

**Sveučilište u Zagrebu**

**Medicinski fakultet**

**Klara Bardač**

**Metabolički utjecaj inhibicije stearoil-koenzim A desaturaze  
na stanice akutne mijeloične leukemije**

**Zagreb, 2025.**

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za staničnu biologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga pod vodstvom doc. dr. sc. Vilme Dembitz, u sklopu znanstvenog projekta „Optimising therapies targeting fatty acid desaturation in AML“ financiranog od strane Europske hematološke asocijacije, šifra projekta: 120259, voditelj projekta: doc. dr. sc. Vilma Dembitz i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2024./2025.

## Popis i objašnjenje kratica

**ACC** - acetil-CoA karboksilaza (engl. *acetyl-CoA carboxylase*)

**ACLY** - ATP citrat-liaza (engl. *ATP citrate lyase*)

**AML** - akutna mijeloična leukemija (engl. *acute myeloid leukemia*)

**AMPK** - AMP-ovisna proteinska kinaza (engl. *AMP-dependent protein kinase*)

**BCAAs** - aminokiseline razgranatog lanca (engl. *branched-chain amino acids*)

**ER** - endoplazmatski retikulum (engl. *endoplasmic reticulum*)

**FASN** - sintaza masnih kiselina (engl. *fatty acid synthase*)

**GC-MS** - plinska kromatografija - masena spektrometrija (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*)

**LC-MS** - tekuća kromatografija - masena spektrometrija (engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*)

**MUFA** - mononezasićene masne kiseline (engl. *monounsaturated fatty acids*)

**PUFA** - polinezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*)

**ROS** - reaktivne kisikove molekule (engl. *reactive oxygen species*)

**SCD** - stearoil-koenzim A desaturaza (engl. *stearoyl CoA desaturase*)

**SFA** - zasićene masne kiseline (SFA, engl. *saturated fatty acids*)

**SNAT** - o natriju ovisan neutralni nosač aminokiselina (engl. *sodium-dependent neutral amino acid transporter*)

**TCA** - Krebsov ciklus, ciklus limunske kiseline ili ciklus trikarboksilnih kiselina (engl. *tricarboxylic acid cycle*)

**UPR** - odgovor na nepravilno savijene proteine (engl. *unfolded protein response*)

## Sadržaj

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Uvod.....                                                                                               | 1  |
| 2. Hipoteza.....                                                                                           | 5  |
| 3. Opći i specifični ciljevi rada.....                                                                     | 5  |
| 4. Materijali i metode.....                                                                                | 6  |
| 4.1. Kemikalije.....                                                                                       | 6  |
| 4.2. Stanična kultura.....                                                                                 | 6  |
| 4.3. Protočna citometrija.....                                                                             | 7  |
| 4.4. Metabolomska analiza tekućom kromatografijom-masenom spektrometrijom (LC-MS)....                      | 7  |
| 4.5. Provjera uloge učinka serije (engl. <i>batch effect</i> ).....                                        | 9  |
| 4.6. Označavanje glukozom.....                                                                             | 10 |
| 4.7. Statistička obrada.....                                                                               | 10 |
| 5. Rezultati.....                                                                                          | 10 |
| 5.1. Osjetljivost pojedinih staničnih linija AML-a na SSI-4.....                                           | 10 |
| 5.2. Metabolomska analiza leukemijskih staničnih linija.....                                               | 12 |
| 5.2.1. Metabolički profil AML staničnih linija u kontrolnim uvjetima.....                                  | 12 |
| 5.2.2. Metabolomska analiza AML staničnih linija u kontrolnim uvjetima i nakon<br>tretiranja sa SSI-4..... | 14 |
| 5.2.3. Obilježavanje metabolita u MOLM-13 staničnoj liniji <sup>13</sup> C glukozom.....                   | 16 |
| 5.2.4. Ovisnost toksičnosti SSI-4 o unosu glutamina u leukemijske stanice.....                             | 19 |
| 5.2.5. Metabolomska analiza staničnog medija.....                                                          | 20 |
| 5.2.6. Ovisnost toksičnosti SSI-4 o dostupnosti drugih aminokiselina u staničnom<br>mediju.....            | 21 |
| 6. Rasprava.....                                                                                           | 23 |
| 7. Zaključci.....                                                                                          | 25 |

|                          |    |
|--------------------------|----|
| 8. Zahvale.....          | 26 |
| 9. Popis literature..... | 27 |
| 10. Sažetak.....         | 30 |
| 11. Summary.....         | 31 |
| 12. Životopis.....       | 32 |

## 1. Uvod

Akutna mijeloična leukemija (AML) brzoprogresivna je neoplazma hematopoetskih matičnih stanica koja nastaje uslijed nekontroliranoga umnažanja njihove mijeloidne loze u koštanoj srži (Vakiti i sur.-2025). Iako ciljana terapija sve više dobiva na važnosti u njezinu liječenju te je tijekom posljednja dva desetljeća odobreno čak osam novih ciljanih terapija za AML, prognoza ovih bolesnika i dalje je nepovoljna, s dugoročnim preživljenjem od svega oko 30% (Cocchi i sur.-2021). Jedna od ključnih prepreka njihovoj široj primjeni jest značajna klonalna heterogenost bolesti, zbog koje terapije usmjerene na određene mutacije donose tek djelomičan i kratkotrajan učinak (Dembitz i sur.-2025). Osim toga, većina trenutno dostupnih ciljanih terapija usmjerena je na mutacije prisutne tek kod dijela oboljelih (Dembitz i sur.-2025).

Reprogramiranje staničnog metabolizma i puteva dobivanja energije jedno je od temeljnih svojstava tumorskih stanica prema poznatom radu Hanahana i Weinberga, koji su izdvojili ključne karakteristike odgovorne za njihov neograničeni rast i preživljenje (Hanahan i sur.-2011). Jedna od glavnih razlika u odnosu na zdrave stanice jest Warburgov efekt, obilježen visokom potrošnjom glukoze i pojačanom glikolizom neovisno o dostupnosti kisika (Warburg i sur.-1927). U slučaju leukemijskih stanica je, izuzev Warburgovog efekta, za dobivanje energije neizostavna komponenta i mitohondrijska oksidativna fosforilacija. Stoga su dosadašnja istraživanja pokušavala djelovati na leukemijske stanice upravo lijekovima usmjerenima na mitohondrijski metabolizam, no zbog njegove sveprisutnosti u zdravim stanicama takav se pristup nije pokazao prikladnim zbog izražene toksičnosti (Dembitz i sur.-2025).

S druge strane, lipidni metabolizam pokazuje značajne razlike između zdravih i tumorskih stanica. Naime, u zdravom organizmu, *de novo* sinteza masnih kiselina odvija se primarno u jetri, adipocitima i dojka u periodu laktacije, dok ostale stanice preuzimaju masne kiseline iz izvanstaničnog prostora (Röhrig i sur.-2016). Nasuprot tomu, tumorske se stanice u velikoj mjeri oslanjaju na vlastitu *de novo* sintezu masnih kiselina nužnih za širok dijapazon biokemijskih procesa (Röhrig i sur.-2016). Reprogramiranje lipidnog metabolizma predstavlja ključnu prilagodbu na nepovoljni, lipidima siromašni tumorski mikrookoliš te omogućuje daljnju proliferaciju i širenje bolesti (Broadfield i sur.-2021, Röhrig i sur.-2016). Naime, one služe kao izvor energije u uvjetima velikih metaboličkih potreba brzoproliferirajućih stanica (Koundouros i sur.-2020), sudjeluju u izgradnji staničnih membrana te pomažu tumorskim stanicama u održavanju redoks ravnoteže tijekom hipoksije (Tracz-Gaszewska i sur.-2019).

Pojačana aktivnost enzima pomoću kojih masne kiseline nastaju iz citrata i acetil-koenzima A - ATP-citrat liaze (ACLY, engl. *ATP citrate lyase*), acetil-koenzim A karboksilaze (ACC, engl. *acetyl-CoA carboxylase*) i sintaze masnih kiselina (FASN, engl. *fatty acid synthase*), povezana je s uznapredovalim stadijima malignih bolesti (Tracz-Gaszewska i sur.-2019), a njihova se inhibicija već dugo istražuje kao potencijalna meta u razvoju terapije za solidne tumore (Röhrig i sur.-2016). Povećana ekspresija FASN zabilježena je i u fetalnim tkivima za koja je karakteristična velika proliferativna aktivnost, što upućuje na povezanost pojačane lipogeneze s dediferencijacijom stanica (Röhrig i sur.-2016). Pa ipak, u slučaju AML-a, uloga ovih enzima još uvijek nije u potpunosti razjašnjena te su dosadašnja saznanja samo djelomično u suglasju s otkrićima u solidnim tumorima (Dembitz i sur.-2025). Naime, Dok ACLY i FASN doprinose leukemogenezi, za ACC se čini da ima suprotan, supresivni učinak (Dembitz i sur.-2025).

Osim po načinu opskrbe masnim kiselinama, tumorske od zdravih stanica razlikuje i njihov karakteristični sastav lipida. Obilježava ih visoki udio mononezasićenih masnih kiselina (MUFA, engl. *monounsaturated fatty acids*) nužnih za izgradnju staničnih membrana brzoproliferirajućih stanica služeći kao ishodišne molekule za fosfolipide (Tracz-Gaszewska i sur.-2019). Njihova nezasićenost pogoduje većoj fluidnosti same membrane, za razliku od membrana građenih od zasićenih masnih kiselina (SFA, engl. *saturated fatty acids*) čija rigidnost otežava transmembranski promet molekula (Oatman i sur.-2021). To je osobito važno za endoplazmatski retikulum (ER, engl. *endoplasmic reticulum*), čiji je transmembranski promet konstitucionalno aktivan jer je on glavno mjesto sinteze proteina i lipida (Oatman i sur.-2021). Dokazano je i da SFA izazivaju stres ER-a koji nadmašuje njegove obrambene mehanizme te na taj način potiču apoptozu (Wang i sur.-2006). Osim što su strukturno važne, MUFA su neophodne za brojne signalne puteve koji potiču stanični rast i proliferaciju (Tracz-Gaszewska i sur.-2019). Važne su i kao izvor energije, pa se tako leukemijske stanice pri  $\beta$ -oksidaciji primarno oslanjaju upravo na njih (Dembitz i sur.-2025). Također, izrazito važnu ulogu imaju i u zaštiti od stresa izazvanog toksičnim nakupljanjem SFA i polinezasićenih masnih kiselina (PUFA, engl. *polyunsaturated fatty acids*), koje lako podliježu peroksidaciji i dovode do stvaranja reaktivnih kisikovih molekula (ROS, engl. *reactive oxygen species*) (Röhrig i sur.-2016, Southam i sur.-2015).

Glavni enzim u sintezi MUFA-e jest stearoil-CoA desaturaza (SCD, engl. *stearoyl CoA desaturase*), smještena u ER-u, a katalizira stvaranje dvostruke veze na cis-9 poziciji SFA (Tracz-Gaszewska i sur.-2019). Tako iz palmitata (C16:0) i stearata (C18:0) nastaju mononezasićene masne kiseline palmitoleat (C16:1) i oleat (C18:1) (Dembitz i sur.-2025). U ljudskim tkivima postoji

u dvije izoforme - SCD1 i SCD5, od kojih je SCD1 znatno zastupljenija, nalazeći se u svim vrstama stanica, a najviše u plućima, jetri, srcu, mozgu i masnom tkivu (Tracz-Gaszewska i sur.-2019).

SCD1 ima ključnu ulogu u održavanju ravnoteže SFA/MUFA u svim stanicama, koja je važna u regulaciji staničnog metabolizma i homeostaze (Sen i sur.-2023). Poremećaj njihovog omjera primijećen je u brojnim metaboličkim i neurološkim poremećajima, kao i u malignim bolestima (Sen i sur.-2023). Naime, održavanjem povoljnog SFA/MUFA omjera SCD1 potiče tumorski rast, lokalnu invaziju i razvoj metastaza (Tracz-Gaszewska i sur.-2019). Brojne *in vitro* studije pokazale su da je njegova ekspresija povišena u tumorskim u odnosu na zdrave stanice (Roongta i sur.-2011) te da njegova pojačana aktivnost doprinosi preživljenju stanica različitih solidnih tumora (Li Y i sur.-2024, Roongta i sur.-2011, Southam i sur.-2015). Nasuprot tomu, inhibicija SCD1 suprimirala je proliferaciju i potaknula apoptozu, također u različitim solidnim tumorima, i u staničnim kulturama i u životinjskim modelima (Tracz-Gaszewska i sur.-2019). Naknadno dodavanje njegova glavnog produkta, oleata, ublažilo je učinke apoptoze i smanjilo stvaranje ROS-a, (Hess i sur.-2010, Southam i sur.-2015), a dodavanjem palmitata, zasićene masne kiseline, postiže se pak suprotni učinak (Southam i sur.-2015). Također, važno je istaknuti kako su stanice s većom ekspresijom SCD1 povezane s većom osjetljivošću na njegovu inhibiciju (Roongta i sur.-2011), pa se tako pokazalo kako u slučaju humanih fibroblasta, koji ne ovise o endogenoj sintezi MUFA-e, njegova inhibicija nije utjecala na proliferacijsku aktivnost (Hess i sur.-2010).

