

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ivana Marković

METABOLIČKA KARAKTERIZACIJA LIMFOCITA B U KRONIČNOJ LIMFOCITNOJ
LEUKEMIJI PRIMJENOM SLIKOVNE SPEKTROMETRIJE MASA

Doktorski rad

Osijek, 2025.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ivana Marković

METABOLIČKA KARAKTERIZACIJA LIMFOCITA B U KRONIČNOJ LIMFOCITNOJ
LEUKEMIJI PRIMJENOM SLIKOVNE SPEKTROMETRIJE MASA

Doktorski rad

Osijek, 2025.

Mentor: nasl. izv. prof. dr. sc. Željko Debeljak, mag. med. biochem., specijalist medicinske biokemije

Komentor: prof. dr. sc. Branko Dmitrović, dr. med., specijalist patološke anatomije

Rad ima 104 stranice, 11 tablica i 20 slika.

Predgovor

Ovaj je doktorski rad napravljen u sklopu infrastrukturnog projekta *Istraživanje i dijagnostika malignih, infektivnih i rijetkih metaboličkih bolesti temeljena na MALDI TOF tehnologiji* (KK.01.1.1.02.0015) koji je financirala Europska Unija te istraživačkog projekta *Leukocitni metabolički biljezi u kroničnoj limfocitnoj leukemiji prostorno razlučeni slikovnom spektrometrijom masa* (HRZZ-IP-2022-10-8228) koji financira Hrvatska zaklada za znanost.

Zahvala

Zahvaljujem mentoru, prof. Debeljaku, na dijeljenom entuzijazmu, nesebičnoj pomoći te velikoj moralnoj podršci i ohrabrenju tijekom konceptualizacije i izrade ovog rada. Hvala komentoru, prof. Dmitroviću, na pristupačnosti i konstruktivnim savjetima.

Zahvaljujem suradnicima iz Odjela za kliničku kemiju i kontrolu kvalitete Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek koji su sudjelovali u organizaciji i prikupljanju uzoraka ispitanika, kao i kolegama hematolozima i transfuziolozima koji su ispitanike regrutirali.

Hvala magistri Dobrošević što me je naučila kako izolirati stanice i magistrama Lukić i Pavičić na pomoći oko analize uzoraka.

Hvala mojoj obitelji koja mi je podrška i najveći navijač od prvog stavljanja školske torbe na leđa, a od tada je prošlo 30 godina. Hvala sestri Bojani koja je lektorirala ovaj rad.

I posebno hvala mojim dečkima – Ivanu, Fabijanu i Ivoru, na velikoj podršci i strpljenju.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Kronična limfocitna leukemija	1
1.1.1. Definicija i epidemiologija kronične limfocitne leukemije	1
1.1.2. B limfopoeza i uloga B-staničnog receptora	1
1.1.3. Etiologija kronične limfocitne leukemije	5
1.1.4. Klinička prezentacija, dijagnostika i procjena tumorskog opterećenja	5
1.1.5. Prognostički markeri	7
1.1.6. Terapija kronične limfocitne leukemije	10
1.1.7. Inhibitori Brutonove tirozin kinaze	14
1.2. Metaboličke promjene limfocita B u kroničnoj limfocitnoj leukemiji	17
1.3. Bioanalitičke tehnike za proučavanje metaboloma stanica	21
1.3.1. Vrste uzoraka i analitičke tehnike	21
1.3.2. Slikovna spektrometrija masa temeljena na MALDI-TOF MS tehnologiji	22
2. HIPOTEZA	27
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	28
4. ISPITANICI I METODE	29
4.1. Ustroj studije	29
4.2. Ispitanici	29
4.2.1. Uzorci za razvoj protokola za izolaciju leukocita i pripravu preparata za MALDI-TOF slikovnu spektrometriju masa zasebnih CD19+ limfocita	29
4.2.2. Kontrolna skupina	30
4.2.3. Neliječeni ispitanici s kroničnom limfocitnom leukemijom	30
4.2.4. Liječeni ispitanici s kroničnom limfocitnom leukemijom	30
4.3. Metode	33
4.3.1. Popis kemikalija, preparativnih i analitičkih uređaja	33

4.3.2.	Razvoj izolacijskog protokola za MALDI-TOF MSI analizu zasebnih stanica.....	33
4.3.3.	Razvoj protokola za fiksaciju stanica i uklanjanje soli.....	34
4.3.4.	Procjena kvalitete preparata.....	34
4.3.5.	Razvoj protokola za sublimaciju matrice i njenu rekristalizaciju.....	35
4.3.6.	Optimizacija analitičkih uvjeta MALDI-TOF MSI zasebnih stanica.....	35
4.3.7.	Optimizirani protokol predanalitičkih i analitičkih uvjeta za MALDI-TOF MSI CD19+ limfocita.....	35
4.4.	Statistička obrada podataka.....	38
4.4.1.	Razlikovanje metaboličkog otiska CD19+ limfocita od okoline na temelju m/z kvocijenata.....	38
4.4.2.	Obrada masenih spektara CD19+ limfocita zdravih ispitanika i neliječenih KLL ispitanika.....	38
4.4.3.	Obrada masenih spektara CD19+ limfocita neliječenih i liječenih KLL ispitanika.....	39
4.4.4.	Provizorna m/z anotacija i neciljano metaboličko profiliranje.....	39
5.	REZULTATI.....	41
5.1.	Evaluacija razvoja protokola za izolaciju leukocita i pripravu staničnog preparata za MALDI-TOF MSI zasebnih CD19+ limfocita.....	41
5.2.	MALDI-TOF MSI zasebnih CD19+limfocita i neciljano metaboličko profiliranje u neliječenih ispitanika.....	44
5.3.	MALDI-TOF MSI zasebnih CD19+ limfocita i neciljano metaboličko profiliranje terapijskih učinaka BTKi-ja.....	49
6.	RASPRAVA.....	61
6.1.	MALDI-TOF MSI zasebnih CD19+ limfocita.....	61
6.2.	Metabolička karakterizacija CD19+ limfocita.....	67
6.2.1.	Glutation i oksidativni status stanica.....	67
6.2.2.	Metabolizam ugljikohidrata i lipida.....	70
6.2.3.	Autofagija i apoptoza.....	71

6.2.4. Upalni medijatori i signalne molekule.....	72
6.3. Ograničenja istraživanja i buduće perspektive.....	76
7. ZAKLJUČAK.....	77
8. SAŽETAK.....	78
9. SUMMARY.....	80
10. LITERATURA.....	82
11. ŽIVOTOPIS.....	101

Popis kratica

α -KG – α -ketoglutarat

ABCA1 – ATP vezujući transporter 1

AKT – protein kinaza B (prema engl. *AKR mouse thymoma*)

AMPK – AMP-om aktivirana protein kinaza (prema engl. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*)

ApoA – apolipoprotein A

BCL-2 – B-stanični limfom 2 (prema engl. *B-cell lymphoma-2*)

BCR – B-stanični receptor (prema engl. *B cell receptor*)

BMX – kinaza koštane srži na kromosomu X

BTK – Brutonova tirozin kinaza (prema engl. *Brutton's tyrosine kinase*)

BTKi – inhibitori Brutonove tirozin kinaze (prema engl. *Brutton's tyrosine kinase inhibitors*)

CARD11 – protein 11 s domenom za regrutiranje kaspaze

CAR-T – T stanice koje izražavaju kimerične receptore (prema engl. *chimeric antigen receptor T cell*)

CAT-1 – transporter kationskih aminokiselina 1

CHCA – α -cijano-4-hidroksicinaminska kiselina (prema engl. *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*)

CID – kolizijom potaknuta disocijacija (prema engl. *collision-induced dissociation*)

CLP – zajednička limfoidna progenitorska stanica (prema engl. *common lymphoid progenitor cell*)

CoA – koenzim A

cPA – ciklična fosfatidična kiselina

CPT – karnitin palmitoil transferaze (prema engl. *carnitine palmitoyltransferase*)

CysLT1 – cisteinil-leukotrien receptor 1 (prema engl. *cysteinyl leukotriene receptor 1*)

DAG – diacilglicerol

dcSAM – S-adenozilmetioninamin

DHB – 2,5-dihidrobenzojeva kiselina (prema engl. *2,5-dihydroxybenzoic acid*)

DHF – dihidrofolat

DHFR – dihidrofolat reduktaza

EGFR – receptor epidermalnog faktora rasta

EZH2 – pojačivač zeste homologa 2

FDR – stopa lažnih otkrića (engl. *false discovery rate*)

FFA – slobodne masne kiseline (prema engl. *free fatty acids*)

FITC – fluorescein izotiocijanat (prema engl. *fluorescein isothiocyanate*)

FMN – flavin mononukleotid

G6P – glukoza-6-fosfat

GLUT – transporter glukoze

GSH – reducirani glutation

GSNO – S-nitrozoglutation

GSSG – oksidirani glutation

HCA – hijerarhijsko klasteriranje (prema engl. *high clustering analysis*)

HMDB – baza humanog metaboloma (prema engl. *Human Metabolome Database*)

HMG-CoA – 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A

HMGCR – 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktaza

HSC – pluripotentna matična stanica (prema engl. *hematopoietic stem cell*)

IgH – teški lanac imunoglobulina

IgHV – varijabilna regija teškog lanca imunoglobulina

IKK – inhibitor NF- κ B kinaze

IP3 – inozitol trifosfat

ITK – interleukin-2-inducibilna T-stanična kinaza

ITO – indij-kositar oksid (prema engl. *indium-tin oxide*)

JAB 1 – protein koji veže c-Jun aktivacijsku domenu-1 (prema engl. *c-Jun activation domain binding protein-1*)

KEGG – Kyoto Encyclopedia of genes and genomes

KLL – kronična limfocitna leukemija

LCFA-CoA – dugolančani acil koenzim A

LC-Q-TOF – tekućinska kromatografija spregnuta s kvadrupol i TOF spektrometrima masa (prema engl. *liquid chromatography-quadrupole-time of flight*)

LPA – lizofosfatidična kiselina

LPC – lizofosfatidilkolin

LPL – lipoprotein lipaza

LTE4 – leukotrien E4

MALDI-TOF MS – matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija spregnuta s masenim detektorom koji mjeri vrijeme preleta (prema engl. *matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight*)

MALT1 – sluznici pridružen limfoidni translokacijski protein 1

MAPK – mitogenom aktivirana protein kinaza

MAPKK – MAPK kinaza

MAPKKK – MAPK kinaza kinaza

MBL – monoklonska B limfocitoza

MCL – limfom stanica plašta (prema engl. *mantle cell lymphoma*)

MS – spektrometrija masa

MSI – slikovna spektrometrija masa (prema engl. *mass spectrometry imaging*)

mTOR – mehanistička meta rapamicina (prema engl. *mechanistic target of rapamycin*)

Nd:YAG – granit neodimija, itrija i aluminijevih soli (prema engl. *neodymium-doped yttrium aluminum garnet*)

NFAT – nuklearni faktor aktiviranih T stanica

NF- κ B – nuklearni faktor- κ B (prema engl. *nuclear factor kappa B*)

NGS – sekvenciranje sljedeće generacije (prema engl. *next-generation sequencing*)

NMR – nuklearna magnetska rezonanca (engl. *nuclear magnetic resonance*)

NOS – reaktivni dušikovi spojevi

PA – fosfatidična kiselina

PBS – fosfatom puferirana fiziološka otopina (prema engl. *phosphate buffered saline*, PBS)

PCA – analiza glavnih komponenti (prema engl. *principal component analysis*)

PD1 – protein programirane stanične smrti 1

PD-L1 – ligand proteina programirane stanične smrti 1

PDX – stanice ksenografta izvedenih od pacijenta (prema engl. *patient-derived xenograft*)

PGC-1 α – proliferatorom aktivirani receptor gama koaktivator 1- α (prema engl. *proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α*)

PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaza (prema engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*)

PIP2 – fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat

PIP3 – fosfatidilinozitol-3,4,5-trisfosfat

PKC β – protein kinaza C β

PLA2 – fosfolipaza A2

PLC γ 2 – fosfolipaza C gama 2 (prema engl. *phospholipase C gamma 2*)

PLD2 – fosfolipaza D2

PLS-DA – diskriminantna analiza parcijalnih najmanjih kvadrata (prema engl. *partial least squares – discriminant analysis*)

PPAR – peroksisomalni proliferatorom aktivirani receptor (prema engl. *peroxisome proliferator-activated receptor*)

RFK – riboflavin kinaza

ROI – područje interesa (prema engl. *region of interest*)

ROS – reaktivni kisikovi spojevi (prema engl. *reactive oxygen species*)

S1P – sfingozin-1-fosfat

S1PR1 – sfingozin-1-fosfat receptor 1 (prema engl. *sphingosine-1-phosphate receptor 1*)

SAH – S-adenozilhomocistein

SAM – S-adenozilmetionin

SFK – sfingozil-fosfokolin

SH2 – Src homologne 2 domene

sIg – površinski membranski imunoglobulin (prema engl. *surface immunoglobulin*)

SK – sfingozin kinaza

SLL – limfom malih limfocita (prema engl. *small lymphocytic lymphoma*)

SM – sfingomijelin

SNO-CoA – S-nitrozo koenzim A

STAT3 – provoditelj signala i aktivator transkripcije 3 (prema engl. *signal transducer and transcription activator 3*)

STIM1 – molekula stromalne interakcije 1

SYK – protein-tirozin kinaza (prema engl. *spleen tyrosine kinase*)

TCA – Krebsov ciklus (prema engl. *tricarboxylic acid cycle*)

TEC – Tec protein tirozin kinaza

THF – tetrahidfofolat

TIC – ukupni intenzitet signala m/z kvocijenata (prema engl. *total ion count*)

TIGAR – TP53-inducirani regulator glikolize i apoptoze

TMP – tiamin monofosfat

TPP – tiamin pirofosfat

TTM – skor ukupne tumorske mase (prema engl. *total tumor mass score*)

Popis tablica

Tablica 1.1. Klinički stadiji za stupnjevanje težine KLL-a.....	7
Tablica 1.2. Varijable za izračun TTM skora.....	7
Tablica 1.3. Najučestalije kromosomske aberacije, prognoza i utjecaj na stanični metabolom.....	8
Tablica 1.4. Kriteriji za definiciju simptomatske ili aktivne bolesti prema smjernicama iwCLL-a.....	11
Tablica 1.5. Prva linija liječenja KLL-a prema Radnoj skupini za kroničnu limfocitnu leukemiju KroHem-a (v1.2023.).....	12
Tablica 1.6. Liječenje relapsa/refraktorne KLL prema Radnoj skupini za kroničnu limfocitnu leukemiju KroHem-a (v1.2023.).....	13
Tablica 1.7. Opis i farmakološka svojstva BTKi-ja.....	16
Tablica 4.1. Demografski i klinički podaci ispitanika svih skupina.....	32
Tablica 4.2. Odnos broja leukocita u punoj krvi, volumena krvi koji ulazi u pripravu i volumena PBS-a nakon završnog centrifugiranja.....	36
Tablica 5.1. Provizorno anotirani m/z kvocijenti čiji je sadržaj promijenjen u KLL-u i njihov biološki značaj.....	48
Tablica 5.2. Provizorno anotirani m/z kvocijenti čiji je sadržaj promijenjen kod terapije s BTKi-jevima u odnosu na neliječene KLL ispitanike.....	56

Popis slika

Slika 1.1. Imunološko sazrijevanje poliklonskih limfocita B od stadija pluripotentne matične stanice do plazma stanice.....	2
Slika 1.2. BCR signalizacija.....	4
Slika 1.3. Prognostička relevantnost kromosomskih aberacija u KLL-u.....	9
Slika 1.4. Metaboličko reprogramiranje u KLL-u.....	20
Slika 1.5. Shematski prikaz iMScope TRIO MALDI-IT-TOF uređaja s integriranim mikroskopom.....	24
Slika 1.6. Princip MALDI-TOF MS analize.....	25
Slika 4.1. Broj i podjela ispitanika na skupine.....	31
Slika 4.2. Optimizirani predanalitički (izolacija i priprava staničnog preparata) i analitički (postavke MALDI-TOF analize) protokol za MSI zasebnih CD19+ limfocita.....	37
Slika 5.1. Prikaz različitih razvojnih protokola i optimiziranog protokola za izolaciju leukocita i izradu staničnog preparata za MADLI-TOF MSI CD19+ limfocita.....	42
Slika 5.2. Identifikacija, odabir mjesta snimanja i koregistracija optičke i MS slike kod MALDI-TOF MSI jednog CD19+ limfocita.....	43
Slika 5.3. TIC normalizirani prosječni spektri masa odabranih ROI-ja kod usporedbe DDK i KLL skupina ispitanika. A) 300 – 600 Da, B) 600 – 950 Da.....	45
Slika 5.4. PLS-DA i redukcija dimenzionalnosti, točnost klasifikacije i vulkanski dijagrami m/z kvocijenata za masene raspone 300 – 600 Da i 600 – 950 Da.....	46
Slika 5.5. <i>Kutija-i-brkovi</i> dijagram s prikazom odnosa intenziteta signala 7 m/z kvocijenata u KLL i DDK CD19+ limfocitima.....	47
Slika 5.6. TIC normalizirani prosječni spektri masa odabranih ROI-ja kod usporedbe KLL, IBR i AKAL skupina ispitanika. A) 300 – 600 Da, B) 600 – 950 Da.....	51
Slika 5.7. Multivarijantna analiza metaboloma CD19+ limfocita iz KLL, IBR i AKAL skupina za maseni raspon 300 – 600 Da.....	52

Slika 5.8. <i>Kutija-i-brkovi</i> dijagram s prikazom statistički značajnih razlika u intenzitetu signala m/z kvocijenata za sve skupine ispitanika u masenom rasponu 300 – 600 Da.....	53
Slika 5.9. Vulkanski dijagrami parnih usporedbi m/z kvocijenata koji pridonose razdvajanju skupina u masenom rasponu 300 – 600 Da.....	54
Slika 5.10. Promjene u masenim spektrima CD19+ limfocita izazvane djelovanjem BTKi-jeva (maseni raspon 300 – 600 Da).....	55
Slika 5.11. Multivarijantna analiza metaboloma CD19+ limfocita iz KLL, IBR i AKAL skupina za maseni raspon 600 – 950 Da.....	58
Slika 5.12. Prikaz provizorno identificiranih metabolita čiji je sadržaj promijenjen kod KLL-a i metabolita čiji je sadržaj promijenjen ovisno o utjecaju terapije.....	59

1. UVOD

1.1. Kronična limfocitna leukemija

1.1.1. Definicija i epidemiologija kronične limfocitne leukemije

Kronična limfocitna leukemija (KLL) hematološka je neoplazma karakterizirana klonalnom ekspanzijom CD5+ limfocita B u koštanoj srži, krvi, limfne čvorove i slezenu. KLL je prema klasifikaciji hematopoetskih neoplazmi Svjetske zdravstvene organizacije svrstana u skupinu pre-neoplastičnih i neoplastičnih proliferacija malih limfocita (1) te je opisana kao *leukemijski limfocitni limfom* koji se od limfoma malih limfocita (engl. *small lymphocytic lymphoma*, SLL) razlikuje samo po svojoj leukemijskoj manifestaciji (2).

KLL je najčešća hematološka neoplazma u odraslih na čiju incidenciju značajno utječu geografska regija, spol, rasa i dob. Medijan dobi pri dijagnozi KLL-a je ~ 70 godina te je incidencija dvostruko veća kod muškaraca (1.9:1) (3). Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo stopa incidencije KLL-a 2022. godine u Hrvatskoj je iznosila ~ 8 na 100 000 stanovnika (4). Pojavnost KLL-a značajno se razlikuje po geografskim regijama – najviša je stopa incidencije u zemljama sjeverne Amerike i Europe, dok je niža u afričkim zemljama i u Aziji (5). Istraživanja provedena na članovima obitelji pokazuju da bliski rođaci (prvo koljeno) pacijenata s KLL-om imaju 2 do 8 puta veći rizik za razvoj bolesti (6).

1.1.2. B limfopoeza i uloga B-staničnog receptora

Stanice limfocitne loze nastaju u koštanoj srži diferencijacijom pluripotentnih matičnih stanica (engl. *hematopoietic stem cell*, HSC) u zajedničke limfoidne progenitorske stanice (engl. *common lymphoid progenitor cell*, CLP). Pod utjecajem okolišnih čimbenika i citokina, CLP diferenciraju i sazrijevaju u limfocitne populacije: limfocite T i B i NK-stanice. Prekursori limfocita B u koštanoj srži podliježu antigen-neovisnoj limfopoezi, koja rezultira imunokompetentnim »djevičanskim« limfocitima B (7). Tijekom diferencijacije limfocita B u koštanoj srži, gen za teški lanac imunoglobulina (IgH) nasumično se preuređuje da bi proizveo jedinstvenu sekvencu genetskog koda (iz V, J i D regija) koja određuje specifičnost imunoglobulina. Samo se funkcionalna preuređenja IgH gena zadržavaju u B-stanicama i kombiniraju sa slično preuređenim genskim produktima lakog lanca imunoglobulina (κ ili λ) kako

bi se formirao potpuni imunoglobulinski receptor. B-stanice bez produktivnih preuređenja IgH-a podliježu apoptozi (8). Svaka populacija limfocita B ima drugačije preuređen gen za imunoglobulin M te se takvi limfociti B nazivaju poliklonskim limfocitima. Nakon preuređivanja gena za laki lanac, IgM se transportira na površinu stanice i tvori funkcionalni B-stanični receptor (engl. *B cell receptor*, BCR). Nakon ekspresije IgD-a na površini stanice, djevičanski limfociti B napuštaju koštanu srž i odlaze u sekundarne limfne organe. U interakciji BCR-a i specifičnog antigena, neki aktivirani limfociti B podliježu izotipnom prekapčanju konstantne regije IgH-a i prelaze u IgG, IgA ili IgE. BCR se sastoji od molekula imunoglobulina koje su istovjetne antitijelima koja proizvode zreli limfociti B i plazma stanice (7) (Slika 1.1.).

Koštana srž				Periferna krv		Limfni čvor/ koštana srž
HSC	CLP	Pro-B	Pre-B	Zreli B	Plazmacito- idna B stanica	Plazma stanica
						
CD34 CD117	CD34 TdT CD117 Flt-3	CD34 TdT CD19 CD22 (c) HLA-DR CD10	TdT HLA-DR CD10 CD19 CD22 (s)+/- CD24 CD20 Cμ CD45 Ra Pre-BCR	HLA-DR CD19 CD22 CD24 CD20 CD21 CD45Ra sIgM, IgD (BCR)	HLA-DR CD19 CD20 CD22 CD34 CD21+/- CD45Ra sIgM, G, A (BCR)	CD38 CD138 sIg- cIg+

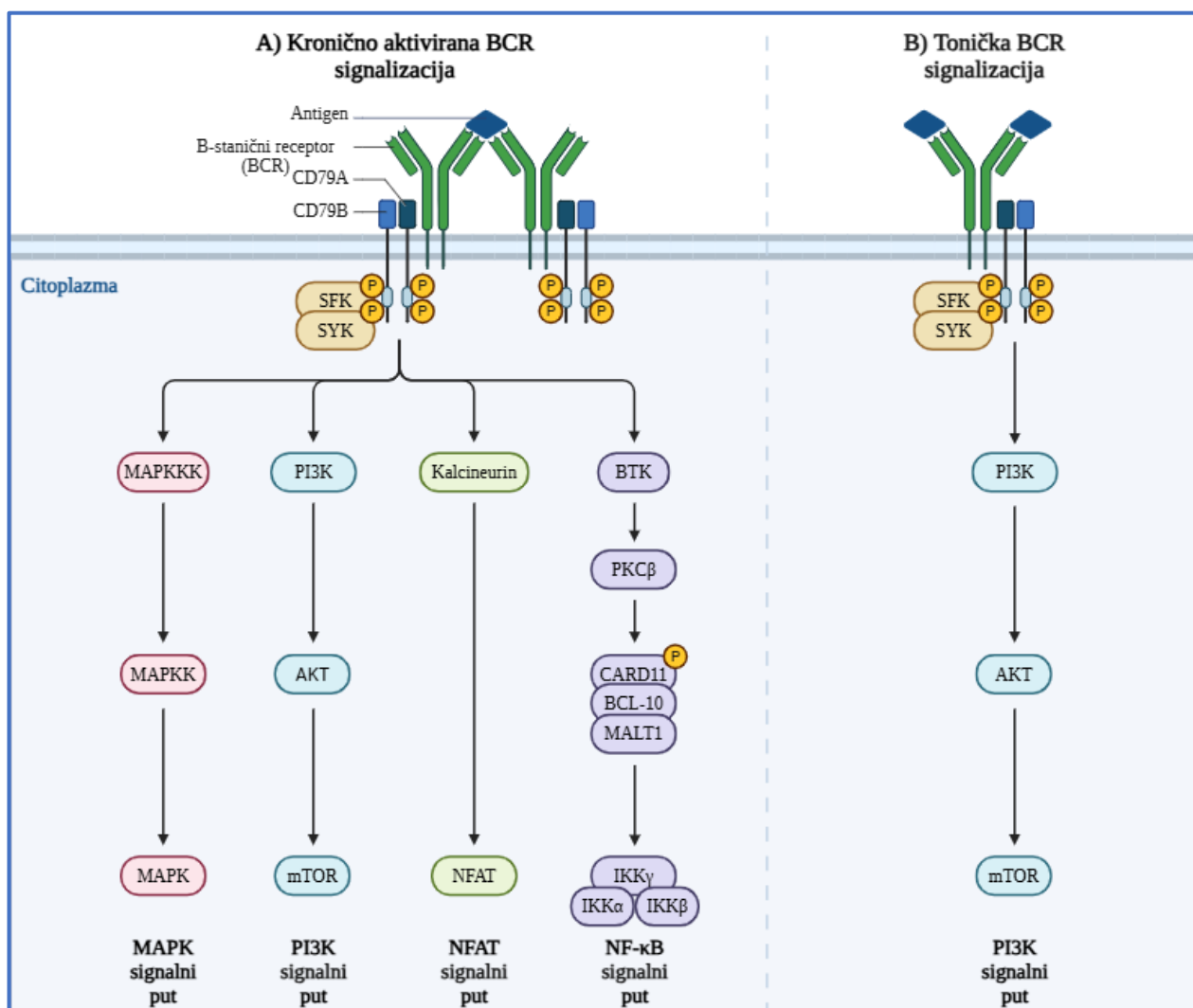
Slika 1.1. Imunološko sazrijevanje poliklonskih limfocita B od stadija pluripotentne matične stanice do plazma stanice (prema (7)). Prikazani stanični antigeni definiraju fazu sazrijevanja. Cμ = citoplazmatski μ lanci, sIg = površinski membranski imunoglobulin, cIg = citoplazmatski imunoglobulin, CD = klaster diferencijacije, BCR = B-stanični receptor, TdT = terminalna deoksinkinukleotidiltransferaza.

Preuređenje IgH gena u limfocitima B podliježe dodatnim somatskim mutacijama kod izlaganja antigenu kao dijelu reakcije germinativnog centra u limfoidnim tkivima. Susret naivnih B stanica s antigenom u germinalnim centrima može se odvijati putem reakcije ovisne o limfocitima T, što dovodi do stvaranja limfocita B sa somatskom hipermutacijom gena za

varijabilnu regiju teškog lanca imunoglobulina (IgHV-a), ili putem reakcije neovisne o limfocitima T, što dovodi do stvaranja limfocita B s nemutiranim IgHV genima. KLL i monokonska B limfocitoza (MBL; stanje koje prethodi KLL-u) mogu nastati iz obje podskupine limfocita B koji su se susreli s antigenima u limfoidnim tkivima. KLL koja potječe iz limfocita B s mutiranim genom za IgHV definirana je kao M-KLL (u 60 – 65 % slučajeva). Suprotno tome, KLL koja potječe iz limfocita B bez somatske hipermutacije definirana je kao U-KLL (u 35 – 40 % slučajeva) (9).

Signalizacija preko BCR-a normalna je signalna kaskada koja se pokreće vezanjem antigena na imunoglobulinski receptor limfocita B (sIgM), s posljedicom stanične aktivacije i proizvodnje antitijela. Uz antigen-vezajući sIg, BCR čine pridruženi heterodimeri $Ig\alpha/Ig\beta$ (CD79A i CD79B) koji prenose signal u unutrašnjost stanice. Aktivacija BCR-a pokreće fosforilaciju tirozinskih ostataka na CD79A i CD79B od strane Src kinaza (LYN, FYN i BLK). Protein-tirozin kinaza (engl. *spleen tyrosine kinase*, SYK) zatim se regrutira putem tandemskih Src homolognih 2 (SH2) domena što uzrokuje aktivaciju Brutonove tirozin kinaze (engl. *Bruton's tyrosine kinase*, BTK). BTK aktivira fosfolipazu $C\gamma 2$ (engl. *phospholipase C gamma 2*, PLC $\gamma 2$) koja zatim katalizira hidrolizu fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata (PIP2) u diacilglicerol (DAG) i inozitol trifosfat (IP3), što rezultira povećanom unutarstaničnom razinom kalcija. Kombinacija DAG-a i povećanog intracelularnog kalcija posljedično dovodi do aktivacije nuklearnog faktora- κB (engl. *nuclear factor kappa B*, NF- κB). Transmembranski protein CD19 fosforilira Src kinazu LYN tijekom BCR signalizacije, regrutirajući fosfatidilinozitol 3-kinazu (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K). PI3K fosforilira PIP2 u fosfatidilinozitol-3,4,5-trisfosfat (PIP3) koji pak aktivira AKT/mTOR signalizaciju (Slika 1.2.) (10, 11). Razlikujemo dvije vrste BCR signalizacije: kronično aktivirana BCR i tonička BCR. Kronično aktivirana BCR signalizacija antigenski je ovisan proces koji upotrebljava put NF- κB . Tonička BCR signalizacija antigenski je neovisan proces koji održava preživljavanje B stanica putem PI3K/AKT/mTOR signalizacije, a ne NF- κB -a. PI3K proksimalna je komponenta BCR signalnog puta uključena i u toničku i u kronično aktiviranu signalizaciju (12). Vezanje antigena na BCR rezultira promjenama u metabolizmu stanica, ekspresiji gena i organizaciji citoskeleta. Složenost BCR signalizacije omogućuje mnoge različite ishode, uključujući preživljavanje, toleranciju (anergiju) ili apoptozu, proliferaciju i diferencijaciju u stanice koje proizvode antitijela ili memorijske B stanice. U usporedbi s normalnim limfocitima B, KLL stanice imaju veću aktivnost BCR signalne kaskade koja je ključna

za njihovu proliferaciju i preživljavanje. Iako pokazuju niske razine sIgM-a, KLL stanice imaju veću ekspresiju i fosforilaciju SYK i BTK u odnosu na zdrave limfocite B. To je posljedica negenetskog mehanizma BCR signalizacije, gdje stereotipni sIg-ovi s visokim stupnjem sekvencijalne homologije i nemutirani IgHV podržavaju tezu da selekcija autoantigena dovodi do kronične aktivacije BCR-a (2, 12, 13). Nadalje, stereotipizacija Ig BCR-a karakteristična je osobina KLL-a, pri čemu se pacijenti koji eksprimiraju određeni arhetip Ig klasificiraju u stereotipne podskupine.



Slika 1.2. BCR signalizacija. A) kronično aktivirana – ovisna o antigenu, B) tonička – neovisna o antigenu (adaptirano prema (11)). BTK = Brutonova tirozin kinaza, CARD11 = protein 11 s domenom za regrutiranje kaspaze, IKK = inhibitor NF-κB kinaze, MALT1 = sluznici pridružen limfoidni translokacijski protein 1, MAPK = mitogenom aktivirana protein kinaza, MAPKK = MAPK kinaza, MAPKKK = MAPK kinaza kinaza, mTOR = mehanistička meta rapamicina, NFAT = nuklearni faktor aktiviranih T stanica, PKCβ = protein kinaza Cβ, AKT = protein kinaza B.

1.1.3. Etiologija kronične limfocitne leukemije

Događaj u sazrijevanju limfocita B zbog kojeg dolazi do maligne transformacije i monoklonske ekspanzije još nije u potpunosti razjašnjen. Istraživanje Kolijn i suradnika (14) pokazalo je da se visokorizični podtipovi KLL-a mogu otkriti 16 godina prije dijagnoze. Pronađeno je značajno iskrivljenje u repertoaru IgH gena kod većine ispitanika s KLL-om prije pojave limfocitoze i neovisno o klonotipskom statusu somatske hipermutacije gena za IgHV. Nadalje, istraživanje Kikushige i suradnika (15) ukazalo je na uključenost samoobnavljajućih HSC-ova u patogenezu KLL-a, gdje je dokazana veća primarna ekspresija ranih limfoidnih transkripcijskih faktora i broj poliklonskih proB stanica na razini pojedinačnih KLL-HSC u odnosu na zdrave HSC. Poliklonske KLL-HSC nisu imale abnormalni kariotip koji je česta osobina KLL-a. Isti prognostički biljezi ranog KLL-a (Rai 0, Binet A) nalaze se kod nekih slučajeva MBL-a s visokim brojem ($500 - 5000/\mu\text{L}$) i u manjoj mjeri kod MBL-a s niskim brojem ($< 500/\mu\text{L}$) monoklonskih limfocita B, što upućuje da se evolucija od MBL-a s niskim brojem do MBL-a s visokim brojem monoklonskih limfocita B i nastanak KLL-a odvijaju postupno, s usputnim stjecanjem visokorizičnih genetskih abnormalnosti (16).

1.1.4. Klinička prezentacija, dijagnostika i procjena tumorskog opterećenja

KLL je često asimptomatska bolest koja se otkiva tijekom rutinskih pregleda. Kod simptomatskog, agresivnijeg tijeka bolesti prisutni su umor, gubitak na tjelesnoj težini, noćno znojenje. Zbog bujanja limfoidne loze, u koštanoj srži dolazi do supresije mijeloidne loze što rezultira pojavom anemije, neutropenije i trombocitopenije, dok zbog pojačanog nakupljanja stanica u limfnim čvorovima i slezeni dolazi do limfadenopatije i splenomegalije. Klinički tijek bolesti među pacijentima je heterogene prirode – neki pacijenti imaju asimptomatski tijek bolesti koji ne zahtijeva liječenje, dok drugi imaju aktivan tijek gdje je farmakoterapija nužna za ublažavanje simptoma i preživljavanje pacijenata (2). Kod 2 – 10 % pacijenata liječenih kemoimunoterapijom KLL prelazi u agresivni limfom, najčešće difuzni B-limfom velikih stanica (Richterova transformacija) (17, 18). Incidencija Richterove transformacije je veća kod pacijenata koji su već primali terapiju za liječenje KLL-a, a manja je kod pacijenata koji se liječe inhibitorima unutarstaničnih signalnih putova (19).

