UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Chemii

Zakład Fizyki Chemicznej

Zespół Spektroskopii Oscylacyjnej

ROZPRAWA DOKTORSKA

Analiza spektroskopowa struktury molekularnej wybranych komórek krwi organizmu żywego obserwowana w infekcji wirusem Epsteina-Barr (EBV)

mgr inż. Magdalena Pietruszewska

Promotor:

prof. dr hab. Aleksandra Wesełucha-Birczyńska

Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński

Promotor:

dr hab. n. med. Grażyna Biesiada, prof. UJ

Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum

Kraków 2023

Składam serdeczne podziękowania

Pani prof. dr hab. Aleksandrze Wesełusze- Birczyńskiej
za wprowadzenie w niezwykły świat nauki,
przekazaną wiedzę, opiekę naukową i merytoryczną,
cierpliwość, motywację oraz twórczą atmosferę pracy

Pani dr hab. n. med. Grażynie Biesiadzie, prof. UJ
za opiekę naukową i cenne wskazówki,
oraz przekazaną wiedzę z nauk medycznych

oraz **Zespołowi Spektroskopii Oscylacyjnej**
za życzliwość, pomoc i fantastyczną atmosferę pracy

Szczególne podziękowania składam mojej **Mamie**
za cierpliwość, wyrozumiałość,
pomoc i wsparcie w chwilach zwątpienia.

Pragnę także podziękować całej **rodzinie i przyjaciołom**
za zaufanie, wsparcie i nieprzemijającą wiarę w moje możliwości

Niniejsza rozprawa doktorska została wykonana przy wsparciu finansowym Projektu:

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.

Spis Treści

Streszczenie……6

Abstract……..……...……..7

Wykaz skrótów i zwrotów……...8

1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA……...……..11

1.1. Mononukleoza zakaźna……...…….……..11

1.1.1. Etiologia choroby…….…….……11

1.1.2. Patogeneza mononukleozy zakaźnej…….…….……...11

1.1.3. Diagnostyka i leczenie mononukleozy zakaźnej…….…….12

1.1.4. Powikłania mononukleozy zakaźnej…….……13

1.2. Wirus Epsteina-Barr……13

1.3. Układ odpornościowy……...……..16

1.3.1. Ogólna Charakterystyka układu odpornościowego…….…….…….16

1.3.2. Funkcje limfocytów w organizmie ludzkim…….…….……17

1.3.3. Budowa limfocytów…….…….…….17

1.3.4. Budowa i rodzaje immunoglobulin……..…….…….19

1.3.5. Funkcja immunoglobulin w organizmie……..……..20

1.4. Techniki analityczne……21

1.4.1. Spektroskopia rozpraszania ramanowskiego…….……21

1.4.2. Pomiar stopnia depolaryzacji…….……26

1.4.3. Analiza widm ramanowskich……...……..27

1.4.4. Metoda korelacji 2D……...……28

1.4.5. Zastosowanie spektroskopii ramanowskiej w badaniach limfocytów……...….29

2. CEL PRACY…….…….…….34

3. HIPOTEZA BADAWCZA…….…..…….…….35

4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA……..…….…..……36

4.1. Materiał badawczy…….……...…….…….36

4.2. Przygotowanie próbek do badania metodą spektroskopii ramanowskiej……...38

4.3. Separowanie komórek przy zastosowaniu technologii MACS®…….……..40

4.4. Widma ramanowskie limfocytów zdrowych ochotników……..42

4.5. Zmiany zachodzące w budowie limfocytu w przebiegu mononukleozy zakaźnej badane metodą spektroskopii ramanowskiej……...…….…..……46

4.6. Badanie polaryzowalności limfocytów w ostrej fazie mononukleozy zakaźne…….66

4.7. Zastosowanie metody korelacji 2D w badaniu limfocytów…….…….68
4.8. Analiza standardowych testów diagnostycznych pacjentów…….…..…….83
4.9. Korelacja wyników klinicznych i spektroskopowych……..…….89
5. PODSUMOWANIE……...……92
6. WNIOSKI……...94
7. DOROBEK NAUKOWY……...……96
7.1. Spis publikacji……..……..96
7.2. Wystąpienia konferencyjne……..……..96
7.3. Staże i wyjazdy naukowe……..…….97
8. BIBLIOGRAFIA…….……..……98

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było badanie aktywności limfocytów u osób chorych na mononukleozę zakaźną oraz porównanie ich z wynikami zdrowych ochotników. Dodatkowo przeprowadzono korelację wyników uzyskanych podczas badań morfologicznych i biochemicznych krwi z wynikami spektroskopowymi. Wszystkie badania zostały wykonane za pomocą mikrospektroskopii ramanowskiej (Renishaw inVia), laser wzbudzający próbkę Ar+ 514,5 nm, przy mocy lasera na próbce 1-3 mW. Wszystkim pacjentom pobrano krew w Uniwersyteckim Oddziale Klinicznym Chorób Zakaźnych. Badani pacjenci byli w wieku 22-26 lat. Każdemu z chorych pobrano krew 3-4 razy w ciągu przebiegu choroby. Krew ochotnika zdrowego pobrano jednorazowo. Przed pomiarem krew była sterylnie przenoszona przez prowadzącego na szkiełka pomiarowe. Wszystkie badania zostały przeprowadzone zgodnie z zasadami etyki prowadzenia badań klinicznych z udziałem ludzi (GCP) Deklaracji Helsińskiej. Lokalny Komitet Bioetyczny zatwierdził przeprowadzenie badań.

Podczas analizy widm zauważono powstanie markera immunoglobulin, odpowiadającego za obronę organizmu przed obcym antygenem. Był to pik przy liczbie falowej 520 cm^{-1}. Obecność immunoglobulin pozwala na badanie limfocytów metodą spektroskopii ramanowskiej. Największą intensywność markera immunoglobulin u wszystkich pacjentów zauważono około czwartego i piątego dnia hospitalizacji, pod koniec choroby pik ten malał. Natomiast analizując wyniki morfologii pacjentów wykazano, iż największy wzrost limfocytów następował w początkowym stadium choroby. Na początku kontaktu z antygenem organizm namnaża limfocyty, po około 4-5 dniu następuje ich najwyższa aktywacja, pod koniec choroby maleje. Porównując wyniki zdrowego ochotnika, nie stwierdzono obecności aktywowanego markera immunoglobulin. Pomiar polaryzacji wskazuje na zmiany strukturalne w domenach białek. Formacja immunoglobulin oraz ich agregacja prowadzi do bardzo dużego wzrostu intensywności pasma 520 cm^{-1}. Wszystkie zmiany strukturalne zostały zainicjowane poprzez infekcję. Dodatkowo marker immunoglobulin (drganie mostków disiarczkowych) obrazuje konkretną konformację i w zależności od tego następuje przyłączenie danego antygenu. Obserwowana zmienność konformacji przyjmowanej przez immunoglobuliny, rejestrowana jako przesuniecie położenia pasma markerowego 520 cm^{-1} (± 10 cm^{-1}), może być efektem patologii funkcji limfocytów B, wywołanej aktywnością wirusa EBV. Wszystkie zmiany strukturalne zostały zainicjowane poprzez infekcję. Dzięki spektroskopii ramanowskiej można określić aktywowane limfocyty i ich strukturę molekularną.

Abstract

The aim of this work is to study lymphocyte cells activity in patients with infectious mononucleosis and to compare them with the results of a healthy volunteer. In addition, the correlation was performed of morphology and spectroscopy results. All tests were performed using Raman microspectroscopy (Renishaw inVia), samples were excited with an Ar^+ 514,5 nm laser, with a laser power of 1-3 mW on the sample. All patients were hospitalized at the University hospital in Kraków. Patients were at the age of 22-26. Hospitalization time was about 7-12 days. Blood was collected 3-4 times during hospitalization. The blood of healthy volunteers was collected once. A blood smear was taken before spectroscopic measurement. All tests were conducted in accordance with guidelines good clinical practice (GCP) in accordance with the principles of ethics of medical research involving people as defined by the Helsinki Declaration. The local ethics committee approved the studies.

During the analysis of the spectra the emergence of immunoglobulins marker was observed, a peak at a wavenumber 520 cm^{-1}. Immunoglobulins are responsible for the defense of the body against the foreign antigens. The presence of immunoglobulin allows the study of lymphocyte cells by Raman spectroscopy. The studied lymphocytes of patients diagnosed with infectious mononucleosis. Present the highest intensity of marker immunoglobulin around the fourth and fifth day of hospitalization. At the end of the disease this peak is decreased. While analyzing the results of the morphology of patients, it has been demonstrated that the largest increase in lymphocytes occurs in the early stages of the disease. At the first contact with the antigen, the activation of lymphocytes begins, on the 4-5 day there is a maximum activation, then at the end of the disease it decreases. Results from healthy volunteers indicate the absence of an immunoglobulin marker. The measurement of the polarization indicates structural changes in the domains of proteins. The formation of immunoglobulins and their aggregation leads to a very considerable increase in the intensity of the band 520 cm^{-1}. All structural changes were initiated by virus infection. Additionally, a marker of immunoglobulins reflect a specific conformation associated with antigen attachment. Changes in the conformation adopted by immunoglobulins are recorded as a shift in the position of the marker band 520 cm^{-1} ($\pm$ 10 cm^{-1}), which may be the result of pathology of B lymphocyte function.. All structural changes were initiated by virus infection. Using Raman spectroscopy activated lymphocytes and their molecular structure can be determined.

Wykaz skrótów i zwrotów:

2D-COS – dwuwymiarowa spektroskopia korelacyjna

3D-CM - trójwymiarowa mikroskopia konfokalna

A - adenina

Arg - arginina

Asp – kwas asparaginowy

auto-piki– auto piki korelacyjne

BCR- receptor powierzchniowy komórek limfocytów B, B-cell antigen receptor

Białko LMP-1 – (Latent Membrane Protein-1) integralne białko błonowe, główne utajone białko onkogenne EBV

Białko LMP-2 (Latent Membrane Protein-2) – utajone białko EBV

Białka LMP-2A i LMP-2B, to integralne białka membranowe, różniące się między sobą domenami N-końcowymi

Białko p53 – białko, czynnik transkrypcyjny o własnościach supresora nowotworowego

Białko pRb - białko kodowane przez gen supresorowy gen *RB1*

Białko ZEBRA (Z) - (BamHI Z EBV replication activator). Pierwsze białko, które pojawia się w przebiegu cyklu litycznego wirusa

CD –ang. cluster of differentiation, antygen różnicowania

CD21 – receptor komórkowy, receptor składowej dopełniacza C3d

CD23 - receptor o niskim powinowactwie dla immunoglobuliny E (IgE)

CD39 – ektoenzym, pełniący ważną rolę w angiogenezie

CD40 - białko występujące na powierzchni komórek prezentujących antygen

CD44 - antygen różnicowania komórkowego

cross-piki –piki korelacyjne

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

EBNA-1 antygen jądrowy Epsteina-Barr 1 (dimeryczne białko wirusowe)

EBNA-2 antygen jądrowy Epsteina-Barr 2 (białko transaktywujące)

EBNA-3 antygen jądrowy Epsteina-Barr 3 (białko wiążące)

EBNA-5 antygen jądrowy Epsteina-Barr 4 (białko wiążące)

EBNA-LP antygen jądrowy Epsteina-Barr LP (białko związane z latencją wirusa)

EBV – wirus Epsteina-Barr

EBV-1 - wirus Epsteina-Barr odmiana 1

EBV-2 - wirus Epsteina-Barr odmiana 2

G – faza cyklu komórkowego

faza G0 - faza spoczynku – faza cyklu komórkowego.

Faza G1 - poprzedza ją zakończony podział mitotyczny i jest fazą wzrostową komórki.

Gen BZLF – gen wirusa Epsteina-Barr

Gen c-myc - koduje białko należące do rodziny czynników transkrypcyjnych

Gln - glutamina

gp 220 - glikoproteina 220 (wirusa EBV)

gp 350 - glikoproteina 350 (wirusa EBV)

gp110 - glikoproteina 110 (wirusa EBV)

gp25 - glikoproteina 25 (wirusa EBV)

gp42 – glikoproteina 42 (wirusa EBV)

gp85 – glikoproteina 85 (wirusa EBV)

His - histydyna

HLA klasy II - układ zgodności tkankowej (ang. human leukocyte antigens)

ICAM-1- cząsteczka adhezyjna

Ig - immunoglobulina

IgA – immunoglobuliny typu A, przeciwciała typu A

IgD - immunoglobuliny typu D, przeciwciała typu D

IgE - immunoglobuliny typu E, przeciwciała typu E

IgG - immunoglobuliny typu G, przeciwciała typu G

IgM - immunoglobuliny typu M, przeciwciała typu M

IL-21 –interleukina 21

IR – zakres podczerwieni promieniowania elektromagnetycznego

Komórki NK, NKT –komórki (ang. natural killer T-cells) – naturalni zabójcy, subpopulacja limfocytów T

limfocyty B – białe krwinki pochodzące ze szpiku, produkujące przeciwciała

limfocyty T – białe krwinki pochodzenia grasicznego

MACSxpress – metoda separowania komórek limfocytów B z pełnej krwi

p – stopień depolaryzacji

PC -fosfatydylocholina

Phe - fenyloalanina

Pro -prolina

IL - interleukiny

Ser - seryna

SS- mostki disiarczkowe

T – tyrozyna

Thr - treonina

Trp - tryptofan

1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1.1. Mononukleoza zakaźna

1.1.1. Etiologia choroby

Mononukleoza zakaźna jest chorobą spowodowaną wirusem Epsteina-Barr (EBV). Wirus Epsteina-Barr to herpeswirus należący do podrodziny *Gammaherpesvirinae* i grupy *Lymphocryptovirus*. Wirus ten zakaża wyłącznie ludzi. Wyróżnia się dwa typy wirusa EBV-1 i EBV-2 [1]. Różnią się one regionem kodującym antygen jądrowy wirusa oraz miejscem geograficznym, w którym występują [2]. Zakażenie wirusem EBV następuje zazwyczaj poprzez kontakt ze śliną chorego (np. picie z jednej butelki wody, pocałunek, kichnięcie) rzadziej poprzez transfuzję krwi, przeszczep zakażonych narządów i kontakt płciowy. Mononukleoza zakaźna jest najczęściej wykrywana u dzieci i młodzieży, natomiast najciężej przechodzą ją dorośli powyżej 25 roku życia. Wirus EBV namnaża się powoli u chorych pacjentów, czas inkubacji wirusa w organizmie chorego to około 30-50 dni. Wirus EBV jest bardzo powszechny, u większości osób dorosłych wykrywa się przeciwciała, które świadczą o przebytej chorobie. Pacjenci, którzy przebyli mononukleozę zakaźną nabywają odporność wirusową EBV na całe życie [3]. Infekcja EBV jest bardzo częsta u osób, które posiadają nabyty lub wrodzony niedobór odporności. Mononukleoza zakaźna jest obserwowana u dzieci w krajach słabo rozwiniętych, natomiast w krajach wysokorozwiniętych choruje głównie młodzież w okresie dojrzewania oraz dorośli [4].

1.1.2. Patogeneza mononukleozy zakaźnej

Mononukleoza zakaźna wywołana jest pierwotną infekcją wirusem EBV, która przebiega poprzez zakażenie komórek nabłonkowych i limfocytów B. Dodatkowo zakażone mogą zostać limfocyty T, komórki NK, komórki dendrytyczne oraz makrofagi [1]. EBV posiada zdolność do unieśmiertelniania limfocytów B [5]. Podczas zarażenia wirusem EBV pierwszą styczność mają komórki nabłonkowe jamy nosowo-gardłowej, gdzie dochodzi na namnażania się wirusa, a następnie do rozprzestrzeniania się do sąsiednich struktur [1]. Dwa główne białka otoczki wirusa: gp350 i gp220, aby wniknąć do komórek gospodarza łączą się z receptorem typu drugiego dla składowej kompleksu C3d (CR2, CD21). W komórkach limfocytów B, znajduje się receptor CD21, natomiast CR2 - w komórkach nabłonkowych [6]. Kolejne białka gp85, gp25, gp110, gp42 są również ważnymi elementami budowy wirusa EBV odpowiedzialnymi za rożne fazy procesu integracji wirusa

z komórkami gospodarza [7, 8]. Wirus pozostaje w stanie utajonym w limfocytach B przez około 30-50 dni. DNA wirusa Epsteina-Barr występuje w formie episomalnej i liniowej. W fazie latencji obecna jest postać episomalna, a w fazie litycznej postać liniowa. W jądrze komórkowym postacie episomalne ulegają replikacji i wnikają do komórek potomnych, gdzie liczba kopii wirusa wynosi około 10-20 na komórkę [5, 9, 10]. Podczas fazy litycznej następuje aktywacja genu BZLF, który odpowiada za kodowanie białka ZEBRA (białko Z) [11]. Białko ZEBRA pełni funkcję w reaktywacji zarażeniem EBV w limfocytach B. Specyficznym markerem do wykrywania EBV są przeciwciała skierowane przeciwko białku ZEBRA. [8]. Transcytoza jest prawdopodobnym mechanizmem do wnikania wirusa EBV do limfocytów B przy pomocy komórek nabłonka [9]. Wirus EBV dodatkowo posiada onkogenny potencjał tworzenia nowotworów nosogardzieli, chłoniaka Hodgkina, chłoniaka Burkitta [12].

Wnikanie wirusa EBV do limfocytów B powoduje ich aktywację do wytwarzania przeciwciał IgM i IgG. Największe wartości przeciwciał występują w ostrej fazie infekcji, po czym następuje ich zmniejszenie. IgG pozostają do końca życia, natomiast IgM zanikają około 3 miesiące po ostrej infekcji [3, 13].

1.1.3. Diagnostyka i leczenie mononukleozy zakaźnej

Diagnostyka mononukleozy zakaźnej polega na ocenie objawów klinicznych, charakterystycznych zmian hematologicznych oraz odczynów serologicznych [14]. Jako podstawowy test diagnostyczny w celu potwierdzenia obecności zakażenia jest stosowany test ELISA. W celu potwierdzenia ostrej infekcji EBV wykonuje się badanie przeciwciał swoistych dla EBV (test na obecność przeciwciał heterofilnych jest dodatni w 75% przypadków). Ostra faza mononukleozy zakaźnej charakteryzuje się szybką odpowiedzią przeciwciał IgM i IgG na wirusowy antygen kapsydowy (VCA) we wszystkich przypadkach i odpowiedzią IgG na wczesny antygen (EA) w większości przypadków [3]. W wielu przypadkach zakażenia objawy nie są charakterystyczne, dlatego podczas diagnozy przeprowadzane jest diagnostyka różnicowa. Bardzo ważnym aspektem w diagnozie oprócz wzrostu ilości limfocytów i specyficznego IgM jest podwyższenie prób wątrobowych [3, 13, 19, 20].

W rozpoznaniu różnicowym należy również rozważyć cytomegalię; paciorkowcowe zapalenie gardła, błonicę, zakażenie HSV, ostrą chorobę retrowirusową (HIV), różyczkę,

wirusowe zapalenie wątroby, ostrą białaczkę, oraz reakcje polekowe (szczególnie po fenytoinie i sulfonamidach), toksoplazmozę [28].

Przebieg zakażenia u wielu pacjentów jest bezobjawowy, jednak w tym czasie zaraża inne osoby w swoim otoczeniu. Najczęściej występującymi objawami są: stany podgorączkowe lub gorączka, silny ból gardła, powiększenie i nalot na migdałkach, powiększenie węzłów chłonnych, obrzęki powiek, bóle karku i szyi, zmęczenie, osłabienie, złe samopoczucie, powiększenie wątroby, bóle brzucha [15, 16, 17, 18].

W leczeniu mononukleozy zalecany jest odpoczynek i leczenie objawowe. W przypadkach ciężkiego przebiegu choroby rekomendowane jest leczenie szpitalne, niekiedy zastosowanie glikokortykosteroidów [21, 22, 23, 24].

1.1.4. Powikłania mononukleozy zakaźnej

Powikłania nie występują często, ale mogą mieć ciężki przebieg. Poważnym, bardzo rzadko występującym powikłaniem mononukleozy zakaźnej jest pęknięcie śledziony. Częściej występują powikłania hematologiczne -niedokrwistość, oraz małopłytkowość. Zagrażającym dla chorego powikłaniem jest nasilona duszność wynikająca z utrudnienia pasażu powietrza w drogach oddechowych. Do powikłań neurologicznych można zaliczyć zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu, zespół Guillain-Barre. Może wystąpić zapalenie mięśnia sercowego. Wirus EBV jest prawdopodobnym czynnikiem powodującym nowotwory takie jak: chłoniak Burkitta, chłoniak Hodgkina i rak nosogardzieli [10, 18, 25, 26, 27, 28].

1.2. Wirus Epsteina-Barr

Wirus Epsteina-Barr to herpeswirus ((human herpesvirus 4 – HHV-4) należący do podrodziny *Gammaherpesvirinae* i rodzaju *Lymphocryptovirus*. Podwójna nić DNA o strukturze liniowej stanowiąca materiał genetyczny wirusa EBV jest otoczona ikosaedralnym kapsydem składającym się z 162 kapsomerów stanowiących osłonką. Wiriony EBV otoczone są tegumentem (warstwą białkową) i osłonką zbudowaną z błony komórkowej gospodarza, której glikoproteiny wystają na zewnątrz osłonki. Kapsyd osiąga wielkość 100-110 nm. z kolei cały wirion 120-200 nm. Wirus występuje w dwóch formach: litycznej oraz episomalnej. W fazie litycznej występuje w formie liniowej. Postać kolista (episomalna) charakteryzuje stany latencji [29]. Receptorem komórkowym dla wirusa

Epsteina-Barr jest CD21 (CR2) czyli receptor układu dopełniacza. Większość wirusów należących do rodziny herpes-wirusów (w tym EBV) nie ulega wydaleniu z organizmu po wyzdrowieniu, przechodzi w stan utajony, powodując przewlekłe zakażenie organizmu. Wirus EBV jest uznawany jako dodatkowy czynnik, który może prowadzić do wystąpienia nowotworów [30]. Charakterystycznymi białkami dla wirusa EBV to: EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3, oraz białko EBNA-LP, białko LMP-1, białka LMP-2A i LMP-2B.

Białko EBNA-1 (EBV nuclear antigen type 1) to fosfoproteina wiążąca DNA. Odpowiada za replikację wirusa i utrzymanie jego genomu. Białko to nie jest wykrywane przez cytotoksyczne limfocyty T. Dodatkowo nie jest immunogenne i omija reakcję układu odpornościowego. Jest wytwarzane w czasie aktywacji do cyklu litycznego [5, 8, 31]. Białko EBNA-2 (Epstein-Barr Nuclear Protein-2) to kwaśna fosfolipoproteina, która bierze udział w immortalizacji limfocytów B. Jest aktywatorem transkrypcji genów komórkowych i wirusowych. Ma zdolność do stymulacji transkrypcji komórkowej protoonkogenu, przez co wpływa na cykl komórkowy limfocytów B. Dodatkowo zwiększa ekspresję latentnych białek błonowych, pobudza ekspresję receptorów CD21 i CD23. Białko EBNA-3 to białko jądrowe heterofilne. Prawdopodobnie jest regulatorem transkrypcji, niezbędnym w procesie immortalizacji [8, 31, 32]. Białko EBNA-LP (nazywane jako EBNA-5) stymuluje ekspresję genu c-myc i prawdopodobnie reguluje apoptozę zainfekowanych komórek. Dodatkowo może współdziałać z EBNA-2. Podczas takiego działania unieczynnia białka pRb i p53, wprowadzić może spoczynkowe limfocyty B w fazę G1 cyklu komórkowego. Białko EBNA-LP wywołuje transformację blastyczną limfocytów B. Białko LMP-1 (Latent Membrane Protein-1) jest związane z cytoszkieletem zakotwiczonym w błonie komórkowej. Posiada zdolność do zwiększania ekspresji indykatorów aktywacji limfocytów B (CD23, CD39, CD40, CD44, HLA klasy II, produkcję IL-6, IL-8 i IL-10 i cząsteczki adhezyjnej ICAM-1). Powoduje ekspresję genów o działaniu antyapoptycznym [33, 34]. Białka LMP-2A i LMP-2B (Latent Membrane Protein-2A i 2B) to integralne proteiny błonowe. LMP-2A zapobiega przejściu fazy latentnej w lityczną. LMP-2B jest modulatorem aktywności LMP-2A [33].

W cyklu życiowym wirusa można wyróżnić dwie fazy: lityczną i latentną.

Cykl lityczny

W początkowym etapie zakażenia wirus przylega do powierzchni komórki, w tym czasie glikoproteinowa osłonka jest zaadsorbowana na receptorach błony komórkowej. Pierwszy etap zazwyczaj rozpoczyna się w jamie nosowo-gardłowej [8, 29, 32]. Następnym etapem

jest fuzja materiału genetycznego wirusa osłoniętego kapsydem i jego fuzja do cytoplazmy, a następnie do jądra komórki. W tym celu EBV używa aparatu enzymatycznego gospodarza, co powoduje szybkie namnażanie i uwolnienie wirionów potomnych prowadzących do śmierci komórki. Wirus może też egzystować w limfocytach B i replikować się z materiałem genetycznym gospodarza. Podczas uwalniania wirionów potomnych, aby doprowadzić do zakażenia kolejnych limfocytów B, może następować także przeniesienie zakażenia na inne osoby [8, 29, 32].

Cykl latentny

Cykl ten związany jest zazwyczaj z bardzo łagodną lub bezobjawową infekcją, wtedy materiał genetyczny wirusa przybiera formę kulistego pozachromosomalnego episomu. Replikacja genomu wirusa zachodzi jednorazowo podczas cyklu komórkowego, a DNA trafia do komórek potomnych żywiciela.

Przejście EBV z cyklu latentnego w lityczny (tzw. reaktywacja wirusa) może powodować upośledzenie funkcji układu immunologicznego. Do czynników wywołujących reaktywację zalicza się leczenie immunosupresyjne, cytokiny, czynniki wzrostów nowotworów, hormony steroidowe. Dodatkowo za aktywację replikacji może odpowiadać zahamowanie ekspresji białka LMP-2A. U pacjentów, którzy przechodzą reaktywację wirusa może występować leukopenia, pojawienie się atypowych limfocytów we krwi, gorączka, zapalenie płuc, wątroby, czy opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu [8, 35, 36].

Dodatkowo wirus Epsteina-Barr może prowadzić do występowania chłoniaka Burkitta, chłoniaka Hodgkina, raka części nosowej gardła oraz raka żołądka [37]. Jest to wirus onkogenny, czyli zwiększający podobieństwo rozwoju choroby nowotworowej. Wiąże się to być może ze stymulacją proliferacji komórek docelowych. Wirus EBV wbudowuje swój genom do genomu gospodarza i zmienia w ten sposób, funkcjonowanie komórek. Posiada również zdolność do transportowania genów na inne chromosomy podczas podziałów komórkowych (powoduje to powstanie translokacji) [36, 37, 38].

Materiał genetyczny wirusa Epteina-Barr posiada kody wielu białek interferujących z cząsteczkami antyapoptycznymi, cytokinami. Wykazano związek pomiędzy infekcją wirusową, a zapaleniem tarczycy i rozwojem nowotworu tarczycy [37, 39].

1.3. Układ odpornościowy

1.3.1. Ogólna Charakterystyka układu odpornościowego

Układ odpornościowy człowieka pełni funkcje: rozpoznawania atakujących patogenów oraz uruchamiania szlaków zapewniających zniszczenie patogenów. Spośród czynników chorobotwórczych wiele wirusów występujących w przyrodzie wywiera destrukcyjny wpływ na organizm gospodarza [40].

Układ odpornościowy obejmuje komórki, tkanki, narządy oraz substancje czynne biologicznie. Do najważniejszych komórek układu odpornościowego zalicza się: limfocyty B, limfocyty T, fagocyty, komórki prezentujące antygen limfocytom T.

Układ odpornościowy działa poprzez dwa mechanizmy: nieswoisty i swoisty. Mechanizm nieswoisty (wrodzony) jest mniej precyzyjny, ale reaguje bardzo szybko na kontakt organizmu z patogenem, stanowi pierwszą linię obrony. Mechanizm swoisty (nabyty) to mechanizm, który rozwija się w określonym czasie i zwraca się precyzyjnie przeciw konkretnemu patogenowi [41, 42].

Wyróżniane są dwa typy swoistej odpowiedzi immunologicznej:

Humoralna- w tym typie odpowiedzi immunologicznej biorą udział wolne przeciwciała istniejące we krwi, limfie, płynach tkankowych. Przeciwciała powstają jako efekt kontaktu antygenu z organizmem, limfocyty B ulegają aktywacji, proliferacji i różnicują się na komórki wytwarzające przeciwciała.

Komórkowa- w tym typie odpowiedzi immunologicznej reagują komórki – limfocyty T na antygen. Podczas ingerencji ze swoistym antygenem wydzielają cytokiny, które pobudzają makrofagi i granulocyty. Jest to odpowiedź późniejsza, ponieważ zaczyna działać dopiero po 24 godzinach. Duże znaczenie mają tutaj limfocyty T, które wywołują efekt cytotoksyczny (główny mechanizm cytotoksyczności opiera się na wydzielaniu ziaren cytolitycznych, które poprzez utworzenie kanału w błonie komórki docelowej powodują wnikanie jonów sodowych Na+, a tym samym jej rozpad oraz apoptozę).

Reakcja immunologiczna zachodzi kilkustopniowo:

Faza indukcji – limfocyty łączą się z antygenem i następuje ich proliferacja oraz różnicowanie się w komórki efektorowe. W tym etapie limfocyty kooperują z innymi populacjami limfocytów oraz z komórkami prezentującymi antygen.

Faza efektorowa – w tej fazie nowo wytworzone komórki efektorowe odpowiadają na antygen: limfocyty B uwalniają przeciwciała, a limfocyty T uwalniają cytokiny (bezpośrednio łącząc się z antygenem) [41, 42].

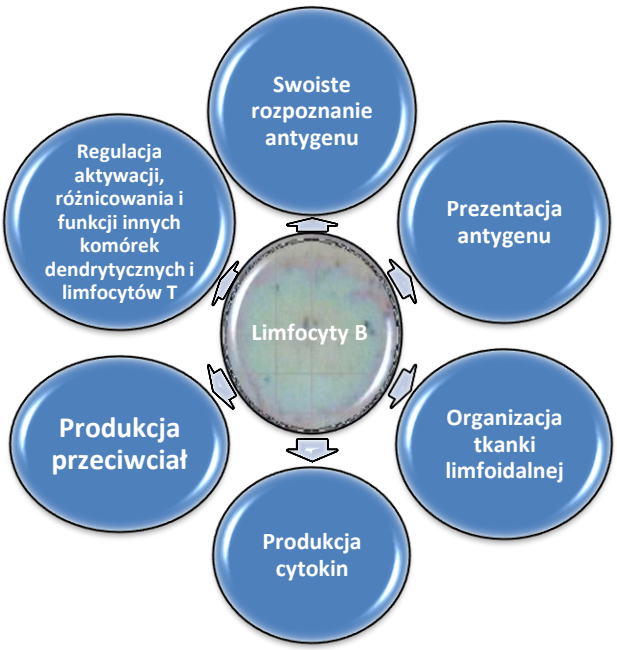
Układ odpornościowy jest w stanie rozpoznać i zniszczyć powstające w organizmie nieprawidłowe komórki, które odpowiadać mogą np. za powstanie nowotworów. Dodatkowo komórki, które wytwarzają przeciwciała są usuwane, jeżeli przeciwciała eksponowane na ich powierzchni rozpoznają prawidłowe składniki organizmu. Dlatego można powiedzieć, że w organizmie nie wytwarzają się przeciwciała przeciwko własnym makrocząsteczkom. Zdarzają się odstępstwa w przypadku chorób autoimmunologicznych [43].