U slučaju solidnih tumora dokazano je više mehanizama putem kojih navedena inhibicija SCD-a i posljedično povećanje SFA/MUFA omjera dovode do stanične smrti. Jedan od ključnih jest već spomenuti stres ER-a, uzrokovan pojačanom ugradnjom zasićenih fosfolipida u njegove membrane, što rezultira smanjenom membranskom fluidnošću i stabilnošću (Tracz-Gaszewska i sur.-2019). ER odgovara na stres aktivacijom zaštitnog mehanizma poznatog kao odgovor na nepravilno savijene proteine (UPR, engl. *unfolded protein response*), koji uključuje niz proteina odgovornih za održavanje funkcionalnosti i sinteze proteina, među njima i šaperone, proteine ključne za pravilno savijanje i stabilnost novonastalih peptida (Liu i sur.-2014). U uvjetima dugotrajnog ili intenzivnog stresa, poput onog uzrokovanog inhibicijom SCD1, UPR aktivira alternativne signalne puteve koji vode do apoptoze (Liu i sur.-2014). Istodobna inhibicija UPR proteina djelomično poništava proapoptotski učinak SCD1 inhibitora, dodatno potvrđujući važnost ovog mehanizma (Li Y i sur.-2024).

Osim apoptoze, inhibicija SCD1 enzima potiče još jedan oblik stanične smrti - ferroptozu, što proizlazi iz njegove ključne uloge u regulaciji iste (Sen i sur.-2023). Radi se o strogo reguliranom

mehanizmu nekroze koji je karakteriziran nakupljanjem lipidnih hidroperoksida, nastalih peroksidacijom PUFA-e u uvjetima pojačanog unosa i skladištenja unutarstaničnog željeza (Stockwell i sur.-2017). Visoke razine željeza povećavaju stvaranje ROS-a, dok inhibicija SCD1 povećava udio PUFA-e, idealnog supstrata za lipidnu peroksidaciju (Sen i sur.-2023). Povišena ekspresija SCD1 i posljedično veća količina MUFA-e u tumorskim stanicama pokazali su protektivni učinak protiv ferroptoze, što je potvrđeno i dodavanjem egzogene MUFA-e (Sen i sur.-2023, Yi J i sur.-2020).

Kliničke studije pokazale su da je SFA/MUFA omjer snižen u pacijenata s određenim vrstama karcinoma, uključujući rak prostate, dojke, jetre, gušterače i kolorektalni karcinom, a za neke od njih (npr. dojku i prostatu) predloženo je uvođenje ovog omjera kao potencijalnog prognostičkog biomarkera (Tracz-Gaszewska i sur.-2019). I u slučaju AML-a povišena ekspresija SCD povezana je s lošijom prognozom (Dembitz i sur.-2025). Usprkos tim obećavajućim epidemiološkim nalazima, SCD je dugo bio izazovna terapijska meta za farmakološku inhibiciju zbog nepostojanja inhibitora kliničkog stupnja s prihvatljivim profilom toksičnosti (Tracz-Gaszewska i sur.-2019).

U slučaju leukemijskih stanica, dostupno je tek nekoliko studija koje su eksperimentalno ispitivale učinke inhibicije SCD1. Inhibicija SCD1 u AML staničnim linijama s FLT3 mutacijom pojačala je osjetljivost stanica na inhibiciju FLT3 receptora i drugih staničnih antioksidativnih sustava, povećavši razine lipidnog oksidativnog stresa (Sabatier i sur.-2023). Nadalje, studija Southam i suradnika ispitivala je učinak kombinacije bezafibrata i medroksiprogesteron acetata (BaP), koja uzrokuje inhibiciju niza enzima zaduženih za *de novo* sintezu masnih kiselina uključujući SCD, na stanične linije AML-a i limfoma te zamijetila toksično djelovanje (Southam i sur.-2015).

U studiji Dembitz i suradnika (Dembitz i sur.-2024) farmakološka inhibicija SCD-a koristeći spoj SSI-4, za koji je pokazano da ima povoljan toksikološki profil i ne uzrokuje znatnije nuspojave u *in vivo* modelima (von Roemeling i sur.-2017), ostvarila je znatan antileukemijski učinak *in vivo* bez djelovanja na normalnu hematopoezu te je zamijećeno smanjenje vijabilnosti stanica AML, kako staničnih linija tako i primarnih uzoraka oboljelih, u odgovoru na *in vitro* izlaganje SSI-4. Zbog obećavajućih eksperimentalnih nalaza, trenutno je u tijeku faza 1 kliničkog ispitivanja MTI-301/SSI-4 u liječenju neresektabilnih i metastatskih solidnih tumora (NCT06911008).

Usprkos jasnom antileukemijskom fenotipu zamijećenom u navedenoj studiji (Dembitz i sur.-2024), mehanizam toksičnosti inhibicije SCD-a po stanice AML-a ostaje nejasan. Stanice osjetljive na SSI-4 pokazuju veću ovisnost o desaturaciji masnih kiselina koja se pokazuje nižim bazalnim omjerom SFA/MUFA i većim padom proizvodnje palmitoleata i oleata u odgovoru na

inhibiciju SCD-a. Posljedično smanjenoj dostupnosti MUFA-e zamijećen je porast lipidne peroksidacije i nakupljanje lizofosfolipida, ali inhibicija lipidne peroksidacije ili općenito oksidativnog stresa ne umanjuje toksičnost SSI-4. Također, mehanizam stanične smrti u tim stanicama nije ferroptaza, a inhibicija ključnih proteina apoptotskog procesa tek djelomično umanjuje indukciju stanične smrti (Dembitz i sur.-2024). Slično kao u modelu glioblastoma (Pinkham i sur.-2019), inhibicija SCD-a u AML-u dovodi do aktivacije stresa ER-a i farmakološka inhibicija jednog od signalnih puteva povezanih sa stresom ER-a, PERK, u potpunosti uklanja toksične učinke SSI-4 na osjetljive stanice (Dembitz i sur.-2024).

Zanimljiva je, međutim, povezanost osjetljivosti stanica na inhibiciju SCD-a s aktivnošću AMP-ovisne proteinske kinaze (AMPK, engl. *AMP-dependent protein kinase*), jednoga od ključnih regulatora staničnog metabolizma (Scaglia i sur.-2009). Aktivacija AMPK koja potiče stanicu na prekapčanje prema katabolizmu i stvaranju ATP-a, umjesto biosinteze makromolekula, poništava sve toksične učinke SSI-4 na stanice AML-a (Dembitz i sur.-2024), naglašavajući povezanost osjetljivosti na inhibiciju SCD-a s metaboličkim statusom stanice. Sukladno tome, cilj ovoga rada bio je odrediti metabolički profil AML stanica pri primjeni SSI-4, inhibitora SCD1, kako bi se identificirale potencijalne metaboličke vulnerabilnosti koje bi mogle objasniti mehanizme njegove toksičnosti.

## **2. Hipoteza**

Toksičnost inhibitora SCD-a posljedica je opsežnih metaboličkih promjena koje izaziva u osjetljivim stanicama akutne mijeloične leukemije.

## **3. Opći i specifični ciljevi rada**

Opći cilj rada je odrediti metaboličku podlogu osjetljivosti na farmakološku inhibiciju SCD-a u staničnim linijama AML-a.

Specifični ciljevi rada su:

1. Odrediti inicijalni metabolički profil jako osjetljive stanične linije MOLM-13, srednje osjetljive stanične linije MV-4-11 i neosjetljive stanične linije OCI-AML3.
2. Izmjeriti promjene u koncentracijama topljivih metabolita u odgovoru na farmakološki inhibitor SCD-a SSI-4 u trima navedenim linijama.

3. Funkcionalno validirati utječu li eventualne metaboličke promjene u stanicama na poticanje stanične smrti.

## **4. Materijali i metode**

### **4.1. Kemikalije**

SSI-4 dobiven je u suradnji s tvrtkom Modulation Therapeutic Inc. (Morgantown, WV, SAD) te otopljen u DMSO do otopine temeljne koncentracije 10 mM. Annexin V-FITC protutijelo (#640945) i odgovarajući pufer (#422201) kupljeni su od tvrtke BioLegend (San Diego, CA, SAD), a otopina propidijevog jodida (P4864) od tvrtke Sigma Aldrich (Burlington, MA, SAD). Metanol, kloroform, acetonitril i voda odgovarajućeg stupnja za tekuću kromatografiju kupljeni su od tvrtke Carl Roth (Karlsruhe, Njemačka), a <sup>13</sup>C-glukoza od Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Tewksbury, MA, United States).

Mediji RPMI-1640, RPMI-1640 bez glukoze,  $\alpha$ -MEM, IMDM i HPLM te fetalni goveđi serum (FBS, prema engl. *fetal bovine serum*), otopina L-glutamina i otopina penicilina i streptomicina kupljeni su od tvrtke Gibco/Invitrogen (Grand Island, NY, SAD).

### **4.2. Stanična kultura**

Stanice MOLM-13, MV-4-11 i OCI-AML3 poklon su prof. dr. sc. P. Gallipolija (Barts Cancer Institute, London, UK). Sve stanične linije su validirane STR tipiziranjem (Eurofins Genomics). Kako bi se smanjila mogućnost pojave spontanih mutacija ili drugih promjena u staničnim linijama, korištene su za pokuse u razdoblju od 2 tjedna do 2 mjeseca od otapanja.

Stanice su uzgajane na temperaturi od 37 °C uz 5 %-tni CO<sub>2</sub> u mediju RPMI-1640 (MOLM-13 i MV-4-11) ili  $\alpha$ -MEM (OCI-AML3) s 10 % fetalnog goveđeg seruma, 2 mM L-glutamina, 50 U/mL penicilina i 50 µg/mL streptomicina.

Dan prije pokusa stanice su oprane u svježem mediju i zasađene u koncentraciji 500 000/mL kako bi na dan pokusa bile u ekspanzijskoj fazi rasta. Na dan pokusa zasađene su u svježem mediju u koncentraciji 200 000/mL i inkubirane sa SSI-4 24 sata (za metaboličke pokuse) ili 72 sata (za provjeru vijabilnosti).

### 4.3. Protočna citometrija

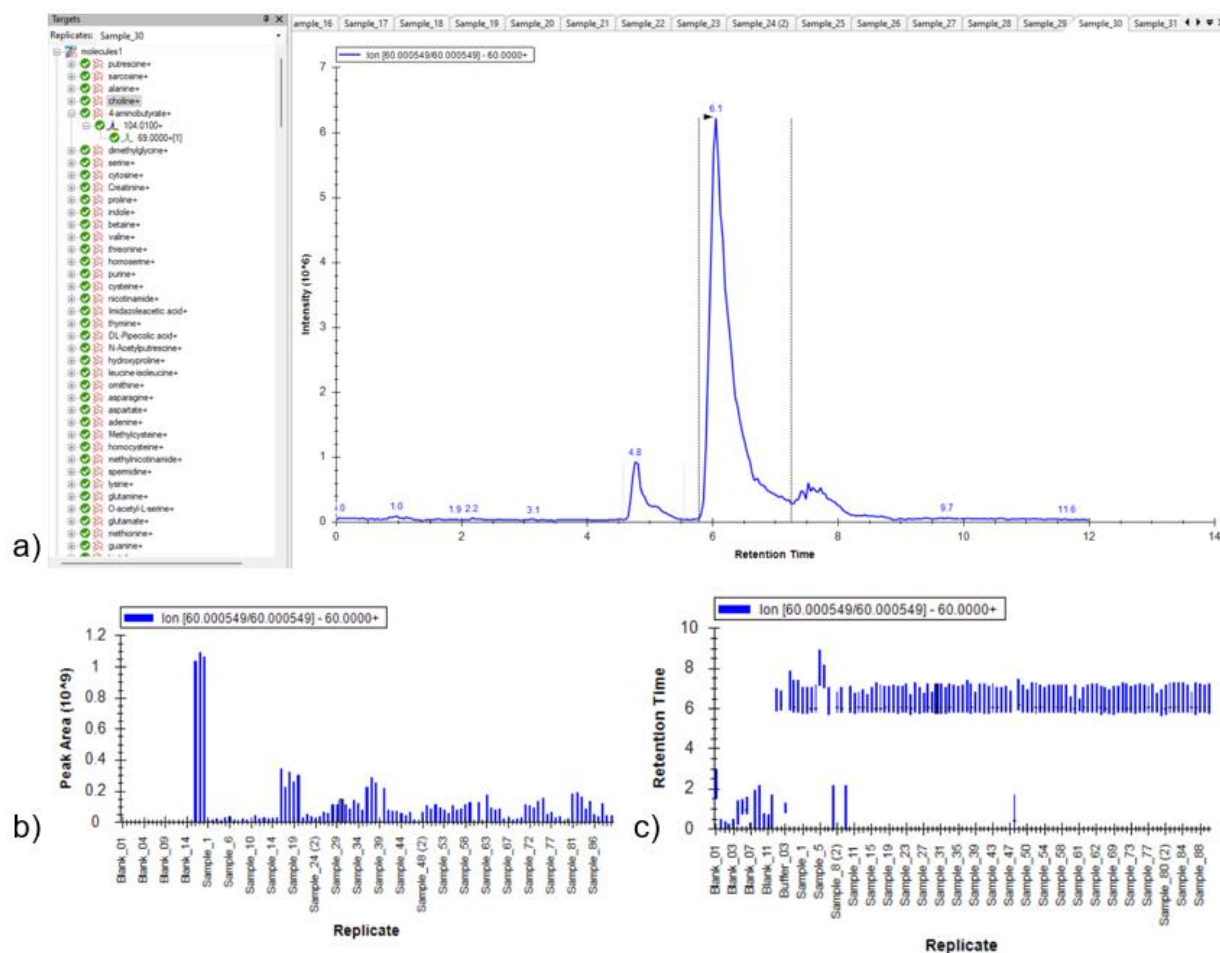
Za određivanje stanične vijabilnosti stanice su oprane u PBS-u, obilježene smjesom protutijela Annexin V-FITC (razrjeđenje 1:100) i propidij jodida (1 µg/mL), inkubirane 20 minuta na sobnoj temperaturi te analizirane koristeći uređaj FACS Canto II (Becton Dickinson).

