

# Eritrocitni markeri splenektomije

---

Lučić, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:928401>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**SVEUČILIŠNI INTEGIRIRANI PREDDIPLOMSKI I**  
**DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINE**

**Andrea Lučić**

**ERITROCITNI MARKERI**  
**SPLENEKTOMIJE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**SVEUČILIŠNI INTEGIRIRANI PREDDIPLOMSKI I**  
**DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINE**

**Andrea Lučić**

**ERITROCITNI MARKERI**  
**SPLENEKTOMIJE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

Rad je ostvaren u Kliničkom bolničkom centru Osijek.

Mentorica rada: prof. dr. sc. Marija Heffer, dr. med.

Neposredni voditelj: dr. sc. Stefan Mrđenović, dr. med.

Rad ima 38 radnih listova, 1 tablicu i 4 slike

## **PREDGOVOR RADU**

*Za početak željela bih zahvaliti mentorici ovoga rada, profesorici Mariji Heffer. Hvala Vam na pruženoj prilici i strpljenju. Iznimno mi je drago što sam mogla biti dio ove priče. Posebne zahvale želim uputiti i neposrednom voditelju ovoga rada – dr. sc. Stefanu Mrđenoviću koji je uvijek bio tu kada sam ga trebala. Uistinu sam imala “pravu” ekipu na ovome radu. Zahvaljujem se također i prof. Debeljaku te svima koje nisam ponaosob istaknula, a koji su ipak bili dio ovoga istraživanja, prije svega zaposlenike odjela abdominalne kirurgije i medicinske biokemije KBC Osijek.*

*Moram spomenuti i svoje prijatelje. Njima veliko hvala jer su strpljivo samnom prolazili muke konstantnog učenja, kolokvija, ispita te konačno i pisanja ovoga rada. Neću duljiti dalje za zahvalom prijateljima jer je većina njih toliko lijena da ovo nikada neće ni pročitati.*

*Zahvalnost koju osjećam prema svojoj obitelji ne mogu iznijeti u jednom predgovoru diplomskog rada. Hvala, hvala, hvala. Hvala mama na svemu što si napravila da ovo bude moguće, ništa od toga nije prošlo nezamijećeno. Hvala mojim sestrama na bezuvjetnoj podršci, na razgovorima i savjetima - uvijek sam govorila da ne znam gdje bih bila da nije bilo vas. Vi ste moja snaga koja me tjera ka naprijed i obećajem da ću vas sve od ovoga trenutka pa nadalje nastaviti činiti ponosnima.*

*I za kraj, nekoliko riječi posvećujem svojem tati koji ne može biti dio ovog poglavlja, poglavlja radi kojega bi bio veoma sretan. Hvala na deset godina ljubavi i sigurnosti, punima pjesme i šale. Dajem ti riječ da ti neću dati razloga da me kudiš od gore i da ću svoje znanje koristiti samo na način na koji ćeš biti ponosan.*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1 Slezena</b> .....	1
<b>1.2. Utjecaj splenektomije na organizam</b> .....	2
<b>1.3. Stanična lipidomika</b> .....	3
<b>1.4. Stanična membrana eritrocita</b> .....	4
<b>1.5. Masena spektrometrija</b> .....	5
<b>1.6. Periferni razmaz krvi</b> .....	7
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	9
<b>3. CILJEVI</b> .....	10
<b>4. ISPITANICI I METODE</b> .....	11
<b>4.1. Ustroj studije</b> .....	11
<b>4.2. Ispitanici</b> .....	11
<b>4.3. Metode</b> .....	11
<b>4.3.1. Testovi koji su korišteni za laboratorijske pretrage iz krvi</b> .....	12
<b>4.3.2. Priprema krvnih razmaza za MSI analizu</b> .....	13
<b>4.4. Statističke metode</b> .....	14
<b>5. REZULTATI</b> .....	15
<b>5.1. Rezultati usporedbe laboratorijskih parametara</b> .....	15
<b>5.2. Rezultati MSI analize krvnih razmaza</b> .....	21
<b>6. RASPRAVA</b> .....	23
<b>6.1. Laboratorijske pretrage iz krvi</b> .....	23
<b>6.1. MSI analiza krvnih razmaza</b> .....	25
<b>7. ZAKLJUČAK</b> .....	28

<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>29</b>
<b>9. SUMMARY.....</b>	<b>30</b>
<b>10. LITERATURA .....</b>	<b>31</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>38</b>



## POPIS KRATICA

ADP	Adenozin difosfat (engl. <i>Adenosine diphosphate</i> )
ALP	Alkalna fosfataza (engl. <i>Alkaline phosphatase</i> )
ALT	Alanin-aminotransferaza
ANF	Antinuklearni faktor
aPTV	Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
AST	Aspartat-aminotransferaza
CPBA	Kloroperbenzoična kiselina (engl. <i>chloroperbenzoic acid</i> )
CRP	C-reaktivni protein
DAT	Direktni antiglobulinski test
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
FLC	Slobodni laki lanci (engl. <i>free light chains</i> )
GGT	Gama-glutamil transferaza
G6PDH	Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza
GUK	Glukoza u krvi
HMDB	<i>Human Metabolome Database</i>
IAT	Indirektni antiglobulinski test
IFCC	<i>International Federation of Clinical Chemistry</i>
INR	Međunarodni normalizirani omjer (engl. <i>The international normalized ratio</i> )
MALDI	Matriks asistirana laserska desorpcija iona (engl. <i>matrix assisted laser desorption source</i> )
MCH	Prosječna masa hemoglobina (engl. <i>Mean corpuscular hemoglobine</i> )
MCHC	Prosječna koncentracija hemoglobina (engl. <i>Mean cosrpuscular hemoglobine concentration</i> )

MCV	Srednji volumen eritrocita (engl. <i>mean corpuscular volume</i> )
MPV	Prosječni volumen trombocita (engl. <i>mean platelet volume</i> )
MS	Masena spektrometrija
MSI	Slikovna masena spektrometrija (engl. <i>mass spectrometry imaging</i> )
PALS	Periarteriolarni limfni omotač (engl. <i>periarteriolar lymphatic sheath</i> )
RDW	Raspon raspodjele crvenih stanica (engl. <i>red cell distribution width</i> )
TIBC	Ukupni kapacitet vezivanja željeza (engl. <i>total iron-binding capacity</i> )
TOF	Analizator ovisan o vremenu letenja (engl. <i>time of flight</i> )
TV	Trombinsko vrijeme
UIBC	Nezasićeni kapacitet vezanja željeza (engl. <i>unsaturated iron binding capacity</i> )

### 1. UVOD

#### 1.1. Slezena

Slezena je organ hematopoetskog sustava smješten u lijevom gornjem kvadrantu trbuha te se nalazi uz veliku krivinu želuca, smještena unutar omentuma. Poznato je da slezena ima brojne važne uloge: sudjeluje u kontroli integriteta crvenih krvnih stanica te kontroli i regulaciji imunološkog sustava, a dodatno i u ekstramedularnoj hematopoezi (1).

Izduženog je oblika i trokutastog presjeka, a izgled i veličina slezene uvelike variraju unutar populacije (2). Trenutno literatura navodi da je duljina slezene u 95 % odraslih osoba manja od 12 cm (s rasponom od 9 do 15 cm). Prema dosadašnjim istraživanjima duljina i volumen slezene su značajno povezani sa spolom, visinom tijela i tjelesnom težinom te se smatra da bi se veličine slezene trebale evaluirati prema korigiranim vrijednostima za spol i tjelesnu visinu (3).

Slezena je u cijelosti obavijena čahuricom od vezivnog tkiva. Parenhim je građen od limfnih nakupina koje čine bijelu pulpu, a te su nakupine posvuda okružene crvenom pulpom - tkivom tamnocrvene boje koje je bogato krvlju (4).

Dijelom crvenu pulpu grade terminalni ogranci arterijskog sustava slezene koji dovode arterijsku krv u tračke crvene pulpe, a iz tračaka krv prelazi u venske sinuse koji se skupljaju u eferentnu venu lienalis (3). Billrothovi tračci nalaze se između sinusa i predstavljaju mrežu makrofaga međusobno povezanih citoplazmatskim nastavcima. Te stanice imaju i funkcionalne i imunološke značajke aktivnih fagocitnih stanica. Podržava ih okvir retikularnog tkiva koji uključuju miofibroblaste i retikularna vlakna. Venski sinusi imaju specifičnu strukturu. Ta struktura nastala je paralelnim postavljanjem specijaliziranih endotelnih stanica (engl. *littoral cells* – obalne stanice) koje su povezane vlaknima koja tvore pukotine kroz koje krvne stanice moraju proći da bi se vratile u cirkulaciju (5). Takva specijalizirana struktura venskog sustava crvene pulpe daje ovom organu jedinstvenu sposobnost filtriranja krvi i uklanjanja starih eritrocita. Ovi sinusi, obloženi endotelom koji ima neobičnu diskontinuiranu strukturu sadrže i tlačna vlakna (stress fibers). Tlačna vlakna povezuju endotelne stanice s komponentama izvanstaničnog matriksa i sastavljena su od aktinu i miozinu sličnih filamenata, što ukazuje na to da bi njihovo djelovanje moglo biti temeljeno na klizanju niti kojim se kontroliraju razmaci između endotelnih stanica (6). Upravo kroz te razmake endotelnih stanica eritrociti trebaju proći kada putuju iz Billrothovih tračaka u sinuse crvene pulpe. Za eritrocite koji su stari i čija je savitljivost membrane pala

## UVOD

ispod kritične granice, taj prolazak je nemoguć. Takvi eritrociti zarobljeni su u tračcima i podložni makrofazima koji ih tada mogu fagocitirati. Treba naglasiti da slezena ne uklanja samo stare eritrocite, već i bilo koje druge eritrocite deformiranog oblika. Zadržavanje deformiranih crvenih krvnih zrnaca u krvi prepoznato je kao kritična odrednica patogeneze u nasljednoj sferocitozi, malariji i drugim poremećajima eritrocita u kojima slezena igra ulogu (7).

Bijela se pulpa sastoji od limfatičkog tkiva koje ima sličnu organizaciju kao limfni čvorovi. Periarteriolar limfni omotač (engl. *periarteriolar lymphatic sheath*, PALS) obavija centralne arteriole koje se odvajaju od trabekularnih arterija koje su pak ogranci arterije lienalis. PALS je ekvivalent T zone limfnih čvorova. Folikuli s B limfocitima nalaze se uz PALS, a oni su okruženi marginalnom i perifolikularnom zonom bogatom makrofazima i dendritičkim stanicama. Ti makrofazi i dendritičke stanice iniciraju imunološki odgovor na antigene iz krvi koje prezentiraju B i T stanicama. Ovakva organizacija je pogotovo važna pri uklanjanju inkapsuliranih bakterija i objašnjava zašto su hiposplenični pacijenti izrazito osjetljivi na ove organizme (1).

Pretpostavlja se da slezena ima ulogu u kontroli obrane domaćina posredovanoj autonomnim živčanim sustavom, ali neuroanatomski dokazi za ovu pretpostavku počivaju na rijetkom broju studija koje se međusobno ne slažu obzirom na postojanje kolinergičke inervacije. Ipak, većina rezultata govori u prilog tome da slezenu inerviraju isključivo katekolaminergička vlakna (8). Aktiviranje simpatičkog živčanog sustava prvenstveno inhibira aktivnost stanica povezanih s urođenim dok ili pojačava ili inhibira aktivnost stanica povezanih sa stečenim imunološkim sustavom. Stanice urođenog imunološkog sustava izražavaju i alfa i beta-adrenergičke receptore, dok T i B limfociti eksprimiraju isključivo adrenergičke receptore podtipa beta 2. Pomoću ovih adrenergičkih receptora noradrenalin može regulirati razinu aktivnosti imunoloških stanica iniciranjem promjene u razini stanične aktivnosti, što često uključuje promjenu razine ekspresije gena za citokine i antitijela (9).