1.3.2. Budowa limfocytów

Limfocyty są składnikiem morfotycznym krwi obwodowej, należą do agranulocytów. Są praktycznie bezbarwne. Średnia wielkość limfocytów wynosi około 6-10 μm, posiadają duże jądro i skąpą cytoplazmę. Wyróżnia się: limfocyty B, limfocyty T oraz komórki NK (ang. Natural Killer) [44]. Limfocyty T odpowiedzialne za swoistą odpowiedź komórkową produkowane są w grasicy, natomiast limfocyty B odpowiedzialne za produkcję przeciwciał powstają w szpiku kostnym. Limfocyty krążą przez całe życie w krwi. Dzięki temu limfocyty potrafią wiązać antygen, który może penetrować organizm w każdym miejscu. Reakcja odpornościowa (humoralna lub komórkowa) pojawia się po okresie utajenia trwającym kilka dni. Podczas tego czasu komórki limfocytów T i B dzielą się i różnicują, co prowadzi do tworzenia dużych populacji komórek aktywnych, zdolnych do szybkiej reakcji immunologicznej. Nieaktywne komórki B i T są morfologicznie mało rozróżnialne (można je różnicować za pomocą markerów powierzchniowych). Gdy limfocyty B wejdą w kontakt z antygenem ich średnica znacznie się zwiększa. W zależności od oddziaływań limfocyty B mogą się różnicować w limfocyty B centrum germinalnego (ang. germinal center, GC), krotko lub długo żyjące komórki plazmatyczne lub długo żyjące komórki pamięci immunologicznej (żyją nawet przez czas życia osobniczego). Limfocyty T mogą żyć nawet przez kilka lat [45, 46, 47, 48].

1.3.3. Funkcje limfocytów w organizmie ludzkim

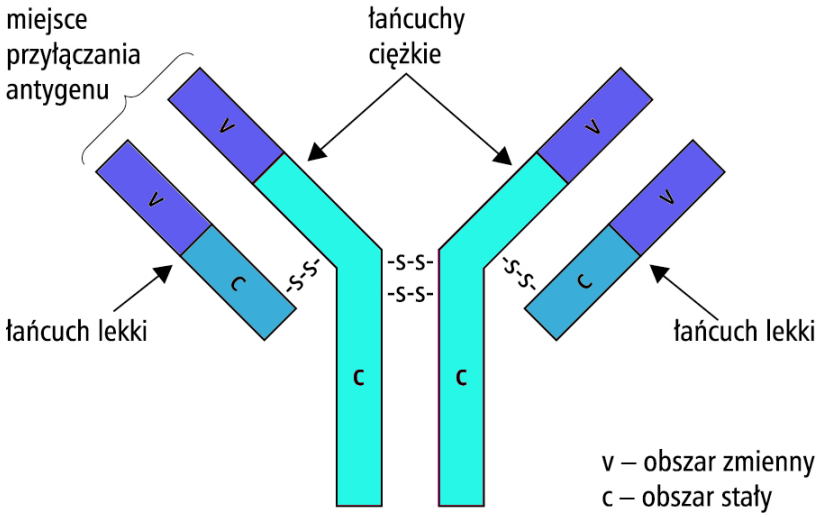
Limfocyty odpowiedzialne są za reakcje immunologiczne humoralne, które związane są z produkcją przeciwciał oraz za bezpośrednią swoistą odpowiedź komórkową. Większość limfocytów w organizmie znajduje się w fazie G0 cyklu komórkowego, czyli pozostają w uśpieniu. Dopiero podczas kontaktu z antygenem przechodzą do fazy G1, zaczynają się aktywować i powielać. Miejscem aktywacji limfocytów T są narządy limfatyczne. Proces aktywacji rozpoczyna tworzenie synapsy immunologicznej pomiędzy limfocytem T a antygenem. Do pełnej aktywacji dochodzi w czasie przekazania dwóch sygnałów wewnątrz synapsy immunologicznej. Natomiast limfocyty B zostają aktywowane poprzez rozpoznanie antygenu. Receptor rozpoznający antygen (BCR ang. B-cell Receptor) zbudowany jest z błonowej formy immunoglobuliny, która odpowiada za rozpoznanie antygenu. Drugą część kompleksu receptora tworzy heterodimer. Jest to dimer czyli związek chemiczny zbudowany z dwóch różnych fragmentów, wykazujących podobieństwo strukturalne. W obu przypadkach ostateczny efekt wywołany przez bodziec działający na receptor antygenowy limfocytu uzależniony jest od wpływu wywieranego w tym samym czasie na inne cząsteczki powierzchniowe. Do większości reakcji immunologicznych konieczna jest kooperacja między limfocytami B i T. W niniejszej pracy badania prowadzone były na limfocytach B (Rys. 1) [5, 7, 8, 49,50].



Rysunek 1. Funkcje limfocytów B (na podstawie [41]).

1.3.4. Budowa i rodzaje immunoglobulin

Cząsteczki immunoglobulin zbudowane są z czterech łańcuchów polipeptydowych: dwóch lekkich i dwóch ciężkich, które połączone są wiązaniami disiarczkowymi (Rys. 2). W obu łańcuchach można wyróżnić części zmienne i części stałe. Każdy łańcuch lekki i ciężki zawiera na końcu N część zmienną, a na końcu C część stałą. W tworzeniu miejsc wiązania antygenu biorą udział łańcuchy lekkie i ciężkie znajdujące się na końcu N to zmiana sekwencji aminokwasów w tych regionach wyjaśnia powstanie wiązań antygenów o różnej swoistości. Określane najczęściej przeciwciała wiązać mogą jeden określony antygen, to znane są również przeciwciała polireaktywne, które mogą wiązać więcej niż jeden antygen są wytwarzane są przez limfocyty B. Swoistość przeciwciał spowodowana jest przez konfigurację przestrzenną części zmiennych łańcuchów lekkich i ciężkich, która zależy od kolejności aminokwasów. Część zmienna łańcuchów składa się z trzech regionów hiperzmiennych, oraz przylegających do nich czterech regionów zrębowych. Sekwencja aminokwasów w rejonach hiperzmiennych determinują swoistość przeciwciał. Domeny homologiczne obejmują 110 aminokwasów, w których znajdują się pętle zamknięte mostkami disiarczkowymi. Dodatkowo immunoglobuliny posiadają przyłączone łańcuchy cukrowe. Przeciwciała posiadają zdolność do swoistego łączenia się z antygenem. Dany antygen łączy się z miejscem wiążącym przeciwciała z tym większą siłą im miejsce wiążące jest bardziej dopasowane. W sposobie wiązania duży wpływ mają: wiązania wodorowe, siły elektrostatyczne, oddziaływania hydrofobowe, siły van der Waalsa. Siłę tę nazywamy powinowactwem (czyli jest to miara siły napędowej reakcji chemicznych, które traktowane są jako samorzutne procesy, dążące do stanu równowagi termodynamicznej). Immunoglobuliny można podzielić na pięć klas i są to: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM [5, 7, 8, 49, 51].



Rysunek 2. Budowa immunoglobuliny (na podstawie [51]).

1.3.5. Funkcja immunoglobulin w organizmie

Przeciwciała posiadają następujące funkcje:

- mogą prowadzić do wyniszczenia komórek zakażonych wirusami lub nowotworowych poprzez wiązanie antygenów na powierzchni niektórych komórek, aktywację dopełniacza, indukcję immunofagocytozy, indukcję cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał,
- mogą blokować wnikanie mikroorganizmów wiążąc antygen na powierzchni,
-mogą blokować działanie toksyn poprzez wiązanie z nimi,
-indukują aglutynację,
-mogą spełniać rolę enzymów w stosunku do wiązanych antygenów,
-wewnątrz komórek mogą spełniać nieoczekiwane funkcje obronne.

Wyodrębniono pięć klas immunoglobulin, które różnią się strukturą i funkcją:

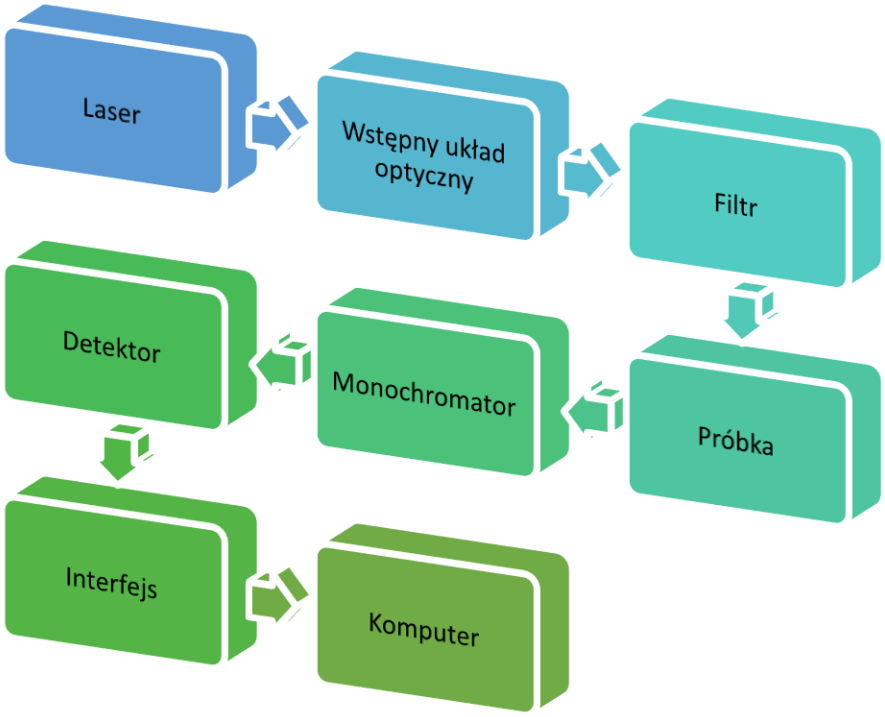
- IgA – jako główna klasa przeciwciał, która występuje w wydzielinach np. łzy, ślina, wydzieliny płuc i jelit, dróg moczowych, gdzie jest pierwszą linią obrony przeciwko drobnoustrojom.
-IgD – funkcja tych przeciwciał jest wciąż słabo poznana, występują wraz z IgM na powierzchni dojrzałych limfocytów B.

-IgE – zawierają cztery domeny w częściach stałych łańcuchów ciężkich. Po związaniu z antygenem stymulują komórki tuczne, które odpowiedzialne są za uwalnianie wielu czynników np. powodujących degranulację. Mogą również aktywować eozynofile, które uczestniczą w likwidacji pasożytów. Mogą uwalniać biologicznie aktywne aminy np. histaminy, które prowadzą do wystąpienia objawów alergicznych.
-IgG – jest to podstawowa immunoglobina, występująca w czterech podklasach. Aktywuje układ dopełniacza i uruchamia makrofagi. Dodatkowo jest jedyną klasą, która jest w stanie przejść przez łożysko, co może zapewniać immunologiczną ochronę płodu. Obecne są w surowicy w najwyższym stężeniu i są ważne w walce z mikroorganizmami. Są w stanie zapoczątkować proces unicestwiania mikroorganizmów, komórek nowotworowych, komórek zarażonych przez wirusy.
-IgM – są to przeciwciała wytwarzane w początkowej fazie immunologicznej. Posiadają dużą liczbę miejsc wiązania antygenu, przez co są w stanie bardzo silnie związać się z patogenem. Podczas pierwotnej odpowiedzi immunologicznej IgM są uwalniane jako pierwsze. Po związaniu z antygenem aktywują układ dopełniacza, co powoduje zniszczenie patogenu. Aktywują makrofagi, które prowadzą fagocytozę patogenów [51, 52, 53].

1.4. Techniki analityczne

1.4.1. Spektroskopia rozpraszania ramanowskiego

Spektroskopia ramanowska to technika polegająca na analizie nieelastycznego rozpraszania fotonów (tzw. rozpraszanie Ramana). Nazwa spektroskopii Ramanowskiej wywodzi się od nazwiska hinduskiego fizyka Chandrasekhary Ramana, który w 1930 roku otrzymał Nagrodę Nobla za eksperymentalne potwierdzenie zjawiska rozproszenia światła [54]. Jest to nowoczesna metoda spektroskopowa, która bardzo dobrze sprawdza się podczas pomiaru materiałów biologicznych, które badano w niniejszej pracy. Schemat budowy spektrometru ramanowskiego przedstawiono na Rys. 3.

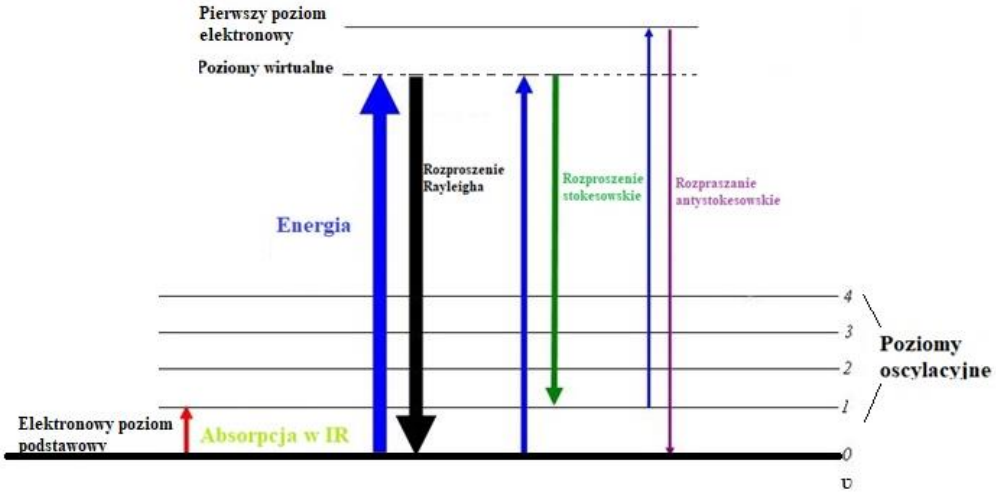


Rysunek 3. Schemat budowy spektrometru ramanowskiego ([na podstawie [54]).

Podstawowym źródłem promieniowania jest współcześnie laser, który zapewnia monochromatyczność i intensywność promieniowania. Najczęściej stosuje się laser jonowy argonowy, który generuje promieniowanie z zakresu 454-514,5 nm (zwykle wykorzystywane: linia zielona 514,4 nm, oraz linia niebieska 488 nm). Niektóre próbki mogą wykazywać fluorescencję, w takim przypadku można zastosować laser helowo-neonowy 628,8 nm, laser diodowy 785 nm lub laser Nd:YAG generujący światło o długości fali 1064 nm W zależności od rodzaju próbki dopasowuje się konkretne długości światła lasera. Promieniowanie laserowe jest przepuszczane przez filtr interferencyjny i układ optyczny, która skupia światło na badanej próbce, gdzie zachodzi zjawisko rozproszenia światła. Potem rozproszone promieniowanie kierowane jest do monochromatora. W monochromatorze promieniowanie jest analizowane, następnie zostaje wzmocnione i zarejestrowane za pomocą detektora. Widmo zostaje zapisane cyfrowo i wyświetlane na ekranie komputera w postaci graficznej, zależności intensywności światła rozproszonego jako funkcji liczby falowej.

Promieniowanie wzbudza oscylacje molekuł, co prowadzi do ramanowskiego rozpraszania.

Można wymienić dwa sposoby rozpraszania nieelastycznego, gdy:
-wartość energii promieniowania padającego jest powiększona o energie przejść między poziomami oscylacyjnymi, są to pasma antystokesowkie,
-wartość energii promieniowania padającego jest pomniejszona o energię przejść między poziomami oscylacyjnymi, wtedy powstają pasma stokesowskie.
Jeżeli rozpraszanie zajdzie w sposób elastyczny to jest to tzw. rozpraszanie Rayleigha (brak zmiany częstotliwości w porównaniu do promieniowania padającego) [54, 55, 56].



Rysunek 4. Diagram energii przejść podczas rozpraszania ramanowskiego, υ – oznacza kwantowa liczbę oscylacji. Zaznaczone jest również przejście absorpcyjne w zakresie podczerwieni (na podstawie [56]).

Zdarza się, że podczas pomiaru widma występuje zjawisko fluorescencji, prowadzące do podwyższenia tła które można zniwelować lub zmniejszyć poprzez, zmianę długości promieniowania lasera wzbudzającego lub przeprowadzenie pomiaru w antystokesowskiej części widma. Metody naświetlenia próbki, oczyszczenia z zanieczyszczeń, lub dodanie do próbki tzw. wygaszaczy nie nadają się do próbek biologicznych [54, 55, 56, 57].

Pasma stokesowskie, antyskokesowskie są rozłożone symetrycznie względem pasma Rayleigha. Energia promieniowania padającego jest znacznie większa od energii przejść oscylacyjnych w spektroskopii ramanowskiej (Rys. 4).
Promieniowanie jest rozproszone we wszystkich kierunkach w przestrzeni.

Promieniowanie rozproszone może mieć częstotliwości :

$$\nu_0,\ \nu_0 - \nu_{osc},\ \nu_0 + \nu_{osc}$$

gdzie ν_0 – częstotliwość padającego na próbkę światła.

Fotony rozproszone dotyczą odpowiednio (Rys. 4):

-rozproszenia Rayleigha (ν_0),

-rozpraszania stokesowskiego ($\nu_0 - \nu_{osc}$)

-rozpraszania antystokesowskiego ($\nu_0 + \nu_{osc}$)

gdzie:

ν_{osc} – częstotliwość drgania normalnego

Pasma antystokesowskie są mniej intensywne niż stokesowskie. Zgodnie z rozkładem Boltzmana najniższy poziom oscylacyjny ($\nu_{osc} = 0$) jest bardziej obsadzony w temperaturze pokojowej niż wyższe poziomy oscylacyjne. Dlatego intensywność pasm stokesowskich jest dużo większa od antystokesowskich.

Mechanizm rozpraszania ramanowskiego wyjaśnia teoria falowa zastosowana przez Placzka. Pod wpływem oddziaływania cząsteczek (materii) ze światłem wzbudzającym zostaje indukowany elektryczny moment dipolowy $\vec{P}$.

$$\vec{P} = \alpha\vec{E},$$

gdzie:

α jest tensorem polaryzowalności.

$\vec{E}$ natężeniem pola elektrycznego fali elektromagnetycznej

Polaryzowalność to zdolność elektronów do przemieszczania się w stosunku do jądra atomowego pod wpływem zewnętrznego pola elektrycznego. Ponieważ odziaływanie pola elektrycznego z cząsteczką zależy od kierunku to polaryzowalność wyrażana jest jako tensor (macierz).

Zjawisko rozpraszania opisywane jest również w oparciu o teorię kwantową. Molekuła może wyemitować lub pochłonąć energię porcjami, tzw. kwantami. Reguły wyboru to warunki potrzebne do spełnienia obserwacji widma ramanowskiego.

Reguły wyboru to:

- Aby przejście ramanowskie było dozwolone w czasie drgania normalnego musi nastąpić zmiana przynajmniej jednej składowej tensora polaryzowalności (moment przejścia jest różny od zera). Regułę wyboru dla przejścia pomiędzy stanami oscylacyjnymi można opisać równaniem:

$$\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q}\right)_0 \neq 0$$

gdzie:

Q – współrzędna drgania normalnego

α- polaryzowalność

Zmiana kwantowej liczby oscylacji i może zmienić się zgodnie z równaniem:

$$\Delta v = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \ldots$$

Zmiana energii molekuły zachodzi kwantowo. Jest to tak zwane „porcjowanie" energii [54, 55, 56].

Jeżeli:

$\Delta v = \pm 1$ są to tony podstawowe, reguła wyboru spełniona dla oscylatora harmonicznego

$\Delta v = \pm 2, \pm 3, \ldots$ to są nadtony, spełnione dla oscylatora anharmonicznego.

- Różnica energii fotonu padającego i rozproszonego pasuje do różnicy poziomów oscylacyjnych:

$$h\upsilon_0 - h\upsilon_R = \Delta E$$

Przejście musi nastąpić tak by kwantowa liczba oscylacji zmieniała się o 1 (dla oscylatora harmonicznego) [54, 55, 56].

- zasadę wzajemnego wykluczania stosuje się w sytuacji, gdy molekuła ma środek symetrii, wtedy drgania które są aktywne w widmie w podczerwieni, w widmie Ramana są zabronione i na odwrót.

1.4.2. Pomiar stopnia depolaryzacji

Zmiana polaryzowalności molekuły podczas drgania normalnego prowadzi do pojawienia się pasm ramanowskich. Jeżeli dana molekuła posiada jednakową polaryzowalność we wszystkich kierunkach (czyli jest izotropowa) to indukowany dipol drgać będzie zgodnie z kierunkiem drgań wektora elektrycznej składowej promieniowania padającego na próbkę (np. x). Natomiast składowa elektryczna promieniowanie rozproszonego pojawi się w kierunku jednej osi (y) i będzie ono spolaryzowane w płaszczyźnie (yz).

Gdy rozpraszająca molekuła jest anizotropowa to elipsoida polaryzowalności dłuższą osią będzie ustawiona wzdłuż jednego kierunku (x), a dipol będzie wyindukowany w skośnym kierunku promieniowania, pośrednim miedzy kierunkiem padania promieniowania a kierunkiem indukowanego momentu dipolowego (xy). W promieniowaniu uwidoczni się w takim przypadku składowa x'. Takie zjawisko, związane z anizotropią polaryzowalności nazwane jest depolaryzacją promieniowania. Natomiast stopień depolaryzacji ρ jest jej miarą.

Stopień depolaryzacji to stosunek intensywności składowej x' (składowej prostopadłej do składowej elektrycznej promieniowania wzbudzającego) do intensywności składowej y'(składowej równoległej do składowej elektrycznej promieniowania wzbudzającego).

$$\rho = \frac{I_{x'}}{I_{y'}}$$

Gdy molekuły są izotropowe to ρ=0, natomiast gdy są anizotropowe to ρ>0. Stopień depolaryzacji można zapisać:

$$\rho = \frac{I_{\perp}}{I_{\parallel}}$$

gdzie $I_{\perp}$- składowa prostopadła i $I_{\parallel}$ - składowa równoległa

Pomiary stopnia depolaryzacji są wykonywane poprzez wstawienie polaryzatora w drogę promieniowania rozproszonego, zarejestrowanie dwóch widm w spektrometrze i analizę stosunku intensywności $I_{\perp}$ i $I_{\parallel}$ dla wybranych pasm. Można zatem wymienić następujące reguły:

-przejście zabronione- kiedy w czasie drgania normalnego nie deformuje się elipsoida polaryzowalności,

-pasmo jest zdepolaryzowane- kiedy drganie normalne powoduje ograniczony obrót elipsoidy polaryzowalności,

-pasmo spolaryzowane- kiedy drganie normalne powoduje deformację, pulsację elipsoidy polaryzowalności.

Powyższe reguły świadczą o tym, że:

- pasma zdepolaryzowane odpowiadają za drgania asymetryczne lub zdegenerowane i są zazwyczaj niskiej intensywności

- pasma spolaryzowane odpowiadają drganiom w pełni symetrycznym względem wszystkich elementów symetrii molekuły. Im stopień depolaryzacji ρ jest bliższy zeru tym wyższa jest symetria molekuły [54, 55, 56, 57].

1.4.3. Analiza widm ramanowskich

Widma ramanowskie są zapisywane w postaci cyfrowej, w formatach skompresowanych, które można odczytać za pomocą odpowiednich programów komputerowych. W niniejszej pracy wykorzystano programy WiRE, Omnic, Excel. W celu przeprowadzenia szczegółowej analizy widma można wybrane pasma rozłożyć na pasma składowe wykorzystując procedurę dopasowania linii (Curve fit) w programie WiRE i w ten sposób określić położenie pasma, jego intensywność, szerokość połówkową, udział linii matematycznych Gaussa i Lotenzta w pasmie, pole powierzchni pasma. Zazwyczaj analizowany jest wybrany punkt próbki, ale można również wybrać metodę mapowania próbki, gdzie widma są zbierane z szeregu punktów w zaznaczonym obszarze z ustalonym krokiem. Obrazy ramanowskie powstają ze zbioru pojedynczych widm z obszaru zaznaczonego na badanej próbce. Widma ramanowskie dostarczają informacji o polaryzowalności cząsteczek, wiązaniach międzycząsteczkowych i ich budowie. Takie informacje określają przebiegi reakcji chemicznych, reaktywność, identyfikację

nieznanych substancji oraz sprawdzenie ilości substancji w badanej próbce. Metodę tę można stosować do próbek w dowolnym stanie skupienia [54, 55, 56, 57].

1.4.4. Metoda korelacji dwuwymiarowej 2D-COS

Metoda korelacji dwuwymiarowej 2D-COS została opracowana w latach 80. XX wieku przez Isao Nodę. Założeniem spektroskopii 2D jest wykorzystanie zewnętrznego zaburzenia badanego układu, które selektywnie wpływa i stymuluje składowe złożonych układów, np. biologicznych. Pomiar spektroskopowy badanej próbki poddanej zewnętrznej perturbacji (czyli bodźcowi) rejestruje jego wpływ jako zmiany intensywności pasm w widmie i zmianę kształtu i przesunięcia pasm [58, 59].

Metoda korelacji 2D jest matematyczną analizą danych, która pozwala na rozciągnięcie pasm wzdłuż drugiego wymiaru, a dzięki temu zwiększenie rozdzielczości spektralnej. Dużym atutem metody jest uzyskanie informacji o oddziaływaniach międzycząsteczkowych i wewnątrzcząsteczkowych oraz o kolejności zachodzących zdarzeń [58, 59].

Intensywność spektralna wyrażana jest jako funkcja dwóch niezależnych zmiennych, np. liczb falowych, definiujących płaszczyznę spektralną. Intensywność widmowa jest trzecią osią. Wszystkie zmiany zachodzące w badanym układzie zawarte są w kolejnych widmach próbki (tzw. widmach dynamicznych), które mierzy się w pewnej sekwencji. Całość zmian spektralnych traktuje się jako funkcję zmiennej fizycznej przedstawiającą zaburzenie. Widma dynamiczne mogą być traktowane jako forma relaksacji, ewolucji w trakcie działania zewnętrznego zaburzenia w funkcji np. czasu. Perturbacją może być także temperatura, ciśnienie itp. które wpływają na obraz widm dynamicznych. Widma dynamiczne przedstawiają zewnętrzne procesy, które wpływają na badany układ. Technika dwuwymiarowa ma na celu zbadanie, rozpoznanie zależności i określenie sekwencji zmian między wywołaną perturbacją a odpowiedzią widmową różnych grup funkcyjnych, czy też całych ugrupowań molekularnych, składowych analizowanego układu. W badaniach należy wybrać odpowiedni bodziec, który będzie selektywny, jedyny dla badanego systemu. Dwuwymiarowa korelacja jest ilościową miarą odmienności i zgodności zachodzących zmian spektralnych intensywności dla dwóch zmiennych.

Przeprowadzając analizę wyróżnia się widma synchroniczne i asynchroniczne. Widmo synchroniczne pokazuje jednoczesne lub pokrewne zmiany spektralne dla dwóch różnych ugrupowań molekularnych w badanym układzie. Wskazuje to możliwe wspólne źródło zmian na dany bodziec zewnętrzny dwóch elementów układu. Na przekątnej w widmach

synchronicznych pojawiają się piki autokorelacyjne (ang. auto-peaks), oraz piki korelacyjne, krzyżowe znajdujące się poza diagonalą (ang. cross-peaks). Autopiki są pikami dodatnimi, które opisują największe zmiany intensywności pasm zachodzące w wyniku zaburzenia. Korelacyjne piki krzyżowe mogą być dodatnie lub ujemne. Przy dodatnich wartościach dwie różne zmienne spektralne równocześnie zwiększają lub zmniejszają intensywność spektralną, natomiast ujemne wartości mówią o tym, że jedna zmienna maleje a druga wzrasta.

Widma asynchroniczne zawierają informacje dotyczącą odpowiedzi fazowych zmierzonych dla dwóch różnych zmiennych spektralnych pod wpływem zaburzenia zewnętrznego. Widma asynchroniczne nie posiadają autopików, natomiast piki korelacyjne widoczne są podczas zmian intensywności dwóch zmiennych, które różnią się od siebie i są opóźnione lub przyśpieszone w fazie. Piki krzyżowe w widmach asynchronicznych są dodatnie lub ujemne. Dodatnie piki korelacyjne informują, iż pod wpływem zaburzenia zewnętrznego zmiana zaszła w pierwszej kolejności w ugrupowaniu scharakteryzowanemu przez liczbę falową ν_1 a następnie ν_2. Piki ujemne mówią o odwrotnej kolejności, czyli pod wpływem zaburzenia zewnętrznego w pierwszej kolejności zmiana dokonała się w ν_2 a następnie ν_1. Ta sekwencja zmian następuje tak jak przedstawiono powyżej, gdy odpowiedni pik w widmie synchronicznym jest obserwowany jako dodatni [58, 59].

1.4.5.Zastosowanie spektroskopii ramanowskiej w badaniach limfocytów

Spektroskopia ramanowska jest bardzo skuteczną metodą do badań materiałów biologicznych, ponieważ można określić zmiany jakie zachodzą w badanym materiale biologicznym, np. w funkcji czasu (Tabela 1). Jest to metoda stosunkowo mało inwazyjna, o dużej dokładności oraz związana z niedużym zużyciem materiału badawczego, ponadto nie wymaga barwienia. Metoda spektroskopii ramanowskiej jest bardzo czuła, stabilna, szybka. Podczas badań limfocytów należy ustalić warunki pomiarowe, tj. zwrócić uwagę na rodzaj i moc lasera (zbyt duża moc powoduje zniszczenie próbki, zbyt mała może dawać widma o gorszej jakości). W pracy badawczej wykorzystano mikrospektrometr ramanowski Renishaw inVia z laserem o linii wzbudzającej 514,5 nm. Rozmiar komórki limfocytu umożliwia jej dobrą obserwację pod mikroskopem optycznym. Dużym atutem spektroskopii ramanowskiej jest możliwość zastosowania techniki mapowania komórek, a co za tym idzie

uzyskanie informacji z większej powierzchni komórki i otrzymanie chemometrycznego obrazu 2D.

Wykorzystanie metody spektroskopii ramanowskiej gwałtownie wzrosło od lat 70 XX wieku, dotyczyło zastosowań w biologii i medycynie [60, 61]. Limfocyty stanowią około 40 procent wszystkich białych krwinek, są bardzo ważną częścią obrony organizmu przed drobnoustrojami i stanowią pierwszą linię obrony [62]. Ważne jest poznanie aktywacji limfocytów podczas przebiegu różnych chorób wirusowych. W ostatnich latach badano proces aktywacji limfocytów. Pierwsze założenia opierały się na rozpoznawaniu antygentów na powierzchni komórek przez limfocyty B. Analizowano przy użyciu spektroskopii elektronowej i modelu dwuwarstwy lipidowej receptory limfocytów B które aktywują komórki i powodują gromadzenie się antygentów a następnie przekazanie informacji komórkom T. Limfocyty B podczas interakcji z antygenami, które są immobilizowanie na powierzchni komórek docelowych prowadzą do powstania tzw. synapsy i pozyskują antygeny z błony [63]. Warto zwrócić uwagę na wykorzystanie trójwymiarowej mikroskopii konfokalnej (3D-CM) w wyjaśnieniu zachodzących zjawisk immunologicznej funkcji synaps, które wpływają na limfocyty B przez antygeny, a które są związane z błoną. Interesującą strategią było zbudowanie systemu mikroprzepływowego, a następnie zaprojektowanie i ilościowe określenie biologicznej adhezji limfocytów T do komórek śródbłonka za pomocą cząsteczek adhezyjnych, które są ważne nie tylko dla utrzymania funkcji, ale także migracji leukocytów w układzie odpornościowym. [64, 67]. Metody spektroskopii w podczerwieni i ramanowskiej mają ogromne znaczenie i przyczyniły się do nowego spojrzenia na ludzkie komórki, tkanki oraz możliwość obserwacji fizjologicznych i patologicznych zmian [65]. Zauważono, że widma uzyskane z komórek węzłów chłonnych, usuniętych podczas operacji raka jelita grubego, z pęcherzyków limfatycznych i obszarów korowych mogą być zróżnicowane z powodu zawartości komórek B i T. Jednak dla pojedynczych komórek, nie zaobserwowano różnic w obrębie układu limfatycznego. Metodą mikrospektroskopii IR poszczególnych komórek obserwuje się niewielkie różnice widmowe między różnymi regionami komórki. Metoda ta ma potencjał jako szybka metoda przesiewowa [66].

