analysis followed with the statistical study using principal component analysis showed significant biomolecular anomalies within the lesion site but not in the area of the dorsal hippocampal formation and in the above situated white matter and cortex. The observed intralésional anomalies included significantly decreased accumulation of lipids and their structural changes within the place of injury. Also the levels of compounds containing phosphate and carbonyl groups were lower within the lesion site comparing to the surrounding cortex. The opposite relation was, in turn, found for the bands characteristic to proteins and cholesterol/cholesterol esters.

© 2021 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

* Corresponding author.

E-mail address: joanna.chwiej@fis.agh.edu.pl (J. Chwiej).¹ Equally contributed.<https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120214>

1386-1425/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier B.V.

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is the injury sustained after the application of the external physical force which causes temporary or permanent, functional or structural, brain damages [1,2]. TBI which constitutes the main cause of death and disability of individuals is also a great socioeconomic challenge [3]. Each year around 50 million of new TBI cases occur in the world [3]. Most of them are the mild cases which are non-fatal and do not change the life expectancy. They may, however, lead to the lifelong disabilities [4].

The primary injury in case of TBI is caused directly by the mechanical force and may involve the skull fracture, contusion, concussion and laceration [5]. The secondary injury, being the consequence of the primary one, covers all the events and processes which lead to various cellular, tissular and behavioural pathologies that may manifest after hours, days or even years from the force action [6]. A time gap occurring between the primary and secondary brain injuries and its neuropathological symptoms, push to look for therapies that used during this period would eliminate or at least attenuate the negative medical conditions being an outcome of TBI [1,2,7].

To successfully search for the new therapeutic strategies for TBI we need to get the better knowledge about posttraumatic pathophysiology and identify the cellular and molecular targets that allow to propose successful new treatments. Such studies cannot be performed on human beings but on the animal models which mimics some aspects of human TBI and are developed and used for this purpose. The existing models are divided based on the type of applied force (controlled cortical impact, fluid percussion, weight drop, impact acceleration, inertial acceleration, blast injury) and the presence or absence of craniectomy. They can also be classified as focal, diffuse and mixed [1,8,9].

In our study we used the rat model of the penetrating brain injury. It is a type of an open TBI with the smaller degree damage but with a blood-brain barrier disruption [10,11]. The utilized approach allowed us to regulate the severity of brain damage as well as to avoid the countercoup injury and the skull fracture. In such a model we examined the influence of the mechanical injury on the brain distribution, accumulation and structure of main biomolecules including proteins, lipids, compounds containing phosphate and carbonyl groups. It is necessary to mention that it has never been done before in such experimental regime so far. The site of the injury and the dorsal part of the hippocampal formation together with the above situated cortex and white matter were the subject of the study. For the topographic and semi-quantitative biochemical analysis we used Fourier transform infrared microspectroscopy (FTIR) which was successfully utilized in our previous research concerning the rat models of seizures [12,13], the neuroprotection with ketogenic diet [14,15] as well as the biocompatibility of iron oxide nanoparticles [16]. In the paper we also carried out advanced statistical evaluation of the spectral data and we used for this purpose one of the multivariate methods, namely the principal component analysis (PCA).

2. Materials and methods

2.1. Animals

All procedures using experimental animals were approved by the Bioethical Commission of Jagiellonian University (agreement no. 41/2010) and were in accordance with the international standards. The adult male Wistar rats came from the Institute of Pediatrics, Collegium Medicum, Jagiellonian University in Cracow. The animal experiment was carried out at the Department of Neuroanatomy, Institute of Zoology and Biomedical Research (Jagiellonian University, Cracow). During this period, the rats were bred under the conditions of controlled temperature (20 ± 2 °C) and illumination (12-h light:12-h dark cycle). A solid diet in the form of Labofeed and water were available for them *ad libitum*.

2.2. Brain injury

Six rats at the age of thirty days were anesthetized with pentobarbital (Vetbutal, Biowet, Poland, 30 mg/kg i.p.). Lesion was made under aseptic conditions in the left cerebral hemisphere. For that purpose rotating dental drill was used. A drill was inserted down to the white matter underlying the cerebral cortex trying to avoid complete perforation of the cerebral hemisphere wall. The depth of drill penetration was adjusted proportionally to the brain size using a limiting plastic ring fixed on the drill. The drill diameter was 1.2 mm. After the procedure, the skin on the rat head was sutured and the animal was placed back into the cage. This brain lesion model was used in our previous studies on glial response to injury [17–19] and on its epileptogenic effects [20].

Brain injury performed in 30-day-old animals did not contribute to their increased mortality, all rats survived the procedure and reached the age at which the experiment was planned to end (60th day of postnatal life). Due to the limited number of animals planned for these preliminary examinations, it was decided to study a time point 30 days from the injury. This choice was dictated by the fact that after such period of time, as was shown in our previous research, the scar that appears in the brain is fully formed.

2.3. Sample preparation

On the day 60 of life the rats received a lethal dose of pentobarbital and were perfused transcardially with physiological saline solution of high analytical purity. The brains were removed from the skulls, frozen in liquid nitrogen and cut using a cryomicrotome into 15- μ m thick slices. From each brain two specimens were taken, namely the lesion site and the dorsal part of the hippocampal formation, mounted on MirrIR slides (Kevley Technologies) and freeze-dried.

2.4. Fourier transform infrared microspectroscopy

The measurements were done at the Department of Medical Physics and Biophysics using Nicolet iN10 MX (Thermo Fisher Scientific) FTIR microscope. The size of the beam was limited using the aperture and was equal to 25 μ m \times 25 μ m. Liquid nitrogen cooled MCT-A detector was used for the study that were carried out in transfection mode. Typically, 32 scans were accumulated per spectrum and each spectrum was recorded for the wavenumber range of 900–4000 cm^{-1} with the resolution of 8 cm^{-1} . The samples were subjected to raster scanning with the step size equal to 25 μ m in two dimensions.

2.5. Topographic, quantitative and statistical analysis of data

The topographic biochemical analysis was based on the chemical mapping of the main absorption bands or their ratios and was carried out using the OMNIC Picta software (Thermo Scientific, version 9.2.0.86). The same software was used for extraction and preprocessing of the spectra for further quantitative and statistical analysis. The preprocessing of the spectra involved the atmospheric and the baseline correction as well as vector-normalization.

To quantitatively present the obtained data, for each experimental animal the mean values of the examined biochemical parameters (intensities of the absorption bands or the ratios of

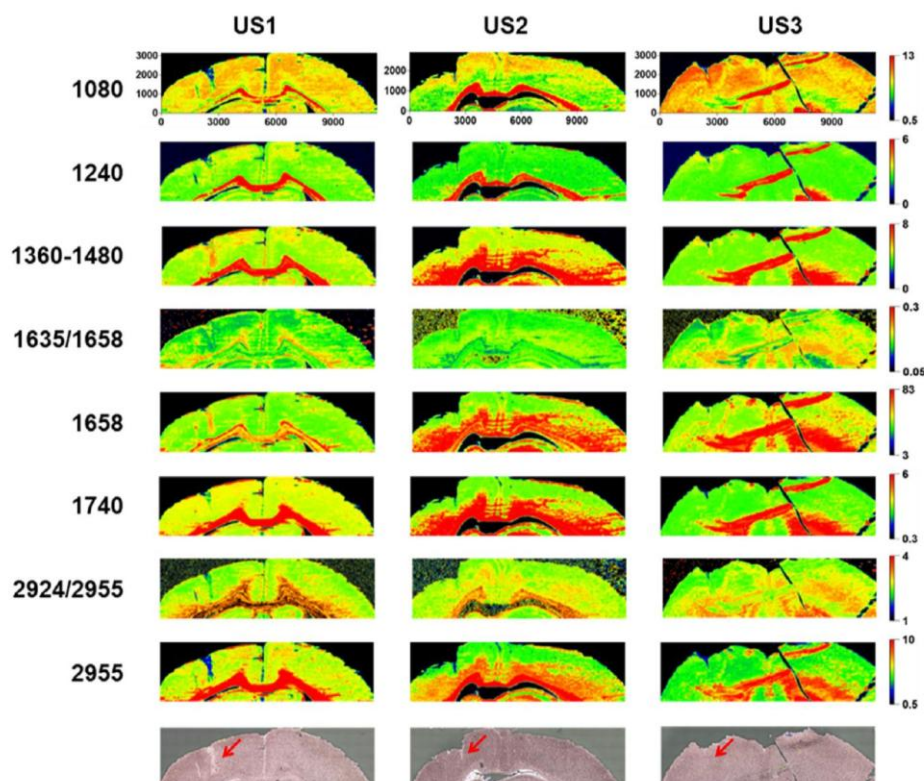


Fig. 1. Examples of chemical mapping on the sections from the three example brains (US 1–3) cut at the level of mechanical injury in the cerebral cortex. The bottom row shows microscope images of the lesion sites (marked with red arrows) in the analysed, histologically unstained brain sections corresponding to the biochemical maps.

intensities) were determined in the compared areas and cellular layers. Typically, the average values were calculated based on 20 spectra. To verify if the differences observed between the areas/cellular layers are statistically relevant, the median values of parameters were determined for the whole population and compared using Mann-Whitney *U* test at the significance level of 5%. In turn, for the statistical evaluation of the spectral data, the PCA was utilized. The PCA was done using Origin software on the second derivative spectra that were previously subjected to the atmospheric and the baseline correction as well as vector-normalization.

3. Results

3.1. Biochemical anomalies within the lesion site

The evaluation of the biochemical changes occurring in the lesion site included the following steps: (1) the topographic analysis of the brain cortex from injured and uninjured hemisphere, (2) the detailed biochemical analysis of the lesion site, (3) the quantitative evaluation of the differences in the accumulation of biomolecules between the place of injury and the surrounding tissue and (4) statistical evaluation of the spectral data using PCA.

The topographic biochemical analysis of the cortex (Fig. 1) and place of injury (Fig. 2) was based on chemical mapping of selected absorption bands or the band ratios which are characterized in the Table 1.

As one can see from the Fig. 1, even excluding the lesion site, the distribution of examined biomolecules within the cortex is strongly nonhomogeneous. Those differences are even more pronounced within the place of injury situated in left upper part of the examined area and concern the distributions of all the examined absorption bands and the ratios of intensities (Figs. 1 and 2). Significantly decreased intensity of 2955 cm^{-1} absorption band and the ratio of 2924 and 2955 cm^{-1} bands, point at the changes in accumulation and structure of lipids within the place of injury. Also the levels of compounds containing phosphate (1080 and 1240 cm^{-1}) and carbonyl (1740 cm^{-1}) groups are lower within the lesion site comparing to the surrounding cortex. The opposite relation was, in turn, found for the bands characteristic to proteins (1658 cm^{-1}) and cholesterol/cholesterol esters (1360–1480 cm^{-1}) which were usually elevated within the injury site.

To quantitatively describe the differences between the inside and the margin part of the lesion site and the surrounding cortex, the data on the values of biochemical parameters in these areas were extracted from the chemical maps of the lesion site. This was done for each animal separately. First, the mean values of parameters were calculated for particular rat and then, based on the obtained data, median, minimal and maximal values as well as interquartile spans were determined for the whole animal population. The obtained values together with the results of statistical evaluation of the differences between the compared areas are presented in the Fig. 3.

As showed in the Fig. 3, the internal part of the lesion site differs significantly both from the neighbouring margin area and the surrounding cortex. The observed differences concern almost all the

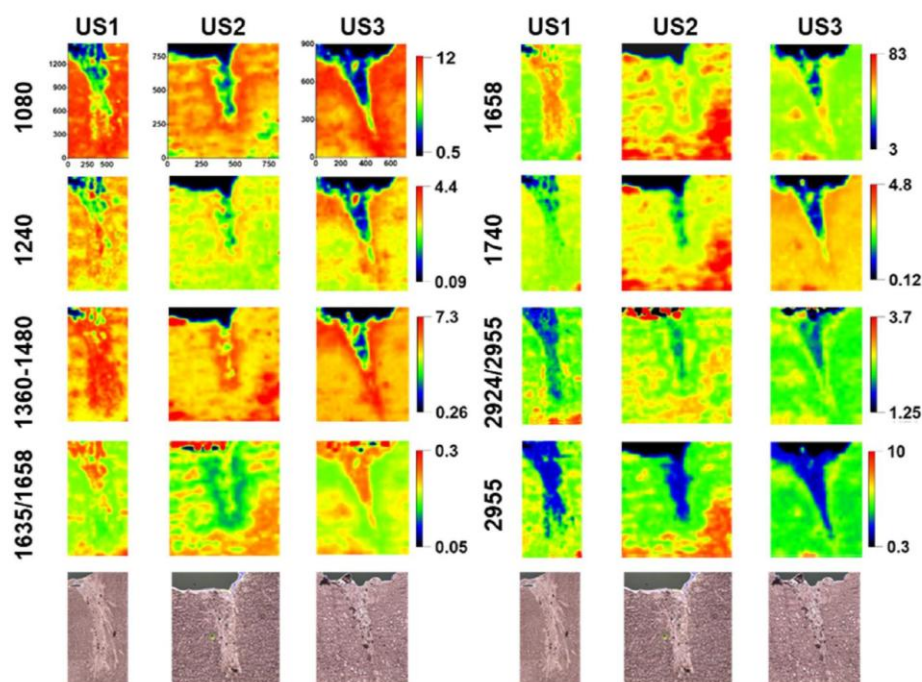


Fig. 2. The detailed topographic analysis of biochemical changes occurring within the mechanically induced lesion site. The bottom row includes microscope images showing the lesion sites in the analysed, histologically unstained brain sections corresponding to the biochemical maps.

Table 1
Examined biochemical parameters [16,21].

Absorption and (ratio of bands)	Remarks
1080 cm^{-1}	distribution of compounds containing phosphate group(s) including nucleic acids
1240 cm^{-1}	phospholipids, phosphorylated carbohydrates, differences in the degree of phosphorylation of carbohydrates and glycoproteins
1360–1480 cm^{-1}	distribution of lipids, cholesterol esters and cholesterol
1635/1658 cm^{-1}	structural changes of proteins
1658 cm^{-1}	amide I band, proteins distribution
1740 cm^{-1}	distribution of compounds containing carbonyl group (s) including phospholipids, cholesterol esters, ketone bodies
2924/2955 cm^{-1}	structural changes of saturated lipids
2955 cm^{-1}	distribution of saturated lipids

examined biochemical parameters and this confirms previously described qualitative data obtained from chemical maps. The results of quantitative analysis allowed us to identify the compounds which level change most severely in the injured tissue. These are lipids and compounds containing phosphate groups and the median intensities of their absorption bands (2955 and 1080 cm^{-1}) are more than two times lower in the central part of lesion than in the surrounding brain cortex.

The farther step of the study was advanced statistical analysis of the spectra taken from the area of injury, its margin and the surrounding brain cortex. The results of PCA carried out on the second derivative spectra are presented in the Fig. 4C whilst the mean spectra and their second derivatives obtained for the examined

areas in the Fig. 4A and 4B. Additionally, in the Fig. 1S of Supplementary materials the loading plots for PC1 and PC2 components are shown. Even coarse analysis of the spectra from the Fig. 4A clearly indicates that the intensity of the absorption bands characteristic for the main biomolecules differ significantly among the three examined regions. The spectra from the internal region of injury are characterized by lower absorption within the wavenumber ranges specific for lipids and phosphate groups. In turn, the intensity of the protein amide I band is higher for both the inside and margin part of lesion comparing to the surrounding cortex.

As we can see from PCA plot presented in the Fig. 4C, the spectra representing the inside part of the injury and the cortex (outside) are well separated in the space of the first and second principal components. The spectra measured in margin part of lesion present similarities to those taken from the two remaining areas. In this context it is necessary to mention that the borders between both the inside and margin part of the lesion as well as the margin and cortex were established subjectively based on the pictures of unfixed and unstained tissue and the chemical maps.

For elucidation and confirmation of the obtained results, the Raman microspectroscopy was used. The lesion sites were raster scanned in the plane perpendicular to the tissue surface with the step of 0.33 μm using the WITec Alpha 300R system. Cluster analysis (CA) performed based on the obtained Raman spectra showed that glial scar differs significantly from the surrounding cortex and can be extracted as an individual cluster alongside the clusters grouping the points from the surrounding tissue, air and glass (Fig. 5B and 5C). From the Fig. 5, one can see also that the observed differences probably concern not only the biomolecular composition of nervous tissue but also its morphology/structure and within the lesion site the tissue is slightly thinner than in the surrounding cortex (Fig. 5C and 5D).

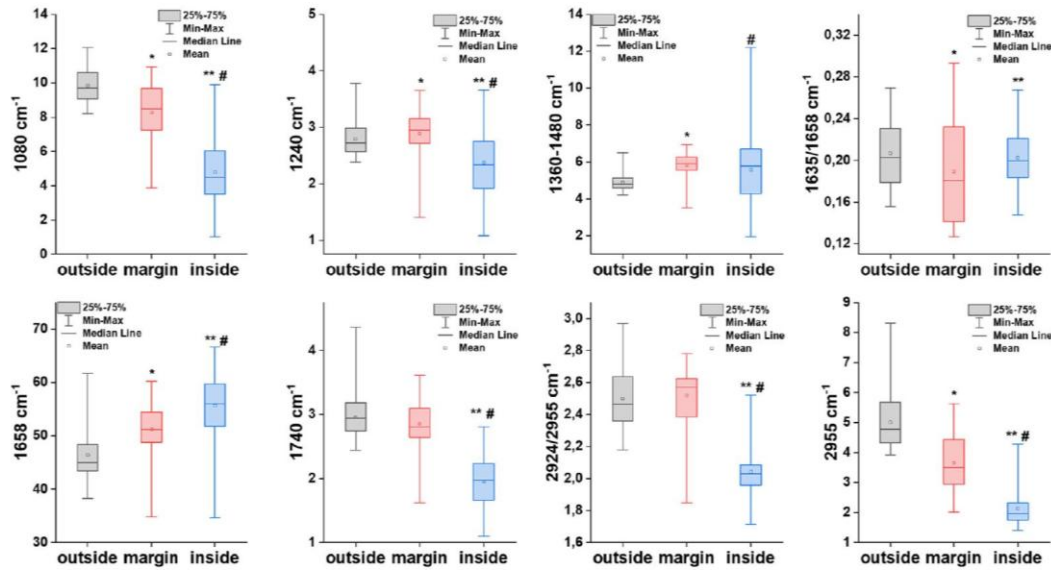


Fig. 3. The box-and-whiskers plots presenting the scatter of the biochemical parameters determined for the inside and margin part of the lesion site and surrounding cortex (outside) for the examined animals. Median, interquartile span and minimal-maximal values in population are marked as a line, a box and whiskers, respectively. Statistically significant differences (Mann-Whitney *U* test, 95% confidence level) between surrounding cortex and margin are marked with *, between margin and inside part of injury with **, and between cortex and internal part of lesion with #.

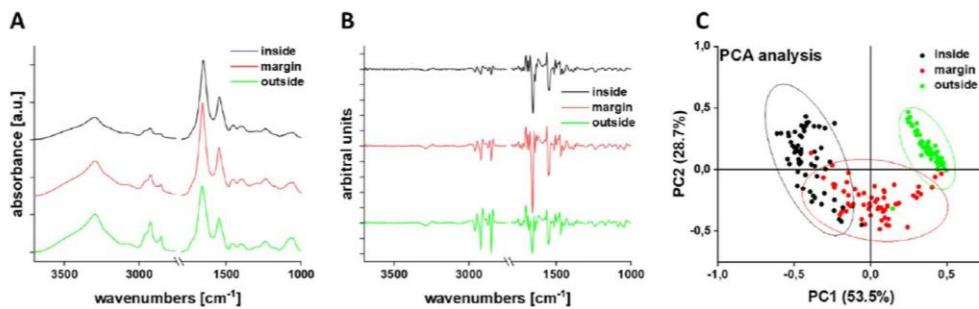


Fig. 4. The average spectra (A) and their second derivatives (B) obtained for the inside and margin part of the injury and the surrounding cortex (outside). The results of PCA carried out on the second derivative spectra from the three mentioned areas (C).

3.2. Biochemical analysis of hippocampal formation region

The hippocampal formation is a brain region known for its particular susceptibility to different types of injuries including those in remote brain areas even of contralateral locations. Therefore, we investigated if local mechanical injury of the cortex might affect biochemical composition of the dorsal part of hippocampus, both ipsi- and contralateral. To do this, for the injured and uninjured brain hemisphere, the mean absorption spectra and their second derivatives were calculated in the pyramidal and granular hippocampal layers as well as in the cortical area and underlying white matter and the obtained data are presented in the Fig. 6A and B. As one can see from these Figures, none pivotal differences among investigated cellular layers and regions from injured and uninjured, contralateral brain hemispheres can be identified. However, in order to confirm this result, PCA on the second derivative spectra was performed and the obtained results are presented in the Fig. 6C. The loading plots for the first two components are, additionally, shown in the Fig. 2S of Supplementary materials.

As it can be noticed from the Fig. 6C, the probability circles for the injured and uninjured hemisphere, containing 95% of cases representing particular group, cover each other in a large part which points that fardistant regions of the two hemispheres do not differ significantly. The less degree of covering was observed for the brain cortex and therefore for this area additional quantitative analysis of biochemical parameters was done and followed with statistical evaluation of significance of the observed differences (Fig. 7). Mann-Whitney *U* test carried out at the 95% confidence level did not show any statistically relevant differences in the biochemical composition of cortex from injured and uninjured hemispheres and the same it confirmed the results of PCA.

4. Discussion

The frequent outcome of mechanical injury of the brain is formation of glial scar appearing as a result of multicellular response of CNS. The pivotal role in the astrogliosis is played by astrocytes,

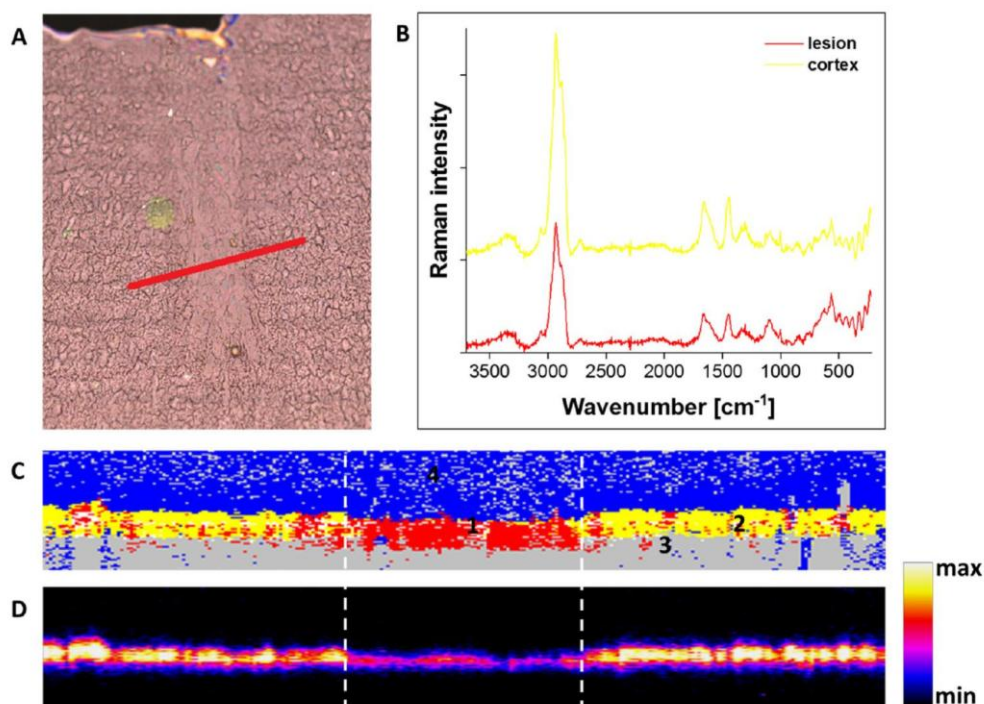


Fig. 5. The data were obtained using the confocal WITec Alpha300R Raman microscope equipped with the 532 nm excitation laser module, the 100x air objective (Zeiss EC Epiplan-Neofluar, NA = 0.9), the UHTS 300 spectrometer (600 gratings/mm) and highly-efficient, thermoelectrically cooled spectroscopy camera. The laser power on the sample was 5 mW whilst the integration time 0.5 s. (A) The picture presenting the region of tissue subjected to raster scanning in the plane perpendicular to the presented surface. (B) The mean Raman spectra obtained for the lesion site and surrounding cortex. Before averaging, individual spectra were subjected to automatic cosmic rays removal procedure and background subtraction. (C) The results of CA (Euclidean distance, Ward's method) done on the preprocessed Raman spectra. The numbers 1, 2, 3 and 4 correspond to the areas distinguished on the basis of a cluster analysis done on pre-processed Raman spectra of the depth profile and constitute: 1 - the area of injury (mostly red), 2 - the surrounding of the lesion (mostly yellow), 3 - sample carrier (mostly grey), 4 - air over the tissue (mostly blue). (D) The results of chemical mapping of the massif 2800–3000 cm^{-1} .

however also other cells may take part in the process including other types of glial cells, neurons and non-neuronal cells derived from bloodstream (leukocytes and platelets) as well as cells intrinsic to the CNS including endothelia, perivascular fibroblasts, pericytes and meningeal cells [22]. Moreover, many nervous cells, adjacent to the injury area, die via apoptotic or necrotic path. The remaining nerve cells, if survive after trauma, can form aberrant connections generating additional excitation, thereby contribute to epileptogenesis or increase susceptibility to seizuregenic stimuli [10].

Our results clearly point that the lesion site differs noticeably from the surrounding cortex area in respect of biochemical composition and the found biomolecular anomalies can be linked with reorganisation and structural changes of the tissue occurring during the astrogliosis process [22]. The results of topographic and quantitative biochemical analysis showed increased intensity of the amide I band (1658 cm^{-1}) within the scar appearing after mechanical brain injury. After mechanical injury multicellular response is initiated in CNS and the main role in glial scarring is played by activated astrocytes and leucocytes which are actively recruited to the place of injury [23]. Therefore, increased intensity of the 1658 cm^{-1} band within the place of injury may be a result of matricellular proteins secretion by astrocytes [24] and the presence of collagens and proteoglycans in the lesion core [24]. Matricellular proteins are not responsible for formation of structural elements in extracellular matrix (ECM), however they modulate cellular matrix interactions and cell function [25]. On the other

hand, our earlier study showed that the tissue surrounding lesion site is rich in zinc [26] – an element necessary for proper functioning of metalloproteinases (MMPs). MMPs are involved in astrocyte migration to the lesion site whilst the expression of MMP-9 is connected with enhanced expression of chondroitin sulphate proteoglycans (CSPGs) [27].

CSPGs, built of protein core and chondroitin sulphate side chain, play a role in processes such as cell adhesion, receptor binding and interactions with extracellular matrix constituents [28]. The most abundant CSPG in CNS is NG2 proteoglycan [28] known for its ability to inhibit the neurite outgrowth. The protein core of NG2 proteoglycan has the secondary structure of β -sheets [29]. The observed elevated ratio of absorbance at the wavenumbers of 1635 and 1658 cm^{-1} means the increase of the relative level of proteins having β -type secondary structure [30] and may be linked with higher secretion of CSPG to the ECM during the processes of repair occurring after the mechanical injury [12,30]. A similar phenomenon was observed in humans after TBI, when the number of amyloid β deposits increased [31].

The healthy cortex tissue is predominantly built from cells which are surrounded by biological membranes containing phospholipids, cholesterol and anchored proteins. The cell nucleuses contain chromatin consisting mainly of nucleic acids. The found decreased level of compounds containing phosphate groups within the lesion site well corresponds with our previous study pointing at decreased phosphorus level for this area [26] and confirms the replacement of the destroyed cells by glial scar which is formed

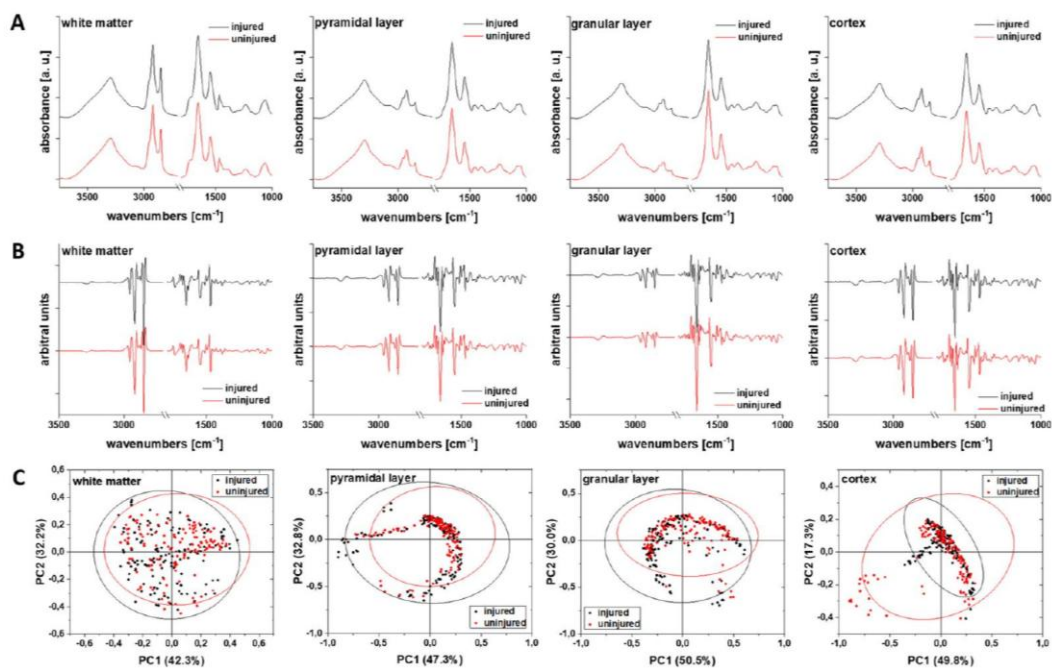


Fig. 6. The comparison of (A) average spectra (subjected to atmospheric and baseline corrections) and (B) second derivative spectra obtained for white matter, pyramidal and granular layer of hippocampal formation as well as the cortex from the injured and control, uninjured, brain hemisphere. (C) The results of PCA performed on the second derivative of vector-normalized spectra separately for each examined region/cellular layer. As the spectra of outliers determined using PCA were of good quality, had appropriate signal to noise ratio, did not present the instrumental artifacts and significant differences in the shape comparing to the mean spectrum from the examined brain area, they were not removed from the data set.

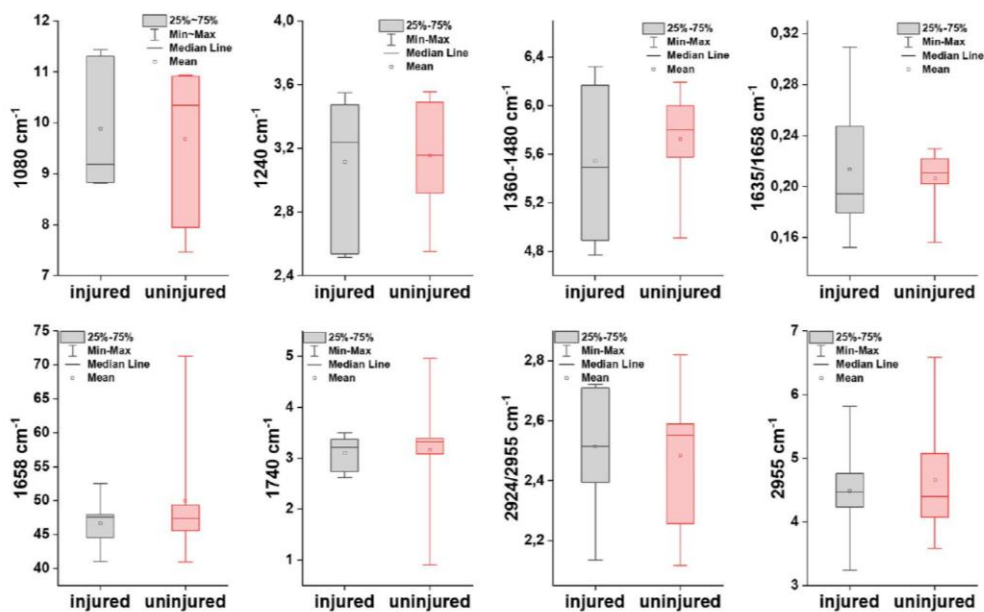


Fig. 7. The box-and-whiskers plots presenting the scatter of the biochemical parameters determined for the cortex of injured and uninjured brain hemisphere. Median, mean, interquartile span and minimal-maximal values in population are marked as a line, small square, box and whiskers, respectively. Mann-Whitney *U* test (95% confidence level) did not show any statistically significant differences between the compared brain areas.

from proteins and other substantial components of ECM [32]. Also diminished level of lipids manifesting in the changes of intensity of the 2955 cm^{-1} band is probably linked with the destruction of healthy tissue and especially its cellular constituents [33].

It is known that the hippocampal formation is the structure especially susceptible to brain damages which may lead to enhanced neurogenesis in granular cell layer and epilepsy development [34,35]. Therefore, besides the region of scar formation, the influence of mechanical injury on the biochemical composition of the dorsal part of the hippocampus and the dorsally located white matter and the cortex were examined. Spectral analysis supported by PCA did not show any significant differences between the granular and pyramidal hippocampal layers as well as the areas of white matter and cortex from injured and uninjured hemispheres. Further quantitative analysis confirmed these results which are also in agreement with the behavioural observations in rats after the injury which did not show any symptoms of spontaneous seizures. Reassuring, the local mechanical brain injury used in our study did not cause any significant changes in biochemical composition of the hippocampal formation, probably because the lesions were examined one month after the injury, while the response of the hippocampal cells at the molecular level might occur earlier. Only regular multistage examination of the process of glial scar formation after the injury can explain this phenomenon.

5. Conclusions

The methods of vibrational spectroscopy such as FTIR microscopy and Raman microspectroscopy are suitable to establish biomolecular changes appearing in the brain tissue as a result of TBI. The changes occurring in the aftermath of the glial scarring include anomalies in the levels and structure of lipids and proteins. What is more abnormalities in the accumulation of compounds containing phosphate and carbonyl groups as well as cholesterol were noticed within the lesion site.

CRedit authorship contribution statement

Kamil Kawon: Methodology, Investigation, Validation, Formal analysis, Visualization, Writing - original draft. **Zuzanna Setkiewicz:** Conceptualization, Methodology, Resources, Investigation, Writing - review & editing. **Agnieszka Drozd:** Methodology, Investigation, Writing - review & editing. **Krzysztof Janeczko:** Conceptualization, Writing - review & editing. **Joanna Chwiej:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Validation, Supervision, Writing - original draft.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

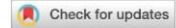
Acknowledgements

This work was partially financed by the Ministry of Education and Science of Poland and the statutory research fund no. N18/DBS/000018 of the Laboratory of Experimental Neuropathology (Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University). Part of the presented results were obtained using apparatus bought in frame of the "Excellence Initiative-Research University" Project granted to AGH UST.

