

## Streszczenie

# „Analiza ramanowska elementów morfotycznych krwi ludzkiej w stanie zdrowia i choroby”

**mgr Mateusz Kozicki**

**Promotor: dr hab. Aleksandra Weselucha - Birczyńska**

Zespół Spektroskopii Oscylacyjnej

Zakład Fizyki Chemicznej

Wydział Chemii

Uniwersytet Jagielloński

Celem pracy doktorskiej było przybliżenie pewnych cech budowy i funkcji wybranych elementów morfotycznych krwi ludzkiej poprzez analizę ich widm oscylacyjnych. Pozwoliło to na rozpoznanie możliwości spektroskopii oscylacyjnej w identyfikacji stanów ludzkiego organizmu określanymi jako zdrowie i choroba. Założeniem pracy doktorskiej było również określenie markerów wybranych stanów chorobowych, głównie przy użyciu techniki mikrospektroskopii ramanowskiej, rozważając istnienie korelacji pomiędzy zmianami molekularnymi w wybranych komórkach krwi a przyczynami chorobowymi, jak również możliwość detekcji tych zmian.

Stosunkowo łatwe przygotowanie próbki oraz krótki czas pomiaru, techniką spektroskopii ramanowskiej oraz spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-FTIR), pozwoliły zbadać dynamikę wybranych komórek krwi poprzez charakterystykę ich stanu biochemicznego. Innym atutem tych metod był fakt, że do przeprowadzenia pomiaru wystarczyła niewielka ilość próbki (1-5  $\mu$ l).

Szczegółowy plan badań przedstawiał się następująco:

1. Badanie procesu starzenia erytrocytów.
2. Analiza wczesnej fazy wewnątrzerytrocytarnego cyklu życiowego zarodźca malarycznego *P. falciparum* - stadium pierścienia.

3. Obserwacja spektroskopowa i analiza hodowli patologicznych erytrocytów. zakażonych *P. falciparum* i efektu działania antymalarycznego leku chlorochiny (CQ).
4. Analiza patologicznych zmian w erytrocytach podczas infekcji wywołanej bakterią *Clostridium difficile*.
5. Badanie procesu aktywacji limfocytów podczas infekcji wirusowej.
6. Badanie ekspresji mieloperoksydazy (MPO) w patologicznych neutrofilach ludzkich.

#### Ad. 1 Badanie procesu starzenia erytrocytów

Rozpad erytrocytów jest naturalną konsekwencją ich starzenia się. Pod wpływem starzenia, zmniejsza się płynność lipidów i ruchliwość białek integralnych błony erytrocytarnej (1, 2). Cechą charakterystyczną procesu starzenia się krwinek czerwonych jest inaktywacja enzymów i zmiany strukturalne większości białek.

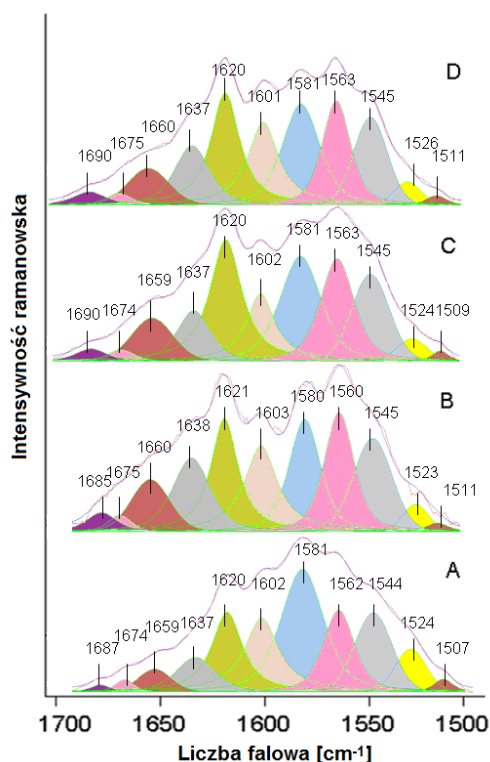
Do analizy widm przedstawiających zmiany zachodzące podczas procesu starzenia się erytrocytów użyto uogólnionej analizy korelacyjnej 2D, metody opracowanej przez Prof. Nodę (3-6). Analiza znaczących synchronicznych i asynchronicznych pików pozwoliła na obserwację procesu rozpadu hemoglobiny. Czas był zaburzeniem oddziałującym na badane erytrocyty, składowe tego układu zachowywały się w różny sposób pod jego wpływem. Asynchroniczne piki na wykresie dwuwymiarowym 2D wskazywały na postępującą separację globin od hemu w procesie starzenia, podczas gdy synchroniczne piki wskazywały na rozpad globin na poszczególne aminokwasy.