Zastosowano metodę spektroskopii ramanowskiej do sprawdzenie aktywacji limfocytów przy zachorowaniu na grypę. Wykazano powstanie pasma disiarczkowego przy liczbie falowej 521 cm^{-1}, które odpowiada za aktywację limfocytów w przebiegu choroby [67, 68, 69, 70].

Aktualnie oprócz badan naukowych metodę spektroskopii ramanowską wykorzystuje się bezpośrednio w szpitalach np. do analiz wycinków ludzkich gruczołów sutkowych itp. [71, 72]. Metoda spektroskopii ramanowskiej może w przyszłości przyczynić się do szybszej diagnozy, badań przesiewowych lub do sprawdzania zmian zachodzących w danych komórkach, organach itp.

Tabela 1 Pasma obserwowane w widmach ramanowskich komórek żywego organizmu oraz ich przypisania (na podstawie [73]).

Pasma ramanowskie (cm^{-1})	**Kwasy nukleinowe**	**Proteiny**	**Lipidy**	**Węglowodany**
1736			νC=O ester	
1680-1655		amid I	νC=C	
1617		νC=C Tyr, Trp		
1607		νC=C Phe, Tyr		
1578	G, A			
1480-1420	G, A, CH def	C-H	CH def	CH def
1342	A, G	C-H		CH def
1320	G	C-H		
1301			CH_2 drgania skręcające	
1284-1220	T, A	amid III	=CH drgania skręcające	
1209		C-C_6H_5. Phe, Trp		
1176		C-H drgania skręcające Tyr		
1158		νC-C/C-N		
1128		νC-N		νC-O
1095-1060	νPO_2^- str.		Łańcuch νC-C	νC-O, νC-C
1033		νC-H w Phe		

Pasma ramanowskie (cm^{-1})	**Kwasy nukleinowe**	**Proteiny**	**Lipidy**	**Węglowodany**
1005		ν Pierścień Phe		
980		νC-C (β –kartka)	=CH drgania skręcające	
937		νC-C (α- helisa)		C-O-C
877			νC-C-N^+ sym.	C-O-C pierścień
854		Pierścień Tyr		
828	νO-P-O asym.	Pierścień Tyr		
811	νO-P-O RNA			
788	νO-P-O DNA			
782	U, C, T pierścień			
760		Pierścień Trp		
729	A			
717			$\nu CN^+(CH_3)_3$	
667	T, G			
645		C-C drgania skręcające Tyr		
621		C-C drgania skręcające Phe		
G- guanina; A- adenina, T- tymina, U- uracyl, Tyr- tyrozyna, Trp- tryptofan, Phe- fenyloalanina				

2. CEL PRACY

Celem niniejszej interdyscyplinarnej pracy doktorskiej było sprawdzenie wpływu wirusa Epsteina-Barr n2a limfocyty ludzkie u pacjentów chorych na mononukleozę zakaźną stosując jako główną metodę analityczną spektroskopię ramanowską. Badania polegały na określeniu zmian i procesów w komórkach krwi zachodzących w związku z infekcją wirusem EBV (Epstein-Barr virus) na poziomie molekularnym.

Analiza procesów zachodzących podczas infekcji oraz mechanizmów obronnych organizmu jest nowoczesną tematyką, w której stale poszukiwane są nowe odpowiedzi poszerzające zrozumienie mechanizmów patologii w zakażeniu wirusowym. Szczególnie istotna jest analiza nieswoistych reakcji odpornościowych na przykładzie przebiegu infekcji wywołanej przez wirus EBV.

W ramach badań w trakcie pracy doktorskiej zastosowano metodę spektroskopii oscylacyjnej. Zastosowanie konfokalnej mikrospektroskopii pozwoliło szczegółowo zanalizować heterogeniczność zmian zachodzących w pojedynczej komórce. Analizę wyników przeprowadzono stosując metody chemometrii. Analiza widm została przeprowadzona również metodą uogólnionej korelacji dwuwymiarowej (2D-COS), aby przez jej zastosowanie określić znaczenie poszczególnych fragmentów molekularnych badanych układów i sposobów ich wzajemnego oddziaływania.

Badanie było przeprowadzone na grupie pacjentów zdiagnozowanych na mononukleozę zakaźną i grupę kontrolna zdrowych ochotników. Pacjenci pozostawali pod opieką Kliniki Chorób Zakaźnych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie oraz Oddziału Chorób Zakaźnych i Tropikalnych UJ CM, który jest jednym z wiodących ośrodków leczenia infekcji w Polsce, obejmuje swoją opieką mieszkańców nie tylko Województwa Małopolskiego, ale i całej Polski południowej i południowo-wschodniej.

Dzięki użyciu mikrospektroskopii ramanowskiej, możliwa była obserwacja pojedynczych krwinek, wybrano limfocyty B ze względu na ich role w układzie odpornościowym i samodzielne aktywowanie się po kontakcie z antygenem. Izolacje limfocytów B wykonano za pomocą technologii MACSxpress® opracowanej przez Miltenyi Biotec GmbH, Germany.

Badania objęły również korelacje przebiegu klinicznego i ciężkości przebiegu zakażenia wirusem względem zmian molekularnych limfocytów metodą mikrospektroskopii ramanowskiej. Ten sposób analizy miał na celu sprawdzenie możliwości zastosowania spektroskopii ramanowskiej w nowoczesnej diagnostyce medycznej.

3. Hipoteza badawcza

Spektroskopia ramanowska to odpowiednie narzędzie do badań aktywowania limfocytów ludzkich podczas zakażenia wirusem Epsteina-Barr. Można wskazać markery spektroskopowe monitorujące kolejne etapy infekcji EBV w organizmie człowieka.

4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

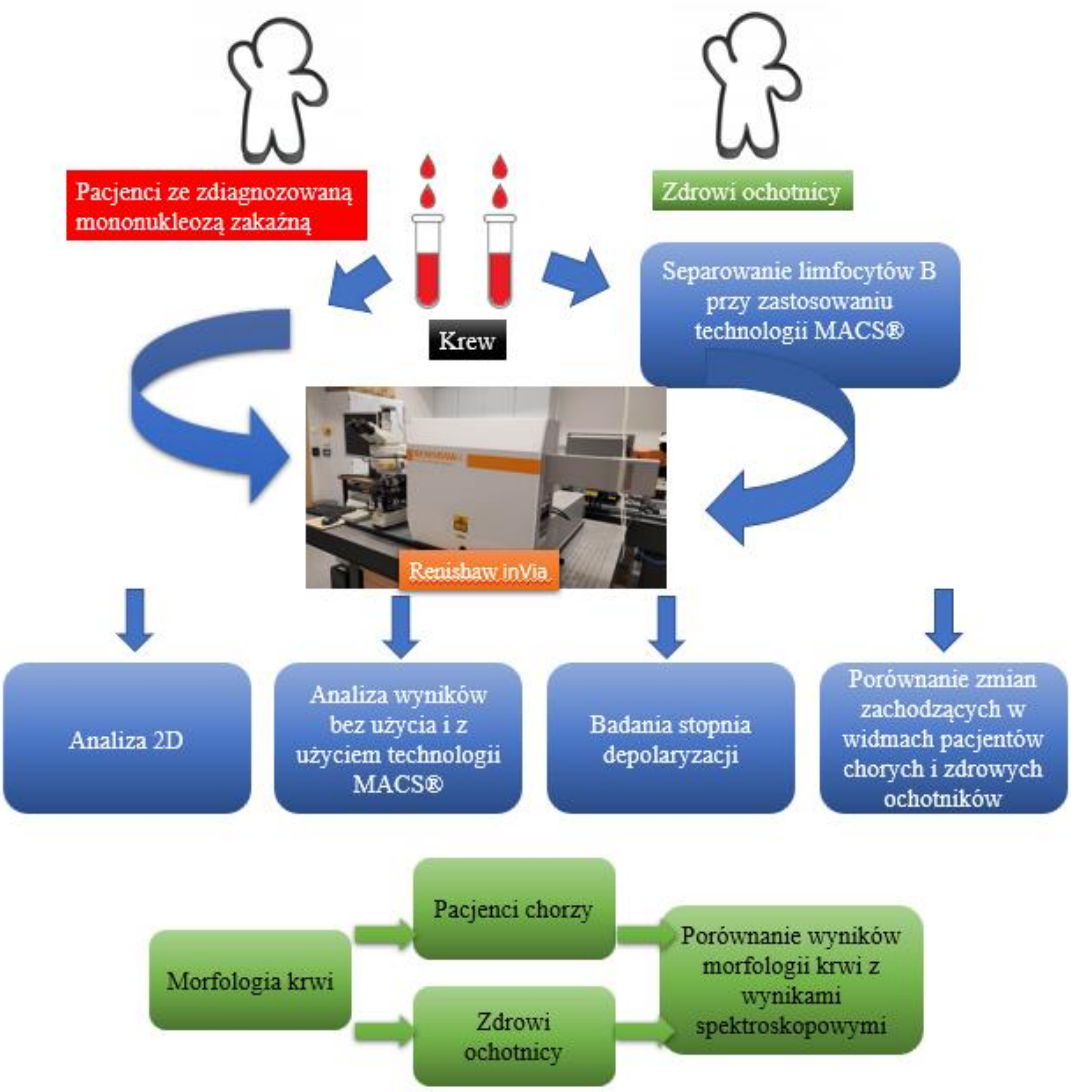
4.1. Materiał badawczy

Głównym materiałem badawczym w pracy doktorskiej były limfocyty pacjentów ze zdiagnozowaną mononukleozą zakaźną oraz zdrowych ochotników.

W badaniu wzięły udział 42 osoby, w tym 21 osób chorych na mononukleozę zakaźną i 21 zdrowych osób. Materiał badawczy pozyskiwano w Oddziale Klinicznym Chorób Zakaźnych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Przedział wiekowy pacjentów chorych na mononukleozę zakaźną wynosił 19-32 lata, natomiast zdrowych ochotników 19-35 lat. Próbki krwi pobierano 3-6 razy w przebiegu choroby. U zdrowych ochotników krew pobierano tylko raz. Wszystkie badania zostały przeprowadzone zgodnie z zasadami prawidłowego prowadzenia badań klinicznych z udziałem ludzi (GCP – *ang. Good clinical practice*) Deklaracji Helsińskiej. Komisja Bioetyczna UJ wyraziła zgodę na przeprowadzenie badań. Krew była pobierana do specjalistycznych probówek z heparyną w Oddziale Klinicznym Chorób Zakaźnych poprzez nakłucie żyły a następnie przewożona była w temperaturze 4ºC do Pracowni Spektroskopii Ramanowskiej Wydziału Chemii UJ.

Dodatkowo wykonano pomiary ramanowskie aminokwasów w celu porównania ich widm jako wzorców z widmami limfocytów u chorych i zdrowych pacjentów. Badane były aminokwasy: L-Cysteina, L-Alanina, L-Tyrozyna, L- Fenyloalanina, Arginina, Guanina, L-Seryna, D-Seryna, Cysteina, Adenina, Tymina, L-Tryptofan, L-Histydyna. Badania prowadzono w Zespole Spektroskopii Oscylacyjnej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, a także podczas stażu na Uniwersytecie w Ghent, gdzie przeprowadzono także pomiary krwi zdrowych ochotników.

Schemat badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej przedstawiono na Rys. 5 i Rys. 6.



Rysunek 5. Schemat badań.

Rysunek 6. Dodatkowe badania aminokwasów i krwi zdrowych ochotników wykonane podczas stażu na Uniwersytecie w Gandawie (University of Ghent), Belgia.

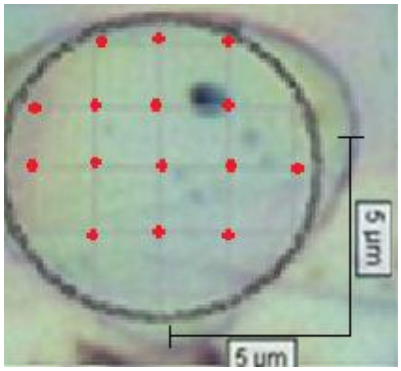
4.2. Przygotowanie próbek do badania metodą spektroskopii ramanowskiej

Badania pacjentów ze zdiagnozowaną mononukleozą zakaźną były prowadzone w latach 2015-2023. Po przewiezieniu próbek krwi do Pracowni Spektroskopii Ramanowskiej wykonywano pomiary dla każdego z pacjentów, oraz dla każdej osoby zdrowej.
Krew przechowywana była do momentu pobrania w specjalistycznej lodówce w temperaturze 4ºC. Badania limfocytów zdrowych pacjentów wykonywano analogicznie do chorych, natomiast od każdego zdrowego ochotnika otrzymywano tylko jedną próbkę krwi do badań. Dużym atutem metody była bardzo mała ilość materiału biologicznego potrzebnego do badań. Podczas przygotowania próbek nie stosowano barwienia. Próbkę krwi badano w postaci rozmazu na szkiełkach pomiarowych pod mikroskopem. Po wykonaniu rozmazu wyszukiwano limfocyty pod mikroskopem. Próbki pacjentów pobrano w trakcie ostrej fazy mononukleozy zakaźnej.

Próbki krwi były badane spektroskopowo w dniu pobrania lub dnia następnego. Pacjenci chorzy na mononukleozę zakaźną mieli pobieraną krew kilkukrotnie z odstępem kilkudniowym. Dodatkowo wykorzystano metodę separowania komórek limfocytów B metodą MACSxpress® przed pomiarem spektroskopowym. Badania metodą spektroskopii ramanowskiej wykonano na mikrospektrometrze firmy Renishaw inVia przy użyciu lasera Ar^+ o linii wzbudzającej 514,5 nm w zakresie spektralnym 3200-300 cm^{-1}. Używano obiektywu o powiększeniu x100, oraz siatki dyfrakcyjnej 2400 linii/mm. Mikrospektrometr ramanowski z mikroskopem optycznym Leica pracował w trybie konfokalnym, z rozdzielczością ± 0.5 cm^{-1}. Podczas wykonywania techniki mapowania w komórce mierzono od 9-15 punktów, oraz kumulowano 9 widm na jeden punkt. Mapowanie komórek dawało możliwość tworzenia obrazów 2D, zaznaczając na powierzchni komórki położenie jej poszczególnych komponentów chemicznych. Dla każdej próbki krwi pacjentów chorych na mononukleozę zakaźną w różnych dniach choroby wybierano około 4-6 krwinek białych w celu przeprowadzenia statystycznego badania limfocytów. Wszystkie widma opracowano w programach WiRE v.2.0. i v. 3.4, oraz Omnic.

Podczas badań aminokwasów i krwi zdrowych ochotników na Uniwersytecie w Ghent stosowano spektrometr ramanowski firmy Bruker. Aminokwasy badano w postaci ciała stałego. Wszystkie aminokwasy mierzono przy liniach wzbudzających 532 nm i 785 nm. Podczas używania lasera 532 nm badania wykonano w zakresie spektralnym 40-2730 cm^{-1} kumulowano po 3 widma dla jednego punktu pomiarowego. Natomiast dla linii wzbudzającej 785 nm zakres spektralny wynosił 80-1520 cm^{-1} i podobnie kumulowano 3 widma na każdy punkt pomiarowy. Rozmazy zdrowych ochotników zostały

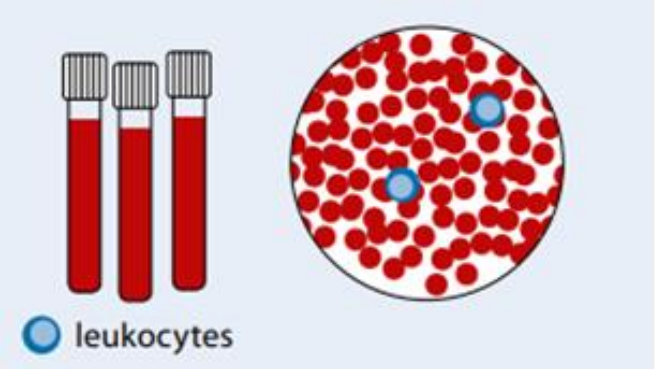
przygotowane w Polsce i zbadane przy wzbudzeniu linią 532 nm w zakresie spektralnym 40-2730 cm^{-1}, kumulowano 9 widm na jeden punkt pomiarowy. Podczas badań aminokwasów i krwi ochotników nie wykonywano mapy pomiarowej, a badano tylko jeden punkt. Czas pomiaru jednej krwinki białej wynosił 1-2 godziny, w zależności od wielkości limfocytu i związanej z tym wyborem ilości punktów pomiarowych na mapie. Wybrana komórka była automatycznie przesuwana przy pomocy zmotoryzowanego stolika mikroskopu (wyprodukowanego przez Prior Scientific), w obrębie ustalonego obszaru próbki. Badania zostały przeprowadzone w zakresie spektralnym 3200-300 cm^{-1}. Moc wiązki lasera penetrującego komórkę pojedynczego limfocytu wynosiła 1-3 mW. Taka moc wiązki lasera została dopasowana, aby zminimalizować ryzyko uszkodzenia komórki. Podczas przeprowadzania pomiarów korzystano z programu WiRE v. 2.0 (ang. Window-based Raman Environment) producenta spektrometru firmy Renishaw. Poniżej przedstawiono przykładowe zdjęcie limfocytu z mikroskopu z zaznaczoną siatką mapowania (Rys. 7). Punkty przecięcia linii (czerwone kropki) w osi x i osi y są miejscem padania lasera i pomiaru. Zebrane dane były następnie porównane.



Rysunek 7. Limfocyt chorego pacjenta ze zdiagnozowaną mononukleozą zakaźną, zaznaczony obszar pomiaru podczas wykonania pomiaru techniką mapowania komórki (na podstawie [70]).

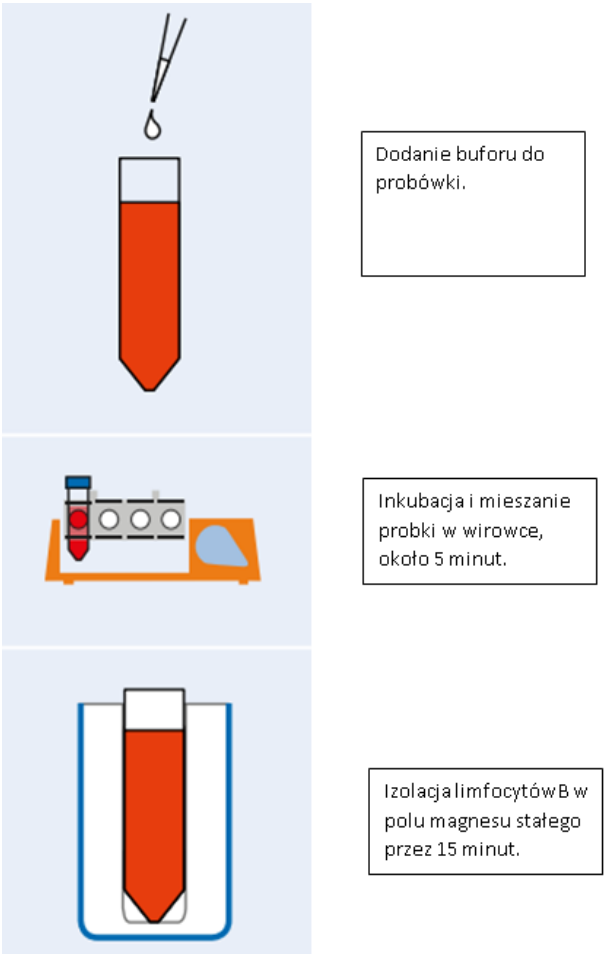
4.3. Separowanie komórek limfocytów B przy zastosowaniu technologii MACSxpress®

Technologia MACSxpress firmy Miltenyi Biotec to metoda do separacji komórek limfocytów B specjalnie zaprojektowana do wykorzystania pełnej krwi. System stosuje mikrokulki MACSxpress pozwalające na selekcję komórek za pomocą separatora MACSxpress wykorzystującego magnes stały. Komórki znakowane magnetycznie przylegają do ścianek probówki. W czasie separacji erytrocyty opadają na dno naczynia, pozostawiając w supernatancie nienaruszone limfocyty B. Czas izolacji komórek limfocytów B wynosi około 30 minut. Procedurę izolacji limfocytów B przedstawia Rys. 8 i Rys. 9.



Próbki krwi pacjentów chorych na mononukleozę zakaźną.

Rysunek 8. Materiał wyjściowy, pełna krew, wykorzystywany do izolacji limfocytów (na podstawie [74]).

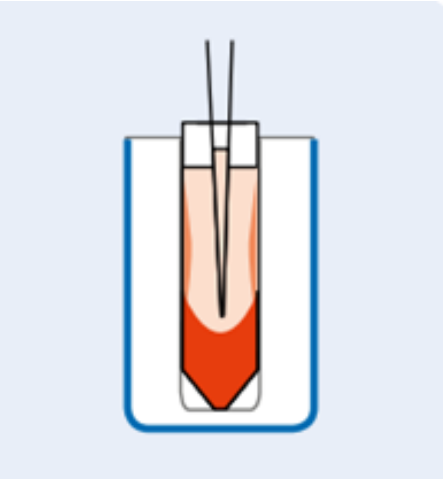


Rysunek 9. Procedura izolacji komórek limfocytów B z pełnej krwi (na podstawie [74]).

W celu przeprowadzenia izolacji wykonano następujące kroki:

1. 0,5 ml specjalistycznego zestawu do izolacji komórek (tzw. koktajlu MACSxpress®) wymieszano z 0,5 ml odpowiedniego buforu B MACSxpress®
2. Do probówki z otrzymaną mieszaniną (pkt. 1) dodano 2 ml krwi
3. Zawartość probówki wirowano przez 5 min
4. Nieprzykrytą probówkę umieszczono w separatorze magnetycznym na 15 min
5. Zebrano nadsącz który zawierał komórki limfocytów B do małej probówki
6. Wirowano nadsącz przez około 5min
7. Wykonano rozmaz na szkiełku pomiarowym

Separator MACSxpress® zawiera magnes trwały, który wytwarza silne pole magnetyczne. Komórki znakowane magnetycznie przylegają do ścianki probówki, , podczas gdy skupione erytrocyty osadzają się w dnie probówki, zaś komórki limfocytów B znajdują się w supernatancie (Rys.10).

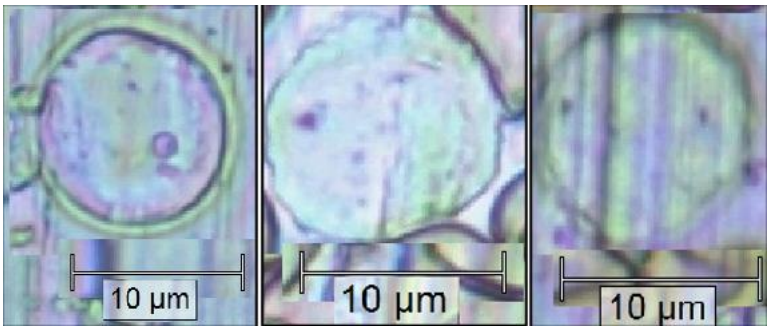


Rysunek 10. Zebrany nadsącz zawierający komórki docelowe limfocytów. Niechciane komórki są zatrzymywane przy ściance rury, a erytrocyty są osadzone na dnie naczynia (na podstawie [74]).

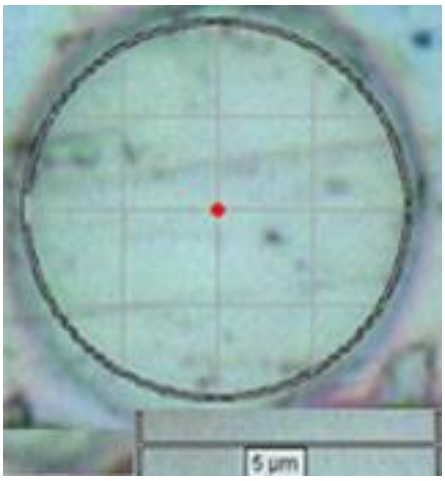
4.4. Widma ramanowskie limfocytów zdrowych ochotników

Podczas wykonywania badań spektroskopowych komórek krwi chorych pacjentów na EBV wykonano również badania zdrowych ochotników. Badania wykonano analogicznie jak u pacjentów chorych. Wykonano rozmaz próbek krwi zdrowych ochotników, następnie wyszukano komórkę limfocytu i wykonano mapowanie komórki. Wszystkie komórki limfocytów u zdrowych osób były małe, owalne.

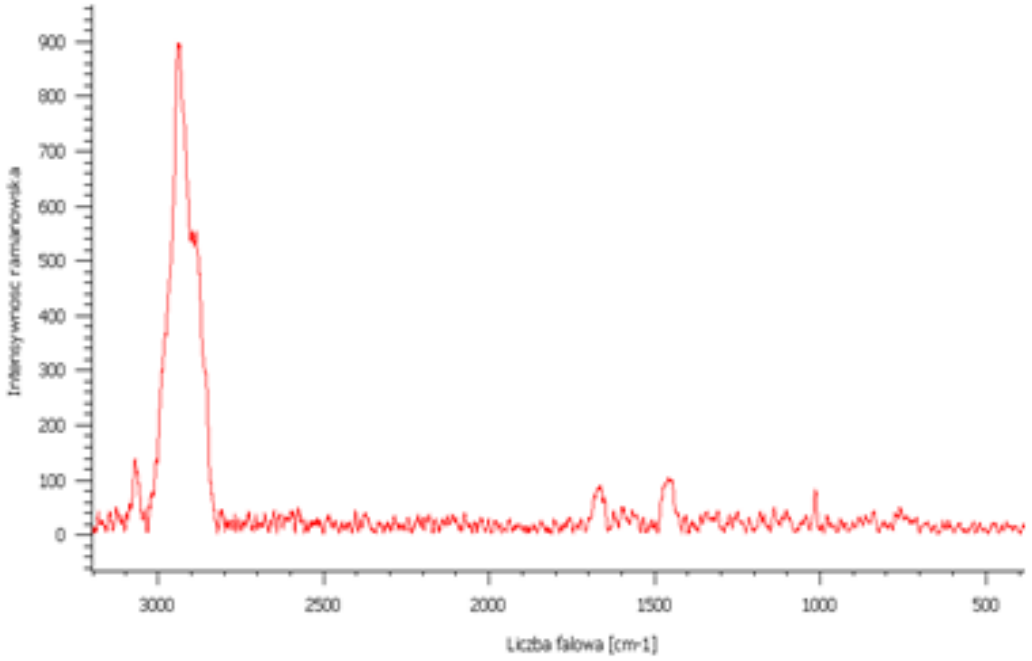
Dla jednej próbki wyszukano około 4-6 limfocytów do przeprowadzenia mapowania ramanowskiego. Poniżej przedstawiono zdjęcia mikroskopowe zdrowych limfocytów przykładowych ochotników, oraz przykład widma ramanowskiego.



Rysunek 11. Przykładowe zdjęcia mikroskopowe limfocytów zdrowych ochotników, skala przedstawiona na mikrofotografiach.

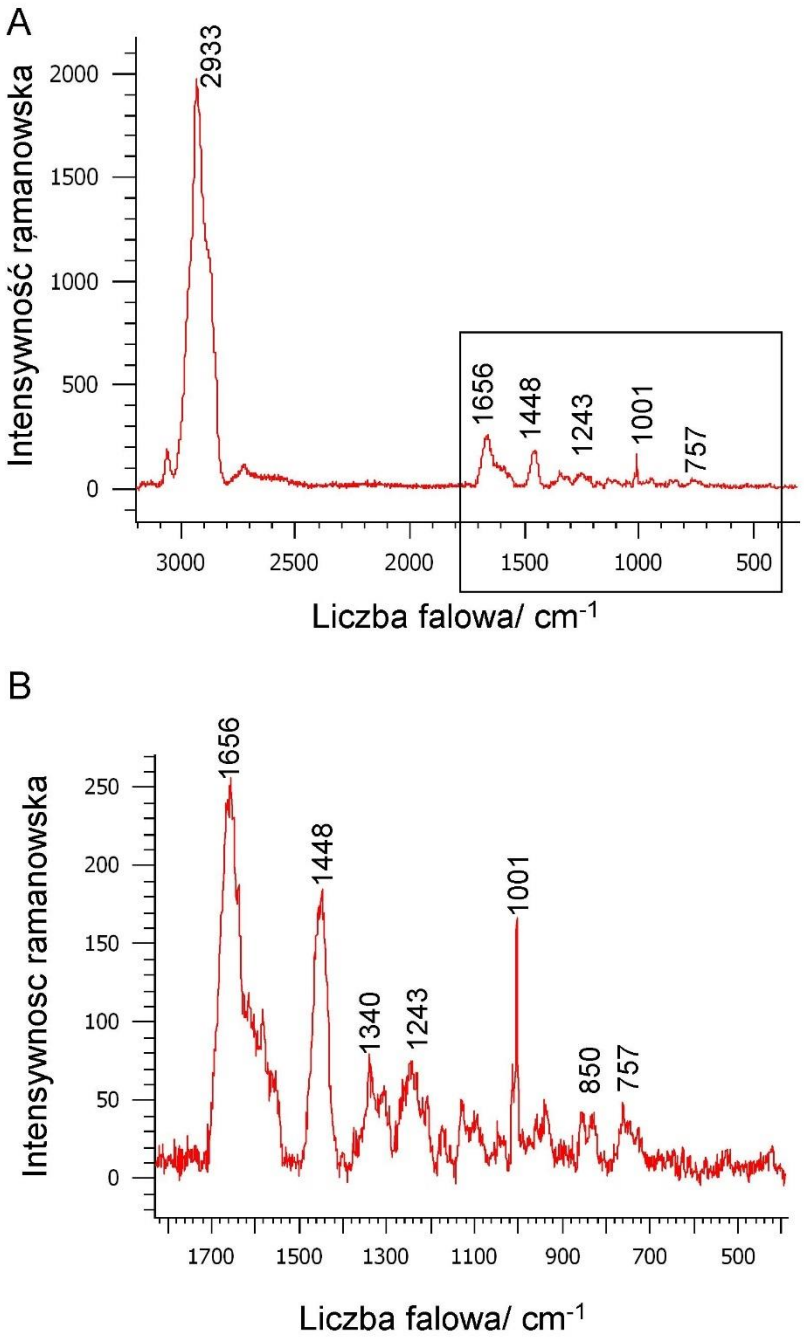


Rysunek 12. Limfocyt zdrowego ochotnika podczas wykonania pomiarów ramanowskich techniką mapowania komórki (na podstawie [70]).



Rysunek 13. Badanie kontrolne limfocytu u zdrowego ochotnika. Widmo ramanowskie odpowiada punktowi pomiarowemu zaznaczonemu na zaznaczonemu na Rys. 12, linia laserowa 514,5 nm (na podstawie [70]).

Wykonano widmo uśrednione wszystkich widm limfocytów zdrowych ochotników, którzy nie mieli kontaktu w wirusem EBV. Przedstawione zostało na Rys. 14.



Rysunek 14. Średnie widmo ramanowskie limfocytów zdrowych ochotników, (A) zakres spektralny 3200-300 cm^{-1}, (B) zakres spektralny 1800-400 cm^{-1}, linia laserowa 514,5 nm (na podstawie [75]).

Tabela 2 Najbardziej istotne pasma ramanowskie limfocytów ludzkich (na podstawie [70]).