References

- [1] D. Lerouet, C. Marchand-Leroux, V.C. Besson, Neuropharmacology in traumatic brain injury: from preclinical to clinical neuroprotection? *fcpl2656 Fundam. Clin. Pharmacol.* (2021), <https://doi.org/10.1111/fcp.12656>.
- [2] R. Crupi, M. Cordaro, S. Cuzzocrea, D. Impellizzeri, Management of traumatic brain injury: From present to future, *Antioxidants* 9 (2020), <https://doi.org/10.3390/antiox9040297>.
- [3] A.L.R. Maas, D.K. Menon, P.D. David Adelson, N. Andelic, M.J. Bell, A. Belli, P. Bragge, A. Brazinova, A. Büki, R.M. Chesnut, G. Citerio, M. Coburn, D. Jamie Cooper, A. Tamara Crowder, E. Czeiter, M. Czosnyka, R. Diaz-Arrastia, J.P. Dreier, A.C. Duhaime, A. Ercole, T.A. van Essen, V.L. Feigin, G. Gao, J. Giacino, L.E. Gonzalez-Lara, R.L. Gruen, D. Gupta, J.A. Hartings, S. Hill, J.Y. Jiang, N. Ketharanathan, E.J.O. Kompanje, L. Lanyon, S. Laureys, F. Lecky, H. Levin, H.F. Lingsma, M. Maegele, M. Majdan, G. Manley, J. Marsteller, L. Mascia, C. McFadyen, S. Mondello, V. Newcombe, A. Palotie, P.M. Parizel, W. Peul, J. Piercy, S. Polinder, L. Puybasset, T.E. Rasmussen, R. Rossaint, P. Smielewski, J. Söderberg, S.J. Stanworth, M.B. Stein, N. von Steinbüchel, W. Stewart, E.W. Steyerberg, N. Stocchetti, A. Synnot, B. Te Ao, O. Tenovou, A. Theadom, D. Tibboel, W. Videtta, K.K.W. Wang, W. Huw Williams, L. Wilson, K. Yaffe, H. Adams, J. Allanson, J. Coles, P.J. Hutchinson, A.G. Koliak, B.J. Sahakian, E. Stamatakis, G. Williams, V. Agnoletti, C. Martino, A. Masala, G. Teodorani, F. Zumbo, K. Amrein, E. Ezer, B. Kolumbán, N. Kovács, B. Meleg, J. Nyirádi, A. Sorinola, Z. Vámos, N. Andaluz, A. Anke, S.K. Frisvold, A. Antoni, A.B. van As, A. Figaji, G. Audibert, A. Azaševac, D. Dilvesi, J. Golubović, B. Jelača, M. Karan, K. Kolundžija, A. Negru, P. Vulekovic, P. Azouvi, M.L. Azzolini, L. Beretta, C. Baciuc, V. Beqiri, G. Chevillard, A. Chiericato, M. Sacchi, R. Badenes, F.J. Belda, F. Bilotta, A. Lozano, K.M. Barlow, K.J. Schneider, R. Bartels, H. den Boogert, C. Hoedemaekers, Ö. Sir, U. Bauerfeind, R. Lefering, N. Schäfer, M. Beauchamp, J. Gravel, D. Beer, R. Beer, R. Helbok, S. Höfer, B.M. Bellander, D. Nelson, R. Bellier, T. Bernard, E. Carise, C. Dahyot-Fizelier, B. Giraud, H. Benali, F. Bernard, G. Bertolini, S. Masson, M. Blaabjerg, C. Rosenlund, R.F. Schou, K. Boutis, P. Bouzat, G. Francony, P. Manhes, J.F. Payen, B. Brooks, D. Dewey, C.A. Emery, S. Freedman, A. Kramer, C. Brorsson, L.O. Koskinen, N. Sundström, M. Bullinger, E. Burns, E. Calappi, F. Ortolano, P. Cameron, A.M. Castañón-León, P.A. Gómez López, A. Lagares, F. Causin, U. Freo, P. Persona, S. Rossi, B. Christie, M. Cnossen, D. Dippel, K. Foks, J.A. Haagsma, I. Haitsma, J.A. Huijben, M. van der Jagt, D. Nieboer, V. Volovic, D.C. Voormolen, J. Collett, H. Dawes, P. Esser, C. van Heugten, F. Della Corte, F. Grossi, W. Craig, G. Csato, A. Csomos, N. Curry, C. Dematteo, M. Meade, B. Depreitere, J. van Dijk, G.C.W. de Ruiter, C. Vleggeert-Lankamp, K. Dizdarevic, E. Donoghue, D. Gantner, L. Murray, T. Trapani, S. Vallance, O. Duek, I. Lazar, G.L. Dulière, H. Maréchal, A. Dzeko, G. Eapen, S. Jankowski, S. English, D. Fergusson, M. Osmond, M. Fabricius, D. Kondziella, J. Feng, J. Hui, J. Fleming, R. Latini, I. Gagnon, A. Ptitto, D. Galanaud, B. Glocker, K. Kamnitsas, C. Ledig, D. Rueckert, W.A. Gordon, P. Gradisek, D. Griesdale, A.K. Häberg, W. van Hecke, D. Smeets, J. Verheyden, T. Vande Vyvere, E. Helseth, C. Røe, O. Røise, L. Horton, B. Jacobs, J. van der Naalt, K. Janssens, V. De Keyser, T. Menovsky, D. Van Praag, K.M. Jones, R. Kapš, A. Katila, J. Posti, R. Takala, K.M. Kaukonen, R. Kivisaari, A. Piippo-Karjalainen, R. Raj, P. Tanskanen, D. Kutsogiannis, T. Kyprianou, F. Lamontagne, F. Lauzier, L. Moore, A. Turgeon, V. Legrand, L. Levi, M. Zaaroor, R. Lightfoot, S. Macdonald, S. Major, P. Vajkoczy, L. Wessels, M.K.L. Winkler, S. Wolf, A. Manara, M. Thomas, J. Matern, O. Sakowitz, L. Vogt, A. Younsi, B. McFadyen, C. McMahon, M.M. Correia, M.C. Morganti-Kossmann, J.V. Rosenfeld, H. Muehlan, S. Schmidt, P. Mukherjee, Q. Noirhomme, M. Oddo, D.O. Okonkwo, A.W. Oldenbeuving, G. Roks, G.A. Schoonman, V. Perlberg, N. Pichon, S. Pili-Floury, M. Pirinen, H. Pleš, M.A. Poca, A. Radoi, J. Sahuquillo, A. Ragauskas, S. Rocka, R.G.L. Real, R. Telgmann, N. Reed, J. Rhodes, C. Robertson, J. Rosand, G. Rosenthal, G. Salvato, R. Sánchez-Porras, J. Sándor, G. Sangha, D. Schnyer, H. Schöhl, T. Skandsen, A. Stevanovic, J.V. van Waesberghe, R.D. Stevens, F.S. Taccone, M.S. Taylor, V. Zelinkova, N. Temkin, C. M. Tolias, A.B. Valadka, E. Valeinis, A. Vargiolu, E. Vega, A. Vik, R. Vilcinis, E. Wildschut, G. Wood, N. Xirouchaki, R. Zemek, Traumatic brain injury: Integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research, *Lancet Neurol.* 16 (2017) 987–1048, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30371-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30371-X).
- [4] K.J. Dixon, Pathophysiology of Traumatic Brain Injury, *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 28 (2017) 215–225, <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2016.12.001>.
- [5] M. Prins, T. Greco, D. Alexander, C.C. Giza, The pathophysiology of traumatic brain injury at a glance, *DMM Dis. Model. Mech.* 6 (2013) 1307–1315, <https://doi.org/10.1242/dmm.011585>.
- [6] S.Y. Ng, A.Y.W. Lee, Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets, *Front. Cell. Neurosci.* 13 (2019) 528, <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00528>.
- [7] A. Jarrahi, M. Braun, M. Ahluwalia, R.V. Gupta, M. Wilson, S. Munie, P. Ahluwalia, J.R. Vender, F.L. Vale, K.M. Dhandapani, K. Vaibhav, Revisiting traumatic brain injury: From molecular mechanisms to therapeutic interventions, *Biomedicines* 8 (2020) 1–42, <https://doi.org/10.3390/biomedicines8100389>.
- [8] Y. Xiong, A. Mahmood, M. Chopp, Animal models of traumatic brain injury, *Nat. Rev. Neurosci.* 14 (2013) 128–142, <https://doi.org/10.1038/nrn3407>.
- [9] N. Marklund, L. Hillered, Animal modelling of traumatic brain injury in preclinical drug development: Where do we go from here?, *Br. J. Pharmacol.* 164 (2011) 1207–1229, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01163.x>.
- [10] Z. Setkiewicz, M. Ciarach, R.X. Guzik, K. Janeczko, Different effects of neuroprotectants FK-506 and cyclosporin A on susceptibility to pilocarpine-

- induced seizures in rats with brain injured at different developmental stages, *Epilepsy Res.* 61 (2004) 63–72, <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2004.06.001>.
- [11] K. Janeczko, R. Pawliński, Z. Setkowicz, M. Ziąja, Z. Soltys, A. Ryszka, Long-term postnatal effect of prenatal irradiation on the astrocyte proliferative response to brain injury, *Brain Res.* 770 (1997) 237–241, [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00873-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00873-1).
- [12] J. Chwiej, J. Dulinska, K. Janeczko, P. Dumas, D. Eichert, J. Dudala, Z. Setkowicz, Synchrotron FTIR micro-spectroscopy study of the rat hippocampal formation after pilocarpine-evoked seizures, *J. Chem. Neuroanat.* 40 (2010) 140–147, <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2010.03.008>.
- [13] J. Kutorasinska, Z. Setkowicz, K. Janeczko, C. Sandt, P. Dumas, J. Chwiej, Differences in the hippocampal frequency of creatine inclusions between the acute and latent phases of pilocarpine model defined using synchrotron radiation-based FTIR microspectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 7337–7345, <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7191-8>.
- [14] A. Skoczen, Z. Setkowicz, K. Janeczko, C. Sandt, F. Borondics, J. Chwiej, The influence of high fat diets with different ketogenic ratios on the hippocampal accumulation of creatine – FTIR microspectroscopy study, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 184 (2017) 13–22, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.04.085>.
- [15] J. Chwiej, A. Skoczen, K. Matusiak, K. Janeczko, A. Patulska, C. Sandt, R. Simon, M. Ciarach, Z. Setkowicz, The influence of the ketogenic diet on the elemental and biochemical compositions of the hippocampal formation, *Epilepsy Behav.* 49 (2015) 40–46, <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.04.042>.
- [16] A. Drozd, K. Matusiak, Z. Setkowicz, M. Ciarach, K. Janeczko, C. Sandt, F. Borondics, D. Horak, M. Babic, J. Chwiej, FTIR microspectroscopy revealed biochemical changes in liver and kidneys as a result of exposure to low dose of iron oxide nanoparticles, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 236 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118355>.
- [17] K. Janeczko, Age-dependent changes in the proliferative response of S-100 protein-positive glial cells to injury in the rat brain, *Int. J. Dev. Neurosci.* 12 (1994) 431–440, [https://doi.org/10.1016/0736-5748\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0736-5748(94)90027-2).
- [18] K. Janeczko, Spatiotemporal patterns of the astroglial proliferation in rat brain injured at the postmitotic stage of postnatal development: a combined immunocytochemical and autoradiographic study, *Brain Res.* 485 (1989) 236–243, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90566-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90566-0).
- [19] Z. Setkowicz, M. Ciarach, Neuroprotectants FK-506 and cyclosporin A ameliorate the course of pilocarpine-induced seizures, *Epilepsy Res.* 73 (2007) 151–155, <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2006.09.001>.
- [20] Z. Setkowicz, K. Janeczko, Long-term changes in susceptibility to pilocarpine-induced status epilepticus following neocortical injuries in the rat at different developmental stages, *Epilepsy Res.* 53 (2003) 216–224, [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(03\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(03)00029-9).
- [21] M. Beekes, P. Lasch, D. Naumann, Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research, *Vet. Microbiol.* 123 (2007) 305–319, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.010>.
- [22] M.V. Sofroniew, Astrogliosis, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7 (2015) a020420, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020420>.
- [23] C. Raposo, M. Schwartz, Glial scar and immune cell involvement in tissue remodeling and repair following acute CNS injuries, *Glia.* 62 (2014) 1895–1904, <https://doi.org/10.1002/glia.22676>.
- [24] E.V. Jones, D.S. Bouvier, Astrocyte-secreted extracellular matrix proteins in CNS remodelling during development and disease, *Neural Plast.* 2014 (2014), <https://doi.org/10.1155/2014/321209>.
- [25] P. Bornstein, E.H. Sage, Extracellular matrix proteins: Extracellular modulators of cell function, *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 (2002) 608–616, [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00361-7](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00361-7).
- [26] J. Chwiej, A. Sarapata, K. Janeczko, Z. Stegowski, K. Appel, Z. Setkowicz, X-ray fluorescence analysis of long-term changes in the levels and distributions of trace elements in the rat brain following mechanical injury, *J. Biol. Inorg. Chem.* 16 (2011) 275–283, <https://doi.org/10.1007/s00775-010-0724-0>.
- [27] J.Y.C. Hsu, L.Y.W. Bourguignon, C.M. Adams, K. Peyrollier, H. Zhang, T. Fandel, C. L. Cun, Z. Werb, L.J. Noble-Haeusslein, Matrix metalloproteinase-9 facilitates glial scar formation in the injured spinal cord, *J. Neurosci.* 28 (2008) 13467–13477, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2287-08.2008>.
- [28] S.A. Busch, J. Silver, The role of extracellular matrix in CNS regeneration, *Curr. Opin. Neurobiol.* 17 (2007) 120–127, <https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.09.004>.
- [29] E. Tamburini, A. Dallatomasina, J. Quartararo, B. Cortelazzi, D. Mangieri, M. Lazzaretti, R. Perris, Structural deciphering of the NG2/CSPG4 proteoglycan multifunctionality, *FASEB J.* 33 (2019) 3112–3128, <https://doi.org/10.1096/fj.201801670R>.
- [30] L.L. Jones, Y. Yamaguchi, W.B. Stallcup, M.H. Tuszynski, NG2 Is a Major Chondroitin Sulfate Proteoglycan Produced after Spinal Cord Injury and Is Expressed by Macrophages and Oligodendrocyte Progenitors, *J. Neurosci.* 22 (2002) 2792–2803, <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-07-02792.2002>.
- [31] V.E. Johnson, W. Stewart, D.H. Smith, Traumatic brain injury and amyloid- β pathology: A link to alzheimer's disease?, *Nat. Rev. Neurosci.* 11 (2010) 361–370, <https://doi.org/10.1038/nrn2808>.
- [32] P. Lasch, A. Pacifico, M. Diem, Spatially resolved IR microspectroscopy of single cells, *Biopolymers* 67 (2002) 335–338, <https://doi.org/10.1002/bip.10095>.
- [33] R.M.C. Dawson, The animal phospholipids: their structure, metabolism and biological significance, *Biol. Rev.* 32 (1957) 188–229, <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1957.tb01562.x>.
- [34] K. Sendrowski, W. Sobaniec, Hippocampus, hippocampal sclerosis and epilepsy, *Pharmacol. Reports.* 65 (2013) 555–565, [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)71033-8](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71033-8).
- [35] P.K. Dash, S.A. Mach, A.N. Moore, Enhanced neurogenesis in the rodent hippocampus following traumatic brain injury, *J. Neurosci. Res.* 63 (2001) 313–319, [https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20010215\)63:4<313::AID-JNR1025>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20010215)63:4<313::AID-JNR1025>3.0.CO;2-4).



OPEN Ketogenic diet influence on the elemental homeostasis of internal organs is gender dependent

Kamil Kawon¹, Marzena Rugeł¹, Zuzanna Setkiewicz², Katarzyna Matusiak¹, Aldona Kubala-Kukus^{3,4}, Ilona Stabrawa^{3,4}, Karol Szary^{3,4}, Zuzanna Rauk² & Joanna Chwiej¹✉

The ketogenic diet (KD) is a low-carbohydrate and high-fat diet that gains increasing popularity in the treatment of numerous diseases, including epilepsy, brain cancers, type 2 diabetes and various metabolic syndromes. Although KD is effective in the treatment of mentioned medical conditions, it is unfortunately not without side effects. The most frequently occurring undesired outcomes of this diet are nutrient deficiencies, the formation of kidney stones, loss of bone mineral density, increased LDL (low-density lipoprotein) cholesterol levels and hormonal disturbances. Both the diet itself and the mentioned adverse effects can influence the elemental composition and homeostasis of internal organs. Therefore, the objective of this study was to determine the elemental abnormalities that appear in the liver, kidney, and spleen of rats subjected to long-term KD treatment. The investigation was conducted separately on males and females to determine if observed changes in the elemental composition of organs are gender-dependent. To measure the concentration of P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn and Se in the tissues the method of the total reflection X-ray fluorescence (TXRF) was utilized. The obtained results revealed numerous elemental abnormalities in the organs of animals fed a high-fat diet. Only some of them can be explained by the differences in the composition and intake of the ketogenic and standard diets. Furthermore, in many cases, the observed anomalies differed between male and female rats.

The ketogenic diet (KD) is characterized by the complete elimination or the reduction of carbohydrate intake, and the main source of energy during its use are fats and proteins¹. During a normal diet, the glycolysis process dominates, and the precursor for the production of adenosine triphosphate (ATP) in the body is pyruvate, which participates in the Krebs cycle. In case of KD, however, the intensity of beta-oxidation of fatty acids in the liver and the synthesis of ketone bodies (acetoacetate, beta-hydroxybutyrate and acetone) significantly increases². The metabolism of ketone bodies is similar to the metabolism of carbohydrates, with the difference that instead of pyruvate, the precursor for acetyl-CoA, which enter the Krebs cycle, is beta-hydroxybutyrate².

Although KD has been used for many years as an individual or adjuvant therapy in the treatment of various diseases, the mechanisms of its curative effect are still not fully understood. For around hundred years KD has been utilized for the management of refractory seizures. It is mostly used to treat pediatric epilepsies but gives satisfactory results also in adolescents and adults^{3–5}. The postulated mechanism of anticonvulsant effect of KD consists in the fact that as a low-carbohydrate diet it leads, by reducing the intensity of the glycolysis process, to a decrease in ATP available in the cytoplasm. The decreased level of ATP in the cytoplasm of nerve cells results in the opening of ATP-dependent potassium channels, which increases the membrane potential and causes a reduced response of cells to the stimuli⁶. In addition, during the use of KD, the concentration of gamma-aminobutyric acid (GABA), which is an inhibitory neurotransmitter in the central nervous system, increases⁶.

The preclinical studies based on animal models have also demonstrated anti-angiogenic, anti-invasive, and pro-apoptotic action of KD in mice with malignant brain cancer⁷. KD enhanced tumor-reactive immune response and sensitized tumors to standard of care therapies used for glioblastoma multiforme (GBM)⁸. Used as adjuvant

¹Faculty of Physics and Applied Computer Science, AGH University of Krakow, Kraków, Poland. ²Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University, Kraków, Poland. ³Institute of Physics, Jan Kochanowski University, Kielce, Poland. ⁴Holy Cross Cancer Center, Kielce, Poland. ✉email: joanna.chwiej@fis.agh.edu.pl

treatment to radiotherapy it led to additional reduction of tumor growth and increased survival of animals with glioma⁹. Glioma cells are characterized by increased energy demand¹⁰. It is also postulated that, unlike normal glial cells and neurons, they are not able to use ketone bodies and survive the metabolic stress caused by glucose deficiency¹⁰. Therefore, KD changing the main source of energy for the metabolism from glucose to ketone bodies can negatively affect cancer cells, saving normal ones, and thus selectively inhibit tumor growth and improve the survival of patients suffering from GBM.

Despite the confirmed or expected therapeutic efficiency of KD in case of various diseases, this diet is not free from undesirable reactions and the most common side effects of KD include nausea, vomiting, headaches and dizziness, fatigue, insomnia, difficulties in tolerating exercise, and constipation. In turn long-term undesirable effects involve fatty liver, protein, vitamin and mineral deficiencies and the appearance of kidney stones¹¹. Therefore, the aim of this study was to determine the influence of the use of KD on the elemental homeostasis of organs engaged in fat metabolism and/or those in which disorders associated with long-term exposure to ketone bodies during KD are observed. The investigation was carried out on rats. The liver, kidneys and spleen were selected for the study. In the liver, beta-oxidation of fatty acids occurs and ketone bodies are produced, and long-term use of KD can lead to fatty liver¹². The kidneys are responsible for filtering the blood from harmful metabolites, and long-term ketosis can result in hypercalciuria, as a result of which kidney stones can accumulate in the organ¹³. Additionally, the effect of KD on the elemental composition of the spleen was studied. Because of significant gender differences in the range of the overall organism functioning and hormonal balance¹⁴ as well as the regulated by sex hormones lipid and glucose metabolism¹⁵, the study was done, separately, on males and females.

To examine the elemental abnormalities appearing in the digested samples of rat organs the total reflection X-ray fluorescence method (TXRF)¹⁶ was applied. The mentioned instrumental technique of elemental analysis is characterized by the possibility of simultaneous analysis of the content of many elements, small amount of material needed for analysis, short determination time and good detection limit at the ng/g level.

Results

Glucose/ketone bodies concentration in blood of ketogenic and standard diet fed animals

The median blood concentration of glucose in male rats fed with standard laboratory diet was 137 ± 29 mg/dl, and in females 125 ± 20 mg/dl. In turn, the concentration of ketone bodies equaled to 0.51 ± 0.33 mmol/l and 0.72 ± 0.43 mmol/l for male and female controls, respectively. In case of KD fed animals the mentioned above blood parameters were controlled before an experiment (D0) and on the days 3, 5, 11, 19 and 33 of the dietary treatment (marked as D3, D5, D11, D19 and D33, respectively). The progress of the changes of the glucose and ketone bodies levels in blood of animals fed with high fat fodder was presented in the Fig. 1.

As shown in Fig. 1, after 3 days of KD use, a significant increase of the ketone bodies concentration and diminished glucose level in the blood of animals was observed. In the following days of the experiment, the level of ketone bodies slowly decreased, whilst that of glucose increased. Nevertheless, at the end of the experiment, animals fed a high-fat diet were still in a state of dietary ketosis, with the blood ketone bodies concentration higher than 1 mmol/l¹⁷.

Elemental composition of liver, kidney and spleen of ketogenic and standard diet fed animals

Using the TXRF method, the concentration of P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn and Se in the liver, kidney and spleen of each examined rat was determined. These data were used to prepare box-whisker plots (Figs. 2, 3 and 4) presenting the scatter of the results obtained for 4 tested animal populations, namely, for male and female rats on KD (marked as KM and KF groups, respectively) and for the animals of both sexes on the standard laboratory diet (marked as NM and NF groups). In addition, in the Figs. 2, 3 and 4, the results of the Mann–Whitney *U* test showing statistically significant differences between animals of a given gender on KD and an ordinary laboratory diet were placed. In turn, in Table S1 of Appendix, the detection limits (LOD) of the measured elements calculated for 3 studied organs were presented. As one can notice from this Table, the best LOD values were obtained for kidneys and they were the lowest for Se ($0.0373 \mu\text{g/g}$) and the highest for P ($12.87 \mu\text{g/g}$).

As it can be seen in Fig. 2, KD significantly affects the elemental homeostasis of the liver. Apart from Fe, the level of all the analyzed elements is lower in the organ of KD-fed males than in those fed a standard diet. Interestingly, in case of female rats, a statistically significant decrease of the concentration in this organ was found only for Cu, Zn and Se. The reduced accumulation of some of the tested elements in the liver can be explained by their reduced supply in KD (the details in the Fig. S1 of Appendix) and lower fodder weight consumed by rats on KD compared to those on a standard diet. However, these are not the only sources of elemental abnormalities observed in the liver, which is indicated, for example, by gender differences in the accumulation of P, S, K and Ca in the organ.

Much greater gender dissimilarities were observed when analyzing the effect of KD on the elemental composition of the kidneys. Elevated concentrations of Fe, Zn and Ca were found in males, while in females the levels of P and Ca increased. Although renal Ca accumulation was higher after KD in both sexes, this effect was definitely stronger in female rats.

The least number of statistically significant differences in elemental composition, between animals on a ketogenic and standard diet, were recorded for spleen. After a high-fat diet, male and female rats showed, respectively, increased Fe and S level in the organ.

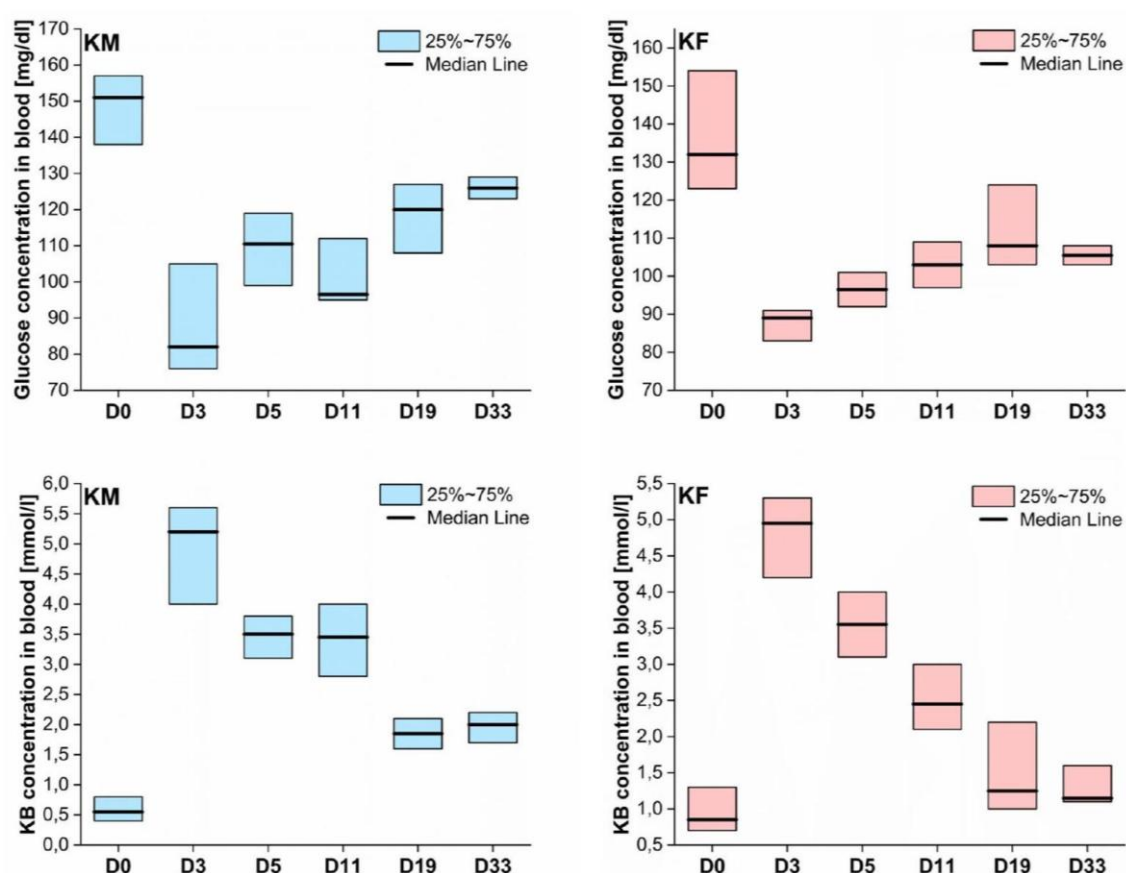


Figure 1. Blood concentration of glucose (upper row) and ketone bodies (lower row) in male (blue) and female rats fed with ketogenic fodder before (D0) and on the days: 3, 5, 11, 19 and 33 of the dietary treatment (D3, D5, D11, D19 and D33, respectively).

Discussion and conclusions

The purpose of this paper was determination of the element abnormalities that appear in the rat internal organs as a result of the treatment with KD. We examined, also, how animal gender influences observed modifications of the element homeostasis. The liver, kidney and spleen were selected for the study, and for the elemental analysis of the digested tissues TXRF method was applied. With the use of it, the concentrations of P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn and Se were determined in the liquid organ samples.

The obtained results showed a large number of elemental abnormalities in the organs taken from animals fed with the high fat fodder. In some cases, the found anomalies were different for male and female rats. Analysis of liver samples showed lower concentration of all elements, except Fe, for male rats fed with the ketogenic fodder. In case of females, the effect was observed only for higher-Z elements, namely, for Cu, Zn and Se. Comparing the content of the examined elements in ketogenic and standard diet (Fig. S1 of the Appendix), one can see that the concentration of most of them (besides K and Zn) in the high fat diet is much lower than in the normal one. This factor, together with the fact that the mass of the fodder consumed by animals is also lower in case of high fat diet, could to some degree explain observed disorder of element homeostasis of the liver. However, different pattern of elemental abnormalities found between male and female rats, normal liver Fe level despite of diminished content of the element in ketogenic fodder, the lack of abnormalities in the range of low-Z elements for female rats, suggest that the diminished level of measured elements in the fodder is not the only reason of the found liver anomalies.

The observed lower concentration of P and Ca in the liver of male rats on KD may be connected with the decreased insulin level during the intake of poor in sugars chow¹⁸. The insulin influences the level of D vitamin, which plays an important role in the process of absorption of P and Ca from the intestines¹⁹. The disturbed absorption and content of these elements in blood may result in their diminished liver concentration. After the treatment of male rats with KD, the decreased K content in the liver was, also, found. Such a result may be an effect of diminished availability of glycogen²⁰ in liver and muscles²¹. K is an important cofactor for glycogen

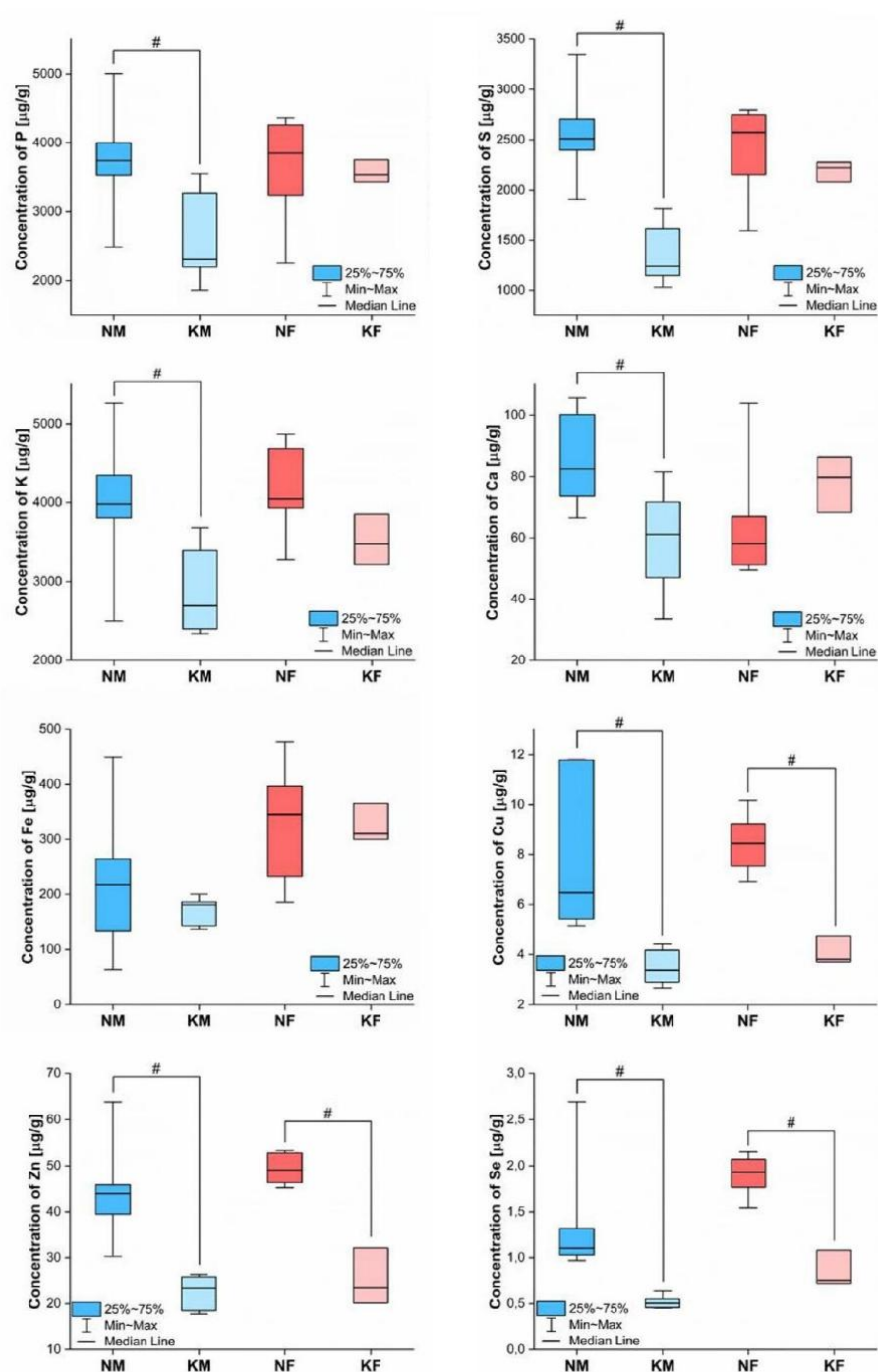


Figure 2. Box-and-whiskers plots presenting the ranges of element concentrations [$\mu\text{g/g}$] in livers taken from male (blue) and female (red) rats fed with ketogenic (groups KM and KF) and standard diets (groups NM and NF). Median (line), interquartile range (box) and minimal-maximal values (whiskers) are marked. The statistically significant differences determined with Mann–Whitney U test (p -value < 0.05) between KD treated animals and controls of given gender are signed with #.

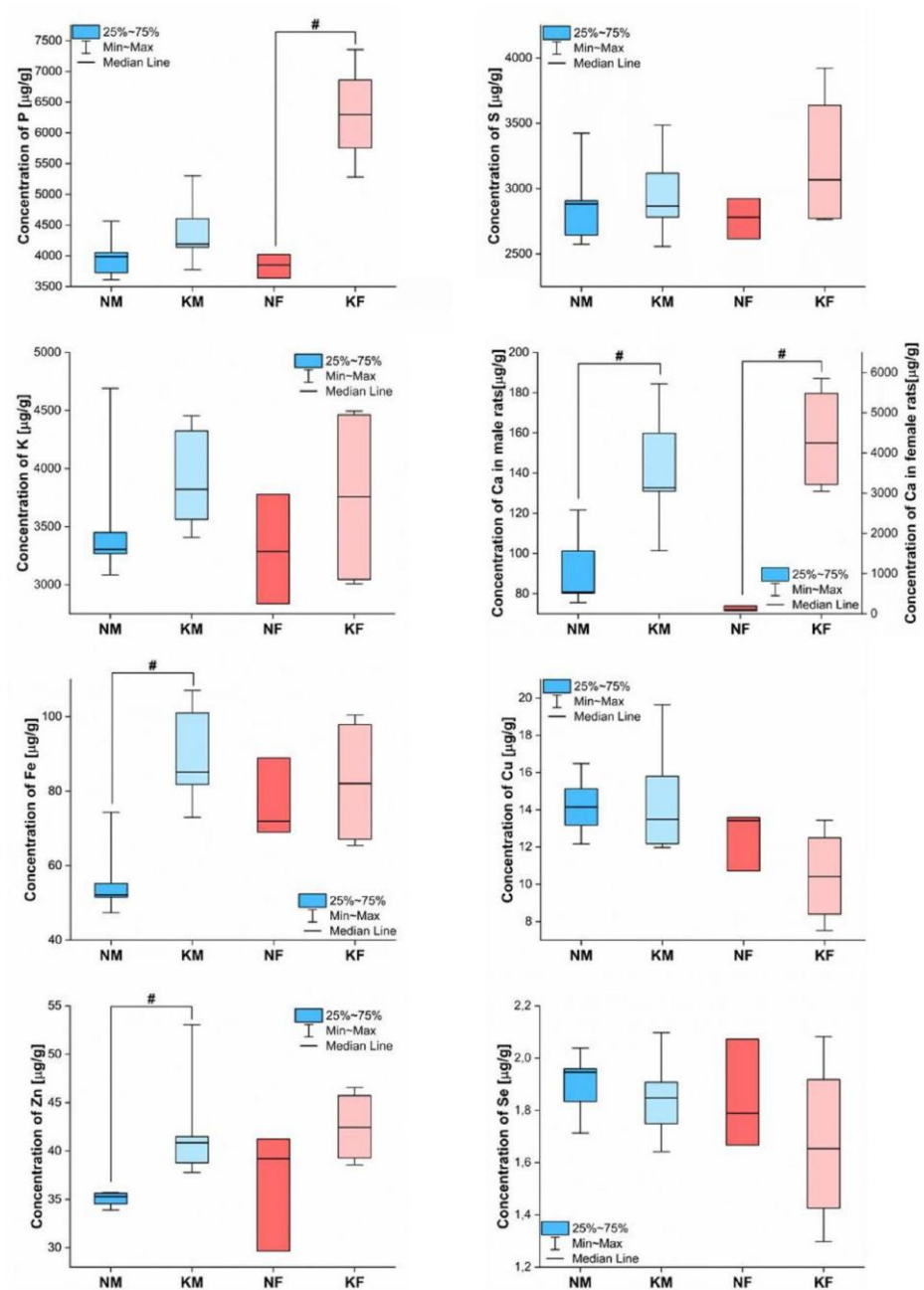


Figure 3. Box-and-whiskers plots presenting the ranges of element concentrations [$\mu\text{g/g}$] in kidneys taken from male (blue) and female (red) rats fed with ketogenic (groups KM and KF) and standard diets (groups NM and NF). The statistically significant differences determined with Mann–Whitney U test (p -value < 0.05) between KD treated animals and controls of given gender are signed with #.

phosphorylase, an enzyme participating in the glycogenolysis process²². Its reduced level may be, therefore, connected with the limited requirement for the enzyme when low levels of glycogen are observed²³.

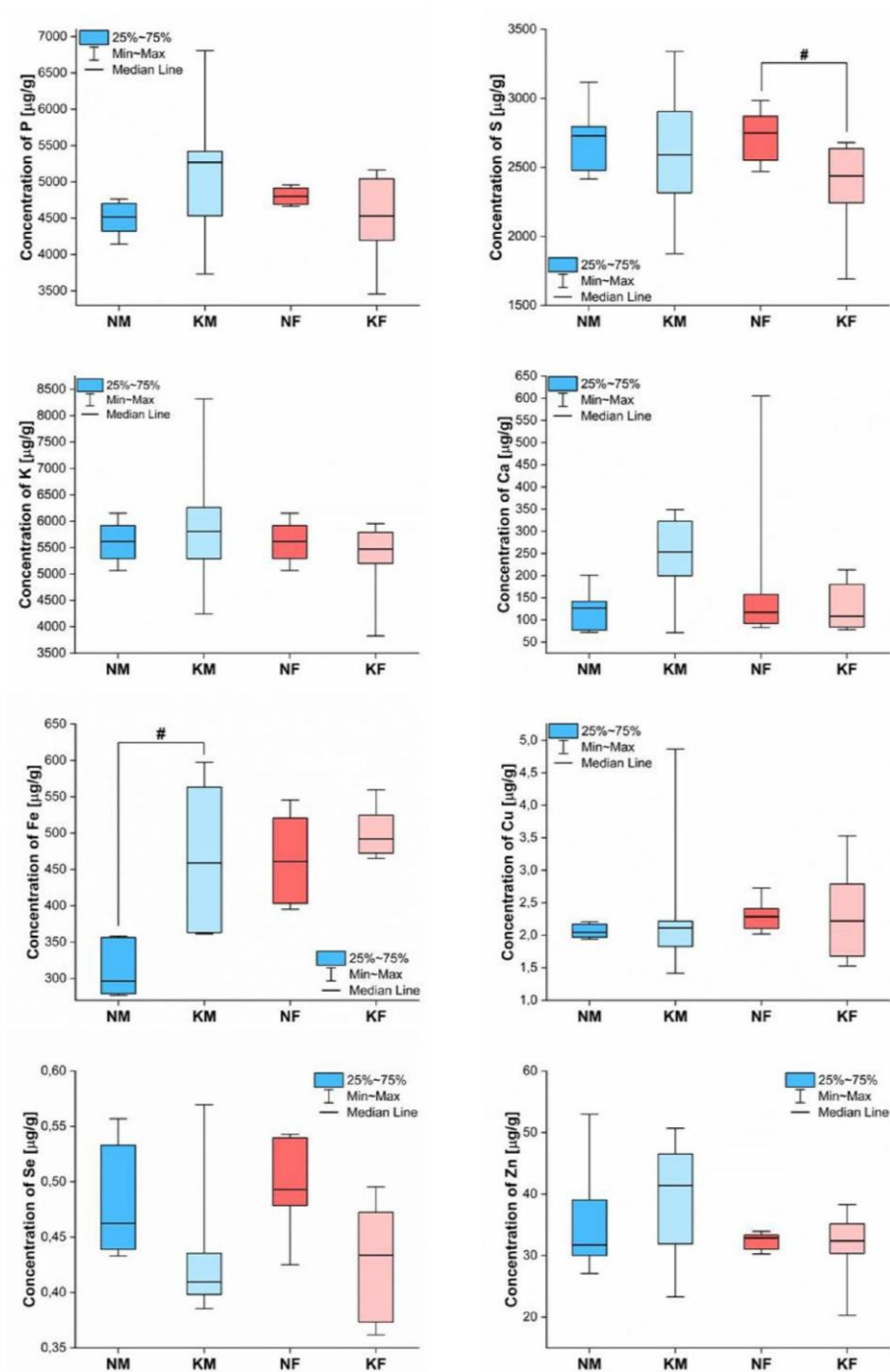


Figure 4. Box-and-whiskers plots presenting the ranges of element concentrations [$\mu\text{g/g}$] in spleens taken from male (blue) and female (red) rats fed with ketogenic (groups KM and KF) and standard diets (groups NM and NF). The statistically significant differences determined with Mann–Whitney U test (p -value < 0.05) between KD treated animals and controls of given gender are signed with #.

The diminished level of Cu, Zn and Se within the liver was found in animals of both genders that were fed with KD. For Cu and Se, the effect may be explained, among others, by the decreased content of these elements in the high fat diet and lower ketogenic fodder intake in comparison with the standard one. The lower levels of trace elements in serum of adults after the long-term treatment with KD were observed previously²⁴ and the found effect depended on the used diet formula²⁵.

KD used to treat refractory seizures in children was leading to the appearance of kidney stones^{13,26}. Kidney stones are mostly formed from uric acid. However, there are also some that contain minerals such as struvite, apatite and brushite, as well as those that are made of calcium phosphate mono- or dihydrates^{27,28} and calcium salt of oxalic acid²⁹. The elevated risk of kidney stones formation during KD, together with their typical elemental composition, seem to elucidate the observed increases of P and Ca concentration in kidneys of female rats. An explanation for the elevated Ca levels found in animals of both genders may be also the occurrence of hypercalciuria as a side effect of KD treatment¹³.

Male rats presented higher concentration of Zn in kidneys. Together with Cu, the mentioned element is a part of Cu,Zn-superoxide dismutase³⁰ belonging to a family of enzymes that catalyze the dismutation of the superoxide radicals³¹. Increased level of the enzyme in kidneys of animals fed with KD might be a result of the inflammation processes occurring in the organ and connected with them reactive oxygen species release³². In such a case, increased kidney Zn accumulation should correlate with the elevated Cu concentration within the organ. Such correlation was, however, not found.

Watanabe et al.³³ observed that the use of KD may result in the chronic kidney disease. In patients suffering from kidney diseases, renal tubules are exposed to a high concentration of Fe owing to increased glomerular filtration of iron and iron-containing proteins. What is more, the levels of intracellular iron may increase when glomerular and renal tubular cells are injured³⁴. The mentioned phenomena connected with the chronic kidney disease may be, therefore, the source of increased concentration of Fe in kidneys of male rats fed with KD.

The elevated Fe concentration in the spleen of male rats might be a result of increased red blood cells production. However, according to Nazarewicz et al.³⁵ the use of KD treatment does not have a positive effect on the blood parameters including red blood cells and hemoglobin level. The systemic iron-regulatory hormone is hepcidin³⁶. The hepcidin synthesis is transcriptionally regulated by extracellular and intracellular iron concentrations, and its increased concentration in plasma is observed in iron-restrictive anemias including those connected with inflammation, chronic kidney disease and some cancers³⁷. Arsyad et al.³² showed that long-term treatment of rats with KD may lead to anemia. During anemia hepcidin, being the negative regulator of hemopoiesis³⁶, blocks the release of Fe from spleen macrophages³⁷.

Most of the literature data show that KD treatment globally diminishes the level of the oxidative stress in the body^{38,39}. This does not exclude, however, the possibility of its local occurrence in the answer to, for example, the high-fat diet induced cellular damage and/or inflammation process, especially in liver^{32,40}. Globally reduced level of the oxidative stress limits the need to produce glutathione by the spleen⁴¹. In turn, the diminished glutathione level, being the major reservoir of non-protein reduced sulfur, may be the source of the decreased level of this element observed in the spleen for female rats. Se is an element necessary for the proper functioning of glutathione peroxidase enzymes. Therefore, decreased accumulation of Se within spleen observed for animals fed with high fat diet, may also be result of the positive effect of KD on the level of oxidative stress⁴². However, it should be noted that the high-fat feed used in the experiment was characterized by a very low content of this element, what may also be the source of found abnormalities.

Summarizing, the treatment with KD may significantly influence the elemental homeostasis of internal organs. Only some of the observed elemental anomalies may be explained by differences in the composition and intake of the high fat fodder, and at least some of them seem to be gender dependent.

Materials and methods

Animals

All methods are reported in the paper in accordance with ARRIVE guidelines (<https://arriveguidelines.org>). The animals used in this study were Wistar rats originating from the husbandry of the Department of Experimental Neuropathology of the Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University in Krakow. All animal studies were conducted in accord with the international standards and under approval of the 2nd Local Institutional Animal Care and Use Committee in Krakow. They were done under agreement no. 316/2020. Twelve male and twelve female rats were included in the study. On the day 27th of postnatal development, animals of both genders were divided into 2 equal subgroups which from that time, for the next 33 days, were fed either with the ketogenic or standard laboratory fodder. Once a week, the rats were weighed. In KD fed animals the state of dietary ketosis was controlled and for this purpose the levels of ketone bodies and glucose in their blood were measured at the beginning of the experiment (D0) and on the chosen days of the dietary treatment (D3, D5, D11, D19 and D33).