Widma Ramana zostały uzyskane także do analizy dezintegracji wyizolowanych cieni erytrocytarnych, w tym wypadku zaburzenie stanowiła moc użytego lasera. Dwuwymiarowe mapy korelacyjne dla ludzkich cieni erytrocytarnych przedstawiły głównie zmiany zachodzące w strukturach białkowych, co wskazuje na inicjację procesu fragmentacji membrany. Wniosek ten został wyciągnięty z analizy niektórych asynchronicznych pików, które można korelować z antygenami starzejących się komórek (SCA, ang. Senescent-Cell Antigen), pasmami wyróżniającymi konformacje białek i ich zmiany, jak również pasmami charakteryzującymi hem.

Ad. 2 Analiza wczesnej fazy wewnątrzerytrocytarnego cyklu życiowego zarodźca malarycznego *P. falciparum* - stadium pierścienia.

Badania wykazały, że podczas fazy wewnątrzerytrocytarnej cyklu życiowego zarodziec malarii degradowuje aż 75 % hemoglobiny (6). Podczas proteolizy hemoglobiny uwalniany zostaje wolny hem, który jest toksyczny dla pasożytów. W celu ochrony przed toksycznym działaniem hemu, pasożyty malarii wytworzyły mechanizm jego detoksykacji, polegający na tworzeniu hemozyny (7). Widmo ramanowskie hemozyny jest bardzo podobne do widma hemoglobiny, ze względu na obecność grup hemowych.

Krew została pobrana pierwszego dnia hospitalizacji od pacjentów leczonych w Szpitalu Uniwersyteckim w Krakowie, u których w badaniach parazytologicznych zaobserwowano obecność pierścieni *P. falciparum*. Analizowano zmiany zachodzące w erytrocytach, pozycje i stosunki intensywności pasm ramanowskich w czterech zakresach spektralnych: najbardziej wrażliwymi na zmiany konformacji łańcuchów węglowodorowych zakresami  $1150-1000\text{ cm}^{-1}$  i  $3000-2850\text{ cm}^{-1}$ ; regionie drgań rozciągających pierścieni pirolowych i drgań deformacyjnych  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ ,  $1500-1200\text{ cm}^{-1}$ ; oraz zakresie markerowym pierścienia porfiryнового  $1700-1500\text{ cm}^{-1}$  (na Rys. 1 znajduje się przykład rozkładu widma ramanowskiego na pasma składowe).



Rysunek 1: Widma ramanowskie pojedynczych erytrocytów dla (A) zdrowego ochotnika i (B-D) pacjentów zarażonych zarodźcem *P. falciparum* w zakresie spektralnym 1700-1500  $\text{cm}^{-1}$ ; linia wzbudzenia 785 nm.

