Priprema krvnog razmaza za MALDI TOF MS slikovnu analizu

Bebek, Davorka

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:577444

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Davorka Bebek

PRIPREMA KRVNOG RAZMAZA ZA MALDI TOF MS SLIKOVNU ANALIZU

Diplomski rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Davorka Bebek

PRIPREMA KRVNOG RAZMAZA ZA MALDI TOF MS SLIKOVNU ANALIZU

Diplomski rad

Osijek, 2021.

Rad je ostvaren na Odjelu za kliničku kemiju i kontrolu kvalitete, Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentor rada: nasl. izv. prof. dr. sc. Željko Debeljak, mag., spec. med. biokemije

Rad ima 41 list, 2 tablice i 8 slika.

SADRŽAJ

1. UVOD.....1

1. 1. Spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry, MS*).....1

1. 2. Slikovna spektrometrija masa (engl. *Imaging Mass Spectrometry, IMS*).....2

1. 3. MALDI TOF MS.....2

1. 3. 1. Matrica.....3

1. 3. 2. Pozitivan i negativan ionski način rada.....3

1. 3. 3. Indij - kositar oksid staklo (engl. *Indium Tin Oxide, ITO*).....4

1. 4. MALDI TOF MS vs. MALDI TOF IMS.....4

1. 5. MALDI TOF MS i ostale metode.....4

1. 6. Prednosti i nedostaci IMS - a.....5

1. 7. Krvni razmaz.....5

1. 7. 1. Primjena krvnog razmaza u dijagnostici.....6

1. 7. 2. Načini pregleda krvnog razmaza.....6

1. 8. Budućnost IMS - a.....6

1. 9. Uloga MALDI TOF IMS - a u proučavanju krvnog razmaza.....7

1. 9. 1. Priprema krvnog razmaza.....7

2. HIPOTEZA.....9

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....10

4. ISPITANICI I METODE.....11

4. 1. Ustroj studije.....11

4. 2. Ispitanici.....11

4. 3. Metode.....11

4. 3. 1. Uvjeti snimanja.....11

4. 3. 2. Protokol za pripremu krvnog razmaza periferne krvi 11

4. 3. 3. Protokol za pripremu trombocitno - leukocitnog međusloja (engl. *buffy coat*) 11

4. 3. 4. Protokol za izolaciju leukocita 11

5. REZULTATI 11

5. 1. Pregled masenih spektara i slika za krvni razmaz periferne krvi 11

5. 2. Pregled masenih spektara za trombocitno - leukocitni međusloj 19

5. 3. Pregled masenih spektara i slika dobivenih nakon izolacije leukocita 27

6. RASPRAVA 31

7. ZAKLJUČAK 35

8. SAŽETAK 36

9. SUMMARY 37

10. LITERATURA 38

11. ŽIVOTOPIS 41

POPIS KRATICA

9-AA (engl. *9-Aminoacridine*) - 9-aminoakridin

ATP (engl. *Adenosine triphosphate*) - Adenozin trifosfat

CHCA (engl. *alpha-Cyano-4-hydroxycynnamic acid*) - alfa-cijano-4-hidroksicimetna kiselina

CI (engl. *Chemical Ionization*) - Kemijska ionizacija

DAN (engl. *1,5-Diaminonaphtalene*) - 1,5-diaminonaftalen

DESI-IMS (engl. *Desorption Electrospray Ionization-Imaging Mass Spectrometry*) - Desorpcijska elektrosprej ionizacija spregnuta sa slikovnom spektrometrijom masa

DHB (engl. *2,5-Dihydroxybenzoic acid*) - 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina

EDTA (engl. *Ethylenediaminetetraacetica acid*) - Etilendiaminotetraoctena kiselina

ESI (engl. *Electrospray Ionization*) - Elektrosprej ionizacija

ESI-MS (engl. *Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*) - Elektrosprej ionizacija spregnuta sa spektrometrijom masa

FISH (engl. *Fluorescence in situ hybridization*) - Fluorescentna *in situ* hibridizacija

FT-ICR (engl. *Fourier-transform ion cyclotron resonance*) - Fourierova ionska ciklotronska rezonanca

GB (engl. *Gigabyte*) - gigabajt

IHC (engl. *Immunohistochemistry*) - Imunohistokemija

IMC (engl. *Imaging Mass Cytometry*) - Slikovna masena citometrija

IMS (engl. *Imaging Mass Spectrometry*) - Slikovna spektrometrija masa

ITO (engl. *Indium Tin Oxide*) - Indij - kositar oksid

KEGG (engl. *Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes*) - Kyoto enciklopedija gena i genoma

LC-MS/MS (engl. *Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry*) - Tekućinska kromatografija spregnuta s tandemskom spektrometrijom masa

MALDI (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) - Matricom potpomognuta laserska desoprcija/ionizacija

MALDI TOF IMS (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Imaging Mass Spectrometry*) - Matricom potpomognuta laserska desoprcija/ionizacija spregnuta sa slikovnom spektrometrijom masa temeljenom na vremenu leta iona

MALDI TOF MS (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*) - Matricom potpomognuta laserska desoprcija/ionizacija spregnuta sa spektrometrijom masa temeljenom na vremenu leta iona

MS (engl. *Mass Spectrometry*) - Spektrometrija masa

PBS (engl. *Phosphate - buffer saline*) - Puferirana otopina fosfatnih soli

SIMS (engl. *Secondary Ion Mass Spectrometry*) - Spektrometrija masa sekundarnih iona

TOF (engl. Time Of Flight) - Analizator vremena leta iona

1. UVOD

Matricom potpomognuta laserska ionizacija/desorpcija spregnuta sa spektrometrijom masa temeljenom na vremenu leta iona (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry, MALDI TOF MS*) je analitička tehnologija koja je zbog brzine obrade uzorka i osjetljivosti postala popularna tijekom prošlog desetljeća (1). Ovom tehnologijom moguće je identificirati i dobiti podatke o količini određenih molekula u uzorku. Nasuprot tome, slikovna inačica (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Imaging Mass Spectrometry, MALDI TOF IMS*) omogućuje, s velikom molekularnom specifičnošću i osjetljivošću, mapiranje prostorne raspodjele molekula poput lipida, šećera, aminokiselina i neurotransmitera u tkivima i stanicama. Kao takva, ova je metoda omogućila ubrzanje znanstvenih otkrića o ulogama koje te molekule imaju u zdravlju i bolesti. Osim toga, slikovnom spektrometrijom masa (engl. *Imaging Mass Spectrometry, IMS*) moguće je analizirati stotine molekula istovremeno, što je značajno brže u odnosu na druge slikovne metode obrade uzoraka poput mikroskopije ili hibridizacije *in situ* (2).

1. 1. Spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry, MS*)

Spektrometrija masa analizira ione u plinovitoj fazi prema njihovom omjeru mase i naboja (m/z). Maseni spektrometar sastoji se od izvora ionizacije, analizatora mase i detektora. Najčešći mehanizmi ionizacije koji se koriste za biološke molekule su elektrosprej ionizacija (engl. *Electrospray Ionization, ESI*), kemijska ionizacija (engl. *Chemical Ionization, CI*) i matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI*). Ionizacija se može provesti u negativnom ili pozitivnom ionskom načinu rada kako bi se poboljšala pokrivenost metaboloma. Suvremeni maseni spektrometri sastavljeni su od velikog broja analizatora mase za identifikaciju analita u prostoru ili vremenu. Najčešće se koriste ionske zamke, Fourierova ionska ciklotronska rezonanca (engl. *Fourier-transform ion cyclotron resonance, FT-ICR*) i analizator vremena leta iona (engl. *Time Of Flight, TOF*). Rezultati se prikazuju kao spektri relativnog udjela detektiranih iona prema omjeru mase i naboja i ti se rezultati mogu usporediti s već postojećim u bazama podataka (3).

1. 2. Slikovna spektrometrija masa (engl. *Imaging Mass Spectrometry, IMS*)

Slikovna spektrometrija masa je tehnologija koja omogućuje prikaz prostorne raspodjele molekula u različitim uzorcima, a služi za kemijsku analizu i karakterizaciju bioloških uzoraka. U pravilu je nakon pripreme uzorka potrebno postaviti način snimanja koji uključuje odabir područja snimanja uzorka i to je područje vidljivo u obliku mreže (x, y) na površini uzorka. Molekule na površini uzorka se desorbiraju i ioniziraju te se snima maseni spektar na svakom pikselu. Nakon snimanja, računalni program može se koristiti za odabir željene m/z vrijednosti. Da bi se utvrdio identitet određene m/z vrijednosti, može se izvesti fragmentacija iona tandemskom spektrometrijom masa ili se dobivene m/z vrijednosti mogu usporediti s već poznatim vrijednostima u bazama podataka (4). MALDI, spektrometrija masa sekundarnih iona (engl. *Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS*) i desorpcijska elektrosprej ionizacija spregnuta sa slikovnom spektrometrijom masa (engl. *Desorption Electrospray Ionization-Imaging Mass Spectrometry, DESI-IMS*) su glavne tehnike ionizacije koje se koriste za slikovnu spektrometriju masa. U SIMS - u se udarom usmjerenom ionskom zrakom na uzorak analiti desorbiraju i ioniziraju, što dovodi do stvaranja i izbacivanja sekundarnih iona. U DESI-IMS - u elektrosprej se koristi za desorbiranje molekularnih vrsta i stvaranje iona, nakon čega slijedi prijenos u analizator mase (5).

1. 3. MALDI TOF MS

MALDI je metoda u kojoj se uzorak prije analize mora pomiješati s organskim spojem koji apsorbira energiju, odnosno matricom. Kada matrica kristalizira sušenjem, uzorak ostaje unutar matrice i također kristalizira zajedno s njom. Uzorak unutar matrice se zatim ionizira laserskom zrakom. Desorpcija i ionizacija laserskom zrakom generira pojedinačno ionizirane ione iz analita u uzorku. Protonirani ioni zatim se ubrzavaju i odvajaju na temelju mase i naboja. Nabijeni analiti mjere se pomoću različitih tipova analizatora mase. Jedan od njih je i TOF analizator mase. Tijekom MALDI-TOF analize, ioni se ubrzavaju djelovanjem elektrostatičkog polja: ioni s jednakim nabojem imaju jednaku kinetičku energiju, ali razlike u brzinama iona razlikuju ione prema masi. Manje čestice kreću se brže kroz cijev i dosežu detektor u kraćim vremenskim razdobljima u odnosu na veće čestice. Vrijeme potrebno za dosezanje detektora određuje omjer mase i naboja iona (6, 7).

1. 3. 1. Matrica

Kako bi poboljšala stvaranje iona, MALDI tehnologija koristi matricu. Prikladna matrica trebala bi rezultirati izvrsnim omjerom signala i šuma, visoko razlučenim spektrima, zanemarivom fragmentacijom analita i umjerenom pozadinom matrice, kako bi se smanjila smetnja između matrice i analita. Budući da je većina dosad provedenih studija izvedena s ultraljubičastim (UV) laserima, matrica mora posjedovati snažnu apsorpciju na valnoj duljini emisije lasera u području između 337 i 355 nm. Matrica bi također trebala biti stabilna u uvjetima visokog vakuuma, što je dulje moguće, jer tijekom postupka ionizacije mnogi spojevi prolaze proces sublimacije, što dovodi do promjene omjera matrice i analita, a što s vremenom mijenja masene spektre analita. Kako se ne bi narušila osjetljivost ove tehnologije, matricom se izoliraju generirani ioni i sprječava stvaranje nakupina analita. Nekoliko se različitih spojeva trenutno koriste kao matrice, poput derivata benzojeve kiseline (primjer: 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina, engl. 2,*5-Dihydroxybenzoic acid, DHB*), derivata cimetne kiseline (primjer: alfa-cijano-4-hidroksicimetna kiselina, engl. *alpha-Cyano-4-hydroxycynnamic acid, CHCA*), heterocikličike matrice (primjer: 9-aminoakridin, engl. *9-Aminoacridine, 9-AA*) i ostale matrice (primjer: derivati acetofenona) (8).