On the day 60th of life, the rats received a lethal dose of pentobarbital and then were perfused transcardially with physiological saline solution of high analytical purity. The organs (liver, kidney and spleen) taken from animals were immediately frozen in liquid nitrogen and till the digestion procedure kept in the temperature not higher than -20°C .

Ketogenic and standard laboratory diet

The ketogenic diet (EF R/M with 80% Fat—ketogenic), enriched in fat, was purchased from ssniff[®], whilst normal laboratory diet (Labofeed H Standard) from Morawski company. For the ketogenic diet, 94% of metabolizable energy (ME) came from fats and the remaining 6% from proteins and carbohydrates. On the other hand, in case

of the standard diet, 60% of ME was provided in the form of carbohydrates, 30% as proteins and the remaining 10% as fats. The animals had the access to food and water *ad libitum* but the daily intake of the chow was controlled.

Sample preparation

The element analysis using the TXRF method was performed for liquid organ samples. To obtain them, each collected organ, in a separate Teflon vessel (DAP100), was subjected to the microwave assisted acid digestion. The mineralization procedure was done in the 65% nitric acid of high purity (Suprapur, Merck) with the use of Speed Wave 4 system (Berghof). The typical volume of acid used for digestion was 2.5 ml per 1 g of tissue. The obtained liquid organ samples were poured into sterile eppendorf tubes and were kept under refrigeration conditions until the measurements were taken.

To estimate the elemental composition of ketogenic and standard diet with TXRF method, the liquid samples of the fodders were prepared. First, 100 g of each diet was initially homogenized, and then 6 samples with the mass of 200 mg were taken and subjected to microwave assisted digestion in 5 ml of the 65% nitric acid. For each of 6 samples of particular fodder, the mineralization procedure was done in a separate Teflon vessel.

TXRF measurements

The quantitative elemental analysis was based on the internal standard method and gallium (Ga) was used for this purpose. 50 μ l of 1000 mg/l Ga solution (Gallium ICP standard in HNO₃, 2–3% 1000 mg/l Ga Certipur[®], Merck) was added to the 1.5 ml of the tissue digest and mixed thoroughly. 6 μ l of such solution was taken and spotted on the clean quartz glass carrier which was then dried on a heating plate. For each organ sample 3 independent replicates were made.

The measurements were carried out in the Laboratory of X-ray Methods of the Centre for Research and Analysis at the Jan Kochanowski University. S2 PICOFOX TXRF spectrometer (Bruker Nano) equipped with the Mo-anode X-ray tube was used for the study. The tube voltage was 50 kV, whilst its current 0.6 mA. The acquisition time of spectrum was 1000 s. The obtained spectral data were analysed using Picofox Spectra 7 (Bruker Nano) software.

Quantitative element analysis

The concentration of each element i in the digest sample was determined based on the formula (1):

$$C_i = \frac{C_{IS} \cdot N_i}{N_{IS} \cdot S_i^s} \quad (1)$$

where:

C_i —concentration of the element i in the digest sample [μ g/g], C_{IS} —concentration of the added internal standard (Ga) in the digest sample [μ g/g], N_i —number of counts in fluorescence line for the element i in the spectrum of the digest sample [cts], N_{IS} —number of counts in fluorescence line for Ga in the spectrum of the digest sample [cts], S_i^s —relative sensitivity for the element i .

The relative sensitivity coefficients of the elements, defined as the ratio of the sensitivity of a given element to the sensitivity of the internal standard, were determined based on calibration measurements of standard solutions using the formula (2):

$$S_i^s = \frac{S_i}{S_{IS}} = \frac{\frac{N_i^s}{C_i^s}}{\frac{N_{IS}^s}{C_{IS}^s}} = \frac{C_{IS}^s \cdot N_i^s}{N_{IS}^s \cdot C_i^s} \quad (2)$$

where:

S_i^s —relative sensitivity for the element i , S_i —sensitivity for the element i , S_{IS} —sensitivity for the internal standard (Ga), C_i^s —known concentration of the element i in the standard solution [μ g/g], C_{IS}^s —concentration of Ga in the standard solution [μ g/g], N_i^s —number of counts in fluorescence line for the element i in the spectrum of the standard solution, N_{IS}^s —number of counts in fluorescence line for Ga in the spectrum of the standard solution.

The element concentration calculated from Eq. (1) corresponds to the volume obtained after IS addition equaled to 1.55 ml (1.5 ml of the tissue digest and 50 μ l of Ga solution). To determine element concentration in the tissue digest, it is necessary to take into account the mentioned dilution as follows (3):

$$C_i^d = \frac{1.55}{1.5} \cdot C_i \quad (3)$$

where:

C_i^d —element concentration in the tissue digest [μ g/g], C_i —element concentration in sample diluted to 1.55 ml by addition of 50 μ l of IS to 1.5 ml of the tissue digest [μ g/g], $\frac{1.55}{1.5}$ —dilution coefficient.

In turn, the element concentration in the wet mass of the organ was calculated from the Eq. (4):

$$C_i^o = C_i^d \cdot k \quad (4)$$

where:

C_i^o —element concentration in the wet mass of the organ [μ g/g], C_i^d —element concentration in the tissue digest [μ g/g], k —conversion factor [a.u.].

The conversion factor k for each organ sample was calculated according to the formula (5):

$$k = \frac{m_o + m_a}{m_o} \quad (5)$$

where:

m_o —weight of the organ o [g], m_a —weight of the nitric acid used for the organ o digestion process [g].

Before quantitative comparisons of elemental data, the detection limits (LOD) of elements under interest were determined for examined organs. First, LOD_i values were calculated according to the formula (6) for each of 216 individual TXRF spectra (24 rats \times 3 organs \times 3 replicates) recorded during the experiment:

$$LOD_i = \frac{3 \cdot C_i \cdot \sqrt{N_{BG}}}{N_i} \quad (6)$$

where:

LOD_i —detection limit of element i obtained for individual TXRF spectrum [$\mu\text{g/g}$], C_i —concentration of the element i in the digest sample determined with TXRF [$\mu\text{g/g}$], N_i —net peak area of the K_α line of the element i for the spectrum of the digest sample [cts], N_{BG} —area of the background under the K_α line of the element i for the spectrum of the digest sample [cts].

Then, the LOD_i values from the spectra measured for the samples of particular organs were averaged. The calculated means and standard deviations were presented in the Table S1 of Appendix.

Statistical analysis

To verify statistical significance of the differences in elemental concentrations observed between ketogenic and standard laboratory diet fed rat organs, Mann–Whitney U test was utilized. The choice of this non-parametric alternative of Student's t test was a result of the low size of examined animal groups that did not allow for verification of the normality of the distributions of the data. The elemental differences were examined at the significance level of 0.05 and Statistica 13.3 software (TIBCO Software Inc.) was used for statistical evaluations.

Data availability

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 1 September 2023; Accepted: 21 October 2023

Published online: 27 October 2023

References

1. Wheless, J. W. History of the ketogenic diet. *Epilepsia* **49**, 3–5. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01821.x> (2008).
2. Hartman, A. L., Gasiior, M., Vining, E. P. & Rogawski, M. A. The neuropharmacology of the ketogenic diet. *Pediatr. Neurol.* **36**, 281–292. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2007.02.008> (2007).
3. Nordli, D. R. Jr. *et al.* Experience with the ketogenic diet in infants. *Pediatrics* **108**, 129–133. <https://doi.org/10.1542/peds.108.1.129> (2001).
4. Mady, M. A. *et al.* The ketogenic diet: Adolescents can do it, too. *Epilepsia* **44**, 847–851. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2003.57002.x> (2003).
5. Coppola, G. *et al.* The ketogenic diet in children, adolescents and young adults with refractory epilepsy: An Italian multicentric experience. *Epilepsy Res.* **48**, 221–227. [https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(01\)00315-1](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(01)00315-1) (2002).
6. Bough, K. J. & Rho, J. M. Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet. *Epilepsia* **48**, 43–58. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.00915.x> (2007).
7. Seyfried, T. N., Marsh, J., Shelton, L. M., Huysentruyt, L. C. & Mukherjee, P. Is the restricted ketogenic diet a viable alternative to the standard of care for managing malignant brain cancer?. *Epilepsy Res.* **100**, 310–326. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2011.06.017> (2012).
8. Poff, A. *et al.* Targeting the Warburg effect for cancer treatment: Ketogenic diets for management of glioma. *Semin. Cancer Biol.* **56**, 135–148. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.12.011> (2019).
9. Abdelwahab, M. G. *et al.* The ketogenic diet is an effective adjuvant to radiation therapy for the treatment of malignant glioma. *PLoS One* **7**, e36197. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036197> (2012).
10. Nebeling, L. C., Miraldi, F., Shurin, S. B. & Lerner, E. Effects of a ketogenic diet on tumor metabolism and nutritional status in pediatric oncology patients: Two case reports. *J. Am. Coll. Nutr.* **14**, 202–208. <https://doi.org/10.1080/07315724.1995.10718495> (1995).
11. Ruiz Herrero, J. *et al.* Safety and effectiveness of the prolonged treatment of children with a ketogenic diet. *Nutrients* **12**, 306. <https://doi.org/10.3390/nu12020306> (2020).
12. Alves-Bezerra, M. & Cohen, D. E. Triglyceride metabolism in the liver. *Compr. Physiol.* **8**, 1–8. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170012> (2017).
13. Sampath, A., Kossoff, E. H., Furth, S. L., Pyzik, P. L. & Vining, E. P. Kidney stones and the ketogenic diet: Risk factors and prevention. *J. Child Neurol.* **22**, 375–378. <https://doi.org/10.1177/0883073807301926> (2007).
14. Tokatli, M. R. *et al.* Hormones and sex-specific medicine in human physiopathology. *Biomolecules* **12**, 413. <https://doi.org/10.3390/biom12030413> (2022).
15. Varlamov, O., Bethea, C. L. & Roberts, C. T. Sex-specific differences in lipid and glucose metabolism. *Front. Endocrinol. Lausanne* **5**, 241. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00241> (2015).
16. Klockenkämper, R. & von Bohlen, A. *Total-Reflection X-Ray Fluorescence Analysis and Related Methods* (Wiley, 2015).
17. Laffel, L. Ketone bodies: A review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **15**, 412–426. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-7560\(199911/12\)15:6%3c412::AID-DMRR72%3e3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-7560(199911/12)15:6%3c412::AID-DMRR72%3e3.0.CO;2-8) (1999).
18. Grandl, G. *et al.* Short-term feeding of a ketogenic diet induces more severe hepatic insulin resistance than an obesogenic high-fat diet. *J. Physiol.* **596**, 4597–4609. <https://doi.org/10.1113/JP275173> (2018).
19. Sindhughosa, D. A., Wibawa, I. D. N., Mariadi, I. K. & Somayana, G. Additional treatment of vitamin D for improvement of insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease patients: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **12**, 7716. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11950-x> (2022).

20. Westman, E. C., Mavropoulos, J., Yancy, W. S. & Volek, J. S. A review of low-carbohydrate ketogenic diets. *Curr. Atheroscler. Rep.* **5**(6), 476–483. <https://doi.org/10.1007/s11883-003-0038-6> (2003).
21. Reason, S. L. & Godfrey, R. J. The potential of a ketogenic diet to minimize effects of the metabolic fault in glycogen storage disease V and VII. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* **27**, 283–290. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000567> (2020).
22. Hue, L., Bontemps, F. & Hers, H. The effects of glucose and of potassium ions on the interconversion of the two forms of glycogen phosphorylase and of glycogen synthetase in isolated rat liver preparations. *Biochem. J.* **152**, 105–114. <https://doi.org/10.1042/bj1520105> (1975).
23. Huang, T. Y. *et al.* Response of liver metabolic pathways to ketogenic diet and exercise are not additive. *Med. Sci. Sports Exerc.* **52**, 37–48. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000002105> (2020).
24. Frommelt, L. *et al.* Effects of low-carbohydrate, high-fat diets on apparent digestibility of minerals and trace elements in rats. *Nutrition* **30**, 869–875. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.11.017> (2014).
25. Bergqvist, A. G. Long-term monitoring of the ketogenic diet: Do's and don'ts. *Epilepsy Res.* **100**, 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2011.05.020> (2012).
26. Acharya, P. *et al.* Incidence and characteristics of kidney stones in patients on ketogenic diet: A systematic review and meta-analysis. *Diseases* **9**, 39. <https://doi.org/10.3390/diseases9020039> (2021).
27. Khan, S. R. *et al.* Kidney stones. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2**, 16008. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.8> (2016).
28. Kubala-Kukuś, A. *et al.* Application of TXRF and XRPD techniques for analysis of elemental and chemical composition of human kidney stones. *X-Ray Spectrom.* **46**, 412–420. <https://doi.org/10.1002/xrs.2778> (2017).
29. Massey, L. K., Roman-Smith, H. & Sutton, R. A. Effect of dietary oxalate and calcium on urinary oxalate and risk of formation of calcium oxalate kidney stones. *J. Am. Diet. Assoc.* **93**, 901–906. [https://doi.org/10.1016/0002-8223\(93\)91530-4](https://doi.org/10.1016/0002-8223(93)91530-4) (1993).
30. Prasad, A. S. & Bao, B. Molecular mechanisms of zinc as a pro-antioxidant mediator: Clinical therapeutic implications. *Antioxid. Basel* **8**, 164. <https://doi.org/10.3390/antiox8060164> (2019).
31. Mondola, P., Damiano, S., Sasso, A. & Santillo, M. The Cu, Zn superoxide dismutase: Not only a dismutase enzyme. *Front. Physiol.* **7**, 594. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00594> (2016).
32. Arsyad, A. *et al.* Long-term ketogenic diet induces metabolic acidosis, anemia, and oxidative stress in healthy wistar rats. *J. Nutr. Metab.* **2020**, 3642035. <https://doi.org/10.1155/2020/3642035> (2020).
33. Watanabe, M. *et al.* Scientific evidence underlying contraindications to the ketogenic diet: An update. *Obes. Rev.* **21**, e13053. <https://doi.org/10.1111/obr.13053> (2020).
34. Martines, A. M. *et al.* Iron metabolism in the pathogenesis of iron-induced kidney injury. *Nat. Rev. Nephrol.* **9**, 385–398. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.98> (2013).
35. Nazarewicz, R. R., Ziolkowski, W., Vaccaro, P. S. & Ghafourifar, P. Effect of short-term ketogenic diet on redox status of human blood. *Rejuven. Res.* **10**, 435–440. <https://doi.org/10.1089/rej.2007.0540> (2007).
36. Ganz, T. & Nemeth, E. Heparin and iron homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* **1434–1443**, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.01.014> (1823).
37. Ganz, T. Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* **102**, 783–788. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0672> (2003).
38. Greco, T., Glenn, T. C., Hovda, D. A. & Prins, M. L. Ketogenic diet decreases oxidative stress and improves mitochondrial respiratory complex activity. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **36**, 1603–1613. <https://doi.org/10.1177/0271678X15610584> (2016).
39. Parry, H. A. *et al.* Ketogenic diet increases mitochondria volume in the liver and skeletal muscle without altering oxidative stress markers in rats. *Heliyon* **4**(11), e00975. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00975> (2018).
40. Jain, S. K., McVie, R. & Bocchini, J. A. Hyperketonemia (ketosis), oxidative stress and type 1 diabetes. *Pathophysiol.* **13**(3), 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2006.05.005> (2006).
41. Ishii, T., Sugita, Y. & Bannai, S. Regulation of glutathione levels in mouse spleen lymphocytes by transport of cysteine. *J. Cell. Physiol.* **133**, 330–336. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041330217> (1987).
42. Rotruck, J. T. *et al.* Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* **179**, 588–590. <https://doi.org/10.1126/science.179.4073.588> (1973).

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the contribution of the COST ACTION CA18130. This work also was partially financed by the Ministry of Education and Science of Poland and the subvention no. N18/DBW/000018 of the Laboratory of Experimental Neuropathology (Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University). Marzena Rugiel has been partially supported by the program “Excellence Initiative-Research University” for the AGH UST.

Author contributions

K.K.: conceptualization, methodology, investigation, validation, writing original draft, M.R.: methodology, resources, investigation, validation, reviewing manuscript, Z.S.: methodology, resources, investigation, reviewing manuscript, K.M.: methodology, investigation, A.K.K.: methodology, resources, investigation, reviewing manuscript, I.S.: investigation, validation, K.S.: investigation, validation, Z.R.: methodology, investigation, J.C.: conceptualization, supervision, resources, methodology, validation, writing original draft, corresponding author.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45611-4>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.C.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

Suplement do pracy A2:

Appendix

Table S1. The averaged values of detection limits (LOD) together with their standard deviations [$\mu\text{g/g}$] for measured elements and examined organs.

		P	S	K	Ca	Fe	Cu	Zn	Se
Liver	LOD	12.87	5.50	1.774	0.344	0.120	0.0628	0.0579	0.0373
	SD	0.77	0.35	0.094	0.029	0.011	0.0044	0.0040	0.0027
Kidney	LOD	16.11	6.86	2.15	0.378	0.1051	0.0670	0.0604	0.0376
	SD	0.62	0.26	0.11	0.017	0.0043	0.0025	0.0022	0.0015
Spleen	LOD	20.15	8.54	3.03	0.541	0.180	0.0907	0.0835	0.0525
	SD	0.94	0.36	0.14	0.033	0.016	0.0061	0.0048	0.0049

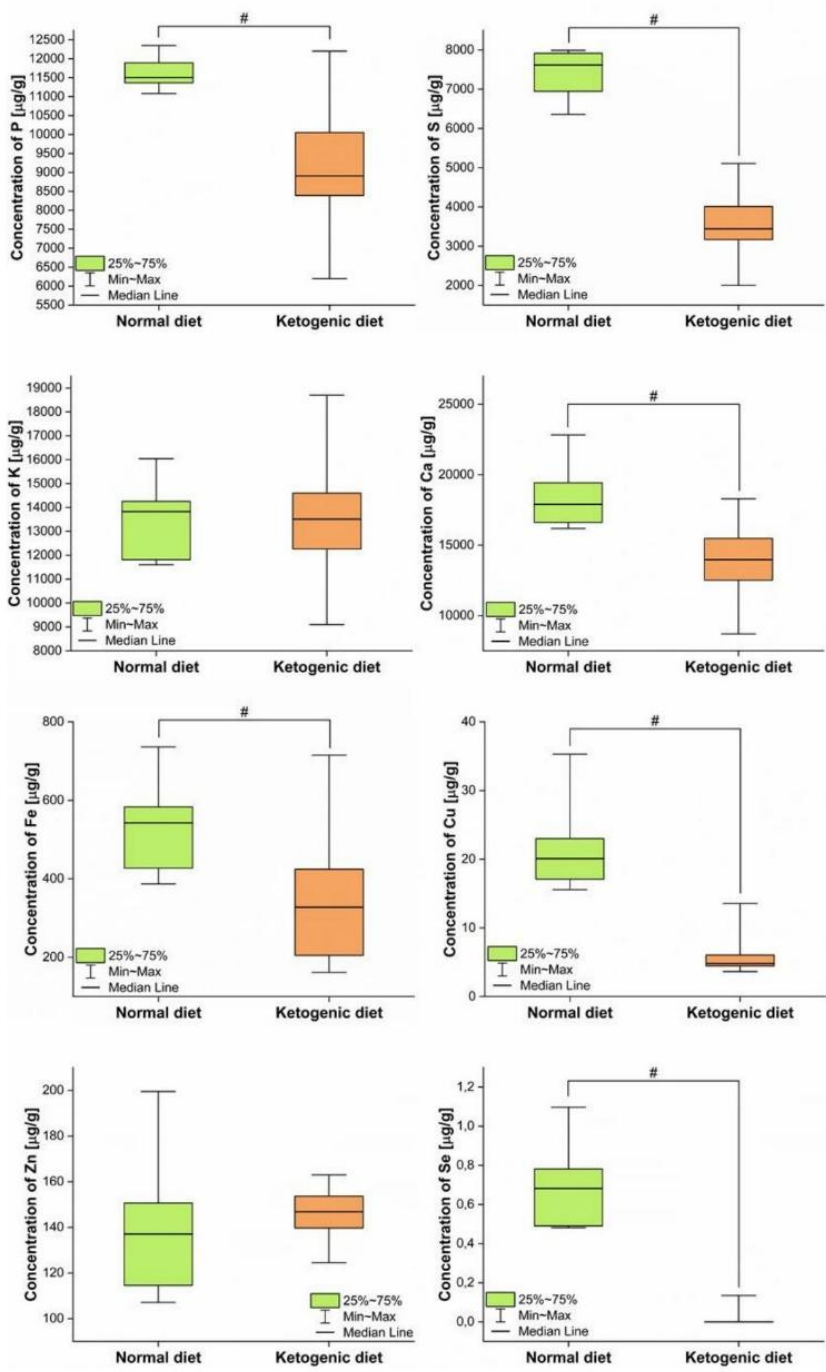


Figure S1. The comparison of the elemental composition of ketogenic and standard diet. Box-and-whiskers plots present the ranges of element concentrations [$\mu\text{g/g}$] obtained based on the TXRF measurements of 6 samples (200 mg) taken from initially homogenized fodder. Median, interquartile range and minimal-maximal values are marked as a line, a box and whiskers, respectively. The statistically significant differences determined with Mann-Whitney U test (p -value <0.05) between ketogenic and normal fodder are signed with #.



Vibrational spectroscopy methods reveal biochemical changes associated with the glial scar formation after traumatic brain injury

Kamil Kawon^{a,1}, Zuzanna Setkowicz^{b,1}, Zuzanna Rauk^b, Joanna Chwiej^{a,*}

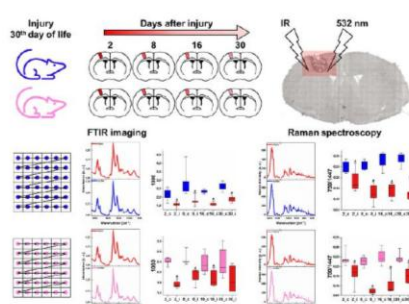
^a AGH University of Krakow, Faculty of Physics and Applied Computer Science, Krakow, Poland

^b Jagiellonian University, Institute of Zoology and Biomedical Research, Krakow, Poland

HIGHLIGHTS

- Vibrational spectroscopy detects biochemical changes associated with TBI.
- Cortical injury leads to changes in biomolecule accumulation and structure.
- Infrared and Raman microscopy allow tracking the process of glial scar formation.
- Subtle sex-dependent biochemical differences were observed post injury.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:

Traumatic brain injury (TBI)
 Glial scar formation
 Fourier transform infrared microspectroscopy (FTIRM)
 Raman microscopy
 Biomolecular anomalies

ABSTRACT

Traumatic brain injury (TBI) is a serious clinical and social problem. Millions of TBI cases, that require hospitalization and consequently burden social security systems, are reported each year. Analysis of the time course of changes that occur in the brain after primary injury may help indicate therapeutic goals and treatment directions that will minimize severe secondary effects of TBI. Existing animal models simulating the development of TBI in human are divided into two main groups, namely into diffuse and local models. Diffuse injury models are ideal for studying concussions and long-term effects of TBI, as they replicate global changes occurring in brain. Local injury models excel in examining focal brain damage and testing region-specific therapies, they also offer greater control and reproducibility. In our study local induction of TBI enabled better control of the extent of the damage and thus reduced the number of animals needed for the experiment.

As part of the work, Fourier transform infrared microspectroscopy and complementary Raman microscopy were used to track the time course of biochemical changes that occur in the rat cerebral cortex as a result of its local mechanical damage. Comparative studies, carried out for the injury site and microscopically unaffected area of the cerebral cortex, indicated some anomalies in the accumulation and structure of organic compounds, including a reduction of the level of cholesterol/cholesterol esters (approx. 30 % in first two examined periods after TBI) and the compounds containing phosphate groups (approx. 25 %), as well as the conformational changes of proteins and lipids in the injury site comparing to unchanged cortex tissue. The comparison of the

* Corresponding author.

E-mail address: joanna.chwiej@fis.agh.edu.pl (J. Chwiej).

¹ Equally contributed

<https://doi.org/10.1016/j.saa.2025.126782>

Received 24 January 2025; Received in revised form 10 July 2025; Accepted 3 August 2025

Available online 5 August 2025

1386-1425/© 2025 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

glial scar development in male and female rats showed only a very subtle differences between sexes. Among them it is necessary to mention the diminished unsaturation degree of lipids within the scar in case of female rats that was not found in males.

The obtained results substantiated that vibrational microspectroscopy methods represent powerful, non-destructive tool of high-resolution biomolecular analysis of brain tissue. These techniques enable the identification of biochemical alterations linked to glial scarring following TBI, allow for the monitoring of the dynamics of this process, and provide insights into the sex-dependence of the recorded anomalies. This knowledge could prove instrumental in identifying potential diagnostic and prognostic biomarkers of TBI, as well as in the development of new therapeutic strategies for managing this condition.

1. Introduction

Brain injuries, including traumatic brain injury (TBI), are a serious clinical problem worldwide. There are 64–74 million cases worldwide of brain damage leading to hospitalization annually [1], which prompts the increased efforts in the range of the search for potential therapeutic targets and windows as well as new therapies of TBI and/or new applications of the therapies that have shown positive impact on other brain diseases.

In the diagnostics of TBI, cerebrospinal fluid markers such as S100b, GFAP, pNF-H, and NSE are employed to evaluate the risk and severity of complications [2–4]. The basic tool in the assessment of the clinical condition after TBI is the use of the Glasgow coma scale (GCS), which has advantages such as high sensitivity and negative predictive value (NPV) for a GCS ≤ 12 , but in the pre-hospital assessment may lead to excessively frequent referral for triage, because only about 1/3 of patients with this result have moderate to severe TBI [5]. Computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI) are utilized to determine the extent of hematoma, brain edema, and cranial damage resulting from the injury [2]. CT and MRI are limited in detecting subtle post-traumatic changes in the brain and, therefore, diffusion tensor imaging (DTI) is used [2,6,7]. It facilitates the assessment of white matter diffusivity by measuring fractional anisotropy, thereby enabling a more precise visualization of axonal damage crucial for understanding cognitive impairments in TBI patients [7,8].

Animal models of TBI are crucial for studying the mechanisms of brain injury, its progression, and potential therapeutic interventions. Several animal models are commonly used in the research, each serving a different purpose based on the type, severity, and region of injury being investigated. They include: an impact injury, a controlled cortical injury, a rotational and a fluid percussion injury models [9–12]. The impact injury model involves using a device that causes a controlled blow to the animal head. This impact may be caused by a freely falling weight [9]. The controlled cortical injury (CCI) model involves performing damage to the cerebral cortex that is precise in terms of size and depth [9]. This model allows for maintaining the repeatability of the performed damage and moderating its severity. The rotational model, developed by Namjoshi [10], reproduces head injuries that often result from car accidents and other situations during which, as a result of impact, the head experiences sudden rotation or displacement [11]. In this model, the animal is placed in a device that applies controlled rotational forces to its head. A fluid percussion injury (FPI) model uses the impact of fluid with an appropriately set force on the exposed dura mater [12], resulting in displacement and deformation of the brain tissue. The severity of damage depends here on the depth, velocity, or strength of the pulse.

In this study a rat model of the penetrating cortical injury was applied. This model, successfully utilized in our earlier investigation on the glial response to the injury [13–15] and on its epileptogenic effects [16,17], is characterized by a small degree brain damage but with a blood-brain barrier disruption.

Following traumatic brain injury, astrocytes rapidly become reactive, initiating a process of astrogliosis that propagates from the lesion core to remote brain regions and ultimately culminates in the formation

of a glial scar [18]. Glial scarring exhibits a dual role: during the acute phase, it mitigates secondary neuroinflammation and provides neuroprotection, while in the chronic phase, it hinders axonal regeneration and functional recovery [19]. The underlying process results from complex interactions among astrocytes, microglia, and other cellular elements, leading to substantial molecular and morphological alterations in brain tissue [19]. Despite extensive research, significant gaps persist in understanding the precise mechanisms that govern the balance between the protective and deleterious effects of the scar, as well as in identifying optimal therapeutic strategies to modulate this response.

As it was shown, brain damage is characterized by specific dynamics of changes. Therefore, it is important that treatment is implemented early enough or at the right moment, which will minimize the long-term consequences of the primary damage [20–22]. So-called therapeutic window also occur in brain injuries classified as TBI [23,24]. Trying to identify this period in the model of penetrating cortical injury, we analyzed the dynamics of biomolecular changes that occur in the region of primary brain damage. This was done by including in the study the rats after 2, 8, 16 and 30 days from the primary injury that was induced on the 30th day of animal life.

The results of the research carried out so far on the influence of sex on the effects of TBI are inconsistent. Studies conducted on animal models indicate better prognosis for female animals [25,26]. On the other hand, clinical data indicate that comparable brain damage in humans leads to more severe consequences in women than in men [25,27]. Therefore, in this study we verified the influence of sex on the course of biomolecular anomalies resulting from the penetrating cortical damage.

To identify TBI-induced biomolecular anomalies in brain tissue, vibrational microspectroscopy techniques, namely Fourier transform infrared microspectroscopy (FTIRM) and Raman microscopy, were employed. Although the tissue preparation required in these techniques, such as freezing and sectioning, introduces inherently invasive steps, the spectroscopic analyses themselves are entirely non-destructive and label-free. This allows, not only, repeated measurements of the same sample without fixation, staining or using the markers, unlike immunohistochemistry or histology, but also its subsequent investigation using additional experimental techniques [28–31]. Raman and infrared (IR) spectroscopies provide complementary vibrational information due to their different selection rules. IR spectroscopy is sensitive to changes in dipole moment, while Raman responds to changes in molecular polarizability, allowing them to detect different molecular vibrations. This complementarity enables comprehensive molecular characterization, particularly valuable in complex biological samples where water interference limits IR analysis but not Raman spectroscopy [32,33]. Complementarity and usefulness of both methods was proven in biomedical research i.e. in cancer malignancy research [34].

In the context of the use of the vibrational techniques in the study of TBI, Rakib et al. [35] indicate that FTIRM has higher sensitivity in detecting cellular-level anomalies resulting from mild TBI, compared to MRI or CT, which do not reach this level of spatial resolution. Another example of the use of FTIRM to explore TBI was the study of Ustaoglu et al. [36]. The researchers examined molecular changes occurring in brain 24 h and one month after the injury. In both studies, a change in

the lipid-to-protein ratio was observed as a result of TBI together with the increased indicators of beta-sheet content in protein secondary structures [35,36].

2. Methodology

2.1. Animals and samples preparation

All methods are described in the paper according to the ARRIVE guidelines (<https://arriveguidelines.org>). Breeding of Wistar rats was performed in the Laboratory of Experimental Neuropathology (Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University in Krakow). The procedures using animals were done in accordance with the international standards and under the agreement no. 316/2020 of the Second Local Institutional Animal Care and Use Committee in Krakow. During whole life the rats were maintained under conditions simulating a day-night cycle, with 12 h of light and 12 h of darkness, and the ambient temperature was 22 ± 2 °C. The animals had unrestricted but controlled access to fodder and water.

The injury was done in the left cerebral hemisphere on the 30th day of animal life as described in details in our previous works on glial response to injury, its epileptogenic effects and others [13–17]. Under aseptic conditions, a rotating dental drill (1.2 mm diameter) was inserted into the left cerebral hemisphere and the drill was made down to the white matter. Drill depth, adjusted to brain size, was limited by a plastic ring to avoid full wall perforation. After this procedure the rats received standard post-operative care. They were housed individually in cages and for the first 7 days (in case of NM2 and NF2 groups for the 2 days), their condition, cage behavior, food and water intake, hygiene activities were checked 3 times a day. Body weight of animals was also monitored.

The study was conducted on both female and male rats. In both cases four groups of animals differing with the time passing between the injury and brain collection were examined. The samples were taken 2, 8, 16, and 30 days post-injury. Each rat group consisted of 6 individuals, resulting in a total of 48 animals used for the study (2 sexes \times 4 time points \times 6 individuals).

On the 2nd, 8th, 16th and 30th day post-injury (in case of groups NM2-NF2, NM8-NF8, NM16-NF16 and NM30-NF30, respectively) the animals were euthanized with 60 % Morbital® and perfused with physiological saline. The average body masses of animals from particular populations on the day of sample collection were shown in Table S1 of Supplementary materials. After removing from the skull, the brains were flash-frozen in liquid N₂ and till the sectioning with cryomicrotome kept in around -20 °C. 12 μ m thick slices that included the injury site were placed on the CaF₂ windows (Crystran®), dried and measured with Fourier transform infrared and Raman microscopy. Due to the limited size of the scar and the need to prepare samples on other carriers for complementary analytical methods, we could collect only one brain section from each animal containing the site of injury for measurements using a given instrumental method.

2.2. Fourier transform infrared microspectroscopy (FTIRM)

The measurements using FTIRM were done in the Laboratory of Atomic and Molecular Biospectroscopy (Faculty of Physics and Applied Computer Science, AGH University of Krakow) using Nicolet iN10 MX (Thermo Fisher Scientific) IR microscope. IR beam was reduced with the aperture to the size of 25 μ m \times 25 μ m. The absorption spectra were recorded in transmission mode with the liquid N₂ cooled MCT-A detector averaging 32 scans per spectrum. The wavenumber range was 900–4000 cm^{-1} , and the spectral resolution was set to 8 cm^{-1} . The samples were raster scanned in two directions with the step equaled to the beam size.

2.3. Analysis of the distribution and accumulation of biomolecules

OMNIC Picta software (Thermo Scientific, version 9.2.0.86) was used both for the chemical mapping of the absorption bands (the ratios of the absorption bands) and the extraction and preprocessing of the spectra dedicated for further semi-quantitative and statistical analysis. Before semi-quantitative analysis the IR spectra were subjected to the atmospheric and baseline correction [15,37,38].

The quantitative comparisons were performed for the area of injury and microscopically unaffected area of the cerebral cortex, and the mentioned areas were identified based on the tissue morphological images. For each of the examined animals 30 spectra from the mentioned areas were collected and averaged. The intensities of examined absorption bands or their ratios were determined using OriginPro software by calculating the integrated area of a given band after prior background subtraction. In order to find if the differences between the two examined areas are statistically relevant, the medians of the parameters were calculated for particular rat populations and compared using *U* test (confidence level of 95 %).

2.4. Raman spectroscopy

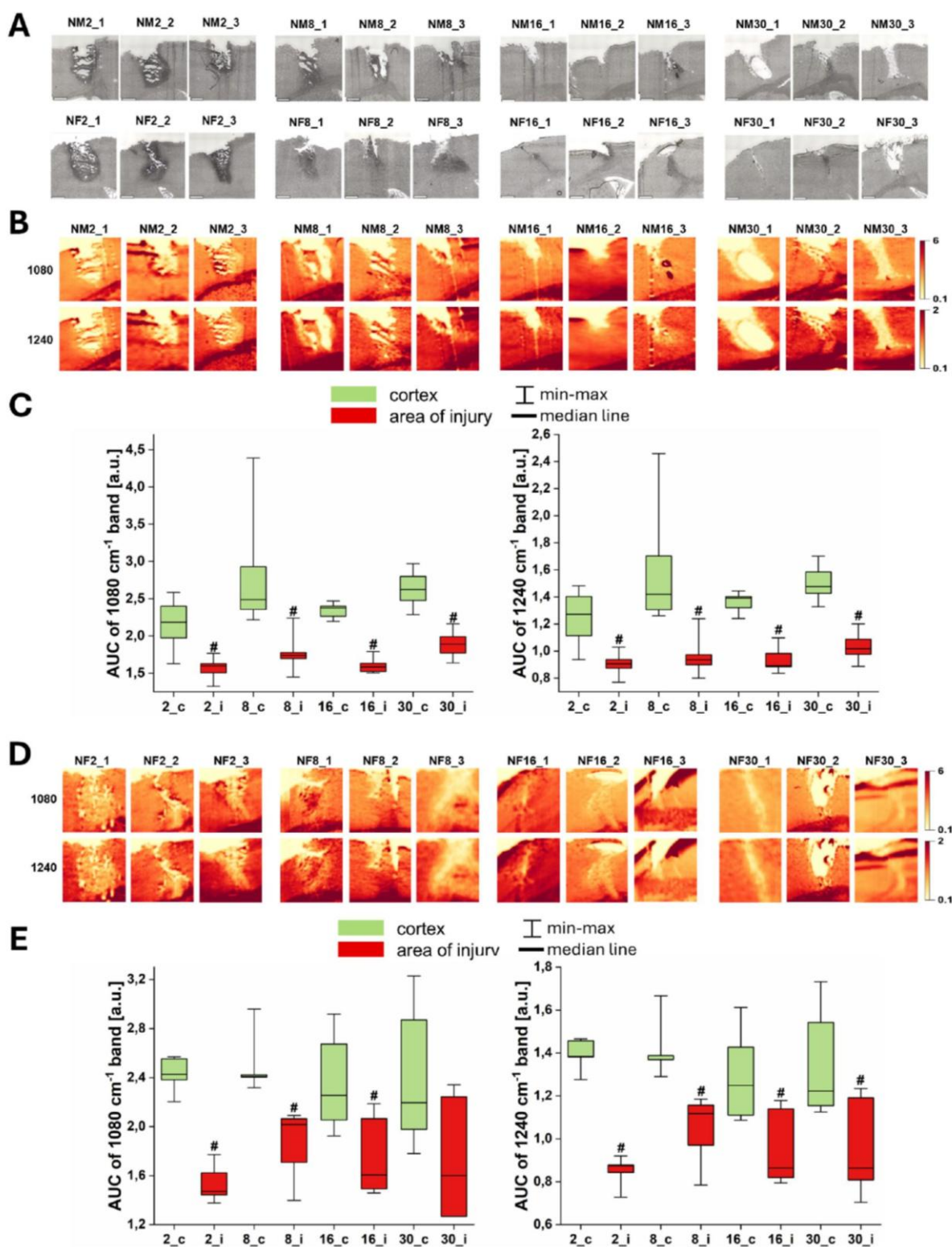
Raman measurements were also performed in the Laboratory of Atomic and Molecular Biospectroscopy using the confocal WiTec Alpha300R Raman microscope. The microscope is equipped with 532 nm and 488 nm laser modules but only the 532 nm laser was used in this study. A 100 \times air objective with a numerical aperture of 0.9 (Zeiss EC Epiplan-Neofluar), the UHTS 300 spectrometer with 600 gratings/mm, and a highly efficient, thermoelectrically cooled spectroscopic camera were used for measurements [15]. The spectra were recorded for the wavenumber range of 400–3200 cm^{-1} with the spectral resolution of 4 cm^{-1} . The laser power on the sample was set to 10 mW, and the integration time was equal to 2.5 s. The scanned area of the injury site and the cortex was at least 200 μ m \times 200 μ m in size. To obtain good quality Raman spectra, binning of the signal from four neighboring pixels was applied. The spectra obtained in this way were subjected to cosmic ray removal using WiTec ProjectFive 5.3 software, followed by baseline correction and vector normalization in OriginPro software.

3. Results

3.1. Topographic and semi-quantitative differences between the area of injury and unaffected area of the cerebral cortex

The subject of investigations using FTIR and Raman microscopy were brain slices that included the place, where the primary damage was induced. In the Fig. S1 of the Appendix one can see the microscopic pictures of selected sections together with the marked areas that were subjected to the raster scanning procedure with an IR beam. As a result of this process for each point of the measured area absorption spectrum was recorded. The origin (assignment of the bonds to the vibration frequency) of the IR and Raman bands recorded in this study was described in Table S2 of the Supplementary materials. In turn their association with the examined biochemical parameters was shown in Table S3.

The topographic biomolecular analysis was based on two-dimensional visualization of the intensities of IR bands (spectral ranges) or the ratios of their intensities. In most cases, the band intensity was calculated as the area under the curve (AUC) after prior baseline subtraction. However, an exception was made for the 1635/1658 cm^{-1} parameter, which was used to monitor conformational changes of proteins. In this case, the ratio was calculated based on the absorbance values at two specific wavenumbers (1635 and 1658 cm^{-1}), following baseline correction. Absorbance at 1635 cm^{-1} is mainly associated with the presence of β -sheets in the protein secondary structure, while absorbance at 1658 cm^{-1} is primarily indicative of α -helices [35,39,40].