Rezultati protočne citometrije obrađeni u računalnom programu FlowJo v10 (Becton Dickinson). Pri analizi podataka napravljena je ograda koja je isključila stanični debris, koristeći osobine izrazito niskog raspršenja laserske svjetlosti prema naprijed (FSC, engl. *forward scatter*) i u stranu (SSC, engl. *side scatter*). Potom je postavljena ograda na temelju jednostrukog bojanja, usporedbom obojenih i neobojenih stanica, uzevši intenzitet fluorescencije od  $10^3$  kao minimalni pozitivni signal. Stanice pozitivne na bojanje samo protutijelom na Annexin V smatraju se rano apoptotičnima, a stanice pozitivne na bojanje i protutijelom na Annexin V i propidijevim jodidom kasno apoptotičnima. Budući da se u ovome radu neće baviti apoptotskim mehanizmom, ovdje je fokus prvenstveno na padu broja vijabilnih stanica koje definiramo kao negativne i na Annexin V i na propidij jodid (Q4 kvadrant).

### 4.4. Metabolomska analiza tekućom kromatografijom-masenom spektrometrijom (LC-MS)

Za potrebe neciljane metabolomike stanice su uzgajane 24 sata u prisutnosti SSI-4 (1 µM) ili u kontrolnim uvjetima. Nakon pranja u hladnom PBS-u polarni metaboliti su izolirani otapalom ohlađenim na -20 °C koje se sastojalo od 40 % metanola, 40 % acetonitrila i 20 % vode te analizirani na Sveučilišnoj bolnici u Grazu u suradnji s dr. sc. Giovannyjem Rodriguez-Blancom. Analiza je provedena koristeći HILIC kolonu i mjerenje na uređaju Vanquish HPLC spojenim s Q-Exactive masenim spektrometrom (ThermoFisher Scientific).

Analiza podataka dobivenih LC-MS metodom provedena je pomoću softvera Skyline. Dobivene vrijednosti površine ispod krivulje (AUC, engl. *area under the curve*) korištene su kao relativna mjera koncentracije u daljnjoj statističkoj analizi i prikazu rezultata. Za svaki metabolit zasebno analiziran je oblik i položaj vrha na kromatogramu (engl. *peak area*) te uspoređen s odgovarajućim signalom u standardu. Metaboliti koji su pokazivali preveliku varijabilnost u vremenu zadržavanja ili nedovoljno izražen signal (intenzitet manji od  $5 \times 10^3$ ) smatrani su nepouzdana izmjerenima i isključeni su iz daljnje analize.



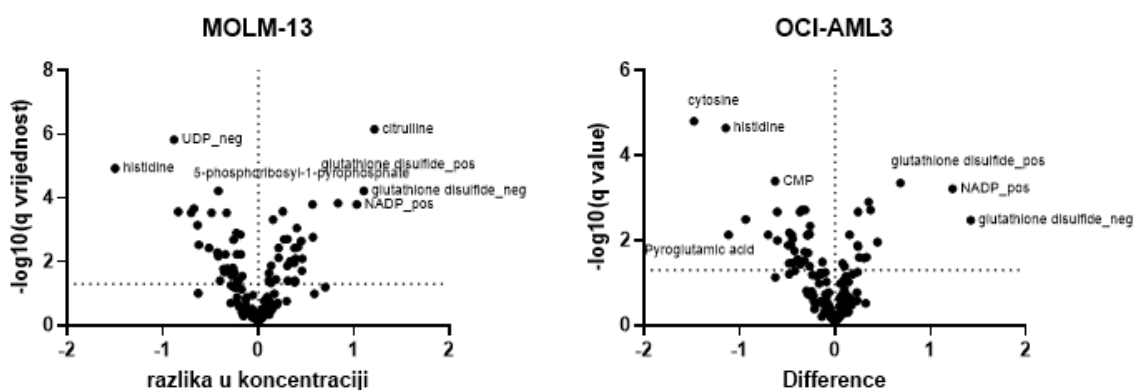
**Slika 1. Prikaz analize podataka dobivenih LC-MS metodom u softveru Skyline na primjeru kolina.** a) Glavni prozor prikazuje vrijeme zadržavanja metabolita (engl. retention time) u pojedinom uzorku. b) AUC vrijednosti za sve izmjerene uzorke. c) Usporedni prikaz vremena zadržavanja svih standardnih i ispitivanih uzoraka za isti metabolit.

Za potrebe analize potrošnje metabolita iz medija, prikupljen je medij u kojem su stanice uzgajane 24 sata i medij koji je inkubiran u jednakim uvjetima bez stanica. Metaboliti su izolirani i analizirani koristeći ranije opisanu metodu. Stanična potrošnja je izračunata oduzimanjem izmjerene vrijednosti u mediju u kojem su stanice uzgajane od vrijednosti u mediju bez stanica i normalizirana na broj stanica. Kako stanice neke metabolite otpuštaju u medij, u njemu su nakon 24 sata uzgoja bili prisutni metaboliti kojih nema u inicijalnoj formulaciji, a kojima je ovom tehnikom pridružena negativna vrijednost. Kako negativne vrijednosti nije moguće izraziti logaritamski u realnim brojevima, iz tog razloga ovi rezultati nisu prikazani logaritamski nego linearno.

#### 4.5. Provjera uloge učinka serije (engl. *batch effect*)

Metoda tekuće kromatografije-masene spektrometrije (LC-MS, engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*) je, zahvaljujući mogućnosti istovremene detekcije i kvantifikacije velikog broja molekula u biološkim uzorcima, danas jedna od ključnih analitičkih metoda u molekularnoj biologiji (Pelletier i sur.-2024). Međutim, prilikom izvođenja tako opsežnih eksperimenata i korištenja velikog broja uzoraka, zbog limitiranosti metode potrebno je tijekom istoga eksperimenta provesti uzorke u nekoliko različitih serija (Liu i sur.-2020). Već je dobro poznato da pri tomu postoji rizik od tzv. učinka serije (engl. *batch effect*), koji uvodi sustavnu pogrešku u mjerenje (Pelletier i sur.-2024). Do njega dolazi zbog varijabilnosti u pripremi uzoraka, vanjskim uvjetima poput temperature i vlažnosti, ali i funkcionalnosti i preciznosti samoga uređaja (Pelletier i sur.-2024). Učinak serije tako može dovesti do lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata, neovisno o biološkim raznolikostima.

Kako bismo dobili uvid u mogućnost uvođenja pogreške zbog učinka serije u našem modelu, izolirali smo metabolite iz stanica MOLM-13 i OCI-AML3 u pet tehničkih replikata u kontrolnim uvjetima. Metabolite iz istog izolata dva puta smo analizirali LC-MS metodom i zaista pronašli statistički značajnu razliku između dva mjerenja (**Slika 2**). Zato smo, kako bismo pojačali robusnost mjerenja, odabrali pristup u kojemu smo proveli dva neovisna pokusa, svaki s pet tehničkih replikata kontrolne i tretirane skupine za sve tri stanične linije, a kao značajne metabolite za daljnje analize odabrali smo samo one čija je koncentracija bila značajno promijenjena u oba pokusa.



**Slika 2. Učinak serije u mjerenju ne ciljane metabolomike.** Razlike u izmjenjenim koncentracijama pojedinih metabolita u dva različita mjerenja iz istih uzoraka (mjerenje 2 prema mjerenju 1). Nazivi metabolita istaknuti su samo za one čije su razlike u koncentraciji bile najizraženije. Y-os predstavlja q-vrijednosti ( $-\log_{10} q$ ), a kojima je izražena statistička značajnost.

#### 4.6. Označavanje glukozom

Stanice MOLM-13 uzgajane su 24 sata u RPMI-1640 mediju koji ne sadrži glukozu, obogaćenim s 2 g/L  $^{13}\text{C}$ -glukoze, a istovremeno su izložene djelovanju SSI-4 (1  $\mu\text{M}$ ). Nakon pranja stanica u hladnom PBS-u metaboliti su izolirani smjesom kloroforma i metanola (omjer 2:1) i osušeni u struji dušika. Izolacija na dobivenom talogu je ponovljena korištenjem smjese metanola i vode (omjer 2:1) i osušena u rotacijskom evaporatoru. Konačno je talog otopljen u smjesi kloroforma, metanola i vode (omjer 1:3:3), pri čemu gornja vodena faza sadrži polarne metabolite.

Uzorci su analizirani u suradnji s Richardom Burtom (Francis Crick Institute, London, UK) plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom (GC-MS, engl. *gas chromatography-mass spectrometry*) koristeći uređaj Agilent 7890B-7000C GC-triple-quadrupole MS. Podaci su obrađeni koristeći program MANIC koji je varijanta analitičkog paketa GAVIN. Zbog prirodne distribucije  $^{13}\text{C}$  atoma, metaboliti koji nisu sadržavali niti jedan  $^{13}\text{C}$  atom ili su sadržavali samo jedan smatrali su se neobilježenima, a oni koji su sadržavali više obilježenima.

#### 4.7. Statistička obrada

Podaci dobiveni LC-MS metodom i protočnom citometrijom obrađeni su u programu Microsoft Excel radi pripreme za daljnju statističku analizu.

Za statističku analizu podataka i grafičke prikaze metabolomske analize korišten je softver Graphpad Prism v10, u kojemu su razlike između skupina analizirane pomoću multiplih t-testova. Za određivanje razine značajnosti korištena je FDR metoda (False Discovery Rate) prema Benjamini, Krieger i Yekutieli, pri čemu je prag značajnosti postavljen na  $q < 0.05$ . Analiza vijabilnosti stanica provedena je korištenjem neparnog t-testa uz odabranu razinu značajnosti  $p < 0.05$ .

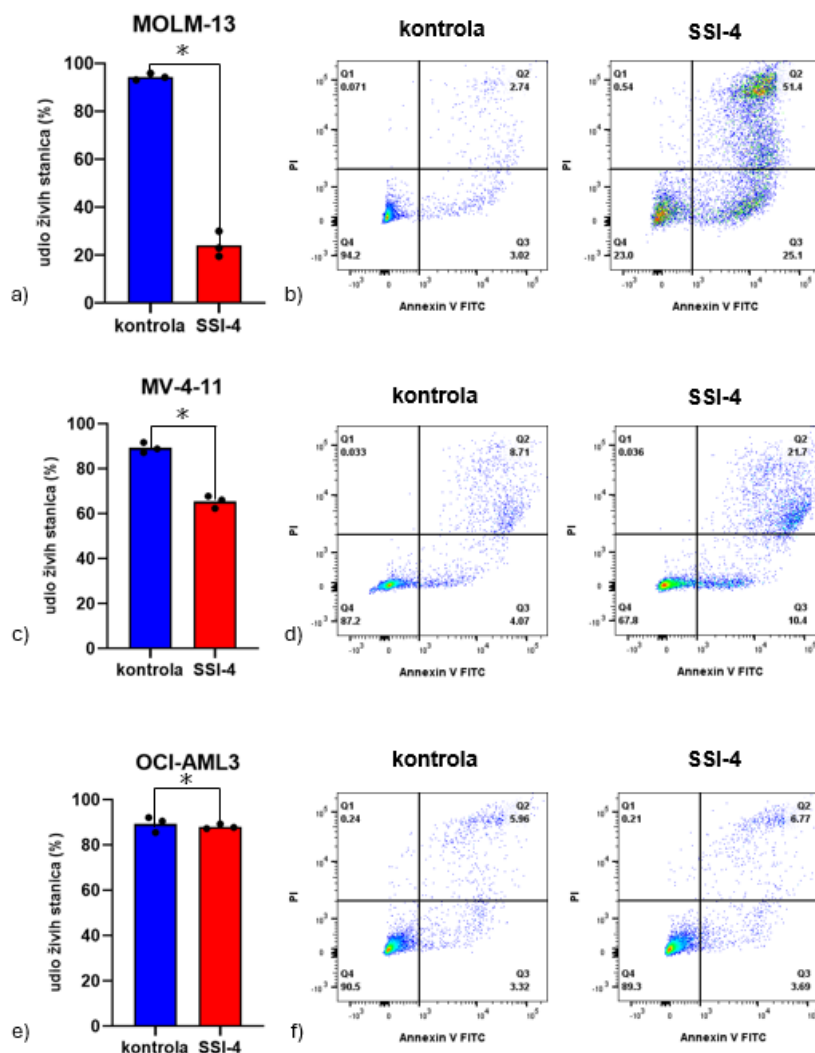
Za usporedbu koncentracija metabolita među staničnim linijama i vizualizaciju rezultata u obliku toplinske karte korišten je softver MetaboAnalyst.