Za postavljanje dijagnoze KLL-a upotrebljavaju se nalazi ukupnog broja leukocita iz krvne slike, postotak (%) limfocita iz diferencijalne krvne slike, mikroskopskog pregleda krvnog razmaza i imunofenotipizacije. Jedan je od kriterija za postavljanje dijagnoze KLL-a apsolutni broj monoklonskih limfocita B u perifernoj krvi $\geq 5 \times 10^9/L$, u periodu duljem od 3 mjeseca. Mikroskopskim pregledom krvnog razmaza vidljivi su mali, zreli limfociti s oskudnom citoplazmom i gustim, djelomično agregiranim kromatinom u jezgri (bez nalaza jezgrica). Karakterističan je i nalaz Gumprechtovih sjena – raspadnutih limfocita koji su zbog promjene sastava i fluidnosti stanične membrane skloniji pucanju pod mehaničkim pritiskom tijekom izrade krvnog razmaza. U razmazu može biti prisutan i manji broj atipičnih limfocita i prolimfocita ($< 10\%$) (17, 20). Karakteristika je leukemijskih klonova restrikcija ekspresije samo jedne vrste lakog lanca: κ ili λ (3), što se dokazuje imunofenotipizacijom, metodom protočne citometrije. Imunofenotip monoklonskih limfocita B u KLL-u pokazuje aberantnu ekspresiju CD5 antigena uz antigene karakteristične za B lozu: CD19, CD20 i CD23. KLL često pokazuje smanjenu ekspresiju CD20, značajno smanjen ili odsutan FMC7, opažen CD23 te smanjenu ekspresiju sIg-a (21). Kako aberantna ekspresija CD5 ne isključuje druge limfoidne malignitete (poput limfoma stanica plašta, engl. *mantle cell lymphoma*, MCL), kod graničnih slučajeva bilježi CD43, CD79b, CD81, CD200, CD10 i ROR1 mogu pridonijeti postavljanju ispravne dijagnoze (2).

Za stupnjevanje težine bolesti i procjenu rizika upotrebljavaju se Rai i Binet klinički stadiji i skor ukupne tumorske mase (engl. *total tumor mass score*, TTM) (Tablice 1.1. i 1.2.).

Tablica 1.1. Klinički stadiji za stupnjevanje težine KLL-a.

Rai		
Stadij	Opis	Rizik
0	Limfocitoza, u perifernoj krvi $> 15 \times 10^9/L$ i $> 40 \%$ u koštanoj srži	niski
I II	Stadij 0 uz limfadenopatiju, splenomegaliju, hepatomegaliju	umjereni
III IV	Stadij 0 – I uz anemiju i trombocitopeniju	visoki
Binet		
Stadij	Opis	Rizik
A	Hemoglobin ≥ 100 g/L i trombociti $\geq 100 \times 10^9/L$ i < 3 zahvaćene regije	niski
B	Hemoglobin ≥ 100 g/L i trombociti $\geq 100 \times 10^9/L$ i ≥ 3 zahvaćene regije	umjereni
C	Hemoglobin < 100 g/L i/ili trombociti $< 100 \times 10^9/L$ i bilo koji broj zahvaćenih regija	visoki

Tablica 1.2. Varijable za izračun TTM skora (prema (22)).

TTM skor		
Odjeljak	Predstavnik	Rizik
TM ₁ – koštana srž i periferna krv	broj limfocita ($\sqrt{ ly } \times 10^9/L$)*	< 9 niski 9 – 15 umjereni > 15 visoki
TM ₂ – limfni čvorovi	promjer najvećeg palpabilnog čvora (cm)	
TM ₃ – slezena	palpabilna slezena (cm)	
TTM = TM ₁ + TM ₂ + TM ₃		

* $|ly|$ = apsolutni broj limfocita

1.1.5. Prognostički markeri

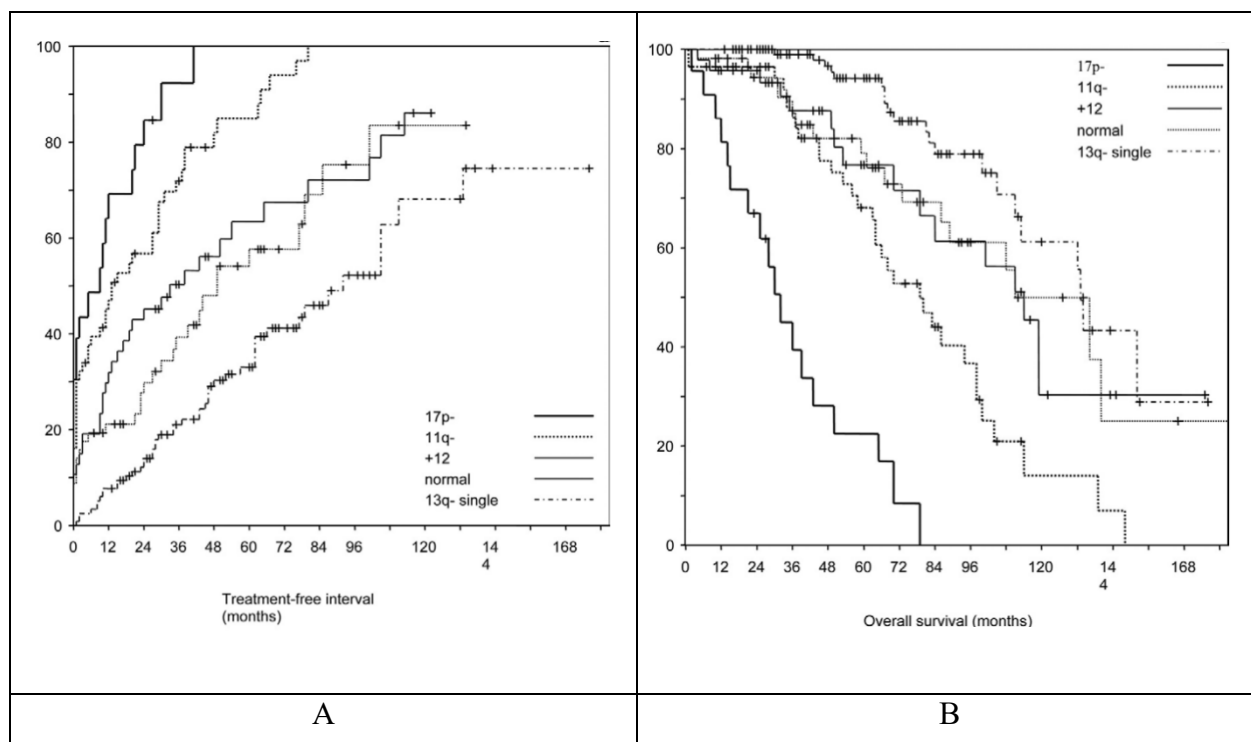
Rai i Binet stadiji pomažu u stratifikaciji pacijenata prema riziku i težini bolesti, međutim ne pružaju informaciju o prognozi tijeka bolesti, pogotovo za niže stadije. Najrelevantniji prognostički parametri su mutacijski status IgHV-a, koncentracija serumskog β_2 -mikroglobulina i

prisutnost mutacija del(17p) i/ili *TP53*. Obično je KLL visokog rizika definiran, barem djelomično genetskom aberacijom gena *TP53* (to jest, del(17p), ili mutacijom gena *TP53*). Međunarodni prognostički indeks CLL-IPI, koji u izračun uključuje klinički stadij, dob, mutacijski status IgHV-a, serumski β 2-mikroglobulin i prisutnost del(17p) i/ili mutacije *TP53*, integrira genetske, biološke i kliničke varijable u svrhu identifikacije različitih rizičnih skupina pacijenata s KLL-om (2, 3, 23).

Otprilike 80 % pacijenata s KLL-om ima barem jednu od četiri najčešće kromosomske aberacije: delecija dugog kraka kromosoma 13 (del(13q)), delecija dugog kraka kromosoma 11 (del(11q)), delecija kratkog kraka kromosoma 17 (del(17p)) i trisomija kromosoma 12 (Tablica 1.3.) (3). Utjecaj vrste kromosomske aberacije na period bez liječenja i na preživljenje prikazan je na Slici 1.3. Pacijenti s del(17p) imaju najkraći period između dijagnoze i uvođenja terapije te najkraće razdoblje između dijagnoze i smrtnog ishoda (24, 25). Moguć je i složeni kariotip (≥ 3 nepovezane kromosomske abnormalnosti u > 1 stanice), koji je povezan s lošijim kliničkim ishodima. Kariotip s ≥ 5 nepovezanih kromosomskih abnormalnosti nepovoljan je prognostički faktor neovisno o kliničkom stadiju, statusu mutacije IgHV-a i aberacijama *TP53*, dok su kariotipi s 3 ili 4 nepovezane kromosomske aberacije klinički relevantni samo ako su prisutne aberacije *TP53* (26).

Tablica 1.3. Najučestalije kromosomske aberacije, prognoza i utjecaj na stanični metabolom.

Kromosomska aberacija	Učestalost	Prognoza	Utjecaj
del(13q)	55 %	povoljna	inhibicija apoptoze, proliferacija
del(11q)	25 %	nepovoljna	proliferacija sa oštećenom DNA, inhibicija apoptoze
del(17p)	5 – 8 %	nepovoljna	delecija/mutacija tumor supresorskog gena <i>TP53</i>
trisomija 12	10 – 20 %	osrednja	RAS-MAPK signalni put



Slika 1.3. Prognostička relevantnost kromosomskih aberacija u KLL-u (prema Döhner i suradnicima (25)). A) Vjerojatnost progresije bolesti procijenjena intervalom bez liječenja kod najčešćih kromosomskih aberacija, B) Procijenjene vjerojatnosti preživljavanja postavljanja dijagnoze kod 325 pacijenata s KLL-om podijeljenih u pet kategorija definiranih u hijerarhijskom modelu genomskih aberacija u KLL-u.

Uz kromosomske aberacije, u KLL-u su prisutne mnogobrojne genske mutacije. Najznačajnija je mutacija gena *TP53*, koja je povezana s lošim odgovorom na kemoimunoterapiju i kraćim preživljavanjem bez progresije bolesti (27). Metodom sekvenciranja sljedeće generacije (engl. *next-generation sequencing*, NGS) otkrivene su ponavljajuće genomske mutacije koje utječu na različite signalne putove. Mutacije gena *TP53*, *ATM*, *BIRC3*, *SF3B1*, *NOTCH*, *RPS15*, *EGR2* i *KRAS*, povezane su s lošijim ishodom, kraćim periodom od dijagnoze do početka liječenja ili manjim ukupnim preživljavanjem. Brojni čimbenici, poput kliničkog statusa, imunogenetske pozadine, tumorskog opterećenja, prisutnosti bialelnih abnormalnosti i koegzistirajućih pokretačkih mutacija utječu na klinički značaj pokretačke mutacije (28).

Ekspresija imunofenotipskih markera ZAP-70 i CD38 kod monoklonskih limfocita B korelira s ekspresijom nemutiranih IgHV gena i povezana je s lošom prognozom (29, 30). Nadalje, ekspresija CD49d, α -lanaca $\alpha\beta$ 1 heterodimera integrina, također je povezana s nepovoljnom

prognozom kod KLL-a. Od navedenih antigena, CD49d se pokazao kao najpouzdaniji prediktor ukupnog preživljavanja i preživljavanja bez terapije, temeljen na protočnoj citometriji (31, 32).

1.1.6. Terapija kronične limfocitne leukemije

Odluku o početku liječenja KLL-a donosi kliničar na temelju prisutnosti simptoma aktivnog tijeka bolesti opisanih u smjernicama iwCLL-a (Tablica 1.4.). Smjernice kažu da se asimptomatski pacijenti s ranim stadijem bolesti (Rai 0, Binet A) prate bez uvođenja farmakoterapije do pojave znakova brzog napredovanja bolesti, ili dok bolest ne postane simptomatska. Pacijenti sa umjerenim rizikom (Rai stadij I i II, Binet stadij B) i visokim rizikom (Rai stadij III i IV, Binet stadij C) obično imaju koristi od početka liječenja, međutim, neki pacijenti sa srednjim rizikom po obje klasifikacije mogu se pratiti bez terapije, dok se ne pojave dokazi o progresivnoj ili simptomatskoj bolesti (2).

Lijekovi različitog mehanizma djelovanja i učinka mogu se upotrebljavati u mono- i politerapiji KLL-a (3):

- Citostatici: alkilirajući agensi (klorambucil), analozi purina (fludarabin, pentostatin i kladribin) i bendamustin
- Anti-CD20 antitijela: rituksimab, obinutuzumab, ofatumumab
- PI3K inhibitori: idelalisib, duvelisib, umbralisib
- BTK inhibitori (BTKi): ibrutinib, akalabrutinib, zanubrutinib, pirtobrutinib
- Lenalidomid
- Inhibitori B-staničnog limfoma-2 (engl. *B-cell lymphoma-2*, BCL-2): venetoklaks
- Terapija T stanicama koje izražavaju kimerične receptore (engl. *chimeric antigen receptor T cell*, CAR-T).

Tablica 1.4. Kriteriji za definiciju simptomatske ili aktivne bolesti prema smjernicama iwCLL-a.

Simptomatska bolest	
1.	Progresivno zatajenje koštane srži koje se očituje razvojem ili pogoršanjem anemije i trombocitopenije (koncentracija hemoglobina < 100 g/L ili broj trombocita $< 100 \times 10^9/L$; kod nekih pacijenata broj trombocita $< 100 \times 10^9/L$ može biti stabilan dulje vrijeme i tada uvođenje terapije nije obavezno).
2.	Masivna (≥ 6 cm ispod lijevog rebrenog ruba) ili progresivna ili simptomatska splenomegalija.
3.	Masivni limfni čvorovi (≥ 10 cm u najdužem promjeru) ili progresivna ili simptomatska limfadenopatija.
4.	Progresivna limfocitoza s porastom od ≥ 50 % tijekom razdoblja od 2 mjeseca ili vrijeme udvostručenja limfocita kraće od 6 mjeseci.
5.	Autoimune komplikacije, uključujući anemiju ili trombocitopeniju, koje slabo reagiraju na kortikosteroidnu terapiju.
6.	Simptomatska ili funkcionalna zahvaćenost (npr. kože, bubrega, pluća, kralježnice) izvan limfnih čvorova.
7.	• Nenamjerni gubitak težine ≥ 10 % unutar prethodnih 6 mjeseci. • Značajan umor (≥ 2 po ECOG ljestvici). • Vrućica $\geq 38,0$ °C tijekom 2 ili više tjedana bez znakova infekcije. • Noćno znojenje ≥ 1 mjesec bez znakova infekcije.

Tablica 1.5. Prva linija liječenja KLL-a prema Radnoj skupini za kroničnu limfocitnu leukemiju KroHem-a (v1.2023.) (33).

Stadij	Svi bolesnici (%)	Bolesnici s indikacijom za liječenje (%)	Molekularna citogenetika	Prva linija liječenja	
				Standard	Druga opcija
Bez simptoma (Binet A – B, Rai 0 – II, TTM < 15)	33	0	nevažno	ništa	
Binet C, Rai III – IV, TTM > 15 ili simptomatska bolest	67	88	bez del17p/TP53w; mutirani IgHV	Obinu + Veneto ili BTKi kont: – Acala ± Obinu – Ibrutinib – Zanubrutinib ili Ibrutinib + Veneto	FCR B + R Chl + Obinu Chl ± R
			bez del17p/TP53w; nemutirani IgHV	BTKi kont: – Acala ± Obinu – Ibrutinib – Zanubrutinib ili Obinu + Veneto ili Ibrutinib + Veneto	∅
		12	del17p/TP53mut	BTKi kont: – Acala ± Obinu – Ibrutinib – Zanubrutinib ili Veneto kont ± R; Veneto + Obinu ili Ibrutinib + Veneto	Idela + R

FCR = fludarabin, ciklofosfamid i rituksimab; B = bendamustin; Veneto = venetoklaks; Obinu = obinutuzumab; Chl = klorambucil; Acala = akalabrutinib; R = rituksimab; Idela = idelalisib

Učinkovitost odgovora na terapiju s definiranim trajanjem liječenja (kod kemoimunoterapijskih pristupa) potrebno je provesti najmanje 2 mjeseca nakon završetka terapije. Procjenjuju se 2 skupine parametara: limfoidni (veličina limfnih čvorova, veličina slezene i jetre te konstitucijski simptomi) i hematopoetski (broj trombocita, koncentracija hemoglobina te udio pojedine loze u koštanoj srži). Kod kontinuirane terapije koja uključuje fazu održavanja, procjena

odgovora provodi se najmanje 2 mjeseca nakon što pacijenti postignu svoj maksimalni odgovor ili u vremenskoj točki koja je unaprijed definirana u protokolu. Maksimalni odgovor može se definirati kao faza liječenja u kojoj se ne vidi dodatno poboljšanje tijekom najmanje 2 mjeseca terapije. Odgovor na terapiju procjenjuje se kao kompletna remisija, parcijalna remisija, progresija bolesti i stabilna bolest (2). Klinički korisnim odgovorima smatraju se kompletna i parcijalna remisija, dok se progresija i stabilna bolest smatraju bezuspješnim liječenjem. Relaps se definira kao dokaz progresije bolesti kod pacijenta koji je prethodno postigao kompletnu ili parcijalnu remisiju, dok se refraktorna bolest definira kao bezuspješno liječenje ili progresija bolesti unutar 6 mjeseci nakon primanja zadnje doze terapije (2). Tablica 1.6. navodi preporuke za liječenje relapsa/refraktorne bolesti kod KLL-a.

Tablica 1.6. Liječenje relapsa/refraktorne KLL prema Radnoj skupini za kroničnu limfocitnu leukemiju KroHem-a (v1.2023.) (33).

Prethodno liječenje		Standardna opcija	Druga opcija
Kemoterapija		– BTKi kont: Acala, Ibrutinib, Zanubrutinib; – Veneto + R – Veneto kont ± R	– Idela + R – Chl + anti-CD20
BTKi	refr	– Veneto kont ± R – Veneto + R	
	intol	promjena BTKi	
Veneto	refr/intol	– BTKi kont: Acala, Ibrutinib, Zanubrutinib ili u kasnom relapsu – ponoviti Veneto ± anti-CD20	
Dvostruka izloženost (BTKi + Veneto)	ne refr na BTKi ili Veneto	ponoviti: – BTKi ili – Veneto kont ± R	
	dvostruko refr	– Idela + R – imunokemoterapija	– nekovalentni BTKi (pirtobrutinib) – Alo-TKMS

Veneto = venetoklaks; Acala = akalabrutinib; Chl = klorambucil; R = rituksimab; Idela = idelalisib; ref = refraktorni; intol = intolerantni; Alo-TKMS = alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica

1.1.7. Inhibitori Brutonove tirozin kinaze

Inhibicija BTK-a smanjuje proliferaciju i preživljavanje B-stanica. U skladu s tim, razvoj BTKi-ja doveo je do dramatičnih poboljšanja u liječenju B leukemija i limfoma (KLL, MCL, Waldenströмова makroglobulinemija, limfom marginalne zone). Ibrutinib, BTKi prve generacije, kovalentno se veže za Cys481 u aktivnom mjestu BTK-a i ireverzibilno inhibira njenu enzimsku aktivnost. Prekid prijenosa proliferacijskih signala utječe na migraciju KLL stanica iz sekundarnih limfoidnih organa i njihovo preživljenje izvan pogodnog mikro-okoliša (34). Ibrutinib je potentni inhibitor BTK-a, međutim, umjereno je selektivan za BTK te njegova ne-ciljana inhibicija drugih tirozin kinaza koje sadrže Cys u aktivnom mjestu (interleukin-2-inducibilna T-stanična kinaza (ITK), Tec protein tirozin kinaza (TEC), kinaza koštane srži na kromosomu X (BMX) i receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR)) dovodi do razvoja nuspojava (35). Najčešći su neželjeni učinci ibrutiniba fibrilacija atrijske, krvarenje, neutropenija i trombocitopenija, probavne smetnje (dijareja), infekcija gornjih dišnih putova, osip i umor (36). BTKi inhibitori druge generacije (akalabrutinib, zanubrutinib, tirabrutinib i orelabrutinib) pokazuju bolju selektivnost za BTK i manji ne-ciljani učinak na druge tirozin kinaze (37). Studije izravnih usporedbi učinka ibrutiniba i BTK-a druge generacije navode smanjenje rizika od atrijske fibrilacije za 2 do 4 puta u korist akalabrutiniba ili zanubrutiniba (38 – 40). Akalabrutinib je bio povezan sa značajnim smanjenjem stope hipertenzije u odnosu na ibrutinib (akalabrutinib: 9 %; ibrutinib: 23 %) (38), dok su stope hipertenzije bile niže sa zanubrutinibom u ASPEN studiji (zanubrutinib: 15 %; ibrutinib: 26 %) (39) i nisu se razlikovale u ALPINE studiji (zanubrutinib: 24 %; ibrutinib: 23 %) (40). Razlozi razlika u prijavljenom signalu hipertenzije između akalabrutiniba i zanubrutiniba nisu poznati.

Mutacija u veznom mjestu Cys481 BTK-a najčešća je mutacija (> 90 %) BTK-a uočenog kod bolesnika liječenih ibrutinibom i BTKi-jem druge generacije. Mutacija sprječava vezanje lijeka na enzim, čime izostaje učinak inhibicije te se stvara rezistencija na lijek. Za razliku od kovalentnih inhibitora, BTKi-ji treće generacije (pirtobrutinib i nemtabrutinib) nekovalentni su inhibitori koji se vežu na ATP vezno mjesto, čime se postiže inhibicija BTK-a i u slučajevima mutacije veznog mjesta Cys481 (35, 41). Mutacije koje dovode do stečene rezistencije na BTKi uključuju i *gain of function* mutacije s povećanom aktivnošću nizvodnih kinaza (npr. PLC γ 2) (42, 43). Nadalje, kod razvoja rezistencije na ibrutinib proučavana je povezanost BTK-a i PI3K/AKT/mTOR signalnih puteva. Inhibicijom BTK-a, KLL stanice razvijaju mehanizam preživljavanja preko

PI3K/AKT/mTOR signalnog puta (44 – 46), što je predmet istraživanja djelotvornosti sinergističke terapije BTKi-ja s mTOR inhibitorima (45, 47, 48). Mehanizam djelovanja i farmakološka svojstva BTKi-ja opisani su u Tablici 1.7. prema (35).

Tablica 1.7. Opis i farmakološka svojstva BTKi-ja (prema (35)).

	Ibrutinib	Akalabrutinib	Zanubrutinib	Tirabrutinib	Orelabrutinib	Pirtobrutinib	Nemtabrutinib
Način vezanja	kovalentno, ireverzibilno	kovalentno, ireverzibilno	kovalentno, ireverzibilno	kovalentno, ireverzibilno	kovalentno, ireverzibilno	ne-kovalentno, reverzibilno	ne-kovalentno, reverzibilno
BTK vezno mjesto	Cys481	Cys481	Cys481	Cys481	Cys481	ATP-vezno mjesto	ATP-vezno mjesto
Selektivnost	umjerena	visoka	visoka	visoka	visoka	visoka	umjerena
IC₅₀							
BTK	0.5 nM	3.0-5.1 nM	0.3 nM	6.8 nM	1.6 nM	3.15 nM	0.85 nM
BMX	0.8 nM	46 nM		6 nM			5.2 nM
EGFR	5.3 nM	> 1000 nM	21 nM	> 1000 nM			
HER2	9.4 nM	> 1000 nM	661 nM	> 1000 nM			
HER4		16 nM		700 nM			
ITK	4.9 nM	> 1000 nM	50 nM	> 1000 nM			> 10000 nM
JAK3	32 nM	> 1000 nM	> 1000 nM	> 1000 nM			
TEC	10 nM	126 nM	44 nM	77 nM			5.8 nM
Apsolutna bioraspoloživost	< 10 %	25 %	45 - 50 %	89 %	20 - 80 %	70 - 74 %	
Vrijeme poluživota	4 - 13h	1 - 2h	2 - 4h	4 - 7h	1.5 - 4h	~ 20h	20 - 30h
Ciljna zauzetost u PMBC	> 90 %	97 - 99 %	> 95 %	> 90 %	> 99 %	> 96 %	
Metabolizam	dominantno preko CYP3A						
Ekskrecija	stolica 80 %, urin <10 %	stolica 84 %, urin 12 %	stolica 87 %, urin 8 %	stolica 52 %, urin 42 %	stolica 49 %, urin 34 %		

BMX = kinaza koštane srži na kromosomu X; BTK = Bruton tirozin kinaza; EGFR = receptor epidermalnog faktora rasta; HER2 = ljudski EGFR 2; HER4 = ljudski EGFR 4; ITK = interleukin-2-inducibilna T-stanična kinaza; JAK3 = Janus kinaza 3; TEC = Tec protein tirozin kinaza; PBMC = periferne krvne mononuklearne stanice

1.2. Metaboličke promjene limfocita B u kroničnoj limfocitnoj leukemiji

Metaboličko preoblikovanje ili prekapćanje osobina je svih tumorski promijenjenih stanica koja osigurava proliferaciju i preživljavanje. Monoklonski limfociti B u KLL-u pokazuju promijenjen metabolizam glukoze te ne podliježu Warburgovom efektu (proces aerobne glikolize), već se oslanjaju na oksidativnu fosforilaciju kao glavni izvor energije. Dokazana je povećana ekspresija GLUT4 receptora kod ~ 60 % monoklonskih limfocita B (49). Del(11q) uzrokuje povećanje ekspresije inzulinskih receptora i, posljedično, unosa glukoze, što ukazuje na ovisnost o glukozi i osjetljivost na inhibiciju glikolize. Nadalje, promjene u strukturi i funkcionalnosti TP53-a umanjuju njegov inhibitorni efekt na GLUT1 i GLUT4 te na represiju glikolize aktivacijom transkripcije TP53-inducibilnog regulatora glikolize i apoptoze (TIGAR) (50, 51). TP53 zbog gubitka funkcije ne suprimira glikolizu te izostaje negativna regulacija proliferacijskog PI3K/AKT signalnog puta (52). Anti-HIV lijek ritonavir (inhibitor proteaza) inhibira GLUT4 i potiče apoptozu KLL limfocita, što ga čini kandidatom za liječenje KLL-a (50).

Transfer jednog ugljika (1C) posredovan folatnim ciklusom uključuje niz povezanih reakcija koje se odvijaju u citosolu i mitohondrijima stanice, a doprinosi *de novo* sintezi purina i timidilata te sudjeluje u metioninskom ciklusu, metabolizmu glutationa i detoksifikaciji endogenog formaldehida kod KLL-a (53, 54). Endogeni formaldehid reagira s cisteinom u aktivnom mjestu S-adenozil-metionin sintaze 1A, što dovodi do inhibicije enzimske aktivnosti te posljedično do smanjene sinteze S-adenozilmetionina i nastajanja epigenetske disregulacije. Nadalje, reakcija formaldehida sa staničnim tiolima može potaknuti nakupljanje reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*, ROS), što dovodi do promjena u redoks ravnoteži staničnog glutationa (55). Stanice leukemije akumuliraju formaldehidom oštećenu DNK, ali promijenjeni mehanizmi popravka DNK štite stanice od apoptoze (56).

KLL stanice imaju veći broj mitohondrija u odnosu na zdrave limfocite B. Masa mitohondrija i njihova aktivnost također su veći, što je u skladu s povećanim energetske potrebama monoklonskih limfocita B. Broj mitohondrija povezan je i s genetskim promjenama TP53-a – KLL limfociti s del(17p) pojačano eksprimiraju proliferatorom aktivirani receptor gama koaktivator 1- α (engl. *proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α* , PGC-1 α), koji je glavni regulator mitohondrijske biogeneze (51). Nadalje, povećana oksidativna fosforilacija i

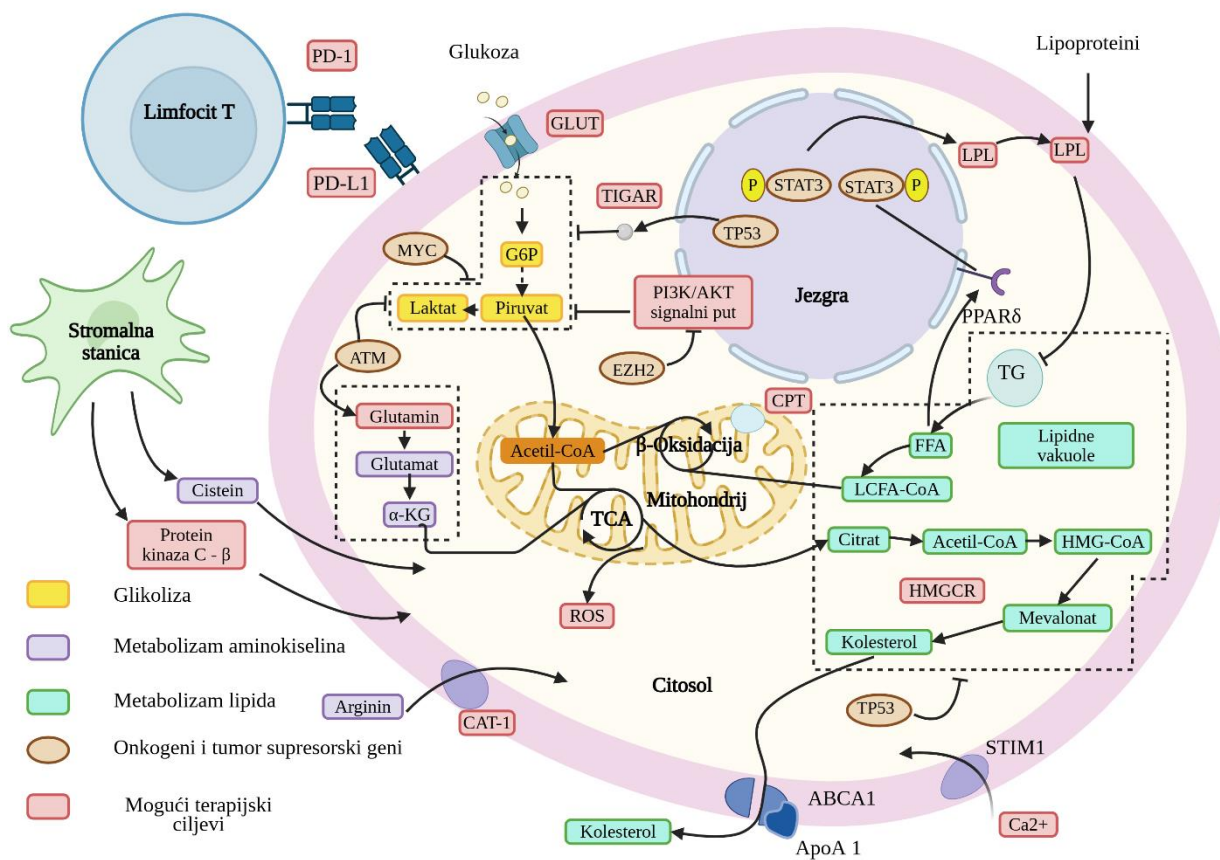
povećano stvaranje ROS-ova u KLL limfocitima dovode do stanične smrti, dok mutacije mitohondrijske DNA povisuju razinu dušikovog oksida (NO), što može značajno utjecati na biogenezu mitohondrija. S druge strane, fosforilacija provoditelja signala i aktivatora transkripcije 3 (engl. *signal transducer and transcription activator 3*, STAT3) kod prekomjerne mitohondrijske aktivnosti može pojačati antioksidativnu obrambenu sposobnost KLL limfocita, što potiče njihovo preživljavanje (52). Nedavna istraživanja pokazuju da hipoglikemik metformin inhibira oksidativnu fosforilaciju i signalni put AMP-om aktivirane protein kinaze (engl. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*, AMPK), što ga čini kandidatom za liječenje KLL-a (57).

Uz promijenjeni mitohondrijski metabolizam, KLL limfociti imaju niži sadržaj izoleucina i viši sadržaj glutamta i piruvata te povećanu *de novo* sintezu glutamina. Prvi i ograničavajući korak katabolizma glutamina pretvorba je glutamina u glutamat pomoću glutaminaze, čija je mRNA pojačano eksprimirana u KLL-u. Povišeni unos amonijaka i ekspresija glutamin sintetaze nalaze se u KLL limfocitima s del(11q), što pogoduje *de novo* sintezi glutamina, dok je ekspresija glutamat dehidrogenaze smanjena, čime je smanjena oksidativna deaminacija glutamata. Glutamin aktivira mTOR signalni put koji regulira translaciju te rast i proliferaciju stanica te inhibira autofagiju (58). S druge strane, amonijak koji je nusprodukt glutaminolize, stimulira autofagiju neovisno o mTOR signalnom putu (59).

KLL stanice imaju promijenjen lipidni metabolizam. Energetska iskorištenost slobodnih masnih kiselina (engl. *free fatty acids*, FFA) veća je kod KLL-a u odnosu na zdrave limfocite B, kao i ekspresija lipoportein lipaze (LPL), napose kod pacijenata čiji limfociti B imaju nemutirani IgHV. LPL, na čiju ekspresiju utječe STAT3, posreduje unos lipoproteina i iskorištavanje FFA u stanicama KLL-a te može doprinijeti širenju i migraciji KLL stanica. Lijek za liječenje pretilosti orlistat inhibira aktivnost LPL koja je inducirana stimulacijom BCR-a u KLL stanicama (60, 61). Povećana je ekspresija i karnitin palmitoiltransferaza 1 i 2 (engl. *carnitine palmitoyltransferase*, CPT), što je u skladu s povećanim metabolizmom i iskorištavanjem masnih kiselina. Nadalje, metabolizam kolesterola i mevalonata povezan je s funkcionalnošću TP53-a, čiji nedostatak dovodi do povećane sinteze kolesterola i doprinosi proliferaciji stanica. U *in vitro* pokusima statini (inhibitori sintetskog puta kolestrola) uzrokuju apoptozu KLL stanica, te pojačavaju antitumorski efekt ibrutiniba i venetoklaksa (52, 62, 63). Sfingolipidi su uključeni u procese regulirane stanične smrti: sfingozin-1-fosfat (S1P) i sfingomijelin (SM) uključeni su u apoptozu, a sfingozin (pozitivni

regulator) u piroptozu (64). S1P se razgrađuje pomoću S1P liaze i tvori heksadekanal te oba metabolita djeluju na glavne regulatore intrinzičnih putova apoptoze (65). SM djeluje na aktivaciju ekstrinzičnih putova apoptoze koalescencijom lipidnih splavi i aktivaciju kaspaznih signalnih putova (64).

Sumarno, u KLL-u zbog konstantne aktivnosti BCR signalizacije i proliferacije monoklonskih limfocita B dolazi do promjena u aerobnoj glikolizi, sintezi lipida, transferu 1C atoma, oksidaciji masnih kiselina, sintezi/potrošnji glutamina, stvaranju i utišavanju ROS-ova te autofagiji/apoptozi (Slika 1.4.). Brojna *in vivo* i *in vitro* istraživanja proučavaju metabolomiku KLL-a, međutim dijagnostika i prognostika KLL-a počivaju na fenotipskim obilježjima monoklonskih limfocita i promjenama na razini DNA/proteina. Ipak, promjene na razini gena i proteina ne daju informaciju o progresiji i/ili relapsu bolesti. Nadalje, pacijenti s KLL-om imaju izrazito heterogenu kliničku sliku, bez obzira na sličnosti/razlike u genetskim promjenama. Navedeno ide u prilog pretpostavci da bi heterogenost kliničke slike mogla biti posljedica metaboličkih promjena koje se na staničnoj razini događaju nakon translacije.



Slika 1.4. Metaboličke promjene u KLL-u i mogući terapijski ciljevi (prilagođeno prema (52)). GLUT = transporter glukoze, G6P = glukoza-6-fosfat, TIGAR = TP53-inducirani regulator glikolize i apoptoze, TCA = Krebsov ciklus, TG = trigliceridi, LPL = lipoproteinska lipaza, LCFA-CoA = dugolančani acil koenzim A, HMG-CoA = 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A, HMGCR = 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktaza, FFA = slobodne masne kiseline, ApoA = apolipoprotein A, CPT = karnitin palmitoil transferaza, α-KG = α-ketoglutarat, CAT-1 = transporter kationskih aminokiselina-1, STIM1 = molekula stromalne interakcije 1, ROS = reaktivni kisikovi spojevi, ABCA1 = ATP-vezujući transporter 1, PPARδ = peroksisomalni proliferatorom aktivirani receptor δ, PI3K = fosfatidilinositol 3-kinaza, EZH2 = pojačivač zeste homologa 2, PD1 = protein programirane stanične smrti 1, PD-L1 = ligand proteina programirane stanične smrti 1, STAT3 = provoditelj signala i aktivator transkripcije 3.