### 1.2. Utjecaj splenektomije na organizam

Splenektomija se izvodi zbog mnoštva razloga. Tupa trauma trbuha i dalje je najčešća indikacija za splenektomiju. Pacijenti s različitim hematološkim poremećajima također imaju koristi od ovog postupka, a osim toga, splenektomija se izvodi i u slučajevima jatrogenih ozljeda i zahvaćenosti susjednim patološkim procesima, u dijagnostičke svrhe i za

## UVOD

ublažavanje hipersplenizma. Naše razumijevanje dugoročnih posljedica splenektomije ostaje nepotpuno.

Najbolje definirana i najšire shvaćena komplikacija splenektomije je osjetljivost pacijenata na infekciju (10). Slezena je glavno mjesto sinteze imunoglobulina M. Razina serumskog imunoglobulina M pokazuje značajan pad nakon splenektomije (11). Posebno značajna i specifična komplikacija splenektomije je uzrokovana inkapsuliranim organizmima kao što su *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* i *Hemophilus influenzae* (12). Iako su neke komplikacije dobro poznate, nastoje se razjasniti ostale posljedice asplenije. Takve posljedice mogu uključivati maligne procese i trombozu. Tromboza portalne vene dobro je poznata komplikacija splenektomije. Porast popularnosti slikovnih studija doveo je do povećanja otkrivanja ove komplikacije (13-15). Neke studije ukazuju na to da bi splenektomija mogla utjecati na pojavu povišene razine glukoze (16). Objašnjenje leži u mogućnosti da slezena proizvodi stanice koje su prekursori stanica koje luče inzulin u gušterači (17, 18). Pojedinačne su studije pokazale promijenjen hematološki i imunološki profil postoperativno. U kratkom vremenu (tjedni do mjeseci) nakon splenektomije, broj leukocita i trombocita se povećava (19-21).

Određene informacije o posljedicama splenektomije postoje no potreban je veći broj studija kako bi stekli detaljno znanje na temelju kojega bi se valjano mogli skrbiti o pacijentima koji su se podvrgli toj operaciji.

### 1.3. Stanična lipidomika

Lipidomika je znanstvena disciplina koja proučava lipidni sastav stanica, tkiva i organizama. Molekularni sastav staničnog lipidoma je složen i trenutno slabo istražen. Ovo novo polje, stoga, razvija osjetljive tehnologije masene spektrometrije za kvantitativnu karakterizaciju lipidoma (22). Desetljećima su lipidi smatrani samo energetske bogatim spojevima. Danas se zna da izvršavaju brojne važne zadaće. Primjerice fosfolipidi predstavljaju važne molekule drugih glasnika koji sudjeluju u staničnoj komunikaciji (23). Uz to, lipidi poput lizofosfatidilkolina također su prepoznati kao važni biljezi bolesti, na primjer, u aterosklerozi ili reumatoidnom artritisu (24, 25).

Lipidi su vrlo heterogena skupina. Zajedničko svojstvo je fizikalne prirode i određeno je njihovom netopljivost u vodi i topljivost u nepolarnim otapalima poput etera i kloroforma. Netopljivi su u vodi stoga što u njihovoj strukturi prevladavaju nepolarne ugljikovodične skupine. U skupinu amfipatskih lipida ubrajamo fosfolipide, kolesterol, sfingolipide pa i

## UVOD

masne kiseline. One se na dodirnome sloju ulje-voda orijentiraju tako da im je polarna skupina okrenuta ka vodi, a nepolarni dio prema uljnoj fazi. Dvosloj amfipatskih molekula osnova je bioloških membrana. Najzastupljenija skupina lipida u membranama su fosfolipidi - lipidi koji osim masnih kiselina i alkohola sadržavaju i ostatak fosfatne kiseline te najčešće još bazičnu skupinu s dušikom. Fosfolipidi čine 50 - 60 % ukupnih membranskih lipida (26).

Iako su strukturno naizgled sastavljeni od malo građevnih jedinica, imaju potencijal generiranja između 9.000 i 100.000 različitih molekularnih vrsta (26). Raznolikost fosfolipida proizlazi ne samo iz razlike u polarnim glavama, već i iz različitog načina vezivanja alkilnog lanca s glicerolom (diacil-, alkil-acil- ili alkenil-acil) i konačno iz velike varijabilnosti potencijalnog acilnog ostatka (27). Daleko smo od razumijevanja biološkog značaja ove kompozicijske složenosti.

Analiza lipida uz pomoć masene spektrometrije (MS) prošla je kroz veliku promjenu u proteklom desetljeću. Tome je pridonio napredak u tehničkoj i analitičkoj metodologiji MS-a. Očekuje se da će poboljšana analiza lipida koristiti molekularnoj medicini. Uvođenje lipidomike u kliničku dijagnostiku potencijalno će otvoriti novi izvor informacija u smislu otkrivanja biomarkera. Lipidomika ovakve vrste pripada novoj grani biologije tzv. sistemskoj biologiji i usmjerena je ka traženju jedinstvenih „*otisaka prstiju*“ koje za sobom ostavljaju specifični stanični procesi (28).

### 1.4. Stanična membrana eritrocita

Eritrociti su okruženi staničnom membranom koja je zbog lake dostupnosti najbolje proučena stanična membrana. Također, eritrociti nemaju organele te svi lipidi koji su predmet istraživanja, dolaze iz njihove membrane. Stoga su eritrociti dobar model za proučavanje membranskih lipida (29).

Obzirom na relativno dug životni vijek eritrocita, bilo kakve promjene u lipidnom profilu membrane mogu reflektirati patofiziološke promjene povezane s napretkom kroničnih sistemskih bolesti (30). Uviđeno je da su promjene u metabolizmu lipida bitan dio patogeneze kardiovaskularnih bolesti (31). Brojna istraživanja ukazuju na to da određene masne kiseline i kolesterol u membrani eritrocita imaju prediktivnu ulogu za kardiovaskularne incidente (32-34). I druge različite bolesti se očituju u promjenama metaboloma i lipidoma eritrocita. Poznato je da se sastav membrane mijenja u raznim bolestima, uključujući akutnu mijeloičnu leukemiju, bolest srpastih stanica, talasemiju pa čak i dijabetes (35-41). Smanjena količina fosfatidilkolina i plazmalogena te povećan omjer fosfatidilkolina i njegovog lizo-oblika

## UVOD

primjećen je u pacijenata s hiperlipidemijama (42). Te studije su dovele do otkrivanja različitih biomarkera pomoću kojih bi mogli pratiti napredak bolesti ili koje bi mogli koristiti u svrhu predviđanja pojave bolesti u općoj populaciji (43, 44).

Neka su istraživanja otkrila da bi lipidi mogli imati ulogu i u uklanjanju starih eritrocita u slezeni te da gubitak membranske asimetrije općenito signalizira kraj životnog vijeka eritrocita. Asimetrija ima važne učinke na funkciju stanica i poznato je da utječe na brojne procese - uključujući apoptozu, diobu stanica i koagulabilnost krvi. Funkcionalna važnost asimetrije lipida dovela je do sve većeg zanimanje za razumijevanje sastava lipida s posebnim zanimanjem za vanjski sloj koji je prvi stanični entitet koji dolazi u kontakt s drugim stanicama i molekulama. U zastarjelim eritrocitima gubitak membranske asimetrije rezultira translokacijom fosfatidilserina na vanjski list membrane te to omogućuje da makrofazi prepoznaju i fagocitiraju takve stanice (45, 46). Iz ovakvih studija proizlazi da bi uklanjanje slezene uvelike moglo utjecati na sastav membranskih lipida eritrocita u splenektomiranih osoba.

### 1.5. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija je analitička tehnika koja se koristi za određivanje cijelog spektra molekula u nekom uzorku prema njihovoj molekularnoj masi. Primjena masene spektrometrije započela je ranih godina prošlog stoljeća. Analiza organskih spojeva započela je nešto kasnije, a od 1960-ih koriste se novi načini ionizacije koji omogućavaju proizvodnju iona u plinskoj fazi iz nehlapljivih organskih spojeva kao što su proteini i polisaharidi. Masena spektrometrija je postala metoda izbora za područje proteomike i srodnih studija. Suvremeni spektrometar je uređaj koji obično uključuje izvor iona, analizator mase, detektor i računalo s pisačem. Izvor iona koristi se za proizvodnju iona u plinskoj fazi, a analizator mase razdvaja ione prema  $m/z$  (omjeru mase i naboja). Detektor broji ione za svaki  $m/z$  omjer te računalo pretvara podatke iz analizatora ( $m/z$ ) i detektora (intenzitet) u spektar masa. Spektar masa je najčešće prikazan stupičastim grafom. Na ordinati su jedinice proporcionalne broju otkrivenih iona u postotku onog iona koji je najzastupljeniji, a često se označava kao "relativna količina". Apscisa je određena takozvanim "omjerom mase i naboja", što se označava kao  $m/z$  - pri čemu je  $m$  relativna masa iona u Daltonima, a  $z$  je naboj (47).

U masenoj spektrometriji ioni se mogu dobiti: udarom elektrona, kemijskom ionizacijom, elektrosprejem i desorpcijskim metodama poput matriks asistirane laserske desorpcije iona

## UVOD

(engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Source*, MALDI) te bombardiranjem brzim atomima (48).

MALDI je način ionizacije u kojem je uzorak potrebno otopiti u otapalu koje sadrži i drugu otopljenu krutu tvar - matriks. Uzorak lipida miješa se s otopinom matriksa i ostavlja da se kristalizira (49). Kada se pažljivo izvede priprema uzorka, mogu se dobiti vrlo homogeni kristali matrice i analita. Homogeni kristali neophodni su za dobivanje reproducibilnih rezultata (48). Ova se otopina zatim podvrgava pulsu laserskog snopa čija valna duljina odgovara apsorpcijskim mogućnostima matrice. Većina MALDI uređaja koristi ultravioletni (UV) laser koji emitira na 337 nm (47). Kada laserski hitac pogodi uzorak, matrica isparava i prenosi molekule lipida u plinovito stanje. Tijekom tog procesa  $H^+$  (kojeg ima u obilju jer su matrice uglavnom kiselog pH) i drugi ioni prisutni u sustavu (npr.  $Na^+$ ) izmjenjuju se između molekula lipida i matriksa, što dovodi do stvaranja kvazi-molekularnih iona (npr.  $[M + H]^+$  ili  $[M + Na]^+$ ) pri čemu se stvaraju uglavnom jednostruko nabijeni ioni. Moguće je generirati i anione uklanjanjem  $H^+$  ili  $Na^+$  iz analita (48).

Nakon stvaranja, ioni se ubrzavaju u jakom električnom polju s naponima reda 20 kV. Zbog upotrebe pulsnog lasera, ioni se stvaraju u vrlo kratkom vremenu i moraju biti analizirani u kratkom vremenskom okviru. Ovaj zahtjev može se ispuniti tzv. "time of flight" (TOF) analizatorom. Osim TOF analizatora postoji još nekoliko vrsta analizatora, a neki od njih su: magnetski sektor, ionski ciklotronski analizatori, kvadrupoli i orbitrap. TOF princip je najjednostavniji od svih. Sačinjava ga izvor, cijev u kojoj ioni slobodno lete prevaljujući određeni put i detektor.  $m/z$  omjer direktno je proporcionalan kvadratu vremena tijekom kojeg molekula prevali put do detektora te će ioni male mase dolaziti na detektor za kraće vrijeme od iona velike mase (47).