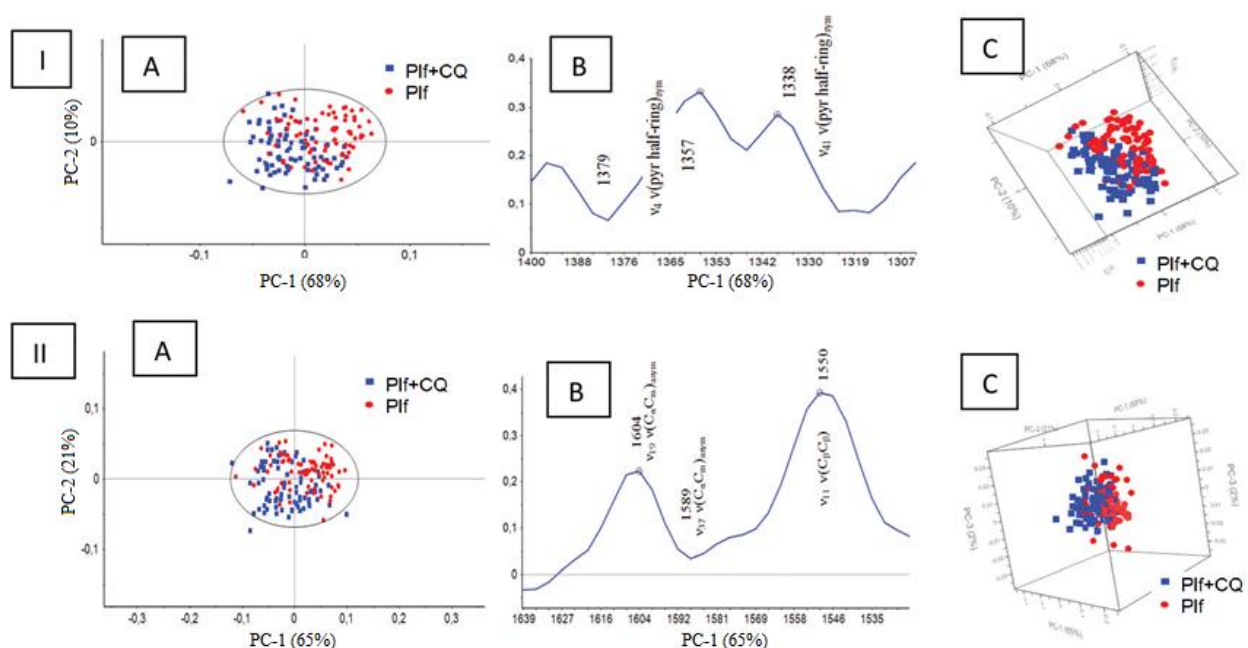
Modyfikacje krwinek przejawiają się poprzez znaczny spadek płynności błony erytrocytarnej odzwierciedlony przez spadek stosunku intensywności pasm  $I_{1130}/I_{1075}$ : z  $1.65 \pm 0.20$  dla zdrowych do  $0.80 \pm 0.20$  dla chorych. Wzrost stosunku intensywności pasm  $I_{2930}/I_{2850}$ : z  $6.50 \pm 0.20$  dla zdrowych do  $12.20 \pm 0.20$  dla chorych, jako ilościowa miara zmian zachodzących w strukturach lipidów, wskazuje na postępujące nieuporządkowanie błony komórkowej. Zmiany te są najlepiej widoczne podczas okresu dojrzewania pasożyta ze stadium niedojrzałej formy pierścienia do stadium dojrzałego trofozoita. Dodatkowo struktura hemu określona przy pomocy markera stanu utleniania  $\nu_4$  ujawniła informacje o strukturze hemoglobiny w erytrocytach zainfekowanych przez *P. falciparum*. Wykazano, że już w pierwszych godzinach po zakażeniu krwinek czerwonych przez pasożyta, przeważa stan deoksyhemoglobiny z żelazem znajdującym się na +3 stopniu utlenienia. Analiza struktury drugorzędowej białek i zmian zawartości poszczególnych konformacji w procesie rozwoju choroby, wskazała na wzrost ilości struktury kłęбка statystycznego, jako konsekwencję degradacji hemoglobiny i zaburzeń postępujących w strukturze białek błonowych. Proces formowania hemozoiny jest opisywany poprzez zmiany intensywności pasma  $\nu_{13}$  odpowiadającego drganiom  $\delta(\text{C}_m\text{H})$  hemu przy ok.  $1220 \text{ cm}^{-1}$  oraz pasm związanych z drganiami tetrameru porfiryny  $\nu_{37}$  i  $\nu_{11}$ , odpowiednio przy ok.  $1580 \text{ cm}^{-1}$  i  $1540 \text{ cm}^{-1}$ , związanych z deoksyHb, które dla zainfekowanych komórek przyjmują większe intensywności.