### 5. Rezultati

#### 5.1. Osjetljivost pojedinih staničnih linija AML-a na SSI-4

Već je prethodno utvrđeno da su pojedine leukemijske stanične linije osjetljivije na inhibiciju SCD1 enzima (Dembitz i sur.-2024). Kako bismo potvrdili te rezultate, provedeno je ispitivanje osjetljivosti staničnih linija MOLM-13, MV-4-11 i OCI-AML3 u odgovoru na inhibiciju SCD1 enzima

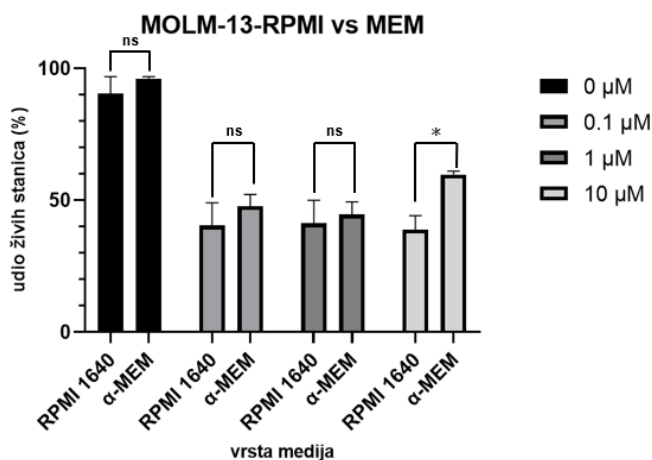
pomoću SSI-4. Stanice su bile inkubirane u periodu od 72 sata u RPMI-1640 mediju u slučaju MOLM-13 i MV-4-11 te u  $\alpha$ -MEM mediju u slučaju OCI-AML3 stanične linije, sukladno preporuci banke tkiva. Stanična linija MOLM-13 pokazala je najveću osjetljivost na SSI-4 (**Slika 3a i 3b**), MV-4-11 srednju osjetljivost (**Slika 3c i 3d**), dok u slučaju OCI-AML3 stanične linije SSI-4 nije pokazao nikakav učinak na stanično preživljenje (**Slika 3e i 3f**).



**Slika 3. Preživljenje staničnih linija AML-a u odgovoru na izlaganja SSI-4.** Udio živih stanica MOLM-13 (a), MV-4-11 (c) i OCI-AML3 (e) mjereno protočnom citometrijom i obilježavanjem Annexin V FITC i propidijevim jodidom nakon 72 sata inkubacije sa SSI-4 (1  $\mu$ M), uz reprezentativne histograme MOLM-13 (b), MV-4-11 (d) i OCI-AML3 (f). Rezultati su srednja vrijednost sa standardnom devijacijom ili reprezentativni prikaz najmanje tri nezavisna pokusa.

\*  $p < 0.05$

Uzevši u obzir da su neosjetljive OCI-AML3 stanične linije uzgajane u  $\alpha$ -MEM mediju koji za razliku od RPMI-1640 medija sadrži brojne metabolite poput neesencijalnih aminokiselina, ribonukleozida i deoksiribonukleozida, potrebno je isključiti mogućnost da ovakav sastav medija može utjecati na moguću metaboličku promjenu koja se dogodi u osjetljivim staničnim linijama. Stoga je provedeno testiranje učinka SSI-4 u oba medija na osjetljive stanice - MOLM-13, pri različitim koncentracijama SSI-4 (0, 0.1, 1 i 10  $\mu$ M) (**Slika 4**).



**Slika 4. Udio živih stanica MOLM-13 tretiranih SSI-4 u RPMI-1640 i  $\alpha$ -MEM mediju.** Stanice MOLM-13 inkubirane su s rastućim koncentracijama SSI-4 72 sata, a udio živih stanica određen je obilježavanjem Annexin V FITC i propidijevim jodidom. Rezultati su srednja vrijednost sa standardnom devijacijom ili reprezentativni prikaz najmanje tri nezavisna pokusa.

\*  $p < 0.05$ , ns – nije značajno

Statistički značajna razlika u preživljenju stanica MOLM-13 uspoređujući primjenu iste koncentracije u dva različita medija primijećena je tek pri najvišoj koncentraciji SSI-4, od 10  $\mu$ M. Međutim, rastom koncentracije lijekova povećava se i nespecifičnost njihova djelovanja te je pri njima stoga teško odrediti radi li se o neselektivnoj toksičnosti ili specifičnom mehanizmu djelovanja. Zaključili smo kako metabolička podloga za različitu osjetljivost pojedinih staničnih linija na SSI-4 nije povezana s uzgojem u različitim vrstama medija.

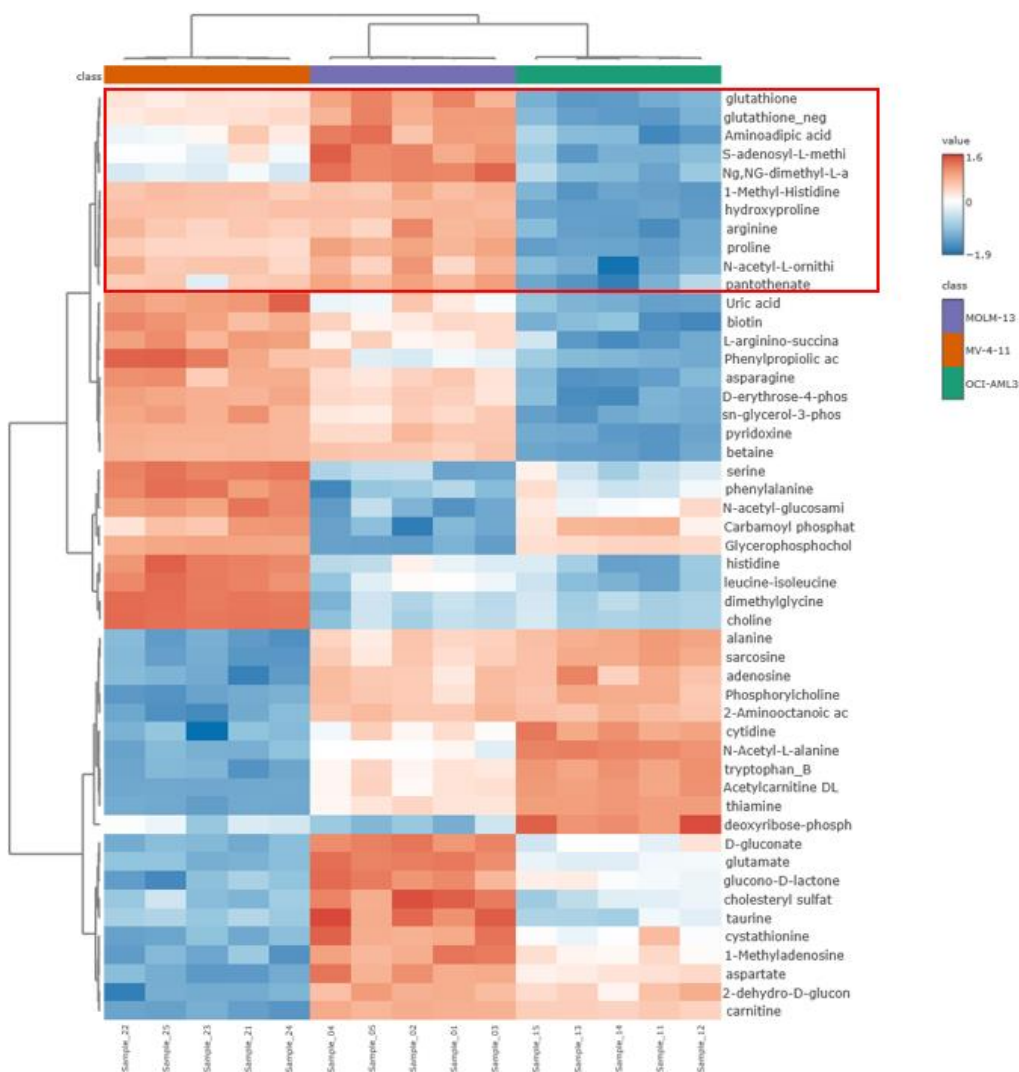
Budući da smo zaključili da vrsta medija ne utječe na djelovanje lijeka, stanične linije će se dalje ispitivati u njihovim uobičajenim medijima.

## 5.2. Metabolomska analiza leukemijskih staničnih linija

### 5.2.1. Metabolički profil AML staničnih linija u kontrolnim uvjetima

Da bismo dobili bolji uvid u potencijalnu metaboličku podlogu razlike u osjetljivosti staničnih linija

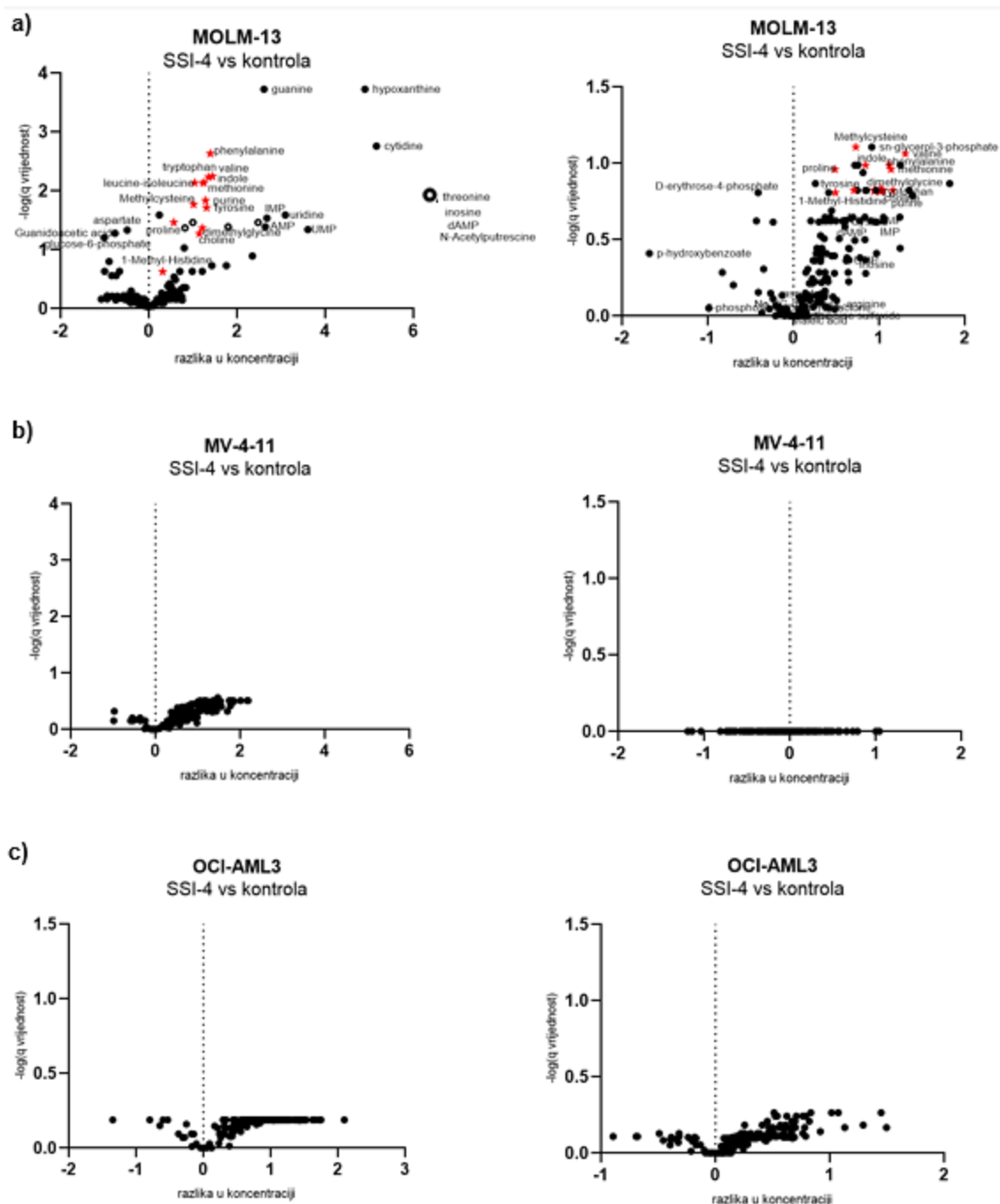
MOLM-13, MV-4-11 i OCI-AML3 na SSI-4, najprije smo usporedili njihove bazalne metabolomske profile (**Slika 5**). Promatrali smo povezanost njihove razine u pojedinim staničnim linijama i osjetljivosti na SSI-4. Međutim, nisu pronađeni jasni metabolički biomarkeri čija koncentracija izravno korelira s osjetljivošću na SSI-4. Ipak, postoje naznake da taj obrazac pokazuje glutathion, pantotemat, metaboliti asocirani s metabolizmom aktiviranih metilnih skupina (1-metil-histidin, S-adenozil-L-metionin i NG-NG-dimetil-L-arginin) te neke aminokiseline (aminoadipinska kiselina, hidrokisprolin, arginin, prolin i N-acetil-L-ornitin) čija je koncentracija izravno pratila pad vijabilnosti stanica leukemijskih linija u odgovoru na SSI-4.