Sve je više dokaza da je ova tehnika također koristan alat i u analizi lipida i lipidomici zbog svojih brzih, jednostavnih i prikladnih performansi koje omogućuju snimanje masenog spektra stanica, ekstrakata sirovog tkiva ili tjelesnih tekućina. Negativna strana je što reproducibilnost masenih spektara dobivenih MALDI - TOF značajno ovisi o homogenosti kokristala između matrice i analita. Također, različite se lipidne klase otkrivaju različitom osjetljivošću. To je posebno važno jer lipidi s kvartarnim skupinama amonijaka (npr. fosfatidilkolin) mogu onemogućiti detektiranje drugih klasa lipida (50).

Lipidi su važne stanične komponente. Strukturna nehomogenost lipida koja proizlazi iz razlika u sastavu masnih kiselina, različitih tipova povezivanja između ostataka masnih



## UVOD

kiselina i okosnice glicerola (diacil-, alkil-acil- i alkenil -acil-) i razlike u strukturi polarnih skupina dugo su kočile detaljnu analizu lipida. To su najvjerojatnije još uvijek razlozi zašto za lipide ne postoje opće prihvaćeni protokoli kao u analizi proteina. Iako je MS za analizu lipida uspostavljen već dulje vrijeme, snimanje masenih spektara cjelovitih lipida bilo je nemoguće desetljećima. Primjena MS metoda u analizi lipida posebno se povećava u posljednjih 15 godina nakon izuma takozvanih tehnika "meke ionizacije" koje omogućavaju analizu netaknutih molekula lipida sa samo malim stupnjem fragmentacije. MALDI - TOF MS ima znatnu prednost jer se ova metoda može izvesti vrlo brzo (48).

Slikovna masena spektrometrija (engl. *mass spectrometry imaging*, MSI) je mikroskopska tehnika koja može direktno analizirati tkiva bez da uništi integritet uzorka (51). Na svakoj koordinati snima se položaj molekule i maseni spektar u isto vrijeme što omogućuje prostorni prikaz i raspodjelu molekula uz količinu te iste molekule koja odgovara određenom m/z omjeru (52). Ta mogućnost čini MSI vrlo privlačnom metodom u kliničkim istraživanjima. Ovo se poglavice odnosi na istraživanje tumora u kojima je MSI imao velike doprinose kao primjerice u otkrivanju biomarkera te u vrlo detaljnom histokemijskom opisivanju tumorskih stanica (53). Za identificiranje molekula koje su specifične za dobiveni m/z omjer možemo se koristiti dostupnim bazama molekularnih vrsta kao što je *Human Metabolome Database* (HMDB). HMDB je trenutno najveća i najopsežnija svjetska metabolomska baza specifična za organizam. Sadrži više od 40.000 metabolita i više od 700 metaboličkih puteva povezanih s bolestima (54).

MSI eritrocita do sada nije detaljnije istraživano. Postoji jedan rad čiji je cilj bio razviti tehniku MALDI TOF MSI razmaza krvi u kojem su postavljeni temelji za primjenu tehnike MSI na krvnom razmazu u kliničkoj dijagnostici i istraživanju (28).

### 1.6. Periferni razmaz krvi

Pregled razmaza periferne krvi jeftin je, ali moćan dijagnostički alat i kod djece i kod odraslih. Često pruža brz, pouzdan pristup informacijama o raznim hematološkim poremećajima. Razmaz nudi prozor u funkcionalni status koštane srži, citopenična stanja (npr. anemija, leukopenija, trombocitopenija) te je u nekim slučajevima sam periferni razmaz dovoljan za postavljanje dijagnoze (55). Automatizirani strojevi dostavljaju sve sofisticiranije podatke o krvnoj slici i morfologiji staničnih elemenata i uključuju širok spektar morfoloških abnormalnosti.

## UVOD

Eritrociti su najbrojnije stanice koje vidimo u perifernom razmazu. Morfološki pregled bi klasično trebao obuhvaćati procjenu veličine, oblika i boje te prisutnosti inkluzija. Primjerice normalne crvene stanice približne su promjera od 7 do 8  $\mu\text{m}$  i srednjim volumenom tijela (*engl. mean corpuscular volume, MCV*) od približno 90 fL. Automatizirani brojači dostavljaju informaciju o stvarnoj veličini dajući numeričku vrijednost u obliku MCV. Međutim, MCV može zavarati u prisutnosti dimorfne populacije mikrocitnih (malih) i makrocitnih (velikih) stanica, jer konačni prosjek može biti normalan. Velik raspon raspodjele crvenih stanica (*engl. red cell distribution width, RDW*) sugerira takvu divergentnu populaciju crvenih stanica različitih veličina (tj. prisutnost anizocitoze), ali ne dopušta izravno procjenjivanje komponenata koje objašnjavaju promjene u veličini (55).

Crvene krvne stanice su obično više ili manje okrugle i imaju glatku konturu. Promjene u obliku crvenih krvnih stanica (poikilocitoza) imaju različite implikacije, ovisno o uočenim specifičnim oblicima. Primjeri abnormalnosti oblika koji upućuju na važan patološki proces uključuju: velike stanice ovalnog oblika (makroovalociti) koje sugeriraju megaloblastični proces (npr. nedostatak vitamina B12 ili folne kiseline), visok postotak eliptičnih stanica (eliptociti) karakterističan je za brojne naslijeđene abnormalnosti crvenih stanica, a fragmentirani eritrociti (shistociti, stanice u obliku kacige, komadići crvenih stanica) upućuju na uništavanje unutar krvožilnih prostora što se može dogoditi u trombotičkoj trombocitopeničnoj purpuri, diseminiranoj intravaskularnoj koagulaciji ili oštećenom protetskom srčanom zalisku (56). Stanice u obliku gljive otkrivene su u seriji od 50 ljudi hospitaliziranih s COVID-19 (57).

Jedini do sada poznati marker nedostatka funkcije slezene, a kojeg možemo otkriti u perifernom razmazu krvi, su Howell-Jollyjeva tjelešca. To su nuklearni ostaci unutar crvenih stanica koje se slezenom obično uklanjaju. Pojedinačne su, okrugle, tamno ljubičasto do crvene boje i perifernog smještaja (58). Nažalost, razmaz periferne krvi nam ne može prikazati moguće kemijske promjene u membrani eritrocita koje bi bile posljedica splenektomije. Takve informacije mogle bi nam koristiti za unaprijeđenje dijagnostike i liječenja eventualnih komplikacija u takvih pacijenata. Upravo radi toga okrećemo se mogućnostima slikovne masene spektrometrije

## HIPOTEZA

### **2. HIPOTEZA**

Hipoteza ove studije je da postupak splenektomije dovodi do metaboličkih promjena koje će se moći uočiti kao biomarkeri eritrocita po kojima bi se na razmazu krvi mogle razlikovati splenektomirane i nesplenektomirane osobe te da splenektomija dovodi do razlike u hematološkim i biokemijskim parametrima u krvi između dvije skupine ispitanika.

## CILJEVI

### 3. CILJEVI

Glavni je cilj ovog istraživanja uočiti razliku u metabolitima eritrocita u ljudi sa slezenom i onih bez slezene. Drugi cilj je izmjeriti hematološke i biokemijske parametre iz krvi eksperimentalne i kontrolne skupine te na temelju njih uočiti moguće razlike između skupina.

### 4. ISPITANICI I METODE

#### 4.1. Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao studija parova. Eksperimentalnu skupinu koju čine osobe podvrgnute splenektomiji uspoređuju se s kontrolnom skupinom koju čine osobe koje imaju slezenu.

#### 4.2. Ispitanici

Eksperimentalnu skupinu čini 5 osoba koje su podvrgnute splenektomiji na Zavodu za abdominalnu kirurgiju u Kliničkom bolničkom centru u Osijeku u razdoblju od 2017. do 2021. godine. Ispitanike smo pronašli uz pomoć podataka u bolničkom informacijskom sustavu (BIS). Osim što su morali biti splenektomirani, kriterij je bio i nepostojanje značajnih komorbiditeta te su stoga odabrane samo one osobe koje su splenektomirane radi traume. Od ukupno 52 osobe koje su bile podvrgnute splenektomiji u navedenom razdoblju, 12 je operaciju obavilo radi traume. Od navedenih 12 osoba, dijelom radi zadanih kriterija, a dijelom radi varijabilnog odaziva, eksperimentalnu skupinu na kraju sačinjava 5 osoba - 2 osobe ženskog spola dobi 56 i 40 godina i 3 osobe muškog spola u dobi od 21, 51 i 34.

Kontrolnu skupinu čini 5 osoba koje odgovaraju po spolu i dobi osobama iz eksperimentalne skupine koji su nam dolazili kao dobrovoljni sudionici studije.

#### 4.3. Metode

Studija je dobila mišljenje da su plan rada i metode istraživanja u skladu s etičkim i znanstvenim standardima od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek i Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Osijek. Također, svaki ispitanik je bio informiran o ciljevima studije te im je uručen informirani pristanak koji su trebali potpisati ukoliko su odlučili pristati na sudjelovanje u istraživanju.

Prethodno venepunkciji ispitanici su bili podvrgnuti kliničkom pregledu hematologa. Nakon kliničkog pregleda pacijentima je izvršena venepunkcija. Za planirane pretrage bilo je potrebno šest EDTA (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*), pet serumskih, jedna citratna i jedna litij-heparin epruveta. Dodatno se uzeo i uzorak krvi za krvnu grupu i za direktni i indirektni antiglobulinski test (DAT/IAT) – sveukupno četrnaest epruveta. Epruvete su se označavale šifrom ispitanika. Jednu epruvetu krvi (za određivanje krvne grupe, DAT i IAT) zaprimio je Zavod za transfuzijsku medicinu, dok je ostale zaprimio Klinički zavod za

## ISPITANICI I METODE

laboratorijsku dijagnostiku radi određivanja: hematoloških parametara - leukociti, eritrociti, hemoglobin, hematokrit, prosječni volume eritrocita (engl. *mean corpuscular volumen*, MCV) prosječna masa hemoglobina (engl. *mean corpuscular hemoglobin*, MCH), prosječna koncentracija hemoglobina (engl. *mean corpuscular hemoglobin concentration*, MCHC), RDW, trombociti, prosječni volumen trombocita (engl. *mean platelet volumen*, MPV), glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6PDH) u eritrocitima, eozinofilni granulociti, bazofilni granulociti, segmentirani granulociti, limfociti, monociti, sedimentacija eritrocita, protrombinsko vrijeme (internacionalni normalizirani omjer [eng. *international normalized ratio*, INR]), aktivnost fibrinogena, trombinsko vrijeme (TV), aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (aPTV), D-dimeri, agregacija trombocita arahidonskom kiselinom. Od biokemijskih pretraga mjerili smo aspartat aminotransferazu (AST), alanin-aminotransferazu (ALT), alkalnu fosfatazu (ALP), gama-glutamilttransferazu (GGT), kolinesterazu, alfa-amilazu, laktat dehidrogenazu, glukozu u krvi (GUK), ureu, kreatinin, urate, ukupni bilirubin, konjugirani bilirubin, nekonjugirani bilirubin, ukupne proteine, albumin, c-reaktivni protein (CRP), natrij, kalij, kloride, ukupni kalcij i magnezij, željezo, nezasićeni kapacitet vezanja željeza (engl. *unsaturated iron binding capacity*, UIBC), ukupni kapacitet vezivanja željeza (engl. *total iron-binding capacity*, TIBC) saturaciju transferina, feritin, eritropoetin, folnu kiselinu i vitamin B12. Nadalje mjerili su se i proteini u serumu: imunoglobulin G, A i M, beta-2-mikroglobulin, haptoglobin, slobodni laki lanci kapa i lambda te kapa/lambda omjer. Također su se protočnom citometrijom mjerili T-limfociti (CD3+), T-pomagački limfociti (CD3+ CD4+), T-citotoksični limfociti (CD3+ CD8+), B-limfociti (CD19+), NK-stanice (CD56+) i omjer pomagačkih i citotoksičnih T-limfocita. Napravila se i elektroforeza proteina iz seruma. Na Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku odrađena je i analiza dva krvna razmaza slikovnom masenom spektrometrijom.

