

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

lek. Malwina Birczyńska-Zych

Zmiany erytrocytów w obrazie spektroskopii Ramanowskiej w toku
zarażenia zarodźcem malarii

Praca doktorska

Promotor I: prof. dr hab. n. med. Jacek Czepiel

Promotor II: prof. dr hab. Maria Łabanowska

Pracę wykonano w: I: Klinice Chorób Zakaźnych i Tropikalnych

Wdziału Lekarskiego UJCM

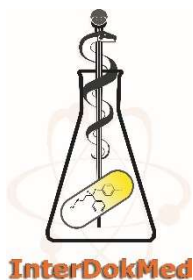
oraz II: Wydziale Chemii UJ

Kierownik jednostki:

I: prof. dr hab. n. med. Aleksander Garlicki

II: prof. dr hab. Wojciech Macyk

Kraków, rok 2023



InterDokMed

Rozprawa doktorska powstała w trakcie realizacji
Środowiskowych Studiów Doktoranckich
w ramach Projektu nr POWR.03.02.00-00-I013/16,
"Interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej" InterDokMed,
realizowanych w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020,
współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego



Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Pragnę bardzo serdecznie podziękować:

Panu Promotorowi prof. dr hab. med. Jackowi Czepielowi za pomoc i wsparcie na każdym etapie moich studiów doktoranckich, badań naukowych oraz powstawaniu niniejszej pracy.

Pani Promotor prof. dr hab. Marii Łabanowskiej za pomoc, wsparcie w badaniach i powstaniu pracy.

Mojej mamie prof. dr hab. Aleksandrze Weselusze-Birczyńskiej Kierownikowi Zespołu Spektroskopii Oscylacyjnej Wydziału Chemii UJ, za wszelką pomoc merytoryczną w badaniach.

Wszystkim pracownikom Oddziału Klinicznego Chorób Zakaźnych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie- Panu Ordynatorowi- prof. dr hab. n. med. A. Garlickiemu, Lekarzom, a także Paniom Pielęgniarkom za wszelką pomoc.

Pracownikom z Zespołu Spektroskopii Oscylacyjnej za współpracę, doktorantom i studentom z którymi prowadzone były badania i wyjazdy na interdyscyplinarne konferencje, gdzie prezentowaliśmy wyniki badań.

Śp. mgr Piotrowi Nowakowi z Zakładu Parazytologii SU za wszelkie wskazówki.

Pani inż. Czesławie Zych oraz Pracownikom Laboratorium ANALIZA w Myślenicach, za pomoc w skompletowaniu grupy kontrolnej do badań.

Mojej rodzinie: mojemu mężowi Sebastianowi za każde dobre słowo, wiarę we mnie i wsparcie, moim synkom Franiowi i Antosiowi za cierpliwość oraz mojemu tacie i siostrze za wszelką pomoc i wsparcie.

Spis treści

| | |
|--|----|
| 1. Wstęp | 8 |
| 1.1. Historia malarii [1-5] | 8 |
| 1.2. Malaria- etiologia, patogenez, cykl życiowy pasożyta [1-22] | 12 |
| 1.2. 1. Etiologia | 12 |
| 1.2.2. Droga przenoszenia | 13 |
| 1.2.3. Rezerwuar | 13 |
| 1.2.4. Cykl życiowy <i>Plasmodium</i> | 13 |
| 1.2.5. Patogeneza i zmiany w erytrocytach w przebiegu malarii | 15 |
| 1.2.6. Okres wylęgania i zakaźności | 16 |
| 1.2.7. Epidemiologia | 16 |
| 1.2.8. Obraz kliniczny | 19 |
| 1.3. Diagnostyka malarii [1-11] | 23 |
| 1.3.1. Identyfikacja czynnika etiologicznego | 23 |
| 1.3.2. Badania dodatkowe | 25 |
| 1.4. Malaria leczenie i profilaktyka [1-15] | 27 |
| 1.4.1. Profilaktyka malarii | 27 |
| 1.4.2. Leczenie malarii | 28 |
| 1.4.2.1 Leczenie przyczynowe | 28 |
| 1.4.2.2. Leczenie objawowe | 29 |

| | |
|---|----|
| 1.5. Eryocyty- budowa i funkcja [1-9]..... | 32 |
| 1.5.1. Budowa eryocytów- ogólna charakterystyka | 32 |
| 1.5.2. Błona biologiczna eryocytów | 33 |
| 1.5.3. Hemoglobina- budowa chemiczna..... | 34 |
| 1.6. Historia spektroskopii Ramanowskiej [1-2]..... | 37 |
| 1.7. Spektroskopia ramanowska [1-10]..... | 42 |
| 1.8. Spektroskopia EPR [1-5]..... | 49 |
| 1.9. Analiza głównych składowych – PCA (ang. Principal Component Analysis) [1-2] | 55 |
| 1.10. Korelacja dwuwymiarowa 2D-COS w badaniach spektroskopowych [1-3] | 58 |
| 1.11. Stan badań spektroskopowych w malarii [1-12] | 61 |
| 2. Hipoteza badawcza | 71 |
| 3. Cel pracy | 72 |
| 4. Materiał i metody | 73 |
| 4.1 Ogólna charakterystyka pacjentów z malarią uczestniczących w badaniu | 73 |
| 4.2 Ogólna charakterystyka grupy kontrolnej | 74 |
| 4.3. Spektroskopia Ramanowska | 74 |
| 4.4. Spektroskopia EPR..... | 75 |
| 4.5. Metoda PCA..... | 75 |
| 4.6. Metoda 2D..... | 75 |
| 4.7 Analiza statystyczna wyników badań laboratoryjnych | 76 |
| 5. Wyniki..... | 77 |

| | |
|--|-----|
| 5.1. Ogólna charakterystyka pacjentów biorących udział w badaniu..... | 77 |
| 5.2. Wyniki standardowych badań laboratoryjnych pacjentów biorących udział w badaniu | 81 |
| 5.3. Leczenie pacjentów z grupy badanej | 93 |
| 5.4. Wyniki badań spektroskopowych – spektroskopia Ramanowska..... | 96 |
| 5.4.1 Pasma markerowe malarii w spektroskopii ramanowskiej [1-6]..... | 96 |
| 5.4.2. Monitorowanie procesu rozpadu erytrocytów pobranych od pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną <i>P. falciparum</i> | 100 |
| 5.4.2.2 Zmiany obserwowane w błonie komórkowej erytrocytów | 115 |
| 5.4.3. Różnice w widmach spektroskopii ramanowskiej pacjentów z malarią wywołaną <i>P. falciparum</i> i <i>P. vivax</i> | 122 |
| 5.4.3.1 Różnice w widmach spektroskopii ramanowskiej pacjentów z malarią wywołaną <i>P. falciparum</i> i <i>P. vivax</i> - analiza PCA [1-3] | 122 |
| 5.4.3.2 Różnice w widmach otrzymanych metodą spektroskopii ramanowskiej pacjentów z malarią wywołaną <i>P. falciparum</i> i <i>P. vivax</i> - analiza 2D [1-7]..... | 141 |
| 5.5 Wyniki badań spektroskopowych- spektroskopia EPR..... | 145 |
| 5.5.1 Spektroskopia EPR pełnej krwi pacjentów z rozpoznaną malarią wywołaną <i>P. falciparum</i> | 145 |
| 5.5.2. Korelacja 2D EPR pełnej krwi pacjentów z rozpoznaną malarią wywołaną <i>P. falciparum</i> [1-2] | 150 |
| 6. Podsumowanie i dyskusja | 154 |
| 7. Wnioski | 159 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 8. | Wykaz skrótów | 162 |
| 9. | Piśmiennictwo alfabetycznie | 165 |
| 10. | Streszczenie w języku polskim | 175 |
| 11. | Streszczenie w języku angielskim..... | 177 |
| 12. | Wykaz rycin | 179 |
| 13. | Wykaz tabel..... | 191 |
| 14. | Wykaz publikacji obejmujących materiał pracy doktorskiej | 194 |

1. Wstęp

1.1. Historia malarii [1-5]

Objawy malarii zostały opisane już w starożytnych chińskich pismach medycznych. Kilka typowych objawów sugerujących malarię, zostało scharakteryzowanych przez Nei Ching'a w Kanonie Medycyny - w 2700 r. p.n.e.. Malaria była także powszechnie znana w starożytnej Grecji i główne objawy zostały opisane przez Hipokratesa w IV wieku p.n.e. Uważa się, że przyczyniła się do upadku wielu populacji miast-państw. W epoce Peryklesa pojawiło się wiele wzmianek w literaturze o malarii i odnotowano wyludnianie się wielu obszarów wiejskich z jej powodu. W Susruta, sanskryckim, indyjskim traktacie medycznym, opisano objawy gorączki malarycznej i przypisano je ukąszeniom niektórych owadów. Wielu pisarzy rzymskich kojarzyło obecność bagien z występowaniem tej choroby.

W Chinach, w grobowcu Mawangdui pochodzącym z II wieku p.n.e. znaleziono traktat medyczny, w którym opisano roślinę Qinghao (*Artemisia annua L.*). Przeciwgorączkowe właściwości Qinghao zostały po raz pierwszy przedstawione przez Ge Honga ze Wschodniej Dynastii Yin w 340 roku n.e. Aktywny składnik rośliny Qinghao został wyizolowany przez chińskich naukowców w 1971 roku- jest znany jako artemizynina. W 2015 roku Tu Youyou została nagrodzona Nagrodą Nobla w dziedzinie Fizjologii lub Medycyny za opisanie tej substancji i jej działania przeciw pasożytniczego.

W XVI w. n.e. po przybyciu do Nowego Świata Hiszpanie dowiedzieli się o leku stosowanym w leczeniu gorączki. Hiszpańscy misjonarze jezuitów w Ameryce Południowej uzyskali informację na temat leczniczej kory od rdzennych plemion indiańskich. Tą właśnie korą hrabina Chinchón, żona wicekróla Peru, została wyleczona z gorączki malarycznej. Kora z drzewa była

wówczas nazywana korą peruwiańską, a drzewo nazwano Cinchona na cześć hrabiny. Lek pozyskiwany z kory chinowca jest obecnie znany jako lek przeciwmalaryczny, chinina.

Charles Louis Alphonse Laveran, francuski chirurg wojskowy stacjonujący w Constantine w Algierii jako pierwszy zauważył pasożyty we krwi pacjenta cierpiącego na malarię. Stało się to 6 listopada 1880 roku. Laveran otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie Fizjologii lub Medycyny w 1907 roku za odkrycie zarodźca zimnicy oraz całokształt prac dotyczących roli pierwotniaków w powstawaniu chorób. Z nagrody ufundował laboratorium medycyny tropikalnej w Instytucie Pasteura.

Camillo Golgi, włoski neurofizjolog, ustalił, że istnieją co najmniej dwie formy choroby, trzeciaczka (z gorączką występującą co drugi dzień) i czwartaczka (gorączka występująca co trzeci dzień). Zauważył również, że po osiągnięciu dojrzałości pasożyty wytwarzają różną liczbę merozoitów, a gorączka zbiega się z pęknięciem erytrocytów i uwolnieniem merozoitów do krwioobiegu. W 1906 roku Camillo Golgi otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny za odkrycia w dziedzinie neurofizjologii.

Włoscy badacze Giovanni Batista Grassi i Raimondo Filetti w 1890 roku po raz pierwszy wprowadzili nazwy *P. vivax* i *P. malariae* dla dwóch pasożytów malarii atakujących ludzi. Laveran uważał bowiem, że istnieje tylko jeden gatunek, *Oscillaria malariae*. Amerykanin William H. Welch dokonał przeglądu tematyki i w 1897 roku nazwał złośliwego pasożyta malarii czwartaczki, *P. falciparum*. Było wiele argumentów przeciwko używaniu tej nazwy, jednak jej obecność była tak rozległa w literaturze, że powrót do nazwy nadanej przez Laveran'a nie był uważany za możliwy. W 1922 roku John William Watson Stephens opisał kolejnego, czwartego ludzkiego pasożyta malarii, *P. ovale*.

20 sierpnia 1897 roku Ronald Ross, brytyjski oficer w indyjskiej służbie medycznej, jako pierwszy wykazał, że pasożyty malarii mogą być przenoszone z zakażonych pacjentów na komary. W dalszej pracy nad ptasią malarią Ross wykazał, że komary mogą przenosić pasożyty

malarii z jednego ptaka na innego osobnika. Wymagało to cyklu sporogonicznego (to przedział czasu, w którym pasożyt rozwija się u komara). W ten sposób rozwiązano zagadkę sposobu transmisji malarii. Za swoje odkrycie, cyklu rozwojowego zarodźca malarii i sposobu szerzenia się choroby. Ross otrzymał Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny 1902 roku.

W Polsce zimnica pojawia się w pamiętnikach i listach z XIV wieku. W tzw. herbariach (zielnikach) można było znaleźć informacje jakie zioła i napary stosowano w jej leczeniu. W czasopiśmie lekarskich zanotowane są zachorowania od 1846 r. Najwięcej zachorowań zanotowano w roku 1921 roku, zarejestrowano wówczas 52 965 przypadków. Czynnikiem wywołującym chorobę był głównie *P. vivax*, zdarzały się także przypadki wywołane *P. falciparum*, głównie u osób powracających z frontu bałkańskiego. Wynikało to ze złej sytuacji epidemiologicznej po wojnie. Wówczas m.in. zdecydowano się na działania mające na celu ograniczenie tej choroby, m.in. poprzez rejestracje przypadków oraz zwalczanie larw komarów- nazywano to „kolumnami przeciwmalarycznymi”. Dzięki tym działaniom udało się uzyskać znaczny spadek zachorowań, bo w 1938 roku zarejestrowano już jedynie 316 przypadków. Niestety kolejna wojna, II wojna światowa, przyniosła pogorszenie także i w tym przypadku. Wówczas największa liczba przypadków została zarejestrowana w 1948 roku i wynosiła 9 941. W Polsce zapadanie na malarię miało charakter sezonowy - pierwszy rzut przypadał na miesiące maj-lipiec, drugi na wrzesień- październik. Miało to związek z aktywnością komarów w tym czasie. Z badań naukowców wynikało także, że większość zachorowań w Polsce należało do podgatunku *P. vivax hibernans*, który wywoływał łagodną trzeciaczkę. Miała ona bardzo długi okres inkubacji- od 8-13 miesięcy, ze względu na przenoszenie przez komary formy uspiętej - hipnozoitów. Chorowano więc w kolejnym sezonie po zarażeniu. Drugi co do częstości występowania podgatunek- *P. vivax vivax* miał krótszy okres inkubacji, ale wywoływał często nawroty. Prawdopodobnie już w końcu lat 50. XX wieku transmisja rodzimej malarii wygasła w Polsce. W połowie lat 60. XX wieku Polska

została oficjalnie uznana przez WHO za kraj wolny od malarii. Terytorium całej Europy ogłoszono zaś wolnym od malarii w roku 1975. Polska nadal jednak uważana jest wg WHO za teren podatny na pojawienie się choroby, gdyż istnieją komary, które potencjalnie, przy sprzyjających warunkach mogłyby tę chorobę ponownie przetransmitować. Na szczęście w ostatnich latach nie zanotowano przypadków zarażeń wtórnych, a aktualnie problemem jest malaria zwlekana. Największym wyzwaniem wydają się być aktualnie trudności diagnostyczne. Pomimo niewielkiej liczby rejestrowanych zgonów z tego powodu, wskaźnik śmiertelności jest znacznie wyższy niż w wielu krajach europejskich.

Piśmiennictwo:

1. <http://www.malaria.com/overview/malaria-history> [dostęp: 20.03.2023]
2. Dzbeński TH, Sytuacja epidemiologiczna malarii w Polsce – dawniej, obecnie i w przyszłości. *Wiad Parazytol.* 54(3) (2008) 205–211.
3. Tu Y., Artemisinin—a gift from traditional Chinese medicine to the world, Nobel lecture, December 7, 2015. <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/tu-lecture.pdf>
4. Wroczyńska A, Kuna A, Mayer L. *Malaria profilaktyka i leczenie*. Alfa-Medica Press, 2016
5. Chałubiński T. *Zimnica, studium ze stanowiska praktycznego*. Gebethner i Wolff, Warszawa, 1875

1.2. Malaria- etiologia, patogenez, cykl życiowy pasożyta [1-22]

Malaria jest jedną z najgroźniejszych w dzisiejszych czasach chorób zakaźnych, obok gruźlicy oraz zakażenia wirusem HIV. Jest to choroba wektorowa przenoszona przez komary z rodziny widliszka. Wywołują ją pasożyty, najczęściej *Plasmodium falciparum* oraz *Plasmodium vivax*. Choroba ta występuje endemicznie w rejonach tropikalnych, gdzie jest nadal dużym wyzwaniem. Są to najczęściej regiony biedne. Dlatego WHO stworzyło specjalny program łączący różne instytucje finansujące, badające potrzeby i najlepsze metody, gdyż pomimo że ten problem dotyczy krajów biednych, jednak jest on globalnym wyzwaniem. Jest to plan strategii walki z tą chorobą GTS (Global technical strategy for malaria) na lata 2016-2030, w którym zaplanowano wielokierunkowe działania w tym pomoc krajom ubogim, które stanowią w większości kraje endemiczne malarii.

1.2. 1. Etiologia

Malaria, inaczej zimnica, jest chorobą pasożytniczą wywołaną przez zarodźca. Opisano następujące gatunki zarodźców wywołujących tę chorobę u ludzi:

- Zarodziec sierpowaty- *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*)
- Zarodziec ruchliwy- *Plasmodium vivax* (*P. vivax*)
- Zarodziec owalny- *Plasmodium ovale* (*P. ovale*)
- Zarodziec malarii- *Plasmodium malariae* (*P. malariae*)
- Zarodziec małpi- *Plasmodium knowlesi* (*P. knowlesi*)

Ponadto według najnowszych doniesień w Malezji i Kambodży chorobę tę wywoływał także *Plasmodium cynomolgi*, natomiast w Wenezueli *Plasmodium brasilianum*. Zdarzają się także zakażenia mieszane.

1.2.2. Droga przenoszenia

Zimnica jest chorobą wektorową. Przenoszona jest przez zarażoną samicę komara widliszka (*Anopheles spp.*), tzw. żywiciela pośredniego podczas ukłucia.

Ponadto możliwe jest zarażenie poprzez transfuzję krwi lub przy przeszczepie narządów, jednak są to epizodyczne przypadki. Możliwa jest także transmisja przez łożysko.

1.2.3. Rezerwuuar

Rezerwuarem jest człowiek, a w przypadku *P. knowlesi* także makak. *P. vivax* i *P. ovale* może tworzyć formę uśpioną- hipnozoit.

1.2.4. Cykl życiowy *Plasmodium*

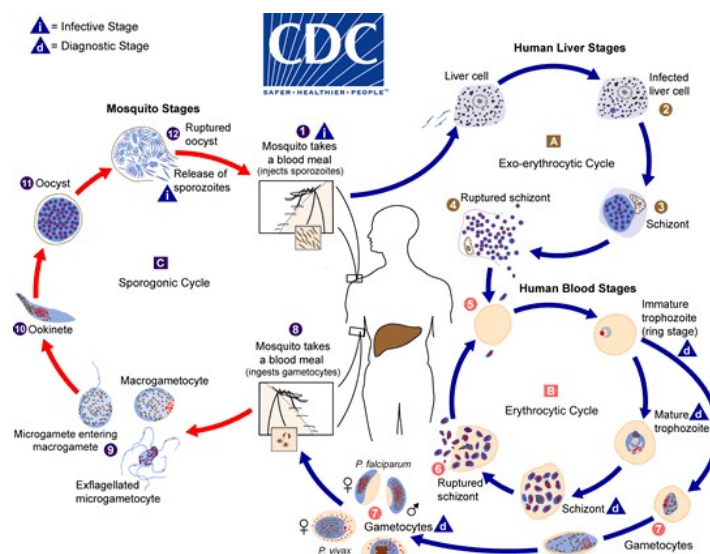
Plasmodium jako pasożyt przechodzi cykl rozwojowy.

Zarodźce malarii wymagają w swoim rozwoju obecności dwóch żywicieli – komara oraz człowieka. Cykl płciowy zarodźca malarii zachodzi w ciele samicy komara (sporogonia), natomiast rozwój bezpłciowy (schizogonia) zachodzi w ciele człowieka. Żywicielem ostatecznym jest komar.

Zarażenie człowieka następuje podczas ukłucia komara i przekazania wraz ze śliną, form inwazyjnych pasożyta – sporozoitów (zwykle około 25). Sporozoity wraz z krwią są przenoszone do wątroby. W hepatocytach odbywa się bezpłciowy cykl rozwojowy, w wyniku którego z jednego sporozoita, który dojrzewa do postaci schizonta powstają tysiące merozoitów (≥ 10000). Proces namnażania zarodźca w hepatocytach trwa do kilkunastu dni. Warto zauważyć, że w przypadku u *P. vivax* i *P. ovale* w wątrobie mogą utrzymywać się w formie uśpionej- tzw. hipnozoity (jeśli nie jest leczona) i powodować nawroty poprzez inwazję do

krwioobiegu tygodnie, a nawet lata później. Następnie komórki wątroby ulegają rozerwaniu a merozoity trafiają do krwi, gdzie wnikają do erytrocytów. Podczas schizogonii erytrocytarnej merozoity przyjmują postać trofozjotów kontynuując cykl 10-krotnego namnażania się pasożyta. Następnie erytrocyty pękają uwalniając kolejne kopie zarodźca do krwi. Podczas dalszych cykli podziałowych, część merozoitów przekształca się w gametocyty, które są przekazywane do komara podczas ukłucia. Gametocyty trafiają do przewodu pokarmowego owada, gdzie gametocyt męski dzieli się na ruchliwe mikrogamety poszukujące makrogamet żeńskich. Powstała w wyniku zapłodnienia zygota przekształca się w ookinetę, która penetruje ścianę jelita i ulega otorbieniu. Powstała oocysta ulega licznym podziałom wytwarzając inwazyjne sporozoitów, które wędrując z hemolimfą trafiają do ślinianek komara i oczekują na możliwość zakażenia człowieka.

Objawy kliniczne są najbardziej nasilone podczas uwalniania pasożytów do krwi- choć obecnie rzadziej obserwuje się typową fazowość gorączki



Rycina 1.2.1 Cykl życiowy zarodźca malarii (źródło:

<https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/> [dostęp :24.04.2023]).

1.2.5. Patogeneza i zmiany w erytrocytach w przebiegu malarii

P. falciparum w stadium merozoitu rośnie szybko, degradując białka śródkomórkowe erytrocytu, zwłaszcza hemoglobinę, której aminokwasy wykorzystuje dla własnego rozwoju. Hem jest toksyczny dla pasożyta, dlatego też unieszkodliwiają go powodując jego polimeryzację do nieaktywnej biologicznie hemozoiny (nazywanej pigmentem malarycznym). Organizm pasożyta rozwija się w otoczeniu właściwie jednego białka, którym jest hemoglobina. *Plasmodium* wykorzystuje hemoglobinę gospodarza, rozkłada ją w wyspecjalizowanej organelli proteolitycznej zwanej wakuolą trawienną. Hemoglobina jest katabolizowana także w celu dostarczenia aminokwasów do rozwoju, gdyż pasożyt ma ograniczone możliwości syntezy *de novo*. Nawet do 75% hemoglobiny w zakażonych erytrocytach ulega degradacji. Enzymem odpowiedzialnym w pasożytach w głównej mierze jest proteaza asparaginowa.

W błonie komórkowej krwinki czerwonej także dochodzi do istotnych zmian, które polegają m.in. na zmianie przepuszczalności, a także pojawianiem się na jej powierzchni ukrytych wcześniej antygenów, mogą pojawiać się także antygeny pochodzące od pasożyta. Przez te zmiany erytrocyty tracą swój charakterystyczny dwuwklęsły kształt, stając się nieregularne i zdeformowane.

Charakterystyczną zmianą w erytrocytach w inwazji *P. falciparum* jest pojawienie się swoistego białka adhezyjnego o wysokiej masie cząsteczkowej, zróżnicowanego antygenowo, tzw. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) jest ono specyficzne dla danego szczepu. PfEMP1 pośredniczy w zjawisku cytoadherencji, czyli przyleganiu czerwonych krwinek zarażonych przez pasożyta do receptorów komórek śródbłonna drobnych naczyń krwionośnych. Erytrocyty mogą ulegać wówczas sekwestracji tym samym powodując blokadę małych żył i kapilarów. Ponadto erytrocyty zarażone *P. falciparum* mogą łączyć się ze

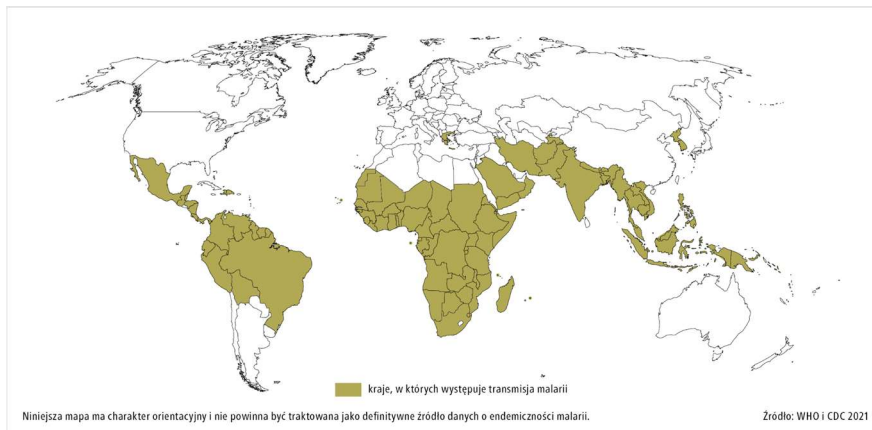
zdrowymi erytrocytami tworząc tzw. rozety lub z innymi zarażonymi krwinkami czerwonymi (aglutynacja). Powyższe mechanizmy prowadzą do zaburzenia mikrokrążenia, a w efekcie zaburzenia metabolizmu w ważnych życiowo narządach (mózgu i sercu).

1.2.6. Okres wylegania i zakaźności

Wyleganie zimnicy przeważnie trwa 12–35 dni, a w przypadku choroby wywołanej *P. falciparum* 12–14 dni. Dużo rzadziej może zdarzyć się, iż objawy pojawią się już po 7 dniach od ukłucia komara lub po wielu miesiącach, zwłaszcza w zarażeniach *P. vivax* i *P. malariae*, w przypadku *P. falciparum* zwykle do 3 miesięcy po powrocie z rejonu endemicznego.

1.2.7. Epidemiologia

Malaria jest chorobą endemiczną występującą w krajach strefy tropikalnej.



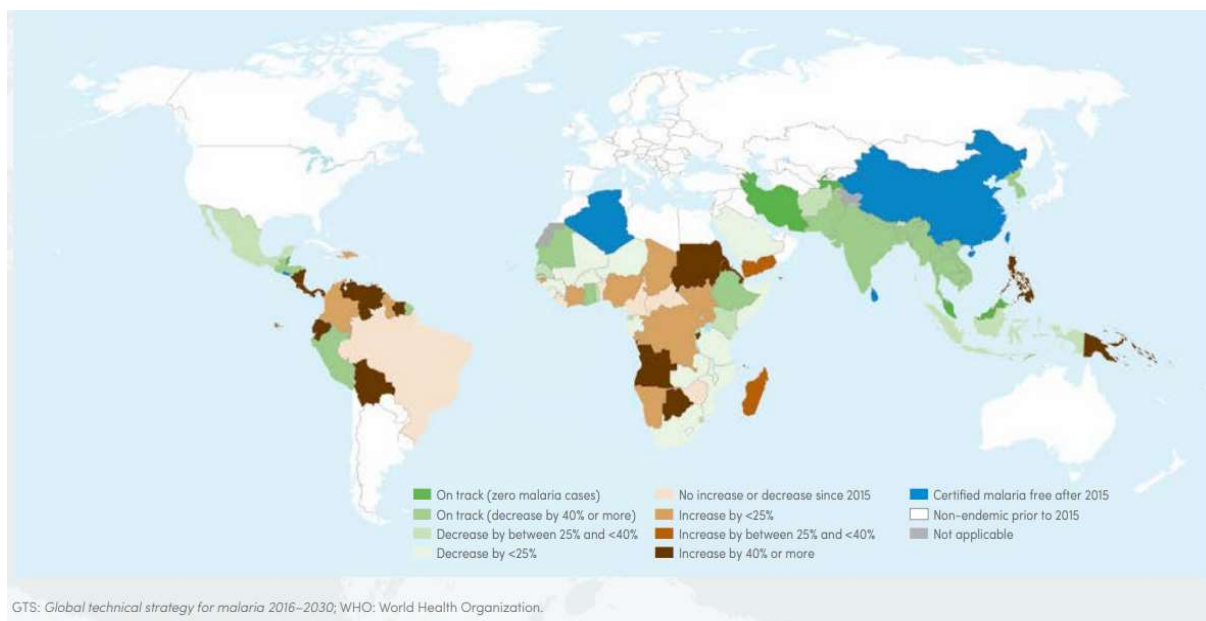
Rycina 1.2.2 Występowanie malarii (źródło: https://www.mp.pl/interna/image/B16.016_4579 [dostęp: 24.04.2023]).

Według raportu WHO „World Malaria Report 2021” ogólnie na świecie zanotowano około 241 milionów przypadków malarii w 2020 roku w 85 krajach endemicznych, czyli nastąpił wzrost z około 227 milionów w 2019 roku, wzrost wynikał głównie z przypadków z rejonu afrykańskiego. Cztery kraje afrykańskie odpowiadały za nieco ponad połowę wszystkich zgonów z powodu malarii na świecie: Nigeria (31,3%), Demokratyczna Republika Konga (12,6%), Zjednoczona Republika Tanzanii (4,1%) i Niger (3,9%). Od 2015 roku kraje europejskie są wolne od malarii.

Jeśli chodzi o rozkład przypadków zachorowań wywołanych przez poszczególne gatunki zarodźca zgodnie z raportem WHO z 2019 roku wygląda następująco: *P. falciparum* jest najbardziej rozpowszechniony zarodźcem w regionie afrykańskim – zanotowano w tym obszarze w 2018 roku aż 99.7% przypadków malarii, w południowo- wschodniej Azji 50% przypadków, w rejonie morza śródziemnego 71%, a w rejonie zachodniego Pacyfiku 65%.

Natomiast jeśli chodzi o *P. vivax*- 53% przypadków zarejestrowano w Regionie Azji południowo-wschodniej, z czego większość, bo aż 47% w Indiach.

Jest też dominującym pasożytem w rejonie obu Ameryk, wywołując tam 75% przypadków malarii.



Rycina 1.2.3. Mapa krajów endemicznych malarii pokazująca postęp w kierunku postulowanych kamieni milowych GTS 2020 dotyczący zmniejszenia zachorowań na malarię o co najmniej 40% w stosunku do wartości wyjściowej z 2015 r. (źródło: szacunki WHO).

W Polsce do lat 60. XX wieku malaria była chorobą endemiczną. Aktualnie Polska jest krajem wolnym od malarii, natomiast jest chorobą zawlekaną z podróży. Chorują podróżnicy, turyści, misjonarze, żołnierze z misji pokojowych, pracownicy sezonowi, studenci z wymian zagranicznych, mieszkańcy stref tropikalnych podróżujący do Polski itp.

Systematyczna rejestracja przypadków malarii jest prowadzona od roku 1919. Wg raportów PZH w roku 2019 były 24 zachorowania na zimnicę, natomiast w 2020 już tylko 7 (co wynikało z ograniczeń pandemicznych), natomiast w kolejnym 2021 roku - 15.

| rok | Liczba przypadków malarii w Polsce | Liczba przy przypadków malarii w Małopolsce |
|------|---------------------------------------|--|
| 2012 | 21 | 2 |
| 2013 | 36 | 9 |
| 2014 | 19 | 4 |
| 2015 | 29 | 3 |
| 2016 | 38 | 9 |
| 2017 | 27 | 5 |
| 2018 | 28 | 0 |
| 2019 | 24 | 4 |
| 2020 | 7 | 1 |
| 2021 | 15 | 4 |

Tabela 1.2.1. Zachorowania na malarię w Polsce w ostatnich 10 latach według raportów PZH.

1.2.8. Obraz kliniczny

Podstawowym objawem malarii jest gorączka, która może być bardzo wysoka (nawet $>40^{\circ}\text{C}$), mogą towarzyszyć jej silne dreszcze. Nie jest to swoisty objaw, dlatego tak ważny jest wywiad, a w przypadku podróży pacjenta w rejony endemiczne również diagnostyka w tym kierunku. Historycznie obserwowano cykliczność występowania gorączki co 48 godzin (*P. ovale* i *P. vivax*) oraz co 72 godziny (*P. malariae*), stąd nazwy trzeciaczka i czwartaczka. Obecnie jest to już rzadziej obserwowany objaw. U osób dorosłych, które przez wiele lat mieszkają,

przebywają w regionach o nasilonej transmisji zarodźców przebieg malarii może być nawet bezobjawowy.

Ponadto do innych częstych objawów towarzyszących gorączce należą:

osłabienie,

bóle mięśniowe,

ból głowy,

żółtaczka,

biegunka,

nudności i wymioty

P. falciparum wywołuje tzw. malarię tropikalną. Charakterystyczne jest to, że ten pasożyt może wywołać najcięższą postać malarii, w tym też postać mózgową.

Kryteria laboratoryjne i kliniczne malarii wywołanej przez *P. falciparum* o ciężkim przebiegu wg WHO (2021) to:

- zaburzenia świadomości <11 pkt w skali GCS (Glasgow Coma Scale)
- osłabienie (chory nie jest w stanie siedzieć, stać lub chodzić bez pomocy)
- >dwa napady drgawkowe w ciągu 24 h
- anemia- hematokryt <20% lub stężenie hemoglobiny we krwi <7 g/dl przy jednoczesnej parazytemii >10 000/ μ l
- uszkodzenie wątroby- stężenie bilirubiny w surowicy >3,0 mg/dl przy jednoczesnej parazytemii >100 000/ μ l
- ostra niewydolność nerek- stężenie kreatyniny w surowicy >3 mg/dl (265 μ mol/l) lub stężenie mocznika >20 mmol/l

- obrzęk płuc lub ostra niewydolność oddechowa- obrzęk płuc potwierdzony badaniem radiologicznym lub wysycenie tlenem hemoglobiny krwi tętniczej <92% z częstotliwością oddechów >30/min, również paradoksalnymi ruchami klatki piersiowej oraz trzeszczeniami w badaniu osłuchowym
- hipoglikemia- stężenie glukozy w surowicy <40 mg/dl (2,2 mmol/l)
- wstrząs
 - wyrównany: nawrót kapilarny >3 s lub dystalne ochłodzenie kończyny dolnej
 - niewyrównany: skurczowe ciśnienie tętnicze <80 mm Hg z objawami wstrząsu
- krwawienie z dziąseł, nosa, przewodu pokarmowego
- parazytemia >10%
- kwasica- niedobór zasad >8 mEq/l, stężenie w surowicy HCO₃⁻ <15 mmol/l lub kwasu mlekowego >5 mmol/l

Piśmiennictwo:

1. Kuna A. Malaria. [w]: Boroń- Kaczmarska A, Wiercińska-Drapało A. Choroby zakaźne i pasożytnicze. PZWL, Warszawa 2022.
2. <https://www.mp.pl/interna/chapter/B16.II.18.153.1.6>. [dostęp: 20.12.2022].
3. White NJ, Breman JG. Harrison Choroby zakaźne. red. Kasper DL, Fauci AS, Filisiak R. Czelej, Lublin, 2012.
4. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2012, Raport PZH, Warszawa 2013.
5. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2013, Raport PZH, Warszawa 2014.
6. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2014, Raport PZH, Warszawa 2015.
7. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2015, Raport PZH, Warszawa 2016.
8. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2016, Raport PZH, Warszawa 2017.

9. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2017, Raport PZH, Warszawa 2018.
10. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2018, Raport PZH, Warszawa 2019.
11. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2019, Raport PZH, Warszawa 2020.
12. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2020, Raport PZH, Warszawa 2021.
13. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2021, Raport PZH, Warszawa 2022.
14. Management of severe Malaria, Practical Handbook, Third Edition, WHO, 2012.
15. World malaria report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021.
16. World malaria report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019.
17. Goldberg DE, Slater AFG, Beavis R, Chait B, Cerami Ay, Henderson GB. Hemoglobin Degradation in the Human Malaria Pathogen *Plasmodium falciparum*: A Catabolic Pathway Initiated by a Specific Aspartic Protease. *J Exp Med.* 173 (1991) 961-969.
18. Goldberg DE, Slater AFG. The Pathway of Hemoglobin Degradation in Malaria Parasites. *Parasitol Today.* 8 (1992) 280-282.
19. Sherman IW. The life of *Plasmodium*: an overview w: Molecular Approaches to malaria, red. Sherman IW. ASM Press, Washington DC, 2005.
20. Malaria w Polsce i na świecie – wczoraj i dziś, red. J. P. Knap i P. Myjak, Wyd. II, α -medica press, Bielsko-Biała, 2009.
21. Grüring C, Heiber A, Kruse F, Ungefehr J, Gilberger T-F, Spielmann T, Development and host cell modifications of *Plasmodium falciparum* blood stages in four dimensions. *Nat Commun.* 2 (2011) 165.
22. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell.* 124 (2006) 755–766.

1.3. Diagnostyka malarii [1-11]

U każdej gorączkującej osoby przybywającej z rejonu endemicznego powinna być wykonana diagnostyka w kierunku malarii.

Zgodnie z wytycznymi WHO we wszystkich przypadkach podejrzenia malarii należy wykonać badanie parazytologiczne (mikroskopia rozmazu krwi i tzw. szybki test RDT) w celu potwierdzenia rozpoznania. Diagnostyka powinna być zgodna z programem zapewniania jakości.

1.3.1. Identyfikacja czynnika etiologicznego

Złotym standardem diagnostyki malarii jest badanie parazytologiczne rozmazu krwi. Krew włośniczkową (pobraną z opuszki palca tak jak przy mierzeniu glikemii), umieszcza się na szkiełku wykonując tzw. cienką i grubą kroplę. Tak otrzymany preparat jest barwiony metodą Giemsy i oceniany pod mikroskopem przez wyspecjalizowanych parazytologów. Badanie grubej kropli zwiększa czułość badania- pozwala na wykrycie już 10-20 pasożytów w jednym mikrolitrze krwi, jednak dochodzi w nim do lizy komórek czerwonych i przez to do utraty części informacji potrzebnych do diagnostyki. Dlatego konieczne jest też wykonanie i ocena cienkiego rozmazu co pozwala dodatkowo na rozpoznanie gatunku pasożyta i intensywności inwazji (parazytemii). Próg rozpoznawalności dla cienkiego rozmazu wynosi 500-1000 pasożytów w jednym mikrolitrze krwi. Ocena rozmazów krwi wymaga znacznej wprawy diagnostyka.

W przypadku *P. falciparum*, czynnik etiologiczny najcięższych postaci malarii prowadzi do najbardziej nasilonej parazytemii, ze względu na zdolność zarażania krwinek na każdym etapie swojego dojrzewania. W przypadku tego gatunku zarodźca w krwi obwodowej stwierdza się

postacie pierścieniowate i półksiężycowate gametocyty w krwinkach czerwonych. W stosunku do innych gatunków zarodźców ich liczba przypadająca na jeden erytrocyt może być większa. Postacie pierścieniowate lokalizują się zwykle na obwodzie komórki, natomiast nie są widoczne w krwi obwodowej dojrzałe trofozoity i schizonty ze względu na ich cytoadherencję do śródbłonna naczyń krwionośnych.

Cechami zarażenia *P. vivax* w krwi obwodowej są charakterystycznie powiększone krwinki czerwone zawierające liczne ziarnistości (tzw. plamki Schüffnera). Są to kompleksy kaweolopęcherzykowe, układające się wzdłuż błony komórkowej erytrocytu. Trofozoity *P. vivax* mają kształt pełzakowaty, natomiast cechą charakterystyczną ich schizontów jest występowanie w ich wnętrzu licznych mereozoitów. Gametocyty mają kształt zaokrąglony.

Kolejnym sposobem identyfikacji zarodźców, jest wykrywanie antygenów przy pomocy testów immunochromatograficznych przez tzw. szybkie testy „Malaria rapid diagnostic tests” (RDTs). RDT wykrywają specyficzne antygeny (białka) wytwarzane przez pasożyty malarii we krwi zakażonych osób. Niektóre RDT mogą wykryć tylko jeden gatunek zarodźca (*P. falciparum* lub *P. vivax*), podczas gdy inne wykrywają wiele gatunków (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* i *P. ovale*). Ich zaletą jest fakt, iż wykonanie testu przez pacjenta jest stosunkowo proste, dzięki temu mogą być szeroko wykorzystywane w krajach endemicznych, gdzie dostęp do wysoko wykwalifikowanego personelu jest ograniczony. Ponadto ich czas wykonania jest bardzo krótki. Natomiast ich wadą jest to, że nie pozwalają na ocenę intensywności inwazji, mogą być fałszywie ujemne przy niskiej parazytemii oraz fałszywie dodatnie przy obecności czynnika reumatoidalnego

W badaniach diagnostycznych wykorzystywana jest także metoda PCR (ang. Polymerase Chain Reaction), wykorzystująca reakcję łańcuchowej polimerazy. Jej zaletą jest czułość i swoistość,

jednak ograniczeniem jest cena. W Polsce badanie jest wykonywane głównie w Zakładzie Parazytologii Tropikalnej IMMiT GUMed w Gdyni. Metoda PCR może być przydatna zwłaszcza przy niskiej parazytemii oraz w zarażeniach mieszanych.

Testy serologiczne są wykorzystywane do celów epidemiologicznych.

1.3.2. Badania dodatkowe

Typowe dla malarii odchylenia w standardowych badaniach laboratoryjnych to:

- niedokrwistość
- małopłytkowość
- zwiększona aktywność ALT (aminotransferazy alaninowej)
- zwiększona aktywność AST (aminotransferazy asparaginianowej)
- hiperbilirubinemia

Piśmiennictwo:

1. Kuna A. Malaria. [w]: Boroń- Kaczmarek A, Wiercińska-Drapała A. Choroby zakaźne i pasożytnicze. PZWL, Warszawa 2022.
2. <https://www.mp.pl/interna/chapter/B16.II.18.153.1.6>. [dostęp: 7.01.2023].
3. Management of severe Malaria, Practical Handbook, Third Edition, WHO, 2012.
4. Kurzer J. Zmiany we krwi obwodowej w przebiegu chorób zakaźnych [w]: Atlas krwi obwodowej podstawowe narzędzie diagnostyczne. red. Pereira I, George Tracy I, Arber DA red. wyd I polskiego Urbanowicz I, Wołowicz D, Korycka-Wołowicz A, MedPharm Polska, Wrocław, 2019.

5. Alencar de FEC, dos Santos Malafrente R, Cerutti Junior C, Fernandes LN, Buery JC, Fux B, Rezende HR, Ribeiro de Castro Duarte AM, Medeiros-Sousa AM, Miranda AE. Assessment of asymptomatic *Plasmodium spp.* infection by detection of parasite DNA in residents of an extra-Amazonian region of Brazil. *Malar J.* 17 (2018) 113.
6. Calderaro A, Montecchini S, Buttrini, M, Piccolo G, Rossi S, Arcangeletti MC, Farina B, De Conto F, Chezzi C. Malaria Diagnosis in Non-Endemic Settings: The European Experience in the Last 22 Years. *Microorganisms.* 9 (2021) 2265.
7. Malaria Clinical Management Guidelines (June 2022) (Version 1.0), MOH, NUG of Myanmar.
8. Myjak P, Nahorski W, Pieniążek NJ, Piętkiewicz H. Usefulness of PCR for Diagnosis of Imported Malaria in Poland, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 21 (2002) 215–218.
9. WHO Guidelines for malaria, 25 November 2022. Geneva: World Health Organization; 2022 (WHO/UCN/GMP/ 2022.01 Rev.3).
10. Universal access to malaria diagnostic testing: an operational manual. 1.Malaria – diagnosis. 2.Antimalarials – therapeutic use. 3.Malaria – drug therapy. 4.Diagnostic tests, Routine – utilization. 5.Manuals. I.World Health Organization. ISBN 978 92 4 150209 2 (NLM classification: WC 750).
11. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/case-management/diagnosis> [dostęp: 7.01.2023].

1.4. Malaria leczenie i profilaktyka [1-15]

1.4.1. Profilaktyka malarii

Podstawą profilaktyki jest stosowanie środków ochrony osobistej, w celu uniknięcia ukłucia przez komary.

Należą do nich:

- moskitiery (szczególnie ze względu na aktywność komarów nocą)
- repelenty, szczególnie zawierające DEET w stężeniu 30-50%
- insektycydy.

Od wielu lat trwały badania nad szczepionką przeciw malarii. Aktualnie od 06.10.2021 WHO zaleca szczepionkę RTS,S/AS01 u dzieci od 5. mż. mieszkających w Afryce Subsaharyjskiej (a także innych regionach o dużym ryzyku wystąpienia) w celu zapobiegania malarii wywołanej przez *P. falciparum*.

W przypadku osób podróżujących w rejony endemiczne zaleca się po analizie miejsca podróży także chemioprophylaktykę. Preparaty stosowane w chemioprophylaktyce to:

- preparat złożony- atowakwon + proguanil
- doksycyklina
- meflochina (w Polsce brak rejestracji)
- chlorochina (jednak w wielu miejscach występuje oporność)
- tafenochina (zarejestrowana do profilaktyki w USA, nie zalecana przez WHO).

1.4.2. Leczenie malarii

Aktualnie w Polsce ze względu na potencjalnie ciężki przebieg oraz trudności z dostępnością leków przeciwmalarycznych wskazana jest hospitalizacja. Rozpoznanie ciężkiej malarii może być nawet wskazaniem do hospitalizacji w Oddziale Intensywnej Terapii.