Ad. 3 Obserwacja spektroskopowa i analiza hodowli patologicznych erytrocytów zakażonych *P. falciparum* i efektu działania antymalarycznego leku chlorochiny (CQ).

Zmiany w intensywnościach pasm oscylacyjnych, będące następstwem dodania chlorochiny (CQ) do hodowli erytrocytów zainfekowanych przez *P. falciparum*, wskazują na istotne zmiany w erytrocytach zachodzące pod wpływem leku. Analizę zmian kontrolowano metodami spektroskopii oscylacyjnej: ATR-FTIR i spektroskopii ramanowskiej, które dostarczyły komplementarnych informacji. Pasma występujące w widmach ATR-FTIR

pozwołyły zanalizować zmiany w białkach, lipidach, kwasach nukleinowych i cukrach, podczas gdy mikrospektroskopia ramanowska uzupełniła informacje na temat stanu utlenowania hemoglobiny w odpowiedzi na podanie CQ.

Procedury identyfikacji zebranych widm za pomocą analizy skupień metodą k-średnich (KCA) i analizy głównych składowych (Principal Component Analysis, PCA) pozwoliły na rozróżnienie zainfekowanych erytrocytów w hodowli: bez leku oraz po dodaniu do nich CQ. Wykresy współrzędnych czynnikowych dla obserwacji (ang. scores plot) wykazały wyraźną separację wyników opartą na różnicach w ilości utlenowanej hemoglobiny pomiędzy klastrami (Rys. 2).