1.3. Bioanalitičke tehnike za proučavanje metaboloma stanica

1.3.1. Vrste uzoraka i analitičke tehnike

Određivanje staničnog sastava moguće je provesti iz uzoraka u kojima je integritet stanica narušen (stanični lizat izoliranih stanica ili tkiva), ili iz uzoraka u kojima su stanice intaktne i mogu biti promatrane kao zasebni entiteti (stanični izolati, suspenzije stanica, razmazi stanica). Vrstu, ali i količinu uzorka koja je potrebna za analizu definira analitička tehnika koja se primjenjuje za istraživanje staničnog metaboloma. Izmjereni metaboliti odražavaju stanični sadržaj i razlikuju se od metaboloma bioloških tekućina (serum, plazma). Analiza zasebnih stanica (engl. *single cell*) daje uvid u homogenost/heterogenost i biološku varijabilnost sadržaja svake pojedinačne stanice u preparatu (66).

Analitičke tehnike koje za analizu staničnog metaboloma zahtijevaju narušen stanični integritet su imunokemijske tehnike i tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom (engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS). Međutim, ukoliko je primarni uzorak suspenzija različitih vrsta stanica, stanice prethodno trebaju biti sortirane (npr. pomoću sortera stanica) kako bi rezultati mjerenja odražavali metabolom jedne stanične vrste. Ukoliko je uzorak tkivo, s pretpostavkom da je građeno od jedne vrste stanica, ono pred analizu treba biti homogenizirano. Nedostatak je imunokemijskih testova selektivnost i dostupnost detekcijskih antitijela te nemogućnost istovremenog određivanja više analita. Za analizu metaboloma imunokemijskim tehnikama potrebno je značajno više uzorka i reagensa zbog zasebne analize svakog pojedinog analita. S LC-MS tehnologijom moguća je multipleks analiza, tj. istovremena analiza do nekoliko desetaka analita iz male količine uzorka. Metoda je visoko selektivna, a tandemaska analiza (MS/MS) daje pouzdanu identifikaciju i kvantifikaciju mjerenih analita (67).

S druge strane, slikovna spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry imaging*, MSI) i nuklearna magnetska rezonanca (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR) tehnike su pomoću kojih je moguća analiza metaboloma zasebnih intaktnih stanica. NMR spektroskopija visoko je reproducibilna i kvantifikacijska metoda koja ne zahtijeva obradu uzorka ili kromatografsko razdvajanje, zbog čega je prikladna tehnika za velike ili multicentrične studije. Međutim, NMR spektroskopija ima lošiju rezoluciju i moć razdvajanja u odnosu na MS tehnike, što utječe na nižu analitičku osjetljivost metode i mogućnost istovremene detekcije manjeg broja (nekoliko desetaka)

metabolita čiji je intracelularni sadržaj visok. MSI je skup tehnologija koje omogućuju vizualizaciju prostorne distribucije analita na temelju njihovih omjera mase i naboja tj. m/z kvocijenata. Za MSI je moguće kombinirati različite ionske izvore s različitim masenim detektorima, a najčešće korištena i komercijalno najdostupnija MSI tehnika je matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija spregnuta s masenim detektorom koji mjeri vrijeme preleta (engl. *matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight*, MALDI-TOF) (67). Nedostatak MSI tehnika je otežana kvantifikacija metabolita – većina MSI tehnika je kvalitativne prirode.

Analiza staničnog metaboloma MSI tehnikama može biti ciljana (engl. *targeted*) ili neciljana (engl. *untargeted*). Kod neciljanih analiza, MS signali koji zadovoljavaju određene kriterije bilježe se na nepristran način, a anotacija molekula izvršava se usporedbom mase molekulskog adukta s masama čistih molekula (standarda) navedenih u bazama podataka. Neciljana metabolomika pruža sveobuhvatan pristup otkrivanju prethodno neočekivanih metaboličkih promjena, međutim, samo se mali dio (obično 5 % – 10 %) snimljenih MS signala doista može anotirati. U ciljanoj metabolomici metaboliti od interesa unaprijed su definirani i promatraju se isključivo njihovi MS signali. Takav princip pruža veću osjetljivost i pouzdanost u identifikaciji odabranih metabolita, međutim, može rezultirati gubitkom informacija jer se odabir metabolita za analizu temelji na prethodnom znanju (67).

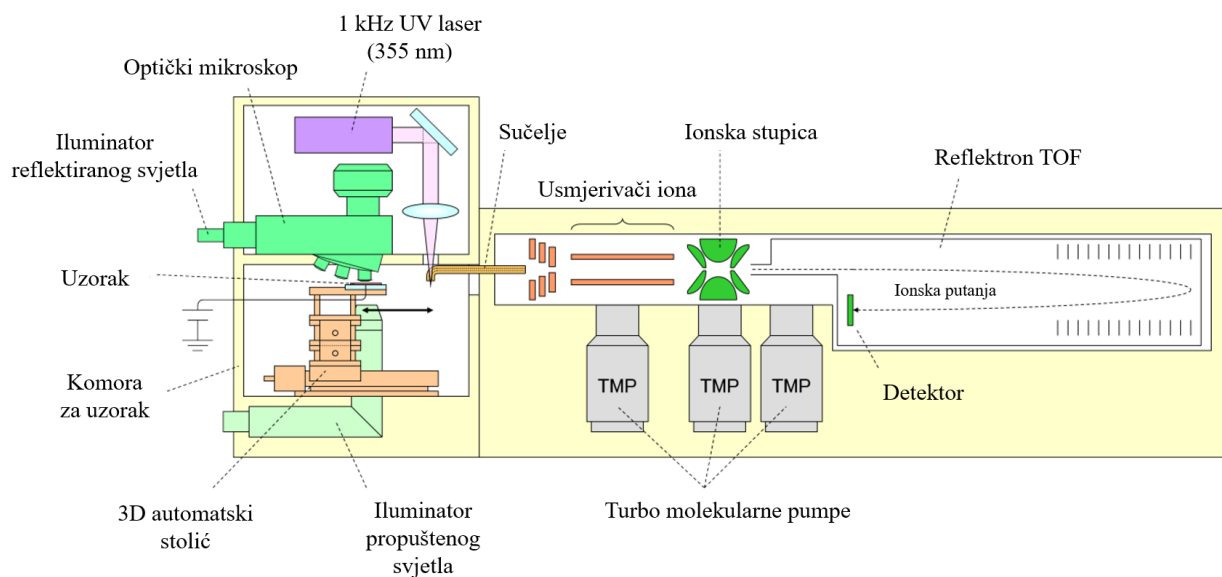
1.3.2. Slikovna spektrometrija masa temeljena na MALDI-TOF MS tehnologiji

MALDI-TOF MSI omogućuje istovremenu analizu nekoliko stotina do nekoliko tisuća metabolita iz zasebnih stanica. Metoda ne upotrebljava obilježivače za detekciju, visoko je selektivna i istovremeno može detektirati različite vrste metabolita: peptide, proteine, lijekove i njihove metabolite, nukleotide, endogene stanične metabolite, lipide, glikane, hormone i dr. (68). Kako MSI tehnike omogućuju vizualizaciju prostorne raspodjele analita prema njihovim masama, akvizicija optičke slike preparata pomoću mikroskopa prvi je korak u analizi zasebnih stanica. Za akviziciju slike može se upotrebljavati svjetlosni, fluorescentni ili polarizacijski mikroskop s ugrađenom kamerom. Neki komercijalno dostupni uređaji za MSI imaju ugrađen mikroskop u analitički sustav (npr. Shimadzu iMScope TRIO maseni mikroskop). Nakon slikanja preparat se obrađuje za MALDI-TOF MS analizu. Predobrada uzorka obavezno uključuje i nanošenje matrice.

Matrice su kristalinične tvari (po kemijskom sastavu slabe kiseline ili slabe baze) koje lako ioniziraju i imaju svojstvo apsorpcije UV zračenja. Za MSI analize matrica na preparat može biti nanescena sublimacijom ili finim sprejanjem, nakon otapanja u pogodnom otapalu. Sublimacija je bolji način nanošenja matrice jer ne uzrokuje delokalizaciju analita na preparatu, što je čest slučaj kod sprejanja otopljene matrice (69). Matrica na preparat treba biti nanescena ravnomjerno, kako bi se osigurala adekvatna ionizacija svih dijelova preparata. Da bi se postigla veća analitička osjetljivost, matricu je na preparatu potrebno rekristalizirati, što dovodi do stvaranja kristala i sažimanja matrice s biološkim materijalom koji se analizira. Veličina i uniformnost kristala utječu na ionizaciju i posljedično na osjetljivost analitičkog postupka (69).

MALDI-TOF MS analiza (70, 71) započinje laserskom desorpcijom analita i matrice. Laser (granit neodimija, itrija i aluminijskih soli (engl. *neodymium-doped yttrium aluminum garnet*, Nd:YAG), $\lambda=355$ nm) s određenim intenzitetom i frekvencijom udara po predefiniranim točkama na preparatu i desorbira, tj. izbija analite i matricu s njegove površine. Da bi MSI analiza zasebnih stanica bila moguća, analitički sustav treba zadovoljiti tehničke specifikacije za postizanje visoke lateralne rezolucije, tj. treba imati sposobnost za jasno razlikovanje dviju bliskih točaka. Visoka rezolucija snimanja obrnuto je proporcionalna s promjerom laserske zrake te je poželjno da analitički sustav ima laser čiji je promjer zrake $5\mu\text{m}$, ili manji, kako bi porijeklo desorbiranog materijala bilo isključivo iz stanice, a ne i od njene okoline. S druge strane, povećanjem rezolucije i sužavanjem promjera laserske zrake pada analitička osjetljivost jer se desorbira manja količina materijala koji ulazi u analizu. Analitičku osjetljivost moguće je povećati podizanjem napona u ionskom izvoru i detektoru te podizanjem intenziteta lasera (69, 72). U procesu laserske desorpcije dolazi i do ionizacije, tj. prijenosa naboja s matrice na analit, koja je potrebna za razdvajanje analita u spektrometru masa. Nabijeni analiti ulaze u vakuumsku komoru, gdje su pomoću sustava leća usmjereni prema jednom ili više spregnutih masenih spektrometara. U masenim spektrometrima, ovisno o principu tehnologije kojem podliježu, dolazi do separacije analita na temelju njihovih m/z kvocijenata. Kod iMScope TRIO masenog mikroskopa (Slika 1.5.) ionska stupica (engl. *ion trap*, IT) služi za selekciju m/z kvocijenata prema veličini i određuje maseni raspon molekula koje će dalje biti propuštene prema drugom spektrometru masa – TOF-u. U TOF-u se molekule razdvajaju prema vremenu preleta, tj. prema vremenu koje im je potrebno da od ulaska u TOF dolete do detektora. Molekule manje mase (tj. manjeg m/z kvocijenta) lete brže od molekula veće mase te se u tom putu preleta razdvajaju i u različito vrijeme udaraju u detektor koji generira signal. Za

povećanje osjetljivosti, umjesto linearnih TOF-ova upotrebljavaju se reflektron TOF spektrometri masa kod kojih je put preleta produžen, što dodatno utječe na masenu rezoluciju, tj. sposobnost detektora u razdvajanju različitih masa. Rezultat je MALDI-TOF MS analize maseni spektar gdje su m/z kvocijenti poredani prema veličini (x os, masa u Da) u odabranom masenom rasponu, dok je na y osi prikazan intenzitet signala u arbitrarnim jedinicama. Princip MALDI-TOF analize prikazan je na Slici 1.6.

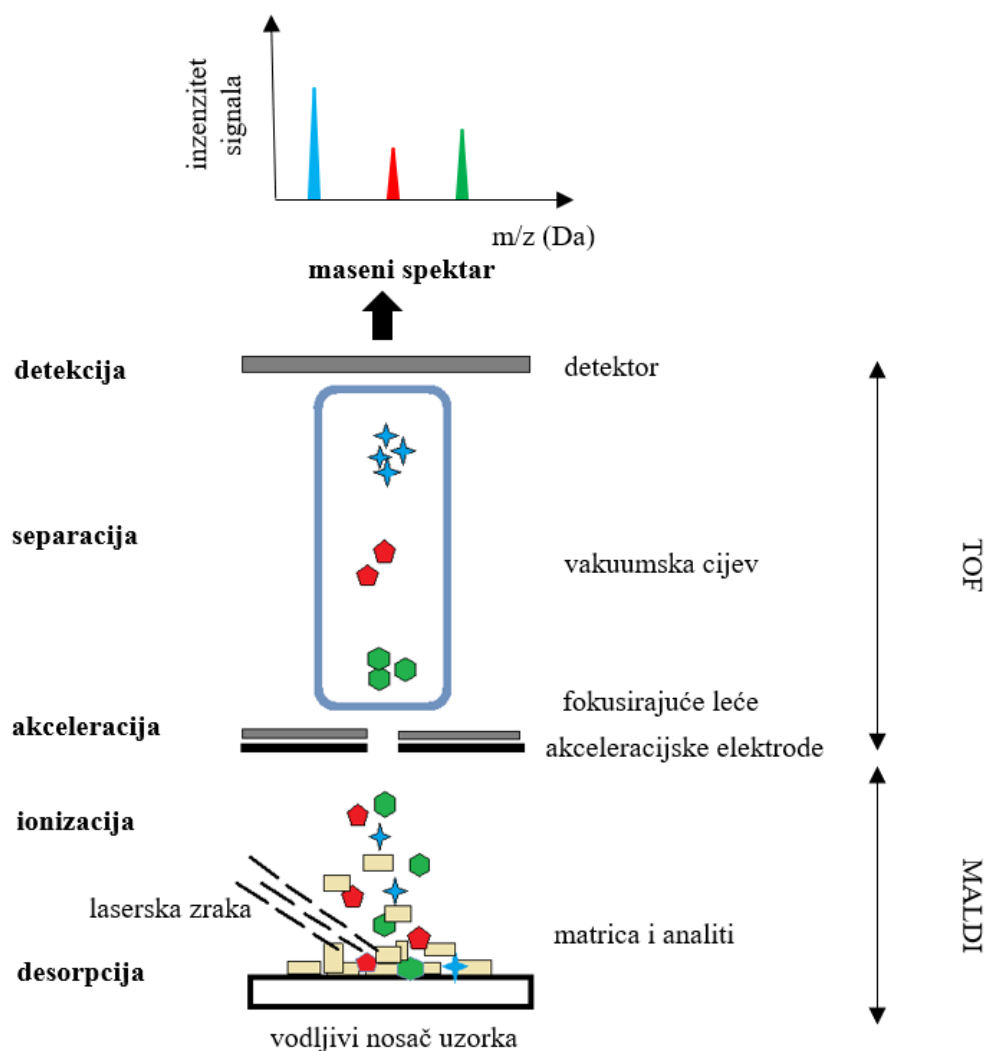


Slika 1.5. Shematski prikaz iMScope TRIO MALDI-IT-TOF uređaja s integriranim mikroskopom (prilagođeno prema (73)).

Nakon analize rezultati se obrađuju u programima za slikovnu i statističku obradu podataka. Kod analitičkih uređaja s integriranim mikroskopom preklapanje je optičke i MS slike za vizualizaciju prostorne distribucije analita automatsko jer obje slike potječu iz istog analitičkog sustava, što osigurava maksimalnu točnost njihove koregistracije. S druge strane, točnost koregistracije optičke i MS slike izazov je pri analizi zasebnih stanica kod analitičkih sustava bez integriranog mikroskopa. U tom slučaju poravnanje optičke i MS slike provodi se pomoću predodređenih markacija ili se upotrebljavaju dodatna programska rješenja treće strane (74).

Statistička obrada intenziteta signala nekoliko stotina do nekoliko tisuća m/z kvocijenata često zahtjeva multivarijantne statističke metode poput analize glavnih komponenti (engl. *principal*

component analysis, PCA), diskriminantne analize parcijalnih najmanjih kvadrata (engl. *partial least squares – discriminant analysis*, PLS-DA) i hijerarhijskog klasteriranja (engl. *high clustering analysis*, HCA) kojima se postiže redukcija dimenzionalnosti i olakšava interpretacija rezultata (75, 76).



Slika 1.6. Princip MALDI-TOF MS analize.

M/z kvocijenti mogu se provizorno anotirati pomoću javno dostupnih ili komercijalnih baza podataka, poput METASPACE (77), LIPID MAPS (78), METLIN (79), Human Metabolome Database (HMDB) (80), MassBank (81), SWISS-PROT (82) i dr. Često isti m/z kvocijent u bazi

podataka ima nekoliko anotacija, tj. navedene molekule za m/z kvocijent od interesa su izobari. Da bi potvrda identiteta bila konačna i točna, potrebno je učiniti fragmentacijsku analizu m/z kvocijenta od interesa (MS/MS ili MS^2 analiza). Molekula od interesa se, u koliziji s inertnim plinom u spektrometru masa (engl. *collision-induced dissociation*, CID), raspada na specifične fragmente ovisne o strukturi. Usporedbom spektara masa fragmenata odabrane molekule i čiste molekule (standardne otopine), ili usporedbom spektra fragmenata odabrane molekule s bazom fragmentiranih molekula može se s visokom točnošću potvrditi identitet (69).

Analiza metaboloma zasebnih stanica novo je i brzo razvijajuće područje koje nadopunjuje analizu genoma i proteoma. Kemijska raznolikost i dinamički raspon metabolita predstavljaju posebne izazove za detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju (49). S obzirom na tehničke karakteristike MALDI-TOF MSI tehnologije nameće se mogućnost njezine primjene u istraživanju metabolizma zasebnih monoklonskih limfocita B. Takav pristup istraživanju staničnog metaboloma može poboljšati razumijevanje patofiziologije KLL-a i praćenje odgovora na terapiju.

2. HIPOTEZA

Slikovna spektrometrija masa temeljena na MALDI-TOF tehnologiji može razlikovati metaboličke profile zasebnih limfocita B u zdravih ispitanika i ispitanika s kroničnom limfocitnom leukemijom.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Opći je cilj istraživanja ispitati kvalitativnu i semikvantitativnu ekspresiju metabolita limfocita B u ispitanika koji boluju od KLL-a i zdravih ispitanika, u svrhu metaboličke karakterizacije KLL-a i praćenja odgovora na terapiju.

Specifični ciljevi istraživanja obuhvaćaju:

1. optimizaciju predanalitičke i analitičke faze za MALDI-TOF MSI analizu zasebnih limfocita B,
2. identifikaciju i evaluaciju staničnih metabolita limfocita B,
3. identifikaciju diskriminatornih metabolita za razlikovanje metaboloma poliklonskih i monoklonskih limfocita B,
4. identifikaciju diskriminatornih metabolita za razlikovanje metaboloma monoklonskih limfocita B u ispitanika koji primaju i ne primaju terapiju.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ustroj studije

Istraživanje o kojem je riječ presječnog je tipa. Provedeno je u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku u suradnji s Kliničkim zavodom za transfuzijsku medicinu i Klinikom za unutarnje bolesti – Zavodom za hematologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek. Istraživanje ima pozitivno mišljenje i dozvolu za provođenje od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Osijeku (KLASA: 602-04/23-08/03) i Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Osijek (Broj: R1-9364/2022). Istraživanje je obuhvatilo zdrave ispitanike koji su činili kontrolnu skupinu i ispitanike koju boluju od kronične limfocitne leukemije (sa i bez terapije). Prije pristanka na sudjelovanje u ovom istraživanju, svim su ispitanicima bili objašnjeni ciljevi, metode istraživanja i njihov angažman putem informiranog pristanka. Svi ispitanici pristali su na sudjelovanje u ovom istraživanju stavljanjem vlastoručnog potpisa na obrazac za suglasnost.

4.2. Ispitanici

Svim ispitanicima uzorkovana je jedna epruveta krvi s K₃-EDTA antikoagulansom (ljubičasti čep) (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, SAD) iz antekubitalne vene. Početno i diferencijalno brojanje leukocita provedeno je na hematološkom analizatoru Sysmex XN-2000 (Sysmex, Kobe, Japan). Priprava izolata leukocita i staničnog preparata započela je najkasnije 2 sata nakon uzorkovanja krvi zbog *ex-vivo* metabolizma u stanicama. Uzorkovanje i analiza svih uzoraka provedena je isti dan, to jest, uzorci se nisu pohranjivali.

4.2.1. Uzorci za razvoj protokola za izolaciju leukocita i pripravu preparata za MALDIT-TOF slikovnu spektrometriju masa zasebnih CD19+ limfocita

Za razvoj izolacijskog protokola leukocita upotrebljavani su rezidualni, ali svježi uzorci pune krvi (koji nisu stariji od 2 sata). 22 uzorka upotrijebljena su za razvoj 41 varijante protokola za izolaciju leukocita i pripravu i analizu staničnih preparata. Početno i diferencijalno brojanje leukocita provedeno je na hematološkom analizatoru Sysmex XN-2000 (Sysmex, Kobe, Japan). Za razvoj protokola upotrijebljeni su samo uzorci s brojem leukocita unutar referentnog intervala.

4.2.2. Kontrolna skupina

Kontrolnu skupinu (oznaka DDK) sačinjavalo je 10 dobrovoljnih darivatelja krvi muškog spola starijih od 40 godina. Status zdravog i primjerenog dobrovoljnog darivatelja krvi za svakog ispitanika potvrđen je od strane transfuziologa. Isključni kriteriji za kontrolnu skupinu ispitanika bili su: ženski spol, dob manja od 40 godina te nemogućnost darivanja krvi zbog bilo kojeg razloga navedenog na standardnom upitniku koji potencijalni darivatelj popunjava prije darivanja krvi.

4.2.3. Neliječeni ispitanici s kroničnom limfocitnom leukemijom

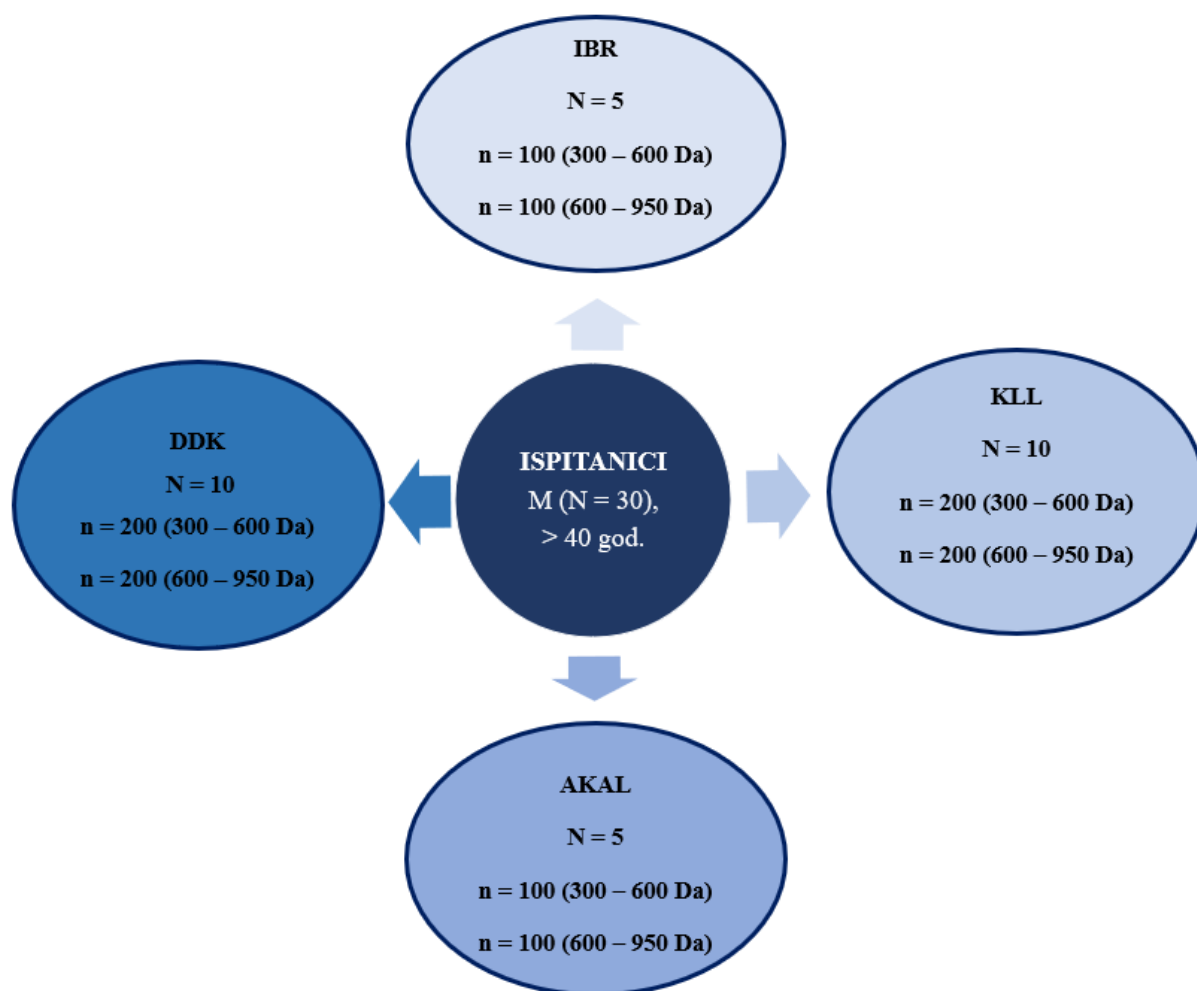
Drugu skupinu (oznaka KLL) sačinjavalo je 10 ispitanika muškog spola starijih od 40 godina koji boluju od KLL-a, a imaju stabilan tijek bolesti i ne upotrebljavaju farmakoterapiju za ublažavanje simptoma bolesti. Status stabilnog tijeka bolesti bio je potvrđen od strane hematologa prema Rai i Binet klasifikaciji i TTM skor (2). Isključni kriteriji za KLL skupinu ispitanika bili su: ženski spol, dob manja od 40 godina, akutna infekcija u trenutku uzorkovanja, prisutnost drugih ne-hematoloških onkoloških bolesti, primitak cjepiva unazad godinu dana, autoimune bolesti, infekcija HIV-om, terapija lijekovima koji utječu na metabolizam limfocita B (statini, metformin, agonisti peroksisomalnog proliferatorom-aktiviranog receptora α (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor α* , PPAR α), ritonavir).

4.2.4. Liječeni ispitanici s kroničnom limfocitnom leukemijom

Treću (oznaka IBR) i četvrtu (oznaka AKAL) skupinu sačinjavalo je po 5 muških ispitanika starijih od 40 godina koji za ublažavanje simptoma KLL-a u monoterapiji imaju jedan inhibitor BTKi-ja – ibrutinib ili akalabrutinib, u monoterapiji dulje od 3 mjeseca. Ispitanike je odabrao hematolog prema kliničkim simptomima i smjernicama iwCLL-a (2). Isključni kriteriji za obje skupine ispitanika s terapijom BTKi-ja bili su: ženski spol, dob manja od 40 godina, akutna infekcija u trenutku uzorkovanja, prisutnost drugih ne-hematoloških onkoloških bolesti, primitak cjepiva unazad godinu dana, autoimune bolesti, infekcija HIV-om, terapija lijekovima koji utječu na metabolizam limfocita B (statini, metformin, agonisti PPAR α receptora (fibrati), ritonavir), pogoršanje kliničkih simptoma, refraktorna bolest te potreba za izmjenom terapije. Slika 4.1.

4. Ispitanici i metode

prikazuje broj ispitanika po skupinama i broj CD19+ limfocita čiji su metabolomi analizirani u 2 masena raspona: po 20 stanica za svakog ispitanika analizirano je u masenom rasponu 300 –600 Da i drugih 20 stanica analizirano je u masenom rasponu 600 – 950 Da.



Slika 4.1. Broj i podjela ispitanika na skupine. DDK = dobrovoljni darivatelji krvi, kontrolna skupina; KLL = neliječeni ispitanici s KLL-om; IBR = ibrutinibom liječeni ispitanici s KLL-om; AKAL = akalabrutinibom liječeni ispitanici s KLL-om; N = broj ispitanika po skupini; n = broj zasebnih CD19+ limfocita čiji su metabolomi analizirani MALDI-TOF MSI.

4. Ispitanici i metode

Demografski i klinički podaci svih ispitanika uključenih u istraživanje prikazani su u Tablici 4.1. Svi su ispitanici muškog spola.

Tablica 4.1. Demografski i klinički podaci ispitanika svih skupina.

Oznaka	Dob (godine)	Broj leukocita (x 10 ⁹ /L)	Limfociti DKS (%)	Binet	Rai	TTM
DDK 1	46	5.6	41	NP*	NP	NP
DDK 2	42	6.2	33			
DDK 3	48	7.1	43			
DDK 4	58	9.7	44			
DDK 5	45	6.1	34			
DDK 6	52	8.2	23			
DDK 7	42	6.2	27			
DDK 8	41	4.8	36			
DDK 9	55	7.2	31			
DDK 10	62	5.6	23			
KLL 1	67	14.7	55	A	1	4.6
KLL 2	54	25.9	82	A	0	4.2
KLL 3	62	21.7	79	A	0	3.0
KLL 4	75	29.8	72	A	0	4.7
KLL 5	65	24.8	78	A	0	6.4
KLL 6	71	46.8	81	A	0	6.9
KLL 7	67	19.5	69	A	0	4.5
KLL 8	83	10.0	70	A	1	3.7
KLL 9	61	96.0	89	B	2	14.3
KLL 10	75	22.3	69	A	0	5.0
IBR 1	66	10.8	26	A	0	1.9
IBR 2	55	10.5	28	A	2	1.6
IBR 3	65	9.6	49	A	2	1.9
IBR 4	58	25.1	62	A	1	4.1
IBR 5	62	25.4	71	A	0	4.6
AKAL 1	71	12.6	41	B	1	4.1
AKAL 2	60	52.9	87	B	1	11.2
AKAL 3	69	6.8	60	A	2	1.7
AKAL 4	66	33.3	86	A	0	5.4
AKAL 5	75	12.1	70	A	2	5.6

* NP = nije primjenjivo

4.3. Metode

4.3.1. Popis kemikalija, preparativnih i analitičkih uređaja

- BD CD19-FITC (4G7) antitijela, kat. br. 345776 (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, SAD);
- BD FACS Lysing Solution reagens za lizu eritrocita, kat. br. 349202 (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, SAD);
- Fosfatom puferirana fiziološka otopina, pH 7.2 (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) (Euroimmun, Lübeck, Njemačka);
- 150 mM otopina amonijevog acetata pH~7.5, kat. br. 1.01116.1000 (Merck, Darmstadt, Njemačka);
- 100 mM N-etilmorfolin formijat (pomiješan *in-house*; N-etilmorfolin, kat.br. 149401000 (Acros Organics, Janssen-Pharmaceuticaaan, Geel, Belgija), mravlja kiselina, kat. br. 33015 (Honeywell Fluka, Seelze, Njemačka));
- 100 postotni metanol, kat. br. 1.06007.2500 (Merck, Darmstadt, Njemačka);
- matrica α -cijano-4-hidroksicinaminska kiselina (engl. *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*, CHCA), kat. br. C2020-25G (Sigma Aldrich, Burlington, Massachusetts, SAD);
- matrica 2,5-dihidrobencojeva kiselina > 99.0 % čistoće (engl. *2,5-dihydroxybenzoic acid*, DHB), kat. br. 85707-1G-F za kalibraciju MALDI-TOF MS uređaja (Sigma Aldrich, Burlington, Massachusetts, SAD);
- 5 postotna vodena otopina metanola za rekristalizaciju matrice;
- predmetna stakalca presvučena vodljivim slojem indij-kositar oksida (engl. *indium tin oxide*, ITO), kat. br. 636916-25PAK (Sigma Aldrich, Burlington, Massachusetts, SAD);
- DOMEL centrifuga s pripadajućim sistemom za cito-rotor (DOMEL, Otoki, Slovenija);
- iMLayer sublimator matrica (Shimadzu, Kyoto, Japan);
- iMScope TRIO maseni mikroskop (Shimadzu, Kyoto, Japan).

4.3.2. Razvoj izolacijskog protokola za MALDI-TOF MSI analizu zasebnih stanica

Za razvoj različitih varijanti izolacijskog protokola 150 μ L svježe K₃-EDTA rezidualne krvi pomiješano je s 20 μ L otopine antitijela obilježenih fluorescein izotiocijanatom (engl. *Fluorescein*

4. Ispitanici i metode

isothiocyanate, FITC) usmjerenih na CD19 antigen limfocita B. Provedena je inkubacija u trajanju od 20 minuta. Dodano je 2 mL BD FACS Lysing Solution za lizu eritrocita te je proveden postupak inkubacije u trajanju 5 ili 10 minuta. Stanična suspenzija zatim je centrifugirana 5 minuta na 3500, 2000, 900, 600 ili 400 g. Nakon uklanjanja supernatanta na stanični su talog dodana 2 mL PBS-a. Postupak ispiranja u PBS-u proveden je 2 ili 3 puta. 100 μ L izoliranih leukocita u PBS-u preneseno je na ITO stakalce pomoću citocentrifuge s brzinom vrtnje 20 g tijekom 8, 6, 4 ili 2 minute.

4.3.3. Razvoj protokola za fiksaciju stanica i uklanjanje soli

Nakon sušenja, ITO stakalca sa stanicama uronjena su na 1 sekundu u 100 postotni metanol kako bi se stanice fiksirale. Nakon isparavanja metanola na sobnoj temperaturi, stakalca su uronjena u otopinu hlapljivog pufera na 10 ili 20 sekundi radi uklanjanja soli, čime se smanjuje supresija ionizacije u MALDI ionskom izvoru. Testirane su dvije različite otopine hlapljivog pufera: 150 mM amonijev acetat i 100 mM N-etilmorfolin formijat (otopina pripremljena *in-house*). Nakon uranjanja, stakalca su ostavljena na sobnoj temperaturi do potpunog hlapljenja pufera.

4.3.4. Procjena kvalitete preparata

Uspješnost postupka izolacije i priprave uzorka procijenjena je pomoću svjetlosnog mikroskopa integriranog u iMScope TRIO MALDI-IT-TOF analizator. Procjena kvalitete uzorka obuhvaćala je vidljivost stanica, njihovu gustoću i integritet. Da bi priprava uzorka bila procijenjena kao adekvatna, u uzorku je trebalo biti prisutno više od 40 CD19+ limfocita koji su razdvojeni od ostalih stanica i čiji integritet nije narušen. Za potvrdnu identifikaciju CD19+ limfocita obilježenih FITC-om upotrijebljen je integrirani fluorescentni mikroskop ($\lambda_{\text{ex}} = 440$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 515$ nm). Te su stanice fotografirane integriranom CCD kamerom radi sekvencijalne i precizne lokalizacije u preparatu nakon nanošenja matrice.

4.3.5. Razvoj protokola za sublimaciju matrice i njenu rekristalizaciju

Matrica CHCA sublimirana je na ITO stakalca s izoliranim stanicama tijekom 2, 2.5, 3, 3.5, 4 ili 5 minuta pomoću iMLayer uređaja za sublimaciju u skladu s postavkama i uputama proizvođača. Matrica je na ITO stakalcu rekristalizirana pomoću 400 μL 5 postotne otopine metanola u vodi, u zatvorenoj posudi prethodno zagrijanoj na 64,7 °C. Rekristalizacija je provedena tijekom 70, 40, 30 ili 20 sekundi.