1.4.2.1 Leczenie przyczynowe

W leczeniu przyczynowym malarii niepowikłanej aktualnie WHO zaleca 3-dniową terapię skojarzoną tzn. ACT (*artemisin-based combination therapy*), czyli terapię opartą na pochodnych artemizyny.

Należą do nich:

- artemeter z lumefantryną (najczęściej stosowany na świecie)
- artesunian z amodiachiną
- artesunian z meflochiną
- artesunian z sulfadoksyną-pirymetaminą
- dihydroartemizyna z piperachiną (wyłączając malarię nabytą w regionach: południowo-zachodniego Wietnamu, zachodniej Kambodży oraz północnowschodniej Tajlandii)

W rejonach, w których występuje oporność na artemizynę, należy stosować terapię przez 6 dni.

W przypadku braku dostępności ACT w krajach nieendemicznych, jak Polska WHO dopuszcza stosowanie w nieciężkiej postaci preparatu łączonego- atowakwon + proguanil.

Jeśli jednak stosowany był w chemioprophylaktyce, należy w leczeniu zastosować inny lek.

W leczeniu malarii ciężkiej stosowany jest artesunat dożylnie. Niestety działaniem niepożądanym tego leku może być późniejsza anemia. Po osiągnięciu optymalnego stanu pacjenta leczenie można kontynuować doustnie. Konieczny jest wówczas pełny kurs ACT.

W przypadku zarażenia *P. vivax* lub *P. ovale* po wyleczeniu konieczna jest następową terapią prymachiną przez 2 tygodnie, ze względu na wytwarzaną przez nie formę przetrwalnikową-hipnozoity w wątrobie powodujące nawroty (terapia ta nie dotyczy stałych mieszkańców rejonów endemicznych). Stosowana także w tym przypadku może być tafenochina.

W przypadku braku dostępności artesunatu stosowane są w ciężkiej postaci artemeter lub chinina.

Chlorochina- stosowana jest w przypadku malarii wywołanej innym gatunkiem niż *P. falciparum*, o ile nie występuje na nią oporność w rejonie, z którego przywleczona jest choroba.

1.4.2.2. Leczenie objawowe

W celu obniżania temperatury stosuje się zwykle paracetamol lub metamizol. Niesterydowe leki przeciwzapalne i kwas acetylosalicylowy są raczej nie wskazane ze względu na ryzyko zaburzeń krzepnięcia.

Konieczne jest leczenie korygujące zaburzenia wodno-elektrolitowe. Jednak, jeśli chodzi o płynoterapię należy ostrożnie nawadniać pacjenta stosowana jest zasada „let them dry”.

Ciężka malaria może torować drogę ciężkim współzakażeniom bakteryjnym. W tych przypadkach konieczna jest także włączenie antybiotykoterapii, najczęściej cefalosporyn III generacji.

W ciężkim przebiegu konieczne może być przetaczanie preparatów krwi.

Ponadto wszelkie działania wspomagające w zależności od uszkodzonego narządu, w tym nawet niekiedy hemodializy lub wspomaganie oddychania.

Piśmiennictwo:

1. Kuna A. Malaria. [w]: Boroń- Kaczmarska A, Wiercińska-Drapało A. Choroby zakaźne i pasożytnicze. PZWL, Warszawa 2022.
2. <https://www.mp.pl/interna/chapter/B16.II.18.153.1.6> [dostęp: 20.02.2023].
3. WHO Guidelines for malaria, 25 November 2022. Geneva: World Health Organization; 2022 (WHO/UCN/GMP/2022.01 Rev.3). License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
4. Management of severe Malaria, Practical Handbook, Third Edition, WHO, 2012.
5. [Profilaktyka malarii - Główny Inspektorat Sanitarny - Portal Gov.pl \(www.gov.pl\)](http://www.gov.pl) [dostęp 20.02.2023].
6. [CDC - Malaria - Diagnosis & Treatment \(United States\) - Treatment \(U.S.\) - Guidelines for Clinicians](https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis-treatment/guidelines-for-clinicians/) [dostęp 20.02.2023].
7. Malaria in the United States: Treatment Tables CDC.
8. <https://www.mayoclinic.org/drugs-supplements/chloroquine-oral-route/proper-use/drg-20062834> [dostęp 20.02.2023].

9. Chionidid PL, Patel D, Goodyer L and Ranson H.. Guidelines for malaria prevention in travellers from the United Kingdom, 2021. London: Public Health England; March 2021.
10. Malaria Clinical Management Guidelines (June 2022) (Version 1.0), MOH, NUG of Myanmar.
11. NVBDCP Guidelines for treatment of malaria I North Eastern States, India.
12. https://www.uptodate.com/contents/treatment-of-uncomplicated-falciparum-malaria-in-nonpregnant-adults-and-children?search=malaria%20treatment&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1 [dostęp 20.02.2023].
13. https://www.uptodate.com/contents/treatment-of-severe-malaria?search=malaria%20treatment&source=search_result&selectedTitle=2~150&usage_type=default&display_rank=2 [dostęp 20.02.2023].
14. https://www.uptodate.com/contents/non-falciparum-malaria-p-vivax-p-ovale-and-p-malariae?search=malaria%20treatment&source=search_result&selectedTitle=3~150&usage_type=default&display_rank=3 [dostęp 20.02.2023].
15. https://www.uptodate.com/contents/prevention-of-malaria-infection-in-travelers?search=malaria%20treatment&source=search_result&selectedTitle=8~150&usage_type=default&display_rank=8 [dostęp 20.02.2023].

1.5. Erytrocyty- budowa i funkcja [1-9]

Krwinki czerwone stanowią jeden z głównych elementów morfotycznych krwi. Podstawową funkcją erytrocytów jest przenoszenie tlenu w naczyniach krwionośnych do tkanek. Ponadto biorą one udział także w transporcie dwutlenku węgla oraz protonów wytwarzanych w metabolizmie tkankowym. Pozostają w krwioobiegu przez około 100-120 dni.

Przybliżenie ich budowy i funkcji ma istotne znaczenie w zrozumieniu patogenezы malarii.

1.5.1. Budowa erytrocytów- ogólna charakterystyka

| | |
|-------------------------------|-----------------------|
| kształt | dwuwklęsła soczewka |
| średnia objętość | 85-94 μm^3 |
| średnia powierzchnia | 135 μm^2 |
| przeciętna średnica | 7,82 μm |
| grubość w najcieńszym miejscu | 0,81 μm |
| grubość w najgrubszym miejscu | 2,58 μm |

Tabela 1.5.1 Podstawowe parametry prawidłowej krwinki czerwonej.

Dzięki powyższej charakterystyce mają one możliwość przeciskania się przez naczynia krwionośne, nawet te najmniejsze - włosniczkowe, których średnica może wynosić tylko 4 μm .

Ponadto charakterystyczny kształt sprzyja zjawisku dyfuzji.

Dojrzałe erytrocyty tracą w toku erytropoezy jądro komórkowe, nie mają organelli. Retikulocyty, niedojrzałe komórki, których jest poniżej 1% w krwi obwodowej, zawierają resztki RNA i śladów organelli. Najważniejszym białkiem wewnątrzkomórkowym jest hemoglobina, która stanowi 95% białek wewnątrzkomórkowych erytrocytu.

1.5.2. Błona biologiczna erytrocytów

Jak każda błona biologiczna błona krwinek czerwonych składa się z dwuwarstwy lipidowej oraz „zanurzonych” w niej białek, w stosunku około 50/50%. Błona biologiczna erytrocytów została bardzo dobrze poznana i opisana.

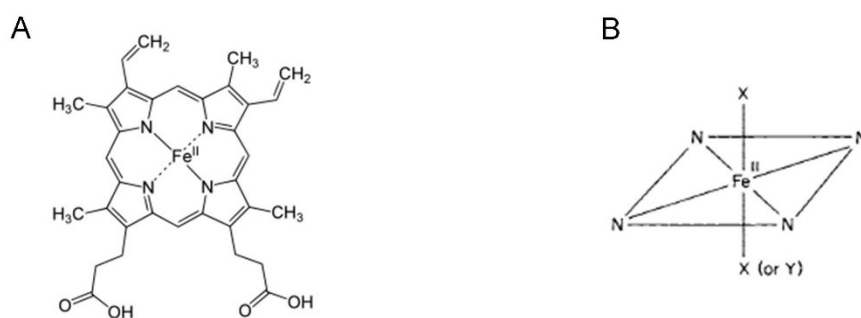
Główne grupy lipidów wchodzących w skład błony to fosfolipidy oraz cholesterol.

Głównymi zaś fosfolipidami są fosfatydylocholina (PC), fosfatydyloetanolamina (PE), fosfatydyloseryna (PS) oraz sfingomielina (Sph).

Rozłożenie lipidów jest niesymetryczne, w warstwie zewnętrznej prędkość ruchów międzybłonowych jest większa niż wewnętrznej ze względu na mniejszą ilość białek zrębu. Fosfolipidy zawierające cholinę- PC oraz Sph są głównymi lipidami zewnętrznej warstwy błony, natomiast zawierające aminokwasy (PE i PS) przeważają w wewnętrznej warstwie błony. Dojrzałe erytrocyty nie syntetyzują lipidów błonowych. Pobierają je z osocza przy pomocy enzymu acylotransferazy lecytynowo-cholesterolowej. W razie dużej zawartości cholesterolu (który powoduje sztywność błony) erytrocyty zmieniają kształt na koleczaste i są wówczas wychwytywane przez śledzionę.

1.5.3. Hemoglobina- budowa chemiczna

Hemoglobina jest białkiem o tetramerycznej budowie. Zawiera dwie podjednostki α i dwie β . Każda podjednostka zawiera w centrum grupę hemu, w której znajduje się atom żelaza, z którym tlen lub inny ligand wiąże się odwracalnie. Grupa hemu jest zbudowana z protoporfiryny oraz osadzonego w niej centralnie jonu żelaza. Heterocykliczny makropierścień formuje układ czterech symetrycznie rozmieszczonych pierścieni pirolowych połączonych ze sobą mostkami metinowymi oraz przyłączone cztery grupy metylowe, dwie grupy winylowe i dwa łańcuchy propionianu (Ryc. 1.5.1A). Jon żelaza znajduje się w środku tego heterocyklu, jest skoordynowany z czterema atomami azotu, może także wiązać jeden lub dwa ligandy aksjalne (Ryc. 1.5.1B). Piąta pozycja koordynacyjna jonu żelaza do reszty histydyny, zwanej histydyną proksymalną, jest połączona wiązaniem kowalencyjnym z częścią białkową danej podjednostki. Wiązanie ditlenu następuje w szóstej pozycji koordynacyjnej atomu żelaza.



Rycina 1.5.1. Cząsteczka hemu: (A) struktura [8] (B) ligandy otaczające atom żelaza, X – apoproteina, Y – np. O₂, CO [9].

Hemoglobina należy do białek allosterycznych, których istotną właściwością jest kooperatywność. Ta cecha hemoglobiny, że przyłączenie tlenu do jednej podjednostki powoduje wzrost powinowactwa do tlenu pozostałych podjednostek sprawiła zainteresowanie hemoglobina i to, że jest jedną z najintensywniej badanych białek. Trójwymiarowe struktury hemoglobiny deoxy- i z ligandami zostały określone w dyfrakcyjnej analizie rentgenowskiej.

W obu formach struktury trzeciorzędowe podjednostek są podobne, składają się z siedmiu helikalnych regionów w podjednostkach α i ośmiu w β podjednostek z nie-helikalnymi regionami między helisami na końcach aminowych i karboksylowych.

Jednak czwartorzędowa struktura deoxy-hemoglobiny różni się od struktury hemoglobiny z przyłączonymi ligandami i wykazano, że efekt kooperacji jest związany ze zmianą struktury czwartorzędowej zachodzącej podczas przyłączania ligandów. Równowaga między dwiema strukturami czwartorzędowymi zależy od odległości atomu żelaza i proksymalnej histydyny od płaszczyzny hemu w każdej z czterech podjednostek. Ta odległość wyraźnie zmniejsza się porównując strukturę deoxy- z w pełni ligandowaną hemoglobinę. Zaproponowano sekwencyjne zmniejszanie się w każdej podjednostce w miarę wiązania ligandu.

Piśmiennictwo:

1. Sułek K. Struktura hemoglobiny. Charakterystyka krwi i elementów morfotycznych. [w]: Wielka Interna, tom 10 Hematologia. red. Dmoszyńska A. Medical Tribune Polska, Warszawa, 2011.
2. Baldwin J, Chothia C, Haemoglobin: The Structural Changes Related to Ligand Binding and its Allosteric Mechanism. J Mol Biol. 129 (1979) 175-220.

3. Perutz MF. Stereochemistry of Cooperative Effects in Haemoglobin: Haem–Haem Interaction and the Problem of Allostery. *Nature*. 228 (1970) 726-39.
4. Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, *Biochemia Harpera Ilustrowana*, PZWL, Warszawa, 2022.
5. Nicolson GL. Update of the 1972 Singer-Nicolson Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure. *Discoveries*. Oct-Dec 1 (2013): e3,
6. Stasiuk M, Kijanka G, Kozubek A. Zmiany kształtu erytrocytów i czynniki je wywołujące. *Postępy Biochem*. 55 (2009) 425-433.
7. Stevens A, Lowe JS. *Human Histology*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL & Wydawnictwo Medyczne Słotwiński Verlag, red. M. Zabel, Warszawa, wyd. 2, 2000.
8. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/be/Heme_b.svg/212px-Heme_b.svg.png [dostęp: 24.04.2023].
9. Carey PR. *Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies*. Academic Press. New York, 1982.

1.6. Historia spektroskopii Ramanowskiej [1-2]

Zagadnienia rozpraszania światła w fizyce zostało zapoczątkowane w fizyce przez prace Tyndalla i Rayleigha, dotyczyły one rozpraszania światła w zawiesinach i w gazach. W latach dwudziestych XX wieku pojawiły się prace teoretyczne Brillouina i Mandelsztama przewidujące widmo częstości rozproszonego promieniowania. Potwierdzenie eksperymentalne nastąpiło przez Ramana i Krishnana a następnie przez Landsberga i Mandelsztama [1].

Krótki zarys historii odkrycia zjawiska rozpraszania światła przez Chandrasekhara Venkata Ramana opisany poniżej powstał na podstawie wystawy obejrzanej przeze mnie na międzynarodowej konferencji poświęconej spektroskopii ramanowskiej, 23 International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS) w Bangalore w Indiach w sierpniu 2012 roku. Wystawa ta została przygotowana przez Komitet Organizacyjny ICORS 11 w 1988 roku w celu upamiętnienia 60. Rocznicy odkrycia efektu Ramana w 1928 roku oraz 100. rocznicy urodzin jego odkrywcy w 1988 roku.

Potencjał efektu Ramana został odkryty bardzo szybko. Na końcu 1928 roku było opublikowanych już 70 publikacji dotyczących efektu Ramana, a już we wrześniu 1929 roku odbyło się pierwsze międzynarodowe spotkanie, podczas którego poruszano także zagadnienia związane z efektem Ramana i pod koniec 1929 roku liczba publikacji z nim związanych wynosiła już ponad 200.

Efekt Ramana wydawał się dawać obiecujące wyniki i rzeczywiście spełnił te oczekiwania. W pierwszej dekadzie od odkrycia zostało opublikowanych około 2000 prac dotyczących użycia tej metody i około 2500 substancji zostało przebadanych za jej pomocą. Pojawienie się we wczesnych latach '60 XX wieku lasera jako źródła światła monochromatycznego nie tylko

zrewolucjonizowało prace spektroskopii ramanowskiej, ale także dało możliwość badań w kierunku efektów nieliniowych.

Na końcu 1978 roku, w 50. rocznicę odkrycia Ramana, było opublikowanych około 24 000 prac oryginalnych dotyczących różnych rodzajów efektów Ramana. W roku 1987 Chemical Abstracts podaje około 2700 publikacji dotyczących spektroskopii ramanowskiej.



Ryc. 1.6.1 Kopia portretu C. V. Ramana, dzieło Homi Bhabba, znanego hinduskiego fizyka teoretycznego, znanego także ze swojego talentu plastycznego. Podobno Bhabba wręczając Ramanowi ten obraz powiedział „Naukowiec namalowany przez naukowca”, na co Raman odpowiedział „Nie, artysta namalowany przez artystę” (fot. z archiwum własnego Malwiny Birczyńskiej-Zych).

Sam autor metody - Chandrasekhara Venkata Raman urodził się w Trinchopoly w południowych Indiach w 1888 roku. Już jako student podejmował oryginalne obserwacje dotyczące akustyki i optyki. Pierwszą pracę opublikował już wieku 18 lat. Kariera rozwijała się w dalszych latach. W latach 20. XX dużo podróżował na kongresy i sympozja naukowe oraz w

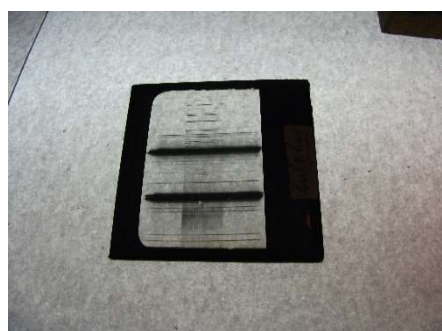
celu wygłaszania wykładów do wielu krajów świata. Zgodnie z opisem z jego wspomnień właśnie obserwacje rozpraszającego się światła słonecznego w falach Morza Śródziemnego podczas wyjazdu do Europy w 1921 roku zainspirowały go do odkrycia efektu nazwanego później jego imieniem. Następnie swoje rozmyślenia i doświadczenia kontynuował w Kalkucie, gdzie wówczas był profesorem. Zjawisko odkrył w 1928 roku. W 1930 roku został nagrodzony Nagrodą Nobla w dziedzinie fizyki. W 1933 roku ufundował Instytut Hinduskiej Akademii Nauk w Bangalore. Kontynuował prace do swojej śmierci w 1970 roku, jego prochy zostały skremowane i rozsypane w pięknych ogrodach Instytutu.



Ryc. 1.6.2. Pierwszy spektrometr używany przez C.V. Ramana (fot. z archiwum własnego Malwiny Birczyńskiej-Zych).



Ryc. 1.6.3. Spektrometr i biurko, przy którym pracował C.V. Raman (fot. z archiwum własnego Malwiny Birczyńskiej-Zych).



Ryc. 1.6.4. Widma otrzymywane przez C.V. Ramana (fot. z archiwum własnego Malwiny Birczyńskiej-Zych).

Po odkryciu efektu ramanowskiego szybko zaczęto stosować tę metodę w badaniach w wielu krajach. Także polscy naukowcy szybko podjęli badania. Pierwsza publikacja autorstwa Wandy Czapskiej dotycząca para-, orto- i meta- ksylenów ukazała się w Comptes Rendus 1 czerwca 1929 roku. Rok później ukazał się artykuł autorstwa S. Ziemeckiego i K. Jodko-Narkiewicza w czasopiśmie Die Naturwissenschaften.

Piśmiennictwo

1. Oleś A. Metody doświadczalne fizyki ciała stałego. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1998.
2. Wystawa, ICORS 11, Indian Academy of Sciences, Bangalore, India, 2012.

1.7. Spektroskopia ramanowska [1-10]

Gdy cząsteczka znajdzie się w polu elektromagnetycznym (którym może być np. światło) przekaz energii zachodzi zgodnie z wzorem Plancka

$$E = h\nu$$

gdzie h – stała Planck'a ($h = 6.63 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s} = 4.14 \cdot 10^{-15} \text{ eV}\cdot\text{s}$)

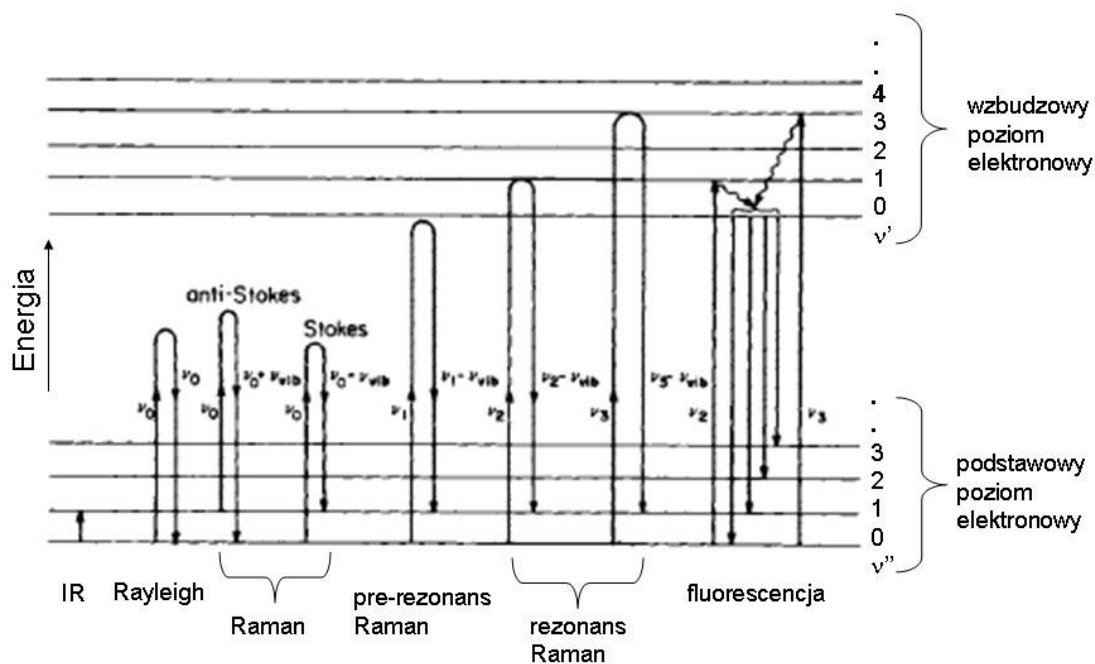
ν - częstotliwość

Widma spektroskopowe to zarejestrowana zależność intensywności promieniowania w funkcji częstotliwości, zwyczajowo są podawane w funkcji liczby falowej.

$$\text{liczba falowa} = \tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} \text{ cm}^{-1}$$

gdzie λ – długość fali.

Niektóre z możliwych sposobów interakcji promieniowania (fotonu) z cząsteczką, które są obserwowane w widmach w zakresie podczerwieni (IR) lub ramanowskich (Raman),



Rycina 1.7.1. Długości strzałek skierowanych w górę są proporcjonalne do częstotliwości padającego światła, podczas gdy długości strzałek skierowanych w dół są proporcjonalne do częstotliwości światła rozproszonego (lub w przypadku fluorescencji, światła emitowanego). Wibracyjne liczby kwantowe w górnym i dolnym stanie elektronowym oznaczone są odpowiednio v' i v'' . Odległość poziomów energetycznych v'' między poziomami wibracyjnymi dla poziomu podstawowego jest równe ν_{vib} (na podstawie [3]).

Spektroskopia ramanowska jest to metoda badawcza, która wykorzystuje zjawisko nieelastycznego oddziaływania fotonów z cząsteczkami budującymi badaną próbkę, podczas którego powstaje rozproszone promieniowanie o zmienionej długości fali (energii) (Ryc. 1.5.1.). W badaniu widm rozpraszania Ramana wykorzystuje się fakt, że każde wiązanie chemiczne w cząsteczce ma określoną energię drgań. Rozproszone promieniowanie następnie

analizowane jest przez układ optyczny spektrometru, a detekcja charakterystycznych drgań umożliwia badanie struktury cząsteczek.



Rycina 1.7.2. Spektrometr ramanowski Renishaw inVia, na którym przeprowadzono badania prezentowane w tej pracy, oraz obiektywy mikroskopu optycznego służące do wyszukania obiektu badań (fot. z archiwum własnego Malwiny Birczyńskiej-Zych).

Zdarzenie rozpraszania Ramana występuje, gdy monochromatyczna wiązka fotonów (zwykle ze źródła światła laserowego), niedopasowana do różnicy poziomów elektronowych, wzbudza drgania molekuł. (Ryc. 1.7.1.).

Podczas zjawiska rozpraszania światła znaczna ilość fotonów jest rozpraszana elastycznie, jest to tzw. rozpraszanie Rayleigh'a. Natomiast niewielka część fotonów (około~ 1 na 10^8) jest rozpraszana nieelastycznie i one niosą informacje analityczną o drganiach cząsteczek. Rozproszone fotony mogą być albo o mniejszej energii poprzez dostarczenie energii do oscylacji wiązań (rozpraszanie Ramana Stokesa) albo o większej energii poprzez otrzymanie energii z wiązania (rozpraszanie ramanowskie antystokesowskie). Różnica energii między padającymi i rozproszonymi fotonami odpowiada energii drgań molekularnych. Detekcja tych rozproszonych fotonów daje widmo Ramana, każde z pasm tego widma jest charakterystyczne dla określonego drgania tzw. normalnego.

Zestaw tych pasm, czyli widmo Ramana dostarcza unikalnego obrazu próbki, stąd określanego jako obraz daktyloskopowy. Widmo zawiera informacje o wiązaniach chemicznych makrocząsteczek obecnych w tkance lub pojedynczej komórce jak np. DNA, RNA, białek, lipidów. Widmo Ramana dostarcza nie tylko informacji o składzie, strukturze i konformacji próbek biologicznych, ale także o oddziaływaniach międzycząsteczkowych.

Zjawiskiem istotnym dla makromolekuł biologicznych jest rezonansowy efekt Ramana (RR). (Ryc. 1.7.1.) Zachodzi ono, gdy długość fali lasera, używanego do wzbudzenia próbki, znajduje się w zakresie elektronicznego pasma absorpcyjnego chromoforu, np. hemu. Wtedy dochodzi do znacznego wzmocnienia intensywności niektórych pasm Ramana, związanych z tym chromoforem, w wyniku czego ich bezwzględne intensywności wzrastają o współczynnik od 10^3 do 10^5 .

Zaletami spektroskopii ramanowskiej w stosunku do innych technik analitycznych są m.in.:

1. Pomiar nie wymaga bezpośredniego kontaktu z próbką, więc można wykonywać widma ze znacznej odległości
2. Jest metodą nie niszcząca badanego materiału
3. Nie wymaga specjalistycznego przygotowania próbki ani zastosowania barwienia do przygotowania preparatów
4. Umożliwia przeprowadzenie analizy mikroskopowej
5. Próbka może być w dowolnym stanie materii, w postaci ciała stałego, cieczy lub gazu.
6. Jest stosunkowo szybką metodą analityczną (czas rzędu sekund dla wielu prostych pomiarów)
7. Nie zachodzi interferencja z drganiami wody (stąd jest dobrą metodą pomiarową dla roztworów wodnych, co jest szczególnie istotne, ponieważ umożliwia badania materiałów biologicznych)
8. Daje możliwość detekcji złożonych molekuł, np. białek, tłuszczów itp., gdyż mają one charakterystyczne widma. Jeżeli chodzi o badania protein to spektroskopia Ramana jest szeroko stosowana do określania konformacji szkieletu białka, konformacji wiązań dwusiarczkowych i lokalnego mikrośrodowiska niektórych grup funkcyjnych.
9. Istnieje możliwość wykrycia nawet niewielkich zmian w tkankach, czyli także takich, które występują we wczesnym etapie choroby
10. Może być wykorzystywana zarówno do badań *in vitro*, jak i *in vivo*.

W ostatnich latach coraz częściej wykorzystuje się tę metodę w badaniach biologicznych, w tym w medycynie. Dobrym przykładem zastosowania spektroskopii ramanowskiej jest „*in vivo* Raman endoscopy”, którego jednym z pionierów jest prof. Nick Stone z Wielkiej Brytanii. Inne przykładowe zastosowania tej metody, które są stale opracowywane to diagnostyka miażdżycy,

osteoporozy, nowotworów, chorób skóry, czy też chorób neurologicznych, jak choroba Parkinsona lub Alzheimerera.

Piśmiennictwo:

1. Nakamoto K. Infrared and Raman spectra of Inorganic and coordination compounds. John Wiley& Sons, Hoboken, NJ, 2009.
2. Nykiel P. Spektroskopia Ramana: nowoczesna technika w diagnostyce medycznej i analizie biochemicznej. *Biul. Wydz. Farm. WUM*, 4 (2013) 27-36.
3. Carey PR. Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies. Academic Press. New York, 1982.
4. Sebastian Wachsmann-Hogiu, Tyler Weeks, Thomas Huser, Chemical analysis in vivo and in vitro by Raman spectroscopy—from single cells to humans, *Current Opinion in Biotechnology*, 20 (2009) 63-73.
5. Tu A. T., Use of Raman Spectroscopy in Biological Compounds, *J Chin Chem Soc.* 50 (2003) 1-10.
6. Almond L M, Hutchings J, Lloyd G, Barr H, Shepherd N, Day J., Stevens O, Sanders S, Wadley M, Stone N, Kendal C. Endoscopic Raman spectroscopy enables objective diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc.* 79 (2014) 37-45.
7. Cordero E, Latka I, Matthäus C, Schie IW, Popp J. In-vivo Raman spectroscopy: from basics to applications. *J. Biomed. Opt.* 23 (2018) 071210 (1-24).
8. Heng HPS, Shu C, Zheng W, Lin K, Huang Z. Advances in real-time fiber-optic Raman spectroscopy for early cancer diagnosis: Pushing the frontier into clinical endoscopic applications. *Transl Biophotonics.* 3 (2021) e202000018 (1-31).
9. Sacharz J, Wesełucha-Birczyńska A, Zięba-Palus J, Lewandowski MH, Kowalski R, Palus K, Chrobok Ł, Moskal P, Birczyńska M, Sozańska A, Epileptic rat brain tissue analyzed by 2D

correlation Raman spectroscopy, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 188 (2018) 581-588.

10. Sacharz J, Weselucha-Birczyńska A, Zięba-Palus J, Lewandowski MH, Palus-Chramiec K, Chrobok Ł, Moskal P, Birczyńska M, Sozańska A. 2D Raman study of the healthy and epileptic rat cerebellar cortex tissue. *Jour Mol Struct.* 1163 (2018) 167-173.

1.8. Spektroskopia EPR [1-5]

Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) jest stosowana do badania materiałów paramagnetycznych, a więc substancji, których atomy, jony lub cząsteczki posiadają nieparzystą liczbę elektronów, a tym samym wykazują wypadkowy moment magnetyczny.

W nieobecności zewnętrznego pola magnetycznego (gdy indukcja magnetyczna $B=0$) uporządkowanie takich elementarnych momentów w materiale paramagnetycznym jest chaotyczne, co prowadzi do zerowego wypadkowego momentu magnetycznego dla całego ciała.

Gdy $B \neq 0$ pojawia się niezerowy moment magnetyczny dla całej próbki dający składową w kierunku wektora indukcji, poziomy energetyczne elektronu ulegają rozszczepieniu na $2S+1$ podpoziomów (efekt Zeemana) pomiędzy którymi mogą zachodzić przejścia energetyczne. Wielkość rozszczepienia tych poziomów zależy od indukcji przyłożonego pola magnetycznego i pod wpływem dostarczonej energii promieniowania równej różnicy energii pomiędzy sąsiednimi poziomami obserwuje się między nimi przejścia energetyczne. Spełniony jest wtedy warunek rezonansu:

$$h\nu_0 = \Delta M_s g_e \beta_e B$$

gdzie:

g_e - czynnik rozszczepienia spektroskopowego elektronu

β_e - magneton Bohra

$$\beta_e = \frac{e\hbar}{2mc} = 4.6688 \cdot 10^{-4} \frac{cm^{-1}}{mT}$$

M_s - magnetyczna spinowa liczba kwantowa

\vec{B} - wartość indukcji pola magnetycznego

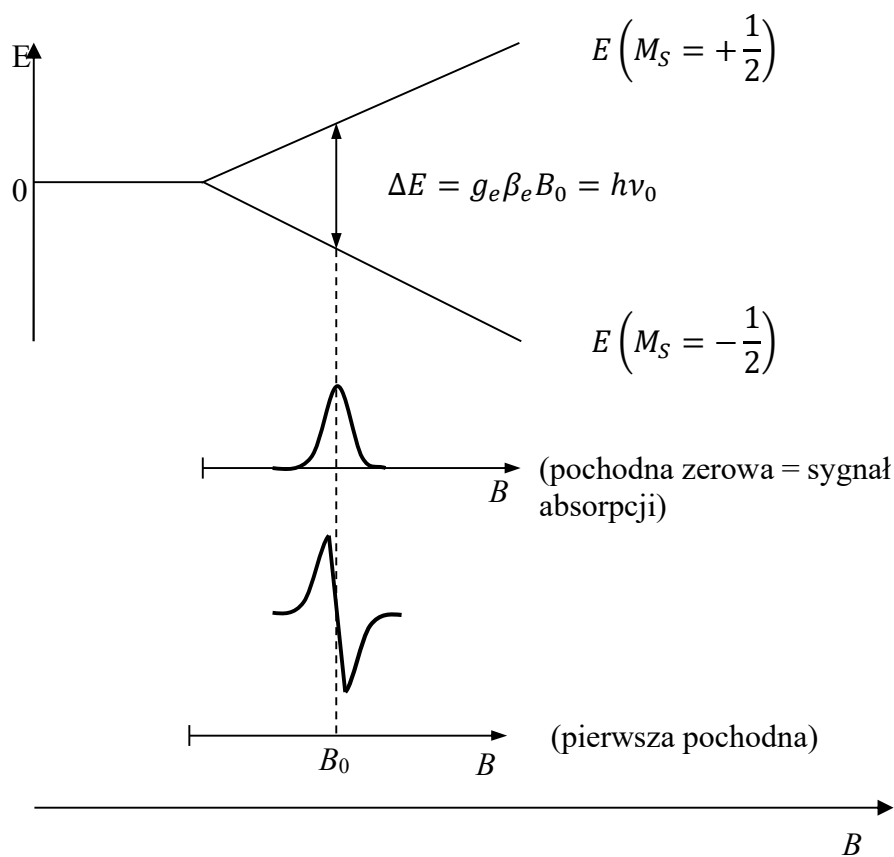
h - stała Plancka

ν_0 - częstotliwość dostarczonego promieniowania.

Przejście układu ze stanu o energii niższej do stanu o energii wyższej następuje po absorpcji promieniowania o energii $h\nu_0$ w zakresie częstotliwości mikrofal, przy czym dozwolone są przejścia, przy których wartość M_s zmienia się o 1 (

Rycina 1.8.1). W eksperymentach EPR częstotliwość promieniowania jest ustalona (najczęściej ok. 10 GHz, tzw pasmo X), a warunek rezonansu jest realizowany przez zastosowanie stałej częstotliwości promieniowania mikrofalowego i zmiany indukcji pola magnetycznego (tzw. metoda fali ciągłej - CW, ang. continuous wave). Do generacji fal z zakresu mikrofalowego używany jest klistron lub generatory półprzewodnikowe, do transportu mikrofal stosowane są falowody, cyrkulatory, rezonatory, tłumiki, a do detekcji odpowiednie mikrofalowe diody detekcyjne.

Badania prowadzi się tak dla próbek stałych jak i ciekłych w różnych temperaturach, a dzięki wysokiej czułości oraz możliwości wykonywania pomiarów przy użyciu niewielkiej ilości próbki spektroskopia EPR ma szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach badań, w tym badaniach materiałów biologicznych, gdyż będąc metodą niedestrukcyjną umożliwia ich pomiar bez naruszania struktury tkanek.



Rycina 1.8.1. Schemat poziomów energetycznych i sygnał EPR dla spinu $S = \frac{1}{2}$.

Dla swobodnego elektronu o spinie $S = \frac{1}{2}$ czynnik g_e jest skalarem i jego wartość wynosi 2.0023, ale w centrach paramagnetycznych, głównie zawierających jony metali przejściowych na moment spinowy elektronu (S) wpływa obecność momentów magnetycznych związanych z orbitalnym momentem pędu elektronu (L). Prowadzi to poprzez sprzężenie spin – orbita (L - S) do wyindukowania dodatkowego pola wewnętrznego \vec{B}_i . Pole to wraz z zewnętrznym polem magnetycznym (\vec{B}) oddziałuje na centrum paramagnetyczne jako tak zwane pole efektywne (\vec{B}_{ef}). Wpływ pola wewnętrznego \vec{B}_i zostaje uwzględniony poprzez modyfikację współczynnika g , który przyjmuje postać tensora i w układzie współrzędnych związanym z centrum paramagnetycznym posiada trzy składowe g_{xx} , g_{yy} oraz g_{zz} , które odpowiadają współczynnikom zeemanowskiego rozszczepienia dla kierunków osi x , y oraz z lokalnego pola

działającego na niesparowany elektron. Tensor g zawiera w ten sposób informację o symetrii lokalnej. Anizotropia tensora g lub jego odchylenie od wartości g_e wskazują na domieszkę wzbudzonych stanów orbitalnych do stanu podstawowego. Znajomość składowych tensora g , które są znajdowane poprzez analizę widma EPR, umożliwia wyznaczenie różnicy energii pomiędzy stanem podstawowym na którym znajduje się niesparowany elektron, a sprzężonym stanem wzbudzonym centrum paramagnetycznego.

W układach paramagnetycznych, w których występuje więcej niż jeden niesparowany elektron ($S > 1/2$) pojawiają się oddziaływania spinowych momentów magnetycznych, prowadzące do powstania wewnętrznego pola magnetycznego, które działa na każdy z elektronów. W wyniku tych oddziaływań następuje częściowe lub całkowite zniesienie degeneracji poziomu, który może rozszczepić się bez obecności zewnętrznego pola magnetycznego w tzw. polu zerowym na $2S$ podpoziomów. W przypadku parzystej liczby elektronów i wysokiej symetrii pola krystalicznego degeneracja spinowa nie jest usuwana, natomiast zgodnie z teorematem Kramersa w przypadku nieparzystej liczby elektronów zewnętrzne pole magnetyczne znosi degenerację poziomów i obserwuje się widmo EPR składające się z $2S$ linii subtelných. Wielkość rozszczepienia opisuje tensor D , który dostarcza również informacji o symetrii centrum i naturze wiązania chemicznego centrum z ligandami.

Obecność w układzie paramagnetycznym jąder o spinie $I \neq 0$ powoduje powstawanie dodatkowego pola magnetycznego \vec{B}_{hf} , w wyniku czego na elektron oddziałuje wypadkowe pole będące sumą $\vec{B} + \vec{B}_{hf}$, a warunek rezonansu przyjmuje postać: $\Delta E = g_e \beta_e (B \pm a m_I)$, gdzie a jest stałą sprzężenia nadsubtelnego, a m_I magnetyczną liczbą kwantową. Stała sprzężenia nadsubtelnego zależy od momentu magnetycznego jądra, a więc jego rodzaju, a także od jego odległości od niesparowanego elektronu. Oddziaływanie nadsubtelne rozszczepia poziom podstawowy elektronu na podpoziomy, pomiędzy którymi są dozwolone przejścia zgodnie z regułą wyboru: $\Delta M_s = 1, \Delta m_I = 0$.

W układach zorientowanych strukturę oddziaływania nadsubtelnego charakteryzuje tensor \tilde{A} , który składa się z części izotropowej i anizotropowej. Część izotropowa - oddziaływanie kontaktowe Fermiego wynika z niezerowej gęstości spinowej elektronu w pozycji danego jądra magnetycznego. Część anizotropowa zależy od oddziaływania dipolowo – dipolowego między momentami magnetycznymi elektronu i jądra. Liczba linii struktury nadsubtelnej, ich intensywność oraz odległości między nimi zależą od liczby oddziałujących jąder magnetycznych i od ich spinu. Struktura nadsubtelna dostarcza wielu informacji o centrum paramagnetycznym. Z liczby i intensywności linii, ich położenia oraz stałej rozszczepienia nadsubtelnego można wnioskować o rozkładzie gęstości elektronowej w cząsteczce i charakterze wiązań chemicznych.

Badania EPR prowadzi się w różnych temperaturach tak dla próbek stałych jak i ciekłych, a dzięki wysokiej czułości oraz możliwości wykonywania pomiarów przy użyciu niewielkiej ilości próbki spektroskopia EPR ma szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach badań, w tym badaniach materiałów biologicznych, gdyż będąc metodą niedestrukcyjną umożliwia ich pomiar bez naruszania struktury tkanek. Parametry sygnałów wyznacza się w oparciu o ich symulację.

Piśmiennictwo

1. Zawada K., Zastosowanie spektroskopii EPR w farmacji i medycynie, Farm Pol. 65 (2009) 224-228.
2. Gutowski M. Spektroskopia rezonansów magnetycznych. [w]: Encyklopedia Fizyki Współczesnej, PWN, Warszawa, str. 332-339.

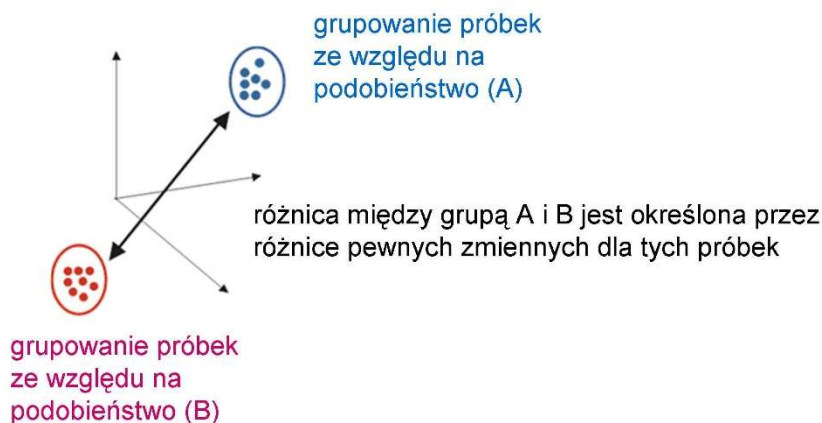
3. Pietrzyk P, Adamski A, Sojka Z. Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego, w: Wybrane metody spektroskopii i spektrometrii molekularnej w analizie strukturalnej, red. K. Małek, L. Proniewicz, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 2005, Rozdz. 6. , str. 141-184.
4. Sigel A, Sigel H. Metal Ions in Biological Systems. CRC Press, 2004.
5. Saifutdinov RG, Larina LI, Vakul'skaya TI, Voronkov MG. Electron Paramagnetic Resonance in biochemistry and medicine. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, USA, 2001.

1.9. Analiza głównych składowych – PCA (ang. Principal Component Analysis) [1-2]

PCA jest matematyczną metodą redukcji wymiarowości tak aby zbiór zredukowany nadal zawierał większość informacji wyjściowego zbioru. Informacje te mogą być częściowo ukryte, ponieważ dane są zwykle zbyt złożone, aby można je było łatwo zinterpretować.

PCA jest wykorzystywane do znalezienia takich ukrytych zależności w dużych zbiorach danych.

W celu zobrazowania znalezionych, nowych zależności wykonywane są wykresy dwu- i trójwymiarowe przedstawiające wizualną reprezentację relacji między próbkami i zmiennymi co zapewnia wgląd w to, w jaki sposób mierzone zmienne powodują, że niektóre dane są podobne lub różnią się od siebie.



Rycina 1.9.1 Przykładowe różnice w przestrzeni wielowymiarowej [1].

Konstruując tabelę danych, każdy wiersz reprezentuje obiekt (np. osobnika, próbkę), a każda kolumna reprezentuje deskryptor (np. miarę, zmienną).

Celem użycia metody PCA jest wydobycie informacji z tabeli danych i zignorowanie „szumu”, tj. zmiennych nie wnoszących istotnych informacji.

W reprezentacji macierzowej model o danej liczbie składowych ma następujące równanie:

$$X = TP^T + E$$

gdzie T to macierz współrzędnych czynnikowych dla zmiennych (ang. scores matrix), P to macierz wag, współczynników dla poszczególnych współrzędnych czynnikowych (ang. loadings matrix), a E to macierz błędów (ang. error matrix). Równanie to przedstawia kombinację liniową nowych zmiennych tzw. głównych składowych, które maksymalizują wariancję oraz nie są ze sobą skorelowane.

Pierwszy składnik tego równania, kombinacja współrzędnych i współczynniki kombinacji liniowej zmiennych początkowych, z których konstruowane są składowe główne to najważniejsza część danych.

Statystycznie PCA znajduje linie, płaszczyzny i hiperpłaszczyzny w K-wymiarowej przestrzeni, które przybliżają dane tak dobrze, jak to możliwe w metodzie najmniejszych kwadratów. Linia lub płaszczyzna, która jest przybliżeniem zbioru punktów danych metodą

najmniejszych kwadratów, powoduje, że wariancja współrzędnych na linii lub płaszczyźnie jest tak duża, jak to tylko możliwe.

Piśmiennictwo:

1. Introduction to Principal Component Analysis (PCA); Program Unscrambler X v.10.3
Help
2. Jolliffe IT, Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments.
Phil Trans R Soc. A 374 (2016) 20150202 (1-16).

1.10. Korelacja dwuwymiarowa 2D-COS w badaniach spektroskopowych [1-3]

Zauważono, że widma 2D są szczególnie przydatne do podkreślania cech widmowych, które nie są łatwo obserwowalne w konwencjonalnych widmach jednowymiarowych.

Korelacja dwuwymiarowa umożliwia pogłębioną analizę danych spektralnych, jest porównaniem zmian zmiennej spektralnej w funkcji dwóch zmiennych. Wprowadzone zewnętrzne zaburzenie stymuluje selektywnie różne składniki chemiczne badanego układu powodując w nim zmiany, które wyraża zmiana intensywności sygnału spektralnego (Ryc. 1.10.1.).

Analiza jest prowadzona w pewnym skończonym zakresie wartości czynnika zaburzającego A , między A_{\min} a A_{\max} . Zaś intensywność widmowa jest określana w funkcji dwóch niezależnych zmiennych widmowych, np. długości fali.