**Slika 5. Prikaz razlike koncentracija metabolita u staničnim linijama MOLM-13, MV-4-11 i OCI-AML3 u obliku toplinske karte (engl. heat-map). Crvena boja označava višu, a plava nižu koncentraciju metabolita u unutarstaničnom izolatu. Crvenim pravokutnikom istaknuti su metaboliti čija koncentracija prati osjetljivost pojedinih staničnih linija na SSI-4.**

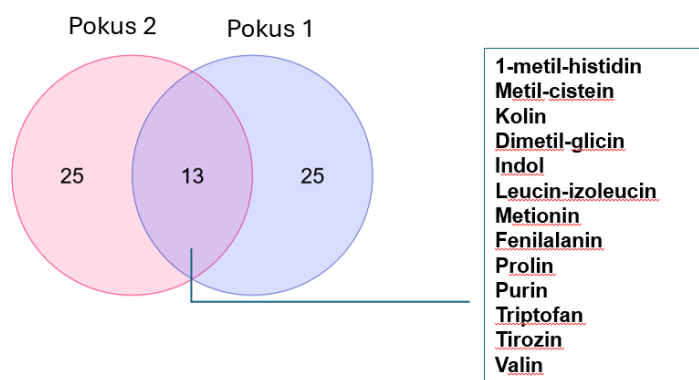
## 5.2.2. Metabolomska analiza AML staničnih linija u kontrolnim uvjetima i nakon tretiranja sa SSI-4

Zbog prethodnih smo zaključaka proveli neciljanu metabolomsku analizu stanica tretiranih sa SSI-4 u usporedbi s kontrolnim stanicama u svrhu opažanja eventualnih metaboličkih promjena uzrokovanih primjenom SSI-4 (**Slika 6**).



**Slika 6. Rezultati metabolomske analize za sve tri stanične linije.** Stanice (a) MOLM-13 (b) MV-4-11 (c) OCI-AML3 inkubirane su 24 sata sa ili bez SSI-4 (1  $\mu$ M) i izmjerena je unutarstanična koncentracija metabolita. Lijevi grafovi prikazuju rezultate prvog, a desni grafovi drugog nezavisnog pokusa. Prethodno statističkoj analizi razlika u koncentraciji, vrijednosti svih koncentracija izražene su kao  $\log_2(\text{koncentracija})$ . Y-os prikazuje q-vrijednosti za izražaj statističke značajnosti. Metaboliti označeni crvenom zvjezdicom su oni kod kojih je statistički značajan porast bio zabilježen u oba pokusa, a ostali metaboliti čija su imena prikazana na grafu istaknuti su jer su pokazali statistički značajne, a ujedno i najveće razlike u koncentracijama u odnosu na kontrolu.

Već je u prvome eksperimentu bilo vidljivo da je metabolička promjena znatno naglašenija u osjetljivim stanicama MOLM-13 nego u umjereno osjetljivima MV-4-11 i neosjetljivima OCI-AML3, upućujući na to da je toksičnost SSI-4 uistinu povezana s metaboličkim odstupanjima koje inducira u osjetljivim stanicama. Dapače, MV-4-11 i OCI-AML3 stanične linije nisu ni u prvom ni drugom pokusu pokazale statistički značajnu razliku u koncentraciji ni za jedan metabolit (**Slika 6b i 6c**). Analizom oba pokusa u stanicama MOLM-13 (**Slika 7**) izdvojeno je 13 metabolita koji su imali statistički značajan porast koncentracije pri tretmanu sa SSI-4 u odnosu na kontrolu: 1-metilhistidin, metilcistein, kolin, dimetilglicin, indol, leucin-izoleucin, metionin, fenilalanin, prolin, purin, triptofan, tirozin i valin.



**Slika 7. Vennov dijagram s metabolitima koji su u staničnoj liniji MOLM-13 pokazali statistički značajno višu koncentraciju prilikom primjene SSI-4 u usporedbi s kontrolom u dva neovisna pokusa.**

Iz priloženog se vidi da su najveće razlike zabilježene u slučaju aminokiselina, njihovih metiliranih formi i razgradnih produkata. Dembitz i suradnici pokazali su u prethodnom istraživanju,

analizirajući transkriptom MV-4-11 stanica koje su tretirane sa SSI-4, da su najznačajnije bili promijenjeni putevi aminoacil-tRNA biosinteze i biosinteze aminokiselina (Dembitz i sur.-2024). To upućuje na pretpostavku da bi povećana količina aminokiselina u ovome pokusu mogla biti rezultat povećane *de novo* sinteze aminokiselina, kao odgovor na pojačanu potrebu za sintezom proteina. Međutim, s obzirom na to da niz aminokiselina koje su bile povećane u našim mjerenjima pripada esencijalnim (leucin, izoleucin, valin, metionin, fenilalanin, triptofan) i kondicionalno esencijalnim (histidin) aminokiselinama, postavlja se i pitanje uloge pojačanog unosa aminokiselina iz izvanstaničnog prostora u stanicu uslijed djelovanja SSI-4.

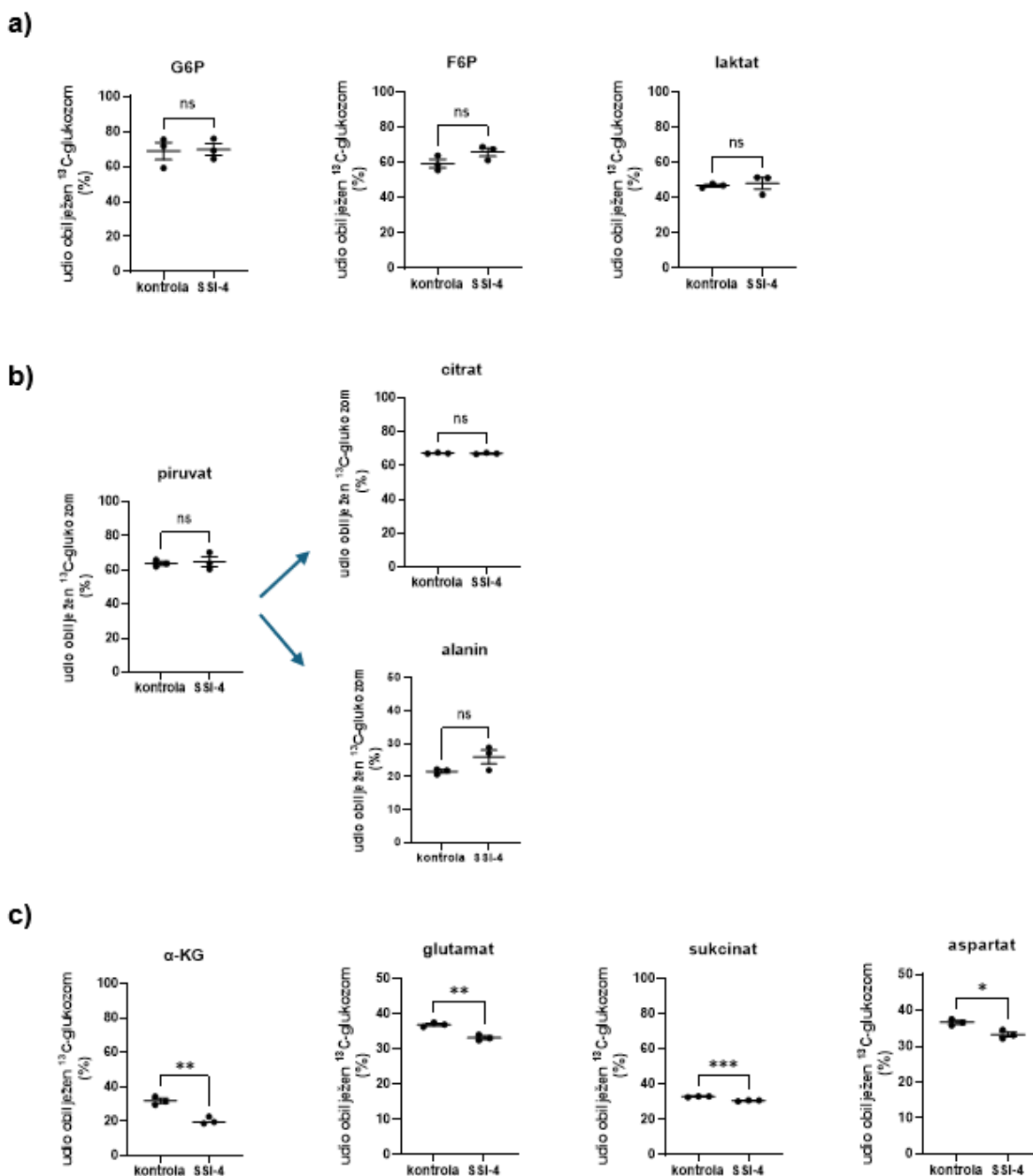
### 5.2.3. Obilježavanje metabolita u MOLM-13 staničnoj liniji $^{13}\text{C}$ glukozom

Da bismo dobili ideju o *de novo* sintezi aminokiselina, proveli smo pokus obilježavanja metabolita u MOLM-13 staničnoj liniji  $^{13}\text{C}$  glukozom u trajanju od 24 sata. U tom pokusu udio molekule koji sadrži više od jednog  $^{13}\text{C}$  atoma smatra se obilježenim i upućuje na udio novosintetizirane molekule koja je koristila glukozu kao svoj prekursor.

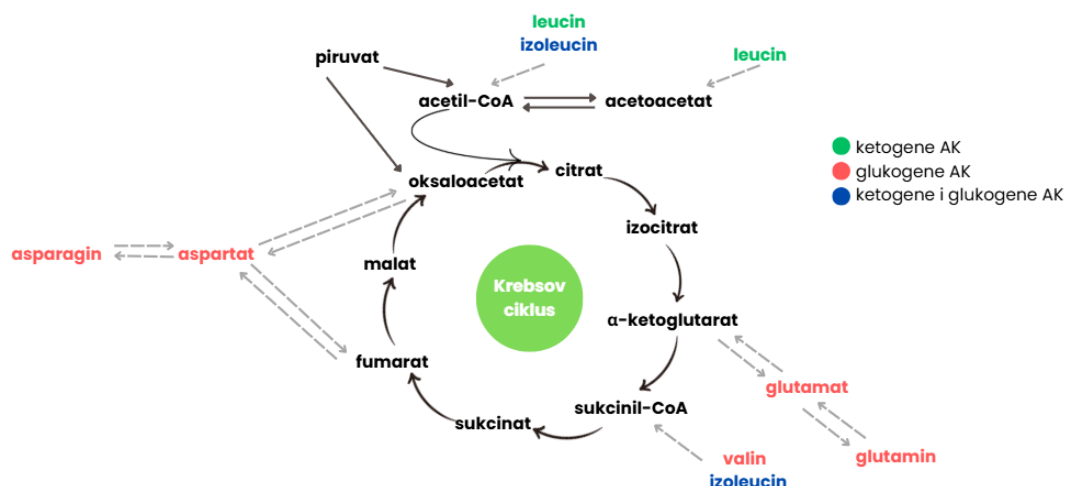
Prilikom tretiranja stanica sa SSI-4 nije došlo do pojačane glikolize, što se može zaključiti po izostanku porasta laktata, glukoza-6-fosfata (G6P), fruktoza-6-fosfata (F6P) i konačno, piruvata, koji svi pripadaju supstratima i konačnim produktima glikolize (**Slika 8a i 8b**). Zanimljivo je da postoji trend povećane *de novo* sinteze alanina, što se vidi po povećanom obilježavanju glukozom nakon primjene SSI-4, ali razlika u odnosu na kontrolu nije bila statistički značajna (**Slika 8b**). Također, nema razlike ni u početnoj aktivaciji Krebsovog ciklusa, što se vidi po izostaloj razlici u koncentraciji citrata (**Slika 8b**). Međutim, analizirajući supstrate nizvodno od citrata, primijećen je značajni pad udjela  $\alpha$ -ketoglutarata ( $\alpha$ -KG) obilježenoga glukozom (**Slika 8c**). Naime, dva su moguća puta njegove sinteze - iz glukoze preko intermedijarnih spojeva Krebsovog ciklusa ili iz aminokiseline glutamata koji nastaje deaminacijom aminokiseline glutamina (**Slika 9**). Navedeni rezultati upućuju na to da potonji put postaje važniji izvor  $\alpha$ -ketoglutarata pri primjeni SSI-4. Dodatno u prilog tomu govori i smanjen udio glutamata dobivenog iz supstrata nizvodno od glukoze, odnosno smanjenje one proporcije glutamata koja nastaje transaminacijom  $\alpha$ -ketoglutarata (**Slika 8c**). To upućuje na veću ulogu deaminacije glutamina u svrhu dobivanja glutamata. Važno je istaknuti kako prijašnji koraci pokusa pokazuju da ukupne količine glutamata i  $\alpha$ -ketoglutarata nisu bile smanjene pri primjeni SSI-4, stoga to nije moglo utjecati na rezultate dobivene obilježavanjem  $^{13}\text{C}$  glukozom, već je njihova niža razina glutamata i  $\alpha$ -ketoglutarata bila posljedica isključivo aktivacije drugog sintetskog puta - deaminacije glutamina, u svrhu održavanja jednakih razina obiju molekula.