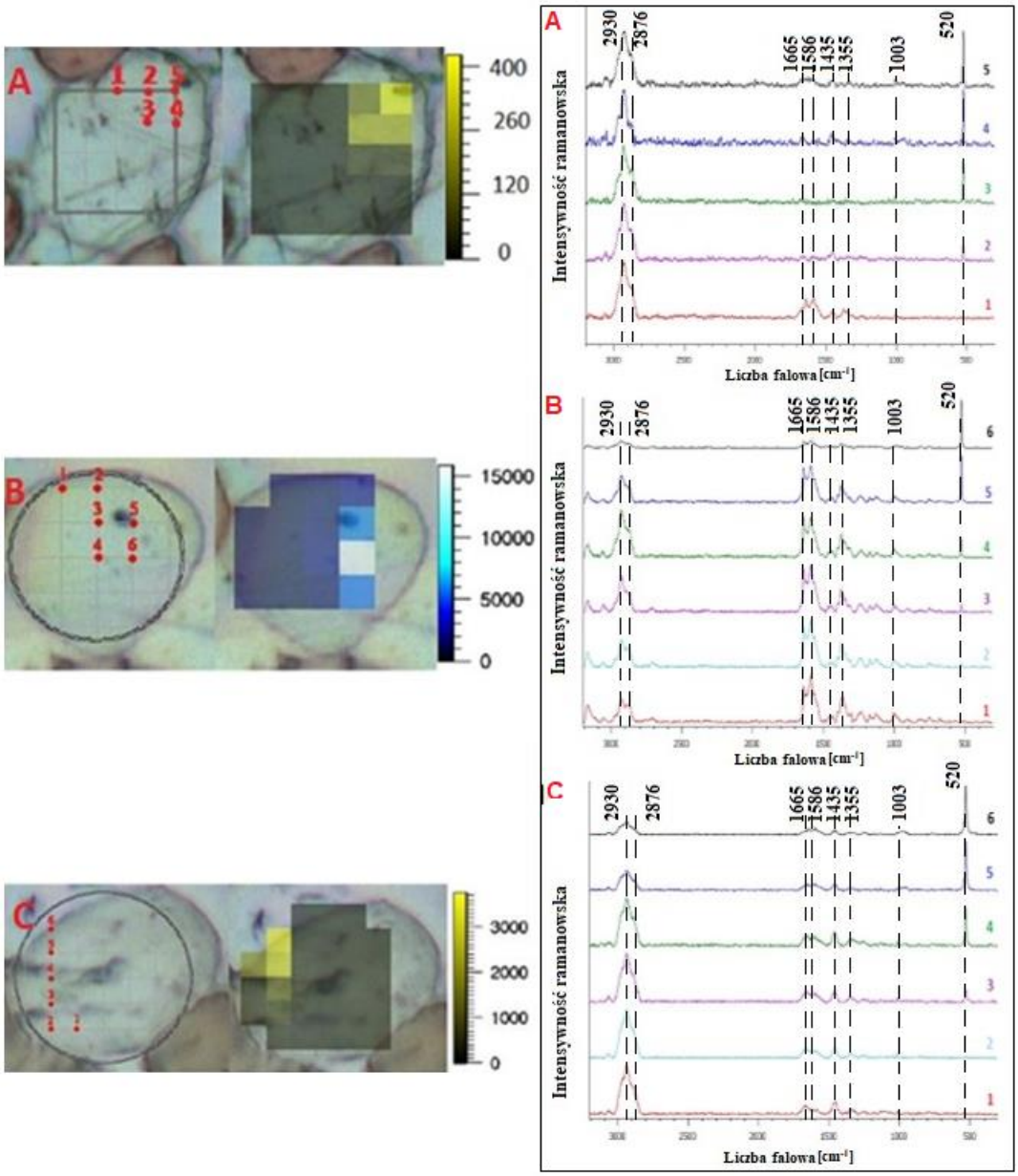
Liczba falowa [cm^{-1}]	Przypisanie pasm
2933	νCH sym CH_3 grupy metylowej
1656	amid I (konf-β)
1448	δCH_2 def., lipidy
1340	δCH_2 def., A (kwasy nukleinowe), proteiny
1243	A, amid III
1003	Phe
850	Pierścień Trp
757	Pierścień Trp
G- guanina, A- adenina, Trp- tryptofan, Phe- fenyloalanina	

4.5. Zmiany zachodzące w budowie limfocytu w przebiegu mononukleozy zakaźnej badane metodą spektroskopii ramanowskiej.

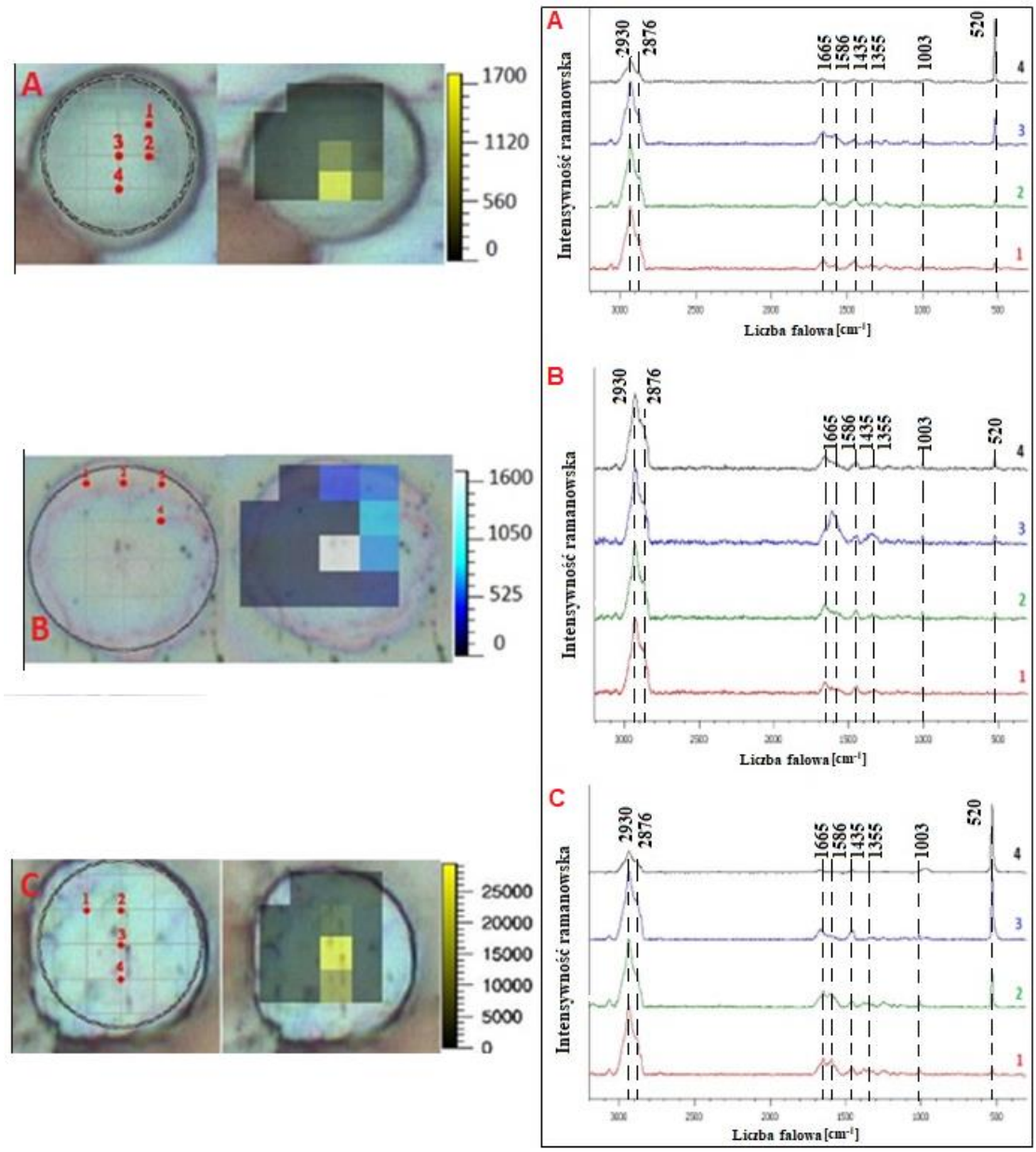
Pierwszym etapem analizy było porównanie zmian w limfocytach B u pacjentów ze zdiagnozowaną mononukleozą zakaźną z wynikami otrzymanymi dla zdrowych ochotników, który nigdy wcześniej nie chorowali na mononukleozę zakaźną.

Do badań wybrano trzech różnych pacjentów i monitorowano przebieg infekcji poprzez zmiany w limfocytach B.

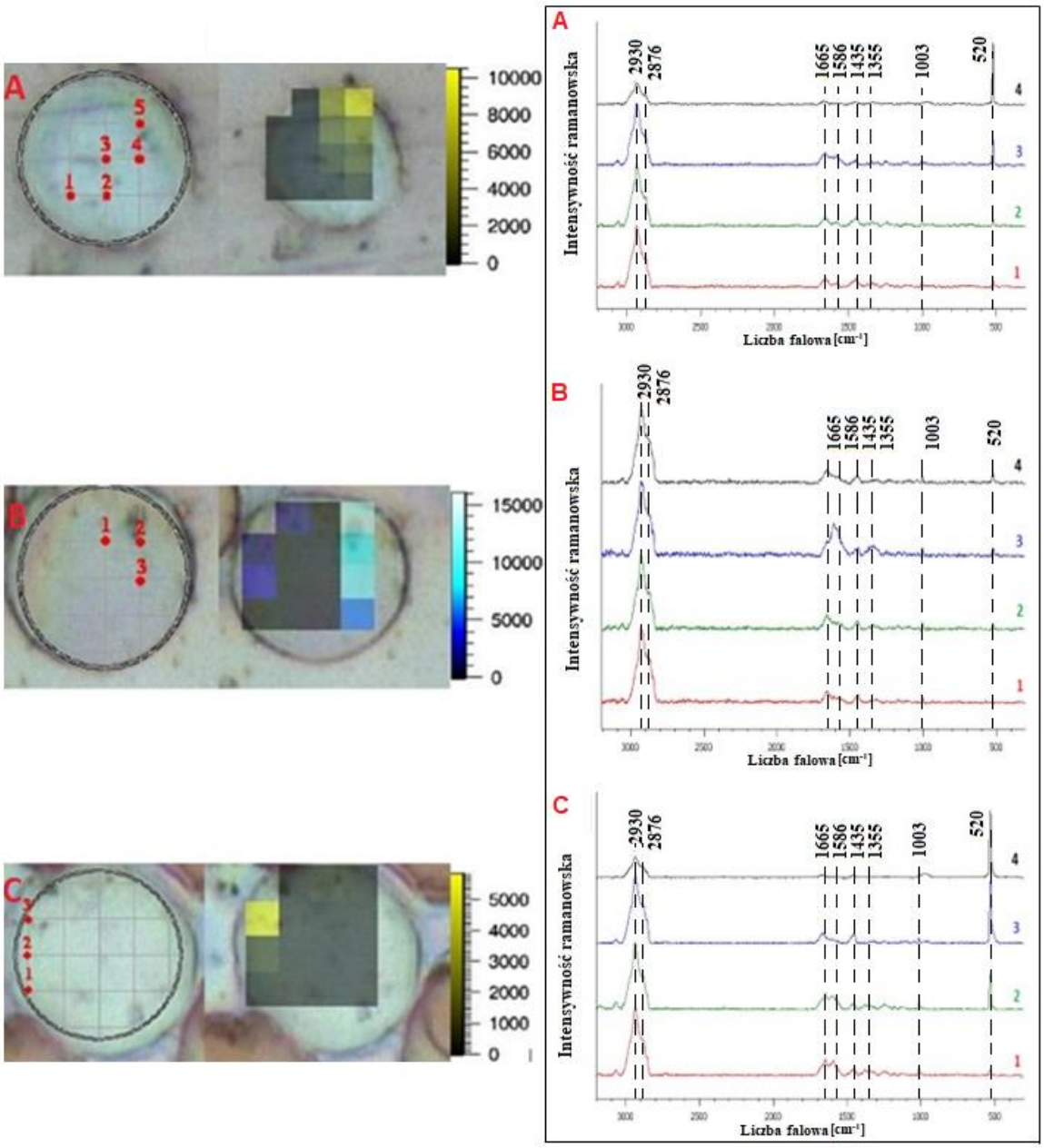
Przedstawiono uśrednione widma ramanowskie uzyskane w pomiarze mapowania komórek limfocytów B w kolejnych etapach hospitalizacji (doba pierwsza, trzecia i dziewiąta) (Rys. 15, 16 i 17), jako dystrybucję markerowego pasma immunoglobulin 520 cm^{-1} w komórce limfocytu B.



Rysunek 15. Zmiany w limfocytach w 1-szej dobie hospitalizacji u trzech pacjentów ze zdiagnozowaną mononukleozą zakaźną oznaczonych A, B i C oraz widma odpowiadające zaznaczonym punktom pomiarowym.



Rysunek 16. Zmiany w limfocytach w 3-ciej dobie hospitalizacji u trzech pacjentów ze zdiagnozowaną mononukleozą zakaźną zaznaczonych A, B i C oraz widma odpowiadające zaznaczonym punktom pomiarowym.



Rysunek 17. Zmiany w limfocytach w 9-tej dobie hospitalizacji u trzech pacjentów ze zdiagnozowaną mononukleozą zakaźną oznaczonych A, B i C oraz widma odpowiadające zaznaczonym punktom pomiarowym.

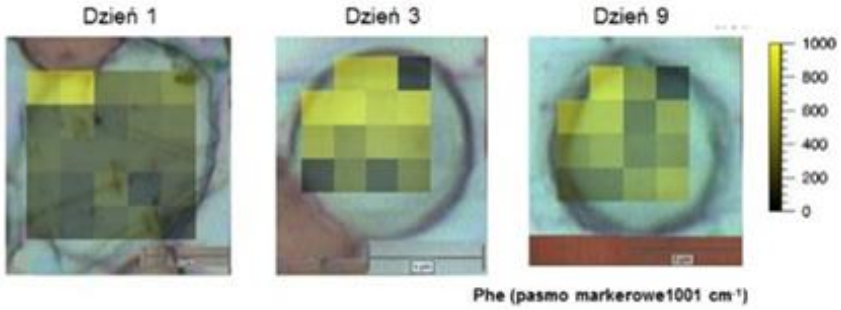
Pasmo które jest markerem immunoglobulin, reprezentuje drgania mostków disiarczkowych SS, wskazuje na aktywację limfocytów B [67, 68, 69, 70]. Największą jego intensywność, wskazującą na największą aktywację limfocytów B zaobserwowano w czwartej dobie hospitalizacji. Poniżej w Tabeli 3 przedstawiono przypisania pasm do odpowiednich liczb falowych.

Tabela 3 Najbardziej istotne pasma ramanowskie limfocytów w 1-szym, 3-cim i 9-tym dniu hospitalizacji, przy pozycji pasma zaznaczono jego intensywność w danym dniu (charakterystyka obserwowana dla prezentowanych pacjentów na Rys. 17, 18 i 19 zdiagnozowanych na mononukleozę zakaźną (na podstawie [70]).

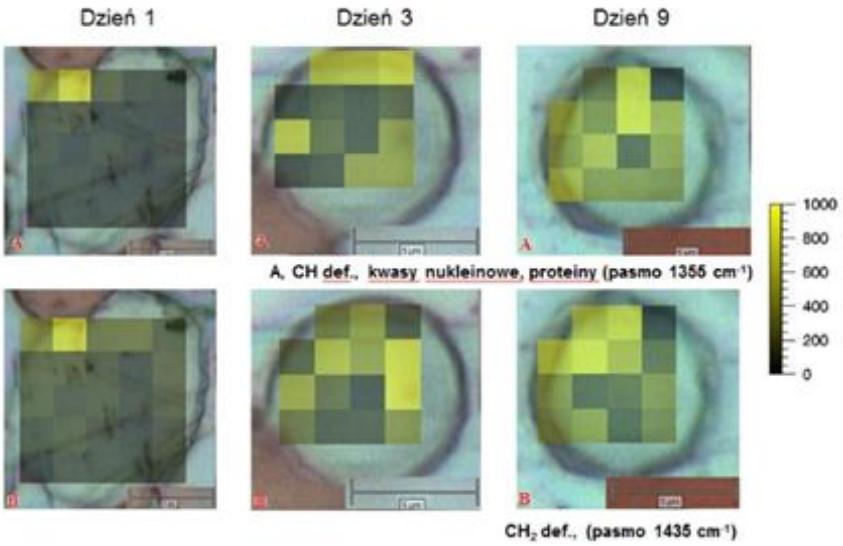
Liczba falowa [cm^{-1}]	**Przypisanie pasm**	**Liczba falowa [cm^{-1}]/ intensywność pasma**		
		1 dzień hospitalizacji	**3 dzień hospitalizacji**	**9 dzień hospitalizacji**
2930	νCH sym CH_3 grupy metylowej	2929/1000	2931/400	2930/1000
2876	νCH asym CH_2 grupy metylenowej	2875/650	2880/200	2881/520
1665	amid I (konf-β)	1665/112	1670/80	1665/200
1586	G, A, (kwasy nukleinowe); Trp,Phe	1585/105	1585/50	1590/100
1435	δCH_2 def., lipidy	1440/215	1455/40	1455/120
1355	δCH_2 def., A (kwasy nukleinowe), proteiny	1335/150	1355/39	1350/90
1003	Phe	1002/130	1001/50	1001/100
520	νSS, mostki disiarczkowe	521/300	521/1000	520/0
G- guanina, A- adenina, Trp- tryptofan, Phe- fenyloalanina				

W trakcie hospitalizacji z powodu mononukleozy zakaźnej u pacjentów obserwowano systematyczną ewolucję rozkładu poszczególnych makrocząsteczek składowych limfocytu B. Wzrost intensywności pasma charakteryzującego składniki jądra komórkowego (1355 cm^{-1}), pasma amidowego I (1665 cm^{-1}) charakterystycznego dla struktury drugorzędowej białek o konformacji β zanotowano dziewiątym dniu hospitalizacji. Zaobserwowano także zmniejszenie intensywności pasma markerowego immunoglobulin (520 cm^{-1}) co oznacza zmniejszenie sekrecji immunoglobulin (Tabela 3). Ich dystrybucję w komórce przedstawia Rys. 17. W trakcie zachorowania na mononukleozę zakaźną następuje aktywacja limfocytów B, a następnie zostaje zwiększona produkcja kwasów nukleinowych (1586 cm^{-1}), protein, oraz poszczególnych aminokwasów np. fenyloalaniny (1001 cm^{-1}). Po zakończeniu choroby i leczenia pacjenta składniki komórki limfocytów B wracają do wartości referencyjnych.

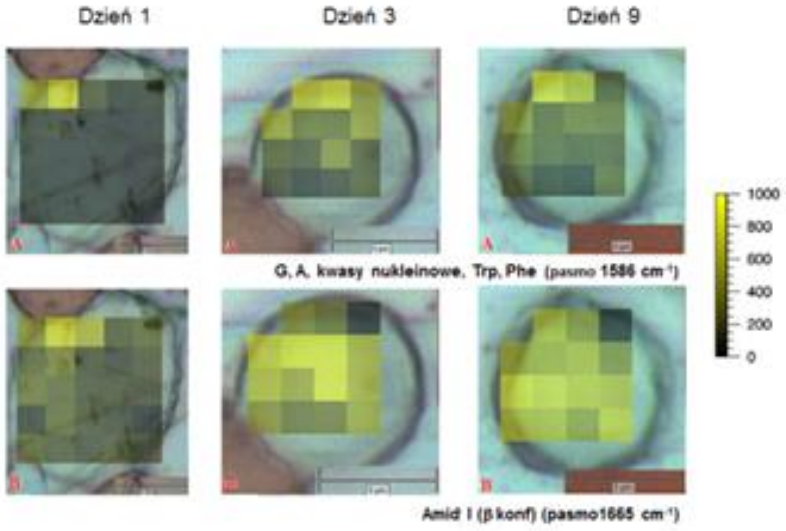
Poniżej na Rys. 18, 19, 20 i 21 przedstawiono rozkłady poszczególnych składników komórki limfocytu dla reprezentatywnego pacjenta w kolejnych dniach hospitalizacji: fenyloalaniny (pasmo markerowe 1001 cm^{-1}); kwasów nukleinowych (1355 cm^{-1}, 1586 cm^{-1}); białek (1435 cm^{-1}, 1655 cm^{-1}, 2930 cm^{-1}); grup metylenowych (2876 cm^{-1}).



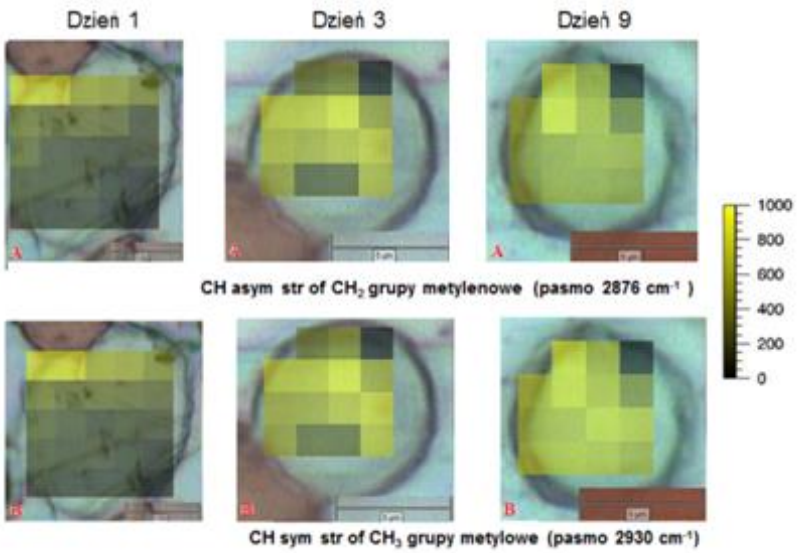
Rysunek 18. Dystrybucja Phe (pasmo markerowe 1001 cm^{-1}) w komórce limfocytu B (na podstawie [70]).



Rysunek 19. Dystrybucja w komórce limfocytu B: A) kwasów nukleinowych (pasmo markerowe 1355 cm^{-1}), B) białek (pasmo markerowe δCH_2, 1435 cm^{-1}) (na podstawie [70]).



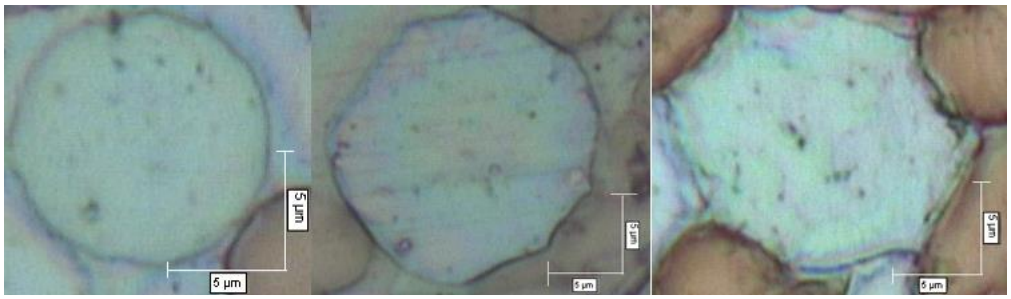
Rysunek 20. Dystrybucja w komórce limfocytu B: A) G, A (kwasów nukleinowych) oraz Trp i Phe (pasmo markerowe 1586 cm^{-1}), B) białek (pasmo markerowe amidu I charakteryzujące konformację β, 1665 cm^{-1}) (na podstawie [70]).



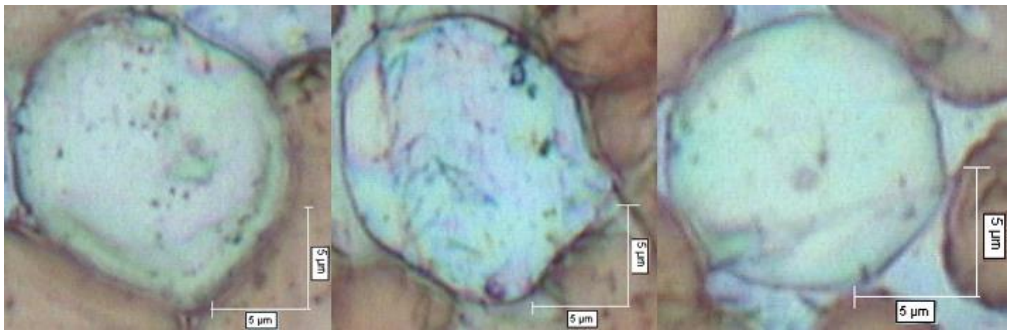
Rysunek 21. Dystrybucja: A) grup metylenowych (pasmo markerowe νCH_2, pozycja 2876 cm^{-1}), B) białek ((pasmo markerowe νCH_3, pozycja 2930 cm^{-1}) w komórce limfocytu B (na podstawie (na podstawie [70]).

U pacjentów z diagnozą mononukleozy zakaźnej, oprócz aktywacji limfocytów B zaobserwowano zmiany w wielkości i kształcie komórek limfocytów B. W początkowym stadium choroby limfocyty B posiadały nieregularne kształty, znacznie się powiększyły (nawet do 140 μm – czyli 5,5 razy większe w porównaniu do zdrowych komórek, Rys. 22). Wszystkie te zmiany świadczyły o kontakcie organizmu z wirusem EBV i różnicowaniu się limfocytów B w komórki plazmatyczne. Po chorobie limfocyty wracały do odpowiednich dla zdrowych pacjentów kształtów i wielkości 6-15 μm [70].

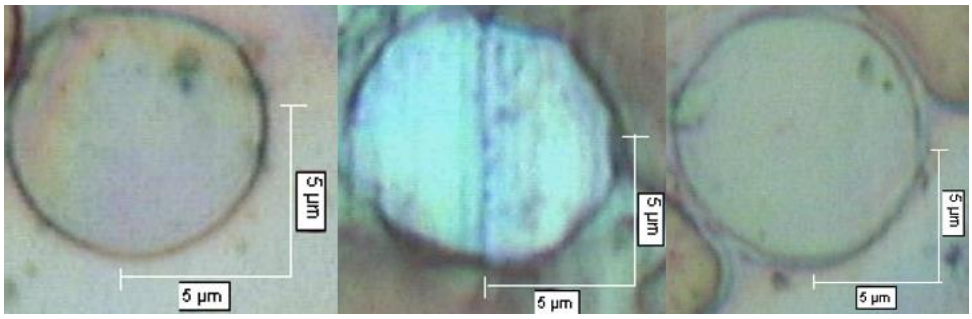
Poniżej przedstawiono przykładowe mikrofotografie limfocytów pacjentów ze zdiagnozowaną mononukleozą zakaźną wykonane w przebiegu choroby za pomocą mikroskopu optycznego Leica.



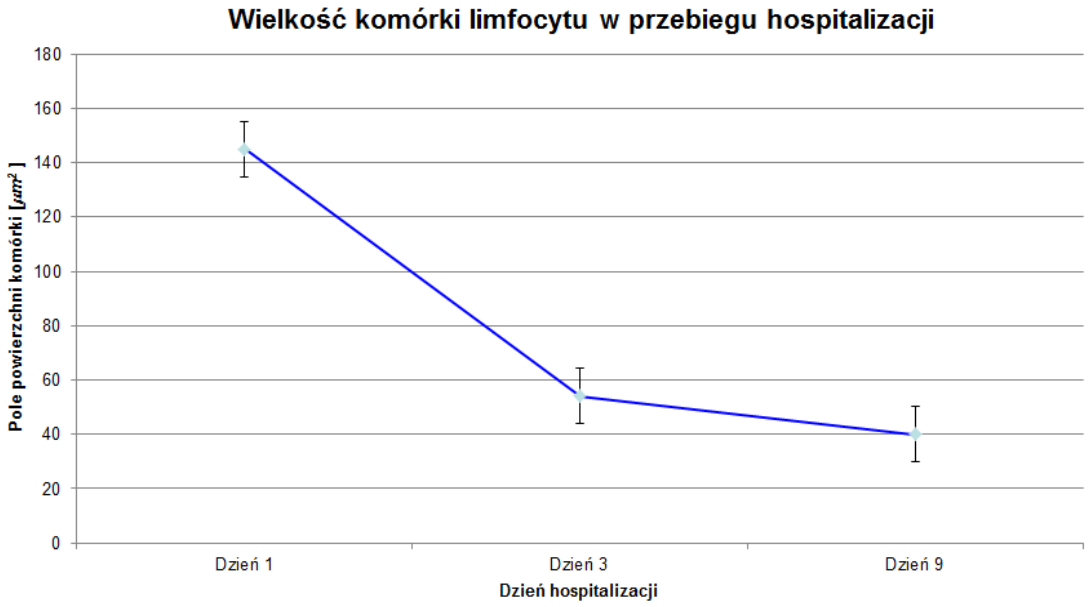
Rysunek 22. Mikrofotografie limfocytów pacjentów w zakażeniu wirusem EBV pierwszego dnia hospitalizacji (obiektyw o powiększeniu 100x).



Rysunek 23. Mikrofotografie limfocytów pacjentów w zakażeniu wirusem EBV trzeciego dnia hospitalizacji (obiektyw o powiększeniu 100x).

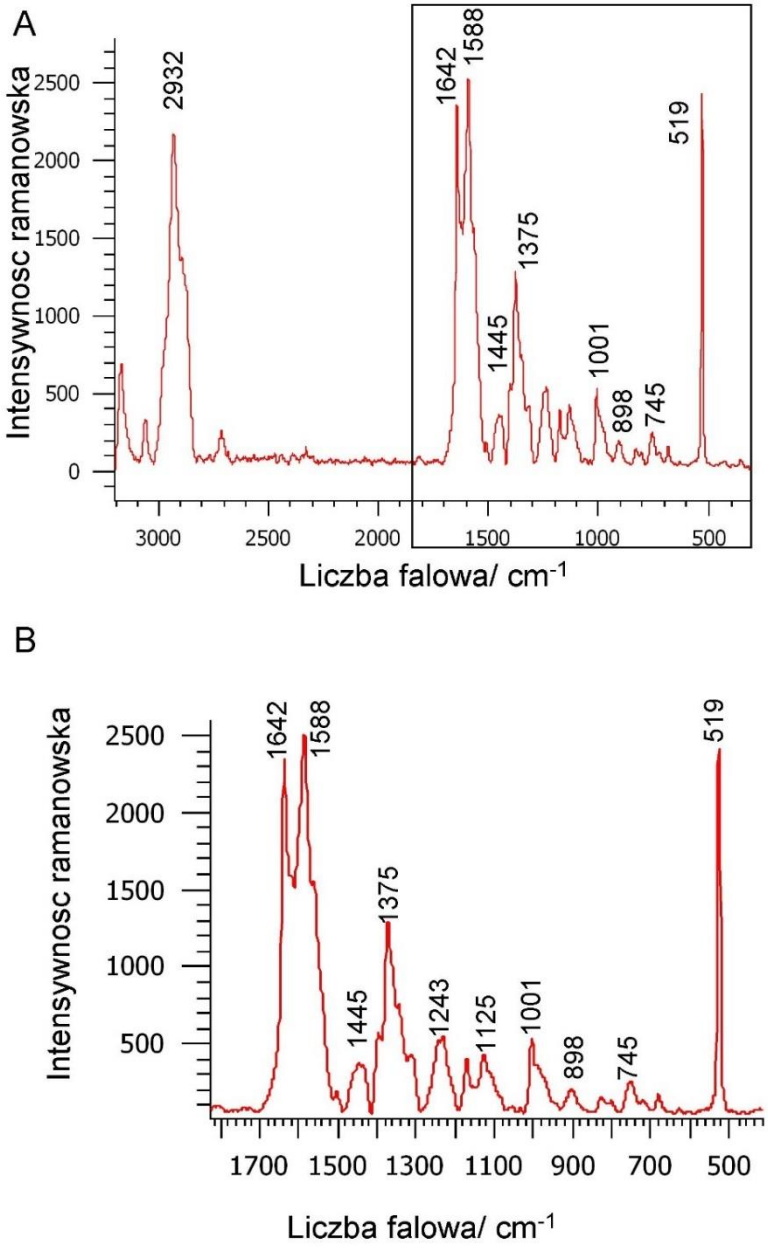


Rysunek 24. Mikrofotografie limfocytów pacjentów w zakażeniu wirusem EBV dwunastego dnia hospitalizacji (obiektyw o powiększeniu 100x).