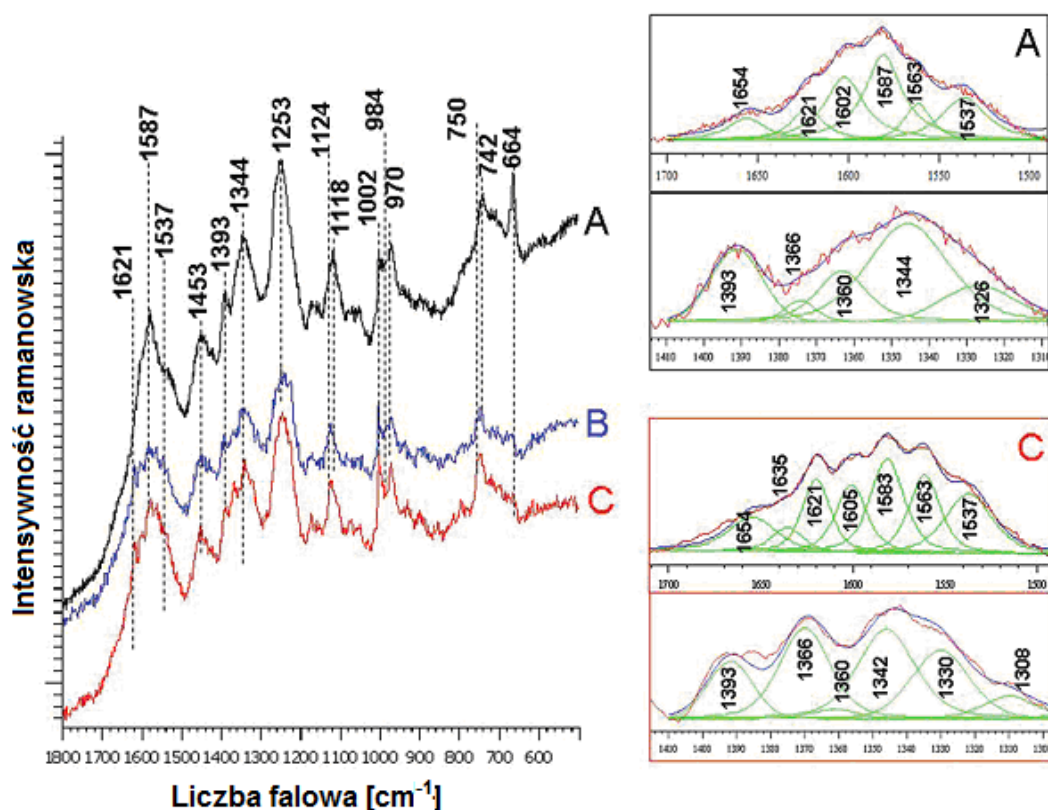


Rysunek 2: Analiza głównych składowych dla składowej pierwszej względem drugiej PC-1 vs. PC-2 zastosowana dla widm ramanowskich (wzbudzenie linią 532 nm) zainfekowanych erytrocytów po dodaniu CQ (Pif+CQ; niebieskie punkty) i grupy kontrolnej bez dodania leku (Pif, czerwone punkty); zakres (I) 1400-1300  $\text{cm}^{-1}$  (II) 1640-1520  $\text{cm}^{-1}$ ; (A) mapa obiektów w przestrzeni dwóch pierwszych składowych (wykres obserwacji) (B) odpowiadający wykres współrzędnej pierwszej PC-1 (wykres zmiennej) i (C) 3D mapa obiektów dla składowych PC-1 vs. PC-2 vs. PC-3.

Wyniki otrzymane dzięki technice ATR-FTIR wskazały wzrost intensywności pasm odpowiadających drganiom rozciągającym CH w zakresie 3100-2800  $\text{cm}^{-1}$  dla erytrocytów zainfekowanych przez *P. falciparum* po dodaniu CQ przy jednoczesnym wzroście intensywności pasm pochodzących od lipidów. Dodanie leku spowodowało również zmiany w strukturze drugorzędowej białek.

Ad. 4 Analiza patologicznych zmian w erytrocytach podczas infekcji wywołanej bakterią *Clostridium difficile*.

Rys. 3 przedstawia widma ramanowskie pojedynczych erytrocytów pochodzące od pacjentów hospitalizowanych z powodu zakażenia bakterią *Clostridium difficile* (*C. diff.*) pierwszego i siódmego dnia leczenia, w porównaniu z widmami zdrowych erytrocytów.



Rysunek 3: Widma ramanowskie pojedynczych erytrocytów dla pacjentów hospitalizowanych z powodu zakażenia *C. diff.* w pierwszym (A) i siódmym dniu ich leczenia (B); widmo ramanowskie zdrowego erytrocytu (C); zakres spektralny 1750-150 cm<sup>-1</sup>; linia wzbudzenia 785 nm.

Wyniki przedstawione na wykresach współrzędnych czynnikowych dla obserwacji przedstawiają wyraźne rozdzielenie danych pomiędzy pierwszym i siódmym dniem hospitalizacji.

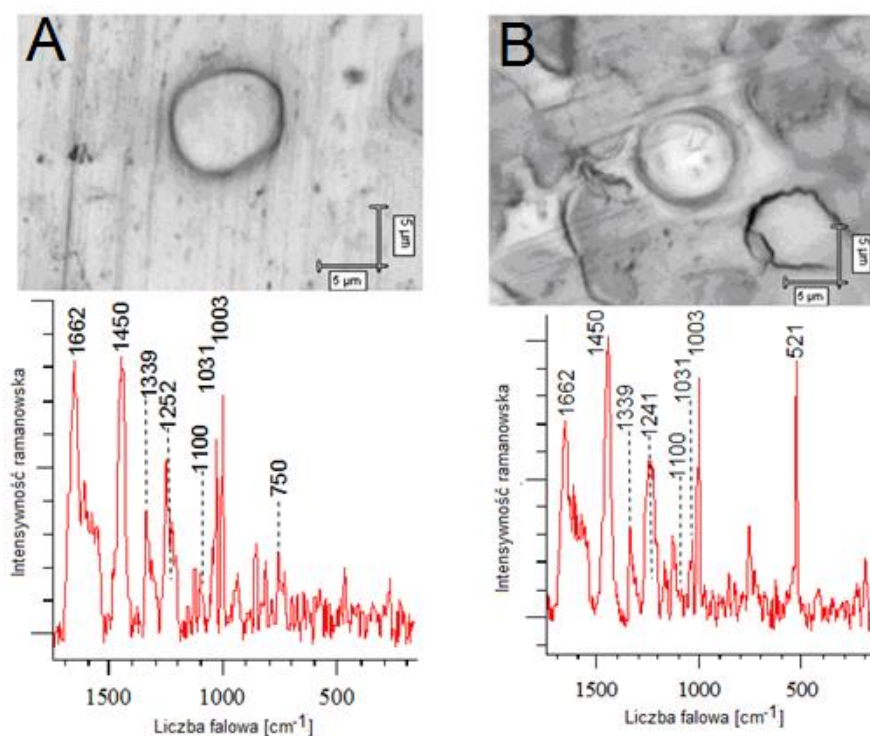
Struktura hemu w przebiegu od ostrego stanu zakażenia bakterią *C. diff.* w pierwszym dniu hospitalizacji (przewaga stanu deoksyhemoglobiny), do siódmego dnia wskazuje, że komórki powracające do stanu zdrowia zawierają zwiększony poziom stanu utlenowanej hemoglobiny.