Można zagadnienie sformalizować wyrażając widmo korelacyjne jako korelację dwóch profili dla ν_1 i ν_2

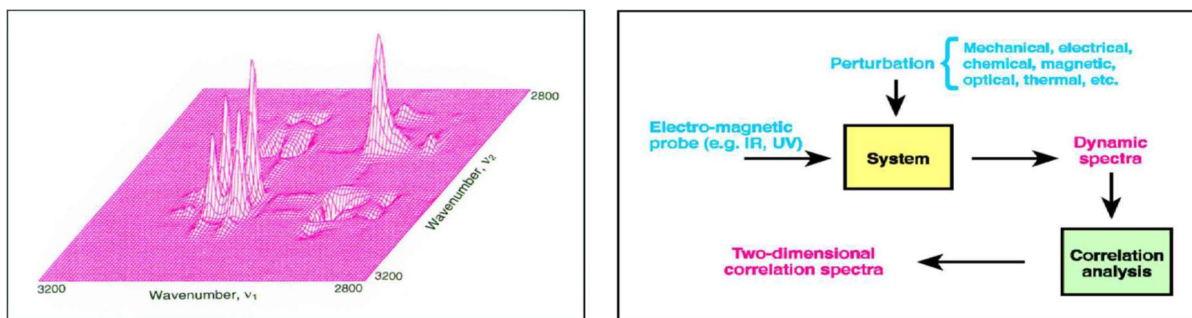
$$X(\nu_1, \nu_2) = \langle y(\nu_1, a) \cdot y(\nu_2, a') \rangle$$

Piki są „rozciągane” na drugi wymiar, aby ułatwić zobrazowanie skomplikowanych widm, złożonych z wielu nakładających się pasm.

Wprowadza się też konwencję traktującą $X(\nu_1, \nu_2)$ jako liczbę zespoloną

$$X(\nu_1, \nu_2) = \Phi(\nu_1, \nu_2) + i\Psi(\nu_1, \nu_2)$$

składającą się z dwóch składowych korelacji 2D, określonych jako synchroniczną i asynchroniczną



Ryc. 1.10.1. Ogólny schemat uzyskiwania widm korelacyjnych 2D, oraz przykładowe widmo dwuwymiarowe [wg 1].

Mapa synchroniczna przedstawia ogólne podobieństwo lub przypadkowe zmiany odchyłeń natężenia widma mierzonymi przy różnych zmiennych widmowych, w zakresie zmiennej A od A_{\min} do A_{\max}

- Jest symetryczna względem linii diagonalnej odpowiadającej współrzędnych $\nu_1 = \nu_2$.
- Piki korelacyjne mogą pojawiać się na diagonalu jak i również poza nią.
- Silna intensywność auto – pików (znajdujących się na diagonalu) sugeruje, że przy danej częstotliwości zmiany silnie od niej zależą.
- Piki również mogą pojawić się poza diagonalą, jeśli dynamika zmian obserwowana przy dwóch różnych liczbach falowych (współrzędnych spektralnych) pików są podobne.
- Dodatni znak pików pozadiagonalnych wskazuje na to, że intensywność pasm przy obu liczbach falowych zwiększa się lub zmniejsza jednocześnie.
- Ujemny znak pików pozadiagonalnych wskazuje na to, że gdy intensywność jednego z pasm rośnie, drugiego w tym czasie maleje.

Mapa asynchroniczna wskazuje na odmienności charakteru zmian widmowych

- Mapa asymetryczna nie posiada auto – pików i składa się wyłącznie z pików pozadiagonalnych.

- Pik asynchroniczny pojawia się, gdy intensywność dwóch pasm spektralnych zmienia się w różnych fazach względem siebie.
- Dodatni znak asymetrycznych pików pozadiagonalnych wskazuje na to, że zmiany wywołane zmianami spektralnymi następują wcześniej dla ν_1 niż te dla ν_2 .
- Ujemny znak asymetrycznych pików pozadiagonalnych wskazuje na to, że zmiany wywołane zmianami spektralnymi następują wcześniej dla ν_2 niż te dla ν_1 .

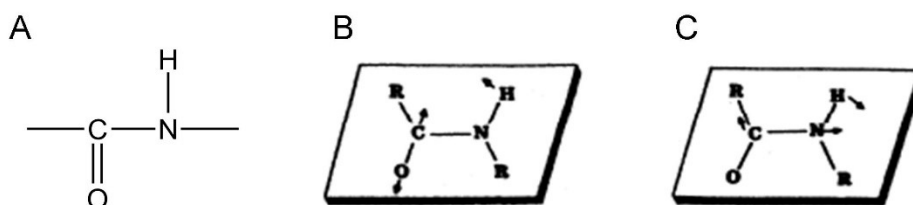
Piśmiennictwo

1. Noda I, Dowrey AE, Marcott C, Story GM, Ozaki Y. Generalized Two-Dimensional Correlation Spectroscopy. *Appl Spectrosc.* 54 (2000) 236A -248A.
2. Noda I, Generalized Two-Dimensional Correlation Method Applicable to Infrared, Raman, and Other Types of Spectroscopy. *Appl Spectrosc.* 47 (1993) 1329-1336.
3. Noda I, Ozaki Y. Two-Dimensional Correlation Spectroscopy: Applications in Vibrational and Optical Spectroscopy. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2002.

1.11. Stan badań spektroskopowych w malarii [1-12]

Renesans w zastosowaniu spektroskopii ramanowskiej w badaniach układów biologicznych nastąpił w latach 70-tych XX wieku [11]. Z tych zastosowań szczególnie istotne są badania białek, ich struktury drugorzędowej, określającej stopień zorganizowania łańcuchów polipeptydowych.

Charakterystyczne pasma grup amidowych, nazywane są tak ze względu na podobieństwo do amidów drugorzędowych.



Rycina. 1.11.1. (A) Grupa amidowa [wg <https://zpe.gov.pl/a/przeczytaj/DISQnfJA1> [dostęp 24.04.2023]]; (B) Pochodzenie pasma amidu I, drgania grupy peptydowej w płaszczyźnie ze znacznym udziałem drgań rozciągających C=O, (C) Pochodzenie pasma amidowego III. Jest to drganie zginające grupy peptydowej N-H w płaszczyźnie, która nie obejmuje drgań rozciągających C = O (według [11]).

Wyróżnia się dziewięć charakterystycznych drgań amidowych białek określonych w teoretycznych obliczeniach kwantowo-mechanicznych. W spektroskopii ramanowskiej istotne są ze względu na zakresy, w których występują:

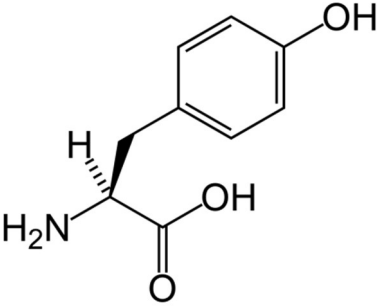
pasmo amidowe I, ok. 1550 cm^{-1} , 80% drgania rozciągającego C=O, 10% drgania rozciągającego C-N oraz 10% drgania zginającego N-H (Ryc. 1.9.1. B);

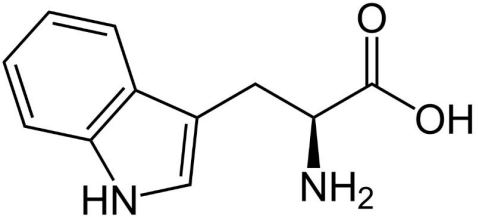
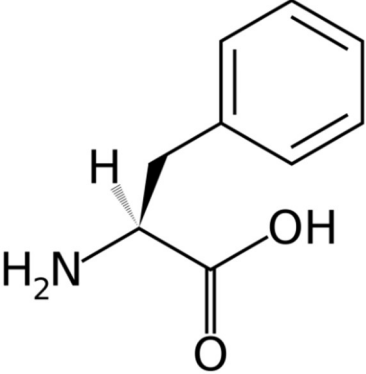
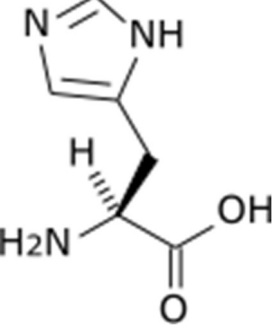
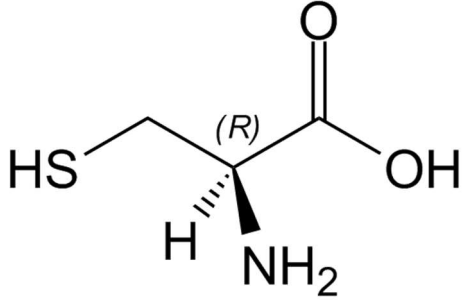
pasmo amidowe III: ok. 1300 cm^{-1} , 30% drgania zginającego C-N, 10% drgania rozciągającego C=O, 10% drgania zginającego O=C-N, 20% inne (Ryc. 1.9.1 C); .

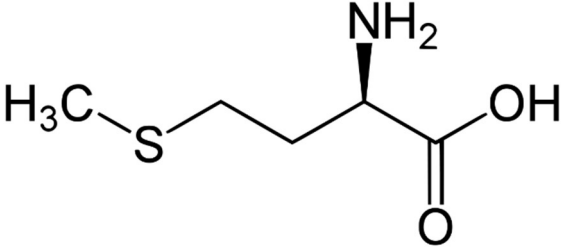
Dokładne pozycje, przy których pasma amidowe są obserwowane zależą od ilości wiązań, w które są zaangażowane grupy C=O i CN stad pozwalają określić strukturę drugorzędową którą przyjmuje białko.

Dodatkowo analiza poszczególnych aminokwasów i ich konformacji, daje informację o symetrii lokalnej.

Tabela 1.11.1. Drgania reszt aminokwasowych (wg [12]).

| Aminokwas | Wzór strukturalny | Pasma charakterystyczne [cm^{-1}] (zaznaczone pasma markerowe) |
|-----------------------------------|---|---|
| tyrozyna (aminokwas endogenny) |  | 1620, 1210, 1183, 855, 835, 645 |

| | | |
|--|---|---|
| tryptofan |  | 1582, 1552, 1417, 1363, 123640, 1011, 881, 757, 570 |
| fenyloalanina (aminokwas endogeny) |  | 1605, 1585, 1207, 1183, 1033, 1005, 622 |
| histydyna |  | 1282, lub 1265, 1204, 985, 623 |
| cysteina |  | S-H - 2550-2600 S-C - 630 – 730 S-S – 500-540 |

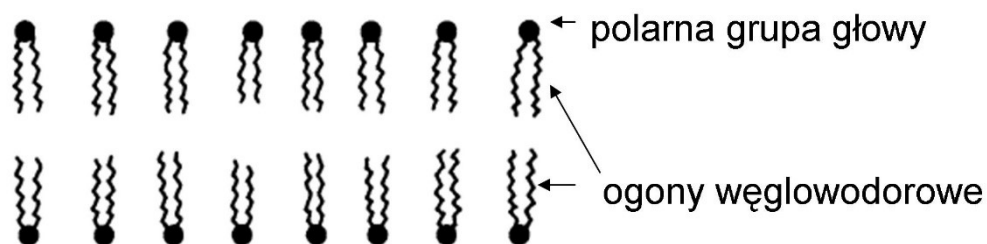
| | | |
|-----------|--|-----------------|
| metionina |  | S-C - 630 – 730 |
|-----------|--|-----------------|

Ważną zaletą spektroskopii ramanowskiej w analizie białek jest możliwość pomiaru próbek w dowolnym stanie skupienia, także w postaci roztworów wodnych ze względu na to, że woda słabo rozprasza promieniowanie.

Również badania lipidów i błon metodą spektroskopii ramanowskiej mają istotne zalety w porównaniu innymi metodami analitycznymi. Widmo ramanowskie zawiera natychmiastową informację o złożonym układzie molekularnym. Ponadto metoda spektroskopii Ramana nie wymaga użycia cząsteczki sondy, a umożliwia monitorowanie układów w dowolnej fazie. Widma ramanowskie lipidów, fosfolipidów zawierają głównie pasma wynikające z drgań łańcuchów węglowodorowych, przy pewnym udziale grupy polarnej (głowy) fosforanowej. (Ryc. 1.9.2). W rzeczywistości dwuwarstwa lipidowa jest preferowaną strukturą dla większości fosfolipidów w środowisku wodnym, czyli organizmu żywego. W tzw. fazie żelowej łańcuchy węglowodorowe lipidów są zasadniczo w konformacji *all-trans* wokół wiązań C-C, co można przedstawić przez ich równoległe ustawienie. W tzw. fazie ciekłokrystalicznej łańcuchy węglowodorowe zawierają populację izomerów CC typu *gauche*, którą reprezentują faliste linie na rysunku. W porównaniu z fazą żelową faza ciekłokrystaliczna powoduje zmniejszenie grubości dwuwarstwy i zwiększenie średniej odległości bocznej między grupami polarnymi głów.

Wysoka zawartość grup metylenowych umożliwia monitorowanie zmian konformacyjnych w błonach poprzez analizę położenia pasm i ich intensywności w zakresie ok. 2800-3100 cm⁻¹.

Obszar spektralny między 1000 a 1150 cm^{-1} zawiera drgania, w którym istnieją co najmniej trzy pasma, które wskazują wyraźne zmiany w nieuporządkowaniu łańcucha węglowodorowego. Intensywności dwóch pasm przy ok. 1128 i 1064 cm^{-1} , przypisanych do drgań konformerów *all-trans*, gwałtownie maleją, gdy wzrasta nieuporządkowanie (wywołane np. wzrostem temperatury). W fazie ciekłokrystalicznej, powyżej np. temperatury przejścia fazowego, pojawia się pasmo przy ok. 1089 cm^{-1} , która jest przypisana drganiom C-C przypadkowych konformacji podobnych do drgań w cieczy. Pasma przy 1089 cm^{-1} może łączyć się z pasmem pojawiającym się przy ok. 1100 cm^{-1} przypisanym do drgań rozciągających grup PO_2^- .

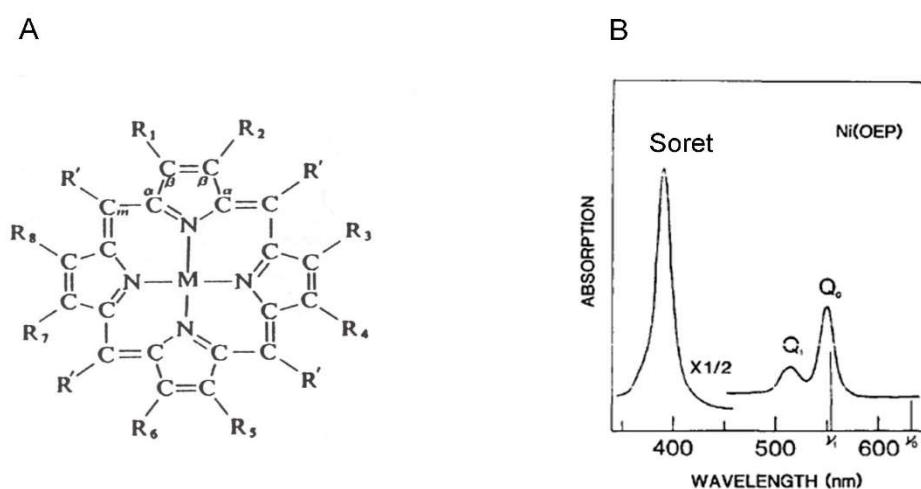


Rycina 1.11.2. Diagram przedstawiający przekrój dwuwarstwy lipidowej utworzonej przez cząsteczki fosfolipidów (schematyczna reprezentacja cząsteczki fosfolipidu: polarna grupa „głowy” i ogony fosfolipidowe).

Rezonansowa spektroskopia ramanowska (RR) okazała się szczególnie czułą sondą do badania właściwości elektronowych i strukturalnych hemoglobiny (Hb). Pierwsze rezonansowe badania Ramana nad białkami hemu wykazały występowanie pasma, wrażliwego na stopień utlenienia żelaza hemowego (Fe). Pasma to przypisane do drgań modu ν_4 występuje między ok. 1361 -

1356 cm^{-1} dla zredukowanych białek hemu i między ok. 1378 -1370 cm^{-1} dla utlenowanych białek.

Rozpoczęto szerokie badania teoretyczne i eksperymentalne modelowych związków hemu tj. metaloporfiryn, ze względu na biologiczne znaczenie grupy prostetycznej występującej w wielu białkach hemowych (Ryc. 1.9.3 A). Metaloporfiryny mają charakterystyczne widmo absorpcyjne w zakresie widzialnym z silnym pasmem Soret w pobliżu UV i znacznie mniej intensywnymi pasmami w zakresie widzialnym (Ryc. 1.9.3 B).



Rycina 1.11.3 (A) Struktura metaloporfiryn; porfiryne octaetylowe (OEP):R1-R8 –grupa etylowa, R'-H (wg [9]); (B) widmo absorpcyjne w zakresie widzialnym nikielowej(II) porfiryne octaetylowej, Ni(OEP) (w CH_2Cl_2) (według: [10]).

Wykorzystanie światła wzbudającego w zakresie pasma absorpcyjnego Soret prowadzi do selektywnego wzbudzenia w pełni symetrycznych drgań makrocyklu porfiryne. Promieniowanie z zakresu Q0 lub Q1 wzbudza selektywnie inne drgania całej cząsteczki.

W latach 90-ych XX wieku stały się możliwe badania poszczególnych komórek i makromolekuł, z których są zbudowane. Rozpoczęły się też badania hemoglobiny i jej stanu w komórkach.

Wykorzystywano technikę spektroskopii Ramanowskiej- ze względu na wysoką polaryzowalność zarówno dla hemoglobiny, jak i hemozoiny, do badania krwinek czerwonych zarażonych Plasmodium w fazie trofozoitów. Pasma tych dwóch składników dominują w widmach erytrocytów zakażonych malarią. Widma Ramana zarażonych erytrocytów w stadium trofozoitu, zarejestrowane przy wzbudzeniu liniami lasera 406, 488, 514, 568, 633, 647, 676, 780, 830 i 1064 nm, pokazują intensywne pasma charakterystyczne dla hemozoiny. Przeprowadzono dokładną analizę, są to pasma ramanowskie hemozoiny dominujące w widmie zarażonych krwinek czerwonych. W przypadku grupy kontrolnej erytrocytów, widma zawierają silne pasma przypisywane oksyhemoglobinie. W przypadku niektórych zarażonych erytrocytów, gdzie stężenie hemozoiny jest niskie, istnieje stan pośredni i widma pochodzą z mieszaniny hemozoiny i oxy-hemoglobiny. Zarówno hemozoiny, jak i oxy-hemoglobiny zawierają hemową grupę prostetyczną, która zapewnia silne wzmocnienie rezonansowe. Widmo Ramana z kontrolnych RBC jest zdominowane przez drgania charakterystyczne dla struktury oksy-hemoglobiny w większości charakterystyczne pasma w obszarze tzw. Drgań fundamentalnych obserwowane są przy 1639, 1605, 1587, 1547, 1473, 1431 i 1376/1357 cm^{-1} i są przypisane drganiom rozciągającym porfiryny odpowiednio ν_{10} , ν_{19} , ν_{37} , ν_{11} , ν_3 , ν_{28} i ν_4 . Zaobserwowano, że widmo Ramana zarażonej krwinki czerwonej w regionie drgania szkieletowe rdzenia porfiryny (makrocyklu hemu, 1600-1500 cm^{-1}) charakteryzuje się silnymi modami ν_{10} i ν_{19} , które są przesunięte odpowiednio do 1629 i 1570 cm^{-1} . Co więcej pojawienie się hemozoiny w zarażonych krwinkach powoduje przesunięcie kolejnych pasm ν_3 i ν_4 do pozycji odpowiednio 1490 i 1371 cm^{-1} . Najważniejszy znacznik pasma hemozoiny to pasmo

przy 1570 cm^{-1} przypisane do modu ν_{19} . Stwierdzono, że to pasmo jest wrażliwe na interakcję i wiązania między hemozoiną a lekami przeciwmalarycznymi. Pasma ν_4 , będące znacznikiem gęstości elektronowej dla hemozoiny, obserwowane przy 1371 cm^{-1} , odpowiada atomowi żelaza będącemu w stanie wysokiego spinowego żelaza i może z powodzeniem być wykorzystane do badania interakcji między hematyną i lekami przeciwmalarycznymi. Do wyraźnego rozróżnienia charakterystyk widmowych hemozoiny wykorzystywano analizę głównych składowych (PCA).

Zespół z Australii Prof. Baydena Wood'a badał pasożyty malarii we wczesnym stadium pierścienia w zawiesinie normalnej erytrocytów za pomocą komplementarnej metody do spektroskopii Ramanowskiej spektroskopii w podczerwieni (ATR-FT-IR) i do analizy wyników metodę regresji cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS). Stwierdzono, że bezwzględna granica wykrywalności wynosi $0,00001\%$ parazytemii (<1 pasożyta/ μl krwi; $p < 0,008$). Badacze wyrażają przekonanie, iż przy dalszych badaniach nastąpi rozwój tej metody, a uniwersalne i solidne modele kalibracyjne mogą poprawić diagnostykę malarii we wczesnej fazie.

Piśmiennictwo:

1. Perez-Guaita D, Marzec KM, Hudson A, Evans C, Chernenko T, Matthäus Ch, Miljkovic M, Diem M, Heraud Ph, Richards JS, Andrew D, Anderson DA, Doerig C, Garcia-Bustos J, McNaughton D, Wood BR. Parasites under the Spotlight: Applications of Vibrational Spectroscopy to Malaria Research. Chem Rev. 118 (2018) 5330-5358.
2. Khoshmanesh A, Dixon MWA, Kenny S, Tilley L, McNaughton D, Wood BR. Detection and Quantification of Early-Stage Malaria Parasites in Laboratory Infected

- Erythrocytes by Attenuated Total Reflectance Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis. *Anal Chem.* 86 (2014) 4379–4386s.
3. Wood BR, McNaughton D. Raman excitation wavelength investigation of single red blood cells *in vivo*. *J Raman Spectrosc.* 33 (2002) 517–523.
 4. Wood BR, McNaughton D. Raman excitation wavelength investigation of single red blood cells *in vivo*. *J Raman Spectrosc.* 33 (2002) 517–523.
 5. Wood BR, Caspers P, Puppels GJ, Pandiancherri S, McNaughton D. Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation. *Anal Bioanal Chem.* 387 (2007)1691–1703.
 6. Pahlow S, Weber K, Popp J, Wood BR, Kochan K, Ruther A, Perez-Guaita D, Heraud P, Stone N, Dudgeon A, Gardner B, Reddy R, Mayerich D, and Bhargava R. Application of Vibrational Spectroscopy and Imaging to Point-of-Care Medicine: A Review. *Appl Spectrosc Rev.* 72(S1) (2018) 52–84.
 7. Khoshmanesh A, Christensen D, Perez-Guaita D, Iturbe-Ormaetxe I, O'Neill SL, McNaughton D, Wood BR. Screening of Wolbachia Endosymbiont Infection in *Aedes aegypti* Mosquitoes Using Attenuated Total Reflection Mid-Infrared Spectroscopy. *Anal Chem.* 89 (10) (2017) 5285–5293.
 8. Abe M, Kitagawa T, and Kyogoku Y. Resonance Raman spectra of octaethylporphyrinatoNi(II) and mesodeuterated and ¹⁵N substituted derivatives. II. A normal coordinate analysis. *J Chem Phys.* 69 (1978) 4526-4534.
 9. Nakamoto K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds.* John Wiley & Sons, 1997.
 10. Kitagawa T, Ozaki Y. *Infrared and Raman Spectra of Metalloporphyrins, Structure and Bonding.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1987.

11. Tu A. T., Use of Raman Spectroscopy in Biological Compounds, J Chin Chem Soc. 50 (2003) 1-10.
12. Twardowski J. Biospektroskopia. PWN, Warszawa, 1990.

2. Hipoteza badawcza

Metody spektroskopii ramanowskiej i EPR, które są dobrymi narzędziami analitycznymi do badania krwinek czerwonych, mogą umożliwić przybliżenie mechanizmu malarii, także w zależności od rodzaju wywołującego je zarodźca. Może to stanowić przyczynek do dalszych badań w tym kierunku.

3. Cel pracy

Celem mojej pracy była:

1. Analiza procesu rozpadu erytrocytów pobranych od pacjentów zarażonych *P. falciparum* w porównaniu do grupy kontrolnej metodą spektroskopii ramanowskiej.
2. Ocena możliwości wykorzystania spektroskopii ramanowskiej w poznaniu zmian strukturalnych w erytrocytach w krwi pobranej od pacjentów zarażonych malarią w zależności od rodzaju atakującego zarodźca. Ocena czy spektroskopowo można uzyskać wgląd w aktywność *P. falciparum* i *P. vivax*?
3. Ocena możliwości wykorzystania spektroskopii EPR w ocenie zmian erytrocytów wywołanych aktywnością *P. falciparum*.
4. Charakterystyka grupy badanej, czyli pacjentów z rozpoznana malarią hospitalizowanych w Oddziale Klinicznym Chorób Zakaźnych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie w latach 2012-2023.

4. Materiał i metody

4.1 Ogólna charakterystyka pacjentów z malarią uczestniczących w badaniu

W badaniu uczestniczyli pacjenci hospitalizowani w Oddziale Klinicznym Chorób Zakaźnych i Tropikalnych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie z rozpoznaniem malarii w latach 2012-2023. Ich łączna liczba wynosiła 29, natomiast 3 pacjentów było hospitalizowanych dwukrotnie. Łączna liczba pacjentów stanowi więc reprezentatywną grupę pacjentów malarycznych, biorąc pod uwagę średnią ilość przypadków odnotowaną w tych latach w Polsce. Wśród pacjentów dominowali mężczyźni (21 pacjentów), kobiet natomiast było 8. Średnia wieku pacjentów wynosiła około 37 lat, najmłodszy pacjent miał 18 lat, najstarszy 63 lata. Wszyscy pacjenci mieli potwierdzoną malarię za pomocą szybkiego testu na malarię oraz badania parazytologicznego rozmazu krwi, barwionego metodą Giemsy. U jednego pacjenta ze względu na niską parazytamię, niemożliwe było określenie jej stopnia. U każdej osoby wykonywano konieczne dodatkowe badania laboratoryjne w tym m.in. morfologię krwi, ocenę wskaźników wątrobowych, parametrów krzepnięcia, elektrolitów, wskaźniki wydolności nerek, parametry zapalne. Leczenie było zgodne z wytycznymi WHO, zależne od ciężkości malarii oraz rodzaju zarodźca ją wywołującego.

Badania były wykonane zgodnie ze standardami dobrej praktyki lekarskiej (Good Clinical Practice), zgodnie z wytycznymi Deklaracji Helsińskiej. Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego. Każdy uczestnik potwierdzał pisemnie świadomą zgodę na udział w badaniu.

4.2 Ogólna charakterystyka grupy kontrolnej

Grupa kontrolna składała się z 39 osób. Wśród nich 19 osób to kobiety, natomiast 20 osób stanowili mężczyźni. Najstarsza osoba była w wieku 63 lat, natomiast najmłodsza 19, średnia wieku wynosiła 39 lat. Z wywiadu wynika, że nie podróżowali oni do krajów tropikalnych. W wykonanych podstawowych badaniach krwi morfologia z rozmazem i ALT nie stwierdzano istotnych odchyleń od normy. Ochotnicy pozyskiwani byli z pomocą pracowników Laboratorium ANALIZA w Myślenicach, a ponadto wśród rodziny i znajomych.

Badania były wykonane zgodnie ze standardami dobrej praktyki lekarskiej (Good Clinical Practice), zgodnie z wytycznymi Deklaracji Helsińskiej. Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego. Każdy uczestnik potwierdzał pisemnie świadomą zgodę na udział w badaniu.

4.3. Spektroskopia Ramanowska

Do pomiaru widma ramanowskiego pojedynczej komórki użyto spektrometru ramanowskiego Renishaw inVia, pracującego w trybie konfokalnym, wyposażonego w mikroskop optyczny Leica. Wiązka z lasera jonowego Ar^+ (Modu laser) o długości fali 514,5 nm oraz lasera diodowego generującego wiązkę o długości 785 nm (HP NIR) została skupiona przez obiektyw o 100-krotnym powiększeniu i dużej aperturze numerycznej ($NA = 0,9$). Rozproszone światło Ramana było analizowane przez siatkę dyfrakcyjną z 2400 rowkami na mm dla linii 514,5 nm, a z 1200 rowkami na mm dla linii 785 nm. Moc lasera była utrzymywana na niskim poziomie ok. 1–3 mW w próbce, aby zapewnić minimalną inwazję do komórek. Rozdzielczość spektralna jest $< 0.5 \text{ cm}^{-1}$ FWHM (full- width half maximum) dla długości fali 532 nm. Wstępne

opracowanie widm Ramana, wygładzanie i korekcję linii bazowej przeprowadzono za pomocą oprogramowania Renishaw WiRE 3.4 i 2.0.

4.4. Spektroskopia EPR

Pomiary EPR przeprowadzono za pomocą spektrometru X-band Bruker ELEXSYS 500 (Karlsruhe, Niemcy) z modulacją pola 100 kHz. Próbkę pełnej krwi pobranej od pacjentów zarażonych *P. falciparum* przechowywane w lodówce przez 1 do 6 tygodni szczelnie zamknięto w probówkach EPR, a widma rejestrowano przy 77 K z amplitudą modulacji 0,5 mT.

4.5. Metoda PCA

Metoda PCA została wykorzystana do statystycznej analizy widm ramanowskich grupy zainfekowanych zarodźcem krwinek czerwonych. Wykorzystano program Unscrambler X, v.10.0.1, Camo Software, Oslo, Norwegia. Dane pomiarowe tj. widma ramanowskie otrzymane w pomiarach, wstępnie opracowano przeprowadzając korektę linii bazowej, gładzenie widm oraz normalizację. Tak przygotowane dane zostały porównane w wybranych zakresach widma modelując dane w zależności od typu pasożyta oraz etapu choroby. Metoda PCA pozwoliła określić podobieństwa i różnice w analizowanych grupach badawczych.

4.6. Metoda 2D

Uogólniona analiza korelacji 2D została oparta na metodzie Nody i wykorzystuje widma Ramana i EPR jako dane wejściowe do generowania map korelacji. Za bodziec zewnętrzny dla widm Ramana erytrocytów oraz dla widm EPR krwi pełnej był obrany czas. Różnice w mocy lasera (~1 – 5mW), podczas wykonywania widm Ramana cieni erytrocytów, uznano za zewnętrzne zaburzenie. Wszystkie zebrane widma korygowano zgodnie z procedurą

bazową. Pakiet oprogramowania do obliczania i prezentacji widm 2D jest wbudowany w oprogramowanie Win-IR Pro (Bio-Rad).

4.7 Analiza statystyczna wyników badań laboratoryjnych

Analizy statystycznej dokonano przy użyciu pakietu IBM SPSS Statistics 25.

- Celem sprawdzenia czy występują istotne statystycznie pomiędzy dwoma niezależnymi grupami osób, zastosowano test t studenta dla prób niezależnych, bądź jego nieparametryczny odpowiednik jakim jest test U Manna Whitneya.

- Przy użyciu analizy korelacji Spearmana sprawdzono, czy występuje istotny statystycznie związek pomiędzy analizowanymi zmiennymi.

- W analizie statystycznej uwzględniono następujące statystyki opisowe: średnią, odchylenie standardowe, minimum, maksimum, medianę, pierwszy oraz trzeci kwartył.

Za poziom istotny statystycznie przyjęto wartość $p < 0,05$.

5. Wyniki

5.1. Ogólna charakterystyka pacjentów biorących udział w badaniu

U większości pacjentów, czyli u 18 osób (3 osoby były dwukrotnie hospitalizowane) zidentyfikowano malarię o etiologii *P. falciparum*, u pozostałych dominowało zarażenie *P. vivax*- 7 pacjentów, jeden przypadek *P. malariae* (lub *ovale*). W dwóch przypadkach rozpoznano zarażenie mieszane- jeden *P. falciparum* z *P. malariae*, drugi z niezidentyfikowanym drugim gatunkiem. U jednego pacjenta parazytemia była na tyle niska, iż nie udało się zidentyfikować gatunku (Tabela 5.1.1).

| Gatunek <i>Plasmodium</i> | Liczba przypadków | procent przypadków |
|--|-------------------|--------------------|
| <i>P. falciparum</i> | 18 | 62% |
| <i>P. vivax</i> | 7 | 24% |
| Zakażenie mieszane <i>P. falciparum</i> i inny gatunek | 2 | 7% |
| <i>P. malariae/ovale</i> | 1 | 3% |
| Niezidentyfikowany | 1 | 3% |

Tabela 5.1.1 Czynniki wywołujące malarię wśród badanych pacjentów.

Wśród pacjentów dominowali mężczyźni -21 pacjentów (72%), kobiet natomiast było- 8 (28%). Średnia wieku pacjentów wynosiła 37 lat, najmłodszy pacjent miał- 18 lat, najstarszy- 63 lata. W badanej grupie większość osób nie stosowała profilaktyki przeciwmalarycznej lub niepełną profilaktykę (łącznie 90%). Jedynie 3 pacjentów stosowało profilaktykę przeciwmalaryczną. Wśród nie stosujących profilaktyki było 2 obywateli krajów afrykańskich oraz 2 osoby z długoletnim pobytem w kraju endemicznym. Jedna osoba przebywała w kraju, którym profilaktyka nie jest konieczna. (Tabela 5.1.2)

| Stosowana profilaktyka przeciwmalaryczna | Liczba pacjentów | procent pacjentów |
|---|-------------------------|--------------------------|
| Stosowana pełna profilaktyka przeciwmalaryczna prawidłowo | 3 | 10% |
| Stosowana profilaktyka przeciwmalaryczna, ale nie przez cały okres pobytu lub przerwana | 2 | 7% |
| Wieloletni pobyt lub endemiczny mieszkaniec | 4 | 14% |
| W rejonie pobytu profilaktyka lekami nie jest konieczna | 1 | 3% |
| Brak profilaktyki przeciwmalarycznej w rejonie, w którym powinna być stosowana | 19 | 66% |

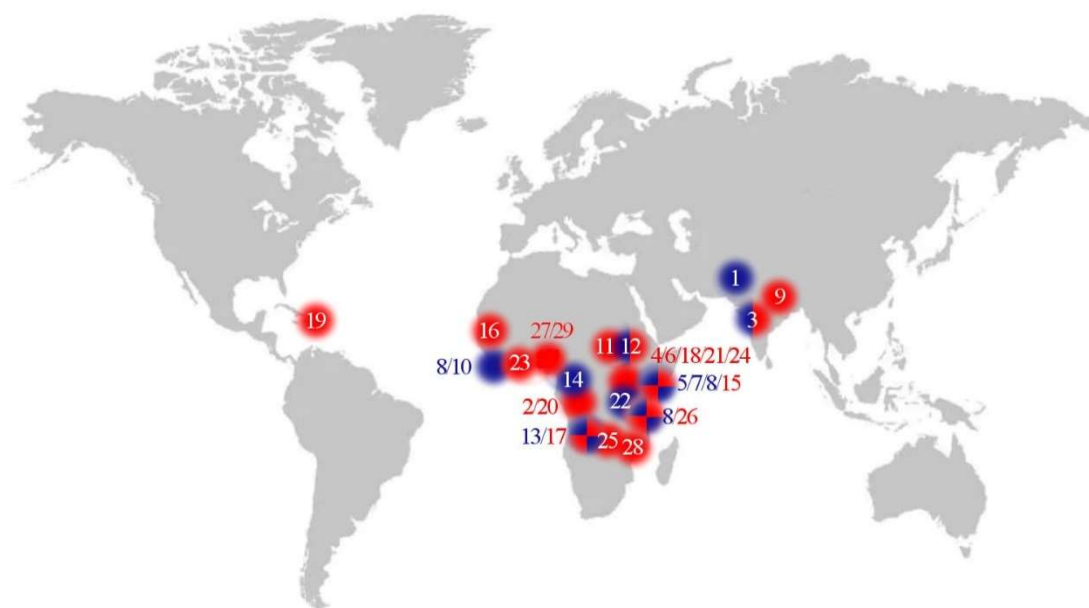
Tabela. 5.1.2. Stosowanie profilaktyki przeciwmalarycznej u pacjentów z malarią biorących udział w badaniu.

Destynacją podróży najczęściej był kontynent Afrykański, na drugim miejscu Azjatycki, jeden pacjent podróżował na Karaiby, do Dominikany (Tabela 5.1.3.) Poglądowe lokalizacje ukazuje

Ryc. 5.1.1.

| Kontynent podróży | Liczba pacjentów | procent pacjentów |
|-------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Afryka | 25 | 86% |
| Azja | 3 | 10% |
| Ameryka Północna (Dominikana) | 1 | 3% |

Tabela 5.1.3. Miejsce podróży pacjentów z malarią biorących udział w badaniu (kontynent).



LEGENDA

- *P. falciparum*
- *P. vivax*
- mieszane
- *P. vivax* lub *P. falciparum* (w zależności od pacjenta, zgodnie z kolorem numeru pacjenta)
- 1/1/1 numer badanego pacjenta

* Rycina Mapy Świata na podstawie <https://www.fototapety.com/mapa-szarego-wiata.html> [dostęp: 28.01.2023]

Rycina 5.1.1 Destynacje podróży z oznaczonym gatunkiem wywołującym malarię wśród pacjentów uczestniczących w badaniu.

Cel podróży najczęściej miał charakter zarobkowy, sezonowy. Byli także podróżujący mieszkańcy endemicznych regionów malarycznych, Polacy, którzy postanowili zamieszkać w krajach tropikalnych na stałe, a także turyści. (Tabela 5.1.4.).

| Cel podróży | Liczba pacjentów | procent pacjentów |
|---|-------------------------|--------------------------|
| Praca zarobkowa sezonowa | 12 | 41% |
| Turystyka | 4 | 14% |
| Mieszkaniec endemiczny | 5 | 17% |
| Polacy, którzy przeprowadzili się do kraju endemicznego i na stałe tam pracują | 3 | 10% |
| Brak danych | 5 | 17% |

Tabela 5.1.4. Cel podróży pacjentów z rozpoznaną malarią biorących udział w badaniu.

5.2. Wyniki standardowych badań laboratoryjnych pacjentów biorących udział w badaniu

W badaniu wzięło udział 68 osób w tym 29 w grupie badanej i 39 w grupie kontrolnej. W pierwszym kroku sprawdzono, czy występują istotne statystycznie różnice między obiema grupami osób w zakresie analizowanych parametrów. Dla poziomu hemoglobiny zastosowano parametryczny odpowiednik testu statystycznego ze względu na brak zaburzeń normalności rozkładu oraz jednorodne wariacje w porównywanych grupach osób. W przypadku pozostałych zmiennych, był to test U Manna-Whitneya ze względu na znaczne zaburzenia normalności rozkładu. Istotne statystycznie różnice dotyczą poziomu hemoglobiny, ALT oraz liczby płytek. W grupie badanej poziom hemoglobiny oraz liczba płytek okazały się być istotnie statystycznie niższe w odniesieniu do grupy kontrolnej. Przeciwna sytuacja jest charakterystyczna dla poziomu ALT. Największe różnice dotyczą liczby płytek krwi oraz poziomu hemoglobiny. Wielkość efektu wskazuje, iż poszczególne parametry w znaczący sposób różnicują obydwie grupy osób. Dotyczy to głównie poziomu Hb oraz liczby płytek krwi.

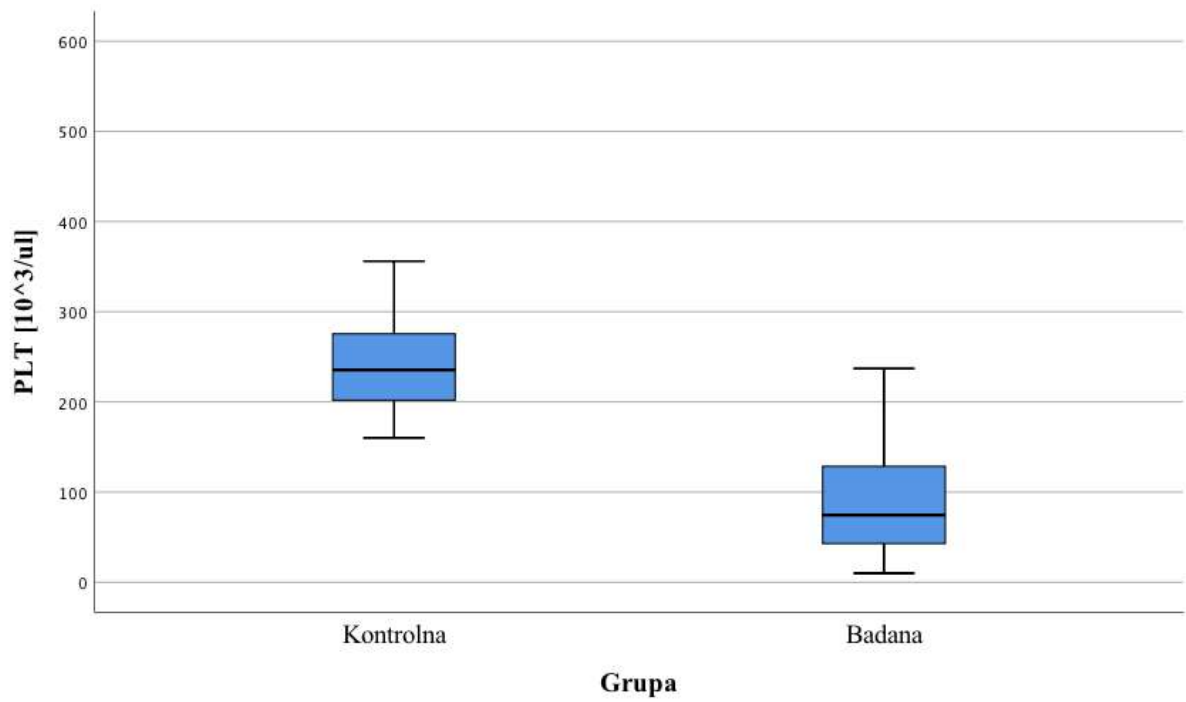
| Zmienna | Grupa | Min | Max | Q1 | Me | Q3 | Wynik testu statystycznego* |
|------------------------------|-----------|------|------|-------|------|------|---|
| WBC [10 ³ /ul] | Kontrolna | 4,3 | 12,9 | 5,3 | 5,9 | 7,2 | U = 475,5; p = 0,46 |
| | Badana | 2,5 | 15,6 | 4,9 | 6,4 | 7,7 | |
| Hb [g/dl] | Kontrolna | 11,3 | 17,3 | 13,53 | 15 | 15,5 | t(62) = 6,88; p < 0,001' d _{Cohen} = 1,72 |
| | Badana | 6,9 | 14,5 | 10 | 11,9 | 13,3 | |
| PLT [10 ³ /ul] | Kontrolna | 51 | 356 | 201 | 236 | 276 | U = 103,5; p < 0,001; η ² = 0,47 |
| | Badana | 10 | 537 | 43 | 75 | 133 | |
| ALT [U/l] | Kontrolna | 12 | 61 | 19 | 28 | 48 | U = 137,5; p = 0,002; η ² = 0,19 |
| | Badana | 14 | 2966 | 34 | 61 | 152 | |

*Test t-studenta dla prób niezależnych/test U Manna-Whitneya

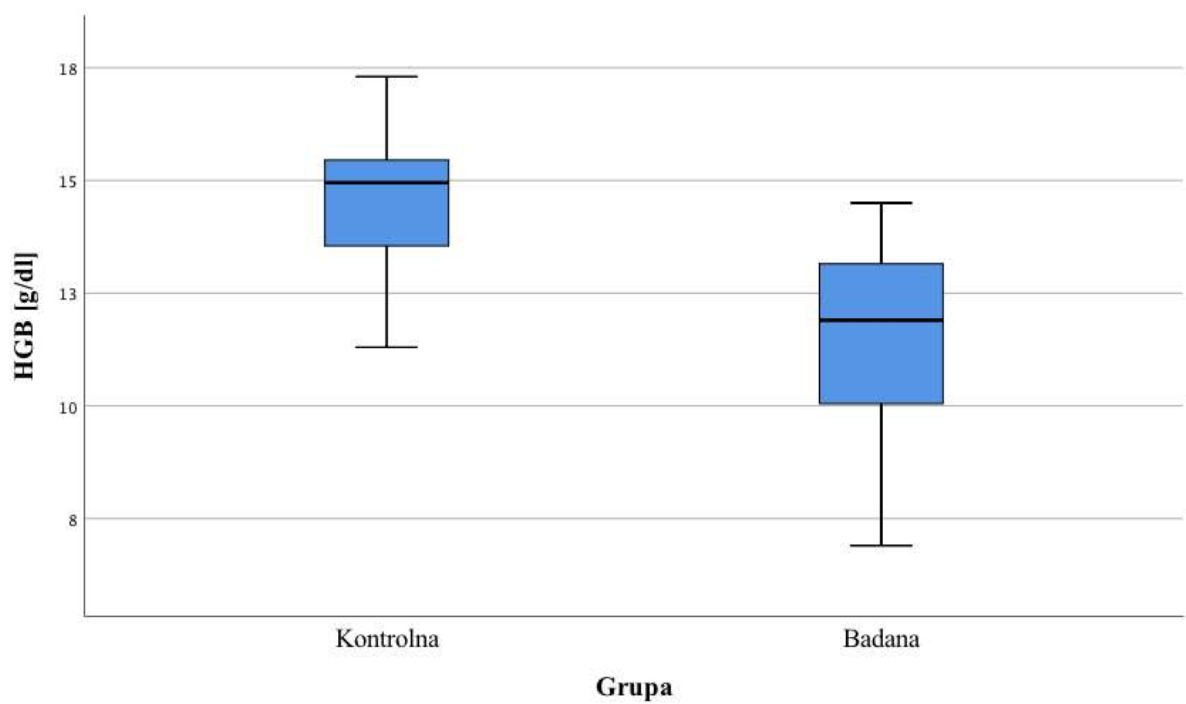
Tabela 5.2.1. Statystyki opisowe dotyczące parametrów laboratoryjnych w zakresie których dokonywano porównania między grupą kontrolną oraz badaną.