1. 3. 2. Pozitivan i negativan ionski način rada

Matrica djeluje kao donor ili akceptor protona, odnosno ionizira analit. Prijenos protona između matrice i analita čini neutralne molekule analita [M] protoniranim ($[M + H]^+$) ili deprotoniranim ($[M–H]^–$), a dobiveni se ioni mogu otkriti u pozitivnom ili negativnom ionskom načinu. Analiti također mogu stvarati adukte sa solima ($[M + Na]^+$) putem prijenosa kationom (7). U pozitivnom ionskom načinu često korištene matrice su DHB i CHCA, čija se smjesa u omjeru 1 : 1 također može primijeniti. S druge strane, u negativnom se ionskom načinu najčešće koriste 1,5-diaminonaftalen (engl. *1,5-diaminonaphtalene, DAN*) i 9-AA (4). Odabir matrice i ionskog načina ovisi o analitu koji se želi analizirati.

1. 3. 3. Indij - kositar oksid staklo (engl. *Indium Tin Oxide, ITO*)

Za MALDI analizu potrebna je električki vodljiva površina. Da bi se to postiglo, površina stakalca za analizu presvučena je indij - kositar oksidom, koji je proziran i električki vodljiv. Prethodno presvučena stakalca dostupna su na tržištu. Matrica se jednoliko nanosi na cijelu vodljivu površinu stakla, pokrivajući uzorak i ostatak stakla presvučenog ITO - om (7).

1. 4. MALDI TOF MS vs. MALDI TOF IMS

Glavna razlika između MALDI TOF MS - a i MALDI TOF IMS - a je što MALDI TOF IMS omogućuje kemijsku analizu, odnosno lokalizaciju i identifikaciju molekula u uzorku. U usporedbi s tehnikama koje se temelje na fluorescenciji i radioaktivnosti, IMS koristi različite skupove molekularnih svojstava za otkrivanje i karakterizaciju analita u uzorku. Glavno načelo IMS - a je korištenje analitičkih svojstava MS - a za stvaranje slika koje prikazuju raspodjelu poznatih i nepoznatih molekula (9, 10).

1. 5. MALDI TOF MS i ostale metode

MALDI TOF MS može se kombinirati s ostalim dijagnostičkim metodama. Jedna od takvih metoda je i protočna citometrija koja se inače koristi za mjerenje intenziteta fluorescencije, omogućuje sveobuhvatnu analizu imunološkog sustava, identifikaciju različitih staničnih populacija i analizu imunološkog odgovora izazvanog novim terapijskim sredstvima, a sada se može kombinirati s IMS - om i imunohistokemijom (engl. *Immunohistochemistry, IHC*), i naziva se slikovna masena citometrija (engl. *Imaging Mass Cytometry, IMC*). IMC se uglavnom primjenjuje za istraživanje raka i mikrookruženja tumora. Antitijela za IMC ne temelje se na fluoroforima, već na metalnim pločicama koje smanjuju slabljenje signala, spektralno preklapanje ili autofluorescenciju. U patologiji, koja većinom koristi metode imunohistokemije i fluorescentne *in situ* hibridizacije (engl. *Fluorescence in situ hibridization, FISH*) te molekularne metode poput sekvenciranja gena, primjenu MALDI TOF MS - a nalazi u otkrivanju temeljne biokemije tkiva i organa te pružanju informacija o utjecaju terapije ili toksina na funkciju ili nefunkcionalnost organa (11, 12).

1. 6. Prednosti i nedostaci IMS - a

IMS ima sposobnost otkrivanja i mapiranja malih molekula (< 2 kDa) i metabolita unutar uzorka, održavajući visoku prostornu rezoluciju i molekularnu specifičnost bez potrebe za kemijskim oznakama, specijalnim bojanjima i molekularnim probama. IMS postaje koristan u farmaceutskoj industriji jer za razliku od tekućinske kromatografije spregnute s tandemskom spektrometrijom masa (engl. *Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS*), daje informacije o prostornoj lokalizaciji određenog lijeka. Također, IMS može odrediti biotransformirane metabolite lijeka i distribuciju ksenobiotika.

Većina nedostataka ove metode vezana je uz pripremu uzorka za analizu. Prilikom odmrzavanja uzorka može doći do njegove degradacije, a neki analiti nisu stabilni na sobnoj temperaturi pa se mogu u potpunosti degradirati. Kako bi se artefakti smanjili na minimum i poboljšala interpretacija podataka, matrica mora biti jednoliko raspoređena po cijelom uzorku, što je teško postići. Analiza se može provoditi u vakuumu pa se uzorci moraju temeljito osušiti, što može biti štetno za uzorke osjetljiva na isušivanje. Prilikom upotrebe IMS - a može doći do supresije ionizacije, što se događa kada različita kemijska priroda svakog metabolita naruši cjelokupnu analizu. Konačno, IMS zahtijeva značajne računalne mogućnosti jer podaci mogu zauzeti veliki dio memorije (do nekoliko desetaka ili stotina gigabajta (engl. *Gigabyte, GB*)) i odgovarajuće vrijeme obrade od nekoliko sati (2). Jedan od najvećih nedostataka MALDI IMS - a je to što mali ioni matrice dominiraju spektrom što otežava otkrivanje iona male molekularne mase (< 500 Da) (13).

1. 7. Krvni razmaz

Klinička obrada pacijenta zasniva se na proučavanju povijesti bolesti, fizikalnom pregledu i laboratorijskoj obradi. Istraživanja pokazuju da je čak 70 % odluka kliničara temeljeno na laboratorijskim nalazima. U tom smislu, krvni razmaz pruža kliničaru mogućnost dijagnoze, praćenje tijeka bolesti te terapijskog odgovora (14).

1. 7. 1. Primjena krvnog razmaza u dijagnostici

Krvni razmaz pruža uvid u morfologiju stanica periferne krvi, što pomaže u dijagnozi različitih primarnih i sekundarnih hematoloških bolesti. Unatoč tehnološkom napretku i automatizaciji hematoloških laboratorija, krvni razmaz ostaje vrijedan izvor informacija jer služi za provjeru rezultata dobivenih automatskim analizatorima ili kao potvrda pretpostavljene dijagnoze. Uobičajene indikacije za analizu krvnog razmaza su neobjašnjive citopenije, žutice ili hemolize, sumnje na kroničnu ili akutnu mijeloproliferativnu bolest, zatajenje bubrega ili jetre, teške bakterijske i parazitske infekcije te zloćudni tumori. Kod procjene takvih stanja, pregled krvnog razmaza zahtijeva posebnu vještinu jer je važno odrediti raspodjelu, veličinu, oblik i boju stanica u krvnom razmazu (14, 15).

1. 7. 2. Načini pregleda krvnog razmaza

Mikroskopski se krvni razmaz može proučiti na tri načina. Prvi način je snimka krvnog razmaza (engl. *blood smear scan* ili *platelet scan*) radi provjere točnog broja trombocita u slučajevima kada automatski analizator to posebno traži ili kada je dobiveni broj trombocita znatno niži od najniže granice referentnog intervala. Drugi način je pregled krvnog razmaza (engl. *blood smear examination*) ili diferencijalna krvna slika koja obično uključuje provjeru morfologije stanica i provjeru rezultata koji su označeni na automatskom analizatoru. Treći način je tumačenje krvnih razmaza (engl. *blood smear review*) koje može zatražiti kliničar ili laboratorij u slučajevima kada su rezultati zbunjujući i dijagnoza se ne može sa sigurnošću odrediti, a provodi ga osoba sa stručnim znanjem iz područja hematologije (15).

1. 8. Budućnost IMS - a

Slikovna masena spektrometrija ima široku primjenu. Kao i većina slikovnih metoda, mogućnost veće prostorne razlučivosti uvijek je bitna za stjecanje boljeg uvida u kontekst biološkog uzorka, no povećanje prostorne razlučivosti dovodi do smanjenja ukupnih iona stvorenih s površine uzorka, što smanjuje osjetljivost metode, odnosno omogućuje vidljivost samo najvećih iona. Zbog toga, neki istraživači koriste više analizatora mase kako bi poboljšali informacijski sadržaj prikupljen sa svakog piksela. Takvi bi kombinirani pristupi mogli pomoći u

prevladavanju ograničenja IMS - a i pružiti širu procjenu molekularnih značajki (13). Kombinacijom IMS - a i mikroskopije, može se predvidjeti raspodjela analita u uzorku, takav pristup pruža novi potencijal za dublje istraživanje podataka i predviđanje novih mogućnosti primjene. Mogućnosti IMS - a u medicini tek počinju biti cijenjene (16).

1. 9. Uloga MALDI TOF IMS - a u proučavanju krvnog razmaza

MALDI TOF IMS tehnologija ujedinjuje mikroskopiju i spektrometriju masa, što omogućuje vizualizaciju prostorne raspodjele pojedinih staničnih sastavnica, kao i uvid u njihovu količinu u stanici ili tkivu. Značajnost proučavanja krvnih razmaza ovom tehnologijom leži u teoriji o deformabilnosti eritrocita (sposobnosti eritrocita da mijenjaju oblik prolaskom kroz male kapilare ili sinuse slezene) pri čemu može doći do kemijske ili promjene u elastičnosti eritrocitne membrane i viskoznosti plazme. Ta bi promjena eritrocita mogla postati potencijalni biomarker za neke bolesti poput dijabetesa, bubrežnih, jetrenih bolesti, pretilosti i malarije. Promjene u strukturi membrane krvnih stanica vidljive su svjetlosnom mikroskopijom, a ovom je tehnologijom moguće pregledati i one kemijske promjene koje bi mogle biti značajne za dijagnozu određene bolesti (17, 18). Primjerice, bolesti jetre, posebno ciroza jetre, povezane su s nizom zanimljivih kemijskih promjena koje rezultiraju strukturnim i metaboličkim abnormalnostima membrane eritrocita što dovodi do mikroskopski uočljivih promjena oblika stanica i hemolitičke anemije koja varira od vrlo blage do potencijalno smrtonosne (19).