Rysunek 25. Wielkość komórki limfocytu (średnia) w przebiegu hospitalizacji (na podstawie [70]).

Średnie widmo ramanowskie z aktywowanego obszaru komórek B reprezentatywnego pacjenta w pierwszym dniu hospitalizacji z powodu mononukleozy zakaźnej przedstawia Rys. 26.



Rysunek 26. Średnie widmo ramanowskie z aktywowanego regionu komórek B reprezentatywnego pacjenta w pierwszym dniu hospitalizacji z powodu mononukleozy zakaźnej, (A) zakres widmowy 3200-300 cm^{-1}, (B) zakres widmowy 1800-300 cm^{-1}, linia lasera 514,5 nm.

Tabela 4 Najbardziej istotne pasma ramanowskie aktywowanych limfocytów ludzkich w 1-szym dniu hospitalizacji (na podstawie [70]).

Liczba falowa [cm^{-1}]	**Przypisanie pasm**
2932	νCH sym CH_3 grupy metylowej
1642	amid I (konf-α)
1588	G, A, (kwasy nukleinowe); Trp,Phe
1445	δCH_2 def., lipidy
1375	δCH_2 def., A (kwasy nukleinowe), proteiny
1243	A, amid III
1125	νC-N
1001	Phe
898	Pierścień C-O-C
745	Pierścień Trp
519	νSS, mostki disiarczkowe
G- guanina, A- adenina, Trp- tryptofan, Phe- fenyloalanina	

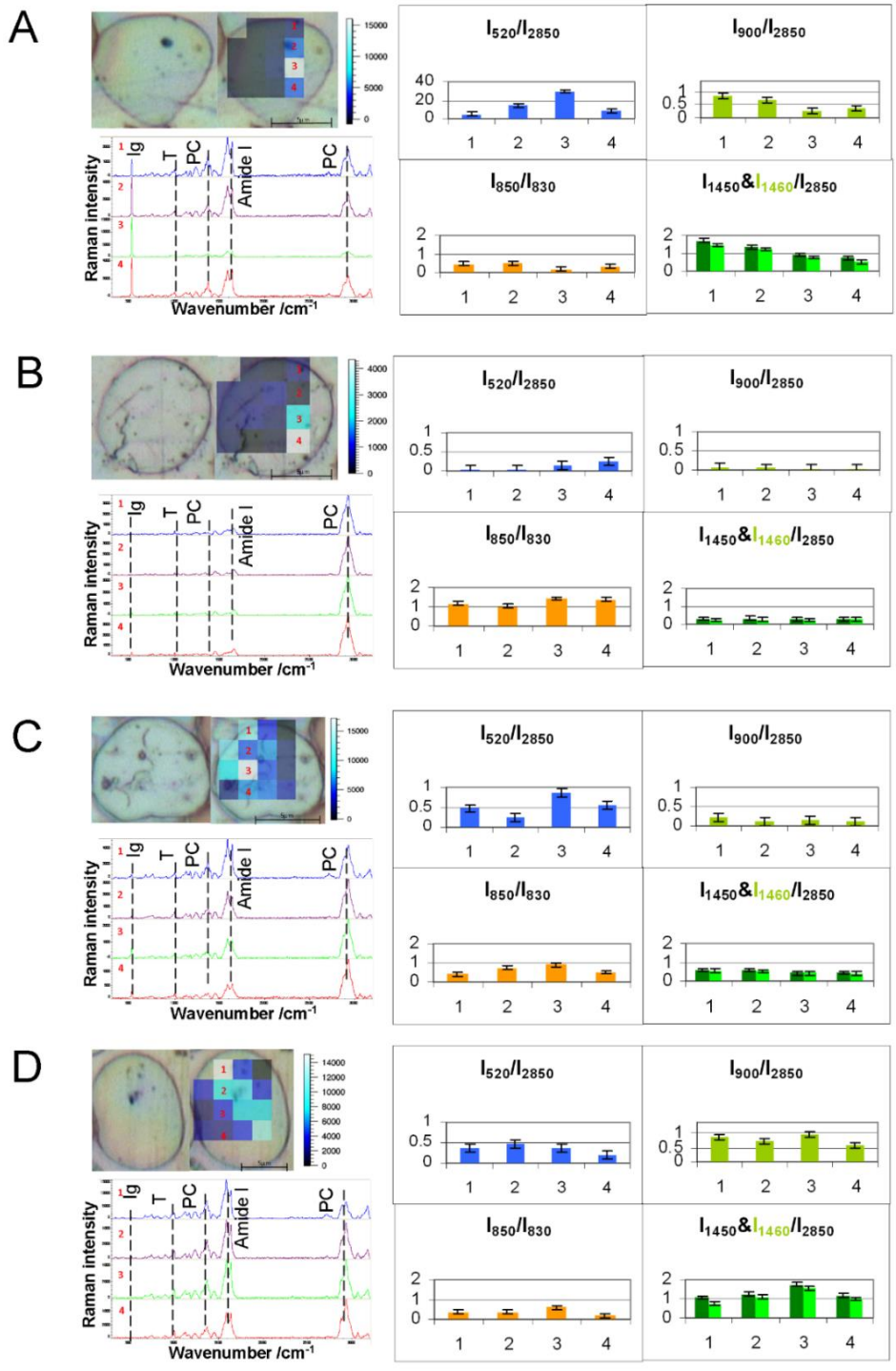
.

Rys. 27 przedstawia otrzymane widma Ramana dla wybranych punktów w komórkach limfocytów w 4-tym, 7-ym, 12-tym i 27-ym dniu hospitalizacji, dla reprezentatywnych pacjentów w ostrej fazie mononukleozy zakaźnej. Podczas pomiarów ramanowskich laser pobudza pojedynczą komórkę limfocytu B, powodując tym samym pobudzenie makrocząsteczek budujących limfocyt. W ten sposób widmo wyraźnie ilustruje materiał biologiczny i zmiany związane z jego funkcją. Warto zwrócić uwagę, że pasmo markerowe immunoglobuliny w pozycji 520 cm^{-1}, które ulega spektakularnym zmianom podczas aktywacji komórek. Przedstawione mapy intensywności dla tego pasma markerowego obrazują dynamikę jego zmian (Rys. 27) [68]. Limfocyty B transformowane przez EBV wydzielają immunoglobuliny [76, 77]. W przypadku grupy referencyjnej, zdrowych ochotników, którzy nigdy wcześniej nie chorowali na mononukleozę zakaźną pasmo 520 cm^{-1} miało niewielką intensywność (Rys. 14) [67]. Inne ważne pasma ramanowskie obserwowane w widmach limfocytów B różniące się położeniem lub intensywnością

aktywowanych limfocytów w mononukleozie zakaźnej i u zdrowych ochotników przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Porównanie głównych pasm ramanowskich [cm^{-1}] limfocytów pacjentów z rozpoznaną mononukleozą (Rys. 26) zakaźną oraz zdrowych ochotników (Rys. 14) (linia lasera 514,5 nm).

Pasma ramanowskie [cm^{-1}]		
Chorzy	Zdrowi	
2932	2933	υCH sym rozc. CH_3 grupy metylowej
2876	2881	υCH asym rozc. CH_3 grupy metylenowej
1665	-	amid I (konf.- β)
	1656	amid I (konf - α)
1642		T
1588	1584	G, A, kwasy nukleinowe; δNH_2, Gln, Trp, Phe
1567	-	Glu
-	1448	G, A, kwasy nukleinowe, Phe, CH_2 def., lipidy
1375		A, CH_2 def., lipidy, PC
-	1336	Trp, CH def., retikulum endoplazmatyczne
-	1308	A, CH_2 def., lipidy
1238	1243	Tyr, amid III
	1173	Tyr, Ser
1169	-	G
1125	-	Asp, Glu; υCC, str., PE
1000	1001	Phe
898		A
822	850, 830	Tyr
-	757	Trp
745	-	Pierścień T, kwasy nukleinowe, Trp
675	-	T, G, υCS
520	-	υSS mostki disiarczkowe
Asp- kwas asparaginowy, Gln-glutamin, Phe –fenyloalanina, Trp- tryptofan, Tyr- tyrozyna, G- guanina; A- adenina, T- tymina, U- uracyl,		



Rysunek 27. Rozkład immunoglobulin ze względu na intensywność pasma markerowego 520 cm^{-1} i wybrane widma dla reprezentatywnego pacjenta z ostrą mononukleozą zakaźną w dniu (A) 4-tym, (B) 7-ym, (C) 12-ym i (D) 27-ym hospitalizacji; numer widma oznacza punkt pomiarowy. Dla każdego z dni pomiarowych przedstawiono również stosunki intensywności I_{520}/I_{2850}, I_{850}/I_{830}, I_{900}/I_{2850} oraz I_{1450}/I_{2850}.

Zachowanie limfocytów B jest w dużym stopniu stymulowane i kontrolowane przez receptory, jednak aktywacja receptorów BCR (*ang. B-cell receptor*) wymaga wielu etapów, w tym kinaz tyrozynowych jako komórkowych elementów regulujących, pośredniczących w regulacji większości dróg przenoszenia sygnału zewnątrzkomórkowego [77, 93, 94]. Fosforylacja tyrozyny jest jednym z najwcześniejszych zdarzeń następujących po aktywacji BCR [93]. W nieaktywowanych limfocytach dublet pasm markerowych Tyr o porównywalnej intensywności pojawia się w pozycji około 850 cm^{-1} i 830 cm^{-1} (Rys, 14). Pasma te są wynikiem rezonansu Fermiego pomiędzy drganiami pierścienia benzenowego a nadtonem drgań zginających poza płaszczyzną atomów tego pierścienia w pozycji *para* [95]. W aktywowanych limfocytach intensywność tych pasm zmienia się (Rys. 26). W 4. dobie hospitalizacji nasila się intensywność pasma około 830 cm^{-1}. Cecha ta wskazuje, że reszta Tyr (związana z kompleksem BCR na powierzchni komórki) bierze udział w procesie fosforylacji Tyr [71]. Wzrost średniego stosunku intensywności pasma 830 cm^{-1} do pasma 850 cm^{-1} w 4 dobie hospitalizacji oznacza spadek intensywności stosunku I_{850}/I_{830} pokazany na Rys. 27A, oraz oznacza zainicjowanie sygnału BCR i aktywację limfocytów B [20].

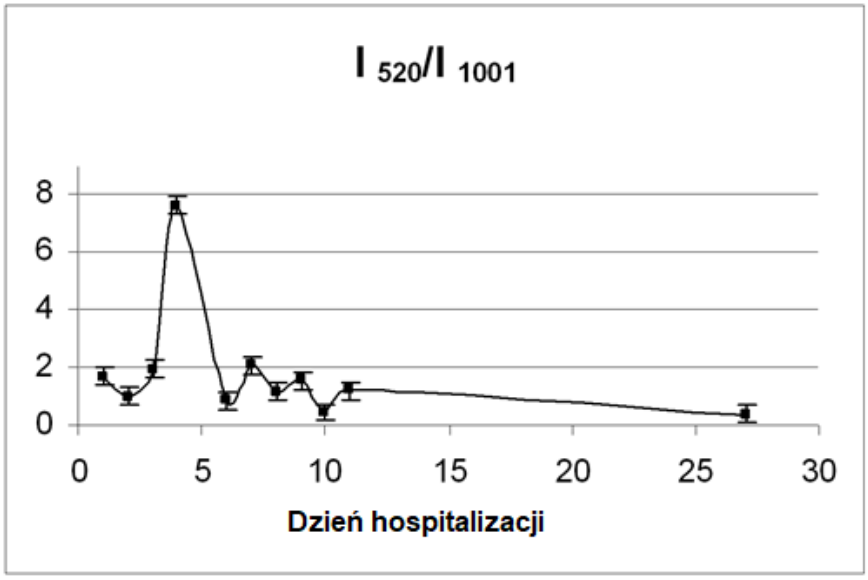
Analizowano również pasmo 900 cm^{-1} jako marker obecności białka błonowego fazy latentnej, LMP2A (i 2B), wirusa EBV. Wzrost intensywności sygnału związanego z proliferacją białek i równoczesny, mniej intensywny sygnał obecność immunoglobulin może wskazywać na przyczynę, która jest powstawanie latentnego białka błonowego 2A i 2B (LMP), białka wirusowego EBV w limfocytach B. [93]. Specyficzne cechy LMP2A obejmują zmianę typowej transdukcji sygnału BCR w komórkach limfocytów B poprzez obniżenie fosforylacji tyrozyny(Rys. 27 B). LMP2A wpływa na apoptozę poprzez jej zakłócanie i dysregulację sygnałów apoptozy [96]. Charakterystyczna domena LMP2A, zawierająca reszty aminokwasowe Pro-Tyr (może być monitorowana stosunkiem ramanowskich pasm markerowych Pro I_{900}/I_{2850}), charakteryzowała się bardzo niskimi wartościami w 7-mym i 12-tym dniu hospitalizacji (Rys. 27B i C). Wydaje się to oznaczać, że wtedy dochodzi do zakłócenia przekazywania sygnału BCR [96].

Spektroskopia ramanowska pozwala analizować wiązania disiarczkowe, które są ważnymi wiązaniami wpływającymi na konformację i stabilność białek. Pasmo SS obserwowane przy liczbie falowej 520 cm^{-1} w widmach ramanowskich pacjentów z rozpoznaną mononukleozą zakaźną wskazuje na obecność rotameru gauche-gauche-trans (g-g-t) immunoglobuliny w domenie zmiennej (VL) [78, 79] . To przypisanie jest zgodne z obecnością pasma CS położone przy liczbie falowej 675 cm^{-1}. Można zwrócić uwagę na

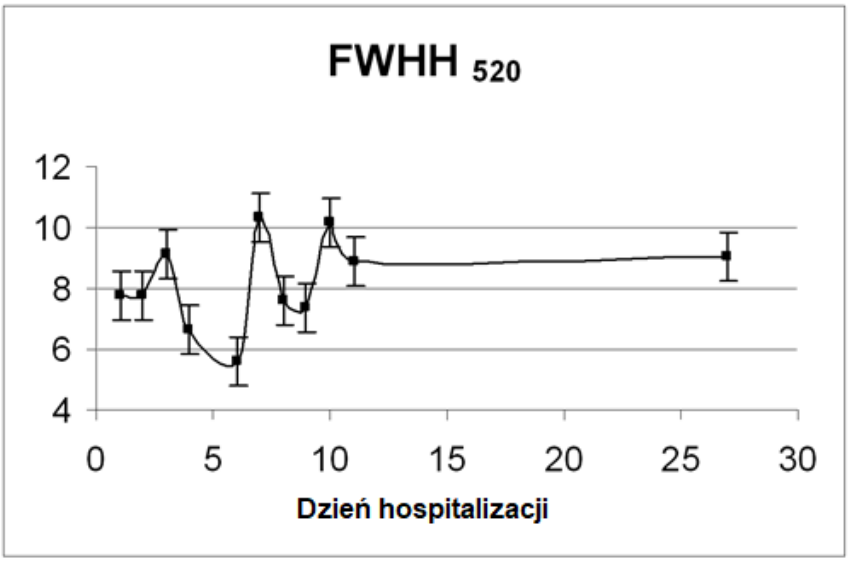
stosunek intensywności pasma 520 cm^{-1} do pasma 2850 cm^{-1}, który był najwyższy w czwartej dobie hospitalizacji (równy prawie 30) u reprezentatywnych pacjentów (Rys. 27A). Średni stosunek intensywności pasma 520 cm^{-1} do intensywności pasma 2850 cm^{-1}, obliczony dla wszystkich zmierzonych krwinek aktywowanych w 4-ym, 7-ym, 12-ym i 27-ym dniu choroby wyniósł, licząc średnią z czterech zaznaczonych zmierzonych punktów, prawie 14,0; 0,1 odpowiednio 0,5 i 0,3 (Rys. 27). Wskazuje to na zmniejszenie wydzielania immunoglobulin w przebiegu choroby.

Zależność ta jest również dobrze widoczna i potwierdzona także w innej uśrednionej wartości stosunku I_{520}/I_{1001} obliczonej dla wszystkich pacjentów w grupie badawczej i wszystkich aktywowanych komórek limfocytów B (Rys. 28).

Najwyższą intensywność pasma markerowego odnotowano w czwartym dniu hospitalizacji (Rys. 28). W tym czasie zaobserwowano również najmniejszą szerokość połówkową (Rys. 29).



Rysunek 28. Intensywność pasma 520 cm^{-1} określona względem pasma Phe 1001 cm^{-1}, I_{520}/I_{1001}, obliczona jako średnia wszystkich widm krwinek wszystkich pacjentów zmierzonych podczas ich hospitalizacji (na podstawie [75]).

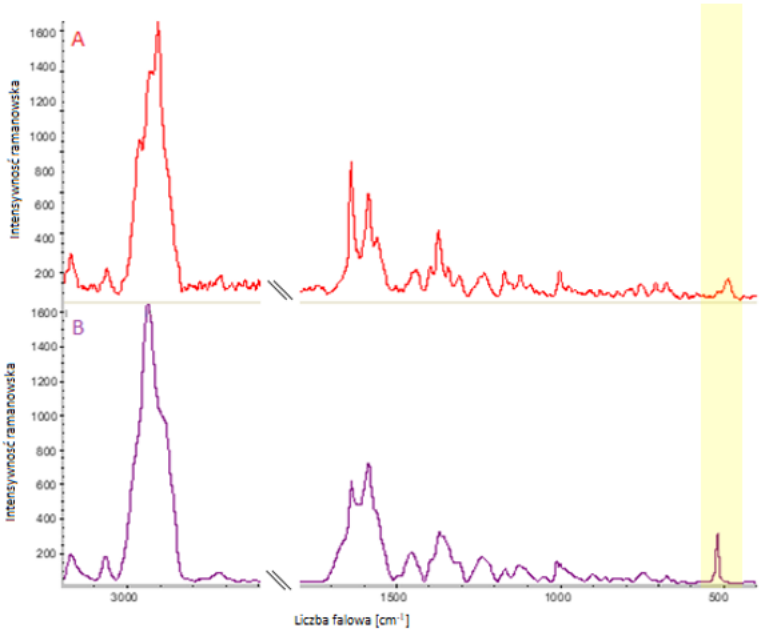


Rysunek 29. FWHH (ang. full width at half maximum, szerokość połówkowa) pasma 520 cm^{-1}, uzyskana jako średnia wszystkich widm krwinek wszystkich pacjentów zmierzonych podczas ich hospitalizacji (na podstawie [75]).

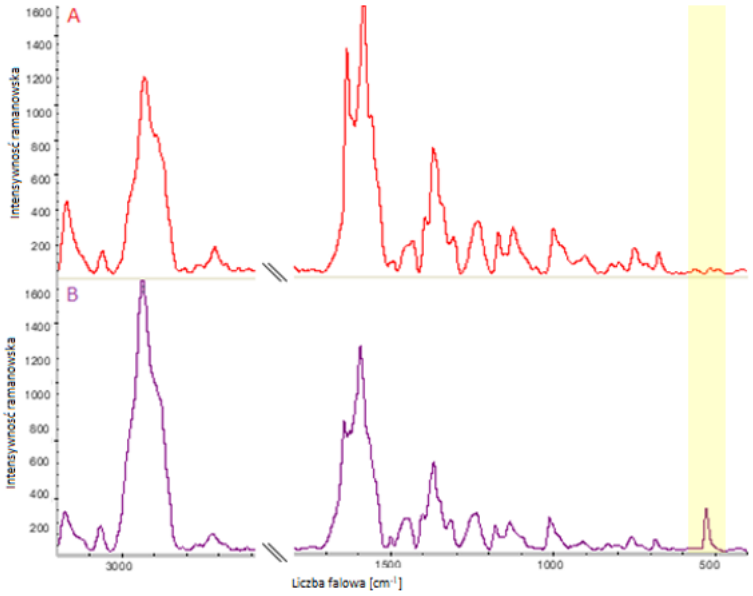
Te wyniki wskazują, że czwartej dobie hospitalizacji pojawia się jedna dominująca konformacja charakteryzująca wiązanie immunoglobulin SS, która jest przyjmowana przez aktywowane limfocyty i intensywność pasma jest wzmacniana dzięki zwiększonemu wydzielaniu IgG przez aktywowane limfocyty [67]. Tak wyraźnego efektu nie obserwowano w kolejnych dniach, chociaż maksimum zaobserwowano przy 520 cm^{-1} z mniejszą intensywnością (Rys. 27B, C, D oraz Rys. 28). Może to oznaczać pewne zaburzenia proliferacyjne limfocytów B spowodowane zakażeniem wirusem EBV [80].

Test metody separacji komórek limfocytów przy użyciu technologii MACSxpress®.

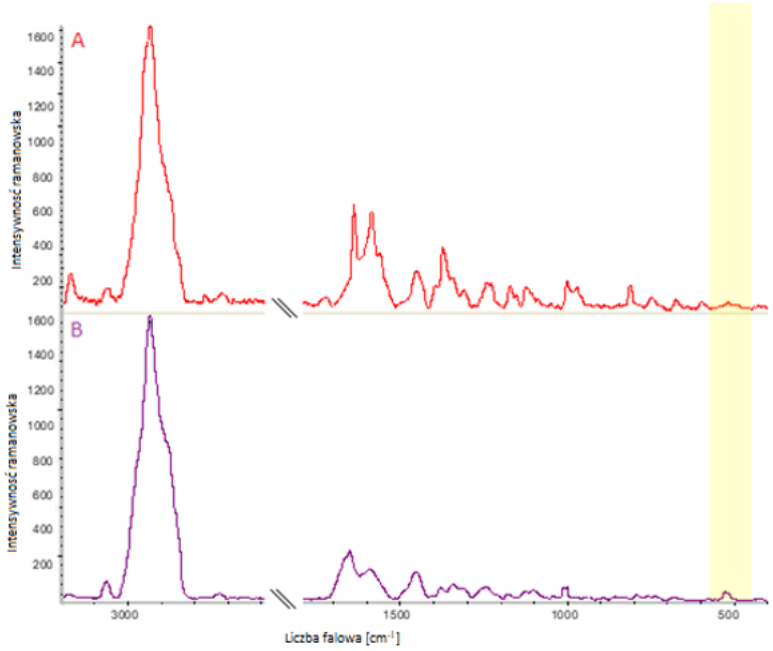
Poniżej, na Rys. 30, 31, 32, 33 przedstawiono porównanie widm otrzymanych w kolejnych dniach choroby z wykorzystaniem metody separacji komórek MACSxpress® i także bez zastosowania tej nowoczesnej technologii.
Do badań wykorzystano próbki krwi pięciu chorych pacjentów na mononukleozę zakaźną. Pomiary spektroskopowe wykonywano od pierwszego dnia hospitalizacji do 10 dnia hospitalizacji.
Wszystkie przestawione dane zebrano i wykonano uśrednienie dla każdego dnia z użyciem metody MACSxpress® i bez jej użycia.



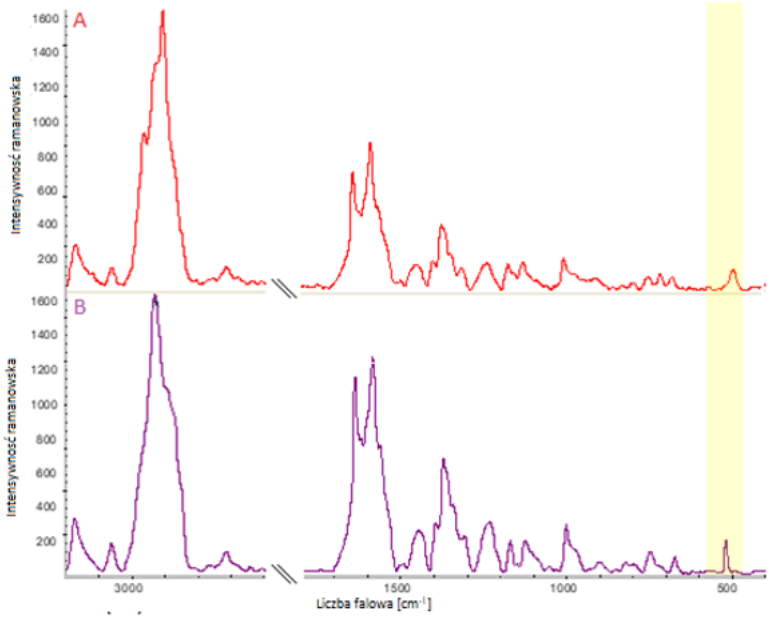
Rysunek 30. Widma spektroskopowe pierwszego dnia hospitalizacji (A) krew po izolacji za pomocą metody MACSxpress®; (B) krew bez użycia metody MACSxpress®.



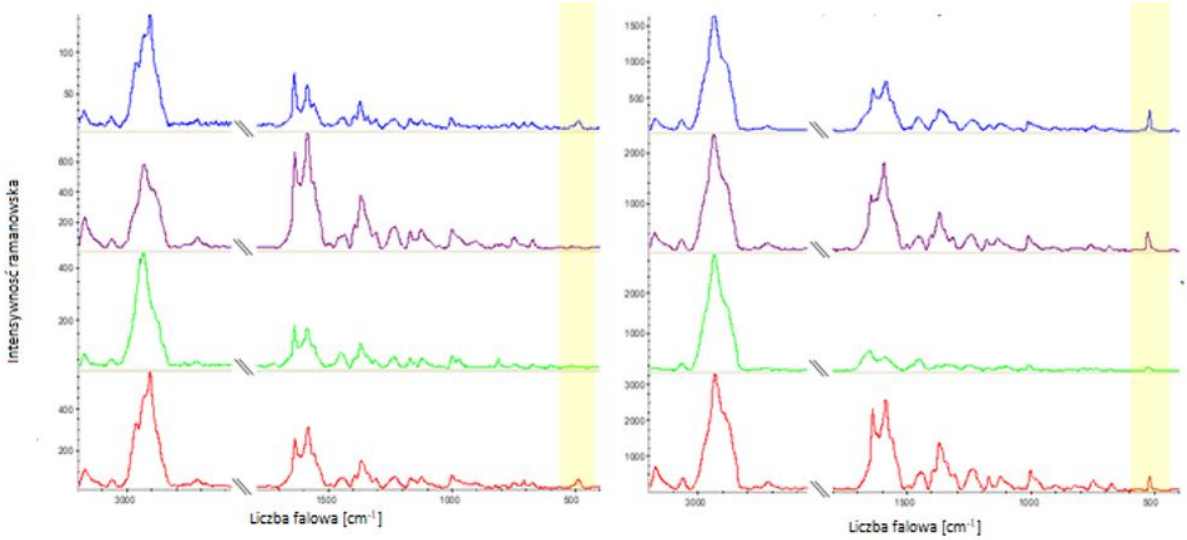
Rysunek 31. Widma spektroskopowe trzeciego dnia hospitalizacji (A) krew po izolacji za pomocą metody MACSxpress®; (B) krew bez użycia metody MACSxpress®.



Rysunek 32. Widma spektroskopowe szóstego dnia hospitalizacji (A) krew po izolacji za pomocą metody MACSxpress®; (B) krew bez użycia metody MACSxpress®.



Rysunek 33. Widma spektroskopowe dziesiątego dnia hospitalizacji (A) krew po izolacji za pomocą metody MACSxpress®; (B) krew bez użycia metody MACSxpress®.



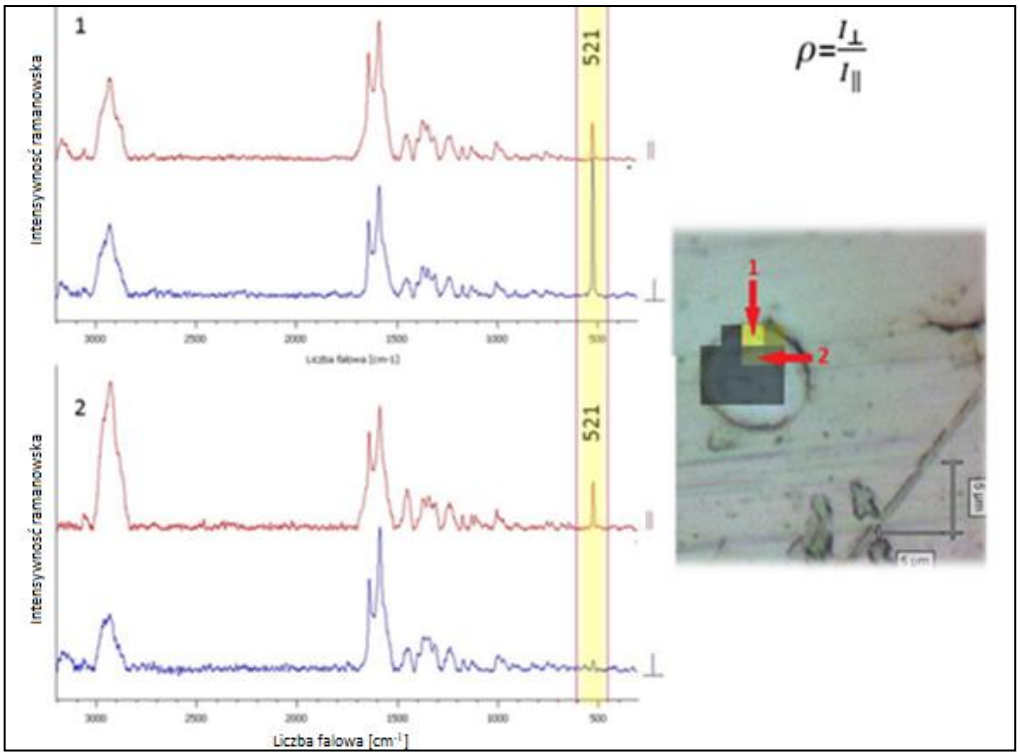
Rysunek 34. Widma spektroskopowe ze wszystkich dni. Po lewej przy użyciu metody MACSxpress®, a po prawej bez użycia metody MACSxpress.

Porównując powyższe widma można stwierdzić, iż metoda MACSxpress® nie do końca jest satysfakcjonująca podczas poszukiwania aktywowanych limfocytów. Widać wyraźne zmniejszenie intensywności pasma 520 cm^{-1}, które świadczy o aktywowaniu komórki przy kontakcie z wirusem. Dodatkowo porównując wszystkie wyniki z każdego dnia w czasie hospitalizacji niosą informację o zmniejszeniu intensywności wszystkich pasm znajdujących się w widmie przy użyciu metody MACSxpress®. Zauważyć można również przesunięcie pasma markerowego immunoglobulin 520 cm^{-1} w stronę niższych liczb falowych. Metoda MACSxpress®, pozwala na separowanie komórek limfocytów B, które jest łatwiej odnaleźć i oglądać pod mikroskopem, natomiast podczas wykazania różnicy w aktywacji lub budowie metodą spektroskopii ramanowskiej nie jest satysfakcjonująca metodą. Prawdopodobnie bufor i zestaw do znakowania magnetycznego, użyty podczas separowania, dezaktywuje lub zmienia komórki docelowe wiążąc się z immunoglobulinami i prowadząc do zmniejszenia intensywności pasm, powoduje również ich nieznaczne przesunięcia. Znakowanie limfocytów ma wpływ na badania. Blokowanie paratopów może utrudniać wykonanie badań. Podsumowując, metoda MACSxpress wymaga dłuższego czasu przygotowania i może nie dostarczyć w pełni zadowalających efektów.