Me – mediana, Min – minimum, Max – maksimum, Q1 - pierwszy kwartył, Q3 - trzeci kwartył

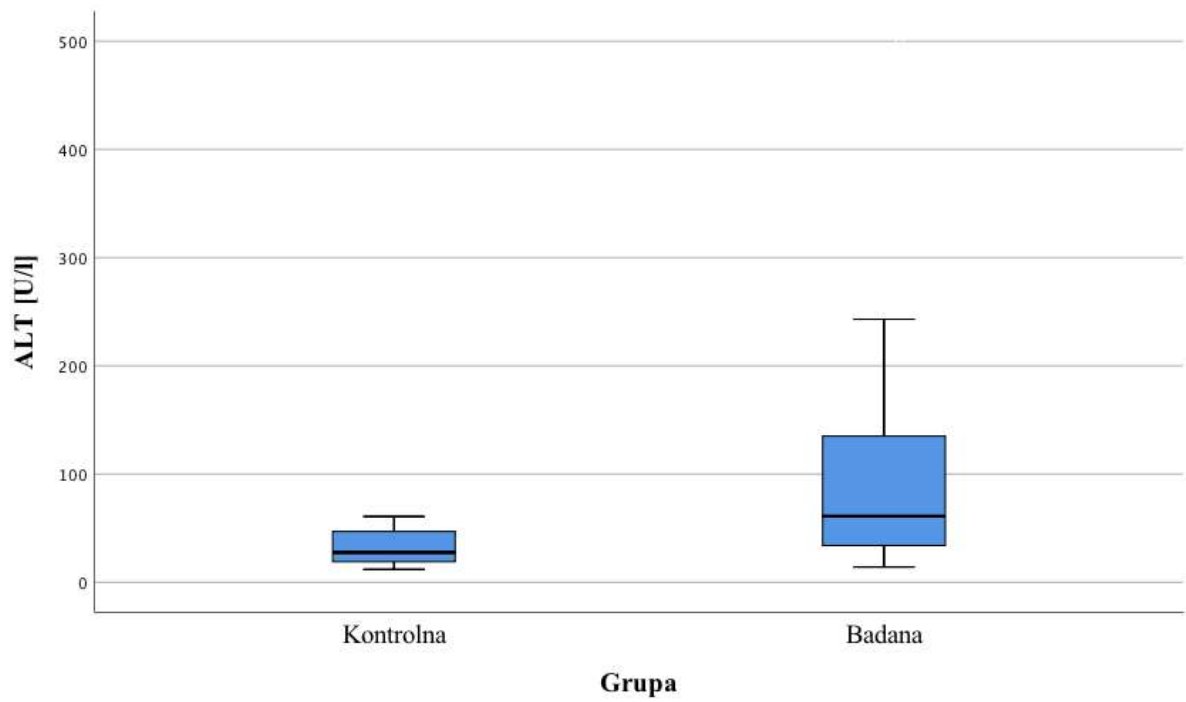
Istotne statystycznie różnice zobrazowano dodatkowo w formie wykresów.



Rycina 5.2.1. Wykres liczby płytek krwi w porównywanych grupach osób.



Rycina 5.2.2. Wykres poziomu hemoglobiny w porównywanych grupach osób.



Rycina 5.2.3. Wykres poziomu ALT w porównywanych grupach osób.

Kolejna analiza dotyczy grupy badanej. W poniższej tabeli umieszczono statystyki opisowe dotyczące dodatkowych (pozostałych) analizowanych parametrów w badanej grupie osób.

| Zmienna | Min | Max | Q1 | Me | Q3 |
|-----------------------|-------|-------|------|------|------|
| Wiek [lata] | 18 | 63 | 29 | 34 | 47 |
| CRP [mg/l] | 1 | 264 | 19 | 85 | 122 |
| PCT [ng/ml] | 0,1 | 32,6 | 0,4 | 2,2 | 8,1 |
| Parazytemia [%] | 0,001 | 27,55 | 0,09 | 0,66 | 2,88 |
| AST | 18 | 578 | 27 | 61 | 211 |
| ALP | 41 | 133 | 61 | 6 | 10 |
| INR | 0,88 | 1,45 | 1,04 | 1,13 | 1,23 |
| APTT | 13,3 | 63,1 | 29,3 | 33,5 | 39,9 |
| Kreatynina | 49 | 121 | 67,4 | 87 | 101 |
| WBC [10^3 /ul] min | 1,6 | 15,6 | 2,7 | 3,7 | 4,4 |

Tabela 5.2.2. Statystyki opisowe dotyczące analizowanych parametrów w badanej grupie osób.

Kolejna analiza dotyczy porównania dwóch najczęstszych gatunków malarii. 65,6% przypadków (n = 21) stanowiło *P. falciparum*, zaś 21,9% (n = 7) *P. vivax*. Pojedyncze przypadki obejmowały *P. ovale*/*P. malariae* (n = 1), zarażenie mieszane *P. falciparum* oraz *P. malariae* (n = 1), zarażenie mieszane *P. falciparum* oraz 1 niezidentyfikowanego gatunku (n = 1) oraz jedną malarię o bardzo niskiej parazytemii, uniemożliwiającą rozpoznanie gatunku (n = 1). Nie zaobserwowano występowania istotnych statystycznie różnic pomiędzy dwoma grupami osób. Ma to zapewne związek z ograniczeniem niniejszego badania, jakim jest niska liczebność *P. vivax*.

| Zmienna | Gatunek malarii | Min | Max | Q1 | Me | Q3 | Wynik testu statystycznego* |
|----------------------------------|----------------------|-------|-------|------|------|-------|-----------------------------|
| WBC max [10 ³ /ul] | <i>P. vivax</i> | 4,6 | 9,1 | 5,8 | 7,2 | 7,8 | U = 52; p = 0,25 |
| | <i>P. falciparum</i> | 2,5 | 15,6 | 4,8 | 6,3 | 7 | |
| Hb [g/dl] | <i>P. vivax</i> | 9,2 | 13,4 | 11,7 | 12,1 | 12,7 | U = 63; p = 0,58 |
| | <i>P. falciparum</i> | 6,9 | 14,3 | 9,8 | 10,9 | 13,3 | |
| PLT [10 ³ /ul] | <i>P. vivax</i> | 43 | 261 | 65 | 72 | 232 | U = 55,5; p = 0,34 |
| | <i>P. falciparum</i> | 10 | 537 | 23 | 52 | 129 | |
| ALT [U/l] | <i>P. vivax</i> | 18 | 2966 | 19 | 46 | 102 | U = 63,5; p = 0,6 |
| | <i>P. falciparum</i> | 14 | 490 | 37 | 64 | 181 | |
| Wiek | <i>P. vivax</i> | 23 | 59 | 31 | 33 | 54 | U = 70; p = 0,85 |
| | <i>P. falciparum</i> | 22 | 63 | 28 | 40 | 49 | |
| CRP [mg/l] | <i>P. vivax</i> | 1,13 | 128,5 | 2,8 | 79,7 | 119,3 | U = 53; p = 0,56 |
| | <i>P. falciparum</i> | 3,9 | 263,9 | 18,9 | 84,7 | 120 | |
| PCT [ng/ml] | <i>P. vivax</i> | 0,06 | 32,6 | 0,06 | 4,74 | - | U = 20; p = 0,77 |
| | <i>P. falciparum</i> | 0,15 | 25,83 | 0,54 | 2,2 | 8,14 | |
| Parazytemia [%] | <i>P. vivax</i> | 0,2 | 3 | 0,21 | 0,72 | 1,98 | U = 49; p = 0,95 |
| | <i>P. falciparum</i> | 0,001 | 27,55 | 0,04 | 0,66 | 4,12 | |
| AST | <i>P. vivax</i> | 18 | 333 | 18 | 38 | - | U = 13; p = 0,47 |
| | <i>P. falciparum</i> | 24 | 578 | 34 | 79 | 211 | |
| ALP | <i>P. vivax</i> | 64 | 103 | 64 | 65 | - | U = 12; p = 0,78 |
| | <i>P. falciparum</i> | 41 | 133 | 55 | 67 | 118 | |
| INR | <i>P. vivax</i> | 0,88 | 1,45 | 0,97 | 1,11 | 1,35 | U = 50,5; p = 0,9 |

| | | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------|------|------|-------|-------|-------|------------------|
| | <i>P. falciparum</i> | 0,99 | 1,44 | 1,04 | 1,12 | 1,21 | |
| APTT | <i>P. vivax</i> | 28 | 46,2 | 29,33 | 33,35 | 43 | U = 38; p = 0,77 |
| | <i>P. falciparum</i> | 13,3 | 63,1 | 29,7 | 34,6 | 41,15 | |
| Kreatynina | <i>P. vivax</i> | 58 | 108 | 74 | 100 | 104 | U = 58; p = 0,41 |
| | <i>P. falciparum</i> | 49 | 121 | 65 | 85 | 98 | |
| WBC min [10 ³ /ul] | <i>P. vivax</i> | 3,1 | 5,3 | 3,6 | 3,9 | 4,9 | U = 39; p = 0,07 |
| | <i>P. falciparum</i> | 1,6 | 15,6 | 2,5 | 3 | 4,2 | |

*Test U Manna-Whitneya

Tabela 5.2.3. Statystyki opisowe dotyczące analizowanych parametrów w grupie osób z *P. vivax* oraz *P. falciparum*.

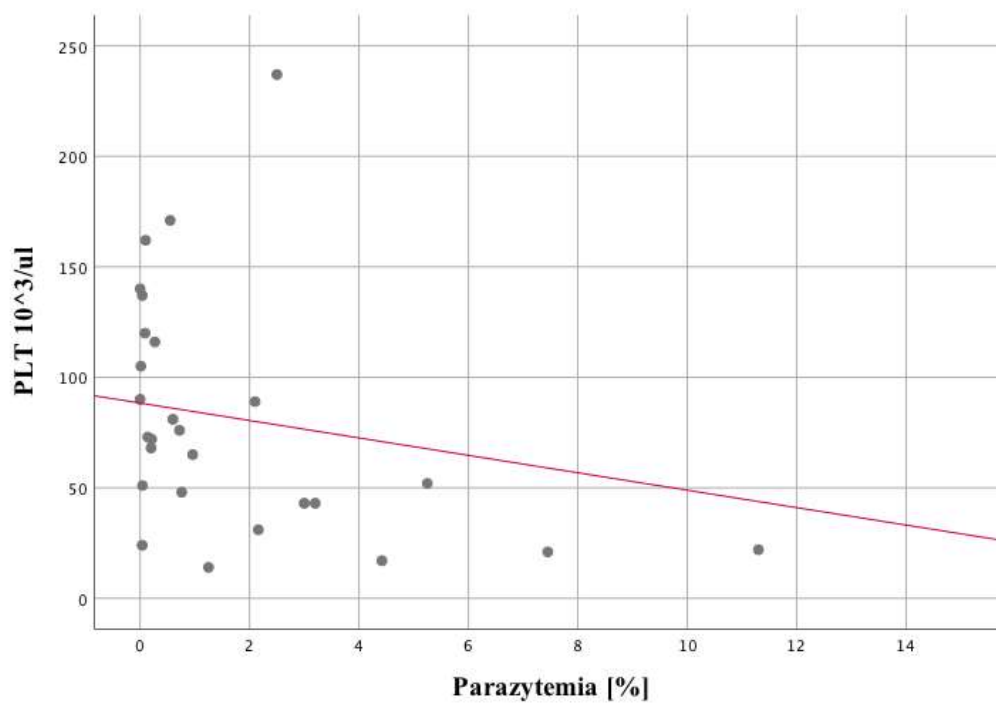
W badanej grupie osób sprawdzono dodatkowo czy występuje istotny statystycznie związek między parazytemią, a analizowanymi zmiennymi. Zaobserwowano występowanie 3 istotnych statystycznie związków. Im większa parazytemia, tym mniejsza liczba płytek oraz wyższy poziom ALT oraz CRP. Najsilniejszy związek dotyczył CRP.

| Zmienna | Wynik testu statystycznego* |
|-------------------------------|--|
| WBC [10 ³ /ul] max | $r_s = 0,29; p = 0,13$ |
| Hb [g/dl] | $r_s = -0,34; p = 0,08$ |
| PLT [10 ³ /ul] | $r_s = -0,59; p = 0,001$ |
| ALT [U/l] | $r_s = 0,6; p = 0,001$ |

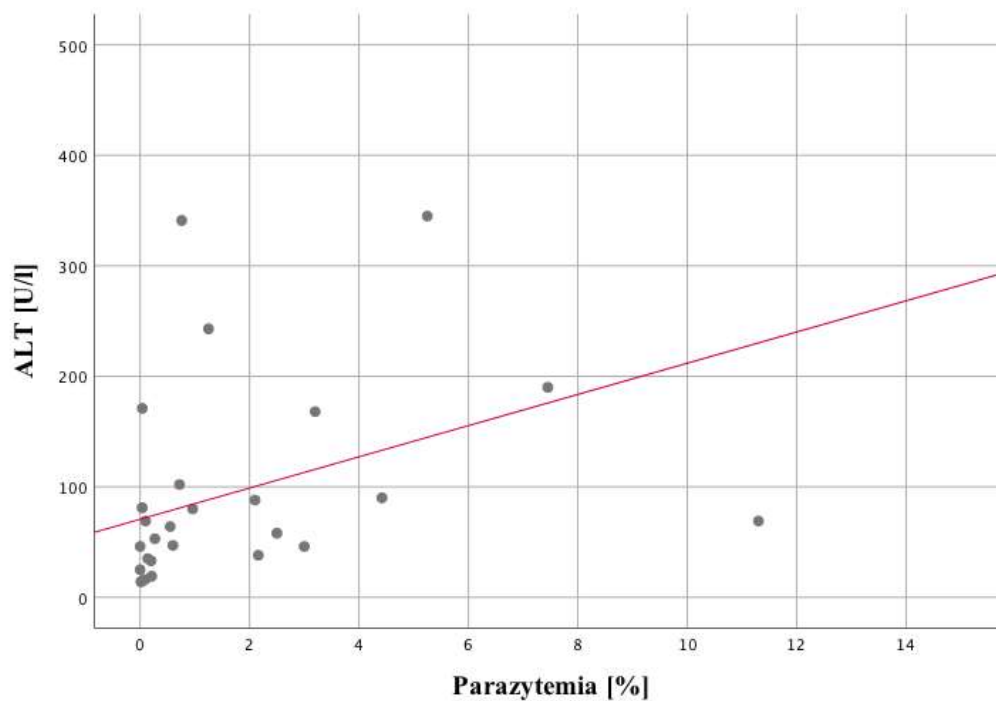
| | |
|-----------------------|---|
| | |
| Wiek | $r_s = 0,16; p = 0,42$ |
| CRP [mg/l] | $r_s = 0,63; p = 0,001$ |
| PCT [ng/ml] | $r_s = 0,43; p = 0,07$ |
| AST | $r_s = 0,48; p = 0,09$ |
| ALP | $r_s = 0,6; p = 0,051$ |
| INR | $r_s = 0,05; p = 0,81$ |
| APTT | $r_s = 0,04; p = 0,87$ |
| Kreatynina | $r_s = 0,25; p = 0,2$ |
| WBC [10^3 /ul] min | $r_s = 0,12; p = 0,56$ |

*Korelacja Spearmana

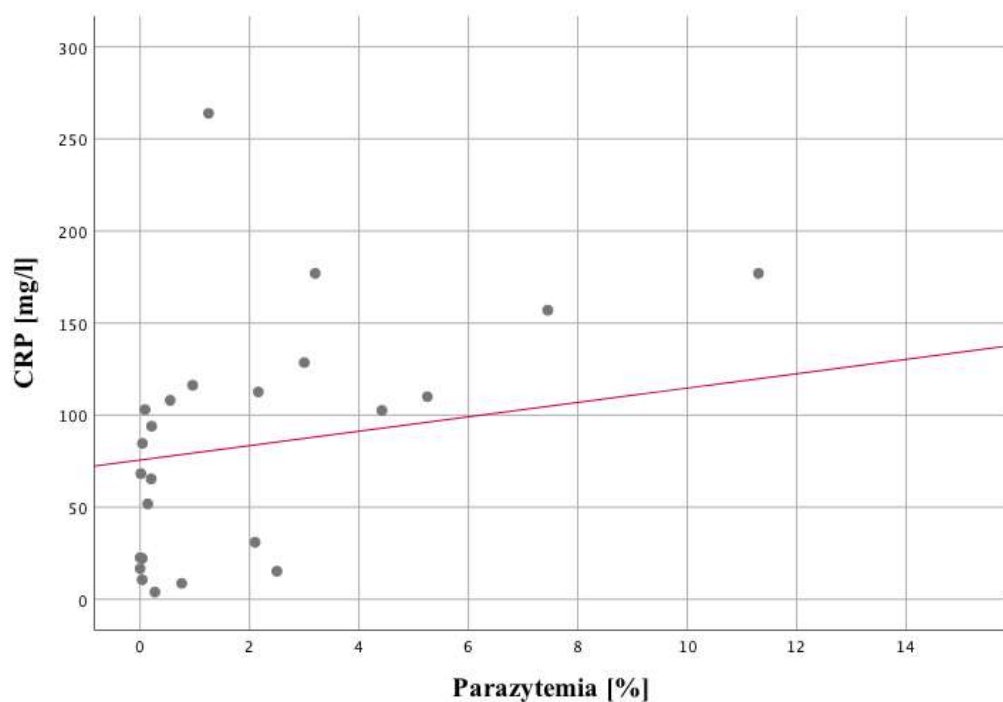
Tabela 5.2.4. Związek między parazytami w badanej grupie osób, a analizowanymi zmiennymi.



Rycina 5.2.4. Wykres- związek między parazytemią, a liczbą płytek krwi w badanej grupie osób.



Rycina 5.2.5. Wykres- związek między parazytemią, a poziomem ALT w badanej grupie osób.



Rycina 5.2.6. Wykres - związek między parazytemią, a poziomem CRP.

Jeżeli chodzi o grupę badaną, zaobserwowano jeszcze kilka ważnych kwestii związanych z wartościami referencyjnymi. Na uwagę zwraca fakt, że w badanej grupie osób:

- u 16 z nich, czyli połowie występował poziom Hb poniżej 12 g/dl,
- u 22 z nich (68,8%) występował poziom ALT powyżej 41 U/l
- u 26 (89,7%) z nich występował poziom CRP powyżej 5 mg/l

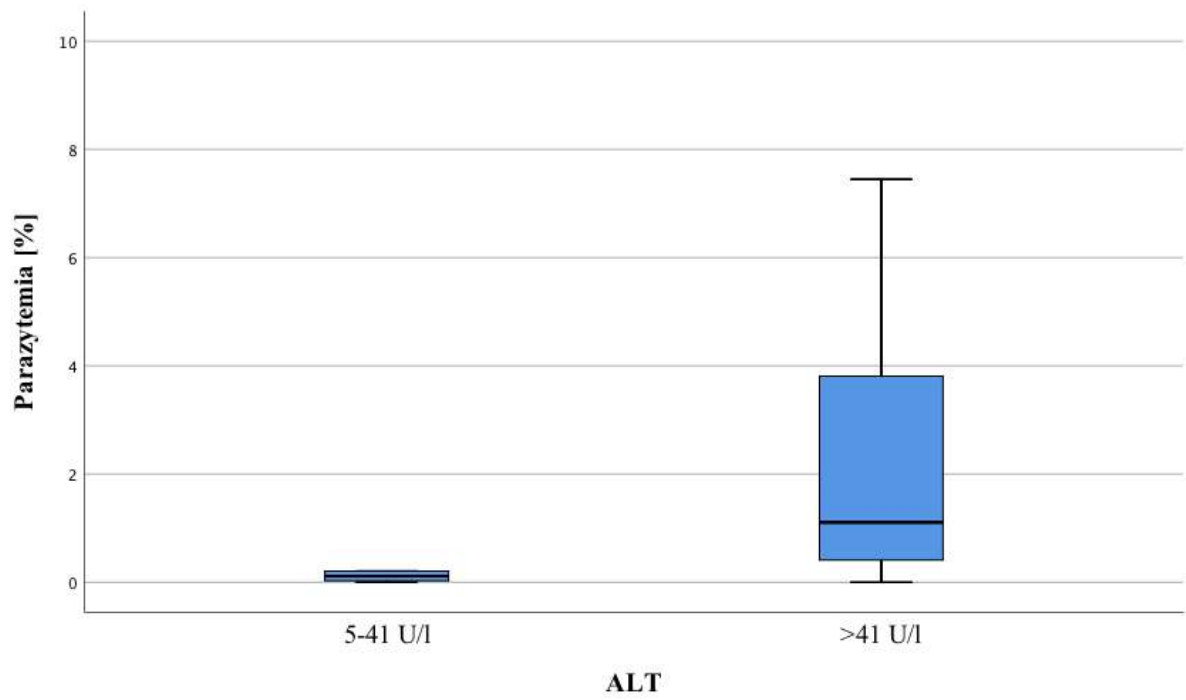
Potwierdza to uzyskane wcześniej wyniki (np. istotne statystycznie związki z parazytemią) wskazujące na duże znaczenie tychże parametrów w badanej grupie osób. Zaobserwowano występowanie istotnych statystycznie różnic między osobami o prawidłowym oraz podwyższonym poziomie ALT w zakresie parazytemii. W grupie osób z podwyższonym poziomem ALT poziom parazytemii był wyższy w odniesieniu do osób z prawidłowym

poziomem tego parametru. W przypadku hemoglobiny nie stwierdzono występowania istotnych statystycznie różnic. W przypadku zaś poziomu CRP nie dokonywano porównania ze względu na fakt, iż u wszystkich prawie osób występował podwyższony poziom tego parametru.

| Zmienna | | M | SD | Min | Max | Q1 | Me | Q3 | Wynik testu statystycznego* |
|---------|------------|------|------|-------|-------|------|------|------|-------------------------------------|
| Hb | <12 g/dl | 4,03 | 7,12 | 0,01 | 27,55 | 0,09 | 2,13 | 4,63 | U = 63; p = 0,11 |
| | 12-17 g/dl | 1,32 | 2,99 | 0,001 | 11,3 | 0,08 | 0,24 | 0,81 | |
| ALT | 5-41 U/l | 0,35 | 0,73 | 0,001 | 2,16 | 0,02 | 0,12 | 0,21 | U = 31,5; p = 0,01; $\eta^2 = 0,22$ |
| | >41 U/l | 3,6 | 6,34 | 0,001 | 27,55 | 0,34 | 1,11 | 4,12 | |

*Test U Manna-Whitneya

Tabela 5.2.5. Statystyki opisowe dotyczące parazytemii w grupie osób z podwyższonym poziomem Hb oraz ALT.



Rycina 5.2.7. Wykres- parazytemia w grupie osób z prawidłowym oraz podwyższonym poziomem ALT.

5.3. Leczenie pacjentów z grupy badanej

Pacjenci należący do grupy badawczej leczenia byli zgodni z normami i wytycznymi, w zależności od rodzaju zarodźca wywołującego malarię oraz wytycznych dla regionu endemicznego, w którym doszło do zakażenia. Przy wyborze kuracji brano także pod uwagę stan kliniczny pacjenta, ewentualną wcześniejszą farmakologiczną profilaktykę przeciwmalaryczną i ciężkość przebiegu malarii.

Poniższe tabele przedstawiają sposób leczenia pacjentów, biorących udział w badaniu.

| Nazwa leku | Liczba pacjentów | Uwagi |
|-------------------------|------------------|---|
| artesunat <i>i.v.</i> | 10 | W każdym przypadku następową terapią doustną |
| artemeter +lumefantryna | 16 | Jako jedyna terapia lub następująca po stosowaniu artesunatu |
| atowakwon + proguanil | 5 | Żaden z leczonych w ten sposób pacjentów pacjentów nie stosował profilaktyki przeciwmalarycznej |
| doksycyklina | 2 | W obu przypadkach leczenie skojarzone |
| chinina | 1 | Leczenie stosowane w Szpitalu, z którego pacjent był przenoszony, jednak ze względu na działania niepożądane nie kontynuowano tego leczenia |
| prymachina | 1 | Wprowadzono i stosowano to leczenie empirycznie ze względu na obserwowany u pacjenta nawrót choroby |

Tabela 5.3.1 Leczenie pacjentów biorących udział w badaniu z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum*

| Nazwa leku | Liczba pacjentów | Uwagi |
|-------------------------|------------------|---|
| artemeter +lumefantryna | 1 | |
| atowakwon + proguanil | 3 | Żaden z leczonych w ten sposób pacjentów nie stosował profilaktyki przeciwmalarycznej |
| chlorochina | 3 | |
| prymachina | 7 | Stosowana u wszystkich pacjentów po zakończonym leczeniu |

Tabela 5.3.2 Leczenie pacjentów biorących udział w badaniu z rozpoznąną malarią wywołaną *P. vivax*

W przypadku pacjenta, u którego rozpoznano zakażenie *P. malariae* (*fovale*) w leczeniu zastosowano chlorochinę i prymachinę. W przypadku zarażeń mieszanych podawano- artemeter i lumefantrynę oraz prymachinę. W przypadku pacjenta z niezidentyfikowanym zarażeniem ze względu na niską parazytamię zastosowano empirycznie artemetr z lumefantryną oraz prymachinę.

Poza wspomnianym wyżej jednym nawrotem *P. falciparum* procedury stosowane w leczeniu okazały się skuteczne.

5.4. Wyniki badań spektroskopowych – spektroskopia Ramanowska

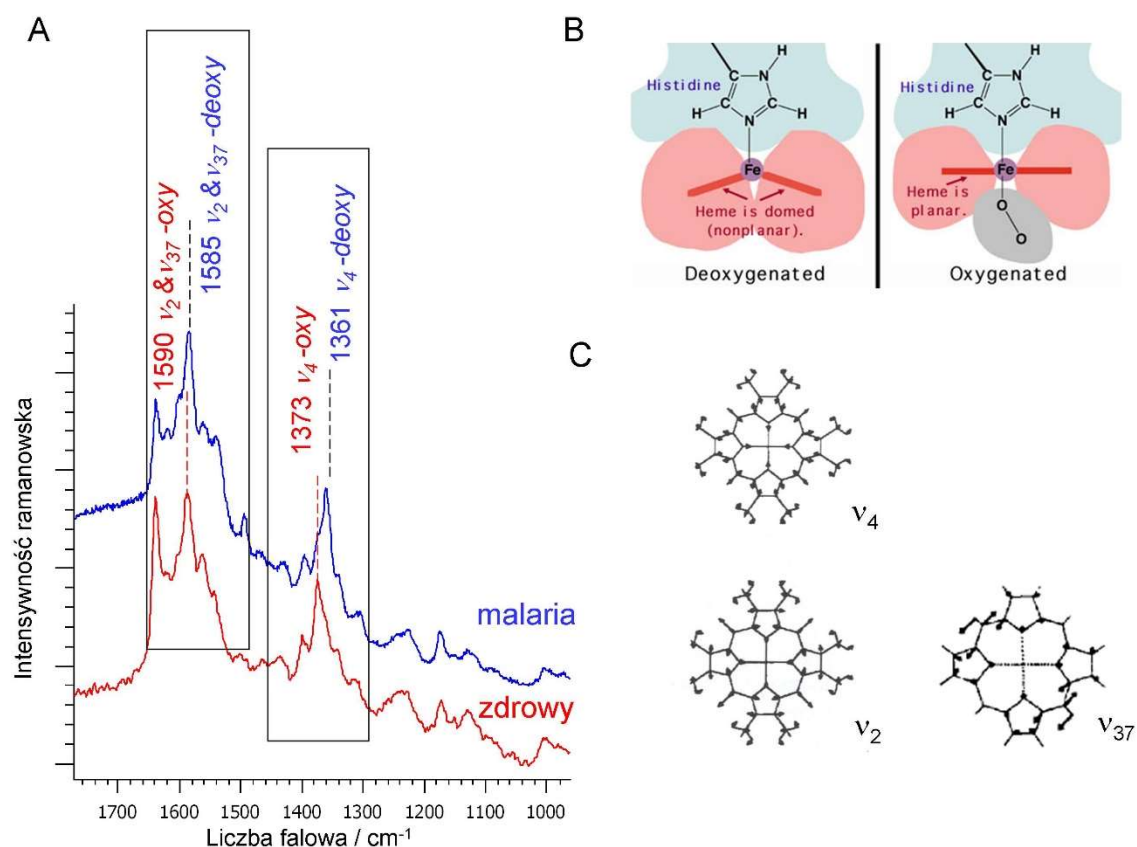
5.4.1 Pasma markerowe malarii w spektroskopii ramanowskiej [1-6]

Za pomocą spektroskopii ramanowskiej wykazano u pacjentów z rozpoznaną malarią zmianę struktury hemu, niezależnie od rozpoznania, zmiany występują zarówno u pacjentów zarażonych *P. falciparum*, jak i *P. vivax*, schemat pokazuje porównanie z pacjentem zdrowym. U chorych dominującą strukturą hemu jest hem nieutlenowany, który różni się od formy utlenowanej (Ryc. 5.4.1.1 A).

W badaniu Ramanowskim widać to jako zmianę pozycji charakterystycznych drgań hemu na Ryc. 5.4.1.1 C). Na niebiesko oznaczono widomo ramanowskie krwinki pacjenta chorego na malarię, a na czerwono zdrowej osoby.

Porównując widać wyraźnie intensywne pasmo drgań ν_2 i ν_{37} u pacjenta z rozpoznaną malarią - 1585 cm^{-1} , natomiast w zdrowej krwi - 1590 cm^{-1} . Drugie istotne pasmo markerowe to pasmo drgań ν_4 u pacjenta z rozpoznaną malarią - 1361 cm^{-1} , natomiast w zdrowej krwi - 1373 cm^{-1} . Podobne wyniki otrzymano wcześniej w badaniach nad hodowlami komórkowymi krwinek zarażanych laboratoryjnie malarią [1].

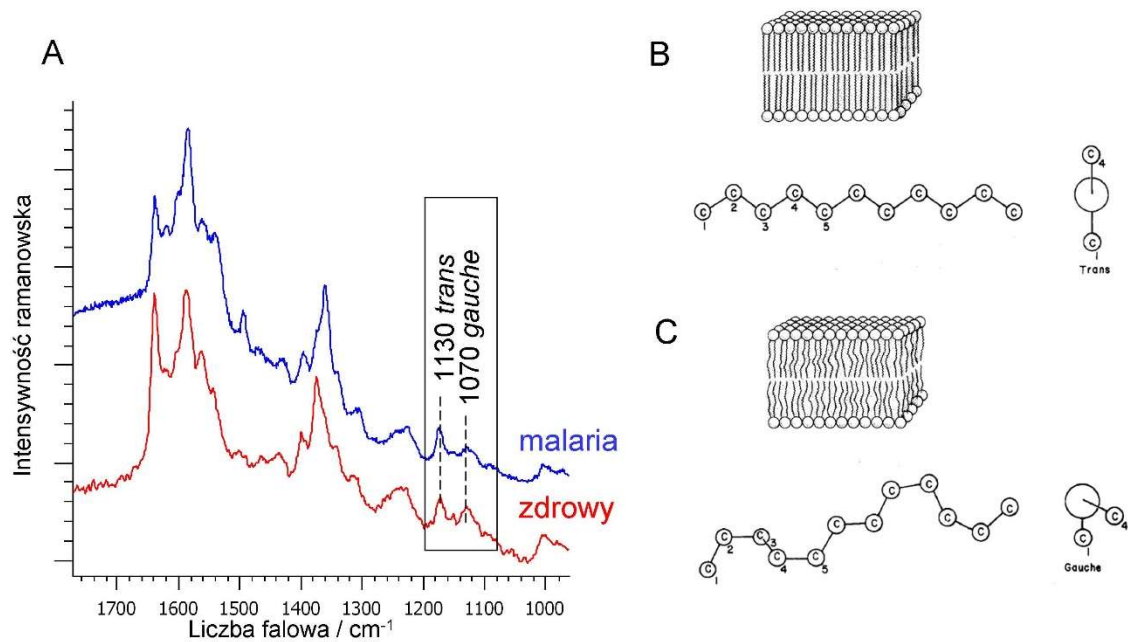
W kolejnych dniach leczenia pacjenta zmiany te stopniowo normalizowały się i pasma były obserwowane dla tych samych liczb falowych co zdrowe.



Rycina 5.4.1.1 (A) Widmo ramanowskie erythrocytu pacjenta ze zdiagnozowaną malarią oraz erythrocytu zdrowego ochotnika z zaznaczonymi pasmami markerowymi hemu (dane z niniejszej pracy), (B) zmiany zachodzące w strukturze hemu przy przyłączeniu (struktura oxygenated) i odłączeniu ditlenu (struktura deoxy-) (wg [6]) (C) aktywne drgania w rezonansie Ramanowskim Ni(OEP) obliczenia teoretyczne metodą drgań normalnych (wg [2,3]).

Inne pasma markerowe wskazują na zmiany w strukturze błony erythrocytów spowodowane obecnością pasożyta. W półpłynnej błonie komórkowej lipidy Ryc. 5.4.1.2 B mogą układać się w konformację *trans* oraz *gauche*. Te konformacje dają wyraźnie różniące się widma ramanowskie Ryc. 5.4.1.2 A) [4]. U pacjenta z malarią obserwuje się obniżony stosunek intensywności pasm 1130/1070 w stosunku do zdrowej błony. Czyli zwiększa się procent

lipidów nieuporządkowanych w konformacji *gauche*. W tym wypadku również kolejnych dniach leczenia pacjenta zmiany te stopniowo normalizowały się.



Rycina 5.4.1.2 A) Widmo ramanowskie erythrocytu pacjenta ze zdiagnozowaną malarią oraz zdrowego ochotnika z zaznaczonymi pasmami markerowymi błony komórkowej erythrocytu (dane z niniejszej pracy), (B) model uporządkowania molekularnego dwuwarstwy fosfolipidowej w fazie żelu oraz drgania łańcucha acylowego w konformacji *trans* (C) model uporządkowania molekularnego dwuwarstwy fosfolipidowej w fazie ciekło-kryształicznej oraz drgania łańcucha acylowego w konformacji *gauche* (według [4]).

Piśmiennictwo:

1. Wood BR, Langford SJ, Cooke BM, Lim J, Glenister FK, Duriska M, Unthank JK, McNaughton D. Resonance Raman spectroscopy reveals new insight into the electronic structure of β -Hematin and malaria pigment. *J Am Chem Soc.* 126 (2004) 9233–9239.
2. Nakamoto K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds.* John Wiley & Sons, 1997.
3. Abe M, Kitagawa T, and Kyogoku Y. Resonance Raman spectra of octaethylporphyrinatoNi(II) and mesodeuterated and ^{15}N substituted derivatives. II. A normal coordinate analysis. *J Chem Phys.* 69 (1978) 4526-4534.
4. B. P. Gaber, P. Yager, W. L. Peticolas, Interpretation of biomembrane structure by Raman difference spectroscopy, *Biophysical Journal*, 21 (1978) 161-176.
5. Tu AT. *Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications.* John Wiley & Sons, New York, 1982.
6. https://www.academia.edu/11104178/Hemoglobin_and_the_Heme_Group_Metal_Complexes_in_the_Blood_for_Oxygen_Transport [dostęp: 28.04.2023].

5.4.2. Monitorowanie procesu rozpadu erytrocytów pobranych od pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum*

5.4.2.1 Zmiany obserwowane w hemoglobinie erytrocytów

Pierwszą przeprowadzaną analizą było badanie za pomocą spektroskopii ramanowskiej krwinek czerwonych otrzymywanych od pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum* w porównaniu z krwią pobraną od zdrowych ochotników. Krew od pacjentów pobierano w dniu przyjęcia do Oddziału. Następnie krew od pacjentów z malarią oraz ochotników przechowywano w warunkach przyjętych w bankach krwi do przechowywania krwi do transfuzji oraz wykonywano kolejne pomiary w 3, 7, 13, 14, 19 i 27 dniu od pobrania krwi.

Obserwowane główne pasma ramanowskie i ich przypisania zawarte są w Tabeli 5.4.2.1.1

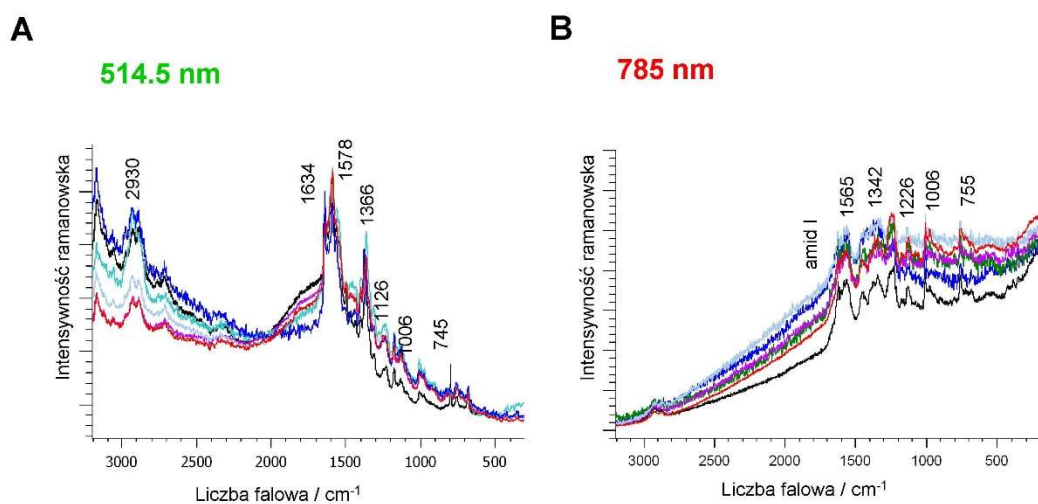
| pasma ramanowskie erytrocytu [cm^{-1}] | | przypisania (numeracja drgań porfiryny wg [4]) | opis drgań |
|---|----------------------|--|---|
| 514.5 nm laser line | 785 nm laser line | | |
| 2930 | 2927 | $\nu_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$ | drżania rozciągające symetryczne CH w grupie CH_3 |
| | 1645 | amid I (o konformacji α) | drżania rozciągające: $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{CN})$ oraz deformacyjne $\delta(\text{NH})$ |
| 1634 | | $\nu_{10}(\text{hem})$ | drżanie rozciągające $\nu(\text{C}_\alpha\text{C}_m)_{\text{as}}$ |

| | | | |
|------|------|---|--|
| | 1617 | ν_{8a} (Tyr) | drgania pierścienia fenyłowego z udziałem drgań rozciągających N_1C_8 pierścienia pirolowego |
| 1578 | | ν_{37} (hem); His | drgania rozciągające hemu $\nu(C_{\alpha}C_m)_{as}$; drgania pierścienia His |
| | 1565 | ν_2 (hem) | drgania rozciągające hemu $\nu(C_{\beta}C_{\beta})$ |
| | 1385 | $\delta_s(CH_3)$ | drganie deformacyjne Asp |
| 1366 | | ν_4 (hem) | drgania rozciągające hemu $\nu(C_{\alpha}C_m)_{as}$ |
| 1354 | | $\delta_s(CH_3)$ | drganie deformacyjne Trp |
| | 1342 | ν_{41} (hem) | drganie pulsacyjne $\nu_{pyr}(\text{half-ring})_{sym}$ |
| | 1226 | ν_{13} (hem) His: $\delta(CH)$, $\nu(CN)$, $\delta(NH)$ | drganie deformacyjne hemu $\delta(C_mH)$; drgania HisH; |
| 1126 | | ν_{40} (hem) | drganie pulsacyjne $\nu_{pyr}(\text{half-ring})_{as}$ |
| | 1006 | Phe | drganie pulsacyjne pierścienia Phe |
| 745 | 755 | ν_{15} (hem) | drganie pulsacyjne $\nu(\text{pyr.breathing})$ |
| | 747 | Thr | drganie deformacyjne $\gamma_{rock}(CH_2)$ |

Asp- kwas asparaginowy, His-histydyna , Phe- fenyloalanina, Thr- treonina, Tyr-tyrozyna

Tabela 5.4.2.1.1 Pasma Ramana [cm^{-1}] i ich przypisania dla erytrocytów pobranych od pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum* wzbudzonego za pomocą linii laserowych 514,5 nm i 785 nm.

Symetria pierścienia porfirynowego hemu determinuje kształt widm ramanowskich (Ryc. 5.4.2.1.1). Linia wzbudzenia 514,5 nm, blisko mniej intensywnego pasma absorpcji Q (Ryc. 5.4.2.1.1 B), powodującego efekt rezonansowy dla tej linii lasera, selektywnie się wzmacnia głównie charakterystyczne drgania porfiryny. Wzbudzenie z linią lasera 785 nm pozwala prześledzić wraz z charakterystycznymi pasmami dla porfiryn również cechy struktury białek, które umożliwiają uzyskanie wglądu w jego strukturę drugorzędową, poprzez analizę pasma amidowego I. Hemozoina, produkt katabolizmu hemoglobiny przez *Plasmodium*, powstaje z reszt hemu połączonych przez wiązanie łączące centralny jon żelaza jednej cząsteczki hemu i tlenu propionianowego grupy bocznej innej. Widmo ramanowskie hemozoiny jest podobne do hemu, ze względu na swoją budowę, na jego obecność wskazuje, np. znaczna intensywność całkowitego symetrycznego drgania ν_4 (ok. 1376 cm^{-1} , obserwowane podczas wzbudzenia linią 785 nm).



Rycina 5.4.2.1.1 Widma ramanowskie erytrocytów pobranych od pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną przez *P. falciparum* rejestrowane w 3, 7, 13, 14, 19 i 27 dniu po pobraniu krwi (reprezentowane przez kolejne widma), (A) linia wzbudzająca 514.5 nm; (B) linia wzbudzająca 785 nm; zakres spektralny $3200\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ (na podstawie [1]).

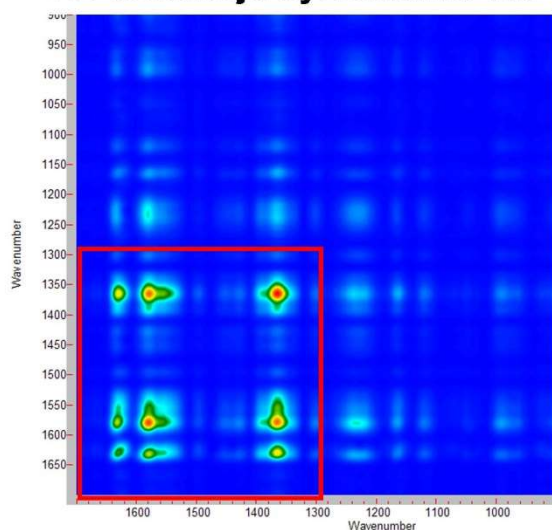
Aktywność *P. falciparum* prowadzi do proteolizy hemoglobiny, która zachodzi w wakuoli pokarmowej pasożyta w stadium trofozoitu dzięki działaniu proteazy asparaginowej. Tnie ona łańcuch α natywnej hemoglobiny w bardzo określonym miejscu, między aminokwasami 33 i 34 (33-Phe i 34-Leu). Natomiast łańcuch β nie ulega degradacji. [Goldberg] Po tym pierwszym cięciu następują kolejno kolejne w innych miejsca białkowe prowadzące do powstania oligopeptydów, co można wywnioskować z pojawiających się pików korelacyjnych dla Asp. Zwraca uwagę podobieństwo widm ramanowskich zmierzonych w kolejnych dniach, czyli podczas procesu ich degradacji (odpowiednio Ryc. 5.4.2.1.1 A i B). Dlatego wybrano jako narzędzie analityczne dwuwymiarową spektroskopię korelacyjną (2D-COS) do rozwikłania pewnych ukrytych w widmach zależności [1-3].

Analiza 2D-COS widm erytrocytów zarażonych przez *P. falciparum* rejestrowana w funkcji czasu pozwala zaobserwować, wyróżnić równoczesne zmiany generowane przez sprzężone drgania ugrupowań badanego układu bio-makromolekularnego. Wyniki są przedstawione Rycinie 5.4.2.1.2 oraz 5.4.2.1.3 Obserwowane piki na dwuwymiarowych mapach wskazują główne zmiany.

514.5 nm

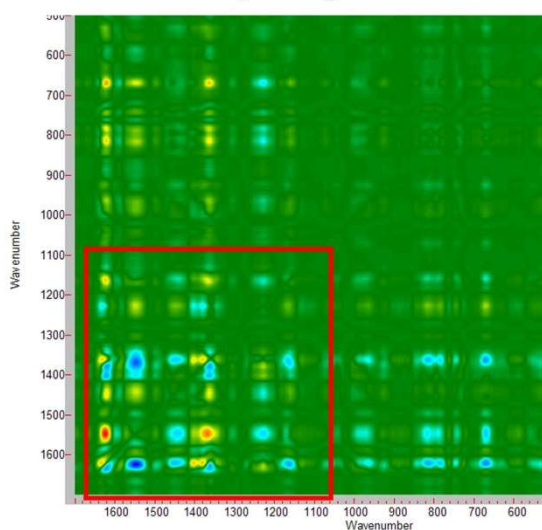
A

2D korelacja synchroniczna



B

2D korelacja asynchroniczna

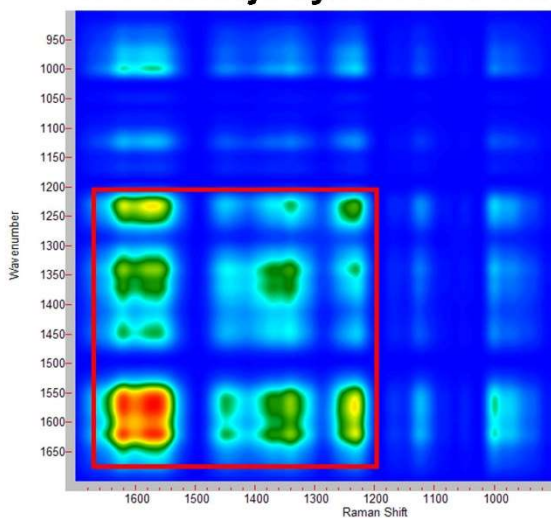


Rycina 5.4.2.1.2. (A) Synchroniczne i (B) asynchroniczne widma korelacji 2D , wygenerowane z widm Ramana zmierzonych w kolejnych dniach od pobrania od pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum* , przedstawionych na Ryc. 5.4.2.1.1 A, w zakresie liczb falowych 3200-400 cm^{-1} ; wzbudzenie 514,5 nm (na podstawie [1]).