1. 9. 1. Priprema krvnog razmaza

Ovo istraživanje nastavak je istraživanja provedenog 2020. godine (18) i predstavlja još jedan korak dalje u poboljšanju pripreme krvnog razmaza i dobivanja optimalnih rezultata koji bi se mogli koristiti u dijagnostici. Ispitana je upotreba lakohlapivih soli u pripremama krvnog razmaza i razvoj protokola koji bi se mogli koristiti za pregled leukocita te su ponovo ispitane i prilagođene postavke lasera koje najbolje odgovaraju određenom protokolu za pripremu krvnog razmaza. Kako bi se krvni razmaz analiziran MALDI TOF IMS - om mogao primjenjivati u dijagnostičke svrhe, potrebno je obratiti pozornost na njegovu pripremu i moguće probleme koji se mogu pojaviti prilikom analize. Kod pripreme krvnog razmaza, važno je odrediti trajanje

izloženosti polarnim otapalima jer o tome ovisi kvaliteta uzorka, odnosno nastoji se izbjeći hemoliza stanica. U prethodno navedenom istraživanju iz 2020. godine (18), krvni razmaz bio je izložen različitim polarnim otapalima u različitim vremenskim razdobljima i takvom pripremom dobiveni su relativno slabi signali. Zbog toga je pripremu krvnog razmaza potrebno unaprijediti kako bi se dobili valjani rezultati. U tu svrhu, ovo istraživanje, osim upotrebe polarnih otapala i odabira optimalnog vremena izloženosti, ispituje i utjecaj lakohlapivih soli na integritet stanica i jačinu dobivenih signala. Kao i kod polarnih otapala, lakohlapive soli mogu uzrokovati hemolizu stanica, što treba uzeti u obzir, ali i poboljšati ionizaciju analita i time unaprijedti kvalitetu dobivenog spektra. Nakon pripreme razmaza, od iznimne je važnosti nanošenje matrice. Debelo nanesena matrica može stvoriti probleme kod vizualnog pregleda razmaza i onemogućiti razlikovanje stanica. Zato je potrebno ponovo preispitati vrijeme nanošenja matrice. Kako bi bili sigurni u dobivene spektre, odnosno da oni odgovaraju stanicama od interesa, potrebno je prilagoditi postavke lasera tako da prilikom analize laser obuhvati stanicu od interesa. Osim kemijske analize eritrocita, za što bi krvni razmaz bio dovoljan, postavlja se problem malog broja leukocita u vidnom polju, odnosno njihovo teško uočavanje u krvnom razmazu, posebno nakon nanošenja matrice. U tu svrhu, moguće je primijeniti boje koje će se vezati za jezgre leukocita, no tu se nameće pitanje razlikovanja mononuklearnih od polimorfonuklearnih leukocita i pojave dodatnih signala u spektrima koji se odnose na boju. Osim primjene boje, moguće je izolirati leukocite i pritom koristiti lakohlapive pufere koji smanjuju ionsku supresiju i poboljšavaju dobivene spektre. Izolacijom leukocita dobije se kemijski sastav pojedinog leukocita, ali opet razlikovanje stanica ovisi o nanošenju matrice, a točnost spektra o postavkama lasera i njegovoj usmjerenosti prema traženoj stanici.

2. HIPOTEZA

Varijacijom eksperimentalnih uvjeta moguće je postići zadovoljavajuće uvjete snimanja dvodimenzionalnih distribucija molekulanrih sastavnica krvnih stanica primjenom MALDI TOF IMS - a.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su razviti metodu za analizu krvnog razmaza pomoću MALDI TOF MS tehnologije, odnosno poboljšati ionizaciju analita od interesa tretiranjem uzoraka otopinama lakohlapivih soli, poboljšati izolaciju pojedinih staničnih loza te optimirati uvjete snimanja.

4. ISPITANICI I METODE

4. 1. Ustroj studije

Predklinički razvoj laboratorijskog postupka.

4. 2. Ispitanici

Tema ovog diplomskog rada dio je većeg istraživanja pod nazivom „Optimizacija uvjeta za kemijsku karakterizaciju i vizualizaciju krvnih stanica primjenom slikovne spektrometrije masa", a koje se provodi u Kliničkom bolničkom centru Osijek. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Osijek i Medicinskog fakulteta u Osijeku, a provodi se na Odjelu za kliničku kemijui kontrolu kvalitete, Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Osijek u razdoblju od 2021. do 2022. godine. U diplomski rad su bila uključena četiri zdrava ispitanika muškog spola, dobrovoljna davatelja krvi, čija krv je, nakon potpisanog informiranog pristanka, uzorkovana na Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu, Kliničkog bolničkog centra Osijek.

4. 3. Metode

Za optimizaciju uvjeta snimanja i dobivanja protokola za pripremu krvnog razmaza, uzorkovano je 4 mL pune krvi iz antekubitalne vene u epruvetu s antikoagulansom etilendiaminotetraoctena kiselina (engl. *Ethylenediaminetetraacetica acid, EDTA*) (Beckton Dickinson, Plymouth, UK). Različito pripremljeni uzorci nanošeni su na ITO stakla (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Matrice koje su korištene i uspoređivane prilikom razvoja optimalnog protokola pripreme uzorka su 9-AA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) i CHCA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Matrica je na uzorke nanešena pomoću uređaja iMLayer (Shimadzu, Kyoto, Japan), a za brojanje stanica prilikom priprave uzoraka korišten je hematološki brojač XN - 2000 (Sysmex, Kobe, Japan). Slikovna analiza pripremljenih razmaza provedena je na uređaju iMScope Trio (Shimadzu, Kyoto, Japan).

4. 3. 1. Uvjeti snimanja

Na uređaju iMScope Trio obavljena je slikovna analiza. Postavke instrumenta korištene za uspoređivanje različito pripremljenih uzoraka, odabrane su nakon nekoliko ispitivanja što je prikazano u Tablici 1. Proučavani su parametri lasera poput promjera, intenziteta, frekvencije, broja snimaka po pikselu i veličine okvira za laser (x, y). Kao pokazatelji kvalitete korišteni su hem i adenozin trifosfat (engl. *Adenosine triphosphate, ATP*), a njihovi omjeri mase i naboja prikazani su u Tablici 2. Svaka priprema krvnog razmaza snimana je u pozitivnom i negativnom ionskom načinu pri povećanju od 400 x i u rasponu m/z od 200 do 600 i od 600 do 900 Da. Korištene su matrice CHCA za pozitivan ionski način i 9-AA za negativan ionski način rada.

Tablica 1. Odabrani uvjeti snimanja za matrice CHCA i 9-AA.

Matrica	Ionski način rada	Promjer lasera (µm)	Veličina okvira za laser x, y (µm)	Broj snimaka po pikselu	Frekvencija lasera (Hz)	Intenzitet lasera (%)
CHCA	pozitivan	5	9, 8,5	30	40	15,1
		10	15, 13	30	40	21,7
9 - AA	negativan	5	9, 8,5	50	100	15,1
		10	11, 9	30	40	21,7

Tablica 2. Prikaz omjera mase i naboja (m /z) hema.

Matrica	Ionski način	Indikator kvalitete	m/z (Da)
CHCA	pozitivan	Hem	616,173
			617,176
9-AA	negativan	ATP	505,988
		Hem	615,166
			616,170

4. 3. 2. Protokol za pripremu krvnog razmaza periferne krvi

POTREBAN MATERIJAL:

1. puna krv u epruveti s antikoagulansom EDTA
2. ITO staklo
3. 100 % metanol (MetOH; Merck, Darmstadt, Germany)
4. 150 mM amonijev acetat
5. Matrica (CHCA i 9-AA)
6. 5 % metanol

PRIPREMA:

1. Od 2 µL pune krvi napraviti razmaz na ITO staklu i čekati nekoliko minuta da se razmaz osuši na zraku
2. Uroniti ITO staklo u 100 % metanol na 1 s i čekati da metanol na razmazu ishlapi
3. Preliti razmaz s 1 mL 150 mM amonijevog acetata i sušiti razmaz na zraku
4. Nanijeti matricu (CHCA ili 9-AA) u uređaju iMLayer u vremenskom periodu od 3 minute korištenjem automatskog načina rada
5. Napraviti rekristalizaciju u zatvorenoj plastičnoj posudi na 70 ºC 105 s, korištenjem 500 µL 5 % metanola

4. 3. 3. Protokol za pripremu trombocitno - leukocitnog međusloja (engl. *buffy coat*)

POTREBAN MATERIJAL:

1. Puna krv u epruveti s antikoagulansom EDTA
2. Epruveta volumena 1,5 mL
3. ITO staklo
4. 100 % metanol
5. 150 mM amonijev acetat
6. Matrica (CHCA i 9-AA)
7. 5 % metanol

PRIPREMA:

1. Punu krv u epruveti s antikoagulansom EDTA centrifugirati na 140 x g 5 minuta
2. Nakon centrifugiranja, supernatant odvojiti u epruvetu od 1,5 mL
3. Epruvetu od 1,5 mL centrifugirati na 600 x g 5 minuta
4. Supernatant odvojiti u drugu epruvetu, a ostatak resuspendirati
5. 2 µL suspenzije staviti na ITO staklo i napraviti razmaz i ostaviti da se osuši na zraku
6. ITO staklo s razmazom uroniti u 100 % metanol na 1 s i čekati da metanol na razmazu ishlapi
7. Razmaz preliti s 1 mL 150 mM amonijevog acetata i sušiti na zraku
8. Nanijeti matricu (CHCA ili 9-AA) u uređaju iMLayer u vremenskom periodu od 3 minute korištenjem automatskog načina rada
9. Napraviti rekristalizaciju u zatvorenoj plastičnoj posudi na 70 ºC 105 s, korištenjem 500 µL 5 % metanola

4. 3. 4. Protokol za izolaciju leukocita

POTREBAN MATERIJAL:

1. Puna krv u epruveti s antikoagulansom EDTA
2. Epruveta volumena 4 mL
3. Amonijev klorid
4. Puferirana otopina fosfatnih soli (engl. *phosphate buffer saline, PBS*)
5. ITO staklo
6. 100 % metanol
7. 150 mM amonijev acetat
8. Matrica (CHCA ili 9-AA)
9. 5 % metanol

PRIPREMA:

1. Punu krv u epruveti s antikoagulansom EDTA centrifugirati 140 x g 5 minuta
2. Nakon centrifuge odvojiti 50 µL supernatanta u epruvetu od 4 mL
3. Dodati 2 mL amonijevog klorida i inkubirati u mraku 10 minuta
4. Nakon inkubacije, centrifugirati uzorak 300 x g 5 minuta
5. Odliti supernatant i dodati 2 mL PBS - a
6. Centrifugirati 300 x g 5 minuta
7. Odliti supernatant i dodati 200 µL PBS - a
8. Na hematološkom brojaču izbrojati dobivene leukocite
9. Uzorak staviti na ITO staklo u citocentrifugi i pustiti da se staklo osuši
10. ITO staklo uroniti u 100 % metanol na 1 s i čekati da metanol na razmazu ishlapi
11. Preliti razmaz 1 mL 150 mM amonijevog acetata i sušiti staklo na zraku
12. Nanijeti matricu (CHCA ili 9-AA) u uređaju iMLayer u vremenskom periodu od 3 minute korištenjem automatskog načina rada
13. Napraviti rekristalizaciju u zatvorenoj posudi na 70 ºC 105 s, korištenjem 500 µL 5 % metanola