Warto ponownie podkreślić możliwości spektroskopii ramanowskiej, która monitorując w pomiarze mapowania specyficzną odpowiedź immunologiczną limfocytów B, którą jest produkcja immunoglobulin, spektroskopowo barwi komórki [77].

4.6. Badanie polaryzowalności limfocytów w ostrej fazie mononukleozy zakaźnej

Dla badanych komórek przeprowadzono pomiary polaryzacyjne (Rys. 35). Wykonano pomiary promieniowania rozproszonego w kierunku równoległym i prostopadłym względem polaryzacji światła lasera wzbudzającego. Pomiary wykonano dla limfocytów B pacjentów ze zdiagnozowaną mononukleozą zakaźną, u których podczas pomiaru metodą mapowania komórki zauważono duże intensywności pasma markerowego immunoglobulin 521cm^{-1} świadczące o sporej aktywacji limfocytu. Analizowano stopień depolaryzacji pasma 521 cm^{-1}, markera immunoglobulin.



Rysunek 35. Widma ramanowskie w równoległej i prostopadłej polaryzacji w punktach 1 i 2 [68].

Obliczono stopień depolaryzacji dla pasma 520 cm^{-1} ze wzoru:

$$\rho = \frac{I_{\perp}}{I_{\parallel}}$$

gdzie:

ρ- stopień depolaryzacji

$I_{\perp}$ - intensywność promieniowania rozproszonego w kierunku prostopadłym w stosunku do polaryzacji światła lasera

$I_{\parallel}$ - intensywność promieniowania rozproszonego w kierunku równoległym w stosunku do polaryzacji światła lasera

Stopień depolaryzacji jest konsekwencją anizotropii optycznej badanej próbki. Drgania, które zachowują symetrię molekuły i posiadają niezerowe elementy diagonalne tensora polaryzowalności to drgania w pełni symetryczne. Oscylacje takie charakteryzują się

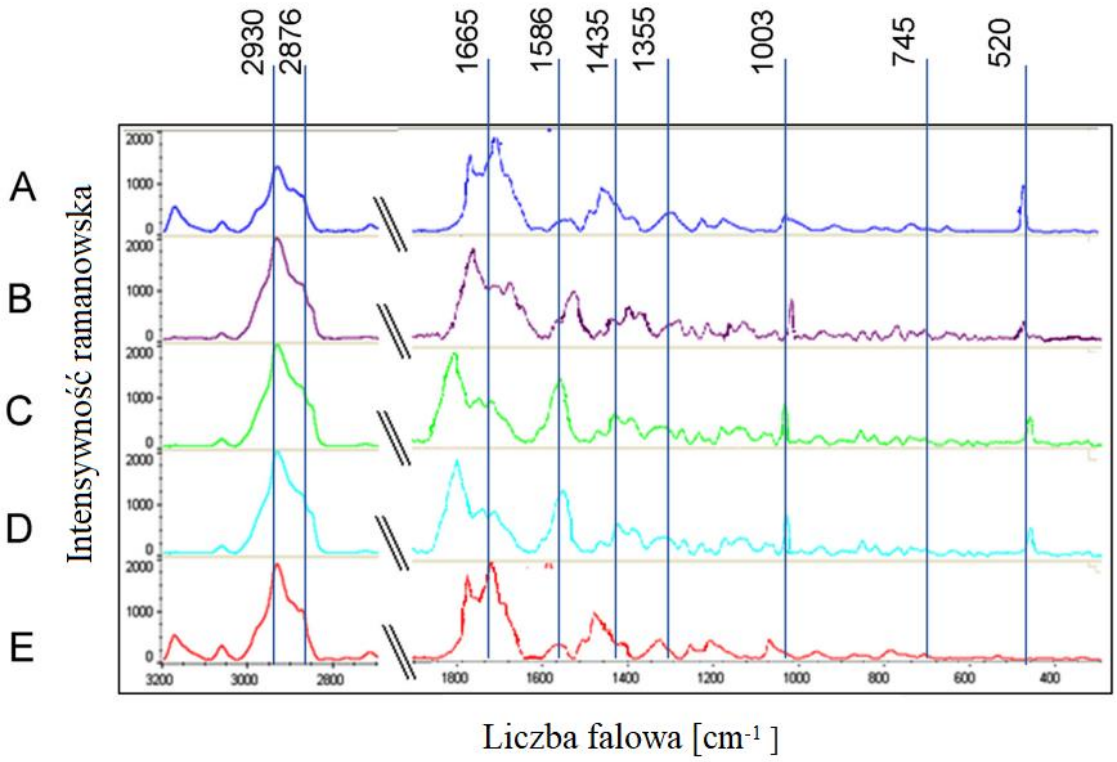
stopniem depolaryzacji z zakresu $0<\rho<3/4$ i są drganiami spolaryzowanymi. Drgania nie są w pełni symetryczne o wartości $\rho>3/4$ i nazwane są pasmami zdepolaryzowanymi. Zdarza się również tak, że w efekcie rezonansowym tensor rozproszenia dla niektórych drgań może być asymetryczny i w takim wyniku pojawiają się pasma anomalnie spolaryzowane dla których $\rho>1$.

Podczas badania stopnia depolaryzacji zaobserwowano polaryzację anomalną (Rys. 35, punkt 1). Pomiary polaryzacyjne wskazują na zmiany strukturalne w domenach białek. Mostki disiarczkowe wskazują na ułożenie łańcucha polipeptydowego w przeciwciele, oraz wpływają na strukturę trzeciorzędową białek.

4.7. Zastosowanie metody korelacji 2D w badaniu limfocytów

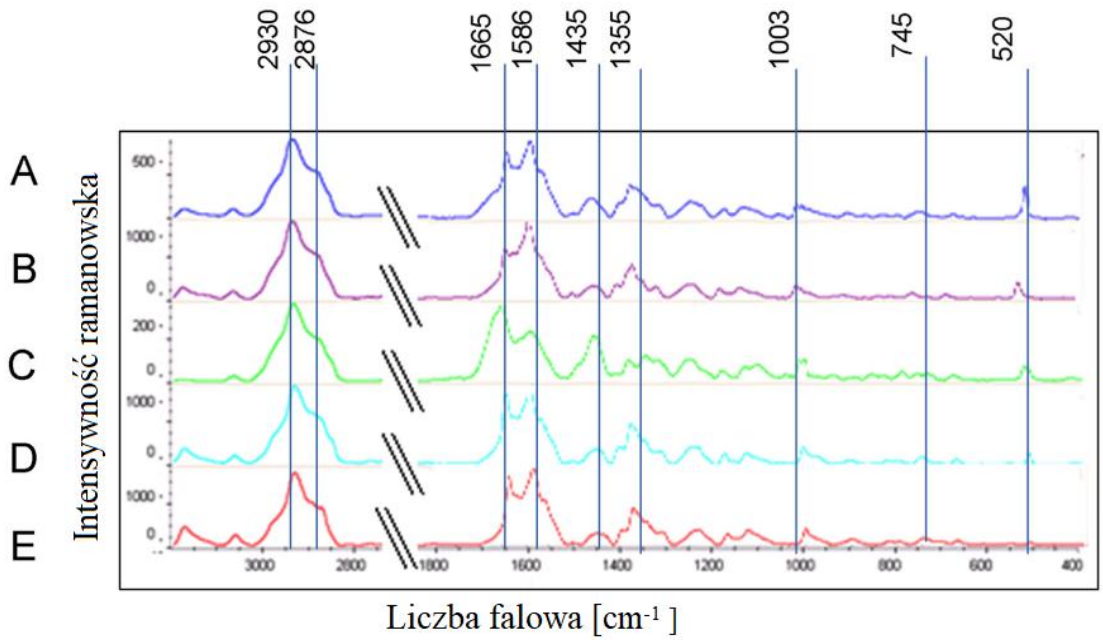
Podczas badań limfocytów pacjentów chorych na mononukleozę zakaźną wykorzystano do analizy dwuwymiarową metodę korelacyjną (2D-COS, Two-Dimensional Correlation Spectroscopy). Jest to metoda, która pokazuje zależności pomiędzy danymi w badanej sekwencji zmienności, które otrzymujemy z widm spektroskopowych [58, 59]. Analizę korelacji 2D przeprowadzono dla uśrednionych danych spektroskopowych otrzymanych w pomiarach limfocytów B pięciu chorych pacjentów zakażonych wirusem EBV. Tak otrzymane uśrednione widma ramanowskie analizowano w kolejnych dniach leczenia. Czas był traktowany jako zewnętrzne zaburzenie w analizie korelacyjnej. Wyniki spektroskopowe tworzyły dynamiczny zbiór danych do przeprowadzenia analizy 2D-COS. Otrzymane mapy korelacyjne były analizowane w zakresie widmowym 3200-400 cm^{-1}. Wyniki otrzymane w analizie korelacyjnej tworzą mapy: synchroniczną i asynchroniczną.

Na Rys. 36 przedstawiono dla porównania widma ramanowskie limfocytów B dla przykładowego pacjenta otrzymane w kolejnych dniach: pierwszym, trzecim, piątym, dziewiątym i dwunastym dniu od momentu diagnozy. Rys. 37 przedstawia uśrednione widma ramanowskie dla pięciu pacjentów w kolejnych dniach hospitalizacji.



Rysunek 36. Porównanie widm ramanowskich limfocytów reprezentatywnego pacjenta z ostrym przebiegiem mononukleozy zakaźnej w: (A) pierwszym, (B) trzecim, (C) piątym, (D) dziewiątym i (E) dwunastym dniu hospitalizacji. Widmo reprezentujące każdy dzień hospitalizacji jest średnią wszystkich widm limfocytów B tego pacjenta zmierzonych w danym dniu (według [69]).

Widmo reprezentujące każdy dzień jest średnią ze wszystkich widm komórek limfocytów B zebranych w danym dniu. Względne zmiany w intensywności pasm wskazują na zmiany zachodzące w limfocytach B, które są zainicjowane przez kontakt z wirusem EBV. Na aktywacje limfocytu wskazuje pojawienie się pasma 520 cm^{-1}, markera immunoglobuliny. Można również zauważyć zmiany intensywności pasma 1586 cm^{-1} związane z kwasami nukleinowymi i aminokwasami, Trp (tryptofan) i Phe (fenyloalanina). Wzrost intensywności pasma amidowego I w pozycji 1660 cm^{-1} wskazuje na tworzenie białek w konformacji β [60, 67, 81, 82, 83].



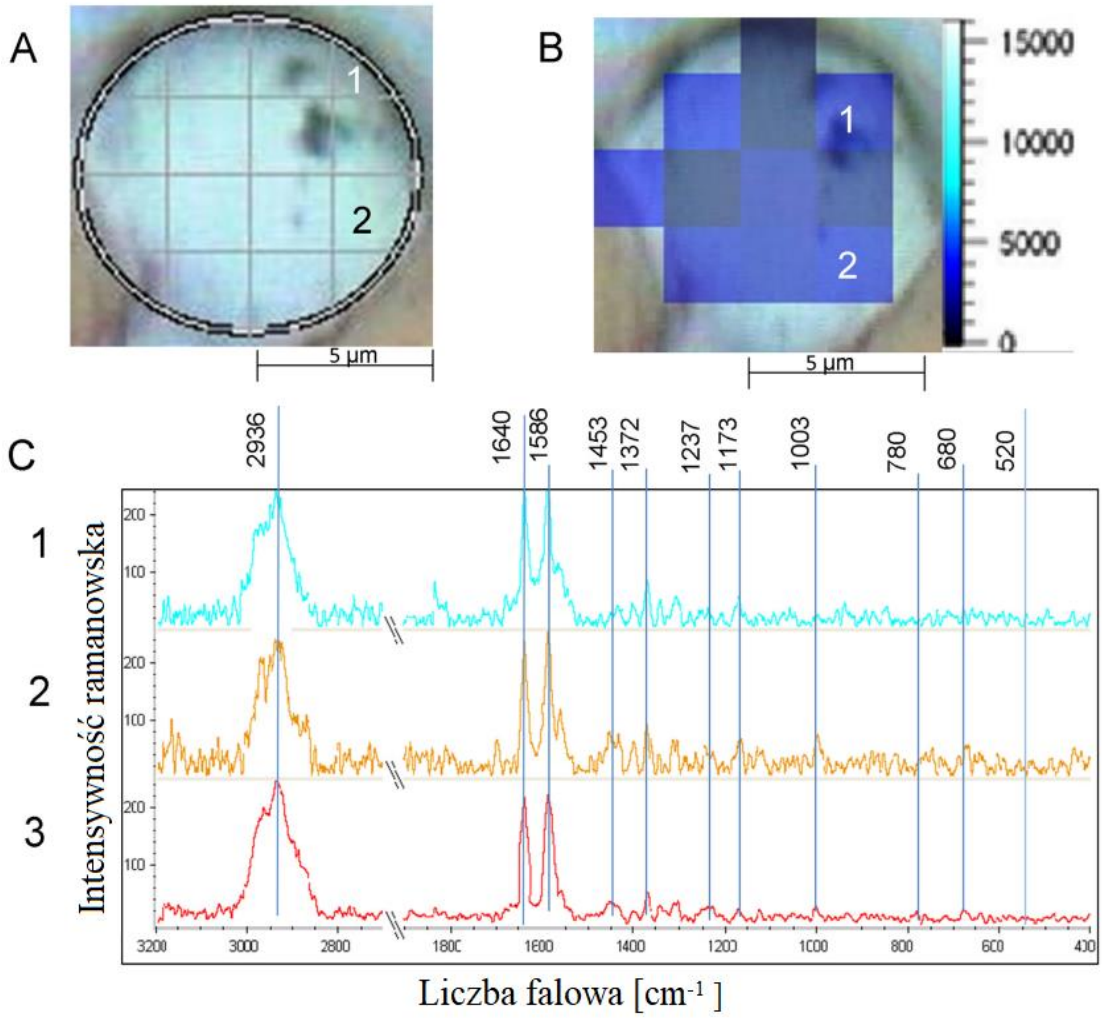
Rysunek 37. Porównanie widm ramanowskich limfocytów wszystkich pacjentów z ostrym przebiegiem mononukleozy zakaźnej w: (A) pierwszym, (B) trzecim, (C) piątym,(D) dziewiątym i (E) dwunastym dniu hospitalizacji. Widmo reprezentujące każdy dzień jest średnią wszystkich widm limfocytów dla wszystkich pacjentów mierzonych w danym dniu (według [69]).

Zwraca uwagę podobieństwo widm na Rys. 36 i 37, co potwierdza zasadność przedstawienia danych w postaci średniej dla wszystkich pacjentów, które potem stanowią dane wejściowe do generowania dwuwymiarowych zależności korelacyjnych.

Tabela 6. Główne pasma Ramana [cm^{-1}] obserwowane dla limfocytów B pacjentów z rozpoznaniem mononukleozy zakaźnej i ich przypisania, linia laserowa 514,5 nm (według [69]).

Liczba falowa [cm^{-1}]	***Przypisanie pasm***
2930	νCH sym CH_3 grupy metylowej
2876	νCH asym CH_2 grupy metylenowej
1665	amid I (konf- β)
1586	G, A (kwasy nukleinowe); Trp, Phe
1435	δCH_2 def., lipidy
1355	δCH def., A (kwasy nukleinowe), proteiny
1003	Phe
745	T -drgania pierścienia, kwasy nukleinowe, Trp
520	νSS, mostki disiarczkowe
A- adenina, G-guanina, Phe – fenyloalanina, T-tymina, Trp- tryptofan.	

Celem badania było zilustrowanie zaobserwowanych zmian limfocytów w trakcie mononukleozy zakaźnej. Dlatego dla porównania wykonano i opracowano widma ramanowskie limfocytów dla zdrowych ochotników, Rys. 38.

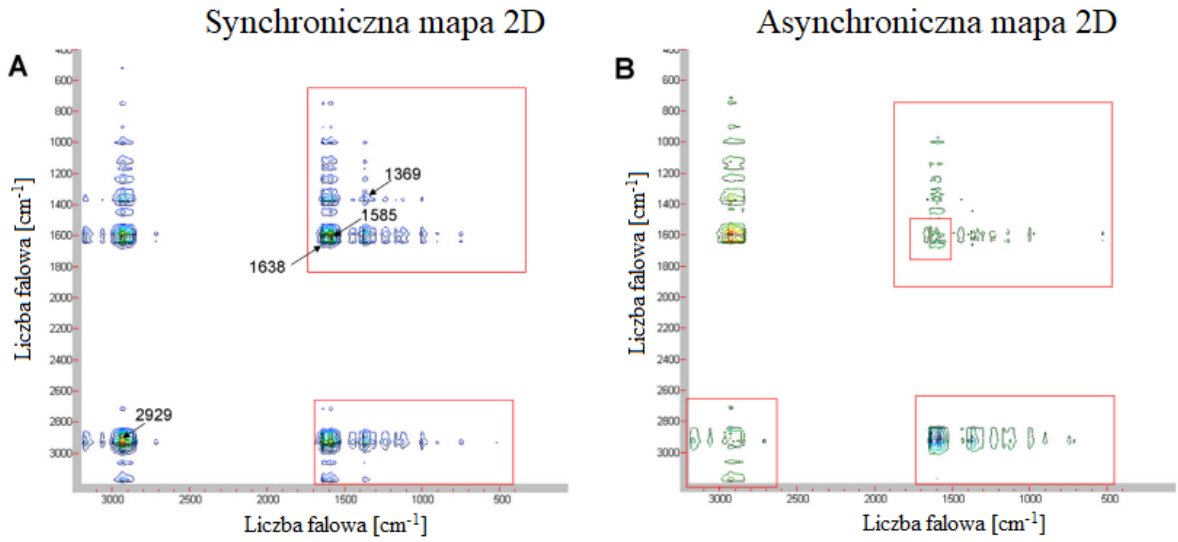


Rysunek 38. Widma ramanowskie limfocytu ludzkiego zdrowego ochotnika, (A) mikrofotografia wykonana z zaznaczonym regionem, w którym przeprowadzono pomiar metodą mapowania; (B) Rozkład w komórce białek w konformacji β (analizowany ze względu na obecność pasma 1665 cm^{-1}, markera amidu I (konf- β); (C) Widma ramanowskie limfocytów w wybranych, zaznaczonych pozycjach (1 i 2), a także uśrednione widmo całej komórki (3); Powiększenie100x, wiązka lasera 514,5 nm (według [69]).

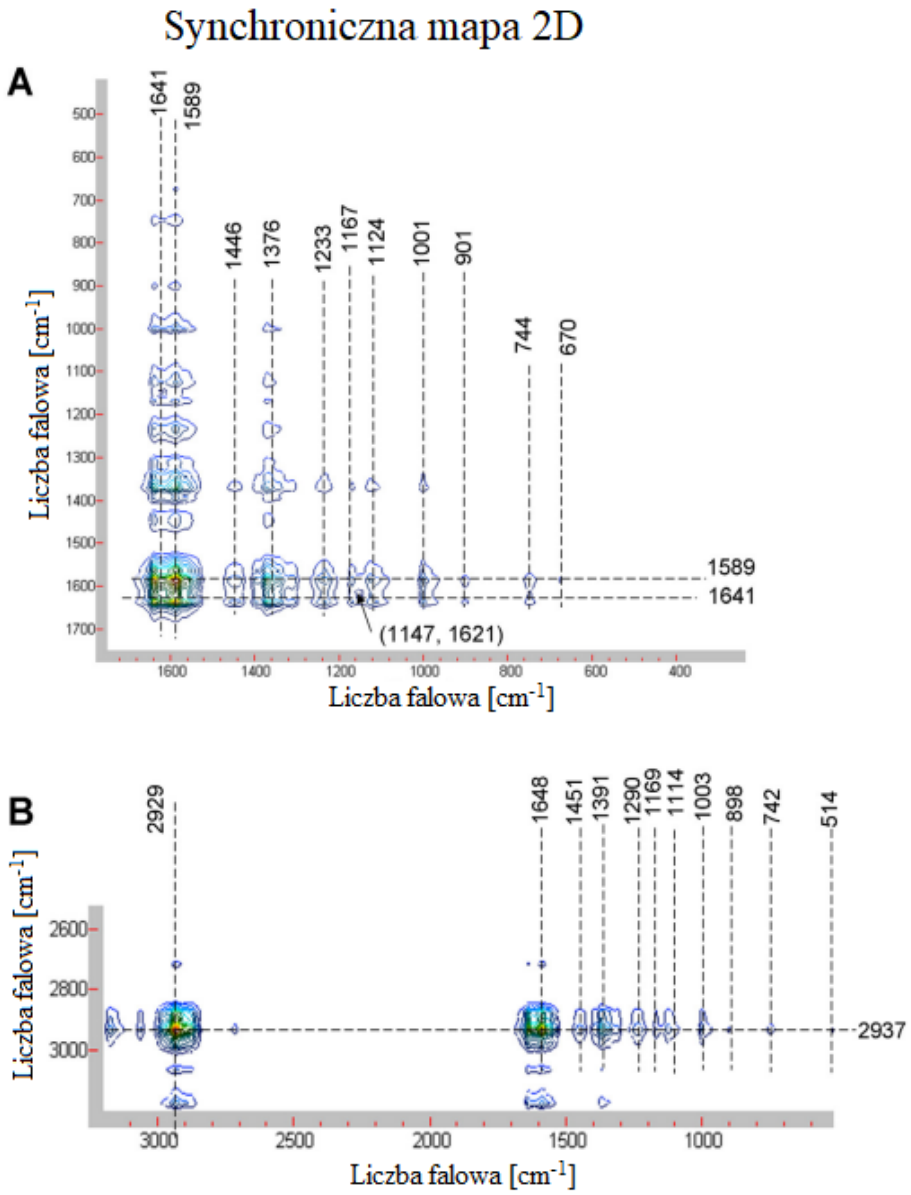
Zdrowe limfocyty B są małymi komórkami o średnicy 6–8 µm z ledwie zauważalną cytoplazmą (Rys. 39) [84]. Obraz spektroskopowy potwierdza badanie histologiczne, komórka jest jednorodna, widma są bardzo podobne. Pasma obserwowane w pozycjach liczby falowej 680 cm^{-1} (T, G), 780 cm^{-1}, 1237 cm^{-1} (T, A), 1453 cm^{-1} (G, A) i 1586 cm^{-1} (G, A) potwierdzają, że komórka jest faktycznie całkowicie wypełniona jądrem

(Rys. 13) [73]. Pozostałe pasma 1003 cm^{-1} (Phe), 1173 cm^{-1} (Tyr) i 1640 cm^{-1} (amid I) wskazują na obecność białek i ich łańcuchów bocznych [60, 82]. Warto zwrócić uwagę na brak pasma przy 520 cm^{-1}, a także brak pasma markera amidu I w konformacji β (1660 cm^{-1}). Te oba wyniki spektroskopowe, brak biomarkerów immunoglobulin i białka immunoglobulin wskazują, że komórka limfocytu nie jest jeszcze aktywowana (Rys. 13) [60].

Synchroniczna mapa 2D pokazuje zmiany zachodzące w limfocytach B, zmiany zachodzące równocześnie, w fazie (Rys. 39).



Rysunek 39. Mapy 2D-COS otrzymane z widm Ramana uśrednionych limfocytów B pacjentów w ciężkim przebiegu mononukleozy zakaźnej: (A) mapa synchroniczna, (B) mapa asynchroniczna zakres 3200–400 cm^{-1}; wzbudzenie lasera 514,5 nm; Zaznaczone obszary są powiększone na Rys. 41 i 42 (według [69]).



Rysunek 40. Mapa synchroniczna 2D otrzymana z widm Ramana uśrednionych limfocytów B pacjentów w ciężkim przebiegu mononukleozy zakaźnej w zakresie liczby falowej: (A) 1700–400 cm^{-1}; (B) 3200–450 cm^{-1} vs 3200–2600 cm^{-1}; wzbudzenie lasera 514,5 nm (według [69]).

Najbardziej intensywne auto-piki, odpowiedzialne są za poważne zmiany w limfocytach podczas choroby, powstają dla liczb falowych 2929 cm^{-1}, 1638 cm^{-1} i 1585 cm^{-1}, a mniej intensywne przy 1369 cm^{-1} (Tabela 7).

Tabela 7. Auto-piki dla korelacji synchronicznej 2D obserwowane dla limfocytów podczas infekcji mononukleozy zakaźnej i ich przypisania, linia laserowa 514,5 nm (według [69]).

2D synchroniczne auto piki	
2929	ν CH sym CH_3 grupy metylowe
1638	amid I (konf- α)
1585	Kwasy nukleinowe (pierścień pirymidynowego); δNH_2, Gln, Trp, Phe
1369	Kwasy nukleinowe (pierścień purynowy); δCH_3, Asp
Asp- kwas asparaginowy, Gln-glutamina, Phe –fenyloalanina, Trp- tryptofan	

Synchroniczne piki korelacyjne 2D są dodatnie i wskazują na spójne, zgodne zmiany w składnikach komórki występujące jednocześnie w tym samym czasie (Tabela 8).

Tabela 8. Wybrane piki korelacyjne obserwowane dla synchronicznej korelacji 2D dla limfocytów podczas infekcji mononukleozy zakaźnej i ich przypisania, linia laserowa 514,5 nm (według [69]).

Synchroniczna korelacja 2D		
	piki korelacyjne	
ν_{sym} CH z CH_3, grupa metylowa	(2931, 1641)	amid I (konf. - α)
ν_{sym} CH grupy metylowej CH_3,: (PC)	(2930, 1589)	Kwasy nukleinowe drgania pierścienia pirymidynowego, δNH_2, Gln, Trp, Phe
Kwasy nukleinowe drgania pierścienia pirymidynowego, δNH_2, Gln, Trp, Phe	(1589, 1641)	amid I (konf.- α)
Kwasy nukleinowe drgania pierścienia purynowego, δCH_3, Asp	(1391, 2937)	ν_{sym} CH grupy CH_3,
Kwasy nukleinowe drgania pierścienia purynowego, δCH_3, Asp PC, CH_2	(1370, 1641)	amid I (konf.- α)
Kwasy nukleinowe drgania pierścienia purynowego, δCH_3, Asp	(1370, 1589)	Kwasy nukleinowe drgania pierścienia pirymidynowego, δNH_2, Gln, Trp, Phe
Kwasy nukleinowe drgania pierścienia pirymidynowego i purynowego, ν CO, ν CC, Tyr, nieuporządkowana struktura protein	(1233, 1641)	amid I (konf. - α)
νCO, νCC, Tyr, T, $\nu_{as}PO_2^-$	(1233, 1589)	G, A, kwasy nukleinowe, δNH_2, Gln, Trp, Phe
νCO, Asp, Glu	(1147, 1621)	νCC, Tyr
νCO, Asp, Glu	(1124, 1641)	amid I (konf. - α)
νCO, Asp, Glu	(1124, 1586)	Kwasy nukleinowe drgania pierścienia pirymidynowego, δNH_2, Gln, Trp, Phe
Phe	(1001, 1641)	amid I (konf.- α)
Phe	(1001, 1589)	Kwasy nukleinowe drgania pierścienia pirymidynowego, δNH_2, Gln, Trp, Phe
Pro	(901, 1589)	Kwasy nukleinowe drgania pierścienia pirymidynowego, δNH_2, Gln, Trp, Phe
Kwasy nukleinowe drgania pierścienia piramidynowego, T	(744, 2930)	CH_{sym} grupy CH_3
Kwasy nukleinowe drgania pierścienia pirymidynowego, T	(744, 1586)	Kwasy nukleinowe drgania pierścienia pirymidynowego, δNH_2, Gln, Trp, Phe
νSS (mostki disiarczkowe)	(514, 2939)	CH_{sym} grupy CH_3
Asp- kwas asparaginowy, Gln-glutamina, Phe –fenyloalanina, Trp- tryptofan		

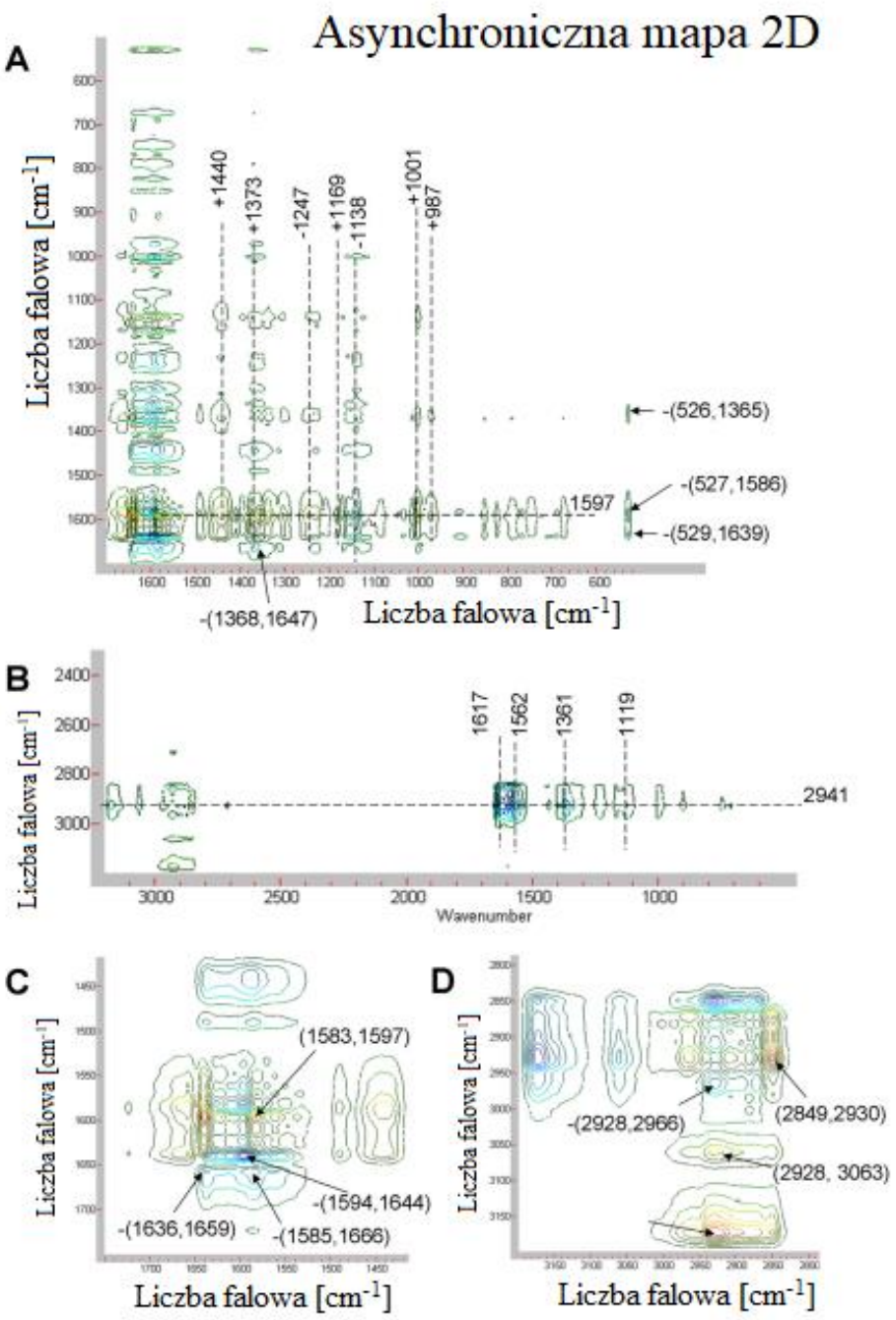
Interesujące jest to, że powstają dwie serie pików korelacyjnych, około 1001 cm^{-1} (Phe), 1124 cm^{-1} (Asp, Glu), 1167 cm^{-1} (Ser, Tyr), 1233 cm^{-1} (Tyr), 1376 cm^{-1} (Asp), 1446 cm^{-1} (Pro) i 1589 cm^{-1} (Gln), które korelują z dwoma drganiami o liczbie falowej ok. 1589 cm^{-1} (Gln) i 1641 cm^{-1} (Arg, amid I) (Rys. 40A, Tabela 8) [60, 85, 86].