Isti fenomen smanjene ugradnje ugljikovih atoma iz glukoze primijećen je i u slučaju sukcinata, prvog metabolita Krebsovog ciklusa nizvodno od sukcinil-CoA (**Slika 8c**), koji, osim iz  $\alpha$ -ketoglutarata, nastaje i katabolizmom aminokiselina razgranatog lanca - valina i izoleucina (**Slika 9**). Podsjetimo, ukupna koncentracija ovih dviju aminokiselina je prema rezultatima prethodno provedene metabolomske analize bila povišena prilikom tretiranja stanica MOLM-13 sa SSI-4, a također, obje pripadaju esencijalnim aminokiselinama. Zanimljivo je da je i udio aspartata dobivenog iz glukoze posredno preko oksaloacetata bio snižen (**Slika 8c**). Iako oksaloacetat nije bilo moguće izmjeriti u ovom pokusu, ovakvi rezultati upućuju na to da je aspartat pri tretiranju stanica sa SSI-4 pretežito nastajao alternativnim načinom - deaminacijom asparagina (**Slika 9**).

Kako je vidljivo iz sheme (**Slika 9**), pojedine neesencijalne aminokiseline mogu nastati iz metabolita Krebsovog ciklusa, ali isto tako i one recipročno mogu biti izvor za sintezu upravo tih istih metabolita. Drugi izvor metabolita Krebsovog ciklusa jest glukoza koja preko piruvata ulazi u ciklus sintezom citrata i oksaloacetata. Ovim pokusom pokazalo se kako metaboliti Krebsovog ciklusa u slučaju primjene SSI-4 više nastaju iz aminokiselina nego iz glukoze u odnosu na kontrolnu skupinu, što ukazuje na pojačanu ukupnu potrošnju aminokiselina. U suglasju s rezultatima metabolomske analize, rezultati ovog pokusa upućuju na to da je zamijećeni porast aminokiselina u stanicama tretiranim sa SSI-4 vjerojatnije posljedica pojačanog unosa iz izvanstaničnog okoliša nego *de novo* sinteze aminokiselina.



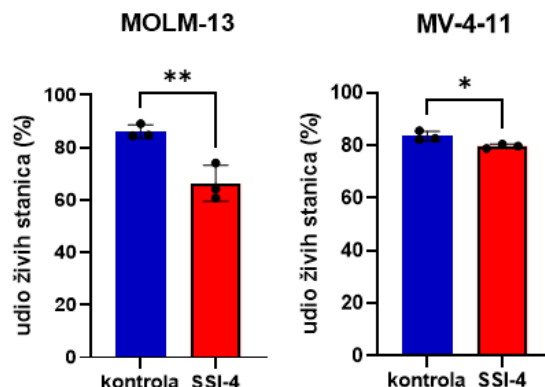
**Slika 8. Grafički prikaz udjela pojedinih metabolita koji su nastali sintezom iz prekursora nizvodno od glukoze, što odgovara razini obilježenosti  $^{13}\text{C}$  glukozom na y-osi. Stanice MOLM-13 bile su uzgajane u mediju bez glukoze u prisutnosti 2 g/L  $^{13}\text{C}$ -glukoze i inkubirane sa SSI-4 (1  $\mu\text{M}$ ) 24 sata. Određen je udio ukupnih metabolita obilježenih glukozom kao bi se izračunao udio novostvorenog metabolita koji koristi glukozu kao izvor ugljikova atoma. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , ns=nije značajno**



**Slika 9. Povezanost ketogenih i glukogenih aminokiselina s Krebsovim ciklusom.**

#### 5.2.4. Ovisnost toksičnosti SSI-4 o unosu glutamina u leukemijske stanice

Iako je u prethodnim koracima pokazano kako je u stanicama MOLM-13, koje su najosjetljivije na primjenu SSI-4, ujedno zabilježeno i najviše metaboličkih promjena, od kojih najviše u kontekstu aminokiselina, potrebno je dodatno potvrditi međusobnu uzročno-posljedičnu vezu povećane količine aminokiselina i opažene citotoksičnosti. Iz tog razloga proveden je funkcionalni pokus u kojemu su stanice MOLM-13 i MV-4-11 u razdoblju od 72 sata bile ponovo uzgajane u RPMI-1640 mediju, ali ovaj put bez glutamina. Glutamin je uz alanin najzastupljenija aminokiselina u ljudskoj plazmi (Holeček-2024) pa je zato bio dobra polazišna točka za provjeru ovisnosti o dostupnosti aminokiselina. Obje linije bile su tretirane sa SSI-4. Nakon 72 sata je pomoću protočne citometrije izmjeren postotak živih stanica u kontrolnoj i tretiranoj skupini (**Slika 10**). Iako je i dalje bio prisutan toksični učinak SSI-4, ponovo puno jače izražen u stanicama MOLM-13, taj učinak bio je znatno manji uspoređujući ga s prvim pokusom gdje je RPMI-1640 medij sadržavao i glutamin (**Slika 3**). Iz ovoga proizlazi da su stanice puno otpornije na toksični učinak SSI-4 u odsustvu unosa glutamina iz okoline, a isti uvjeti nisu utjecali na preživljenje netretiranih stanica jer glutamin pripada neesencijalnim aminokiselinama, stoga što stanice posjeduju mogućnost njegove *de novo* sinteze.



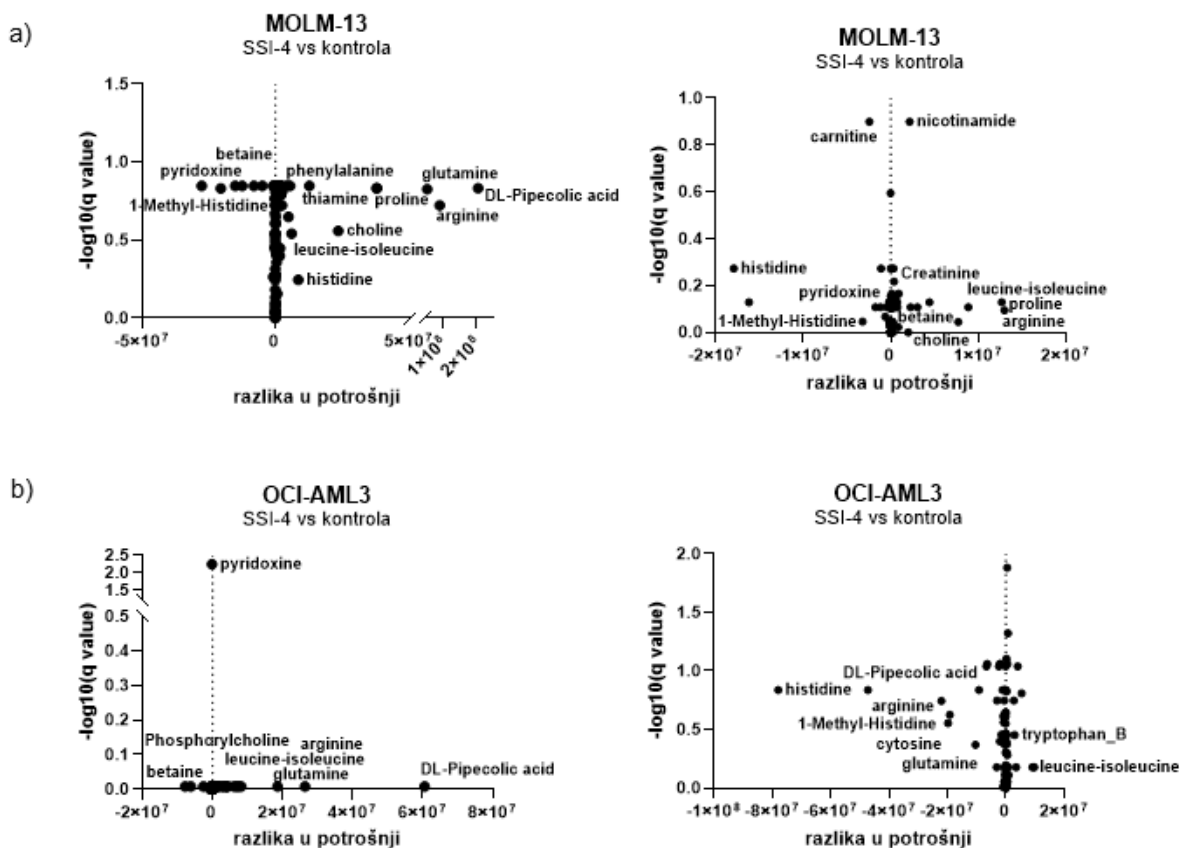
**Slika 10. Utjecaj prisutnosti glutamina na toksičnost SSI-4.** Stanice MOLM-13 i MV-4-11 uzgajane su u RPMI-1640 mediju bez glutamina i inkubirane sa SSI-4 (1  $\mu$ M) 72 sata, a udio živih stanica određen je obilježavanjem Annexin V FITC i propidijevim jodidom. Rezultati su srednja vrijednost sa standardnom devijacijom ili reprezentativni prikaz najmanje tri nezavisna pokusa. \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$

### 5.2.5. Metabolomska analiza staničnog medija

Kako bismo konačno potvrdili da je u stanicama tretiranim sa SSI-4 povećan unos aminokiselina, izmjerena je potrošnja metabolita iz medija za osjetljivu staničnu liniju MOLM-13 i neosjetljivu OCI-AML3, obje inkubirane sa SSI-4 24 sata.

Usporedba promjene koncentracije metabolita u odnosu na kontrolne stanice (**Slika 11**) pokazuje ponovno najveće korištenje aminokiselina poput arginina, prolina i leucina-izoleucina. Nadalje, 1-metilhistidin pokazao je veću koncentraciju u mediju stanica tretiranih sa SSI-4 što upućuje na njegovo povećano otpuštanje u okolinu, s obzirom na to da 1-metilhistidin nije u inicijalnom sastavu medija. Ovaj rezultat podudara se s metabolomskom analizom unutarstaničnih metabolita, gdje je njegova koncentracija u stanicama također bila povećana u odnosu na kontrolu.

Sličan obrazac promjena u korištenju i oslobađanju pojedinih metabolita zamijećen je i u slučaju neosjetljivih stanica OCI-AML3 iako rezultat nije bio statistički značajan.

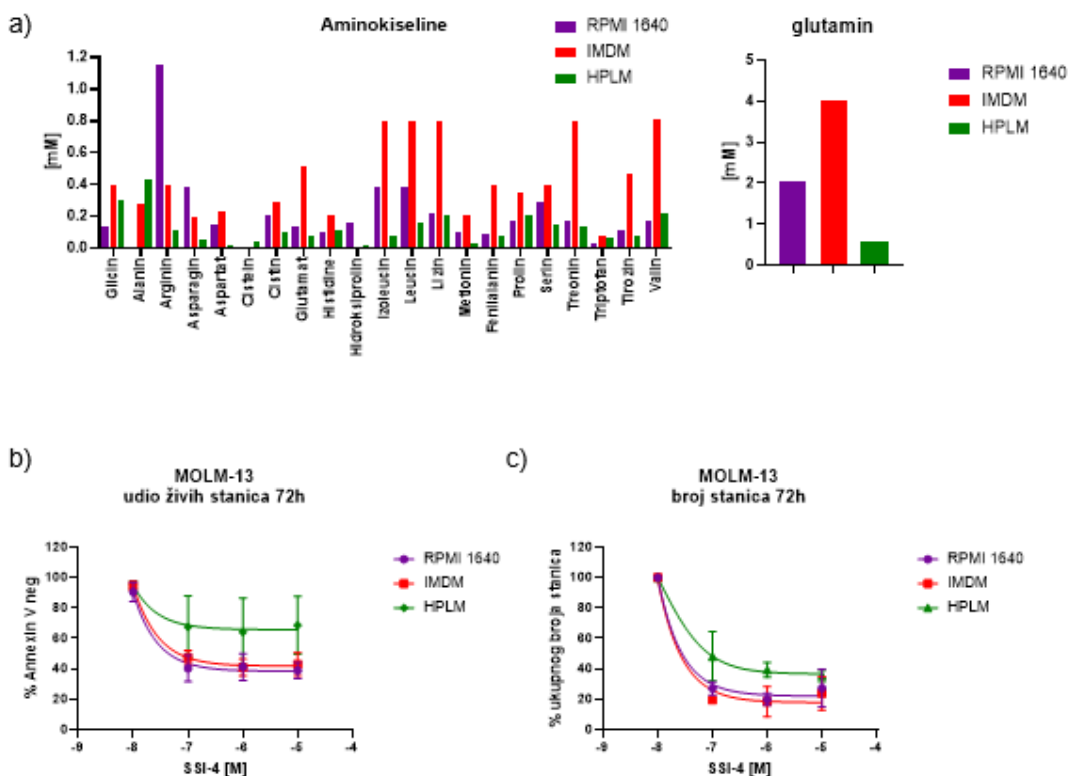


**Slika 11. Promjena koncentracije metabolita u mediju nakon izlaganja SSI-4.** Stanice (a) MOLM-13 i (b) OCI-AML3 inkubirane su 24 sata sa ili bez SSI-4 (1  $\mu$ M) i izmjerena je koncentracija metabolita u mediju u odnosu na medij koji ne sadrži stanice, koja je normalizirana prema broju stanica. Lijevi grafovi prikazuju rezultate prvog, a desni grafovi drugog nezavisnog pokusa. S desne strane pravca  $x = 0$  na grafovima nalaze se metaboliti koje stanice tretirane sa SSI-4 pojačano troše u odnosu na kontrolu, a s lijeve one čija je potrošnja manja ili unutarstanična proizvodnja povećana.