4.3.6. Optimizacija analitičkih uvjeta MALDI-TOF MSI zasebnih stanica

MALDI-TOF MSI analiza provedena je na iMScope TRIO MALDI-IT-TOF analizatoru nakon dnevne kalibracije TOF spektrometra masa DHB-om. Nakon nanošenja matrice, pozicija obilježenih FITC-CD19+ limfocita u staničnom preparatu pronađena je pomoću koordinata zabilježenih prije nanošenja matrice. Svaka stanica je pronađena pomoću integriranog fluorescentnog mikroskopa, a stanice su ponovno snimljene pomoću integrirane CCD kamere u prikazu svjetlosnim mikroskopom u *incident* načinu rada (izvor svjetlosti mikroskopa obasjava preparat od gore). U pozitivnom modu ionizacije testirani su sljedeći analitički uvjeti: D0 (promjer lasera 5 μm , veličina x i y zahvata 6.5 x 5.5 μm , intenzitet lasera 15.1 %, frekvencija 20 Hz, 20 snimaka po pikselu) i D1 (promjer lasera 10 μm , veličina x i y zahvata 11.0 x 9.0 μm , intenzitet lasera 21.7 %, frekvencija 20 Hz, 20 snimaka po pikselu) u rasponima masa 300 – 600 Da i 600 – 950 Da. Za svaki CD19+ limfocit i njegovu okolinu (medij) analizirano je 36 piksela.

4.3.7. Optimizirani protokol predanalitičkih i analitičkih uvjeta za MALDI-TOF MSI CD19+ limfocita

150 ili 100 μL K₃-EDTA krvi (ovisno o početnom broju leukocita, Tablica 4.2.) od svakog ispitanika pomiješano je s 20 μL otopine antitijela FITC-CD19 i inkubirano 20 minuta. Dodano je 2 mL BD FACS Lysing Solution i inkubirano 5 minuta. Suspenzija je centrifugirana 5 minuta na 900 g, supernatant je odbačen, a staničnom talogu dodano je 2 mL PBS-a. Stanična suspenzija ponovno je centrifugirana na 400 g, supernatant je odbačen, a staničnom talogu dodan je PBS prema početnom broju leukocita (Tablica 4.1.).

Tablica 4.2. Odnos broja leukocita u punoj krvi, volumena krvi koji ulazi u pripravu i volumena PBS-a nakon završnog centrifugiranja.

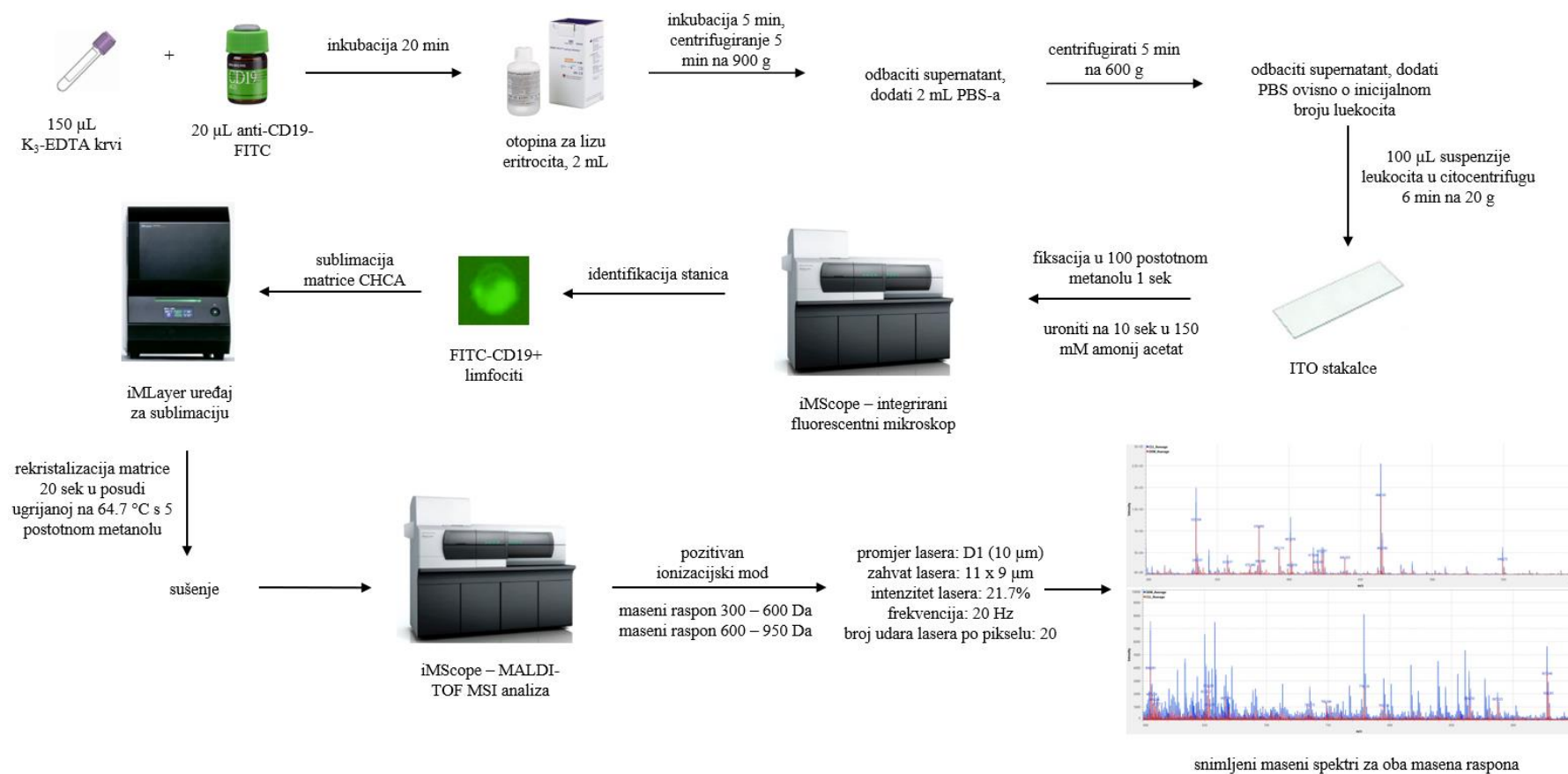
Početni broj leukocita u punoj krvi ($\times 10^9/L$)	Volumen pune krvi koji ulazi u pripravu (μL)	Volumen PBS-a nakon završnog centrifugiranja (mL)
10	150	4
20		6
30		8
40		10
50		12
60	100	6
70		8
80		10
90		12
100		14

100 μL izoliranih leukocita u PBS-u preneseno je na ITO stakalce pomoću citocentrifuge s brzinom vrtnje 20 g tijekom 6 minuta. Stanice su fiksirane na ITO stakalcima sa 100 postotnim metanolom (stakalca su bila uronjena u metanol 1 sekundu). Nakon sušenja stakalca su bila uronjena u 150 mM amonijev acetat 10 sekundi. Preparati su ostavljeni da se osuše u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon procjene kvalitete uzorka, odabrano je i fotografirano 40 FITC-CD19+ limfocita. CHCA matrica je sublimirana na ITO stakalca tijekom 2 minute (za usporedbu kontrolne skupine i neliječanih KLL ispitanika) i 5 minuta (usporedba KLL, IBR i AKAL skupina) i rekristalizirana s 400 μL 5 postotne otopine metanola u vodi tijekom 20 sekundi u zatvorenoj posudi prethodno zagrijanoj na 64,7 °C.

Maseni spektri 40 CD19+ limfocita po ispitaniku (20 stanica u rasponu mase 300 – 600 Da i 20 stanica u rasponu mase 600 – 950 Da) snimljeni su u pozitivnom ionizacijskom modu s D1 analitičkim uvjetima. Zadano područje za analizu postavljeno je na 36 laserskih točaka za svaki CD19+ limfocit i njegovu okolinu, tj. 36 piksela, gdje je 1 pozicija udara lasera postavljena izravno na stanicu.

Schema optimiziranog predanalitičkog i analitičkog postupka prikazana je na Slici 4.2.

4. Ispitanici i metode



Slika 4.2. Optimizirani predanalitički (izolacija i priprava staničnog preparata) i analitički (postavke MALDI-TOF analize) protokol za MSI zasebnih CD19+ limfocita.

4.4. Statistička obrada podataka

4.4.1. Razlikovanje metaboličkog otiska CD19+ limfocita od okoline na temelju m/z kvocijenata

Razlike u intenzitetu m/z signala između stanica i stanične okoline dobivene su za odgovarajuća područja interesa (engl. *region of interest*, ROI) u programskom paketu IMAEREVEAL v1.1 (Shimadzu, Kyoto, Japan). PCA (metoda nenadziranog strojnog učenja) (83) upotrebljavana je za smanjenje dimenzionalnosti i procjenu sposobnosti analitičke metode za razlikovanje CD19+ limfocita u odnosu na okolinu. Da bi protokol pripreme uzorka bio valjan, u 2D PCA analizi su ROI-jevi stanica trebali biti potpuno odvojeni od ROI-jeva stanične okoline (medija).

4.4.2. Obrada masenih spektara CD19+ limfocita zdravih ispitanika i neliječenih KLL ispitanika

Nakon MALDI-TOF MSI analize, ROI-jevi su iscertani preko svih analiziranih DDK i KLL CD19+ limfocita. Mogućnost ručnog poravnanja, tj. koregistracije optičke i MS slike nije korištena. Granična tolerancija odstupanja mase postavljena je na 50 ppm. Za smanjenje dimenzionalnosti i procjenu sposobnosti metode da razlikuje metabolome KLL od DDK CD19+ limfocita na temelju ukupnih masenih spektara pojedinačnih stanica, korištena je PLS-DA. PLS-DA je, kao i PCA, multivarijantna metoda koja se upotrebljava za redukciju dimenzionalnosti. Međutim, za razliku od PCA, PLS-DA je metoda nadziranog strojnog učenja gdje su poznate informacije o svakoj skupini (84). Granična vrijednost za intenzitet signala m/z kvocijenata u masenom rasponu 300 – 600 Da bila je postavljena na 1 % intenziteta najjačeg m/z kvocijenta, dok je za maseni raspon 600 – 950 Da granična vrijednost bila postavljena na 10 % intenziteta najjačeg signala m/z kvocijenta. Točnost PLS-DA klasifikacije CD19+ limfocita koji dolaze iz KLL i DDK skupina procijenjena je 10-strukom unakrsnom validacijom ponovljenom 10 puta. U tu svrhu korišten je skup podataka koji se sastojao od 100 KLL i 100 DDK CD19+ limfocita za svaki raspon mase. Maseni spektri normalizirani su prema ukupnom intenzitetu signala m/z kvocijenata (engl. *total ion count*, TIC); intenzitet svakog signala u spektru podijeljen je s ukupnim intenzitetom signala za skupinu od 20 CD19+ limfocita po ispitaniku. Normalizacija (proces pretvaranja

4. Ispitanici i metode

spektralnog intenziteta svakog piksela u zajedničku skalu intenziteta (76)) je provedena s ciljem smanjenja eventualne predanalitičke i/ili analitičke varijacije i očuvanja dokaza biološke varijacije (85). *Kutija-i-brkovi* dijagrami korišteni su za prikaz razlike u intenzitetu signala između promatranih skupina. Vulkanski dijagrami korišteni su za odabir značajnih m/z kvocijenata iz normaliziranih masenih spektara pojedinačnih stanica. Diskriminantne linije na vulkanskim dijagramima za svaki raspon mase bile su postavljene na dvostruku promjenu intenziteta signala m/z kvocijenata i na P vrijednost dobivenu Kruskal-Wallisovim H testom koja je korigirana na stopu lažnih otkrića (engl. *false discovery rate*, FDR) < 5 %. Intenziteti signala koji su zadovoljavali dvostruku promjenu i statističke kriterije smatrani su značajnima. PLS-DA, *Kutija-i-brkovi* dijagrami te vulkanski dijagrami izrađeni su pomoću statističkog paketa R ver 4.2 (86).

4.4.3. Obrada masenih spektara CD19⁺ limfocita neliječenih i liječenih KLL ispitanika

Nakon MALDI-TOF MSI analize, ROI-jevi su iscrtani preko svih analiziranih KLL, IBR i AKAL CD19⁺ limfocita. Obrada podataka za navedene skupine provedena je na način kako je opisano u odjeljku 4.4.2. sa sljedećim razlikama: granična vrijednost za intenzitet m/z signala u masenom rasponu 300 – 600 Da bila je postavljena na 5 % intenziteta najjačeg signala m/z kvocijenta, dok je za maseni raspon 600 – 950 Da granična vrijednost bila postavljena na 10 % intenziteta najjačeg signala m/z kvocijenta. Za pregled statistički značajnih m/z kvocijenata između skupina upotrijebljeni su vulkanski dijagrami s diskriminantnim linijama postavljenim na dvostruku promjenu intenziteta signala i na 5 % za FDR-korigiranu P-vrijednost dobivenu Mann-Whitney U testom za parne usporedbe. Vennov dijagram korišten je za prikaz grupno specifičnih promjena u intenzitetu signala m/z kvocijenata između KLL-a i BTKi skupina. PLS-DA, Vennov, vulkanski i *Kutija-i-brkovi* dijagrami izrađeni su pomoću statističkog paketa R ver 4.2 (86).

4.4.4. Provizorna m/z anotacija i neciljano metaboličko profiliranje

Za provizornu m/z anotaciju, tj. okvirnu identifikaciju metabolita, upotrijebljene su dvije javno dostupne baze podataka: HMDB (80) i METASPACE (77). Filteri primijenjeni za pretraživanje HMDB-a bili su pozitivni polaritet, M+H, M+H-H₂O, M+H-2H₂O, M+NH₄-H₂O, M+NH₄, M+Na

4. Ispitanici i metode

i M+K maseni adukti i tolerancija mase od 50 ppm. Filteri primijenjeni za METASPACE bazu bili su pozitivni polaritet, HMDB-endogeni v4. za pretraživanje baze podataka, FDR 50 %, organizam Homo Sapiens, MALDI izvor ionizacije i tolerancija mase od 50 ppm. Za istraživanje metaboličkih putova korištena je baza podataka PATHWAY Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (87).

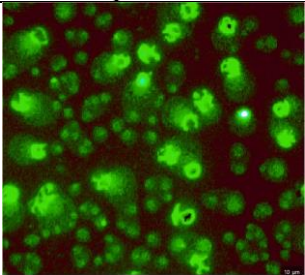
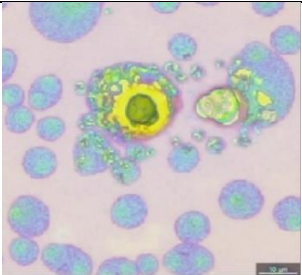
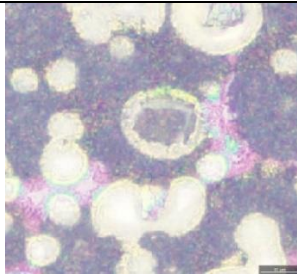
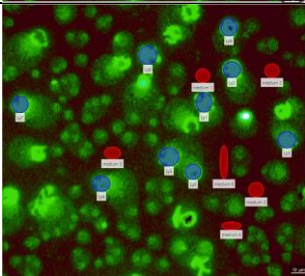
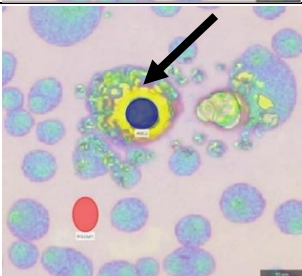
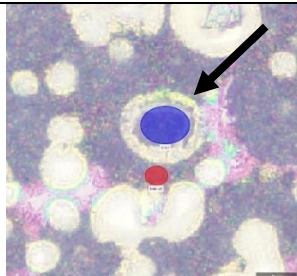
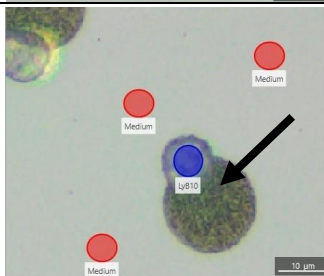
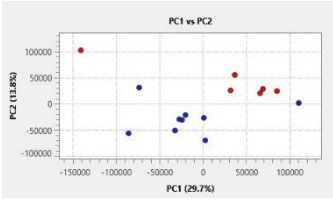
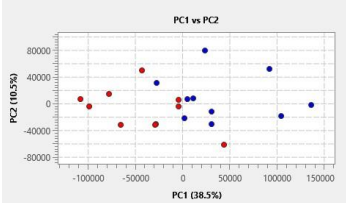
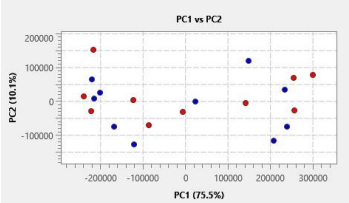
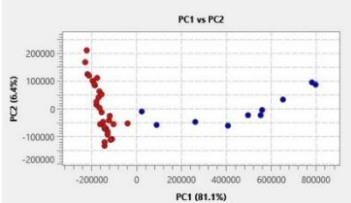
5. REZULTATI

5.1. Evaluacija razvoja protokola za izolaciju leukocita i pripravu staničnog preparata za MALDI-TOF MSI zasebnih CD19+ limfocita

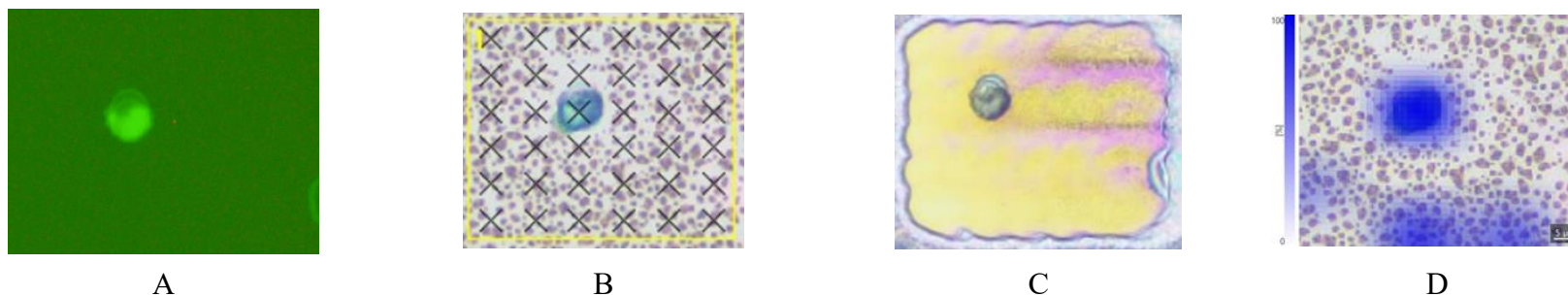
Nekoliko različitih predanalitičkih i analitičkih uvjeta za razvoj protokola za izolaciju leukocita te pripravu staničnog preparata za MALDI-TOF MSI zasebnih CD19+ limfocita (opisanih u odjeljcima 4.3.2. – 4.3.7.) prikazani su na Slici 5.1. PCA je upotrijebljena za procjenu učinkovitosti cjelokupnog procesa, a protokol je potvrđen kao valjan tek u slučaju potpunog razdvajanja ROI-ja stanica od ROI-ja medija (Slika 5.1. D). Neadekvatne pripreve s raspadom stanica zbog prebrzog centrifugiranja, neadekvatne vrste hlapljivog pufera, neadekvatne količine matrice i duljine rekristalizacije te neadekvatnih analitičkih uvjeta prikazane su na Slici 5.1. A – C.

Kako je promjer limfocita B oko 8 – 10 μm , bitno je da kod preklapanja, tj. koregistracije optičke slike i slike prostorne distribucije analita prema m/z kvocijentima (MS slika), dobivene nakon MALDI-TOF MSI analize, ne dolazi do pomaka, jer neadekvatno preklapanje utječe na broj m/z signala koji su obuhvaćeni iscrtavanjem ROI-ja preko stanica. Dodatno poravnanje slika u ovom istraživanju nije primjenjivano, a mogući pomaci u poravnanju između optičke i MS slike isključeni su dodatnim slikanjem CD19+ stanica nakon nanošenja matrice. Primjer identifikacije CD19+ limfocita, odabira 36 piksela za analizu i ispravnog poravnanja optičke i MS slike nakon MALDI-TOF analize prikazan je na Slici 5.2.

5. Rezultati

	A	B	C	D
uvjeti pripreve	centrifugiranje 3500g, ispiranje PBS-om 3x, 20 sek amonijevog acetata, CHCA 2.5 min, rekristalizacija 70 sek, D0 postavke lasera	10 sek 150 mM amonijev acetat, CHCA 2.5 min, rekristalizacija 30 sek, D0 postavke lasera	10 sek 100 mM N-etilmorfolin formijat, CHCA 3 min, rekristalizacija 70 sek, D0 postavke lasera	10 sek 150 mM amonijev acetat, CHCA 2 min, rekristalizacija 20 sek, D1 postavke lasera
mikroskopska slika nakon sublimacije matrice				
isertani ROI-ji				
PCA				
broj analiziranih ROI-ja	9 limfocita (plavo) vs. 6 medija (crveno)	11 limfocita (plavo) vs. 9 medija (crveno)	10 limfocita (plavo) vs. 10 medija (crveno)	10 limfocita (plavo) vs. 30 medija (crveno)

Slika 5.1. Prikaz različitih razvojnih protokola (A – C) i optimiziranog protokola (D) za izolaciju leukocita i izradu staničnog preparata za MADLI-TOF MSI CD19+ limfocita. Uspješnost izolacijskog protokola i izrade preparata ocijenjena je s usporedbom intenziteta signala m/z kvocijenata iz ROI-ja iscrtanih preko stanica (crveno) i oko stanica (plavo). Zbog promjene tlaka u sublimacijskoj komori, tijekom sublimacije matrice dolazi do pucanja stanica i izlivanja staničnog sadržaja (prikazano strelicom).



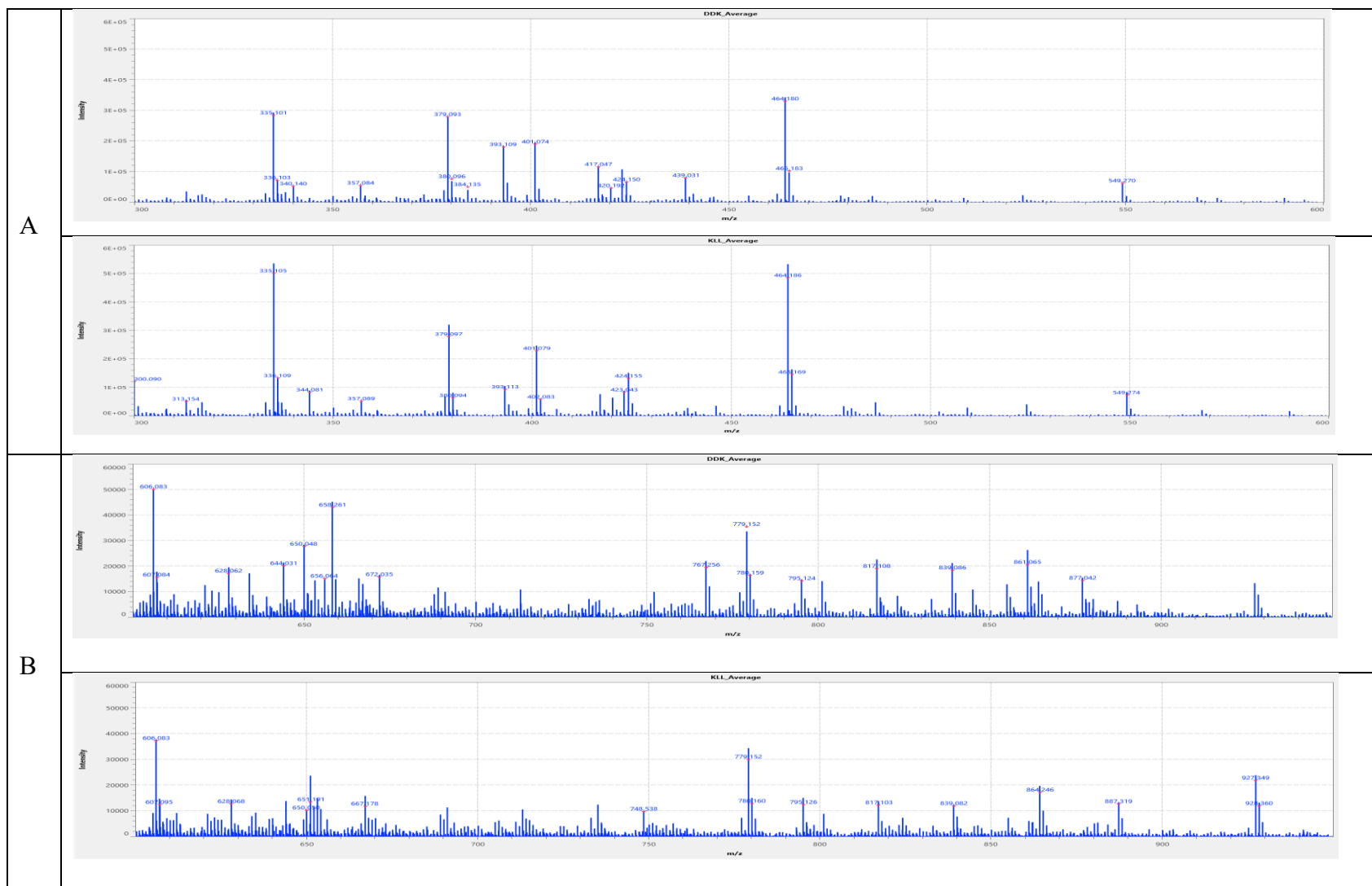
Slika 5.2. Identifikacija, odabir mjesta snimanja i koregistracija optičke i MS slike kod MALDI-TOF MSI jednog CD19+ limfocita. A) identifikacija FITC-om obilježenog CD19+ limfocita (integrirani fluorescentni mikroskop, povećanje 400x) prije sublimacije CHCA; B) CD19+ limfocit nakon sublimacije CHCA s označenih 36 mjesta udara lasera (integrirani svjetlosni mikroskop, povećanje 400x); C) CD19+ limfocit nakon MALDI-TOF analize s vidljivim tragom laserske desorpcije uzorka s površine preparata; D) preklopljene optička i MS slika CD19+ limfocita s prikazom prostorne distribucije jednog m/z kvocijenta – najveći intenzitet signala lokaliziran je na stanici.

5.2. MALDI-TOF MSI zasebnih CD19+limfocita i neciljano metaboličko profiliranje u neliječenih ispitanika

Nakon optimizacije predanalitičkih i analitičkih uvjeta, s MALDI-TOF MSI analizirano je 400 CD19+ limfocita (po 200 iz DDK i KLL skupina) u masenom rasponu 300 – 600 Da i 400 CD19+ limfocita (po 200 iz DDK i KLL skupina) u masenom rasponu 600 – 950 Da. Slika 5.3. prikazuje prosječne spektre masa ROI-ja po promatranim skupinama za oba masena raspona. PLS-DA ukupnih masenih spektara upotrebljavana je za razlikovanje metaboloma CD19+ limfocita DDK i KLL ispitanika (Slika 5.4. A i D). Na slikama je vidljivo razdvajanje stanica u odgovarajuću skupinu, međutim, razdvajanje je uočljivije za maseni raspon 300 – 600 Da u odnosu na maseni raspon 600 – 950 Da. Za oba masena raspona heterogenost skupa (varijanca) manja je za KLL skupinu u odnosu na DDK skupinu (narančasta i plava površina na Slici 5.4. A i D). Točnost klasifikacije stanica u odgovarajuću skupinu za oba masena raspona prikazana je na Slici 5.4. B i E. Vulkanski dijagram korišten je za prikaz m/z kvocijenata koji su najviše utjecali na razdvajanje dviju skupina stanica (Slika 5.4. C i F).

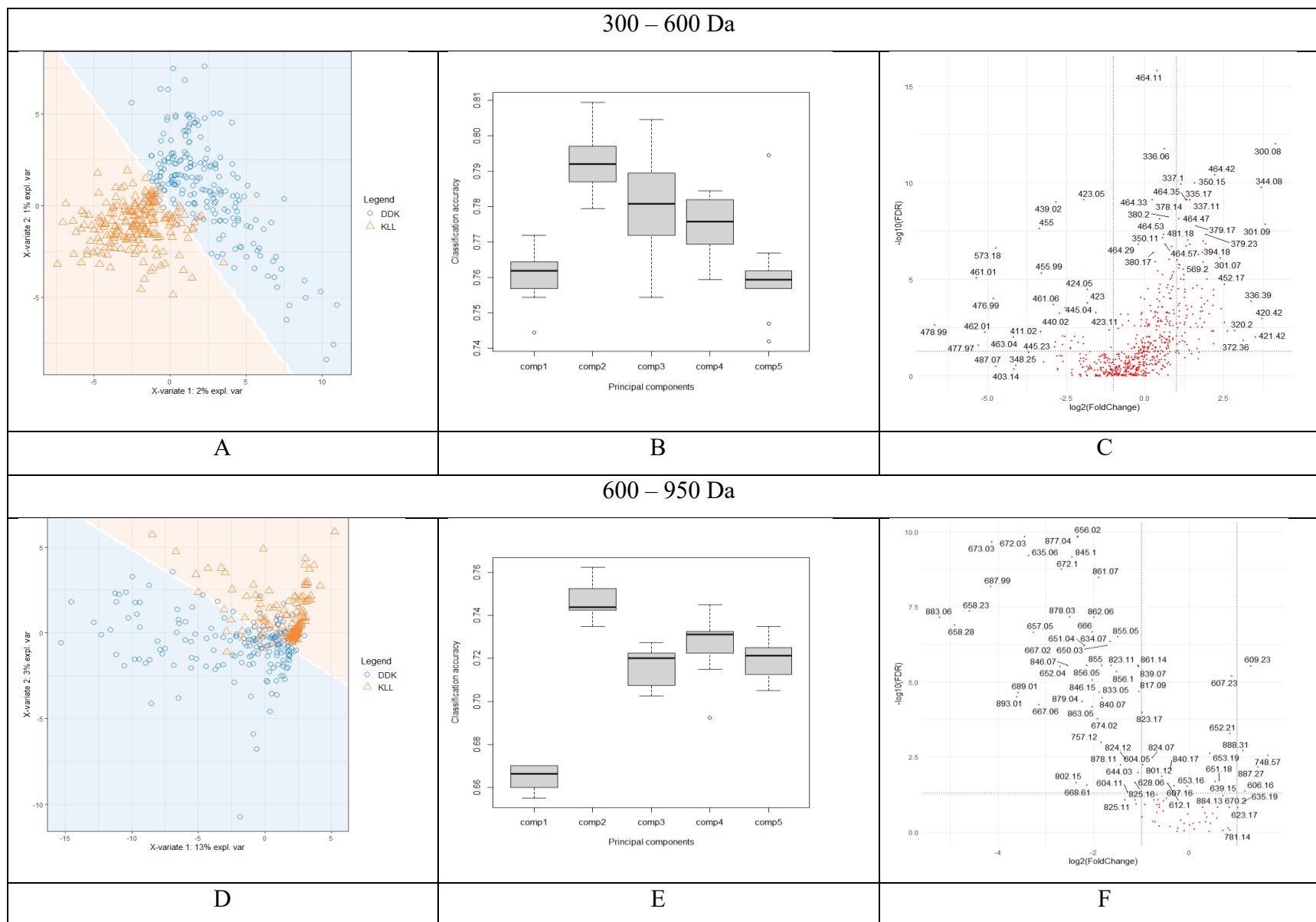
125 intenziteta signala m/z kvocijenata bilo je značajno različito u masenom rasponu 300 – 600 Da (Kruskal-Wallis H test, $P < 0.05$). *Kutija-i-brkovi* dijagram prikazuje 7 odabranih m/z kvocijenata s najvećom razlikom u intenzitetu signala (Slika 5.5.) dok Tablica 5.1. prikazuje te m/z kvocijente provizorno identificirane.

52 intenziteta signala m/z kvocijenata bila su značajno različita u masenom rasponu 600 – 950 Da (Kruskal-Wallis H test, $P < 0.05$). Kako su intenziteti signala m/z kvocijenata za cijeli raspon bili niski, *Kutija-i-brkovi* dijagrami nisu prikazani. Nadalje, statistički značajne razlike u intenzitetu signala m/z kvocijenata ukazivale su na općenito niži stanični sadržaj metabolita kod KLL ispitanika u odnosu na DDK ispitanike, ali ni jedan m/z kvocijent iz ovog masenog raspona nije provizorno identificiran pomoću korištenih baza podataka.

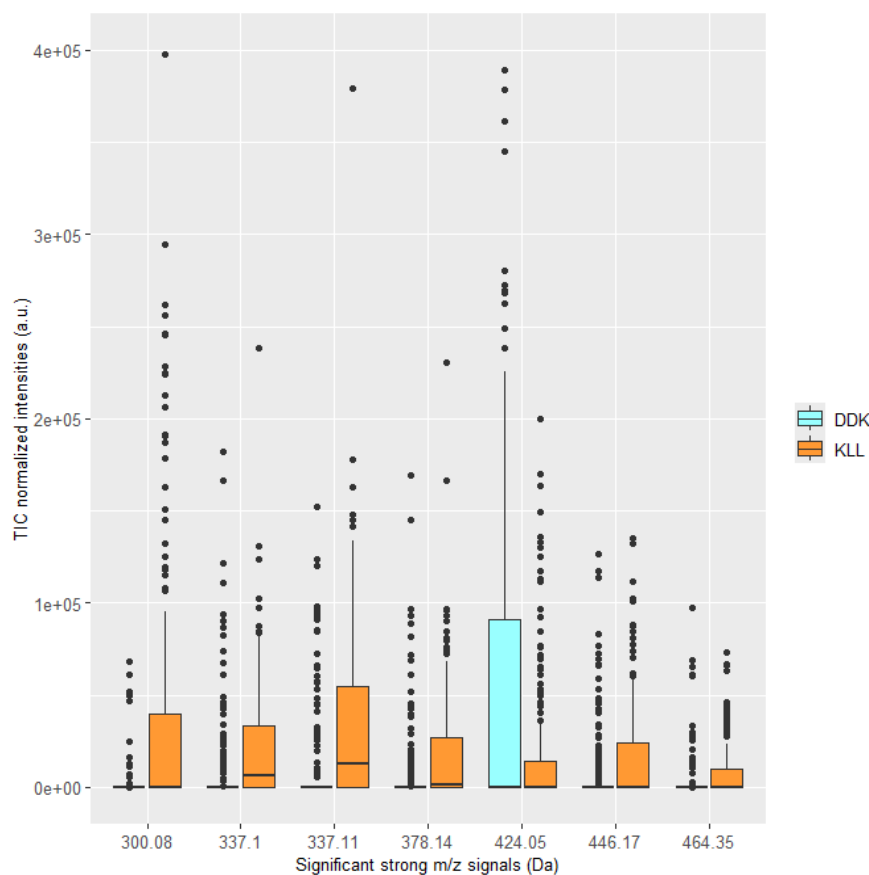


Slika 5.3. TIC normalizirani prosječni spektri masa odabranih ROI-ja kod usporedbe DDK i KLL skupina ispitanika. A) 300 – 600 Da, B) 600 – 950 Da.