Pewne cytokiny wpływają na różnicowanie, proliferację a także przeżycie limfocytów B [87]. Niedawno zwrócono uwagę na znaczenie cytokiny IL-21 w funkcjonowaniu limfocytów B [88]. Interleukina-21 należy do rodziny cytokin zależnych od wspólnego receptora łańcucha gamma (γ). Obserwowana silna korelacja 2D z drganiem amidowym I o konformacji- α wydaje się wskazywać na wpływ IL-21 w powstaniu tego piku korelacyjnego. Struktura IL-21 składa się z czterech helis o charakterystycznej topologii, tworzy kompleks receptora z łańcuchem receptora γ [32].

Piki korelacyjne 2D wskazują na współzależność, kompleksu receptora o strukturze czterohelikalnej wiązki, o pewnej swobodzie strukturalnej (Tabela 8 i Rys. 40) [89, 90]. Synchroniczne piki korelacyjne 2D ujawniają tworzenie kompleksu receptora, początkowego etapu aktywacji i rozwoju limfocytów B [91]. Reszty aminokwasowe uczestniczą w tworzeniu kolejnych pików krzyżowych synchronicznych 2D wskazując na zmiany zachodzące w komórkach limfocytów B (Rys. 40).

Widmo ramanowskie ludzkiej immunoglobuliny IgG w roztworze charakteryzuje stosunkowo szerokie pasmo wyśrodkowane w pozycji 510 cm^{-1}. Pasmo disiarczkowe 520 cm^{-1} jest nieobecne w zdrowych limfocytach B. Podsumowując, zarówno interleukiny, jak i białka ich receptorów, są glikoproteinami składającymi się z licznych reszt aminokwasów zaangażowanych w połączenie, np. Asp, Ser/Thr, Trp i Arg. Z powodu geometrii helis α i odpowiedniego receptora odpowiadające pasma różnią się, co wskazuje, że łańcuch γ jest odpowiednio dopasowany [89].

Mapy asynchroniczne 2D przedstawiono na Rys. 41, najbardziej intensywne piki korelacyjne są zebrane w Tabeli 9.



Rysunek 41. Dwuwymiarowa mapa asynchroniczna 2D otrzymana z widm ramanowskich uśrednionych limfocytów B pacjentów w ciężkim przebiegu mononukleozy zakaźnej w zakresie liczb falowych: (A) 1700-400 cm-1; (B) 3200-400 cm-1 vs 3200-2400 cm-1; (C) 1750-1400 cm-1; (D) 3200-2800 cm-1; wzbudzenie linią lasera 514,5 nm (według [69]).

Tabela 9. Wybrane asynchroniczne piki korelacyjne 2 D obserwowane dla korelacji dla limfocytów B podczas infekcji mononukleozy zakaźnej i ich przypisania, linia laserowa 515,5 nm (według [69]).

Asynchroniczna korelacja 2D		
	piki korelacyjne	
ν_{sym} CH drgania grupy metylowej CH_3, proteiny, lipidy, PC	-(2928, 2966)	ν_{asym} CH drgania grupy metylowej CH_3
ν_{sym} CH wibracyjne CH_2, grupa metylenowa	+(2849, 2930)	ν_{sym} CH drgania grupy metylowej CH_3
ν_{sym} CH drgania grupy metylowej CH_3 proteiny, lipidy, PC	+(2928, 3063)	νCH w pierścieniach aromatycznych
ν_{sym} CH drgania grupy metylowej CH_3 proteiny, lipidy, PC	+(2928, 3171)	νCH w pierścieniach aromatycznych
νCC, Tyr	-(1617, 2941)	ν_{sym} CH drgania grupy metylowej CH_3
$\nu_{asym}COO^-$, Glu	-(1562, 2941)	ν_{sym} CH drgania grupy metylowej CH_3
δ CH_3, Asp: ω CH_2, PC	-(1361, 2941)	ν_{sym} CH drgania grupy metylowej CH_3
ν (CO), Asp, Glu	+(1119, 2941)	ν_{sym} CH drgania CH_3, grupa metylowa
Kwasy nukleinowe drgania pierścienia pirymidynowego, δNH_2, Gln, Trp, Phe	+(1583, 1597)	νCC, Tyr
νCC, Tyr	-(1594, 1644)	amid I (konf. -α)
Kwasy nukleinowe drgania pieścienia pirymidynowego, δNH_2, Gln, Trp, Phe	-(1585, 1666)	amid I (konf. -β)
Amid I (konf. -α): Arg	-(1636, 1659)	amid I (konf. -β)
δ CH_3, Asp: ω CH_2, PC	-(1368, 1647)	amid I (konf. -α)

δ CH_3, Phe: ω CH_2, PC	+(1440, 1586)	Kwasy nukleinowe drgania pierścienia pirymidynowego, δNH_2, Gln, Trp, Phe
δ CH_3, Asp: ω CH_2, PC	+(1373, 1586)	Kwasy nukleinowe drgania pierścienia pirymidynowego, δNH_2, Gln, Trp, Phe
νCC, δCH, Trp	+(1247, 1586)	Kwasy nukleinowe drgania pierścienia pirymidynowego, δNH_2, Gln, Trp, Phe
δCOH, Tyr: ω CH_2, Ser	+(1169, 1586)	Kwasy nukleinowe drgania pierścienia pirymidynowego, δNH_2, Gln, Trp, Phe
νCO, Asp, Glu, νCC, lipidy	-(1138, 1586)	Kwasy nukleinowe drgania pierścienia pirymidynowego , δNH_2, Gln, Trp, Phe
νCC, Phe	+(1001, 1586)	Kwasy nukleinowe drgania pierścienia pirymidynowego, δNH_2, Gln, Trp, Phe
νCC, proteiny	+(987, 1586)	Kwasy nukleinowe drgania pierścienia pirymidynowego, δNH_2, Gln, Trp, Phe
νSS (mostki disiarczkowe)	-(526, 1365)	δ CH_2, Asp: ω CH_2, PC
νSS (wibracyjne mostki disiarczkowe)	-(527, 1586)	Kwasy nukleinowe drgania pierścienia pirymidynowego, δNH_2, Gln, Trp, Phe
νSS (mostki disiarczkowe)	-(529, 1639)	amid I (konf. -α)
Asp- kwas asparaginowy, Gln-glutamina, Phe –fenyloalanina, Trp- tryptofan, Tyr- tyrozyna		

Pasma widoczne przy 2941 cm^{-1} (lipidy i białka CH_3) prowadzą do powstania intensywnych pików asynchronicznych, ujemnych z 1617 cm^{-1} (Tyr) , 1562 cm^{-1} (Glu) i 1361 cm^{-1} (Trp) i dodatnich z 1119 cm^{-1} (Asp, Glu) (Rys. 42). Kolejne ujemne piki korelacyjne powstają dla 1138 cm^{-1} (Asp, Glu), podczas gdy dodatnie dla 1440 cm^{-1} (His, Pro), 1373 cm^{-1} (Asp), 1247 cm^{-1} (Trp), 1169 cm^{-1} (Ser, Tyr), 1001 cm^{-1} (Phe) i 987 cm^{-1} (νCC, wrażliwy na konformację) z drganiem 1597 cm^{-1} (Glu, Tyr) (Rys. 41) [60]. Ujemny pik asynchroniczny, -(1636, 1669), wskazuje na tworzenie białek w konformacji β, które powstają przed zmianami zachodzącymi w konformacji amidu I (Rys. 41). Asynchroniczna mapa wskazuje na rozwój limfocytów B w kierunku odpowiedzi immunologicznej polegającej na tworzeniu immunoglobulin (Rys. 41A). Wskazuje na to obecność sygnałów z reszt Tyr (kinaz tyrozynowych), których aktywacja odbywa się pod wpływem IL-21. Ujemna asynchroniczna korelacja dla drgań disiarczkowych w pozycjach 526, 527 i 529 cm^{-1} jest związana z serią drgań przy 1365 cm^{-1} (Trp), 1586 cm^{-1} (Trp, Phe) i 1639 cm^{-1} (Arg, His). Nieco różne energie pasm SS, generujące asynchroniczne piki korelacyjne, odzwierciedlają różne geometrie mostków disiarczkowych w białkach w kompleksie receptora (Rys. 41A). Zaobserwowane przesunięcia wydają się wskazywać na heterogeniczność konformacyjną w wiązaniach disiarczkowych, które stabilizują kompleks receptora, a także na powstające immunoglobuliny [81, 89].

Metoda mikroskoproskopii Ramana, z zastosowaną do opracowania wyników analizą korelacji 2D, pozwoliła uzyskać wgląd w przebieg zjawisk występujących w limfocytach B na początku ich różnicowania. Synchroniczne mapy monitorowały sterowany przez cytokiny typu IL-21 proces tworzenia kompleksu receptora złożonego z łańcucha receptora w kompleksie ze wspólnym łańcuchem γ [90]. Pojawienie się synchronicznego piku korelacyjnego generowanego przez mostki disiarczkowe dla liczby falowej 515 cm^{-1} może wskazywać na obecność jeszcze niezróżnicowanych ludzkich imunoglobulin w limfocytach B [67, 81]. Mapy asynchroniczne wskazywały na rozwój wydzielania Ig. Limfocyty B podczas odpowiedzi immunologicznej wytwarzają immunoglobuliny charakteryzujące się konformacją -β amidu I. Dodatkowo, piki asynchroniczne, obserwowane dla różnych mostków disiarczkowych, wydają się wskazywać również na tworzenie kompleksu receptora [88]. Różne, energie drgania pasm generujących synchroniczne i asynchroniczne piki korelacyjne, na przykład 1589 cm^{-1}, 1641 cm^{-1}, 2937 cm^{-1} piki synchroniczne zaś 1597 cm^{-1}, 2941 cm^{-1} piki asynchroniczne, wskazują na różne ugrupowania i/lub różne lokalne otoczenie modulujące oddziałujące grupy molekularne (Rys. 39 i 41). Obecność bodźca jest wskazywana przez asynchroniczne piki krzyżowe w zakresie 3200–2800 cm^{-1}.

Zmiany w drganiach CH grup metylenowych (lipidów) poprzedzają zmiany w grupach metylowych (białka i lipidy) i wskazują na przygotowanie do ekspresji klonalnej (Rys. 41D) [77].

4.8. Analiza standardowych testów diagnostycznych pacjentów

Testy diagnostyczne wykonywano równocześnie z badaniami spektroskopowymi. Zebrano wyniki pacjentów ze zdiagnozowaną mononukleozą zakaźną (Rys. 43, 44, 45) oraz zdrowych ochotników (Tabela 11, Rys. 42). Wartości przyjęte za normę podane są w Tabeli 10. Testy diagnostyczne dostarczają informacji o stanie zdrowia pacjenta. Pacjenci trafiając do szpitali zazwyczaj oczekują minimum dobę na wykonanie badań na przeciwciała. Jest to metoda bardzo skuteczna, ale wymaga dłuższego czasu oczekiwania. Pacjenci z ciężkimi objawami takimi jak powiększona wątroba, gorączka, wysypka trafiają do oddziałów zakaźnych. Standardowo u chorych bada się morfologię krwi obwodowej, biochemię krwi, np. CRP, ALT, przeciwciała. Te wyniki pozwalają postawić diagnozę.

Tabela 10. Normy morfologii krwi u dorosłych pacjentów [28].

Składniki krwi	**Osoba dorosła**
Leukocyty ($x10^3/\mu L$)	4-10
Hemoglobina (g/dL)	14-18
Neutrocyty ($x10^3/\mu L$)	1,8-7,7
Bazocyty ($x10^3/\mu L$)	0,01-0,2
Limfocyty ($x10^3/\mu L$)	1-4,5
Erytrocyty ($x10^6/\mu L$)	4,5-5,9
Płytki krwi ($x10^3/\mu L$)	140-440
Eozynocyty ($x10^3/\mu L$)	0,04- 0,45
Monocyty ($x10^3/\mu L$)	0,1-0,8
Aminotransferaza alaninowa (U/l)	10-40

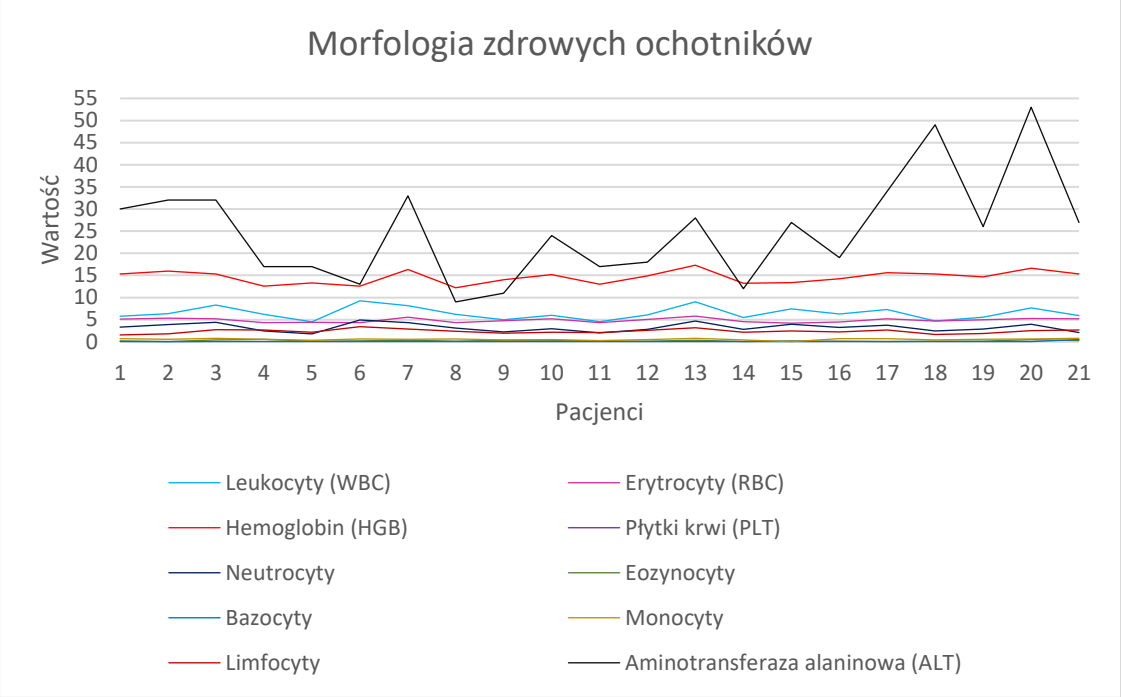
Tabela 11. Wyniki morfologii wybranych, zdrowych ochotników.

Ochotnik	Leukocyty (WBC)	Erytrocyty (RBC)	Hemoglobin (HGB)	Płytki krwi (PLT)	Neutrocyty	Eozynocyty	Bazocyty	Monocyty	Limfocyty	Aminotransferaza alaninowa (ALT)
1	5,8	5,09	15,3	176	3,33	0,19	0,02	0,7	1,54	30
2	6,34	5,31	16	263	3,9	0,07	0,01	0,58	1,76	32
3	8,27	5,17	15,3	260	4,36	0,38	0,02	0,76	2,73	32
4	6,23	4,3	12,6	225	2,42	0,54	0,06	0,55	2,64	17
5	4,5	4,36	13,3	199	1,78	0,14	0,03	0,37	2,17	17
6	9,25	4,32	12,6	357	4,92	0,22	0,02	0,64	3,41	13
7	8,14	5,57	16,3	316	4,31	0,32	0,02	0,59	2,87	33
8	6,18	4,29	12,2	248	3,06	0,12	0,03	0,61	2,35	9
9	4,95	4,79	14	213	2,23	0,32	0,03	0,45	1,91	11
10	5,97	5,17	15,2	280	2,97	0,31	0,08	0,48	2,12	24

Tabela 11 cd. Wyniki morfologii wybranych, zdrowych ochotników.

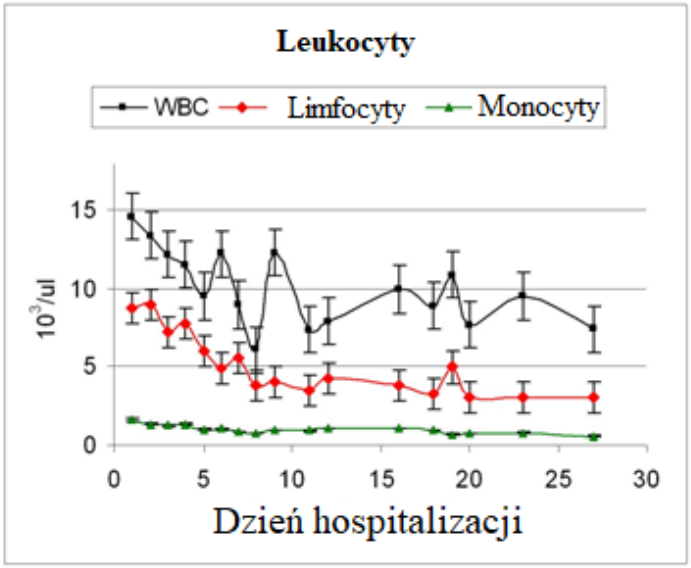
Ochotnik	Leukocyty (WBC)	Erytrocyty (RBC)	Hemoglobin (HGB)	Płytki krwi (PLT)	Neutrocyty	Eozynocyty	Bazocyty	Monocyty	Limfocyty	Aminotransferaza alaninowa (ALT)
11	4,52	4,32	13	286	2,03	0,12	0,03	0,29	2,05	17
12	6,08	5,03	14,9	308	2,79	0,16	0,03	0,49	2,6	18
13	9,05	5,79	17,3	356	4,71	0,32	0,07	0,78	3,14	28
14	5,47	4,52	13,2	277	2,81	0,05	0,04	0,39	2,17	12
15	7,43	4,2	13,4	205	3,98	0,17	0,03	0,02	2,43	27
16	6,3	4,44	14,2	239	3,24	0,13	0,05	0,68	2,19	19
17	7,29	5,22	15,6	248	3,76	0,04	0,06	0,67	2,68	34
18	4,66	4,71	15,3	220	2,41	0,13	0,06	0,4	1,65	49
19	5,52	4,94	14,7	232	2,91	0,1	0,04	0,57	1,89	26
20	7,62	5,23	16,6	250	3,94	0,46	0,05	0,6	2,52	53
21	5,88	5,21	15,3	198	2,06	0,29	0,5	0,79	2,68	27

Z wyników otrzymanych wykonano wykres dla wszystkich pacjentów.

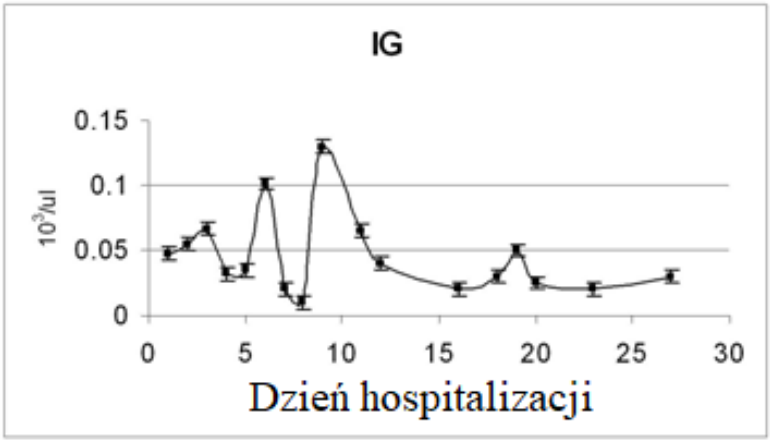


Rysunek 42. Morfologia zdrowych ochotników.

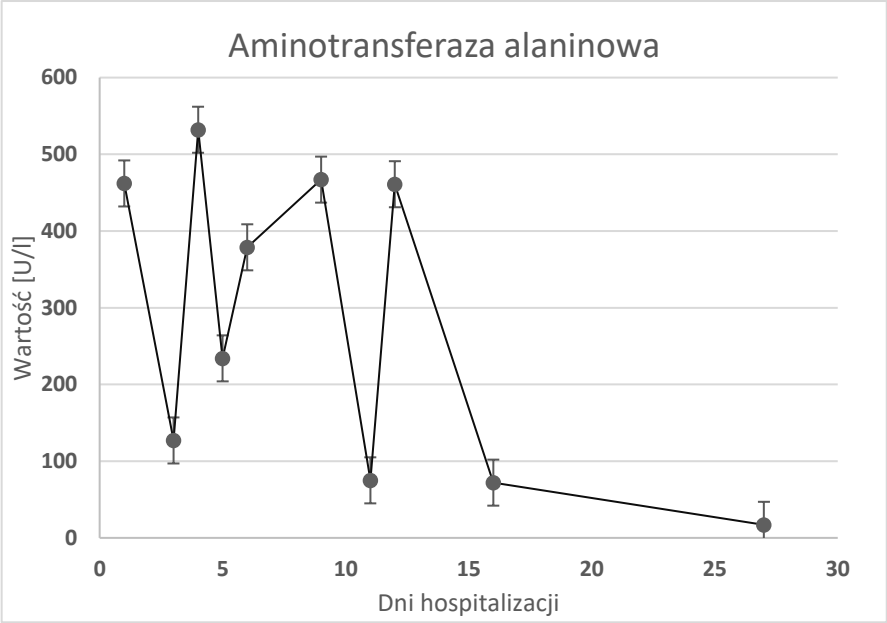
Dla każdego pacjenta ze zdiagnozowaną mononukleozą zakaźną wykonano w kolejnych dniach hospitalizacji badania morfologiczne. Wszystkie dane zebrano i uśredniono. Przedstawiono te dane, które są najważniejsze podczas zmian zachodzących w czasie mononukleozy zakaźnej (Rys. 43).



Rysunek 43. Liczba leukocytów jako wartość średnia dla wszystkich pacjentów w grupie badanej: WBC [norma 4,00-10,00x103/µl], limfocyty [norma 0,80-4,00x103/µl], monocyty [norma 0,16-0,80 x103/µl], czyli u pacjentów z rozpoznaną mononukleozą zakaźną w kolejnych dniach hospitalizacji (na podstawie [75]).



Rysunek 44. Poziom IG (granulocytów niedojrzałych) [norma 0,00-0,09x103/µl] u pacjentów z rozpoznaną mononukleozą zakaźną w kolejnych dniach hospitalizacji (na podstawie [75]).



Rysunek 45. Uśrednione wyniki aminotransferazy alaninowej (ALT) u pacjentów chorych na mononukleozę zakaźna (na podstawie [75]).

U wszystkich diagnozowanych pacjentów wykonano testy swoiste dla EBV, które były dodatnie (EBV anty-VCA IgM: dodatnie).

Z morfologii krwi można było wnioskować, że liczba limfocytów skontrolowanych u pacjentów z EBV była największa w pierwszych dniach hospitalizacji, ale także w późniejszych etapach choroby przekraczała wartości uznawane za prawidłowe (Rys. 43). Kolejne maksimum zaobserwowano w 7 dniu leczenia, a mniej intensywne maksimum w 19 dniu hospitalizacji.

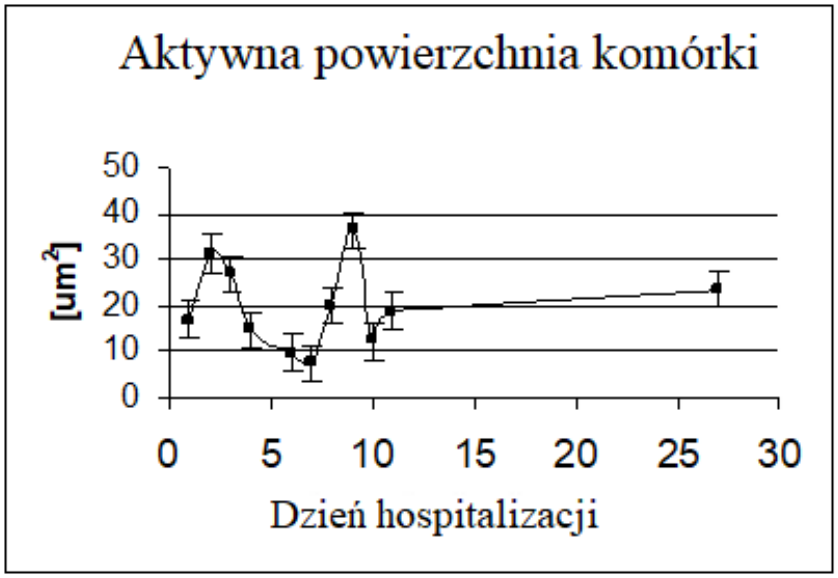
Należy zwrócić uwagę na zwiększoną liczbę niedojrzałych granulocytów po około tygodniu infekcji (Rys. 44). Wzrost IG oznacza, że odpowiedź immunologiczna została zakłócona. Zmiany hematopoetyczne indukowane przez EBV sugerują, że może wystąpić immunosupresja za pośrednictwem wirusów, co dodatkowo zaostrza patologię zaburzeń związanych z EBV [92].

Obserwowany poziom ALT zależał od stanu indywidualnego pacjenta, zazwyczaj wyniki były znacznie powyżej normy (Rys. 45).

4.9. Korelacja wyników klinicznych i spektroskopowych

Podczas mononukleozy zakaźnej znacząco zmienia się kształt i morfologia komórki. W pierwszych dniach choroby komórki są znacznie powiększone (prawdopodobnie nawet sześciokrotnie większe niż komórki zdrowe), średnio do 140 μm2 i mają nieregularny kształt [70]. Obserwowana charakterystyka świadczy o różnicowaniu się limfocytów B w komórki plazmatyczne i na trwającą infekcje wirusową w organizmie Po zakończeniu infekcji limfocyty wracają do kształtu i wielkości sprzed choroby [70]. Jednak różnicowanie się komórek limfocytów B można charakteryzować na różne sposoby [45].

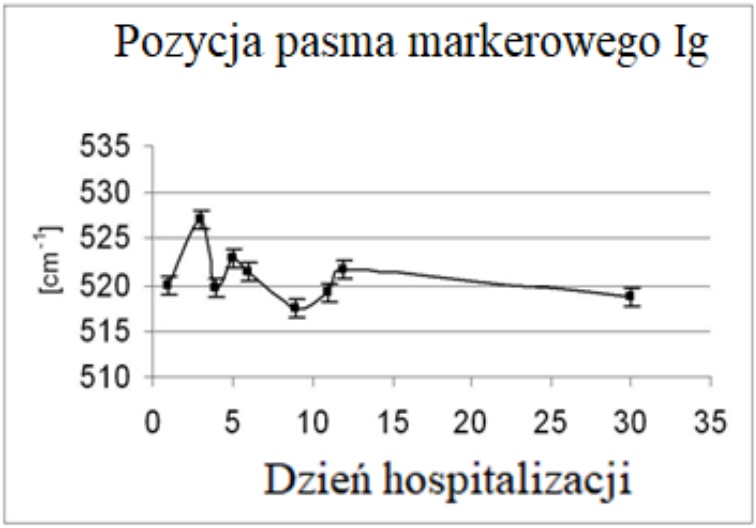
Jeden ze sposobów scharakteryzowania tych zmian za pomocą spektroskopii ramanowskiej został już zaproponowany przez ocenę intensywności pasma markera immunoglobulin. Ponadto przeprowadzono ocenę aktywacji komórek B przez ocenę aktywowanych obszarów w komórkach, określonych przez obecność markera Ig (Rys. 46). Wyraźny wzrost aktywowanego obszaru obserwuje się w dwóch przedziałach czasowych, około 3. i 9. dnia, co wydaje się wskazywać na rozwój aktywowania komórek B. Oznacza to zwiększoną produkcję przeciwciał do walki z wirusem [67, 68]. Wzrost powierzchni komórek aktywowanych około 9 dnia hospitalizacji wydaje się być zgodny z transformacją i różnicowaniem limfocytów B w komórki plazmatyczne wytwarzające przeciwciała, których największe stężenie spodziewane jest w okolicach od 2 do 4 tygodnia choroby [25]. Jednak transformacje limfocytów B mogą również zachodzić na inne sposoby, takie jak różnicowanie się w limfocyty B w centra germinalne (GC, germinal center) lub limfocyty B pamięci [93].



Rysunek 46. Aktywowany region komórek B [μm^2], oszacowany na podstawie pojawienia się w danym fragmencie komórki pasma 520 cm^{-1}, w czasie dni hospitalizacji (na podstawie [75]).

Największy wzrost markera aktywacji immunoglobulin zaobserwowano w 4 dobie hospitalizacji, natomiast największy wzrost liczby limfocytów odnotowano na początku hospitalizacji. We krwi zdrowych ochotników nie obserwowano aktywowanych limfocytów.

Dynamika zmian pełnej szerokości połówkowej (FWHH) charakterystycznego pasma markeru Ig, pojawiającego się w aktywowanych limfocytach, przedstawiono na Rys. 47. Zauważono zwiększoną szerokość połówkową w 3-cim i 9-tym dniu hospitalizacji. Cechę tę można skorelować ze zmianą położenia pasma markerowego Ig, która mieści się w zakresie około 10 cm^{-1} (od 517 do 527 cm^{-1}) i może być związana z dynamicznym postępującym procesem dojrzewania w którym komórki B wytwarzają przeciwciała o zwiększonym powinowactwie do antygenu w trakcie odpowiedzi immunologicznej poprzez dopasowywanie struktury paratopu. Przy wielokrotnej ekspozycji na ten sam antygen gospodarz będzie wytwarzał przeciwciała o coraz większym powinowactwie [75].



Rysunek 47. Pozycja pasma markera immunoglobulin Ig podczas hospitalizacji oszacowana jako średnia dla wszystkich pacjentów (na podstawie [75]).

Limfocyty B są głównym celem wirusa EBV, który jest silnie powiązany z niektórymi nowotworami złośliwymi z komórek B. W późniejszym stadium choroby wyraźniejszy jest wpływ utajonego białka błonowego LMP2A, do wartości progowej wymaganej do pośredniczącej proliferacji limfocytów B. Wcześniejsze pomiary polaryzacji wskazują na zmiany strukturalne w domenach białkowych. Nieprawidłowy stopień depolaryzacji uzyskiwany w przebiegu choroby może być spowodowany wpływem białka wirusowego LMP2A na rozregulowanie transdukcji sygnału receptora. Obraz spektroskopowy, który odzwierciedla to zaburzenie sygnalizacji na poziomie molekularnym, odzwierciedla anomalny stopień depolaryzacji obserwowany w badanych limfocytach B, ale także w niektórych innych układach biologicznych [82].

5. PODSUMOWANIE

W niniejszej pracy badano zmiany zachodzące w limfocytach u pacjentów ze zdiagnozowaną mononukleozą zakaźną. Jako główną metodę badawczą wybrano spektroskopię ramanowską. Spektroskopia ramanowska to nowoczesna metoda wykrywania zmian w poszczególnych komórkach krwi. Spektroskopia ramanowska umożliwiła jednoczesne zbadanie wszystkich zmian biochemicznych zachodzących w komórkach limfocytów wywołanych przez infekcję wywołaną przez wirus EBV. Metodologia oparta na pomiarach obrazowania ramanowskiego w celu identyfikacji markera immunoglobulin była wspierana dodatkowymi metodami izolowania limfocytów B za pomocą technologii MACSxpress®.

Stwierdzono, że biomarkerem aktywacji komórek jest pasmo 520 cm^{-1}, wskazujące na powstawanie immunoglobulin. Podczas kontaktu komórek z antygenem, w czwartej dobie po zdiagnozowaniu choroby, monitorowano zwiększoną produkcję białka i zwiększoną ekspresję immunoglobulin. Obserwowana zmienność położenia pasma markerowego (± 10 cm^{-1}), czyli niestałość konformacji przyjmowanej przez immunoglobuliny, może być wskaźnikiem pewnej patologii proliferacji limfocytów B Dużym atutem metody spektroskopii ramanowskiej było użycie małej ilości materiału biologicznego do badań. Widma ramanowskie dostarczyły informacji o składzie komórki, budowie, oraz umożliwiły sprawdzenie zmian zachodzących w funkcji czasu. Badania morfologiczne pozwoliły skorelować wyniki pacjentów z wynikami spektroskopowymi.