#### 5.2.6. Ovisnost toksičnosti SSI-4 o dostupnosti drugih aminokiselina u staničnom mediju

Budući da je prilično zahtjevno provoditi funkcionalne eseje za svaku pojedinu aminokiselinu zbog kompenzatornih staničnih mehanizama kojima se nadomješta manjak pojedinih aminokiselina (Huggler i sur.-2025), ulogu dostupnosti aminokiselina u toksičnosti SSI-4 provjerili smo uzgajajući stanice u različitim medijima. Izabrani su bili početni RPMI-1640 medij, IMDM medij koji obilježava viša koncentracija izoleucina, leucina, valina i prolina nego RPMI-1640, te konačno, HPLM medij (engl. *human plasma-like medium*) koji ima niže koncentracije izoleucina i leucina, a podjednake

koncentracije valina i prolina kao RPMI-1640 (**Slika 12a**). HPLM je novodizajnirani medij koji imitira metabolički profil ljudske plazme i zbog toga predstavlja uvjete najbliže fiziološkima (Savani i sur.-2025). Zapaženo je značajno veće preživljenje i manji pad broja živih stanica u odgovoru na SSI-4 kod stanica uzgajanih u HPLM-u u odnosu na druga dva medija (**Slika 12b i 12c**). Nije bilo velikih razlika između preživljenja u RPMI-1640 i IMDM mediju, ukazujući na to da je vrhunac toksičnosti postignut već u RPMI-1640, koji posjeduje suprafiziološke koncentracije pojedinih aminokiselina, a njihova veća dostupnost u IMDM-u ne pridonosi dodatnoj toksičnosti. Stanično preživljenje i broj stanica su u slučaju sva tri medija pokazali eksponencijalni pad pri manjim koncentracijama SSI-4, dok se daljnjim povećanjem koncentracije taj pad usporava, upućujući na to da se daljnjim povećanjem koncentracije SSI-4 ne povećava nužno i njegova toksičnost.



**Slika 12. Utjecaj dostupnosti aminokiselina u mediju na staničnu toksičnost posredovanu SSI-4.** (a) Koncentracija pojedinih aminokiselina u staničnim medijima RPMI-1640, IMDM i HPLM. (b) Stanice MOLM-13 inkubirane su 72 sata s rastućim koncentracijama SSI-4 (0.1, 1, 10  $\mu$ M), a udio živih stanica određen je obilježavanjem Annexin V FITC i propidijevim jodidom. Udio živih stanica i broj stanica prikazan je u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji SSI-4 izraženoj logaritamski u molarnim koncentracijama. (c) Grafički prikaz ukupnog broja stanica MOLM-13 u istim uvjetima kao u grafu (b). Za brojanje živih stanica korištena je metoda isključenja pomoću tripanskog modrila.

## 6. Rasprava

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da stanice AML-a osjetljive na farmakološku inhibiciju SCD-a nakupljaju aminokiseline, predominantno povećanim unosom iz izvanstaničnog prostora. Moguće obrazloženje poveznice između desaturacije masnih kiselina i povećane potrebe za aminokiselinama leži u opažanju Dembitz i suradnika da osjetljive stanice u odgovoru na SSI-4 povećaju sintezu zasićenih masnih kiselina (Dembitz i sur.-2024). Signalizacija za aktivaciju navedene sinteze vjerojatno ide preko AMPK jer je zamijećena smanjena aktivnost AMPK pri izlaganju SSI-4 i povećana aktivnost ACC - njezinog nizvodnog ciljnog enzima odgovornog za aktivaciju puta sinteze masnih kiselina. Navedeni pomak prema anabolizmu čini se ključnim za poticanje stanične smrti u odgovoru na SSI-4 jer inhibicija direktno uzvodnih enzima bitnih za proizvodnju masnih kiselina, poput ACC i FASN, poništava njegovu toksičnost, a isti učinak zamjećuje se prilikom aktivacije AMPK (Dembitz i sur.-2024). Sličan učinak primijećen je i u stanicama adenokarcinoma voda gušterače, gdje je inhibicija lipogeneze ublažila toksičnost SCD inhibicije (Lien i sur.-2021). Nije nevjerojatno da je leukemijska stanica izložena inhibiciji SCD-a stoga sklona nakupljanju esencijalnih nutrijenata poput aminokiselina.

Osim svoje uloge u sintezi proteina, čija je regulacija također nizvodno od inhibicije AMPK (Bolster i sur.-2002), aminokiseline mogu služiti kao prekursori intermedijarnih spojeva Krebsovog ciklusa, nizvodno sudjelujući u sintezi glukoze i masnih kiselina (D'Andrea-2000). Iako aminokiseline ulaskom u Krebsov ciklus ili pretvorbom u acetil-CoA mogu služiti kao izvor energije, njihov doprinos ukupnoj sintezi ATP-a obično ne prelazi 10–15 % (D'Andrea-2000). Također, važnost aminokiselina kao izvora energije osobito raste u uvjetima katabolizma i tzv. staničnog gladovanja, a budući da su se, po svemu sudeći, tretirane leukemijske stanice nalazile u anaboličkom stanju, malo je vjerojatno da je povećani unos aminokiselina imao isključivo energetske svrhu. Vjerojatnije je da su korištene kao, uz glukozu, dodatni izvor ugljika za izrazito povećanu produkciju *de novo* masnih kiselina.

Zanimljivo je da su primjenom SSI-4 porasle unutarstanične razine i esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina, kao i glukogenih i ketogenih, što upućuje na mogućnost neselektivnog unosa aminokiselina, pri čemu tumorska stanica ne prepozna koje su joj zaista potrebne za sintezu masnih kiselina. Naime, transport aminokiselina u tumorskim stanicama odvija se preko membranskih proteinskih nosača, tzv. uniportera, simportera i antiportera, koji nisu strogo specifični za pojedinu aminokiselinu, već svaki nosač prenosi aminokiseline sličnih fizikalno-kemijskih svojstava, poput veličine i električnog naboja (Bröer-2020). U prilog toj nespecifičnosti govori i podatak da čak 90 % od ukupne potrebne zalihe aminokiselina ulazi u stanicu preko samo

dva nosača – SNAT1 i SNAT2 (Bröer-2020). Osim toga, čak 8 od ukupno 13 aminokiselina čija je koncentracija porasla u metabolomskoj analizi MOLM-13 stanica (leucin, izoleucin, valin, metionin, fenilalanin, histidin, triptofan i tirozin) ulazi u stanicu preko zajedničkog nosača (Bröer-2020). Daljnjim transkriptomskim analizama mogla bi se ispitati ekspresija pojedinih proteinskih nosača u tretiranim stanicama, kako bi se potvrdila njihova uloga u povećanom unosu aminokiselina.

Ovo istraživanje pokazalo je da upravo povećano nakupljanje aminokiselina pridonosi toksičnosti SSI-4 u leukemijskim stanicama. Naime, njihova smanjena dostupnost u mediju umanjila je indukciju stanične smrti u odgovoru na SSI-4 u osjetljivim stanicama. Ovi rezultati naizgled su u suprotnosti s dosadašnjim saznanjima o tumorskom metabolizmu, prema kojima preživljenje tumorskih stanica snažno ovisi o dostupnosti aminokiselina potrebnih za povećanu proliferaciju te sintezu proteina i drugih biomolekula (Endicott i sur.-2021). Upravo je iz tog razloga trenutno u fokusu razvoj novih terapijskih pristupa u liječenju malignih bolesti, a koji se temelje na mehanizmima deplecije zaliha aminokiselina. Među njima je najbolji primjer primjena asparaginaze u liječenju akutne limfoblastične leukemije (ALL), koja razgradnjom egzogenog asparagina djeluje nepovoljno na leukemijske stanice (Endicott i sur.-2021). Međutim, iz drugih organskih sustava poznata je toksičnost previsokih unutarstaničnih koncentracija pojedinih aminokiselina. Primjerice, leucin, izoleucin i valin pripadaju aminokiselinama razgranatog lanca (BCAAs, engl. *branched-chain amino acids*), a u metabolomskoj analizi MOLM-13 stanica, unutarstanična koncentracija svih triju aminokiselina bila je povećana pri primjeni SSI-4. U nasljednom metaboličkom poremećaju nazvanom bolesti javorovog sirupa zbog smanjene funkcije kompleksa dehidrogenaze  $\alpha$ -ketokiselina razgranatih lanaca dolazi do nakupljanja BCAAs i njihovog razgradnog produkta  $\alpha$ -ketokiselina u organizmu. Leucin i  $\alpha$ -ketokiseline uzrokuju izravnu neurotoksičnost koja dovodi do poremećaja u razvoju mozga i neurokognitivnih deficita u djece, a povećana koncentracija  $\alpha$ -ketokiselina u urinu daje mu karakteristični miris javorovog sirupa (Blackburn i sur.-2017). Citotoksičan učinak opisan je i pri pretjeranoj unutarstaničnoj koncentraciji metionina, još jedne aminokiseline povišene u odgovoru na SSI-4, iako točni mehanizmi još nisu razjašnjeni (Pitsch i sur.-2022).

Iako sam glutamin nije bio povišen u stanicama inkubiranim sa SSI-4, funkcionalni pokusi su potvrdili njegovu važnu ulogu u odgovoru na SSI-4. Glutamin je jedna od ključnih aminokiselina u tumorskom metabolizmu, sudjelujući u brojnim staničnim procesima. Pretvorbom u glutamat i potom u  $\alpha$ -ketoglutarat, glutamin kontinuirano opskrbljuje TCA ciklus intermedijarnim spojevima i postaje važan izvor energije (Yang i sur.-2017). To je osobito važno u tumorskim stanicama koje

zbog Warburgova efekta i manjka piruvata dobivenog iz glukoze ovise o glutaminu kao izvoru intermedijarnih spojeva za TCA ciklus, a taj proces naziva se anapleroza (Yang i sur.-2017). Dodatni nizvodni putevi metabolizma glutamina uključuju sintezu glutationa nužnog za regulaciju staničnog odgovora na oksidativni stres te sintezu nukleotida (Yoo i sur.-2020). Prethodni rezultati Dembitz i suradnika pokazali su da stanična smrt u odgovoru na inhibiciju SCD-a ne ovisi o oksidativnom stresu, ali da su te stanice podložnije oštećenju DNA kroz još nerazjašnjeni mehanizam (Dembitz i sur.-2024). Zanimljivo je da je u oba pokusa na stanicama MOLM-13 zamijećena povišena koncentracija purina nakon inkubacije sa SSI-4, što bi moglo povezati ovisnost njegovog toksičnog učinka o metabolizmu glutamina i, kroz nesrazmjer purina i pirimidina, veću podložnost oštećenju DNA. Ipak, za potvrdu te hipoteze i za detaljno raščlanjenje uključenosti navedenih metaboličkih puteva potrebna su dodatna istraživanja.

Konačno, povišena koncentracija pojedinih aminokiselina za posljedicu može imati promjene u sintezi proteina i održavanju proteostaze. Kao što je već navedeno, jedan od najčešće opisanih učinaka inhibicije SCD-a u različitim tumorskim modelima je aktivacija stresa ER-a, odnosno UPR-a (Dembitz i sur.-2024, Pinkham i sur.-2019). Do sada je učinak inhibicije SCD-a na aktivaciju stresa ER-a uglavnom obrazlagan kroz promjenu SFA/MUFA omjera i učinak na membrane ER-a (Pinkham i sur.-2019), no moguće je da je mehanizam kompleksniji i povezan sa zapaženom neravnotežom aminokiselina koja potom utječe na homeostazu proteina u stanici. Ponovno, za dublje razumijevanje uloge stresa ER-a, ali i općenito sinteze i razgradnje proteina u stanici, potrebna su daljnja istraživanja.

Najveći doprinos ovog rada je, međutim, identificiranje do sada nepoznate metaboličke poveznice između regulacije desaturacije masnih kiselina u leukemijskoj stanici i metabolizma aminokiselina. To opažanje može biti podloga za daljnji rad na razjašnjavanju mehanizma toksičnosti inhibicije SCD-a u AML-u.

## **7. Zaključci**

1. Izloženost SSI-4 uzrokuje porast unutarstanične koncentracije aminokiselina u osjetljivim stanicama AML-a.
2. Porast koncentracije aminokiselina posljedica je njihovog povećanog unosa u stanicu.
3. Smrt stanica AML-a u odgovoru na SSI-4 ovisna je o vanjskoj dostupnosti aminokiselina, poglavito glutamina.

## **8. Zahvale**

Ovim putem želim zahvaliti svojoj mentorici, doc. dr. sc. Vilmi Dembitz, na svojoj pomoći koju mi je pružila tijekom pisanja ovog rada, kao i na životnim savjetima koje mi je nesebično pružala u ovom izazovnom završnom razdoblju studija.

Veliko hvala i prof. dr. sc. Dori Višnjić na povjerenju i prilici da radim u laboratoriju te što me uvela u svijet znanosti na najbolji mogući način.

Zahvaljujem i cijelom timu u Laboratoriju na uvijek ugodnoj atmosferi i pristupačnosti, čime su mi pomogli da se tijekom protekle dvije godine osjećam kao ravnopravni dio tima.

## 9. Popis literature

- Blackburn PR, Gass JM, Vairo FPE, Farnham KM, Atwal HK, Macklin S i sur. Maple syrup urine disease: mechanisms and management. *Appl Clin Genet*. 2017;10:57-66.
- Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem*. 2002;277(27):23977-23980.
- Broadfield LA, Pane AA, Talebi A, Swinnen JV, Fendt SM. Lipid metabolism in cancer: New perspectives and emerging mechanisms. *Dev Cell*. 2021;56(10):1363-1393.
- Bröer S. Amino Acid Transporters as Targets for Cancer Therapy: Why, Where, When, and How. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17):6156.
- Cucchi DGJ, Polak TB, Ossenkoppele GJ, Uyl-De Groot CA, Cloos J, Zweegman S i sur. Two decades of targeted therapies in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2021;35(3):651-660.
- D'Andrea G. Classifying amino acids as gluco(glyco)genic, ketogenic, or both. *Biochem Educ*. 2000;28(1):27-28.
- Dembitz V, James SC, Gallipoli P. Targeting lipid metabolism in acute myeloid leukemia: biological insights and therapeutic opportunities. *Leukemia*. 2025.
- Dembitz V, Lawson H, Burt R, Natani S, Philippe C, James SC i sur. Stearoyl-CoA desaturase inhibition is toxic to acute myeloid leukemia displaying high levels of the de novo fatty acid biosynthesis and desaturation. *Leukemia*. 2024;38(11):2395-2409.
- Endicott M, Jones M, Hull J. Amino acid metabolism as a therapeutic target in cancer: a review. *Amino Acids*. 2021;53(8):1169-1179.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
- Hess D, Chisholm JW, Igal RA. Inhibition of stearylCoA desaturase activity blocks cell cycle progression and induces programmed cell death in lung cancer cells. *PLoS One*. 2010;5(6):e11394.
- Holeček M. Origin and Roles of Alanine and Glutamine in Gluconeogenesis in the Liver, Kidneys, and Small Intestine under Physiological and Pathological Conditions. *Int J Mol Sci*. 2024;25(13):7037.
- Huggler KS, Mellado Fritz CA, Flickinger KM, Chang GR, McGuire MF, Cantor JR. Hexokinase detachment from mitochondria drives the Warburg effect to support compartmentalized ATP production. *bioRxiv [Preprint]*. 2025:2025.02.07.637120.
- Koundouros N, Poulogiannis G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *Br J Cancer*. 2020;122(1):4-22.

Li Y, Piao C, Kong C. Stearoyl CoA desaturase inhibition can effectively induce apoptosis in bladder cancer stem cells. *Cancer Cell Int.* 2024;24(1):357.

Lien EC, Westermark AM, Zhang Y, Yuan C, Li Z, Lau AN i sur. Low glycaemic diets alter lipid metabolism to influence tumour growth. *Nature.* 2021;599(7884):302-307.

Liu Q, Walker D, Uppal K, Liu Z, Ma C, Tran V i sur. Addressing the batch effect issue for LC/MS metabolomics data in data preprocessing. *Sci Rep.* 2020;10(1):13856.

Liu Z, Xia Y, Li B, Xu H, Wang C, Liu Y i sur. Induction of ER stress-mediated apoptosis by ceramide via disruption of ER Ca(2+) homeostasis in human adenoid cystic carcinoma cells. *Cell Biosci.* 2014;4:71.

Oatman N, Dasgupta N, Arora P, Choi K, Gawali MV, Gupta N i sur. Mechanisms of stearoyl CoA desaturase inhibitor sensitivity and acquired resistance in cancer. *Sci Adv.* 2021;7(7):eabd7459.

Pelletier SJ, Leclercq M, Roux-Dalvai F, de Geus MB, Leslie S, Wang W i sur. BERNN: Enhancing classification of Liquid Chromatography Mass Spectrometry data with batch effect removal neural networks. *Nat Commun.* 2024;15(1):3777.

Phase I Trial of SCD I: A First in Human Dose Regimen-Finding Study to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Activity of MTI-301 in Patients With Advanced Malignancy. Dostupno na: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06911008/>

Pinkham K, Park DJ, Hashemiaghdam A, Kirov AB, Adam I, Rosiak K i sur. Stearoyl CoA Desaturase Is Essential for Regulation of Endoplasmic Reticulum Homeostasis and Tumor Growth in Glioblastoma Cancer Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2019;12(4):712-727.

Pitsch E, Hughes A. Elucidating the cellular mechanism of methionine toxicity. *FASEB J.* 2022;36.

Röhrig F, Schulze A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(11):732-749.

Roongta UV, Pabalan JG, Wang X, Ryseck RP, Fargnoli J, Henley BJ i sur. Cancer cell dependence on unsaturated fatty acids implicates stearoyl-CoA desaturase as a target for cancer therapy. *Mol Cancer Res.* 2011;9(11):1551-1561.

Sabatier M, Birsén R, Lauture L, Mouche S, Angelino P, Dehairs J i sur. C/EBP $\alpha$  Confers Dependence to Fatty Acid Anabolic Pathways and Vulnerability to Lipid Oxidative Stress-Induced Ferroptosis in FLT3-Mutant Leukemia. *Cancer Discov.* 2023;13(7):1720-1747.

Savani MR, El Shami M, Gattie LC, Smith BC, Hicks WH, Oken SS i sur. Stable isotope tracing in human plasma-like medium reveals metabolic and immune modulation of the glioblastoma microenvironment. *bioRxiv [Preprint].* 2025:2023.05.29.542774.

Scaglia N, Chisholm JW, Igal RA. Inhibition of stearoylCoA desaturase-1 inactivates acetyl-CoA carboxylase and impairs proliferation in cancer cells: role of AMPK. *PLoS One.* 2009;4(8):e6812.

Sen U, Coleman C, Sen T. Stearoyl coenzyme A desaturase-1: multitasker in cancer, metabolism, and ferroptosis. *Trends Cancer*. 2023;9(6):480-489.

Southam AD, Khanim FL, Hayden RE, Constantinou JK, Koczula KM, Michell RH i sur. Drug Redeployment to Kill Leukemia and Lymphoma Cells by Disrupting SCD1-Mediated Synthesis of Monounsaturated Fatty Acids. *Cancer Res*. 2015;75(12):2530-2540.

Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon SJ i sur. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*. 2017;171(2):273-285.

Tracz-Gaszewska Z, Dobrzyn P. Stearoyl-CoA Desaturase 1 as a Therapeutic Target for the Treatment of Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(7):948.

Vakiti A, Reynolds SB, Mewawalla P. Acute Myeloid Leukemia (Internet). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 (ažurirano 27. travnja 2024; citirano 16. lipnja 2025). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507875/>

von Roemeling CA, Caulfield TR, Marlow L, Bok I, Wen J, Miller JL i sur. Accelerated bottom-up drug design platform enables the discovery of novel stearoyl-CoA desaturase 1 inhibitors for cancer therapy. *Oncotarget*. 2017;9(1):3-20.

Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology*. 2006;147(2):943-951.

Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol*. 1927;8(6):519-530.

Yang L, Venneti S, Nagrath D. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annu Rev Biomed Eng*. 2017;19:163-194.

Yi J, Zhu J, Wu J, Thompson CB, Jiang X. Oncogenic activation of PI3K-AKT-mTOR signaling suppresses ferroptosis via SREBP-mediated lipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(49):31189-31197.

Yoo HC, Yu YC, Sung Y, Han JM. Glutamine reliance in cell metabolism. *Exp Mol Med*. 2020;52(9):1496-1516.

## 10. Sažetak

Klara Bardač

### **Metabolički utjecaj inhibicije stearoil-koenzim A desaturaze na stanice akutne mijeloične leukemije**

Inhibicija enzima stearoil-koenzim A desaturaze (SCD) narušava ravnotežu zasićenih i nezasićenih masnih kiselina te dovodi do smrti tumorskih stanica. U solidnim tumorima toksičnost se povezuje sa stresom endoplazmatskog retikuluma i lipidnom peroksidacijom koji aktiviraju apoptozu i ferroptozu, no u AML-u ti mehanizmi objašnjavaju tek dio učinka. Cilj ovog rada bio je ispitati metaboličku osnovu osjetljivosti AML stanica na farmakološku inhibiciju SCD-a. Provedena je metabolomska analiza staničnih linija AML-a nakon inkubacije sa ili bez inhibitora SCD-a SSI-4. Sukladno najvećoj osjetljivosti na SSI-4, MOLM-13 stanice pokazale su značajne promjene koncentracija metabolita, koje su bile najizraženije u slučaju aminokiselina. Pokus obilježavanja  $^{13}\text{C}$ -glukozom pokazao je da povećana koncentracija aminokiselina nije posljedica povećane sinteze te da metaboliti Krebsovog ciklusa pri primjeni SSI-4 manje koriste glukozu kao izvor ugljika, upućujući na pojačano korištenje aminokiselina u osjetljivim stanicama. Analiza potrošnje metabolita iz medija potvrdila je povećan unos aminokiselina. Konačno, uzgojem MOLM-13 stanica tretiranih sa SSI-4 u medijima s različitom dostupnošću pojedinih aminokiselina, dokazano je smanjenje apoptoze pri njihovoj smanjenoj dostupnosti, poglavito leucina, izoleucina i glutamina, što ukazuje na to da toksičnost SSI-4 proizlazi iz metaboličkih promjena povezanih s povećanim unosom aminokiselina i da ovisi o njihovoj vanjskoj dostupnosti.

**Ključne riječi:** akutna mijeloična leukemija; aminokiseline; metabolomika; sinteza masnih kiselina; stearoil-koenzim A desaturaza

## 11. Summary

Klara Bardáč

### **Metabolic impact of stearoyl-CoA desaturase inhibition on acute myeloid leukemia cells**

Inhibition of stearoyl-CoA desaturase (SCD) disrupts the balance between saturated and unsaturated fatty acids, leading to the death of tumor cells. In solid tumors, this toxicity is associated with endoplasmic reticulum stress and lipid peroxidation, which activate apoptosis and ferroptosis. However, in acute myeloid leukemia (AML), these mechanisms account for only part of the observed effect. This study aimed to investigate the metabolic basis of AML cell sensitivity to pharmacological SCD inhibition. A metabolomic analysis was performed on AML cell lines following incubation with or without the SCD inhibitor SSI-4. Following their highest sensitivity to SSI-4, MOLM-13 cells exhibited significant changes in metabolite concentrations, most notably in amino acids. A  $^{13}\text{C}$ -glucose tracing experiment demonstrated that the increased amino acid concentrations were not a result of enhanced synthesis. Additionally, Krebs cycle metabolites in the presence of SSI-4 utilized glucose less as a carbon source, indicating an increased reliance on amino acids in sensitive cells. Analysis of metabolite consumption from the culture media confirmed an increased uptake of amino acids. Finally, culturing SSI-4-treated MOLM-13 cells in media with varying availability of specific amino acids showed a reduction in apoptosis under limited availability, particularly of leucine, isoleucine, and glutamine, suggesting that the toxicity of SSI-4 arises from metabolic changes associated with increased amino acid uptake and is dependent on their extracellular availability.

**Keywords:** acute myeloid leukemia; amino acids; metabolomics; fatty acid synthesis; stearoyl-CoA desaturase

## 12. Životopis

Rođena sam u Zagrebu 10. veljače 2001. godine, gdje sam završila Prvu gimnaziju s brojnim uspjesima na državnim natjecanjima, uključujući treće mjesto iz biologije i dvostruko treće mjesto iz hrvatskog jezika. Godine 2019. upisujem Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu kao jedna od 1 % najbolje rangiranih pristupnika prema ukupnim rezultatima državne mature i prijemnoga ispita. Dobitnica sam Dekanove nagrade za najboljeg studenta akademske godine 2019./2020. te sam svih šest godina studija završila s odličnim uspjehom. Bila sam demonstratorica na katedrama za anatomiju, histologiju i embriologiju te patofiziologiju. Tijekom studija sam sudjelovala na različitim stručnim praksama u inozemstvu, uključujući Clinical Electives na University of Kansas Medical Center (Kansas City, SAD) i IFMSA Research Exchange Program na I-Shou University (Kaohsiung City, Tajvan), a pohađala sam i dva međunarodna studentska tečaja iz onkologije - ESMO Course on Medical Oncology for Medical Students 2023 (Valencia) te ESO-ESSO-ESTRO-SIOPE Multidisciplinary Course in Oncology for Medical Students 2023 (Poznań). Sudjelovala sam na brojnim znanstvenim i stručnim kongresima, uključujući ESMO Kongres u Madridu 2023. godine i 15. kongres Hrvatskog društva za internističku onkologiju HLZ-a. Aktivno sam sudjelovala i u organizaciji nekoliko studentskih kongresa (Croatian Student Summit 19, Hrvatski studentski simpozij o bioetici 4, Studentski simpozij GušteRAK) te sam bila glavna organizatorica prvog studentskog multidisciplinarnog simpozija o melanomu „Melanomika“ održanog 24. svibnja 2025. godine. Predsjednica sam Studentske sekcije za onkologiju i imunologiju. Uz akademske aktivnosti, bila sam članica kadetske, juniorske i seniorske hrvatske stolnoteniske reprezentacije, a 2022. godine predstavljala sam Sveučilište u Zagrebu na Europskim sveučilišnim igrama u Łódžu, osvojivši peto mjesto u paru. Voditeljica sam Stolnoteniske sekcije Fakulteta, koji sam predstavljala na sportskim natjecanjima tijekom čitavog studija, osvajajući brojna prva mjesta.