5. REZULTATI

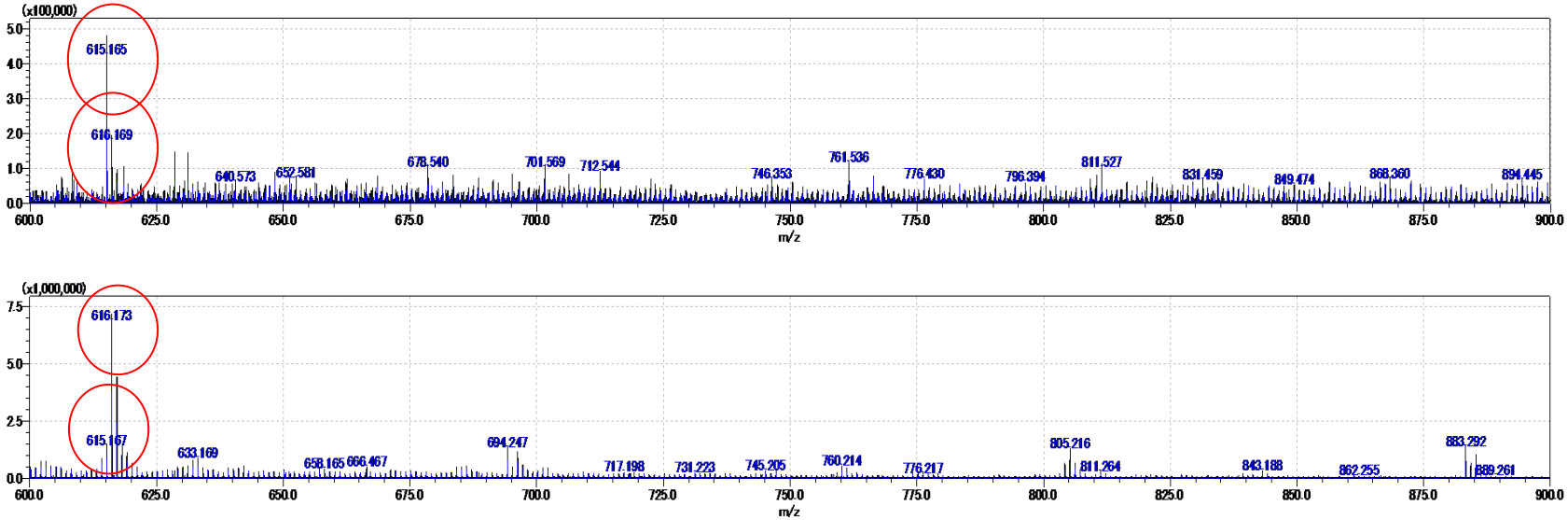
Istraživanje je provedeno na 4 muška ispitanika, dobrovoljna davatelja krvi. Krv je uzorkovana iz antekubitalne vene u epruvetu s antikoagulansom EDTA. Uzorci krvi pripremljeni su prema prethodno opisanim protokolima za krvni razmaz, trombocitno - leukocitni međusloj i izolaciju leukocita. Najvažniji nalazi prikazani su u sljedećim masenim spektrima i slikama dobivenima iz uzorka istog pacijenta.

5. 1. Pregled masenih spektara i slika za krvni razmaz periferne krvi

Krvni razmaz pripremljen je prema prethodno navedenom protokolu u pozitivnom i negativnom ionskom načinu rada i u rasponu masa m/z od 200 do 600 i od 600 do 900 Da te s promjerima lasera 5 i 10 µm prema postavkama koje su navedene u Tablici 1.

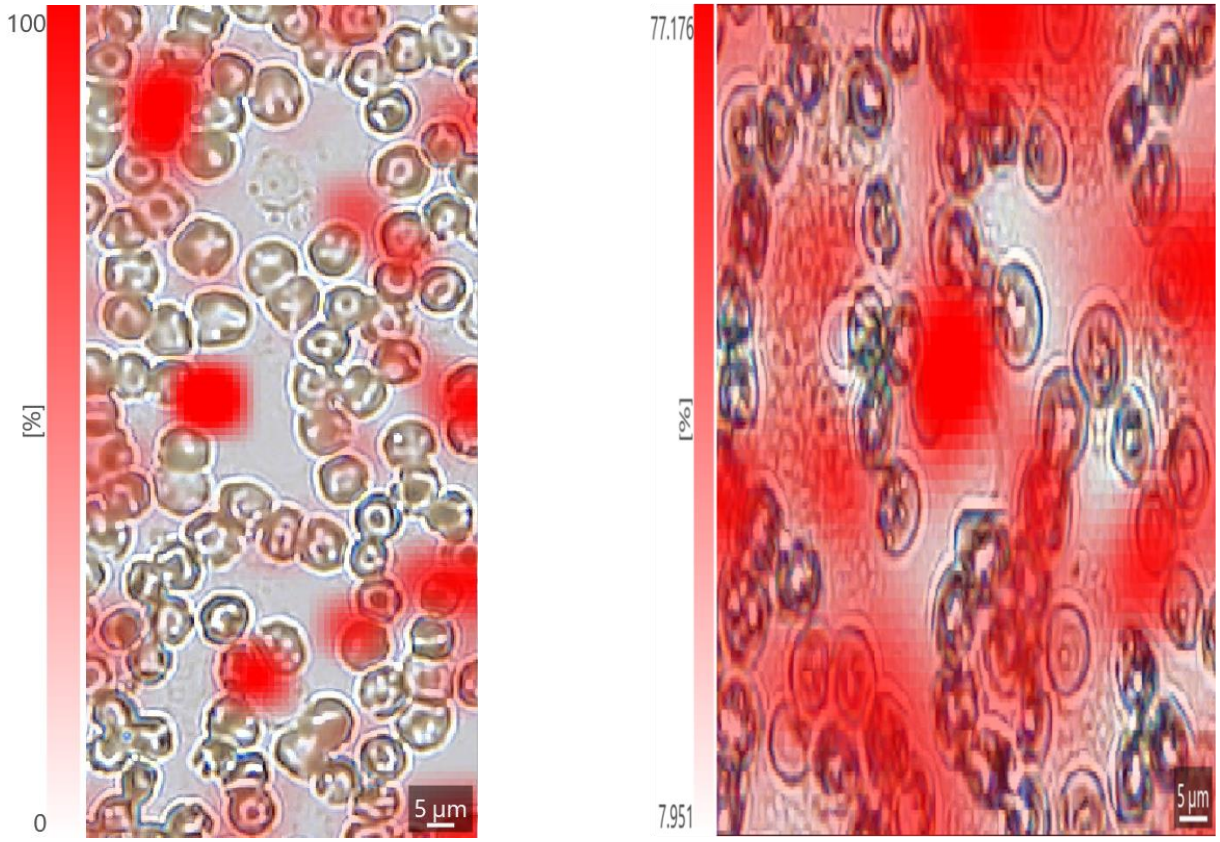
(a)

(b)



Slika 1. Ukupni maseni spektar za krvni razmaz s promjerom lasera 5 µm u negativnom (a) i pozitivnom (b) ionskom načinu rada.

Slika 1. sastoji se od dva ukupna spektra krvnog razmaza, dobivenih s promjerom lasera 5 µm i rasponom masa od 600 do 900 Da, prema postavkama iz Tablice 1. Crvenim krugovima označen je hem kao indikator kvalitete. Iz spektara je vidljivo da je signal hema jači u spektru (b) u odnosu na spektar (a).



(a) (b)

Slika 2. Prikaz prostorne raspodjele hema (označen crvenom bojom) u krvnom razmazu u negativnom (a) i pozitivnom (b) ionskom načinu rada s promjerom lasera 5 µm.

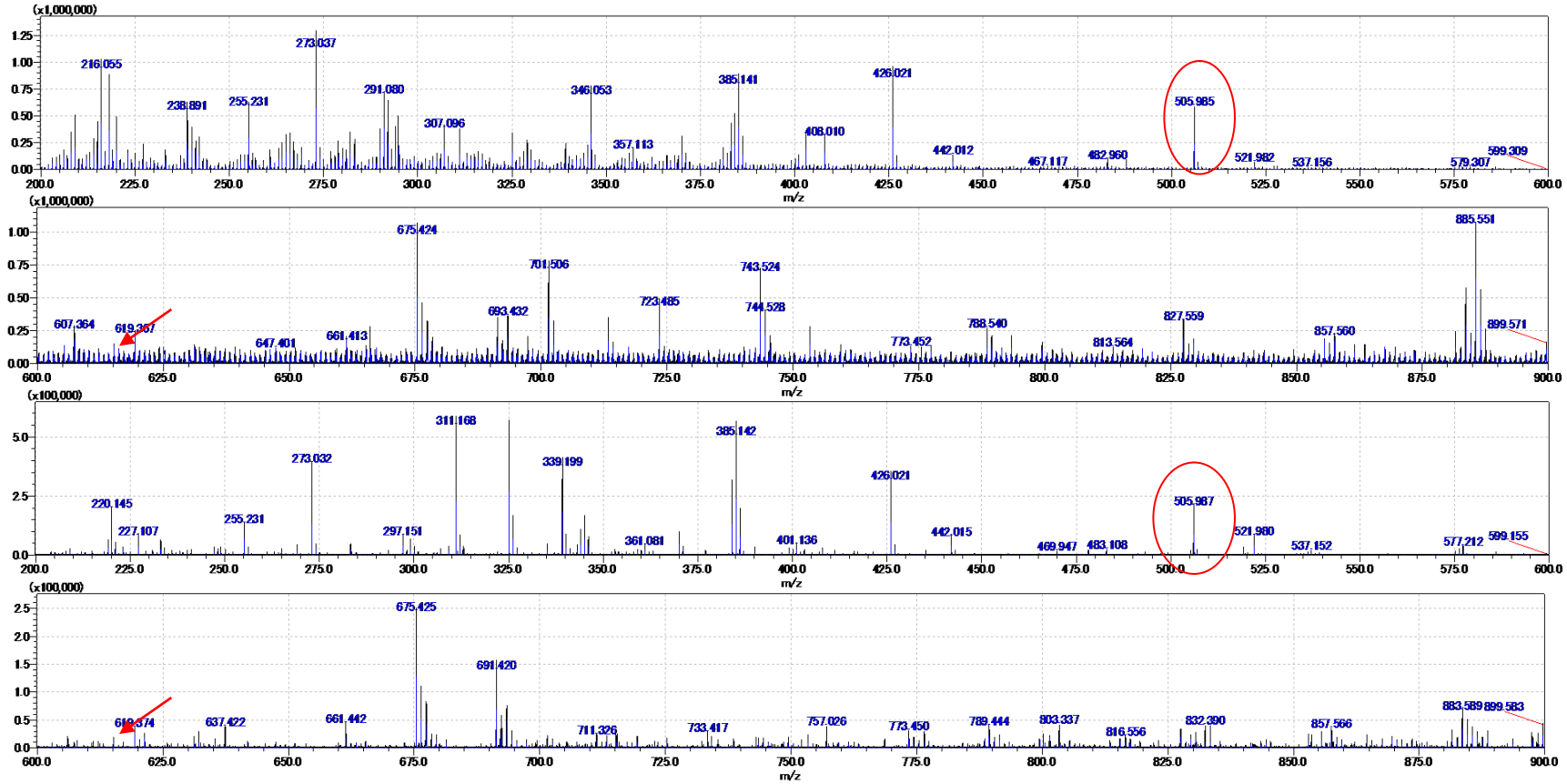
Slika 2. prikazuje raspodjelu hema u krvnom razmazu u negativnom (a) i pozitivnom (b) ionskom načinu rada s postavkama lasera u kojima je promjer lasera 5 µm. Hem je označen crvenom bojom. Iz slika je vidljivo da je prilikom priprave krvnog razmaza došlo do hemolize eritrocita jer se hem ne nalazi samo u eritrocitima, nego i u međustaničnom prostoru. Unatoč tome, hem je bolje smješten u stanicama u negativnom ionskom načinu, korištenjem matrice 9-AA (a), nego u pozitivnom ionskom načinu rada, korištenjem matrice CHCA (b).

5. 2. Pregled masenih spektara za trombocitno - leukocitni međusloj

Trombocitno - leukocitni međusloj pripremljen je prema prethodno navedenom protokolu u pozitivnom i negativnom ionskom načinu rada i u rasponu masa m/z od 200 do 600 i od 600 do 900 Da te s promjerima lasera 5 i 10 µm prema postavkama koje su navedene u Tablici 1.