Metoda mikrospektroskopii ramanowskiej wzmocniona metodą korelacji dwuwymiarowej 2D-COS pozwoliła uzyskać wgląd w zjawiska zachodzące w limfocytach B w przebiegu choroby i ich zróżnicowanie. Synchroniczne mapy ukazywały proces tworzenia kompleksu receptorowego złożonego z łańcucha receptorowego w kompleksie ze wspólnym łańcuchem γ [90]. Drgania disiarczkowe charakteryzowane przez liczbę falową 515 cm^{-1} reprezentowały obecność jeszcze niezróżnicowanych immunoglobulin ludzkich w komórkach limfocytów B [67,81]. Mapy asynchroniczne wskazywały na rozwój limfocytów B wydzielających Ig podczas odpowiedzi immunologicznej, czyli tworzenie immunoglobulin charakteryzujących się konformacją β wiązania amidowego. Dodatkowo piki asynchroniczne obserwowane dla różnych konformacji mostków disiarczkowych, wydają się również wskazywać na powstawanie kompleksu receptorowego [88].

Wykonywano również pomiary stopnia depolaryzacji pasma markerowego immunoglobulin dlatego analizowano promieniowanie rozproszone w dwóch położeniach

polaryzatora względem padającego światła, a wyniki wskazały polaryzację anomalną dla niektórych Ig na powierzchni komórki. Wydaje się to wskazywać na obecność innej konformacji immunoglobulin, a zaburzenia proliferacji limfocytów B, prawdopodobnie wskazują na przejście do postaci utajonej.

Wyniki otrzymane w ramach pracy doktorskiej pokazują, że, spektroskopia ramanowska dostarcza informacji na temat różnych zmian molekularnych w komórkach limfocytów B. Tym samym postawiona hipoteza badawcza została pozytywnie zweryfikowana, a cel badań osiągnięty. Udało się określić marker spektroskopowy, który może wskazywać mechanizm aktywacji limfocytów podczas kontaktu z wirusem EBV. Przedstawione wyniki, które doprowadziły do przedstawionych poniżej wniosków pozwalają sądzić, że opracowana metodologia może być interesującą alternatywą badań w zakresie infekcji wirusem EBV. Dalsze badania mogą prowadzić do analizy mechanizmu onkogennego wirusa EBV.

6. WNIOSKI

Zastosowanie spektroskopii ramanowskiej pozwoliło na uzyskanie dodatkowych informacji o budowie limfocytu B, które może monitorować metodą spektroskopii, oraz o zmianach chemicznych zachodzących w komórce podczas przebiegu mononukleozy zakaźnej, czyli dostarczają dodatkowych informacji o mechanizmie i przebiegu choroby.

Określono marker immunoglobulin, który świadczy o aktywacji limfocytów. W pomiarach ramanowskich z użyciem lasera 514,5 nm., głównym markerem spektroskopowym, który pojawiał się w limfocytach u pacjentów z mononukleozą zakaźną było pasmo 520 cm^{-1} pochodzące od mostków disiarczkowych SS. U zdrowych ochotników pasmo 520 cm^{-1} nie było obserwowane. Względem tego markera budowano obrazy chemometryczne 2D. z użyciem lasera 514,5 nm. [68, 69, 70].

Obserwowana zmienność konformacji przyjmowanej przez immunoglobuliny, rejestrowana jako przesuniecie położenia pasma markerowego 520 cm^{-1} ($\pm$ 10 cm^{-1}), może być wskaźnikiem pewnej patologii funkcji limfocytów B, wywołanej aktywnością wirusa EBV.

Separowanie komórek limfocytów przy zastosowaniu technologii MACS® nie dało satysfakcjonujących wyników. Pasmo markerowe immunoglobulin w tym przypadku było mniej intensywne, niż wtedy gdy nie zastosowania tej metody separacji. Prawdopodobnie bufor i zestaw do znakowania magnetycznego, użyty podczas separowania, dezaktywuje lub zmienia komórki docelowe wiążąc się z immunoglobulinami.

Metoda mikrospektroskopii ramanowskiej wzmocniona metodą korelacji dwuwymiarowej 2D-COS pozwoliła uzyskać wgląd w przebieg procesu zjawisk zachodzących w limfocytach B i ich zróżnicowanie. Mapy synchroniczne pokazały procesy zainicjowane przez cytokinę typu IL-21, wiązkę czterech helis, w kierunku tworzenia kompleksu receptorowego złożonego z łańcucha receptorowego wzdłuż w kompleksie ze wspólnym łańcuchem γ [33]. Mapy asynchroniczne wskazywały na rozwój komórek limfocytów B wydzielających Ig podczas odpowiedzi immunologicznej, czyli tworzenie immunoglobulin charakteryzujących się konformacją β wiązania amidowego. Dodatkowo piki asynchroniczne obserwowane dla różnych mostków disiarczkowych, wydają się również wskazywać na powstawanie kompleksu receptorowego [88].

Podczas badań stopnia depolaryzacji zaobserwowano polaryzację anomalną pasma Ig. Pomiary polaryzacyjne wskazują na zmiany strukturalne w domenach białek. Mostki disiarczkowe charakteryzują ułożenie łańcucha polipeptydowego w przeciwciele, w Ig, oraz wpływają na strukturę trzeciorzędową białek. Badanie stopnia depolaryzacji markera immunoglobulinowego obserwowanego w przebiegu mononukleozy zakaźnej może wskazywać na dodatkową specyfikę zakażenia EBV i dostarczać dodatkowych informacji na temat zakażenia i jego przebiegu [68, 69, 70].

Dzięki zastosowaniu mikroskopu optycznego uzyskano mikrofotografie, za pomocą których można było ustalić wielkość limfocytów. Pierwszego dnia choroby komórki posiadały nieregularne kształty, były znacznie powiększone. Obserwowana charakterystyka świadczy o różnicowaniu się limfocytów B w komórki plazmatyczne i na trwającą infekcje wirusową w organizmie Z czasem ustępowania objawów chorobowych limfocyty wracały do pierwotnej formy i odpowiednich kształtów [68,70].

Badania morfologii krwi wspomogły badania spektroskopowe i wnioski z nich płynące. U wszystkich diagnozowanych pacjentów chorych na mononukleozę zakaźną testy swoiste dla EBV były dodatnie (EBV anty-VCA IgM: dodatnie). Z morfologii krwi można było wnioskować, że liczba limfocytów u pacjentów z EBV była największa w pierwszych dniach hospitalizacji, ale także w późniejszych etapach choroby przewyższała wartości prawidłowe. Dodatkowo po około tygodniu infekcji u chorych pacjentów była zwiększoną liczba niedojrzałych granulocytów. Wzrost IG oznacza, że w organizmie następuje odpowiedź immunologiczna na zewnętrzny czynnik chorobowy (wirus EBV).

Największy wzrost markera aktywacji immunoglobulin zaobserwowano w 4 dobie hospitalizacji, natomiast największy wzrost liczby limfocytów odnotowano na początku hospitalizacji. Podczas początkowego kontaktu z wirusem komórki w pierwszej kolejności różnicowały się, a następnie rozpoczynała się aktywacja limfocytów [68, 69, 70].

Spektroskopia ramanowska może być w przyszłości rozważana jako metoda wspomagająca badania przesiewowe, diagnostyczne.

7. DOROBEK NAUKOWY

7.1. Spis publikacji,

Których wyniki były częściowo przestawione w pracy:

1. Pietruszewska, M.; Biesiada, G.; Czepiel, J.; Birczyńska, M.; Moskal, P.; Kozicki, M.; Hola, E.; Garlicki A.; Wesełucha-Birczyńska, A.; Lymphocytes Studied by Raman Microspectroscopy. In Lymphocytes, Istifli, E. S.; Ila, H.B., Eds.; IntechOpen Ltd., London, UK, 2019, pp. 85-100.

2. Pietruszewska, M.; Biesiada, G.; Czepiel, J.; Birczyńska-Zych, M.; Moskal, P.; Garlicki, A.; Wesełucha-Birczyńska, A.; A 2D COS study of lymphocytes in the course of infectious mononucleosis. J. Mol. Struct. 2021, 1229, 129837 (1-9).

3. Pietruszewska, M.; Wesełucha-Birczyńska, A.; Biesiada, G.; Badania spektroskopowe limfocytów w przebiegu mononukleozy zakaźnej, w Wyzwania współczesnej medycyny i nauk pokrewnych analiza, diagnostyka i leczenie, Maciąg, M.; Danielewska, A. Eds.; Scientific Publishing House TYGIEL sp. z o.o., Lublin, Poland, 2020; pp. 100 – 110.

4. Pietruszewska M., Biesiada G., Czepiel J., Birczyńska-Zych M., Moskal P., Garlicki A., Wesełucha-Birczyńska, A, Raman spectroscopy of human lymphocytes in infectious mononucleosis, w przygotowaniu

7.2. Wystąpienia konferencyjne

1. XXVth International Conference on Raman Spectroscopy, ICORS2016, Fortaleza, Brazylia, 14-19.08.2016; *Human lymphocytes in infectious mononucleosis, studied by Raman microspectroscopy,* Wesełucha-Birczyńskaa A., Czepiel J.; Pietruszewska M., Hola E., Moskal P., Biesiada G., Birczyńska M., Garlicki A. (plakat)

2. International Symposium 2DCOS, Changchun, Chiny, 18-20.08.2019; *2D COS study of lymphocytes in the course of infectious mononucleosis,* Pietruszewska M., Biesiada G., Czepiel J., Birczyńska-Zych M., Moskal P., Garlicki A., Wesełucha Birczyńska A. (plakat)

3. XVth International Conference on Molecular Spectroscopy, ICMS2019, Wrocław-Wojanów, Polska, 15.09-19.09.2019; *Raman Spectroscopy of Lymhocytes in Mononucleosis,* Pietruszewska M., Wesełucha Birczyńska A., Biesiada G., Czepiel J., Birczyńska M., Moskal P., Garlicki A. (plakat)

-4. XVth International Conference on Molecular Spectroscopy, ICMS2019, Wrocław-Wojanów, M. Pietruszewska Polska, 15.09-19.09.2019; *Spectroscopic Examination of Erythocytes, in Mononucleosis,* Pietruszewska M., Herba P., Wesełucha Birczyńska A., Biesiada G., Czepiel J., Birczyńska M., Moskal P., Garlicki A. (plakat)

5. VI Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne Eskulap, Lublin, Polska, 30.11-01.12.2019; *Badania spekroskopowe limfocytów w przebiegu mononukleozy zakaźnej,* Pietruszewska M., Biesiada G., Wesełucha Birczyńska A. (wystąpienie ustne)

6. 11th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, ICAVS11, 23-26.08.2021; *Raman studies of activated lymphocytes in the infectious moninucleosis,* Pietruszewska M. (Prezentacja online)

7. XVI International Conference on Molecular Spectroscopy, Szczawnica, Poland, 11-14.09.2022; *Analysis of B cells for active and inactive lymphocytes,* Pietruszewska M., Biesiada G., Czepiel J., Birczyńska-Zych M., Lycke S., Vandenabeele P., Wesełucha Birczyńska A. (plakat)

7.3. Staże i wyjazdy naukowe

1. Ghent University, Gent, Belgia 01.05.2022-01.06.2022 (staż naukowy w grupie u Prof. Peter Vandaenabeele)

8. BIBLIOGRAFIA

[1]Leś K., Przybylski M., Łazińska B., Diagnostyka laboratoryjna mononukleozy zakaźnej u chorych leczonych ambulatoryjn. Postępy Nauk Medycznych, t. XXVIII, nr 4B, 2015 (42-47).

[2]Żuk-Wasek A., Charakterystyka białek wirusa Epsteina-Barr – ich udział w zakażeniu latentnym i powiązanie z procesami nowotworzenia, POST. MIKROBIOL., 2012, 51, 3, (191–201).

[3]Jenson H.B., Epstein-Barr virus. [w:] Nelson textbook of pediatrics. R.E. Berhman, R.M. Kliegman, H.B. Jenson (red.). Saunders, Philadelphia 2004, (1062-1066).

[4]Kalicki B., Maślany A., Milart J., Jung A., Przebieg i diagnostyka zakażenia EBV u dzieci- obserwacje kliniczne, Pediatr Med Rodz 2011, 7 (3), (247-252).

[5]Beaulieu B.L. Sullivan J.L., Epstein- Barr Virus Clinical Virology, 2005, (479- 493).

[6]Sybilski A. Szymaniec J., Ostre zapalenie nerek jako powikłanie infekcji wirusem Epsteina- Barr, Przeglad Pediatryczny. 36. (181-84).

[7]Bocian J., Januszkiewicz-Lewandowska D., Zakażenia EBV – cykl życiowy, metody diagnostyki, chorobotwórczość Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 2011;65, (286-298).

[8]Bienias J., Krzemień S., Mazurek U., Charakterystyka wirusa Epsteina-Barr- aspekty epidemiologiczne, bimolekularne i transplantologiczne Postępy Mikrobiologii 2007;46: (153-165).

[9]Faulkner G.C., Krajewski A.S., The ins and outs of EBV infection Trends in Microbiology 2000; 8, (185-189).

[10] Taga K., Taga H., Tosato G., Diagnosis of Atypical Cases of Infectious Mononucleosis Clinical Infectious Diseases 2001;33, (83-88).

[11] Dreyfus D.H., Nagasawa M., Kelleher C.A., Gelfand E.W., Stable expression of Epstein-Barr virus BZLF-1 encoded ZEBRA protein activates p53-dependent transcription in human Jurkat T-lymphomablastoid cells. Blood, 2000, 96, (625–634).

[12] Aozasa K., Zaki M.A.: Epidemiology and pathogenesis of nasal NK/T-cell lymphoma: a mini-review. Scientific World Journal. 2011, 11, (422–428)

[13] Talarek E., Duszczyk E., Popieliska J., i in. Przyczyny hospitalizacji dzieci z mononukleozą zakaźną Przegląd Pediatryczny 2007;37, (217-220).

[14] Hu L., Yang J., Cui T., et al. Diagnosis of infectious mononucleosis by combined detection of atypical lymphocytes and transaminase Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences] 2006;26, (384-385).

[15] Miendje Deyi Y., Goubau P., Bodéus M., False-Positive IgM Antibody Tests for Cytomegalovirus in Patients with Acute Epstein-Barr Virus Infection, European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2000;19, (557–560).

[16] Mel´on S., M´endez S., Iglesias B., et al. Involvement of adenovirus in clinical mononucleosis-like syndromes in young children. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2005;24, (314–318).

[17] Polz-Dacewicz M., Stec A., Koncewicz R., Zakażenia wirusem cytomegalii i Epsteina-Barr u dzieci Przegląd Epidemiologiczny, 2002;56, (65-72).

[18] Simon M.W., Unusual Presentations of EBV Illness in Children International Pediatrics, 2003;14.

[19] Styczyński J., Wąsewicz A., Balcar – Baroń A., Rozpoznanie mononukleozy zakaźnej u dzieci. Wiadomości Lekarskie, 1998;51, (46 -50).

[20] Andersson J.P., Clinical aspects on Epstein-Barr virus infection Scandinavian Journal of Infectious Diseases Suppl., 1991;80, (94-104).

[21] Torre D., Tambibi R., Acyclovir for Treatment of Infectious Mononucleosis: A Meta-analysis, Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 1999; 31, (543–547).

[22] Van der Horst C., Joncas J., Ahronheim G. et al. Lack of effect of peroral acyclovir for the treatment of acute infectious mononucleosis, Journal of Infectious Diseases, 1991;164, (788-792).

[23] Tynell E., Aurelius E. Brandell A. et al. Acyclovir and prednisolone treatment of acute infectious mononucleosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled study Journal of Infectious Diseases, 1996;174, (324-331).

[24] Torre D, Tambini R. Acyclovir for treatment of infectious mononucleosis: a meta-analysis. Scand J Infect Dis. 1999;31(6), (543-547).

[25] Öncel C., A rare clinical presentation of Ebstein-Barr virus Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2010;14, (211-212).

[26] Ishikawa T., Zhu B.L., Li D.R., et al., Epstein-Barr virus myocarditis as a cause of sudden death: two autopsy cases, Internaltional Journal of Legal Medicine, 2005;119, (231-235).

[27] Keramidas D., Antoniou D., Marinos L., Infectious mononucleosis manifested as a cecal mass, Journal of Pediatric Surgery, 2007;42, {1295-1297).

[28] Bukowczan M., Soja J., Sanak M., Prokop A., Szczeklik A., Sladek K., The incidence of rearranged form of Epstein-Barr Virus (WZhet) in the idiopathic interstitial pneumonias (IIP), American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2005 : Vol. 170, nr 2, (A125).

[29] Bocian J, Januszkiewicz-Lewandowska D. Epstein-Barr virus infection - life cycle, methods of diagnosis, associated diseases. Postepy Hig Med Dosw. 2011; 65, (286-298) .

[30] Nicklim J., Mikrobiologia krótkie wykłady, Warszawa, 2021, (296-390).

[31] Njie R., Bell A.I., Jia H., i wsp., The Effects of Acute Malaria on Epstein-Barr Virus (EBV) Load and EBV Specific T Cell Immunity in Gambian Children, The Journal of Infectious Diseases, 2009:199 (31-38).

[32] Crawford DH., Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2001; 356, (461-473).

[33] Flavell KJ, Murray PG. Hodgkin's disease and the Epstein-Barr virus. Mol Pathol. 2000; 53, (262-269).

[34] Thompson MP, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and cancer. Clin Cancer Res. 2004; 10, (803-821).

[35] Piecyk-Sidor M., Polz-Dacewicz MA., Ocular involvement in Epstein-Barr virus infection. Postepy Hig Med Dosw. 2005; 59, (602-607).

[36] Dobrzańska J., Szawczuk-Chabin J., Warzocha K., Rola wirusów w etiopatogenezie chłoniaków nieziarniczych. Onkol Prakt Klin. 2006; 2, (64-72).

[37] Goldenberg D., Golz A., Netzer A., Epstein-Barr Virus and Cancers of the Head and Neck, American Journal of Otolaryngology ,2001;22, (197-205).

[38] Piriou E., Asito A.S., Sumba P.O., et al. Early age at time of primary Epstein-Barr virus infection results in poorly controlled viral infection in infants from Western Kenya: clues to the etiology of endemic Burkitt lymphoma, Journal of Infectious Diseases 2012; 205, (906-913).

[39] Etemadi A., Mostafaei S., Yari K., Ghasemi A., Minaei Chenar H., Moghoofei M., Detection and a possible link between parvovirus B19 and thyroid cancer, Tumour Biol. 2017; 39: 1010428317703634.

[40] Rouse B.T., Sehrawat S.: Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? Nat. Rev. Immunol., 2010; 10, (514-526).

[41] Gołąb J. Jakóbisiak M. Lasek W. Immunologia 2004 : 76-78, (264-287).

[42] Male, D., Brostoff, J., Roth, D.B., Roitt, I., Immunology, 7th. ed., Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2006, (127-182).

[43] Hames B.D., Biochemia krótkie wykłady, Warszawa, 2021, (33-169).

[44] Carney W. P., Rubin R. H., Hoffman R. A., Hansen W. P., Healey K., Hirsch M. S., Analysis of T lymphocyte subsets in cytomegalovirus mononucleosis, J Immunol *1* June 1981; 126 (6), (2114–2116).

[45] Kwak, K., Akkaya, M., Pierce, S.K., B cell signaling in context, Natur. Immunol. . 2019, 20, (963–969).

[46] Shaw R.K., Issekutz A.C., Fraser R., et al., Bilateral adrenal EBV-associated smooth muscle tumors in a child with a natural killer cell deficiency, Blood. 2012 Mar 16 (Published online before print).

[47] Turk SM., Liudmila RJ., Chesnokova LS., Hutt-Fletcher LM., Antibodies to gp350/220 Enhance the Ability of Epstein-Barr Virus To Infect Epithelial Cells, Journal of Virology 2006; 80(19), (9628-9633).

[48] Lowe-Shannon C., Adland E., Bell AI et al., Features Distinguishing Epstein-Barr Virus Infection of Ephitelial Cells and B Cells: Viral Genome Expression, Genome Maintenance, and Genome Amplification, Journal of Virology 2009; 83(15), (7749-7760).

[49] Rea T., Russo J., Katon W., et al., Prospective Study of the Natural History of Infectious Mononucleosis Caused by Epstein-Barr Virus, JABFP July-August 2001;14:4.

[50] Williams H., Macsween K., McAulay K., et al., Analysis of immune activation and clinical events in acute infectious mononucleosis, Journal of Infectious Diseases 2004;190, (63-71).

[51] Pietruszewska, M.; Biesiada, G.; Czepiel, J.; Birczyńska, M.; Moskal, P.; Kozicki, M.; Hola, E.; Garlicki A.; Wesełucha-Birczyńska, A.; Lymphocytes Studied by Raman Microspectroscopy. In Lymphocytes, Istifli, E. S.; Ila, H.B., Eds.; IntechOpen Ltd., London, UK, 2019, (85-100).

[52] Schroeder Jr H.W., Cavacini L., Structure and Function of Immunoglobulins, J. Allergy Clin. Immunol. 125 (2010) S41–S52, doi:10.1016/j.jaci.2009.09.046.

[53] Gieryńska M. Mechanizmy odporności w zakażeniach wirusowych, [w:] Wróblewska M., Dziewiątkowski T. (red.), Choroby wirusowe w praktyce klinicznej, PZWL, Warszawa 2017.

[54] Kęcki Z., Podstawy spektroskopii molekularnej. Warszawa, PWN, 1975.

[55] Twardowski J., Biospektroskopia 4, PWN, Warszawa, 1990, s. 12-54, s. 112-129, s. 188- 199, s. 208-211.

[56] Barańska H., Łabudzinska A., Terpiński J., Laserowa spektrometria ramanowska, PWN, Warszawa 1981.

[57] Scherer, J.R., Experimental considerations for accurate polarization measurements, in Analytical Raman Spectroscopy, Grasselli, J.G.; Bulkin, B.J. Eds.;. John Wiley & Sons, New York 1991, (45-57).

[58] Noda I., Dowrey A.E., Marcott C., Story G.M., Generalized two-dimensional correlation spectroscopy, generalized two-dimensional correlation spectroscopy, Appl. Spectrosc. 54 (2000) 236A–248A, doi:10.1366/0003702001950454.

[59] INoda., Ozaki Y., Two-dimensional Correlation Spectroscopy and Applications in Vibrational and Optical Spectroscopy, Wiley, England, 2004.

[60] Tu A. T., Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications, John Wiley & Sons, New York, 1982.

[61] Fawcett V. and Long D. A., Biological Applications of Raman Spectroscopy, in Molecular Spectroscopy, ed. R. F. Barrow, Royal Society of Chemistry, 1976, vol. 4, ch. 4.

[62] Stevens A. and Lowe J. S., Human Histology, Wydawnictwo Lekarskie PZWL & Wydawnictwo Medyczne Słotwinski Verlag ´ , ed. M. Zabel, Warszawa, Poland, 2nd edn, 2000.

[63] Batista F. D., Iber D. and Neuberger M. S., B cells acquire antigen from target cells after synapse formation, Nature, 2001, 411, (489–494).

[64] Park J. Y., Kim H. O., Kim K.-D., Kim S. K., Lee S. K. and Jung H., Monitoring the status of T-cell activation in a microuidic system, Analyst, 2011, 136, (2831–2836).

[65] Diem M., Romeo M., Boydston-White S., Miljkovic M., Matthaus C. A decade of vibrational micro-spectroscopy of human cells and tissue (1994-2004). Analyst. 2004;129, (880-885).

[66] Lasch P., Boese M., Pacifico A., Diem M., FT-IR spectroscopic investigations of single cells on the subcellular level, Vibrational Spectroscopy. 2002;28 (147-157).

[67] Wesełucha-Birczyńska A., Kozicki M., Czepiel J., Birczyńska M. Raman micro-spectroscopy tracing human lymphocyte activation. Analyst. 2013;138(23), (7157-7163).

[68] Pietruszewska M., Biesiada G., Czepiel J., Birczyńska M., Moska, P., Kozicki M., Hola E., Garlicki A., Wesełucha-Birczyńska A., Lymphocytes Studied by Raman Microspectroscopy. In Lymphocytes, Istifli, E. S.; Ila, H.B., Eds.; IntechOpen Ltd., London, UK, 2019, (85-100).

[69] Pietruszewska M., Biesiada G., Czepiel J., Birczyńska-Zych M., Moskal P., Garlicki A., Wesełucha-Birczyńska A., A 2D COS study of lymphocytes in the course of infectious mononucleosis. J. Mol. Struct. **2021**, 1229, 129837 (1-9).

[70] Pietruszewska M., Wesełucha-Birczyńska A., Biesiada G., Spectroscopic studies of lymphocytes in the course of infectious mononucleosis (Abstract in English), in Challenges of modern medicine and related sciences - analysis, diagnosis and treatment (in Polish), Maciąg, M.; Danielewska, A. Eds.; Scientific Publishing House TYGIEL sp. z o.o., Lublin, Poland, 2020, (100-110).

[71] Abramczyk, H., Imiela, A., Brożek-Płuska, B., Kopeć, M., Sarmacki, J., Śliwińska, A., Aberrant Protein Phosphorylation in Cancer by Using Raman Biomarkers. Cancers. 2019, 11, 2017.

[72] Brożek-Płuska B., Metody spektroskopowe w diagnostyce zmian nowotworowych ludzkiego gruczołu piersiowego, Łódź, Zeszyty Naukowe, Nr 1157, 2013, s. 26,57.

[73] Notingher I., Raman spectroscopy cell-based biosensors, Sensors 7, 2007, (1343-1358), doi:10.3390/S7081343.

[74] Biotec M., MACSxpress® Technology Untouched cell isolation directly from blood products, Germany, 2018, pdf. 130-100-072.03.

[75] Pietruszewska M., Biesiada G., Czepiel J., Birczyńska-Zych M., Moskal P., Garlicki A., Wesełucha-Birczyńska, A, Raman spectroscopy of human lymphocytes in infectious mononucleosis, w przygotowaniu.

[76] Cohen J.I., Infection with the Epsteina-Barr virus. Infectious mononucleosis. In Kasper Fauci D.L.; Harrison, A.S., Infectious Diseases, Czelej Publishing Company, Lublin, Poland, 2012, Vol. II, Ch. 82.

[77] LeBien T.W., Tedder T.F., B lymphocytes: how they develop and function. Blood 2008, 112, (1570–1580).

[78] Qian W., Krimm S., Vibrational studies of the disulfide group in proteins. J. Raman Spectrosc. **1992**, 23, (517–521).

[79] Stawosk, I., Waga J., Wesełucha-Birczyńska A., Dziurka M., Podolska G., Aleksandrowicz E., Skoczowski A., Does nitrogen fertilization affect the structures of gluten and gliadin proteins in hypoallergenic wheat? Molecules **2022**, 27, 5684.

[80] Rosa D., Saletti G., De Gregorio E., Zorat F., Comar C., D'Oro U., Nuti S., Houghton M., Barnaba V., Pozzato G., Abrignani S., Activation of naıve B lymphocytes via CD81, a pathogenetic mechanism for hepatitis C virus-associated B lymphocyte disorders, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005, 102, 18544–18549.

[81] Qian W., Zhao W., Krimm S., Vibrational studies of disulfide group in proteins. Part IV. SS and CS stretch frequencies of known peptide and protein disulfide bridges, J. Mol. Struct. 250 (1991) (89–102).

[82] Spiro T.G., Gaber B.P., Laser Raman scattering as a probe of protein structure, Ann. Rev. Biochem. 46 (1977) (553–572).

[83] Erfurth S.C., Kiser E.J., Peticolas W.L., Determination of the backbone structure of nucleic acids and nucleic acid oligomers by laser Raman scattering, Proc. Nat. Acad. Sd. USA 69 (1972) (938–941) .

[84] Stevens A., Lowe J., Human Histology, 2nd Edition, Timers Mirror International Publishers Ltd, 1997.

[85] de la O-Cuevas E., Badillo-Ramırez I., Islas S.R., Araujo-Andrade C., Saniger J.M., Sensitive Raman detection of human recombinant interleukin-6 mediated by DCDR/GERS hybrid platforms, RSC Adv. 9 (2019) 12269–12275.

[86] De Gelder J., De Gussem K., Vandenabeele P., Moens L., Reference database of Raman spectra of biological molecules, J. Raman Spectrosc. 38 (2007) (1133– 1147).

[87] Deenick E.K., Avery D.T., Chan A., Berglund L.J., Ives M.L., Moens L., Stoddard J.L., Bustamante J., Boisson-Dupuis S., Tsumura M., Kobayashi M., Arkwright P.D., Averbuch D., Engelhard D., Roesler J., Peake J., Wong M., Adelstein S., Choo S., Smart J.M., French M.A., Fulcher D.A.,. Cook M.C, Picard C., Durandy A., Klein C., Holland S.M., Uzel G., Casanova J.-.L., Ma C.S., Tangye S.G., Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells, J. Exp. Med. Nov. 11 (2013) (1– 15).

[88]]Konforte D., Simard N., Paige C.J., IL-21: an executor of B cell fate, J. Immunol. 182 (2009), (1781–1787) .

[89] Hamming O.J., Kang L., Svensson A., Karlsen J.L., Rahbek-Nielsen H., Paludan S.R., Hjorth S.A., Bondensgaard K., Hartmann R., Crystal structure of interleukin-21 receptor (IL-21R) bound to IL-21 reveals that sugar chain interacting with WSXWS motif is integral part of IL-21R, J. Biol. Chem. 287 (2012) (9454–9460).

[90] Bondensgaard K., Breinholt J., Madsen D., Højmark Omkvist D., Kang L., Worsaae A., Becker P., Bruun Schiødt C., Hjorth S.A., The existence of multiple conformers of interleukin-21 directs engineering of a superpotent analogue, J. Biol. Chem. 282 (2007) 23326–23336.

[91] Walsh S.T.R., Structural insights into the common γ -chain family of cytokines and receptors from the interleukin-7 pathway, Immunol Rev. 250 (2012), (303– 316).

[92] Salehi H., Salehi M., Roghanian R., Bozari M., Taleifard S.; Salehi M.M., Salehi M., Comparison of serological and molecular test for diagnosis of infectious mononucleosis. Adv. Biomed. Res. **2016**, 5, 95.

[93] Rovedo M., Longnecker R., Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2B (LMP2B) Modulates LMP2A Activity. J. Virol. 2007, 81, (84–94).

[94] Lu, J.; Chen, S.-Y.; Chua, H.-H.; Liu, Y.-S.; Huang, Y.-T. ; Chang, Y.; Chen, J.-Y.; Sheen, T.-S.; Tsai, C.-H. Upregulation of Tyrosine Kinase TKT by the Epstein-Barr Virus Transactivator Zta, J. Virol. 2000, 74, 7391–7399.

[95] Siamwiza, M.N.; Lord, R.C.; Chen, M.C.; Takamatsu, T.; Harada, I.; Matsuura, H.; Shimanouchi, T.; Interpretation of doublet at 850 and 830 cm-1 in Raman spectra of tyrosyl residues in proteins and certain model compounds. Biochem. 1975, 14, 4870–4876.

[96] Fish, K.; Comoglio, F.; Shaffer III, A. L.; Ji, Y.; Pan, K.-T.; Scheich, S.; Oellerich, A.; Doebele, C.; Ikeda, M.; Schaller, S. J.; Nguyen, H.; Muppidi, J.; Wright, G. W.; Urlaub, H.; Serve, H.; Staudt, L. M.; Longnecker, R.; Oellerich, T.; Rewiring of B cell receptor signaling by Epstein–Barr virus LMP2A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2020, 117, 26318–26327.