785 nm

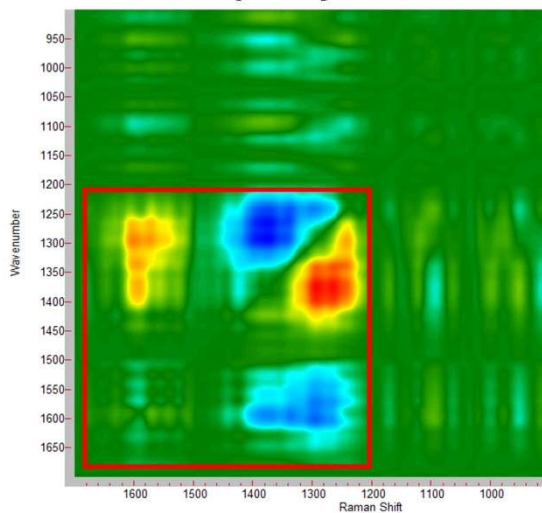
A

2D korelacja synchroniczna



B

2D korelacja asynchroniczna



Rycina 5.4.2.1.3. (A) synchroniczne i (B) asynchroniczne widma korelacji 2D , wygenerowane z widm Ramana zmierzonych w kolejnych dniach od pobrania od pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum*, przedstawionych na Ryc. 5.4.2.1.1 .B, w zakresie liczb falowych 3200-400 cm^{-1} ; wzbudzenie 785 nm (na podstawie [1]).

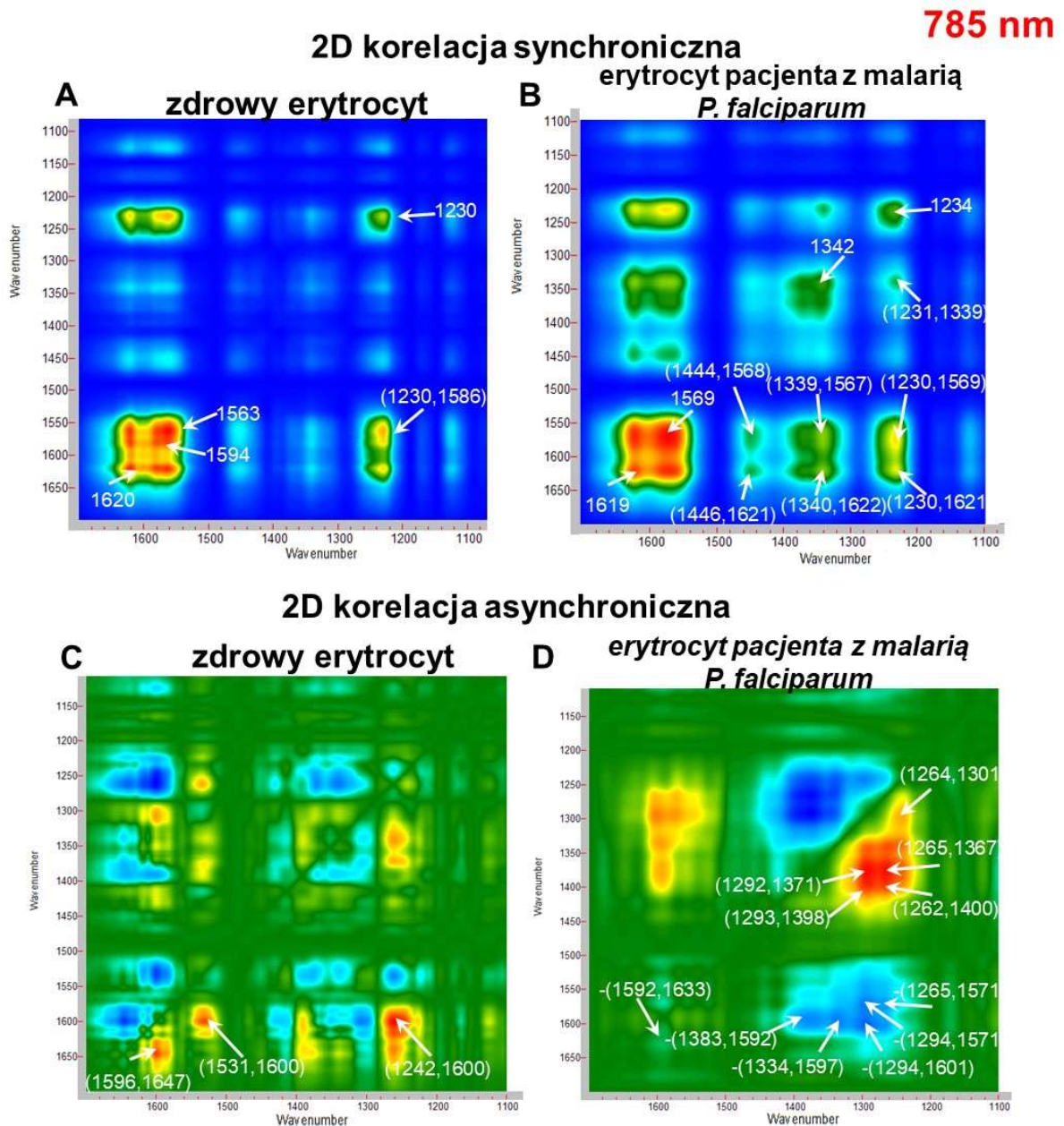
Pasma 2D zdrowych krwinek różnią się od tych uszkodzonych przez zarodźca, wyraźnie jest to widoczne, gdy obie krwinki ulegają degradacji w takich samych warunkach. Najwięcej zmian obserwowanych jest w zakresach spektralnych zaznaczonych na Ryc. 5.4.2.1.2. i 5.4.2.1.3. czerwoną ramką, stąd na kolejnych rysunkach Ryc. 5.4.2.1.4. i 5.4.2.1.5. przedstawiono porównanie obrazu krwinek zdrowych i zainfekowanych w tych zakresach spektralnych.

Piki na diagonalu, tzw. auto-piki, w synchronicznych widmach 2D dla pacjentów ze zdiagnozowaną malarią- są w pozycjach- 1619, 1569, 1342, 1234 cm^{-1} dla linii lasera 785 nm, a w położeniach 1635, 1579, 1364 cm^{-1} dla linii lasera 514.5

(Ryc. 5.4.2.1.5. B i w Tabeli 5.4.2.1.2.) Szczególnie interesujące ze względu na przypisanie do hemozoiny są auto-piki w pozycji 1342 cm^{-1} (ν_{41}) oraz 1569 cm^{-1} (ν_2).

Istotne dodatnie synchroniczne pozadiagonalne piki korelacyjne dla pacjentów ze zdiagnozowaną malarią, przy użyciu lasera 785 nm pojawiają się dla liczb falowych 1231 cm^{-1} z 1339 cm^{-1} , także z 1569 cm^{-1} oraz 1621 cm^{-1} (każdy z pików pochodzi od drgań zagregowanych ugrupowań hemu lub hemozoiny), Ryc. 5.4.2.1.4. B i Tabeli 5.4.2.1.2.

Dodatnie synchroniczne drgania hemu u pacjentów ze zdiagnozowaną malarią są także związane z pikami korelacyjnymi generowanymi przez 1339 cm^{-1} (ν_{41}), z 1567 cm^{-1} oraz z 1622 cm^{-1} . Kolejne piki korelacyjne dla hemozoiny u pacjentów ze zdiagnozowaną malarią występują dla 1444 cm^{-1} (ν_{40}) z drganiami 1568 cm^{-1} i 1622 cm^{-1} . Synchroniczne piki 2D wynikają ze zmian wstępujących w hemie ulegającym agregacji oraz produktów detoksykacji hemu przez *Plasmodium*, np. powstawanie hemozoiny.



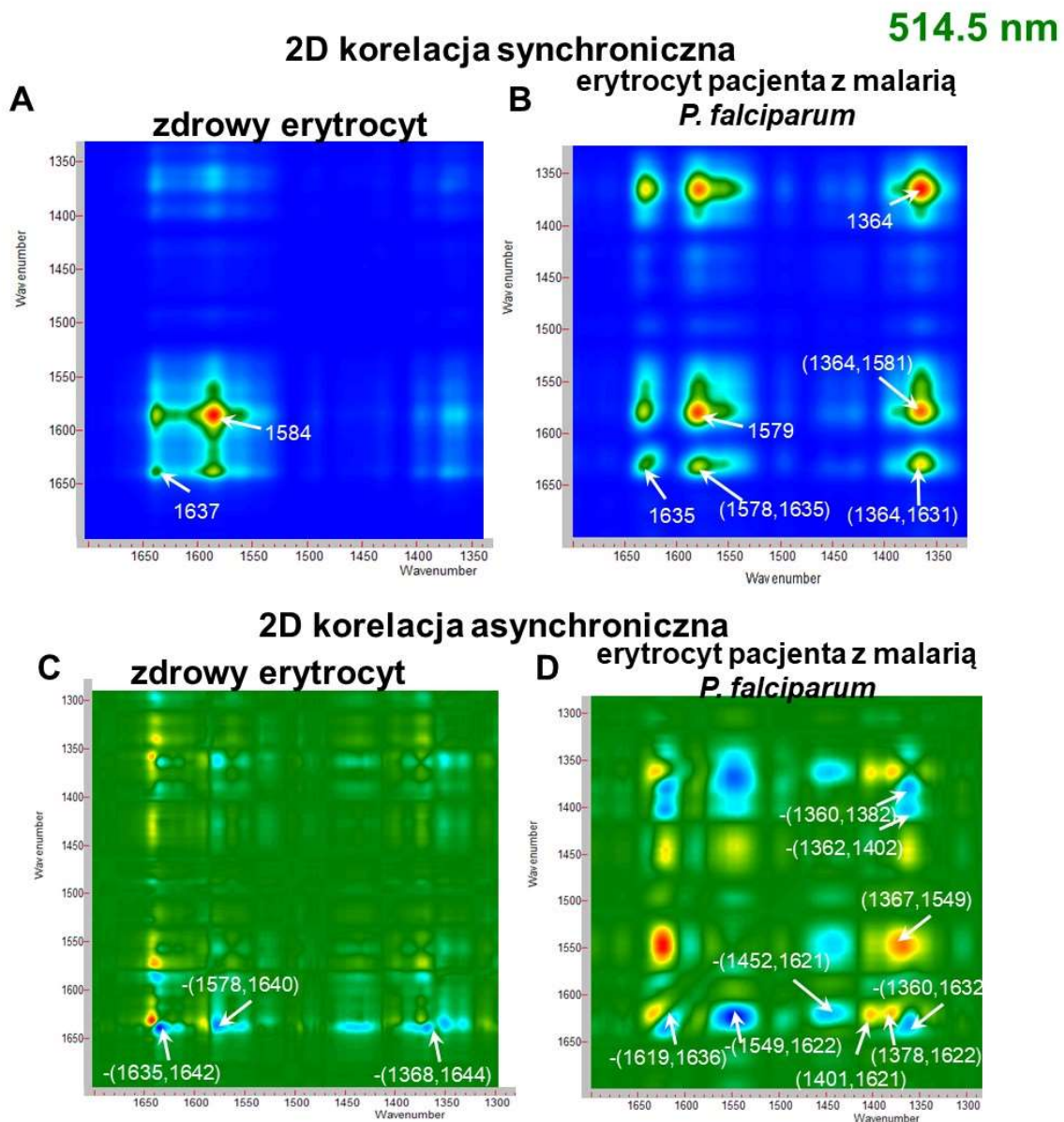
Rycina 5.4.2.1.4. Widma korelacji synchronicznej 2D erytrocytów pobranych od: (A) zdrowych ochotników, (B) pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum* i asynchroniczne widma korelacji 2D erytrocytów pobranych od: (C) zdrowych ochotników, (D) pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum*, w zakres liczb falowych 1700–1350 cm^{-1} ; lina lasera 785 nm. (według [1]).

| 2D piki synchroniczne | | | 2D piki asynchroniczne | | |
|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------------|--|
| auto-piki | przypisania | | przypisania | cross-peaks | przypisania |
| 1619 | $\nu(\text{C}_a=\text{C}_b)$; hem | | $\delta(\text{COH})$, Asp | (1264,1301) | ν_{21} ; hem |
| 1569 | ν_2 ; Hz | | $\delta(\text{COH})$, Asp | (1265,1367) | ν_4 ; Hz |
| 1342 | ν_{41} ; hem (deoxy); Hz | | $\delta(\text{COH})$, Asp | (1262,1400) | $\nu_s(\text{COO}^-)$, Asp |
| 1234 | ν_{13} or ν_{42} ; hem | | Amid III | (1292,1371) | ν_4 ; Hz; $\nu(\text{C}=\text{C})$, His |
| przypisania | piki korelacyjne | przypisania | Amid III | (1293,1398) | $\nu_s(\text{COO}^-)$, Asp |
| ν_{13} lub ν_{42} ; hem | (1231,1339) | ν_{41} ; hem | $\delta(\text{COH})$, Asp | -(1265,1571) | ν_2 ; Hz; $\nu(\text{C}=\text{C})$, His |
| ν_{13} lub ν_{42} ; hem | (1230,1569) | ν_{37} ; hem | Amid III | -(1294,1571) | ν_2 ; Hz; $\nu(\text{C}=\text{C})$, His |
| ν_{13} lub ν_{42} ; hem | (1230,1621) | ν_{10} ; hem | Amid III | -(1294,1601) | Phe |
| ν_{41} ; hem | (1339,1567) | ν_{11} ; hem | ν_{41} ; hem | -(1334,1597) | $\nu(\text{CC})$, Phe , Tyr |
| ν_{41} ; hem | (1339,1622) | $\nu(\text{C}_a=\text{C}_b)$; | $\delta_s(\text{CH}_3)$, Asp | -(1383, 1597) | $\nu(\text{CC})$, Phe, Tyr |
| ν_{40} ; Hz | (1444,1568) | ν_{11} ; Hz | $\nu(\text{CC})$, Phe , Tyr | -(1592,1633) | ν_{10} ; Hz; $\nu(\text{C}=\text{C})$, His |

| | | | |
|-----------------|-------------|------------------|--|
| ν_{40} ; Hz | (1444,1621) | $\nu(C_a=C_b)$; | |
|-----------------|-------------|------------------|--|

Hz- hemozoina, Asp- kwas asparaginowy, His-histydyna , Phe- fenyloalanina, Tyr-tyrozyna

Tabela 5.4.2.1.2. Istotne piki korelacyjne synchroniczne i asynchroniczne 2D dla erytrocytów pacjentów zarażonych *P. falciparum* i ich przypisania, linia lasera 785 nm. [według [1]].



Rycina 5.4.2.1.5. Widma korelacji synchronicznej 2D erytrocytów pobranych od: (A) zdrowych ochotników, (B) pacjentów ze zdiagnozowaną malarią *P. falciparum* i asynchroniczne widma korelacji 2D erytrocytów pobranych od: (C) zdrowych ochotników, (D) pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum*, w zakres liczby falowej 1700–1350 cm^{-1} ; lina lasera 514.5 nm.

| 2D piki synchroniczne | | | 2D piki asynchroniczne | | |
|--------------------------|-----------------------|------------------|-----------------------------------|------------------|---|
| auto-piki | przypisania | | przypisania | piki korelacyjne | przypisania |
| 1635 | ν_{10} ; Hz | | ν_4 ; hem (deoxy) | -(1360,1382) | $\delta_s(\text{CH}_3)$, Asp |
| 1579 | ν_{37} ; Hz; Asp | | ν_4 ; hem (deoxy) | -(1362,1402) | $\nu_s(\text{COO}^-)$, Asp |
| 1364 | ν_4 ; hem (deoxy) | | ν_4 ; hem (deoxy) | (1367,1549) | $\nu_{as}(\text{COO}^-)$, Glu |
| | | | ν_4 ; hem (deoxy) | -(1360,1632) | ν_{10} ; Hz; $\nu(\text{C}=\text{C})$, His |
| przypisania | piki korelacyjne | przypisania | $\delta(\text{CH}_3)$, Asp | (1378,1622) | ν_{10} ; hem; $\nu(\text{C}=\text{C})$, His |
| ν_4 ; hem (deoxy) | (1364,1581) | ν_{37} ; hem | $\nu_s(\text{COO}^-)$, Asp | (1401,1621) | ν_{10} ; hem; $\nu(\text{C}=\text{C})$, His |
| ν_4 ; hem (deoxy) | (1364,1631) | ν_{10} ; Hz; | $\delta(\text{CH}_3)$, Phe | -(1452,1621) | ν_{10} ; hem; $\nu(\text{C}=\text{C})$, His |
| ν_{37} ; hem | (1578,1635) | ν_{10} ; Hz | ν_{10} ; hem; Tyr | -(1619,1636) | ν_{10} ; Hz; $\nu(\text{C}=\text{C})$, His |
| | | | $\nu_{as}(\text{COO}^-)$, Asp | -(1549,1622) | ν_{10} ; hem; $\nu(\text{C}=\text{C})$, His |

Hz- hemozoina, Asp- kwas asparaginowy, His-histydyna , Tyr-tyrozyna

Tabela 5.4.2.1.3. Istotne piki korelacyjne synchroniczne i asynchroniczne dla erytrocytów pacjentów zarażonych *P. falciparum* i ich przypisania, linia lasera 514,5 nm (na podstawie [1]).

Dodatknie asynchroniczne piki korelacyjne dla pacjentów ze zdiagnozowaną malarią pojawiają się około 1265 cm^{-1} (Asp) oraz 1301 cm^{-1} (hem), ponadto 1367 cm^{-1} (hem, hemozoina) 1400 cm^{-1} (Asp). Dodatkowo piki korelacyjne są także generowane przez drgania Amidu III (1292 cm^{-1}) i hemozoinę (1371 cm^{-1}) oraz Asp (1398 cm^{-1}). Natomiast ujemne piki korelacyjne pojawiają się dla Asp (1265 cm^{-1}), hemozoiny (1571 cm^{-1}), Amidu III (1294 cm^{-1}) oraz hemozoiny (1571 cm^{-1}) (Tabela 5.4.2.1.3., Ryc. 5.4.2.1.5. D). Warto zaznaczyć, że pojawiające się asynchroniczne piki korelacyjne związane pasmami z Asp, Phe, His oraz amidem III pojawiają się przed sygnałem hemu lub hemozoiny, wskazując na charakterystyczną drogę degradacji hemoglobiny.

Wzbudzenie czerwonych krwinek linią lasera $514,5\text{ nm}$ powoduje wystąpienie w korelacji 2D innych pików niż przy wzbudzeniu laserem 785 nm (Ryc. 5.4.2.1.5. i Tabela 5.4.2.1.3.). Wynika to z efektu rezonansowego dla linii lasera $514,5\text{ nm}$ i z selektywnego wzmocnienia innych pasm w widmie ramanowskim.

Wykorzystanie metody korelacji 2D umożliwiła uwidocznienie procesów prowadzących do różnic pomiędzy zdrowymi krwinkami, a zarażonymi *P. falciparum*.

Podsumowując mapy korelacji 2D uzyskane z widm Ramana krwinek czerwonych zainfekowanych *P. falciparum* wzbudzonych przez linie lasera 785 nm oraz $514,5\text{ nm}$, obie mapy synchroniczna i asynchroniczna są wypełnione pikami korelacyjnymi, których nie obserwuje się dla zdrowych erytrocytów. Synchroniczne piki korelacyjne wskazują drogę agregacji hemu do hemozoiny. Natomiast piki korelacyjne wyraźnie wskazują na obecność i istotność w zmian spowodowanych działaniem asparaginazy hemoglobinowej- na produkty rozkładu hemoglobiny. Wskazują one na obecność i aktywność zarodźca. Warto zaznaczyć, że ta unikatową cechą jest miejsce rozkładu hemoglobiny. Sygnały pochodzące od Tyrozyny wskazują kolejny etap procesu rozpadu hemoglobiny, obserwowany także przy degradacji

zdrowych krwinek- na degradację wiązań wodorowych pomiędzy heliakalnymi fragmentami, pomiędzy odpowiednimi podjednostkami globiny.

Piśmiennictwo:

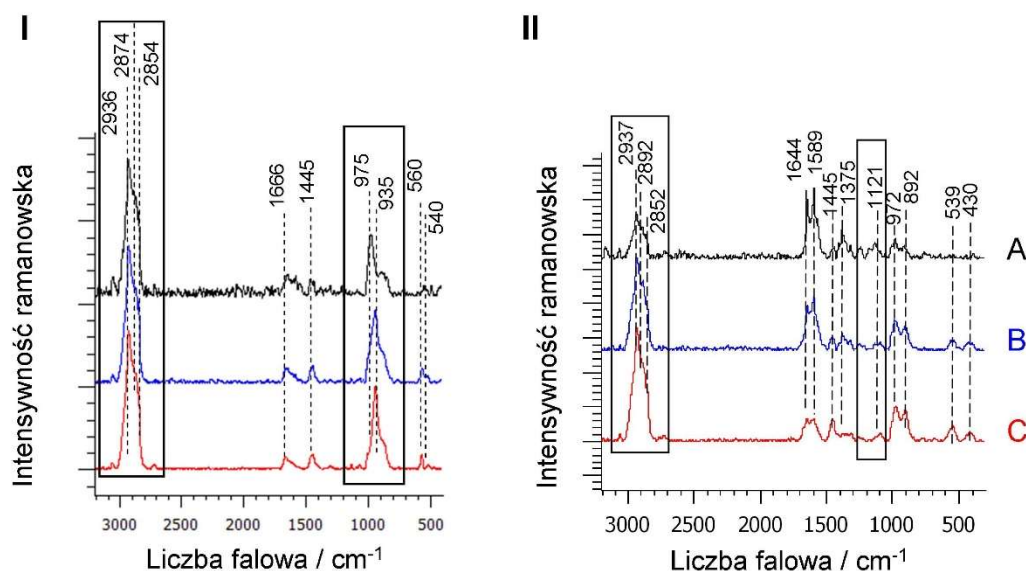
1. Birczyńska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kurdziel M, Biesiada G, Kozicki M, Garlicki A, Wesełucha-Birczyńska A. The aging of *P. falciparum* infected RBCs by 2D-correlation Raman and EPR spectroscopy. *J Mol Struct.* 1224 (2021) 129036.
2. Birczyńska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Krainska M, Biesiada G, Moskal P, Kozicki M, Garlicki A, Wesełucha-Birczyńska A. Could Raman spectroscopy distinguish between *P. falciparum* and *P. vivax* Infection? *Clin Spectrosc.* 3 (2021) 100015.
3. Wesełucha-Birczyńska A, Kozicki M, Czepiel J, Łabanowska M, Nowak P, Kowalczyk G, Kurdziel M, Birczyńska M, Biesiada G, Mach T, Garlicki A. Human erythrocytes analyzed by generalized 2D Raman correlation spectroscopy. *J Mol Struct.* 1069 (2014) 305-312.
4. Abe M, Kitagawa T, and Kyogoku Y. Resonance Raman spectra of octaethylporphyrinatoNi(II) and mesodeuterated and ¹⁵N substituted derivatives. II. A normal coordinate analysis. *J Chem Phys.* 69 (1978) 4526-4534.
5. Goldberg DE, Slater AFG. The Pathway of Hemoglobin Degradation in Malaria Parasites. *Parasitol Today.* 8 (1992) 280-282.
6. Noda I, Dowrey AE, Marcott C, Story GM, Ozaki Y. Generalized Two-Dimensional Correlation Spectroscopy. *Appl Spectrosc.* 54 (2000) 236A -248A.
7. Noda I, Generalized Two-Dimensional Correlation Method Applicable to Infrared, Raman, and Other Types of Spectroscopy. *Appl Spectrosc.* 47 (1993) 1329-1336.

8. Noda I, Ozaki Y. Two-Dimensional Correlation Spectroscopy: Applications in Vibrational and Optical Spectroscopy. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2002.

5.4.2.2 Zmiany obserwowane w błonie komórkowej erytrocytów

Cienie krwinek to pozostałości błony komórkowej zhemolizowanych erytrocytów, badanie ich było kolejnym etapem eksperymentu. W mikrospektroskopii ramanowskiej zarażonych *P. falciparum* cieni erytrocytów mierzonych laserem 514,5 nm uwidoczniły się różnice w porównaniu z błoną zdrowych krwinek. Widma uwidaczniają niewielkie przesunięcie pasm i różnice ich względnych intensywności (Ryc. 5.4.2.2.1). Ponadto zmieniona przez zarodźce błona inaczej reaguje na zewnętrzny bodziec jakim jest źródło laserowe i jego moc, w porównaniu ze zdrową błoną.

514.5 nm



Rycina 5.4.2.2.1. (I) Widma ramanowskie erytrocytów zdrowych ochotników (II) Widma ramanowskie erytrocytów pobranych od pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum* zarejestrowane przy wzbudzeniu laserem o długości fali 514,5 nm przy zastosowaniu jego mocy przy pomiarze: (A) 0,5 mW, (B) 2,5 mW i (C) 5 mW, w zakresie liczb falowych 3200-400 cm⁻¹ (na podstawie [5,7]).

Błona erythrocytu tworzy dwuwarstwę, która zbudowana jest z lipidów (40% lipidy, 20% fosfolipidy) i białek. W fazie żelowej, charakteryzującej zdrowe krwinki dominuje konfiguracja *trans*. Drgania wiązania acylowego CC (intra-chain) są wskaźnikiem uporządkowania błony (zaznaczony ramką na Ryc. 5.4.2.2.1. obszar ok. 1150 -1000 cm^{-1}). Pasma około 1130 cm^{-1} wskazuje na ułożenie *trans*, podczas gdy pasmo około 1080 cm^{-1} wynika z pojawiających się w dwuwarstwie lipidowej rotacji typu *gauche*. Stosunek intensywności pasm markerowych *trans* do *gauche* dla krwinek zdrowych wynosi 1,65 (SD=0.20), natomiast w krwinkach pobranych od pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum* 1.06 (SD=0.20). Ten spadek parametru wskazuje na reorganizację błony- zwiększone nieuporządkowanie spowodowane obecnością pasożyta.

Zakres spektralny C-H 3100-2800 cm^{-1} charakterystyczny dla drgań rozciągających C-H (inter-chain) był analizowany pod kątem wzajemnego upakowania i oddziaływania łańcuchów lipidowych (zaznaczony ramką na Ryc. 5.4.2.2.1. obszar ok. 3100 -2800 cm^{-1}). Pasma około 2850 cm^{-1} wynika z drgań symetrycznych C-H w grupie metylenowej CH_2 , natomiast pasmo około 2930 cm^{-1} wynika z symetrycznych drgań terminalnego wiązania metylowego CH_3 . Pomiar stosunku intensywności $I(2930)/I(2850)$ wykorzystywany jest do określenia upakowania między łańcuchami. Obliczona intensywność $I(2930)/I(2850)$ to 2,49 (SD=0,20) dla cieni zdrowych erythrocytów, natomiast dla zarażonych wzrasta ona do 3,6. Wzrost intensywności pasma 2930 cm^{-1} wskazuje na zwiększenie dezorganizacji międzycząsteczkowych wiązań oraz w konsekwencji zmniejszenie symetrii błony. Ten nieporządek pokazuje także zmiany środowiska grup białkowych i ich grup CH_3 i przejście do bardziej zjonizowanych postaci. Także i te zmiany mogą wynikać z obecności produktów wydzielanych do błony przez *Plasmodium*.

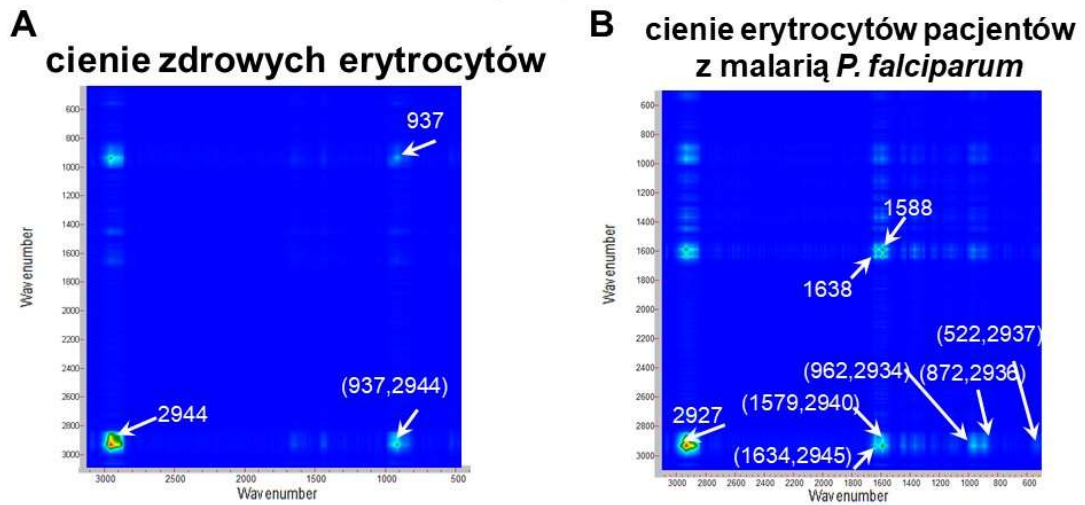
Pasma, które występuje dla liczby falowej 892 cm^{-1} , a jest przypisana do νCH węglowodanów, może wskazywać na zmiany wynikające z metabolizmu *Plasmodium* wywołane w błonie

erytrocytów, gdyż nie występuje w błonie zdrowych krwinek. Obserwowane kolejne pasmo w błonie zarażonych erytrocytów- pasmo 972 cm^{-1} jest charakterystyczne dla nieuporządkowanych polipeptydów, również nie jest obserwowane w błonie zdrowych ochotników.

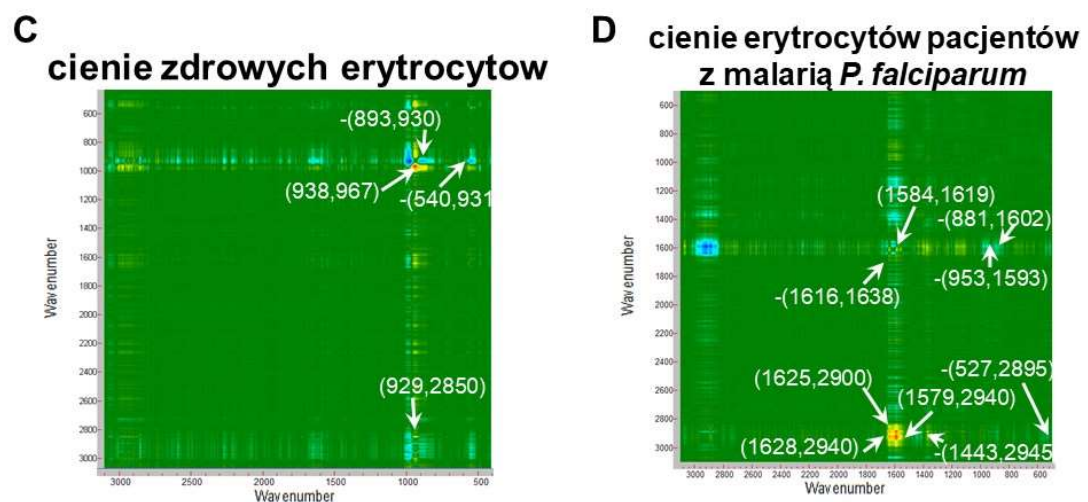
Widma Ramana pokazane Ryc. 5.4.2.2.1. (tzw. dynamiczne) były wykorzystane, aby otrzymać korelacyjne widma dwuwymiarowe 2D pokazane na Ryc. 5.4.2.2.2. Za czynnik zaburzający, umożliwiający stworzenie korelacji 2D obrano zwiększanie mocy lasera.

Obraz widm 2D cieni erytrocytów otrzymanych z krwi pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum* są zupełnie różne niż cieni erytrocytów otrzymanych z krwi zdrowych ochotników. Wskazuje to na aktywność pasożyta w krwince.

2D korelacja synchroniczna



2D korelacja asynchroniczna



Rycina 5.4.2.2.2. Widma korelacji synchronicznej 2D cieni erytrocytów pobranych od: (A) zdrowych ochotników, (B) pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum* i asynchroniczne widma korelacji 2D cieni erytrocytów pobranych od: (C) zdrowych ochotników, (D) pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum*, w zakresie liczb falowych 3100-500 cm^{-1} .

Na mapie synchronicznej dla cieni erytrocytów pobranych od pacjentów z malarią widoczny jest jeden wyraźny auto-pik w pozycji 2927cm^{-1} wynikający z drgań CH białek i lipidów oraz dwa mniej intensywne. Są to: auto-pik 1638cm^{-1} przypisany do amidu I (pozycja pasma wskazuje na konformację α) i wydaje się pochodzić głównie od białka pasma 3 opisywanego jako zawierającego 43% α -helisy oraz auto-pik w pozycji 1588cm^{-1} przypisany glutaminie (Gln) i wskazujący na zwiększoną zużycie glukozy przez *Plasmodium*. Te nowe pozycje auto-pików 2D dla cieni erytrocytów malarycznych w porównaniu do zdrowych wskazują na modyfikację struktury molekularnej błony erytrocytu wywołane obecnością pasożyta. (Ryc. 5.4.2.2.2. A i B).

Dodatknie synchroniczne piki korelacyjne cieni erytrocytów pobranych od pacjentów z rozpoznana malarią *P. falciparum* pojawiają się poza diagonalą dla liczby falowej 1579cm^{-1} , 2940cm^{-1} (His, PE), następnie dla 1634cm^{-1} , 2945cm^{-1} (Amid I, His, Arg; PE). Pik korelacyjny 967cm^{-1} i 2936cm^{-1} , gdzie pierwsza liczba falowa reprezentuje drgania $\nu(\text{CC})$ nieuporządkowanych białek a druga liczba falowa odpowiada za modyfikacje PE, ten fosfolipid jest charakterystyczny dla wewnętrznej warstwy błony komórkowej. Zmiany strukturalne obserwowane w białkach pojawiają się więc równocześnie z modyfikacjami wewnętrznej części błony. Kolejne piki korelacyjne występują dla 872cm^{-1} i 2936cm^{-1} (Thr, PE, węglowodany; PE). Kolejny pik korelacyjny to drgania 522cm^{-1} oraz 2927cm^{-1} pochodzące odpowiednio od mostków disiarczkowych SS oraz drgań PE. Ten pik korelacyjny określa zmiany w strukturze białek wewnętrznej warstwy błony komórkowej, w połączeniu z mostkami disiarczkowymi. Możliwe, że zmiany te związane są z dostosowaniem białek transbłonowych, np. struktury białka pasma 3. Ten pik korelacyjny, w który zaangażowana jest cysteina, wskazuje na fragmentację i powstanie fragmentów białka pasma 3 w ramach ogólnego procesu dezintegracji błony.

Asynchroniczne ujemne piki korelacyjne cieni erytrocytów pobranych od pacjentów z rozpoznana malarią *P. falciparum* występują w pozycji 1616 cm^{-1} oraz 1638 cm^{-1} (Tyr; amid I o konfiguracji α , Arg). Dodatkowo piki korelacyjne to pasma dla liczb falowych 1584 cm^{-1} (Gln) z 1619 cm^{-1} (Tyr) oraz 1579 cm^{-1} (Asp) z 2940 cm^{-1} (PE). Kolejne dodatnie piki korelacyjne powstają z kombinacji drgań His oraz Lys w pozycji około 1628 cm^{-1} oraz 2940 cm^{-1} (PE). Są także ujemne piki korelacyjne w pozycji 953 cm^{-1} (Ser, Thr) oraz 1593 cm^{-1} (Tyr) a także 881 cm^{-1} (Thr, PE, węglowodany), 1602 cm^{-1} (Phe, Tyr). Pojawia się także ujemny pik (527, 2895) spowodowany przez (wiązanie disiarczkowe białek i PE), związany z wiązaniem dwusiarczkowym o innej energii niż synchroniczny pik korelacyjny. Dlatego można wnioskować, że prawdopodobnie został wygenerowany przez inne białka transbłonowe niż np. białko pasma 3. Ze względu na asynchroniczną korelację fosfolipidów wewnętrznej części błony (PE) z sygnałem wiązania disiarczkowego przy 527 cm^{-1} , może to drganie być związane z białkami *Plasmodium*, prawdopodobnie z białkiem bogatym w histydynę 2 (PfHRP2). Błona komórkowa erytrocytów została znacząco zmieniona przez infekcję *P. falciparum*. Na uwagę zasługuje duża ilość pików korelacyjnych, wynikających z sygnałów fosfolipidowych charakterystycznych dla wewnętrznej warstwy błony, a także z aminokwasów, takich jak His i Phe. Tendencja ta może wskazywać na pochodzenie związane z PfHRP2 i/lub proteazami asparaginowymi *Plasmodium*, które są uważane za integralne białka błonowe powstające w wyniku rozwoju i metabolizmu *Plasmodium*.

Piśmiennictwo

1. Carey PR. Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies. Academic Press. New York, 1982.
2. Steck TL. The band 3 protein of the human red cell membrane: a review. *J Supramol Struct.* 8 (1978) 311–324.
3. Hsiao LL, Howard RJ, Aikawa M, Taraschi TF, Modification of host cell membrane lipid composition by the intra-erythrocytic human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J.* 274 (1991) 121-132.
4. Papalexis V, Siomos M-A, Campanalea N, Guo X.-G, Kocak G, Foley M, Tilley L. Histidine-rich protein 2 of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, is involved in detoxification of the by-products of haemoglobin degradation. *Mol Biochem Parasit.* 115 (2001) 77–86.
5. Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kurdziel M, Biesiada G, Kozicki M, Garlicki A, Wesełucha-Birczynska A. The aging of *P. falciparum* infected RBCs by 2D-correlation Raman and EPR spectroscopy. *J Mol Struct.* 1224 (2021) 129036.
6. Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Krainska M, Biesiada G, Moskal P, Kozicki M, Garlicki A, Wesełucha-Birczynska A. Could Raman spectroscopy distinguish between *P. falciparum* and *P. vivax* Infection? *Clin Spectrosc.* 3 (2021) 100015.
7. Wesełucha-Birczyńska A, Kozicki M, Czepiel J, Łabanowska M, Nowak P, Kowalczyk G, Kurdziel M, Birczyńska M, Biesiada G, Mach T, Garlicki A. Human erythrocytes analyzed by generalized 2D Raman correlation spectroscopy. *J Mol Struct.* 1069 (2014) 305-312.

5.4.3. Różnice w widmach spektroskopii ramanowskiej pacjentów z malarią wywołaną *P. falciparum* i *P. vivax*

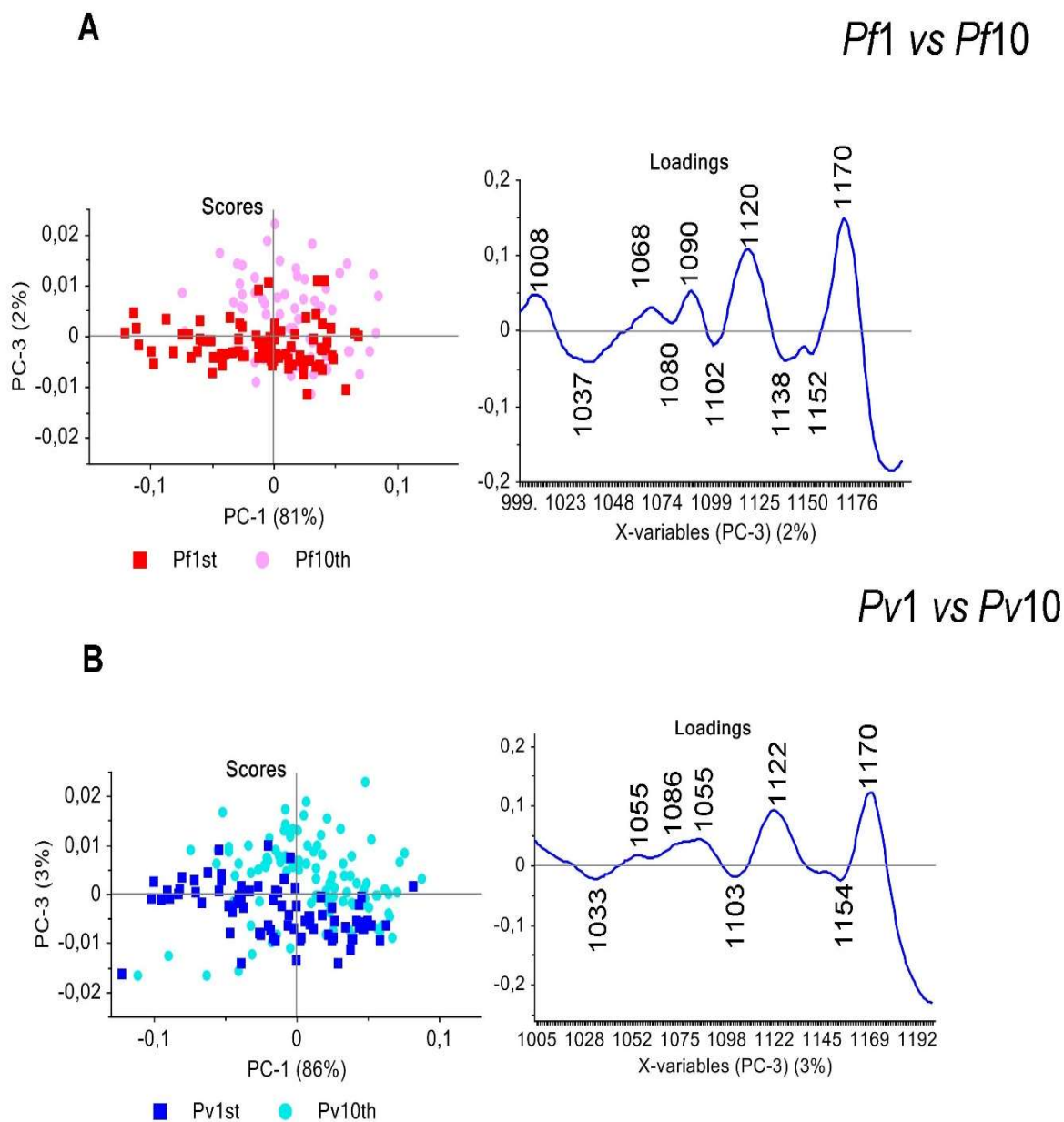
Następną przeprowadzaną analizą było badanie za pomocą spektroskopii ramanowskiej krwinek czerwonych otrzymywanych od pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum* w porównaniu z krwinkami czerwonymi pobranymi od pacjentów z malarią wywołaną *P. vivax*. Krew od pacjentów pobierano w dniu przyjęcia do Oddziału oraz po 5 i po 10 dniach od rozpoczęcia hospitalizacji. W 10. dniu większość pacjentów była już w fazie zdrowienia, parazytemia wynosiła u nich 0%.

Różnice w widmach dla pojedynczych pomiarów nie były widoczne, dlatego w celu głębszej analizy i odnalezienia różnic wykorzystano dwie metody – analizę PCA oraz korelację dwuwymiarową (2D).

5.4.3.1 Różnice w widmach spektroskopii ramanowskiej pacjentów z malarią wywołaną *P. falciparum* i *P. vivax*- analiza PCA [1-3]

Zakres drgań rozciągających C – C wewnątrz łańcuchów lipidowych (intra-chain) (1200–1000 cm^{-1})

Ten obszar widmowy obejmuje drgania wiązań C-C szkieletu acylowego wrażliwe na układ molekularny fosfolipidów i jego uporządkowanie. W tym zakresie widmowym występują również pasma charakteryzujące drgania hemu. Wykresy wyników analizy metodą PCA (Ryc. 5.4.3.1.1) pokazują separację opartą głównie na różnicach we wrażliwych strukturalnie pasmach występujących w tym regionie.



Ryc. 5.4.3.1.1. Analiza głównych składowych zastosowana do widm ramanowskich erytrocytów, pokazująca separację między wynikami pacjentów z rozpoznaną malarią wywołaną: (A) *P. falciparum* w 1. dniu hospitalizacji (czerwone punkty) i 10. dniu hospitalizacji (rózowe punkty); (B) malarii *P. vivax* w 1. dniu hospitalizacji (granatowe punkty) i 10. dniu hospitalizacji (turkusowe punkty); przedstawione wykresy wyników składowych PC-1 vs PC-3, zakres spektralny 1200–1000 cm^{-1} (wg [2]).

Różnice pomiędzy wynikami dla *P. falciparum* w pierwszym i 10 dniu hospitalizacji

Zakres drgań rozciągających C-C wykazuje wyraźną separację dla wyników z 1. i 10. dnia pacjentów z malarią wywołaną *P. falciparum* na wykresie wyników PC-1 vs PC-3, Ryc. 5.4.3.1.1 A. Pasma przy 1080 cm^{-1} obserwowane w pierwszej dobie hospitalizacji jest spowodowane drganiami vCC lipidów w konformacji *gauche*, natomiast przy 1068 cm^{-1} jest przypisane drganiom w konformacji vCC *trans* i charakteryzuje proces powrotu do równowagi zdrowotnej błony erytrocytów. Maksimum w pozycji 1102 cm^{-1} , jest przypisane symetrycznym drganiom rozciągającym grupy PO^{2-} fosfolipidów, obserwowane pierwszego dnia, jest przesunięte do niższej częstotliwości 1090 cm^{-1} w 10 dniu. Opisuje to zaburzenie wywołane aktywnością pasożytów wciąż obecne w zespołach fosfolipidów błonowych. Inne pasma minimów dla współrzędnej czynnikowej PC-3, dla 1037 cm^{-1} (Ser), 1138 cm^{-1} (Asp), 1152 cm^{-1} (Thr), są przypisane do reszt aminokwasowych związanych z inwazją pasożyta i z obecnością obcych białek wprowadzonych do błony erytrocytu chorych.