### 4.3.1. Testovi koji su korišteni za laboratorijske pretrage iz krvi

Od testova korišteni su: potenciometrijsko određivanje za natrij, kalij i kloride, spektrofotometrijske metode za ukupni kalcij (uz arsenazo-III-kromogen) i magnezij (uz ksilidil plavilo), enzimska metoda s heksokinazom za GUK, spektrofotometrijska metoda (biuretska reakcija) za ukupne proteine, metoda određivanja uz indikator (bromkrezol-zelenilo) za albumin, enzimsko određivanje oslobođenog amonijaka nakon hidrolize s ureazom za ureu i spektrofotometrijska metoda koja se temelji na prevođenju u hemoglobincijanid za hemoglobin. Glukoza-6-fosfat-dehidrogenazu smo mjerili kinetičkom

## ISPITANICI I METODE

UV metodom, AST, ALT, laktat dehidrogenazu, GGT, ALP i alfa amilazu IFCC (engl. *International Federation of Clinical Chemistry*) metodom na 37°C (optički test), kolinesterazu spektrofotometrijom uz kontinuirano mjerenje uz butiriltiokolin na 37°C, kreatinin enzimskom metodom s optičkim testom, urate spektrofotometrijskom UV metodom s urikazom, cijanokobalamin imunokemijskom metodom, folnu kiselinu imunokemijskom metodom s kloroperbenzoičnom kiselinom (engl. *chloroperbenzoic acid*, CPBA) željezo spektrofotometrijski s ferozinom, UIBC spektrofotometrijskom metodom s nitrozo-PSAP-om, TIBC računski iz UIBC ( $TIBC = Fe + UIBC$ ), zasićenje transferina računski iz TIBC i konc. Fe u serumu, a feritin imunokemijskom metodom s obilježivačima. CRP smo mjerili imunoturbidimetrijom, ukupni i konjugirani bilirubin metodom s diazoreagensom (3,5-diklorfenil-diazonij-tetrafluoroboratom - DPD), a nekonjugirani bilirubin računski iz razlike ukupnog i konjugiranog bilirubina. Kapilarnom elektroforezom smo mjerili ukupne proteine, albumine, alfa 1 globuline, alfa 2 globuline, beta globuline i gamma globuline, a protočnom citometrijom T limfocite CD3+, T pomagačke limfocite CD3+ CD4+, T-citotoksične limfocite CD3+ CD8+, B limfocite CD19+ i NK stanice CD56+ (59). Hematološke parametre (leukociti, eritrociti, hemoglobin, hematokrit, MCV, MCH, RDW-CV, retikulociti, trombociti, MPV) mjereni su metodom impedancije, a MCHC računski. Diferencijalna krvna slika - eozinofili, bazofili, segmentirani granulociti, limfociti, monociti - uz pomoć analizatora te sedminataciju eritrocita putem automatizirane metode direktnog mjerenja agregacije eritrocita (iSED). Koagulacijske parametre (PV INR, trombinsko vrijeme, aPTV, D-dimeri) uz pomoć imunokemijskih metoda. Također smo mjerili agregaciju trombocita uz pomoć arahidonske kiseline. Eritropoetin smo mjerili kemiluminescentnom imunokemijskom metodom. Naposljetku imunoglobulin G, A i M, beta-2-mikroglobulin, haptoglobin, slobodne lake lance kapa i lambda mjerili smo nefelometrijom

### 4.3.2. Priprema krvnih razmaza za MSI analizu

Priprema krvnih razmaza za MSI analizu odrađena je na način da su na jednom ITO stakalcu napravljena po 2 krvna razmaza. Svaki je učinjen od 2  $\mu$ L EDTA krvi te spremljen na - 70°C do analize. Nakon temperiranja od 30 minuta u eksikatoru na sobnoj temperaturi stakalce je uronjeno u 80 % metanol te sušeno na zraku. Krvni razmaz je nakon toga ispran s 1 mL 150 mM amonijeva acetata te potom osušen na zraku. Nakon što se razmaz u potpunosti osušio slijedilo je nanošenje matrice sublimacijom u iMLayer-u koje je trajalo 4 minute na automatskim postavkama za sublimaciju uz 9-aminokridin (9-AA). Rekrystalizacija je

provedena u plastičnom zatvorenom spremniku u kojem je postavljen filter papir natopljen 5 % metanolom na 37°C tijekom 5 minuta. Nakon toga slijedilo je 10-minutno sušenje razmaza u eksikatoru na sobnoj temperaturi nakon kojeg je stakalce bilo spremno za IMS analizu.

Korištene kemikalije i instrumenti: 9-AA (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka), 5 %-tni metanol (MetOH) pripremljen od metanola (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka), amonij acetat, stakalca presvučena indij kositrovim oksidom (ITO; 15 - 25  $\Omega$ /sq) (Sigma-aldrich chemie GmbH, Steinheim, Njemačka), uređaj za nanošenje matrice shimadzu iMLayer (Shimadzu Inc., Kyoto, Japan) te iMScope Trio (Shimadzu Inc., Kyoto, Japan).

#### 4.4. Statističke metode

Za usporedbu laboratorijskih pretraga iz krvi dviju nezavisnih skupina korišten je t-test kojim smo uspoređivali aritmetičke sredine mjerenih karakteristika svake grupe. Uvjeti koji nam dozvoljavaju da koristimo t-test su zadovoljeni (nezavisnost grupa, ne postoje statistički značajni ekstremni slučajevi, normalnost koju smo testirali P-P dijagramima, Shapiro-Wilk testom i Kolmogorov-Smirnov testom te homogenost varijanci što smo testirali Levenovim testom). Prilikom obrade uzeta je razina rizika od 5 %. Za obradu podataka korišten je računalni program za statističku obradu IBM SPSS (inačica verzija 24.0, SPSS Inc., Chicago, IL, SAD) (60).

Za analizu dva krvna razmaza koristio se Studentov t-test primjenom računalnog programa IMAGEREVEAL verzija 1.1. proizvođača Shimadzu Inc. (Kyoto, Japan)



## REZULTATI

### 5. REZULTATI

#### 5.1. Rezultati usporedbe laboratorijskih parametara

Splenektomirane osobe, prema našem istraživanju, u prosjeku pokazuju višu razinu leukocita, glukoze, slobodnih lakih lanaca kapa i lambda te beta globulina od osoba koje imaju slezenu (Tablica 1.)

**Tablica 1: Statističke vrijednosti laboratorijskih testova mjerenih iz uzoraka krvi**

Mjerena karakteristika	Kontrolna skupina		Eksperimetnalna skupina		$p^*$	IP*
	M*	SD*	M	SD		
Leukociti ( $\times 10^9/L$ )	6.42	1.97	9.06	1.00	0.028	- 4.92, - 0.36
Eritrociti ( $\times 10^{12}/L$ )	4.94	0.36	4.79	0.53	0.602	- 0.51, 0.82
Hemoglobin (g/L)	144.60	14.05	112.09	63.43	0.296	- 34.50, 99.51
Hematokrit (L/L)	0.43	0.04	0.43	0.04	0.882	- 0.06, 0.05
Prosječni volumen eritrocita – MCV (fL)	86.22	5.26	90.10	3.05	0.192	- 10.15, 2.39
Prosječna masa hemoglobina – MCH (pg)	29.22	1.62	29.52	0.83	0.721	- 2.17, 1.57
Prosječna koncentracija hemoglobina – MCHC (g/L)	339.2	6.72	327.80	10.09	0.069	- 1.09, 23.90
Raspon raspodjele crvenih stanica- RDW (%)	12.82	0.95	13.72	0.54	0.103	- 2.03, 0.23
Trombociti ( $\times 10^9/L$ )	264.20	38.19	398.60	190.15	0.160	- 334.41, 65.61
Prosječni volumen trombocita – MPV (fL)	10.58	0.56	8.80	4.57	0.413	- 2.97, 6.53

## REZULTATI

Mjerena karakteristika	Kontrolna skupina		Eksperimetnalna skupina		<i>P</i>	IP
	M	SD	M	SD		
Glukoza 6 fosfat dehidrogenaza u eritrocitima (U/10 <sup>12</sup> E)	231.20	17.95	246.80	23.44	0.271	- 46.04, 14.84
Eozinofilni granulociti (%)	3.80	2.05	2.60	1.82	0.356	- 1.624, 4.02
Bazofilni granulociti (%)	0.60	0.55	0.80	0.45	0.545	- 0.929, 529
Segmentirani granulociti (%)	53.00	2.74	50.20	5.45	0.335	- 3.49, 9.09
Limfociti (%)	33.40	3.85	36.00	5.24	0.397	- 9.31, 4.11
Monociti (%)	9.20	1.92	9.20	2.78	> 0.99	- 3.48, 3.48
Sedimentacija eritrocita (mm/3.6 KS)	6.20	4.44	15.40	12.58	0.162	- 22.96, 4.56
Protrombinsko vrijeme – INR (omjer)	0.93	0.07	0.91	0.07	0.591	- 0.08, 0.13
Fibrinogen-aktivnost (g/L)	3.42	0.81	3.76	1.06	0.584	- 1.71, 1.03
Trombinsko vrijeme – TV (s)	17.94	1.70	17.16	0.83	0.384	- 1.17, 2.73
Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme – aPTV (omjer)	0.88	0.06	0.85	0.08	0.450	- 0.06, 0.13

REZULTATI

Mjerena karakteristika	Kontrolna skupina		Eksperimetnalna skupina		<i>P</i>	IP
	M	SD	M	SD		
D-dimeri (µg/L FEU)	388.80	229.11	941.80	1368.33	0.399	- 1983.77, 877.76
Agregacija trombocita arahidonskom kiselinom (U)	104.60	31.56	121.00	31.99	0.466	- 66.76, 33.96
Aspartat amino transferaza (U/L)	24.00	6.67	24.20	9.04	0.969	- 11.79, 11.39
Alanin amino transferaza (U/L)	27.60	9.42	21.40	12.44	0.400	-9.90, 22.30
Alkalna fosfataza (U/L)	67.20	18.14	100.60	63.31	0.290	- 101.32, 34.52
Gama glutamil transferaza (U/L)	21.00	7.00	165.20	315.30	0.337	- 469.45, 181.05
Kolinesteraza (U/L)	7055.00	2127.40	8430.00	1169.15	0.241	- 3878.422, 1128.42
Alfa Amilaza (U/L)	65.00	20.68	65.60	6.19	0.952	-22.86, 21.66
Laktat dehidrogenaza (U/L)	174.20	29.16	186.20	14.04	0.431	-45.38, 21.38
Glukoza (mmol/L)	4.42	0.16	5.10	0.42	0.010	- 1.14, - 0.22
Urea (mmol/L)	4.68	0.78	4.88	1.06	0.743	-1.56, 1.16
Kreatinin (µmol/L)	75.20	13.14	57.08	29.68	0.247	- 15.36, 51.60
Urati (µmol/L)	300.40	87.78	306.40	100.98	0.923	- 143.98, 131.98
Ukupni bilirubin (µmol/L)	11.80	6.06	10.60	2.88	0.700	- 5.72, 8.12
Konjugirani bilirubin (µmol/L)	1.80	1.10	1.40	0.55	0.486	- 0.863, 1.66
Nekonjugirani bilirubin (µmol/L)	10.20	4.82	9.40	2.51	0.750	- 4.80, 6.40