Efektem działania toksyn jest zniesienie ograniczeń sterycznych białek w erytrocytach. W związku z tym w widmach ramanowskich zaobserwowano wyraźne wzmocnienie symetrycznych drgań pulsacyjnych pierścieni pirolowych hemu, całego makrocyklu hemu i wszystkich reszt aminokwasowych.

#### Ad. 5 Badanie procesu aktywacji limfocytów podczas infekcji wirusowej.

Strukturalne zmiany biochemiczne w ludzkich limfocytach zostały zaobserwowane podczas infekcji wirusowej (grypa). Obecność i koncentracja immunoglobulin pozwoliła „oznaczać” spektroskopowo zaktywowane komórki limfocytów. Aktywowana forma jest rozpoznawana za pomocą obecności pasma charakteryzującego drgania mostków disiarczkowych S-S w immunoglobulinach w położeniu  $521\text{ cm}^{-1}$  (Rys. 4 B).

Przesunięcie w kierunku wyższych liczb falowych, szerokiego pasma S-S przy  $510\text{ cm}^{-1}$  dla referencyjnego roztworu ludzkiej immunoglobuliny do pasma w położeniu  $521\text{ cm}^{-1}$  dla aktywowanych ludzkich limfocytów B, wskazało na wybór optymalnej geometrii mostków disiarczkowych w obecności obcych antygenów. Przeciwciała (immunoglobuliny) produkowane przez plazmocyty, związały się z antygenami i zapoczątkowały proces ich neutralizacji.



Rysunek 4: Mikrofotografia pojedynczego, nieaktywowanego limfocytu (A) i limfocytu w stanie aktywacji (B) przy 100-krotnie powiększającym obiektywnie wraz z jego widmem ramanowskim w zakresie spektralnym 1750-150  $\text{cm}^{-1}$  przy linii wzbudzenia 785 nm.