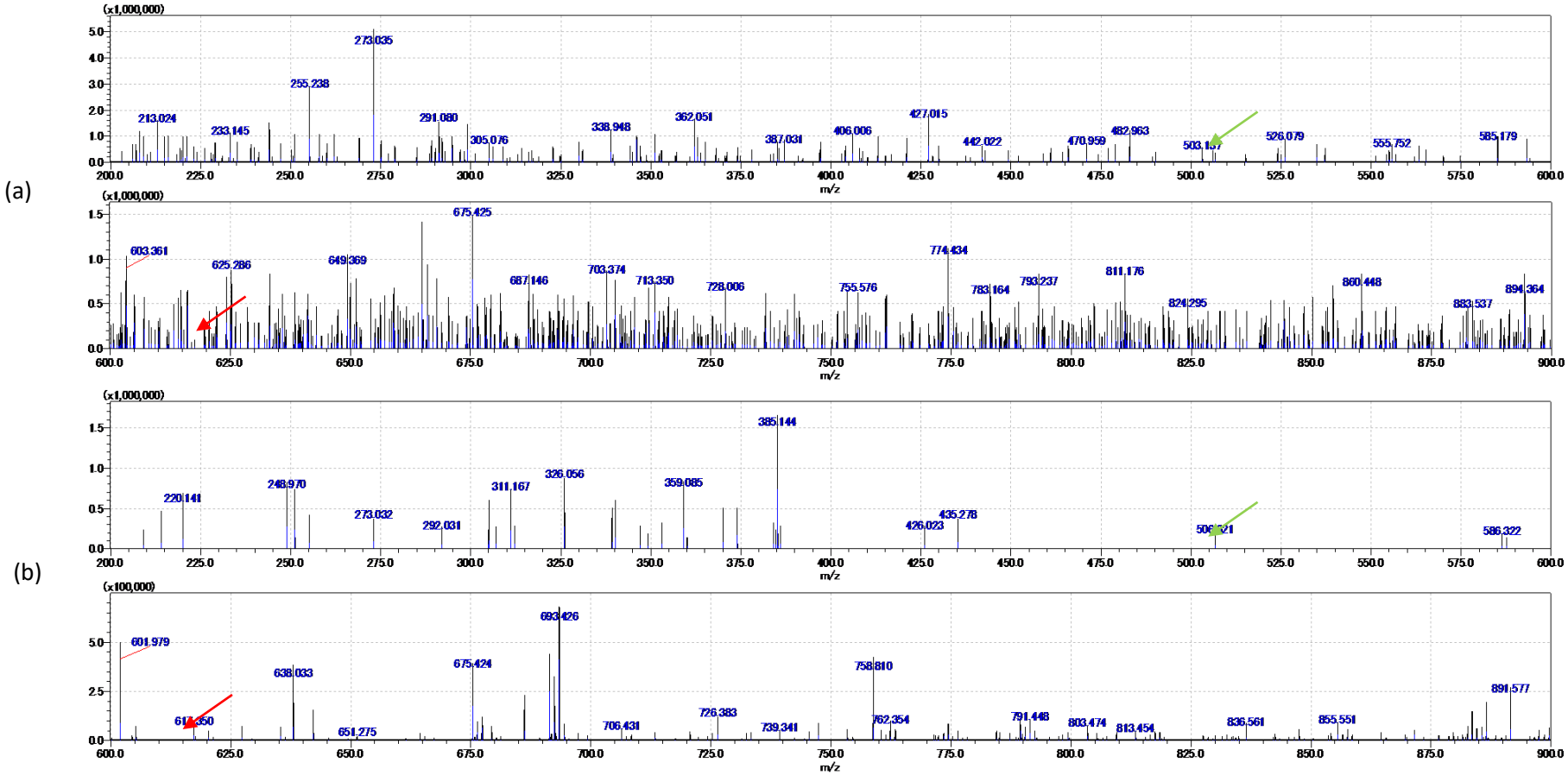
(a)

(b)



Slika 3. Maseni spektri ukupnog trombocitno - leukocitnog međusloja u negativnom ionskom načinu s promjerom lasera 5 µm (a) i 10 µm (b), korištenjem matrice 9-AA. Crvenim krugom označen je ATP, a crvenom strelicom mjesto gdje bi se trebao nalaziti hem.

Slika 3. sastoji se od četiri spektra ukupnog trombocitno - leukocitnog sloja, od kojih su prva dva spektra (a) dobivena s postavkama lasera u kojima je njegov promjer 5 µm i raspon masa od 200 do 600 i od 600 do 900 Da, a druga dva spektra (b) s promjerom lasera 10 µm i rasponom masa od 200 do 600 i od 600 do 900 Da prema postavkama iz Tablice 1. Crvenim krugom označen je ATP kao indikator kvalitete. Iz spektara je vidljivo da ima manje signala dobivenih s promjerom lasera 10 µm (b) te da su slabiji u odnosu na signale dobivene s promjerom lasera 5 µm (a).

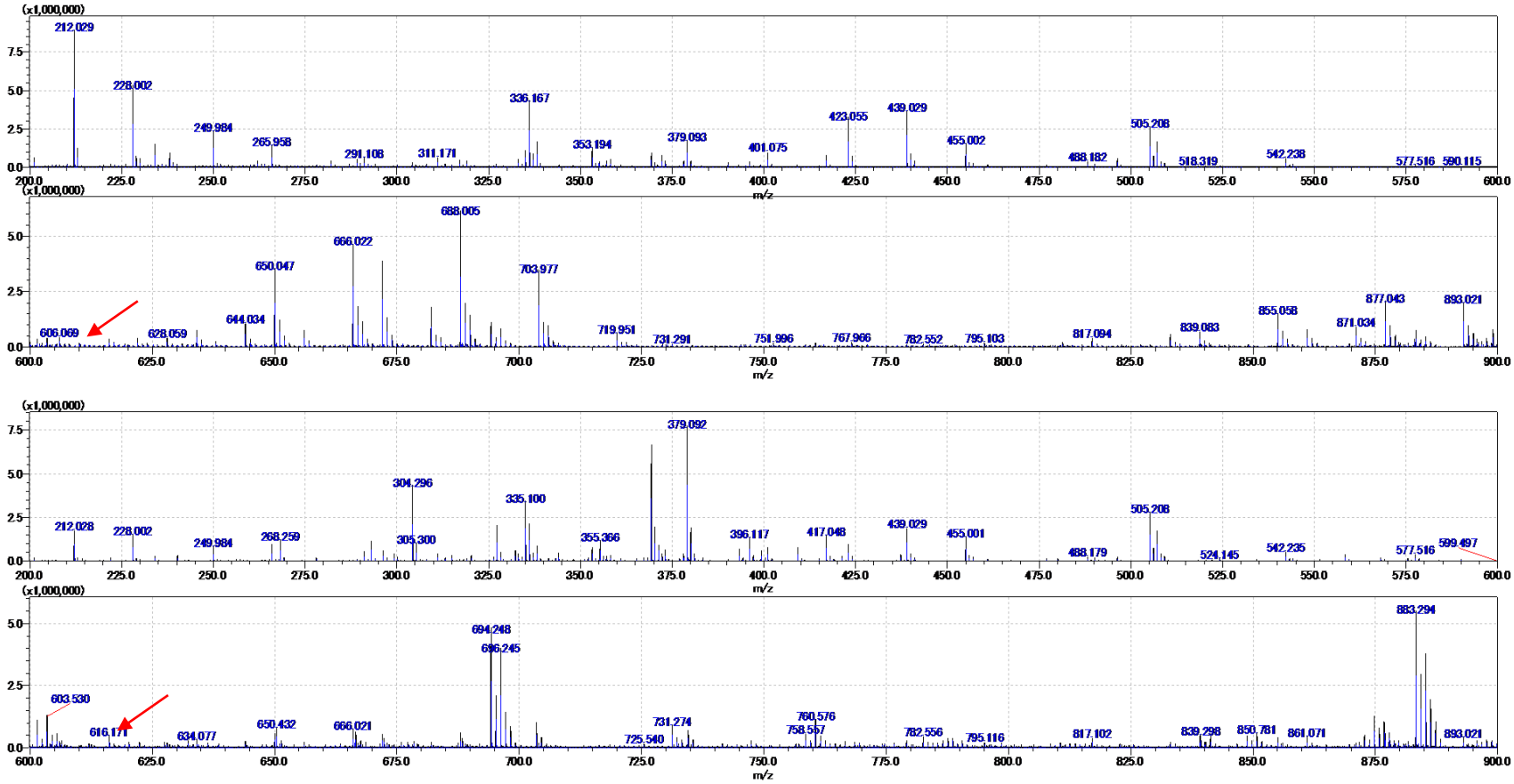


Slika 4. Maseni spektri jednog leukocita iz trombocitno - leukocitnog međusloja u negativnom ionskom načinu s promjerom lasera 5 µm (a) i 10 µm (b), korištenjem matrice 9-AA. Crvenom strelicom označeno je mjesto gdje bi trebao biti hem, a zelenom strelicom mjesto gdje bi trebao biti ATP.

Slika 4. sastoji se od četiri spektra jednog leukocita iz trombocitno - leukocitnog međusloja, od kojih su prva dva spektra (a) dobivena s postavkama lasera u kojima je njegov promjer 5 µm i raspon masa od 200 do 600 i od 600 do 900 Da, a druga dva spektra (b) s promjerom lasera 10 µm i rasponom masa od 200 do 600 i od 600 do 900 Da prema postavkama iz Tablice 1. Iz spektara je vidljivo da u spektrima dobivenima s promjerom lasera 5 µm (a) ima više šumova u odnosu na spektre dobivene s promjerom lasera 10 µm (b), stoga su spektri (b) pogodniji za promatranje količine određenih molekula u leukocitu.

(a)

(b)