REZULTATI

Mjerena karakteristika	Kontrolna skupina		Eksperimetnalna skupina		<i>P</i>	IP
	M	SD	M	SD		
Ukupni proteini (g/L)	67.34	2.24	70.38	4.57	0.219	- 8.29, 2.21
Albumini (g/L)	42.02	1.87	42.88	1.10	0.401	- 3.10, 1.38
C-reaktivni protein (mg/L)	1.40	1.36	4.22	3.16	0.104	- 6.37, 0.73
Natrij (mmol/L)	137.20	3.70	137.60	2.88	0.854	- 5.24, 4.44
Kalij (mmol/L)	4.26	0.48	4.44	0.15	0.445	- 0.70, 0.34
Kloridi (mmol/L)	103.40	2.30	103.00	1.23	0.740	- 2.29, 3.09
Ukupni kalcij (mmol/L)	2.36	0.12	2.40	0.04	0.534	- 0.16, 0.09
Ukupni magnezij (mmol/L)	0.79	0.08	0.80	0.07	0.706	- 0.12, 0.09
Željezo (μmol/L)	12.16	6.24	15.48	6.19	0.423	- 12.39, 5.75
Nezasićeni kapacitet vezanja željeza – UIBC (μmol/L)	48.64	16.48	40.10	4.10	0.293	- 8.97, 26.05
Ukupni kapacitet vezivanja željeza – TIBC (μmol/L)	60.80	12.95	55.58	4.68	0.421	-8.98, 19.42
Saturacija transferina (%)	21.60	14.38	27.40	9.45	0.473	- 23.55, 11.95
Feritin (μg/L)	96.20	134.62	198.80	209.91	0.384	- 359.77, 154.57
Eritropoetin (IU/L)	10.37	2.91	6.55	2.95	0.073	- 0.45, 8.09
Folna kiselina (nmol/L)	14.94	6.56	14.74	2.15	0.950	- 6.92, 7.32
Vitamin B12 (pmol/L)	234.80	48.93	326.20	112.61	0.135	- 218.02, 35.22

## REZULTATI

Mjerena karakteristika	Kontrolna skupina		Eksperimetalna skupina		P	IP
	M	SD	M	SD		
Imunoglobulin G (g/L)	9.17	1.49	10.80	1.62	0.136	- 3.91, 0.64
Imunoglobulin A (g/L)	1.61	0.75	2.41	0.23	0.052	- 1.61, 0.01
Imunoglobulin M (g/L)	0.86	0.88	1.27	1.98	0.689	- 2.63, 1.83
Beta-2 mikroglobulin (mg/L)	1.58	0.15	1.62	0.25	0.776	- 0.34, 0.26
Haptoglobin (g/L)	1.47	0.34	1.60	0.47	0.636	- 0.73, 0.47
Slobodni laki lanci kapa (mg/L)	10.28	5.28	18.82	4.65	0.026	- 15.79, - 1.29
Slobodni laki lanci lambda (mg/L)	10.52	6.29	20.54	4.57	0.020	- 18.05, - 2.00
Kapa lambda omjer	1.08	0.34	0.93	0.22	0.422	- 0.27, 0.57
T limfociti CD3+ (%)	70.20	22.31	68.20	5.36	0.850	- 21.66, 25.66
T pomagački limfociti CD3+ CD4+ (%)	46.60	4.28	41.80	7.86	0.264	- 4.42, 14.02
T citotoksični limfociti CD3+ CD8+ (%)	28.40	5.08	24.00	10.84	0.435	- 7.95, 16.75
B limfociti CD19+ (%)	8.40	4.28	16.20	7.79	0.085	- 16.97, 1.37
NK stanice CD56+ (%)	12.20	6.38	13.00	5.24	0.834	- 9.32, 7.72
Omjer pomagačkih i citotoksičnih limfocita	1.70	0.44	2.10	1.04	0.449	-1.56, 0.76

## REZULTATI

Mjerena karakteristika	Kontrolna skupina		Eksperimetalna skupina		<i>P</i>	IP
	M	SD	M	SD		
Ukupni proteini (g/L)	67.34	2.24	70.38	4.57	0.219	-8.29, 2.21
Albumini (%)	63.06	3.52	59.60	3.01	0.134	-1.32, 8.24
Alfa 1 globulini (%)	3.88	0.59	4.00	0.53	0.744	- 0.94, 0.70
Alfa 2 globulin (%)	10.52	1.32	10.82	1.65	0.760	- 2.48, 1.88
Beta globulini (%)	10.60	1.28	11.64	0.55	0.134	- 2.48, 0.40
Gamma globulini (%)	11.94	1.81	13.98	2.66	0.194	-5.36, 1.28
Albumin (g/L)	42.46	2.73	41.85	1.33	0.664	- 2.52, 3.74
Alfa 1 globulini (g/L)	2.61	0.40	2.82	0.45	0.450	- 0.83, 0.41
Alfa 2 globulini (g/L)	7.08	0.89	7.63	1.52	0.504	- 2.37, 1.27
Beta globulini (g/L)	7.13	0.80	8.18	0.39	<b>0.030</b>	- 1.97, - 0.13
Gamma globulini (g/L)	8.06	1.36	9.90	2.39	0.173	- 4.68, 0.99
Omjer Albumini/globulini	1.73	0.26	1.48	0.18	0.130	- 0.09, 0.58

\*M-aritmetička sredina, SD-standardna devijacija, *p*-značajnosti, IP-interval pouzdanosti

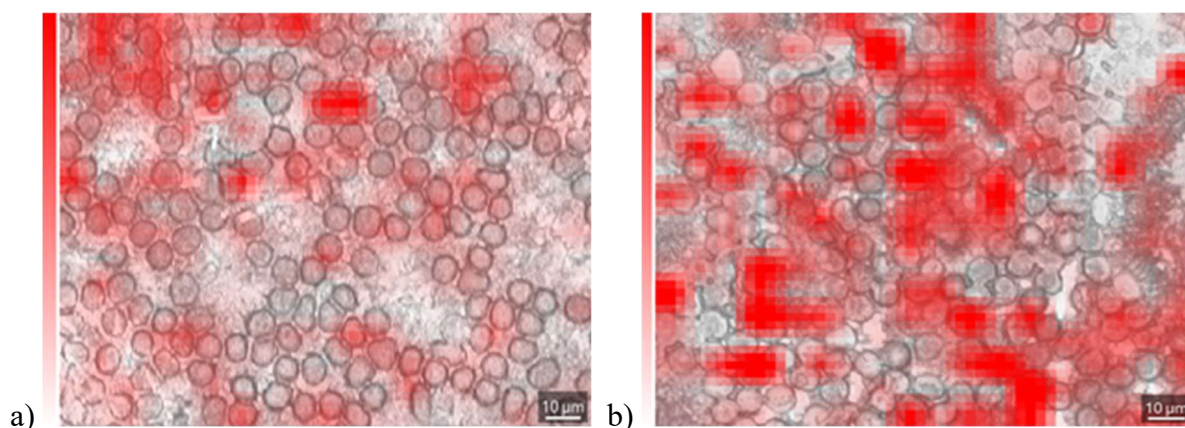
Iako je statističkom obradom dobiveno da u većini parametara nema statistički značajne razlike između eksperimentalne i kontrolne skupine, kako se ovdje radi o malom uzorku, postoji šansa da se neke razlike nisu pokazale statistički značajne, kao za primjerice imunoglobulin A i eritropoetin, samo zbog veličine uzorka.

## REZULTATI

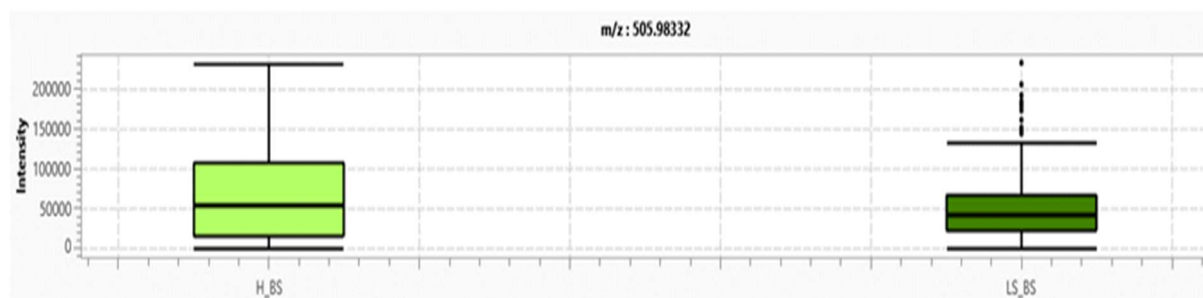
### 5.2. Rezultati MSI analize krvnih razmaza

Prilikom MSI analize usporedili smo intenzitet signala molekule adenozin trifosfata (ATP) i hema iz krvnih razmaza splenektomirane osobe i ispitanika iz kontrolne skupine.

Naši rezultati pokazali su statistički značajnu razliku u količina signala molekule ATP-a između uzoraka ispitanika sa slezenom i ispitanika bez slezene ( $p < 0.001$ ) (slike 1. i 2.)



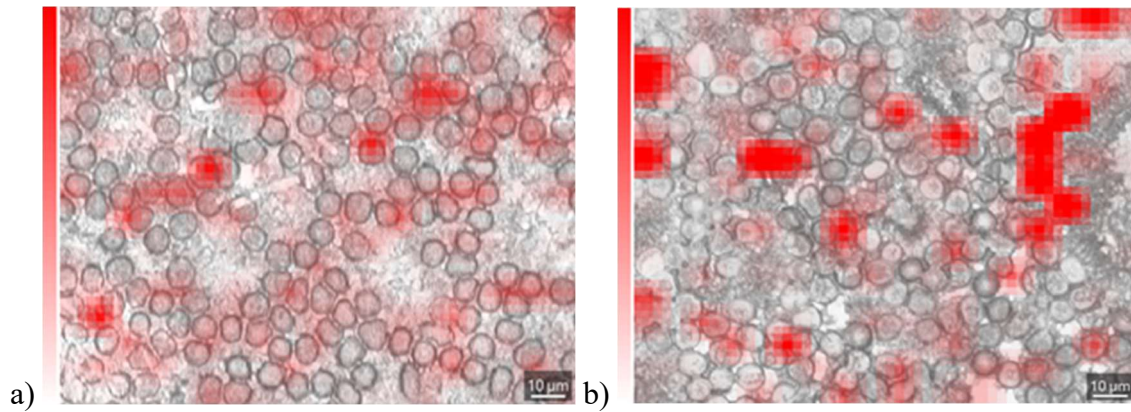
**Slika 1.** Slikovni prikaz MSI analize zbroja signala ATP u krvnom razmazu a) ispitanika bez slezene i b) ispitanika sa slezenom.



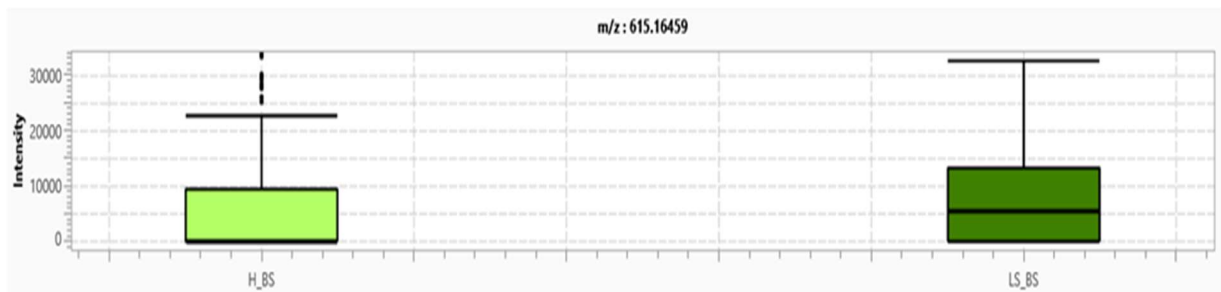
**Slika 2.** Kutijasti dijagram intenziteta signala ATP-a u ispitanika sa slezenom (HBS) i ispitanika bez slezene (LSBS). Uzorak HBS pokazuje intenzitet signala s vrijednošću aritmetičke sredine  $M = 50038.697$  ( $SD = 78273.667$ ) dok je za LSBS  $SD = 39714.947$ .