Różnice pomiędzy wynikami dla *P. vivax* w pierwszym i 10 dniu hospitalizacji

Wykres wyników PC-1 vs PC-3 pokazuje rozdzielanie danych dla pacjentów z malarią wywołaną *P. vivax* (Ryc. 5.4.3.1.1. B). Podobne pozycje minimów dla współrzędnej PC-3, nieznacznie przesunięte w stosunku do korelacji dla *P. falciparum*, opisuje grupę zarażonych *P. vivax* z pierwszego dnia.

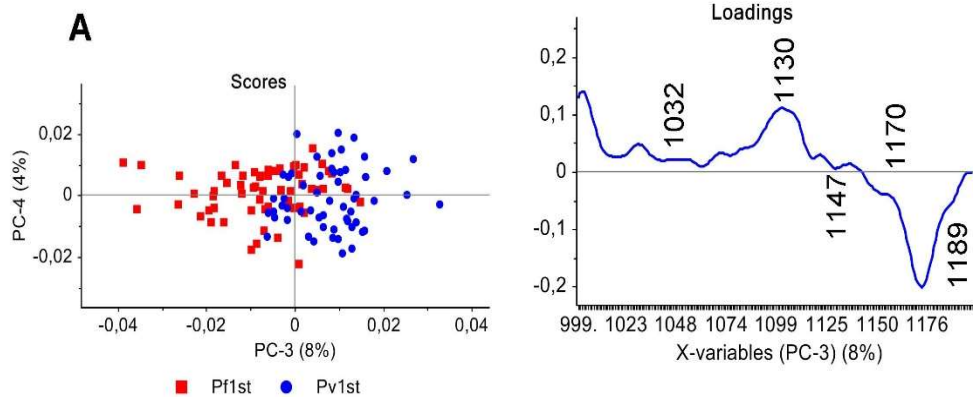
Podsumowując te dwa przypadki, widma ramanowskie z pierwszych dni hospitalizacji zarówno dla pacjentów z malarią wywołaną *P. falciparum* jak i *P. vivax* charakteryzują się większą obecnością konformacji typu *gauche*, podczas gdy w ostatnim badanym dniu – 10 w obu przypadkach zawierają więcej konformacji *trans*.

Różnice pomiędzy wynikami w pierwszym i 10 dniu hospitalizacji porównując *P. falciparum* i *P. vivax*

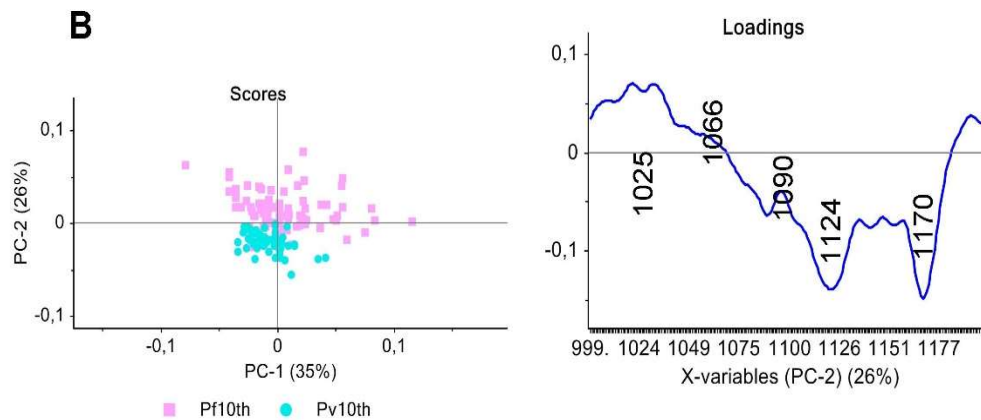
Kolejne porównanie dotyczyło badań krwi pobranej od pacjentów z malarią wywołaną *P. falciparum*, a *P. vivax* z pierwszego dnia hospitalizacji. Uzyskana analiza PCA daje zależność współrzędnych PC-3 vs PC-4, co pokazuje wykres – Ryc. 5.4.3.1.2. A. Maksima we współrzędnej PC-3 w pierwszych dniach wskazują na liczby falowe 1032 cm^{-1} (Ser), 1130 cm^{-1} (vCC konformacja trans, PE) dla *P. vivax*, natomiast minima 1147 cm^{-1} (Asp, Glu), 1189 cm^{-1} (Tyr, Ser), a także 1170 cm^{-1} (Tyr, Ser) wyróżnia erytrocyty pacjentów zakażonych *P. falciparum*.

Porównanie wyników z obu grup pacjentów z ostatniego dnia hospitalizacji pokazuje także wyraźne rozdzielanie danych dla obu przypadków według głównego składnika PC-2 ze stosunkowo dużą zmiennością 26% (Ryc. 5.4.3.1.2. A.). Efekt wywołany przez *P. falciparum* charakteryzuje się pasmami 1025 cm^{-1} (Ser), 1066 cm^{-1} (Arg) i 1090 cm^{-1} (vCC konformacja *gauche*), podczas gdy *P. vivax* charakteryzuje się pasmami 1124 cm^{-1} (v₂₂) i 1170 cm^{-1} (Ser, Tyr).

Pf1 vs Pv1



Pf10 vs Pv10



Rycina 5.4.3.1.2. Analiza głównych składowych zastosowana do widm ramanowskich erytrocytów, pokazująca separację między pacjentami z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum* i *P. vivax*: (A) w 1. dniu hospitalizacji *P. falciparum* (czerwone punkty) i *P. vivax* (granatowe punkty); wykresy wyników składowych PC-3 vs PC-4 i wykres współrzędnej czynnikowej PC-3, (B) w 10. dobie hospitalizacji, *P. falciparum* (różowe punkty) i *P. vivax* (turkusowe punkty); wykresy wyników składowych PC-1 vs PC-2 i wykres składowej czynnikowej PC-2, zakres spektralny 1200–1000 cm⁻¹ (wg [2]).

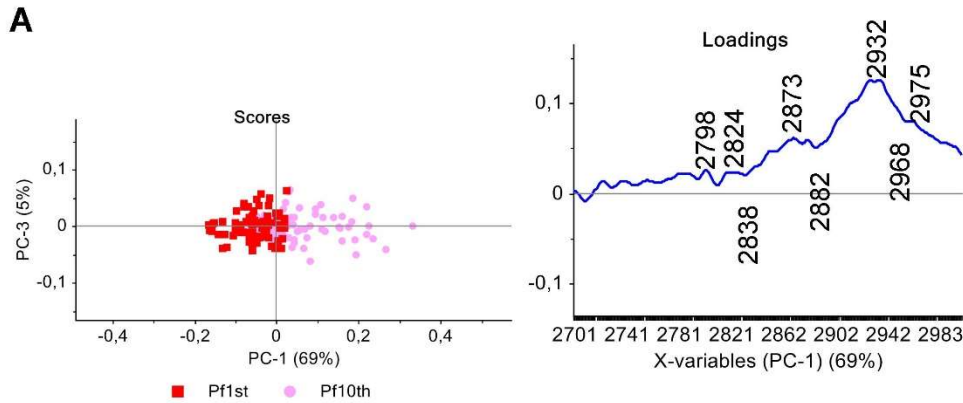
Obszar drgań rozciągających C – H między łańcuchami lipidowymi (inter-chain) (3000–2850 cm⁻¹)

W obszarze drgań rozciągających C-H występują drgania między łańcuchami lipidowymi. Uzupełniają one informacje o wewnątrzłańcuchowych drganiach C-H zachodzących w zakresie 1200–1000 cm⁻¹, wzbogacając uzyskane informacje strukturalne dotyczące błony zainfekowanych erytrocytów. Pasma o liczbie falowej 2933 cm⁻¹ i 2872 cm⁻¹ są przypisane symetrycznym i asymetrycznym drganiom rozciągającym C–H grup metylowych i metylenowych, które pochodzą z nasyconych łańcuchów lipidowych w komórkach pacjentów z rozpoznaną malarią.

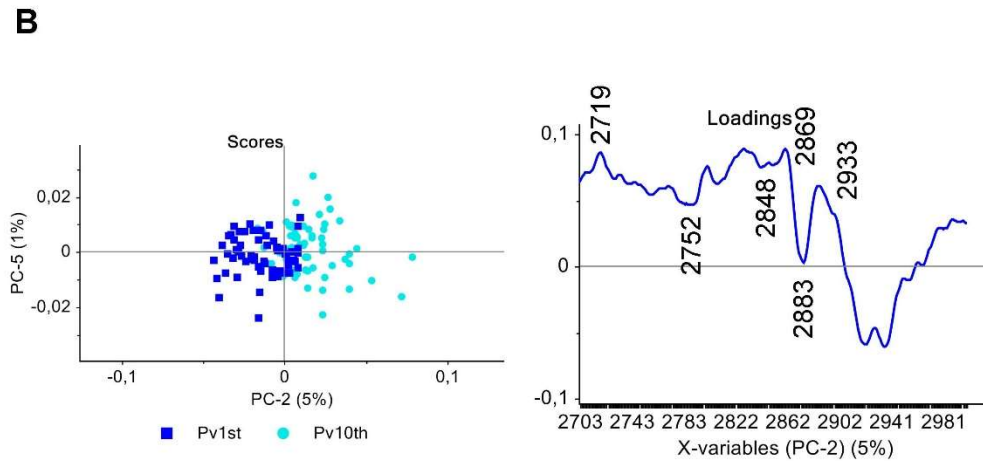
Różnice pomiędzy wynikami dla *P. falciparum* w pierwszym i 10 dniu hospitalizacji oraz *P. vivax* w pierwszym i 10 dniu hospitalizacji

Pasma około 2930 cm⁻¹ we współrzędnej czynnikowej PC-1 dla zarażenia *P. falciparum* w porównaniu wyników pierwszego i 10 dnia oraz PC-2 dla *P. vivax* w porównaniu wyników dla pierwszego i 10 dnia wskazują na zaburzenie w błonie spowodowane aktywnością *Plasmodium*, jak również udziałem lipidów *Plasmodium* (Ryc. 5.4.3.1.3). Ponadto wzmocnienie pasma 2930 cm⁻¹ odzwierciedla zmianę otoczenia grup CH₃ w białkach w kierunku środowiska bardziej polarnego. Wskazuje to na normalizację błony erytrocytów i powrót do stanu typowego dla zdrowych erytrocytów, co jest zgodne ze stanem klinicznym tych pacjentów w 10. dobie hospitalizacji.

Pf1 vs Pf10



Pv1 vs Pv10

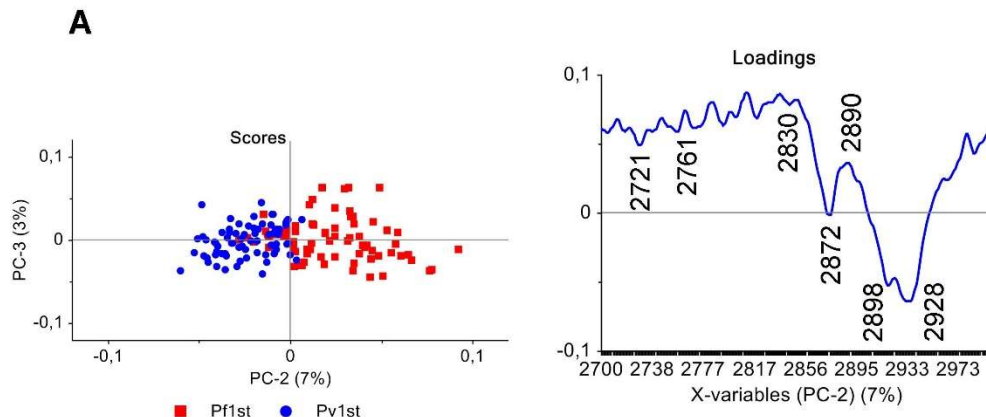


Rycina 5.4.3.1.3. Analiza głównych składowych zastosowana do widm ramanowskich erytrocytów, pokazująca separację między wynikami pacjentów z rozpoznaną malarią: (A) *P. falciparum* w 1. dniu hospitalizacji (czerwone punkty) i 10. dniu hospitalizacji (różowe punkty); wykresy wyników składowych PC-1 vs PC-3 i wykres współrzędnej czynnikowej PC-1, (B) *P. vivax* w 1. dniu hospitalizacji (granatowe punkty) i 10. dniu hospitalizacji (turkusowe punkty); przedstawione wykresy wyników składowych PC-2 vs PC-5 i wykres współrzędnej czynnikowej PC-2, zakres spektralny 3000–2700 cm^{-1} (wg [2]).

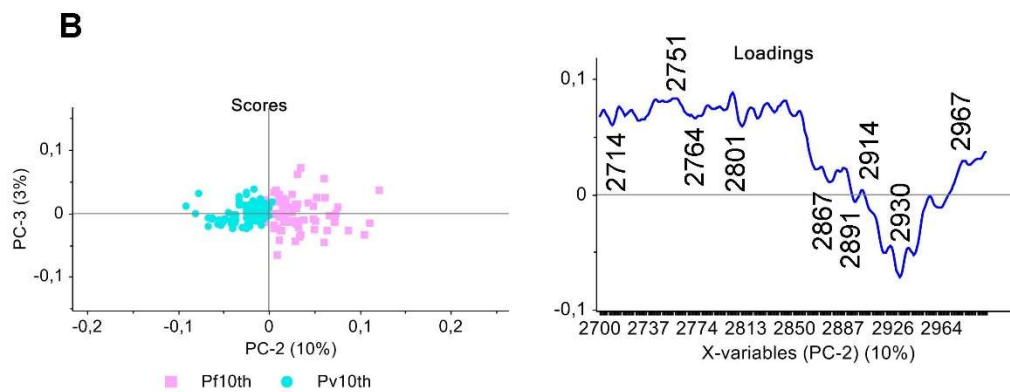
Różnice pomiędzy wynikami dla *P. falciparum* i *P. vivax* w pierwszym dniu hospitalizacji

Dodatnie maksima na wykresie współrzędnej czynnikowej PC-2 wskazują na pasma 2830 cm^{-1} i 2890 cm^{-1} wynikające z drgań Glu, a także asymetrycznych drgań CH_2 pochodzących od PC, które charakteryzują erytrocyty pacjentów z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum*. Natomiast ujemne maksima na wykresie współrzędnej czynnikowej PC-2, wskazują pasma charakterystyczne dla *P. vivax*, są to drgania o liczbach falowych 2721 cm^{-1} , 2761 cm^{-1} , które są przypisane odpowiednio do drgań hemu i Asp. Natomiast pasma 2872 cm^{-1} , 2898 cm^{-1} i 2928 cm^{-1} przypisane asymetrycznym drganiom rozciągającym metylenu (Ryc. 5.4.3.1.4 A). Wskazują przede wszystkim na zmiany, zaburzenia, jakie zaszły w dwuwarstwie lipidowej erytrocytów, które dominują w zakażeniu *P. vivax*. Obecność maksimów związanych z aminokwasami Glu i Asp wskazuje na znaczenie transportu i metabolizmu węglowodanów znajdujących się w krwinkach czerwonych.

Pf1 vs Pv1



Pf10 vs Pv10



Rycina 5.4.3.1.4 Analiza głównych składowych zastosowana do widm ramanowskich erytrocytów, pokazująca separację między pacjentami z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum* i *P. vivax*: (A) w 1. dniu hospitalizacji *P. falciparum* (czerwone punkty) i *P. vivax* (granatowe punkty); wykresy wyników składowych PC-2 vs PC-3 i wykres współrzędnej czynnikowej PC-2, (B) w 10. dobie hospitalizacji, *P. falciparum* (różowe punkty) i *P. vivax* (turkusowe punkty); wykresy wyników składowych PC-2 vs PC-3 i wykres składowej czynnikowej PC-2, zakres spektralny 3000–2700 cm^{-1} (wg [2]).

Różnice pomiędzy wynikami dla *P. falciparum* i *P. vivax* w 10 dniu hospitalizacji

Zakres drgań rozciągających C-H pokazuje separację na wykresie wyników PC-2 vs PC-3 dla ostatniego dnia pomiarowego, przy porównaniu wyników dla obu zarażeń pasożytniczych. Dla *P. vivax* jest zaznaczone ujemnymi maksimami na wykresie PC-3, przy 2714 cm^{-1} ($2 \times \nu_4$; deoksyHb), 2764 cm^{-1} ($2 \times \nu_4$; oksyHb), 2891 cm^{-1} (PC-fosfolipid charakterystyczny dla zewnętrznej warstwy błony erythrocytu), 2930 cm^{-1} , podczas gdy dla *P. falciparum* pojawiają się dodatnie maksima, 2751 cm^{-1} ($2 \times \nu(\text{CH}_2)$, PC-zewnętrzny), 2801 cm^{-1} , 2914 cm^{-1} ($2 \times \delta\text{CH}_2$, DLPE-wewnętrzny), 2967 cm^{-1} ($\nu_{\text{asym}}(\text{CH}_3)$) (Ryc. 5.4.3.1.4 B). Obserwowanych jest wiele charakterystycznych pasm dla fosfolipidów, składowych zarówno warstwy wewnętrznej jak i zewnętrznej. Można przypuszczać, że wiele z nich pochodzi od *P. falciparum*. Jest to zgodne z danymi, że całkowita zawartość lipidów w erythrocytach zmienionych przez *P. falciparum* jest znacznie wyższa niż w zdrowych. Dlatego ta zwiększona zawartość lipidów jest prawdopodobnie spowodowana fosfolipidami błony *Plasmodium*.

Zakres drgań rozciągających pierścienia pirolu i drgań deformacyjnych grup CH_2/CH_3 ($1500\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$)

W tym zakresie spektralnym na wykresach PC-1 vs PC-2 można zauważyć wiele zmian związanych ze zjawiskiem rezonansowego wzmocnienia ramanowskiego drgań pierścienia pirolu. Główny składnik PC-1 (na wykresie PC1 vs PC-2, Ryc. 5.4.3.1.5 A) wyjaśnia aż 40% w przypadku wyników pacjentów z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum*, a PC2 20% w przypadku *P. vivax* zmienności widm w tym zakresie (wykresie PC2 vs PC-3, (Ryc. 5.4.3.1.5 B)).

Różnice pomiędzy wynikami dla *P. falciparum* w pierwszym i 10 dniu hospitalizacji

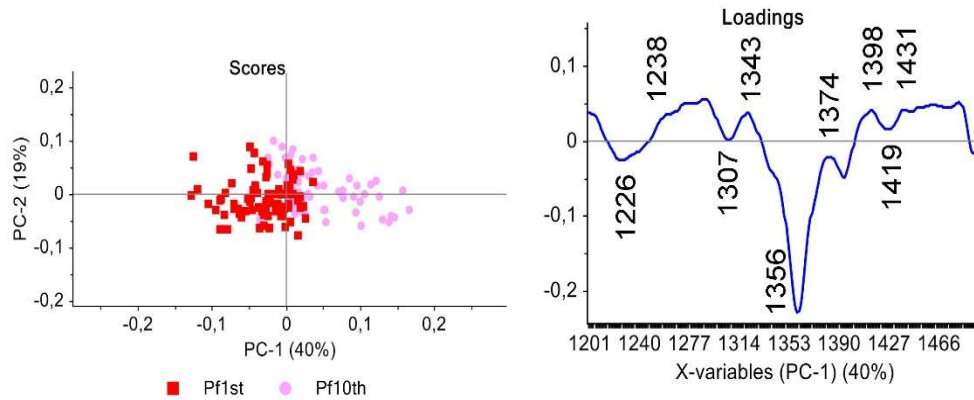
Ujemne maksima PC-1, które obrazują 1. dzień hospitalizacji pacjentów z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum*, są to następujące liczby falowe: 1226 cm^{-1} (PE – warstwa wewnętrzna; His), 1307 cm^{-1} , 1356 cm^{-1} (ν_4 , znaczący pasmo markerowe deoksy-Hb) i pasmo 1419 cm^{-1} (Glu) (Ryc. 5.4.3.1.5 A). Intensywne dodatnie piki dla PC-1 to przede wszystkim pasmo 1374 cm^{-1} , biomarker ramanowski ν_4 , oksy-Hb i hemozoiny (Hz). Pozostałe pasma to 1238 cm^{-1} (ν_{42} ; Hz), 1307 cm^{-1} (ν_{21} ; Hz), 1343 cm^{-1} , 1398 cm^{-1} (ν_{20} ; Hz) i 1431 cm^{-1} . Powstawanie Hz charakteryzuje krwinki czerwone już w 1., ale także w 10. dobie hospitalizacji.

Różnice pomiędzy wynikami dla *P. vivax* w pierwszym i 10 dniu hospitalizacji

Ujemne maksima współrzędnej PC-2, opisujący 1 dzień hospitalizacji pacjentów z rozpoznaną malarią wywołaną *P. vivax* wyróżnia pasmo 1354 cm^{-1} (ν_4 , intensywny pik charakteryzujący strukturę deoksy-Hb) oprócz maksimów wyróżniających łańcuchy boczne aminokwasów, takich jak Trp lub Arg. W 10. dniu hospitalizacji pojawia się dodatni pik 1374 cm^{-1} (ν_4). Inne pasma pojawiające się w 10. dniu hospitalizacji to również 1243 cm^{-1} (ν_{13}), 1306 cm^{-1} (ν_{21}), wszystkie charakteryzują oksy-Hb, 1399 cm^{-1} (ν_{20}), pochodzące z Hz i Glu (Ryc. 5.4.3.1.5 B). Tutaj ponownie struktura oksyHb i tworzenie hemozoiny charakteryzują czerwone krwinki w 10. dniu hospitalizacji.

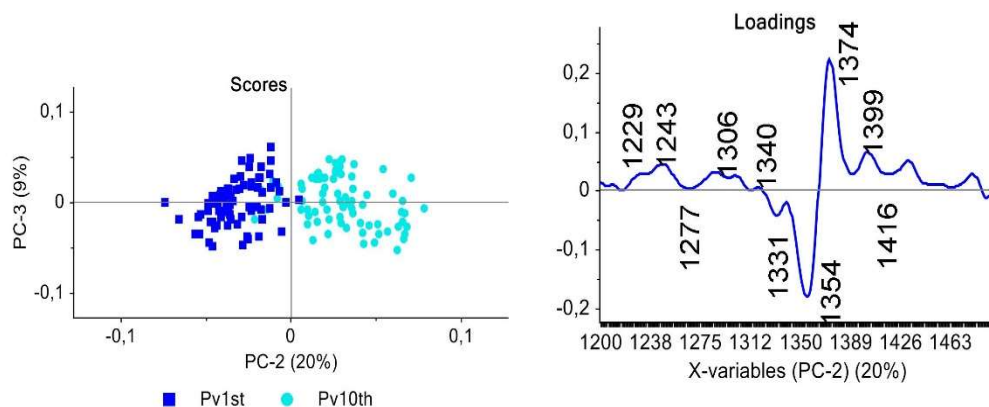
Pf1 vs Pf10

A



Pv1 vs Pv10

B



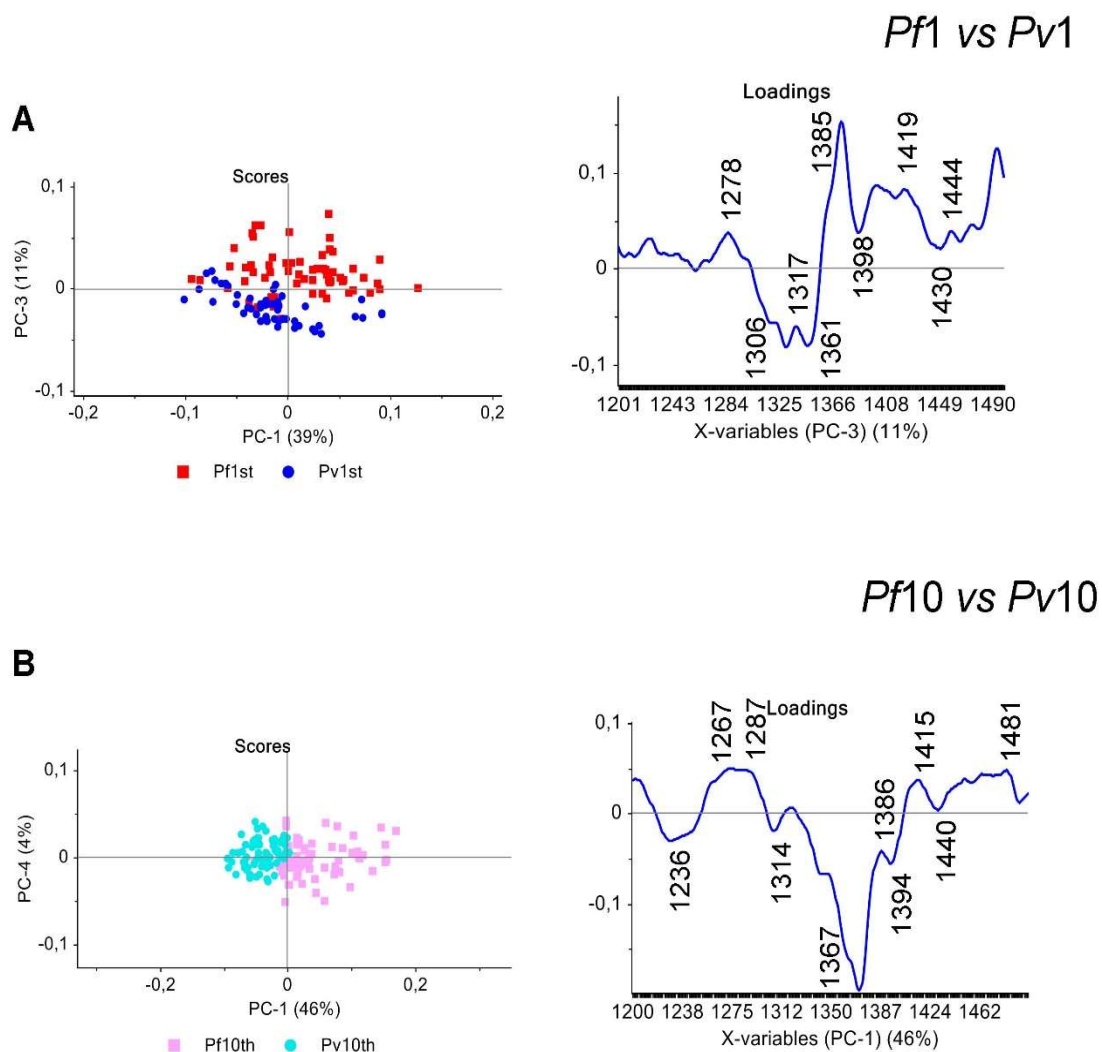
Rycina 5.4.3.1.5 Analiza głównych składowych zastosowana do widm ramanowskich erytrocytów, pokazująca separację między wynikami pacjentów z rozpoznaną malarią wywołaną: (A) *P. falciparum* w 1. dniu hospitalizacji (czerwone punkty) i 10. dniu hospitalizacji (różowe punkty); przedstawione wykresy wyników składowych PC-1 vs PC-2, wykres współrzędnej PC-1 (B) malarii *P. vivax* w 1. dniu hospitalizacji (granatowe punkty) i 10. dniu hospitalizacji (turkusowe punkty); przedstawione wykresy wyników składowych PC-2 vs PC-3, wykres współrzędnej PC-2, zakres spektralny 1500–1200 cm^{-1} (wg [2]).

Różnice pomiędzy wynikami dla *P. falciparum* i *P. vivax* w pierwszym dniu hospitalizacji

Główny składnik PC-3 na wykresie PC-1 vs PC-3 separuje dane dla *P. falciparum* i *P. vivax* z 11% zmiennością danych. Dodatni wykres ładunków PC-3 wskazuje na strukturę drugorzędową białka typu α -helikalną (amid III) dla *P. falciparum* w pierwszym dniu, a także inne charakterystyczne drgania pierścienia pirolu. Widoczne są też drgania deformacyjne fosfatydylocholiny (PC), fosfolipidowego składnika zewnętrznej warstwy błony erytrocytów (Ryc. 5.4.3.1.6 A). Wykres ujemnych pików PC-2 dla *P. vivax* w pierwszym dniu wskazuje inne maksima typowe dla agregacji hemu, w procesie tworzenia H_z. Ujemne pasmo 1361 cm⁻¹ jest zwykle skorelowane ze środowiskiem łańcucha bocznego indolu i wskazuje na ukrytą w globuli białka resztę Trp. Pasma to może wskazywać na obecność antygenów bogatych w tryptofan (TRAg).

Różnice pomiędzy wynikami dla *P. falciparum* i *P. vivax* w 10. dniu hospitalizacji

Wykres współrzędnych czynnikowych PC-1 vs PC-4 rozróżnia dane pacjentów z ostatniego dnia hospitalizacji pacjentów z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum* i *P. vivax*. Pasma dla niektórych aminokwasów, takich jak Gln i Arg, pojawiają się dla obu gatunków, ale z nieco innymi pozycjami maksimów. Ważnym pasmem jest sygnał 1367 cm⁻¹ z Trp pojawiający się w wynikach badań krwinek pacjentów z malarią wywołaną *P. vivax* w 10. dniu hospitalizacji. Ta pozycja pasma wskazuje na inne lokalne środowisko, w którym znajduje się Trp niż w pierwszym dniu hospitalizacji. Zmienność składowej głównej PC-1, która rozdziela grupy, jest dość wysoka i wynosi 46%.



Rycina 5.4.3.1.6. Analiza głównych składowych zastosowana do widm ramanowskich erytrocytów, pokazująca separację między pacjentami z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum* i *P. vivax*: (A) w 1. dniu hospitalizacji *P. falciparum* (czerwone punkty) i *P. vivax* (granatowe punkty); wykresy wyników składowych PC-1 vs PC-3 i wykres współrzędnej czynnikowej PC-3, (B) w 10. dobie hospitalizacji, *P. falciparum* (różowe punkty) i *P. vivax* (turkusowe punkty); wykresy wyników składowych PC-1 vs PC-4 i wykres składowej czynnikowej PC-1, zakres spektralny 1500–1200 cm^{-1} (wg [2]).

Zakres drgań rdzenia porfirynowego (1700–1500 cm⁻¹)

Różnice pomiędzy wynikami dla *P. falciparum* w pierwszym i 10 dniu hospitalizacji

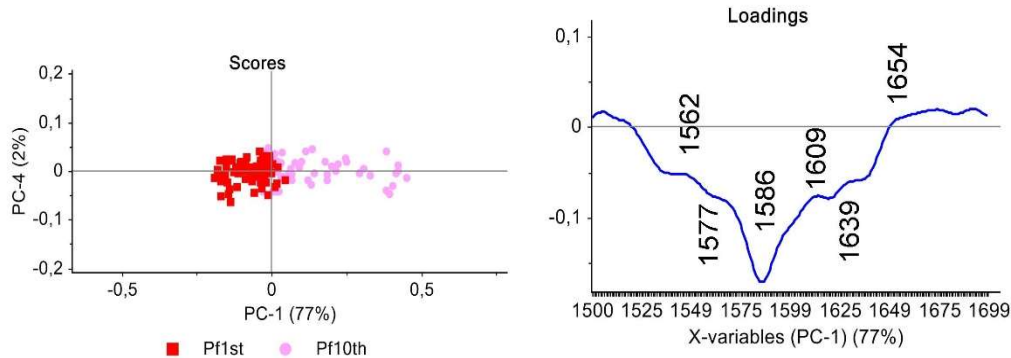
Ten zakres widmowy pokazuje separację na wykresie współrzędnych czynnikowych PC-1 vs PC-4 dla analizowanych wyników badań spektroskopowych pacjentów z rozpoznana malaria wywołaną *P. falciparum* i jest opisany przez zmienność PC-1 równą 77%. Dodatkowo piki na wykresie PC-1, przedstawiające charakterystykę w 10. dniu leczenia, wskazują pasmo 1562 cm⁻¹ (ν_2) przypisane Hz i 1639 cm⁻¹ (ν_{10} i Arg). Pierwszy dzień hospitalizacji charakteryzuje się pikami 1586 cm⁻¹ (ν_{38} , Hz i Glu), 1577 cm⁻¹ (Asp) i 1609 cm⁻¹ (ν_{19}) (Ryc. 5.4.3.1.7 A).

Różnice pomiędzy wynikami dla *P. vivax* w pierwszym i 10 dniu hospitalizacji

Jeśli chodzi o porównanie wyników z 1 i 10 dnia pacjentów z rozpoznana malarią wywołaną *P. vivax* można zaobserwować zmienność pasm markerów spektroskopowych na wykresie wyników PC-2 vs PC-4 (Ryc. 5.4.3.1.7 B). Pierwszy dzień hospitalizacji charakteryzują piki 1525 cm⁻¹ (ν_2 i Lys), 1574 cm⁻¹ (Asp), 1609 cm⁻¹ (ν_{19}) na dodatkim wykresie współrzędnej PC-2. Ostatni dzień hospitalizacji wyróżnia się natomiast pasmami, 1561 cm⁻¹ przypisany ν_2 , 1587 cm⁻¹ od ν_{37} i 1638 cm⁻¹ związany z Gln i ν_{10} .

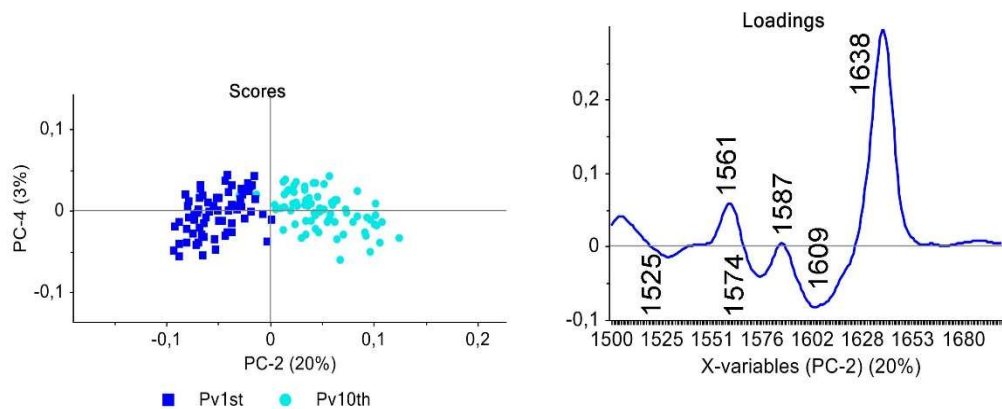
Pf1 vs Pf10

A



Pv1 vs Pv10

B



Rycina 5.4.3.1.7 Analiza głównych składowych zastosowana do widm ramanowskich erytrocytów, pokazująca separację między wynikami pacjentów z rozpoznaną malarią wywołaną: (A) *P. falciparum* w 1. dniu hospitalizacji (czerwone punkty) i 10. dniu hospitalizacji (różowe punkty); przedstawione wykresy wyników składowych PC-1 vs PC-4, wykres współrzędnej PC-1 (B) malarii *P. vivax* w 1. dniu hospitalizacji (granatowe punkty) i 10. dniu hospitalizacji (turkusowe punkty); przedstawione wykresy wyników składowych PC-2 vs PC-4, wykres współrzędnej PC-2, zakres spektralny 1700–1500 cm⁻¹ (wg [2]).

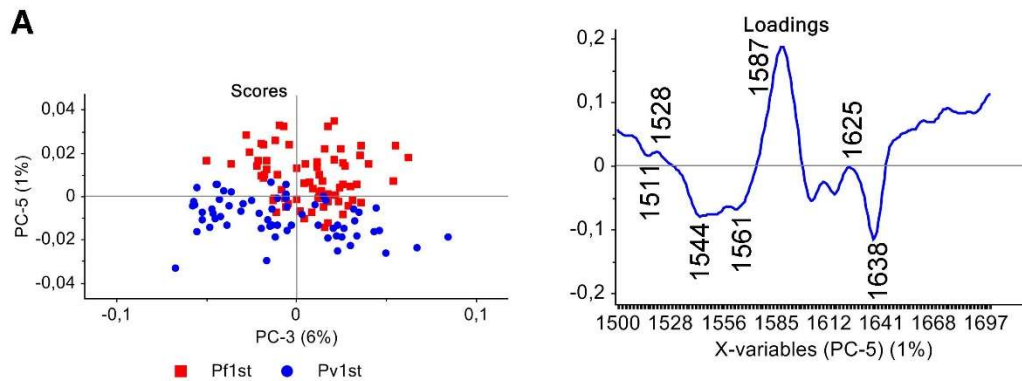
Różnice pomiędzy wynikami dla *P. falciparum* i *P. vivax* w pierwszym dniu hospitalizacji

Jeśli chodzi o porównanie wyników z pierwszego dnia hospitalizacji w obu typach malarii to dodatkowo piki dla współrzędnej czynnikowej PC-5 wskazują na pierwszy dzień malarii wywołanej *P. falciparum*. Występują tam drgania o liczbach falowych: 1528 cm^{-1} pochodzące od ν_{28} Hz i Lys, 1587 cm^{-1} pochodzące od ν_{32} Hz i Gln oraz 1625 cm^{-1} od aminokwasów, Lys i Tyr. Wykres dodatnich maksimów współrzędnej PC-4 opisuje pierwszy dzień hospitalizacji dla wyników pacjentów z malarią wywołaną *P. vivax* i pokazuje piki 1511 cm^{-1} przypisane dla Trp, następnie 1544 cm^{-1} , 1561 cm^{-1} i 1638 cm^{-1} z ν_{13} , ν_2 i odpowiednio ν_{10} (Ryc. 5.4.3.1.8 A.). Główny składnik PC-5 oddziela dwie modelowane grupy pacjentów z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum* oraz *P. vivax*, co wynika głównie z odmiennej struktury hemu, którym są odpowiednio już utworzone agregaty Hz lub struktura oksy-Hb.

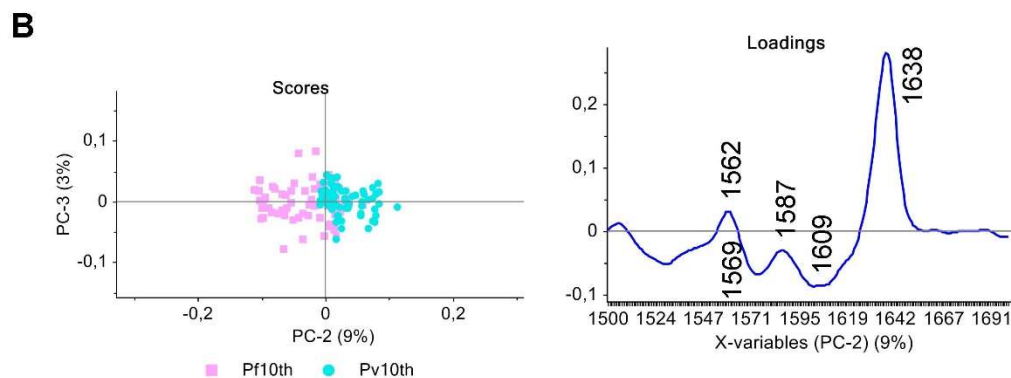
Różnice pomiędzy wynikami dla *P. falciparum* i *P. vivax* w 10. dniu hospitalizacji

Wykres wyników PC-2 vs PC-3 pokazuje 9% rozdział względem PC-2, który określa wyniki z 10. dnia hospitalizacji pacjentów z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum* i *P. vivax*. Składowa główna PC-2 różnicuje drgania ν_2 i ν_{19} wskazujące na oksy-Hb w przypadku malarii wywołanej *P. falciparum* w stosunku do drgań *P. vivax* do ν_{10} i Arg (Ryc. 5.4.3.1.8 B.). Dla erytrocytów zarażonych *P. falciparum* typowe stają się zmiany strukturalne w hemie, natomiast dla erytrocytów zarażonych *P. vivax* widoczne są również drgania wskazujące Hz oraz aminokwasy takie jak Glu, Gln i Arg.

Pf1 vs Pv1



Pf10 vs Pv10



Rycina 5.4.3.1.8. Analiza głównych składowych zastosowana do widm ramanowskich erytrocytów, pokazująca separację między pacjentami z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum* i *P. vivax*: (A) w 1. dniu hospitalizacji *P. falciparum* (czerwone punkty) i *P. vivax* (granatowe punkty); wykresy wyników składowych PC-3 vs PC-5 i wykres współrzędnej czynnikowej PC-5, (B) w 10. dobie hospitalizacji, *P. falciparum* (różowe punkty) i *P. vivax* (turkusowe punkty); wykresy wyników składowych PC-2 vs PC-3 i wykres składowej czynnikowej PC-2, zakres spektralny 1700–1500 cm^{-1} (wg [2]).

Piśmiennictwo

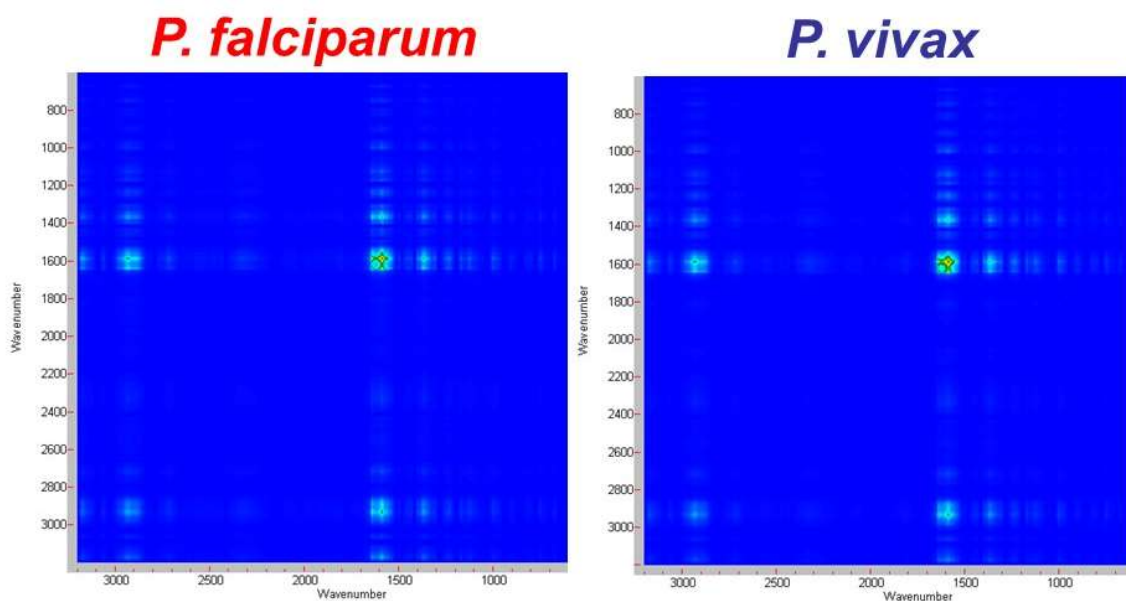
1. Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kurdziel M, Biesiada G, Kozicki M, Garlicki A, Wesełucha-Birczynska A. The aging of *P. falciparum* infected RBCs by 2D-correlation Raman and EPR spectroscopy. *J Mol Struct.* 1224 (2021) 129036.
2. Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Krainska M, Biesiada G, Moskal P, Kozicki M, Garlicki A, Wesełucha-Birczynska A. Could Raman spectroscopy distinguish between *P. falciparum* and *P. vivax* Infection? *Clin Spectrosc.* 3 (2021) 100015.
3. Wesełucha-Birczyńska A, Kozicki M, Czepiel J, Łabanowska M, Nowak P, Kowalczyk G, Kurdziel M, Birczyńska M, Biesiada G, Mach T, Garlicki A. Human erythrocytes analyzed by generalized 2D Raman correlation spectroscopy. *J Mol Struct.* 1069 (2014) 305-312.

5.4.3.2 Różnice w widmach otrzymanych metodą spektroskopii ramanowskiej pacjentów z malarią wywołana *P. falciparum* i *P. vivax*-analiza 2D [1-7]

Spektroskopia ramanowska umożliwia monitorowanie modyfikacji hemu zachodzących w fazie wewnątrzerytrocytarnej cyklu życiowego *Plasmodium* [5]. Jednak widma krwinek czerwonych pacjentów z malarią, w tym samym stadium choroby, są dość podobne, trudno jest zidentyfikować cechy związane z konkretnym gatunkiem pasożyta. W związku z tym poza wykorzystaniem metody PCA w kolejnej analizie wykorzystano technikę spektroskopii dwuwymiarowej, która umożliwia znalezienie ukrytych zależności, pozwalających na dyskryminację widm ramanowskich uzyskanych dla widm krwinek czerwonych pobranych od pacjentów, u których rozpoznano malarię (Ryc. 5.4.3.2). Widma synchroniczne 2D są bardzo podobne, widoczne są auto-piki w tych samych pozycjach (Ryc. 5.4.3.2 A). Jako przykład różnic możemy wymienić asynchroniczne piki korelacyjne dodatni (1360,1642) dla *P. falciparum* oraz ujemny (1358,1640) dla *P. vivax*. Pierwszy pik korelacyjny wymieniony dla *P. falciparum* jest generowany przez drgania ν_4 pulsacyjne pierścienia dla deoksy-hemowe, które pojawiają się przed drganiami pochodzącymi od ν_{10} (symetryczne drgania rozciągające hemu ν ($C_{\alpha}C_m$)_{asym}) i Arg (symetryczne drgania rozciągające ν_s $CN_3H_5^+$) (Ryc. 5.4.3.2 C). Odwrotną sekwencję wydarzeń obserwuje się dla *P. vivax*. W tym przypadku zmiany opisane przez ν_{10} i Arg pojawiają się przed tymi w ν_4 . Świadczy to o przesunięciu czasowym zmian obserwowanych w erytrocytach zainfekowanym odpowiednio przez *P. falciparum* lub *P. vivax*. Zmiany powstałe w wyniku działania *P. falciparum* w pierścieniu hemu (ν_4) pojawiają się wcześniej niż drgania hemu ν_{10} i Arg. Inwazja *Plasmodium* przebiega przez szereg złożonych

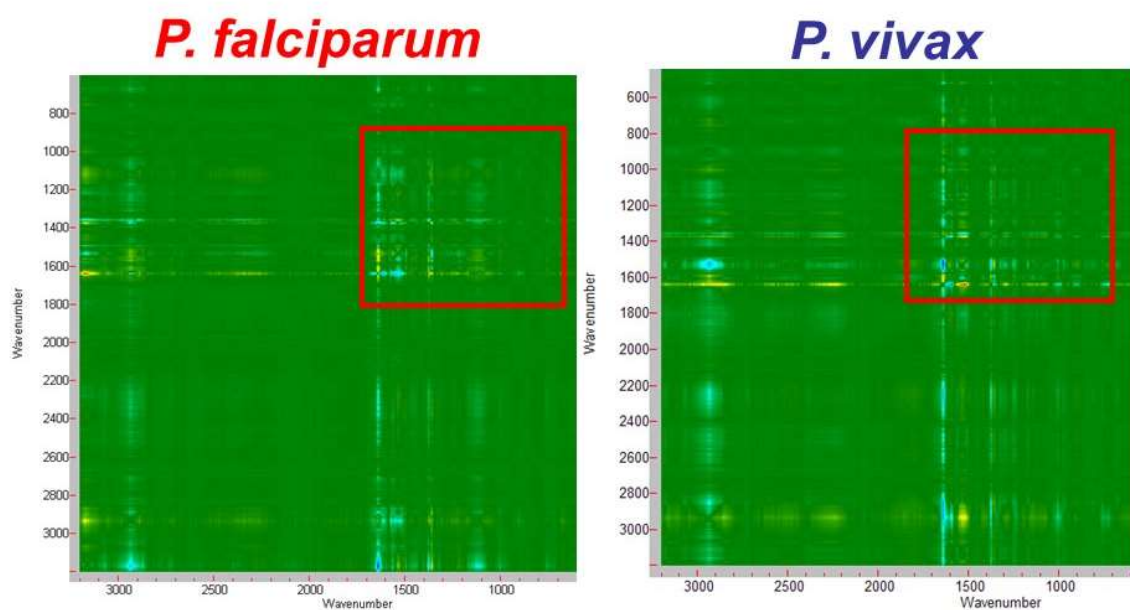
etapów interakcji receptor-ligand, obserwowane zależności wydają się być związane z powstawaniem kompleksu receptora [6].