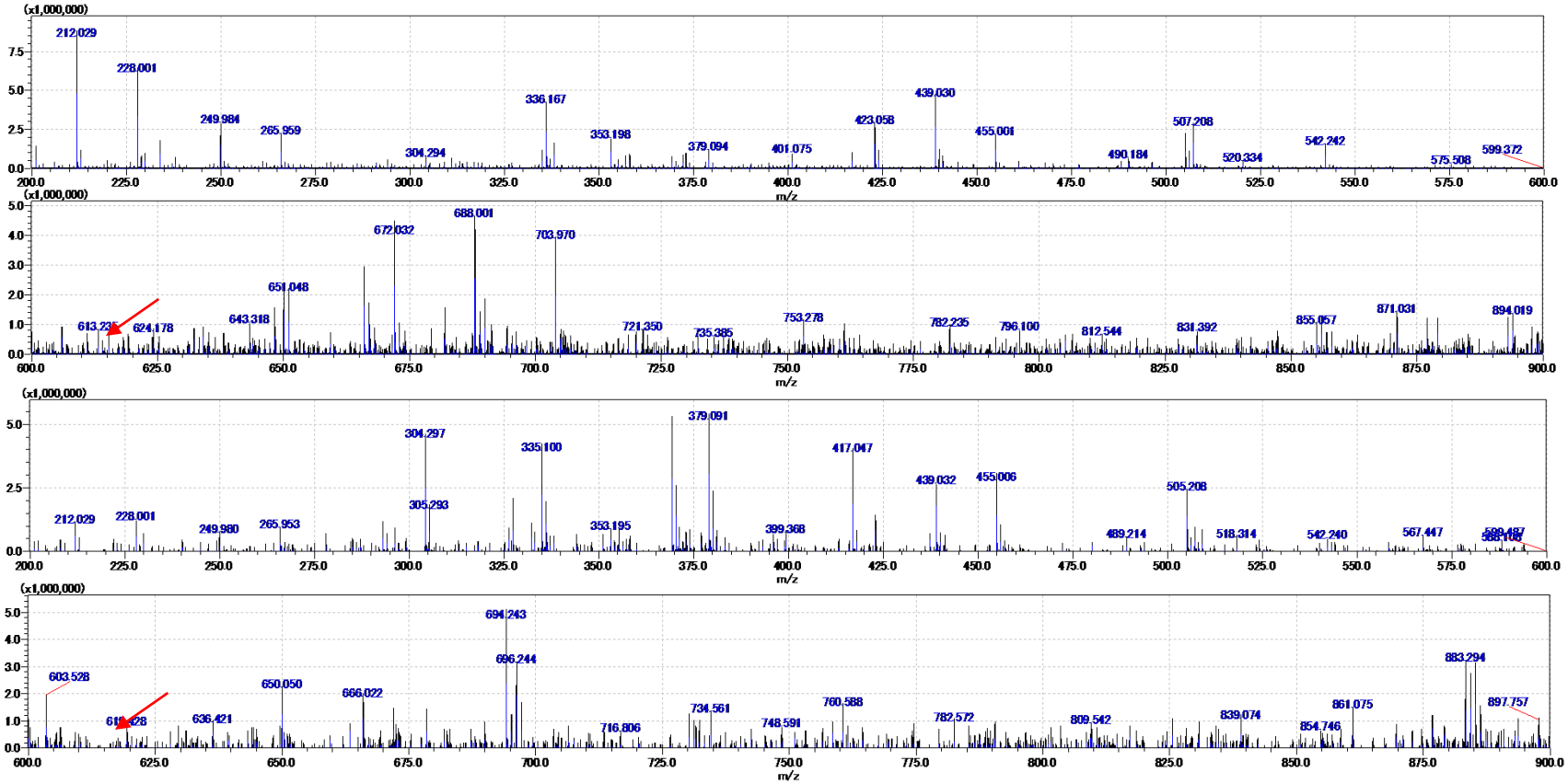


Slika 5. Maseni spektri ukupnog trombocitno - leukocitnog međusloja u pozitivnom ionskom načinu s promjerom lasera 5 µm (a) i 10 µm (b), korištenjem matrice CHCA. Crvenom strelicom označeno je mjesto gdje bi trebao biti hem.

Slika 5. sastoji se od četiri spektra ukupnog trombocitno - leukocitnog sloja, od kojih su prva dva spektra (a) dobivena s postavkama lasera u kojima je njegov promjer 5 µm i raspon masa od 200 do 600 i od 600 do 900 Da, a druga dva spektra (b) s promjerom lasera 10 µm i rasponom masa od 200 do 600 i od 600 do 900 Da prema postavkama iz Tablice 1. Iz spektara je vidljivo da su signali dobiveni za promjer lasera 5 µm (a) jači u odnosu na signale dobivene za promjer lasera 10 µm (b), odnosno da nemaju isti uzorak signala.

(a)

(b)



Slika 6. Maseni spektri jednog leukocita u trombocitno - leukocitnom međusloju u pozitivnom ionskom načinu s promjerom lasera 5 µm (a) i 10 µm (b), korištenjem matrice CHCA. Crvenom strelicom označeno je mjesto gdje bi trebao biti hem.

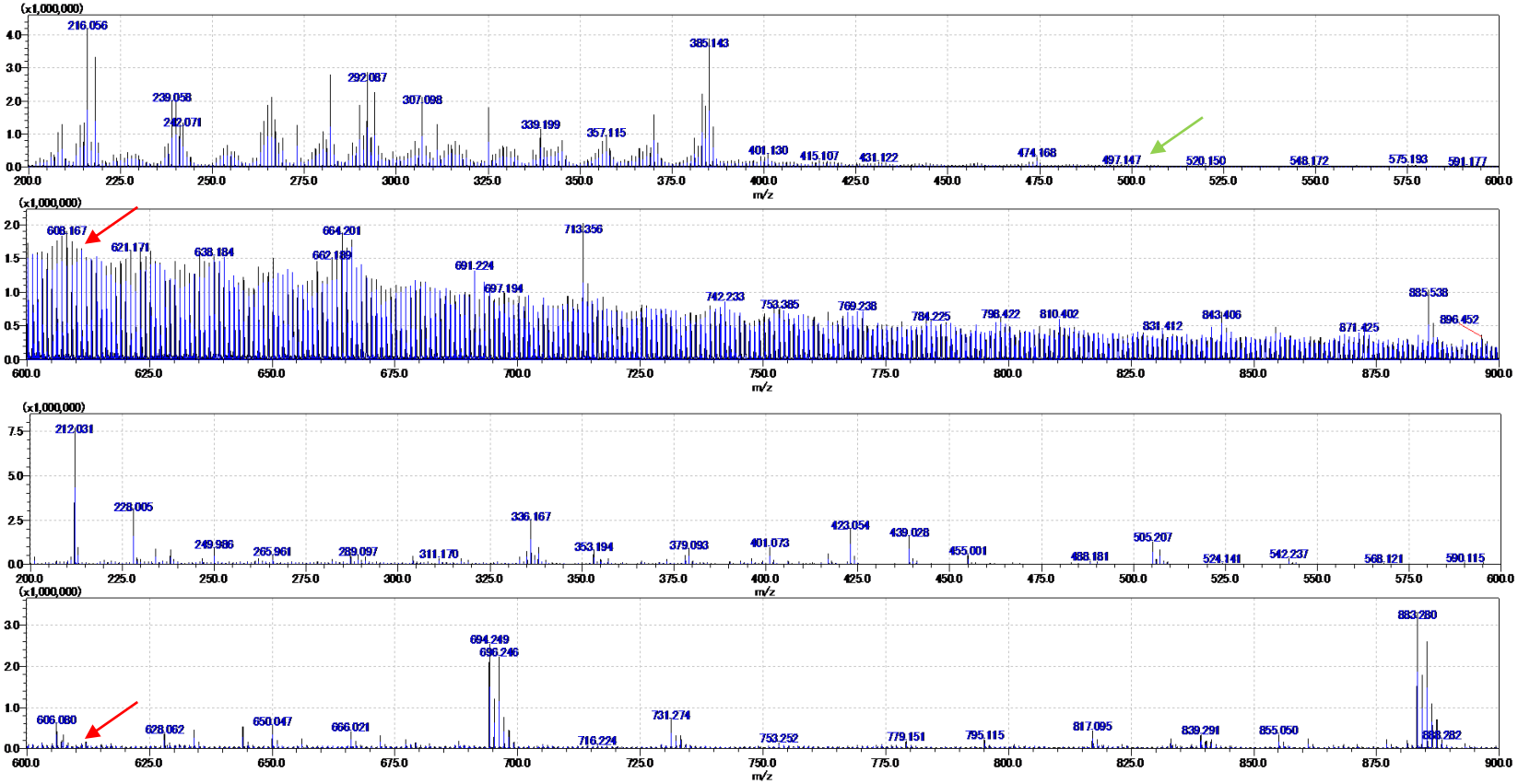
Slika 6. sastoji se od četiri spektra jednog leukocita u trombocitno - leukocitnom međusloju, od kojih su prva dva spektra (a) dobivena s postavkama lasera u kojima je njegov promjer 5 µm i raspon masa od 200 do 600 i od 600 do 900 Da, a druga dva spektra (b) s promjerom lasera 10 µm i rasponom masa od 200 do 600 i od 600 do 900 Da prema postavkama iz Tablice 1. Vidljivo je da se spektri međusobno kvalitativno razlikuju.

5. 3. Pregled masenih spektara i slika dobivenih nakon izolacije leukocita

Izolacija leukocita napravljena je prema prethodno navedenom protokolu u pozitivnom i negativnom ionskom načinu rada i u rasponu masa m/z od 200 do 600 i od 600 do 900 Da te s promjerima lasera 5 i 10 µm prema postavkama koje su navedene u Tablici 1.

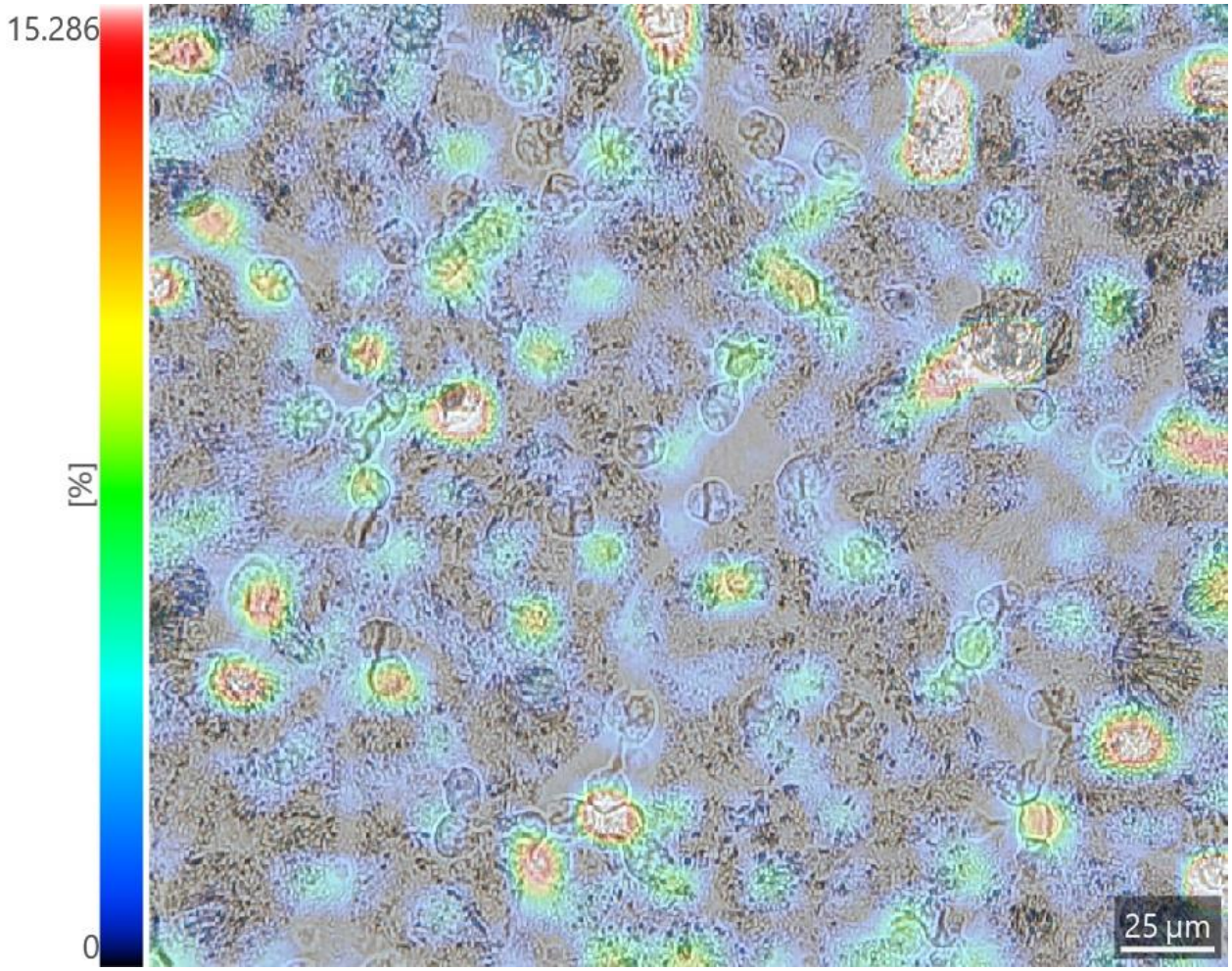
(a)

(b)



Slika 7. Prikaz ukupnih spektara nakon izolacije leukocita u negativnom (a) i pozitivnom (b) ionskom načinu rada s promjerom lasera 5 µm. Crvenom strelicom označeno je mjesto gdje bi trebao biti hem, a zelenom strelicom mjesto gdje bi trebao biti ATP.