5. Rezultati



Slika 5.4. PLS-DA i redukcija dimenzionalnosti, točnost klasifikacije i vulkanski dijagrami m/z kvocijenata za masene raspone 300 – 600 Da i 600 – 950 Da. PLS-DA prikaz (A i D) raspodjele CD19+ limfocita i heterogenost skupa za KLL i DDK skupinu (n = 400 za svaki maseni raspon). Analiza točnosti PLS-DA klasifikacije (B i E) 10-stukom unakrsnom validacijom ponovljenom 10 puta prikazuje najveću točnost klasifikacije kod 2 glavne komponente (79 % i 75 % za maseni raspon 300 – 600 Da odnosno 600 – 950 Da). Vulkanski dijagrami (C i F) s predefiniranim diskriminantnim linijama prikazuju m/z kvocijente (crvene točke) koji najviše pridonose razdvajanju skupina.



Slika 5.5. *Kutija-i-brkovi dijagrami* s prikazom odnosa intenziteta signala 7 m/z kvocijenata u KLL (narančasti Box) i DDK (plavi Box) CD19+ limfocitima. Vidljiv je i veliki rasap intenziteta signala između CD19+ limfocita unutar iste skupine.

Tablica 5.1. Provizorno anotirani m/z kvocijenti čiji je sadržaj promijenjen u KLL-u i njihov biološki značaj

Izmjereni m/z	METASPACE m/z	HMDB m/z	Devijacija mase (ppm)	Adukt	Metabolit	KEGG ID	Biološki značaj	P ⁺
300.08	300.08	300.08	14	M+H	4'-Fosfopantotenat	C03492	metabolizam pantotenata i CoA	< 0.001
	300.09	300.08	15	M+K	Metilmalonilkarnitin	N.D.*	β-oksidacija, mitohondrijski metabolizam	
	300.09	300.08	15	M+K	Sukcinilkarnitin	N.D.	β-oksidacija, mitohondrijski metabolizam	
	300.09	300.09	44	M+H	8-hidroksigvanozin	N.D.	oksidativno oštećenje nukleinskih kiselina	
	-	300.07	49	M+H-2H ₂ O	S-Formilglutation	C01031	detoksikacija formaldehida ovisna o glutationu	
337.10	337.08	337.08	42	M+H	S-Nitrozoglutation (GSNO)	N.D.	regulacija RNS-ova, tumorska proliferacija	< 0.001
	337.08	337.08	42	M+K	Lizofosfatidična kiselina (8:0/0:0) (LPA)	N.D.	metabolizam glicerofosfolipida, signalna molekula	
337.12	337.10	337.10	38	M+Na	7,8-Dihidropteroična kiselina	C00921	metabolizam tetrahidrofolne kiseline,	< 0.001
	-	337.12	6	M+NH ₄ -H ₂ O	S-Hidroksimetilglutation	C14180	detoksikacija formaldehida ovisna o glutationu	
378.14	378.15	-	8	M+Na	S-Adenozilmetioninamin	C01137	metabolizam poliamina i autofagija	< 0.001
424.05	-	424.06	16	M+NH ₄ -H ₂ O	Tiamin pirofosfat (TPP)	C00068	metabolizam ugljikohidrata, tumorski metabolizam	< 0.001
446.17	446.18	446.18	20	M+H	Tetrahidrofolna kiselina (THF)	C00101	transfer C1, sinteza nukleinskih kiselina	< 0.001
464.35	464.34	464.33	36	M+Na	3-Hidroksi-11Z-oktadekanoilkarnitin	N.D.	β-oksidacija, mitohondrijski metabolizam	< 0.001
	-	464.36	21	M+NH ₄ -H ₂ O	Sfingozil-fosfokolin (SFK)	C03640	metabolizam sfingolipida	

* N.D. = nije dostupno; ⁺ P = Kruskal-Wallis H test.

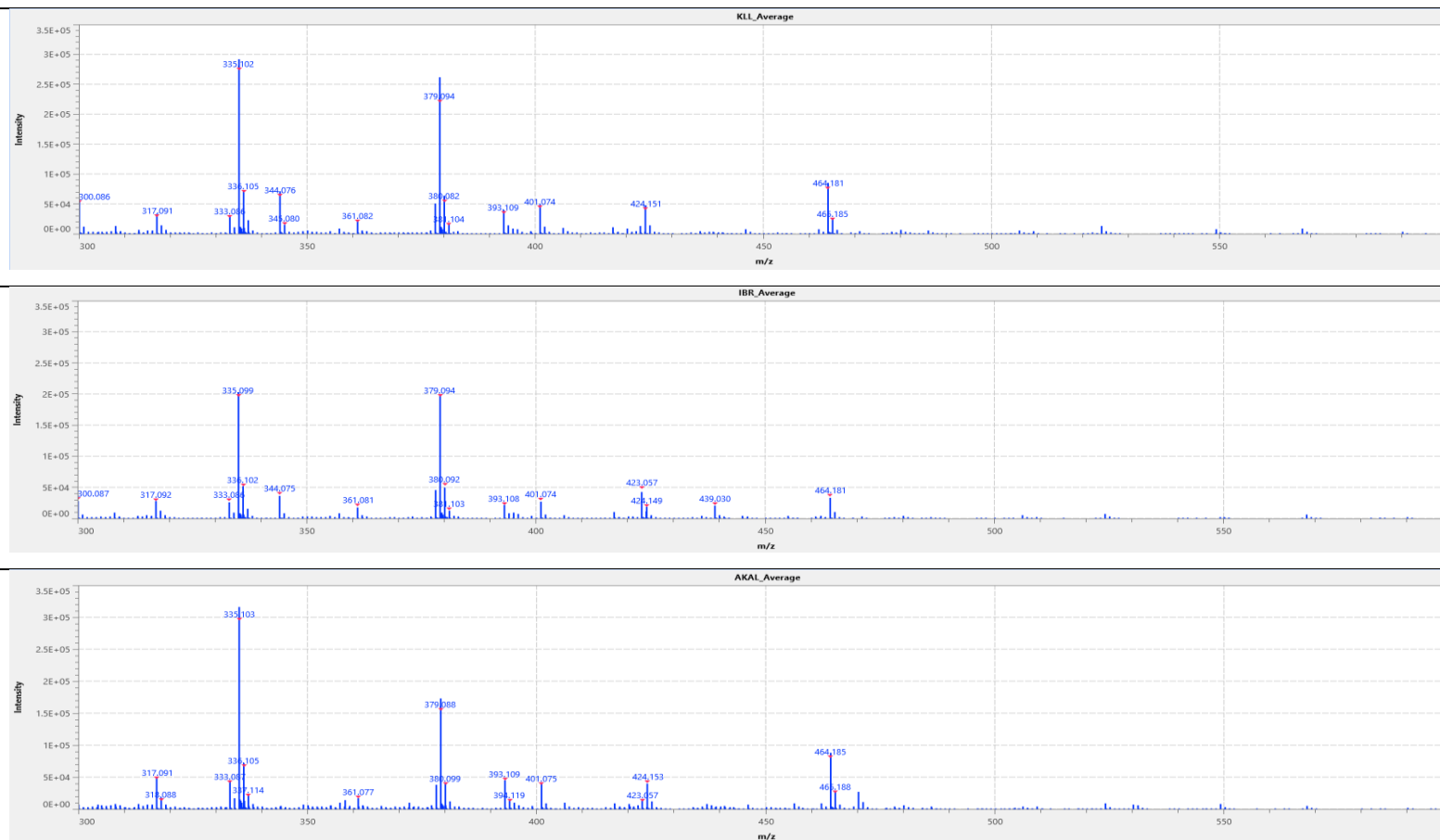
5.3. MALDI-TOF MSI zasebnih CD19+ limfocita i neciljano metaboličko profiliranje terapijskih učinaka BTKi-ja

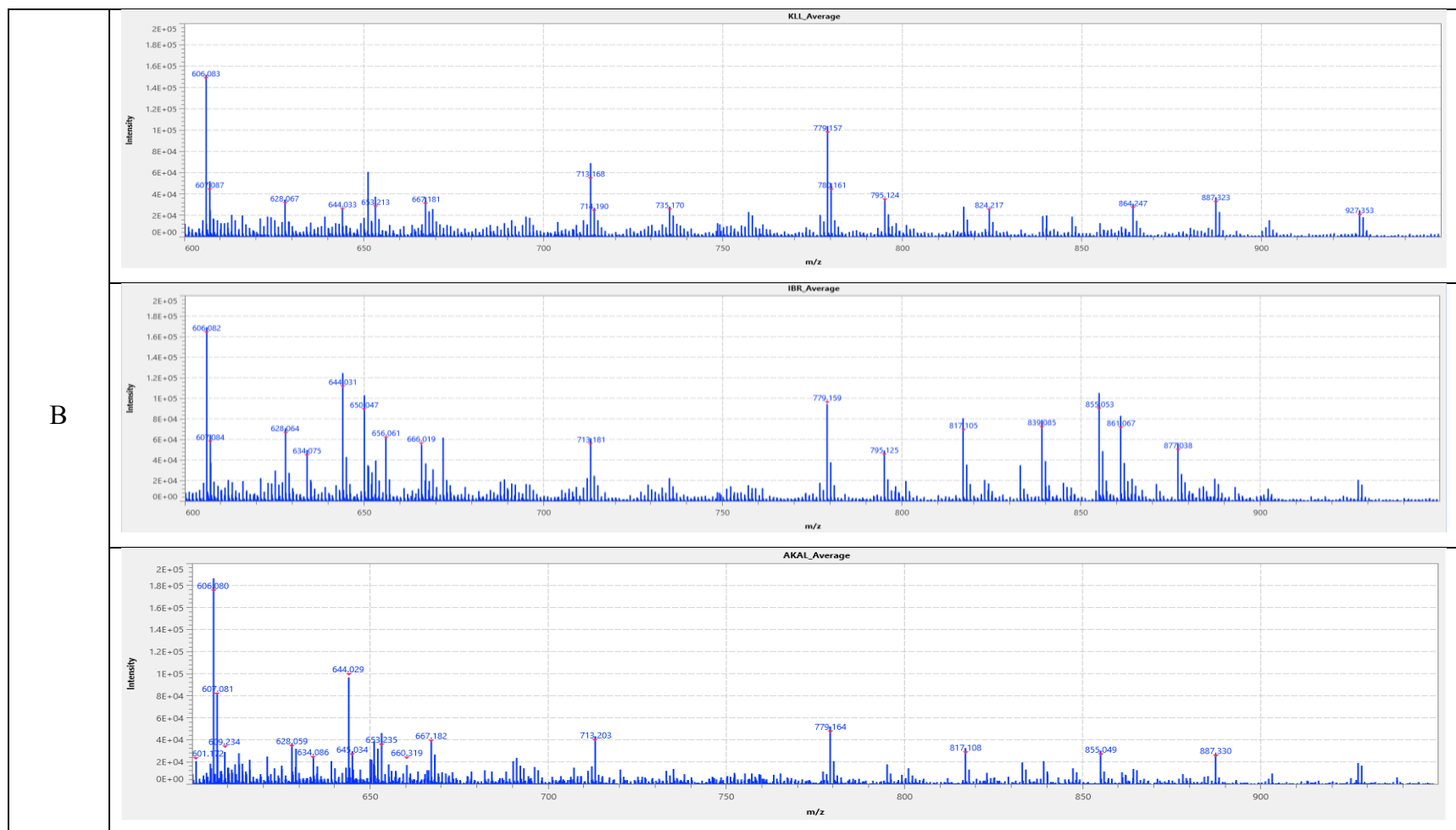
MALDI-TOF slikovnom spektrometrijom masa analizirano je 400 CD19+ limfocita (200 iz KLL skupine i po 100 iz IRB i AKAL skupina) u masenom rasponu 300 – 600 Da i 400 CD19+ limfocita (200 KLL skupine i po 100 iz IRB i AKAL skupina) u masenom rasponu 600 – 950 Da. Slika 5.6. prikazuje prosječne masene spektre po ROI-ju za sve promatrane skupine i za oba masena raspona. PLS-DA ukupnih masenih spektara upotrebljavana je za razlikovanje metaboloma CD19+ limfocita neliječenih i liječenih ispitanika (Slike 5.7. i 5.11.).

Metabolomi CD19+ limfocita snimljeni u masenom rasponu 300 – 600 Da pokazuju zadovoljavajuću klasifikaciju stanica u odgovarajuću skupinu, međutim postoji preklapanje distribucije KLL stanica sa stanicama iz IBR i AKAL skupine. PLS-DA razgraničenje CD19+ limfocita između IBR i AKAL skupine je jasnije (Slika 5.7. A). Najheterogeniji skup čine stanice u IBR skupini (narančasta površina), dok KLL stanice čine najhomogeniji skup (siva površina). Točnost klasifikacije stanica u odgovarajuću skupinu prikazana je na Slici 5.7. B, i najveća je na 3 glavne komponente te iznosi 69 %. Slike 5.7. C i D prikazuju doprinos pojedinih m/z kvocijenata na prvu i drugu glavnu komponentu PLS-DA – ti m/z kvocijenti imali su najveći utjecaj na razdvajanje stanica prema staničnom metabolomu i na klasifikaciju u ispravnu skupinu. *Kutija-i-brkovi* dijagram prikazuje značajno različit odnos intenziteta signala 43 m/z kvocijenta između promatranih skupina (Slika 5.8.), a m/z kvocijenti koji su provizorno anotirani prikazani su u Tablici 5.2. Vulkanski dijagrami (Slika 5.9.) parnih usporedbi skupina prikazuju statistički značajne m/z kvocijente koji doprinose razdvajanju pojedinih skupina (Mann-Whitney U test, $P < 0.05$), dok Vennov dijagram ukazuje na m/z kvocijente čiji je intenzitet signala posljedica terapije različitim BTKi-jevima (Slika 5.10.).

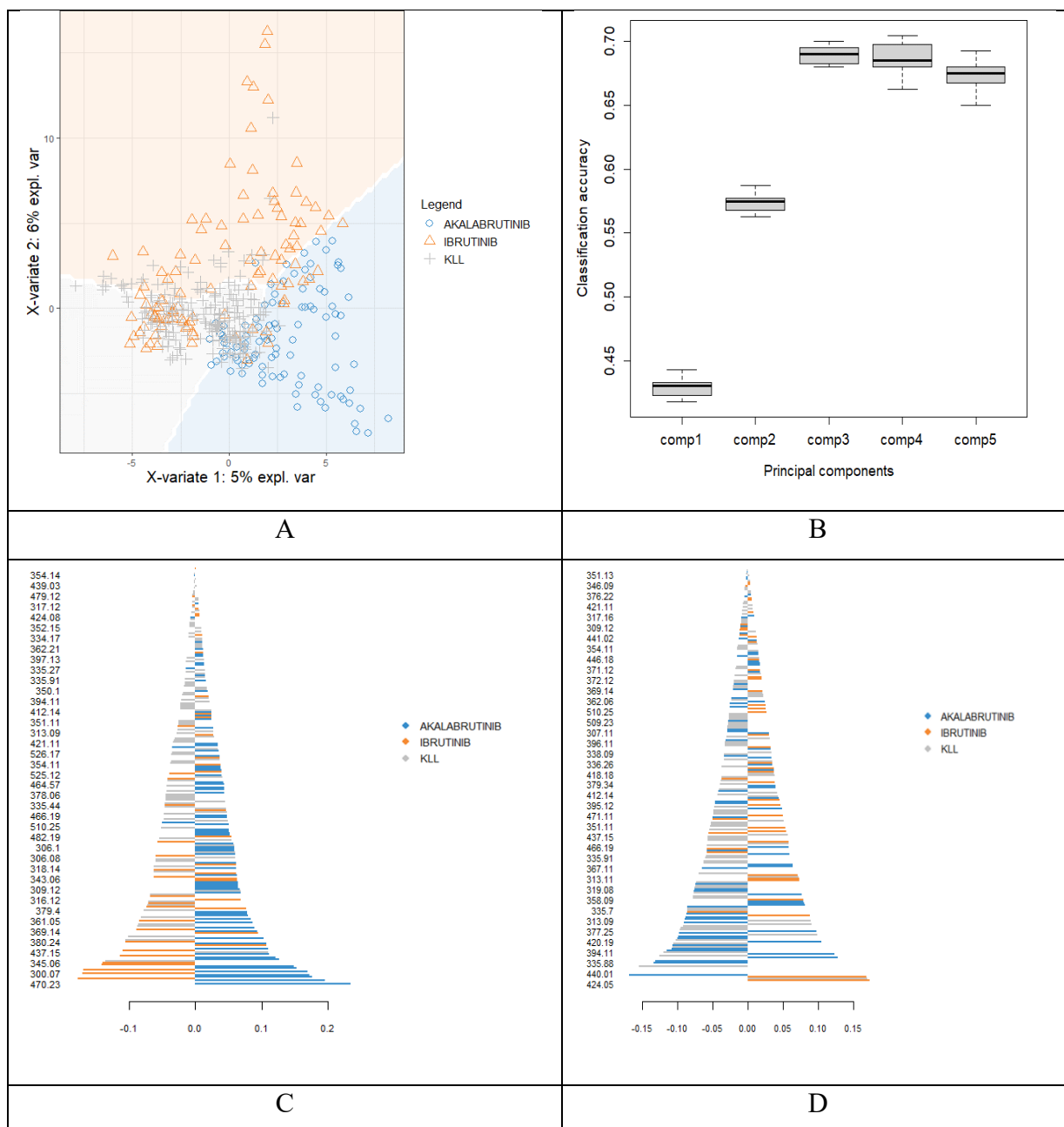
Metabolomi CD19+ limfocita snimljeni u masenom rasponu 600 – 950 Da ne pokazuju zadovoljavajuću klasifikaciju u odgovarajuće skupine – nema razgraničenja između promatranih skupina. Točnost klasifikacije stanica također je niska, < 60 % (Slika 5.11.). Zbog navedenih rezultata PLS-DA analize, rezultati iz ovog masenog raspona nisu se dalje razmatrali.

A



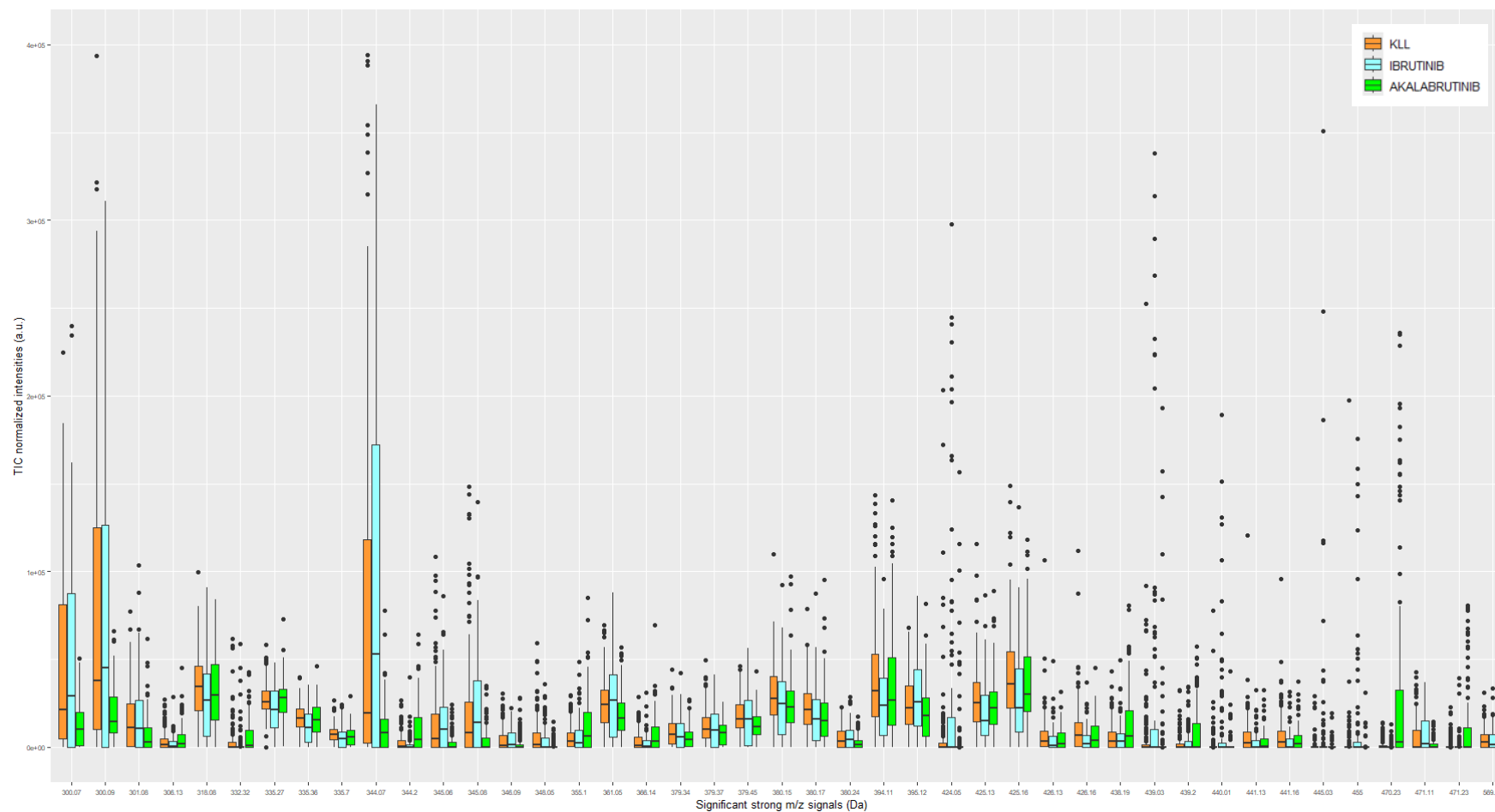


Slika 5.6. TIC normalizirani prosječni spektri masa odabranih ROI-ja kod usporedbe KLL, IBR i AKAL skupina ispitanika. A) 300 – 600 Da, B) 600 – 950 Da.

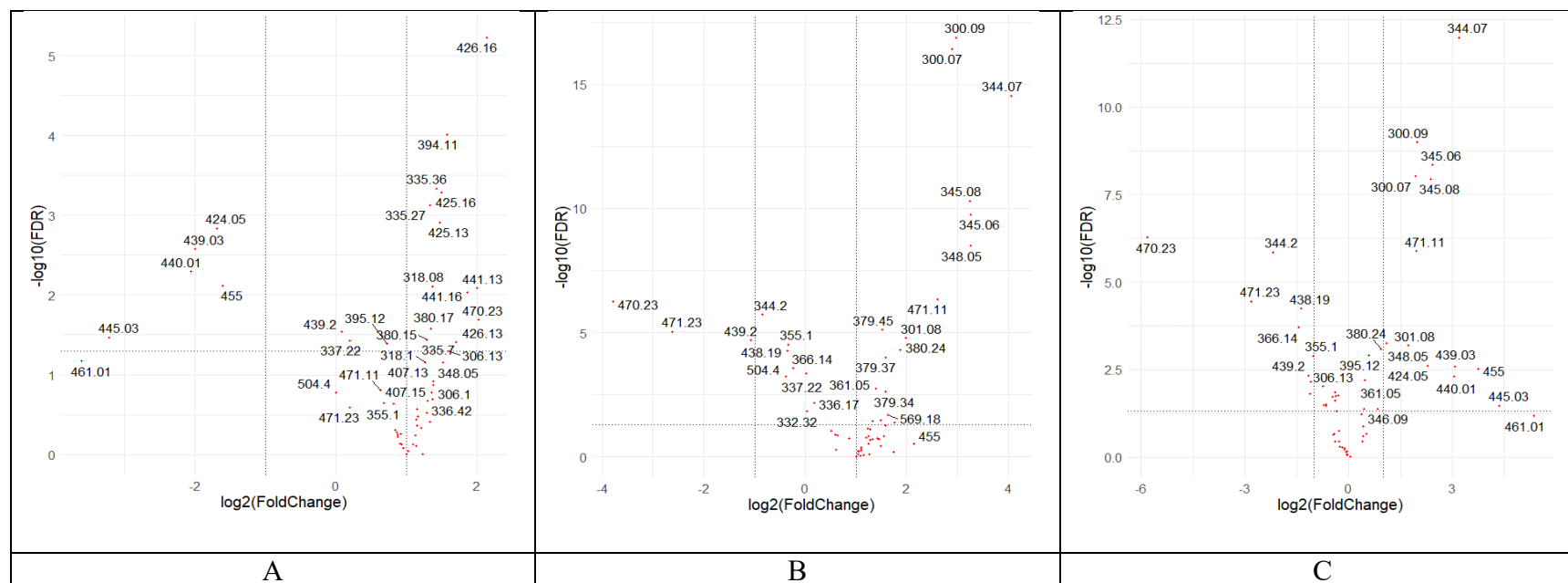


Slika 5.7. Multivarijantna analiza metaboloma CD19+ limfocita iz KLL, IBR i AKAL skupina za maseni raspon 300 – 600 Da. (A) PLS-DA prikaz raspodjele CD19+ limfocita (n = 400) i heterogenosti svakog skupa, B) najveća je točnost klasifikacije stanica u pripadajuće skupine kod 3 glavne komponente i iznosi 69 %, prikaz utjecaja pojedinih m/z kvocijenata na prvu (C) i drugu (D) glavnu komponentu u PLS-DA.

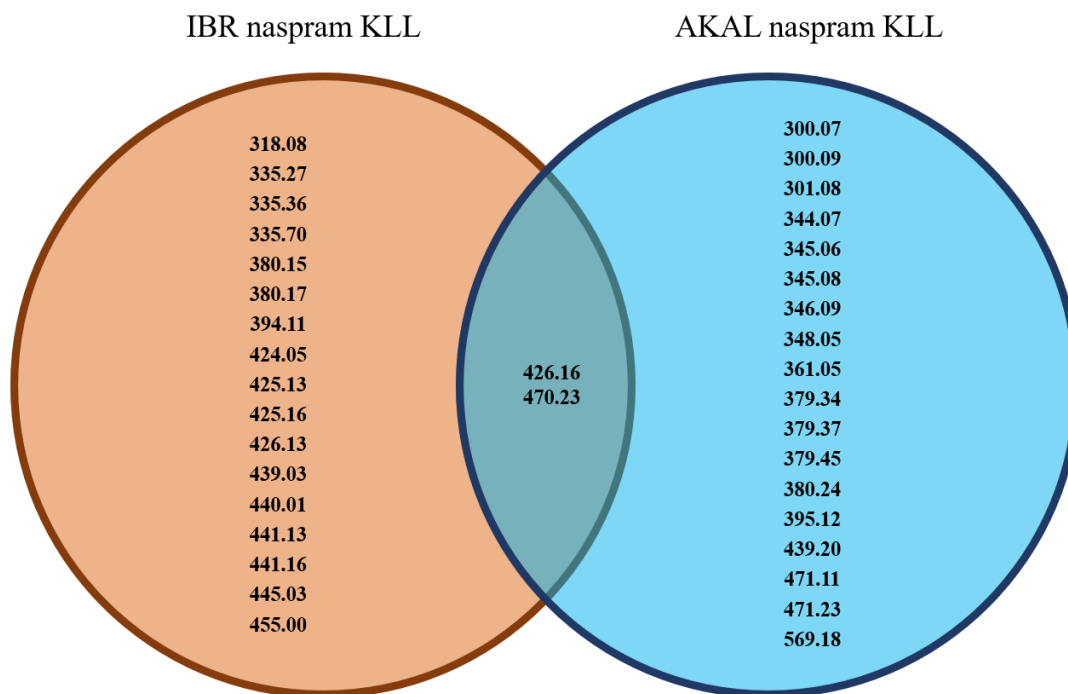
5. Rezultati



Slika 5.8. *Kutija-i-brkovi* dijagram s prikazom statistički značajnih razlika u intenzitetu signala m/z kvocijenata za sve skupine ispitanika u masenom rasponu 300 – 600 Da.



Slika 5.9. Vulkanski dijagrami parnih usporedbi m/z kvocijenata koji pridonose razdvajanju skupina u masenom rasponu 300 – 600 Da. A) KLL i IBR (19 m/z kvocijenata), B) KLL i AKAL (20 m/z kvocijenata), C) IRB i AKAL (22 m/z kvocijenata).



Slika 5.10. Promjene u masenim spektrima CD19+ limfocita izazvane djelovanjem BTKi-jeva (maseni raspon 300 – 600 Da). 17 m/z kvocijenata bilo je značajno različito između IBR i KLL skupine i specifično za učinak ibrutiniba (narančasti krug), 18 m/z kvocijenata bilo je značajno različito između AKAL i KLL skupine i specifično za učinak akalabrutiniba (plavi krug). U presjeku krugova nalaze se 2 m/z kvocijenta koji su bili značajno različiti u obje terapijske skupine u odnosu na KLL skupinu.

Tablica 5.2. Provizorno anotirani m/z kvocijenti čiji je sadržaj promijenjen kod terapije s BTKi-jevima u odnosu na neliječene KLL ispitanike.

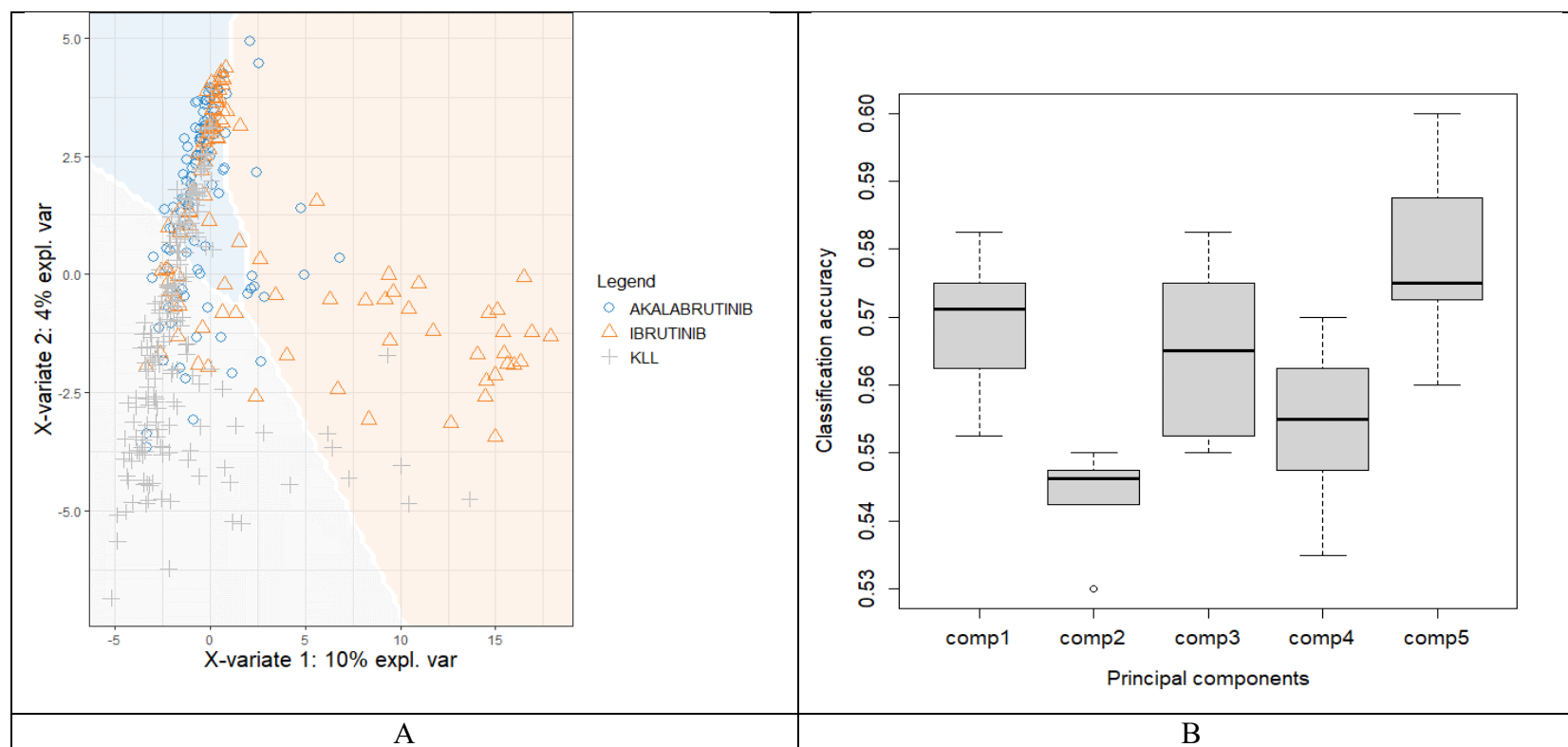
Izmjereni m/z	METASPACE m/z	HMDB m/z	Devijacija mase (ppm)	Adukt	Metabolit	KEGG ID	Biološki značaj	Parna usporedba (P) ⁺
300.07	-	300.07	13	M+H-2H ₂ O	S-Formilglutation	C01031	detoksikacija formaldehida ovisna o glutationu	KLL vs. AKAL (< 0.001); IBR vs. AKAL (< 0.001)
300.07, 300.09	300.08	300.08	48	M+K	Metilmalonilkarnitin	N.D.*	β-oksidacija, mitohondrijski metabolizam	KLL vs. AKAL (< 0.001); IBR vs. AKAL (< 0.001)
	300.08	300.08	48	M+K	Sukcinilkarnitin	N.D.	β-oksidacija, mitohondrijski metabolizam	
	300.08	300.08	48	M+H	4'-Fosfopantotenat	C03492	metabolizam pantotenata i CoA	
300.09	300.09	300.09	13	M+H	8-Hidroksigvanozin	N.D.	oksidativno oštećenje nukleinskih kiselina	KLL vs. AKAL (< 0.001); IBR vs. AKAL (< 0.001)
318.08	-	318.08	13	M+H-H ₂ O	S-Formilglutation	C01031	detoksikacija formaldehida ovisna o glutationu	KLL vs. IBR (0.007)
	-	318.09	21	M+NH ₄ -H ₂ O	Melanin	C05606	apoptoza	
345.08	345.08	345.08	4	M+H	Tiamin monofosfat (TMP)	C01081	metabolizam ugljikohidrata	KLL vs. AKAL (< 0.001); IBR vs. AKAL (< 0.001)

* N.D. = nije dostupno; P⁺ = Mann-Whitney U test.