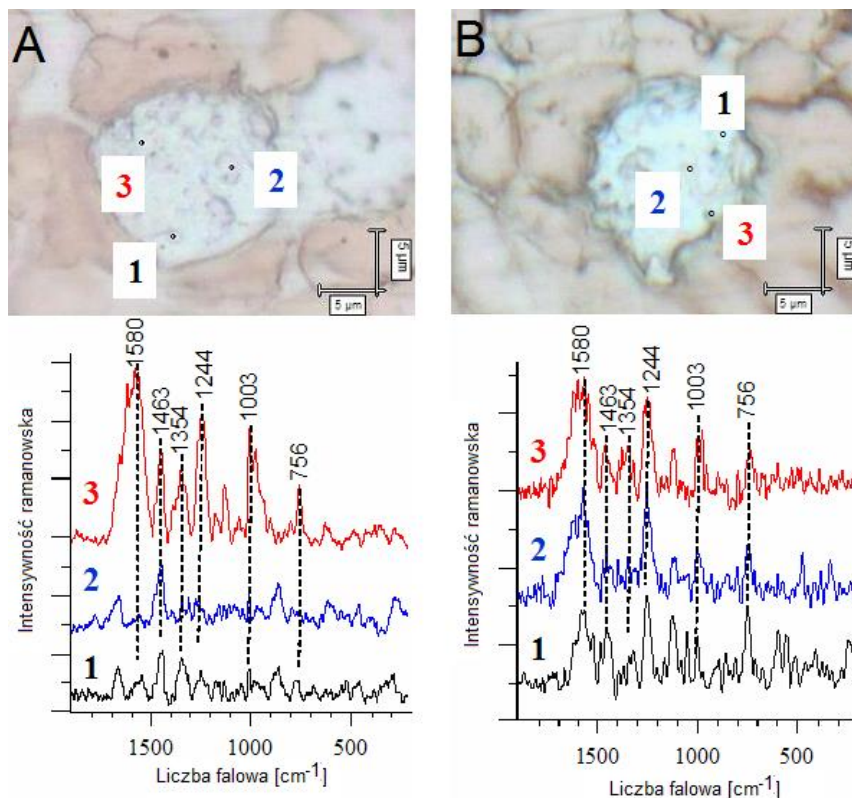
Wyraźne pasmo w pozycji 521  $\text{cm}^{-1}$  dla pojedynczych limfocytów określiło, że wiązania disiarczkowe znalazły się w podobnej geometrii dla aktywowanych komórek. Formowanie immunoglobulin i ich agregacja wystąpiły podczas aktywacji komórek B, co wywołało znaczący wzrost intensywności pasma markerowego przy 521  $\text{cm}^{-1}$ .

Różnice w intensywnościach pozostałych pasm były efektem różnego składu białek w obydwu badanych stanach. Aktywacja limfocytów B spowodowała zmianę składu wewnątrzkomórkowej cytoplazmy, co szczególnie wyraźnie przedstawiła dystrybucja tyrozyny (850  $\text{cm}^{-1}$ ).

Ad. 6 Badanie ekspresji mieloperoksydazy (MPO) w patologicznych neutrofilach ludzkich.

Mikrospektroskopia ramanowska skutecznie monitoruje stan aktywacji neutrofilii podczas infekcji bakteryjnej, na przykładzie posocznicy. Posocznica charakteryzuje się występowaniem stanu zapalnego w całym organizmie, przy czym kluczową rolę w procesie niszczenia bakterii ogrywają neutrofile. Sprawdzono, że spektroskopia Ramana monitorowała obecność enzymu mieloperoksydazy (MPO) na poziomie pojedynczej komórki, poprzez silny sygnał ramanowski barwnika hemowego, składnika enzymu. MPO został potraktowany jako marker stanu infekcji bakteryjnej (Rys. 5).





Rysunek 5: Mikrofotografia fragmentu cienkiego rozmazu krwi zawierającego neutrofil pochodzący od (A) zdrowego ochotnika (pkt 3-obecność MPO) oraz (B) pacjenta septycznego (pkt 1- 3-obecność MPO) (obiektyw  $\times 100$ ); widma ramanowskie zaznaczonych punktów przedstawione w zakresie spektralnym  $1900-200\text{ cm}^{-1}$ .

Najintensywniejsze obserwowane pasma występujące przy  $1580\text{ (}\nu_{37}(\text{C}_\alpha\text{C}_m\text{))}$ ,  $1463\text{ (}\nu_3(\text{C}_\alpha\text{C}_m\text{))}$  i  $1354\text{ cm}^{-1}\text{ (}\nu_4(\text{C}_\alpha\text{N}))$  związane są z drganiami szkieletu porfirynowego, typowymi dla MPO i pojawiły się w punkcie 3 na Rys. 5A i we wszystkich punktach na Rys. 5B neutrofilów dla pacjentów z syndromem sepsy. Poza tym komórki w stanie aktywowanym były większe, a ich kształt stał się charakterystyczny, wydłużony lub nieregularny.

### Podsumowanie

W widmach ramanowskich zawarte były pełne informacje o badanym materiale biologicznym pozwalającym na jego potencjalne wykorzystanie w diagnostyce biomedycznej. Stany chorobowe poczynając od infekcji wirusowych, a kończąc na poważnych chorobach zakaźnych jak malaria czy posocznica, będących odpowiedziami organizmu na ciężkie zakażenia, odpowiednio pasożytnicze i bakteryjne - spowodowały zmiany w komórkach krwi i aktywację układu immunologicznego. Nowatorskim etapem badań było określenie spektroskopowe aktywacji poszczególnych krwinek i znalezienie pasm ramanowskich-

markerów tych stanów. Umożliwiło to skorelowanie morfologii z biochemiczną i molekularną strukturą, dzięki tzw. spektroskopowemu barwieniu, a więc w nowy, innowacyjny sposób. Badania prowadzone do tej pory ograniczały się wyłącznie do charakterystyki składu biochemicznego (8, 9) elementów morfologicznych krwi, nie analizowały ich zmian w czasie choroby.

#### Bibliografia:

- (1) Fizjologia krwi. Wybrane zagadnienia; pod redakcją Z. Dąbrowskiego, Wydawnictwo PWN; Warszawa 1998
- (2) Fizjologia krwi. Wybrane zagadnienia. Część 2; pod redakcją Z. Dąbrowskiego, Wydawnictwo PWN; Warszawa 2000
- (3) I. Noda, Appl. Spectrosc. 47 (1993) 1329
- (4) I. Noda, A.E. Dowrey, C. Marcott, G.M. Story, Appl. Spectrosc. 54 ,2000, 236A
- (5) I. Noda, Y. Ozaki, Two-dimensional Correlation Spectroscopy – Applications in Vibrational and Optical Spectroscopy, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, 2004
- (6) B. R. Wood, D. McNaughton, “Raman Spectroscopy in Malaria Research”, Expert Rev. Proteomics 3(5), 2006
- (7) W. Sherman, ed. “Molecular Approaches to Malaria”, ASM Press, Washington D.C., 2005
- (8) V. V. Pully, A. T. M. Lenferinkb and C. Otto, "Time-lapse Raman imaging of single live lymphocytes", J. Raman Spectrosc. (2011), 42, 167–173
- (9) B. R. Wood, D. McNaughton, ”Raman excitation wavelength investigation of single red blood cells in vivo”, J. Raman Spectrosc. (2002); 33: 517-523

#### Spis publikacji stanowiących dorobek doktoranta:

1) **M. Kozicki**, D. J. Creek, A. Sexton, B. J. Morahan, A. Weselucha-Birczyńska, B. R. Wood

*“An attenuated total reflection (ATR) and Raman spectroscopic investigation into the effects of chloroquine on Plasmodium falciparum-infected red blood cells”*; Analyst, 2015,140, 2236-2246

2) J. Czepiel, **M. Kozicki**, P. Panasiuk, M. Birczyńska, A. Garlicki, A. Weselucha-Birczyńska

*“Clostridium difficile the hospital plague”*; Analyst, 2015,140, 2513-2522

3) A. Weselucha-Birczyńska, **M. Kozicki**, J. Czepiel, M. Birczyńska

„*Raman micro-spectroscopy tracing human lymphocyte activation*”; *Analyst*, 138, 2013, 7157-7163

4) A. Weselucha-Birczyńska, **M. Kozicki**, J. Czepiel, M. Łabanowska, P. Nowak, G. Kowalczyk, M. Kurdziel, M. Birczyńska, G. Biesiada, T. Mach, A. Garlicki

"*Human erythrocytes analyzed by generalized 2D Raman correlation spectroscopy*"; *Journal of Molecular Structure*, 1069, 2014, 305–312

rozdział w książce:

5) **M. Kozicki**, A. Weselucha-Birczyńska

"*Raman spectroscopy of human RBC excited by various laser lines*"

"Na pograniczu chemii i biologii" Tom 28, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań, 299-306 (2012)

oraz publikacja wysłana do czasopisma *Analyst*:

6) **M. Kozicki**, J. Czepiel, G. Biesiada, P. Nowak, A. Garlicki, A. Weselucha-Birczyńska

„*Ring-stage of Plasmodium falciparum observed in RBCs malaria hospitalized patients*”