Slika 7. sastoji se od četiri ukupna spektra za izolaciju leukocita, od kojih su prva dva spektra (a) dobivena s postavkama lasera u kojima je promjer lasera 5 µm i raspon masa od 200 do 600 i od 600 do 900 Da u negativnom ionskom načinu (matrica 9-AA), a druga dva spektra (b) s promjerom lasera 5 µm i rasponima masa od 200 do 600 i od 600 do 900 Da u pozitivnom ionskom načinu (matrica CHCA), prema postavkama iz Tablice 1. Iz spektara je vidljivo da u negativnom ionskom načinu (a), u odnosu na pozitivni (b), ima više signala.



Slika 8. Raspodjela ATP - a u leukocitima u negativnom ionskom načinu s promjerom lasera 5 µm.

Slika 8. prikazuje raspodjelu ATP - a u leukocitima u negativnom ionskom načinu (matrica 9-AA) s promjerom lasera 5 µm. Iz slike je vidljivo da ATP nije smješten samo u leukocitima, nego se, u manjoj količini, nalazi i u međustaničnom prostoru.

6. RASPRAVA

U provedenom istraživanju razvijeni su protokoli za tri različite pripreme krvnog razmaza za MALDI TOF MS slikovnu analizu. Osim protokola, odabrani su uvjeti snimanja koji daju optimalne rezultate u pozitivnom i negativnom ionskom načinu rada, odnosno korištenjem matrica CHCA i 9-AA. Prilikom odabira uvjeta snimanja, ispitivani su promjeri lasera od 5 i 10 µm, veličina okvira za laser, broj snimaka po pikselu te frekvencija i intenzitet lasera. Kao i u istraživanju provedenom 2020. godine (18), za pokazatelje kvalitete odabrani su ATP za leukocite i hem za eritrocite. ATP i hem, kao i njihovi omjeri mase i naboja, identificirani su u Kyoto enciklopediji gena i genoma (engl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG*). Jedna od funkcija hema je da u eritrocitima, kao dio hemoglobina, služi u prijenosu kisika (20). ATP u leukocitima služi kao supstrat i inhibitor sinteze DNA, a u eritrocitima može poslužiti kao sekundarni izvor energije (18).

Prvi protokol odnosi se na pripremu razmaza iz pune krvi za MALDI TOF MS slikovnu analizu. U odnosu na istraživanje provedeno 2020. godine (18), prilikom izrade krvnog razmaza, korištena je 150 mM otopina amonijevog acetata te je upotreba polarnih otapala, u ovom slučaju apsolutnog metanola, za fiksaciju krvnog razmaza smanjena s 5 sekundi na 1. Amonijev acetat dosad se nije koristio za tretiranje krvnih stanica. Istraživanja koja uključuju amonijev acetat provedena su na masenoj spektrometriji s elektrosprej ionizacijom (engl. *Electrospray Ionization -Mass Spectrometry, ESI-MS*) i to kako bi se povećala osjetljivost i selektivnost metode te poboljšala ionizacija analita. Utvrđeno je da amonijev acetat, zahvaljujući svojoj hlapljivoj prirodi, ne pogoršava kvalitetu dobivenih spektara, nego čak može suzbiti stvaranje neželjenih adukata soli natječući se s nehlapljivim elektrolitima za vezna mjesta na površini proteina (21, 22). U prilog tome idu i maseni spektri dobiveni snimanjem krvnog razmaza u pozitivnom i negativnom ionskom načinu s promjerom lasera 5 µm, prethodno tretiranog s amonijevim acetatom. U spektrima su vidljivi signali ATP - a i hema kao indikatora kvalitete, što u prethodnom istraživanju (6), gdje nije bilo tretiranja stanica s ovom soli, nije slučaj. Osim korištenja amonijevog acetata i smanjenja vremena fiksacije krvnog razmaza, povećana je veličina okvira za laser, kao i intenzitet lasera što je utjecalo na bolju usmjerenost lasera prema stanicama, a time i na jačinu signala. Negativna strana amonijevog acetata je što može uzrokovati hemolizu stanica. Hem se nalazi unutar stanica, ali i u međustaničnom prostoru, a

objašnjenje za to je u pripremi krvnog razmaza i upotrebi amonijevog acetata koja mora biti kratka, nakon čega razmaz treba osušiti na zraku. Amonijev acetat uzrokuje hemolizu eritrocita jer je membrana eritrocita, kada je eritrocit izložen 150 mM otopini soli amonijevog acetata, slabo propusna za amonijev ion, kao i za druge katione, ali vrlo propusna za amonijak koji je prisutan u vanjskoj otopini te se uspostavlja nova ravnoteža koja uzrokuje bubrenje stanice i hemolizu (23). Iz prostorne raspodjele hema može se primijetiti da je hem bolje smješten u stanicama u negativnom ionskom načinu, korištenjem matrice 9-AA, što se može pripisati svojstvima matrice. Krvni razmaz sniman je u pozitivnom i negativnom ionskom načinu s matricama CHCA i 9-AA. Kao što je vidljivo iz spektara, signal hema je nešto slabiji s promjerom lasera 5 µm u negativnom ionskom načinu, korištenjem matrice 9-AA, u odnosu na pozitivni ionski način i matricu CHCA. Moguće je da je na slabiji signal utjecala matrica jer jačina signala, učinkovitost ionizacije i prostorna razlučivost ovise o stvaranju kristala matrice, jednakoj raspodjeli po uzorku, što nije uvijek jednostavno postići (18). Prilikom slikovne obrade krvnih razmaza, uočeno je da je, zbog neravnomjerno nanesene matrice, značajno otežano razlikovanje krvnih stanica i traženje leukocita. Uz to, teško je, ponekad i nemoguće, razlikovati mononuklearne od polimorfonuklearnih leukocita. Amonijev acetat, u prethodno opisanoj pripremi krvnog razmaza, daje bolje signale ATP - a i hema, ali i hemolizira eritrocite. Od korištenih matrica, bolju raspodjelu signala i lokalizaciju hema u stanicama daje matrica 9-AA.

Drugi protokol odnosi se na pripremu trombocitno - leukocitnog međusloja. Na ovaj način pripremljen razmaz, sniman je u pozitivnom i negativnom ionskom načinu, korištenjem matrica CHCA i 9-AA. Slikovnom obradom tako pripremljenog razmaza, uočeno je da su leukociti prekriveni trombocitima te da nije moguće tvrditi da je dobiveni maseni spektar zaista spektar leukocita, odnosno trombocita. Kao i prilikom priprave krvnog razmaza iz pune krvi, isti nedostatak javlja se i u ovoj pripravi jer se ne mogu sa sigurnošću razlikovati vrste leukocita. Također, vidljivost stanica i njihovih jezgara ovisi o nanošenju i ravnomjernoj raspodjeli matrice. Unatoč nedostacima, vidljivo je da su signali dobiveni snimanjem ukupnog spektra trombocitno - leukocitnog međusloja u negativnom ionskom načinu s promjerom lasera 5 µm i matricom 9-AA, jači i brojniji od onih dobivenih s promjerom lasera 10 µm te da su time postavke s laserom promjera 5 µm informativnije. Može se primijetiti da na tim spektrima na nema signala hema, što može značiti da je priprema trombocitno - leukocitnog međusloja dobro izvedena, odnosno da kod izdvajanja sloja leukocita i trombocita nije došlo do izdvajanja eritrocita ili da je prilikom

analize, primjenom odabranih uvjeta snimanja, laser usmjeren na leukocit, što potvrđuje dobiveni signal ATP - a. S druge strane, pregledom spektra samo jednog leukocita, vidljivo je da je spektar dobiven s promjerom lasera 10 µm jednostavniji za analizu jer ima manje signala. Jačina signala u spektrima s postavkama lasera 5 i 10 µm je podjednaka. Kod promjera lasera 5 µm, laserska zraka je više usmjerena i time dobijemo veliki broj signala. Kada je promjer lasera 10 µm, laserska zraka je manje usmjerena, ali je intenzitet lasera veći. Spektri jednog leukocita ne prikazuju signale hema i ATP - a, što može značiti da je laserska zraka usmjerena na međustanični prostor ili trombocite i da nije obuhvatila leukocit. Spektri dobiveni snimanjem ukupnog trombocitno - leukocitnog međusloja u pozitivnom ionskom načinu pokazuju da su signali dobiveni s promjerom lasera 5 µm jači u odnosu na signale dobivene s promjerom lasera 10 µm te da su takve postavke pogodnije za promatranje ukupnog spektra. Iste informacije dobiju se pregledom masenih spektara jednog leukocita u trombocitno - leukocitnom međusloju u pozitivnom ionskom načinu, gdje su signali dobiveni s promjerom lasera 5 µm jači u odnosu one dobivene s promjerom lasera 10 µm. U oba slučaja nema signala hema, što može biti potvrda dobre priprave trombocitno - leukocitnog međusloja. Gore navedena priprava trombocitno - leukocitnog međusloja nije pogodna za analizu jer su leukociti prekriveni trombocitima, ali prilikom analize u pozitivnom i negativnom ionskom načinu rada, bolje signale i bolji ukupni spektar daju postavke s promjerom lasera 5 µm.

Treća priprema odnosi se na izolaciju leukocita. Nakon izolacije leukocita, pripremljeni uzorak sniman je u pozitivnom i negativnom ionskom načinu, korištenjem matrica CHCA i 9-AA. Da bi se dobili leukociti, korišten je amonijev klorid koji je lizirao eritrocite, a trombociti su uklonjeni prilikom centrifugiranja. Amonijev klorid je sredstvo za hemolizu eritrocita koje se prvi put počelo koristiti još 1897., a danas svoju primjenu pronalazi i u protočnoj citometriji. Kada jednom uđe u stanicu, uspostavlja se nova ravnoteža između amonijaka i amonijevog iona i unutarstanični hidroksidni ion mijenja se za izvanstanični kloridni, što rezultira priljevom amonijevog klorida i dovodi do hemolize (24). Nakon priprave uzorka prema navedenom protokolu, dobiju se leukociti čije se jezgre ne mogu jasno razlikovati nakon nanošenja matrica. Vidljivo je da se spektri dobiveni u negativnom ionskom načinu sastoje od mnogo signala, što otežava analizu, dok ih u pozitivnom ionskom načinu ima manje. U oba slučaja, bolji spektri dobiju se ako se promjer lasera postavi na 5 µm. Još jedan nedostatak ove priprave je da zbog načina pripreme stanica, odnosno njihove obrade u nekoliko faza, može doći do puknuća stanica,

odnosno, stanični će sadržaj biti vidljiv izvan stanica. Također, u spektrima nema signala hema i ATP - a. Nedostatak signala ATP - a može značiti da prilikom analize laserska zraka nije bila usmjerena na leukocit, što dovodi u pitanje postavke lasera, odnosno jesu li one prikladne za ovu vrstu pripreme. Izolacija leukocita uključuje dva koraka ispiranja puferiranom otopinom fosfatnih soli (engl. *Phosphate - buffer saline, PBS*) kojima se uklanjaju ostaci liziranih eritrocita, što objašnjava nedostatak hema u spektrima i potvrđuje valjanost protokola za izolaciju leukocita.