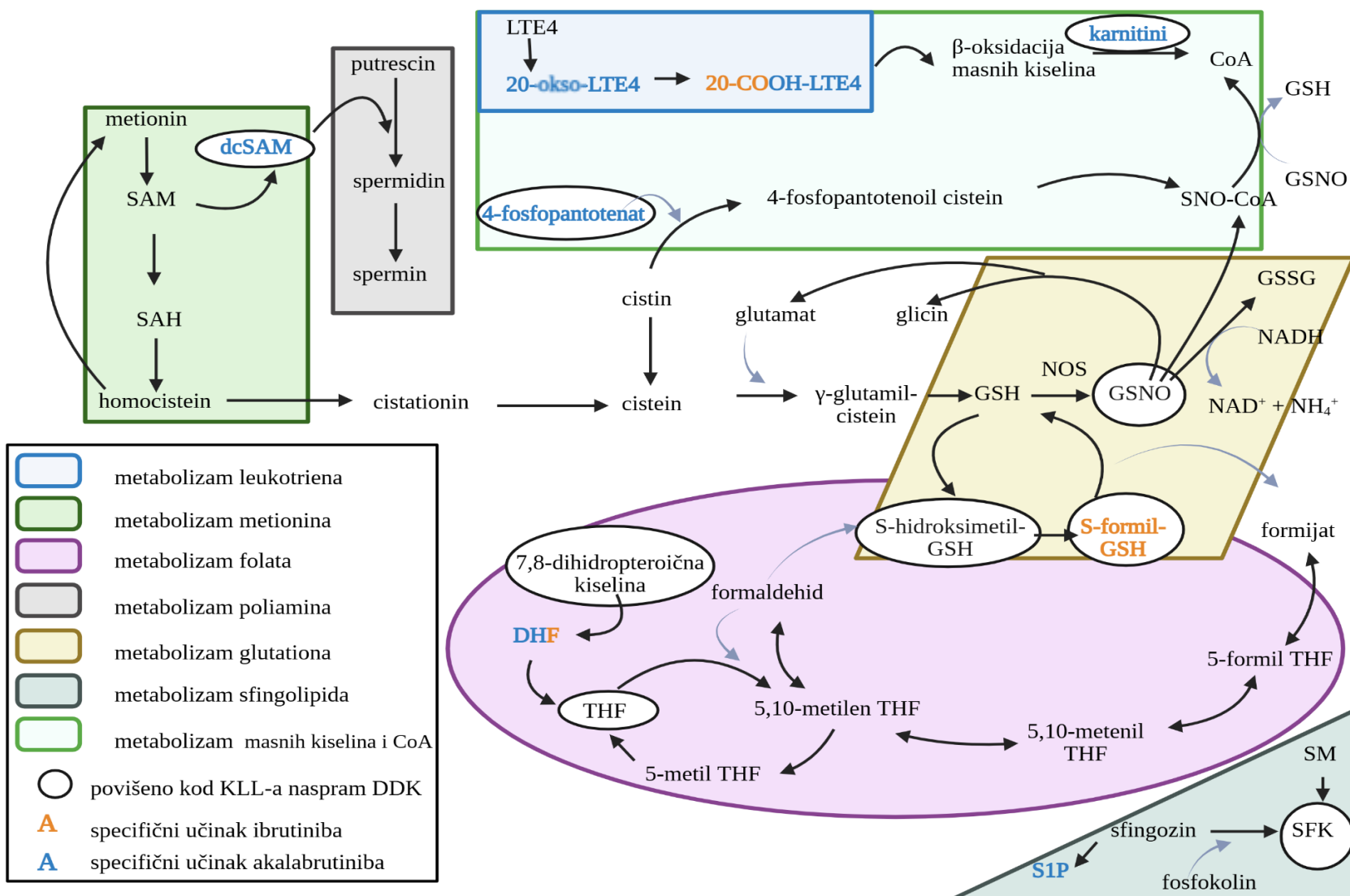
Tablica 3. Nastavak.

Izmjereni m/z	METASPACE m/z	HMDB m/z	Devijacija mase (ppm)	Adukt	Metabolit	KEGG ID	Biološki značaj	Parna usporedba (P) ⁺
380.24	380.26	380.26	42	M+H	Sfingozin-1-fosfat (S1P)	C06124	signalna molekula	KLL vs. AKAL (< 0.001)
395.12	-	395.13	16	M+K	S-Adenozil metioninamin	C01137	metabolizam poliamina i autofagija	KLL vs. AKAL (0.04)
424.05	-	424.06	25	M+NH ₄ -H ₂ O	Tiamin pirofosfat (TPP)	C00068	metabolizam ugljikohidrata	KLL vs. IBR (0.001); IBR vs. AKAL (0.002)
426.16	-	426.15	17	M+H-H ₂ O	Dihidrofolna kiselina (DHF)	C00415	transfer C1, tumorski metabolizam	KLL vs. IBR (< 0.001); KLL vs. AKAL (0.03)
439.20	439.22	-	45	M+Na	Ciklična fosfatidlična kiselina (18:2(9Z,12Z)/0:0) (cPA)	N.D.	metabolizam glicerofosfolipida, signalna molekula	KLL vs. AKAL (< 0.001); IBR vs. AKAL (0.005)
441.13	-	441.12	28	M+H-H ₂ O	Flavin mononukleotid (FMNH ₂)	C01847	oksidativna fosforilacija, apoptoza	KLL vs. IBR (0.008)
470.23	470.22	470.22	20	M+H	20-COOH-Leukotrien E4 (LTE4)	N.D.	medijator upalnog odgovora	KLL vs. IBR (0.02); KLL vs. AKAL (< 0.001); IBR vs. AKAL (< 0.001)
471.23	-	471.25	47	M+NH ₄	20-okso-Leukotrien E4 (LTE4)	N.D.	medijator upalnog odgovora	KLL vs. AKAL (< 0.001); IBR vs. AKAL (< 0.001)

* N.D. = nije dostupno; P⁺ = Mann-Whitney U test.



Slika 5.11. Multivarijantna analiza metaboloma CD19+ limfocita iz KLL, IBR i AKAL skupina za maseni raspon 600 – 950 Da. (A) PLS-DA prikaz raspodjele CD19+ limfocita (n = 400) i heterogenosti svakog skupa, B) najveća točnost klasifikacije stanica u pripadajuće skupine javlja se kod 5 glavnih komponenti i iznosi 58 %.



Slika 5.12. Prikaz provizorno identificiranih metabolita čiji je sadržaj promijenjen kod KLL-a i metabolita čiji je sadržaj promijenjen ovisno o utjecaju terapije. SAM = S-adenozilmetionin, SAH = S-adenozilhomocistein, dcSAM = S-adenozilmetioninamin, LTE4 = leukotrien E4, CoA = koenzim A, GSH = reducirani glutation, GSSG = oksidirani glutation, GSNO = S-nitrozoglutation, SNO-CoA = S-nitrozo koenzim A, NOS = reaktivni dušikovi spojevi, THF = tetrahidrofolat, DHF = dihidrofolat, SM = sfingomijelin, SFK = sfingozil-fosfokolin, S1P = sfingozin-1-fosfat.

6. RASPRAVA

Tehničke i analitičke karakteristike MALDI-TOF MSI tehnologije omogućuju njezinu primjenu u proučavanju metabolizma zasebnih limfocita B. Cilj je istraživanja bio ispitati kvalitativnu ekspresiju metabolita limfocita B u ispitanika koji boluju od KLL-a i zdravih ispitanika, sa svrhom metaboličke karakterizacije KLL-a. Rezultati pokazuju da MALDI-TOF MSI sa velikom točnosti klasificira poliklonske i monoklonske limfocite B u odgovarajuće skupine na temelju njihovih metaboličkih profila, dok evaluacija i identifikacija diskriminatornih metabolita pruža uvid u promijenjene metaboličke putove u KLL-u. MALDI-TOF MSI limfocita B ispitanika s KLL-om koji primaju i ne primaju terapiju ukazuje na različite metaboličke karakteristike tih stanica između promatranih skupina te pruža uvid u specifične učinke BTKi-jeva.

6.1. MALDI-TOF MSI zasebnih CD19+ limfocita

Iako se tehničke mogućnosti analitičkih uređaja za MSI zasebnih stanica neprestano razvijaju, trenutno nema mnogo istraživanja koja se bave analizom metaboloma humanih leukocita: istraživanje slično ovom proveli su Hossen i sur. (88), a bavi se smanjenom razinom fosfatidilkolina u stanicama multiplog mijeloma. Međutim, u spomenutoj studiji principi izolacije i identifikacije stanica (sortiranje stanica protočnom citometrijom i zamrzavanje stanica prije analize) bili su različiti u odnosu na ovo istraživanje. Zbog *ex vivo* staničnog metabolizma, mogućeg narušavanja staničnog integriteta tijekom zamrzavanja (-70 °C) i odmrzavanja te posljedičnog gubitka materijala za analizu, za provedbu ovog istraživanja uzorkovanje krvi i cjelokupna predanalitička i analitička faza provedeni su isti dan. Predanalitička faza MALDI-TOF MSI-ja zasebnih CD19+ limfocita započinje odabirom optimalne vrste uzorka za analizu, gdje su se razmaz periferne krvi i izolat leukocita pokazali kao adekvatni uzorci (89, 90). Prednost krvnog razmaza lakoća je izrade preparata, međutim, nedostatak je ove vrste uzorka prisutnost krvne plazme koja prekriva stanice, a koja prirodno sadrži velike količine metabolita. Prisutnost plazme rezultirala je manjim brojem statistički značajnih intenziteta signala m/z kvocijenata između ROI-ja iz stanica i plazme te nemogućnošću otkrivanja podrijetla metabolita. Drugi nedostatak krvnog razmaza blizina je susjednih stanica, uglavnom eritrocita, što otežava precizno iscrtavanje ROI-ja. Suprotno krvnom razmazu, izolat leukocita ne sadrži eritrocite, ispran je od plazme, a stanice su

na ITO stakalcu nakon citocentrifugiranja međusobno jasno odvojene. Poteškoće sa staničnim preparatom izoliranih leukocita povezane su s koracima u pripravi uzoraka, gdje različiti predanalitički i analitički uvjeti utječu na integritet stanice, transparentnost uzorka, intenzitet signala itd. (89). Postavke lasera i veličine iscrtanih ROI-ja koji pokrivaju stanice također utječu na klasifikaciju, što je vidljivo u PCA metaboloma stanica. Ispitivanjem različitih varijanti sublimacije i rekristalizacije matrice uočeno je da je duljina rekristalizacije matrice, a ne njezina količina, ključna za transparentnost staničnog preparata, tj. vidljivost stanica pod mikroskopom nakon sublimacije matrice. Također, identifikacija FITC-om obilježenih CD19+ limfocita provedena je prije sublimacije matrice jer CHCA autofluorescira unutar radne valne duljine integriranog fluorescentnog mikroskopa iMScope TRIO uređaja (91), što onemogućuje pouzdano raspoznavanje CD19+ limfocita od ostalih leukocita ili stanične okoline nakon sublimacije.

Dodatni izazov u MALDI-TOF MSI zasebnih stanica je analitička osjetljivost. Osjetljivost ovisi o analitičkim i tehničkim specifikacijama uređaja na kojem se provodi analiza, međutim, ona je direktno povezana i s prirodom promatranog uzorka. Jedna stanica sadrži raznoliku populaciju biomolekula u različitim količinama. Tipična stanica ima volumen od oko 1 do 20 pL, a količina određene biomolekule može se kretati od nekoliko kopija do nekoliko milijuna kopija po stanici (množinska koncentracija od visokog pikomolarnog do niskog mikromolarnog područja) (92). ROI CD19+ limfocita u ovom istraživanju sadržavao je nekoliko stotina m/z kvocijenata, gdje je svaki m/z kvocijent pridružen određenom metabolitu.

Svako postavljanje ITO stakalca u iMScope TRIO uređaj zahtijevalo je poravnanje nosača uzorka čime se provjeravala preciznost robotskog transfera uzorka od integriranog mikroskopa do MALDI jedinice. Cilj učestalih poravnanja bio je osiguranje ispravne koregistracije optičke i MS slike prije i nakon sublimacije matrice te nakon MALDI-TOF MSI analize. Čak i male neusklađenosti u koregistraciji optičke i MS slike (1-2 μm) imaju utjecaj na prikaz prostorne distribucije m/z kvocijenata. ROI-ji se iscrtavaju preko jezgre CD19+ limfocita na optičkim slikama i ukoliko one nisu precizno poravnate s MS slikama, dio m/z kvocijenata neće biti obuhvaćen za statističku analizu što dovodi do gubitka informacija. Nadalje, ukoliko su dvije stanice u preparatu međusobno blizu, a pomak u koregistraciji je velik, moguće je preklapanje MS signala jedne stanice s optičkom slikom druge stanice što daje lažne rezultate i dovodi do pogrešnih zaključaka. Potencijalne pogreške u ovom su istraživanju svedene na najnižu razinu zbog tehničkih

specifikacija iMScope TRIO uređaja (upotreba integriranog svjetlosnog/fluorescentnog mikroskopa) (69) gdje je poravnanje slika kontrolirano računalnim programom te manualna koregistracija nije upotrebljavana.

Optimizacija predanalitičkih i analitičkih uvjeta za MALDI-TOF MSI zasebnih CD19+ limfocita na rezidualnim uzorcima K₃-EDTA krvi bila je dovršena kada je s jednom od 41 ispitane varijante pripreve staničnog preparata postignuto razdvajanje u PCA između ROI-ja stanica i staničnog okoliša. Tek tada se pristupilo analizi uzoraka krvi ispitanika podijeljenih u 4 skupine. Prvo su analizirani uzorci dobrovoljnih darivatelja krvi i ispitanika sa stabilnim tijekom bolesti, sa svrhom potvrde mogućnosti razlikovanja metaboloma monoklonskih i poliklonskih CD19+ limfocita MALDI-TOF MSI. PLS-DA je pokazala odvajanje DDK i KLL stanica na temelju njihovih masenih spektara u oba masena raspona čime su potvrđene reproducibilnost protokola za pripravu uzoraka i osjetljivost tehnologije za diskriminaciju stanica na temelju njihovih metaboloma. Varijanca je za oba masena raspona bila veća u DDK skupini, što upućuje da zdravi, poliklonski limfociti B imaju raznovrsniji metabolom u odnosu na tumorski promijenjene, monoklonske limfocite. PLS-DA točnost klasifikacije stanica u pripadajuću skupinu bila je najveća kod 2 glavne komponente za oba masena raspona, ali je bila niža za maseni raspon 600 – 950 Da. To je rezultat ukupnog nižeg intenziteta signala m/z kvocijenata (otprilike 10 puta niži signal u odnosu na intenzitet signala u masenom rasponu 300 – 600 Da), tj. niže analitičke osjetljivosti IT-a u ovom rasponu mase. Zbog različitog intenziteta signala u različitim masenim rasponima snimanja, postavljena je i različita granična vrijednost za analitički šum kod statističke obrade podataka. Svi signali niži od 10 % najvišeg signala za raspon 600 – 950 Da i signali niži od 1 % najvišeg signala za raspon 300 – 600 Da smatrani su analitičkim šumom te intenziteti tih m/z kvocijenata nisu bili uključeni u obradu podataka.

Vulkanski dijagrami pokazuju da je u masenom rasponu 300 – 600 Da bilo 125 značajno različitih signala m/z kvocijenata, dok ih je u masenom rasponu 600 – 950 Da bilo 52. Ta je razlika posljedica već spomenute osjetljivosti IT-a kod snimanja većih m/z kvocijenata. Za provizornu anotaciju m/z kvocijenata korištene su dvije javno dostupne baze podataka: HMDB i METASPACE. Iako je HMDB baza podataka opsežnija po vrsti masenih adukata i broju endogenih metabolita, ona sadrži i veliki broj egzogenih metabolita, što otežava pregled i korištenje baze. Također, metaboliti u HMDB bazi dokazani su LC-MS tehnologijom. S druge strane,

METASPACE bazu moguće je pretraživati s uključenim filterom ionskog izvora, gdje je moguć prikaz rezultata istraživanja koja su provedena samo s MALDI tehnologijom. Međutim, METASPACE nudi manji broj vrsta masenih adukata koji mogu biti pretraženi, pogotovo onih s amonijakom i gubitkom vode u ionskom izvoru. Kako je u protokolu za pripremu staničnog preparata korišten 150 mM amonijev acetat za ispiranje soli, i stanice su bile u kontaktu sa spojem koji sadrži amonijak, nastanak masenih adukata s amonijevim ionom moguć je i očekivan (u LC-MS analizama uobičajeni su adukti s amonijakom jer su amonijevi spojevi često sastavni dio mobilne faze za kromatografske separacije (93)). Od ukupno 125 statistički značajnih intenziteta signala m/z kvocijenata u rasponu 300 – 600 Da, anotirano ih je samo 7. Broj je anotiranih m/z kvocijenata mali u odnosu na ukupni broj statistički značajnih m/z kvocijenata (~ 6 %), međutim, to nije neuobičajeno za MS analize (69) – postoji veliki nesrazmjer između broja izmjerenih i identificiranih metabolita, bez obzira na vrstu promatranih molekula ili MS tehnologiju kojom su istraživanja provedena (94, 95). Općeniti i najveći nedostatak identifikacije metabolita pomoću baza podataka su izobari – molekule koje imaju jednaku masu, gdje je za 7 izmjerenih m/z kvocijenata navedeno 14 mogućih molekula. Da bi identitet molekula bio konačno potvrđen, molekule od interesa potrebno je fragmentirati tandemskom MS/MS analizom. Spektar fragmenata uspoređuje se s bazom spektara fragmenata ili sa spektrom fragmenata standarda (čiste molekule) (96,97). Problem s anotacijom m/z kvocijenata u masenom rasponu 600 – 950 Da još je radikalniji – ni jedna značajna razlika u intenzitetu signala m/z kvocijenata nije identificirana. To ukazuje na manjkavost baza podataka o metabolitima koji su prisutni u limfocitima.

Nakon što su utvrđene razlike u metabolomima CD19⁺ limfocita između DDK i KLL skupina, pristupilo se analizi CD19⁺ limfocita ispitanika koji u terapiji imaju BTKi. U svrhu povećanja ionizacije analita u MALDI ionskom izvoru, a posljedično i povećanja osjetljivosti analitičkog postupka, na stanične preparate KLL, IBR i ACAL ispitanika sublimirana je veća količina CHCA (sublimacija matrice je produžena sa 2 na 5 min). Međutim, veća analitička osjetljivost nije postignuta pa je granična vrijednost za intenzitet m/z signala u masenom rasponu 300 – 600 Da bila postavljena na 5 % najvišeg signala, dok je za maseni raspon 600 – 950 Da granična vrijednost bila postavljena na 10 % najvišeg signala. Odnos intenziteta signala m/z kvocijenata u masenom rasponu 300 – 600 Da evaluiran je s PLS-DA koja je pokazala djelomično razdvajanje CD19⁺ limfocita u odgovarajuće skupine. Najnetočniju klasifikaciju imale su stanice iz IBR skupine – stanice su se u većoj mjeri preklapale sa stanicama iz KLL skupine, dok se manji

broj preklapao i sa stanicama iz AKAL skupine. Ujedno je i heterogenost IBR skupa bila najveća, što ukazuje na velike razlike u sastavu metaboloma CD19+ limfocita koji su tretirani ibrutinibom. Veći dio IBR stanica imao je metabolom sličniji stanicama u KLL nego u IBR skupini, što upućuje na manji utjecaj ibrutiniba na metabolom monoklonskih limfocita. Istraživanje Mazzarella i suradnika (98) pokazalo je različit utjecaj ibrutiniba na različite subklonalne populacije monoklonskih limfocita B, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja u pogledu velike metaboličke heterogenosti unutar IBR skupine i sličnosti sa stanicama iz KLL skupine. Stanice iz KLL skupine činile su najhomogeniji skup. Ipak, manji broj KLL stanica preklapao se sa AKAL skupinom. Najtočniju klasifikaciju u pripadajuću skupinu imale su stanice iz AKAL skupine. Gotovo potpuno odvajanje AKAL od KLL stanica upućuje na to da akalabrutinib ima značajan utjecaj na metabolom monoklonskih limfocita i da je taj utjecaj veći od utjecaja koji na metabolom monoklonskih limfocita ima ibrutinib. Neočekivan je rezultat gotovo potpunog razdvajanja IBR i AKAL stanica – kako su oba lijeka BTKi, očekivan je sličniji sastav metaboloma IBR i AKAL skupine u odnosu na KLL skupinu jer su oba lijeka usmjerena na inhibiciju iste tirozin kinaze (12). Točnost klasifikacije stanica u odgovarajuću skupinu bila je najveća kod 3 glavne komponente i iznosila je 69 %. Ovakva klasifikacija ukazuje na to da su promjene metaboloma u liječenju KLL-a potencijalno složenije u usporedbi s malignim promjenama koje dovode do razvoja KLL-a. Navedeni rezultati slični su rezultatima prijašnjeg ispitivanja koje je provedeno na manjem broju ispitanika (99). *Kutija-i-brkovi* dijagram prikazuje odnos 43 značajno različita intenziteta signala m/z kvocijenata kroz sve promatrane skupine. Kao i kod usporedbe DDK i KLL ispitanika, dijagram s usporedbom KLL, IBR i AKAL skupina prikazuje veliki rasap u intenzitetu signala među stanicama unutar iste skupine, što ukazuje na međustaničnu heterogenost u količini promatrane molekule, tj. na veliku biološku varijaciju. Da bi m/z kvocijent bio uvršten u ovaj dijagram trebala je postojati značajna razlika u intenzitetu signala između barem 2 skupine ispitanika. Te razlike su prikazane u vulkanskim dijagramima koji prikazuju parnu usporedbu svih skupina. Najveći broj značajno različitih signala m/z kvocijenata dobiven je usporedbom BTKi skupina. Prethodna istraživanja usmjerena na usporedbu ibrutiniba i akalabrutiniba pokazala su da nema većih razlika u proizvodnji citokina, migraciji stanica, apoptozi i inhibitornom učinku B signalnog puta. Jedine razlike između učinaka ovih lijekova bile su *off-target* inhibicija Src-kinaze i učinak na limfocite T, oboje uzrokovano djelovanjem ibrutiniba (100, 101). Rezultati ovog istraživanja ukazuju na postojanje metaboličkih razlika CD19+ limfocita uzrokovanih liječenjem

ibrutinibom ili akalabrutinibom. Vennov dijagram ukazuje na 17 m/z kvocijenata, promjena čijih intenziteta je specifična za metabolički utjecaj ibrutiniba i 18 m/z kvocijenata, promjena čijih intenziteta je specifična za metabolički utjecaj akalabrutiniba. Svaki skup m/z signala specifičnih za pojedini BTKi rezultat je usporedbe s netretiranim CD19⁺ limfocitima iz KLL skupine. 2 m/z signala bila su značajno različita kod obje BTKi skupine u odnosu na KLL skupinu. Takvo oštro razgraničenje otvara mogućnost proučavanja navedenih metabolita kao biomarkera terapijskog učinka pojedinih BTKi-ja i ukazuje na njihov različit utjecaj na metabolom limfocita B. Pretraživanjem HMDB i METASPACE baza za provizornu identifikaciju m/z kvocijenata iz skupina liječenih i neličenih ispitanika u masenom rasponu 300 – 600 Da anotirano je 12 m/z kvocijenata. Kao i u usporedbi KLL i DDK ispitanika, neki m/z kvocijenti imaju više anotiranih molekula koje su izobari, pa je tako navedeno 16 provizorno identificiranih molekula. Specifična je anotacija m/z 300.07 Da i 300.09 Da. Iako je razlika između tih masa veća od 50 ppm (kolika je dozvoljena tolerancija u odstupanju masa kod mjerenja), u razlici od 0.02 Da postoje 3 izobarne molekule (metilamlonilkarnitin, sukcinilkarnitin i 4'-fosfopantotenoat) čija se nominalna masa razlikuje u 4. decimali 1 Daltona te ih nije moguće međusobno razlučiti u TOF spektrometru masa. Za analitičku separaciju takvih molekula potrebno je upotrebljavati maseni spektrometar s većom rezolucijom masa, poput ionskog ciklotrona (102).

Kao i kod usporedbe zdravih i KLL CD19⁺ limfocita, analitička osjetljivost u masenom rasponu 600 – 950 Da kod analize KLL, IBR i AKAL skupina bila je niska. PLS-DA nije pokazala jasno razdvajanje stanica u pripadajuće skupine, što može biti posljedica sličnosti staničnih metaboloma u promatranom masenom području u pozitivnom ionizacijskom modu snimanja kod svih skupina, ali može biti i posljedica niske analitičke osjetljivosti. Molekule čiji su m/z kvocijenti > 600 Da u velikoj su mjeri lipidne vrste koje zbog svojih kemijskih skupina (npr. fosfatna ili sulfatna skupina, neuraminska ili glukuronska kiselina i dr.) imaju negativni naboj i lakše se detektiraju u negativnom modu ionizacije (103). I u ovom masenom rasponu najveću heterogenost skupa imala je IBR skupina, dok je najmanju imala AKAL skupina. Očekivano, i točnost klasifikacije stanica u odgovarajuće skupine bila je niska (~58 % kod 5 glavnih komponenti). Zbog svega navedenog, rezultati za ovaj maseni raspon nisu dalje statistički obrađeni.

6.2. Metabolička karakterizacija CD19+ limfocita

6.2.1. Glutation i oksidativni status stanica

Nastanak kromosomskih aberacija, koje su obilježje KLL-a, povezan je s oksidativnim stresom, tj. neravnotežom redoks statusa stanice (104, 105). Jedan od začetnika oksidativnog stresa endogeni je formaldehid koji potječe iz metabolizma transfera 1C atoma u ciklusu folne kiseline. Učinak formaldehida na humane limfoblastne stanične linije prethodno je opisan (106, 107). Formaldehid se fiziološki pretvara u manje toksični formijat u nizu kemijskih reakcija s reduciranim glutathionom (108) (Slika 5.12.). Ovaj proces narušava ravnotežu između reduciranog i oksidiranog glutathiona što dovodi do mogućeg poremećaja ravnoteže stanične redoks homeostaze (106). U ovom istraživanju, provizorno su identificirani S-hidroksimetilglutathion (m/z kvocijent 337.12 Da; kataliziran S-nitrozoglutathion (GSNO) reduktazom) i S-formilglutathion (m/z kvocijent 300.08 Da, kataliziran esterazom D). Navedeni metaboliti su međuprodukti u metabolizmu formaldehida te je veći intenzitet signala izmjeren u KLL skupini nego u DDK skupini. Usporedba intenziteta signala kod neliječenih i liječenih ispitanika dala je oprečne rezultate: provizorno je identificiran S-formilglutathion za 2 m/z kvocijenta (adukt $M+H-2H_2O$ za m/z kvocijent 300.07 Da i adukt $M+H-H_2O$ za m/z kvocijent 318.08 Da) čiji je intracelularni sadržaj u promatranim skupinama nije usporediv. Medijan intenziteta signala m/z kvocijenta 300.07 Da, koji može biti identificiran kao S-formilglutathion, najviši kod IBR skupine, dok je intenzitet signala m/z kvocijenta 318.08 Da koji također odgovara S-formilglutathionu u IBR skupini najniži. Identifikacija obaju m/z kvocijenta pomoću dostupnih baza podataka otežana je prisustvom izobara i upućuje na to da jedan od provizorno identificiranih m/z kvocijenata nije S-formilglutathion. Za konačnu i sigurnu identifikaciju takvih metabolita neophodna je fragmentacija MS/MS analizom. Veći sadržaj metabolita glutathiona kod KLL stanica u skladu je s prethodnim istraživanjima koja pokazuju da ROS-ovi u stanicama KLL-a nastaju zbog sklonosti brznoj proliferaciji, tj. zbog povećanog mitohondrijskog metabolizma (109). Kako bi preživjeli, monoklonalni limfociti razvijaju sustave koji neutraliziraju slobodne radikale putem tiola, čiji je sadržaj veći u monoklonskim u odnosu na poliklonske limfocite B (62, 110, 111). Drugo objašnjenje za veći sadržaj glutationskih intermedijera moglo bi biti rezultat del13q14, najčešće kromosomske aberacije u KLL-u. Naime, enzim esteraza D (ili S-formilglutathion hidrolaza), koji pretvara S-formilglutathion u reducirani glutathion i formijat, kodiran je u regiji kromosoma 13, a delecija tog

dijela kromosoma ili bilo koja druga rjeđa mutacija dovela bi do smanjenja ekspresije enzima i akumulacije intermedijera. Slični rezultati dobiveni su u istraživanju Kaźmierczaka i suradnika (112), gdje je MALDI-TOF MS analizom proteoma stanica akutne mijeloidne leukemije utvrđena veća ekspresija esteraze D kod ispitanika u potpunoj remisiji u odnosu na ispitanike koji primaju terapiju. Nadalje, esteraza D indirektno je povezana s unutarstaničnom lokacijom TP53. Jedna je od funkcija TP53-a regulacija stanične autofagije, a utjecaj na autofagiju ovisi o njegovoj lokaciji u stanici – TP53 unutar jezgre promovira autofagiju aktivacijom mTOR signalnog puta, dok citoplazmatski TP53 inhibira taj proces (113 – 115). Istraživanje Yao i suradnika (116) navodi da aktivacija esteraze D inhibira interakciju između proteina koji veže *c-Jun* aktivacijsku domenu-1 (engl. *c-Jun activation domain binding protein-1*, JAB1) i TP53, što smanjuje transfer TP53 pomoću JAB1 iz jezgre u citoplazmu te posljedično aktivira autofagijske procese i tumorsku proliferaciju.

Osim S-hidroksimetilglutathiona, GSNO reduktaza upotrebljava i GSNO kao supstrat (106, 117, 118). GSNO je metabolit koji nastaje vezanjem NO na glutathion (119). NO sudjeluje u brojnim signalnim putovima i redoks reakcijama te, ovisno o njegovom sadržaju u stanici, utječe na proliferaciju i/ili inhibiciju rasta tumora i apoptozu. NO, stvaranjem reaktivnih dušikovih spojeva (NOS), utječe na prekid, popravak i modifikacije DNK (118). Slično kao sa sadržajem NO u stanicama, aktivnost enzima GSNO reduktaze je u korelaciji s količinom S-nitroziliranih proteina. Smanjena koncentracija ili aktivnost GSNO reduktaze dovodi do tumorogenog procesa, ali i do apoptoze stanica zbog prekomjerne nitrozilacije proteina (120, 121). GSNO reduktaza kodirana je na dugom kraku kromosoma 4 (4q23), čije su aberacije i translokacije prisutne kod hematoloških neoplazmi mijeloidnog i limfoidnog tipa (122, 123) i često su povezane s progresijom bolesti i lošim ishodom (124, 125). U ovom istraživanju intenzitet signala GSNO viši je u limfocitima KLL skupine u odnosu na DDK skupinu (Slika 5.8.). Takav rezultat upućuje na povećano stvaranje NO i nitroziliranih metabolita ili smanjenu aktivnost/masu GSNO reduktaze, što je u skladu rezultatima prethodnih istraživanja o utjecaju GSNO reduktaze na tumorske procese (126, 127). Intenzitet signala GSNO nije bio značajno različit između neliječenih i ispitanika liječenih BTKi-jem.

3 provizorno identificirana metabolita – 7,8-dihidropteroična kiselina i THF te DHF sastavnice su ciklusa sinteze folata koji je povezan s ciklusom glutathiona i detoksifikacijom endogenog formaldehida (128). Povećana količina THF-a normalno reagira s formaldehidom stvarajući 5,10-

metilen-THF, ali oba metabolita sklona su oksidativnoj razgradnji i disocijaciji na formaldehid, što može biti pogubno za stanice kod kojih je mehanizam uklanjanja ROS-ova poremećen (npr. zbog smanjenog sadržaja glutationa i/ili nemogućnosti popravka DNA) (107). U prijašnjem istraživanju ekspresije citosolnih proteina u staničnoj liniji MEC1 (linija B stanica kronične limfocitne leukemije) utvrđena je povećana ekspresija C1-tetrahidrofolat sintaze (129). Također, tumorske stanice imaju veću ekspresiju gena za dihidrofolat reduktazu (DHFR) (130) zbog potrebe za sintezom DNK. Taj rezultat je indirektno u skladu s rezultatima ovog istraživanja jer su intenziteti signala m/z kvocijenata za 7,8-dihidropteroičnu kiselinu (prekursor DHF-a) i THF viši u KLL skupini u odnosu na DDK skupinu (Slika 5.5.), dok razlika u intenzitetu signala za DHF nije bila značajna između tih skupina. S druge strane, intenzitet signala za DHF je bio različit u parnoj usporedbi neliječenih i liječenih ispitanika – intenzitet je bio značajno viši u KLL skupini u odnosu na IBR i na AKAL skupinu. Vennov dijagram prikazuje da je intenzitet signala m/z 426.16 Da (u presjeku krugova), koji je provizorno identificiran kao DHF, značajno različit kod ispitanika tretiranih s BTKi-jevima u odnosu na KLL ispitanike. Takav rezultat kod neliječenih ispitanika može biti posljedica oksidativnog raspada DHFR-a zbog utjecaja ROS-ova i nedostatka NADPH (131, 132). S druge strane, inhibicijom BTK-a prekinuta je signalizacija prema PI3K u PI3K/AKT/mTOR signalnom putu koji pak preko MYC onkogeno utječe na transkripciju gena za DHFR (133). Intenzitet signala DHF između IBR i AKAL skupine nije bio značajno različit.

Nukleinske kiseline također su sklone oštećenju ROS-ovima. U usporedbi s DNK, RNK je osjetljivija na oksidativne promjene, a njezina oksidativna transformacija nije posljedica stanične smrti, već je znak pojave patoloških procesa u stanici (134). Jedna od mogućih anotacija m/z kvocijenta 300.08 Da ili 300.09 Da je 8-hidroksigvanozin, najčešći produkt oksidativnog oštećenja RNK. Ovisno o sadržaju 8-hidroksigvanozina u molekuli RNK i vrsti poli(C)-vezujućeg proteina koji se veže na oksidativno modificiranu RNK, dolazi do degradacije RNK ili apoptoze stanica (135, 136). Limfociti iz KLL skupine imali su značajno viši signal za ovaj m/z kvocijent u odnosu na DDK limfocite, što ukazuje na oksidativno oštećenje RNK koje može biti posljedica prethodno spomenute neravnoteže redoks sustava. U parnoj usporedbi neliječenih i liječenih ispitanika, 8-hidroksigvanozin imao je značajno viši signal kod KLL-a u odnosu na AKAL skupinu i kod IBR-a u odnosu na AKAL skupinu, što upućuje na moguće manje oksidativno oštećenje RNK-a kod liječenja akalabrutinibom.

6.2.2. Metabolizam ugljikohidrata i lipida

Tiamin pirofosfat (TTP), fiziološki najzastupljeniji oblik tiamina (137), imao je jači signal u DDK skupini u odnosu na KLL skupinu (m/z kvocijent 424.05 Da). U ovom istraživanju to je ujedno i jedini anotirani metabolit čija je ekspresija niža u KLL ispitanika u odnosu na DDK. Rezultati prethodnih istraživanja pokazuju da je potrošnja tiamina i njegovih derivata povećana u tumorskim stanicama (138), što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Istraživanje Jonusa i suradnika sugerira da TPP inhibira piruvat dehidrogenaza kinazu, enzim koji fosforilira i time inhibira aktivnost piruvat dehidrogenaze, što dovodi do obnavljanja funkcije mitohondrija i antiproliferativnog učinka (139). Kod parne usporedbe neliječenih i liječenih ispitanika, TPP je imao niži intenzitet signala kod KLL skupine u usporedbi s IBR skupinom i kod AKAL skupine u usporedbi s IBR skupinom. Značajno viši signal TPP-a kod stanica tretiranih ibrutinibom ukazuje na specifičan učinak tog BTKi-ja. Intenzitet signala m/z kvocijenta 345.08 Da provizorno je identificiran kao tiamin monofosfat (TMP) te je u parnoj usporedbi neliječenih i liječenih ispitanika intenzitet promatranog signala viši u KLL-u u odnosu na AKAL skupinu i u IBR-u u odnosu na AKAL skupinu. Navedeni rezultati istovjetni su rezultatima istraživanja provedenih na manjem broju ispitanika (89, 99) i navode na zaključak da monoklonski limfociti B tretirani ibrutinibom imaju veći sadržaj metabolita tiamina koji ispoljavaju antitumorski učinak, međutim ciljana istraživanja za potvrdu takve pretpostavke tek trebaju biti provedena. S druge strane, značajno niži sadržaj TMP-a kod AKAL skupine ukazuje na specifični učinak tog BTKi-ja.