Tijekom MSI analize dobili smo i jači intenzitet signala molekule hema u krvnom razmazu ispitanika sa slezenom koji nije potvrđen statistički značajnom razlikom ( $p = 0.055$ ) (Slike 3. i 4.). Jači intenzitet mogao bi biti posljedica nejednolikog nanošenja matrice, obzirom da su molekule hema uvelike ovisne o matrici kada govorimo o ionizaciji, što nije slučaj za molekule ATP-a.

## REZULTATI



**Slika 3.** Slikovni prikaz MSI analize zbroja signala hema u krvnom razmazu a) ispitanika bez slezene i b) ispitanika sa slezenom.



**Slika 4.** Kutijasti dijagram intenziteta signala hema u ispitanika sa slezenom (HBS) i ispitanika bez slezene (LSBS). HBS ispitanik pokazuje  $SD = 22411.942$ . Dok LSBS pokazuje  $M = 9030.255$  ( $SD = 10451.824$ ).



## 6. RASPRAVA

### 6.1. Laboratorijske pretrage iz krvi

Slezena je važan organ za održavanje odgovarajućih imunoloških i hematoloških odgovora. Međutim, mnoge njene funkcije ostaju nejasne, uglavnom zbog činjenice da, za razliku od vitalnih organa kao što su jetra ili bubrezi, uklanjanje slezene obično kratkoročno ne ugrožava preživljavanje. Osim toga, splenektomija postaje sve rjeđa, a time i proučavanje njezinog ishoda postaje sve teže

Obzirom da slezena igra važnu ulogu sekundarnog limfoidnog organa, za očekivati je da splenektomija dovodi do oscilacija cirkulirajućih bijelih krvnih stanica. U istraživanju Rab i sur. iz 2017. mjerili su razinu imunoloških parametara i trombocita u 47 pacijenata koji su podvrgnuti splenektomiji radi traume (61). Medijan eozinofila, bazofila, neutrofila, limfocita i monocita bio je povišen u usporedbi s normalnom populacijom. Također, njihovi rezultati pokazali su povećanu razinu svih vrsta T limfocita dok su serumske razine IgM bile snižene u usporedbi s normalnom populacijom. Za razliku od IgM protutijela, protutijela IgG i IgA klase bila su povišena. Naši rezultati nisu pokazali značajnu razliku između dvije skupine ispitanika u navedenim parametrima, ali jesu u razini ukupnih leukocita. Povećana razina leukocita mogla bi se objasniti činjenicom da je slezena organ koji u sebi nakuplja veliku količinu krvnih stanica te je u nedostatku tog organa veća količina krvnih stanica prisutna na periferiji. Dodatno možemo komentirati da tek mali udio limfocita cirkulira u perifernoj krvi dok je većina smještena u limfoidnim organima. Poznato je da se 15 % ukupnih limfocita zadržava u slezeni (62). Istraživanje Juneja i sur. navodi da se povećane razine limfocita mogu pronaći i 50 mjeseci kasnije (63). Iako se u našim rezultatima razlika razina limfocita nije pokazala značajnom, razine limfocita su ipak nešto više u eksperimentalnoj skupini od kontrolne. Ovaj podatak bi mogao dati pojašnjene za značajnu razliku ukupnih leukocita s većom razinom u eksperimentalnoj skupini spram kontrolne.

Slični nalazi u vezi povišenih IgA i IgG objavljeni su i u ranijem istraživanju iz 1978. od Chaimof i sur. (64). U našoj studiji, razine imunoglobulina G i A bile su nešto više u eksperimentalnoj skupini nego u kontrolnoj, ali bez statistički značajne razlike. Razine IgM su se također pokazale povećanima u eksperimentalnoj skupini spram kontrolne što odskaače od dosadašnjih istraživanja. (65)

Značajna razlika pokazala se i u razini FLC kapa i lambda. Plazma stanice stvaraju višak lakih lanaca koji se ne vežu za teške lance, tvoreći tako potpunu molekulu imunoglobulina,

već umjesto toga ulaze u krvotok kao slobodni laki lanci (66). Iako se razlika u količini B limfocita nije pokazala kao značajna, razine u eksperimentalnoj skupini bile su ipak nešto više nego u kontrolnoj. Povećane razine B limfocita bi mogle objasniti i povećanu razinu imunoglobulina te FLC.

Broj studija koje su istraživale razinu trombocita nakon duljeg vremena od operacije je malen. S druge strane, trombocitoza nedugo nakon splenektomije je pojava koja je dobro poznata (67, 68). Primjerice jedna studija je pokazala da 75 % pojedinaca razvija trombocitozu nakon splenektomije (69). Izvijesteno je da se broj trombocita nakon splenektomije povećava za 30 % do 100 %, a vrhunac doseže 7 do 20 dana nakon operacije (70). Već spomenuto istraživanje Rab i sur. pokazalo je u rezultatima perzistirajuću povećanu razinu trombocita u splenektomiranih pacijenata. U našem istraživanju nije potvrđena statistički značajna razlika, ali u prosjeku, eksperimentalna skupina ipak pokazuje nešto više razine trombocita od kontrolne.

U istraživanju Perl i sur. iz 2011. predlažu da je oslabljena kontrola eozinofilnog odgovora dugotrajni učinak splenektomije što postaje očitim u kontekstu akutnog stresa. Istraživanje je provedeno na 29 osoba koje su podvrgnute splenektomiji. Rezultati krvne slike otkrili su učestalost pojave povišenih eozinofila od 14.6 % u usporedbi sa stanjem prije splenektomije kada je povećana razina pronađena u samo 2% ispitanika. Nadalje, vrijednosti eozinofila koje prelaze 1.000/mm<sup>3</sup> (maksimalno, 3.070/mm<sup>3</sup>) pronađene su u 8 pacijenata nakon splenektomije, ali niti u jednom nalazu tih pacijenata prije splenektomije ili u skupini kontrola (71). Naši rezultati nisu potvrdili rezultate navedenog istraživanja. Ispitanici iz eksperimentalne skupine pokazuju nešto nižu razinu eozinofilnih granulocita od kontrolne, ali bez statistički značajne razlike.

Naši rezultati su također pokazali statistički značajnu razliku u razini beta globulina dobivenih elektroforezom serumskih proteina. Beta frakcija ima dva vrha označena kao  $\beta 1$  i  $\beta 2$ .  $\beta 1$  se uglavnom sastoji od transferina, a  $\beta 2$  sadrži beta-lipoproteine. IgA, IgM, a ponekad i IgG, zajedno s proteinima komplementa, također se mogu identificirati u beta frakciji (72). Ovaj podatak se podudara s rezultatom malo viših razina imunoglobulina u eksperimentalnoj skupini.

Sve više dokazi upućuju na to da slezena sadrži matične stanice koje djeluju kao prekursori stanica gušterače koje proizvode inzulin. Nekoliko studija pokazuje da podudarni donorski splenociti izravno doprinose regeneraciji otočića gušterače i obnavljaju glikemijsku

kontrolu u miševa s dijabetesom (17, 18). Postoji još istraživanja u kojima životinjski modeli šećerne bolesti također ukazuju na međusobnu vezu između slezene i endokrine funkcije gušterače (73), ali su studije koje uključuju čovjeka još uvijek malobrojne. U studiji Ley i sur. iz 2012. izvukli su podatke o razini glukoze u krvi nakon 5 godina od splenektomije u 9 pacijenata koji su podvrgnuti toj operaciji radi traume. Kao kontrolnu grupu izabrali su pacijente koji su prošli kroz laparotomiju i rekonstrukciju crijeva radi traume čiji su podatci o razini glukoze u krvi također bili nakon 5 godina od operacije (16). Njihovi rezultati pokazali su višu srednju razinu glukoze u pacijenata sa splenektomijom u usporedbi s pacijentima koji su prošli kroz operaciju rekonstrukcije crijeva. Četiri od devet pacijenata u eksperimentalnoj skupini su imali posljednju zabilježenu razinu glukoze u krvi veću od 130 mg/dL, dok nijedan pacijent iz kontrolne skupine nije imao veću razinu glukoze u krvi od 130 mg/dL. Jedan je pacijent imao novu utvrđenu dijagnozu DM u grupi splenektomija u usporedbi s nijednim u kontrolnoj skupini. Naši rezultati podržavaju povezanost između splenektomije i povišene srednje razine glukoze u krvi. Iako postoji nekoliko mogućih objašnjenja, potrebne su buduće studije s većim brojem pacijenata i preciznijim praćenjem glikemije. Ako se potvrdi, učinak splenektomije na metabolizam glukoze može imati značajne implikacije u razmatranju splenektomije kao izbora liječenja, kao i na potrebu za dugotrajnim praćenje DM u bolesnika koji su prošli tu operaciju.

## 6.2. MSI analiza krvnih razmaza

Analiza krvnih razmaza putem slikovne masene spektrometrije je metoda u nastajanju čija procedura nije još u potpunosti optimizirana. U istraživanju Debaljak i sur. (28) uspjeli su razviti prikladnu proceduru pripreme uzoraka i instrumentalnih postavki za MALDI TOF MSI, ali se pri analizi još uvijek javljaju manji problemi poput nejednolikog nanošenja matrice zbog čega tijekom snimanja uzoraka signali traženih molekula pojačano dolaze sa lokalizacija na kojima je matrica gušća, a ne radi toga što je prisutnost iste molekule veća. Takav problem pojavio se i tijekom analize naših uzoraka (slika 3.).

Naši rezultati MSI analize uzorka splenektomirane osobe i zdrave kontrole pokazuju statistički značajnu razliku u intenzitetu signala ATP-a. Eritrociti stvaraju ATP razgradnjom glukoze anaerobnim putem u kojem piruvat ostaje unutar citoplazme i pretvara se u laktat. Ovim se putem dobivaju dvije molekule ATP-a po reakciji (74). Adenozin-trifosfat predstavlja prototip energijom bogatih spojeva te sudjeluje u brojnim biokemijskim

reakcijama kao prenosilac energije. Razlog tome je što se prilikom hidrolize fosfatnih anhidridnih veza oslobađaju velike količine energije (75). Eritrocitima je ATP potreban za održavanje strukture membrana, fosforilaciju glukoze, za funkcije kationskih pumpa te sintezu glutationa što bi značilo da su sve ove zadaće pri nedostatku ATP-a u splenektomiranih pacijenata ugrožene (76). Drugim riječima, eritrociti takvih osoba nisu u potpunosti funkcionalni

Utvrđeno je da nekoliko stresnih čimbenika, poput hipoksije i mehaničke traume, dovodi do otpuštanja ATP-a iz eritrocita (77). U istraživanju Sprague i sur. dokazali su da deformacija eritrocitne membrane dovodi do otpuštanja ATP-a (78). Otpuštanje ATP-a kao posljedicu deformacije eritrocitne membrane dokazali su u još nekoliko istraživanja (79, 80). Ovaj mehanizam služi za regulaciju vaskularnog otpora jer je ATP snažan signal za sintezu endotelnog dušikovog oksida. Jedna od hipoteza je da se oslobađanje ATP-a izazvano deformacijama membrane događa na način da defekti mreže spektrina izlažu molekule aktina transmembranskim proteinima koji se potom aktiviraju i naknadno pokreću oslobađanje ATP-a (81). S druge strane, istraživanja poput onoga Sikore i sur. sugeriraju da je jedino hemoliza eritrocita izvor takvog otpuštanja ATP-a (82).