Pregledom spektara jednog leukocita u pozitivnom i negativnom ionskom načinu rada za trombocitno - leukocitni međusloj, pokazalo se da je u negativnom ionskom načinu spektar dobiven s promjerom lasera 10 µm jednostavniji za analizu jer ima manje signala, dok je u pozitivnom ionskom načinu rada, za analizu pogodniji spektar dobiven s promjerom lasera 5 µm. Kod izolacije leukocita, dobiveni spektri pokazuju mnogo signala, što otežava analizu, ali je u oba ionska načina rada, bolji spektar dobiven s promjerom lasera 5 µm. Unatoč jednostavnosti spektra dobivenog pregledom leukocita u trombocitno - leukocitnom međusloju, treba uzeti u obzir moguću nesigurnost u interpretaciji rezultata jer su leukociti većinom prekriveni trombocitima pa se ne može točno znati čiji se stanični kemijski sastav pregledava. U tom smislu, spektri dobiveni analizom izoliranih leukocita, unatoč brojnosti signala, predstavljaju dobar temelj za pregled kemijskog sastava leukocita jer nema ostalih stanica poput eritrocita i trombocita, a kao provjera pravilne izolacije može poslužiti vizulani pregled dobivenog uzorka i pregled spektra u kojem bi trebao biti signal ATP - a, a nedostajati signal hema.

7. ZAKLJUČAK

Nakon provedenog istraživanja i dobivenih rezlutata, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Upotrebom amonijevog acetata pojačava se signal ATP - a i hema
- Trombocitno - leukocitni međusloj sadrži leukocite prekrivene trombocitima, što otežava analizu leukocita
- Nakon izolacije leukocita, u prostorima između leukocita javljaju se unutarstanične molekule
- Krvni razmaz sadrži previše eritrocita koji su lizirali - dokaz tome su maseni spektri
- Bolju ionizaciju analita daju postavke s promjerom lasera 5 µm
- Bolje lokaliziranu raspodjelu signala u spektrima daje primjena matrica 9-AA

8. SAŽETAK

Priprema krvnog razmaza za MALDI TOF MS slikovnu analizu

Ciljevi istraživanja: Ciljevi ovog istraživanja su razviti metodu za analizu krvnog razmaza pomoću MALDI TOF MS tehnologije, odnosno poboljšati ionizaciju analita od interesa, izolaciju pojedinih staničnih loza te optimirati uvjete snimanja.

Nacrt studije: Predklinički razvoj laboratorijskog postupka.

Ispitanici i metode: U istraživanje su bila uključena 4 muška ispitanika, dobrovoljna davatelja krvi. Nakon venepunkcije, krv je podvrgnuta pripremi krvnih razmaza prema tri različita protokola. Različito pripremljeni uzorci nanošeni su na ITO stakla i podvrgnuti slikovnoj analizi na MALDI TOF MS uređaju.

Rezultati: Krvni razmaz pripremljen prema prvom protokolu, uz upotrebu amonijevog acetata, daje bolje signale ATP - a i hema, ali i hemolizira eritrocite. Priprema trombocitno - leukocitnog međusloja rezultirala je prekrivenošću leukocita trombocitima, što nije pogodno za analizu, a prilikom izolacije leukocita, upotrebom amonijevog klorida, nije moguće razlikovati vrste leukocita te zbog opsežne obrade stanica postavlja se pitanje pouzdanosti rezultata.

Zaključak: Najbolju ionizaciju analita daju postavke uređaja s laserom promjera 5 µm, a korištenje matrice 9-AA omogućuje bolje usmjerenu raspodjelu signala u spektrima. Za analizu kemijskog sastava eritrocita jedino je prikladan krvni razmaz kojeg treba manje izlagati amonijevom acetatu, a za analizu kemijskog sastava leukocita, od ispitanih pristupa, najpogodniji je pristup temeljen na izolaciji.

KLJUČNE RIJEČI: krvni razmaz; MALDI TOF; slikovna masena spektrometrija

9. SUMMARY

Blood Smear Preparation for MALDI TOF MS Imaging

Objectives: The main objectives of this research were to develop a method for blood smear analysis using MALDI TOF MS imaging technology, to improve the ionization of analytes of interest, isolation of individual cell lines and to optimize imaging conditions.

Study design: Preclinical development of laboratory procedure.

Participants and methods: In this research we have included 4 male participants, voluntary blood donors. After venipuncture, the blood was subjected to the preparation of blood smears according to the three different protocols. Differently prepared samples were applied to ITO slides and analyzed using MALDI TOF IMS.

Results: Blood smear prepared according to the first protocol, with the use of ammonium acetate, gives better signals of ATP and heme, but also hemolyzes erythrocytes. Preparation of buffy coat resulted in leukocyte overlap with platelets, which is not suitable for analysis. After the leukocytes isolation, using ammonium chloride, it is not possible to distinguish the types of leukocytes and due to over - processing of the cells, during preparation, the question of the reliability of the results arises.

Conclusion: The best ionization of the analyte is given by the laser firing paramters that include laser diameter of 5 µm and the use of a matrix 9-AA contributes to the better targeted signal distribution in the spectra. For the analysis of the chemical composition of erythrocytes, blood smear is the most suitable, but should be less exposed to ammonium acetate, and for the analysis of the chemical composition of leukocytes, the most suitable approach is based on isolation.

KEYWORDS: blood smear; imaging mass spectrometry; MALDI TOF

10. LITERATURA

1. Lopez - Fernandez H, Santos HM, Capelo JL, Fdez - Riverola F, Glez - Pena D, Reboiro - Jato M. Mass - Up: an all - in - one open software application for MALDI - TOF mass spectrometry knowledge discovery. BMC Bioinformatics. 2015; 16: 318.
2. Chen K, Baluya D, Tosun M, Li F, Maletic - Savatic M. Imaging Mass Spectrometry: A New Tool to Assess Molecular Underpinnings of Neurodegeneration. Metabolites. 2019; 9: 135.
3. Ludwig KR, Hummon AB. Mass Spectrometry for the Discovery of Biomarkers of Sepsis. Mol Biosyst. 2017; 13 (4): 648 - 664.
4. Buchberger AR, DeLaney K, Johnson J, Li L. Mass Spectrometry Imaging: A Review of Emerging Advancements and Future Insights. Anal Chem. 2018; 90 (1): 240 - 265.
5. Karlsson O, Hanrieder J. Imaging mass spectrometry in drug development and toxicology. Arch Toxicol. 2017; 91: 2283 - 2294.
6. Singhal N, Kumar M, Kanauija PK, Virdi JS. MALDI - TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Front. Microbiol. 2015; 6: 791.
7. Emine B, de la Monte YSM. Review of Matrix assisted Laser Desorption Ionization - Imaging Mass Spectrometry for Lipid Biochemical Histopathology. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 2015; 63 (10): 762 - 77.
8. Leopold J, Popkova Y, Engel KM, Schiller J. Recent Developments of Useful MALDI Matrices for the Mass Spectrometric Characterization of Lipids. Biomolecules. 2018; 8: 173.
9. Jurinke C, Oeth P, van den Boom D. MALDI TOF Mass Spectrometry. Molecular Biotechnology. 2004; 26 (2): 147 - 163.
10. Hyun Ko K, Kwon C, Hye Park S, Young Han N, Keun Lee H, Hee Kim E, i sur. Application of Matrix - Assisted Laser Desorption / Ionization Time - of - Flight Imaging Mass Spectrometry (MALDI - TOF IMS) for Premalignant Gastrointestinal Lesions. Clin Endosc. 2013; 46: 611 - 619.

11. Tsuchida S, Umemura H, Nakayama T. Current Status of Mastrix - Assisted Laser Desorption / Ionization - Time- of - Flight Mass Spectrometry (MALDI - TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology. Molecules. 2020; 25: 4775.
12. Siegel TP, Hamm G, Bunch J, Cappell J, Fletcher JS, Schwamborn K. Mass Spectrometry Imaging Modalities for Greater Molecular Understanding of Biological Tissues. Mol Imaging Biol. 2018; 20: 888 - 901.
13. Spraker JE, Luu GT, Sanchez LM. Imaging mass spectrometry for natural products discovery: a review of ionization methods. Nat Prod Rep. 2020; 37 (2): 150 - 162.
14. Adewoyin AS, Nwogoh B. Peripheral Blood Film - Review. Ann Ibd. Pg. Med. 2014; 12 (2): 71 - 79.
15. Gulati G, Song J, Dulau Florea A, Gong J. Purpose and Criteria for Blood Smear Scan, Blood Smear Examination, and Blood Smear Review. Ann Lab Med. 2013; 33: 1 - 7.
16. Cressman ENK, Spraggins JM. Viewing the Future of IR through Molecular Histology: An Overview of Imaging Mass Spectrometry. J Vasc Inter Radiol. 2018; 29 (11): 1543 - 1546.
17. Pinho D, Carvalho V, Goncalves IM, Teixeira S, Lima R. Visualization and Measurements of Blood Cells Flowing in Microfluidic Systems and Blood Rheology: A Personalized Medicine Prespective. J. Pers. Med. 2020; 10: 249.
18. Debeljak Ž, Niehoff AC, Bandjak A, Mandić D, Bošnjak B, Heffer M, i sur. MALDI TOF Mass Spectrometry Imaging of Blood Smear: Method Development and Evaluation. Int. J. Mol. Sci. 2021; 22: 585.
19. Morse EE. Mechanisms of hemolysis in liver disease. Ann Clin Lab Sci. 1990; 20 (3): 169 - 74.
20. Chung J, Chen C, Paw BH. Heme Metabolism and Erythropoesis. Curr Opin Hematol. 2012; 19 (3): 156 - 162.
21. Majedi SM, Lai EPC. Mass Spectrometric Analysis of Bisphenol A Desorption from Titania Nanoparticles: Ammonium Acetate, Fluoride, Formate, and Hydroxide as Chemical Desorption Agents. Methods and Protoc. 2018; 1: 26.

22. Konermann L. Addressing a Common Misconception: Ammonium Acetate as Neutral pH “Buffer” for Native Electrosprey Mass Spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom. 2017; 28: 1827 - 1835.

23. Aubert L, Motais R. Molecular Features of Organic Anion Permeability in Ox Red Blood Cell. J. Physiol. 1975; 246: 159 - 179.

24. Chernyshev AV, Tarasov PA, Semianov KA, Nekrasov VM, Hoekstra AG, Maltsev VP. Erythrocyte lysis in isotonic solution of ammonium chloride: Theoretical modeling and experimental verification. Journal of Theoretical Biology. 2008; 251: 93 - 107.

11. ŽIVOTOPIS

Opći podatci

Ime i prezime : Davorka Bebek

Datum i mjesto rođenja: 06. travnja 1997. godine, Osijek

Adresa: Naselje Vladimira Nazora 17, 31000 Osijek

Kontakt: davorkabebek@gmail.com

Obrazovanje:

- 2019. - 2021. Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika u Osijeku
- 2016. - 2019. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika u Osijeku
- 2012. - 2016. Opća gimnazija Osijek

Nagrade:

Dekanova nagrada za uspješnost u studiranju u akademskoj godini 2019. / 2020.