(caption on next page)

Fig. 1. The results of the chemical mapping of the bands at 1080 and 1240 cm^{-1} obtained for the region of primary injury after 2, 8, 16 and 30 days from its induction. In part (A) the microscopic views of the scanned tissue areas were presented, scale bar in the left down corner of the picture indicates 600 μm . The chemical maps for the three selected male rats, representing each of analyzed time points, were shown in part (B), whilst analogical data for females were presented in part (D). The box-and-whisker plots demonstrating the scatter of the biochemical parameters values (integrated areas of 1080 and 1240 cm^{-1} bands) in area of injury (I) and in unaffected cerebral cortex (C) of male and female rats were, respectively, presented in parts (C) and (E). Statistically relevant differences (*U* test, 5 % significance level) between the area of injury and cortex for examined stages of glial scar development were marked with #.

Therefore, the ratio of IR absorption at 1635 and 1658 cm^{-1} provides insight into the relative proportion of β -sheet to α -helix structures within the protein secondary structure.

The bands at the wavenumber of 1080 and 1240 cm^{-1} were used to image the distributions of compounds containing phosphate groups, whilst those at 1380 and 1460 cm^{-1} to determine the levels of cholesterol and/or its esters. To examine the localization of compounds containing carbonyl groups the band at 1740 cm^{-1} was utilized. Proteins and the changes of their relative secondary structure were visualized using the intensity of amide I band and the ratio of absorbance at 1635 and 1658 cm^{-1} . In turn, to determine the distributions of lipids, unsaturated lipids and structural changes of these compounds, the intensities of bands at 2924 and 3012 cm^{-1} as well as the ratio of intensities of lipid bands at 2924 and 2955 cm^{-1} were applied. In the Figs. 1–4, the results of topographic analysis, performed for the site of primary injury, are shown. To present the evolution of biochemical changes occurring during glial scar formation the data obtained for animals at 2nd, 6th, 16th and 30th day from the injury are compared. In parts A of these Figures the microscopic views of the scanned areas were presented. In parts B and D, the chemical maps recorded for male and female rats are shown, respectively. In turn, in parts C and E (for males and females, respectively) the scatter of the values of examined biochemical parameters recorded for the area of injury and microscopically unaffected cerebral cortex was compared for four examined time points.

The topographic analysis of the data shown in parts B and D of the Fig. 1, similarly as the results of semi-quantitative and statistical analysis shown in parts C and E, pointed at the significantly diminished content of compounds with the phosphate groups within the area of injury. Most of the found differences were statistically significant and the exception to this rule, observed for female rats 30 days after primary injury, resulted probably from the quite large dispersion of the results that was observed for this population. As one can see in the Fig. 2, also the level of cholesterol/cholesterol esters and compounds with the carbonyl groups were diminished within the area of injury. The effect was especially pronounced for the band at 1740 cm^{-1} , which median intensity was at least 2 times smaller within the scar comparing to the unaffected cerebral cortex. In the site of injury diminished accumulation of proteins and lipids (Figs. 3 and 4) was also observed. The level of unsaturated lipids monitored through the median intensity of the band at 3012 cm^{-1} was 2–4 times lower within the place of injury than in the surrounding tissue. Structural changes of proteins, namely the elevated relative content of proteins with the β structure, were the most pronounced for the early stage/stages of the glial scar formation. For the fully formed scar the ratio of the absorbance at 1635 and 1658 cm^{-1} did not differ between the area of injury and unaffected cortex for female rats, whilst for males the observed differences were smaller than for earlier time points. Although, the chemical maps presenting the ratio of intensity of bands at 2924 and 2955 cm^{-1} showed slightly diminished level of this parameter within the scar, the subsequent semi-quantitative and statistical analysis, with the one exception, did not confirm the statistical significance of the differences in the structure of lipids between the injury site and the microscopically unaffected area of the cortex.

3.2. The progress of biomolecular anomalies during glial scar formation

To track the dynamics of biomolecular changes occurring within the area of injury during glial scar formation, the statistical relevance of the differences in the biochemical parameters between the neighboring time

points was checked and the obtained findings are shown schematically in the Fig. 5 for both male and female rats. Statistically relevant increases of the values of biochemical parameters occurring in particular time period were marked with green rising arrows, whilst the decreases with red falling arrows. As starting values of the levels of examined parameters the values obtained for the unaffected brain cortex were taken.

The analysis of changes occurring during the first period of observation, meaning those directly caused by the mechanical injury, pointed at a number of anomalies both in male and female rats. The level of all tested biomolecules was reduced as a result of the primary injury. In addition to changes in the accumulation of the examined compounds, immediately after the damage, a very large increase in the relative accumulation of proteins with a β structure compared to those with an α -helix conformation was also observed. However, between the 2nd and 8th day after the injury in male rats, and between the 2nd and 16th day in females, the ratio of the absorbance at 1635 and 1658 cm^{-1} decreased and in case of females reached the level characteristic for the surrounding cerebral cortex. An increase in the content of some of the tested biomolecules within the site of injury was observed only in the last analyzed time interval. Between the 16th and 30th day after the primary damage, for male rats a growth in the intensity of bands at 1080 and 1360 cm^{-1} within the scar was found. While in females, an increase in the content of unsaturated fats was observed.

3.3. Spectral analysis of IR and Raman data

To find the spectral signatures characteristic for the area of injury and verify the results of the analysis of the distribution and accumulation of biomolecules, the average IR and Raman spectra were calculated for the area of injury and microscopically unaffected cerebral cortex. This was done independently for all the examined time points as well as male and female rats. The mean IR spectra are shown in parts A of Figs. 6 and 7, whilst mean Raman spectra in parts B of these Figures.

The analysis of the IR spectra shown in part A of Figs. 6 and 7, confirmed the previously presented results of chemical mapping and semi-quantitative biochemical evaluations. The intensity of all IR bands in the spectra of the area of injury is lower than the one in the spectra of the unaffected cerebral cortex. The bands at 1740 and 3012 cm^{-1} , characterized by low intensity in the case of unchanged tissue, are much smaller or even invisible for the injury site.

Also the average Raman spectra (part B of Figs. 6 and 7) obtained for the lesion and the unaffected cortex show significant differences. For the area of injury, abnormalities in the course of the Raman spectrum are observed for the wavenumber ranges of 1500–1800 and 2800–3020 cm^{-1} . The differences in the progress of the spectrum for the range of 1500–1600 cm^{-1} indicate at the anomalies in proteins conformation and confirm the conclusions done previously based on FTIRM data. Additionally, noticeable for the area of injury is the decreased Raman intensity at 750 cm^{-1} .

The anomalies in the Raman spectra of the area of injury seem to evolve during the glial scar formation. In order to better visualize this, in the Fig. 8 the changes in the shape of the IR (part A) and Raman spectra (part B) occurring together with the time passing from the primary injury were presented. This was done independently for male and female rats.

As one can see in Fig. 8A, the changes in the shape of IR spectra caused by the primary injury are subtle and manifest mainly as a

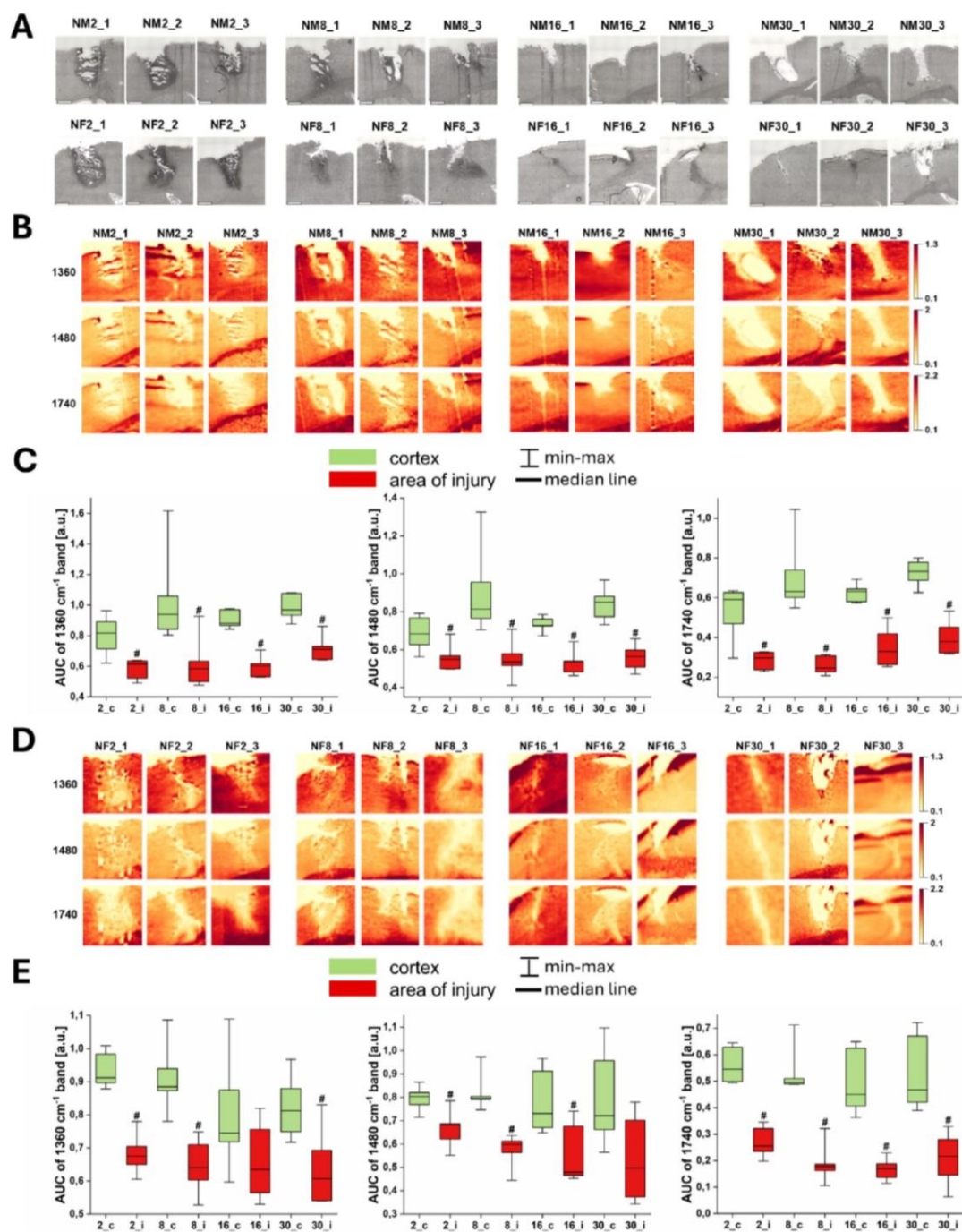


Fig. 2. The results of the chemical mapping of the bands at 1360, 1480 and 1740 cm^{-1} for the region of primary injury after 2, 8, 16 and 30 days from its induction. In part (A) the microscopic views of the scanned tissue areas were presented, scale bar in the left down corner of the picture indicates 600 μm . The chemical maps for the three selected male rats, representing each of analyzed time points, were shown in part (B), whilst analogical data for females were presented in part (D). The box-and-whisker plots demonstrating the scatter of the biochemical parameters values (integrated areas of the examined bands) in area of injury (i) and in unaffected cerebral cortex (c) of male and female rats were, respectively, presented in parts (C) and (E). Statistically relevant differences (*U* test, 5 % significance level) between the area of injury and cortex for examined stages of glial scar development were marked with #.

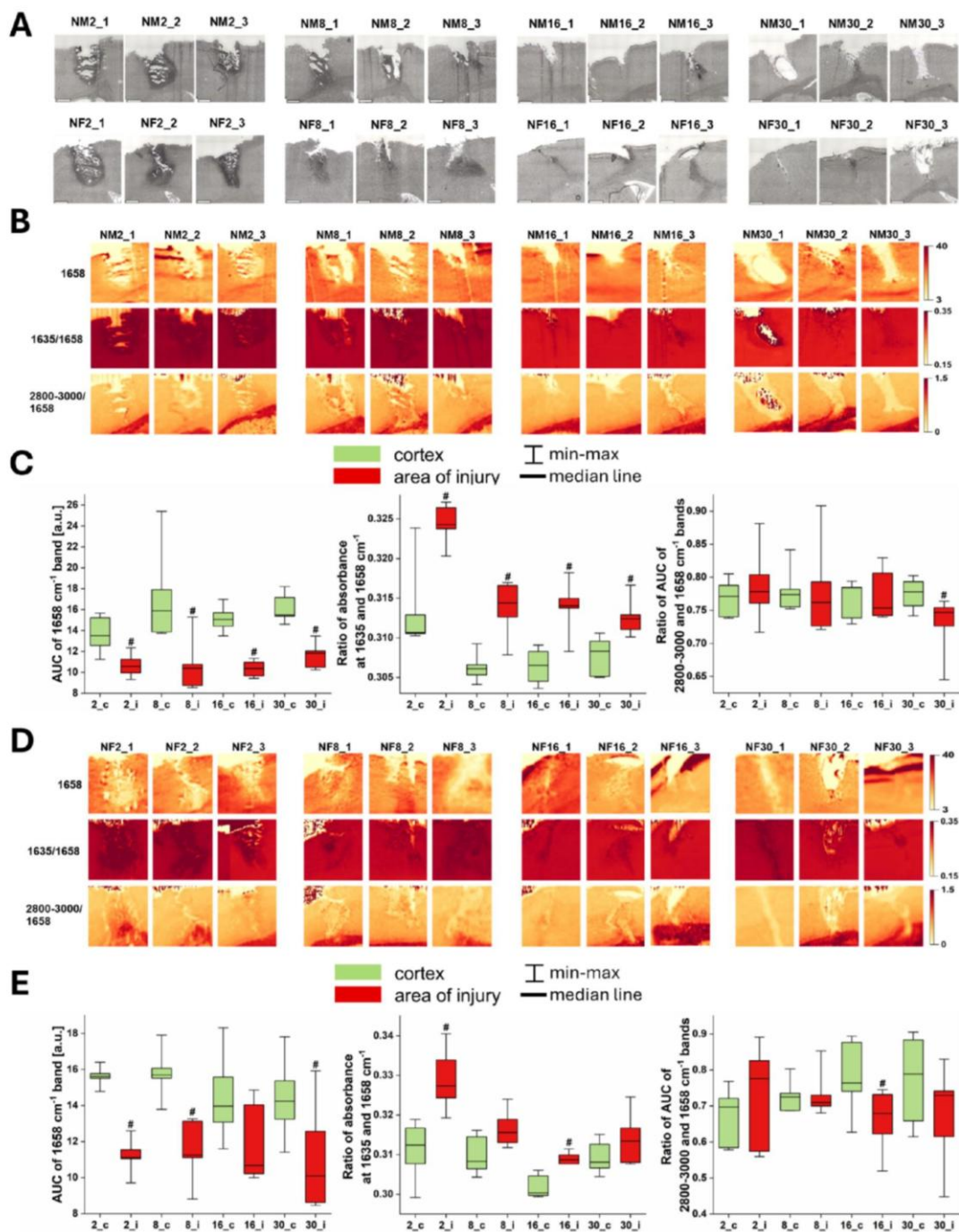


Fig. 3. The results of the chemical mapping of the Amide I band, the ratio of absorbance at 1635 and 1658 cm^{-1} as well as the ratio of lipid mass and Amide I band intensity for the region of primary injury after 2, 8, 16 and 30 days from its induction. In part (A) the microscopic views of the scanned tissue areas were presented, scale bar in the left down corner of the picture indicates 600 μm . The chemical maps for the three selected male rats, representing each of analyzed time points, were shown in part (B), whilst analogical data for females were presented in part (D). The box-and-whisker plots demonstrating the scatter of the biochemical parameters values in area of injury (i) and in unaffected cerebral cortex (c) of male and female rats were, respectively, presented in parts (C) and (E). Statistically relevant differences (*U* test, 5 % significance level) between the area of injury and cortex for examined stages of glial scar development were marked with #.

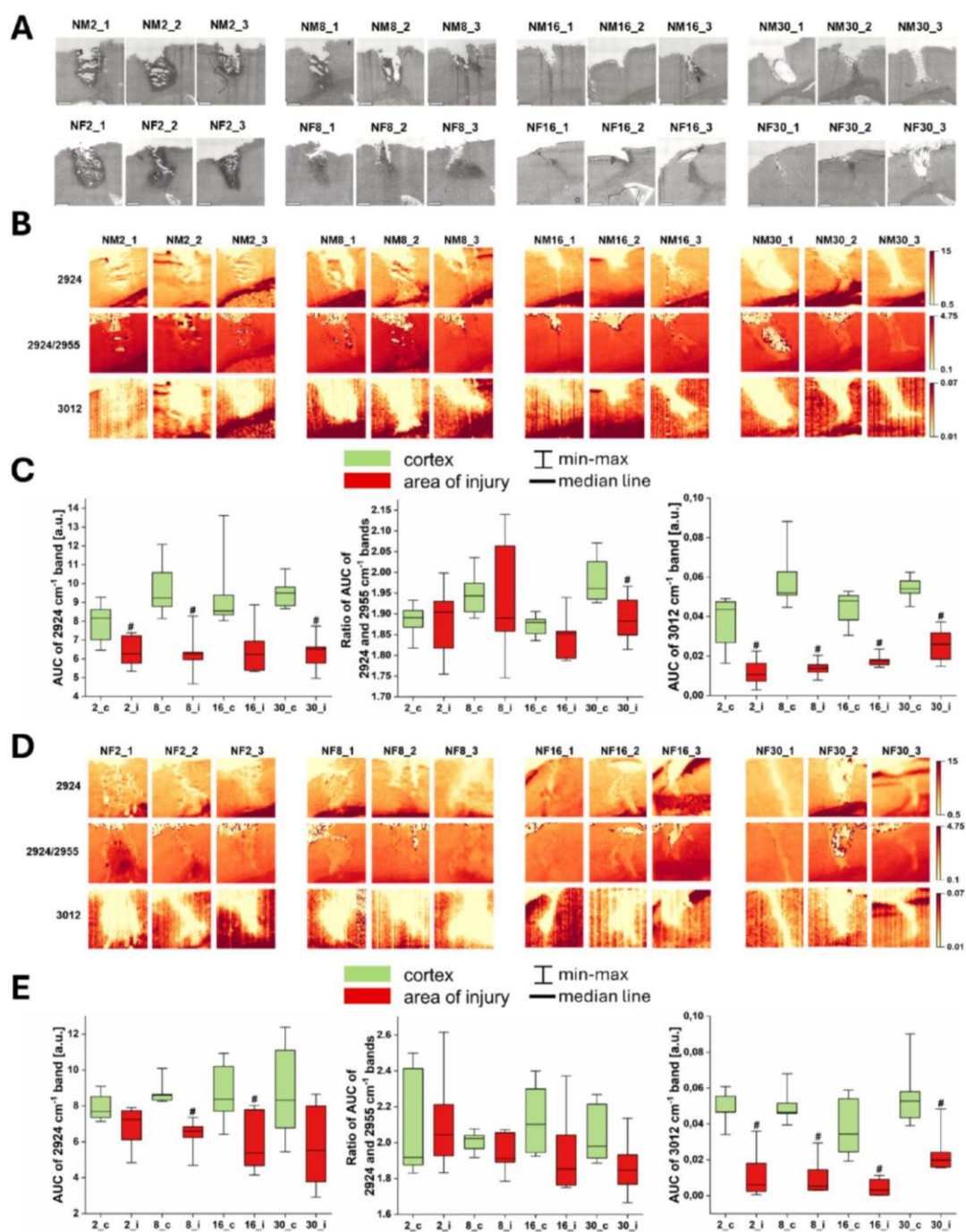


Fig. 4. The results of the chemical mapping of lipid bands at 2924 and 3012 cm^{-1} as well as the ratio of intensity of the bands at 2924 and 2955 cm^{-1} for the region of primary injury after 2, 8, 16 and 30 days from its induction. In part (A) the microscopic views of the scanned tissue areas were presented, scale bar in the left down corner of the picture indicates 600 μm . The chemical maps for the three selected male rats, representing each of analyzed time points, were shown in part (B), whilst analogical data for females were presented in part (D). The box-and-whisker plots demonstrating the scatter of the biochemical parameters values in area of injury (i) and in unaffected cerebral cortex (c) of male and female rats were, respectively, presented in parts (C) and (E). Statistically relevant differences (*U* test, 5 % significance level) between the area of injury and cortex for examined stages of glial scar development were marked with #.

IR band	Males – periods [days]				Females – periods [days]			
	0 - 2	2 - 8	8 - 16	16 - 30	0 - 2	2 - 8	8 - 16	16 - 30
1080 cm ⁻¹	↓	→	→	↑	↓	→	→	→
1240 cm ⁻¹	↓	→	→	→	↓	→	→	→
1360 cm ⁻¹	↓	→	→	↑	↓	→	→	→
1480 cm ⁻¹	↓	→	→	→	↓	→	→	→
1740 cm ⁻¹	↓	→	→	→	↓	→	→	→
1658 cm ⁻¹	↓	→	→	→	↓	→	→	→
1635/1658	↑	↓	→	→	↑	↓	↓	→
2800-3000/1658	→	→	→	→	→	→	→	→
2924 cm ⁻¹	↓	→	→	→	→	→	→	→
3012 cm ⁻¹	↓	→	→	→	↓	→	→	↑
2924/2955	→	→	→	→	→	→	→	→

Fig. 5. The dynamics of biomolecular changes (statistically significant differences in the level of examined biochemical parameters between the neighboring time points) occurring in the area of injury during the glial scar formation in male rats. Statistically significant increases found for the studied periods were marked as the green rising arrows, whilst decreases as red falling arrows. The black horizontal arrow means the lack of the statistically relevant differences between the neighboring time points. The verification of the statistical relevance of the observed differences was based on the *U* test (5 % significance level). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

diminished intensity of the bands at 1740 and 3012 cm⁻¹. Intensity of these bands, however, seem to increase together with the scar formation, what may point at a gradual regeneration of the cerebral cortex. The comparison of the results obtained for male and female rats may indicate higher populational variability in the case of females that manifests by higher standard deviation values in case of average IR spectra.

The analysis of the Raman spectra presented in Fig. 8B indicates that the intensities of the bands at 750 and 1586 cm⁻¹ decrease not only as a consequence of the primary injury but also throughout the progression of glial scar formation. Furthermore, a comparison of the spectra obtained from the intact cortical regions of male and female rats reveals distinct differences in the spectral profile within the 1500–1700 cm⁻¹ range. In male rats, the intensities of the bands at 1586 cm⁻¹ (amide II) [41] and 1661 cm⁻¹ (amide I) [42] are comparable, whereas in females, the intensity of the 1586 cm⁻¹ band is markedly reduced. In both sexes, glial scar development leads to a significant decrease in the 1586 cm⁻¹ band relative to the 1661 cm⁻¹ one. Notably, in the case of a fully formed glial scar, the Raman spectral profiles do not exhibit significant sex-dependent differences.

Besides the qualitative comparisons of the Raman spectra, a set of biochemical parameters was also determined based on the experimental data. The ratios of the following Raman bands were calculated: 750 cm⁻¹/1447 cm⁻¹, 1586 cm⁻¹/1447 cm⁻¹, 1743 cm⁻¹/2853 cm⁻¹ and 3010 cm⁻¹/2853 cm⁻¹, and afterwards presented in the Figs. 6C and 7C (for males and females, respectively) in the form of box-and-whisker plots showing the populational scatter of the examined parameters in the area of injury and cerebral cortex for four examined time points.

The ratio of Raman bands at 750 cm⁻¹ and 1447 cm⁻¹ informs about the abundance of cytochrome C [43] and, the same, is an indicator of the survived or undamaged cells in the examined tissue areas. The analysis of the data presented in the Figs. 6C and 7C shows that, both for male and female rats, the level of this ratio is significantly lower within the scar comparing to the unaffected cortex. Similar result was obtained for the ratio of Raman bands at 1586 cm⁻¹ and 1447 cm⁻¹ that is used as an indicator of the amide II distribution and the changes in the secondary structure of proteins [41]. Although not always significantly, the values of this parameter are lower for the injury site comparing to the

microscopically unchanged brain tissue.

The ratio of Raman signal at 1743 cm⁻¹ and 2853 cm⁻¹ is a measure of the level of lipid esterification [44]. For female rats one can see that its value tends to decrease for the area of injury. However the observed differences are not statistically significant. In males, statistically relevant decrease of the level of lipid esterification was found 2 days after primary damage. Afterwards, the parameter increased for the area of injury reaching the value characteristic for the unaffected tissue.

The ratio of Raman bands at 3010 cm⁻¹ and 2853 cm⁻¹ is used as a measure of lipids unsaturation degree [45]. Our results show that its level is relevantly lower in the glial scar but only in case of female rats 2, 6 and 16 days from the injury. For the fully formed scar the ratio of 3010 cm⁻¹/2853 cm⁻¹ does not differ between the injury site and unchanged cortex even for females.

4. Discussion

The TBI model used in this study leads to the damage of the skull, meninges and cerebral cortex [13–17]. Such a serious violation of the integrity of brain tissue must be reflected in the glial scarring processes that follow the injury. Brain damage involves two main stages. The first stage is the primary injury, which is related to the occurrence of forces or events that cause damage to the organ [46,47]. The second stage, which is much longer and more complicated and is a consequence of the primary damage, includes a number of processes occurring at the cellular, tissue and behavioral levels [48,49]. Thanks to the use of four time points after the injury induction in our study (2, 8, 16 and 30 days), we were able to observe the dynamics of formation and the morphological and biochemical changes characteristic for the forming glial scar.

Investigation carried out using FTIRM indicated, among others, a significant decrease, or even disappearance, in the spectra from the damaged area the band at 3012 cm⁻¹ characteristic for unsaturated bonds in aliphatic chains of lipids. The observed changes in the accumulation of unsaturated fatty acids are most likely due to the damage to the cell membranes of neurons and glial cells, which contain large amounts of phospholipids [50,51]. The reduced content of these compounds may, in turn, lead to the disruption of signaling pathways in

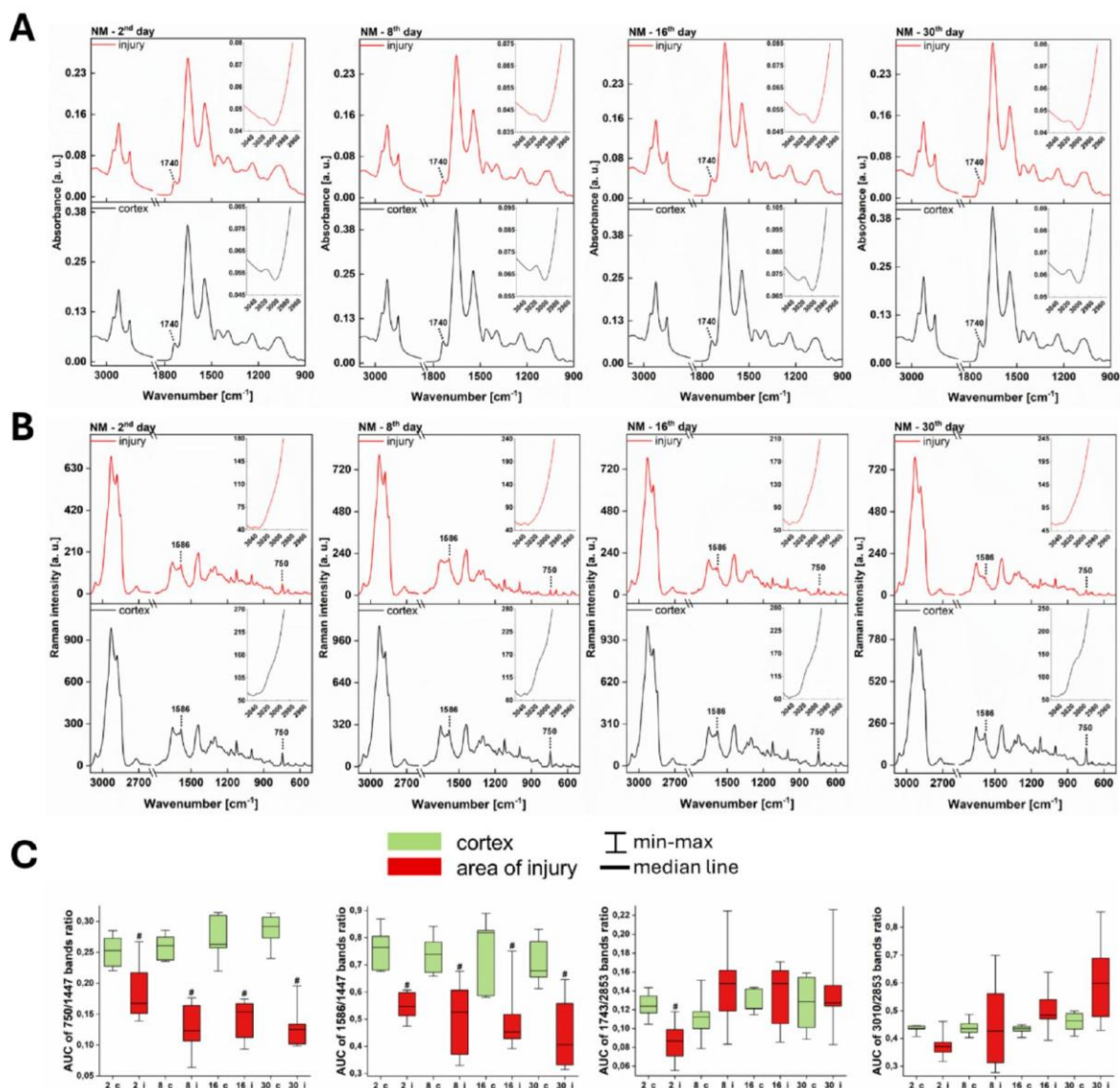


Fig. 6. The average IR (A) and Raman (B) spectra obtained for the area of injury and unaffected cortex after 2, 8, 16 and 30 days from its induction in male rats. The inset in the upper right corner shows a magnified fragment of the spectrum obtained in the high wavenumber region. (C) The box-and-whisker plots demonstrating the scatter of the biochemical parameters values in the area of injury (i) and in microscopically unchanged cortex (c) of male rats. Statistically relevant differences (*U* test, 5 % significance level) between the injury site and cortex for examined stages of glial scar development were marked with #.

cells, because they act as receptor activators and/or may constitute a matrix for other fatty acid-based transmitters [52–55].

The results obtained with both techniques of vibrational spectroscopy showed the presence of significant changes in proteins conformation in the area of injury. The anomalies, which were manifested by an elevated ratio of absorbance at 1635 and 1658 cm⁻¹ in the case of FTIRM and diminished ratio of bands at 1586 and 1447 cm⁻¹ in the case of Raman microscopy, indicate a significant increase of the relative content of proteins with the β structure in the glial scar area. The greatest conformational changes of proteins are visible immediately after the injury and at the early stages of the scar formation. On the 30th day from the primary damage, the relative content of proteins with

β -structure within area of injury is already at a level characteristic for the unchanged cerebral cortex. The increased content of proteins with the β -sheet secondary structure at the early stages of the scar formation may point at an increased expression of chondroitin sulphate proteoglycans (CSPGs). CSPGs, containing a protein core of β -type secondary structure [56,57], constitute attachment points for extracellular matrix proteins [58,59]. It has been shown that the damage to the central nervous system causes the appearance of CSPGs-rich glial scars formed by the reactive astrocytes. What is more, the accumulation of CSPGs in the region of injury is considered to be one of the main causes of failure in axonal regeneration [60–64]. On the other hand, TBI may also lead to the deposition of β -amyloid in the brain [65,66], which may

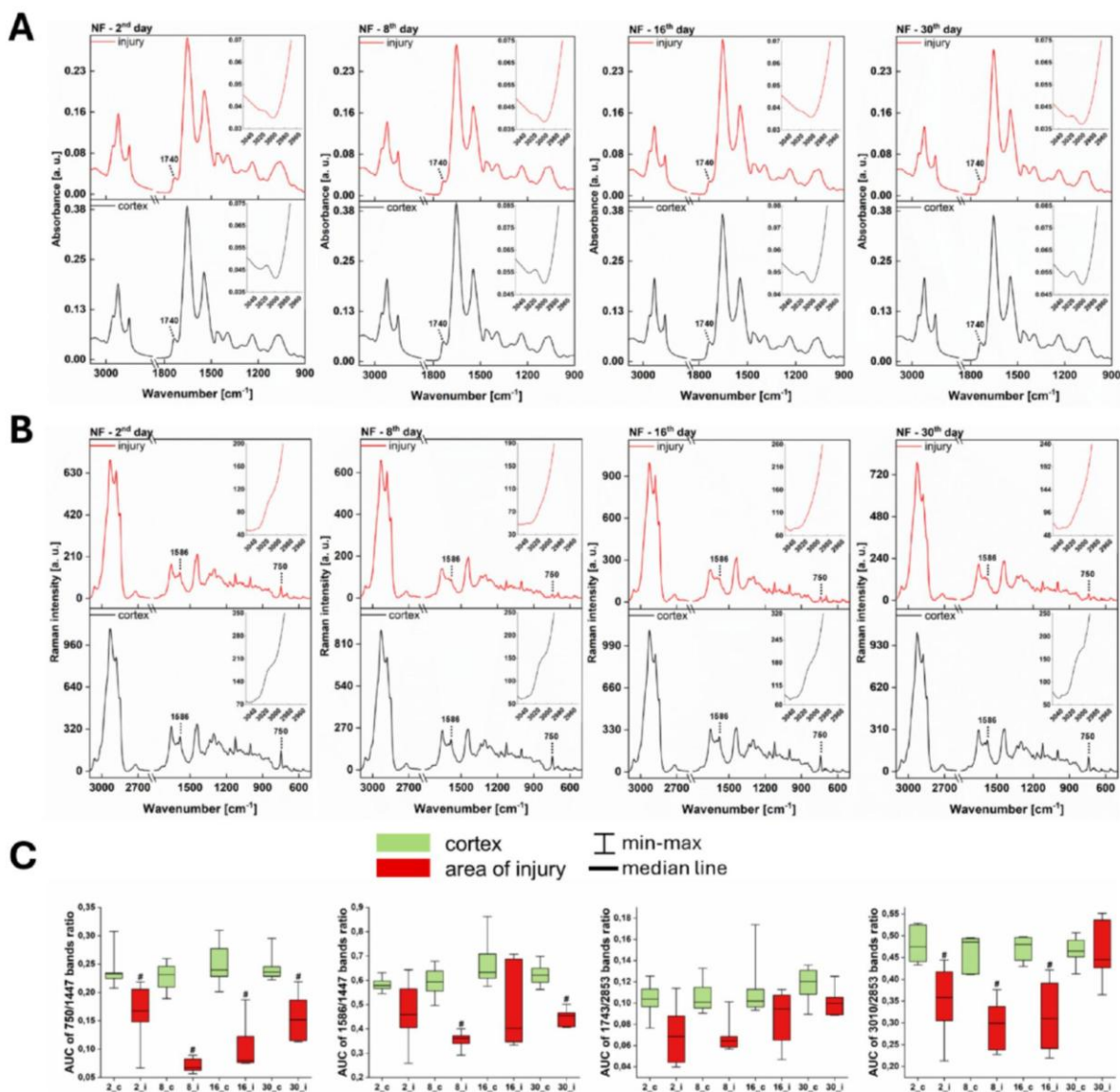


Fig. 7. The average IR (A) and Raman (B) spectra obtained for the area of injury and unaffected cortex after 2, 8, 16 and 30 days from its induction in female rats. The inset in the upper right corner shows a magnified fragment of the spectrum obtained in the high wavenumber region. (C) The box-and-whisker plots demonstrating the scatter of the biochemical parameters values in the area of injury (i) and in microscopically unchanged cortex (c) of female rats. Statistically relevant differences (*U* test, 5 % significance level) between the injury site and cortex for examined stages of glial scar development were marked with #.

be a marker of axonal damages occurring within it [67].

Our findings also indicate that mechanical injury to the cerebral cortex results in a local decrease of the level of phosphate-containing compounds, such as nucleic acids and phospholipids. This was reflected in a significant reduction (by at least 25 %) in the intensity of absorption bands at 1080 and 1240 cm⁻¹ for the injury site. These results were corroborated by Raman spectroscopy, which showed a reduction of approximately 30 % in the relative intensity of the band at 750 cm⁻¹ in this area. The mentioned band is related to the presence of cytochrome C and/or DNA [68,69], and its occurrence in the spectrum indicates the presence of living cells within the tissue. The diminished accumulation of compounds with the phosphate groups found in the scar

region is also in agreement with the data obtained previously by Chwiej et al. [70], which shown a decrease in phosphorus content at the area of injury.

The diminished intensity of the IR band at 1658 cm⁻¹ band observed for the area of injury may result from both the reduced content of proteins in this area and the smaller thickness of the examined tissue. Rakib et al. [39] observed diminished accumulation of proteins in the damaged tissue, using for this purpose the impact TBI model based on the Marmarou method [71]. In turn, the results of our previous study, conducted using Raman microspectroscopy for a fully formed glial scar [15], point at a smaller tissue thickness in the area of injury.

The TBI model with the damage of the blood-brain barrier (BBB),

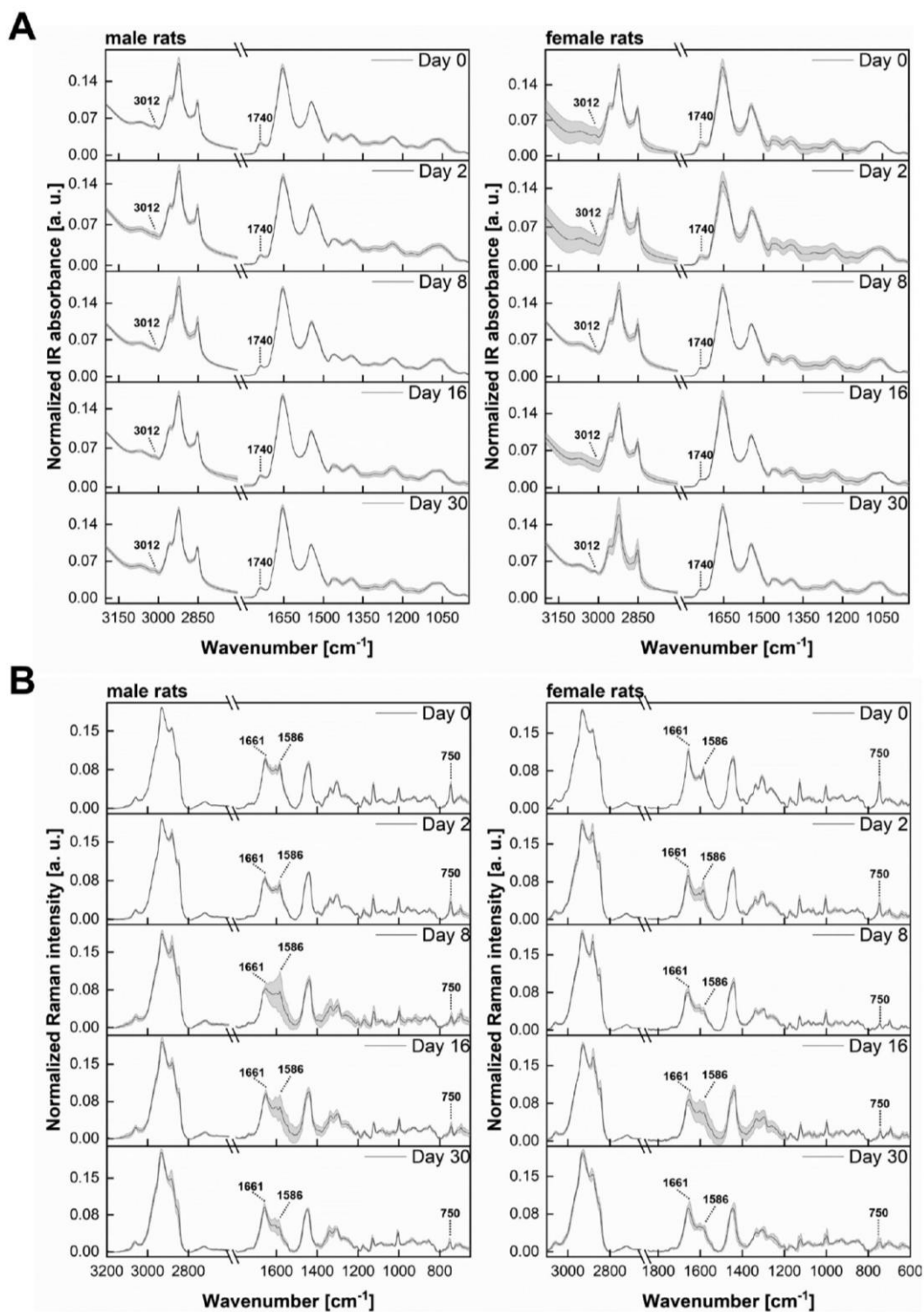


Fig. 8. Average IR (A) and Raman spectra (B) – solid lines – together with their standard deviations – shadows – obtained for the area of injury in analyzed time points. Prior to averaging the spectra were vector normalized and subjected to baseline (background) subtraction. For better visualization the wavenumber region of 2500–3200 cm^{-1} in the IR spectra and 600–1900 cm^{-1} in the Raman spectra was multiplied by the factor of 2.

that was used in our investigation, causes irreversible damage of a huge number of cells, which are largely composed of cell membranes containing phospholipids. The mentioned process leads to a reduction in the content of phospholipids in tissue, which is manifested by a reduced intensity of lipid bands at 2924 and 3012 cm^{-1} within the area of injury. Most likely, the same phenomenon leads also to the diminished accumulation of cholesterol and cholesterol esters in the scar area, which translates into the diminished intensity of IR bands at 1360 and 1480 cm^{-1} (by approximately 30 % in first two periods after TBI) in this region comparing to the unaffected cortex.