Eritrociti posjeduju sposobnost prilagođavanja oblikom prolazeći kroz krvne žile. Patološki čimbenici, poput nedostatka slezene, omogućavaju zadržavanje slabo savitljivih eritrocita koji bi mogli pridonjeti još većem otpuštanju ATP-a te posljedično njegovom trošenju. Dodatno, promjene u metaboličkom statusu starih eritrocita i smanjenje razine staničnog ATP-a izazivaju promjene oblika eritrocita i mijenjaju fluktuacije membrane. Fluktuacije membrane izravno su povezane s vezanjem membranskog dvosloja na mrežu spektrina koju aktivno kontrolira ATP (83).

Snižena razina ATP-a u splenektomiranih pacijenata bi mogla imati poguban učinak na regulaciju vaskularnog otpora i povećanu incidenciju stanja čiji je glavni patofiziološki mehanizam povećani vaskularni otpor te nedostatno opskrbljivanje perifernih tkiva kisikom i glukozom. Velika nacionalna kohortna studija sprovedena na tajvanskoj populaciji Jiun-Nong Lin i sur. dokazala je da su ozljeda slezene i splenektomija značajno povezane s povećanim rizikom od hemoragijskog i ishemijskog moždanog udara (84). Danska kohortna studija provedena u razdoblju od 1996. do 2012. Rørholt i sur. dokazala je veći rizik od infarkta miokarda, plućne hipertenzije i moždanog udara u splenektomiranih osoba spram opće populacije (85). Iako se ovakve komplikacije povezuju s povećanom pojavnosću tromboze i

## RASPRAVA

tromboembolije u splenektomiranih pacijenata, snižena proizvodnja ATP-a i regulacija vaskularnog otpora zasigurno pridonose ovim lošim ishodima.

Obzirom da su ovo samo preliminarni rezultati dobiveni od malog broja uzoraka, još uvijek ne možemo govoriti o sigurnom dokazu da pacijenti koji su bili podvrgnuti splenektomiji u svojim eritrocitima sadrže nižu količinu molekula ATP-a. Daljnje usavršavanje metodologije je potrebno kako bi se mogla provesti istraživanja sa većim brojem uzoraka i rezultatima koji bi mogli potvrditi ovu hipotezu.

## ZAKLJUČAK

### 7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Splenektomija dovodi do oscilacija u koncentraciji imunoloških parametara mjenjenih iz periferne krvi
- Splenektomija kao moguću posljedicu ima povišenu razinu glukoze u krvi
- Splenektomija kao moguću posljedicu ima sniženu razinu ATP-a u eritrocitima

### 8. SAŽETAK

**CILJEVI ISTRAŽIVANJA:** Glavni je cilj ovog istraživanja otkriti razliku metabolita eritrocita u ljudi sa slezenom i onih bez slezene putem slikovne masene spektrometrije. Drugi cilj je izmjeriti hematološke i biokemijske parametre iz krvi jedne i druge skupine te na temelju njih uočiti moguće razlike.

**NACRT STUDIJE:** Istraživanje je provedeno kao studija parova.

**ISPITANICI I METODE:** Eksperimentalnu skupinu sačinjava 5 osoba koje su bile podvrgnute splenektomiji dok kontrolnu skupinu čini 5 osoba koje odgovaraju po spolu i dobi osobama iz eksperimentalne grupe. Ispitanicima su izmjereni hematološki i biokemijski parametri iz krvi radi uočavanja značajne razlike između grupa te je od njihovih uzoraka napravljen krvni razmaz kojega smo analizirali MALDI TOF uređajem. Za usporedbu laboratorijskih pretraga iz krvi dviju nezavisnih grupa korišten je t-test. Prilikom obrade uzeta je razina rizika od 5 %. Za obradu podataka korišten je računalni program za statističku obradu IBM SPSS (inačica verzija 24.0, SPSS Inc., Chicago) te ImageReveal (Shimadzu, Kyoto, Japan).

**REZULTATI:** Prema rezultatima laboratorijskih pretraga iz krvi, splenektomirane osobe, prema našem istraživanju, u prosjeku pokazuju višu razinu leukocita, glukoze, slobodnih lakih lanaca kapa i lambda te beta globulina od osoba koje imaju slezenu. MSI analiza krvnih razmaza pokazuje višu razinu ATP-a u zdravih kontrola.

**ZAKLJUČAK:** Splenektomija dovodi do oscilacije koncentracija imunoloških parametara mjerenih iz krvi. Splenektomija bi mogla kao posljedicu imati povećane razine glukoze u krvi. Eritrociti splenektomiranih osoba bi mogli imati nižu razinu ATP-a.

**KLJUČNE RIJEČI:** ATP; eritrociti; krvne pretrage; slezena; slikovna masena spektrometrija; splenektomija

## SUMMARY

### 9. SUMMARY

#### **Erythrocyte markers of splenectomy**

**OBJECTIVES:** The main goal of the research was to discover the differences in the red blood cells metabolites in people with a spleen versus people without the spleen via imaging mass spectrometry. Other goals were to measure and differentiate the bloods hematological and biochemical parameters in both groups.

**STUDY DESIGN:** Research was conducted as match pair study.

**SUBJECTS AND METHODS:** Experimental group consisted of 5 people who had splenectomy and control group consisted of 5 people who matched the experimental group by age and sex. Blood hematological and biochemical parameters were measured for differentiation and blood smears were analyzed by MALDI TOF device. To compare laboratory tests in both groups t-test was used. A risk level of 5 % was calculated during the tests. For statistical analysis and data processing computer programs IBM SPSS (version 24.0, SPSS Inc., Chicago) and ImageReveal (Shimadzu, Kyoto, Japan) were used.

**RESULTS:** According to laboratory tests of blood samples in conducted research people who had had splenectomy show higher levels of leucocytes, glucose, free kapa and lambda chains and beta globulins compared to people who had not been splenectomised. MSI analysis of blood smears shows higher levels of ATP in healthy individuals.

**CONCLUSION:** Splenectomy does affect oscillation of immunological parameters concentrations measured from blood samples. As a result of splenectomy there is a possibility for higher blood glucose levels and lower erythrocytes ATP levels.

**KEY WORDS:** ATP; blood tests; erythrocytes; imaging mass spectrometry; spleen; splenectomy



**10. LITERATURA**

1. V. HA, P.A.H. M. Hoffbrand's essential haematology. West Sussex, Chichester: John Wiley & sons; 2016. 356 p.
2. Cesta MF. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol Pathol.* 2006;34(5):455-65.
3. Chow KU, Luxembourg B, Seifried E, Bonig H. Spleen Size Is Significantly Influenced by Body Height and Sex: Establishment of Normal Values for Spleen Size at US with a Cohort of 1200 Healthy Individuals. *Radiology.* 2016;279(1):306-13.
4. L.C.U. J, J. C, R.O. K. Basic Histology. Stamford, Conn: Appleton & Lange; 1998.
5. Crane GM, Liu YC, Chadburn A. Spleen: Development, anatomy and reactive lymphoid proliferations. *Semin Diagn Pathol.* 2021;38(2):112-24.
6. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(8):606-16.
7. Deplaine G, Safeukui I, Jeddi F, Lacoste F, Brousse V, Perrot S, et al. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. *Blood.* 2011;117(8):e88-95.
8. Verlinden T, van Dijk P, Hikspoors J, Herrler A, Lamers W, Koehler S. Innervation of the human spleen: A complete hilum-embedding approach. *Brain, Behavior, and Immunity.* 2018;77.
9. Nance DM, Sanders VM. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain Behav Immun.* 2007;21(6):736-45.
10. Cadili A, de Gara C. Complications of splenectomy. *Am J Med.* 2008;121(5):371-5.
11. Rowley DA. The formation of circulating antibody in the splenectomized human being following intravenous injection of heterologous erythrocytes. *J Immunol.* 1950;65(5):515-21.
12. Cullingford GL, Watkins DN, Watts AD, Mallon DF. Severe late postsplenectomy infection. *Br J Surg.* 1991;78(6):716-21.
13. Stamou KM, Toutouzas KG, Kekis PB, Nakos S, Gafou A, Manouras A, et al. Prospective study of the incidence and risk factors of postsplenectomy thrombosis of the portal, mesenteric, and splenic veins. *Arch Surg.* 2006;141(7):663-9.
14. Winslow ER, Brunt LM, Drebin JA, Soper NJ, Klingensmith ME. Portal vein thrombosis after splenectomy. *Am J Surg.* 2002;184(6):631-5; discussion 5-6.

## LITERATURA

15. Fujita F, Lyass S, Otsuka K, Giordano L, Rosenbaum DL, Khalili TM, et al. Portal vein thrombosis following splenectomy: identification of risk factors. *Am Surg*. 2003;69(11):951-6.
16. Ley EJ, Singer MB, Clond MA, Johnson T, Bukur M, Chung R, et al. Long-term effect of trauma splenectomy on blood glucose. *J Surg Res*. 2012;177(1):152-6.
17. Ryu S, Kodama S, Ryu K, Schoenfeld DA, Faustman DL. Reversal of established autoimmune diabetes by restoration of endogenous beta cell function. *J Clin Invest*. 2001;108(1):63-72.
18. Kodama S, Kühtreiber W, Fujimura S, Dale EA, Faustman DL. Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. *Science*. 2003;302(5648):1223-7.
19. Toutouzas KG, Velmahos GC, Kaminski A, Chan L, Demetriades D. Leukocytosis after posttraumatic splenectomy: a physiologic event or sign of sepsis? *Arch Surg*. 2002;137(8):924-8; discussion 8-9.
20. Weng J, Brown CV, Rhee P, Salim A, Chan L, Demetriades D, et al. White blood cell and platelet counts can be used to differentiate between infection and the normal response after splenectomy for trauma: prospective validation. *J Trauma*. 2005;59(5):1076-80.
21. Banerjee A, Kelly KB, Zhou HY, Dixon SD, Papan Dagiasis A, Quinn LM, et al. Diagnosis of infection after splenectomy for trauma should be based on lack of platelets rather than white blood cell count. *Surg Infect (Larchmt)*. 2014;15(3):221-6.
22. D. A. Lipidomics-methods and protocols. New York, USA: Humana Press; 2009.
23. Wymann MP, Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(2):162-76.
24. Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K. Role of lysophosphatidylcholine (LPC) in atherosclerosis. *Curr Med Chem*. 2007;14(30):3209-20.
25. Fuchs B, Schiller J, Wagner U, Häntzschel H, Arnold K. The phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratio in human plasma is an indicator of the severity of rheumatoid arthritis: investigations by <sup>31</sup>P NMR and MALDI-TOF MS. *Clin Biochem*. 2005;38(10):925-33.
26. R.K. M, D.A. B, K.M. B, P.J. K, V.W. R, W.P. A. Harperova Ilustrirana biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
27. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Jr., Murphy RC, et al. A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res*. 2005;46(5):839-61.

## LITERATURA

28. Debeljak Ž, Niehoff A-C, 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(2):585.
29. Vahedi A, Bigdelou P, Farnoud AM. Quantitative analysis of red blood cell membrane phospholipids and modulation of cell-macrophage interactions using cyclodextrins. *Sci Rep.* 2020;10(1):15111.
30. Tang HY, Wang CH, Ho HY, Wu PT, Hung CL, Huang CY, et al. Lipidomics reveals accumulation of the oxidized cholesterol in erythrocytes of heart failure patients. *Redox Biol.* 2018;14:499-508.
31. Stegemann C, Pechlaner R, Willeit P, Langley SR, Mangino M, Mayr U, et al. Lipidomics profiling and risk of cardiovascular disease in the prospective population-based Bruneck study. *Circulation.* 2014;129(18):1821-31.
32. Shearer GC, Pottala JV, Spertus JA, Harris WS. Red blood cell fatty acid patterns and acute coronary syndrome. *PLoS One.* 2009;4(5):e5444.
33. Lausada NR, Boullón S, Boullón F, Tacconi de Gómez Dumm IN. Erythrocyte membrane, plasma and atherosclerotic plaque lipid pattern in coronary heart disease. *Medicina (B Aires).* 2007;67(5):451-7.
34. Tziakas DN, Kaski JC, Chalikias GK, Romero C, Fredericks S, Tentes IK, et al. Total cholesterol content of erythrocyte membranes is increased in patients with acute coronary syndrome: a new marker of clinical instability? *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(21):2081-9.
35. Darghouth D, Koehl B, Heilier JF, Madalinski G, Bovee P, Bosman G, et al. Alterations of red blood cell metabolome in overhydrated hereditary stomatocytosis. *Haematologica.* 2011;96(12):1861-5.
36. Kumar A, Gupta CM. Red cell membrane abnormalities in chronic myeloid leukaemia. *Nature.* 1983;303(5918):632-3.
37. Darghouth D, Koehl B, Madalinski G, Heilier JF, Bovee P, Xu Y, et al. Pathophysiology of sickle cell disease is mirrored by the red blood cell metabolome. *Blood.* 2011;117(6):e57-66.
38. Zwaal RF, Bevers EM, Comfurius P, Rosing J, Tilly RH, Verhallen PF. Loss of membrane phospholipid asymmetry during activation of blood platelets and sickled red cells; mechanisms and physiological significance. *Mol Cell Biochem.* 1989;91(1-2):23-31.
39. Yasin Z, Witting S, Palascak MB, Joiner CH, Rucknagel DL, Franco RS. Phosphatidylserine externalization in sickle red blood cells: associations with cell age, density, and hemoglobin F. *Blood.* 2003;102(1):365-70.

## LITERATURA

40. Borenstain-Ben Yashar V, Barenholz Y, Hy-Am E, Rachmilewitz EA, Eldor A. Phosphatidylserine in the outer leaflet of red blood cells from beta-thalassemia patients may explain the chronic hypercoagulable state and thrombotic episodes. *Am J Hematol.* 1993;44(1):63-5.
41. Wahid ST, Marshall SM, Thomas TH. Increased platelet and erythrocyte external cell membrane phosphatidylserine in type 1 diabetes and microalbuminuria. *Diabetes Care.* 2001;24(11):2001-3.
42. G. S, E. AM, W. B, G. S, A W-E, K. P. Targeted profiling of atherogenic phospholipids in human plasma and lipoproteins of hyperlipidemic patients using MALDI-QIT-TOF MS/MS2012.; 224(224):[177-86 pp.].
43. Song J, Wang D, Chen H, Huang X, Zhong Y, Jiang N, et al. Association of Plasma 7-Ketocholesterol With Cardiovascular Outcomes and Total Mortality in Patients With Coronary Artery Disease. *Circ Res.* 2017;120(10):1622-31.
44. Wang M, Long W, Li D, Wang D, Zhong Y, Mu D, et al. Plasma 7-ketocholesterol levels and the risk of incident cardiovascular events. *Heart.* 2017;103(22):1788-94.
45. Connor J, Pak CC, Schroit AJ. Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells. *J Biol Chem.* 1994;269(4):2399-404.
46. Lang KS, Lang PA, Bauer C, Duranton C, Wieder T, Huber SM, et al. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem.* 2005;15(5):195-202.
47. E. DH. Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology2005.
48. Schiller J, Suss R, Fuchs B, Muller M, Zschornig O, Arnold K. MALDI-TOF MS in lipidomics. *Front Biosci.* 2007;12:2568-79.
49. Fuchs B, Süß R, Schiller J. An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Prog Lipid Res.* 2010;49(4):450-75.
50. Emerson B, Gidden J, Lay JO, Jr., Durham B. A rapid separation technique for overcoming suppression of triacylglycerols by phosphatidylcholine using MALDI-TOF MS. *J Lipid Res.* 2010;51(8):2428-34.
51. Walch A, Rauser S, Deininger SO, Höfler H. MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: a new frontier for molecular histology. *Histochem Cell Biol.* 2008;130(3):421-34.
52. Vaysse PM, Heeren RMA, Porta T, Balluff B. Mass spectrometry imaging for clinical research - latest developments, applications, and current limitations. *Analyst.* 2017;142(15):2690-712.

## LITERATURA

53. Schwamborn K, Kriegsmann M, Weichert W. MALDI imaging mass spectrometry - From bench to bedside. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2017;1865(7):776-83.
54. Wishart DS, Mandal R, Stanislaus A, Ramirez-Gaona M. Cancer Metabolomics and the Human Metabolome Database. *Metabolites.* 2016;6(1).
55. Bain BJ. Diagnosis from the blood smear. *N Engl J Med.* 2005;353(5):498-507.
56. D.S. R. Evaluation of peripheral blood smear. 2011.
57. Gérard D, Ben Brahim S, Lesesve JF, Perrin J. Are mushroom-shaped erythrocytes an indicator of COVID-19? *Br J Haematol.* 2021;192(2):230.
58. Bain BJ. Prominent Howell-Jolly bodies when megaloblastic anemia develops in a hyposplenic patient. *Am J Hematol.* 2014;89(8):852.
59. Božidar Š. Štrausova Medicinska Biokemija. Zagreb, Hrvatska: Medicinska naklada; 2009.
60. Andy F. Discovering statistics using IBM SPSS statistics. London, UK: Sage publications; 2013.
61. Rab MAE, Meerveld-Eggink A, van Velzen-Blad H, van Loon D, Rijkers GT, de Weerd O. Persistent changes in circulating white blood cell populations after splenectomy. *Int J Hematol.* 2018;107(2):157-65.
62. Blum KS, Pabst R. Lymphocyte numbers and subsets in the human blood. Do they mirror the situation in all organs? *Immunol Lett.* 2007;108(1):45-51.
63. Juneja S, Januszewicz E, Wolf M, Cooper I. Post-splenectomy lymphocytosis. *Clin Lab Haematol.* 1995;17(4):335-7.
64. Chaimoff C, Douer D, Pick IA, Pinkhas J. Serum immunoglobulin changes after accidental splenectomy in adults. *Am J Surg.* 1978;136(3):332-3.
65. de Souza TA, de Souza DW, Siqueira BS, Rentz T, de Oliveria Emílio HR, Grassioli S. Splenic participation in glycemic homeostasis in obese and non-obese male rats. *Obes Res Clin Pract.* 2020;14(5):479-86.
66. Rao M, Lamont JL, Chan J, Concannon TW, Comenzo R, Ratichek SJ, et al. AHRQ Future Research Needs Papers. Serum Free Light Chain Analysis for the Diagnosis, Management, and Prognosis of Plasma Cell Dyscrasias: Future Research Needs: Identification of Future Research Needs From Comparative Effectiveness Review No 73. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2012.
67. Hayes DM, Spurr CL, Hutaff LW, Sheets JA. Post-splenectomy thrombocytosis. *Ann Intern Med.* 1963;58:259-67.

## LITERATURA

68. Oida T, Kano H, Mimatsu K, Kawasaki A, Kuboi Y, Fukino N, et al. Thrombocytosis following splenectomy: with or without additional organ resection. *Hepatology*. 2012;59(116):1033-5.
69. Boxer MA, Braun J, Ellman L. Thromboembolic risk of postsplenectomy thrombocytosis. *Arch Surg*. 1978;113(7):808-9.
70. JP G, J F, JN L, GM R, F P, B G. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1981.
71. Perl L, Pasvolsky O, Lifshitz L, Mekori YA, Hershko AY. Increased eosinophilic responses in splenectomized patients. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2012;108(1):34-8.
72. R R. *Clinical laboratory medicine: clinical application of laboratory data*. St. Louis: Mosby; 1995.
73. Yin D, Tao J, Lee DD, Shen J, Hara M, Lopez J, et al. Recovery of islet beta-cell function in streptozotocin- induced diabetic mice: an indirect role for the spleen. *Diabetes*. 2006;55(12):3256-63.
74. Melkonian EA, Schury MP. *Biochemistry, Anaerobic Glycolysis*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
75. Peter K. *Biokemija za studente kemije i medicine Zagreb, Hrvatska: Školska knjiga*; 1669.
76. Engelking LR. Chapter 31 - Carbohydrate Metabolism in Erythrocytes. In: Engelking LR, editor. *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry (Third Edition)*. Boston: Academic Press; 2015. p. 190-4.
77. Grygorczyk R, Orlov SN. Effects of Hypoxia on Erythrocyte Membrane Properties— Implications for Intravascular Hemolysis and Purinergic Control of Blood Flow. *Frontiers in Physiology*. 2017;8(1110).
78. Sprague RS, Ellsworth ML, Stephenson AH, Lonigro AJ. ATP: the red blood cell link to NO and local control of the pulmonary circulation. *Am J Physiol*. 1996;271(6 Pt 2):H2717-22.
79. Faris A, Spence DM. Measuring the simultaneous effects of hypoxia and deformation on ATP release from erythrocytes. *Analyst*. 2008;133(5):678-82.
80. Sprung R, Sprague R, Spence D. Determination of ATP Release from Erythrocytes Using Microbore Tubing as a Model of Resistance Vessels in Vivo. *Analytical Chemistry*. 2002;74(10):2274-8.
81. Gov NS, Safran SA. Red blood cell membrane fluctuations and shape controlled by ATP-induced cytoskeletal defects. *Biophys J*. 2005;88(3):1859-74.

## LITERATURA

82. Sikora J, Orlov SN, Furuya K, Grygorczyk R. Response: Hemolysis is a primary and physiologically relevant ATP release mechanism in human erythrocytes. *Blood*. 2015;125(11):1845-6.
83. Park Y, Best CA, Auth T, Gov NS, Safran SA, Popescu G, et al. Metabolic Remodeling of the Human Red Blood Cell Membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(4):1289-94.
84. Lin JN, Lin CL, Lin MC, Lai CH, Lin HH, Yang CH, et al. Increased Risk of Hemorrhagic and Ischemic Strokes in Patients With Splenic Injury and Splenectomy: A Nationwide Cohort Study. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(35):e1458.
85. Rørholt M, Ghanima W, Farkas DK, Nørgaard M. Risk of cardiovascular events and pulmonary hypertension following splenectomy - a Danish population-based cohort study from 1996-2012. *Haematologica*. 2017;102(8):1333-41.

## ŽIVOTOPIS

### 11. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Andrea Lučić

**Datum i mjesto rođenja:** 05.09.1996.

**Adresa:** Ul. Vladimira Gortana 28, Vinkovci 32100

**Telefon:** 098/941-0746

**E-mail:** alucius777@gmail.com

#### **Obrazovanje:**

2011.-2015. Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci

2015.-2021. Medicinski fakultet Osijek, Studij medicine

#### **Članstva:**

Član udruge Croomsic od 2016. do 2021.

Član Rotaract kluba Vinkovci od 2021.

#### **Ostale aktivnosti:**

2019. – Tjedan mozga u Osijeku, aktivni sudionik

2019. – 8. Hrvatski Kongres Ginekologa i Opstetričara u Osijeku, pasivni sudionik

2020. – Simpozij Upoznaj me u Osijeku, aktivni sudionik

2020. – sudionik u projektu Pogled u sebe u Osijeku

2020. – sudionik u mRAK kampanji u Osijeku

2020.-2021.- studentski kongres OSCON u Osijeku, pasivni sudionik