A 2D korelacja synchroniczna

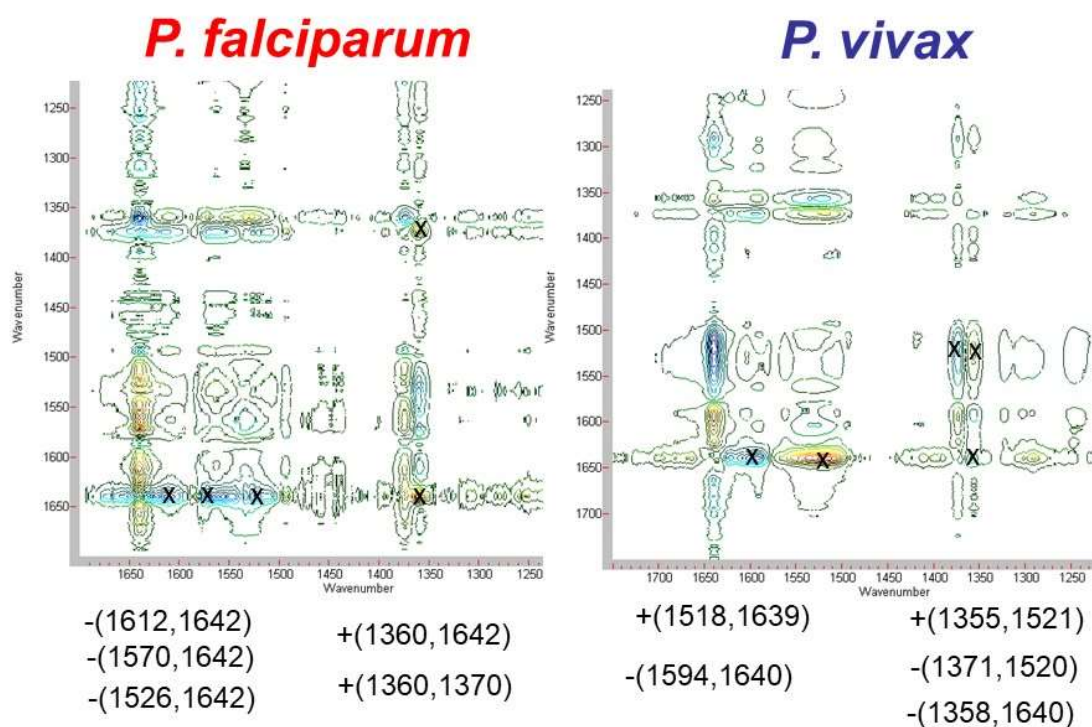


auto-piki: 2929, 1642, 1584, 1367, 1360 cm^{-1}

B 2D korelacja asynchroniczna



C 2D korelacja asynchroniczna



Rycina 5.4.3.2. Obrazy widm 2D pacjentów z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum* po lewej, *P. vivax* po prawej (A) widma synchroniczne (B) widma asynchroniczne, zakres spektralny 3200-500 cm^{-1} ; (C) widma asynchroniczne, w zakresie spektralnym 1800-1200 cm^{-1} , w którym widoczne są różnice wywołane aktywnością zarodźców (wg [1]).

Piśmiennictwo:

1. Birczyńska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kucharska M, Kurdziel M, Biesiada G, Garlicki A, Wesełucha-Birczyńska A. Course of Plasmodium infection studied using 2D-COS on human erythrocytes, Malar J., przyjęte do druku.
2. Baird JK. Tropical Diseases, Trop Dis Travel Med Vaccines. 3 (2017) 7.
3. Noda I, Dowrey AE, Marcott C, Story GM, Ozaki Y. Generalized Two-Dimensional Correlation Spectroscopy. Appl Spectrosc. 54 (2000) 236A -248A.
4. Noda I, Ozaki Y. Two-Dimensional Correlation Spectroscopy: Applications in Vibrational and Optical Spectroscopy. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2002.
5. Wood BR, McNaughton D. Raman excitation wavelength investigation of single red blood cells *in vivo*. J Raman Spectrosc. 33 (2002) 517–523.
6. Cowman AF, Tonkin CJ, Tham W-H, Duraisingh MT. Cell Host Microbe. 22 (2017) 232-245.

5.5 Wyniki badań spektroskopowych- spektroskopia EPR

5.5.1 Spektroskopia EPR pełnej krwi pacjentów z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum*

Tkanki organizmów żywych, np. krew, mają własności magnetyczne, dlatego mogą być także badane za pomocą spektroskopii EPR. Badania EPR dają wgląd w naturę zjawisk poprzez badanie centrów paramagnetycznych związanych w przypadku krwi z jonami żelaza i miedzi, znajdujących się w ich specyficznym otoczeniu, które ulega zmianom w czasie choroby. W trakcie pracy wykonywano badanie metodą EPR pełnej krwi pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum* oraz pełnej krwi zdrowych ochotników w dniu pobrania, następnie w 4, 5, 6 i 47 dniu po pobraniu krwi, którą przechowywano w warunkach stosowanych do przechowywania krwi w bankach krwi. Wyniki dla pacjentów z malarią przedstawiono na Ryc. 5.5.1.

W funkcjonalnych formach hemoglobiny żelazo występuje jako Fe(II). Jednak nie jest możliwa obserwacja Fe(II), gdyż jest niestabilne, ponadto oxy-Hb jest diamagnetyczna, a więc niemożliwa jest jej obserwacja za pomocą tej metody. Obserwowane są natomiast postaci utlenowanego żelaza Fe(III) z charakterystycznym, osiowym widmem EPR. Prostopadła składowa sygnału ($g_{\perp} = 6,00$) wysokospinowego żelaza Fe(III), ($S=5/2$) jest rozdzielona na dwa sygnały z $g_1 = 6,10$, $g_2 = 5,80$, co sugeruje, że pozycja jonu żelaza ma niższą symetrię, jest rombowo odkształcona od symetrii tetragonalnej. Trzecia składowa sygnału żelaza pochodzącego od hemu jest równa $g_3 = 2,04$ i jest ukryta w obserwowanych widmach w intensywnym sygnale pochodzącym od miedzi przy czynniku $g = 2,05$. W widmie krwi pacjentów zakażonych *P. falciparum* rozdzielona składowa prostopadła tego sygnału jest

widoczna po 47 dniach od pobrania (rys. 5.5.1 A). Natomiast w widmie EPR krwi pacjentów zdrowych sygnał obserwowany jest bezpośrednio po pobraniu, ale w odróżnieniu od krwi pacjentów chorych zanika po dwóch miesiącach od pobrania (rys.5.5.1 C). Różna charakterystyka pojawiania i zaniku tego sygnału odróżnia przebieg procesu degradacji obserwowany dla krwi pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum* od krwi zdrowych ochotników. Ścieżka rozpadu krwi dla grupy badawczej i kontrolnej jest więc inna. Kolejny wyraźny anizotropowy sygnał EPR o symetrii rombowej ($g_1 = 4,38$, $g_2 = 4,26$, $g_3 = 4,06$) obserwowany w obu grupach badawczych można przypisać niehemowym wysokospinowym jonom żelaza znajdującym się w białku transportowym (transferynie). Intensywność tego sygnału, zdecydowanie większa w przypadku krwi pacjentów zakażonych również różnicuje obie badane grupy, potwierdzając wzrost ilości tego białka, pochodzącego z rozpadu hemu.

W zakresie $g = 2,30 - 2,60$ w każdym kolejnym przedziale czasu, czyli mierzonych widmach krwi pobranej od pacjentów z malarią widoczna jest szeroka, intensywna linia. Podobny sygnał przypisywano jonom żelaza upakowanym w matrycy białkowej, prawdopodobnie w białku magazynującym żelazo, w ferrytynie, która zawiera jony Fe(II) i Fe(III). Podobne sygnały obserwowane są w przypadku badań krwi zdrowych ochotników.

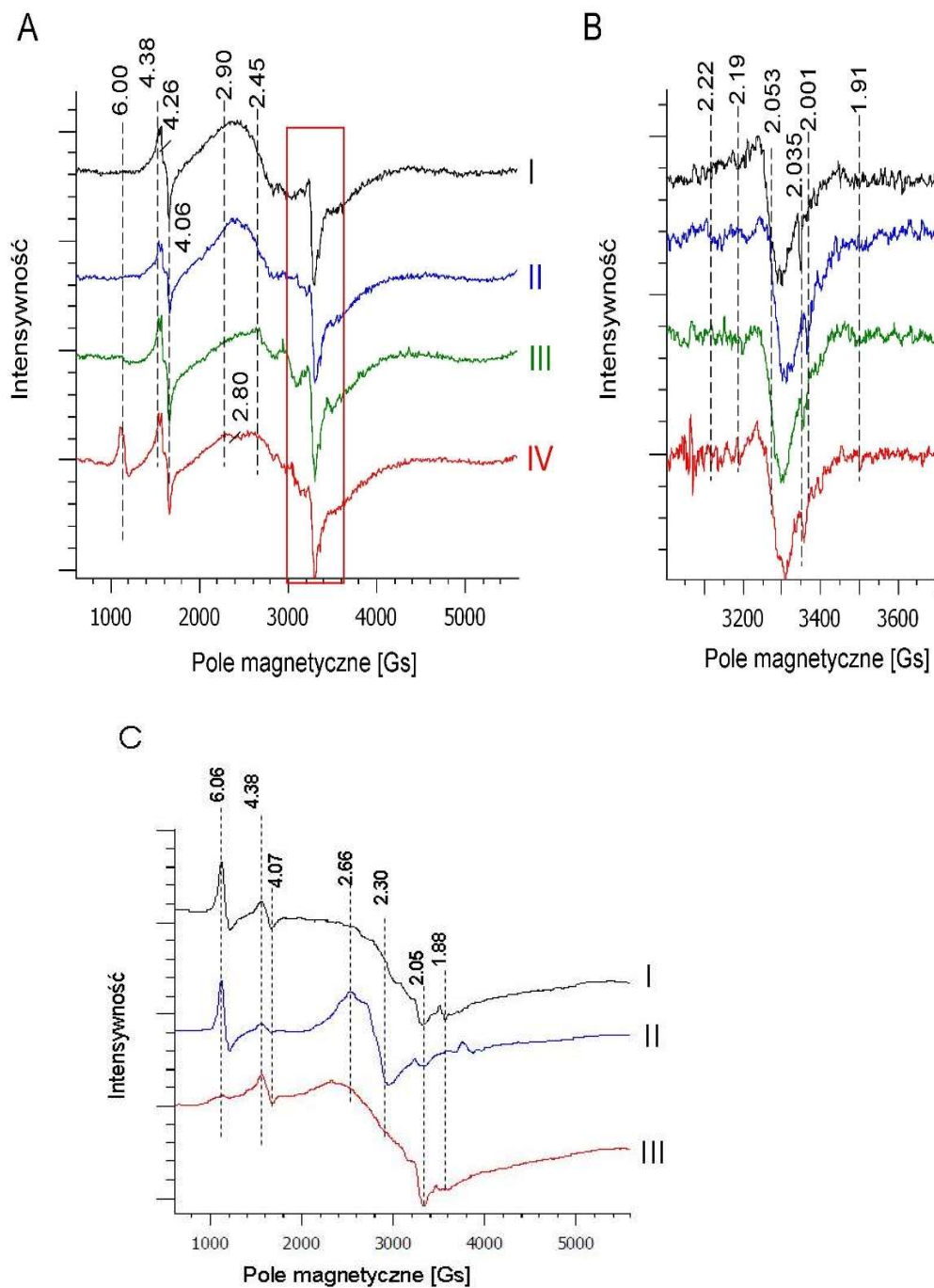
Kolejne małe intensywne, wąskie linie EPR obserwowane w obu grupach badawczych przy g równym 2,50 i 2,20 które można wyróżnić na tym szerokim sygnale i także linię przy $g = 1,90$ można przypisać niskospinowemu ($S = 1/2$) żelazu hemowemu o symetrii rombowej. Ich pochodzenie jest trudne do określenia.

Analizując widma EPR pozwala więc zaobserwować proces recyklingu żelaza w krwi i jego zróżnicowanie ze względu na jego pochodzenie.

Oprócz jonów Fe(III), widoczny jest także w widmie sygnał paramagnetyczny jonów miedzi Cu(II) o czynniku $g = 2,05$ w obu grupach badawczych. Linię tę można przypisać składowej

prostopadłej sygnału miedzi, która często jest obserwowana w strukturze ceruloplazminy. Główną funkcją tego ważnego białka osocza jest transport miedzi. Z literatury wiadomo, że dla miedzi w ceruloplazminie obserwuje się trzy odrębne symetrie centrów paramagnetycznych: charakterystyczną dla kompleksów tetraedrycznych Cu^{2+} typu 1, tzw. białka niebieskie (blue copper proteins) o $g_{\perp} = 2,05$ i $g_{\parallel} = 2,20$ i dwa centra typu 2, pierwszy z $g_{\perp} = 2,04$ i $g_{\parallel} = 2,25$, a drugi z $g_{\perp} = 2,04$ i $g_{\parallel} = 2,27$ oraz typ 3, który nie jest paramagnetyczny.

Pomiary widm przeprowadzone w węższym zakresie pola magnetycznego (3000 –3600 G) ujawniły dwie wąskie linie przy $g = 2,03$ i $g = 2,00$, które można przypisać strukturom rodnikowym. We krwi postulowana jest obecność rodników: hydroperoksyłowego i tyrozyłowego, Ryc. 5.5.1 B.



Rycina 5.5.1 Widma EPR ludzkiej krwi pełnej zakażonej *P. falciparum* mierzone: (I) 4, (II) 5, (III) 6 i (IV) 47 dni po pobraniu, w zakresie pola magnetycznego: (A) 600–5600 Gs, (B) 3000–3600 G; temperatura 77 K, pasmo X. (wg [1]) (C) Widma EPR pełnej krwi zdrowych ochotników mierzone: (I) 1 dzień, (II) 1 miesiąc, (III) 2 miesiące po pobraniu w zakresie pola magnetycznego 600–5600 Gs, (wg [2]).

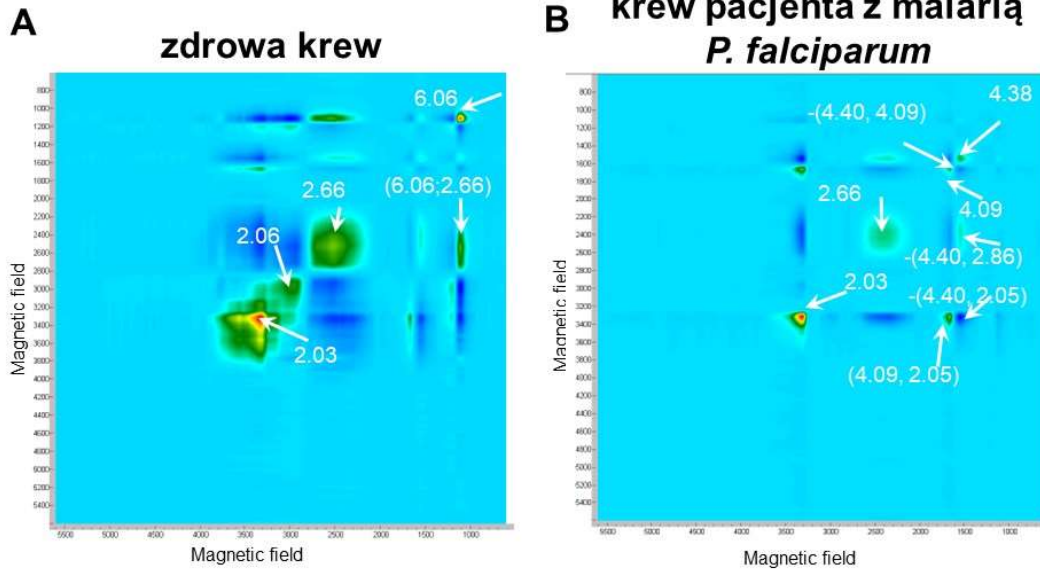
Piśmiennictwo:

1. Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kurdziel M, Biesiada G, Kozicki M, Garlicki A, Wesełucha-Birczynska A. The aging of *P. falciparum* infected RBCs by 2D-correlation Raman and EPR spectroscopy. *J Mol Struct.* 1224 (2021) 129036.
2. Wesełucha-Birczyńska A, Kozicki M, Czepiel J, Łabanowska M, Nowak P, Kowalczyk G, Kurdziel M, Birczyńska M, Biesiada G, Mach T, Garlicki A. Human erythrocytes analyzed by generalized 2D Raman correlation spectroscopy. *J Mol Struct.* 1069 (2014) 305-312.

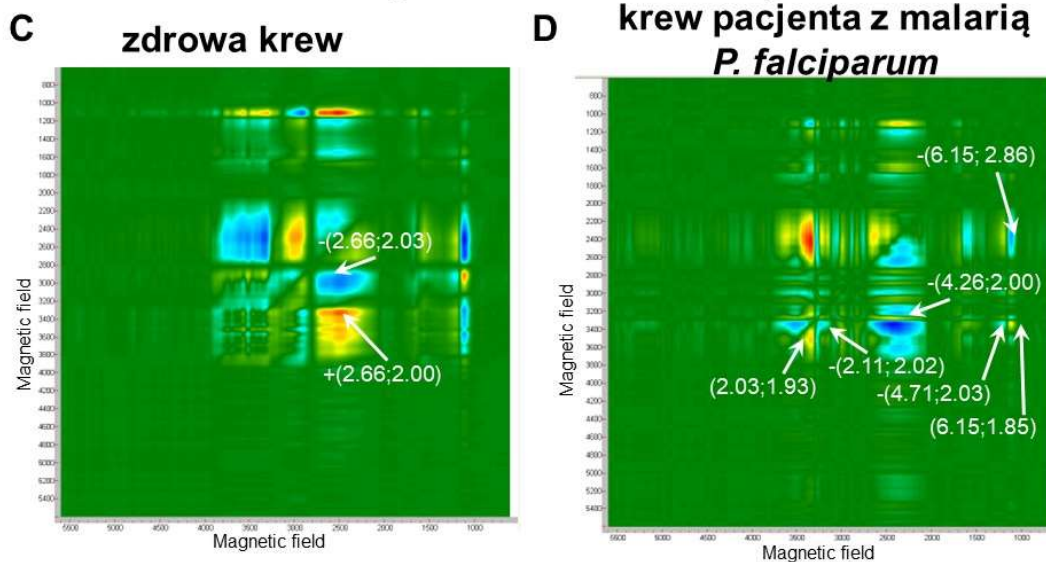
5.5.2. Korelacja 2D EPR pełnej krwi pacjentów z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum* [1-2]

Dynamiczne widma EPR pacjentów z rozpoznaną malarią *P. falciparum* były danymi, z których uzyskano widma 2D-COS (Ryc. 5.5.2). Obserwowane auto-piki w dwuwymiarowych (2D) widmach synchronicznych z wartościami współczynnika g , przy 2,03 (obecność rodnika hydroperoksylogowego), 2,66 (niskospinowe Fe(III), prawdopodobnie ferrytyna), 4,09 i 4,38 (oba wysokospinowe Fe(III), sygnał transferyny), różnią się od tych uzyskanych dla krwi pobranej od zdrowych ochotników (ryc. 5.5.2. A i B).

2D synchroniczna korelacja



2D asynchroniczna korelacja



Rycina. 5.5.2. Synchroniczne widma korelacyjne 2D COS ludzkiej pełnej krwi pobranej od: (A) zdrowych ochotników, (B) pacjentów ze zdiagnozowaną malarią *P. falciparum* i asynchroniczne widma korelacyjne 2D krwi pobranej od: (C) zdrowych ochotników, (D) pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum*, zakres pola magnetycznego 5600–600 Gs. (wg [1]).

Synchroniczne ujemne piki korelacyjne pojawiające się poza przekątną, w widmach krwi pacjentów z malarią pojawiają się przy czynnikach g równych 4,40 (wysokospinowy niehemowy Fe(III)) z 4,09, (wysokospinowy niehemowy Fe(III)), 2,86 (niskospinowy hem Fe(III)) i 2,05 (Cu^{2+}), 4,09 i 2,05 (wysokospinowe niehemowe Fe(III); Cu^{2+}) (Ryc. 5.5.2B).

Asynchroniczne dodatnie piki korelacyjne w widmach krwi pacjentów z malarią o g równych to: 6,15 i 1,85 (wysokospinowy hem Fe(III); niskospinowy Fe(III) hydroksyhem lub β -hematyna), 2,03 i 1,93 (rodnik hydroperoksyłowy; β -hematyna). Ujemne asynchroniczne piki korelacyjne w widmach krwi pacjentów z malarią pojawiają się przy g równym: 6,15 i 2,86 (wysokospinowy hem Fe(III); niskospinowe kompleksy hemu), 4,25 z 2,00 (wysokospinowy niehemowy Fe(III); rodnik tyrozyłowy) (Ryc. 5.5.2 D).

Pojawiające się piki korelacyjne na widmach 2D pochodzą głównie z jonów żelaza i ilustrują złożoną ewolucję żelaza we krwi. Przypisanie niektórych z nich może być niejednoznaczne ze względu na złożoność struktur środowiska lokalnego o niskiej symetrii. Synchroniczne piki korelują sygnały miedzi i żelaza w ceruloplazminie i albuminie oraz transferynie. Ich obecność może wskazywać na wcześniejszy proces degradacji erytrocytów, a co z tym idzie zaangażowanie białek transportowych w krwi pacjentów zarażonych *Plasmodium*, w stosunku do krwi zdrowych pacjentów. Źródłem pików asynchronicznych są jony żelaza w kompleksach nisko- i wysokospinowych. Na uwagę zasługuje pojawienie się asynchronicznych sygnałów o bardzo niskiej wartości czynnika g oraz różnorodność wyodrębnionych centrów paramagnetycznych w krwi pacjentów z malarią.

Piśmiennictwo:

1. Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kurdziel M, Biesiada G, Kozicki M, Garlicki A, Wesełucha-Birczynska A. The aging of *P. falciparum* infected RBCs by 2D-correlation Raman and EPR spectroscopy. *J Mol Struct.* 1224 (2021) 129036.
2. Wesełucha-Birczyńska A, Kozicki M, Czepiel J, Łabanowska M, Nowak P, Kowalczyk G, Kurdziel M, Birczyńska M, Biesiada G, Mach T, Garlicki A. Human erythrocytes analyzed by generalized 2D Raman correlation spectroscopy. *J Mol Struct.* 1069 (2014) 305-312.

6. Podsumowanie i dyskusja

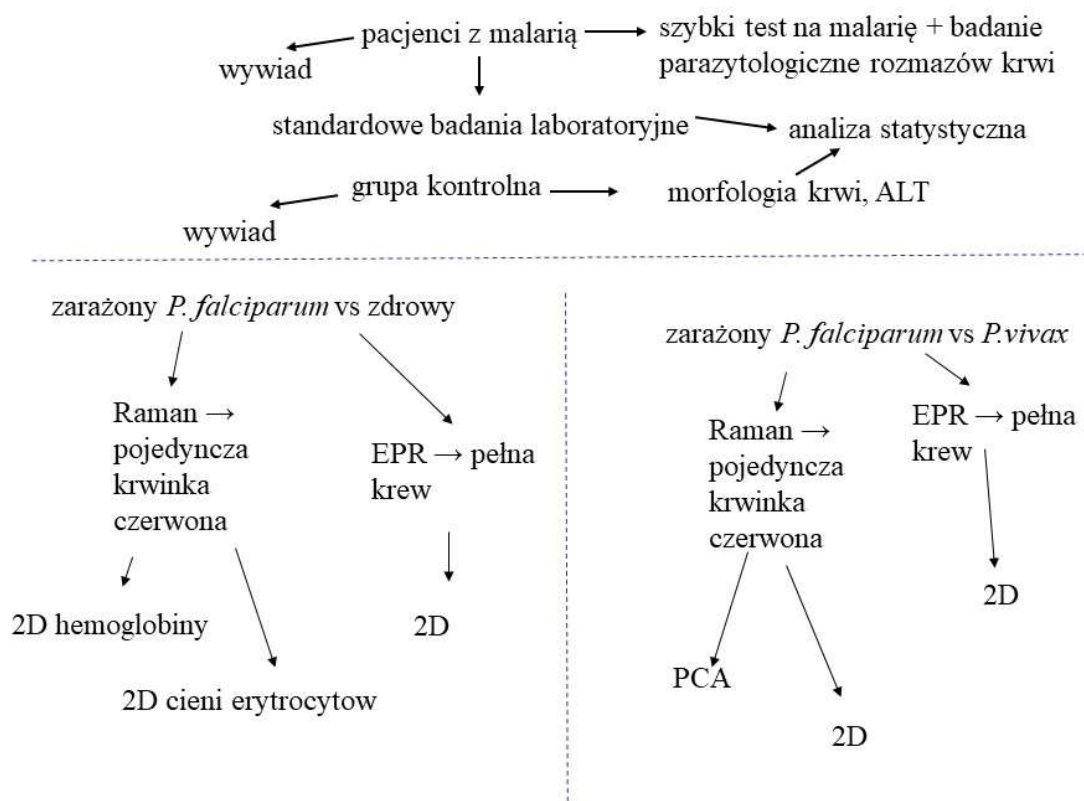
Malaria jest jedną z najgroźniejszych w dzisiejszych czasach chorób zakaźnych, obok gruźlicy oraz zakażenia wirusem HIV. Jest to choroba wektorowa przenoszona przez komary z rodziny widliszka. Wywołują ją pasożyty, najczęściej *Plasmodium falciparum* oraz *Plasmodium vivax*. Choroba ta występuje endemicznie w rejonach tropikalnych, które najczęściej są biedne. Przez to walka z malarią staje się globalnym wyzwaniem. W Polsce aktualnie jest chorobą zawlekana przez podróżników oraz pracujących w rejonach endemicznych i jest najczęstszą, najgroźniejszą chorobą, z którą się mogą mierzyć po powrocie. Ważnym elementem w walce z tą chorobą jest diagnostyka, jest to jeden z punktów ABCD zwalczania malarii opracowany przez WHO (A- awarness- świadomość, B – bite prevention, czyli zapobieganie ukąszeniom, C- chemioprophylaktyka, D- diagnostyka).

Celem pracy była ocena możliwości wykorzystania spektroskopii ramanowskiej oraz EPR w poznaniu zmian strukturalnych w erytrocytach w zależności od rodzaju atakującego zarodźca. Spektroskopia ramanowska jest to metoda z powodzeniem znajdująca w ostatnim czasie zastosowanie także w medycynie. Jest nieinwazyjną i stosunkowo szybką metodą przybliżającą skład chemiczny i budowę substancji. Badania spektroskopowe wykonywano na hodowlach komórkowych erytrocytów zarażanych *Plasmodium* były obiecujące. Ponadto obie metody spektroskopia ramanowska oraz spektroskopia EPR są dobrymi metodami do analizy krwinek czerwonych, które odgrywają istotną rolę w patogenezie malarii.

Do badania włączono pacjentów hospitalizowanych z powodu malarii w Oddziale Chorób Zakaźnych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie w latach 2012-2023 ich wyniki porównywano z grupą kontrolną zdrowych ochotników. U pacjentów z malarią

przeprowadzano rutynową diagnostykę laboratoryjną, w tym rozmazy krwi włośniczkowej celem oceny stopnia parazytemii i potwierdzenia gatunku zarodźca. Ponadto od pacjentów (na początku hospitalizacji oraz w trakcie i pod koniec leczenia) oraz zdrowych ochotników pobierano krew w celu wykonania badań metodą spektroskopii ramanowskiej oraz EPR. Badania te wykonywano we współpracy z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Badania były zgodne z dobrą praktyką lekarską, zgodnie z deklaracją Helsińską, uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Plan badań przedstawia poniższy schemat.



Rycina 10.1 Schemat badań przeprowadzanych w pracy doktorskiej.

Analizie poddano dane z historii chorób pacjentów, przeanalizowano ich sposób leczenia. Poddano także analizie, w tym także statystycznej w porównaniu z wynikami badań grupy kontrolnej wyniki podstawowych badań laboratoryjnych. Najważniejsze wnioski z przeprowadzanej analizy były spodziewane - Zaobserwowano występowanie 3 istotnych statystycznie związków- im większa parazytemia, tym mniejsza liczba płytek krwi, wyższy poziom ALT oraz wyższy poziom CRP. Jeśli chodzi o dane z wywiadu większość pacjentów stanowili młodzi, zdrowi mężczyźni pracujący sezonowo w krajach afrykańskich, niestosujący profilaktyki przeciwmalarycznej.

W badaniach spektroskopowych metodą spektroskopii ramanowskiej zaobserwowano charakterystyczne pasma markerowe u chorych dominująca strukturą hemu jest hem nieutlenowany. Charakterystyczne pasma drgań pasmo drgań ν_2 i ν_{37} u pacjenta z rozpoznaną malarią (dla *P. falciparum* drganie 1587 cm^{-1} , zaś dla *P. vivax* 1638 cm^{-1}). Wskazano pasma aktywności proteinaz asparaginowych, które prowadzą do lizy hemoglobiny na oligopeptydy: 1550 cm^{-1} (Trp), 1620 cm^{-1} , 1170 cm^{-1} i 1189 cm^{-1} (Tyr). W półpłynnej błonie komórkowej lipidy układają się konformację *trans* oraz *gauche*. U pacjentów z malarią obserwuje się obniżony stosunek intensywności pasm $1130\text{ cm}^{-1}/1070\text{ cm}^{-1}$ w stosunku do zdrowej błony, czyli zwiększa się procent lipidów nieuporządkowanych w konformacji *gauche*.

Analiza 2D-COS widm erytrocytów pobranych od pacjentów ze zdiagnozowanym *P. falciparum* rejestrowana w funkcji czasu i porównania ze wyników zdrowej kontroli wykazała charakterystyczne zmiany mapy są wypełnione są wypełnione pikami korelacyjnymi, których nie obserwuje się dla zdrowych erytrocytów. Wskazują one na drogę agregacji hemu do hemozoiny, działania spowodowane aktywnością asparaginazy hemoglobinowej- dezintegrację na produkty rozkładu hemoglobiny. Widoczne są także sygnały pochodzące od tyrozyny wskazują kolejny etap procesu rozpadu hemoglobiny, obserwowany także przy degradacji

zdrowych krwinek- na degradację wiązań wodorowych pomiędzy heliakalnymi fragmentami, pomiędzy odpowiednimi podjednostkami globiny. Podobnie obraz widm 2D cieni erytrocytów otrzymanych z krwi pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum* są zupełnie różne niż cieni erytrocytów otrzymanych z krwi zdrowych ochotników- wskazują one na zmiany białek błonowych (w tym powstawanie PfHRP2) oraz proces dezintergracji dwuwarstwy lipidowej.

W celu zróżnicowania widm ramanowskich pacjentów z malarią wywołaną *P. falciparum* oraz *P. vivax* wykorzystano do analizy 2 metody- PCA oraz 2D.

W analizie widm metoda PCA podzielono na odpowiednie zakresy widm i analizowano wyniki badań krwi pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum* oraz *P. vivax* na początku hospitalizacji oraz w fazie zdrowienia. Zauważalne są m.in. zmiany w zawartości aminokwasów białek błonowych- dla *P. falciparum* występuje wzrost zawartości Asp, Glu, Ser, a dla *P. vivax* następuje wzrost zawartości Tyr oraz zmiany w wewnętrznej warstwie błony cytoplazmatycznej. Różnice między wynikami indukowanymi przez dwa gatunki pasożytów pojawiające się w pierwszej dobie hospitalizacji wskazują na zmiany w drganiach hemu jako charakterystyczne dla *P. falciparum*, natomiast obecność zagregowane formy hemu i Hz oraz łańcuchów bocznych Trp i Glu dla *P. vivax*. W kolejnych zakresach pasm- widma wskazują na tworzenie PfEMP1 przez *P. falciparum*, natomiast w widmach pacjentów wywołanych *P. vivax* tworzenie kompleksu ligand-receptor - receptor transferyny (TfR).

Przy zastosowaniu metody 2D w celu rozróżnienia zmian w erytrocytach wywołanych działaniem *P. falciparum* i *P. vivax* wykazano podobne zmiany, jednak można zaobserwować ich przesunięcie czasowe. Jako przykład można zauważyć, że zmiany powstałe w wyniku działania *P. falciparum* w pierścieniu hemu (v4) pojawiają się wcześniej niż drgania hemu v10 i Arg.

Spektroskopia ramanowska może więc służyć do oceny zmian strukturalnych erytrocytów w zależności od gatunku zarażającego *Plasmodium* po zastosowaniu metod 2D lub PCA do obróbki danych daje przyszłościowe nadzieje na nowe metody diagnostyczne. Wymaga to jednak wielu badań i walidacji.

W badaniach pełnej krwi metodą spektroskopii EPR obserwowane są natomiast postaci utlenionego żelaza Fe(III) z charakterystycznym, osiowym widmem. Prostopadła składowa sygnału ($g_{\perp} = 6,00$) wysokospinowego żelaza Fe(III), ($S=5/2$) jest widoczna w zakresie niskiego pola i można wyróżnić dwie składowe z $g_1 = 6,10$, $g_2 = 5,80$, co sugeruje, że pozycja jonu żelaza ma niższą symetrię, jest rombowo odkształcona od symetrii tetragonalnej. Charakterystyczną cechą dla pacjentów z malarią są sygnały pochodzące od transferryny. Różnice w widmach EPR próbek krwi grupy badanej i kontrolnej są bardziej widoczne po obróbce za pomocą metody 2D.

7. Wnioski

1. Potwierdzona została hipoteza badawcza, że analiza spektroskopowa erytrocytów pobranych od pacjentów zarażonych malarią metodą spektroskopii ramanowskiej i EPR, może przybliżyć mechanizm tej choroby, oraz rozróżnić sposób aktywności wywołujących ją zarodźców co może być przyczynkiem do dalszych badań w tym kierunku.
2. Ocena przebiegu rozpadu erytrocytów pobranych od pacjentów zarażonych *P. falciparum* w porównaniu do grupy kontrolnej wykazała charakterystyczne dla *Plasmodium* zmiany występujące w krwinkach.
3. Ocena i porównanie badanych krwinek pacjentów pokazuje także różnice w zmianach wywołanych przez aktywność *P. falciparum* oraz *P. vivax*.
4. Powyższe obserwacje wskazują na potencjalną możliwość wykorzystania spektroskopii ramanowskiej w diagnostyce po dalszych wieloletnich obserwacjach krwi pobieranej od pacjentów oraz następowej walidacji.
5. W analizie statystycznej wyników podstawowych badań laboratoryjnych stwierdzono następujące różnice pomiędzy grupą badaną, a grupą kontrolną:
 - w grupie badanej poziom hemoglobiny oraz liczba płytek były istotnie statystycznie niższe w odniesieniu do grupy kontrolnej
 - w grupie badanej poziom ALT były istotnie statystycznie wyższy w odniesieniu do grupy kontrolnej.

6. W analizie statystycznej wyników podstawowych badań laboratoryjnych przy podziale grupy badanej według najczęstszych gatunków malarii – *P. falciparum* oraz *P. vivax* nie zaobserwowano występowania istotnych statystycznie różnic pomiędzy dwoma grupami osób. Wydaje się, że ma to związek z ograniczeniem niniejszego badania, jakim jest niska liczebność pacjentów ze zdiagnozowaną malarią *P. vivax*.

7. W badanej grupie osób sprawdzono dodatkowo czy występuje istotny statystycznie związek między parazytemią, a analizowanymi zmiennymi w podstawowych badaniach laboratoryjnych pacjentów. Zaobserwowano występowanie 3 istotnych statystycznie związków- im większa parazytemia, tym:
 - mniejsza liczba płytek krwi
 - wyższy poziom ALT
 - wyższy poziom CRP (najsilniejszy związek).

8. Jeżeli chodzi o grupę badaną, zaobserwowano jeszcze kilka ważnych kwestii związanych z wartościami referencyjnymi. Na uwagę zwraca fakt, że w badanej grupie osób:
 - u 16 z nich, czyli połowie występował poziom Hb poniżej 12 g/dl,
 - u 22 z nich (68,8%) występował poziom ALT powyżej 41 U/l
 - u 26 (89,7%) z nich występował poziom CRP powyżej 5 mg/l.

9. Zaobserwowano jeszcze następujące zależności:
 - w grupie pacjentów z podwyższonym poziomem ALT zaobserwowano wyższą parazytemię, niż w grupie osób z prawidłowym poziomem ALT.

10. Ponadto analiza danych pacjentów uczestniczących w badaniu hospitalizowanych w Oddziale Klinicznym Chorób Zakaźnych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie w latach 2012-2023, pozwala stwierdzić, że:

- większość chorujących na malarię nie stosowała profilaktyki przeciwmalarycznej
- większość osób chorujących na malarię podróżowała w celach zarobkowych (praca sezonowa)
- najczęstszym celem podróży były kraje afrykańskie
- większość pacjentów stanowili młodzi mężczyźni (średnia wieku poniżej 40 lat)
- większość osób nie cierpiała na inne przewlekłe choroby.

8. Wykaz skrótów

2D-COS- dwuwymiarowa spektroskopia korelacyjna

ACT (ang. artemisin-based combination therapy)- terapia malarii oparta na pochodnych artemizyny

ALP- fosfataza alkaliczna

ALT- aminotransferaza alaninowa

APTT (ang. activated partial thromboplastin time)- czas częściowej tromboplastyny po aktywacji- czas kaolinowo-kefalinowy

Arg- arginina

Asp- kwas asparaginowy

AST- aminotransferaza asparaginianowa

CRP (ang. C-reactive protein)- białko C-reaktywne

DEET- N,N-dietylo-m-toluamid

DNA- kwas deoksyrybonukleinowy

EPR (ang. Electron Paramagnetic Resonance)- elektronowy rezonans paramagnetyczny

FT-IR- fourierowska spektroskopia w zakresie podczerwieni

FWHM (ang. full- width half maximum)- szerokość połówkowa linii spektralnej

GCS (ang. Glasgow Coma Scale)- skala używana w medycynie w celu oceny poziomu przytomności

Gln- glutamina

Glu- kwas glutaminowy

GTS (ang. Global technical strategy for malaria)- globalny program strategii WHO w walce z malarią

GUMed- Gdański Uniwersytet Medyczny

Hb- hemoglobina

His-histydyna

Hz- hemozoina

ICORS (ang. International Conference on Raman Spectroscopy)- Międzynarodowa Konferencja Spektroskopii Ramanowskiej

IMMiT- Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej

INR (ang. international normalized ratio)- standaryzowany współczynnik czasu protrombinowego

Lys- lizyna

P. falciparum- *Plasmodium falciparum*

P. knowlesi- *Plasmodium knowlesi*

P. malariae- *Plasmodium malariae*

P. ovale- *Plasmodium ovale*

P. vivax hibernans- *Plasmodium vivax hibernans*

P. vivax- *Plasmodium vivax*

P. vivax vivax- *Plasmodium vivax vivax*

PC- fosfatydylocholina,

PC- współrzędna czynnikowa

PCA (ang. Principal Component Analysis)- analiza głównych składowych

PCR (ang. Polymerase Chain Reaction)- reakcja łańcuchowa polimerazy

PCT- prokalcytonina

PE- fosfatydyloetanolamina,

PfEMP1 (ang. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1)- antygen, charakterystyczny *P. falciparum*, który odgrywa kluczową rolę w patogenezie malarii przez niego wywołanej

Phe- fenyloalanina

PLS- analiza metodą regresji cząstkowych najmniejszych kwadratów

PLT – wskaźnik liczby płytek krwi w μl (mm^3) krwi

PS- fosfatydyloseryna

PZH- Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy

RDT (ang. Malaria rapid diagnostic test)- tzw. szybki test na malarię

RNA- kwas rybonukleinowy

RR- rezonansowy efekt Ramana

RTS,S/AS01- szczepionka przeciwko malarii (nazwa handlowa Mosuirix)

SD- odchylenie standardowe

Ser- seryna

Sph- sfingomielin

Thr- treonina

TRAg- antygeny bogate w tryptofan

Trp- tryptofan

Tyr-tyrozyna

WBC (ang. white blood cells) – wskaźnik określający liczbę białych krwinek w morfologii krwi

WHO (ang. World Health Organization)- Światowa Organizacja Zdrowia

9. Piśmiennictwo alfabetycznie

Spis alfabetyczny piśmiennictwa:

1. Abe M, Kitagawa T, and Kyogoku Y. Resonance Raman spectra of octaethylporphyrinatoNi(II) and mesodeuterated and ^{15}N substituted derivatives. II. A normal coordinate analysis. *J Chem Phys.* 69 (1978) 4526-4534.
2. Alencar de FEC, dos Santos Malafrente R, Cerutti Junior C, Fernandes LN, Buery JC, Fux B, Rezende HR, Ribeiro de Castro Duarte AM, Medeiros-Sousa AM, Miranda AE. Assessment of asymptomatic *Plasmodium spp.* infection by detection of parasite DNA in residents of an extra-Amazonian region of Brazil. *Malar J.* 17 (2018) 113.
3. Almond L M, Hutchings J, Lloyd G, Barr H, Shepherd N, Day J., Stevens O, Sanders S, Wadley M, Stone N, Kendal C. Endoscopic Raman spectroscopy enables objective diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc.* 79 (2014) 37-45.
4. Baird JK. Tropical Diseases, *Trop Dis Travel Med Vaccines.* 3 (2017) 7.
5. Baldwin J, Chothia C, Haemoglobin: The Structural Changes Related to Ligand Binding and its Allosteric Mechanism. *J Mol Biol.* 129 (1979) 175-220.
6. Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Krainska M, Biesiada G, Moskal P, Kozicki M, Garlicki A, Wesełucha-Birczynska A. Could Raman spectroscopy distinguish between *P. falciparum* and *P. vivax* Infection? *Clin Spectrosc.* 3 (2021) 100015.
7. Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kurdziel M, Biesiada G, Kozicki M, Garlicki A, Wesełucha-Birczynska A. The aging of *P. falciparum* infected RBCs by 2D-correlation Raman and EPR spectroscopy. *J Mol Struct.* 1224 (2021) 129036.

8. Birczyńska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kucharska M, Kurdziel M, Biesiada G, Garlicki A, Wesełucha-Birczyńska A. Course of Plasmodium infection studied using 2D-COS on human erythrocytes, Malar J., przyjęte do druku.
9. Calderaro A, Montecchini S, Buttrini, M, Piccolo G, Rossi S, Arcangeletti MC, Farina B, De Conto F, Chezzi C. Malaria Diagnosis in Non-Endemic Settings: The European Experience in the Last 22 Years. Microorganisms. 9 (2021) 2265.
10. Carey PR. Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies. Academic Press. New York, 1982.
11. CDC - Malaria - Diagnosis & Treatment (United States) - Treatment (U.S.) - Guidelines for Clinicians [dostęp 20.02.2023].
12. Chałubiński T. Zimnica, studium ze stanowiska praktycznego. Gebethner i Wolff, Warszawa, 1875.
13. Chionidid PL, Patel D, Goodyer L and Ranson H. Guidelines for malaria prevention in travellers from the United Kingdom, 2021. London: Public Health England; March 2021.
14. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2012, Raport PZH, Warszawa 2013.
15. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2013, Raport PZH, Warszawa 2014.
16. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2014, Raport PZH, Warszawa 2015.
17. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2015, Raport PZH, Warszawa 2016.
18. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2016, Raport PZH, Warszawa 2017.
19. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2017, Raport PZH, Warszawa 2018.
20. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2018, Raport PZH, Warszawa 2019.
21. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2019, Raport PZH, Warszawa 2020.
22. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2020, Raport PZH, Warszawa 2021.
23. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2021, Raport PZH, Warszawa 2022.