Promjene u mitohondrijskoj disfunkciji i metabolizmu lipida karakteristike su tumorskog reprogramiranja u monoklonskim limfocitima B (20,52). m/z kvocijenti 300.08 Da te m/z kvocijenti 300.07 Da i 300.09 Da imaju nekoliko mogućih anotacija: izobari metilmalonil-karnitin i sukcinil karnitin (140) te 4-fosfopantotenoat. U ovom istraživanju m/z kvocijent 300.08 Da imao je veći intenzitet signala kod KLL ispitanika u odnosu na DDK, dok su kod parne usporedbe neliječenih i liječenih ispitanika m/z kvocijenti 300.07 Da i 300.09 Da bili značajno viši kod KLL skupine u odnosu na AKAL skupinu i kod IBR skupine u odnosu na AKAL skupinu. Tanoury i suradnici (141) uz upotrebu LC-MS tehnologije dokazali su visoke razine C2-C6 (kratkolančanih) karnitina kao krajnjih produkata peroksisomalne oksidacije masnih kiselina u KLL-u, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Nadalje, m/z kvocijent 464.35 Da u usporedbi KLL i DDK ispitanika može biti identificiran kao 3-hidroksi-11Z-oktadekanoilkarnitin (dugolančani karnitin), čiji je

intenzitet signala značajno viši u KLL skupini ispitanika, što je u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja o oksidaciji masnih kiselina u KLL-u (142). Jedna od mogućih anotacija za m/z kvocijente 300.07 – 300.09 Da s jednakim intenzitetom signala po promatranim skupinama je 4-fosfopantotenoat. 4-fosfopantotenoat je prekursor u sintezi koenzima A (CoA), molekule koja sudjeluje u oksidaciji masnih kiselina. Trenutno ne postoje istraživanja koja potvrđuju različitu ekspresiju 4-fosfopantotenoata u KLL-u, međutim poznato je da aktivacija PI3K signalnog puta, koji je u KLL-u aktiviran preko aktivacije BCR-a (143), pokreće *de novo* sintezu CoA iz pantotenske kiseline (vitamin B5) (144), što može bit posljedica ranije spomenute povećane potrebe za tom molekulom u metabolizmu masnih kiselina.

6.2.3. Autofagija i apoptoza

S-adenizilmetioninamin provizorno je identificiran za m/z kvocijent 378.14 Da (M+Na). Intenzitet signala bio je značajno viši u stanicama KLL ispitanika u usporedbi sa stanicama DDK ispitanika. Također, S-adenizilmetioninamin provizorno je identificiran i za m/z kvocijent 395.12 Da (M+K), gdje je intenzitet signala bio značajno viši u KLL skupini u odnosu na AKAL skupinu. S-adenozilmetioninamin je dekarboksilirani oblik S-adenozilmetionina i donor je aminopropilne skupine za sintezu poliamina spermina i spermidina (145). Poliamini su uključeni u mnoge biološke procese, uključujući replikaciju stanica, translaciju, transkripciju, regulaciju genske ekspresije, autofagiju (146 – 148), te im je sadržaj zbog nekontrolirane proliferacije viši u tumorskim stanicama (149). Choi i suradnici LC-MS/MS tehnologijom neciljano su uspoređivali metabolome tkiva karcinoma želuca s metabolomima tkiva intestinalne metaplazije, gdje je sadržaj S-adenozilmetioninamina bio značajno veći u tkivu karcinoma (150), što upućuje na promijenjeni sadržaj tog metabolita kod tumorski promijenjenih stanica. Niži intenzitet signala S-adenozilmetioninamina kod AKAL u odnosu na KLL skupinu mogao bi ukazivati na specifični utjecaj akalabrutiniba na metabolizam poliamina i tumorsku proliferaciju.

Moguća anotacija za m/z kvocijent 336.10 Da je melanin, koji ima antioksidativnu funkciju. Prethodne studije Zhanga i suradnika (151) i Koikea i suradnika (152) na različitim tipovima stanica ukazuju da inhibicija melanogeneze inducira apoptozu stanica. U ovom istraživanju intenzitet signala bio je veći za KLL skupinu u odnosu na IBR skupinu, što bi moglo upućivati na citoprotektivnu i antiapoptotičku ulogu melanina, a to pridonosi mehanizmu preživljavanja

limfocita. Kod ovog m/z kvocijenta nije bilo statistički značajne razlike u intenzitetu signala između KLL i AKAL skupina, kao ni između IBR i AKAL skupina.

M/z 441.13 Da provizorno je identificiran kao reducirani flavin mononukleotid (FMNH₂), metabolit vitamina B2. Uloga FMN-a u oksidativnoj fosforilaciji, redoks homeostazi i enzimskim reakcijama dugo je poznata, međutim, FMN je koenzim i u reakcijama metabolizma, apoptoze i proliferacije tumorskih stanica (153). Enzim riboflavin kinaza (RFK) limitirajući je enzim koji katalizira pretvorbu riboflavina u FMN. Rezultati istraživanja Bjeloševića i suradnika (154) pokazali su da *knock-out* RFK-a ili egzogeno smanjenje riboflavina u genetski raznolikim staničnim linijama AML-a i stanicama ksenografta izvedenih od pacijenta (engl. *patient-derived xenograft*, PDX) induciraju diferencijaciju i apoptozu, dok ti procesi nisu uočeni na ne-hematološkim tumorskim staničnim linijama (155). Manjak FMN-a dovodi do smanjenja aktivnosti dihidroorotat dehidrogenaze, limitirajućeg enzima u *de novo* sintezi pirimidina (156). Zbog nedostatka pirimidina u promatranim staničnim linijama dolazi do neravnoteže sadržaja nukleotida koja je popraćena s oslabljenim sastavljanjem mitohondrijskog kompleksa I i II, te posljedično kolapsom oksidativne fosforilacije i povećane osjetljivosti na inhibiciju BCL-2 (npr. venetoklaxsom) (154). U ovom istraživanju intenzitet signala FMN-a bio je značajno viši kod KLL ispitanika (što je u skladu s utjecajem FMN-a na tumorski metabolizam leukemijskih stanica) u odnosu na IBR ispitanike u parnoj usporedbi. Istraživanja koja proučavaju sadržaj FMN-a u monoklonskim limfocitima B tretiranih ibrutinibom nisu još provedena, ali ovaj rezultat upućuje na specifični, ali vjerojatno *off target*, učinak ibrutiniba u liječenju KLL-a.

6.2.4. Upalni medijatori i signalne molekule

M/z kvocijent 470.23 Da provizorno je identificiran kao 20-COOH-leukotrien E4, medijator upalnog odgovora (157). Rezultati prijašnjih istraživanja ukazuju na povećanu ekspresiju enzima uključenih u biosintezu leukotriena u KLL-u, dok glavni receptor za cisteinil-leukotriene, (engl. *cysteinyl leukotriene receptor 1*, CysLT1), ima učinak na migraciju, proliferaciju i preživljavanje stanica (158, 159). Intenzitet signala 20-COOH-LTE4 bio je značajno različit između sve tri skupine ispitanika u parnoj usporedbi. Odnos intenziteta signala po skupinama bio je sljedeći: AKAL >>> KLL > IBR, te m/z kvocijent 470.23 Da ima najveći utjecaj na 1. glavnu komponentu u PLS-DA. Viši intenzitet signala metabolita LTE4 kod AKAL skupine u odnosu na IBR skupinu upućuje na specifičan učinak različitih BTKi-ja na biosintezu ili metabolizam

leukotriena, što je pak povezano s razlikama u selektivnosti navedenih lijekova prema BTK-u i ne-ciljanoj inhibiciji drugih kinaza (160). Ibrutinib inhibira TEC kinazu i utječe na kalcij-posredovanu unutarstaničnu signalizaciju i aktivaciju 5-lipooksigenaze, koja je ključni enzim u sintezi leukotriena iz arahidonske kiseline i čija je ekspresija povećana u KLL-u (161, 162). Ibrutinib smanjuje aktivaciju PLC γ 2 i razgradnju PIP $_2$ na IP3 i DAG, što dovodi do smanjenja nastanka arahidonske kiseline iz odgovarajućih molekula DAG-a i posljedično do smanjenja koncentracije polazišne molekule za sintezu leukotriena (163, 164). Razlika je u intenzitetu signala između AKAL i KLL skupina, s naglaskom na višestruko viši intenzitet kod AKAL skupine, neočekivana. Moguće objašnjenje ovog rezultata inhibicija je BTK-a akalabrutinibom, čime se inhibira PLC γ 2, što bi moglo pokrenuti kompenzatornu aktivaciju membranske fosfolipaze A2 (PLA2) i hidrolizu membranskih lipida do arahidonske kiseline iz koje se dalje sintetiziraju leukotrieni. S druge strane, oksidacija atoma C20 (ω -oskidacija) dovodi do metaboličke inaktivacije LTE4 jer se karboksilirani oblik ne može vezati za CysLT1receptor. Nastali 20-COOH-LTE4 ulazi u proces β -oksidacije s ω kraja molekule i skraćivanja ugljikovodičnog lanca po 2C atoma (165), a za taj proces su potrebni CoA, ATP i NAD. Utjecaj akalabrutiniba na ekspresiju/metabolizam bilo koje od navedenih molekula mogao bi imati utjecaj na stanični sadržaj 20-COOH-LTE4. Obje hipoteze moraju biti potvrđene ciljanim istraživanjima učinka akalabrutiniba na limfocite B u KLL-u. Liu i suradnici (166) upotrebom tekućinske kromatografije spregnute s kvadrupol i TOF spektrometrima masa (engl. *liquid chromatography-quadrupole-time of flight*, LC-Q-TOF) dokazali su povećanu ekspresiju 20-COOH-leukotriena E4 kod platinom liječenih u odnosu na neliječene ispitanice s karcinomom jajnika. Nadalje, sličan odnos intenziteta signala među skupinama ispitanika uočen je i za m/z kvocijent 471.25 Da, koji je provizorno identificiran kao 20-okso-leukotrien E4, intermedijer u ω -oksidaciji LTE4 u 20-COOH-LT4. Signal je bio značajno i višestruko viši u AKAL skupini u odnosu na KLL skupinu i u AKAL skupini u odnosu na IBR skupinu. Razlika u intenzitetu signala m/z kvocijenta 471.25 Da nije bila značajna između KLL i IBR skupina.

Sfingozin-1-fosfat (S1P), moguća anotacija m/z kvocijenta 380.24 Da, signalna je molekula koja nastaje fosforilacijom sfingozina. Njegova je uloga u KLL-u dvojaka: izvan stanice djeluje kao signalna molekula koja u interakciji s membranskim receptorom (engl. *sphingosine-1-phosphate receptor 1*, S1PR1) utječe na migraciju limfocita iz cirkulacije u limfne čvorove i obrnuto, dok intracelularno djeluje na proliferaciju, diferencijaciju i inhibiciju apoptoze (167). Rezultati istraživanja Almejun i suradnika (168) pokazali su heterogenu ekspresiju sfingozin kinaze

1 (SK1), sfingozin kinaze 2 (SK2) i S1P liaze među KLL ispitanicima, gdje su jedino ekspresija mRNA i enzima SK1 bile značajno veće. Također, uočen je veći omjer SK1/S1P liaze kod KLL ispitanika u odnosu na zdrave ispitanike, što upućuje na povećanu sintezu S1P-a i uvećanu unutarstaničnu koncentraciju tog metabolita. KLL ispitanici s lošijom prognozom bolesti imali su veći omjer SK1/S1P liaze. Nadalje, u *ex vivo* pokusu istog istraživanja dokazano je da ibrutinib smanjuje omjer SK1/S1P liaze. U ovom istraživanju značajna razlika u intenzitetu signala S1P uočena je samo kod parne usporedbe neliječenih i liječenih ispitanika, i bila je značajno viša kod KLL skupine u odnosu na AKAL skupinu, što je u skladu s rezultatima istraživanja Almejun i suradnika. Nije bilo značajne razlike u intenzitetu signala između KLL i IBR skupine. Istraživanje Till i suradnika (169) upućuje na smanjenu ekspresiju funkcionalnog S1PR1-a zbog konstantne aktivacije signalnog puta B staničnog receptora, dok je ekspresija S1PR1-a povećana kod inhibicije PI3K-a, ali ne i SYK-a ili BTK-a u stanicama kronične limfocitne leukemije. Isto istraživanje navodi da se utjecaj BTKi-ja na migraciju KLL stanica postiže preko kemokinske supresije integrina. Suprotno navedenom, rezultati istraživanja od Borge i suradnika (170) navode da SYK inhibitori povećavaju ekspresiju i funkciju S1PR1-a u stanicama KLL-a i njihov migracijski odgovor prema S1P-u. Zbog dvosmislenih zaključaka prethodnih istraživanja, utjecaj BTKi-ja na metabolizam S1P-a i njegovu unutarstaničnu i izvanstaničnu funkciju treba biti predmet daljnjih ispitivanja.

Jedna od mogućih anotacija m/z kvocijenta 464.35 Da je sfingozil-fosfokolin (SFK; sinonim lizosfingomijelin, lizoSM), metabolit koji nastaje deacetilacijom sfingomijelina (SM) (enzim sfingomijelin deacilaza) u citoplazmi ili transferom fosfokolina na sfingozin (enzim sfingozin kolinfosfotransferaza) u endoplazmatskom retikulumu (171). Aktivnost sfingomijelin deacilaze nije jednaka u svim tipovima stanica te je fiziološki niža u limfocitima (172), što bi moglo upućivati na sintezu SFK-a preko sfingozina u KLL-u. Istraživanja Dielschneider i suradnika (173) i Raze i suradnika (174) pokazuju da stanice KLL-a imaju više lizosoma i više razine sfingozina (prekursora SFK-a) u usporedbi s normalnim B stanicama. Nadalje, istraživanje Parka i suradnika (175) pokazuje da više koncentracije sfingozina i SFK-a smanjuju proliferaciju i potiču apoptozu, te da SFK potiče autofagiju preko utišavanja AKT/mTOR signalnog puta i pojačavanja TP53 signalnog puta. Provedena su istraživanja koja proučavaju metabolički utjecaj SFK-a na različite tipove solidnih tumora i staničnih linija (176), međutim, istraživanja koja proučavaju utjecaj SFK-a na limfocite B u KLL-u još nisu provedena. Rezultati ovog istraživanja (viši intenzitet signala

SFK-a kod KLL u odnosu na DDK ispitanike) u skladu je s rezultatima prijašnjih istraživanja o količini prekursora SFK-a, sfingozina.

Nadalje, m/z kvocijent 337.10 Da značajno je viši kod KLL ispitanika u odnosu na DDK ispitanike te je provizorno anotiran kao kratkolančana lizofosfatidična kiselina (LPA 8:0/0:0). Rezultati istraživanja Hu i suradnika (177) ukazuju da dodatak LPA u medij B-staničnih linija sprječava apoptozu induciranu fludarabinom i etopozidom te spontanu apoptozu kod primarnih KLL stanica. Utvrđeno je da je ekspresija receptora LPA1 povećana u primarnim KLL stanicama u usporedbi s normalnim B-stanicama (177, 178). LPA1 receptor aktivira PI3K/AKT signalni put. Dok izvanstanična LPA nastaje hidrolizom lizofosfatidilkolina (LPC) i djeluje kao signalna molekula putem LPA1-5 receptora smještenih na staničnoj membrani, unutarstanična LPA može biti međuprodukt metabolizma fosfatidične kiseline (PA) do monoacilglicerola te supstrat za sintezu drugih glicerolipida (179, 180) ili produkt razgradnje unutarstaničnog LPC posredovane enzimom PLA2 (181). Stanični sadržaj LPA ovisi o sadržaju ishodišnih molekula i aktivnosti enzima koji sudjeluju u njenom metabolizmu. LPA je koaktivator nuklearnih receptora PPAR γ čime se potiče stanična proliferacija, preživljavanje i migracija. Uloga unutarstanične LPA u KLL-u još nije razjašnjena, ali može biti povezana s promijenjenim metabolizmom lipida i mehanizmima preživljavanja koji su obilježja metaboličkog reprogramiranja u KLL-u.

M/z kvocijent 439.20 Da provizorno je identificiran kao ciklična fosfatidična kiselina (cPA). Izvanstanična cPA je analog LPA, nastaje transfosfatidilacijom LPC-a i aktivira LPA1-5 G-protein spregnute receptore (182). Unutarstanična cPA nastaje iz LPC-a posredovanjem enzima fosfolipaze D2 (PLD2) te djeluje kao korepresor nuklearnih receptora PPAR γ (181), što dovodi do inhibicije proliferacije stanica, stvaranja aktinskih stresnih vlakana te inhibicije tumorske invazije (182). Kao i za LPA, uloga cPA u KLL-u nije razjašnjena. Kako je intenzitet signala ove molekule značajno viši u parnoj usporedbi AKAL u odnosu na KLL ispitanike te u AKAL u odnosu na IBR ispitanike, veći sadržaj ove molekule mogao bi upućivati na specifično djelovanje akalabrutiniba na monoklonske limfocite B, međutim ta hipoteza tek mora biti potvrđena provedbom istraživanja ciljanih učinka akalabrutiniba na metabolizam lipida.

6.3. Ograničenja istraživanja i buduće perspektive

Jedno je od ograničenja ovog istraživanja mogućnost nastanka *in vitro* / *ex vivo* promjena u metabolizmu stanica tijekom složene i dugotrajne pripreme uzoraka. Zbog vrlo male količine materijala desorbiranog iz jedne stanice, osjetljivost metode predstavlja poprilični izazov. Provizorno je identificiran mali broj m/z kvocijenata sa značajnom razlikom u intenzitetu signala, što ukazuje na manjkavost baza podataka, tj. općenito nedovoljno poznavanje metabolizma leukocita. Iako pretraživanje baza podataka nije vrlo pouzdana metoda za identifikaciju metabolita, mnogi metaboliti dio su istog metaboličkog puta ili su dokazani u monoklonskim limfocitima B drugim tehnologijama, što čini provizorne identifikacije smislenima. Ipak, s obzirom na toleranciju mase od 50 ppm i FDR od 50 % kod pretraživanja baza podataka, konačni identitet m/z kvocijenata mora biti potvrđen fragmentacijom (MS²) ili LC-MS/MS analizom. Daljnja istraživanja metaboloma KLL-a trebala bi uključivati analizu CD19+ limfocita u negativnom ionizacijskom modu i analizu metabolita čiji su m/z kvocijenti manji od 300 Da, što bi moglo rezultirati pronalaskom većeg broja klinički značajnih metabolita. Nadalje, ovakav tip istraživanja trebao bi biti proveden i na populaciji ženskog spola.

7. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da slikovna spektrometrija masa temeljena na MALDI-TOF tehnologiji razlikuje metaboličke profile zasebnih limfocita B u zdravih ispitanika i ispitanika s kroničnom limfocitnom leukemijom. Specifični zaključci koji proizlaze iz rezultata studije su:

- Optimizirani predanalitički i analitički protokol za MALDI-TOF MSI zasebnih stanica osigurava dovoljnu analitičku osjetljivost i reproducibilnost za analizu limfocita B.
- MALDI-TOF MSI sa vrlo dobrom točnosti razlikuje metaboličke profile zasebnih limfocita B zdravih ispitanika i ispitanika s kroničnom limfocitnom leukemijom.
- MALDI-TOF MSI sa zadovoljavajućom točnosti razlikuje metaboličke profile zasebnih limfocita B neliječenih i liječenih ispitanika s KLL-om u masenom rasponu 300 – 600 Da.
- Iako ibrutinib i akalabrutinib inhibiraju aktivnost iste tirozin kinaze (BTK), njihov učinak na metabolom monoklonskih limfocita B je različit.
- Pouzdana klasifikacija limfocita B u odgovarajuću skupinu ispitanika nakon MALDI-TOF MSI omogućila je neciljano metaboličko profiliranje, koje je rezultiralo s velikim brojem m/z kvocijenata značajno promijenjenih kod KLL-a.
- Provizorno identificirani metaboliti prvenstveno su međuprodukti kemijskih reakcija povezanih s metabolizmom glutationa, folata, ugljikohidrata i lipida ili su signalne molekule apoptotičkih i drugih staničnih procesa.

Daljnje proučavanje navedenih mehanizama, kao i specifičnog terapijskog djelovanja pojedinih BTKi-ja, moglo bi pružiti nove uvide u efektivnost liječenja KLL-a. Rezultati ovog istraživanja mogli bi doprinijeti boljem razumijevanju staničnih procesa i izuzetno heterogene kliničke manifestacije KLL-a. Da bi se to postiglo, trebalo bi provesti veće kliničke studije s pažljivo odabranim homogenim populacijama ispitanika s KLL-om kako bi se provjerio mogući dijagnostički/prognostički značaj.

8. SAŽETAK

Metabolička karakterizacija limfocita B u kroničnoj limfocitnoj leukemiji primjenom slikovne spektrometrije masa

Cilj istraživanja: Ispitati kvalitativnu i semikvantitativnu ekspresiju metabolita limfocita B u ispitanika koji boluju od KLL i zdravih ispitanika, u svrhu metaboličke karakterizacije KLL-a i praćenja odgovora na terapiju.

Nacrt studije: Provedeno istraživanje presječnog je tipa. Istraživanje je provedeno u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku u suradnji s Kliničkim zavodom za transfuzijsku medicinu i Klinikom za unutarnje bolesti, Zavodom za hematologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Ispitanici i metode: Istraživanje je uključilo 30 ispitanika muškog spola starijih od 40 godina koji su bili podijeljeni u 4 skupine – kontrolna skupina (DDK; N = 10), ispitanici s KLL-om bez terapije (KLL; N = 10), ispitanici s KLL-om liječeni ibrutinibom (IBR; N = 5), ispitanici s KLL-om liječeni akalabrutinibom (AKAL; N = 5). Nakon optimizacije protokola za izolaciju leukocita iz pune krvi, svakom ispitaniku je analizirano 40 CD19⁺ limfocita slikovnom spektrometrijom masa temeljenom na MALDI-TOF MS tehnologiji.

Rezultati: Kod usporedbe DDK i KLL ispitanika, PLS-DA je klasificirala CD19⁺ limfocite u odgovarajuće skupine sa 79 postotnom točnosti za maseni raspon 300 – 600 Da i sa 75 postotnom točnosti za maseni raspon 600 – 950 Da. Intenziteti signala 125 i 52 m/z kvocijenta, snimljenih u masenom rasponu 300 – 600 Da, odnosno 600 – 950 Da, bili su značajno promijenjeni. Kod usporedbe KLL, IBR i AKAL ispitanika, CD19⁺ limfociti klasificirani su u odgovarajuće skupine sa 69 postotnom točnosti za maseni raspon 300 – 600 Da, dok je točnost klasifikacije za maseni raspon 600 – 950 Da iznosila 58 %. 19, 20 i 22 intenziteta signala m/z kvocijenata bili su značajno različiti u usporedbi po parovima, redom KLL i IBR, KLL i AKAL, odnosno IBR i AKAL skupina, što ukazuje na specifičan učinak pojedinih lijekova na metabolom CD19⁺ limfocita. Manji broj m/z kvocijenata provizorno je identificiran pomoću METASPACE i HMDB baza podataka. Anotirani metaboliti sastavnice su metabolizma glutaciona, folata, ugljikohidrata i lipida, ili su signalne molekule anti-apoptotičkih procesa koji osiguravaju proliferaciju i preživljavanje monoklonskih limfocita B.

Zaključak: MALDI-TOF MS tehnologija ima zadovoljavajuću analitičku osjetljivost i reproducibilnost za analizu metaboloma zasebnih limfocita B. Metaboliti, čiji je sadržaj promijenjen u monoklonskim limfocitima B, sastavnice su ciklusa folata, glutationa, ugljikohidrata, lipida i dr. Rezultati ovog istraživanja mogli bi doprinijeti boljem razumijevanju staničnih procesa i vrlo heterogene kliničke manifestacije KLL-a.

Ključne riječi: analiza zasebnih stanica; kronična limfocitna leukemija; limfocit B; MALDI MS; metabolizam

9. SUMMARY

Metabolic characterization of B lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia using mass spectrometry imaging

Objectives: To examine the qualitative and semi-quantitative expression of B lymphocyte metabolites in subjects suffering from CLL and healthy subjects, for metabolic characterization of CLL and monitoring of the therapy response.

Study Design: The research was cross-sectional. The research was conducted at the Clinical Institute for Laboratory Diagnostics in collaboration with the Clinical Institute for Transfusion Medicine and the Clinic for Internal Medicine, Department of Hematology of the University Hospital Centre Osijek.

Participants and methods: This research included 30 male subjects over the age of 40 who were divided into 4 groups - control group (DDK; N = 10), subjects with CLL without therapy (KLL; N = 10), subjects with CLL treated with ibrutinib (IBR; N = 5), subjects with CLL treated with acalabrutinib (AKAL; N = 5). After optimizing the protocol for the isolation of leukocytes from whole blood, 40 CD19⁺ lymphocytes were analyzed for each subject by imaging mass spectrometry based on MALDI-TOF MS technology.

Results: When comparing DDK and KLL subjects, PLS-DA classified CD19⁺ lymphocytes into the appropriate groups with 79 % accuracy for the mass range of 300 – 600 Da and with 75 % accuracy for the mass range of 600 – 950 Da. The signal intensities of the 125 and 52 m/z quotients, recorded in the mass range of 300 – 600 Da and 600 – 950 Da, respectively, were significantly changed. When comparing KLL, IBR and AKAL subjects, CD19⁺ lymphocytes were classified into the appropriate groups with 69 % accuracy for the mass range of 300 – 600 Da, while the classification accuracy for the mass range of 600 – 950 Da was 58 %. 19, 20 and 22 m/z signal intensities were significantly different in pairwise comparisons of KLL and IBR, KLL and AKAL, and IBR and AKAL groups, respectively, indicating a specific effect of individual drugs on the metabolome of CD19⁺ lymphocytes. A smaller number of m/z quotients were tentatively identified using the METASPACE and HMDB databases. Annotated metabolites were components of glutathione, folate, carbohydrate and lipid metabolism or are signaling molecules of anti-apoptotic processes that ensure the proliferation and survival of monoclonal B lymphocytes.

Conclusion: MALDI-TOF MS technology has satisfactory analytical sensitivity and reproducibility for the analysis of the metabolome of individual B lymphocytes. Metabolites, the content of which is altered in monoclonal B lymphocytes, are components of the folate, glutathione, carbohydrate, lipid, etc. cycles. The results of this study could contribute to a better understanding of cellular processes and the highly heterogeneous clinical manifestations of CLL.

Key words: Single Cell Analysis; Leukemia, Chronic B-Lymphocytic; B Lymphocyte; MALDI MS; Metabolism

10. LITERATURA

1. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IBDO, Berti E, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36:1720–48.
2. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018;131:2745–60.
3. Hallek M. Chronic Lymphocytic Leukemia: 2025 Update on the Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Therapy. *American J Hematol*. 2025;100:450–80.
4. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Publikacije-odjel za maligne bolesti. Podaci registra za rak za 2022. godinu. Dostupno na adresi: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevenција-nezaraznih-bolesti/publikacije-odjel-za-maligne-bolesti/>. Datum pristupa 20.07.2025.
5. Miranda-Filho A, Piñeros M, Ferlay J, Soerjomataram I, Monnereau A, Bray F. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *Lancet Haematol*. 2018;5:e14–24.
6. Julio Delgado, Ferran Nadeu, Dolors Colomer, Elias Campo. Chronic lymphocytic leukemia: from molecular pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Haematologica*. 2020;105:2205–17.
7. Williams L, Finnegan K. Lymphocytes. U: McKenzie SB, William JL, urednice. *Clinical Laboratory Hematology*. New Jersey: Pearson; 2015. str. 122-143.
8. Gupta SK, Viswanatha DS, Patel KP. Evaluation of Somatic Hypermutation Status in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) in the Era of Next Generation Sequencing. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:357.
9. Gaidano G, Foà R, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2012;122:3432–8.

10. Tanaka S, Baba Y. B Cell Receptor Signaling. U: Wang JY. (urednik). B Cells in Immunity and Tolerance. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapur: Springer; 2020. str. 23-36.
11. Young RM, Staudt LM. Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12:229–43.
12. Ahn IE, Brown JR. Targeting Bruton's Tyrosine Kinase in CLL. *Front Immunol.* 2021;12:687458.
13. Haselager MV, Kater AP, Eldering E. Proliferative Signals in Chronic Lymphocytic Leukemia; What Are We Missing? *Front Oncol.* 2020;10:592205.
14. Koliijn PM, Hosnijeh FS, Späth F, Hengeveld PJ, Agathangelidis A, Saleh M, et al. High-risk subtypes of chronic lymphocytic leukemia are detectable as early as 16 years prior to diagnosis. *Blood.* 2022;139:1557–63.
15. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, et al. Self-Renewing Hematopoietic Stem Cell Is the Primary Target in Pathogenesis of Human Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell.* 2011;20:246–59.
16. Kostopoulos IV, Paterakis G, Pavlidis D, Kastritis E, Terpos E, Tsitsilonis OE, et al. Clonal evolution is a prognostic factor for the clinical progression of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Blood Cancer J.* 2017;7:e597–e597.
17. Craig F. Mature Lymphoid Neoplasms. U: McKenzie SB, William JL, urednice. Clinical Laboratory Hematology. New Jersey: Pearson; 2015. str. 535-56.
18. Maher N, Mouhssine S, Matti BF, Alwan AF, Gaidano G. Molecular Mechanisms in the Transformation from Indolent to Aggressive B Cell Malignancies. *Cancers.* 2025;17:907.
19. Hampel PJ, Rabe KG, Wang Y, Hwang SR, Kenderian SS, Muchtar E, et al. Incidence of Richter transformation of chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma in the targeted therapy era. *Leukemia.* 2025;39:503–7.

20. Thurgood LA, Dwyer ES, Lower KM, Chataway TK, Kuss BJ. Altered expression of metabolic pathways in CLL detected by unlabelled quantitative mass spectrometry analysis. *Br J Haematol.* 2019;185:65–78.
21. Li W. Flow Cytometry in the Diagnosis of Leukemias. U: Li W, urednik .*Leukemia.* On-line: Exon Publications; 2022. str. 53–77.
22. Jakšić B. Guidelines for Diagnosis and Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Krohem B-CLL* 2017. *Acta Clin Croat.* 2018;57:190–215.
23. Stephens DM. NCCN Guidelines Update: Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma. *J Natl Compr Canc Ne.* 2023;21:563–6.
24. Seiler T, Dohner H, Stilgenbauer S. Risk Stratification in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Seminars in Oncology.* 2006;33:186–94.
25. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 2000;343:1910–6.
26. Baliakas P, Jeromin S, Iskas M, Puiggros A, Plevova K, Nguyen-Khac F, et al. Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. *Blood.* 2019;133:1205–16.
27. Wierda WG, Brown J, Abramson JS, Awan F, Bilgrami SF, Bociek G, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma. *J Natl Compr Canc Ne.* 2024;22:175–204.
28. Blakemore SJ, Clifford R, Parker H, Antoniou P, Stec-Dziedzic E, Larrayoz M, et al. Clinical significance of TP53, BIRC3, ATM and MAPK-ERK genes in chronic lymphocytic leukaemia: data from the randomised UK LRF CLL4 trial. *Leukemia.* 2020;34:1760–74.
29. Paulus A, Malavasi F, Chanan-Khan A. CD38 as a multifaceted immunotherapeutic target in CLL. *Leukemia Lymphoma.* 2022;63:2265–75.

30. Chen J, Sathiaselvan V, Moore A, Tan S, Chilamakuri CSR, Roamio Franklin VN, et al. ZAP-70 constitutively regulates gene expression and protein synthesis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2021;137:3629–40.
31. Gooden CE, Jones P, Bates R, Shallenberger WM, Surti U, Swerdlow SH, et al. CD49d shows superior performance characteristics for flow cytometric prognostic testing in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Cytom Part B-Clin Cy*. 2018;94:129–35.
32. Bulian P, Shanafelt TD, Fegan C, Zucchetto A, Cro L, Nüchel H, et al. CD49d Is the Strongest Flow Cytometry–Based Predictor of Overall Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol*. 2014;32:897–904.
33. Radna skupina KroHem-a za KLL. Smjernice za liječenje KLL-a (v1. 2023). Dostupna na adresi: <https://www.krohema.hr/kronicna-limfocitna-leukemija-kll/>. Datum pristupa: 26. srpnja 2025.
34. Rey-Barroso J, Munaretto A, Rouquié N, Mougél A, Chassan M, Gadat S, et al. Lymphocyte migration and retention properties affected by ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2023;109:809–23.
35. Shirley M. Bruton Tyrosine Kinase Inhibitors in B-Cell Malignancies: Their Use and Differential Features. *Targ Oncol*. 2022;17:69–84.
36. Paydas S. Management of adverse effects/toxicity of ibrutinib. *Crit Rev Oncol Hemat*. 2019;136:56–63.
37. Tam C, Thompson PA. BTK inhibitors in CLL: second-generation drugs and beyond. *Blood Adv*. 2024;8:2300–9.
38. Byrd JC, Hillmen P, Ghia P, Kater AP, Chanan-Khan A, Furman RR, et al. Acalabrutinib Versus Ibrutinib in Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia: Results of the First Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol*. 2021;39:3441–52.

39. Tam CS, Opat S, D'Sa S, Jurczak W, Lee HP, Cull G, et al. A randomized phase 3 trial of zanubrutinib vs ibrutinib in symptomatic Waldenström macroglobulinemia: the ASPEN study. *Blood*. 2020;136:2038–50.
40. Brown JR, Eichhorst B, Hillmen P, Jurczak W, Kaźmierczak M, Lamanna N, et al. Zanubrutinib or Ibrutinib in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2023;388:319–32.
41. Mouhssine S, Maher N, Matti BF, Alwan AF, Gaidano G. Targeting BTK in B Cell Malignancies: From Mode of Action to Resistance Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2024;25:3234.
42. Smith CIE, Burger JA. Resistance Mutations to BTK Inhibitors Originate From the NF- κ B but Not From the PI3K-RAS-MAPK Arm of the B Cell Receptor Signaling Pathway. *Front Immunol*. 2021;12:689472.
43. Blombery P, Chatzikonstantinou T, Gerousi M, Rosenquist R, Gaidano G, Pospisilova S, et al. Resistance to targeted therapies in chronic lymphocytic leukemia: Current status and perspectives for clinical and diagnostic practice. *Leukemia*. 2025 (on-line).
44. Medina-Gil D, Palomo L, Navarro V, Lázaro G, Martín-Mur B, Hernández C, et al. Bruton tyrosine kinase covalent inhibition shapes the immune microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2025 (on-line).
45. Parigger T, Drothler S, Scherhäufl C, Gassner FJ, Schubert M, Steiner M, et al. Oncogenic MTOR Signaling Axis Compensates BTK Inhibition in a Chronic Lymphocytic Leukemia Patient with Richter Transformation: A Case Report and Review of the Literature. *Acta Haematol*. 2024;147:604–11.
46. Ondrisova L, Seda V, Hlavac K, Pavelkova P, Hoferkova E, Chiodin G, et al. FoxO1/Rictor axis induces a nongenetic adaptation to ibrutinib via Akt activation in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2024;134: e173770.
47. Hezkiy EE, Kumar S, Gahramanov V, Yaglom J, Hesin A, Jadhav SS, et al. Search for Synergistic Drug Combinations to Treat Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cells*. 2022;11:3671.