According to the literature greater neuroplasticity causes a milder course of the events occurring as a result of primary injury [25] as well as better prognosis in case of the brain damage in females. Neuroplasticity is modulated, among others, by estrogens, which activate pathways related to brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which is crucial for neuronal regeneration [72–74]. Our results, however, did not show relevant differences between male and female rats in the course of biochemical abnormalities occurring as a result of mechanical cortical injury. For females, higher spread of calculated biochemical parameters both for the area of injury and microscopically unaffected cortex and the temporary decrease in the level of unsaturation of lipids within the area of injury was only found.

When comparing our study to similar research in the field of TBI, particular attention should be given to the type of animal model used. Most studies employ diffuse injury models, usually induced by a falling weight in accordance with the Marmarou method [71]. Despite the differences in the injury models applied, the results of our study are consistent with those reported by Rakib et al. [35], and Ustaoglu et al. [36]. In all three studies, similar anomalies in the IR spectra of the injured area were found, including a noticeable decrease in the intensity of bands at 3012 cm^{-1} , 1740 cm^{-1} , and 2924 cm^{-1} . Moreover, these changes showed a slight trend toward recovery during the scar formation. Compared to the study by Ustaoglu et al., we examined larger number of time points and used Raman microscopy as a complementary technique to FTIRM. This enabled us to gain deeper insight into the behavior of cerebral tissue in response to the localized TBI and verify the observed changes in the key molecular parameters.

The data obtained in the work concerning biochemical anomalies that occur in the brain as a result of its mechanical damage and how they change over time from the initial damage allow us to enter the next stage of the research. Their aim will be, among others, to assess what modifications in this area are introduced in animals by the ketogenic diet and how this translates into the neuroprotective effect of such dietary therapy in TBI.

5. Limitations of the study

In this study, we compared the injured region of the cerebral cortex to a distant, microscopically unaffected area within the same brain slice. While this approach provides insight into local biochemical alterations associated with the injury, it does not represent a true uninjured biological control. The surrounding cortex was used as an internal reference point, rather than as an independent control region. As such, this comparison does not fully account for the systemic effects of TBI, which may influence the biochemistry of seemingly unaffected areas. Future studies should incorporate a separate, non-injured control group to enable a more comprehensive evaluation of both local and systemic consequences of TBI.

6. Conclusions

The data obtained in this work indicate that the methods of vibrational microscopy may serve as a source of valuable information on biomolecular changes of the cerebral cortex occurring both as a result of its primary mechanical damage and the process of formation of a glial scar. Abnormalities in both the level and structure of biologically

important molecules in the nervous tissue appeared immediately after the damage and were mostly maintained till the last day of observation. The exception here were the changes in the secondary structure of proteins. The relative content of proteins with a β -conformation, that increased significantly directly after the brain damage, reached finally the level characteristic for the unaffected cerebral cortex in both male and female rats. Animal sex did not influence spectacularly the process of glial scar formation. The subtle differences between males and females included higher spread of measured biochemical parameters for both injury site and unchanged cortex area and diminished unsaturation level of lipids within scar in case of female rats. Summarizing, this study enhances our understanding of post-injury biochemical changes in the cortex and provides a foundation for future research into TBI therapeutic strategies.

CRedit authorship contribution statement

Kamil Kawon: Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Visualization, Writing – original draft. **Zuzanna Setkiewicz:** Conceptualization, Methodology, Resources, Writing – review & editing. **Zuzanna Rauk:** Investigation. **Joanna Chwiej:** Conceptualization, Methodology, Resources, Investigation, Supervision, Writing – original draft.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The present study was supported by: (1) the Ministry of Science and Higher Education of Poland, (2) the subvention fund no. N18/DBS/000018 of the Laboratory of Experimental Neuropathology, (3) the funds granted to the AGH University of Krakow in the frame of the “Excellence Initiative – Research University” project (Action 4: A system of university grants for research carried out with the participation of doctoral students and young scientists, PL-Joanna Chwiej).

The Raman data were recorded and analyzed using WITec Alpha300R Raman microscope and dedicated software that was bought in frame of the “Excellence Initiative-Research University” Project granted to AGH UST.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.saa.2025.126782>.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- [1] C. Iaccarino, A. Gerosa, E. Viaroli, Epidemiology of traumatic brain injury, traumatic brain injury: science, practice, Evid. Ethics (2021) 3–11, https://doi.org/10.1007/978-3-030-78075-3_1.
- [2] B.I. Martinez, S.E. Stabenfeldt, Current trends in biomarker discovery and analysis tools for traumatic brain injury, J. Biol. Eng. (2019) 1–12, <https://doi.org/10.1186/S13036-019-0145-8>.
- [3] R. Sharma, D.T. Laskowitz, Biomarkers in traumatic brain injury, Curr. Neurol. Neurosci. Rep. 12 (2012) 560–569, <https://doi.org/10.1007/S11910-012-0301-8>.
- [4] I. Leister, T. Haider, G. Mattiassich, J.L.K. Kramer, L.D. Linde, A. Pajalic, L. Grassner, B. Altendorfer, H. Resch, S. Aschauer-Wallner, L. Aigner, Biomarkers in traumatic spinal cord injury—technical and clinical considerations: a systematic review, Neurorehabil. Neural Repair 34 (2020) 95–110, <https://doi.org/10.1177/1545968319899920>.

- [5] J.E. Schucht, S. Rakhit, M.C. Smith, J.H. Han, J.B. Brown, A. Grigorian, S. P. Gondek, J.W. Smith, M.B. Patel, A.W. Maiga, Beyond Glasgow coma scale: prehospital prediction of traumatic brain injury, *Surgery* 179 (2025) 108893, <https://doi.org/10.1016/J.SURG.2024.07.090>.
- [6] T. Dalkilic, N. Fallah, V.K. Noonan, S. Salimi Elizei, K. Dong, L. Belanger, L. Ritchie, A. Tsang, E. Bourassa-Moreau, M.K.S. Heran, S.J. Paquette, T. Ailon, N. Dea, J. Street, C.G. Fisher, M.F. Dvorak, B.K. Kwon, Predicting Injury Severity and Neurological Recovery after Acute Cervical Spinal Cord Injury: A Comparison of Cerebrospinal Fluid and Magnetic Resonance Imaging Biomarkers, <https://Home.Liebertpub.Com/Neu> 35, 2018, pp. 435–445, <https://doi.org/10.1089/NEU.2017.5357>.
- [7] M.F. Kraus, T. Susmaras, B.P. Caughlin, C.J. Walker, J.A. Sweeney, D.M. Little, White matter integrity and cognition in chronic traumatic brain injury: a diffusion tensor imaging study, *Brain* 130 (2007) 2508–2519, <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWM216>.
- [8] R. Scheid, K. Walther, T. Guthke, C. Preul, D.Y. Von Cramon, Cognitive sequelae of diffuse axonal injury, *Arch. Neurol.* 63 (2006) 418–424, <https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.63.3.418>.
- [9] A. Petersen, M. Soderstrom, B. Saha, P. Sharma, Animal models of traumatic brain injury: a review of pathophysiology to biomarkers and treatments, *Exp. Brain Res.* 239 (2021) 2939–2950, <https://doi.org/10.1007/S00221-021-06178-6>.
- [10] D.R. Namjoshi, W.H. ang Cheng, K.A. McInnes, K.M. Martens, M. Carr, A. Wilkinson, J. Fan, J. Robert, A. Hayat, P.A. Crompton, C.L. Wellington, Merging pathology with biomechanics using CHIMERA (Closed-Head Impact Model of Engineered Rotational Acceleration): a novel, surgery-free model of traumatic brain injury, *Mol. Neurodegener.* 9 (2014) 55, <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-55>.
- [11] E.H. McNamara, A.A. Grillakis, L.B. Tucker, J.T. McCabe, The closed-head impact model of engineered rotational acceleration (CHIMERA) as an application for traumatic brain injury pre-clinical research: a status report, *Exp. Neurol.* 333 (2020) 113409, <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEURO.2020.113409>.
- [12] X. Ma, A. Aravind, B.J. Pfister, N. Chandra, J. Haorah, Animal models of traumatic brain injury and assessment of injury severity, *Mol. Neurobiol.* (2019) 5332–5345, <https://doi.org/10.1007/S12035-018-1454-5>.
- [13] K. Janeczko, Age-dependent changes in the proliferative response of S-100 protein-positive glial cells to injury in the rat brain, *Int. J. Dev. Neurosci.* 12 (1994) 431–440, [https://doi.org/10.1016/0736-5748\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0736-5748(94)90027-2).
- [14] K. Janeczko, Spatiotemporal patterns of the astroglial proliferation in rat brain injured at the postmitotic stage of postnatal development: a combined immunocytochemical and autoradiographic study, *Brain Res.* 485 (1989) 236–243, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90566-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90566-0).
- [15] K. Kawon, Z. Setkowicz, A. Drozd, K. Janeczko, J. Chwiej, The methods of vibrational microspectroscopy reveals long-term biochemical anomalies within the region of mechanical injury within the rat brain, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 263 (2021) 120214, <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2021.120214>.
- [16] Z. Setkowicz, K. Janeczko, Long-term changes in susceptibility to pilocarpine-induced status epilepticus following neocortical injuries in the rat at different developmental stages, *Epilepsy Res.* 53 (2003) 216–224, [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(03\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(03)00029-9).
- [17] Z. Setkowicz, E. Kosonowska, M. Kaczyńska, K. Gzielo-Jurek, K. Janeczko, Physical training decreases susceptibility to pilocarpine-induced seizures in the injured rat brain, *Brain Res.* 1642 (2016) 20–32, <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2016.03.008>.
- [18] M.B. Cieri, A.J. Ramos, Astrocytes, reactive astrogliosis, and glial scar formation in traumatic brain injury, *Neural Regen. Res.* 20 (2025) 973–989, <https://doi.org/10.4103/NRR.NRR-D-23-02091>.
- [19] Y. He, X. Liu, Z. Chen, Glial scar—a promising target for improving outcomes after CNS injury, *J. Mol. Neurosci.* 70 (2020) 340–352, <https://doi.org/10.1007/S12031-019-01417-6>.
- [20] D. Lerouet, C. Marchand-Leroux, V.C. Besson, Neuropharmacology in traumatic brain injury: from preclinical to clinical neuroprotection? *Fundam. Clin. Pharmacol.* 35 (2021) 524–538, <https://doi.org/10.1111/FCP.12656>.
- [21] R. Crupi, M. Cordaro, S. Cuzzocrea, D. Impellizzeri, Management of traumatic brain injury: from present to future, *Antioxidants* 9 (2020) 297, <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9040297>.
- [22] A. Jarrahi, M. Braun, M. Ahluwalia, R.V. Gupta, M. Wilson, S. Munie, P. Ahluwalia, J.R. Vender, F.L. Vale, K.M. Dhandapani, K. Vaibhav, Revisiting traumatic brain injury: from molecular mechanisms to therapeutic interventions, *Biomedicines* 8 (2020) 389, <https://doi.org/10.3390/BIMEDICINES8100389>.
- [23] M. Mohamadpour, K. Whitney, P.J. Bergold, The importance of therapeutic time window in the treatment of traumatic brain injury, *Front. Neurosci.* 13 (2019) 436553, <https://doi.org/10.3389/FNINS.2019.00007>.
- [24] P.G. Sullivan, A.H. Sebastian, E.D. Hall, Therapeutic Window Analysis of the Neuroprotective Effects of Cyclosporine A after Traumatic Brain Injury, <https://Home.Liebertpub.Com/Neu> 28, 2011, pp. 311–318, <https://doi.org/10.1089/NEU.2010.1646>.
- [25] R. Gupte, W. Brooks, R. Vukas, J. Pierce, J. Harris, Sex differences in traumatic brain injury: what we know and what we should know, *J. Neurotrauma* 36 (2019) 3063–3091, <https://doi.org/10.1089/NEU.2018.6171>.
- [26] T.G. Rubin, M.L. Lipton, Sex differences in animal models of traumatic brain injury, *J. Exp. Neurosci.* 13 (2019), <https://doi.org/10.1177/1179069519844020>, 1179069519844020.
- [27] T. Mollayeva, S. Mollayeva, A. Colantonio, Traumatic brain injury: sex, gender and intersecting vulnerabilities, *Nat. Rev. Neurol.* 14 (2018) 711–722, <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0091-y>.
- [28] H.J. Byrne, Spectralomics – towards a holistic adaptation of label free spectroscopy, *Vib. Spectrosc.* 132 (2024) 103671, <https://doi.org/10.1016/J.VIBSPEC.2024.103671>.
- [29] R. Galli, O. Uckeremann, Vibrational spectroscopy and multiphoton microscopy for label-free visualization of nervous system degeneration and regeneration, *Biophys. Rev.* 16 (2) (2023) 219–235, <https://doi.org/10.1007/S12551-023-01158-2>.
- [30] J.M. Surmacki, L. Ansel-Bollepalli, F. Pischotta, E.R. Zanier, A. Ercole, S. E. Bohndiek, Label-free monitoring of tissue biochemistry following traumatic brain injury using Raman spectroscopy, *Analyst* 142 (2016) 132–139, <https://doi.org/10.1039/C6AN02238C>.
- [31] G. Harris, C.A. Stickland, M. Lim, P. Goldberg Oppenheimer, Raman spectroscopy spectral fingerprints of biomarkers of traumatic brain injury, *Cells* 12 (2023) 2589, <https://doi.org/10.3390/CELLS12222589/S1>.
- [32] B.H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, 2004, <https://doi.org/10.1002/0470011149>.
- [33] E. Smith, G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*, John Wiley & Sons, 2004, <https://doi.org/10.1002/0470011831>.
- [34] H. Song, X. Zhou, C. Chen, C. Dong, Y. He, M. Wu, J. Yu, X. Chen, Y. Li, B. Ma, Multimodal separation and cross fusion network based on Raman spectroscopy and FTIR spectroscopy for diagnosis of thyroid malignant tumor metastasis, *Sci. Rep.* 14 (1) (2024) 1–15, <https://doi.org/10.1038/s41598-024-80590-0>.
- [35] F. Rakib, K. Al-Saad, S.G. Ustaoglu, E. Ullah, R. Mall, R. Thompson, E. M. Abdelalim, T. Ahmed, F. Severcan, M.H.M. Ali, Fourier transform infrared imaging—a novel approach to monitor bio molecular changes in subacute mild traumatic brain injury, *Brain Sci.* 11 (2021) 918, <https://doi.org/10.3390/BRAINS11070918>.
- [36] S.G. Ustaoglu, M.H.M. Ali, F. Rakib, E.L.A. Blezer, C.L. Van Heijningen, R. M. Dijkhuizen, F. Severcan, Biomolecular changes and subsequent time-dependent recovery in hippocampal tissue after experimental mild traumatic brain injury, *Sci. Rep.* 11 (1) (2021) 1–13, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92015-3>.
- [37] M. Rugiel, Z. Setkowicz-Janeczko, W. Kosiek, Z. Rauk, K. Kawon, J. Chwiej, Does ketogenic diet used in pregnancy affect the nervous system development in offspring?—FTIR microspectroscopy study, *ACS Chem. Neurosci.* 14 (2023) 2775–2791, <https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.3C00331>.
- [38] J.G. Chwiej, S.W. Ciesielka, A.K. Skoczyn, K.J. Janeczko, C. Sandt, K.L. Planeta, Z. K. Setkowicz, Biochemical changes indicate developmental stage in the hippocampal formation, *ACS Chem. Neurosci.* 10 (2019) 628–635, <https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.8B00471>.
- [39] F. Rakib, K. Al-Saad, T. Ahmed, E. Ullah, G.E. Barreto, G. Md Ashraf, M.H.M. Ali, Biomolecular alterations in acute traumatic brain injury (TBI) using Fourier transform infrared (FTIR) imaging spectroscopy, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 248 (2021) 119189, <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2020.119189>.
- [40] S. Saladrigas-Manjón, T. Dučić, L. Galindo, C. Fernández-Avilés, V. Pérez, R. de la Torre, P. Robledo, Effects of Cannabis Use on the Protein and Lipid Profile of Olfactory Neuroepithelium Cells from Schizophrenia Patients Studied by Synchrotron-Based FTIR Spectroscopy, *Biomolecules* 2020, Vol. 10, Page 329 10 (2020) 329, <https://doi.org/10.3390/B10M10020329>.
- [41] G.K. Jain, R. Verma, A. Chougule, B. Singh, Raman spectroscopy study of healthy and cancerous human breast tissue for cancer detection, *Explor. Anim. Med. Res.* 12 (2022) 160–166, <https://doi.org/10.52635/EAMR/12.2.160-166>.
- [42] A. Rygula, K. Majzner, K.M. Marzec, A. Kaczor, M. Pilarczyk, M. Baranska, Raman spectroscopy of proteins: a review, *J. Raman Spectrosc.* 44 (2013) 1061–1076, <https://doi.org/10.1002/JRS.4335>.
- [43] N.A. Brazhe, A.B. Evlyukhin, E.A. Goodilin, A.A. Semenov, S.M. Novikov, S.I. Bozhevolnyi, B.N. Chichkov, A.S. Sarycheva, A.A. Baizhuvanov, E.I. Nikelshparg, L.I. Deev, E.G. Maksimov, G. V. Maksimov, O. Sosnovtseva, Probing cytochrome c in living mitochondria with surface-enhanced Raman spectroscopy, *Scientific Reports* 2015 5:1 5 (2015) 1–13, <https://doi.org/10.1038/srep13793>.
- [44] J. Dybas, K. Bulat, A. Blat, T. Mohaisen, A. Wajda, M. Mardyla, M. Kaczmarek, M. Franczyk-Zarow, K. Malek, S. Chlopicki, K.M. Marzec, Age-related and atherosclerosis-related erythropathy in ApoE/LDLR^{-/-} mice, *Biochim. Biophys. Acta* 2020 (1866) 165972, <https://doi.org/10.1016/J.BBADS.2020.165972>.
- [45] A.F. García-Flores, L. Raniero, R.A. Canevari, K.J. Jalkanen, R.A. Bitar, H. S. Martinho, A.A. Martin, High-wavenumber FT-Raman spectroscopy for in vivo and ex vivo measurements of breast cancer, *Theor. Chem. Accounts* 130 (2011) 1231–1238, <https://doi.org/10.1007/S00214-011-0925-9>.
- [46] M. Prins, T. Greco, D. Alexander, C.C. Giza, The pathophysiology of traumatic brain injury at a glance, *Dis. Model. Mech.* 6 (2013) 1307–1315, <https://doi.org/10.1242/DMM.011585>.
- [47] K. Thapa, H. Khan, T.G. Singh, A. Kaur, Traumatic Brain Injury: Mechanistic Insight on Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets, *Journal of Molecular Neuroscience* 2021 71:9 71 (2021), 1725–1742, <https://doi.org/10.1007/S12031-021-01841-7>.
- [48] S.Y. Ng, A.Y.W. Lee, Traumatic brain injuries: pathophysiology and potential therapeutic targets, *Front. Cell. Neurosci.* 13 (2019) 484040, <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2019.00528>.
- [49] M.A.M. Freire, G.S. Rocha, L.O. Bittencourt, D. Falcao, R.R. Lima, J.R.L. P. Cavalcanti, Cellular and molecular pathophysiology of traumatic brain injury: what have we learned so far? *Biology* 12 (2023) 1139, <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY12081139>.
- [50] H. Watson, *Biological membranes*, *Essays Biochem.* 59 (2015) 43–70, <https://doi.org/10.1042/BSE0590043/88342>.
- [51] W. Szlasa, I. Zendran, A. Zalesińska, M. Tarek, J. Kulbacka, Lipid composition of the cancer cell membrane, *J. Bioenerg. Biomembr.* 5 (2) (2020) 321–342, <https://doi.org/10.1007/S10863-020-09846-4>.

- [52] I. Nessel, A.T. Michael-Titus, Lipid profiling of brain tissue and blood after traumatic brain injury: a review of human and experimental studies, *Semin. Cell Dev. Biol.* 112 (2021) 145–156, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.08.004>.
- [53] R.A. Colas, M. Shinohara, J. Dalli, N. Chiang, C.N. Serhan, Identification and signature profiles for pro-resolving and inflammatory lipid mediators in human tissue, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 307 (2014), <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00024.2014>.
- [54] E.A. Dennis, P.C. Norris, Eicosanoid storm in infection and inflammation, *Nat. Rev. Immunol.* 15 (8) (2015) 511–523, <https://doi.org/10.1038/nri3859>.
- [55] X. He, Y. Li, B. Deng, A. Lin, G. Zhang, M. Ma, Y. Wang, Y. Yang, X. Kang, The PI3K/AKT signalling pathway in inflammation, cell death and glial scar formation after traumatic spinal cord injury: mechanisms and therapeutic opportunities, *Cell Prolif.* 55 (2022) e13275, <https://doi.org/10.1111/CPR.13275>.
- [56] J.Y.C. Hsu, L.Y.W. Bourguignon, C.M. Adams, K. Peyrollier, H. Zhang, T. Fandel, C. L. Cun, Z. Werb, L.J. Noble-Haesslein, Matrix Metalloproteinase-9 facilitates glial scar formation in the injured spinal cord, *J. Neurosci.* 28 (2008) 13467–13477, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2287-08.2008>.
- [57] E. Tamburini, A. Dallatomasina, J. Quartararo, B. Cortelazzi, D. Mangieri, M. Lazzaretti, R. Perris, Structural deciphering of the NG2/CSPG4 proteoglycan multifunctionality, *FASEB J.* 33 (2019) 3112–3128, <https://doi.org/10.1096/FJ.201801670R>.
- [58] S.A. Busch, J. Silver, The role of extracellular matrix in CNS regeneration, *Curr. Opin. Neurobiol.* 17 (2007) 120–127, <https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.09.004>.
- [59] J.A. Ortega, G.P. Soares de Aguiar, P. Chandravanshi, N. Levy, E. Engel, Z. Álvarez, Exploring the properties and potential of the neural extracellular matrix for next-generation regenerative therapies, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 16 (2024) e1962, <https://doi.org/10.1002/WNAN.1962>.
- [60] S. Haylock-Jacobs, M.B. Keough, L. Lau, V.W. Yong, Chondroitin sulphate proteoglycans: extracellular matrix proteins that regulate immunity of the central nervous system, *Autoimmun. Rev.* 10 (2011) 766–772, <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.05.019>.
- [61] C.M. Galtrey, J.W. Pawcett, The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system, *Brain Res. Rev.* 54 (2007) 1–18, <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.09.006>.
- [62] X. Tang, J.E. Davies, S.J.A. Davies, Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue, *J. Neurosci. Res.* 71 (2003) 427–444, <https://doi.org/10.1002/JNR.10523>.
- [63] U. John, N. Patro, I.K. Patro, Astroglialosis and associated CSPG upregulation adversely affect dendritogenesis, spinogenesis and synaptic activity in the cerebellum of a double-hit rat model of protein malnutrition (PMN) and lipopolysaccharide (LPS) induced bacterial infection, *J. Chem. Neuroanat.* 131 (2023) 102286, <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2023.102286>.
- [64] N. Mukherjee, S. Nandi, S. Garg, S. Ghosh, S. Ghosh, R. Samat, S. Ghosh, Targeting chondroitin sulfate proteoglycans: an emerging therapeutic strategy to treat CNS injury, *ACS Chem. Neurosci.* 11 (2020) 231–232, <https://doi.org/10.1021/ACSCHENNEURO.0C00004>.
- [65] V.E. Johnson, W. Stewart, D.H. Smith, Traumatic brain injury and amyloid- β pathology: a link to Alzheimer's disease? *Nat. Rev. Neurosci.* 11 (5) (2010) 361–370, <https://doi.org/10.1038/nrn2808>.
- [66] B.L. Brett, R.C. Gardner, J. Godbout, K. Dams-O'Connor, C.D. Keene, Traumatic brain injury and risk of neurodegenerative disorder, *Biol. Psychiatry* 91 (2022) 498–507, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2021.05.025>.
- [67] J. Zhang, F. Niu, H. Dong, L. Liu, J. Li, S. Li, Characterization of protein alterations in damaged axons in the brainstem following traumatic brain injury using Fourier transform infrared microspectroscopy: a preliminary study, *J. Forensic Sci.* 60 (2015) 759–763, <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12743>.
- [68] M. Mehta, Y. Liu, M. Waterland, G. Holmes, Characterization of the degradation of sheepskin by monitoring cytochrome c of Bacteria by Raman spectroscopy, *Anal. Lett.* (2021) 1–18, <https://doi.org/10.1080/00032719.2020.1792476>.
- [69] A.C.S. Talari, Z. Movasaghi, S. Rehman, I.U. Rehman, Raman spectroscopy of biological tissues, *Appl. Spectrosc. Rev.* 50 (2015) 46–111, <https://doi.org/10.1080/05704928.2014.923902>.
- [70] J. Chwiej, A. Sarapata, K. Janeczko, Z. Stegowski, K. Appel, Z. Setkowicz, X-ray fluorescence analysis of long-term changes in the levels and distributions of trace elements in the rat brain following mechanical injury, *J. Biol. Inorg. Chem.* 16 (2011) 275–283, <https://doi.org/10.1007/S00775-010-0724-0>.
- [71] M.A. Abd-Elfattah Foda, A. Marmarou, A new model of diffuse brain injury in rats: part II: morphological characterization, *J. Neurosurg.* 80 (1994) 301–313, <https://doi.org/10.3171/JNS.1994.80.2.0301>.
- [72] C.K. Barha, L.A.M. Galea, Influence of different estrogens on neuroplasticity and cognition in the hippocampus, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1800 (2010) 1056–1067, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.01.006>.
- [73] H.E. Scharfman, T.C. Mercurio, J.H. Goodman, M.A. Wilson, N.J. MacLusky, Hippocampal excitability increases during the estrous cycle in the rat: a potential role for brain-derived neurotrophic factor, *J. Neurosci.* 23 (2003) 11641–11652, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-37-11641.2003>.
- [74] N.C. Berchtold, J.P. Kesslak, C.J. Pike, P.A. Adlard, C.W. Cotman, Estrogen and exercise interact to regulate brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein expression in the hippocampus, *Eur. J. Neurosci.* 14 (2001) 1992–2002, <https://doi.org/10.1046/J.0953-816X.2001.01825.X>.

Supplementary materials

Vibrational spectroscopy methods reveal biochemical changes associated with the glial scar formation after traumatic brain injury

Kamil Kawon^{1#}, Zuzanna Setkowicz^{2#}, Zuzanna Rauk², Joanna Chwiej^{1*}

¹ AGH University of Krakow, Faculty of Physics and Applied Computer Science, Krakow, Poland

² Jagiellonian University, Institute of Zoology and Biomedical Research, Krakow, Poland

* Corresponding author

Equally contributed

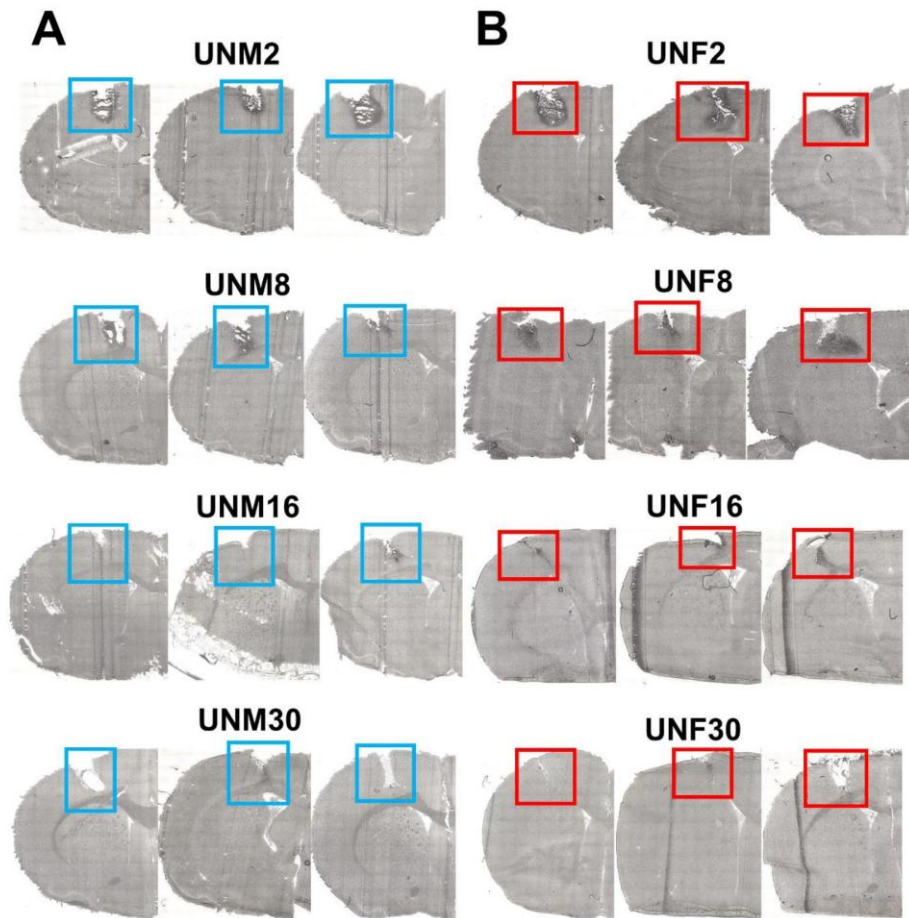


Figure S1. The microscopic views of selected brain slices taken from the area of injury with marked areas subjected to raster scanning with the infrared beam. Pictures obtained for male rats are presented in part A whilst for females in part B of the Figure S1.

Table S1. The average body masses of animals from particular populations on the day of sample collection.

Group	Body mass [g]	SD [g]
NM2	111.2	6.2
NM8	142.6	15.9
NM16	190.2	15.2
NM30	260.6	18.3
NF2	102.5	2.3
NF8	133.2	9.7
NF16	153.1	5.9
NF30	190.3	19.5

Table S2. Assignment of frequencies recorded in FTIR and Raman spectra to the corresponding vibrations of bonds/functional groups of compounds present in the studied tissues [1–8].

Frequency [cm ⁻¹]	Assignment
FTIRM	
~1080	PO ₂ symmetric stretching
~1240	PO ₂ asymmetric stretching
~1360	CH ₂ symmetric bending
~1480	CH ₂ (cyclic) scissoring
~1635	C=O stretching, C-N stretching, N-H bending
~1658	C=O stretching, C-N stretching, N-H bending
~1740	C=O stretching
~2924	CH ₂ asymmetric stretching
~2955	CH ₃ asymmetric stretching
~3012	=C-H stretching
Raman	
~750	C-C and C-N in macrocyclic porphyrin structure
~1447	C-H bending in lipids and proteins
~1586	C=C and C=N stretching in aromatic rings
~1743	C=O stretching
~2853	CH ₂ stretching
~3010	=C-H stretching

Table S3. Examined IR and Raman bands and their assignment to biochemical parameters [1–7].

IR absorption band/ratio of absorption bands	Assignment to biochemical parameter
1080 cm ⁻¹ and 1240 cm ⁻¹	distribution of compounds containing phosphate group(s) including nucleic acids, phospholipids, phosphorylated carbohydrates, differences in the degree of phosphorylation of carbohydrates and glycoproteins
1360 cm ⁻¹	distribution of lipids, cholesterol and its esters
1480 cm ⁻¹	distribution of lipids, cholesterol and its esters
1635 cm ⁻¹ /1658 cm ⁻¹	conformational changes of proteins, the relative level of proteins with β -sheet to α -helix in secondary structure
1658 cm ⁻¹	amide I band, protein distribution
1740 cm ⁻¹	distribution of compounds containing carbonyl group(s)
2924 cm ⁻¹	distribution of lipids
2924 cm ⁻¹ /2955 cm ⁻¹	the degree of branching and structural changes of lipids
2800-3000 cm ⁻¹ /1658 cm ⁻¹	distribution of lipids in relation to proteins
3012 cm ⁻¹	distribution of unsaturated lipids
Ratio of Raman bands	Assignment to biochemical parameter
750 cm ⁻¹ /1447 cm ⁻¹	distribution of cytochrome C in relation to aliphatic chains in lipids and proteins
1586 cm ⁻¹ /1447 cm ⁻¹	amide II band in relation to aliphatic chains in lipids and proteins
1743 cm ⁻¹ /2853 cm ⁻¹	level of lipids esterification
3010 cm ⁻¹ /2853 cm ⁻¹	unsaturation level of lipids

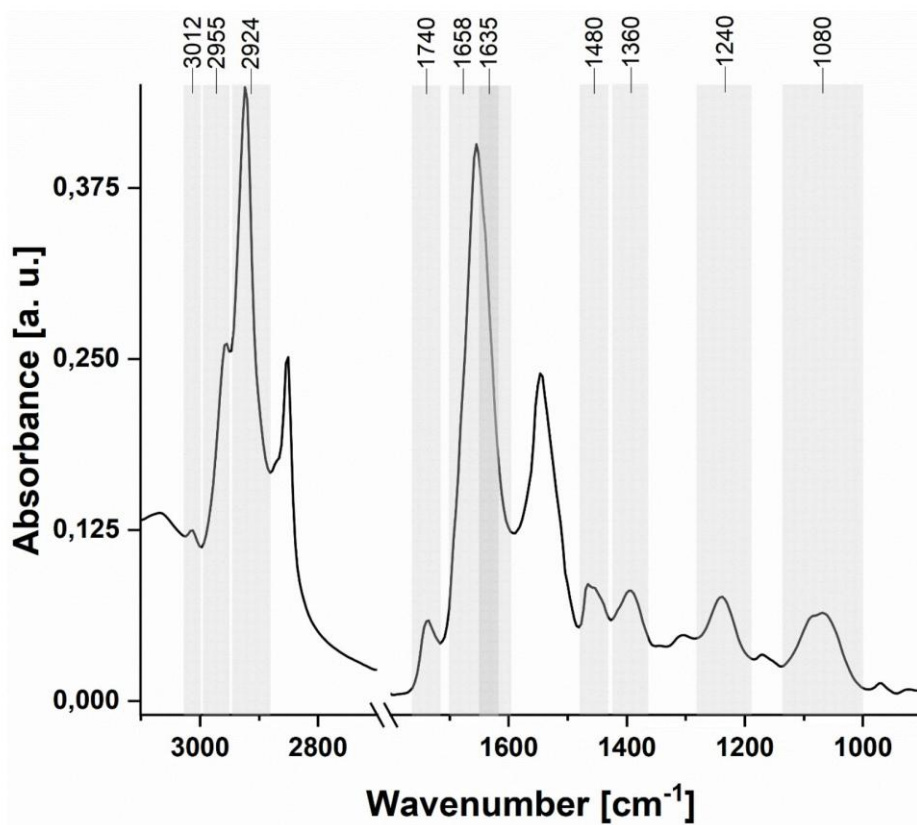


Figure S2. The exemplary IR spectrum after background subtraction and vector normalization. Shaded regions inform about the spectral ranges taken for integration of examined bands. The spectrum in the range from 3100 to 2600 cm^{-1} was enlarged 2 times in order to better visualize the 3012 cm^{-1} band.

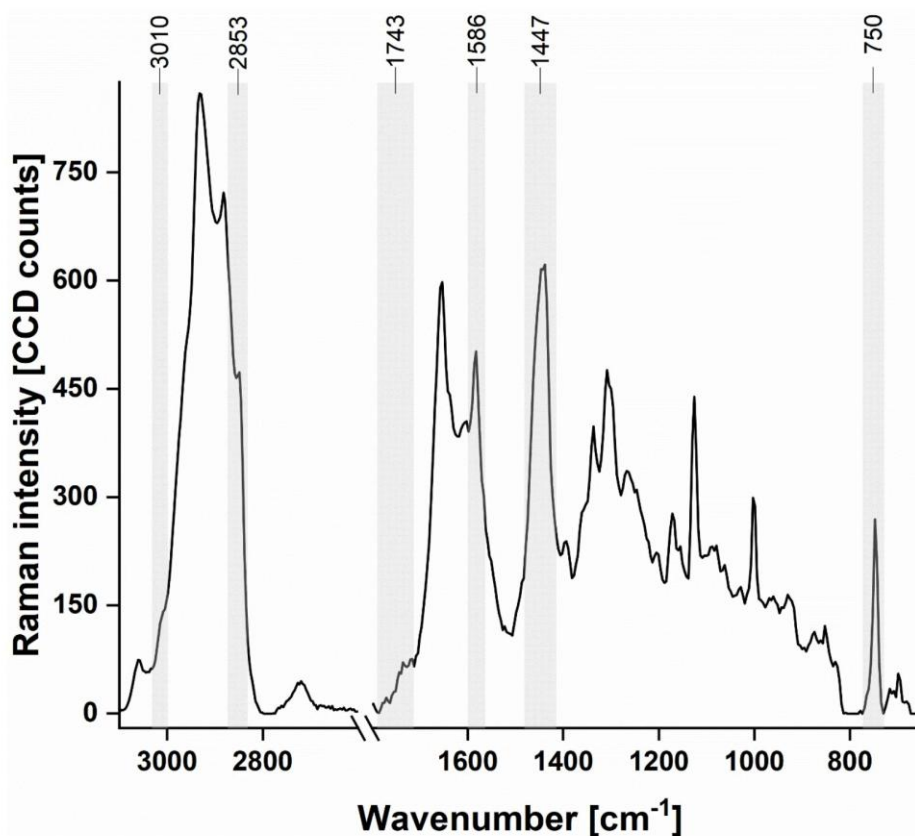


Figure S3. The exemplary Raman spectrum after background subtraction. Shaded regions inform about the spectral ranges taken for integration of examined bands. The spectrum in the fingerprint region (1900-600 cm⁻¹) was enlarged 2.5 times for better visualization of low intensity bands.

References:

- [1] M. Rugiel, Z. Setkowicz-Janeczko, W. Kosiek, Z. Rauk, K. Kawon, J. Chwiej, Does Ketogenic Diet Used in Pregnancy Affect the Nervous System Development in Offspring?—FTIR Microspectroscopy Study, *ACS Chem Neurosci* 14 (2023) 2775–2791.
- [2] K. Kawon, Z. Setkowicz, A. Drozd, K. Janeczko, J. Chwiej, The methods of vibrational microspectroscopy reveals long-term biochemical anomalies within the region of mechanical injury within the rat brain, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 263 (2021) 120214.
- [3] J. Dybas, K. Bulat, A. Blat, T. Mohaissen, A. Wajda, M. Mardyla, M. Kaczmarek, M. Franczyk-Zarow, K. Malek, S. Chlopicki, K.M. Marzec, Age-related and atherosclerosis-related erythropathy in ApoE/LDLR^{-/-} mice, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1866 (2020) 165972.
- [4] N.A. Brazhe, A.B. Evlyukhin, E.A. Goodilin, A.A. Semenova, S.M. Novikov, S.I. Bozhevolnyi, B.N. Chichkov, A.S. Sarycheva, A.A. Baizhumanov, E.I. Nikelshparg, L.I. Deev, E.G. Maksimov, G. V. Maksimov, O. Sosnovtseva, Probing cytochrome c in living mitochondria with surface-enhanced Raman spectroscopy, *Sci Rep* 5 (2015) 13793.
- [5] G.K. Jain, R. Verma, A. Chougule, B. Singh, Raman Spectroscopy study of healthy and cancerous human breast tissue for cancer detection, *Exploratory Animal and Medical Research* 12 (2022) 160–166.
- [6] M.V.P. Chowdary, K. Kalyan Kumar, S. Mathew, L. Rao, C. Murali Krishna, J. Kurien, Biochemical correlation of Raman spectra of normal, benign and malignant breast tissues: A spectral deconvolution study, *Biopolymers* 91 (2009) 539–546.
- [7] A.F. García-Flores, L. Raniero, R.A. Canevari, K.J. Jalkanen, R.A. Bitar, H.S. Martinho, A.A. Martin, High-wavenumber FT-Raman spectroscopy for in vivo and ex vivo measurements of breast cancer, *Theor Chem Acc* 130 (2011) 1231–1238.
- [8] J. Chwiej, A. Skoczen, K. Janeczko, J. Kutorasinska, K. Matusiak, H. Figiel, P. Dumas, C. Sandt, Z. Setkowicz, The biochemical changes in hippocampal formation occurring in normal and seizure experiencing rats as a result of a ketogenic diet, *Analyst* 140 (2015) 2190–2204.

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy
Modulatory role of the ketogenic diet in glial scar formation after traumatic brain injury -
FTIR, Raman and X-ray fluorescence microscopy study
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	SAA-D-25-04429
Article Type:	Full Length Article
Section/Category:	Analytical Biospectroscopy
Keywords:	traumatic brain injury (TBI); glial scar formation; ketogenic diet; Fourier transform infrared microspectroscopy (FTIRM); Raman microscopy; synchrotron X-ray fluorescence microscopy
Corresponding Author:	Joanna Chwiej AGH University of Krakow POLAND
First Author:	Kamil Kawon
Order of Authors:	Kamil Kawon Zuzanna Setkowicz Mateusz Czyzycki Zuzanna Rauk Aleksandra Wilk Anna Slawek Jakub Cieslak Giuliana Aquilanti Ilaria Carlomagno Agnieszka Drozd Joanna Chwiej
Abstract:	<p>Traumatic brain injuries (TBI) represent a significant clinical challenge, causing not only direct damage to neural tissue but also triggering secondary pathophysiological processes, including glial scar formation. While the glial scar serves a protective role, it simultaneously generates profound biochemical and elemental disturbances that may contribute to secondary neurodegeneration and the development of epilepsy. In recent years, the ketogenic diet (KD), recognized for its anticonvulsant properties, has emerged as a potential therapeutic strategy for TBI. However, despite growing interest, its impact on glial scar formation and biomolecular remodeling in the injured brain remains poorly understood. A better understanding of these mechanisms is essential for developing personalized dietary interventions for TBI treatment.</p> <p>To assess the modulatory effects of KD on glial scar development, male and female Wistar rats maintained on ketogenic or standard diets were subjected to controlled cortical injury. Brain samples collected at 2-, 8-, 16-, and 30-days post-injury were analyzed using Fourier transform infrared (FTIR) microspectroscopy, Raman microscopy, and synchrotron radiation-based X-ray fluorescence (SRXRF) microscopy. FTIR and Raman spectroscopy enabled topographic and semi-quantitative assessment of biomolecules accumulation and structure at the lesion site and adjacent cortex, while SRXRF provided detailed elemental mapping of P, S, K, Ca, Fe, Cu, and Zn within the developing glial scar.</p> <p>Topographic chemical maps obtained with FTIR microspectroscopy consistently revealed reduced biomolecule levels at the lesion site, largely independent of diet. Semi-quantitative biomolecular analyses, however, demonstrated some sex- and time-dependent effects of KD. Raman spectroscopy further highlighted cortical modifications, showing increased lipid unsaturation in males on KD. In females treated with high-fat fodder, elevated levels of lipid esterification, cytochrome, and amide III and/or deoxyhemoglobin was additionally observed. SRXRF imaging revealed dynamic</p>

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	<p>elemental changes, including transient Ca release, delayed Fe accumulation, and progressive Cu increase during scar formation, without a pronounced effect of KD. All findings together suggest that KD may modulate biomolecular responses to TBI in a sex-dependent manner, with females displaying greater susceptibility to the observed changes.</p>
--	--

Modulatory role of the ketogenic diet in glial scar formation after traumatic brain injury - FTIR, Raman and X-ray fluorescence microscopy study

Kamil Kawon^{1#}, Zuzanna Setkowicz^{2#}, Zuzanna Rauk², Mateusz Czyzycki³, Aleksandra Wilk¹, Anna Slawek¹, Jakub Cieslak¹, Giuliana Aquilanti⁴, Ilaria Carlomagno⁴, Agnieszka Drozd¹, Joanna Chwiej^{1*}

¹ Faculty of Physics and Applied Computer Science, AGH University of Krakow, Al. Mickiewicza 30, 30-059 Krakow, Poland

² Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University, Gronostajowa 9, 30-387 Krakow, Poland

³ Institute for Photon Science and Synchrotron Radiation, Karlsruhe Institute of Technology, Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany

⁴ Elettra Sincrotrone Trieste S.C.p.A., s.s. 14, km 163.5, 34149, Basovizza, Trieste, Italy

* Corresponding author: jchwiej@fis.agh.edu.pl

Equally contributed

ABSTRACT

Traumatic brain injuries (TBI) represent a significant clinical challenge, causing not only direct damage to neural tissue but also triggering secondary pathophysiological processes, including glial scar formation. While the glial scar serves a protective role, it simultaneously generates profound biochemical and elemental disturbances that may contribute to secondary neurodegeneration and the development of epilepsy. In recent years, the ketogenic diet (KD), recognized for its anticonvulsant properties, has emerged as a potential therapeutic strategy for TBI. However, despite growing interest, its impact on glial scar formation and biomolecular remodeling in the injured brain remains poorly understood. A better understanding of these mechanisms is essential for developing personalized dietary interventions for TBI treatment.

To assess the modulatory effects of KD on glial scar development, male and female Wistar rats maintained on ketogenic or standard diets were subjected to controlled cortical injury. Brain samples collected at 2-, 8-, 16-, and 30-days post-injury were analyzed using Fourier transform infrared (FTIR) microspectroscopy, Raman microscopy, and synchrotron radiation-based X-ray fluorescence (SRXRF) microscopy. FTIR and Raman spectroscopy enabled topographic and semi-quantitative assessment of biomolecules accumulation and structure at the lesion site and adjacent cortex, while SRXRF provided detailed elemental mapping of P, S, K, Ca, Fe, Cu, and Zn within the developing glial scar.

Topographic chemical maps obtained with FTIR microspectroscopy consistently revealed reduced biomolecule levels at the lesion site, largely independent of diet. Semi-quantitative biomolecular analyses, however, demonstrated some sex- and time-dependent effects of KD. Raman spectroscopy further highlighted cortical modifications, showing increased lipid unsaturation in males on KD. In females treated with high-fat fodder, elevated levels of lipid esterification, cytochrome, and amide III and/or deoxyhemoglobin was additionally observed. SRXRF imaging revealed

dynamic elemental changes, including transient Ca release, delayed Fe accumulation, and progressive Cu increase during scar formation, without a pronounced effect of KD. All findings together suggest that KD may modulate biomolecular responses to TBI in a sex-dependent manner, with females displaying greater susceptibility to the observed changes.

INTRODUCTION

Epilepsy is a significant clinical and economic challenge, affecting approximately 70 million people annually [1], with around 30% of patients diagnosed as resistant to currently available epilepsy treatments [2,3]. This condition can result from brain damage, which includes strokes [4] and injuries caused by external forces, commonly referred to in the literature as traumatic brain injury (TBI) [5,6]. The treatment of drug-resistant epilepsy focuses on using various combinations of antiepileptic drugs in search of the most effective regimen [7]. If drug combinations prove ineffective, surgical intervention may be considered, during which brain areas responsible for triggering epileptic seizures are removed [8].

One of the therapeutic approaches that has shown positive effects in the treatment of drug-resistant epilepsy is the use of the ketogenic diet (KD) [9]. Its therapeutic effect in managing seizures is based on several mechanisms [10]. Ketone bodies competitively block the vesicular glutamate transporter (VGLUT2), reducing the transport of glutamate into synaptic vesicles [11]. The oxidation of ketone bodies in mitochondria increases the levels of acetyl-CoA, which indirectly leads to reduced oxaloacetate levels and thus decreases the conversion of glutamate to aspartate (an excitatory neurotransmitter), while simultaneously providing more glutamate for the production of GABA (an inhibitory neurotransmitter) [12]. Ketosis, which occurs due to reduced glycolysis as a result of the diet, leads to the opening of ATP-sensitive potassium channels, causing hyperpolarization and decreased neuronal excitability [13]. KD also enhances astrocyte metabolism, which increases adenosine levels. Elevated extracellular adenosine, acting through adenosine A1 receptors, may exert an anticonvulsant effect [14].

Despite its beneficial effects in epilepsy, KD may unfortunately also have negative impact on the organism. In the study by Mayengbama *et al.* [15], it was shown that KD affects the mass and volume of the rodent brain. Similar findings were reported by Desli *et al.* [16], who indicated developmental disturbances, such as reduced body weight and slowed growth, as well as other side effects, including nausea, vomiting, diarrhea, urinary tract stones, and osteoporosis. Our previous studies [17] demonstrated that KD disrupts also the elemental homeostasis of internal organs, and the identified elemental anomalies suggest that it may induce kidney stone formation and cause chronic nephritis as well as inflammatory changes in other organs.

The aim of the present study is to determine whether, and if so, how KD modifies the process of glial scar formation resulting from controlled TBI to the left hemisphere, accompanied by disruption of the blood-brain barrier [18–20]. To this end, two complementary spectroscopic and molecular imaging techniques were used, namely Fourier transform infrared (FTIR) microspectroscopy and Raman microscopy, as well as X-ray fluorescence microscopy. The first two techniques were employed to assess changes in the accumulation and structure of biomolecules within the developing glial scar, while the latter was used for topographical and quantitative evaluation of elemental changes occurring in the region of the primary injury.

METHODOLOGY

Animals

This study adhered to the ARRIVE guidelines (<https://arriveguidelines.org>). Its subject were Wistar rats obtained from the breeding facility of the Laboratory of Experimental Neuropathology at the Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University in Krakow, Poland. All experiments, approved by the 2nd Local Institutional Animal Care and Use Committee in Krakow (approval no. 316/2020), were conducted in compliance with international standards. Throughout the study, the rats were housed at a controlled

temperature (20 ± 2 °C) under a 12-hour light/12-hour dark cycle, with the free access to fodder and water [17]. The detailed characterization of the examined animal groups is placed in Table 1.

Brain Injury

The brain injury model used in this study has previously been employed in our research on glial response to injury and its epileptogenic effects [18–20]. A lesion in the left cerebral hemisphere was induced in rats on the postnatal day 30 under anesthesia with inhaled isoflurane mixed with oxygen (Isoflurin, 2-4%) and in sterile conditions. The procedure was performed using a stereotactic apparatus and a rotating dental drill with a diameter of 1.2 mm. Drill with depth limiter was applied to prevent complete perforation of the skull and to preserve the integrity of the white matter underlying the cerebral cortex. After the surgery, the incision was sutured, and the rat was returned to its home cage.

Ketogenic diet

On the postnatal day 27, animals from groups KM2-KM30 and KF2-KF30 (see also Table 1) were placed on KD to ensure they would be in a state of ketosis at the time of injury. They remained on this diet until the end of their participation in the experiment. Blood glucose and ketone body levels were monitored throughout the study, as detailed in Kawon *et al.* [17].

The ketogenic diet (EF R/M with 80% fat - ketogenic), characterized by a high fat content, was obtained from ssniff®, while the standard laboratory diet (Labofeed H Standard) was supplied by the Morawski company. In the ketogenic fodder, 94% of the metabolizable energy (ME) was derived from fats, with the remaining 6% coming from proteins and carbohydrates. In contrast, the standard diet provided 60% of ME from carbohydrates, 30% from proteins, and 10% from fats. The animals had free access to food and water, although their daily fodder intake was monitored.

Sample Preparation

2, 8, 16, and 30 days after the injury, depending on the experimental group (for details see Table 1), the animals were euthanized using 60% Morbital® and perfused with physiological saline. The brains were then removed from skulls, flash-frozen in liquid nitrogen, and stored in a freezer at approximately -20 °C until sectioning with a cryomicrotome. Two neighboring 12 μ m thick slices containing the injury site were mounted on a CaF₂ window (Crystran®) and Ultralene® foil and dried. The specimens placed on the CaF₂ substrates were analyzed by FTIR and Raman microscopy, whilst those on Ultralene® foil by synchrotron radiation-based X-ray fluorescence (SRXRF).

Table 1. Specification of the studied animal groups

Group	Sex	Diet	Time*	Number of animals
NM2	male	standard	2	6
NM8	male	standard	8	6
NM16	male	standard	16	6
NM30	male	standard	30	6
KM2	male	ketogenic	2	6
KM8	male	ketogenic	8	6
KM16	male	ketogenic	16	6
KM30	male	ketogenic	30	6
NF2	female	standard	2	6
NF8	female	standard	8	6

NF16	female	standard	16	6
NF30	female	standard	30	6
KF2	female	ketogenic	2	6
KF8	female	ketogenic	8	6
KF16	female	ketogenic	16	6
KF30	female	ketogenic	30	6

* time counted from the injury until perfusion and brain sample collection.

Fourier transform infrared microspectroscopy (FTIRM)

Experiments using FTIR and Raman microscopy were carried out at the Laboratory of Atomic and Molecular Biospectroscopy, Faculty of Physics and Applied Computer Science, AGH University of Krakow, Poland. For infrared spectroscopy and imaging, a Nicolet iN10 MX microscope (Thermo Fisher Scientific) was used, and measurements were performed in transmission mode. Using an aperture, the beam was confined to an area of 25 $\mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$. Absorption spectra were recorded with a liquid nitrogen-cooled MCT-A detector. Typically, 32 scans were accumulated per spectrum, recorded over a wavenumber range of 900-4000 cm^{-1} at a resolution of 8 cm^{-1} . For the evaluation of distribution of biomolecules, the samples were raster-scanned in two dimensions with a step size of 25 μm .

Topographic and semi-quantitative biochemical analysis based on FTIRM

Topographic biochemical analysis was based on chemical mapping of key absorption bands or the ratios of their intensities for the site of primary injury. Chemical imaging was performed using OMNIC Picta software (Thermo Scientific, version 9.2.0.86), which was also used for spectral extraction and preprocessing prior to semi-quantitative and statistical analysis. Preprocessing steps included atmospheric and baseline correction of the spectra. In part A of the Figure S1 of Supplementary materials, one can see the typical IR spectrum recorded for morphologically unchanged cerebral cortex with marked the absorption bands used in the present study.

For semi-quantitative biochemical analysis, based on microscopic images of the scanned areas (Figure 1) two regions were identified in each brain slice: the injury site and the surrounding cerebral cortex. From each region, 30 spectra were collected per sample and averaged. As a result, six mean spectra (one per animal) were obtained for each experimental group. The semi-quantitative analysis involved calculating the area under the curve (AUC) using OriginPro software. To determine whether differences between the analyzed regions were statistically significant, median values of the examined biochemical parameters were compared using the Mann–Whitney U test at a significance level of 5%.

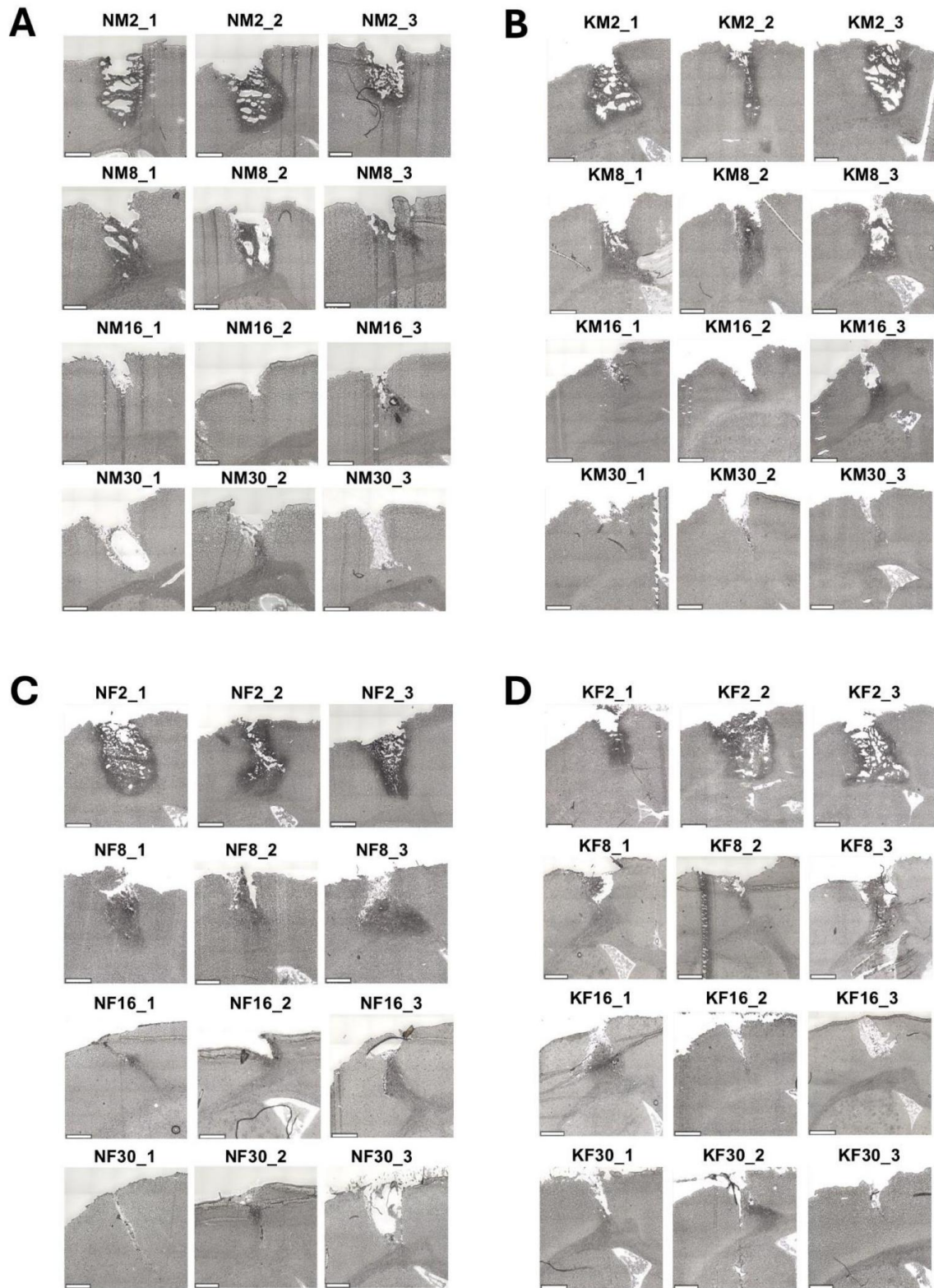


Figure 1. Optical microscope images of the scanned areas of the cerebral cortex for selected animals from experimental groups examined. A and B – males on standard and ketogenic diet, respectively; C and D – females on standard and ketogenic diet, respectively.

Raman spectroscopy

Raman measurements were performed in our home institute by a confocal WITec Alpha300R microscope equipped with a 532 nm laser module, a 100x air objective (Zeiss EC Epiplan-Neofluar, NA = 0.9), an UHTS 300 spectrometer (600 gratings/mm), and a high-efficiency, thermoelectrically cooled spectroscopic camera. The laser power on the sample was set to 10 mW, and an integration time of 2.5 s was used. The areas of at least 200 μm x 200 μm were raster scanned with the laser beam. To obtain high-quality Raman spectra, a binning function combining the data from four neighboring points was applied. Such acquired spectra were subjected to preprocessing which included cosmic rays removal, baseline correction, and vector normalization.

Synchrotron radiation-based X-ray fluorescence (SRXRF)

SRXRF measurements were performed at the XRF beamline of the Elettra synchrotron in Trieste, Italy [21]. The experimental setup included an advanced end-station dedicated to X-ray spectroscopy, equipped and developed by the International Atomic Energy Agency [22,23]. Brain slices were raster-scanned using a 10 keV X-ray beam shaped to 200 μm x 200 μm . The measurements were conducted under vacuum conditions (10^{-7} mbar) at room temperature. X-ray fluorescence spectra were recorded using a Bruker XFlash SDD detector (measurements relative to proposal 20230125) and using RaySpec 3-elements SIRIUS SDD detector (measurements relative to proposal 20240069), with a typical acquisition time of 15 s and 5 s per pixel, respectively. Spectral data were analyzed using the PyMca software package to extract net peak areas corresponding to the K- α lines of selected elements, including P, S, K, Ca, Fe, Cu, and Zn. Information on the beam position on the sample, net peak areas for individual pixels, and elemental sensitivities - calculated based on measurements of certified reference materials - were used to generate elemental distribution maps of the imaged brain sections [24].

RESULTS

Influence of KD on the distribution of biomolecules within the glial scar and its surrounding

As a result of raster scanning of brain sections with the IR beam, hyperspectral maps were obtained (Figures 2-5). They covered the entire area of the primary lesion and the cerebral cortex in its immediate vicinity. The topographic analysis performed included all the most important groups of compounds present in the nervous tissue. The distributions of compounds containing phosphate groups (characteristic absorption bands at wave numbers 1080 and 1240 cm^{-1}) [25,26], cholesterol and its esters (bands at 1360 and 1480 cm^{-1}) [26] and compounds containing carbonyl groups 1740 cm^{-1} [25] were examined. The accumulation and changes in the structure of proteins were analyzed by using, respectively, the band at the wavenumber of 1658 cm^{-1} [25] and the absorbance ratio at 1635 and 1658 cm^{-1} [27]. Changes in fats and unsaturated fats accumulation, and lipid structure were studied based on the bands at 2924 and 3012 cm^{-1} [28], and the ratio of the bands at 2924 and 2955 cm^{-1} [26], respectively.



Figure 2. Chemical maps, scaled in arbitrary units, showing the distribution of band intensities at 1080 and 1240 cm^{-1} in the region of primary injury, 2, 8, 16, and 30 days after its induction. Panels (A) and (B) present results for male rats on a standard (NM) and ketogenic diet (KM), respectively, while panels (C) and (D) show the corresponding results for female rats on a standard (NF) and ketogenic diet (KF). The digit following the underscore identifies a specific animal within the group.

Analysis of the chemical maps shown in Figure 2 indicates a significant reduction in the level of phosphate-containing compounds within the area of the primary injury and the forming glial scar. This is most likely associated with changes in the molecular composition of the scar region, where a decrease in nucleic acids and phospholipids, the key components of cell membranes, occurs. A qualitative comparison of the maps obtained from animals on a ketogenic versus standard laboratory diet does not allow for definitive conclusions regarding the impact of the high-fat diet on these effects.

Cholesterol and/or its esters, as well as compounds containing carbonyl groups, also exhibit lower levels within the area of the glial scar (Figure 3). Moreover, the decrease in the content of these compounds appears to be independent on the time elapsed since the injury, the sex of the animals, and the type of diet administered. Their low levels at the injury site may likewise result from the damage to cell membranes rich in cholesterol and cholesterol esters or from alterations in the biomolecular composition of the damaged neural tissue, including a reduction in the level of sugars, fatty acids, and intermediate metabolites (e.g. acetyl-CoA and pyruvate), whose molecules contain carbonyl groups. Since KD leads to the replacement of glycolysis-derived metabolites with ketone bodies, it is surprising that the intensity of the band at 1740 cm^{-1} does not differ within the site of injury between the animals fed the high-fat diet and those on the standard diet (Figure 3). This may be because within the scar the compounds other than ketone bodies containing carbonyl groups may have a dominant influence on IR absorption in this wavenumber range.

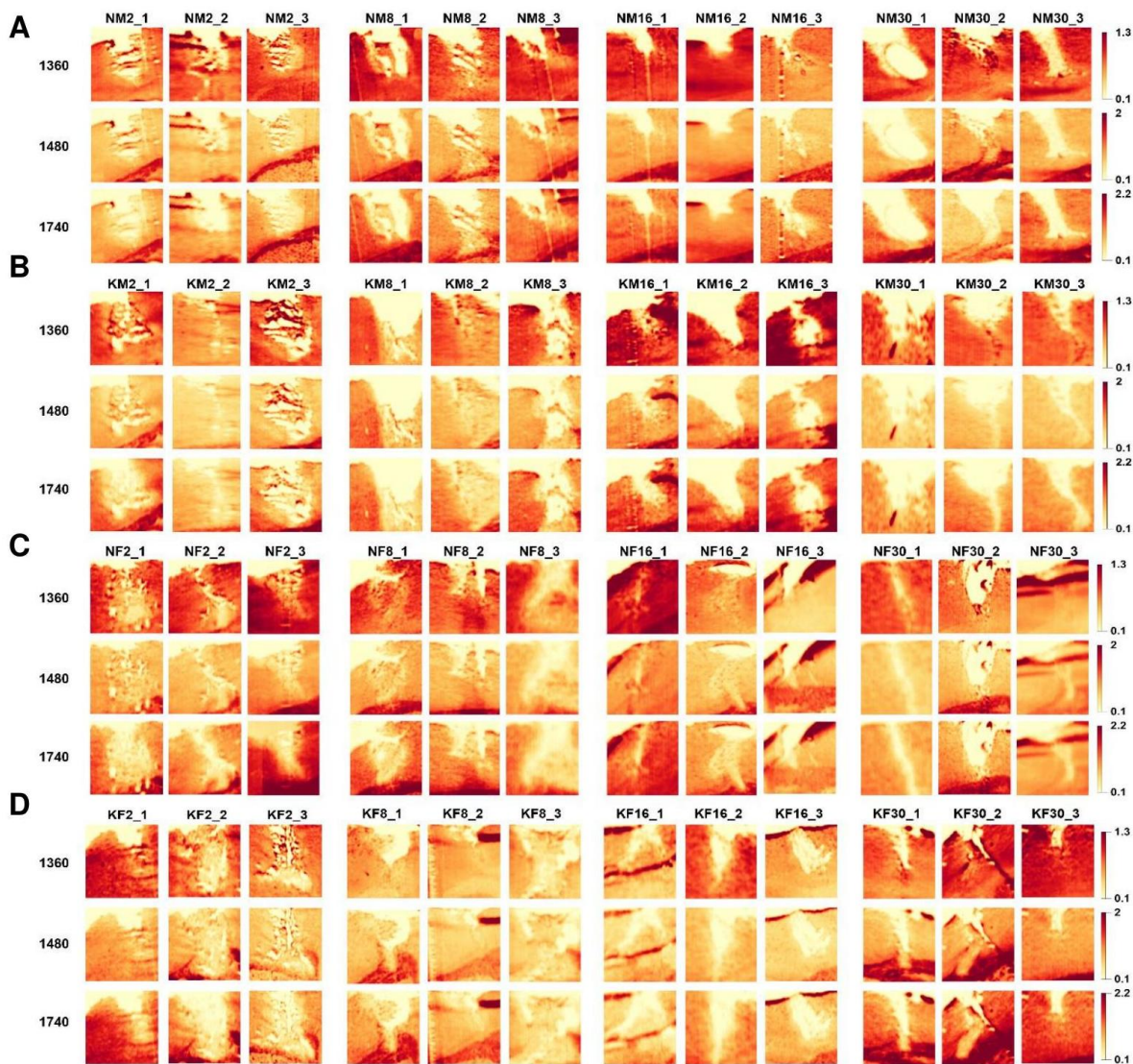


Figure 3. Chemical maps, scaled in arbitrary units, showing the distribution of band intensities at 1360, 1480 and 1740 cm^{-1} in the region of primary injury, 2, 8, 16, and 30 days after its induction. Panels (A) and (B) present results for male rats on a standard (NM) and ketogenic diet (KM), respectively, while panels (C) and (D) show the corresponding results for female rats on a standard (NF) and ketogenic diet (KF). The digit following the underscore identifies a specific animal within the group.

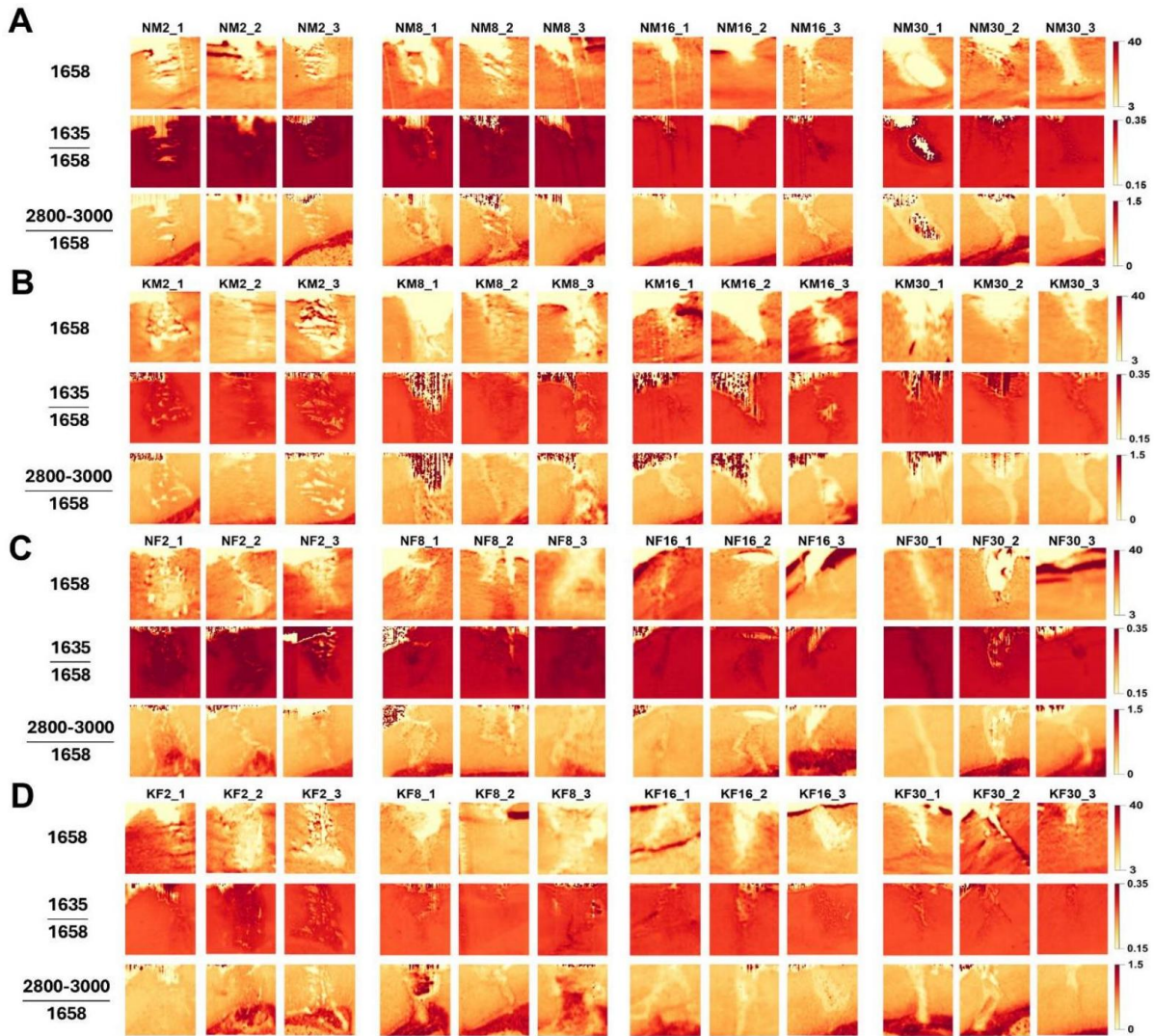


Figure 4. Chemical maps, scaled in arbitrary units, showing the distribution of amide I band intensity (1658 cm^{-1}), the absorbance ratio at 1635 and 1658 cm^{-1} , and the relative intensity (compared to amide I) of lipid mass at $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ for the area of primary injury, 2, 8, 16, and 30 days after its induction. Panels (A) and (B) present results for male rats on a standard (NM) and ketogenic diet (KM), respectively, while panels (C) and (D) show the corresponding results for female rats on a standard (NF) and ketogenic diet (KF). The digit following the underscore identifies a specific animal within the group.

As shown in Figure 4, the relative level of proteins with β -sheet secondary structure within the glial scar is not constant over time and depends on the type of diet administered to the animals. The absorbance ratio at 1635 and 1658 cm^{-1} is the highest in the injury area two days after induction and remains consistently lower throughout the examined tissue region in animals fed with KD.

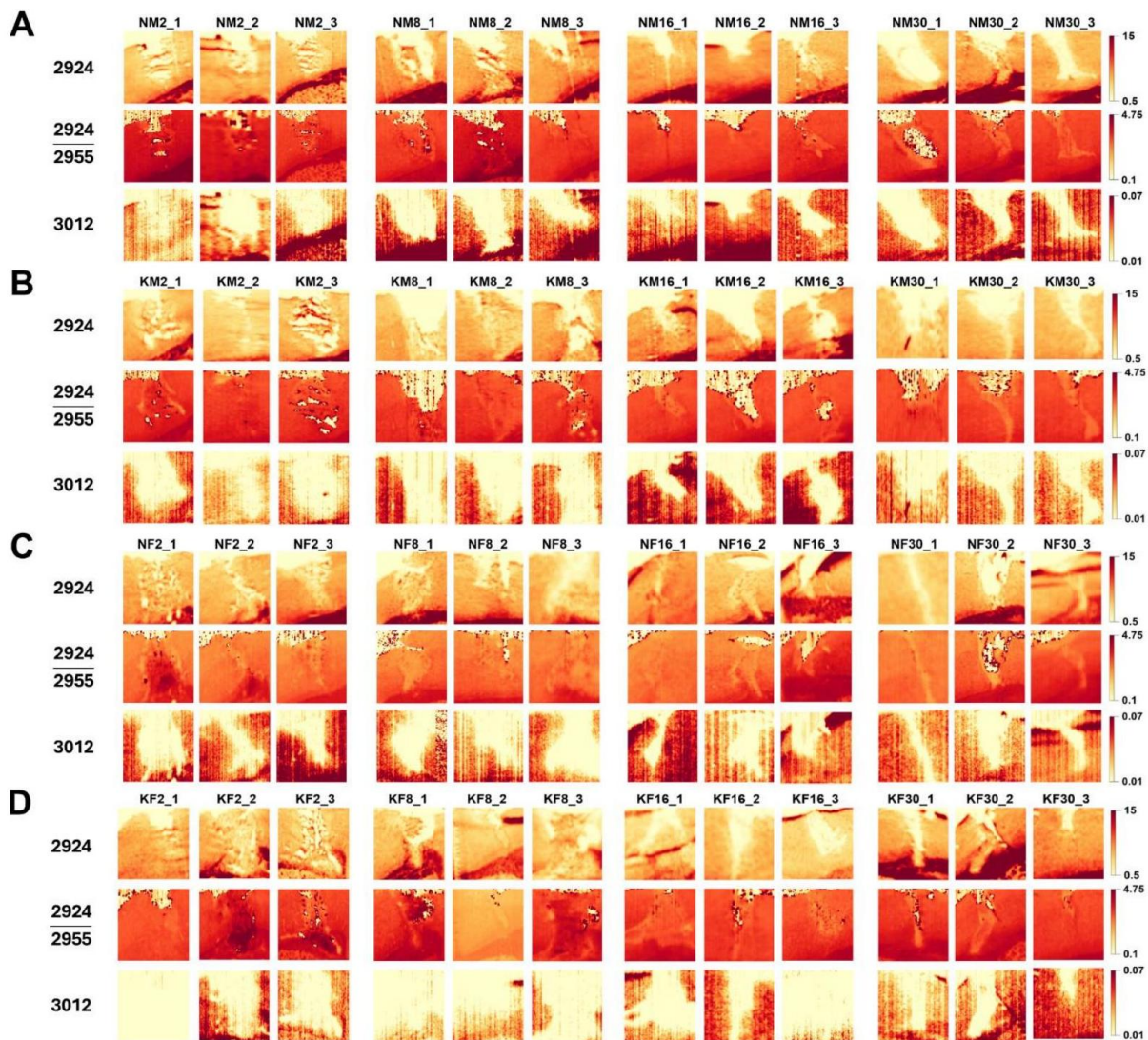


Figure 5. Chemical maps, scaled in arbitrary units, showing the distribution of lipid band intensities at 2924 and 3012 cm^{-1} , as well as the intensity ratio of the 2924 and 2955 cm^{-1} bands for the area of primary injury, 2, 8, 16, and 30 days after its induction. Panels (A) and (B) present results for male rats on a standard (NM) and ketogenic diet (KM), respectively, while panels (C) and (D) show the corresponding results for female rats on a standard (NF) and ketogenic diet (KF). The digit following the underscore identifies a specific animal within the group.

The analysis of the maps presented in Figure 5 clearly indicates that local brain injury leads to a significant decrease in lipid levels, including unsaturated lipids (band at 3012 cm^{-1}), as well as structural alterations in fats. Changes in lipid accumulation and structure originate from damage to cell membranes and organelle membranes caused by local TBI.

Semi-quantitative differences in biomolecules accumulation within the area of injury between ketogenic and standard diet fed rats

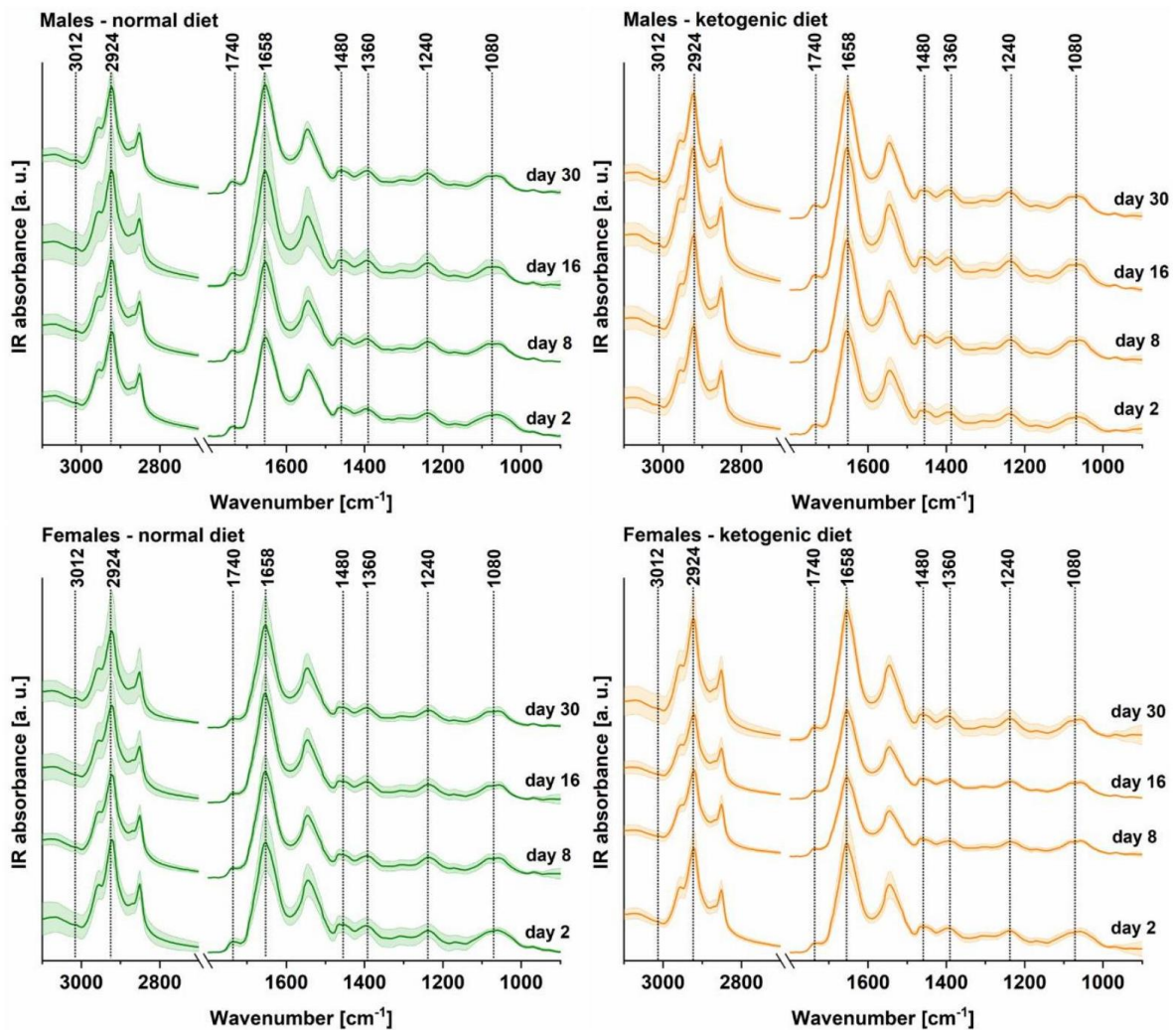


Figure 6. Average IR spectra (solid line) with standard deviation (shade) for the injury site after background subtraction. For better visualization the 2600-3200 cm⁻¹ region was multiplied by the factor of 2. An indication (dash line) of the main bands used for semi-quantitative analysis. Animals fed a standard diet are colored green, and animals fed a ketogenic diet are colored orange.

Semi-quantitative analysis was performed separately for the site of injury (Figures 7 and 9) and the surrounding cerebral cortex (Figures 8 and 10). Its aim was to verify whether the state of ketosis, induced before the injury, caused modifications in the biomolecular composition of these regions.

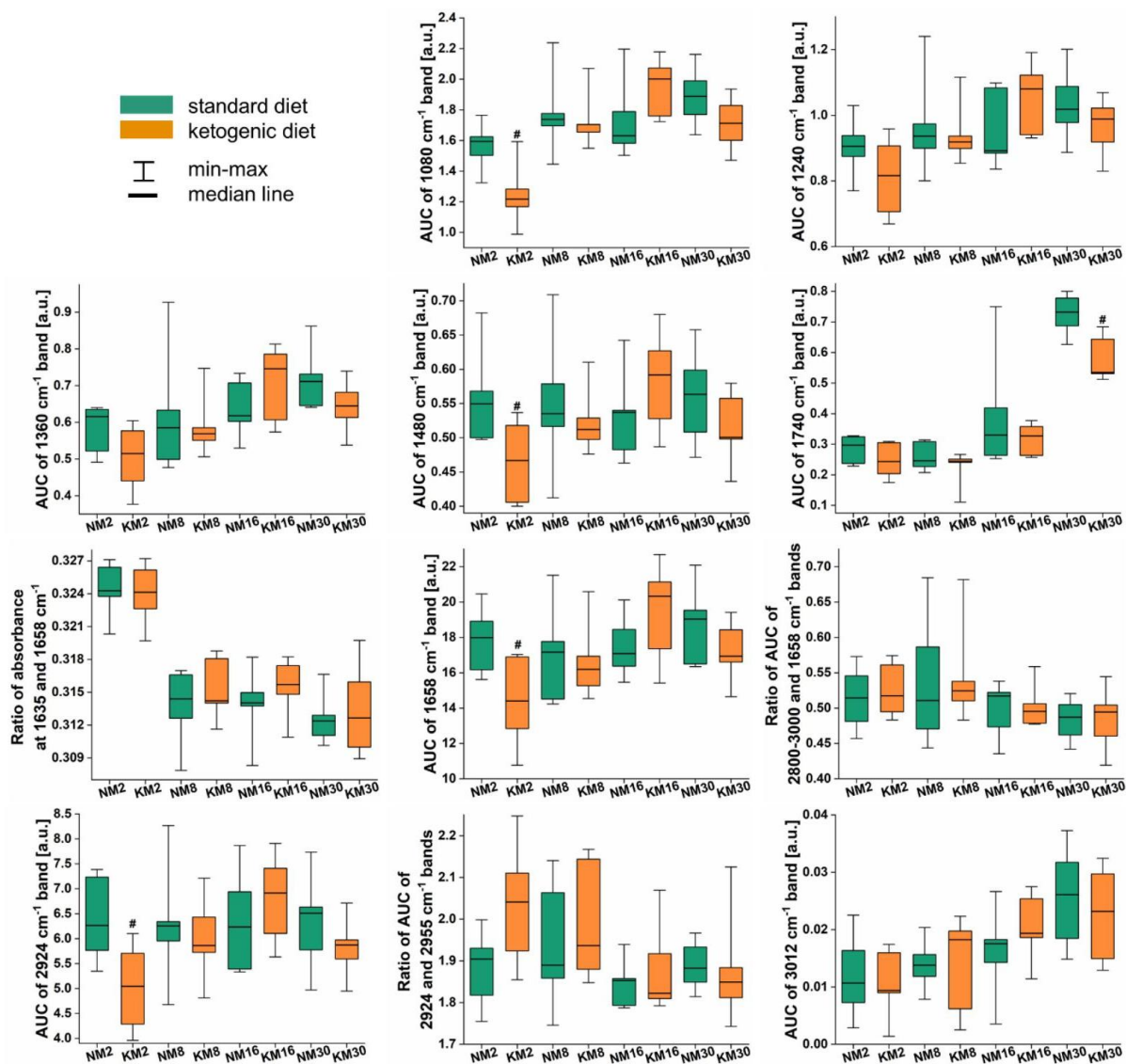


Figure 7. Box-and-whisker plots showing the distribution of the analyzed biochemical parameters at the injury site in male rats fed a standard (NM, green boxes) or ketogenic (KM, orange boxes) diet. Statistically significant differences between the groups (Mann-Whitney U test, 95% confidence level) at particular stages of glial scar development are marked with #.

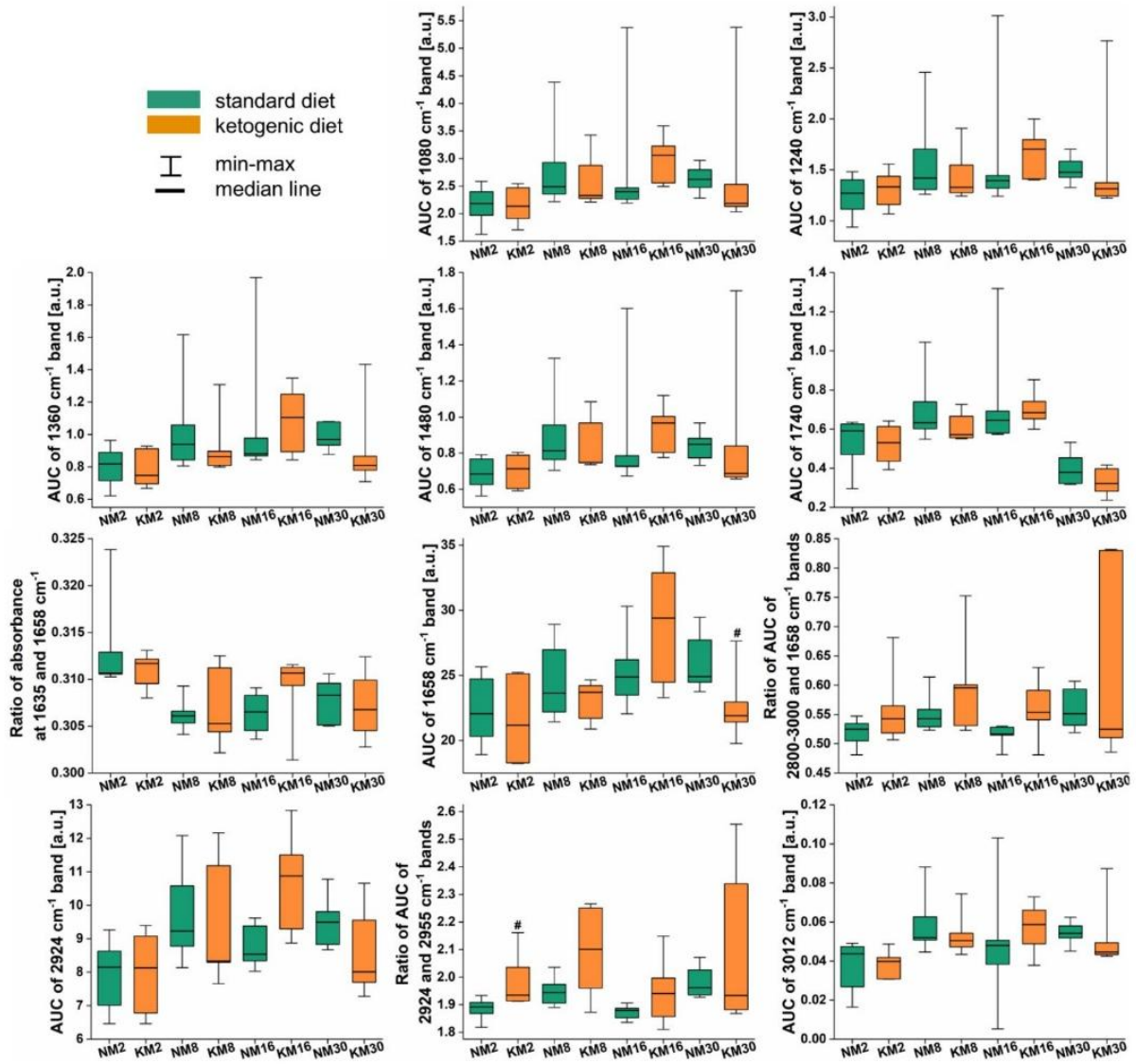


Figure 8. Box-and-whisker plots showing the distribution of the analyzed biochemical parameters for the area of cortex in male rats fed a standard (NM, green boxes) or ketogenic (KM, orange boxes) diet. Statistically significant differences between the groups (Mann-Whitney U test, 95% confidence level) at particular stages of glial scar development are marked with #.

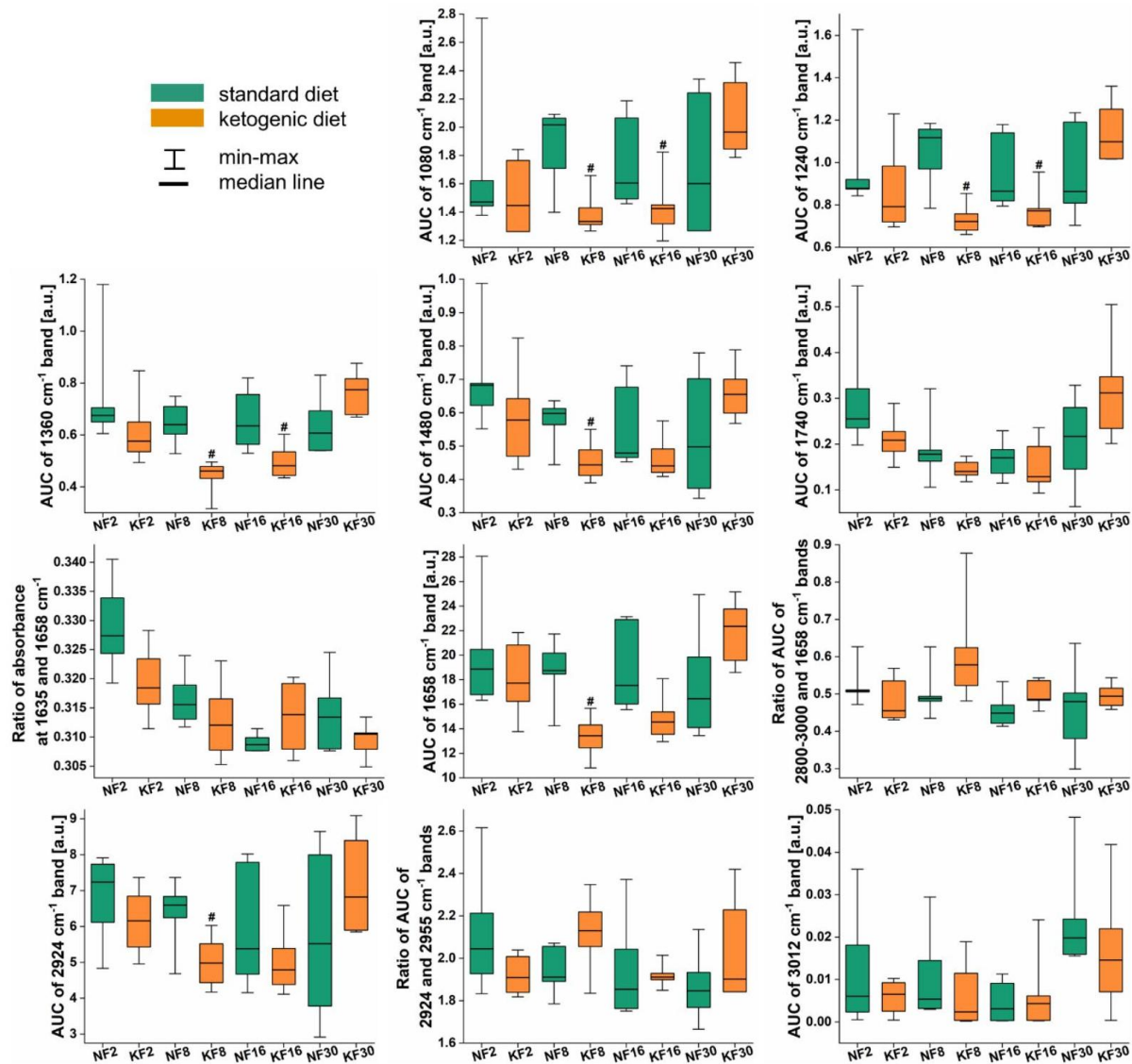


Figure 9. Box-and-whisker plots showing the distribution of the analyzed biochemical parameters at the injury site in female rats fed a standard (NF, green boxes) or ketogenic (KF, orange boxes) diet. Statistically significant glial differences between the groups (Mann-Whitney U test, 95% confidence level) at particular stages of glial scar development are marked with #.

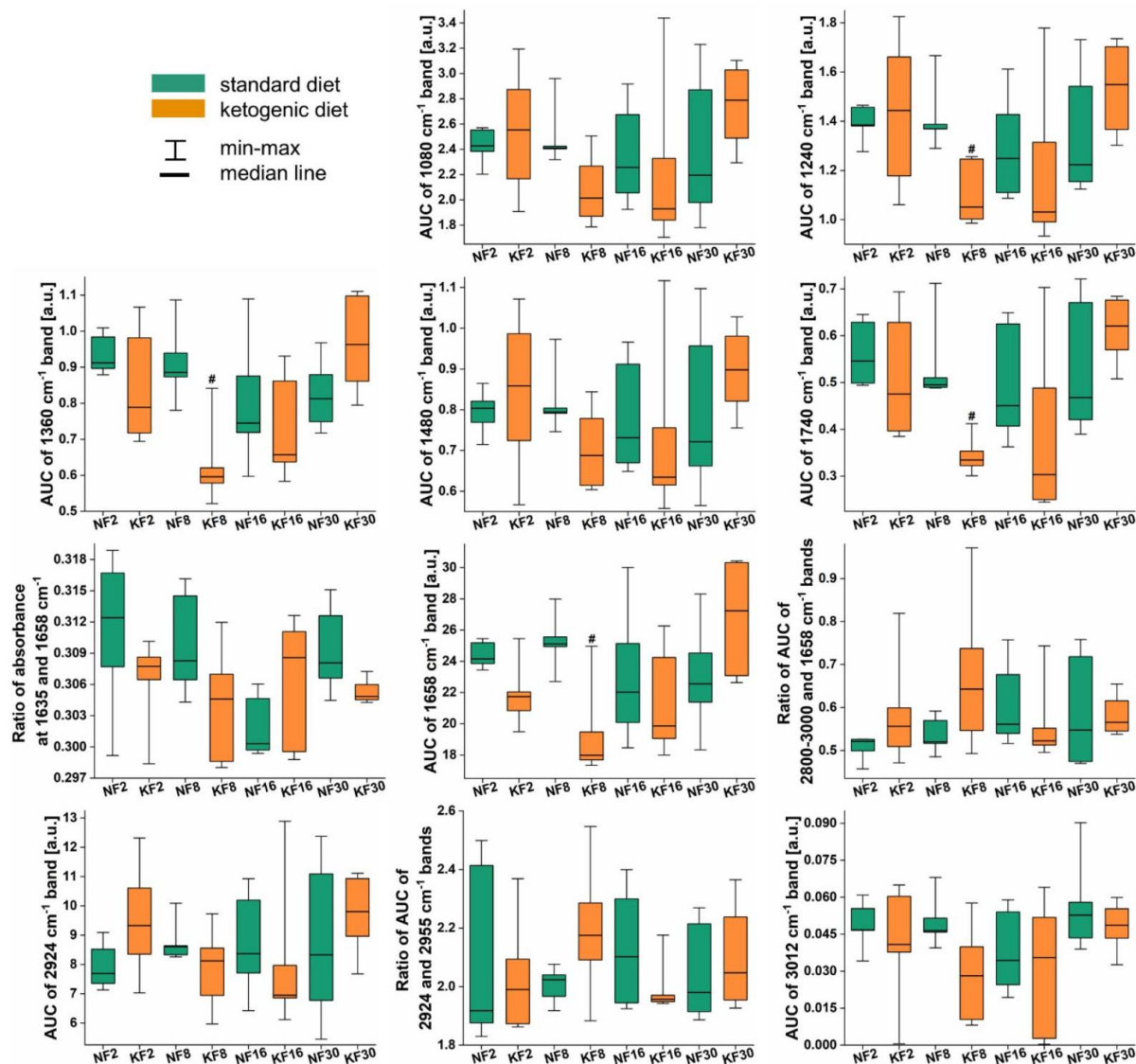


Figure 10. Box-and-whisker plots showing the distribution of the analyzed biochemical parameters for the area of unchanged cortex in female rats fed a standard (NF, green boxes) or ketogenic (KF, orange boxes) diet. Statistically significant differences between the groups (Mann-Whitney U test, 95% confidence level) at particular stages of glial scar development are marked with #.

The analysis of box-and-whisker plots obtained for male rats and presented in Figures 7 and 8 indicates that the application of KD after TBI introduces some temporary changes in the biomolecular composition of the injury site. The observed modifications involve the diminished levels of proteins, lipids, cholesterol and/or its esters, and compounds containing phosphate groups on the second day after damage induction. A similar, although statistically insignificant, effect was noted in the scar area on day 8 post-injury. In turn, in the cortex area (Figure 8), an increase in the band ratio at 2924 and 2955 cm^{-1} was observed in males fed KD, which may indicate changes in lipid structure.

In female rats, a different response pattern is observed. The use of KD results in a statistically significant decrease in the levels of most biomolecules within the injury area on days 8 and 16 post-injury (Figure 9). Very similar effects, although not always statistically significant, were also observed in the cortex adjacent to the injury site (Figure 10).

Complementary analysis of KD induced biochemical modifications with Raman microscopy

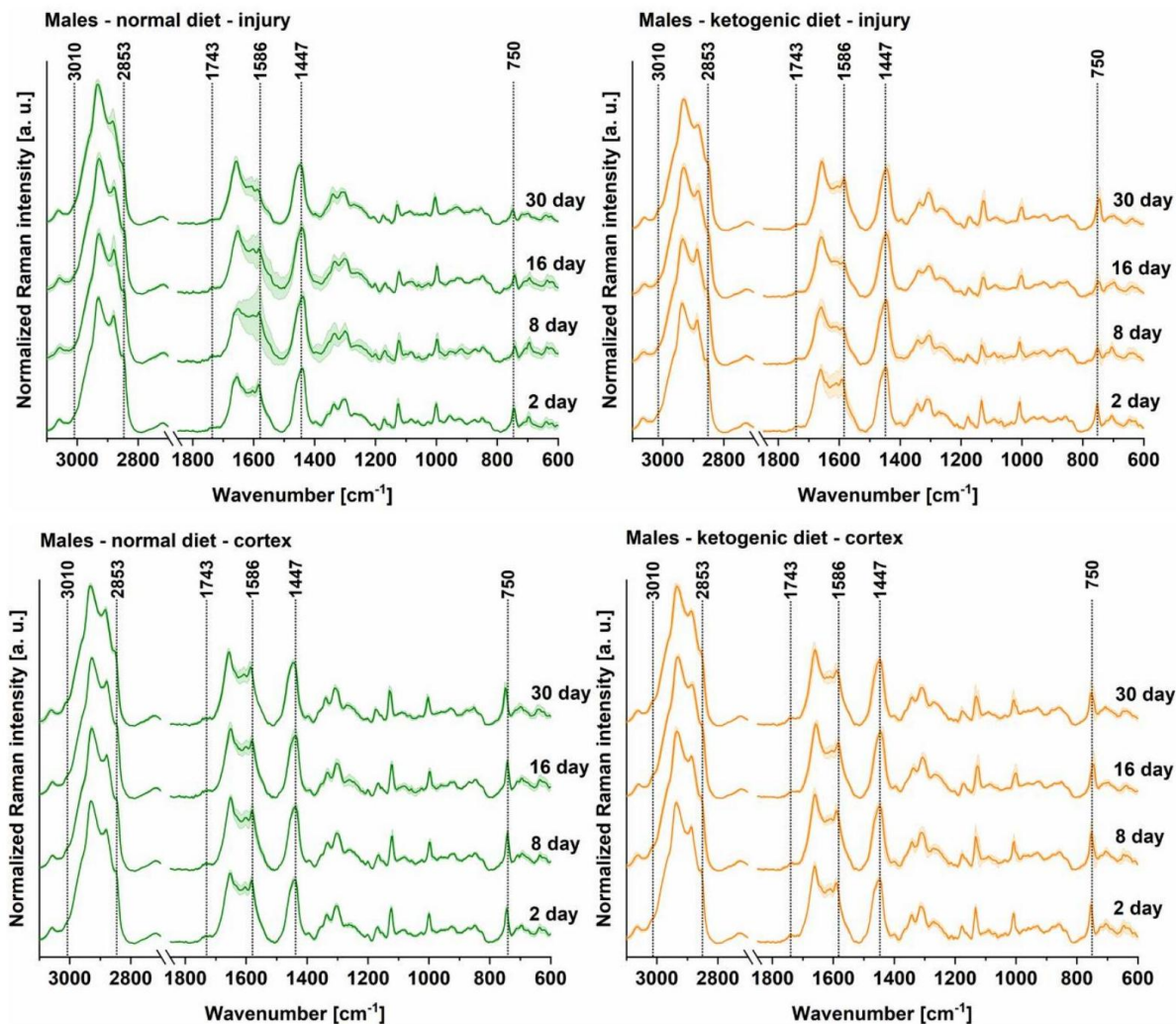


Figure 11. Average Raman spectra (solid line) after background subtraction and vector normalization together with their standard deviation (shaded area) for the injury site and cortex of male rats. For better visualization, the 600-1900 cm^{-1} region was multiplied by a factor of 2. Dashed lines indicate the bands used for semi-quantitative analysis. Animals fed a standard diet are marked in green, and those on a ketogenic diet in orange.

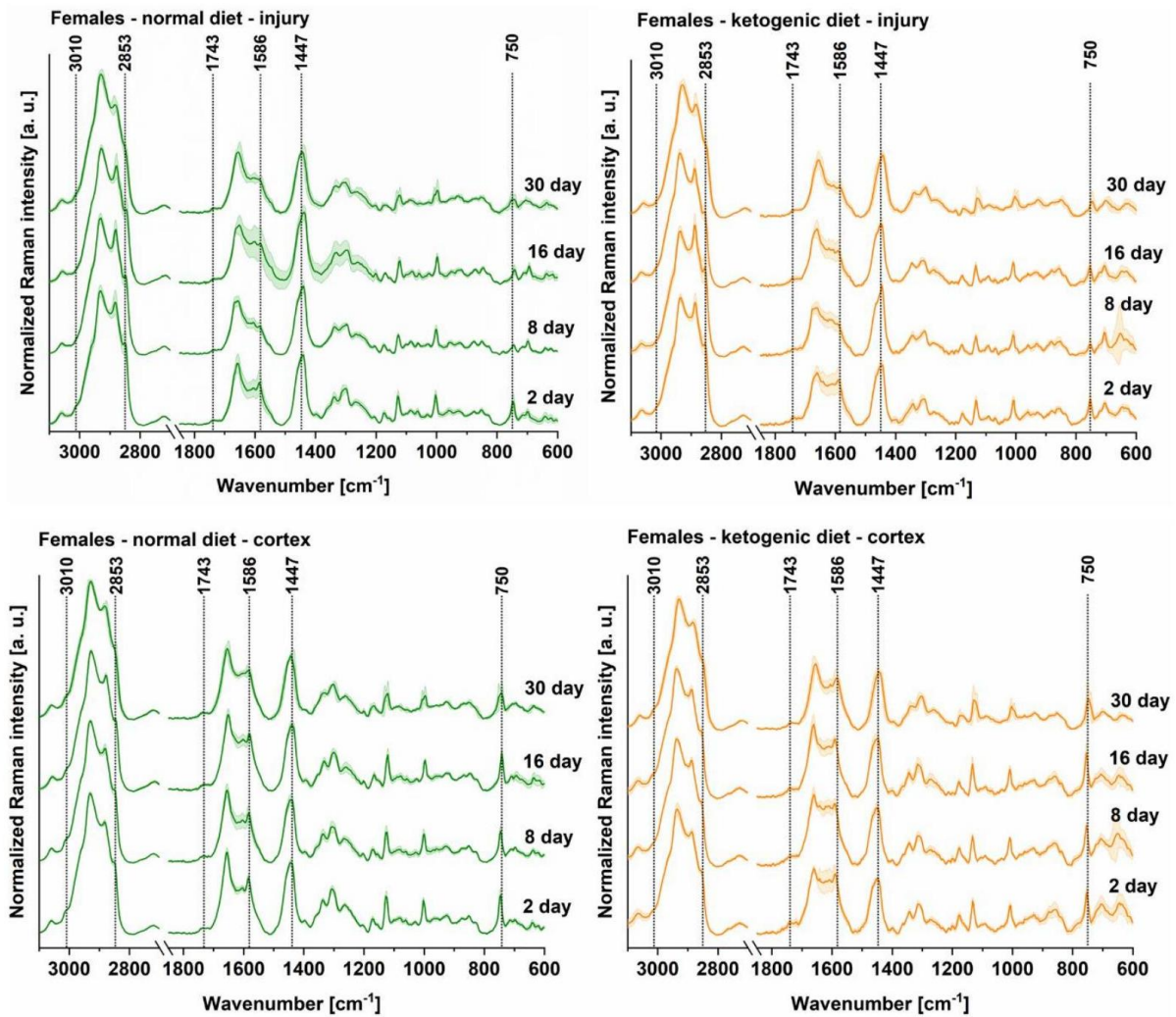


Figure 12. Average Raman spectra (solid line) after background subtraction and vector normalization together with their standard deviation (shaded area) for the injury site and cortex of female rats. For better visualization, the 600-1900 cm^{-1} region was multiplied by a factor of 2. Dashed lines indicate the bands used for semi-quantitative analysis. Animals fed a normal diet are marked in green, and those on a ketogenic diet in orange.

Raman microscopy was used in this study to assess biomolecular changes that were difficult or impossible to evaluate using FTIRM. This technique, complementary to IR microspectroscopy, was employed to examine the effect of KD on lipid unsaturation (band ratio $3010/2853 \text{ cm}^{-1}$), the levels of: cytochrome (band ratio $750/1447 \text{ cm}^{-1}$), amide III and/or deoxy-Hb ($1586/1447 \text{ cm}^{-1}$), and lipid esterification (band ratio $1743/2853 \text{ cm}^{-1}$) [29–33]. The distribution of these parameters within the injury site and surrounding cerebral cortex in males fed a ketogenic or standard laboratory diet is shown in Figure 13. Corresponding data for females are presented in Figure 14.

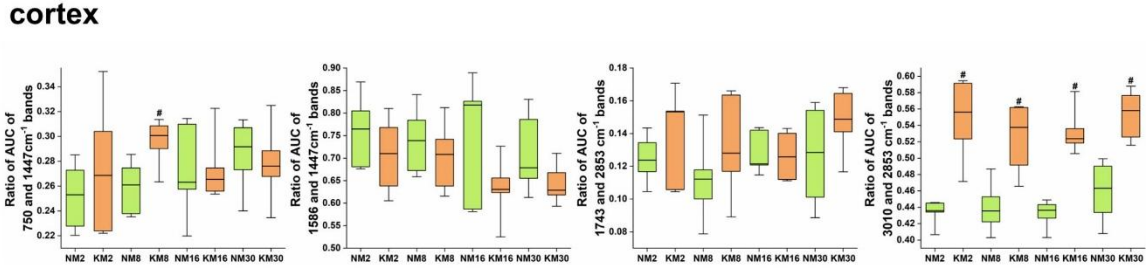
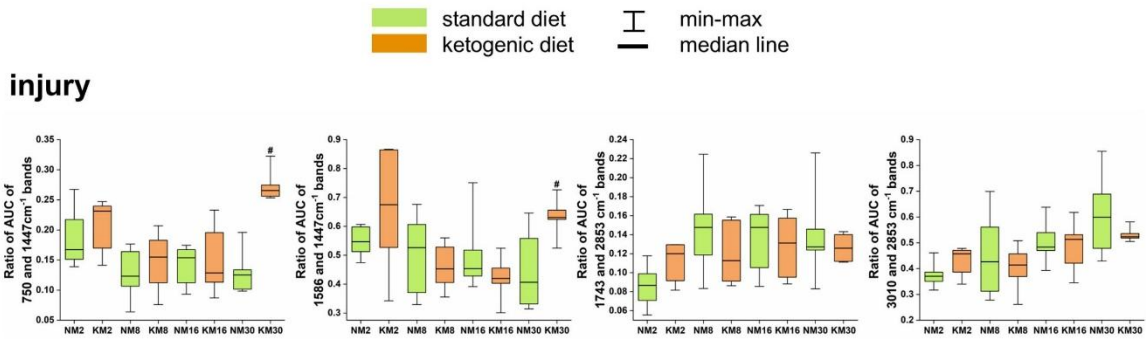


Figure 13. Box-and-whisker plots showing the spread of the biochemical parameters determined with Raman microscopy for the injury area and the cortex of male rats fed a standard (NM, green boxes) or ketogenic (KM, orange boxes) diet. Statistically significant differences between the animals on standard and ketogenic fodder (Mann-Whitney U test, 95% confidence level) at particular stages of glial scar development are marked with #.

18

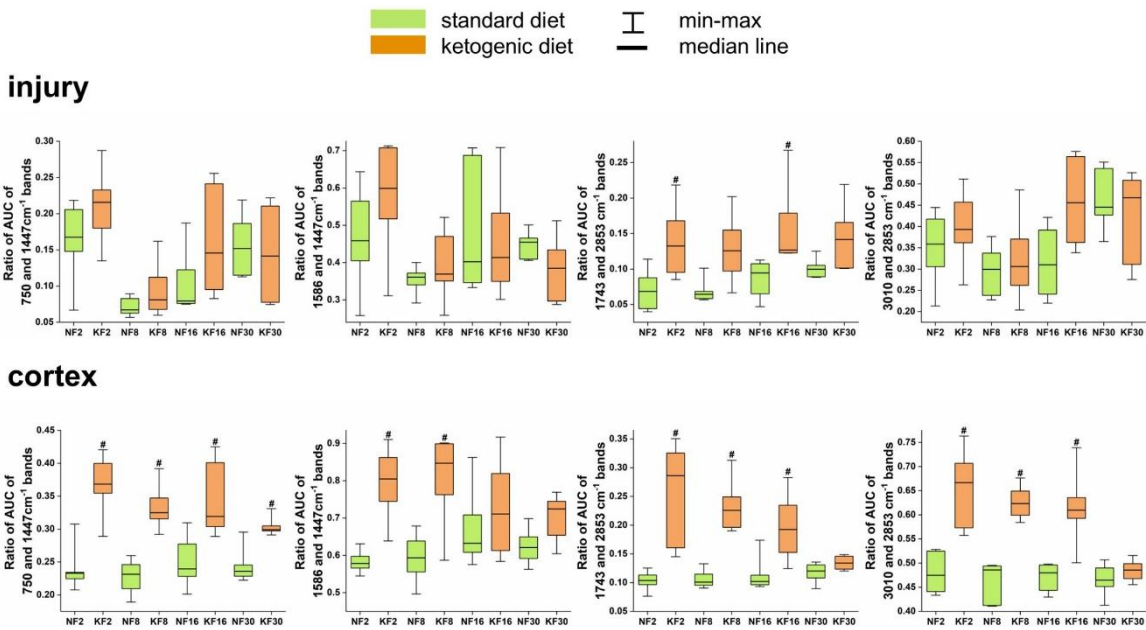


Figure 14. Box-and-whisker plots showing the spread of the biochemical parameters determined with Raman microscopy for the injury area and the cortex of female rats fed a standard (NF, green boxes) or ketogenic (KF, orange boxes) diet. Statistically significant differences between the animals on standard and ketogenic fodder (Mann-Whitney U test, 95% confidence level) at particular stages of glial scar development are marked with #.

19

As shown in Figure 14, statistically significant differences in the values of the analyzed Raman band ratios were observed primarily in the cerebral cortex of female subjects. The effect of KD was manifested there by elevated values of each of the analyzed biochemical parameters. Moreover, as time passed after the injury, the differences between animals fed the high fat diet and those on the standard diet gradually diminished, and by day 30 post-injury, they were no longer statistically significant. An exception to this was the ratio of Raman bands at 750 and 1447 cm^{-1} , reflecting the level of cytochrome, which remained significantly higher in the cortex of females fed the high fat fodder even on the 30th day after the primary injury.

The effect of KD on the male cerebral cortex was less pronounced (Figure 13). In male rats fed the high fat diet, the most notable change was an increase in the degree of lipid unsaturation, which was manifested by an elevated ratio of Raman signal intensities at 3010 and 2853 cm^{-1} .

As shown in Figures 13 and 14, KD also induces certain biomolecular modifications in the area of the glial scar formed after injury. In females fed a high-fat diet, an increase was observed in the ratio of Raman bands at 1743 and 2853 cm^{-1} , indicating a higher level of lipid esterification in this region. In males, the effect of KD was observed only on day 30 after the primary injury, when animals fed the high fat fodder showed an increase in the relative level of cytochrome (750/1447 cm^{-1} ratio) as well as an increase in the intensity of the amide III band and/or the presence of deoxyhemoglobin (1586/1447 cm^{-1} ratio).

The influence of KD on the distribution and accumulation of selected elements within the glial scar and its surrounding

For topographic elemental analysis of the injury site, synchrotron-based X-ray fluorescence microscopy was used. The studies conducted with this technique aimed to investigate the dynamics of elemental changes associated with glial scar formation, as well as the modifications induced by KD administered to the animals. The results of elemental mapping performed on brain samples collected from rats representing each of the experimental groups are presented in Figure 15.

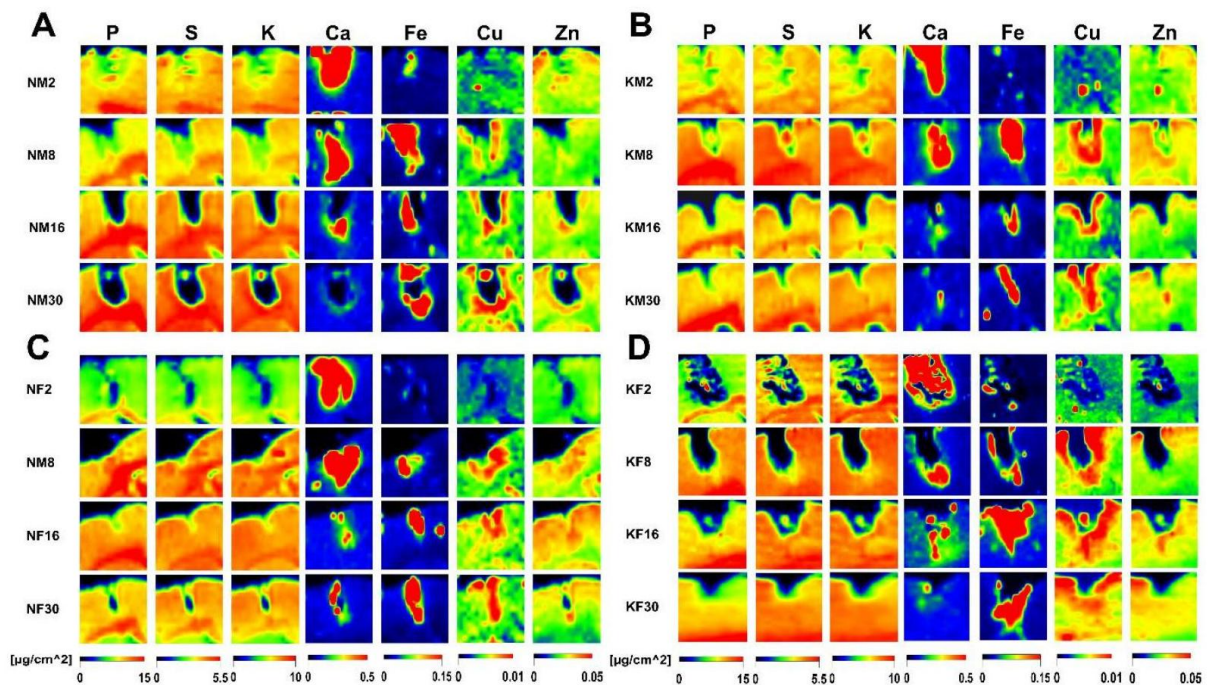


Figure 15. Distributions of P, S, K, Ca, Fe, Cu and Zn in the area of injury for the representative brain slices taken from rats of all the examined experimental groups. A and B – males on standard and ketogenic diet, respectively; C and D – females on standard and ketogenic diet, respectively. Color

scales below the maps, unified for a particular element, represent the areal density of elements in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

As shown in Figure 15, low atomic number elements such as P, S, and K exhibit a high degree of similarity in their distribution within the area of the glial scar and its immediate surroundings. Their levels in the injury site are clearly lower than in the surrounding cerebral cortex. Moreover, this pattern is maintained throughout the entire observation period. In contrast, the situation is different for Fe, Cu, and Zn. The distribution of these elements in the examined area clearly depends on the time elapsed since the primary injury. On the second day post-injury, the tissue surface showing elevated calcium levels is extensive, but it gradually decreases as the glial scar forms in the cerebral cortex. A distinctly elevated level of iron, observed on the eighth day after TBI, persists until the end of the observation period. Similarly to iron, copper levels in the analyzed area significantly increase on the eighth day post-injury and remain elevated until day thirty. Moreover, elevated copper concentrations are found in the region directly surrounding the scar, which also corresponds to the area with increased areal density of iron.

The analysis of elemental distribution maps shown in Figure 15 does not allow us for drawing definitive conclusions regarding the influence of sex and the applied diet on the course of post-TBI elemental abnormalities.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Research on the use of KD for treating TBI has been ongoing for many years. Rat models are most commonly employed in these studies due to their developmental profile and ketone metabolism under starvation conditions, which closely resemble those of humans among mammals [34,35]. According to McDougall *et al.*, the beneficial effects of KD in TBI may stem from several mechanisms, including improved mitochondrial metabolic efficiency, decreased levels of reactive oxygen species (ROS) and oxidative damage, and enhanced activity of respiratory complex II [36]. Supporting these findings, Thau-Zuchman *et al.* [37] demonstrated that a specially formulated KD reduced the volume of brain injury induced by controlled cortical impact (CCI) in mice. However, their analysis was limited to 70 days post-injury, leaving the temporal dynamics of recovery between injury onset and endpoint unexplored. Additionally, Deng-Bryant *et al.* [38] highlighted that young rats exhibit greater resilience to brain injury and display more efficient adaptation to ketone metabolism, which contributes to improved neurochemical and metabolic regeneration. What is more Rauk *et al.* [39] indicate strong sex dependency in process of glial scar development. Together, these studies underscore the potential of KD to modulate injury outcomes and promote recovery and underline the necessity of testing both sexes, although further research is needed to clarify the underlying mechanisms and temporal progression of their effects.

Accordingly, our study focuses on evaluating the effects of KD on glial scar formation after TBI, considering sex differences and the temporal dynamics of biomolecular changes. The use of the CCI model and the analysis of scar development over consecutive days post-injury allows us for a detailed assessment of molecular and elemental processes that determine the course of brain regeneration. This approach enables the study of both short- and long-term effects of KD and provides a better understanding of sex-dependent differences in the response to brain injury.

The chemical maps obtained in this study did not demonstrate any significant influence of the administered diet on the spatial distribution of biomolecules within the injury site or its immediate surroundings. Topographic analysis revealed that the levels of the analyzed classes of compounds were consistently lower in the injured area compared to the adjacent cortical tissue. This observation aligns with findings from our previous publication, in which we investigated the time-dependent development of the glial scar in relation to the sex of the animals [40].

The results of the more detailed semi-quantitative analysis of FTIRM data indicated sex-dependent responses of rats to the application of KD following TBI. In male rats, KD induced only minor changes in the biomolecular composition of the cortex surrounding the injury site. An increase in the band ratio at 2924 and 2955 cm^{-1} observed on day 2 post-injury may suggest alterations in lipid structure within this region. On the same day, the influence of KD was also evident in the region of injury, where most analyzed biomolecular levels were lower in KD-fed males compared to those on a standard diet. In females, KD led to more pronounced and generally statistically significant changes in the injury area. On days 8 and 16 post-injury, a significant decrease in the levels of most biomolecules was observed both within the injury site and, to a lesser extent, in its immediate vicinity in female rats on KD. This may indicate a greater sensitivity of the female brain to the effects of KD in the context of biomolecular remodeling following TBI.

Complementary measurements performed using Raman microscopy provided additional information on the influence of KD on the level and/or structure of biomolecules in the lesion area. Differences in the accumulation and properties of the analyzed groups of compounds were observed primarily in the cerebral cortex surrounding the scar. These differences were noted in both male and female subjects. In males, an increased degree of lipid unsaturation was observed in this region, while in females, an elevation was noted in all the analyzed biochemical parameters, i.e., levels of lipid unsaturation and esterification, cytochrome, and amide III and/or deoxyhemoglobin.

The intensity ratio of the bands at 750 and 1447 cm^{-1} , which reflects the relative cytochrome content [29], provides insights into mitochondrial activity, where cytochrome c is a key component of the respiratory chain. According to Greco *et al.* [41], ketone bodies enhance energy metabolism following TBI and, due to their antioxidant properties, mitigate mitochondrial dysfunction under oxidative stress conditions. Changes in the intensity ratio of the bands at 1586 and 1447 cm^{-1} may also be attributed to the antioxidant effects of KD, including the protection of thiol groups in cysteine residues from oxidation [42,43].

In both female and male subjects fed a high-fat diet, Raman spectroscopy revealed in the cerebral cortex surrounding the injury site an increased ratio of band intensities at 3010 and 2853 cm^{-1} , which is a measure of the degree of unsaturation of aliphatic fatty acid chains. A similar effect of KD was observed in children suffering from drug-resistant epilepsy [44], in whom elevated levels of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) were found in the serum. Moreover, studies conducted by Nathan *et al.* [45] indicate that the addition of PUFAs to the ketogenic diet formulation improves seizure control.

Topographic elemental analysis performed using X-ray fluorescence microscopy revealed several abnormalities in both the levels and spatial distribution of the examined elements. The concentrations of low atomic number elements such as P, S and K were significantly reduced at the injury site compared to the surrounding tissue. In contrast, Ca showed a markedly different pattern as its areal density peaked at the site of the forming glial scar on the second day post-injury and subsequently declined over time. This transient increase in Ca levels is likely associated with its release from intracellular stores, primarily the endoplasmic reticulum and mitochondria, as a result of mechanical damage. The elevation of extracellular Ca^{2+} concentration initiates a cascade of events that contribute to secondary injury mechanisms, independent of the initial mechanical insult [46]. Our findings are consistent with those reported by Sun *et al.*, who observed elevated intracellular Ca^{2+} levels in isolated neurons on days 1 and 7 post-injury, followed by stabilization by day 30 [47]. According to the authors, the observed dysregulation may result from long-term impairments in calcium buffering capacity or alterations in the mechanisms of Ca^{2+} sequestration and release [47].

Our findings revealed that Fe levels in brain tissue undergo significant alterations during glial scar formation. These anomalies cannot be fully explained solely by blood influx resulting from blood–brain barrier (BBB) disruption. Secondary processes, such as angiogenesis occurring within the damaged area, are likely to play an important role. In BBB-penetrating brain injuries,

elevated expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), a key promoter of neovascularization, has been documented [48–50]. According to the results reported by Cheng *et al.* [51], post-traumatic Fe accumulation in the brain exhibits both temporal and cell-type specificity. Within the first three days following injury, ferroptosis of cortical neurons in the vicinity of the lesion is observed. In later stages, increased Fe deposition is primarily attributed to oligodendrocytes and microglial cells, with peak levels reported on days 7 and 14 post-TBI [51]. This mechanism may explain the elevated Fe levels observed in our study on days 8 and 16 post-injury.

The progressive accumulation of Cu in the immediate vicinity of the developing glial scar following TBI may indicate the involvement of delayed mechanisms of brain damage [52,53]. This increase in Cu concentration may be associated with the influx of ceruloplasmin, which is a protein with antioxidant properties that contains 6-8 Cu atoms per molecule. Under normal physiological conditions ceruloplasmin crosses BBB with low efficiency. However, the injury model used in this study, which involves BBB disruption, likely facilitates its entry into brain tissue [54]. Cu accumulation in the lesion area may enhance oxidative stress by promoting free radical formation, ultimately contributing to neuronal dysfunction [53,55]. On the other hand, copper–zinc superoxide dismutase (Cu/Zn SOD), which plays a role in scavenging ROS, may partially explain the slight but noticeable increase in Zn levels observed in the region adjacent to the glial scar [56]. It is important to note, however, that disturbances in Zn homeostasis may impair protein degradation pathways, potentially leading to neuronal injury [57]. Moreover, disruptions in elemental balance within the brain can have serious consequences, including the development of post-traumatic epilepsy [58]. Sande *et al.* [59] highlight the role that Fe, Cu, and Zn may play in the progression of seizures. Fe released from hemoglobin can accumulate and generate ROS and reactive nitrogen species (RNS). Excessive levels of Cu in the brain may disrupt neuronal signaling by blocking GABAergic pathways and AMPA receptors. In turn Zn, when present at elevated concentrations, exhibits neurotoxic effects.

In summary, our study indicates that KD exerts a subtle yet measurable impact on glial scar formation following brain injury. Although the spatial distribution of biomolecules within the lesion remained largely unchanged, semi-quantitative biochemical analysis using FTIRM revealed sex- and time-dependent modifications in the accumulation and structure of biomolecules within the injury site and its vicinity induced by KD. Raman microscopy demonstrated further alterations in the surrounding cortex: increased lipid unsaturation in males, and elevated levels of lipid unsaturation and esterification, cytochrome, and amide III and/or deoxyhemoglobin in females. X-ray fluorescence imaging revealed dynamic changes in elemental content associated with glial scar development, including early Ca release, delayed Fe accumulation, and a gradual increase in Cu concentration. These changes were largely independent of diet type.

Collectively, the findings suggest that KD may influence brain tissue remodeling after injury more prominently in females than in males. This underscores the importance of considering both sex and the timing of dietary intervention when assessing its therapeutic potential in TBI. Future research should focus on mechanistic links between KD, metal homeostasis, and biomolecular remodeling, as well as on evaluating the extent to which the observed phenomena translate into functional outcomes and potential clinical strategies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS:

Kamil Kawon: Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Visualization, Writing - original draft. **Zuzanna Setkowicz:** Conceptualization, Methodology, Resources, Writing - review & editing. **Zuzanna Rauk:** Investigation. **Mateusz Czyzycki:** Methodology, Investigation, Writing - review & editing. **Aleksandra Wilk:** Investigation. **Anna Slawek:** Investigation. **Jakub Cieslak:** Investigation. **Giuliana Aquilanti:** Methodology, Investigation, Writing - review & editing. **Ilaria Carlomagno:** Methodology, Investigation, Writing - review &

editing. **Agnieszka Drozd:** Supervision, Investigation. **Joanna Chwiej:** Conceptualization, Methodology, Resources, Investigation, Supervision, Writing - original draft.

DECLARATION OF COMPETING INTEREST:

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The present study was supported by:

1. the Ministry of Science and Higher Education of Poland,
2. the subvention fund no. N18/DBS/000018 of the Laboratory of Experimental Neuropathology,
3. the funds granted to the AGH University of Krakow in the frame of the “Excellence Initiative – Research University” project (Action 4: A system of university grants for research carried out with the participation of doctoral students and young scientists, PLs-Joanna Chwiej and Jakub Cieslak),
4. Elettra Sincrotrone Trieste experimental grants no. 20230125 and 20240069.

This work was financially supported by the IAEA in realization of Elettra Sincrotrone Trieste experimental grant no. 20230125.

The research leading to the XRF results (Proposal n. 20240069) has been co-funded by the project NEPHEWS under Grant Agreement No 101131414 from the EU Framework Programme for Research and Innovation Horizon Europe.

The Raman data were recorded and analyzed using WITec Alpha300R Raman microscope and dedicated software that was bought in frame of the “Excellence Initiative-Research University” Project granted to AGH UST.

References

- [1] L. Kalilani, X. Sun, B. Pelgrims, M. Noack-Rink, V. Villanueva, The epidemiology of drug-resistant epilepsy: A systematic review and meta-analysis, *Epilepsia* 59 (2018) 2179–2193. <https://doi.org/10.1111/EPI.14596>.
- [2] P. Kwan, M.J. Brodie, Early Identification of Refractory Epilepsy, *New England Journal of Medicine* 342 (2000) 314–319. https://doi.org/10.1056/NEJM200002033420503/ASSET/DAC08226-FE72-4672-BADB-E43D445FE18D/ASSETS/IMAGES/LARGE/NEJM200002033420503_T2.JPG.
- [3] C. Panayiotopoulos, Old versus new antiepileptic drugs: the SANAD study, *The Lancet* 370 (2007) 313–314. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)61150-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(07)61150-7).
- [4] A.M. Feyissa, T.F. Hasan, J.F. Meschia, Stroke-related epilepsy, *Eur J Neurol* 26 (2019) 18–e3. <https://doi.org/10.1111/ENE.13813>.
- [5] A. Pitkänen, J. Kyyriäinen, P. Andrade, L. Pasanen, X.E. Nnode-Ekane, Epilepsy After Traumatic Brain Injury, *Models of Seizures and Epilepsy: Second Edition* (2017) 661–681. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804066-9.00046-8>.
- [6] B.P. Lucke-Wold, L. Nguyen, R.C. Turner, A.F. Logsdon, Y.W. Chen, K.E. Smith, J.D. Huber, R. Matsumoto, C.L. Rosen, E.S. Tucker, E. Richter, Traumatic brain injury and epilepsy: Underlying mechanisms leading to seizure, *Seizure* 33 (2015) 13–23. <https://doi.org/10.1016/J.SEIZURE.2015.10.002>.

- [7] L. Dalic, M.J. Cook, Managing drug-resistant epilepsy: Challenges and solutions, *Neuropsychiatr Dis Treat* 12 (2016) 2605–2616. <https://doi.org/10.2147/NDT.S84852>.
- [8] F.J. López González, X. Rodríguez Osorio, A. Gil-Nagel Rein, M. Carreño Martínez, J. Serratos Fernández, V. Villanueva Haba, A.J. Donaire Pedraza, J.M. Mercadé Cerdá, Drug-resistant epilepsy: Definition and treatment alternatives, *Neurología (English Edition)* 30 (2015) 439–446. <https://doi.org/10.1016/J.NRLENG.2014.04.002>.
- [9] M. Ułamek-Kozioł, S.J. Czuczwar, R. Pluta, S. Januszewski, Ketogenic Diet and Epilepsy, *Nutrients* 2019, Vol. 11, Page 2510 11 (2019) 2510. <https://doi.org/10.3390/NU11102510>.
- [10] P. Mishra, S.C. Singh, B. Ramadass, Drug resistant epilepsy and ketogenic diet: A narrative review of mechanisms of action, *World Neurosurg X* 22 (2024) 100328. <https://doi.org/10.1016/J.WNSX.2024.100328>.
- [11] N. Juge, J.A. Gray, H. Omote, T. Miyaji, T. Inoue, C. Hara, H. Uneyama, R.H. Edwards, R.A. Nicoll, Y. Moriyama, Metabolic Control of Vesicular Glutamate Transport and Release, *Neuron* 68 (2010) 99–112. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2010.09.002/ATTACHMENT/16AE9CC9-811D-49DE-8FFC-FEA1A4DB9A80/MMC1.PDF>.
- [12] M. Yudkoff, Y. Daikhin, T.M. Melø, I. Nissim, U. Sonnewald, I. Nissim, The ketogenic diet and brain metabolism of amino acids: Relationship to the anticonvulsant effect, *Annu Rev Nutr* 27 (2007) 415–430. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NUTR.27.061406.093722/CITE/REFWORKS>.
- [13] G. Yellen, Ketone bodies, glycolysis, and KATP channels in the mechanism of the ketogenic diet, *Epilepsia* 49 (2008) 80–82. <https://doi.org/10.1111/J.1528-1167.2008.01843.X>.
- [14] S.A. Masino, J.D. Geiger, Are purines mediators of the anticonvulsant/neuroprotective effects of ketogenic diets?, *Trends Neurosci* 31 (2008) 273–278. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2008.02.009/ASSET/2CC29D2F-6BE2-443C-90F0-21C81E9381CA/MAIN.ASSETS/GR2.SML>.
- [15] S. Mayengbam, J. Ellegood, M. Kesler, R.A. Reimer, J. Shearer, K. Murari, J.M. Rho, J.P. Lerch, N. Cheng, A ketogenic diet affects brain volume and metabolome in juvenile mice, *Neuroimage* 244 (2021) 118542. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROIMAGE.2021.118542>.
- [16] E. Desli, M. Spilioti, A. Evangelidou, F. Styllas, F. Magkos, M. Dalamaga, The Efficacy and Safety of Ketogenic Diets in Drug-Resistant Epilepsy in Children and Adolescents: a Systematic Review of Randomized Controlled Trials, *Curr Nutr Rep* 11 (2022) 102–116. <https://doi.org/10.1007/S13668-022-00405-4/FIGURES/5>.
- [17] K. Kawon, M. Rugiel, Z. Setkowicz, K. Matusiak, A. Kubala-Kukus, I. Stabrawa, K. Szary, Z. Rauk, J. Chwiej, Ketogenic diet influence on the elemental homeostasis of internal organs is gender dependent, *Scientific Reports* 2023 13:1 13 (2023) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45611-4>.
- [18] K. Janeczko, Age-dependent changes in the proliferative response of S-100 protein-positive glial cells to injury in the rat brain, *International Journal of Developmental Neuroscience* 12 (1994) 431–440. [https://doi.org/10.1016/0736-5748\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0736-5748(94)90027-2).

- [19] K. Janeczko, Spatiotemporal patterns of the astroglial proliferation in rat brain injured at the postmitotic stage of postnatal development: a combined immunocytochemical and autoradiographic study, *Brain Res* 485 (1989) 236–243. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90566-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90566-0).
- [20] K. Kawon, Z. Setkowicz, A. Drozd, K. Janeczko, J. Chwiej, The methods of vibrational microspectroscopy reveals long-term biochemical anomalies within the region of mechanical injury within the rat brain, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 263 (2021) 120214. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2021.120214>.
- [21] W. Jark, D. Eichert, L. Luehl, A. Gambitta, Optimisation of a compact optical system for the beamtransport at the x-ray fluorescence beamline at Elettra for experiments with small spots, <https://doi.org/10.1117/12.2063009> 9207 (2014) 100–111. <https://doi.org/10.1117/12.2063009>.
- [22] A.G. Karydas, M. Czyzycki, J.J. Leani, A. Migliori, J. Osan, M. Bogovac, P. Wrobel, N. Vakula, R. Padilla-Alvarez, R.H. Menk, M.G. Gol, M. Antonelli, M.K. Tiwari, C. Caliri, K. Vogel-Mikuš, I. Darby, R.B. Kaiser, An IAEA multi-technique X-ray spectrometry endstation at Elettra Sincrotrone Trieste: benchmarking results and interdisciplinary applications, *Urn:Issn:1600-5775 25* (2018) 189–203. <https://doi.org/10.1107/S1600577517016332>.
- [23] P.M. Wrobel, M. Bogovac, H. Sghaier, J.J. Leani, A. Migliori, R. Padilla-Alvarez, M. Czyzycki, J. Osan, R.B. Kaiser, A.G. Karydas, LabVIEW interface with Tango control system for a multi-technique X-ray spectrometry IAEA beamline end-station at Elettra Sincrotrone Trieste, *Nucl Instrum Methods Phys Res A* 833 (2016) 105–109. <https://doi.org/10.1016/J.NIMA.2016.07.030>.
- [24] V.A. Solé, E. Papillon, M. Cotte, P. Walter, J. Susini, A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra, *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc* 62 (2007) 63–68. <https://doi.org/10.1016/J.SAB.2006.12.002>.
- [25] M. Al-Kelani, N. Buthelezi, Advancements in medical research: Exploring Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy for tissue, cell, and hair sample analysis, *Skin Research and Technology* 30 (2024) e13733. <https://doi.org/10.1111/SRT.13733>.
- [26] M. Lasalvia, V. Capozzi, G. Perna, Comparison of FTIR spectra of different breast cell lines to detect spectral biomarkers of pathology, *Infrared Phys Technol* 120 (2022) 103976. <https://doi.org/10.1016/J.INFRARED.2021.103976>.
- [27] J. De Meutter, E. Goormaghtigh, Evaluation of protein secondary structure from FTIR spectra improved after partial deuteration, *European Biophysics Journal* 50 (2021) 613–628. <https://doi.org/10.1007/S00249-021-01502-Y/FIGURES/1>.
- [28] V. Shapaval, J. Brandenburg, J. Blomqvist, V. Tafintseva, V. Passoth, M. Sandgren, A. Kohler, Biochemical profiling, prediction of total lipid content and fatty acid profile in oleaginous yeasts by FTIR spectroscopy, *Biotechnol Biofuels* 12 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13068-019-1481-0/TABLES/8>.
- [29] N.A. Brazhe, A.B. Evlyukhin, E.A. Goodilin, A.A. Semenova, S.M. Novikov, S.I. Bozhevolnyi, B.N. Chichkov, A.S. Sarycheva, A.A. Baizhumanov, E.I. Nikelshparg, L.I. Deev, E.G. Maksimov, G. V. Maksimov, O. Sosnovtseva, Probing cytochrome c in living mitochondria with surface-enhanced Raman spectroscopy, *Scientific Reports* 2015 5:1 5 (2015) 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep13793>.

- [30] G.K. Jain, R. Verma, A. Chougule, B. Singh, RAMAN SPECTROSCOPY STUDY OF HEALTHY AND CANCEROUS HUMAN BREAST TISSUE FOR CANCER DETECTION, *Exploratory Animal and Medical Research* 12 (2022) 160–166. <https://doi.org/10.52635/EAMR/12.2.160-166>.
- [31] M.V.P. Chowdary, K. Kalyan Kumar, S. Mathew, L. Rao, C. Murali Krishna, J. Kurien, Biochemical correlation of Raman spectra of normal, benign and malignant breast tissues: A spectral deconvolution study, *Biopolymers* 91 (2009) 539–546. <https://doi.org/10.1002/BIP.21171>.
- [32] J. Dybas, K. Bulat, A. Blat, T. Mohaissen, A. Wajda, M. Mardyla, M. Kaczmarek, M. Franczyk-Zarow, K. Malek, S. Chlopicki, K.M. Marzec, Age-related and atherosclerosis-related erythropathy in ApoE/LDLR^{-/-} mice, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1866 (2020) 165972. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2020.165972>.
- [33] A.F. García-Flores, L. Raniero, R.A. Canevari, K.J. Jalkanen, R.A. Bitar, H.S. Martinho, A.A. Martin, High-wavenumber FT-Raman spectroscopy for in vivo and ex vivo measurements of breast cancer, *Theor Chem Acc* 130 (2011) 1231–1238. <https://doi.org/10.1007/S00214-011-0925-9/TABLES/1>.
- [34] M.L. Prins, Cerebral metabolic adaptation and ketone metabolism after brain injury, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28 (2008) 1–16. https://doi.org/10.1038/SJ.JCBFM.9600543/ASSET/D23DB0E9-1197-451A-92FE-E52C23B3FC3E/ASSETS/IMAGES/LARGE/10.1038_SJ.JCBFM.9600543-FIG3.JPG.
- [35] S.G. Hasselbalch, G.M. Knudsen, J. Jakobsen, L.P. Hageman, S. Holm, O.B. Paulson, Blood-brain barrier permeability of glucose and ketone bodies during short-term starvation in humans, <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.1995.268.6.E1161> 268 (1995). <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.1995.268.6.E1161>.
- [36] A. McDougall, M. Bayley, S.E.P. Munce, The ketogenic diet as a treatment for traumatic brain injury: a scoping review, *Brain Inj* 32 (2018) 416–422. <https://doi.org/10.1080/02699052.2018.1429025>.
- [37] O. Thau-Zuchman, L. Svendsen, S.C. Dyal, U. Paredes-Esquivel, M. Rhodes, J. V. Priestley, R.G. Feichtinger, B. Kofler, S. Lotstra, J. Martin Verkuyl, R.J. Hageman, L.M. Broersen, N. van Wijk, J.P. Silva, J.L. Tremoleda, A.T. Michael-Titus, A new ketogenic formulation improves functional outcome and reduces tissue loss following traumatic brain injury in adult mice, *Theranostics* 11 (2021) 346. <https://doi.org/10.7150/THNO.48995>.
- [38] Y. Deng-Bryant, M.L. Prins, D.A. Hovda, N.G. Harris, Ketogenic Diet Prevents Alterations in Brain Metabolism in Young but not Adult Rats after Traumatic Brain Injury, <https://home.liebertpub.com/Neu> 28 (2011) 1813–1825. <https://doi.org/10.1089/NEU.2011.1822>.
- [39] Z. Rauk, J. Jędrusik, Z. Walczak, Z. Setkowicz, Sex differences in neuropathological response to traumatic brain injury: increased neuronal loss and astrogliosis in females, *Brain Struct Funct* 230 (2025) 1–30. <https://doi.org/10.1007/S00429-025-02986-6/TABLES/8>.
- [40] K. Kawon, Z. Setkowicz, Z. Rauk, J. Chwiej, Vibrational spectroscopy methods reveal biochemical changes associated with the glial scar formation after traumatic brain

injury, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 345 (2026) 126782.
<https://doi.org/10.1016/J.SAA.2025.126782>.

- [41] T. Greco, T.C. Glenn, D.A. Hovda, M.L. Prins, Ketogenic diet decreases oxidative stress and improves mitochondrial respiratory complex activity, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 36 (2016) 1603–1613.
https://doi.org/10.1177/0271678X15610584/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0271678X15610584-FIG7.JPEG.
- [42] B. D'Autréaux, M.B. Toledano, ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007 8:10 8 (2007) 813–824. <https://doi.org/10.1038/nrm2256>.
- [43] D.P. D'agostino, A.M. Poff, D. Kernagis, Chapter, *Compr Physiol* 7 (2016) 213–234.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c150032>.
- [44] D.D. Fraser, S. Whiting, R.D. Andrew, E.A. Macdonald, K. Musa-Veloso, S.C. Cunnane, Elevated polyunsaturated fatty acids in blood serum obtained from children on the ketogenic diet, *Neurology* 60 (2003) 1026–1029.
<https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000049974.74242.C6>.
- [45] J. Nathan, S. Bailur, K. Datay, S. Sharma, D.K. Kale, A Switch to Polyunsaturated Fatty Acid Based Ketogenic Diet Improves Seizure Control in Patients with Drug-resistant Epilepsy on the Mixed Fat Ketogenic Diet: A Retrospective Open Label Trial, *Cureus* 11 (2019) e6399. <https://doi.org/10.7759/CUREUS.6399>.
- [46] M.W. Greve, B.J. Zink, Pathophysiology of traumatic brain injury, *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine* 76 (2009) 97–104.
<https://doi.org/10.1002/MSJ.20104>.
- [47] D.A. Sun, L.S. Deshpande, S. Sombati, A. Baranova, M.S. Wilson, R.J. Hamm, R.J. DeLorenzo, Traumatic brain injury causes a long-lasting calcium (Ca²⁺)-plateau of elevated intracellular Ca levels and altered Ca²⁺ homeostatic mechanisms in hippocampal neurons surviving brain injury, *European Journal of Neuroscience* 27 (2008) 1659–1672. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2008.06156.X>.
- [48] Z.A. Zhao, L. Yan, J. Wen, S.K. Satyanarayanan, F. Yu, J. Lu, Y.U. Liu, H. Su, Cellular and molecular mechanisms in vascular repair after traumatic brain injury: a narrative review, *Burns Trauma* 11 (2023). <https://doi.org/10.1093/BURNST/TKAD033>.
- [49] P.M. Shore, E.K. Jackson, S.R. Wisniewski, R.S.B. Clark, P.D. Adelson, P.M. Kochanek, C.S. Robertson, M.R. Proctor, R.M. Scott, L.N. Sutton, H.E. Aryan, M.L. Levy, Vascular Endothelial Growth Factor is Increased in Cerebrospinal Fluid after Traumatic Brain Injury in Infants and Children, *Neurosurgery* 54 (2004) 605–612.
<https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000108642.88724.DB>.
- [50] M.K. Sköld, C. Von Gertten, A.C. Sandberg-Nordqvist, T. Mathiesen, S. Holmin, VEGF and VEGF Receptor Expression after Experimental Brain Contusion in Rat, <https://Home.Liebertpub.Com/Neu> 22 (2005) 353–367.
<https://doi.org/10.1089/NEU.2005.22.353>.
- [51] H. Cheng, N. Wang, X. Ma, P. Wang, W. Dong, Z. Chen, M. Wu, Z. Wang, L. Wang, D. Guan, R. Zhao, Spatial-temporal changes of iron deposition and iron metabolism after traumatic brain injury in mice, *Front Mol Neurosci* 15 (2022) 949573.
<https://doi.org/10.3389/FNMOL.2022.949573/BIBTEX>.

- [52] N.K. Isaev, E. V. Stelmashook, E.E. Genrikhs, Role of zinc and copper ions in the pathogenetic mechanisms of traumatic brain injury and Alzheimer's disease, *Rev Neurosci* 31 (2019) 233–243. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO-2019-0052/XML>.
- [53] S.D. Portbury, D.J. Hare, C.J. Sgambelloni, D.P. Bishop, D.I. Finkelstein, P.A. Doble, P.A. Adlard, Age modulates the injury-induced metallomic profile in the brain, *Metallomics* 9 (2017) 402–410. <https://doi.org/10.1039/C6MT00260A>.
- [54] N.K. Isaev, E. V. Stelmashook, E.E. Genrikhs, Role of zinc and copper ions in the pathogenetic mechanisms of traumatic brain injury and Alzheimer's disease, *Rev Neurosci* 31 (2019) 233–243. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO-2019-0052/MACHINEREADABLECITATION/RIS>.
- [55] X. Huang, M.P. Cuajungco, C.S. Atwood, M.A. Hartshorn, J.D.A. Tyndall, G.R. Hanson, K.C. Stokes, M. Leopold, G. Multhaup, L.E. Goldstein, R.C. Scarpa, A.J. Saunders, J. Lim, R.D. Moir, C. Glabe, E.F. Bowden, C.L. Masters, D.P. Fairlie, R.E. Tanzi, A.I. Bush, Cu(II) potentiation of alzheimer abeta neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction, *J Biol Chem* 274 (1999) 37111–37116. <https://doi.org/10.1074/JBC.274.52.37111>.
- [56] S. Mikawa, H. Kinouchi, H. Kamii, G.T. Gobbel, S.F. Chen, E. Carlson, C.J. Epstein, P.H. Chan, Attenuation of acute and chronic damage following traumatic brain injury in copper, zinc-superoxide dismutase transgenic mice, *J Neurosurg* 85 (1996) 885–891. <https://doi.org/10.3171/JNS.1996.85.5.0885>.
- [57] K.J. Sun, L. Zhu, H.D. Wang, X.J. Ji, H. Pan, M. Chen, T.J. Lu, Y.W. Fan, H.L. Cheng, C.H. Hang, J.X. Shi, Zinc as mediator of ubiquitin conjugation following traumatic brain injury, *Brain Res* 1506 (2013) 132–141. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2013.02.011>.
- [58] J. Chwiej, W. Winiarski, M. Ciarach, K. Janeczko, M. Lankosz, K. Rickers, Z. Setkowicz, The role of trace elements in the pathogenesis and progress of pilocarpine-induced epileptic seizures, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 13 (2008) 1267–1274. <https://doi.org/10.1007/S00775-008-0411-6/FIGURES/4>.
- [59] R. Sande, G. Doshi, A. Godad, Deciphering the role of metal and non-metals in the treatment of epilepsy, *Neurochem Int* 167 (2023) 105536. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2023.105536>.

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Supplementary materials

Modulatory role of the ketogenic diet in glial scar formation after traumatic brain injury - FTIR, Raman and X-ray fluorescence microscopy study

Kamil Kawon^{1#}, Zuzanna Setkowicz^{2#}, Zuzanna Rauk², Mateusz Czyzycki³, Aleksandra Wilk¹, Anna Slawek¹, Jakub Cieslak¹, Giuliana Aquilanti⁴, Ilaria Carlomagno⁴, Agnieszka Drozd¹, Joanna Chwiej¹

¹Faculty of Physics and Applied Computer Science, AGH University of Krakow, Al. Mickiewicza 30, 30-059 Krakow, Poland

²Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University, Gronostajowa 9, 30-387 Krakow, Poland

³Institute for Photon Science and Synchrotron Radiation, Karlsruhe Institute of Technology, Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany

⁴Elettra Sincrotrone Trieste S.C.p.A., s.s. 14, km 163.5, 34149, Basovizza, Trieste, Italy

* Corresponding author

Equally contributed

Table S1. Assignment of frequencies recorded in FTIR and Raman spectra to the corresponding vibrations of bonds/functional groups of compounds present in the studied tissues [1–12].

Frequency [cm ⁻¹]	Assignment
FTIRM	
~1080	PO ₂ symmetric stretching
~1240	PO ₂ asymmetric stretching
~1360	CH ₂ symmetric bending
~1480	CH ₂ (cyclic) scissoring
~1635	C=O stretching, C-N stretching, N-H bending
~1658	C=O stretching, C-N stretching, N-H bending
~1740	C=O stretching
~2924	CH ₂ asymmetric stretching
~2955	CH ₃ asymmetric stretching
~3012	=C-H stretching
Raman	
~750	C-C and C-N in macrocyclic porphyrin structure
~1447	C-H bending in lipids and proteins
~1586	C=C and C=N stretching in aromatic rings
~1743	C=O stretching
~2853	CH ₂ stretching
~3010	=C-H stretching

Table S2. Examined IR and Raman bands and their assignment to biochemical parameters [1–7,9–12].

IR absorption band/ratio of absorption bands/ratio of absorbance	Assignment to biochemical parameter
1080 cm ⁻¹ and 1240 cm ⁻¹	distribution of compounds containing phosphate group(s) including nucleic acids, phospholipids, phosphorylated carbohydrates, differences in the degree of phosphorylation of carbohydrates and glycoproteins
1360 cm ⁻¹	distribution of lipids, cholesterol and its esters
1480 cm ⁻¹	distribution of lipids, cholesterol and its esters
1635 cm ⁻¹ /1658 cm ⁻¹	conformational changes of proteins, the relative level of proteins with β-sheet to α-helix in secondary structure
1658 cm ⁻¹	amide I band, protein distribution
1740 cm ⁻¹	distribution of compounds containing carbonyl group(s)
2924 cm ⁻¹	distribution of lipids
2924 cm ⁻¹ /2955 cm ⁻¹	the degree of branching and structural changes of lipids
2800-3000 cm ⁻¹ /1658 cm ⁻¹	distribution of lipids in relation to proteins
3012 cm ⁻¹	distribution of unsaturated lipids
Ratio of Raman bands	Assignment to biochemical parameter
750 cm ⁻¹ /1447 cm ⁻¹	distribution of cytochrome C in relation to aliphatic chains in lipids and proteins
1586 cm ⁻¹ /1447 cm ⁻¹	amide III band in relation to aliphatic chains in lipids and proteins
1743 cm ⁻¹ /2853 cm ⁻¹	level of lipids esterification
3010 cm ⁻¹ /2853 cm ⁻¹	unsaturation level of lipids

Table S3. Weight of animals taking part in the experiment. The day of weighing corresponds to the day of the end of the animals' participation in the experiment.

Groups		Rat body mass \pm SD [g]		
Groups	Normal diet	NM2	111.21	6.18
		NM8	142.61	15.96
		NM16	190.23	15.15
		NM30	260.60	18.33
		NF2	102.49	2.27
		NF8	133.17	9.66
		NF16	153.10	5.85
		NF30	190.26	19.53
	Ketogenic diet	KM2	98.79	7.99
		KM8	117.19	15.24
		KM16	124.95	5.78
		KM30	161.45	15.47
		KF2	91.82	13.36
		KF8	100.82	13.37
KF16	112.45	9.98		
KF30	147.72	12.39		

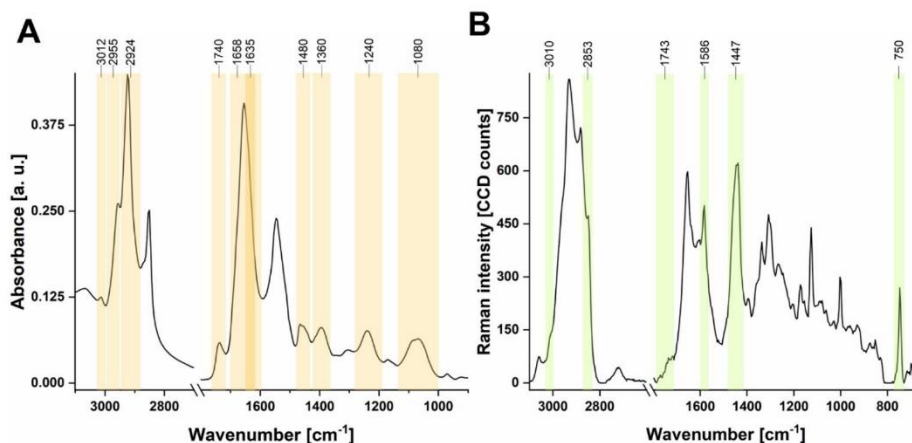


Figure S1. Exemplary summary FTIR and Raman spectrum after background subtraction and vector normalization. Shaded regions inform about spectral range taken for spectrum integration of selected bands. For the FTIR spectrum range from 3100 cm^{-1} to 2600 cm^{-1} was enlarged 2 times. The Raman spectrum in the fingerprint region (1900-600 cm^{-1}) was enlarged 2.5 times for better visualization of selected bands in this region.

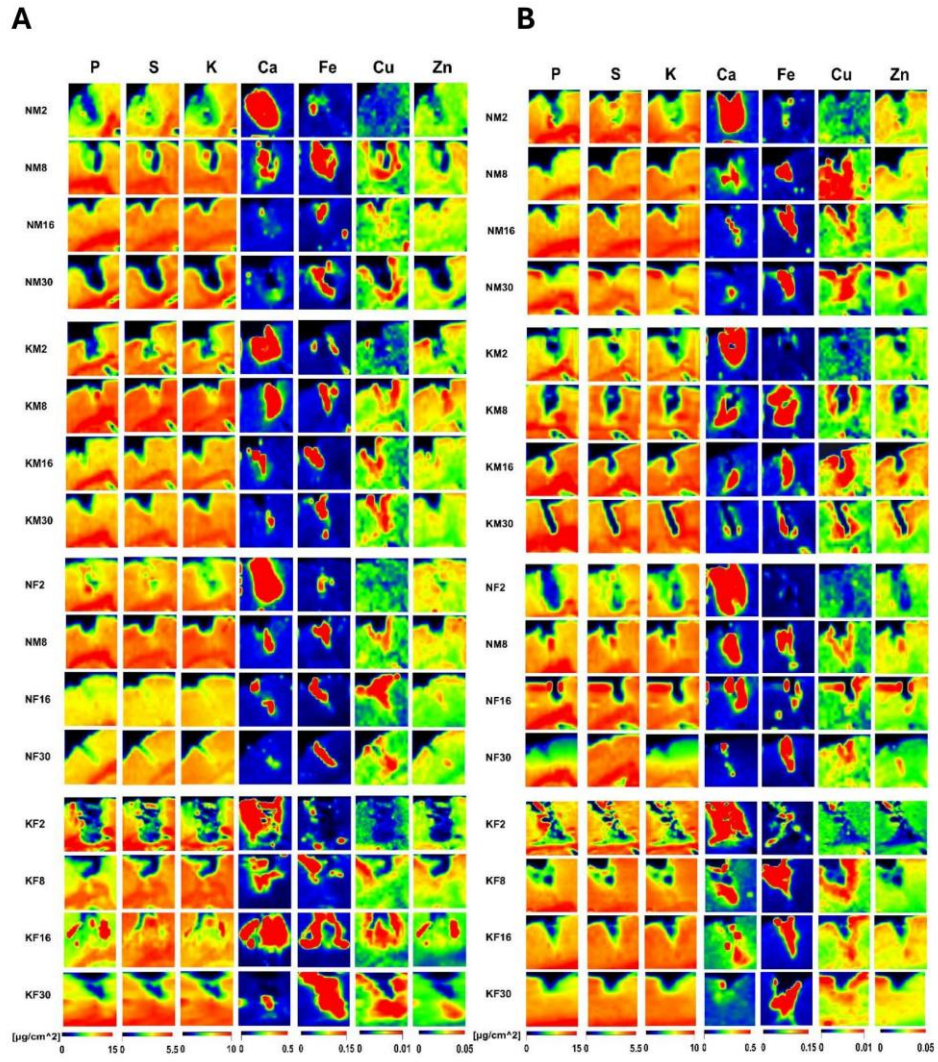


Figure S2. Distributions of P, S, K, Ca, Fe, Cu and Zn in the area of injury for the representative brain slices taken from rats of all examined experimental groups. Colour scales below the maps, unified for particular element, represent the element mass deposit in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

- [1] M. Rugeł, Z. Setkowicz-Janeczko, W. Kosiek, Z. Rauk, K. Kawon, J. Chwiej, Does Ketogenic Diet Used in Pregnancy Affect the Nervous System Development in Offspring?—FTIR Microspectroscopy Study, *ACS Chem Neurosci* 14 (2023) 2775–2791. <https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.3C00331>.
- [2] K. Kawon, Z. Setkowicz, A. Drozd, K. Janeczko, J. Chwiej, The methods of vibrational microspectroscopy reveals long-term biochemical anomalies within the region of mechanical injury within the rat brain, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 263 (2021) 120214. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2021.120214>.
- [3] J. Dybas, K. Bulat, A. Blat, T. Mohaissen, A. Wajda, M. Mardyla, M. Kaczmarek, M. Franczyk-Zarow, K. Malek, S. Chlopicki, K.M. Marzec, Age-related and atherosclerosis-related erythropathy in ApoE/LDLR^{-/-} mice, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1866 (2020) 165972. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2020.165972>.
- [4] N.A. Brazhe, A.B. Evlyukhin, E.A. Goodilin, A.A. Semenova, S.M. Novikov, S.I. Bozhevolnyi, B.N. Chichkov, A.S. Sarycheva, A.A. Baizhumanov, E.I. Nikelshparg, L.I. Deev, E.G. Maksimov, G. V. Maksimov, O. Sosnovtseva, Probing cytochrome c in living mitochondria with surface-enhanced Raman spectroscopy, *Scientific Reports* 2015 5:1 5 (2015) 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep13793>.
- [5] G.K. Jain, R. Verma, A. Chougule, B. Singh, Raman spectroscopy study of health and cancerous human breast tissue for cancer detection, *Exploratory Animal and Medical Research* 12 (2022) 160–166. <https://doi.org/10.52635/EAMR/12.2.160-166>.
- [6] M.V.P. Chowdary, K. Kalyan Kumar, S. Mathew, L. Rao, C. Murali Krishna, J. Kurien, Biochemical correlation of Raman spectra of normal, benign and malignant breast tissues: A spectral deconvolution study, *Biopolymers* 91 (2009) 539–546. <https://doi.org/10.1002/BIP.21171>.
- [7] A.F. García-Flores, L. Raniero, R.A. Canevari, K.J. Jalkanen, R.A. Bitar, H.S. Martinho, A.A. Martin, High-wavenumber FT-Raman spectroscopy for in vivo and ex vivo measurements of breast cancer, *Theor Chem Acc* 130 (2011) 1231–1238. <https://doi.org/10.1007/S00214-011-0925-9>.
- [8] J. Chwiej, A. Skoczen, K. Janeczko, J. Kutorasinska, K. Matusiak, H. Figiel, P. Dumas, C. Sandt, Z. Setkowicz, The biochemical changes in hippocampal formation occurring in normal and seizure experiencing rats as a result of a ketogenic diet, *Analyst* 140 (2015) 2190–2204. <https://doi.org/10.1039/C4AN01857E>.
- [9] V. Shapaval, J. Brandenburg, J. Blomqvist, V. Tafintseva, V. Passoth, M. Sandgren, A. Kohler, Biochemical profiling, prediction of total lipid content and fatty acid profile in oleaginous yeasts by FTIR spectroscopy, *Biotechnol Biofuels* 12 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13068-019-1481-0>.
- [10] J. De Meutter, E. Goormaghtigh, Evaluation of protein secondary structure from FTIR spectra improved after partial deuteration, *European Biophysics Journal* 50 (2021) 613–628. <https://doi.org/10.1007/S00249-021-01502-Y/FIGURES/1>.
- [11] M. Lasalvia, V. Capozzi, G. Perna, Comparison of FTIR spectra of different breast cell lines to detect spectral biomarkers of pathology, *Infrared Phys Technol* 120 (2022) 103976. <https://doi.org/10.1016/J.INFRARED.2021.103976>.
- [12] M. Al-Kelani, N. Buthelezi, Advancements in medical research: Exploring Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy for tissue, cell, and hair sample analysis, *Skin Research and Technology* 30 (2024) e13733. <https://doi.org/10.1111/SRT.13733>.