24. Cordero E, Latka I, Matthäus C, Schie IW, Popp J. *In-vivo* Raman spectroscopy: from basics to applications. *J. Biomed. Opt.* 23 (2018) 071210 (1-24).
25. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell.* 124 (2006) 755–766.
26. Cowman AF, Tonkin CJ, Tham W-H, Duraisingh MT. *Cell Host Microbe.* 22 (2017) 232-245.
27. Dzbeński TH, Sytuacja epidemiologiczna malarii w Polsce – dawniej, obecnie i w przyszłości. *Wiad Parazytol.* 54(3) (2008) 205–211.
28. Gaber BP, Yager P, Peticolas WL, Interpretation of biomembrane structure by Raman difference spectroscopy. *Biophys J.* 21 (1978) 161-176.
29. Goldberg DE, Slater AFG, Beavis R, Chait B, Cerami Ay, Henderson GB. Hemoglobin Degradation in the Human Malaria Pathogen *Plasmodium falciparum*: A Catabolic Pathway Initiated by a Specific Aspartic Protease. *J Exp Med.* 173 (1991) 961-969.
30. Goldberg DE, Slater AFG. The Pathway of Hemoglobin Degradation in Malaria Parasites. *Parasitol Today.* 8 (1992) 280-282.
31. Grüning C, Heiber A, Kruse F, Ungefehr J, Gilberger T-F, Spielmann T, Development and host cell modifications of *Plasmodium falciparum* blood stages in four dimensions. *Nat Commun.* 2 (2011) 165.
32. Gutowski M. Spektroskopia rezonansów magnetycznych. [w]: *Encyklopedia Fizyki Współczesnej*, PWN, Warszawa, str. 332-339.
33. Heng HPS, Shu C, Zheng W, Lin K, Huang Z. Advances in real-time fiber-optic Raman spectroscopy for early cancer diagnosis: Pushing the frontier into clinical endoscopic applications. *Transl Biophotonics.* 3 (2021) e202000018 (1-31).

34. Hsiao LL, Howard RJ, Aikawa M, Taraschi TF, Modification of host cell membrane lipid composition by the intra-erythrocytic human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J.* 274 (1991) 121-132.
35. <http://www.malaria.com/overview/malaria-history> [dostęp: 20.03.2023].
36. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/be/Heme_b.svg/212px-Heme_b.svg.png [dostęp: 24.04.2023].
37. https://www.academia.edu/11104178/Hemoglobin_and_the_Heme_Group_Metal_Complexes_in_the_Blood_for_Oxygen_Transport [dostęp: 28.04.2023].
38. <https://www.mayoclinic.org/drugs-supplements/chloroquine-oral-route/proper-use/drg-20062834> [dostęp 20.02.2023].
39. <https://www.mp.pl/interna/chapter/B16.II.18.153.1.6> [dostęp: 19.12.2022].
40. <https://www.mp.pl/interna/chapter/B16.II.18.153.1.6>.
41. <https://www.mp.pl/interna/chapter/B16.II.18.153.1.6>.
42. https://www.uptodate.com/contents/non-falciparum-malaria-p-vivax-p-ovale-and-p-malariae?search=malaria%20treatment&source=search_result&selectedTitle=3~150&usage_type=default&display_rank=3 [dostęp 20.02.2023].
43. https://www.uptodate.com/contents/prevention-of-malaria-infection-in-travelers?search=malaria%20treatment&source=search_result&selectedTitle=8~150&usage_type=default&display_rank=8 [dostęp 20.02.2023].
44. https://www.uptodate.com/contents/treatment-of-severe-malaria?search=malaria%20treatment&source=search_result&selectedTitle=2~150&usage_type=default&display_rank=2 [dostęp 20.02.2023].
45. <https://www.uptodate.com/contents/treatment-of-uncomplicated-falciparum-malaria-in-nonpregnant-adults-and->

[children?search=malaria%20treatment&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1](https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/case-management/diagnosis) [dostęp 20.02.2023].

46. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/case-management/diagnosis> [dostęp: 7.01.2023].
47. Introduction to Principal Component Analysis (PCA); Program Unscrambler X v.10.3 Help.
48. Jolliffe IT, Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Phil Trans R Soc. A* 374 (2016) 20150202 (1-16).
49. Khoshmanesh A, Christensen D, Perez-Guaita D, Iturbe-Ormaetxe I, O'Neill SL, McNaughton D, Wood BR. Screening of Wolbachia Endosymbiont Infection in *Aedes aegypti* Mosquitoes Using Attenuated Total Reflection Mid-Infrared Spectroscopy. *Anal Chem.* 89 (10) (2017) 5285–5293.
50. Khoshmanesh A, Dixon MWA, Kenny S, Tilley L, McNaughton D, Wood BR. Detection and Quantification of Early-Stage Malaria Parasites in Laboratory Infected Erythrocytes by Attenuated Total Reflectance Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis. *Anal Chem.* 86 (2014) 4379–4386s..
51. Kitagawa T, Ozaki Y. Infrared and Raman Spectra of Metalloporphyrins, Structure and Bonding. *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg*, 1987.
52. Knap J. P. i Myjak P. red. *Malaria w Polsce i na świecie – wczoraj i dziś*, Wyd. II, *α-medica press, Bielsko-Biała*, 2009.
53. Kuna A. *Malaria*. [w]: Boroń- Kaczmarek A, Wiercińska-Drapała A. *Choroby zakaźne i pasożytnicze*. PZWL, Warszawa 2022.
54. Kurzer J. *Zmiany we krwi obwodowej w przebiegu chorób zakaźnych* [w]: *Atlas krwi obwodowej podstawowe narzędzie diagnostyczne*. red. Pereira I, George Tracy I, Arber

- DA red. wyd I polskiego Urbanowicz I, Wołowicz D, Korycka-Wołowicz A, MedPharm Polska, Wrocław, 2019.
55. Malaria Clinical Management Guidelines (June 2022) (Version 1.0), MOH, NUG of Myanmar.
56. Malaria in the United States: Treatment Tables CDC.
57. Management of severe Malaria, Practical Handbook, Third Edition, WHO, 2012.
58. Myjak P, Nahorski W, Pieniążek NJ, Piętkiewicz H. Usefulness of PCR for Diagnosis of Imported Malaria in Poland, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 21 (2002) 215–218.
59. Nakamoto K. Infrared and Raman spectra of Inorganic and coordination compounds. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2009.
60. Nakamoto K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. John Wiley & Sons, 1997.
61. Nicolson GL. Update of the 1972 Singer-Nicolson Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure. *Discoveries.* Oct-Dec 1 (2013): e3.
62. Noda I, Dowrey AE, Marcott C, Story GM, Ozaki Y. *Appl Spectrosc.* 54 (2000) 236A–248A.
63. Noda I, Dowrey AE, Marcott C, Story GM, Ozaki Y. Generalized Two-Dimensional Correlation Spectroscopy. *Appl Spectrosc.* 54 (2000) 236A -248A.
64. Noda I, Generalized Two-Dimensional Correlation Method Applicable to Infrared, Raman, and Other Types of Spectroscopy. *Appl Spectrosc.* 47 (1993) 1329-1336.
65. Noda I, Ozaki Y. Two-Dimensional Correlation Spectroscopy: Applications in Vibrational and Optical Spectroscopy. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2002.
66. NVBDCP Guidelines for treatment of malaria I North Eastern States, India .
67. Nykiel P. Spektroskopia Ramana: nowoczesna technika w diagnostyce medycznej i analizie biochemicznej. *Biul. Wydz. Farm. WUM,* 4 (2013) 27-36.

68. Oleś A. Metody doświadczalne fizyki ciała stałego. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1998.
69. Pahlow S, Weber K, Popp J, Wood BR, Kochan K, Ruther A, Perez-Guaita D, Heraud P, Stone N, Dudgeon A, Gardner B, Reddy R, Mayerich D, and Bhargava R. Application of Vibrational Spectroscopy and Imaging to Point-of-Care Medicine: A Review. *Appl Spectrosc Rev.* 72(S1) (2018) 52–84.
70. Papalexis V, Siomos M-A, Campanalea N, Guo X.-G, Kocak G, Foley M, Tilley L. Histidine-rich protein 2 of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, is involved in detoxification of the by-products of haemoglobin degradation. *Mol Biochem Parasit.* 115 (2001) 77–86.
71. Perez-Guaita D, Marzec KM, Hudson A, Evans C, Chernenko T, Matthäus Ch, Miljkovic M, Diem M, Heraud Ph, Richards JS, Andrew D, Anderson DA, Doerig C, Garcia-Bustos J, McNaughton D, Wood BR. Parasites under the Spotlight: Applications of Vibrational Spectroscopy to Malaria Research. *Chem Rev.* 118 (2018) 5330-5358.
72. Perutz MF. Stereochemistry of Cooperative Effects in Haemoglobin: Haem–Haem Interaction and the Problem of Allostery. *Nature.* 228 (1970) 726-39.
73. Pietrzyk P, Adamski A, Sojka Z. Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego, w: Wybrane metody spektroskopii i spektrometrii molekularnej w analizie strukturalnej, red. K. Małek, L. Proniewicz, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 2005, Rozdz. 6. , str. 141-184.
74. [Profilaktyka malarii - Główny Inspektorat Sanitarny - Portal Gov.pl \(www.gov.pl\)](http://www.gov.pl) [dostęp 20.02.2023].
75. Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, *Biochemia Harpera Ilustrowana*, PZWL, Warszawa, 2022.

76. Sacharz J, Weselucha-Birczyńska A, Zięba-Palus J, Lewandowski MH, Kowalski R, Palus K, Chrobok Ł, Moskal P, Birczyńska M, Sozańska A, Epileptic rat brain tissue analyzed by 2D correlation Raman spectroscopy, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 188 (2018) 581-588.
77. Sacharz J, Weselucha-Birczyńska A, Zięba-Palus J, Lewandowski MH, Palus-Chramiec K, Chrobok Ł, Moskal P, Birczyńska M, Sozańska A. 2D Raman study of the healthy and epileptic rat cerebellar cortex tissue. *Jour Mol Struct.* 1163 (2018) 167-173.
78. Saifutdinov RG, Larina LI, Vakul'skaya TI, Voronkov MG. *Electron Paramagnetic Resonance in biochemistry and medicine.* Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, USA, 2001.
79. Sherman IW. *The life of Plasmodium: an overview w: Molecular Approaches to malaria,* red. Irwin W. Sherman. ASM Press, Washington DC, 2005.
80. Sigel A, Sigel H. *Metal Ions in Biological Systems.* CRC Press, 2004.
81. *Spectroscopies,* Academic Press, New York, 1982.
82. Stasiuk M, Kijanka G, Kozubek A. Zmiany kształtu erytrocytów i czynniki je wywołujące. *Postępy Biochem.* 55 (2009) 425-433.
83. Steck TL. The band 3 protein of the human red cell membrane: a review. *J Supramol Struct.* 8 (1978) 311–324.
84. Stevens A, Lowe JS. *Human Histology.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL & Wydawnictwo Medyczne Słotwiński Verlag, red. M. Zabel, Warszawa, wyd. 2, 2000.
85. Sułek K. *Struktura hemoglobiny. Charakterystyka krwi i elementów morfotycznych.* [w]: *Wielka Interna, tom 10 Hematologia* red. Dmoszyńska A. Medical Tribune Polska, Warszawa, 2011.

86. Tu A. T., Use of Raman Spectroscopy in Biological Compounds, *J Chin Chem Soc.* 50 (2003) 1-10.
87. Tu AT. *Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications.* John Wiley & Sons, New York, 1982.
88. Tu Y., Artemisinin—a gift from traditional Chinese medicine to the world, Nobel lecture, December 7, 2015. <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/tu-lecture.pdf>
89. Twardowski J. *Biospektroskopia.* PWN, Warszawa, 1990.
90. Universal access to malaria diagnostic testing: an operational manual. 1.Malaria – diagnosis. 2.Antimalarials – therapeutic use. 3.Malaria – drug therapy. 4.Diagnostic tests, Routine – utilization. 5.Manuals. I. World Health Organization. ISBN 978 92 4 150209 2 (NLM classification: WC 750).
91. *Vibrational and Optical Spectroscopy,* John Wiley & Sons, Chichester, 2004.
92. Wachsmann-Hogiu S, Weeks T, Huser T. Chemical analysis in vivo and in vitro by Raman spectroscopy—from single cells to humans. *Curr Opin Biotechnol.* 20 (2009) 63-73.
93. Wesełucha-Birczyńska A, Kozicki M, Czepiel J, Łabanowska M, Nowak P, Kowalczyk G, Kurdziel M, Birczyńska M, Biesiada G, Mach T, Garlicki A. Human erythrocytes analyzed by generalized 2D Raman correlation spectroscopy. *J Mol Struct.* 1069 (2014) 305-312.
94. White NJ, Breman JG. *Zimnica (malaria) [w]: Harrison Choroby zakaźne.* red. Kasper DL, Fauci AS, Filisiak R. Czelej, Lublin, 2012.
95. WHO Guidelines for malaria, 25 November 2022. Geneva: World Health Organization; 2022 (WHO/UCN/GMP/2022.01 Rev.3). License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

96. Wood BR, Caspers P, Puppels GJ, Pandiancherri S, McNaughton D. Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation. *Anal Bioanal Chem.* 387 (2007)1691–1703.
97. Wood BR, Langford SJ, Cooke BM, Lim J, Glenister FK, Duriska M, Unthank JK, McNaughton D. Resonance Raman spectroscopy reveals new insight into the electronic structure of β -Hematin and malaria pigment. *J Am Chem Soc.* 126 (2004) 9233–9239.
98. Wood BR, McNaughton D. Raman excitation wavelength investigation of single red blood cells *in vivo*. *J Raman Spectrosc.* 33 (2002) 517–523.
99. World malaria report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019.
100. World malaria report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021.
101. Wroczyńska A, Kuna A., Mayer L. *Malaria profilaktyka i leczenie*, Alfa-Medica Press, 2016.
102. Wystawa, ICORS 11, Indian Academy of Sciences, Bangalore, India, 2012.
103. Zawada K., *Zastosowanie spektroskopii EPR w farmacji i medycynie*, *Farm Pol.* 65 (2009) 224-228.

10. Streszczenie w języku polskim

Malaria jest wciąż jedną z najgroźniejszych w dzisiejszych czasach chorób zakaźnych. Jest to pasożytnicza choroba wektorowa przenoszona przez komary, najczęściej wywołana *Plasmodium falciparum* oraz *Plasmodium vivax*. Występuje endemicznie w rejonach tropikalnych, w Polsce aktualnie jest chorobą zawlekaną przez podróżników oraz pracujących w rejonach endemicznych i jest najczęstszą chorobą, z którą się mogą mierzyć po powrocie.

Celem pracy była ocena możliwości wykorzystania spektroskopii ramanowskiej w poznaniu zmian strukturalnych w erytrocytach w zależności od rodzaju atakującego zarodźca. Zastosowano również spektroskopie elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Wcześniej inni badacze wykonywali badania spektroskopowe na hodowlach komórkowych erytrocytów zarażanych *Plasmodium* i były one obiecujące.

Do badania włączono pacjentów hospitalizowanych z powodu malarii w Oddziale Chorób Zakaźnych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie w latach 2012-2023 ich wyniki porównywano z grupą kontrolną zdrowych ochotników. U pacjentów z malarią przeprowadzano rutynową diagnostykę laboratoryjną, w tym rozmazy krwi włośniczkowej celem oceny stopnia parazytemii i potwierdzenia gatunku zarodźca. Ponadto od pacjentów (na początku, w trakcie i pod koniec leczenia) oraz zdrowych ochotników pobierano krew w celu wykonania badań metodą spektroskopii ramanowskiej oraz EPR. Badania te wykonywano w ramach interdyscyplinarnej współpracy z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w trakcie realizacji Środowiskowych Studiów Doktoranckich „Interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej” InterDokMed,. Badania były zgodne z dobrą praktyką lekarską,

zgodnie z deklaracją Helsińską, uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Zaobserwowano różnice erytrocytów w zakresie zmian struktury hemu i enzymów białkowych biorących udział w degradacji hemoglobiny, zarówno pomiędzy pacjentami z malarią a zdrowymi ochotnikami, jak i pomiędzy pacjentami zakażonymi różnymi gatunkami zarodźca. Wskazano także pasma proteinaz asparaginowych, które prowadzą do lizy hemoglobiny na oligopeptydy, a których pochodzenie można przypisać aktywności zarodźców. Określono pasma markerowe wskazujące na nieuporządkowanie/ uporządkowanie lipidów w błonie erytrocytów jako wzrost stosunku konformacji *gauche* do konformacji *trans*. W celu lepszego porównania zmian w erytrocytach pacjentów z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum* lub *P. vivax* wykorzystywano statystyczną metodę opracowania danych- analizę głównych składowych (ang. principal component analysis, PCA), oraz korelację dwuwymiarową (2D-COS). Umożliwiły one uwidocznienie różnic. Spektroskopia ramanowska może służyć więc do oceny zmian strukturalnych erytrocytów w zależności od gatunku zarażającego *Plasmodium* co daje przyszłościowe nadzieje na nowe metody diagnostyczne. Wymagałoby to jednak wielu dalszych badań i walidacji.

W badaniach pełnej krwi metodą spektroskopii EPR obserwowane są natomiast postaci żelaza Fe(III), które miało obniżoną symetrię u pacjentów z rozpoznaną malarią. Widoczne także były sygnały hemozoiny, świadczące o aktywności zarodźców. Zastosowaniu metody korelacji dwuwymiarowej 2D, pozwoliło wskazać na zmiany były bardziej widoczne.

11. Streszczenie w języku angielskim

Malaria is still one of the most dangerous infectious diseases. It is a mosquito-borne parasitic disease, usually caused by *Plasmodium falciparum* or *Plasmodium vivax*. It is endemic in tropical regions. In Poland it is currently a disease brought by travelers and people working in endemic regions and it is the most common disease that they may face after returning.

The aim of the study was to evaluate the possibility of using Raman spectroscopy in the study of structural changes in erythrocytes depending on the type of parasite attack. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy was also used. Previously, spectroscopic studies were performed by other researchers on cell cultures of erythrocytes infected with *Plasmodium* and were promising.

Patients hospitalized for malaria in the Department of Infectious Diseases of the University Hospital in Krakow in 2012-2023 were included in the study and their results were compared with a control group of healthy volunteers. Routine laboratory diagnostics were performed in patients with malaria, including capillary blood smears to assess the degree of parasitemia and to confirm the species of parasite. In addition, blood samples were taken from patients (at the beginning, during the treatment and at the end of treatment) and healthy volunteers for Raman spectroscopy and EPR studies. These studies were carried out as part of interdisciplinary cooperation with the Faculty of Chemistry of the Jagiellonian University in Krakow during the Cross-institutional PhD Studies "Interdisciplinarity for Innovation Medicine" InterDokMed. The studies were in line with good medical practice, in accordance with the Helsinki Declaration, approval of the Bioethics Committee of the Jagiellonian University was obtained.

Differences in erythrocytes in terms of changes in heme structure and protein enzymes involved in hemoglobin degradation were observed, both between malaria patients and healthy volunteers, as well as between patients infected with different *Plasmodium* species. The bands of aspartic proteinases, which lead to the lysis of hemoglobin into oligopeptides, and whose origin can be attributed to the activity of parasites, were also indicated. Marker bands indicating lipid disorder/order in the erythrocyte membrane as an increase in the *gauche* to *trans* conformation ratio were determined. In order to better compare changes in the erythrocytes of patients diagnosed with malaria caused by *P. falciparum* or *P. vivax*, a statistical method of data processing was used - principal component analysis (PCA) and two-dimensional correlation (2D-COS). They made it possible to highlight the differences. Therefore, Raman spectroscopy can be used to assess structural changes in erythrocytes depending on the species infecting *Plasmodium*, which gives future hopes for new diagnostic methods. However, this would require much further research and validation.

Whole blood studies using EPR spectroscopy, on the other hand, show forms of iron Fe(III), which had reduced symmetry in patients diagnosed with malaria. Hemozoin signals were also visible, indicating the activity of parasites. The use of the 2D two-dimensional correlation method made it possible to indicate the changes were more visible.

12. Wykaz rycin

Rycina 1.2.1 Cykl życiowy zarodźca malarii

(źródło: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/> [dostęp: 24.04.2023])

Rycina 1.2.2 Występowanie malarii (źródło: https://www.mp.pl/interna/image/B16.016_4579 [dostęp: 24.04.2023])).

Rycina 1.2.3. Mapa krajów endemicznych malarii pokazująca postęp w kierunku postulowanych kamieni milowych GTS 2020 dotyczący zmniejszenia zachorowań na malarię o co najmniej 40% w stosunku do wartości wyjściowej z 2015 r. (źródło: szacunki WHO).

Rycina 1.5.1. Cząsteczka hemu: (A) struktura (według: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/be/Heme_b.svg/212px-Heme_b.svg.png [dostęp: 24.04.2023]) (B) ligandy otaczające atom żelaza, X – apoproteina, Y – np. O₂, CO (według: P. R. Carey, Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies, Academic Press, New York, 1982.).

Ryc. 1.6.1 Kopia portretu C. V. Ramana, dzieło Homi Bhabba, znanego hinduskiego fizyka teoretycznego, znanego także ze swojego talentu plastycznego. Podobno Bhabba wręczając Ramanowi ten obraz powiedział „Naukowiec namalowany przez naukowca”, na co Raman odpowiedział „Nie, artysta namalowany przez artystę” (fot. z archiwum własnego Malwiny Birczyńskiej-Zych).

Ryc. 1.6.2. Pierwszy spektrometr używany przez C.V. Ramana (fot. z archiwum własnego Malwiny Birczyńskiej-Zych).

Ryc. 1.6.3. Spektrometr i biurko, przy którym pracował C.V. Raman (fot. z archiwum własnego Malwiny Birczyńskiej-Zych).

Ryc. 1.6.4. Widma otrzymywane przez C.V. Ramana (fot. z archiwum własnego Malwiny Birczyńskiej-Zych).

Rycina 1.7.1. Długości strzałek skierowanych w górę są proporcjonalne do częstotliwości padającego światła, podczas gdy długości strzałek skierowanych w dół są proporcjonalne do częstotliwości światła rozproszonego (lub w przypadku fluorescencji, światła emitowanego). Wibracyjne liczby kwantowe w górnym i dolnym stanie elektronowym oznaczone są odpowiednio v' i v'' . Odległość poziomów energetycznych v'' między poziomami wibracyjnymi dla poziomu podstawowego jest równe ν_{vib} (na podstawie: Carey PR. Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies. Academic Press. New York, 1982).

Rycina 1.7.2. Spektrometr ramanowski Renishaw inVia, na którym przeprowadzono badania prezentowane w tej pracy, oraz obiektywy mikroskopu optycznego służące do wyszukania obiektu badań (fot. z archiwum własnego Malwiny Birczyńskiej-Zych).

Rycina 1.8.1. Schemat poziomów energetycznych i sygnał EPR dla spinu $S = \frac{1}{2}$.

Rycina 1.9.1 Przykładowe różnice w przestrzeni wielowymiarowej (na podstawie: Introduction to Principal Component Analysis (PCA); /Program%20Files/The%20Unscrambler%20X%2010.3/Help/).

Ryc. 1.10.1. Ogólny schemat uzyskiwania widm korelacyjnych 2D, oraz przykładowe widmo dwuwymiarowe (według: Noda I, Dowrey AE, Marcott C, Story GM, Ozaki Y. Generalized Two-Dimensional Correlation Spectroscopy. Appl Spectrosc. 54 (2000) 236A -248A).

Rycina 1.11.1. (A) Grupa amidowa [wg <https://zpe.gov.pl/a/przeczytaj/DISQnfJA1> [dostęp 24.04.2023]]; (B) Pochodzenie pasma amidu I, drgania grupy peptydowej w płaszczyźnie ze znacznym udziałem drgań rozciągających C=O, (C) Pochodzenie pasma amidowego III. Jest to drganie zginające grupy peptydowej N-H w płaszczyźnie, która nie obejmuje drgań rozciągających C = O (według: Tu A. T., Use of Raman Spectroscopy in Biological Compounds, J Chin Chem Soc. 50 (2003) 1-10.).

Rycina 1.11.2. Diagram przedstawiający przekrój dwuwarstwy lipidowej utworzonej przez cząsteczki fosfolipidów (schematyczna reprezentacja cząsteczki fosfolipidu: polarna grupa „głowy” i ogony fosfolipidowe.

Rycina 1.11.3 (A) Struktura metaloporfiryn; porfiryne oktaetylowa (OEP):R1-R8 –grupa etylowa, R'-H (według: 60. Nakamoto K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. John Wiley & Sons, 1997); (B) widmo absorpcyjne w zakresie widzialnym niklowej(II) porfiryne octaetylowej, Ni(OEP) (w CH₂Cl₂) (według: Kitagawa T, Ozaki Y. Infrared and Raman Spectra of Metalloporphyrins, Structure and Bonding. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1987).

Rycina 5.1.1 Destynacje podróży z oznaczonym gatunkiem wywołującym malarię wśród pacjentów uczestniczących w badaniu.

Rycina 5.2.1. Wykres liczby płytek krwi w porównywanych grupach osób.

Rycina 5.2.2. Wykres poziomu hemoglobiny w porównywanych grupach osób.

Rycina 5.2.3. Wykres poziomu ALT w porównywanych grupach osób.

Rycina 5.2.4. Wykres- związek między parazytemią, a liczbą płytek krwi w badanej grupie osób.

Rycina 5.2.5. Wykres- związek między parazytemią, a poziomem ALT w badanej grupie osób.

Rycina 5.2.6. Wykres - związek między parazytemią, a poziomem CRP.

Rycina 5.2.7. Wykres- parazytemia w grupie osób z prawidłowym oraz podwyższonym poziomem ALT.

Rycina 5.4.1.1 (A) Widmo ramanowskie erythrocytu pacjenta ze zdiagnozowaną malarią oraz erythrocytu zdrowego ochotnika z zaznaczonymi pasmami markerowymi hemu (dane z niniejszej pracy), (B) zmiany zachodzące w strukturze hemu przy przyłączeniu (struktura oxy-) i odłączeniu ditlenu (struktura deoxy-) (według: <http://www.chemistry.wustl.edu/~edudev/LabTutorials/Hemoglobin/MetalComplexinBlood.h>

tml#HelixMovie) (C) aktywne drgania w rezonansie Ramanowskim Ni(OEP) obliczenia teoretyczne metodą drgań normalnych (według: Nakamoto K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. John Wiley & Sons, 1997; Abe M, Kitagawa T, and Kyogoku Y. Resonance Raman spectra of octaethylporphyrinatoNi(II) and mesodeuterated and ¹⁵N substituted derivatives. II. A normal coordinate analysis. J Chem Phys. 69 (1978) 4526-4534).

Rycina 5.4.1.2 A) Widmo ramanowskie erythrocytu pacjenta ze zdiagnozowaną malarią oraz zdrowego ochotnika z zaznaczonymi pasmami markerowymi błony komórkowej erythrocytu (dane z niniejszej pracy), (B) model uporządkowania molekularnego dwuwarstwy fosfolipidowej w fazie żelu oraz drgania łańcucha acylowego w konformacji *trans* (C) model uporządkowania molekularnego dwuwarstwy fosfolipidowej w fazie ciekło-kryształicznej oraz drgania łańcucha acylowego w konformacji *gauche* (według: Gaber BP, Yager P, Peticolas WL, Interpretation of biomembrane structure by Raman difference spectroscopy. Biophys J. 21 (1978) 161-176).

Rycina 5.4.2.1.1 Widma ramanowskie erythrocytów pobranych od pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną przez *P. falciparum* rejestrowane w 3, 7, 13, 14, 19 i 27 dniu po pobraniu krwi (reprezentowane przez kolejne widma), (A) linia wzbudzająca 514.5 nm; (B) linia wzbudzająca 785 nm; zakres spektralny 3200-400 cm⁻¹ (na podstawie: Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kurdziel M, Biesiada G, Kozicki M, Garlicki A, Weselucha-Birczynska A. The aging of *P. falciparum* infected RBCs by 2D-correlation Raman and EPR spectroscopy. J Mol Struct. 1224 (2021) 129036).

Rycina 5.4.2.1.2. (A) Synchroniczne i (B) asynchroniczne widma korelacji 2D, wygenerowane z widm Ramana zmierzonych w kolejnych dniach od pobrania krwi od pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum*, przedstawionych na Rycinie. 5.4.2.1.1 A, w zakresie liczb falowych 3200-400 cm^{-1} ; wzbudzenie 514,5 nm (na podstawie Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kurdziel M, Biesiada G, Kozicki M, Garlicki A, Weselucha-Birczynska A. The aging of *P. falciparum* infected RBCs by 2D-correlation Raman and EPR spectroscopy. J Mol Struct. 1224 (2021) 129036).

Rycina 5.4.2.1.3. (A) Synchroniczne i (B) asynchroniczne widma korelacji 2D, wygenerowane z widm Ramana zmierzonych w kolejnych dniach od pobrania krwi od pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum*, przedstawionych na Ryc. 5.4.2.1.1 .B, w zakresie liczb falowych 3200-400 cm^{-1} ; wzbudzenie 785 nm (na podstawie Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kurdziel M, Biesiada G, Kozicki M, Garlicki A, Weselucha-Birczynska A. The aging of *P. falciparum* infected RBCs by 2D-correlation Raman and EPR spectroscopy. J Mol Struct. 1224 (2021) 129036).

Rycina 5.4.2.1.4. Widma korelacji synchronicznej 2D erytrocytów pobranych od: (A) zdrowych ochotników, (B) pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum* i asynchroniczne widma korelacji 2D erytrocytów pobranych od: (C) zdrowych ochotników, (D) pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum*, w zakresie liczby falowej 1700-1350 cm^{-1} ; lina lasera 785 nm. (według Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kurdziel M, Biesiada G, Kozicki M, Garlicki A, Weselucha-Birczynska A. The aging of *P. falciparum* infected RBCs by 2D-correlation Raman and EPR spectroscopy. J Mol Struct. 1224 (2021) 129036).

Rycina 5.4.2.1.5. Widma korelacji synchronicznej 2D erytrocytów pobranych od: (A) zdrowych ochotników, (B) pacjentów ze zdiagnozowaną malarią *P. falciparum* i asynchroniczne widma korelacji 2D erytrocytów pobranych od: (C) zdrowych ochotników, (D) pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum*, w zakresie liczby falowej 1700–1350 cm^{-1} ; lina lasera 514.5 nm. (według M. Birczynska-Zych, J. Czepiel, M. Łabanowska, M. Kurdziel, G. Biesiada, M. Kozicki, Aleksander Garlicki, Aleksandra Wesełucha-Birczynska, The aging of *P. falciparum* infected RBCs by 2D-correlation Raman and EPR spectroscopy, Journal of Molecular Structure 1224 (2021) 129036).

Rycina 5.4.2.2.1. (I) Widma ramanowskie erytrocytów zdrowych ochotników (II) Widma ramanowskie erytrocytów pobranych od pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum* zarejestrowane przy wzbudzeniu laserem o długości fali 514,5 nm przy zastosowaniu jego mocy przy pomiarze: (A) 0,5 mW, (B) 2,5 mW i (C) 5 mW, w zakresie liczb falowych 3200-400 cm^{-1} (na podstawie: M. Birczynska-Zych, J. Czepiel, M. Łabanowska, M. Kurdziel, G. Biesiada, M. Kozicki, Aleksander Garlicki, Aleksandra Wesełucha-Birczynska, The aging of *P. falciparum* infected RBCs by 2D-correlation Raman and EPR spectroscopy, Journal of Molecular Structure 1224 (2021) 129036; A. Wesełucha-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. 2014; 1069: 305-312).

Rycina 5.4.2.2.2. Widma korelacji synchronicznej 2D cieni erytrocytów pobranych od: (A) zdrowych ochotników, (B) pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum* i asynchroniczne widma korelacji 2D cieni erytrocytów pobranych od: (C) zdrowych

ochotników, (D) pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum*, w zakresie liczb falowych 3100-500 cm^{-1} .

Ryc. 5.4.3.1.1. Analiza głównych składowych zastosowana do widm ramanowskich erytrocytów, pokazująca separację między wynikami pacjentów z rozpoznaną malarią wywołaną: (A) *P. falciparum* w 1. dniu hospitalizacji (czerwone punkty) i 10. dniu hospitalizacji (różowe punkty); (B) malarii *P. vivax* w 1. dniu hospitalizacji (granatowe punkty) i 10. dniu hospitalizacji (turkusowe punkty); przedstawione wykresy wyników składowych PC-1 vs PC-3, zakres spektralny 1200–1000 cm^{-1} (według: Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Krainska M, Biesiada G, Moskal P, Kozicki M, Garlicki A, Wesełucha-Birczynska A. Could Raman spectroscopy distinguish between *P. falciparum* and *P. vivax* Infection? Clin Spectrosc. 3 (2021) 100015).

Rycina 5.4.3.1.2. Analiza głównych składowych zastosowana do widm ramanowskich erytrocytów, pokazująca separację między pacjentami z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum* i *P. vivax*: (A) w 1. dniu hospitalizacji *P. falciparum* (czerwone punkty) i *P. vivax* (granatowe punkty); wykresy wyników składowych PC-3 vs PC-4 i wykres współrzędnej czynnikowej PC-3, (B) w 10. dobie hospitalizacji, *P. falciparum* (różowe punkty) i *P. vivax* (turkusowe punkty); wykresy wyników składowych PC-1 vs PC-2 i wykres składowej czynnikowej PC-2, zakres spektralny 1200–1000 cm^{-1} (według: Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Krainska M, Biesiada G, Moskal P, Kozicki M, Garlicki A, Wesełucha-Birczynska A. Could Raman spectroscopy distinguish between *P. falciparum* and *P. vivax* Infection? Clin Spectrosc. 3 (2021) 100015).

Rycina 5.4.3.1.3. Analiza głównych składowych zastosowana do widm ramanowskich erytrocytów, pokazująca separację między wynikami pacjentów z rozpoznaną malarią: (A) *P. falciparum* w 1. dniu hospitalizacji (czerwone punkty) i 10. dniu hospitalizacji (różowe punkty); wykresy wyników składowych PC-1 vs PC-3 i wykres współrzędnej czynnikowej PC-1, (B) *P. vivax* w 1. dniu hospitalizacji (granatowe punkty) i 10. dniu hospitalizacji (turkusowe punkty); przedstawione wykresy wyników składowych PC-2 vs PC-5 i wykres współrzędnej czynnikowej PC-2, zakres spektralny 3000–2700 cm⁻¹ (według: Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Krainska M, Biesiada G, Moskal P, Kozicki M, Garlicki A, Wesełucha-Birczynska A. Could Raman spectroscopy distinguish between *P. falciparum* and *P. vivax* Infection? Clin Spectrosc. 3 (2021) 100015).

Rycina 5.4.3.1.4 Analiza głównych składowych zastosowana do widm ramanowskich erytrocytów, pokazująca separację między pacjentami z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum* i *P. vivax*: (A) w 1. dniu hospitalizacji *P. falciparum* (czerwone punkty) i *P. vivax* (granatowe punkty); wykresy wyników składowych PC-2 vs PC-3 i wykres współrzędnej czynnikowej PC-2, (B) w 10. dobie hospitalizacji, *P. falciparum* (różowe punkty) i *P. vivax* (turkusowe punkty); wykresy wyników składowych PC-2 vs PC-3 i wykres składowej czynnikowej PC-2, zakres spektralny 3000–2700 cm⁻¹ (według: Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Krainska M, Biesiada G, Moskal P, Kozicki M, Garlicki A, Wesełucha-Birczynska A. Could Raman spectroscopy distinguish between *P. falciparum* and *P. vivax* Infection? Clin Spectrosc. 3 (2021) 100015).

Rycina 5.4.3.1.5 Analiza głównych składowych zastosowana do widm ramanowskich erytrocytów, pokazująca separację między wynikami pacjentów z rozpoznaną malarią wywołaną: (A) *P. falciparum* w 1. dniu hospitalizacji (czerwone punkty) i 10. dniu

hospitalizacji (różowe punkty); przedstawione wykresy wyników składowych PC-1 vs PC-2, wykres współrzędnej PC-1 (B) malarii *P. vivax* w 1. dniu hospitalizacji (granatowe punkty) i 10. dniu hospitalizacji (turkusowe punkty); przedstawione wykresy wyników składowych PC-2 vs PC-3, wykres współrzędnej PC-2, zakres spektralny 1500–1200 cm⁻¹ (według: Birczyńska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Krainska M, Biesiada G, Moskal P, Kozicki M, Garlicki A, Wesełucha-Birczyńska A. Could Raman spectroscopy distinguish between *P. falciparum* and *P. vivax* Infection? Clin Spectrosc. 3 (2021) 100015).

Rycina 5.4.3.1.6 . Analiza głównych składowych zastosowana do widm ramanowskich erytrocytów, pokazująca separację między pacjentami z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum* i *P. vivax*: (A) w 1. dniu hospitalizacji *P. falciparum* (czerwone punkty) i *P. vivax* (granatowe punkty); wykresy wyników składowych PC-1 vs PC-3 i wykres współrzędnej czynnikowej PC-3, (B) w 10. dobie hospitalizacji, *P. falciparum* (różowe punkty) i *P. vivax* (turkusowe punkty); wykresy wyników składowych PC-1 vs PC-4 i wykres składowej czynnikowej PC-1 , zakres spektralny 1500–1200 cm⁻¹ (według: Birczyńska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Krainska M, Biesiada G, Moskal P, Kozicki M, Garlicki A, Wesełucha-Birczyńska A. Could Raman spectroscopy distinguish between *P. falciparum* and *P. vivax* Infection? Clin Spectrosc. 3 (2021) 100015).

Rycina 5.4.3.1.7 Analiza głównych składowych zastosowana do widm ramanowskich erytrocytów, pokazująca separację między wynikami pacjentów z rozpoznaną malarią wywołaną: (A) *P. falciparum* w 1. dniu hospitalizacji (czerwone punkty) i 10. dniu hospitalizacji (różowe punkty); przedstawione wykresy wyników składowych PC-1 vs PC-4, wykres współrzędnej PC-1 (B) malarii *P. vivax* w 1. dniu hospitalizacji (granatowe punkty) i 10. dniu hospitalizacji (turkusowe punkty); przedstawione wykresy wyników składowych PC-

2 vs PC-4, wykres współrzędnej PC-2, zakres spektralny 1700–1500 cm⁻¹ (według: Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Krainska M, Biesiada G, Moskal P, Kozicki M, Garlicki A, Weselucha-Birczynska A. Could Raman spectroscopy distinguish between *P. falciparum* and *P. vivax* Infection? Clin Spectrosc. 3 (2021) 100015).

Rycina 5.4.3.1.8. Analiza głównych składowych zastosowana do widm ramanowskich erytrocytów, pokazująca separację między pacjentami z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum* i *P. vivax*: (A) w 1. dniu hospitalizacji *P. falciparum* (czerwone punkty) i *P. vivax* (granatowe punkty); wykresy wyników składowych PC-3 vs PC-5 i wykres współrzędnej czynnikowej PC-5, (B) w 10. dobie hospitalizacji, *P. falciparum* (różowe punkty) i *P. vivax* (turkusowe punkty); wykresy wyników składowych PC-2 vs PC-3 i wykres składowej czynnikowej PC-2, zakres spektralny 1700–1500 cm⁻¹ (według: Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Krainska M, Biesiada G, Moskal P, Kozicki M, Garlicki A, Weselucha-Birczynska A. Could Raman spectroscopy distinguish between *P. falciparum* and *P. vivax* Infection? Clin Spectrosc. 3 (2021) 100015).

Rycina 5.4.3.2. Obrazy widm 2D pacjentów z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum* po lewej, *P. vivax* po prawej (A) widma synchroniczne (B) widma asynchroniczne, zakres spektralny 3200-500 cm⁻¹; (C) widma asynchroniczne, w zakresie spektralnym 1800-1200 cm⁻¹, w którym widoczne są różnice wywołane aktywnością zarodźców (według: Birczyńska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kucharska M, Kurdziel M, Biesiada G, Garlicki A, Weselucha-Birczyńska A. Course of *Plasmodium* infection studied using 2D-COS on human erythrocytes, Malar J., przyjęte do druku).

Rycina 5.5.1 Widma EPR ludzkiej krwi pełnej zakażonej *P. falciparum* mierzone: (I) 4, (II) 5, (III) 6 i (IV) 47 dni po pobraniu, w zakresie pola magnetycznego: (A) 600 –5600 Gs, (B) 3000 –3600 G; temperatura 78K, pasmo X (na podstawie: Birczyńska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kurdziel M, Biesiada G, Kozicki M, Garlicki A, Weselucha-Birczyńska A. The aging of *P. falciparum* infected RBCs by 2D-correlation Raman and EPR spectroscopy. J Mol Struct. 1224 (2021) 129036).

(C) Widma EPR pełnej krwi zdrowych ochotników mierzone: (I) 1 dzień, (II) 1 miesiąc, (III) 2 miesiące po pobraniu w zakresie pola magnetycznego 600 –5600 Gs, (według: Weselucha-Birczyńska A, Kozicki M, Czepiel J, Łabanowska M, Nowak P, Kowalczyk G, Kurdziel M, Birczyńska M, Biesiada G, Mach T, Garlicki A. Human erythrocytes analyzed by generalized 2D Raman correlation spectroscopy. J Mol Struct. 1069 (2014) 305-312).

Rycina. 5.5.2. Synchroniczne widma korelacyjne 2D COS ludzkiej pełnej krwi pobranej od: (A) zdrowych ochotników, (B) pacjentów ze zdiagnozowaną malarią *P. falciparum* i asynchroniczne widma korelacyjne 2D krwi pobranej od: (C) zdrowych ochotników, (D) pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum*, zakres pola magnetycznego 5600–600 Gs. (na podstawie: 7. Birczyńska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kurdziel M, Biesiada G, Kozicki M, Garlicki A, Weselucha-Birczyńska A. The aging of *P. falciparum* infected RBCs by 2D-correlation Raman and EPR spectroscopy. J Mol Struct. 1224 (2021) 129036).

Rycina 10.1 Schemat badań przeprowadzanych w pracy doktorskiej.

13. Wykaz tabel

Tabela 1.2.1. Zachorowania na malarię w Polsce w ostatnich 10 latach według raportów PZH.

Tabela 1.5.1 Podstawowe parametry prawidłowej krwinki czerwonej.

Tabela 1.11.1. Drgania reszt aminokwasowych (według: Biospektroskopia, red J. Twardowski, t,4, PWN, Warszawa, 1990).

Tabela 5.1.1 Czynniki wywołujące malarię wśród badanych pacjentów.

Tabela. 5.1.2. Stosowanie profilaktyki przeciwmalarycznej u pacjentów z malarią biorących udział w badaniu.

Tabela 5.1.3. Miejsce podróży pacjentów z malarią biorących udział w badaniu (kontynent).

Tabela 5.1.4. Cel podróży pacjentów z rozpoznaną malarią biorących udział w badaniu.

Tabela 5.2.1. Statystyki opisowe dotyczące parametrów laboratoryjnych w zakresie których dokonywano porównania między grupą kontrolną oraz badaną.

Tabela 5.2.2. Statystyki opisowe dotyczące analizowanych parametrów w badanej grupie osób.

Tabela 5.2.3. Statystyki opisowe dotyczące analizowanych parametrów w grupie osób z *P. vivax* oraz *P. falciparum*

Tabela 5.2.4. Związek między parazytemią w badanej grupie osób, a analizowanymi zmiennymi.

Tabela 5.2.5. Statystyki opisowe dotyczące parazytemii w grupie osób z podwyższonym poziomem Hb oraz ALT.

Tabela 5.3.1 Leczenie pacjentów biorących udział w badaniu z rozpoznaną malarią wywołaną *P. falciparum*.

Tabela 5.3.2 Leczenie pacjentów biorących udział w badaniu z rozpoznaną malarią wywołaną *P. vivax*.

Tabela 5.4.2.1.1 Pasma Ramana [cm^{-1}] i ich przypisania dla erytrocytów pobranych od pacjentów ze zdiagnozowaną malarią wywołaną *P. falciparum* wzbudzonego za pomocą linii laserowych 514,5 nm i 785 nm. (według: Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kurdziel M, Biesiada G, Kozicki M, Garlicki A, Weselucha-Birczynska A. The aging of *P. falciparum* infected RBCs by 2D-correlation Raman and EPR spectroscopy. J Mol Struct. 1224 (2021) 129036).

Tabela 5.4.2.1.2. Istotne piki korelacyjne synchroniczne i asynchroniczne 2D dla erytrocytów pacjentów zarażonych *P. falciparum* i ich przypisania, linia lasera 785 nm. (według Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kurdziel M, Biesiada G, Kozicki M, Garlicki A, Weselucha-Birczynska A. The aging of *P. falciparum* infected RBCs by 2D-correlation Raman and EPR spectroscopy. J Mol Struct. 1224 (2021) 129036).

Tabela 5.4.2.1.3. Istotne piki korelacyjne synchroniczne i asynchroniczne dla erytrocytów pacjentów zarażonych *P. falciparum* i ich przypisania, linia lasera 514,5 nm (na podstawie Birczynska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kurdziel M, Biesiada G, Kozicki M, Garlicki A, Weselucha-Birczynska A. The aging of *P. falciparum* infected RBCs by 2D-correlation Raman and EPR spectroscopy. J Mol Struct. 1224 (2021) 129036).

14. Wykaz publikacji obejmujących materiał pracy doktorskiej

1. Birczyńska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kurdziel M, Biesiada G, Kozicki M, Garlicki A, Wesełucha-Birczyńska A. The aging of *P. falciparum* infected RBCs by 2D-correlation Raman and EPR spectroscopy. *J Mol Struct.* 1224 (2021) 129036.
2. Birczyńska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Krainska M, Biesiada G, Moskal P, Kozicki M, Garlicki A, Wesełucha-Birczyńska A. Could Raman spectroscopy distinguish between *P. falciparum* and *P. vivax* Infection? *Clin Spectrosc.* 3 (2021) 100015.
3. Wesełucha-Birczyńska A, Kozicki M, Czepiel J, Łabanowska M, Nowak P, Kowalczyk G, Kurdziel M, Birczyńska M, Biesiada G, Mach T, Garlicki A. Human erythrocytes analyzed by generalized 2D Raman correlation spectroscopy. *J Mol Struct.* 1069 (2014) 305-312.
4. Birczyńska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kucharska M, Kurdziel M, Biesiada G, Garlicki A, Wesełucha-Birczyńska A. Course of *Plasmodium* infection studied using 2D-COS on human erythrocytes, *Malar J.*, przyjęte do druku.