48. Thijssen R, Van Bochove G, Derks IA, Ter Burg J, De Rooij MF, Spaargaren M, et al. Combined Inhibition of mTOR and DNA-PK Blocks Survival, Adhesion, Proliferation and Chemoresistance in Primary Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Cells. *Blood*. 2014;124:1981.
49. Zuo F, Yu J, He X. Single-Cell Metabolomics in Hematopoiesis and Hematological Malignancies. *Front Oncol*. 2022;12:931393.
50. Galicia-Vázquez G, Aloyz R. Metabolic rewiring beyond Warburg in chronic lymphocytic leukemia: How much do we actually know? *Crit Rev Oncol Hemat*. 2019;134:65–70.
51. Napoli M, Flores ER. The p53 family orchestrates the regulation of metabolism: physiological regulation and implications for cancer therapy. *Br J Cancer*. 2017;116:149–55.
52. Nie Y, Yun X, Zhang Y, Wang X. Targeting metabolic reprogramming in chronic lymphocytic leukemia. *Exp Hematol Oncol*. 2022;11:39.
53. Zarou MM, Vazquez A, Vignir Helgason G. Folate metabolism: a re-emerging therapeutic target in haematological cancers. *Leukemia*. 2021;35:1539–51.
54. Thorndike J, Beck WS. Production of formaldehyde from N5-methyltetrahydrofolate by normal and leukemic leukocytes. *Cancer Res*. 1977;37:1125–32.
55. Valverde-Santiago M, Pontel LB. Emerging mechanisms underlying formaldehyde toxicity and response. *Mol Cell*. 2025;85:2068–79.
56. Vekariya U, Toma MM, Nieborowska-Skorska M, Le BV, Caron MC, Kukuyan AM, et al. DNA polymerase theta protects leukemia cells from metabolic-induced DNA damage. *Blood*. 2023;141:2372-89.
57. Zhang Y, Zhou F, Guan J, Zhou L, Chen B. Action Mechanism of Metformin and Its Application in Hematological Malignancy Treatments: A Review. *Biomolecules*. 2023;13:250.
58. Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, et al. Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy. *Cell*. 2009;136:521–34.

59. Eng CH, Yu K, Lucas J, White E, Abraham RT. Ammonia Derived from Glutaminolysis Is a Diffusible Regulator of Autophagy. *Sci Signal*. 2010;3:ra31.
60. Rozovski U, Grgurevic S, Bueso-Ramos C, Harris DM, Li P, Liu Z, et al. Aberrant LPL Expression, Driven by STAT3, Mediates Free Fatty Acid Metabolism in CLL Cells. *Mol Cancer Res*. 2015;13:944–53.
61. Pallasch CP, Schwamb J, Königs S, Schulz A, Debey S, Kofler D, et al. Targeting lipid metabolism by the lipoprotein lipase inhibitor orlistat results in apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. 2008;22:585–92.
62. Rozovski U, Hazan-Halevy I, Barzilai M, Keating MJ, Estrov Z. Metabolism pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Lymphoma*. 2016;57:758–65.
63. Gimenez N, Tripathi R, Giró A, Rosich L, López-Guerra M, López-Oreja I, et al. Systems biology drug screening identifies statins as enhancers of current therapies in chronic lymphocytic leukemia. *Sci Rep*. 2020;10:22153.
64. Lin Z, Long F, Kang R, Klionsky DJ, Yang M, Tang D. The lipid basis of cell death and autophagy. *Autophagy*. 2024;20:469–88.
65. Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond — mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J*. 2018;285:416–31.
66. Ali A, Davidson S, Fraenkel E, Gilmore I, Hankemeier T, Kirwan JA, et al. Single cell metabolism: current and future trends. *Metabolomics*. 2022;18:77.
67. Haring E, Buescher JM, Apostolova P. Metabolism in hematology: Technological advances open new perspectives on disease biology and treatment. *Hemasphere*. 2025;9:e70134.
68. Aichler M, Walch A. MALDI Imaging mass spectrometry: current frontiers and perspectives in pathology research and practice. *Lab Invest*. 2015;95:422–31.

69. Ščupáková K, Balluff B, Tressler C, Adelaja T, Heeren RMA, Glunde K, et al. Cellular resolution in clinical MALDI mass spectrometry imaging: the latest advancements and current challenges. *Clin Chem Lab Med*. 2020;58:914–29.
70. Duncan MW, Nedelkov D, Walsh R, Hattan SJ. Applications of MALDI Mass Spectrometry in Clinical Chemistry. *Clin Chem*. 2016;62:134–43.
71. Körber A, Anthony IGM, Heeren RMA. Mass Spectrometry Imaging. *Anal Chem*. 2025;97:15517–49.
72. Li D, Ouyang Z, Ma X. Mass Spectrometry Imaging for Single-Cell or Subcellular Lipidomics: A Review of Recent Advancements and Future Development. *Molecules*. 2023;28:2712.
73. The Biophysical Society of Japan. Applicatins of Biophysics. Sano K, Setou M. High spatial resolution imaging mass spectrometry with atmospheric-pressure ion source. Shimadzu Corporation. Dostupno na adresi: https://www.biophys.jp/dl/pub/appli_03.pdf. Datum pristupa: 05.08.2025.
74. Ščupáková K, Dewez F, Walch AK, Heeren RMA, Balluff B. Morphometric Cell Classification for Single-Cell MALDI-Mass Spectrometry Imaging. *Angew Chem Int Ed*. 2020;59:17447–50.
75. Chen Y, Li EM, Xu LY. Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformatics Workflow. *Metabolites*. 2022;12:357.
76. Ràfols P, Vilalta D, Brezmes J, Cañellas N, Del Castillo E, Yanes O, et al. Signal preprocessing, multivariate analysis and software tools for MA(LDI)-TOF mass spectrometry imaging for biological applications. *Mass Spectrom Rev*. 2018;37:281–306.
77. Palmer A, Phapale P, Chernyavsky I, Lavigne R, Fay D, Tarasov A, et al. FDR-controlled metabolite annotation for high-resolution imaging mass spectrometry. *Nat Methods*. 2017;14:57–60.

78. Conroy MJ, Andrews RM, Andrews S, Cockayne L, Dennis EA, Fahy E, et al. LIPID MAPS: update to databases and tools for the lipidomics community. *Nucleic Acids Res.* 2024;52:D1677–82.
79. Xue J, Guijas C, Benton HP, Warth B, Siuzdak G. METLIN MS2 molecular standards database: a broad chemical and biological resource. *Nat Methods.* 2020;17:953–4.
80. Wishart DS, Guo A, Oler E, Wang F, Anjum A, Peters H, et al. HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Res.* 2022;50:D622–31.
81. Horai H, Arita M, Kanaya S, Nihei Y, Ikeda T, Suwa K, et al. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J Mass Spectrom.* 2010;45:703–14.
82. Bairoch A. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:45–8.
83. Mayonu M, Babae S, Jiang L, Wilson D, Wang B. Evaluation of a New Approach for Principal Component Analysis Application in Metabolomics Studies. *Anal Lett.* 2025;1–14.
84. Ruiz-Perez D, Guan H, Madhivanan P, Mathee K, Narasimhan G. So you think you can PLS-DA? *BMC Bioinformatics.* 2020;21:2.
85. Wulff JE, Mitchell MW. A Comparison of Various Normalization Methods for LC/MS Metabolomics Data. *Advances in Bioscience and Biotechnology.* 2018;09:339–51.
86. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Dostupno na adresi: <https://www.R-project.org/>. Datum pristupa: 02.05.2025.
87. Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:27–30.
88. Hossen MA, Nagata Y, Waki M, Ide Y, Takei S, Fukano H, et al. Decreased level of phosphatidylcholine (16:0/20:4) in multiple myeloma cells compared to plasma cells: a single-cell MALDI–IMS approach. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407:5273–80.

89. Marković I, Debeljak Ž, Dobrošević B, Lukić M, Mrđenović S, Kotris A, et al. Metabolic profiling of CD19+ cells in chronic lymphocytic leukemia by single-cell mass spectrometry imaging. *Clin Chim Acta*. 2024;561:119758.
90. Debeljak Ž, Niehoff AC, Bandjak A, Mandić D, Bošnjak B, Heffer M, et al. MALDI TOF Mass Spectrometry Imaging of Blood Smear: Method Development and Evaluation. *Int J Mol Sci*. 2021;22:585.
91. Yang E, Shen XE, West-Foyle H, Hahm T, Siegler MA, Brown DR, et al. FluoMALDI Microscopy: Matrix Co-Crystallization Simultaneously Enhances Fluorescence and MALDI Imaging. *Adv Sci*. 2023;10:2304343.
92. Passarelli MK, Ewing AG. Single-cell imaging mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol*. 2013;17:854–9.
93. Cajka T, Hricko J, Rudl Kulhava L, Paucova M, Novakova M, Kuda O. Optimization of Mobile Phase Modifiers for Fast LC-MS-Based Untargeted Metabolomics and Lipidomics. *Int J Mol Sci*. 2023;24:1987.
94. Minerva L, Boonen K, Menschaert G, Landuyt B, Baggerman G, Arckens L. Linking Mass Spectrometric Imaging and Traditional Peptidomics: A Validation in the Obese Mouse Model. *Anal Chem*. 2011;83:7682–91.
95. Ščupáková K, Soons Z, Ertaylan G, Pierzchalski KA, Eijkel GB, Ellis SR, et al. Spatial Systems Lipidomics Reveals Nonalcoholic Fatty Liver Disease Heterogeneity. *Anal Chem*. 2018;90:5130–8.
96. Huan T, Tang C, Li R, Shi Y, Lin G, Li L. MyCompoundID MS/MS Search: Metabolite Identification Using a Library of Predicted Fragment-Ion-Spectra of 383,830 Possible Human Metabolites. *Anal Chem*. 2015;87:10619–26.
97. Monge ME, Dodds JN, Baker ES, Edison AS, Fernández FM. Challenges in Identifying the Dark Molecules of Life. *Annual Rev Anal Chem*. 2019;12:177–99.

98. Mazzarello AN, Fitch M, Cardillo M, Ng A, Bhuiya S, Sharma E, et al. Characterization of the Intraclonal Complexity of Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells: Potential Influences of B-Cell Receptor Crosstalk with Other Stimuli. *Cancers*. 2023;15:4706.
99. Marković I, Lukić I, Lukić M, Pavičić E, Mrđenović S, Kotris A, et al. Differentiation of the chronic lymphocytic leukemia response to ibrutinib and acalabrutinib treatment by single-cell MALDI-TOF MS imaging. *J Pharmaceut Biomed*. 2025;255:116664.
100. Patel V, Balakrishnan K, Bibikova E, Ayres M, Keating MJ, Wierda WG, et al. Comparison of Acalabrutinib, A Selective Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor, with Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Clin Cancer Res*. 2017;23:3734–43.
101. Patel VK, Lamothe B, Ayres ML, Gay J, Cheung JP, Balakrishnan K, et al. Pharmacodynamics and proteomic analysis of acalabrutinib therapy: similarity of on-target effects to ibrutinib and rationale for combination therapy. *Leukemia*. 2018;32:920–30.
102. Huang D, Bouza M, Gaul DA, Leach FE, Amster IJ, Schroeder FC, et al. Comparison of High-Resolution Fourier Transform Mass Spectrometry Platforms for Putative Metabolite Annotation. *Anal Chem*. 2021;93:12374–82.
103. Liu Y, Pizzato J, Larrouy-Maumus G. Detection of Lipids in the MALDI Negative Ion Mode for Diagnostics, Food Quality Control, and Antimicrobial Resistance. U: Shah HN, Gharbia SE, Shah AJ, Tranfield EY, Thompson KC, urednici. *Microbiological Identification using MALDI-TOF and Tandem Mass Spectrometry*. New York: Wiley; 2023. str. 381–403.
104. Hallek M, Al-Sawaf O. Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *American J Hematol*. 2021;96:1679–705.
105. Zhevak T, Shelekhova T, Chesnokova N, Tsareva O, Chanturidze A, Litvitsky P, et al. The relationship between oxidative stress and cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Exp Mol Pathol*. 2020;116:104524.
106. Umansky C, Morellato AE, Rieckher M, Scheidegger MA, Martinefski MR, Fernández GA, et al. Endogenous formaldehyde scavenges cellular glutathione resulting in redox disruption and cytotoxicity. *Nat Commun*. 2022;13:745.

107. Burgos-Barragan G, Wit N, Meiser J, Dingler FA, Pietzke M, Mulderrig L, et al. Mammals divert endogenous genotoxic formaldehyde into one-carbon metabolism. *Nature*. 2017;548:549–54.
108. Brosnan ME, Brosnan JT. Formate: The Neglected Member of One-Carbon Metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2016;36:369–88.
109. Jitschin R, Hofmann AD, Bruns H, Gießl A, Bricks J, Berger J, et al. Mitochondrial metabolism contributes to oxidative stress and reveals therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123:2663–72.
110. Tibaldi E, Federti E, Matte A, Iatcenko I, Wilson AB, Riccardi V, et al. Oxidation Impacts the Intracellular Signaling Machinery in Hematological Disorders. *Antioxidants*. 2020;9:353.
111. Recktenwald CV, Kellner R, Lichtenfels R, Seliger B. Altered Detoxification Status and Increased Resistance to Oxidative Stress by K-Ras Transformation. *Cancer Res*. 2008;68:10086–93.
112. Kaźmierczak M, Luczak M, Lewandowski K, Handschuh L, Czyż A, Jarmuż M, et al. Esterase D and gamma 1 actin level might predict results of induction therapy in patients with acute myeloid leukemia without and with maturation. *Med Oncol*. 2013;30:725.
113. Tasdemir E, Maiuri MC, Morselli E, Criollo A, D’Amelio M, Djavaheri-Mergny M, et al. A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy*. 2008;4:810–4.
114. Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D’Amelio M, et al. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol*. 2008;10:676–87.
115. Xu J, Patel NH, Gewirtz DA. Triangular Relationship between p53, Autophagy, and Chemotherapy Resistance. *Int J Mol Sci*. 2020;21:8991.
116. Yao W, Yang Y, Chen X, Cui X, Zhou B, Zhao B, et al. Activation of Esterase D by FPD5 Inhibits Growth of A549 Lung Cancer Cells via JAB1/p53 Pathway. *Genes*. 2022;13:786.

117. Broniowska KA, Diers AR, Hogg N. S-Nitrosoglutathione. *BBA - Gen Subjects*. 2013;1830:3173–81.
118. Salvatori L, Spallotta F, Gaetano C, Illi B. Pillars and Gaps of S-Nitrosylation-Dependent Epigenetic Regulation in Physiology and Cancer. *Life*. 2021;11:1424.
119. Marozkina N, Gaston B. An Update on Thiol Signaling: S-Nitrosothiols, Hydrogen Sulfide and a Putative Role for Thionitrous Acid. *Antioxidants*. 2020;9:225.
120. Rizza S, Filomeni G. Tumor Suppressor Roles of the Denitrosylase GSNOR. *Crit Rev Oncog*. 2016;21:433–45.
121. Yang Z, Wang ZE, Doulias PT, Wei W, Ischiropoulos H, Locksley RM, et al. Lymphocyte Development Requires S-nitrosoglutathione Reductase. *J Immunol*. 2010;185:6664–9.
122. Torkildsen S, Gorunova L, Heim S, Tjønnfjord GE, Spetalen S, Risberg B, et al. Molecular Genetic Characterization of Acute Myeloid Leukemia With Trisomy 4 as the Sole Chromosome Abnormality. *Cancer Genomics Proteomics*. 2019;16:175–8.
123. Wu Y, Liu S, Wang D, Yao X. Acute Myeloid Leukemia Secondary to Chronic Lymphocytic Leukemia After Prolonged Chlorambucil Therapy: A Case Report. *Pharmgenomics Pers Med*. 2023;16:401–5.
124. Cuneo A, Roberti MG, Bigoni R, Minotto C, Bardi A, Milani R, et al. Four novel non-random chromosome rearrangements in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: 6p24–25 and 12p12–13 translocations, 4q21 anomalies and monosomy 21. *Br J Haematol*. 2000;108:559–64.
125. Atli EI, Gurkan H, Demir AM. An unknown chromosomal aberration in a patient with chronic lymphocytic leukemia: Extra isochromosome 4q. *J Canc Res Ther*. 2021;17:282–7.
126. Mena-Osuna R, Mantrana A, Guil-Luna S, Sánchez-Montero MT, Navarrete-Sirvent C, Morales-Ruiz T, et al. Metabolic shift underlies tumor progression and immune evasion in S-nitrosoglutathione reductase-deficient cancer. *J Pathol*. 2023;260:261–75.

127. Rizza S, Di Leo L, Pecorari C, Giglio P, Faienza F, Montagna C, et al. GSNOR deficiency promotes tumor growth via FAK1 S-nitrosylation. *Cell Rep.* 2023;42:111997.
128. Chen X, Chothia SY, Basran J, Hopkinson RJ. Formaldehyde regulates tetrahydrofolate stability and thymidylate synthase catalysis. *Chem Commun.* 2021;57:5778–81.
129. Gez S, Crossett B, Christopherson RI. Differentially expressed cytosolic proteins in human leukemia and lymphoma cell lines correlate with lineages and functions. *BBA - Proteins and Proteomics.* 2007;1774:1173–83.
130. Zhao LN, Björklund M, Caldez MJ, Zheng J, Kaldis P. Therapeutic targeting of the mitochondrial one-carbon pathway: perspectives, pitfalls, and potential. *Oncogene.* 2021;40:2339–54.
131. Chen L, Zhang Z, Hoshino A, Zheng HD, Morley M, Arany Z, et al. NADPH production by the oxidative pentose-phosphate pathway supports folate metabolism. *Nat Metab.* 2019;1:404–15.
132. Ma Y, Yi M, Wang W, Liu X, Wang Q, Liu C, et al. Oxidative degradation of dihydrofolate reductase increases CD38-mediated ferroptosis susceptibility. *Cell Death Dis.* 2022 ;13:944.
133. Hoxhaj G, Manning BD. The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2020;20:74–88.
134. Kong Q, Lin C liang G. Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67:1817–29.
135. Ishii T, Igawa T, Hayakawa H, Fujita T, Sekiguchi M, Nakabeppu Y. PCBP1 and PCBP2 both bind heavily oxidized RNA but cause opposing outcomes, suppressing or increasing apoptosis under oxidative conditions. *J Biol Chem.* 2020;295:12247–61.
136. Chao MR, Evans MD, Hu CW, Ji Y, Møller P, Rossner P, et al. Biomarkers of nucleic acid oxidation – A summary state-of-the-art. *Redox Biol.* 2021;42:101872.

137. Mrowicka M, Mrowicki J, Dragan G, Majsterek I. The importance of thiamine (vitamin B1) in humans. *Bioscience Reports*. 2023;43:BSR20230374.
138. Iimura Y, Andoh S, Kawamata T, Sato A, Yokoyama K, Imai Y, et al. Thiamine Deficiency and Neurological Symptoms in Patients with Hematological Cancer Receiving Chemotherapy: A Retrospective Analysis. *J Neurosci Rural Pract*. 2021;12:726–32.
139. Jonus HC, Byrnes CC, Kim J, Valle ML, Bartlett MG, Said HM, et al. Thiamine mimetics sulbutiamine and benfotiamine as a nutraceutical approach to anticancer therapy. *Biomed Pharmacother*. 2020;121:109648.
140. Rizzo C, Boenzi S, Inglese R, La Marca G, Muraca M, Martinez TB, et al. Measurement of succinyl-carnitine and methylmalonyl-carnitine on dried blood spot by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. 2014;429:30–3.
141. Tannoury M, Ayoub M, Dehgane L, Nemazanyy I, Dubois K, Isabelle C, et al. ACOX1-mediated peroxisomal fatty acid oxidation contributes to metabolic reprogramming and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2024;38:302–17.
142. Gugliatti E, Tenca C, Ravera S, Fabbi M, Ghiotto F, Mazzarello AN, et al. A reversible carnitine palmitoyltransferase (CPT1) inhibitor offsets the proliferation of chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*. 2018;103:e531–6.
143. Okkenhaug K, Burger JA. PI3K Signaling in Normal B Cells and Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Curr Top Microbiol Immunol*. 2016;393:123–42.
144. Dibble CC, Barritt SA, Perry GE, Lien EC, Geck RC, DuBois-Coyne SE, et al. PI3K drives the de novo synthesis of coenzyme A from vitamin B5. *Nature*. 2022;608:192–8.
145. Massaro C, Thomas J, Ikhlef H, Dinara S, Cronk S, Moots H, et al. Serendipitous Discovery of Leucine and Methionine Depletion Agents during the Search for Polyamine Transport Inhibitors. *J Med Chem*. 2020;63:2814–32.
146. Holbert CE, Cullen MT, Casero RA, Stewart TM. Polyamines in cancer: integrating organismal metabolism and antitumour immunity. *Nat Rev Cancer*. 2022;22:467–80.

147. Novita Sari I, Setiawan T, Seock Kim K, Toni Wijaya Y, Won Cho K, Young Kwon H. Metabolism and function of polyamines in cancer progression. *Cancer Lett.* 2021;519:91–104.
148. Prasher P, Sharma M, Singh SK, Gulati M, Chellappan DK, Rajput R, et al. Spermidine as a promising anticancer agent: Recent advances and newer insights on its molecular mechanisms. *Front Chem.* 2023;11: 1164477.
149. Holbert CE, Casero RA, Stewart TM. Polyamines: the pivotal amines in influencing the tumor microenvironment. *Discov Onc.* 2024;15:173.
150. Choi SJ, Choi HS, Kim H, Lee JM, Kim SH, Yoon JH, et al. Gastric Cancer and Intestinal Metaplasia: Differential Metabolic Landscapes and New Pathways to Diagnosis. *Int J Mol Sci.* 2024;25:9509.
151. Zhang J, Ye Z wei, Bräutigam L, Chakraborty P, Luo Z, Culpepper J, et al. A role for microsomal glutathione transferase 1 in melanin biosynthesis and melanoma progression. *J Biol Chem.* 2023;299:104920.
152. Koike S, Yamasaki K. Melanogenesis Connection with Innate Immunity and Toll-Like Receptors. *Int J Mol Sci.* 2020;21:9769.
153. Nisco A, Tolomeo M, Scalise M, Zanier K, Barile M. Exploring the impact of flavin homeostasis on cancer cell metabolism. *BBA - Reviews on Cancer.* 2024;1879:189149.
154. Bjelosevic S, Fauth R, Do BT, Alexe G, Ryback B, Basanthakumar AT, et al. Riboflavin Drives Nucleotide Biosynthesis and Iron-Sulfur Metabolism to Promote Acute Myeloid Leukemia. *Blood.* 2024;144:626–626.
155. Bjelosevic S, Fauth R, Do BT, Alexe G, Merickel LA, Ryback B, et al. Riboflavin metabolism as a selective therapeutic vulnerability in Acute Myeloid Leukemia (AML). *Klin Padiatr.* 2025;237:175.
156. Zeng T, Zuo Z, Luo Y, Zhao Y, Yu Y, Chen Q. A novel series of human dihydroorotate dehydrogenase inhibitors discovered by *in vitro* screening: inhibition activity and crystallographic binding mode. *FEBS Open Bio.* 2019;9:1348–54.

157. Hajeyah AA, Griffiths WJ, Wang Y, Finch AJ, O'Donnell VB. The Biosynthesis of Enzymatically Oxidized Lipids. *Front Endocrinol.* 2020;11: 591819.
158. Drost A, Funk M, Norz K, Zipfel A, Kanz L, Mohle R. Cysteinyl Leukotrienes Signal Via Overexpressed CysLT1, but Not CysLT2 Receptor In Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood.* 2010;116:3612.
159. Drost A, Norz K, Funk M, Seitz G, Kanz L, Möhle R. Autocrine Function of Cysteinyl-Leukotrienes and Their Receptor CysLT1 in Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL). *Blood.* 2009;114:2325.
160. Sousa BB, De Almeida CR, Barahona AF, Lopes R, Martins-Logrado A, Cavaco M, et al. Selective Inhibition of Bruton's Tyrosine Kinase by a Designed Covalent Ligand Leads to Potent Therapeutic Efficacy in Blood Cancers Relative to Clinically Used Inhibitors. *ACS Pharmacol Transl Sci.* 2022;5:1156–68.
161. Lepley RA, Muskardin DT, Fitzpatrick FA. Tyrosine Kinase Activity Modulates Catalysis and Translocation of Cellular 5-Lipoxygenase. *J Biol Chem.* 1996;271:6179–84.
162. Claesson HE, Sjöberg J, Xu D, Björkholm M. Expression and putative biological roles of lipoxygenases and leukotriene receptors in leukemia and lymphoma. *Prostag Oth Lipid M.* 2024;174:106871.
163. Peeters R, Jellusova J. Lipid metabolism in B cell biology. *Mol Oncol.* 2024;18:1795–813.
164. Jing H, Reed A, Ulanovskaya OA, Grigoleit JS, Herbst DM, Henry CL, et al. Phospholipase $\text{C}\gamma 2$ regulates endocannabinoid and eicosanoid networks in innate immune cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2021;118:e2112971118.
165. Austen KF, Maekawa A, Kanaoka Y, Boyce JA. The leukotriene E4 puzzle: Finding the missing pieces and revealing the pathobiologic implications. *J Allergy Clin Immun.* 2009;124:406–14.

166. Liu M, Liu Y, Feng H, Jing Y, Zhao S, Yang S, et al. Clinical Significance of Screening Differential Metabolites in Ovarian Cancer Tissue and Ascites by LC/MS. *Front Pharmacol.* 2021;12:701487.
167. Rufail ML, Bassi R, Giussani P. Sphingosine-1-Phosphate Metabolic Pathway in Cancer: Implications for Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci.* 2025;26:1056.
168. Almejún MB, Borge M, Colado A, Elías EE, Podaza E, Risnik D, et al. Sphingosine kinase 1 participates in the activation, proliferation and survival of chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica.* 2017;102:e257–60.
169. Till KJ, Pettitt AR, Slupsky JR. Expression of Functional Sphingosine-1 Phosphate Receptor-1 Is Reduced by B Cell Receptor Signaling and Increased by Inhibition of PI3 Kinase δ but Not SYK or BTK in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *J Immunol.* 2015;194:2439–46.
170. Borge M, Remes Lenicov F, Nannini PR, De Los Ríos Alicandú MM, Podaza E, Ceballos A, et al. The Expression of Sphingosine-1 Phosphate Receptor-1 in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Is Impaired by Tumor Microenvironmental Signals and Enhanced by Piceatannol and R406. *J Immunol.* 2014;193:3165–74.
171. Bolander FF. Calcium, Calmodulin, and Phospholipids. U: Bolander FF (urednik). *Molecular Endocrinology.* Amsterdam Elsevier; 2004. str. 273–319.
172. Nixon GF, Mathieson FA, Hunter I. The multi-functional role of sphingosylphosphorylcholine. *Prog Lipid Res.* 2008;47:62–75.
173. Dielschneider RF, Eisenstat H, Mi S, Curtis JM, Xiao W, Johnston JB, et al. Lysosomotropic agents selectively target chronic lymphocytic leukemia cells due to altered sphingolipid metabolism. *Leukemia.* 2016;30:1290–300.
174. Raza Y, Atallah J, Luberto C. Advancements on the Multifaceted Roles of Sphingolipids in Hematological Malignancies. *Int J Mol Sci.* 2022;23:12745.

175. Park MK, Lee CH. Role of Sphingosylphosphorylcholine in Tumor and Tumor Microenvironment. *Cancers*. 2019;11:1696.
176. Yue HW, Jing QC, Liu PP, Liu J, Li WJ, Zhao J. Sphingosylphosphorylcholine in cancer progress. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8:11913–21.
177. Hu X, Haney N, Kropp D, Kabore AF, Johnston JB, Gibson SB. Lysophosphatidic Acid (LPA) Protects Primary Chronic Lymphocytic Leukemia Cells from Apoptosis through LPA Receptor Activation of the Anti-apoptotic Protein AKT/PKB. *J Biol Chem*. 2005;280:9498–508.
178. Kumar SA, Hu X, Brown M, Kuschak B, Hernandez TA, Johnston JB, et al. Lysophosphatidic acid receptor expression in chronic lymphocytic leukemia leads to cell survival mediated through vascular endothelial growth factor expression. *Leukemia Lymphoma*. 2009;50:2038–48.
179. Sheng X, Yung YC, Chen A, Chun J. Lysophosphatidic acid signalling in development. *Development*. 2015;142:1390–5.
180. Pagès C, Simon MF, Valet P, Saulnier-Blache JS. Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostag Oth Lipid M*. 2001;64:1–10.
181. Tsukahara T, Matsuda Y, Haniu H. Lysophospholipid-Related Diseases and PPAR γ Signaling Pathway. *Int J Mol Sci*. 2017;18:2730.
182. Fujiwara Y. Cyclic phosphatidic acid - a unique bioactive phospholipid. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1781:519–24.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ivana Marković

Titula: magistra medicinske biokemije, specijalist medicinske biokemije i laboratorijske medicine

Datum i mjesto rođenja: 10. 5. 1989., Čakovec, Hrvatska

Adresa: Vrbaska 32, 31 000 Osijek

Kontakt: ivanaa.markovic@kbco.hr

Zaposlenje: Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Osijek

Školovanje:

2019. – upis Poslijediplomskog doktorskog studija Biomedicina i zdravstvo (Medicinski fakultet Osijek, Osijek)

2019. – položen specijalistički ispit iz medicinske biokemije i laboratorijske medicine

2015. – 2019. specijalizacija iz medicinske biokemije i laboratorijske medicine (Klinički bolnički centar Osijek, Osijek)

2012. – 2013. pripravnički staž iz medicinske biokemije i laboratorijske medicine (Klinička bolnica Merkur, Zagreb)

2007. – 2012. Studij medicinske biokemije (Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb)

2003. – 2007. srednjoškolsko obrazovanje (Gimnazija »Fran Galović«, Koprivnica)

1995. – 2003. osnovnoškolsko obrazovanje (OŠ Ludbreg, Ludbreg)

Radno iskustvo:

7. 5. 2019. – danas specijalist medicinske biokemije i laboratorijske medicine, Klinički bolnički centar Osijek

15. 1. 2014. – 6. 5. 2019. specijalizant iz medicinske biokemije i laboratorijske medicine, Klinički bolnički centar Osijek

14. 8. 2014. – 14. 1. 2015. magistra medicinske biokemije, voditelj tima

Medicinsko-biokemijski laboratorij, Dom zdravlja Varaždinske županije, Varaždin

1. 4. 2014. – 13. 8. 2014. magistra medicinske biokemije, voditelj laboratorija

Medicinsko-biokemijski laboratorij, Dom zdravlja Otočac, Otočac

22. 12. 2012. – 21. 12. 2013. pripravnik na stručnom osposobljavanju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

Popis znanstvenih radova:

1. **Marković I**, Lukić I, Lukić M, Pavičić E, Mrđenović S, Kotris A, et al. Differentiation of the chronic lymphocytic leukemia response to ibrutinib and acalabrutinib treatment by single-cell MALDI-TOF MS imaging. *J Pharm Biomed Anal* 2025;255:116664. doi:10.1016/j.jpba.2025.116664.
2. **Marković I**, Debeljak Ž, Dobrošević B, Lukić M, Mrđenović S, Kotris A, et al. Metabolic Profiling of CD19+ Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia by Single-Cell Mass Spectrometry Imaging. *Clin Chim Acta* 2024;561:119758. doi.org/10.1016/j.cca.2024.119758.
3. Begolli G, **Marković I**, Knežević J, Debeljak Ž. Carbohydrate sulfotransferases: a review of emerging diagnostic and prognostic applications. *Biochem Med* 2023;33:030503. doi: 10.11613/BM.2023.030503.
4. Debeljak Ž, Niehoff AC, Bandjak A, Mandić D, Bošnjak B, Heffer M, Mrđenović S, **Marković I**, et al. MALDI TOF mass spectrometry imaging of blood smear: method development and evaluation. *Int J Mol Sci* 2021;22:585. doi: 10.3390/ijms22020585.
5. Debeljak Ž, **Marković I**, Pavela J, Lukić I, Mandić D, Mandić S et al. Analytical bias of automated immunoassays for six serum steroid hormones assessed by LC-MS/MS.

Biochem Med 2020;30:030701. doi: 10.11613/BM.2020.030701.

6. **Marković I**, Debeljak Z, Bosnjak B, Marijanovic M. False positive immunoassay for heparin-induced thrombocytopenia in the presence of monoclonal gammopathy: a case report. Biochem Med 2017;27:030801.
7. Glavaš-Obrovac Lj, Jukić M, Mišković K, **Marković I**, Saftić D, Ban Ž, Matić J, Žinić B. Antiproliferative and proapoptotic activity of molecular copper (II) complex of N-1-tosylcytosine. J Trace Elem Med Bio 2017.

Aktivno sudjelovanje na skupovima (posterski sažeci):

1. **Marković I**, Lukić M, Lukić I, Debeljak Ž. MALDI-TOF MS analysis of plasma samples in chronic lymphocytic leukemia, EuroMedLab 2025, Brisel, Belgija
2. Lukić M, Suknović M, **Marković I**, Debeljak Ž. Single-cell MALDI TOF MS Imaging of Human Granulocytes. International School on Mass Spectrometry (intSMS), 2024, Erice, Italija
3. Pavičić E, **Marković I**, Debeljak Ž. Mass spectrometry imaging discerns the metabolome of CD19+ lymphocytes in untreated and treated subjects with chronic lymphocytic leukemia. 20. Ružičkini dani, 2024., Vukovar, Hrvatska
4. **Marković I**, Debeljak Ž, Bošnjak B, Mandić D. Laser Settings' Optimization for Single Cell MALDI-TOF MS Imaging of Human CD19+ Lymphocytes, 6th International Mass Spectrometry School, 2023, Cagliari, Italija
5. **Marković I**, Debeljak Ž, Mandić D, Šerić V. Imaging mass spectrometry of lymphocyte clones in chronic lymphocytic leukemia, Euromedlab Worldlab 2023, Rim, Italija
6. **Marković I**, Debeljak Ž, Bošnjak B, Šerić V. Microscopic Mass Spectrometry of White Blood Cells: Resolving the Blood Smear Preparation Issues, 6th EFLM Conference on Preanalytical Phase, 2022, *on-line*
7. **Marković I**, Debeljak Ž, Bošnjak B, Šerić V. Mass Spectrometry Imaging of Neopterin in Individual Mononuclear Blood Cells, 10. kongres HDMBLM 2022, Zagreb, Hrvatska

8. **Marković I**, Debeljak Ž, Šerić V. Non-classic congenital adrenal hyperplasia and polycystic ovary syndrome differentiation using commercially available LC-MS/MS steroid profile kit: a case report, MSACL 2019, Salzburg, Austrija
9. **Marković I**, Debeljak Ž, Šerić V. Secretory biomarkers in pheochromocytoma diagnosis: a case report, 9. kongres HDMBLM 2018, Zagreb, Hrvatska
10. Vukovic B, **Markovic I**, Debeljak Z, Dobrosevic B, Seric V. Diagnostic biomarkers for serotonin producing midgut carcinoid: case report, IFCC WorldLab 2017, Durban, Južnoafrička Republika
11. Jonjić J, **Marković I**, Šerić V. Utvrđivanje pouzdanosti vizualne procjene hemolize u kapilarnim uzorcima pacijenata dojenačke dobi u odnosu na semikvantitativni fotometrijski test LIH, Lokus 2015, Mali Lošinj, Hrvatska

Stručna predavanja:

1. Slikovna spektrometrija masa krvnih stanica u kroničnoj limfocitnoj leukemiji (Shimadzu kongres »150 godina Shimadzu korporacije«, Zagreb, 2025)
2. Masena mikroskopija u kroničnoj limfocitnoj leukemiji (HKMB tečaj trajne edukacije »Dijagnostičke primjene spektrometrije masa«, Zagreb, 2024)
3. Slikovna spektrometrija masa (Shimadzu stručni skup »Budućnost instrumentalne analitike«, Zagreb, 2022)

Članstva:

Hrvatska komora medicinskih biokemičara

Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu