Evolucijska i prostorno-vremenska usporedba N-glikoma mozga

Gudelj, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:152986

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Ivan Gudelj

EVOLUCIJSKA I PROSTORNO-VREMENSKA USPOREDBA N-GLIKOMA MOZGA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Ivan Gudelj

EVOLUTIONARY AND SPATIO-TEMPORAL COMPARISON OF THE BRAIN N-GLYCOMS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017.

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Ivan Gudelj

EVOLUCIJSKA I PROSTORNO-VREMENSKA USPOREDBA N-GLIKOMA MOZGA

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Gordan Lauc

Zagreb, 2017.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Ivan Gudelj

EVOLUTIONARY AND SPATIO-TEMPORAL COMPARISON OF THE BRAIN N-GLYCOMS

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Dr. Gordan Lauc, Professor

Zagreb, 2017.

Zahvala

Hvala mentoru prof. dr. sc. Gordanu Laucu na pruženoj prilici, iskazanom povjerenju, danoj podršci, slobodi koju mi je davao kod planiranja i izrade doktorata te stručnim savjetima kojima me usmjeravao.

Hvala prof. dr. sc. Nenadu Šestanu na danoj prilici za rad na Sveučilištu Yale i vremenu koje je pronašao za razgovor sa mnom, a posebno na iskazanom povjerenju te prenesenom znanju i iskustvu. Osobito veliko hvala Danielu (majstoru Mrkonji) za sve sate provedene u laboratoriju, sve ispijene kave (i piva), razgovore, prenesenom znanju, strpljivosti i posvećenom vremenu. Hvala Mariu što je uvijek bio tu da sasluša, da savjet i oraspoloži anegdotom. Thank you Candace for all your support with tedious paper work, company and time. Thank you Andrew for your help in the lab, letting me use all your enzymes and supervising me when Daniel was not there. Months at Yale gave me a chance to meet and work with wonderful people: Forrest, Marco, Andre, Kyle, Ying and Kiki. Finally, thank you Alice for all the time spent together, conversations, trips, board games, coffees and beers, with you it was easier to be far from home and work during weekends.

Hvala prof. dr. sc. Đuri Josiću što mi je dopustio da provedem tri mjeseca na Odjelu za biotehnologiju i omogućio trajnu okupaciju laboratorija i MALDI-a. Hvala Urošu što je svojim znanjem olakšao upoznavanje s masenom i svojim iskustvom pridonio rješavanju problema s kojim sam se susretao, a posebno na prenesenom životnom iskustvu i vremenu provedenom izvan laboratorija. Hvala Tamari za sve otpjevane pjesme u labu i razgovore o životu. Hvala Karlu za sve razgovore, savjete i vrijeme provedeno na kavi i u Bar Baru.

Veliko hvala ekipi s FBF-a, Olgi i Tomi, što su me uveli u glikobiologiju i uvijek bili dobro društvo, a Tamari na svim „uskakanjima" oko uzoraka, a pogotovo na dobrom društvu tijekom rada u laboratoriju kao i izvan njega.

Beskrajno hvala Thomasu na pomoći s analizom uzoraka i rezultata, Frani na pomoći sa statistikom i dobrom društvu kroz sve ove godine provedene u Genosu, Mislavu za pomoć oko MALDI-a bez čijeg iskustva i znanja bi ovo bilo puno teže izvedivo, a bez zanimljivih razgovora rad u Genosu puno monotoniji, i Maji za slušanje svih problema i traženja rješenja tijekom razvoja UPLC metode kao i na razgovorima tijekom šetnji doma.

Hvala Genos ekipi na zanimljivoj svakodnevnici, razgovorima, pomoći, podršci i razumijevanju : Luciji, Ireni, Jerku, Genadiju, Ivoni, Jasminki, Olgi, Mariji P., Mariji V., Natali, Jeleni, Maji i šefici Ivani kao i ostaloj Genos ekipi i pridruženim članovima.

Hvala svim prijateljima koji su bili tu da saslušaju probleme i budu podrška, a osobito Katici i Danielu jer su uvijek našli vremena za piće, druženje i beskrajne razgovore.

Veliko hvala mojim roditeljima na bezuvjetnoj podršci, savjetima, brigama i svim odricanjima da bih mogao slijediti put koji sam izabrao, a mojoj sestri jedno veliko hvala što je bila skoro cijeli moj život tu i svojom vedrinom činila ga ljepšim.

Ivana, hvala ti što si uvijek tu, na svoj tvojoj podršci, ljubavi, razgovorima i najviše što imaš beskrajno strpljenja. Iako sam odmah znao da „nisi ti tako" i dalje se pitam: „Kako uvijek napraviš da s tobom vrijedim više?".

Sadržaj

SAŽETAK ..... **XV**
ABSTRACT ..... **XVII**
§ 1. UVOD **1**
1.1. Svrha i cilj rada **3**
§ 2. LITERATURNI PREGLED **5**
2.1. Glikozilacija **5**
2.1.1. Važnost i funkcija glikozilacije *6*
2.1.2. Vrste glikozilacije *6*
2.2. N-glikozilacija proteina **7**
2.2.1. Vrste N-glikana i stupnjevi njihove biosinteze *8*
2.2.1.1. Sinteza oligosaharidnig prekusora na dolikol pirofosfatu *9*
2.2.1.2. Prijenos oligosaharidnog prekusora na polipeptid *11*
2.2.1.3. Procesiranje prekusora glikozidazama i glikoziltransferazama *12*
2.2.1.4. Završna obrada glikana *14*
2.2.2. N-glikani i njihova uloga u središnjem živčanom sustavu *15*
2.2.2.1. N-glikozilacija i razvoj živčanog sustava *15*
2.2.2.2. N-glikozilacija u fiziologiji živčanog sustava *16*
2.2.3. Evolucija N-glikozilacije *17*
2.3. Analiza glikozilacije proteina **18**
2.3.1. Analiza N- i O-glikozilacije proteina *19*
2.3.2. Analiza N-glikana UPLC metodom *20*
2.4. Središnji živčani sustav **21**
2.4.1. Stanični sastav središnjeg živčanog sustava *21*
2.4.1.1. Neuroni *22*
2.4.1.2. Glija stanice *22*
2.4.2. Anatomska podjela središnjeg živčanog sustava *24*
2.4.3. Razvoj središnjeg živčanog sustava *25*
2.4.4. Evolucija središnjeg živčanog sustava *26*
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO **27**
3.1. Uzorci **27**
3.2. Materijali **28**
3.2.1. Standardne kemikalije *28*

3.2.2. Enzimi *29*
3.2.3. Pločice i filtri *29*
3.3. Metode za pripravu uzoraka za analizu tekućinskom kromatografijom **29**
3.3.1. Homogenizacija uzoraka tkiva *29*
3.3.2. Metanol/kloroform ekstrakcija proteina *30*
3.3.3. Denaturacija i deglikozilacija proteina *31*
3.3.4. Uklanjanje proteina iz reakcijske smjese nakon deglikozilacije *31*
3.3.5. Izmjene metode u optimizaciji *32*
3.3.5.1. Optimizacija homogenizacije i ekstrakcije *32*
3.3.5.2. Optimizacija denaturacije i deglikozilacije *32*
3.3.5.3. Optimizacija pročišćavanja glikana nakon deglikozilacije *32*
3.3.6. Obilježavanje oslobođenih glikana fluorescentnom bojom *33*
3.3.7. Analiza fluorescentno obilježenih glikana tekućinskom kromatografijom *34*
3.3.7.1. Opis metode *34*
3.3.7.2. Skupljanje frakcija pojedinačnih kromatografskih pikova *35*
3.4. Robusnost metode **35**
3.5. Metode za pripravu uzoraka za analizu spektrometrijom masa **36**
3.5.1. Metoda esterifikacije *36*
3.5.2. Pročišćavanje esterificiranih glikana *37*
3.5.3. Analiza glikana spektrometrijom masa *37*
3.5.4. Određivanje struktura nakon spektrometrije masa i tandemske spektrometrije masa *38*
3.6. Statističke metode **39**
§ 4. REZULTATI **40**
4.1. Razvoj metode za analizu N-glikana mozga **40**
4.2. Optimizacija metode za analizu N-glikana mozga **44**
4.2.1. Optimizacija homogenizacije i ekstrakcije *44*
4.2.2. Optimizacija denaturacije i deglikozilacije *46*
4.2.3. Optimizacija pročišćavanja glikana nakon deglikozilacije *52*
4.3. Robusnost metode za analizu N-glikana mozga **53**
4.4. HILIC-UPLC analiza N-glikana mozga **56**
4.4.1. Razlike između glikanskih profila različitih vrsta, regija i razvoja mozga *58*
4.5. Analiza N-glikana mozga spektrometrijom masa **62**
§ 5. RASPRAVA **87**
5.1. Analiza N-glikana mozga je moguća reproducibilnom HILIC-UPLC metodom **87**
5.2. Rezultati nakon MALDI-TOF-MS analize otkrivaju veliku raznolikost N-glikanskih struktura mozga **90**

5.3. N-glikozilacija mozga se mijenja tijekom razvoja čovjeka 93
5.4. N-glikozilaciji mozga je različita između različitih vrsta 96
5.5. Različite regije mozga imaju različitu N-glikozilaciju....99
5.6. Smjernice za buduća istraživanja....102
§ 6. ZAKLJUČAK 104
§ 7. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ.... 105
§ 8. LITERATURNI IZVORI.... 108
§ 9. DODATAK XVII
§ 10. ŽIVOTOPIS XVIII

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

EVOLUCIJSKA I PROSTORNO-VREMENSKA USPOREDBA N-GLIKOMA MOZGA

Ivan Gudelj
Genos, d.o.o., Laboratorij za glikobiologiju, Hondlova 2/11, 10 000 Zagreb

N-glikozilacija proteina je ključna za razvoj i funkciju živčanog sustava. U ovoj disertaciji konstruiran je prostorno-vremenski glikomski profil mozga, istražujući N-glikanske strukture četiriju funkcionalno različitih regija mozga, fronatalna dorsalna kora velikog mozga, hipokampus, strijatum te mali mozak, i njihovu raspodjelu u mozgu odraslog čovjeka; kao i u mozgu čovjeka tijekom fetalnog razvoja. Također, s namjerom da se dobije evolucijska perspektiva N-glikanskih struktura unutar različitih regija mozga, napravljena je usporedba odgovarajućih regija mozga između glikoma mozga čovjeka, čimpanzi, makaki majmuna i štakora. Određivanje glikanskih profila uzoraka mozga je provedeno korištenjem dvaju analitičkih pristupa: tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti i spektrometrije masa. Uvidom u N-glikom analiziranih uzoraka, uočena je značajna razlika između različitih regija, vrsta i razvoja mozga. Razlika između N-glikoma je bila veća što su vrste bile evolucijski udaljenije. N-glikanski profil malog mozga se najviše razlikovao od ostalih analiziranih regija. Razvijena HILIC-UPLC metoda za analizu N-glikana tkiva mozga se pokazala reproducibilnom i robusnom.

(115 stranica, 24 slike, 12 tablica, 130 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: evolucija/ HILIC-UPLC/ mozak/ N-glikozilacija/ razvoj

Mentor: Prof. dr. sc. Gordan Lauc

Rad prihvaćen: 1.3.2017.

Ocjenitelji: Doc. dr. sc. Marko Močibob
Izv. prof. dr. sc. Olga Gornik
Dr. sc. Silva Katušić Hećimović, v. zn. sur.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

EVOLUTIONARY AND SPATIO-TEMPORAL COMPARISON OF THE BRAIN N-GLYCOMS

Ivan Gudelj
Genos Ltd, Glycobiology laboratory, Hondlova 2/11, 10 000 Zagreb

Protein N-glycosylation is crucial for the development and function of the nervous system. In this dissertation, a spatio-temporal profile of the brain glycome was constructed by investigating N-glycan structures of four functionally distinct brain regions, the dorsal fronatal cortex, the hippocampus, the striatum and the cerebellum, and their distribution within the adult human brain as well as the fetal. Moreover, in order to obtain an evolutionary perspective of the corresponding brain regions, a cross-species comparison was made between the human, the chimpanzee, the macaque and the rat. Two analytical approaches were used for glycosylation profiling of brain samples: ultra-performance liquid chromatography and mass spectrometry. Significant difference was noticed between the regions, the species and the developmental stages in the analyzed N-glycomes. The difference between species was higher as they were evolutionary more distinct. The cerebellar N-glycom was the most distinctive of all the analyzed brain regions. The developed HILIC-UPLC method for the N-glycans analysis of the brain tissue was reproducible and robust.

(115 pages, 24 figures, 12 tables, 130 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: brain/ evolution/ development/ HILIC-UPLC/ N-glycosylation

Supervisor: Dr. Gordan Lauc, Professor

Thesis accepted: 1.3.2017.

Reviewers: Dr. Marko Močibob, Assistant Professor
Dr. Olga Gornik, Associate Professor
Dr. Silva Katušić Hećimović, Senior Research Associate

§ 1. UVOD

Glikozilacija je najčešća posttranslacijska modifikacija proteina, koja se ne događa slučajno (za razliku od glikacije), nego je to kontrolirani enzimski proces dodavanja šećera proteinima za koji ne postoji izravna uputa upisna u molekuli DNA, nego je rezultat složenog međudjelovanja različitih enzima i metabolita. Glikani vezani za proteine uključeni su u skoro sve molekularne interakcije na staničnoj površini i međustaničnom prostoru[1]. Promijene u sastavu i količini glikana su povezane s brojnim fiziološkim svojstvima kao što su dob, spol, rasa, reproduktivni ciklus, stadij razvoja, utjecaji okoliša, indeks tjelesne mase, te prehrambenim i životnim navikama[2].

Poznato je više različitih vrsta glikozilacije od kojih je najproučavanija N-glikozilacija. Početna N-glikanska struktura je sintetizirana u endoplazmatskom retikulumu kao razgranata struktura na lipidnom sidru (dolikol pirofosfatu) te se kasnije kotranslacijski, „en bloc" prenosi i veže preko N-acetilglukozamina (GlcNAc) na dušikov atom asparagina u evolucijski očuvanom aminokiselinskom slijedu asparagin–X–serin ili asparagin–X–treonin, gdje je X bilo koja aminokiselina osim prolina. U endoplazmatskom retikulumu i kasnije u Golgijevom aparatu, N-vezane glikanske strukture su modificirane hidrolitičkim uklanjanjem šećernih struktura nakon kojeg slijedi ponovna glikozilacija s dodatnim šećernim strukturama, stvarajući na taj način N-glikoproteinski kompleks. Dok je slijed reakcija koje dovode do biosinteze, "en bloc" prijenosa i procesiranja N-glikana dosta dobro poznat, još uvijek nije u potpunosti poznato kako N-glikani utječu na biološku sudbinu i funkciju N-glikoproteina[3].

Iznenađujuće je koliko je glikanskih struktura zajedničko različitim grupama eukariota. To se može objasniti evolucijom proteina koji kontroliraju metabolizam glikana; glikoziltransferaze, glikozilhidrolaze, transporteri šećera te lektini su organizirani u svakom tkivu i stanici tako da omoguće pravilnu glikozilaciju glikokonjugata, stvarajući time strukturne i funkcionalne potrebe u različitim uvjetima. Sve obitelji glikana su prisutne kod eukariota: N-glikani, različiti O-glikani, C-manoze, glikolipidi i glikozaminoglikani. Svaki od navedenih tipova posjeduje jezgru koja je zajednička svim strukturama toga tipa. Nadogradnja sržne strukture je, također, popraćena zajedničkim procesima. Međutim, perifernim dodavanjem završni dio glikana rezultira specifičnim glikanskim strukturama, a te strukture su one koje su izložene vanjskom okruženju te su selektirane da bi omogućile odgovarajuće

prilagodbe u određenim uvjetima. Na taj način mnoga svojstva glikanskih struktura utječu na fenotipsku varijaciju i omogućuju nam uvidjeti fleksibilnost sljedova šećernih struktura[4]. Navedena strukturalna selekcija se javlja kroz mutacije unutar ili gubljenjem određenih metaboličkih putova[5].

Glikokonjugati se mogu pronaći u svim stanicama i tkivima životinja, uključujući i središnji živčani sustav[3,6] gdje igraju ključnu ulogu u njegovoj funkciji, a osobito u dijelu životnog ciklusa tijekom kojeg stanice živčanog sustava prolaze "metamorfoze" od neuralnih matičnih stanica do zrelih neurona, astrocita i oligodendrocita (ili Schwannovih stanica u perifernom živčanom sustavu). Diferencijacija i funkcija tih stanica ovisi o njihovom odgovoru na vanstanične i unutarstanične signale, a ti odgovori ovise o specifičnosti i osjetljivosti receptorskih proteina. Sve više postaje jasno da je osjetljivost tih receptora regulirana specifičnošću N-glikanskih ostataka koji utječu na: (1) sekreciju, stabilnost i razgradnju liganda receptora; (2) staničnu ekspresiju, internalizaciju te recikliranje ili turnover takvih receptora; (3) adheziji neurona i drugih stanica preko receptora koji se nalaze na staničnoj površini i vanstaničnih proteina matriksa; (4) indukciji i transdukciji signala preko faktora rasta te neurotransmitorskih receptora i ionskih kanala. Kod mnogih od navedenih slučajeva, N-glikani utječu na: (1) pravilno smatanje liganada ili receptora; (2) topljivost ili polarnost liganada ili receptora; (3) vezanje na vanstanične ili unutarstanične faktore koji induciraju stanične signalne putove ili posreduju daljnje procesiranje N-glikoproteina. Posljednje navedeno zaokuplja osobitu pažnju u posljednje vrijeme zato jer određeni N-glikani mogu regulirati povezivanje proteina u receptor/ligand kompleksima ili šećer-specifično vezanje proteina na plazmatskoj membrani (npr. galektini) koji posreduju u endcitozi i egzocitozi, transportu ili sortiranju, te recikliranju ili turnoveru takvih receptora[7–9].

Također, mutacije u proteinima koji posreduju N-glikozilaciji i procesiranju N-glikana mogu dovesti do ozbiljnih poremećaja, uključujući i one u središnjem živčanom sustav[10]. Navedeno nije ograničeno samo na mutacije u glikozidazama/glikoziltransferazama koje sudjeluju u obradi i procesiranju glikana, nego obuhvaća i proteine koji sudjeluju u transportu N-glikoproteina za njihovo daljnje procesiranje u endoplazmatskom retikulumu ili Golgijevom aparatu, kao što je pronađeno kod humanih urođenih poremećaja glikozilacije (CDG, eng. *congenital disorders of glycosylation*)[11].

U posljednje vrijeme je molekularna neuroznanost transformirana dolaskom "*omics*" tehnologija i profiliranjem genoma, proteoma i metaboloma mozga[12–14]. Tradicionalne

metodologije kao što su fluorescentno obilježavanje i imunohistokemija su zamijenjene spektrometrijom masa visoke rezolucije i automatskim pretraživanjem baza. Unatoč tome, relativno malo se zna o glikomu mozga. Iako postoji obilje imunohistokemijskih dokaza koji povezuju glikozilaciju s ključnim funkcijama mozga kao što su plastičnost sinapsi i formiranje memorije[15,16], relativno malo istraživanja je bilo uspješno u primjeni novih "*omics*" tehnologija koje bi dale bolji uvid u glikozilaciju mozga[17,18]. Jedan od razloga zašto je glikozilacija mozga tako slabo istražena bi mogao biti u činjenici da su glikani relativno slabo zastupljeni u mozgu, tj. manje od 5 % suhe tvari mozga dolazi od ugljikohidrata, a dok preko 80 % dolazi od lipida i proteina[3].

Za definiranje funkcije N-glikana u normalnim fiziološkim uvjetima kao i onima u bolesti, potrebno je poznavati njihovu točnu strukturu i enzimske korake koji generiraju takve strukture. Trenutačno je napravljen veliki napredak u analizi struktura uz pomoć spektrometrije masa (MS) za veliki broj uzoraka te je to otvorilo novo veliko područje za proučavanje N-glikana i ostalih proteinskih glikokonjugata kao što su O-glikani i proteoglikani[19]. MS je već dosta dugo prisutna u polju glikomike, ali njena kombinacija s tekućinskom kromatografijom (LC, eng. *liquid chromatography*) je postala popularna tek nedavno. Prednosti nano-LC tehnologije, kombinirane sa stvaranjem glikanskih LC i LC/MS baza podataka je značajno potpomogla razvoj strukturno specifičnih glikan profilirajućih metoda. Mogućnost razlikovanja različitih izomernih struktura je ključni analitički zahtjev u glikomici, zato jer glikanski izomeri često vuku podrijetlo od totalno drugačijeg biosintetskog procesa[20] .

1.1. Svrha i cilj rada

N-glikozilacija mozga je dosta slabo istražena, a na taj način i uloga N-glikana u razvoju i funkcioniranju mozga kao i korištenje N-glikana kao potencijalnih meta za liječenje te rano i točno dijagnosticiranje bolesti u kojima se zna da N-glikani igraju ključnu ulogu. Većina podataka koje imamo je dobivena istraživanjem i analizom N-glikana malog broja pojedinačnih proteina te i dalje nedostaje cjelokupan N-glikom mozga. Problem nepoznavanja N-glikoma postaje puno izraženiji kad se govori o nehumanim primatima kao i tijekom čovječjeg prenatalnog razvoja gdje nedostaje skoro pa cijela slika o strukturama N-glikana. Stoga je cilj ove doktorske disertacije analizirati ukupnu N-glikozilaciju kore velikog mozga,

hipokampusa, strijatuma te malog mozga četiriju različitih vrsta: štakora, makaki majmuna, čimpanze i čovjeka; pri čemu će kod vrste *Homo sapiens* biti analizirani i fetalni uzorci. Na taj način ovo će postati prvo istraživanje koje će dati pregled N-glikoma navedenih regija mozga i vrsta, njihovu evolucijsku usporedbu kao i usporedbu tijekom razvoja. U tu svrhu ukupni N-glikani uzorka će biti profilirani i razdijeljeni tekućinskom kromatografijom koja se temelji na hidrofilnim interakcijama (HILIC, eng. *hydrophilic interaction liquid chromatography*) u kombinaciji s tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (UPLC, eng. *ultra performance liquid chromatography*). Strukture u pojedinačnim frakcijama će biti određene pomoću matricom potpomognute laserske desorpcije/ionizacije (MALDI, eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization*) spektrometrije masa te općeg poznavanja glikobiologije.

Također, zbog nepostojanja prikladne metode za analizu N-glikoma mozga iz relativno većeg broja uzoraka u kratkom vremenu, a istovremeno uz dobivanje pouzdanijih rezultata, dio ove disertacije obuhvaća razvoj, optimizaciju i validaciju metode koja će se koristiti za analizu prethodno navedenih uzoraka.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Glikozilacija

Ugljikohidrati su najzastupljeniji, strukturno kompleksni i funkcionalno različiti organski spojevi. Oni obuhvaćaju monosaharide (npr. glukoza), oligosaharide (npr. saharoza, laktoza) te polisaharide (npr. škrob, celuloza, polisaharidi biljnog i bakterijskog staničnog zida, hitin te životinjski glikozaminoglikani). Osim što mogu postojati kao samostalne molekule, oni se mogu vezati s proteinima i lipidima, pritom stvarajući glikokonjugate (glikoproteini, proteoglikani i glikolipidi)[1,6]. Oligo- i polisaharidi koji su kovalentno vezani za proteine ili lipide nazivaju se glikanima, a enzimski proces kovalentnog vezanja glikana na proteine/lipide glikozilacija. Većina dobro istraženih biosintetskih puteva glavnih skupina glikana je prostorno ograničena na endoplazmatski retikulum (ER) i Golgijev aparat (GA). Tako su novosintetizirani proteini koju potječu iz ER kotranslacijski ili posttranslacijski promijenjeni dodavanjem šećernog lanca tijekom različitih stupnjeva njihovog putovanja prema konačnom odredištu. Glikozilacijske reakcije obično koriste aktivirane oblike monosaharida (nukleotidni šećeri) kao donore u reakcijama koje se katalizirane glikoziltransferazama. U skoro svim slučajevima nukleotidni donori su sintetizirani unutar citoplazmatskog ili nuklearnog dijela stanice od monosaharidnih prekusora endogenog ili egzogenog podrijetla, te kao takvi trebaju biti aktivno transportirani kroz membranski dvosloj u ER i GA da bi bili dostupni za reakcije glikozilacije. Također, važno je naglasiti da za razliku od proteinskih sljedova koje su primarno produkti gena, glikanske lančane strukture nisu direktno kodirane genomom te su sekundarni produkti gena. Glikanski lanci se mogu pojaviti u brojnim mogućim kombinacijama jer nastaju kao posljedica kompeticijskih i sekvencijalno djelujućih glikozidaza i glikoziltransferaza. Tako da unatoč poznavanju razina ekspresije svih relevantnih genskih produkata, mi i dalje ne razumijemo dovoljno strukture i biosintetske putove da bi mogli precizno predvidjeti glikanske strukture u određenom tipu stanica. Štoviše, male promijene u okolišu mogu uzrokovati dramatične promjene u glikanima određene stanice; to zajedno tvori varijabilnu i dinamičnu prirodu glikozilacije što je čini moćnim biosintetskim putom koji stvara biološku raznolikost i kompleksnost. Naravno, to, također, čini istraživanje glikana puno zahtjevnijim i težim od nukleinskih kiselina i proteina.

2.1.1. Važnost i funkcija glikozilacije

Glikanske strukture glikokonjugata su strukturno kompleksne te su uključene u broje funkcije koje su ključne u diferencijaciji, razvoju te svim ostalim pogledima normalnog funkcioniranja životinja. Tako npr. oni čine glavne krvne grupe i ostale antigene, služe kao informacijske molekule u interakcijama stanica – stanica i stanica – molekula, funkcioniraju kao receptori za biološke procese te pomažu smatanje, usmjeravanje i sekreciju proteina. Također su uključeni u organizaciju tkiva, kretanje limfocita, staničnu signalizaciju i regulaciju imunološkog sustava. U dosta slučajeva, prava uloga glikana nije u potpunosti razjašnjena. Istraživanja u posljednjih nekoliko desetljeća zajedno s tehnološkim napretkom su otkrili strukture velikog broja glikana te znatno povećali naše znanje o njihovoj biološkoj ulozi, ali i dalje je to samo „vrh ledenog brijega". Glikokonjugati su značajno prisutni u svim životinjskim stanicama i tkivima, uključujući i one u živčanom sustavu[1,6]. Oni su pronađeni u tkivnom matriksu i vanstaničnim tekućinama kao što su serum, spinalna tekućina (likvor), slina te su prisutni u izrazito velikim količinama u respiratornoj, gastrointestinalnoj i urogenitalnoj sluzi. Međutim, glavni razlog povećanog zanimanja za glikane je njihovo pojavljivanje na staničnim površinama gdje imaju važnu ulogu u brojnim biološkim procesima. Glikani glikokonjugata koji se nalaze na staničnoj membrani su okrenuti prema vanjskoj strani (široko i daleko) čime postaju dostupni za funkcionalne interakcije. Anionski šećerni ostatci glikana koji povećavaju hidrofilnost i doprinose negativnom naboju stanične površine, su važne odrednice socijalnog ponašanja stanice[1,6,21–23].

2.1.2. Vrste glikozilacije

Dva najčešća i najviše proučavana tipa glikozilacije su:

a) N-glikozilacija – glikan je kovalentno vezan *β*-glikozidnom vezom za dušikov atom asparaginskiog ostataka proteina u slijedu aminokiselina Asn – Xaa – Ser/Thr (gdje je Xaa bilo koja aminokiselina osim Pro) najčešće preko *N*-acetilglukozamina (GlcNAc*β*1-Asn). Iako rijetko, N-glikani se mogu pronaći vezani za asparagin u slijedu Asn– Xaa–Cys, gdje se cistein nalazi u reduciranoj formi. Također, kod određenih vrsta glikani mogu biti vezani za asparagin preko glukoze, *N*-acetilgalaktozamina i ramnoze; dok glikoproteini slatkog kukuruza imaju vezanu glukozu na arginin.

b) O-glikozilacija – glikan je kovalentno vezan α-glikozidnom vezom za kisikov atom hidroksilne skupine serina ili treonina preko *N*-actilgalaktozamina (GalNAc) te se takve strukture nazivaju mucinima. Ostali nemucinski tipovi O-glikana mogu imati fukozu, manozu, galaktozu i glukozu vezanu α-glikozidnom vezom ili ksilozu, GlcNAc, galaktozu i glukozu vezanu β-glikozidnom vezom.

Vrste glikozilacije koje nisu toliko učestale kao prethodno navedene, a također prolaze ER/GA sintetski put su:

c) C-manozilacija – C-1 atom manoze je vezan α-glikozidnom vezom za C-2 atom indolskog prstena prvog triptofana u W-X-X-W (gdje je X bilo koja aminokiselina) aminokiselinskom slijedu. Iako je ovaj aminokiselinski slijed relativno čest u proteinima, C-manozilacija je uočena kod tek nekoliko protein, a njena uloga je i dalje nepoznata.
d) Glikozilfosfatidilinozitolna (GPI) sidra – biosintetski put sinteze GPI sidra je počinje prijenosom GlcNAc-a na fosfoinoziltol. GPI sidra služe za usidravanje brojnih proteina stanične površine za plazmatsku membranu; C-kraj proteina je povezan preko glikana za lipide membrane[24].
e) Fosfoglikozilacija– glikani, najčešće preko manoze i GlcNAc-a, su vezani za kisik fosfatne skupine serina, a u rijetkim slučajevima treonina. Koliko je proteina modificirano ovom vrstom glikozilacije te koja je njena uloga i dalje je nepoznato[25].

2.2. N-glikozilacija proteina

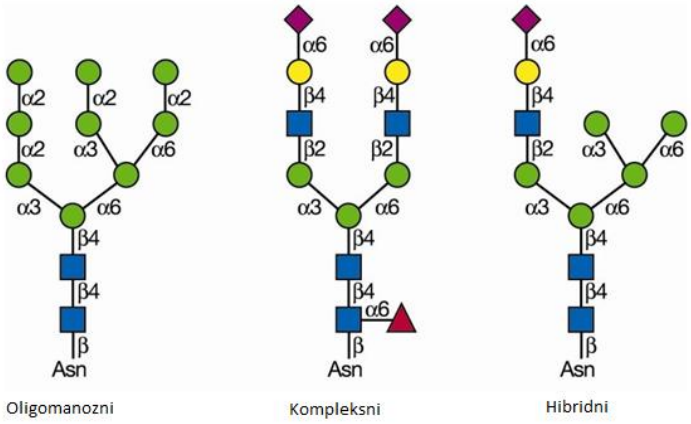
Brojni membranski kao i oni sekrecijski proteini, uključujući faktore rasta i njihove receptore, su N-glikozilirani. Početna N-glikanska struktura sintetizira se u ER-u kao razgranata struktura na lipidnom sidru (dolikolpirofosfatu) te kotranslacijski, „en bloc“ prenosi i veže preko GlcNAc-a za asparagain unutar specifičnog za N-glikozilaciju aminokiselinskog slijeda proteina. U ER i kasnije GA, N-glikani podliježu hidrolitičkom uklanjanju određenih šećera nakon kojih slijedi ponovna glikozilacija dodavanjem šećera kao što su galaktoza, fukoza ili sialinska kiselina stvarajući na taj način kompleksne N-glikoproteine. Dok je slijed reakcija koje dovode do biosinteze, „en bloc“ prijenosa i procesiranja N-glikana dosta istražen, i dalje

nije u potpunosti poznato na koji način N-glikani utječu na biološku sudbinu i funkciju N-glikoproteina.

2.2.1. Vrste N-glikana i stupnjevi njihove biosinteze

Kod životinjskih stanica, šećer koji je povezan za asparaginski ostatak proteina je skoro uvijek GlcNAc koji je uvijek u β konfiguraciji (slika 1). Uz prvi GlcNAc svim N-glikanima su zajednički još jedan GlcNAc te tri manoze (Man) stvarajući na taj način sržnu strukturu svih N-glikan: Manα1–6(Manα1–3)Manβ1–4GlcNAcβ1–4GlcNAcβ1-Asn. Vrste šećera i način grananja šećera dodanih na sržnu strukturu daju tri vrste N-glikana:

1. Oligomanozni – isključivo su manoze vezane na sržnu strukturu
2. Kompleksni – na svakoj od krajnjih manoza sržne strukture je vezan GlcNAc koji je početni šećer „antena“
3. Hibridni – na Manα1–3 ruku sržne strukture su vezane jedna ili dvije antene, dok su na Manα1–6 ruku vezane samo manoze



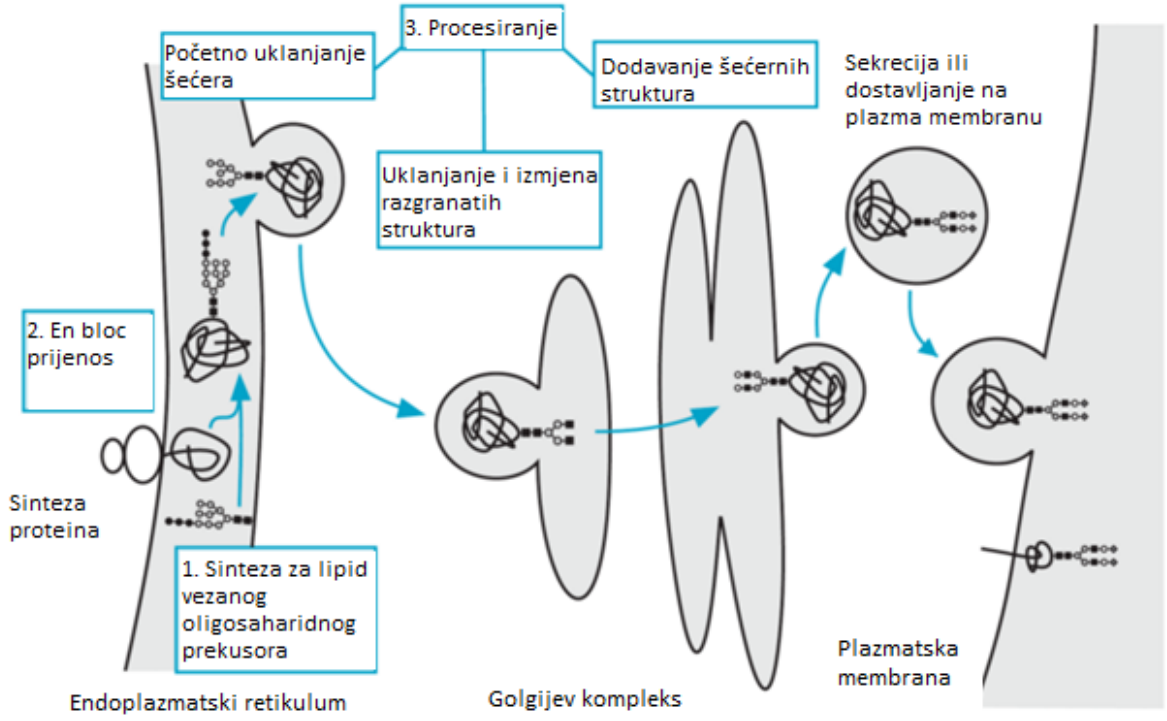
Slika 1. Vrste N-glikana. N-glikani vezani za protein u Asn – Xaa – Ser/Thr slijedu mogu se podijeliti na tri vrste kod zrelih glikoproteina: oligomanozni, kompleksni i hibridni. Svaka vrsta N-glikana ima zajedničku sržnu strukturu $Man_3GlcNAc_2Asn$. Zeleni krug – manoza, plavi kvradrat – *N*-acetilglukozamin, ljubičasti romb – *N*-acetineuraminska kiselina, žuti krug – galaktoza, crveni trokut – fukoza (Preuzeto i prilagođeno iz Varki i suradnici[1])

Općenito biosinteza N-glikana se može podijeliti na tri stupnja[26] (slika 2):

1. Sinteza lipid vezanog oligosaharidnog prekusora
2. „En bloc“ prijenos oligosaharida na polipeptid
3. Procesiranje oligosaharida

Posljednji korak uključuje uklanjanje nekih šećera koji se nalaze na oligosaharidnom prekusoru nakon kojeg slijedi dodavanje novih šećera na nereducirajući kraj glikana. Unutar

stanice, sinteza glikoproteina je prostorno odvojena; sinteza prekusora vezanog za lipid, „en bloc“ prijenos na protein te početno uklanjanje određenih šećernih struktura se odvija u hrapavom ER-u, dok se procesiranje događa kako glikoprotein putuje kroz GA.

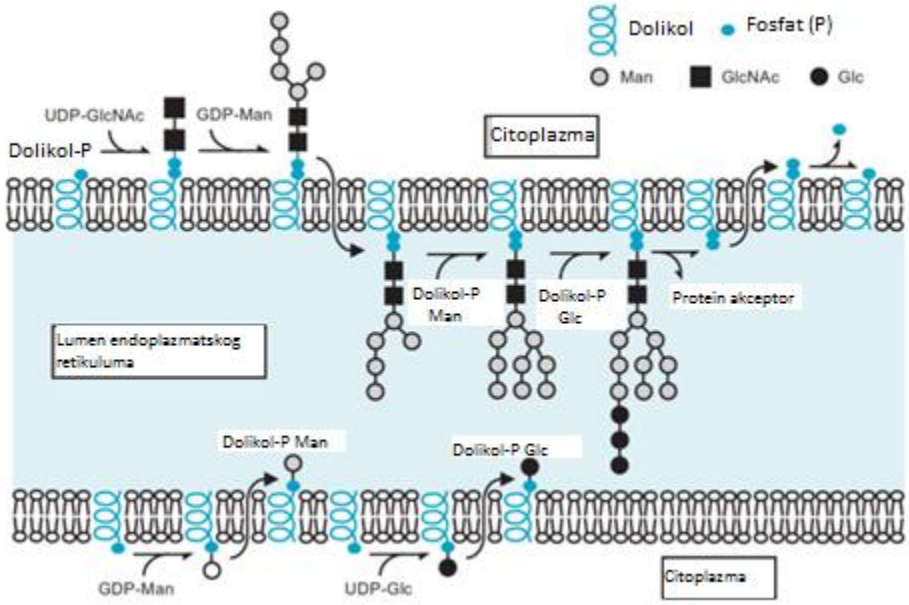


Slika 2. Biosinteza N-glikana. Biosinteza N-glikana se može podijeliti u tri stupnja: 1) Sinteza lipid vezanog oligosaharidnog prekusora, 2) „En bloc“ prijenos oligosaharida na polipeptid, 3) Procesiranje oligosaharida (Preuzeto i prilagođeno iz Tylor i Drickamer[6])

2.2.1.1. Sinteza oligosaharidnig prekusora na dolikol pirofosfatu

Dolikol, na kojem se sintetizira $Glc_3Man_6GlcNac$ struktura, nastaje kondenzacijom izoprenskih jedinica što je istovjetno sintezi kolesterola i drugih sterola s razlikom da kod dolikola izoprenske jedinice su vezane kraj jedne za kraj druge i nisu ciklizirane. S obzirom da dolikol nastaje od velikog broja izoprenskih jedinica, njegov hidrofobni dio je dosta veći od repova masnih kiselina membranskih fosfolipida te se zbog toga ova hidrofobna regija nalazi vjerojatno u uzvojitoj ili preklopljenoj konformaciji. Sinteza glikana na dolikolu ide u dvije faze. Prva faza se odvija na citoplazmatskoj strani ER-a dok druga faza u lumenu. Enzimi koji kataliziraju vezanje dva GlcNAc-a i prvih pet manoza koriste izravno UDP-GlcNAc i GDP-Man kao nukleotidne donore šećera. Nakon toga, dolikol-PP-glikan se prenosi preko membrane i postaje nedostupan citoplazmatskim enzimima. Navedeni prijenos preko

membrane i dalje nije u potpunosti razjašnjen. Jednom kad se glikan nalazi na luminalnoj strani ER-a on postaje dostupan za nastavak sinteze, tj. dodatak posljednje četiri manoze i tri glukoze. Međutim, u ovom slučaju donori manoze i glukoze ne dolaze direktno od nukleotidnih donora već monosaharida vezanih na dolikol koji su sintetizirani na citoplazmatskoj strani ER-a reakcijom dolikol fosfata s UDP-Glc ili GDP-Man te se prenose na luminalnu stranu ER-a. Ovaj prijenos je analogan prethodno spomenutom prijenosu preko membrane ER-a te jednako kao i prethodni niti ovaj prijenos dolikol fosfomonosaharida preko membrane ER-a nije u potpunosti razumljiv. Energija potrebna za sintezu glikozidnih veza dolazi od saharid-fosfat veze preko koje je monosaharid vezan za dolikol fosfat. Prijenos završenog glikana na polipeptid se, također, događa na luminaloj strani ER-a. Energija potrebna za sintezu GlcNAc-asparagin veze dolazi od energije kidanja glikan-fosfat veze. S obzirom da je glikan vezan za dolikol pirofosfatnom skupinom, nakon prijenosa glikana fosfataza uklanja jednu fosfatnu skupinu te je tom reakcijom dolikol spreman za sljedeći ciklus (slika 3).



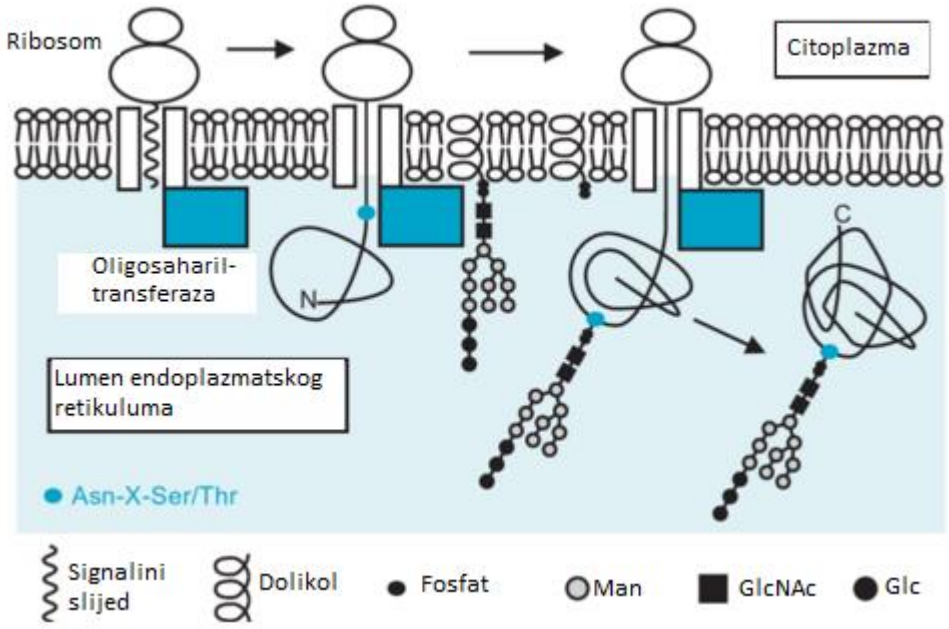
Slika 3. Sinteza oligosaharidnog prekusora na dolikol pirofosfatu. Man – manoza, GlcNAc – *N*-acetilglukozaim, Glc – glukoza (Preuzeto i prilagođeno iz Tylor i Drickamer[6])

2.2.1.2. Prijenos oligosaharidnog prekusora na polipeptid

Općenito, asparaginski ostaci na koje se glikani mogu vezati trebaju ispuniti tri uvjeta:

1. Trebaju biti smješteni unutar specifičnog aminokiselinskog slijeda unutar primarne proteinske strukture
2. Trebaju biti pravilno smješteni u trodimenzijonalnoj strukturi proteina
3. Trebaju se nalaziti u određenom unutarstaničnom odjeljku

Glikozilirani asparaginski ostaci su skoro uvijek prisutni u određenom aminokiselinskom slijedu (Poglavlje 2.1.2.). Također, N-glikani su pronađeni na površini proteina, a ne unutar njih te se njihova sinteza inicira isključivo u lumenu ER-a. Zbog toga se asparaginski ostaci koji mogu biti podložni glikozilaciju mogu naći kod sekretornih proteina kao i na dijelu transmembranskog proteina koji je okrenut prema lumenu. Enzim koji katalizira prijenos dovršenog glikanskog prekusora vezanog za dolikol na polipeptidni akceptor je oligosahariltransferaza (slika 4). Svojstva ovog enzima mogu objasniti prethodno navedene uvjete glikozilacije. Uvjet za Asn-Xaa-Ser/Thr aminokiselinski slijed je određen specifičnošću enzima. Također, činjenica da su N-vezani glikani pronađeni isključivo na luminalnom dijelu proteina je posljedica luminalnog smještaja enzima.



Slika 4. Prijenos oligosaharidnog prekusora na polipeptid. Man – manoza, GlcNAc – *N*-acetilglukozaim, Glc – glukoza (Preuzeto i prilagođeno iz Tylor i Drickamer[6])

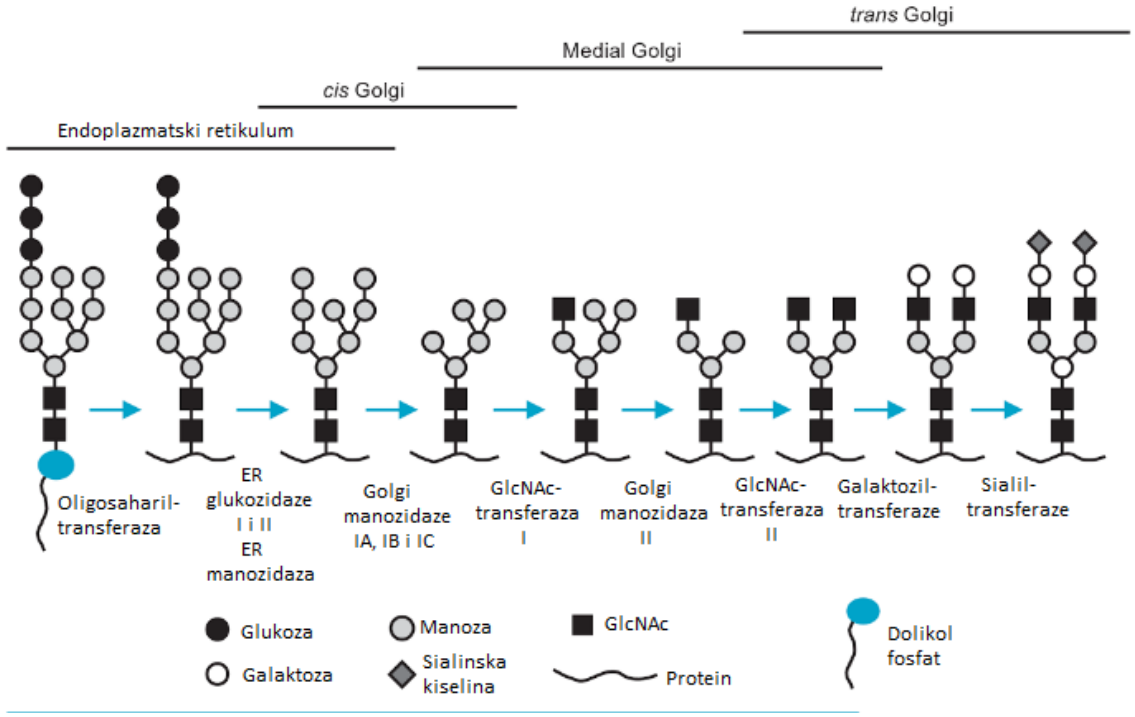
Drugi uvjet za glikozilaciju, tj. da se događa isključivo na površini proteina, postoji zbog energetskih uvjeta; relativno polarna svojstva šećera su nekompatibilna s hidrofobnom unutrašnjosti proteina. Međutim, mehanizam zbog kojeg se to stvarno događa i dalje je nepoznat. Iako se glikozilacija često naziva posttranslacijskom modifikacijom, određena vrsta oligosahariltransferaze je povezana s dijelovima membrane ER-a koji su vezani za ribosom i translociraju polipetid kroz membranu na luminalnu stranu. Tako da se prijenos glikana događa u trenutku kad polipeptid ulazi u lumen ER-a te je kotranslacijski događaj. Druga vrsta oligosahariltransferaza glikozilira „promašene" mete postranslacijski. Kod oba načina glikozilacije, ona se događa na nesmotanom polipeptidu te se može pretpostaviti da bilo koji Asn- Xaa- Ser/Thr aminokiselinski slijed može biti potencijalna meta za glikozilaciju. Iako je poznato da se takav relativno polaran aminokiselinski slijed često nalazi na površini proteina, postoje primjeri kada se navedeni slijed nalazi u unutrašnjosti proteina, ali u tome slučaju nije glikoziliran. Postoji mogućnost da dolazi do jako brzog smatanja proteina te u tom slučaju čini mjesto nedostupnim za glikozilaciju. Nakon prijenosa na polipeptid, slijedi procesiranje N-vezanih glikana. Prvo se uklanjaju određeni šećeri pomoću glikozidaza; enzimi koji kataliziraju energetski povoljno kidanje glikozidne veze pomoću molekule vode. Navedeni enzimi su egzoglikozidaze koje mogu ukloniti samo monosaharide koji se nalaze na nereducirajućem kraju glikana. Prvi korak je uklanjanje tri glukoze koji se događa dok je glikozilirani polipeptid još uvijek u ER-u. Glukozidaza I je odgovorna za uklanjanje krajnjih α1-2 vezanih glukoza, dok glukozidaza II uklanja dvije unutrašnje α1-3 vezane glukoze jednom kad je krajnja uklonjena. Uklanjanje posljednje glukoze je znak da je novosintetizirani glikoprotein spreman za prijenos iz ER-a. Sustav kontrole kvalitete koji kontrolira pravilno smatanje proteina je povezan s navedenim procesom.

2.2.1.3. Procesiranje prekusora glikozidazama i glikoziltransferazama

Struktura koja ostaje nakon obrade glukozidazom I i II je supstrat za niz manozidaza koje uklanjaju sve ili samo neke manoze vezane α1-2 vezom (slika 5). Prva manozidaza – α-manozidaza I se nalazi u lumenu ER-a te uklanja terminalnu manozu sa sržne ruke $Man_9GlcNAc_2$. Međutim, navedena manozidaza ne obrađuje sve glikane, tako da ovisno o tome jesu li glikani bili supstrat α-manozidaze I ili ne, u GA dolaze $Man_9GlcNAc_2$ ili $Man_8GlcNAc_2$ gdje postaju supstrat za α-manozidaze IA, IB i IC smještene u cis-GA-u te nastaje međuprodukt hibridnih i kompleksnih glikana $Man_5GlcNAc_2$. Glikani koji su vezani

za određene proteine ostaju nepromijenjeni nakon početnih koraka do stanične površine. Takvi glikani, koji sadržavaju pet do devet manoza se nazivaju oligomanozni glikani, dok su ostali glikani procesirani u složenije strukture u medial-GA-u.

Početak biosinteze hibridnih i kompleksnih glikana počinje djelovanje N-acetilglukozaminiltransferaze GlcNAcT-I koja dodaje GlcNAc na C-2 α1-3 vezane manoze sržnog dijela $Man_5GlcNAc_2$. Nakon ovog koraka, kod većine glikana slijedi uklanjanje krajnjih α1-3 i α1-6 vezanih manoza pomoću α-manozidaze II koja se, također, nalazi u medial-GA-u; na taj način nastaje $GlcNAcMan_3GlcNAc_2$. Na nastali glikan GlcNAcT-II dodaje GlcNAc na C-2 α1–6 vezane manoze stvarajući prekusora za sve kompleksne N-glikane. Hibridni glikani nastaju u slučajevima kada ne dolazi do uklanjanja α1-3 i α1-6 vezanih manoza pomoću α-manozidaze II dajući na taj način $GlcNAcMan_4GlcNAc_2$ strukturu. Kompleksni N-glikani koji nastaju u medial-GA-u imaju dvije grane ili „antene“ nastale dodatkom dva krajnja GlcNAc-a. Dodatne grane nastaju djelovanjem GlcNAcT-IV na C-4 α1–3 vezane manoze ili GlcNAcT-V na C-6 α1–6 vezane manoze stvarajući tri- i tetra-antenarene N-glikane. Uz navedene enzime postoje i druge *N*-acetilglukozaminiltransferaze stvarajući na taj način drugačije vezane antene ili veći broj njih. Također, kompleksni i hibridni glikani mogu imati račvajući GlcNAc koji je vezan za β-manozu sržne strukture koji nastaje djelovanjem GlcNAcT-III. Prisutnost račvajućeg GlcNAc-a blokira djelovanje α-manozidaze II te, također, sprječava određene N-acetilglukozaminiltransferaze. Međutim, di-, tri- i tetra-antenarni kompleksni N-glikani s račvajućim GlcNAc-om nastaju nakon djelovanja α-manozidaze II te kad je sintetiziran početak grana odgovarajućim *N*-acetilglukozaminiltransferazama, tako da nije neobično vidjeti N-glikane s više grana i račvajućim GlcNAc-om.



Slika 5. Procesiranje prekusora N-glikana glikozidazama i glikoziltransferazama. GlcNAc – *N*-acetilglukozamin (Preuzeto i prilagođeno iz Tylor i Drickamer[6])

2.2.1.4. Završna obrada glikana

Daljnja dodavanja šećera se najčešće događaju u trans-GA-u stvarajući tako više složene N-glikane. Ovaj dio biosintetskog puta se može podijeliti na tri dijela:

1. Sržno dodavanje šećera – najčešća sržna modifikacija N-glikana kod kralježnjaka je dodavanje α1–6 vezane fukoze na GlcNAc vezan za asparagin. Kod beskralježnjaka fukoza može biti vezana α1–3 i/ili α1–6 vezom za isti GlcNAc kao i kod kralježnjaka, dok je kod biljaka isključivo vezana α1–3 vezom. Za prijenos fukoze na sržni GlcNAc potreban je prvo prijenos GlcNAc-a pomoću GlcNAcT-I. Kod biljaka i helminta je prisutan i dodatak ksiloze vezane β1–2 vezom za β-manozu sržne strukture; ksiloziltransferaze baš kao i fukoziltransferaze zahtijevaju prethodno djelovanje GlcNAcT-I.

2. Produžetak antena dodatkom šećera na GlcNAc – većina kompleksnih i hibridnih N-glikana ima produžene antene nastale dodatkom β-vezane galaktoze na početni GlcNAc stvarajući Galβ1-4GlcNAc, često nazivan tip-2 *N*-acetillaktozamin (LacNAc). Antene mogu biti dalje produživane dodavanjem GlcNAc-a i galaktoze

dajući ponavljajuće LacNAc strukture, nazvane poli-*N*-acetillaktozamin ili polyLacNAc. Također, galaktoza može biti vezana β-vezom za C-3 GlcNAc-a dajući Galβ1–3GlcNAc (tip-1 LacNAc) strukturu. Kod određenih glikoproteina β-vezani *N*-acetilgalaktozamin je vezan za GlcNAc umjesto β-vezano galaktoze stvarajući antene s GalNAcβ1–4GlcNAc (LacDiNAc) strukturama. Suprotno od polyLacNAc-a koje je relativno česta struktura, ponavljanja LacDiNAc-a ili tipa-1 LacNAc-a su rijetke, iako ponekad polyLacNAc završava tipom-1 LacNAc-a.

3. Završno vezanje šećera na produžene antene – dodaci sialinske kiseline, fukoze, galaktoze, *N*-acetilgalaktozamina i sulfata produženim antenama pripadaju u najvažnije reakcije završne obrade glikana. Završni šećeri su najčešće α-vezani, za razliku od β-vezanih antena polyLacNAc-a, tako omogućavajući prezentaciju završnih šećera lektinima i protutijelima; većina od tih struktura je zajednička glikolipidima, O- i N-vezanim glikanima.

2.2.2. N-glikani i njihova uloga u središnjem živčanom sustavu

Raznovrsnost N-glikana koji se mogu nalaziti na određenom proteinu je velika te se može značajno razlikovati između različitih vrsta stanica i tkiva, te utjecati na njihov razvoj i funkciju pri čemu živčani sustav nije iznimka[27].

2.2.2.1. N-glikozilacija i razvoj živčanog sustava

Važnost N-glikozilacije u razvoju živčanog sustava se vidi kod humanih kongenitalnih poremećaja glikozilacije. Kod njih se jasno očituje da je genetski poremećaj u N-glikozilacijskom putu skoro uvijek povezan s ozbiljnim neurološkim abnormalnostima[28]. Također, inaktivacije gena kod miševa pokazuje *in vivo* ulogu nekoliko ključnih gena glikoziltransferaza i njhovih produkata u živčanom sustavu[29]. Tako, na primjer, moždano specifična inaktivacija GlcNAcT-I, glikoziltransferaze koja je bitna za sintezu hibridnih i kompleksnih N-glikana, rezultira ozbiljnim neurološkim poremećajima uključujući abnormalnu lokomotoriku, tremore i paralizu[30]. Međutim, pleiotropni učinak glikozilacije na razvoj i fiziologiju često sprječava dublje analize i interpretaciju fenotipova nastalih „knockoutom“ gena koji sudjeluju u stvaranju sržne strukture N-glikana. Za razliku od ovih istraživanja, mutacije koje su utjecale na terminalne strukture glikana su se pokazale dosta

boljima za istraživanje. Fenotipovi takvih mutacija pokazuju važnost određenih N-glikanskih struktura za specifične događaje. Tako, genetska inaktivacija ST8Sia II i ST8Sia IV je pokazala izuzetnu važnost polisialinske kiseline (PSA, eng. *polysialic acid*)[31–33]. PSA je dugački polimer α2,8-vezane sialinske kiseline koji se nalazi na krajevima glikana određenih glikoproteina, uključujući N-glikane adhezijske molekule živčanih stanica (NCAM, eng. *neural cell adhesion molecule*), za koje je pokazano da reguliraju razvoj mozga, rast neurita te utječu na sinaptičku plastičnost, učenje i pamćenje[31,34,35]. Također, fenotipovi povezani s nedostatkom PSA uključuju ranu postnatalnu smrtnost, poremećaje u glavnim traktovima aksona, progresivni hidrocefalus[31]. Drugi primjer N-glikanske strukture koja ima specifičnu ulogu u neuralnom razvoju je poli-*N*-acetillaktozamin (PLN). Sinteza PLN u razvoju olfaktornog sustava ovisi o aktivnosti β1,3- *N* – acetilglukozaminiltransferaze (β3GnT2) koja inicira i prolongira PLN na terminalni β1-vezani galaktozni ostatak[36]. Inaktivacija gena β3GnT2 rezultira različitim abnormalnostima olfaktornog sustava, uključujući poremećaje vođenja aksona i formiranja glomerula. Čini se da je glavni uzrok takvog fenotipa hipoglikozilacija adenilil ciklaze 3, enzima koji generira cAMP koji je ključna signalna molekula olfaktornih aksona te gubitak PLN dramatično smanjuje aktivnost adenilil ciklaze i produkciju cAMP-a[37]. Navedeni primjeri su samo „vrh ledenog brijega“ brojnih nepoznatih i važnih uloga N-glikozilacije u razvoju živčanog sustava.

2.2.2.2. N-glikozilacija u fiziologiji živčanog sustava

Važnost glikozilacije proteina za različite aspekte sinaptičke transmisije je pokazana brojnim istraživanjima[38–40]. Međutim, molekularni i stanični utjecaji glikozilacije na sinaptičku transmisiju su kompleksni i nisu u potpunosti razjašnjeni, ali kad se pogledaju sva istraživanja kao cjelina ona pokazuju da je glikozilacija neophodna za normalnu sinaptičku funkciju; N-glikozilacija kontrolira funkciju brojnih ključnih proteina u sinaptičkom procesu i njezini utjecaji na sinaptičku fiziologiju su višeslojni. Tako je, na primjer, funkcija sinaptičkog vezikularnog proteina 2 (SV2) koji se nalazi u sinapsama kralježnjaka, ovisna o njegovoj N-glikozilaciji. Njegovom inaktivacijom dolazi do smrtnosti zbog neuroloških napadaja, dok nisu pronađeni nikakvi razvojni poremećaji što pokazuje njegovu važnost isključivo u sinaptičkoj fiziologiji[41]. Osim SV2, poznato je da su N-glikani prisutni na vanstaničnoj domeni neurotransmitorskih receptora koji su ključni proteini u sinaptičkoj transmisiji te omogućuju komunikaciju između neurona ili neurona i mišića u neuromuskularnim

spojevima. Sve je više dokaza koji upućuju na funkcionalnu važnost glikana; tako je pokazano da su N-glikani uključeni u funkciju nikotinskih acetilkolinskih receptora, a oni su samo jedan član super obitelji ionskih kanala koja još uključuje serotoninske, γ-aminomaslačne kiseline i glicinske receptore[42]. Općenito, glikani mogu regulirati ionske kanale na najmanje tri različita načina: (1) promovirajući njihovo smatanje i prijenos na staničnu površinu, (2) utječući na njihovu stabilnost i distribuciju na staničnoj površini (npr., kroz regulaciju endocitoze i/ili recikliranja proteina na staničnoj membrani), (3) mijenjajući njihova molekularna svojstva i tako potencirajući kanalnu funkciju (npr. utječući na biofizikalne karakteristike i/ili funkcionalne interakcije s drugim molekulama). Posljedice prvih dvaju mehanizama je kontrola broja kanala na staničnoj površini; utjecaj N-glikozilacije na ekspresiju kanala stanične površine je pokazan za nekoliko različitih tipova neuralnih kanala (npr. kanali osjetljivi na kiselinu ASIC1a i 1b, kalijevi ionski kanali kontrolirani naponom Kv1.3, Kv1.4 i HERG, te kalcijevi kanali Csv3.2)[43–47]. Utjecaj na biofizička svojstva je najčešće posredovan vezanjem glikana za poru kanala gdje utječe na otvaranje/zatvaranje kanala. Navedene funkcije nisu jedini načini na koje sve glikani utječu na fiziologiju živčanog sustava, ali nam pokazuju da njihova uloga može varirati ovisno o molekularnom i staničnom kontekstu, te da varira od neesencijanih utjecaja do neophodnih zahtjeva za funkciju proteina.

2.2.3. Evolucija N-glikozilacije

Za razliku od proteina i RNA, glikani nemaju predložak prema kojem bi bili sintetizirani. Njihova sinteza je složeni proces dodavanja, micanja i modificiranja šećernih podjedinica. Oblik i raznolikost glikana ovisi o proteinima, ali također ovisi o prehrani i fiziološkom uvjetima. Zbog toga što glikani nisu direktno kodirani genomom, njihova evolucija se može pratiti jedino indirektno; npr. evolucija proteina uključenih u procesiranje glikana otkriva također i glikanske promijene tijekom evolucije. Nastanak ili gubitak šećernih transportera, transferaza i glikozidaza ima direktan utjecaj na sintezu ili razgradnju glikana organizma. N-glikani mogu jako varirati između različitih organizama; N-glikani sisavaca često završavaju sialinskom kiselinom, dok to nije nikad slučaj kod N-glikana biljaka. Kod gljiva, N-glikani sadrže dosta manoza, a beskralježnjaci sintetiziraju manje razgranate hibridne N-glikane od sisavaca i s modifikacijama koje se mogu vidjeti kod biljaka[48]. Općenito se može reći da višestanični organizmi proizvode više N-glikana te su oni složeniji u usporedbi s bakterijama i

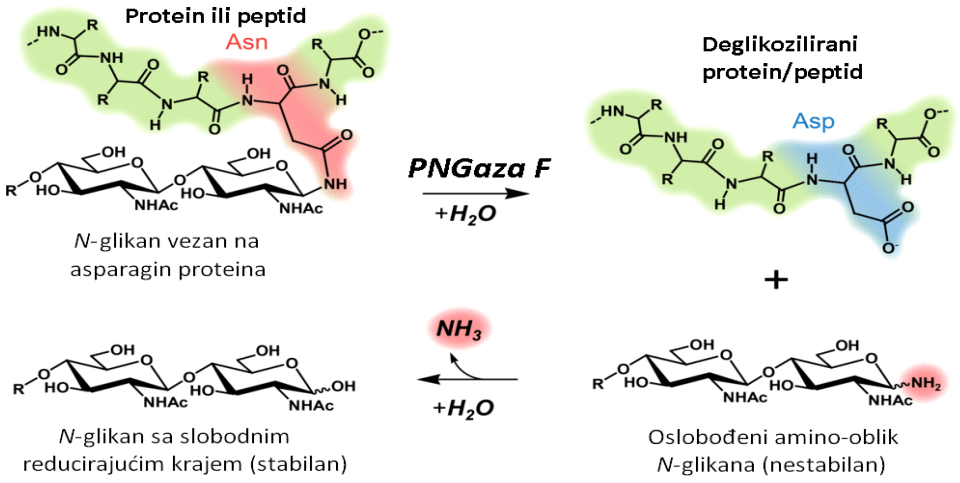
arheama. Raznolikost N-glikana višestaničnih organizama pomaže definiranju staničnog identiteta kao i modulaciji staničnog signaliziranja tijekom razvoja. Dodatno, spektar fenotipske raznolikosti nastale mutacijama proteina uključenih u sintezu glikana može značajno varirati; neki koraci sinteze imaju trenutačne specifične utjecaje koji mogu biti vremenski ili prostorni, dok drugi imaju utjecaje na cijeli organizam. Tako su, npr. genetske manipulacije sinteze N-glikana pokazale da su rani koraci njihove sinteze više konzervirani nego što je to slučaj s kasnijim koracima[29]. Jedan od primjera promjena na krajevima je α-gal epitop koji je česta struktura na animalnim glikanima (prisutan kod većine sisavaca osim primata Starog svijeta), a čini ga terminalna galaktoza povezana α1,3 vezom za prethodnu galaktozu. Enzim, α1,3 galaktozilatransferaza (α1,3GT), koji sintetizira α-gal je inaktiviran kod zajedničkog pretka primata Starog svijeta. Jedan od mogućih scenarija koji je doveo do inaktivacije α1,3GT gena je pojava infektivnog agenta koji je eksprimirao α-gal epitop i bio determinirajući za primate te prisutan samo u Starom svijetu (npr. nije došlo do njegovog rasprostranjivanja po Južnoj Americi). Takav infektivni agent mogao je inducirati selektivni pritisak na evoluciju primata koji su eksprimirali α-gal epitop (npr. inaktivacija α1,3GT gena) i proizvodnju α-gal protutijela kao sredstvo obrane[49]. Drugi primjer evolucije koja se dogodila na krajevima N-glikana je inaktivacija gena koji kodira za hidroksilazu citidin monofosfat-*N*-acetilneraminske kiseline (CMAH, eng. *cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase*) protein koji hidroksilira terminalnu metilnu skupinu N-acetilneuraminske kiseline (Neu5Ac) pri tome stvarajući N-glikolilneuraminsku kiselinu (Neu5Gc). Kod ljudi je došlo do inaktivacije navedenog gena evolucijski gledano nedavno (prije otprilike 2 milijuna godina), a vjeruje se da je došlo do selekcije zbog izbjegavanja patogena, seksualnog konflikta ili kombinacije tog dvoje[50,51]. Pojedinačni gubitci aktivnosti CMAH aktivnosti su pronađen kod primata Novog svijeta i kuna[52,53].

2.3. Analiza glikozilacije proteina

Iako je glikozilacija proteina jedna od najčešćih postranslacijskih modifikacija ona je relativno slabo proučavana. Složenost i raznovrsnost glikana predstavljaju izazov za pronalazak analitičkih metoda koje bi s podjednakom učinkovitošću omogućile istovremenu analizu različitih vrsta glikana (različitog naboja i hidrofilnosti), a bez razgradnje složenih glikana na pojedinačne šećere.

2.3.1. Analiza N- i O-glikozilacije proteina

Postoji veliko međusobno razlikovanje pojedinih vrsta glikana (Poglavlje 2.1.2.) po svojim kemijskim svojstvima i stabilnosti što predstavlja veliki izazov za paralelnu analizu različitih tipova glikozilacije (uglavnom N- i O-vezanih glikana). Iako postoje metode koje omogućuju istovremenu analizu obje vrste glikana u nekom uzorku, te su metode često nereproducibilne, najčešće nisu potpune, te zahtijevaju mnogo koraka priprave i pročišćavanja obje skupine glikana. Kemijski postupci oslobađanja glikana s proteina se najčešće primjenjuju u analizi O-glikana pri čemu su moguće sporedne reakcije, što dovodi do problema slabije učinkovitosti oslobađanja O-glikana i lošije reproducibilnosti. Osim toga, manja kemijska stabilnost O-vezanih glikana u odnosu na N-glikane zbog procesa u kojem se postepeno razgrađuju, koji se naziva „ljuštenje“ (eng. *peeling*), dodatno otežava njihovu točnu i reproducibilnu analizu[54–56]. Nasuprot tome, N-glikane je moguće osloboditi s proteina enzimskim putem, inkubacijom s peptid-*N*-glikozidazom F (PNGazom F), što ima brojne prednosti u odnosu na kemijske postupke. PNGaza F specifično cijepa vezu između N-vezanog sržnog GlcNAc-a i Asn glikoproteina, pri čemu se Asn prevodi u Asp i nastaje 1-aminooligosaharid, koji se u sljedećem koraku neenzimski hidrolizira u amonijak i oligosaharid sa slobodnim reducirajućim krajem[57] (slika 6). Zbog svega navedenog i činjenice da su N-glikani više zastupljeni u odnosu na druge vrste glikana, ne iznenađuje da su upravo oni najproučavaniji tip glikana.



Slika 6. Prikaz reakcija oslobađanja N-vezanih glikana s glikoproteina PNGazom F (Preuzeto i prilagođeno iz Wang i suradnici[57])

2.3.2. Analiza N-glikana UPLC metodom

Nekoliko različitih tehnika se trenutno koristi prilikom visokoprotočne analize N-glikana: 1) tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC-MS, eng. *liquid chromatography mass spectrometry*) koja omogućava pouzdanu kvantifikaciju i analizu mjesno specifične glikozilacije, dovoljno je osjetljiva te omogućava određivanje struktura fragmentacijom uz nedostatak slabije protočnosti i visoke cijene analize i opreme; 2) spektrometrija masa s matricom potpomognutom ionizacijom laserskom desorpcijom (MALDI-MS, eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*) omogućava analizu mjesno specifične glikozilacije, visoku protočnost i određivanje struktura fragmentacijom uz nisku cijenu, a nedostatak tehnike je nepouzdana kvantifikacija i gubitak sialinskih kiselina tijekom analize; 3) kapilarnom gel-elektroforezom je moguće analizirati veliki broj uzoraka u relativno kratkom vremenu zbog visoke protočnosti i robusnosti, manje zahtjevne priprave uzoraka u odnosu na ostale metode, visoke osjetljivosti i pouzdane kvantifikacije, a nedostatak tehnike je nemogućnost analize mjesno specifične glikozilacije i mala baza podataka s obzirom da je tehnika relativno rijetko korištena u analizama glikana[58].

Osim prethodno navedenih tehnika, analiza glikana tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (UPLC, eng. *ultra-performance liquid chromatography*) uz fluorescencijski detektor je dosta česta, budući da omogućava pouzdanu i robusnu kvantifikaciju, razdvajanje glikanskih izomera, te uz relativno nisku cijenu opreme. Nedostaci tehnike su nemogućnost analize mjesno specifične glikozilacije, relativno niska protočnost i veća cijena analize po uzorku u odnosu na npr. MALDI-MS. Standardni postupak analize glikana UPLC-om se sastoji od:

1) deglikozilacije proteina – u poliakrilamidnom gelu,[59] na membrani[59–61] ili u otopini,[62]
2) obilježavanja oslobođenih glikana fluorescentnom bojom (2-aminobenzojevom kiselinom;[63] 2-aminopiridinom;[64] prokainamidom;[65] a najčešće 2-aminobenzamidom, 2-AB),[63]
3) pročišćavanja obilježenih glikana radi uklanjanja suviška reagensa – najčešće ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE, eng. *solid phase extraction*) za što se koriste različite čvrste faze,

4) fluorescencijske detekcije obilježenih i pročišćenih glikana razdvojenih na temelju njihove hidrofilnosti tekućinskom kromatografijom.

Zbog zahtjeva za visokoprotočnom analizom glikana što većeg broja uzoraka u što kraćem vremenu uz što manju potrošnju organskih otapala, napuštena je donedavno najviše korištena metoda deglikozilacije proteina u poliakrilamidnom gelu[59] (eng. *in-gel block method*) te su razvijeni alternativni pristupi koji su znatno skratili vrijeme priprave uzoraka i smanjili utrošak otapala, te zamijenili toksični natrijev cijanoborhidrid koji se koristio za redukciju s 2-pikolin boranom (2-PB)[66].

Također, kod analize N-glikana iz tkiva potrebno je prije deglikozilacije provesti homogenizaciju tkiva (najčešće soniciranjem) te pročistiti glikoproteine (npr. voda/metanol/kloroform)[67–72]. Analiza glikana tkiva je također moguća direktnim nanošenjem PNGaze F na tkivo[73] te analizom spektrometrijom masa, ali ta metoda zbog velike ovisnosti o mjestu nanošenja nije dovoljno reproducibilna te zbog toga neprihvatljiva za istraživanja razlika između tkiva i vrsta.

2.4. Središnji živčani sustav

Središnji živčani sustav (CNS, eng. *central nervous system*) se sastoji od mozga (lat. *encephalon*) i kralježnične moždine (lat. *medulla spinalis*). Mozak se nalazi unutar lubanje, a kralježnična moždina unutar spinalnog kanala, pružajući se od velikog otvora (lat. *foramen magnum*) do razine drugog lumbalnog kralješka[74].

2.4.1. Stanični sastav središnjeg živčanog sustava

Složena mreža stanica CNS-a se sastoji od neurona i glija stanica. Za većinu njih vrijedi da se razvijaju od neuroektoderma i neuralne krijeste tijekom embriogeneze. Neuroni i glija stanice imaju specijaliziranu ekspresiju proteina koja pomaže njihovoj funkciji unutar CNS-a; npr. neuroni su primarno odgovorni za propagaciju akcijskog potencijala te zbog toga sadrže podjednako raspoređene naponom regulirane ionske kanale koji pomažu propagaciji električnog signala. Postoje različiti tipovi glija stanica (astrociti, mikroglije i oligodendrociti) i svaki od tih podtipova posjeduje drugačiju funkciju. Iako svaka od tih stanica ima posebnu ulogu unutar živčanog sustava, neke od njih sadrže komponente koje su slične drugim eukariotskim stanicama izvan CNS-a[74].

2.4.1.1. Neuroni

Neuroni su specijalizirane stanice CNS-a koje služe kao jedinice za procesiranje informacija, integrirajući odgovor organizma na vanjski podražaj. Ljudski mozak sadrži oko 100 milijardi neurona s otprilike 100 bilijuna sinapsi između njih. Također, postoji oko 100 različitih, jedinstvenih tipova neurona unutar CNS-a. Oni se mogu pojaviti u različitim veličinama i oblicima, ali i dalje imaju zajedničke komponente koje služe njihovoj specifičnoj ulozi. Osnovni oblik neurona je polarizirana stanica, koja se sastoji od tijela ili some s dendritima zaslužnima za primanje podražaja na jednoj strani i aksona zaduženog za daljnju transmisiju signala na drugoj strani. Jedinstvena sposobnost neurona da usmjereno prenese informaciju je zbog njegove asimetrije i polarizacije. Neuroni komuniciraju jedan s drugim polariziranim valovima nastalim pomoću akcijskog potencijala. Akcijski potencijal je kratkoživući „sve-ili-ništa“ depolarizirajući val koji počinje u tijelu neurona i završava na kraju aksona. Tijelo neurona izravno prima depolarizirajuće (ekscitatorne) i hiperpolarizirajuće (inhibitorne) impulse od drugih neurona preko sinapsi na staničnoj površini. Sinapsa je područje gdje stanična membrana signalizirajućeg (presinaptičkog) neurona dolazi blizu ciljnog (postsinaptičkog) neurona pomoću sinaptičkih molekula koje povezuju stanice (synCAMs, eng. *synaptic cell adhesion molecules*). Određene synCAMs mogu povećati ili smanjiti njihovu adheziju pomoću mjesno specifične N-glikozilacije, te tako mijenjati stvaranje sinapse[75].

2.4.1.2. Glija stanice

U početku se vjerovalo da glija stanice služe isključivo za držanje neurona na mjestu poput ljepila (glija na grčkom znači ljepilo), ali s vremenom se otkrilo da su te stanice neophodne za održavanje CNS homeostaze – povećavajući sinaptičku točnost, pružajući nutritivnu podršku i doprinoseći imunom odgovoru unutar mozga. Tri glavne vrste glija stanica u CNS-u su:

1) Astrociti – najbrojnije glija stanice u mozgu kralježnjaka, koje su pet puta učestalije od neurona i zauzimaju 20-50 % volumena mozga[76]. Astrocite tvore sincicij, gdje su spojevi/pukotine između susjednih astrocita usklađeni tako da šalju nutrijente i ione iz krvi prema neuronima. Oni su također odgovorni za održavanje osmolarnosti u mozgu pomoću unosa iona, prostornog puferiranja i kontrolirane difuzije vode kroz ekspresiju akvaporina. S obzirom da se mozak nalazi unutar lubanje, male promjene u

metabolizmu vode mogu dovesti do kompresivnog cerebralong edema, hidrocefalusa ili promjena u neuralnoj aktivnosti[77]. Astrocite, također, mogu unositi, degradirati i otpuštati neurotransmitere i njihove prekusore (npr. glutamat) te tako pomažu u regulaciji sinaptičke aktivnosti. Na taj način, astrociti su ključni u prevenciji ekscitotoksičnosti. Astrociti su jedino mjesto skladištenja glikogena i tako važan regulator održavanja razine glukoze u mozgu. Također, astrociti luče neurotrofine poput BDNF, GDNF i HGF koji su važni za rast, preživljavanje i sinaptogenezu neurona[76]. Astrociti mogu migrirati i mijenjati oblik kao odgovor na akutnu traumu u procesu zvanom astroglioza. Tijekom tog procesa, astrociti postaju veći, više plastični, pokretni i metabolički aktivni. Astroglioza ima pozitivan i negativan utjecaj na oporavak mozga. Odmah nakon povrede, astrociti uklanjanju preostale fragmente i kontroliraju proupalne odgovore ovisno o vrsti stimulacije, a nakon toga zajedno s mikroglijama stvaraju glijalni ožiljak koji odjeljuje povredu i upalu od ostatka tkiva što pomaže modulaciji lokalnog imunog odgovora, prevenira nenormalan aksonalni rast i pomaže revaskularizaciji oštećenog tkiva[78]. Tako astroglioza pomaže preživljavanju neurona i homeostazi mozga, ali nastali ožiljci mogu dovesti do ograničenja rasta aksona te sprječavanja ponovnog uspostavljanja funkcionalnih veza između neurona.

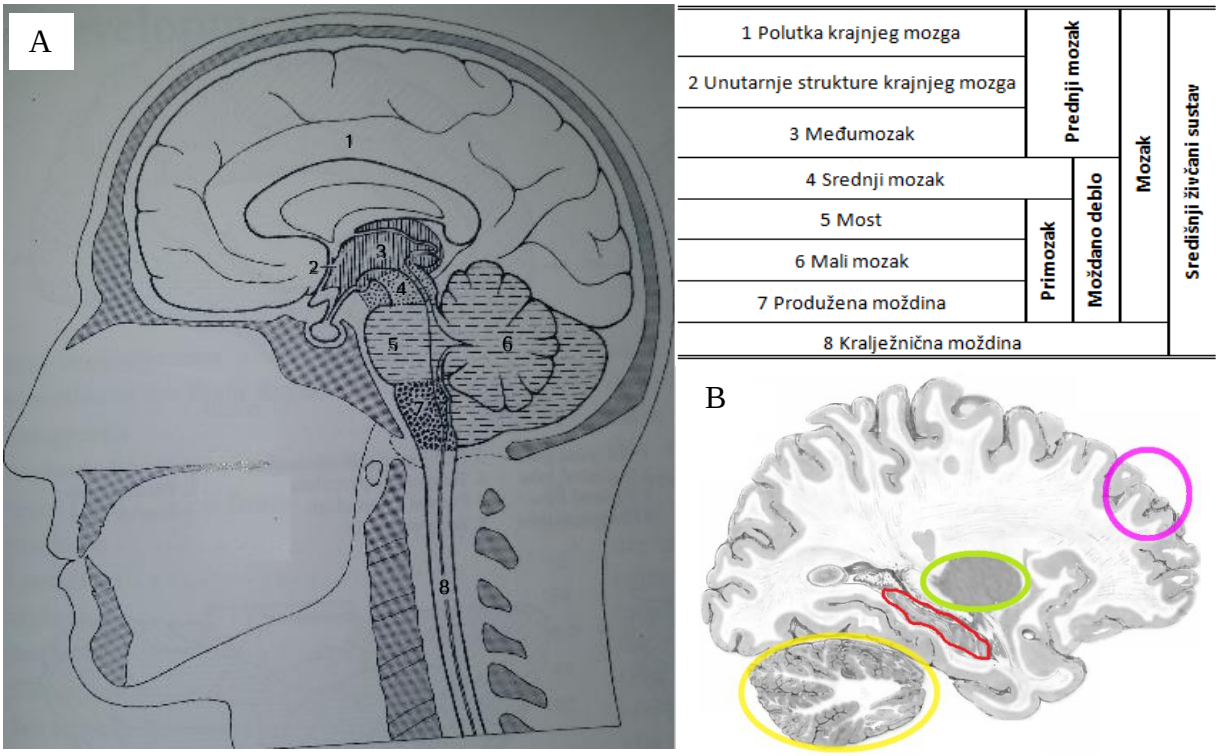
2) Oligodendrociti – glija stanice odgovorne za potporu i izolaciju aksona unutar CNS-a. Za razliku od astrocita, oligodendrociti ne sadrže veliki broj integralnih transportnih proteina potrebnih za održavanje metaboličke i ionske raspodjele unutar CNS-a[79]. Oligodendrociti su slični Schwannovim stanicama perifernog živčanog sustava zato jer su obije vrste odgovorne za omotavanje aksona plazmatskim membranama. Međutim, razlika između te dvije vrsta stanica je u tome što Schwannove stanice omataju segment samo jednog neurona, dok oligodendrociti mogu omotati segmente aksona i do 30 različitih neurona. Zreli oligodendrociti spiralno omataju vlastitim palzmatskim membrana nekoliko puta aksonalni segment, stvarajući višeslojni lipidni sloj zvan mijelin te se nalaze u redovima u traktovima bijele tvari CNS-a, ali u nekim slučajevima mogu se naći i pojedinačno.
3) Mikroglije – najmanje od svih glija stanica, sadrže brojne razgranate nastavke s trnastim produljcima i s gustom, heterokromatskom jezgrom kad se nalaze u stanju mirovanja te su jedine stanice imunološkog sustava koje se konstantno nalaze u CNS-

u i pripadaju monocitno-makrofagnoj liniji. Mikroglije se ponašaju poput imunoloških nadglednih stanica, koje zahvaljujući svojoj maloj dendritičkoj masi patroliraju zdravim mozgom u stanju mirovanja i stupaju u interakciju s perisnaptičkim astrocitima i sinapsama[80,81]. Također, mikroglije mijenjaju brojne elemente unutar zadanog okoliša kao odgovor na promijene njihove okoline. Površina mikroglija je prekrivena receptorima koji upućuju na njihovu ulogu u urođenoj imunosti kao i imunom odgovoru na bakterije i viruse, ali također eksprimiraju receptore za neurotransmitore i trofne faktore. Aktivacija mikroglija može biti inducirana stranom tvari (npr. fragment virusa) ili odsutnošću normalnog signala (npr. trofnog faktora). Aktivirane mikroglije povlače svoje nastavke i postaju okrugle te počinju kretanje u smjeru citokina[80]; na cilju fagocitiraju fragmente neurona, uklanjaju teške metale, oblikuju sinaptičke veze i mijenjaju sinaptički prijenos uklanjajući sinapse[82]. Na taj način aktivacija mikroglija može biti povezana s normalnim neuralnim razvojem, funkcijom kao i odgovorom na infekciju ili traumu.

2.4.2. Anatomska podjela središnjeg živčanog sustava

Općenito, mozak se može podijeliti na veliki cerebrum ili veliki mozak, cerebelum ili mali mozak i truncus cerebri ili moždano deblo (slika 7). Ontogenetski mozak može biti podijeljen na tri glavna djela: primozak (lat. *rhombencephalon*), srednji mozak (lat. *mesencephalon*) i prednji mozak (lat. *prosencephalon*). Primozak uključuje produženu moždinu (lat. *medulla oblongata*; *myelencephalon*) te most i mali mozak (lat. *metencephalon*). Produžena moždina predstavlja rostralno proširenje kralježnične moždine, dok metencephalon tvori veliki ventrali produžetak poznat kao most (lat. *pons*) te izraženiji dorzalni dio nazvan mali mozak (lat. *cerebellum*). Isthmus je dio primozga smješten najviše rostralno koji graniči sa srednjim mozgom. Srednji mozak je kratki, u obliku klina oblikovani segment mozga između primozga i prednjeg mozga. Produžena moždina, most i srednji mozak tvore moždano deblo. Prednji mozak se sastoji od međumozga (lat. *diencephalon*) i krajnjeg mozga (lat. *telencephalon*). Međumozak sadrži dva važna nuklearna kompleksa, brežuljak (lat. *thalamus*) koji je veći te manji podbrežje (lat. *hypothalamus*). Prednji mozak se uglavnom sastoji od dvije polutke koje su daleko najveći dio humanog mozga; one okružuju i prekrivaju oba ostala dijela mozga (međumozak i srednji mozak). Površina cerebralnih polutki se sastoji od brojnih moždanih

vijuga (lat. *gyri*), koje su odijeljene jedna od druge brazdama (lat. *sulcus*) i jamama (lat. *fissura*). Cerebralne polutke su dalje podijeljene u pet glavnih dijelova ili režnjeva (lat. *lobes*): čeoni režanj (lat. *lobus frontalis*), tjemeni režanj (lat. *lobus parietalis*), sljepoočni režanj (lat. *lobus temporalis*), zatiljni režanj (lat. *lobus occipitalis*) i limbički režanj (lat. *lobus limbicus*). Većina, iako ne sve, granica između režanja je određena brazdama i jamama[74].



Slika 7. Ontogenetska podjela mozga (A) i prerez mozga (B) odraslog čovjeka kroz lateralni dio putamena. Regije mozga su označene brojevima u skladu s legendom, a analizirane regije u ovom radu su označene žutom (mali mozak), crvenom (hipokampus), zelenom (strijatum) i ljubičastom (frontalna dorsalna kora velikog mozga) (Preuzeto i prilagođeno iz Nieuwenhuys i suradnici[74])

2.4.3. Razvoj središnjeg živčanog sustava

Središnji živčani sustav čovjeka i ostalih kralježnjaka se razvija od neuralne ploče ektoderma. Na rubovima neuralne ploče se stvara neuralna krijesta koja odvaja neuralni ektoderm od ostatka ektoderma. S rastom neuralne ploče, njezini krajevi se uzdižu i stvaraju neuralne nabore dok središnji dio tone te stvara neuralni žlijeb. Tijekom daljnjeg razvoja, neuralni žlijeb se produbljuje te dolazi do spajanja neuralnih nabora te na taj način nastaje neuralna cijev. Zatvaranje cijevi počinje na više mjesta, a zadnji se zatvaraju krajevi cijevi; rostralni dio 30 dana nakon fertilizacije dok kaudalni jedan dan kasnije. Tijekom šestog gestacijskog

tjedna formiraju se tri primarna moždana vezikula: prednji mozak, srednji mozak te primozak. Unutar sedmog gestacijskog tjedna nastaje pet sekundarnih moždanih vizikula od primarna tri: krajnji mozak, međumozak, srednji mozak, mali mozak s mostom i produženu moždinu. Navedenih pet moždanih vezikula formira moždane komore te daje temeljnu regionalnu podjelu kasnije odraslog mozga[74,83].

2.4.4. Evolucija središnjeg živčanog sustava

Dijelovi bilo kojeg prilagodljivog sustava, kao što je mozak sisavaca, podliježu koordiniranoj evoluciji; dok u isto vrijeme funkcionalna diferencijacija živčanog sustava unutar mozga sisavaca potencijalno stvara područje za mozaične evolucijske promjene koje su posljedica alometrijske kovarijacije pojedinačnih dijelova. Komparativne analize pokazuju da su specifični sustavi i strukture evoluirali djelomično neovisno od ukupne veličine mozga i da te sustavno-specifične promjene koreliraju s ekologijom ponašanja. Nakon prilagodbe u odnosu na ostale strukture mozga, neokorteks primata je u prosjeku pet puta veći nego kod kukcojeda (iako neke usporedbe pokazuju i do deset puta veću razliku). Povećanje neokorteksa i ukupne veličine mozga tijekom evolucije primata je povezano s neproporcionalnom ekspanzijom vidnog sustava i s ostalim aspektima vidne specijalizacije kao što su povećana orbitalna konvergencija i ekspanzija malog mozga[84]. Mozaična priroda promjena u proporcijama mozga tijekom evolucije primata se jasno vidi kad se usporedi veličina glavnih dijelova mozga naspram tjelesne mase[85]. Neki dijelovi (npr. neokorteks i mali mozak) pokazuju jasnu razliku između taksona, dok ostale (npr. produžena moždina) to ne pokazuju. Također, svi utjecaji nisu jednako snažni za različite strukture: veličina neokorteksa i malog mozga je veća kod primata nego kod kukcojeda, ali jedino veličina neokorteksa je različita između strepsirhinih (mokronosci ili vlažnonosci) i haplorhinih (suhonosci) primata. Dok je s druge strane veličina malog mozga veća kod čovjekolikih majmuna nego kod ostalih catarrhina (uskonosci). Olfaktorni bulbli su veći kod strepsirhnih primata i kukcojeda nego kod haplorhinih primata; navedena promjena je barem djelomično posljedica prilagodbe nokturalnom ili diurnalnom ritmu. Usporedba pojedinačnih struktura kod vrsta sa sličnom veličinom mozga otkriva razmjer sustavno-specifične promijene u veličini, tako je gornji kolikul (lat. *superior colliculus*) približno deset puta veći kod svizaca nego kod štakora bez obzira na sličnosti u veličini mozga i tijela[85,86].

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Uzorci

Ovo istraživanje odobrili su Etičko povjerenstvo Sveučilišta Yale i Etičko povjerenstvo Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu za životinjske uzorke, te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Zagrebu za ljudske uzorke.

U istraživanje su uključene četiri regije mozga: frontalna dorsalna kora mozga, hipokampus, strijatum te mali mozak. Regije su prikupljene od četiri vrste: čovjek (*Homo sapiens, Hominidae;* odrasli i fetalni), čimpanza (*Pan troglodytes, Hominidae*), makaki majmun (*Macaca mulatta, Cercopithecidae*) te štakor (*Rattus norvegicus, Muridae,* soj Fischer 344). Detaljan pregled uzoraka je dan u Tablici 1.

Uzorci tkiva mozga čovjeka (odrasli i fetalni), čimpanze i makaki majmuna su prikupljeni od strane Sestan Lab, Department of Neurobiology and Kavli Institute for Neuroscience, Yale University School of Medicine koji ima etičko odobrenje protokola za rad na mozgovima primata dok su mozgovi štakora ustupljeni od strane Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Tablica 1. Pregled uzoraka prema vrsti, stupnju razvoja, spolu i dobi

Vrsta	Stupanj razvoja	Spol	Broj jedinki	Dob (prosjek godina(raspon))
Čovjek	Odrasla jedinka	Ženski	3	50,6 (30-82)
		Muški	3	32 (23-37)
	Fetus	Ženski	2	22 (21-23)*
		Muški	1	23,5*
Čimpanza	Odrasla jedinka	Ženski	2	27 (23-31)
		Muški	2	25 (23-27)
Makaki majmun	Odrasla jedinka	Ženski	3	10,6 (10-11)
		Muški	3	8,3 (7-11)
Štakor	Odrasla jedinka	Ženski	3	10**
		Muški	3	10**

*postkoncepcijski tjedni

**postnatalni tjedni (svi štakori su iz istog legla)

3.2. Materijali

3.2.1. Standardne kemikalije

1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC) (Fluka), 2-aminobenzamid (2-AB) (Sigma-Aldrich), 2-merkaptoetanol (βME) (Acros Organics), 2-pikolin boran (2-PB) (Sigma-Aldrich), 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina (2,5-DHB) (Bruker Daltonik), acetonitril (J. T. Baker), dimetil sulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich), etanol (Carlo Erba), formijatna kiselina (HCOOH) (Merck), hidroksibenzotriazol monohidrat (HOBt) (Sigma-Aldrich), igepal CA-630 (Sigma-Aldrich), kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) (Sigma-Aldrich), kalijev klorid (KCl) (EMD Milipore), kloridna kiselina (HCl) (Kemika), kloroform ($CHCl_3$) (Sigma-Aldrich), metanol (J. T. Baker), natrijev azid (NaN_3) (Sigma-Aldrich), natrijev dodecil-sulfat (SDS) (Sigma-Aldrich), natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) (Acros Organics), natrijev hidrogenkarbonat ($NaHCO_3$) (Merck), natrijev hidroksid (NaOH) (Kemika), natrijev klorid (NaCl) (Carlo Erba), octena kiselina (CH_3COOH) (Merck), otopina amonijaka (Merck), trifluoroctena kiselina (TFA) (Sigma-Aldrich).

3.2.2. Enzimi

PNGaza F (Prozyme) - 2,5 mU μL^{-1} (1 U - eng. *unit*, količina PNGaze F koja katalizira oslobađanje N-vezanih oligosaharida s 1 μmol denaturirane ribonukleaze B pri pH 7.5 i 37 °C u jednoj minuti.)[87]

3.2.3. Pločice i filtri

0,20 μm *GHP AcroPrep* (Pall) - filtar pločica s 96 jažica volumena 1 mL i hidrofilnom polipropilenskom membranom veličine pora 0,20 μm. Korištena je za pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana.

Amicon Ultra centrifugal filter devices (Merck Millipore) – centrikon volumena 2 mL s veličinom pora kroz koje prolaze čestice manje od 30 kDa. Korišten za pročišćavanje N-glikana nakon deglikozilacije.

MTP AnchorChip 384 T F (Bruker Daltonik) – pločica s 384 hidrofiline točke okružene hidrofobnim prstenima koji ukoncetriravaju uzorke u dijametru između 0,4 i 2 mm te sprječavaju razlijevanje uzorka izvan njih. Korištena za pripremu uzorka za MALDI analizu.

3.3. Metode za pripravu uzoraka za analizu tekućinskom kromatografijom

U nedostatku metoda za analizu N-glikana tkiva tekućinskom kromatografijom za potrebe analize uzoraka (Poglavlje 3.1.) razvijena je niže opisana metoda koja je temeljena na metodi za analizu N-glikana tkiva spektrometrijom masa[88] uz značajne modifikacije.

3.3.1. Homogenizacija uzoraka tkiva

Zamrznuti uzorci tkiva mozga (količina tkiva je za većinu uzorka bila između 25 – 50 mg) su stavljeni u tubice volumena 2 mL te dodan Lysing Matrix D (keramičke kuglice promjera 1,4 mm namijenjene za liziranje mekih tkiva) ovisno o početnoj količini tkiva (5 – 6 kuglica na

25 mg tkiva). U tubicu je potom dodan 1 mL ultra čiste vode (8 MΩ cm pri 25 °C) ohlađene na 4 °C, tubica je zatvorena i čep omotan parafilmom. Za homogenizaciju je korišten *FastPrep-24* Instrument (MP Biomedicals), a uzorci su homogenizirani pri brzini 6 u vremenskom periodu od 40 sekundi. Nakon homogenizacije, supernatant je prenesen u tubice volumena 15 mL. Tubica s matriksom je isprana s 1 mL metanola ohlađenog na 4 °C, kratko vorteksirana, metanol s ostacima tkiva prenesen u istu tubicu volumena 15 mL te postupak ponovljen još jednom s 0,75 mL hladnog metanola. Čep tubicâ je omotan parafilmom te su tubice sonicirane u vodenoj kupelji 15 min.

3.3.2. Metanol/kloroform ekstrakcija proteina

Nakon homogenizacije i soniciranja u uzorke je dodano 3,24 mL kloroforma ohlađenog na 4 °C te su tubice vorteksirane, a potom su ponovo čepovi omotani parafilmom te sonicirani 15 min u vodenoj kupelji. Centrifugiranje 30 min pri 4500 g (model *5804*, Eppendorf) je uslijedilo nakon soniciranja i uklanjanja parafilma; proteini se nalaze u međufazi nakon centrifugiranja između vodene (voda/metanol) i organske faze (kloroform). Vodena faza je odbačena pazeći na proteinsku međufazu te nadomještena volumenom koji odgovara ostatku organske faze otopinom metanola u vodi (φ = 50 %) ohlađenom na 4 °C te vorteksirana. Postupak koji uključuje soniciranje, centrifugiranje i dodatak 50 %-tnog metanola je ponovljen, nakon čega su uzorci sonicirani 15 min u vodenoj kupelji, parafilm uklonjen te centrifugirani 30 min pri 4500 g (model *5804*, Eppendorf).

Nakon centrifugiranja vodena faza je odbačena te je dodan metanol ohlađen na 4 °C što uzrokuje precipitaciju proteina. Nakon centrifugiranja 30 min pri 4500 g (model *5804*, Eppendorf) supernatant je pažljivo uklonjen bez doticanja proteinskog precipitata. U tubicu je potom dodano 0,5 mL hladnog metanola te je precipitat prenesen u novu tubicu volumena 2 mL te prvotna tubica isprana s dodatnih 0,5 mL hladnog metanola koji je prenesen u istu tubicu gdje i precipitat. Nakon prijenosa proteina, tubice su centrifugirane 15 min pri 13 000 g (centrifuga *miniSpin*, Eppendorf) i supernatant odbačen. Jedan mililitar hladnog metanola je dodan, pelet resuspendiran te potom centrifugiran 15 min pri 13 000 g (centrifuga *miniSpin*, Eppendorf). Koraci odbacivanja supernatanta, dodatka metanola i centrifugiranja su ponovljeni dodatno dva puta nakon čega su talozi sušeni 10 min u vakuum centrifugi (Thermo

Scientific vakuum koncentrator *Savant SC210A* s hlađenom stupicom za paru *Savant RVT400* i vakuum pumpom *OFP400*).

3.3.3. Denaturacija i deglikozilacija proteina

Osušeni talog proteina je resuspendiran u jednom mililitru 1x koncentriranog pufera PBS pH 7,4 (137 mmol L^{-1} NaCl; 2,7 mmol L^{-1} Na2HPO4; 9,7 mmol L^{-1} KH2PO4; 2,2 mmol L^{-1} KCl; titrirano s NaOH do pH 7,4) te je dodano 150 µL SDS-a (γ = 100 g L^{-1}) i 6 µL βME. Otopina je vorteksirana te inkubirana 10 min pri 95° C u trsilici *Thermomixer comfort* (Eppendorf) s blagim protresanjem. Nakon inkubacije uzorci su brzo preneseni na led i inkubirani pet minuta, nakon čega je dodano 15 µL natrijevog azida (γ = 100 g L^{-1}) i 200 µL igepal CA-630 (φ = 10 %). Prije prekonoćne inkubacije u inkubatoru pri 37 °C dodano je 0,5 µL PNGaze F (5 U). Sljedeći dan je ponovo dodano uzorcima 0,5 µL PNGaze F (5 U), uzorci su vorteksirani te ostavljeni preko noći pri 37 °C.

3.3.4. Uklanjanje proteina iz reakcijske smjese nakon deglikozilacije

Centrikoni *Amicon Ultra centrifugal filter* (Merck Millipore) su isprani dva puta s mililitrom ultra čiste vode (8 MΩ cm pri 25 °C) i centrifugiranjem 5 min pri 2 450 g (model *5804*, Eppendorf). Na tako isprane centrikone prenesen je cjelokupni volumen deglikozilacijske smjese te su centrifugirani 20 min pri 4 000 g (model *5804*, Eppendorf). Tubica u kojoj se nalazila deglikozilacijska smjesa je isprana s 500 µL ultra čiste vode te je voda prenesena u isti centrikon koji je potom centrifugiran 10 min pri 4 000 g (model *5804*, Eppendorf). Postupak ispiranja je ponovljen te centrikon ponovno centrifugiran 15 min pri 4 000 g (model *5804*, Eppendorf). Tubica u kojoj se skupljalo filtrate je odvojena od filtra te filtrat sušen u vakuum centrifugi (Thermo Scientific vakuum koncentrator *Savant SC210A* s hlađenom stupicom za paru *Savant RVT400* i vakuum pumpom *OFP400*) dva do četiri sata, nakon kojih je ostatak filtrata prenesen u tubicu volumena 2 mL, a tubica centrikona u kojoj se skupljao filtrat isprana dva puta sa po 200 µL ultra čiste vode koja je potom prenesena u tubicu s filtratom. Tubica s filtratom sa slobodnim N-glikanima je stavljena u vakuum centrifugu (Thermo Scientific vakuum koncentrator *Savant SC210A* s hlađenom stupicom za paru *Savant RVT400* i vakuum pumpom *OFP400*) te je filtrat osušen do kraja.

3.3.5. Izmjene metode u optimizaciji

Nakon razvoja gore opisane metode i provjere robusnosti (Poglavlje 3.4.) pokušali su se određeni koraci tako optimirati da bi se skratilo vrijeme i trošak analize.

3.3.5.1. Optimizacija homogenizacije i ekstrakcije

Metoda homogenizacije tkiva (Poglavlje 3.3.1.) i metanol/kloroform ekstrakcije proteina (Poglavlje 3.3.2.) sadrže nekoliko koraka soniciranja od 15 min. Navedeni koraci su izbačeni iz metode, a u takvu metodu je uveden dodatni korak homogeniziranja; nakon prve homogenizacije ponovljena je homogenizacija pri brzini 6 u vremenskom periodu od 40 sekundi u homogenizatoru *FastPrep-24 Instrument* (MP Biomedicals).

3.3.5.2. Optimizacija denaturacije i deglikozilacije

Navedeni koraci su se pokušali optimirati na više načina:

a) Volumen reakcijske smjese – volumen 1 x PBS-a koji se dodaje u koraku opisan u Poglavlju 3.3.3. je smanjen na 500 μL, 250 μL ili 100 μL te ostalih otopina na način da koncentracija ostaje jednaka u procesu denaturacije, dok je volumen enzima ostao jednak.
b) SDS – volumen SDS-a (γ = 100 g L^{-1}) korišten u koraku opisanom u Poglavlju 3.3.3. je smanjen na 37 μL tako da konačni postotak u otopini bude 0,3 %.
c) Enzim - volumen od 0,5 μL PNGaze F koji se dodaje dva puta u koracima opisanim u Poglavlju 3.3.3. je reduciran na polovinu navedenog volumena za svako dodavanje.
d) Vrijeme inkubacije – umjesto dvije prekonoćne inkubacije s PNGazom F (Poglavlje 3.3.3.), provedena je jedna prekonoćna inkubacija s tim da je dodana ukupna količina PNGaze F odjednom, a ne dva dana uzastopno.

3.3.5.3. Optimizacija pročišćavanja glikana nakon deglikozilacije

Nakon koraka opisanog u Poglavlju 3.3.3. cijeli volumen deglikozilacijske smjese je prebačen u tubicu od 15 mL, a potom je dodan devet puta veći volumen etanola ohlađenog na -20 °C.

Otopina je potom vortekisrana i inkubirana sat vremena pri -20 °C. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 20 min pri 4 500 g (model *5804*, Eppendorf). Supernatant je prebačen u novu tubicu od 15 mL i sušen preko noći u vakuum cetrifugi (Thermo Scientific vakuum koncentrator *Savant SC210A* s hlađenom stupicom za paru *Savant RVT400* i vakuum pumpom *OFP400*).

3.3.6. Obilježavanje oslobođenih glikana fluorescentnom bojom

Oslobođeni glikani su radi detekcije obilježeni fluorescentnom bojom 2-aminobenzamidom (2-AB). Smjesa za obilježavanje je svježe pripravljena otapanjem 2-AB (konačna masena koncentracija 19,2 mg mL^{-1}) i reducensa 2-PB (konačna masena koncentracija 44,8 mg mL^{-1}) u smjesi ψ(DMSO, CH_3COOH) = 70:30. Prije dodavanja 50 μL pripravljene smjese za obilježavanje osušeni oslobođeni glikani su resuspendirani u 100 μL ultra čiste vode. Nakon što su uzorci uz protresanje inkubirani pri sobnoj temperaturi 10 minuta, reakcija obilježavanja glikana provedena je pri 65 °C 2 sata.

Hidrofilni 0,20 μm *GHP AcroPrep* filtar je prije nanošenja uzoraka pripravljen na način da je korištenjem uređaja za filtriranje uz pomoć vakuuma (približno 25 mm Hg) (Milipore) ispran s 200 μL svježe pripremljenog etanola u ultra čistoj vodi (φ = 70 %), 200 μL ultra čiste vode i 200 μL 96 %-tnog acetonitrila ohlađenog na 4 °C. Nakon reakcije obilježavanja i hlađenja reakcijske smjese na sobnoj temperaturi 30 minuta, glikanima je dodano 800 μL acetonitrila te su premješteni na hidrofilni 0,2 μm *GHP AcroPrep* filtar i inkubirani 2 minute. Suvišak reagensa je uklonjen ispiranjem pet puta s hladnim 96 %-tnim acetonitrilom s tim da je zadnje ispiranje provedeno centrifugiranjem 5 min pri 165 g (model *5804*, Eppendorf). Filtar s vezanim glikana je stavljen na PCR pločicu s 96 jažica, uzorci inkubirani dva puta s 90 μL ultra čiste vode po 15 minuta uz potresanje pri sobnoj temperaturi i eluirani u PCR pločicu centrifugiranjem 5 min pri 165 g (model *5804*, Eppendorf). Nakon eluiranja obilježenih glikana, pločica je zatvorena i uzorci čuvani pri -20 °C do analize tekućinskom kromatografijom.

3.3.7. Analiza fluorescentno obilježenih glikana tekućinskom kromatografijom

3.3.7.1. Opis metode

Fluorescentno obilježeni pročišćeni glikani analizirani su tekućinskom kromatografijom temeljenom na hidrofilnim interakcijama na instrumentu *Acquity* UPLC (Waters) koji se sastoji od modula za upravljanje otapalima (eng. *solvent manager*), modula za upravljanje uzorcima (eng. *sample manager*) te FLR fluorescencijskog detektora. Za kontrolu kromatografa korišten je program *Empower 2*, verzija 2145 (Waters). Svi uzorci i standardi, osim ultra čiste vode, pripravljeni su u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 30:70, na način da je pripravljeni volumen veći za 10 μL od injektiranog (*Vinj*). Svaki set uzoraka je analiziran na sljedeći način: **1.** Ultra čista voda (18 MΩ cm pri 25 °C), *Vinj* = 10 μL **2.** Dekstran (vanjski standard, vidi dolje), *Vinj* = 10 μL **3.** Standard glikana mozga (interni standard obilježenih i pročišćenih ukupnih glikana mišjeg mozga), *Vinj* = 40 μL **4.** do 16 uzoraka, *Vinj* = 50 μL **20.** Standard glikana mozga (interni standard obilježenih i pročišćenih ukupnih glikana mišjeg mozga), *Vinj* = 40 μL **21.** Ultra čista voda (18 MΩ cm pri 25 °C), *Vinj* = 10 μL. Za razdvajanje je korištena kolona *Acquity BEH Glycan* (Waters) duljine 150 mm i unutarnjeg promjera 2,1 mm te veličine čestica 1,7 μm. Pokretnu fazu činio je 100 mmol L^{-1} amonijev formijat pH 4,4 kao otapalo A i acetonitril kao otapalo B uz linearni gradijent od 27 % do 29,5 % prvih 15 minuta i 29.5 – 38.7 % volumnog udjela otapala A pri protoku od 0,561 mL min^{-1} sljedećih 80 minuta. U sljedećoj minuti je sastav pokretne faze postupno promijenjen do 70 % otapala A, te je kolona ispirana 2 minute pri protoku 0,4 mL min^{-1}. Zatim je sastav pokretne faze postupno u jednoj minuti promijenjen na volumni udjel otapala A od 27 %, što odgovara početnim uvjetima sljedećeg injektiranja uzorka, te je kolona ispirana dvije minute u tim uvjetima uz protok od 0,561 mL min^{-1}. Ukupno trajanje analize pojedinog uzorka bilo je 100 minuta. Kao otapalo za ispiranje kromatografskog sustava (eng. *seal wash*) korišten je acetonitril u vodi (φ = 20 %). Temperatura kolone bila je 25 °C, a temperatura uzoraka prije injektiranja 5 °C. Fluorescentno obilježeni glikani detektirani su pri valnoj duljini pobude od 250 nm, i valnoj duljini emisije od 428 nm. Sustav je kalibriran prema vanjskom standardu hidroliziranih i fluorescentno obilježenih oligomera glukoze (2-AB obilježenim dekstranom) te su vremena zadržavanja pojedinih glikana pretvorena u GU jedinice (eng. *glucose units*);

preračunavanje u GU jedinice je napravljeno samo na početku analize da bi se kasnije olakšalo određivanje struktura prisutnih u svakom kromatografskom piku. Kromatogrami su obrađeni automatskom metodom integriranja nakon čega je svaki kromatogram ručno ispravljen kako bi svi uzorci bili integrirani na jednak način. Svaki kromatogram je, prema tome, razdvojen na 58 kromatografskih pikova (slika 14), te je udio površine svakog kromatografskog pika izražen kao postotak ukupne površine svih kromatografskih pikova koji odgovaraju glikanskim strukturama.

3.3.7.2. Skupljanje frakcija pojedinačnih kromatografskih pikova

Reprezentativni uzorci za svaku regiju i svaku vrstu su nakon analize tekućinskom kromatografijom i integriranja ponovo analizirani po metodi opisanoj u Poglavlju 3.3.7.2. s tim da su frakcije svakog pojedinačnog kromatografskog pika nakon prolaska kroz FLR fluorescencijski detektor skupljene u prethodno obilježene tubice, osim frakcije za kromatografski pik GP54 koji je skupljen u dvije zasebne tubice zbog volumena frakcije. Tako skupljene frakcije su osušene do suha u vakuum centrifugi (Thermo Scientific vakuum koncentrator *Savant SC210A* s hlađenom stupicom za paru *Savant RVT400* i vakuum pumpom *OFP400*) te čuvani pri -20 °C do analize spektrometrijom masa.

3.4. Robusnost metode

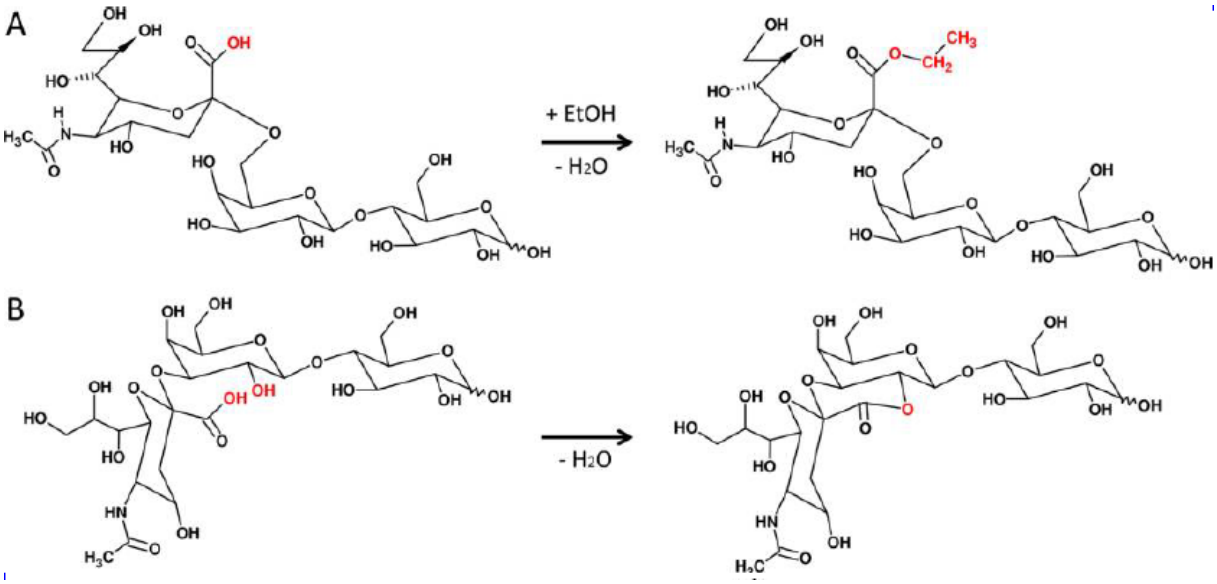
Za provjeru robusnosti metode uzeto je 1000 mg mišjeg tkiva mozga te je nakon koraka homogenizacije i dodavanja metanola (Poglavlje 3.3.1.) podijeljeno na 16 alikvota (~ 62,5 mg tkiva po alikvotu) u tubice volumena 15 mL. Alikvoti su čuvani pri -20 °C do analize. Analiza za prvih osam alikvota je nastavljena tri dana poslije homogenizacije te je u potpunosti napravljena u roku od četiri dana (što je standardno vrijeme potrebno za analizu gore opisanom metodom). Preostalih osam uzoraka je analizirano deset dana nakon homogenizacije istom metodom i na jednak način, ali od strane drugog analitičara. Nakon analize HILIC-UPLC-om (Poglavlje 3.3.7.1.) kromatogrami su podijeljeni na 75 kromatografskih pikova, te je udio površine svakog kromatografskog pika izražen kao postotak ukupne površine svih pikova.

3.5. Metode za pripravu uzoraka za analizu spektrometrijom masa

Određivanje glikanskih struktura u frakcijama pojedinačnih kromatografskih pikova je napravljeno prema prethodno objavljenoj metodi[89].

3.5.1. Metoda esterifikacije

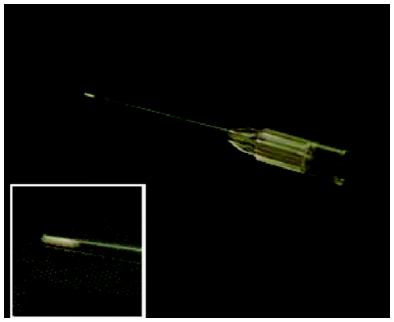
Oslobođeni glikani su radi stabilizacije, neutralizacije i razlikovanja sialinske kiseline vezane α2,3 i α2,6 vezom modificirani reakcijom esterifikacije (slika 8). Osušene frakcije pojedinačnih kromatografskih pikova su resuspendirane u 5 µL ultra čiste vode. Od navedene otopine su uzeta 2 µL te dodana u 20 µL svježe pripremljene smjese za esterifikaciju otapanjem EDC (konačna koncentracija 0,25 mol L^{-1}) i HOBt (konačna koncentracija 0,25 mol L^{-1}) u etanolu. Smjesa glikana i otopine za esterifikaciju inkubirana je jedan sat pri 37 °C. Za kalibraciju je uz svaki set kromatografskih pikova u zasebnu tubicu u esterifikacijsku smjesu dodan 1 µL smjese glikana humane plazme; 10 µL humane plazme je pomiješano s 20 µL SDS-a (γ = 20 g L^{-1}) i inkubirano 10 min pri 65 °C, nakon inkubacije od pola sata pri sobnoj temperaturi uz blago potreskivanje je dodano 10 µL igepala CA-630 (φ = 4 %) te inkubirano dodatnih 15 min pri sobnoj temperaturi. Nakon završetka inkubacije dodano je 10 µL 5x koncentriranog pufera PBS-a i 1,25 U PNGaze F (Promega). Uzorci su potom inkubirani 18 h pri 37 °C.



Slika 8. Strukture α2-6 sialillaktoze (A) i α2-3 sialillaktoze (B) prije i nakon reakcije esterifikacije etanolom. Dok α2-6 vezana sialinska kiselina stvara ester, α2-3 sialinska kiselina stvara lakton sa susjednom galaktozom rekacijom esterifikacije (Preuzeto i prilagođeno iz Reiding i suradnici[89])

3.5.2. Pročišćavanje esterificiranih glikana

Nakon inkubacije u svaki uzorak je dodano 20 µL acetonitrila te su uzorci inkubirani 15 min pri -20 °C radi zaustavljanja esterifikacije. U međuvremenu su nastavci za pipete volumena 200 µL napunjeni pamukom[90] kao što je prikazano na slici 9**.** Takvi nastavci su neposredno prije nanošenja uzorka pripravljeni na način da je pamuk ispran tri puta s 30 µL ultra čiste vode i tri puta sa svježe pripremljenim 85 %-tnim acetonitrilom u ultra čistoj vodi. Nakon završetka inkubacije, uzorci su ostavljeni 10 min na sobnoj temperaturi te su esterificirani glikani vezani na pamuk gore opisanih nastavaka pipetiranjem uzorka 20 puta. Pamuk s vezanim glikanima je ispran tri puta s otopinom 1 %-tne TFA u 85 %-tnom acetonitrilu i nakon toga tri puta u 85 %-tnom acetonitrilu. Pročišćeni glikani su eluirani s pamuka pipetiranjem pet puta 10 µL ultra čiste vode koja se nalazila u prethodno pripremljenoj i označenoj tubici. Uzorak humane plazme koji je korišten za kalibraciju je prolazio sve jednake korake kao i ostali uzorci. Eluat svih uzoraka, osim uzorka plazme, je osušen do suha u vakuum centrifugi (Eppendorf) i potom resuspendiran u 2 µL ultra čiste vode.



Slika 9. Nastavak za pipete napunjen pamukom korišten za pročišćavanje esterificiranih N-glikana (Preuzeto i prilagođeno iz Selman i suradnici[90])

3.5.3. Analiza glikana spektrometrijom masa

Na *MTP AnchorChip 384 T F* (Bruker Daltonik) pločicu je na svako mjesto na koje se trebao nanijeti uzorak stavljen 1 µL otopine matriksa (5 g L^{-1} 2,5-DHB, 1 mmol L^{-1} NaOH u 50 %-tnom acetonitrilu u ultra čistoj vodi) te prenesen ukupni volumen uzorka, osim za uzorak plazme gdje je prenesen samo 1 µL, na isto mjesto gdje i otopina matriksa. Smjesa otopine matriksa i uzorka je osušena na sobnoj temperaturi. Kristali glikana i matriksa su rekristalizirani s 0,2 µL etanola. Uzorci su analizirani unutar nekoliko sati s MALDI – vrijeme leta (TOF, eng. *time of flight*) – spektrometrom masa *Ultraflex TOF/TOF (*Bruker Daltonik) s

UV-laserom *Smartbeam-II* u pozitivnom modu koristeći reflektor i program *Flexcontrol 3.4 Build 119* (Bruker Daltonik). Instrument je kalibriran koristeći N-glikane humane plazme kao standard. Tijekom analize je korišten akceleracijski napon od 25 kV koji je primijenjen nakon ekstrakcijske odgode od 140 ns. Za analizu N-glikana mozga korišten je prozor masa od 1000 do 5000 m/z sa supresijom do 900 m/z. Za svaki spektar je skupljeno 10 000 pucanja laserom pri laserskoj frekvenciji od 200 Hz koristeći cijeli uzorak s nasumičnim hodom s 200 pucnjeva laserom po mjestu. Tandemska spektrometrija masa je napravljena za najzastupljenije pikove u spektru pomoću laserom inducirane disocijacije.

3.5.4. Određivanje struktura nakon spektrometrije masa i tandemske spektrometrije masa

Rezultati nakon MALDI-TOF-MS analize su uneseni u tablicu u kojoj je naznačeno koja masa je prisutna u kojem kromatografskom piku, kojoj regiji mozga te vrsti. S obzirom da sve mase koje se nalaze u pojedinačnom spektru ne pripadaju određenoj glikanskoj strukturi, nego nekom onečišćenju ili fragmentu glikanske strukture, sve mase su asignirane koristeći različite baze glikanskih struktura i računalne alate. Od glikanskih baza korištena je NIBRT GlycoBase[91] pomoću koje su dobivene informacije o GU jedinicama određene strukture, kao i interna baza podataka koristeći glikanske strukture prisutne u humanoj plazmi i imunoglobulinu G (IgG). Od računalnih alata je korišten GlycoMod[92], računalni alat koji koristi izračun šećernog sastava glikanske strukture nakon unosa podatka o masi nakon analize spektrometrije masa, te GlycoWorkbench[93], računalni alat koji daje informacije o fragmentima koji nastaju nakon tandemske spektrometrije masa na osnovu pretpostavljene strukture. Koristeći informacije dobivene korištenjem prethodno navedenih glikanskih baza i računalnih alata za svaku masu nakon MALDI-TOF-MS analize dobiven je konačan popis struktura koja su prisutne u svakom kromatografskom piku za svaku regiju mozga i životinjsku vrstu.

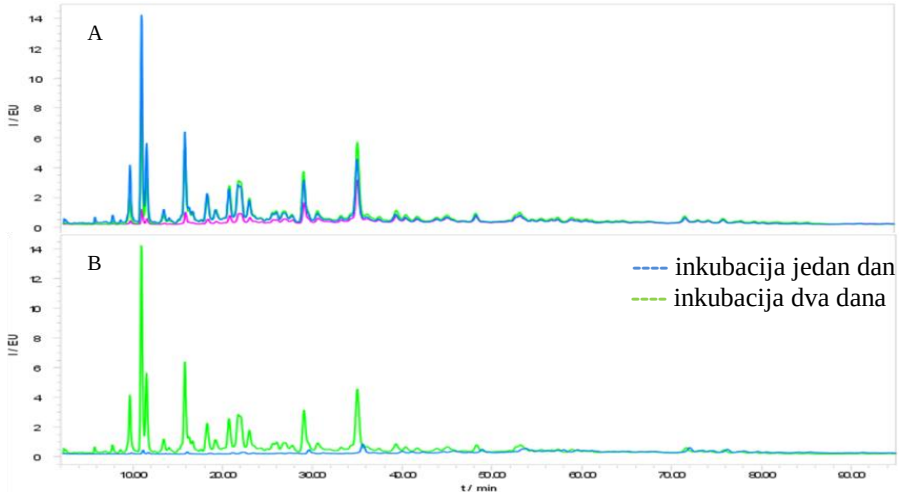
3.6. Statističke metode

Analiza podataka je provedena koristeći računalni program za statističke analize R[94] (verzija 3.2.2.). Analiza glavnih komponenti[95] (PCA, eng. *principal component analysis*) je korištena za eksplorativnu statistiku, koristeći svih 58 kromatografskih pikova. Postojanje razlika između N-glikoma mozga različitih vrsta, regija i tijekom razvoja je napravljeno usporedbom svih mogućih parova. U tu svrhu je korištena statistička metoda analiza varijance, a nad rezultatima je potom provedena korekcija na višestruko testiranje koristeći metodu FDR[96] (eng. *false discovery rate*). Kako bi mjerenja pratila normalnu distribuciju korištene su logaritmirane vrijednosti mjerenja kromatografskih pikova.

§ 4. REZULTATI

4.1. Razvoj metode za analizu N-glikana mozga

Dosadašnje metode za analizu N-glikana tkiva su bile razvijene za analizu spektrometrijom masa, a zbog potrebe za većom količinom glikana za analizu tekućinskom kromatografijom, kao i analize većeg broja uzorka nije ih bilo moguće samo preuzeti u postojećem obliku, već je bilo potrebno značajno modificirati. Prilikom preuzimanja metode za analizu glikana spektrometrijom masa[88] i obilježavanja oslobođenih glikana s 2-AB-om prema metodi za analizu N-glikana plazme i IgG-a HILIC-UPLC-om[97] (Poglavlja 3.3.1, 3.3.2., 3.3.3, 3.3.6. i 3.3.7.) uočena je slaba ponovljivost, kao i ovisnost o vremenu inkubacije s PNGazom F (slika 10, tablica 2). Za potrebe ispitivanja ponovljivosti metode jedan mišji mozak je homogeniziran (Poglavlje 3.3.1.) i podijeljen u tri alikvota te je svaki alikvot analiziran kao neovisan uzorak istom metodom, u istom vremenskom periodu te od strane istog analitičara. Od 61 kromatografskog pika samo ih je sedam imalo koeficijent varijacije (CV) < 15 %, dok je kod ostalih kromatografskih pikova CV bio do 89 % (tablica 2). Također, nakon samo jednog dana inkubacije s PNGazom F (Poglavlje 3.3.5.2.) vidi se da većina glikana dobivenih HILIC-UPLC analizom čine nabijeni glikani, dok se inkubacijom od dva dana može vidjeti znatno povećanje u intenzitetu signala neutralnih glikanskih struktura (slika 10).



Slika 10. Ponovljivost metode HILIC-UPLC (A) i ovisnost o vremenu inkubacije s PNGazom F (B) nakon preuzimanja metoda bez značajnih modifikacija. A. Usporedba kromatograma tri alikvota istog mišjeg mozga nakon homogenizacije analizirana pod istim uvjetima, u istom vremenskom periodu i od istog analitičara. B. Usporedba kromatograma dva alikvota koja su analalizirana na jednak način s jedinom razlikom u vremenu inkubacije s PNGazom F. I – intenzitet, EU – jedinice emisije.

Tablica 2. Ponovljivost metode HILIC-UPLC nakon preuzimanja metoda bez značajnih modifikacija i inkubacije s PNGazom F dva dana. Prikazana je vrijednost udjela površine pojedinog kromatografskog pika u ukupnoj površini svih kromatografskih pikova u kromatogramu (Udio), srednja vrijednost ($\overline{\text{Udio}}$), standardna devijacija udjela površine (SD) te koeficijent varijacije (CV).

Kromatografski pik	Udio / %			$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %
	Replika 1	Replika 2	Replika 3			
GP1	0,05	0,11	0,32	0,16	0,14	88,61
GP2	0,08	0,09	0,25	0,14	0,10	68,14
GP3	0,09	0,16	0,51	0,25	0,23	88,82
GP4	0,59	1,67	4,13	2,13	1,81	85,18
GP5	1,57	5,15	11,22	5,98	4,88	81,58
GP6	0,77	2,71	5,29	2,92	2,27	77,57
GP7	0,20	0,81	1,19	0,73	0,50	68,10
GP8	0,10	0,47	0,59	0,39	0,26	66,05
GP9	0,14	0,53	0,62	0,43	0,26	59,34
GP10	1,55	4,49	6,05	4,03	2,28	56,70
GP11	0,29	0,83	1,05	0,72	0,39	54,06
GP12	0,32	1,01	1,12	0,82	0,43	53,10
GP13	0,12	0,31	0,28	0,24	0,1	43,16
GP14	1,07	2,52	2,81	2,13	0,93	43,70
GP15	0,69	1,61	1,64	1,31	0,54	41,12
GP16	0,30	0,55	0,44	0,43	0,13	29,14
GP17	1,71	3,26	3,34	2,77	0,92	33,17
GP18	1,81	3,23	3,30	2,78	0,84	30,24
GP19	1,75	2,88	3,02	2,55	0,7	27,31
GP20	2,12	3,16	3,07	2,78	0,58	20,70
GP21	0,64	0,82	0,73	0,73	0,09	12,33
GP22	0,36	0,47	0,43	0,42	0,06	13,26
GP23	1,85	2,16	2,00	2,00	0,16	7,74
GP24	1,77	1,95	1,78	1,83	0,10	5,52
GP25	1,21	1,20	1,05	1,15	0,09	7,77
GP26	5,07	5,33	4,90	5,10	0,22	4,25
GP27	3,29	3,05	2,54	2,96	0,38	12,94
GP28	1,79	1,72	1,28	1,60	0,28	17,32
GP29	1,03	0,88	0,73	0,88	0,15	17,05
GP30	10,12	8,36	7,20	8,56	1,47	17,18
GP31	2,27	1,88	1,38	1,84	0,45	24,20
GP32	1,98	1,54	0,94	1,49	0,52	35,12
GP33	3,02	2,16	1,58	2,25	0,72	32,15
GP34	2,07	1,46	1,06	1,53	0,51	33,24
GP35	2,24	1,54	1,08	1,62	0,58	36,06
GP36	2,53	1,51	1,09	1,71	0,74	43,31
GP37	3,64	2,21	1,76	2,54	0,98	38,70

Nastavak tablice 2.

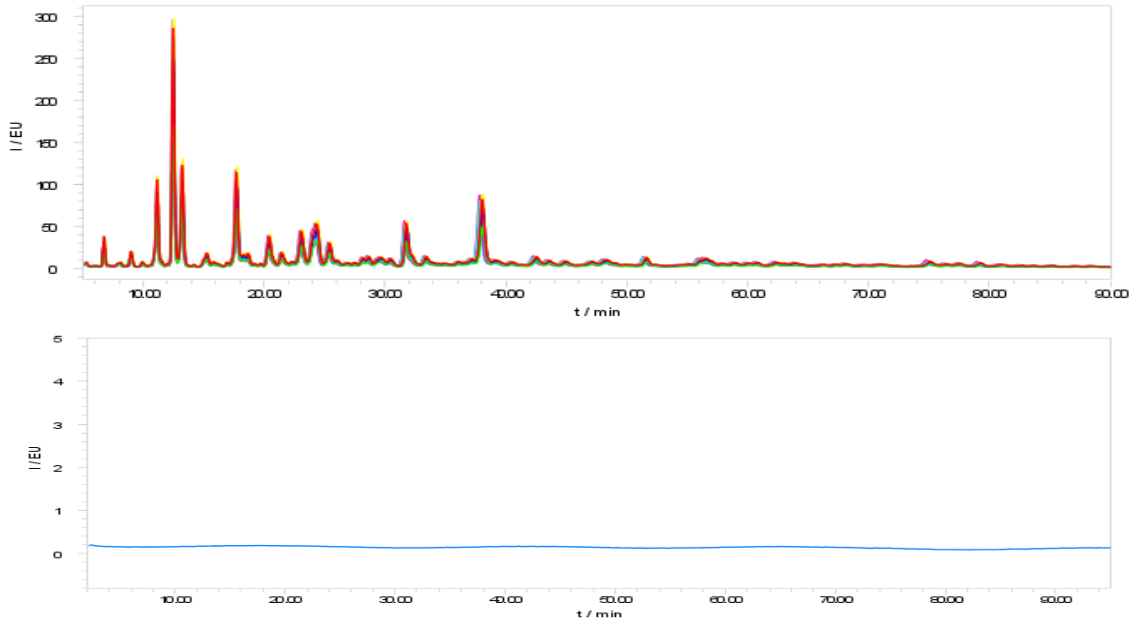
Kromatografski pik	Udio / %			$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %
	Replika 1	Replika 2	Replika 3			
GP38	1,18	0,79	0,60	0,86	0,30	34,52
GP39	3,38	2,02	1,82	2,41	0,85	35,27
GP40	2,25	1,39	1,06	1,57	0,61	39,21
GP41	4,68	2,92	2,35	3,32	1,21	36,62
GP42	1,15	0,73	0,55	0,81	0,31	38,01
GP43	1,8	1,04	0,71	1,18	0,56	47,24
GP44	1,35	0,85	0,58	0,93	0,39	42,16
GP45	1,68	1,10	0,74	1,17	0,47	40,42
GP46	1,80	1,16	0,77	1,24	0,52	41,83
GP47	1,22	0,66	0,39	0,76	0,42	55,95
GP48	2,15	1,38	0,86	1,46	0,65	44,35
GP49	1,35	0,90	0,58	0,94	0,39	41,01
GP50	1,91	1,23	0,75	1,30	0,58	44,95
GP51	2,82	1,87	1,49	2,06	0,69	33,26
GP52	2,62	1,58	1,39	1,86	0,66	35,54
GP53	1,40	0,85	0,64	0,96	0,39	40,74
GP54	1,40	0,91	0,70	1,00	0,36	35,80
GP55	1,44	0,96	0,67	1,02	0,39	38,00
GP56	1,61	1,02	0,65	1,09	0,48	44,29
GP57	0,74	0,6	0,29	0,54	0,23	42,38
GP58	0,51	0,45	0,17	0,38	0,18	48,18
GP59	0,70	0,80	0,22	0,57	0,31	54,08
GP60	0,32	0,50	0,10	0,31	0,20	65,33
GP61	0,33	0,50	0,12	0,32	0,19	60,11

Zbog loše ponovljivosti uveden je korak pročišćavanja glikana kroz 30 kDa filter (Poglavlje 3.3.4.) čime se uklonio utjecaj proteina na kasnije korake analize te mogućnost ukoncentriranja glikana što je u konačnici dovelo do značajnog porasta ponovljivosti (slika 10, tablica 3). Prilikom prvog testiranja nakon uvođenja 30 kDa filtera na tri uzorka uočena je dobra ponovljivost (rezultati nisu prikazani; CV svih kromatografskih pikova je bio ispod 10 %) koja je potom testirana na dodatnih osam uzoraka na isti način kako je provedeno testiranje nakon samog preuzimanja metode bez značajnih modifikacija; CV svih kromatografskih pikova je bio manji od 12 % s tim da je većina kromatografskih pikova (n = 52) imala CV manji od 5 %, a samo su četiri kromatografska pika imala CV veći od 10 % što je ukazalo na dobru ponovljivost metode. Također, prilikom testiranja jedan uzorak nije inkubiran s PNGazom F da bi se dokazalo da signal na kromatogramima dolazi isključivo od N-glikana što je i bio slučaj (slika 11).

Tablica 3. Ponovljivost metode HILIC-UPLC nakon uvođenja koraka pročišćavanja glikana kroz 30 kDa filter. Usporedba osam alikvota mišjih mozgova (dobivenih od dva mišja mozga) analizirana pod istim uvjetima, u istom vremenskom periodu i od istog analitičara. Prikazana je srednja vrijednost udjela površine pojedinog kromatografskog pika u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu ($\overline{\text{Udio}}$), standardna devijacija udjela površine (SD) te koeficijent varijacije (CV).

Kromatografski pik	Udio kromatografskog pika (n = 8)			Kromatografski pik	Udio kromatografskog pika (n = 8)		
	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %		$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %
GP1	1,33	0,04	3,37	**GP35**	1,34	0,02	1,51
GP2	0,39	0,05	11,59	**GP36**	1,00	0,02	1,69
GP3	0,90	0,11	12,52	**GP37**	1,57	0,02	1,10
GP4	0,31	0,01	3,37	**GP38**	1,01	0,02	1,63
GP5	5,01	0,09	1,87	**GP39**	0,99	0,01	1,47
GP6	0,15	0,02	10,96	**GP40**	1,17	0,02	1,55
GP7	11,88	0,17	1,40	**GP41**	1,71	0,03	1,74
GP8	5,82	0,13	2,20	**GP42**	0,50	0,02	4,90
GP9	0,12	0,01	4,45	**GP43**	1,24	0,02	1,98
GP10	1,21	0,02	1,77	**GP44**	0,37	0,01	2,38
GP11	0,57	0,01	2,18	**GP45**	0,89	0,04	4,05
GP12	0,27	0,01	2,72	**GP46**	2,26	0,05	2,35
GP13	7,04	0,11	1,60	**GP47**	0,53	0,01	2,69
GP14	0,89	0,02	2,52	**GP48**	0,72	0,02	2,40
GP15	0,22	0,00	1,62	**GP49**	1,31	0,04	3,22
GP16	0,22	0,01	2,90	**GP50**	1,20	0,04	3,25
GP17	2,70	0,04	1,59	**GP51**	1,00	0,04	4,23
GP18	1,41	0,01	0,92	**GP52**	0,53	0,02	3,94
GP19	3,64	0,05	1,37	**GP53**	0,32	0,01	4,54
GP20	5,87	0,06	1,10	**GP54**	0,58	0,03	4,79
GP21	2,23	0,03	1,13	**GP55**	0,45	0,03	7,25
GP22	0,60	0,02	3,04	**GP56**	0,95	0,06	6,15
GP23	0,51	0,02	4,10	**GP57**	1,20	0,08	6,90
GP24	0,36	0,01	2,97	**GP58**	0,47	0,03	7,37
GP25	0,80	0,02	1,89	**GP59**	0,67	0,03	4,48
GP26	0,89	0,02	1,80	**GP60**	0,70	0,04	6,03
GP27	1,52	0,02	0,99	**GP61**	0,55	0,04	7,09
GP28	0,91	0,02	2,59	**GP62**	0,32	0,02	7,78
GP29	4,49	0,03	0,57	**GP63**	0,24	0,01	6,14
GP30	1,72	0,03	1,47	**GP64**	0,36	0,02	6,04
GP31	0,55	0,01	2,04	**GP65**	0,18	0,01	5,14
GP32	0,67	0,02	2,26	**GP66**	0,19	0,02	7,77
GP33	1,17	0,05	4,06	**GP67**	0,05	0,01	11,19

n = broj replika



Slika 11. Ponovljivost metode HILIC-UPLC nakon uvođenja koraka pročišćavanja glikana kroz 30 kDa filter (A) i analiza tkiva mozga bez dodatka PNGaze F (B). A. Usporedba kromatograma osam alikvota ista dva mišja mozga nakon homogenizacije analizirana pod istim uvjetima, u istom vremenskom periodu i od istog analitičara. B. Kromatogram nakon analize tkiva mišjeg mozga nakon razvoja metode bez dodatka PNGaze F. EU – jedinice emisije.

4.2. Optimizacija metode za analizu N-glikana mozga

4.2.1. Optimizacija homogenizacije i ekstrakcije

Optimizacija ovog koraka je napravljena na način kako je opisano u Poglavlju 3.3.5.1., a za ispitivanje ponovljivosti korištena su dva mišja mozga te podijeljena u 16 alikvota od kojih je osam analizirano na način da kod metode nije ništa mijenjano, dok je drugih osam analizirano prema prethodno spomenutom poglavlju. Obje analize su napravljene paralelno od strane istog analitičara. Usporedbom koeficijenata varijacije nakon analiza (tablica 4) se vidjelo da je broj kromatografskih pikova koji imaju CV veći/manji od druge metode podjednak, s tim da je srednji CV bez soniciranja ($\overline{CV}$ = 10,56 %) ipak malo veći od srednjeg CV-a sa soniciranjem ($\overline{CV}$ = 7,27 %). S obzirom da zamjena soniciranja dodatnom homogenizacijom značajno skraćuje vrijeme analize i s obzirom na broj uzoraka koji je trebao biti analiziran, opcija metode u kojoj je izostavljeno soniciranje se činila prikladnijom za konačnu analizu.

Tablica 4. Ponovljivost metode HILIC-UPLC nakon uvođenja dodatne homogenizacije umjesto soniciranja. Usporedba po osam alikvota mišjih mozgova (dobivenih od dva mišja mozga) analizirana pod istim uvjetima, u istom vremenskom periodu i od istog analitičara s jedinom razlikom u soniciranju i homogenizaciji. Prikazana je srednja vrijednost udjela površine pojedinog kromatografskog pika u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu ($\overline{\text{Udio}}$), standardna devijacija udjela površine (SD) te koeficijent varijacije (CV).

Kromatografski pik	Udio kromatografskog pika sa soniciranjem (n = 8)			Udio kromatografskog pika bez soniciranja (n = 8)		
	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %
GP1	2,00	0,09	4,56	1,84	0,14	7,62
GP2	0,22	0,02	8,42	0,20	0,04	19,35
GP3	1,17	0,18	15,65	0,89	0,15	16,86
GP4	0,30	0,02	6,23	0,27	0,04	13,84
GP5	4,92	0,08	1,71	4,86	0,20	4,02
GP6	12,24	0,24	1,99	12,61	0,66	5,27
GP7	6,87	0,19	2,83	6,90	0,47	6,86
GP8	1,82	0,06	3,42	1,87	0,09	4,68
GP9	9,57	0,16	1,65	9,86	0,34	3,48
GP10	3,12	0,07	2,10	3,08	0,05	1,56
GP11	1,50	0,03	2,17	1,60	0,06	3,65
GP12	4,11	0,09	2,14	4,30	0,11	2,46
GP13	6,29	0,11	1,74	6,43	0,15	2,38
GP14	2,22	0,03	1,45	2,30	0,03	1,37
GP15	1,29	0,06	4,54	1,25	0,15	12,08
GP16	1,55	0,06	3,81	1,63	0,07	4,16
GP17	2,83	0,15	5,38	2,87	0,20	7,10
GP18	4,96	0,09	1,87	4,92	0,11	2,14
GP19	1,70	0,06	3,70	1,85	0,13	6,98
GP20	1,73	0,06	3,64	1,64	0,20	12,05
GP21	9,60	0,15	1,59	9,60	0,27	2,78
GP22	0,68	0,04	5,72	0,63	0,06	9,48
GP23	0,62	0,05	7,66	0,60	0,05	8,74
GP24	2,29	0,07	3,08	2,29	0,21	8,98
GP25	0,87	0,05	6,23	0,82	0,08	9,75
GP26	0,98	0,05	4,88	0,96	0,09	9,14
GP27	1,13	0,05	4,74	1,12	0,22	19,84
GP28	0,96	0,07	7,65	0,97	0,02	2,13
GP29	1,31	0,12	9,18	1,25	0,16	12,76
GP30	1,05	0,07	6,60	1,05	0,17	15,81
GP31	2,22	0,06	2,71	2,12	0,19	9,04
GP32	0,57	0,05	8,38	0,54	0,08	14,61
GP33	1,07	0,06	5,25	1,00	0,12	12,44

Nastavak tablice 4.

Kromatografski pik	Udio kromatografskog pika sa soniciranjem (n = 8)			Udio kromatografskog pika bez soniciranja (n = 8)		
	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %
GP34	0,83	0,05	6,24	0,8	0,07	8,86
GP35	1,41	0,09	645	1,43	0,12	8,53
GP36	1,02	0,06	6,33	0,98	0,06	6,12
GP37	1,08	0,09	8,34	0,99	0,07	7,26
GP38	0,64	0,08	13,01	0,58	0,06	10,42
GP39	0,64	0,13	20,97	0,55	0,1	17,75
GP40	0,24	0,06	25,99	0,19	0,05	24,65
GP41	0,25	0,06	23,8	0,19	0,05	27,72
GP42	0,13	0,03	21,38	0,1	0,03	33,47
GP43	0,08	0,02	27,6	0,05	0,02	35,75

n = broj replika

4.2.2. Optimizacija denaturacije i deglikozilacije

Prilikom optimiziranja ovog koraka (Poglavlje 3.3.5.2.), prvo se pokušalo reducirati volumen pufera 1xPBS-a čime bi se postiglo: 1) smanjenje soli koje stvaraju problem prilikom pročišćavanja na GHP filteru (Poglavlje 3.3.6.), 2) koncentracija PNGaze bi bila veća što bi potencijalno utjecalo na povećanje intenziteta te 3) sveukupno smanjenje volumena što bi olakšalo rukovanje uzorcima jer je prvotni volumen bio dosta velik. Testiranje je provedeno od strane jednog analitičara, unutar jednakog vremenskog perioda, koristeći istu metodu s jedinom razlikom u volumenu 1xPBS-a (Poglavlje 3.3.5.2.). Nakon testiranja smanjenja volumena i njegovog utjecaja na ponovljivost (tablica 5) pokazalo se da smanjenje volumena na 250 µL i 100 µL blago smanjuje srednji koeficijent varijacije ($\overline{\text{CV}}$ za 1000 µL = 9,96 %, $\overline{\text{CV}}$ za 500 µL = 16,14 %, $\overline{\text{CV}}$ za 250 µL = 8,06 %, $\overline{\text{CV}}$ za 100 µL = 9,84 %), ali uzrokuje znatno povećanje koeficijenta varijacije za određene kromatografske pikove (npr. GP1) te velike varijacije u intenzitetima što je sveukupno dovelo do zaključka da se dodatkom 1000 µL 1xPBS-a dobivaju robusniji uvjeti za analizu te da smanjenje volumena pufera 1xPBS nije prihvatljiva opcija optimizacije metode za analizu N-glikana.

Tablica 5. Ponovljivost metode HILIC-UPLC pri različitim volumenima 1xPBS-a prilikom denaturacije i deglikozilacije. Usporedba po osam alikvota mišjih mozgova (dobivenih od dva mišja mozga) analizirana pod istim uvjetima, u istom vremenskom periodu i od istog analitičara s jedinom razlikom u volumenu 1xPBS-a prilikom denaturacije i deglikozilacije. Prikazana je srednja vrijednost udjela površine pojedinog kromatografskog pika u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu ($\overline{\text{Udio}}$), standardna devijacija udjela površine (SD) te koeficijent varijacije (CV).

Kromatografski pik	Udio kromatografskog pika (1000 µL, n = 8)			Udio kromatografskog pika (500 µL, n = 8)			Udio kromatografskog pika (250 µL, n = 8)			Udio kromatografskog pika (100 µL, n = 8)		
	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %
GP1	2,07	0,31	14,79	1,85	0,34	18,31	0,57	0,11	19,18	0,24	0,08	32,60
GP2	0,30	0,03	8,94	0,31	0,05	16,46	0,16	0,02	14,24	0,13	0,03	27,09
GP3	1,01	0,10	9,55	0,94	0,16	17,04	0,57	0,09	15,13	0,35	0,09	24,77
GP4	0,40	0,03	7,29	0,39	0,06	14,80	0,27	0,03	12,52	0,20	0,05	24,60
GP5	5,04	0,16	3,14	5,18	0,67	12,96	3,76	0,33	8,67	2,66	0,51	19,33
GP6	11,86	0,42	3,54	13,73	1,48	10,80	10,80	0,64	5,96	8,73	1,23	14,05
GP7	6,85	0,49	7,10	6,67	1,14	17,12	5,30	0,49	9,28	4,00	0,64	15,93
GP8	0,21	0,05	22,08	0,15	0,01	9,32	0,17	0,05	28,35	16,00	0,03	20,63
GP9	1,23	0,07	5,78	1,21	0,13	11,10	1,09	0,04	3,78	0,99	0,09	9,41
GP10	0,19	0,03	16,60	0,26	0,02	9,44	0,29	0,01	4,19	0,30	0,03	9,47
GP11	0,24	0,02	6,43	0,24	0,02	10,34	0,24	0,02	8,14	0,25	0,03	12,34
GP12	0,21	0,01	3,33	0,24	0,01	5,87	0,26	0,01	2,75	0,28	0,02	6,70
GP13	6,60	0,48	7,28	6,52	0,56	8,66	5,89	0,15	2,50	5,27	0,20	3,79
GP14	2,30	0,13	5,87	2,25	0,29	13,07	2,11	0,13	6,04	2,03	0,16	7,99
GP15	0,21	0,02	8,62	0,23	0,01	5,19	0,27	0,01	3,87	0,30	0,02	6,33
GP16	2,83	0,09	3,25	2,76	0,18	6,53	2,65	0,07	2,63	2,54	0,06	2,52
GP17	1,40	0,04	3,11	1,42	0,09	6,10	1,45	0,04	3,05	1,51	0,03	1,82
GP18	0,50	0,04	7,33	0,45	0,02	4,56	0,48	0,02	3,88	0,49	0,02	4,87
GP19	3,29	0,21	6,47	3,11	0,19	6,10	3,10	0,12	3,79	3,00	0,08	2,66
GP20	6,47	0,17	2,65	6,30	0,27	4,25	6,13	0,15	2,40	5,91	0,15	2,55
GP21	3,08	0,05	1,53	3,11	0,15	4,71	3,21	0,15	4,75	3,32	0,15	4,54
GP22	0,74	0,01	1,78	0,70	0,03	3,73	0,77	0,03	4,37	0,79	0,05	6,43
GP23	0,45	0,06	12,18	0,52	0,02	3,94	0,62	0,02	2,84	0,68	0,04	5,84
GP24	1,04	0,08	7,62	1,13	0,08	7,25	1,22	0,05	3,81	1,28	0,04	3,42
GP25	2,23	0,01	0,67	2,20	0,07	3,09	2,43	0,05	2,26	2,62	0,11	4,06
GP26	3,57	0,04	1,25	3,52	0,06	1,77	3,58	0,09	2,41	3,55	0,18	5,06
GP27	1,32	0,10	7,54	1,16	0,05	3,89	1,22	0,08	6,70	1,24	0,10	8,28
GP28	1,27	0,04	3,10	1,30	0,05	3,61	1,47	0,04	2,62	1,59	0,09	5,55
GP29	1,55	0,03	1,68	1,44	0,12	8,39	1,61	0,09	5,47	1,74	0,19	10,69
GP30	1,09	0,09	7,82	0,97	0,07	7,69	1,11	0,07	6,44	1,21	0,06	5,12
GP31	9,45	0,41	4,31	8,55	0,39	4,58	9,02	0,29	3,23	8,92	0,39	4,38

Nastavak tablice 5.

Kromatografski pik	Udio kromatografskog pika (1000 µL, n = 8)			Udio kromatografskog pika (500 µL, n = 8)			Udio kromatografskog pika (250 µL, n = 8)			Udio kromatografskog pika (100 µL, n = 8)		
	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %
GP32	1,08	0,05	4,81	1,02	0,12	11,40	1,25	0,05	3,82	1,44	0,13	9,20
GP33	1,33	0,08	5,67	1,32	0,18	13,85	1,58	0,05	3,04	1,69	0,05	3,15
GP34	1,13	0,04	3,35	0,99	0,11	11,50	1,15	0,04	3,65	1,19	0,07	5,84
GP35	0,59	0,04	6,01	0,53	0,05	10,33	0,61	0,03	4,60	0,69	0,07	10,42
GP36	0,98	0,04	4,32	0,87	0,13	15,32	1,06	0,07	6,96	1,18	0,15	12,80
GP37	0,71	0,05	6,91	0,66	0,09	13,01	0,79	0,03	3,34	0,84	0,05	6,46
GP38	2,03	0,13	6,28	1,98	0,37	18,47	2,47	0,11	4,33	2,76	0,14	5,09
GP39	1,26	0,08	6,03	1,13	0,20	17,95	1,42	0,07	4,98	1,54	0,09	5,85
GP40	0,66	0,05	7,16	0,60	0,13	21,32	0,86	0,09	10,64	1,09	0,15	14,00
GP41	1,39	0,09	6,14	1,33	0,29	21,60	1,63	0,06	3,97	1,82	0,11	6,06
GP42	0,82	0,07	8,37	0,78	0,16	20,42	1,00	0,03	3,30	1,10	0,13	11,35
GP43	0,57	0,04	6,51	0,50	0,12	23,16	0,65	0,05	6,94	0,75	0,05	6,01
GP44	0,49	0,04	8,18	0,47	0,09	19,87	0,61	0,03	4,52	0,67	0,05	7,01
GP45	1,04	0,15	14,49	1,09	0,31	28,36	1,47	0,11	7,40	1,75	0,16	8,90
GP46	0,98	0,16	16,45	1,04	0,30	28,79	1,44	0,14	9,81	1,78	0,16	9,26
GP47	0,77	0,16	20,21	0,83	0,25	30,75	1,16	0,09	7,45	1,40	0,08	5,64
GP48	0,41	0,08	18,49	0,44	0,14	31,79	0,63	0,08	12,10	0,83	0,12	14,44
GP49	1,61	0,30	18,51	1,77	0,61	34,68	2,62	0,34	12,96	3,34	0,28	8,54
GP50	0,77	0,20	25,26	0,94	0,35	36,88	1,43	0,22	15,42	1,93	0,26	13,24
GP51	0,39	0,12	31,54	0,51	0,20	39,29	0,75	0,11	14,18	1,07	0,20	18,91
GP52	0,52	0,13	24,05	0,58	0,20	34,06	0,86	0,10	11,46	1,02	0,09	8,51
GP53	0,48	0,14	29,16	0,60	0,25	41,39	0,90	0,13	14,10	1,18	0,16	13,52
GP54	0,64	0,17	26,14	0,79	0,32	40,50	1,19	0,23	19,51	1,66	0,16	9,91
GP55	0,21	0,06	26,45	0,26	0,10	37,41	0,39	0,11	29,24	0,59	0,09	15,25
GP56	0,16	0,04	24,41	0,21	0,08	41,36	0,31	0,09	28,25	0,45	0,04	8,82

n = broj replikata

Nakon testiranja utjecaja volumena 1xPBS-a na ponovljivost metode pokušalo se je reducirati količinu detergenta SDS-a čime bi se, također, reducirao volumen i smanjili problemi prilikom pročišćavanja na GHP filteru. Dva mišja mozga su homogenizirana i nakon homogenizacije podijeljena u 16 alikvota, od kojih je osam analizirano na način kako je to opisano u Poglavlju 3.3.3., dok je drugih osam analizirano na jednak način, u istom vremenskom periodu i od strane istog analitičara s jedinom razlikom u volumenu dodanog

SDS-a (Poglavlje 3.3.5.2.). Nakon analize (tablica 6) srednji koeficijent varijacije je bio manji za skupinu s manjom količinom SDS-a ($\overline{CV}$ = 5,38 %) u usporedbi s kontrolnom skupinom ($\overline{CV}$ = 7,27 %). Također, proces pročišćavanja obilježenih glikana preko GHP filtera je bio značajno olakšan, a došlo je i do porasta intenziteta nakon HILIC-UPLC analize. Zbog svega navedenog ova izmjena je zadržana u konačnoj metodi kojom su na kraju analizirani uzorci.

Tablica 6. Ponovljivost metode HILIC-UPLC pri različitim količinama SDS-a prilikom denaturacije i deglikozilacije. Usporedba po osam alikvota mišjih mozgova (dobivenih od dva mišja mozga) analizirana pod istim uvjetima, u istom vremenskom periodu i od istog analitičara s jedinom razlikom u količini SDS-a prilikom denaturacije i deglikozilacije. Prikazana je srednja vrijednost udjela površine pojedinog kromatografskog pika u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu ($\overline{Udio}$), standardna devijacija udjela površine (SD) te koeficijent varijacije (CV).

Kromatografski pik	**Udio kromatografskog pika s nepromijenjenim volumenom SDS-a (n = 8)**			**Udio kromatografskog pika sa smanjenim volumenom SDS-a (n = 8)**		
	$\overline{Udio}$ / %	**SD / %**	**CV / %**	**$\overline{Udio}$ / %**	**SD / %**	**CV / %**
GP1	2,00	0,09	4,56	0,74	0,02	3,27
GP2	0,22	0,02	8,42	0,20	0,01	4,67
GP3	1,17	0,18	15,65	0,68	0,09	12,67
GP4	0,30	0,02	6,23	0,19	0,01	6,05
GP5	4,92	0,08	1,71	3,81	0,05	1,34
GP6	12,24	0,24	1,99	12,30	0,36	2,95
GP7	6,87	0,19	2,83	5,77	0,15	2,67
GP8	1,82	0,06	3,42	1,74	0,05	2,72
GP9	9,57	0,16	1,65	8,62	0,09	1,07
GP10	3,12	0,07	2,10	2,80	0,08	2,83
GP11	1,50	0,03	2,17	1,61	0,06	3,80
GP12	4,11	0,09	2,14	3,64	0,04	1,23
GP13	6,29	0,11	1,74	6,09	0,06	1,01
GP14	2,22	0,03	1,45	2,09	0,07	3,18
GP15	1,29	0,06	4,54	1,36	0,03	2,12
GP16	1,55	0,06	3,81	1,83	0,02	1,33
GP17	2,83	0,15	5,38	2,80	0,12	4,30
GP18	4,96	0,09	1,87	4,77	0,07	1,37
GP19	1,70	0,06	3,70	1,71	0,07	4,22
GP20	1,73	0,06	3,64	1,80	0,07	3,76
GP21	9,60	0,15	1,59	8,07	0,16	1,99
GP22	0,68	0,04	5,72	0,62	0,03	4,58
GP23	0,62	0,05	7,66	0,75	0,03	3,34
GP24	2,29	0,07	3,08	2,81	0,08	2,73
GP25	0,87	0,05	6,23	0,73	0,02	2,62

Nastavak tablice 6.

Kromatografski pik	Udio kromatografskog pika s nepromijenjenim volumenom SDS-a (n = 8)			Udio kromatografskog pika sa smanjenim volumenom SDS-a (n = 8)		
	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %
GP26	0,98	0,05	4,88	1,07	0,03	2,63
GP27	1,13	0,05	4,74	1,23	0,03	2,06
GP28	0,96	0,07	7,65	1,17	0,06	4,71
GP29	1,31	0,12	9,18	1,70	0,11	6,47
GP30	1,05	0,07	6,60	1,13	0,04	3,26
GP31	2,22	0,06	2,71	3,33	0,15	4,42
GP32	0,57	0,05	8,38	0,75	0,02	2,82
GP33	1,07	0,06	5,25	1,22	0,20	16,11
GP34	0,83	0,05	6,24	1,37	0,20	14,32
GP35	1,41	0,09	6,45	2,28	0,05	2,33
GP36	1,02	0,06	6,33	1,79	0,08	4,52
GP37	1,08	0,09	8,34	1,94	0,09	4,68
GP38	0,64	0,08	13,01	1,27	0,10	8,24
GP39	0,64	0,13	20,97	1,12	0,13	11,40
GP40	0,24	0,06	25,99	0,47	0,07	15,29
GP41	0,25	0,06	23,80	0,37	0,05	12,58
GP42	0,13	0,03	21,38	0,19	0,03	13,24
GP43	0,08	0,02	27,60	0,09	0,02	20,50

n = broj replika

Nakon gore navedenih testiranja, analizirali smo smanjenje količine enzima PNGaze F (Poglavlje 3.3.3.) s ciljem smanjenja troškova analize. Količina enzima PNGaze F je smanjena na pola od početne količine. Testiranje je napravljeno tako da su dva mišja mozga homogenizirana i podijeljena u 16 alikvota od kojih je osam analizirano kako je opisano u Poglavlju 3.3.3., dok je drugih osam analizirano na jednak način, u istom vremenskom periodu i od strane jednog analitičara s jedinom razlikom da je količina enzima koja se dodaje u dva koraka smanjena na pola. Rezultati nakon testiranja su prikazani u tablici 7. S obzirom da je srednji koeficijent varijacije bio veći nakon što je količina enzima smanjena na pola ($\overline{\text{CV}}$ = 4,08 %) u usporedbi s kontrolom ($\overline{\text{CV}}$ = 3,30 %), a intenziteti nakon HILIC-UPLC analize niži, ova modifikacija se nije pokazala dobrom opcijom pri optimizaciji metode te nije uključena u konačnu metodu kojom su se analizirali uzorci.

Tablica 7. Ponovljivost metode HILIC-UPLC pri različitim količinama PNGaze F prilikom denaturacije i deglikozilacije. Usporedba po osam alikvota mišjih mozgova (dobivenih od dva mišja mozga) analizirana pod istim uvjetima, u istom vremenskom periodu i od istog analitičara s jedinom razlikom u količini enzima PNGaze F prilikom denaturacije i deglikozilacije. Prikazana je srednja vrijednost udjela površine pojedinog kromatografskog pika u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu ($\overline{\text{Udio}}$), standardna devijacija udjela površine (SD) te koeficijent varijacije (CV).

Kromatografski pik	Udio kromatografskog pika s nepromijenjenom količinom enzima (n = 8)			Udio kromatografskog pika sa smanjenom količinom enzima (n = 8)		
	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %
GP1	1,16	0,02	1,68	1,36	0,04	2,78
GP2	0,22	0,01	2,48	0,21	0,01	3,89
GP3	0,80	0,11	13,70	0,91	0,10	11,16
GP4	0,28	0,01	2,92	0,30	0,01	2,29
GP5	4,66	0,04	0,89	4,95	0,07	1,44
GP6	12,05	0,08	0,66	11,93	0,13	1,06
GP7	6,96	0,08	1,11	7,27	0,18	2,42
GP8	1,71	0,02	0,94	1,74	0,04	2,49
GP9	9,48	0,12	1,28	10,21	0,12	1,16
GP10	2,81	0,06	1,96	2,90	0,05	1,56
GP11	1,61	0,02	1,33	1,61	0,02	1,18
GP12	4,20	0,04	0,99	4,34	0,06	1,28
GP13	6,43	0,03	0,50	6,65	0,04	0,55
GP14	2,44	0,03	1,36	2,30	0,07	2,88
GP15	1,53	0,01	0,96	1,53	0,03	2,08
GP16	1,50	0,02	1,48	1,41	0,02	1,59
GP17	2,32	0,02	0,96	2,30	0,04	1,54
GP18	4,84	0,04	0,76	4,94	0,03	0,61
GP19	1,76	0,11	6,20	1,62	0,04	2,36
GP20	1,59	0,12	7,73	1,62	0,04	2,31
GP21	9,50	0,10	1,04	9,89	0,05	0,51
GP22	0,72	0,02	2,47	0,70	0,01	1,29
GP23	0,66	0,02	3,61	0,63	0,02	3,83
GP24	2,45	0,03	1,07	2,32	0,03	1,49
GP25	0,99	0,02	1,62	0,98	0,01	1,41
GP26	1,16	0,02	2,05	1,13	0,01	1,11
GP27	1,34	0,01	1,09	1,29	0,01	1,13
GP28	1,70	0,03	1,59	1,55	0,02	1,16
GP29	0,31	0,01	3,04	0,30	0,02	8,25
GP30	1,80	0,04	2,15	1,67	0,04	2,62
GP31	2,04	0,03	1,25	1,90	0,05	2,67
GP32	0,67	0,02	2,99	0,58	0,01	2,23
GP33	1,20	0,02	2,03	1,12	0,03	2,85

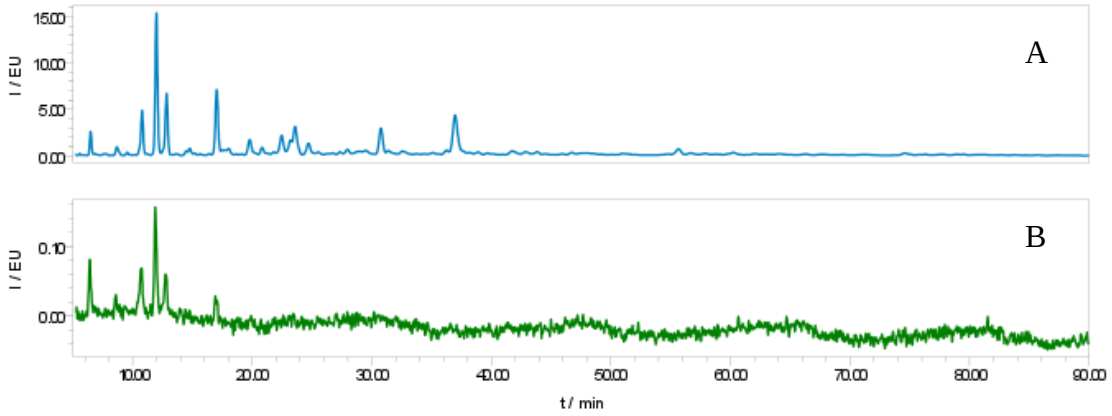
Nastavak tablice 7.

Kromatografski pik	Udio kromatografskog pika s nepromijenjenom količinom enzima (n = 8)			Udio kromatografskog pika sa smanjenom količinom enzima (n = 8)		
	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %
GP34	0,97	0,03	3,18	0,85	0,03	3,49
GP35	0,68	0,02	2,88	0,57	0,03	5,67
GP36	0,35	0,01	4,31	0,30	0,03	9,05
GP37	0,56	0,03	5,61	0,47	0,03	6,85
GP38	0,53	0,03	5,06	0,46	0,03	5,89
GP39	0,62	0,03	4,92	0,54	0,05	8,54
GP40	0,26	0,02	7,83	0,20	0,02	7,64
GP41	0,58	0,03	5,92	0,48	0,06	12,03
GP42	0,75	0,03	3,95	0,59	0,06	9,43
GP43	0,87	0,05	5,44	0,67	0,06	8,43
GP44	0,39	0,03	6,78	0,30	0,03	8,82
GP45	0,30	0,02	6,94	0,23	0,02	10,44
GP46	0,13	0,01	7,27	0,11	0,01	9,23
GP47	0,11	0,01	9,09	0,09	0,01	9,18

n = broj replika

4.2.3. Optimizacija pročišćavanja glikana nakon deglikozilacije

Nakon optimizacije koraka denaturacije i deglikozilacije, ispitan je utjecaj taloženja proteina hladnim etanolom (Poglavlje 3.3.5.3.) sa svrhom izostavljanja filtriranja uzoraka kroz 30 kDa filtere (Poglavlje 3.3.4.) čime bi se smanjila količina vremena i troškovi potrebni za analizu. S obzirom da se uvođenjem metode taloženja proteina hladnim etanolom umjesto metode filtriranja uzoraka kroz 30 kDa filtre nisu dobili kromatogrami koji bi se mogli integrirati i rezultati usporediti nakon HILIC-UPLC analize (slika 12), ova vrsta zamjene nije bila moguća tako da je konačna metoda kojom su analizirani uzorci sadržavala korak filtriranja uzoraka kroz 30 kDa filtere.



Slika 12. Reprezentativni kromatogrami nakon HILIC-UPLC analize nakon pročišćavanja glikana kroz 30 kDa filter (A) ili taloženjem hladnim etanolom (B). EU – jedinice emisije.

4.3. Robusnost metode za analizu N-glikana mozga

Robusnost metode je testirana kako je opisano u Poglavlju 3.4. Na taj se način namjeravalo ispitati koliki utjecaj na metodu imaju faktori koje nije moguće izbjeći tijekom analize većeg broja uzoraka, tj. kad nije moguće sve uzorke paralelno analizirati unutar istog vremenskog perioda, istim kemikalijama i od strane samo jednog analitičara. Rezultati analize (tablica 8) su pokazali da je metoda robusna jer svi od 75 kromatografskih pikova su imali CV manji od 12 % s tim da su samo tri kromatografska pika imala CV veći od 10 %. Prosječni koeficijent varijacije je bio 3.93 %. Također, napravljena je usporedba prvih osam replika analiziranih od jednog analitičara s drugih osam analiziranih od drugog analitičara s vremenskom razlikom od tjedan dana (slika 13) i tu je primijećeno da iako su vrijednost CV-a pojedinačnih kromatografskih pikova kao i $\overline{CV}$ bile relativno niske, kod određenih kromatografskih pikova (npr. GP6 i GP30) se jasno vidjelo razdvajanje ovisno o analitičaru i vremenu analize. Razlika između dvije analize je bila najveća za GP6 te je iznosila svega 0,4 %, ali unatoč tome svi uzorci su randomizirani prije analize tako da dobivena razlika ne bi bila zbog razlike između analiza, nego da bi pokazala stvarnu biološku razliku.

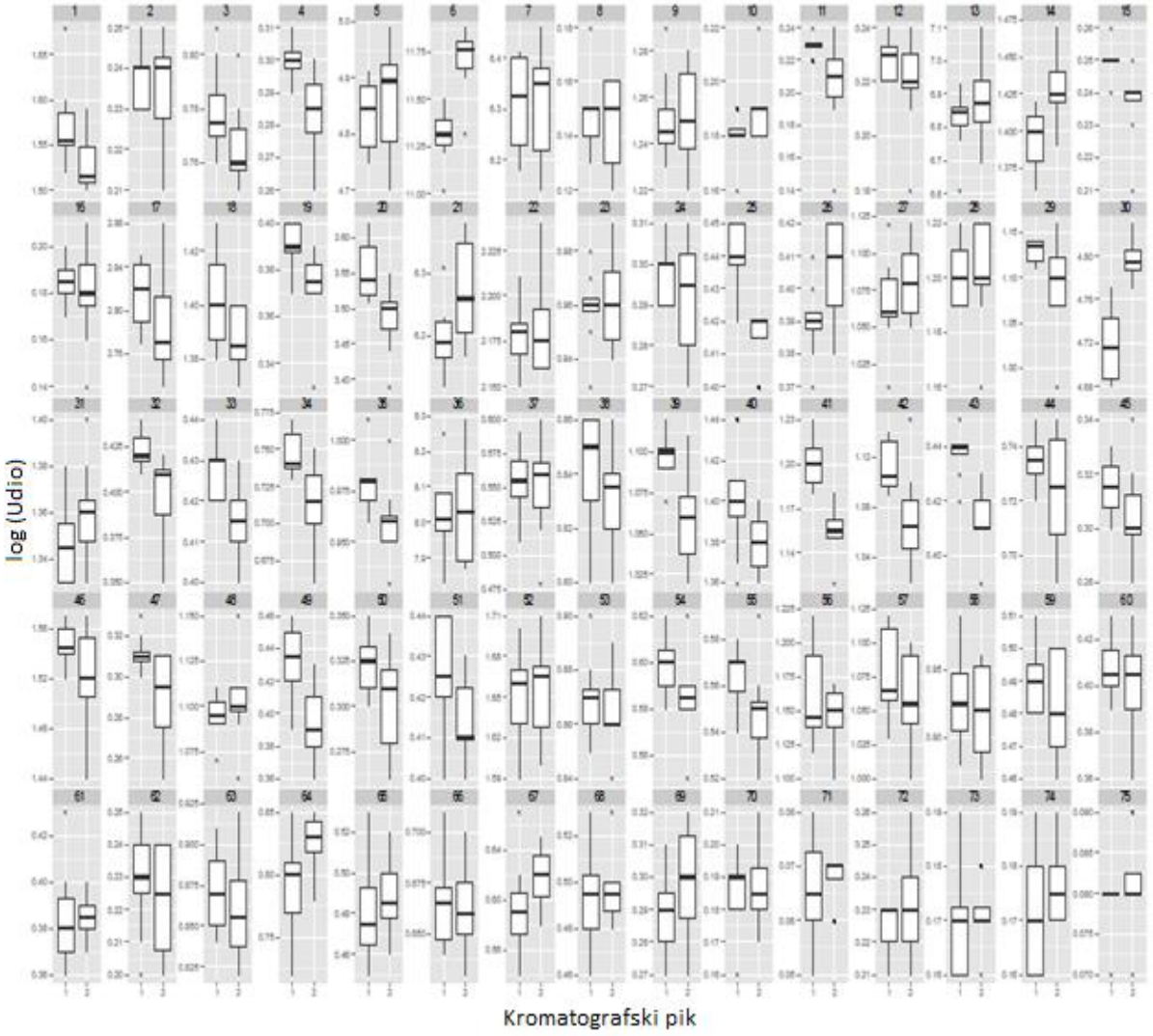
Tablica 8. Robusnost metode HILIC-UPLC. Usporedba 16 alikvota mišjih mozgova (dobivenih od dva mišja mozga) analizirana istom metodom, u različitim vremenskim periodima i od različitih analitičara. Prikazana je srednja vrijednost udjela površine pojedinog kromatografskog pika u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu ($\overline{\text{Udio}}$), standardna devijacija udjela površine (SD) te koeficijent varijacije (CV).

Kromatografski pik	Udio kromatografskog pika (n = 16)			Kromatografski pik	Udio kromatografskog pika (n = 16)		
	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %		$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %
GP1	1,55	0,05	3,00	**GP39**	1,08	0,03	2,80
GP2	0,24	0,01	4,60	**GP40**	1,39	0,03	1,80
GP3	0,77	0,02	2,30	**GP41**	1,18	0,03	2,45
GP4	0,29	0,01	4,72	**GP42**	1,09	0,04	3,45
GP5	4,85	0,08	1,65	**GP43**	0,43	0,02	3,84
GP6	11,51	0,26	2,25	**GP44**	0,73	0,02	2,43
GP7	6,31	0,10	1,59	**GP45**	0,31	0,02	5,13
GP8	0,15	0,01	10,17	**GP46**	1,53	0,03	2,21
GP9	1,25	0,02	1,60	**GP47**	0,30	0,02	6,99
GP10	0,19	0,01	6,55	**GP48**	1,10	0,02	1,79
GP11	0,22	0,02	11,31	**GP49**	0,41	0,03	7,11
GP12	0,22	0,01	6,50	**GP50**	0,31	0,02	7,71
GP13	6,85	0,13	1,82	**GP51**	0,42	0,01	3,19
GP14	1,41	0,03	1,94	**GP52**	1,65	0,04	2,15
GP15	0,24	0,01	4,68	**GP53**	0,87	0,01	1,71
GP16	0,18	0,02	9,06	**GP54**	0,59	0,02	3,05
GP17	2,80	0,04	1,58	**GP55**	0,56	0,02	3,34
GP18	1,40	0,02	1,28	**GP56**	1,15	0,03	2,61
GP19	0,38	0,02	4,58	**GP57**	1,07	0,03	3,13
GP20	3,52	0,06	1,65	**GP58**	0,92	0,04	3,93
GP21	6,24	0,08	1,29	**GP59**	0,49	0,01	3,07
GP22	2,18	0,02	1,07	**GP60**	0,41	0,02	4,51
GP23	0,96	0,02	1,70	**GP61**	0,39	0,02	4,24
GP24	0,30	0,01	3,91	**GP62**	0,23	0,02	7,41
GP25	0,43	0,02	3,77	**GP63**	0,87	0,03	3,47
GP26	0,40	0,02	4,06	**GP64**	0,81	0,04	4,71
GP27	1,07	0,03	2,68	**GP65**	0,48	0,02	4,71
GP28	1,20	0,02	1,32	**GP66**	0,66	0,02	3,39
GP29	1,11	0,04	3,91	**GP67**	0,61	0,04	5,91
GP30	4,76	0,05	1,03	**GP68**	0,50	0,02	3,69
GP31	1,35	0,02	1,55	**GP69**	0,29	0,02	5,54
GP32	0,41	0,02	5,30	**GP70**	0,19	0,01	6,47
GP33	0,42	0,01	2,43	**GP71**	0,07	0,01	11,86

Nastavak tablice 8.

Kromatografski pik	Udio kromatografskog pika (n = 16)			Kromatografski pik	Udio kromatografskog pika (n = 16)		
	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %		$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %
GP34	0,73	0,03	3,78	**GP72**	0,23	0,01	5,36
GP35	0,97	0,02	2,01	**GP73**	0,17	0,01	5,00
GP36	8,03	0,13	1,67	**GP74**	0,17	0,01	5,51
GP37	0,55	0,03	5,78	**GP75**	0,08	0,01	6,45
GP38	0,84	0,02	2,42	/	/	/	/

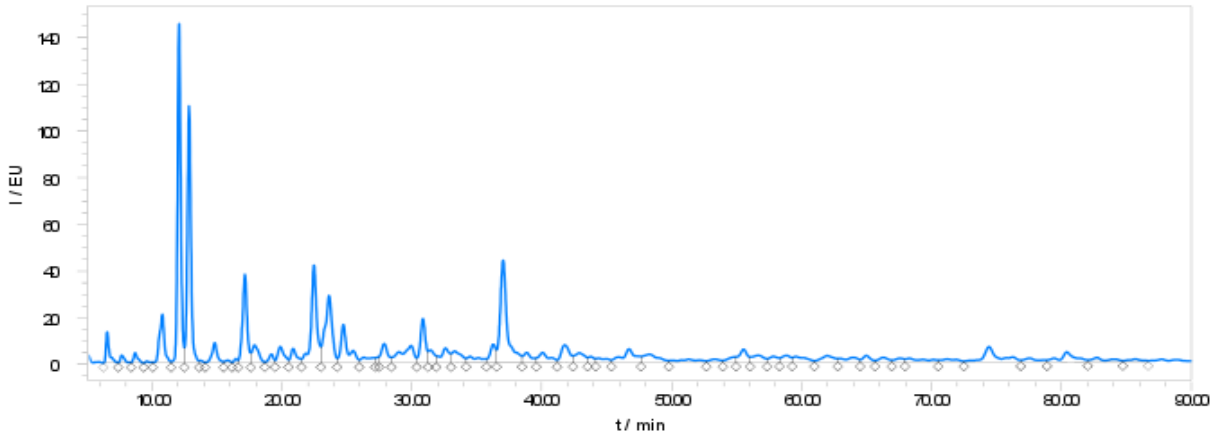
n = broj replika



Slika 13. Robusnost HILIC-UPLC metode za analizu N-glikana tkiva mozga. Za svaki kromatografski pik su prikazana dva box-plota, po jedan za svaki analizu kod ispitivanja robusnosti i osam replikata.

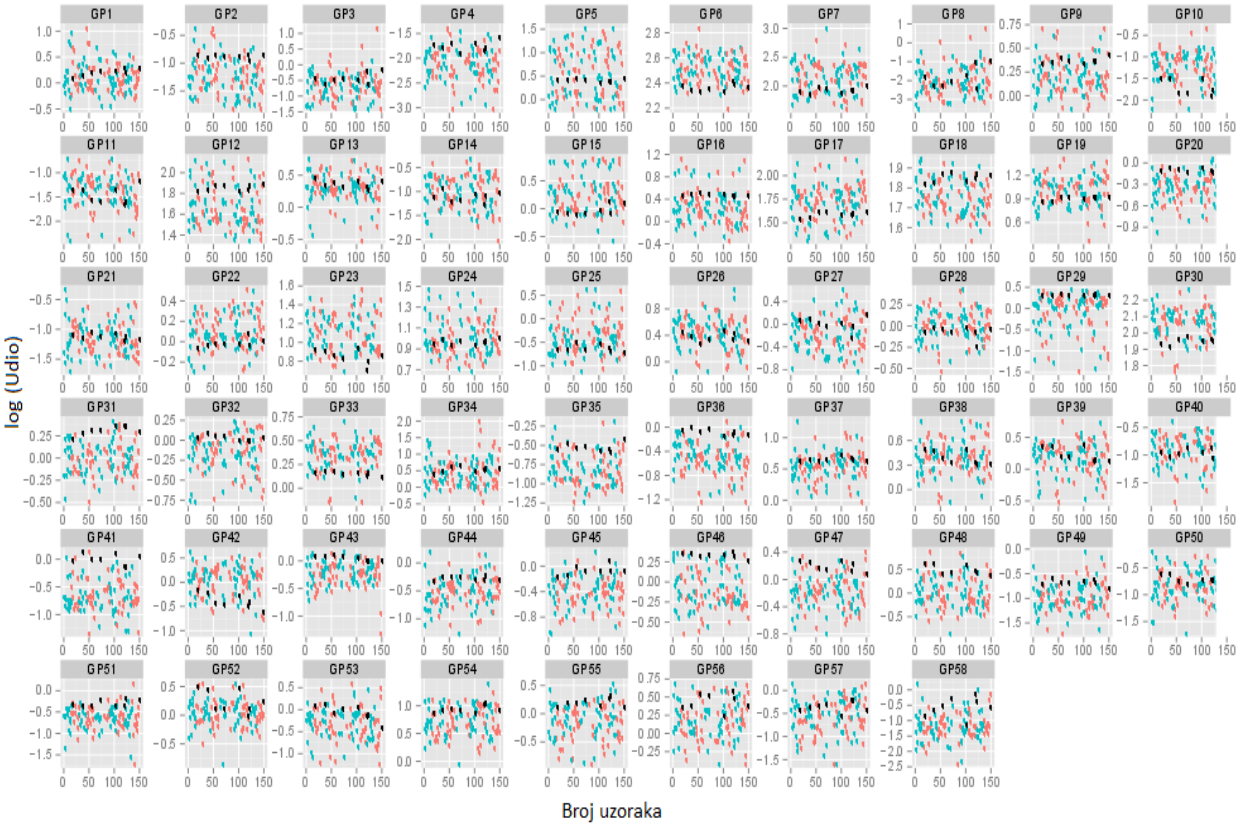
4.4. HILIC-UPLC analiza N-glikana mozga

Glikani mozga različitih vrsta i regija su analizirani na način da su uzorci nasumično raspoređeni (dodatak 1) tako da se u svakoj analiziranoj seriji nalazi što sličniji odnos između vrsta, regija, dobi i spola. Svi uzorci su na taj način podijeljeni u 10 serija te je svakoj seriji uzoraka pridodan i jedan standard. Standardi su napravljeni homogenizacijom 500 mg humane kore velikog mozga te podjelom nakon homogenizacije i dodavanja metanola (Poglavlje 3.3.1.) u 10 jednakih alikvota. Svaki je standard kao i uzorci nakon randomizacije čuvan pri -20 °C. Svaka serija je analizirana unutar četiri dana na način da su uzorci homogenizirani (Poglavlje 3.3.1.) i napravljena kloroform/metanol ekstrakcija kako je to opisano u Poglavlju 3.3.2., s tim da su koraci soniciranja zamijenjeni dodatnim korakom homogenizacije (Poglavalja 3.3.5.1. i 4.2.1.). Uzorci su potom denaturirani u prisutnosti SDS-a i Igepala CA-640 i deglikozilirani enzimom PNGazom F u skladu s Poglavljem 3.3.3., s izmjenom dodane količine SDS-a (Poglavlje 3.3.5.3. i 4.2.2.). Nakon deglikozilacije uzorci su pročišćeni kroz 30 kDa filtere (Poglavlje 3.3.4.), osušeni te obilježeni reduktivnom aminacijom fluorescentnom bojom, 2-AB, prema postupku opisanom u Poglavlju 3.3.6. Fluorescentno obilježeni glikani su pročišćeni od suviška fluorescentene boje, ostatka reagensa i proteina HILIC-SPE pročišćavanjem na 0,2 μm *GHP AcroPrep* filterima uz ispiranje s 96 %-tnim acetonitrilom u vodi ohlađenim pri 4 °C (Poglavlje 3.3.6.). Pročišćeni fluorescentno obilježeni glikani su analizirani HILIC-UPLC metodom opisanom u Poglavlju 3.3.7. i u svim kromatogramima je na identičan način integrirano 58 kromatografskih pikova (slika 14). Iz analize su isključeni svi uzorci kod kojih je intenzitet bio nedovoljan da bi se moglo sa sigurnošću odrediti granice svakog kromatografskog pika (takvih je uzoraka bilo devet).



Slika 14. Reprezentativni kromatogram fluorescentno obilježenih glikana kore velikog mozga čovjeka. Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 30:70, te analizirani uz linearni gradijent od 27 % do 29,5 % prvih 15 minuta i 29,5 – 38,7 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,561 mL min^{-1} sljedećih 80 minuta. U kromatogramu je integrirano ukupno 58 kromatografskih pikova (označeni rombom). *Vinj* = 50 µL, *Tkolone* = 25 °C, *Tuzoraka* = 5 °C, λex = 250 nm, λem = 428 nm. EU – jedinica emisije

Standardi su analizirani na identičan način kao i uzorci da bi se dobio uvid u ponovljivost metode, što je bila i kontrola da uočene razlike između vrsta, regija i razvoja nisu posljedica pogreške metode, nego su posljedica biološke razlike. Nakon završetka cjelokupne analize izračunati su koeficijenti varijacije za svaki kromatografski pik (dodatak 2), kao i srednji koeficijent varijacije ($\overline{CV}$ = 10,20 %). Od 58 kromatografskih pikova njih 11 je imalo CV veći od 15 % i to su uglavnom bili kromatografski pikovi s udjelom kromatografskog pika manjim od 1 %. Također, raspršenje udjela kromatografskog pika standarda za svaki kromatografski pik je bilo manje od raspršenja udjela kromatografskog pika uzoraka (slika 15) tako da se ova metoda pokazala dovoljno pouzdanom za otkrivanje biološke razlike između analiziranih uzoraka.

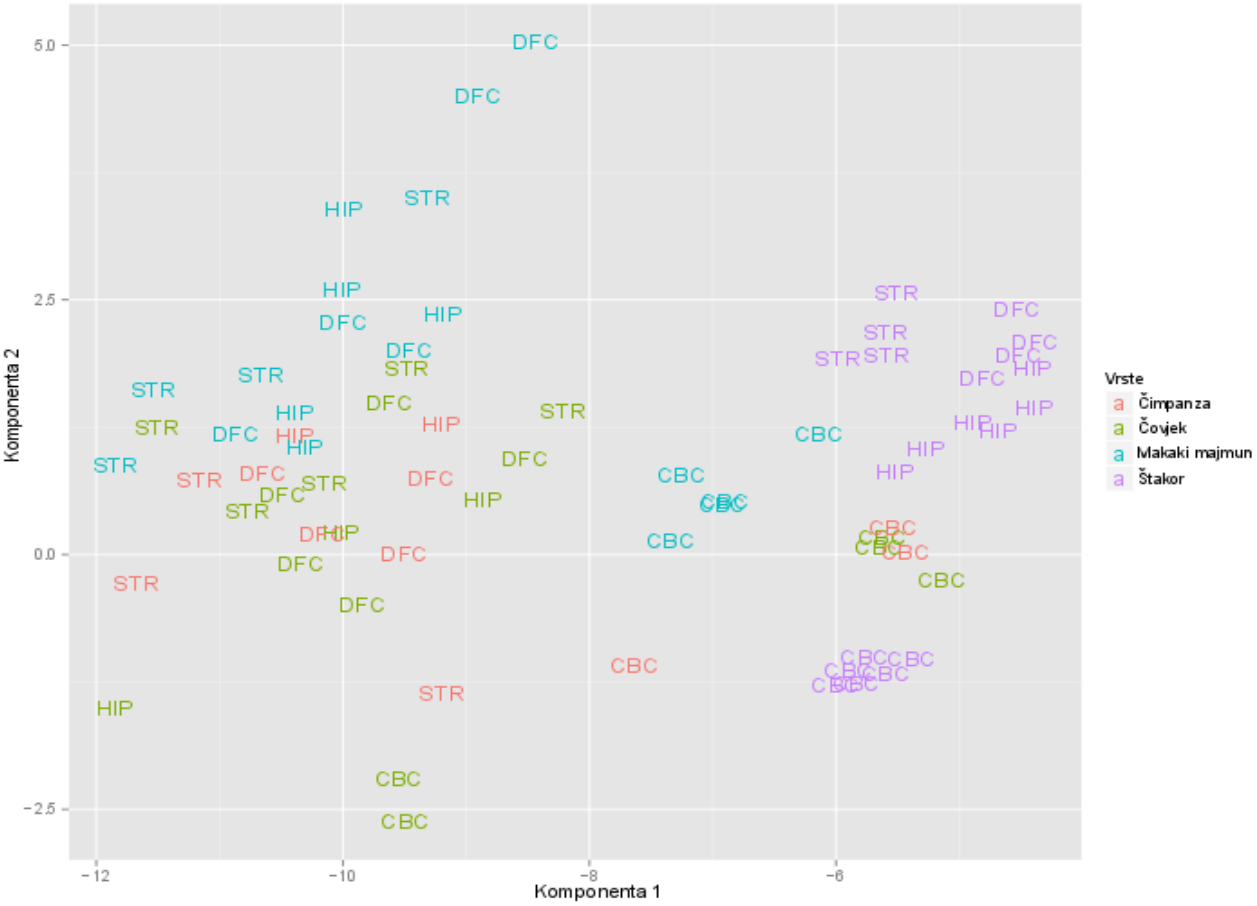


Slika 15. Prikaz uzoraka i standarada nakon analize. Standardi su prikazani crnim točkama, dok su uzorci prikazani plavim (neparne serije) i crvenim (parne serije).

4.4.1. Razlike između glikanskih profila različitih vrsta, regija i razvoja mozga

Analiza glavnih komponenti je napravljena kako je opisano u Poglavlju 3.6. Analizom kod koje su uzete u obzir sve odrasle jedinke svih vrsta (slika 16) je pokazano da se N-glikanski profili razlikuju između različitih vrsta i regija mozga. Na Slici 16 se vidi grupiranje različitih regija određene vrste međusobno u zasebne skupine, a to je najjasnije izraženo kod štakora. Razlog za to bi mogao ležati u činjenici da je kod štakora bilo moguće analizirati cijelu regiju određene polutke mozga, svi štakori su bili jednog soja i dobi, dok kod ostalih vrsta nije bilo moguće imati takve uzorke. Statistička značajnost između regija za svaki kromatografski pik dana je u Dodatku 3. Također, ovom analizom se pokazalo da se mali mozak između različitih vrsta grupira zajedno i uvijek je jasno odvojen od ostalih regija. Činjenica da mali mozak pripada u evolucijski najstarije regije mozga bi mogla objasniti razlog takvog rezultata. Osim grupiranja N-glikanskih profila različitih regija mozga, vidljivo je jasno odvajanje svih vrsta osim čimpanze i čovjeka, a osobito štakora od kojih su evolucijski znatno udaljeniji, nego što je to slučaj između pojedinih vrsta primata. Od primata, makaki majmun je jedini pokazao grupiranje neovisno od čimpanze i čovjeka. Preklapanje između glikanskih profila između

čimpanze i čovjeka leži u činjenici da su te dvije vrste evolucijski najbliže od svih analiziranih. Naravno, gore navedena opažanja se ne odnose na mali mozak koji se grupira zajedno bez obzira na vrstu kojoj pripada; iako se unutar te skupine ipak vidi grupiranje prema vrsti kojoj pripada, npr. jasno se vidi grupiranje malog mozga štakora, kao i makaki majmuna neovisno o ostalim vrstama.

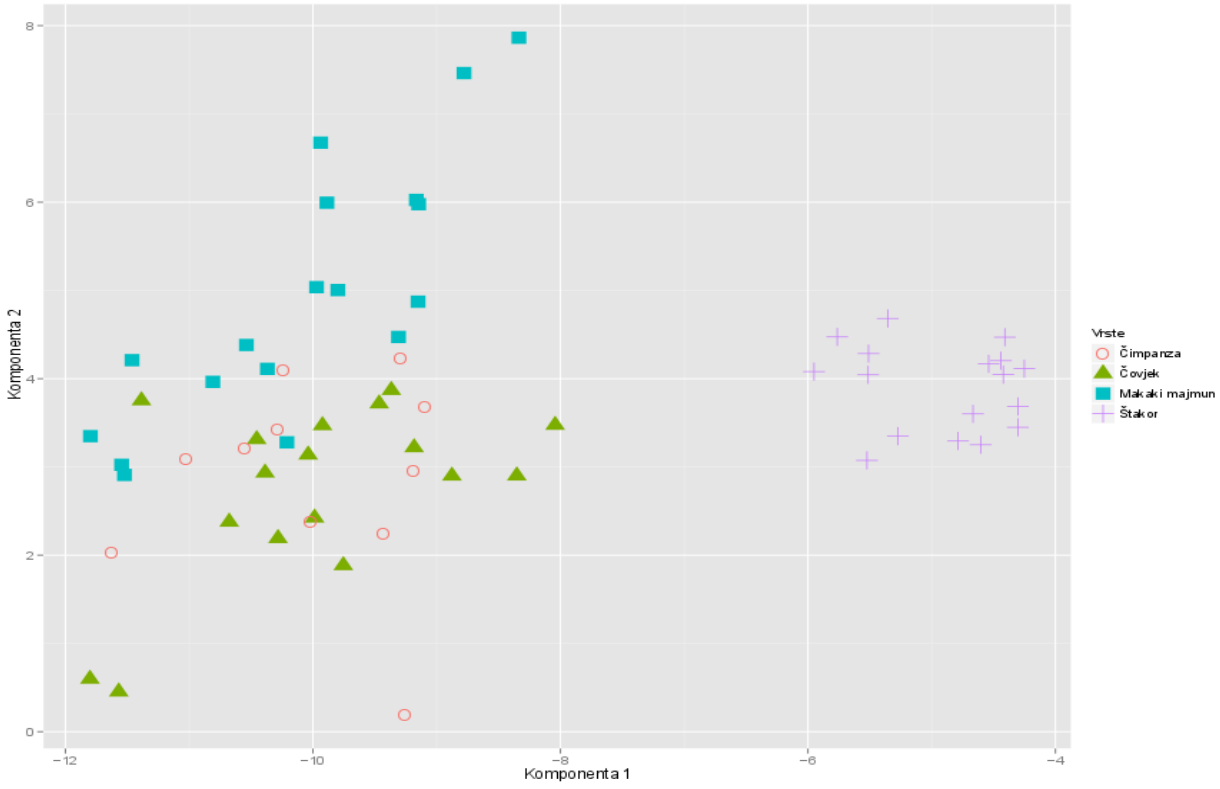


Slika 16. Analiza glavnih komponenti glikankih profila svih odraslih jedinki uključenih u analizu. Svaka boja predstavlja određenu vrstu kako je navedeno u legendi. DFC – kora velikog mozga (eng. ***d**orsal **f**rontal **c**ortex*), HIP – **hip**okampus, STR – **str**ijatum, CBC – mali mozak (eng. ***c**ere**b**ellum **c**ortex*).

Kad se zbog svega navedenog mali mozak izbaci iz analize glavnih komponenti, postaje jasnije vidljivo razdvajanje između štakora i primata, kao i preklapanje u glikanskom profilu između čimpanze i čovjeka kod svih ostalih regija (slika 17). Iako postoji preklapanje između glikanskih profila navedenih vrsta nakon analize glavnih komponenti, nakon testiranja značajnosti razlika za svaki pojedinačni kromatografski pik (tablica 9), vidljivo je da, iako ne postoji generalna razlika u glikanskom profilu između čimpanze i čovjeka, razlika postoji između određenih kromatografskih pikova. Za sve ostale vrste značajni kromatografski pikovi su dani u Dodatku 3.

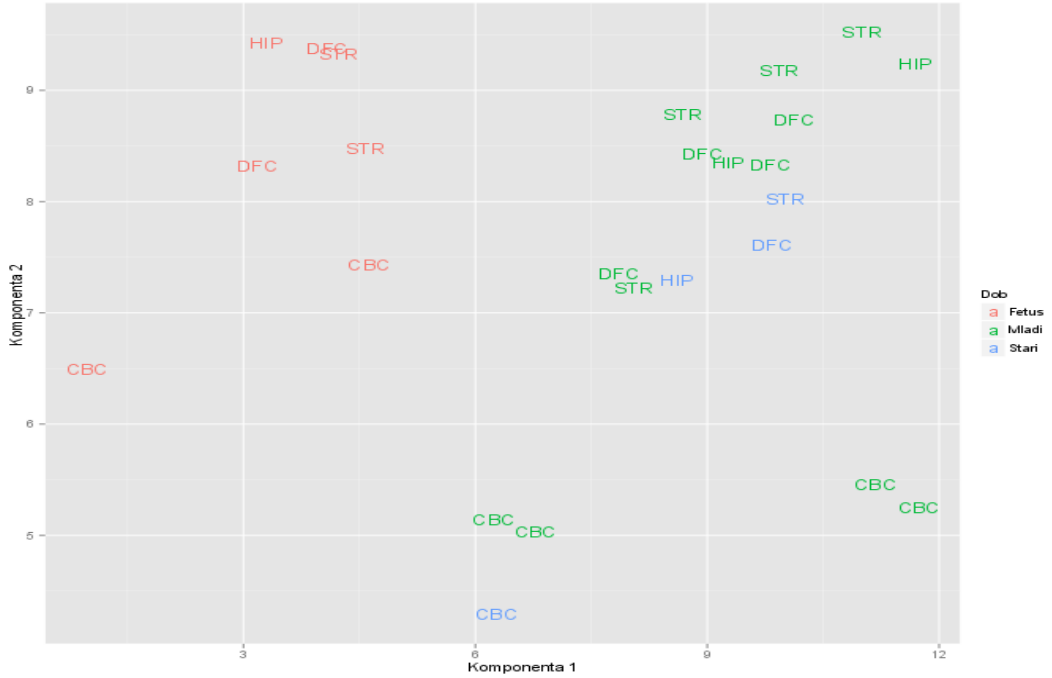
Tablica 9. Statistički značajni kromatografski pikovi nakon prilagodbe na višestruko testiranje (Poglavlje 3.6.) između čovjeka i čimpanze (prilagođena p-vrijednost < 0,05). Utjecaj govori koliko je puta veća/manja srednja vrijednost čovjek/čimpanza za određeni kromatografski pik kad se vrijednost utjecaja stavi u eksponent baze prirodnog logaritma *e*.

Kromatografski pik	Utjecaj	Standardna pogreška	p-vrijednost	Prilagođena p-vrijednost
GP39	0,3058	0,0774	0,0002	0,0005
GP47	-0,2266	0,0642	0,0006	0,0016
GP22	-0,1676	0,0489	0,0008	0,0021
GP46	-0,0977	0,0328	0,0030	0,0066
GP50	-0,1872	0,0697	0,0067	0,0139
GP52	0,1439	0,0619	0,0172	0,0328
GP41	-0,1614	0,0713	0,0199	0,0376
GP49	-0,2352	0,1050	0,0211	0,0392
GP38	0,0549	0,0256	0,0268	0,0491

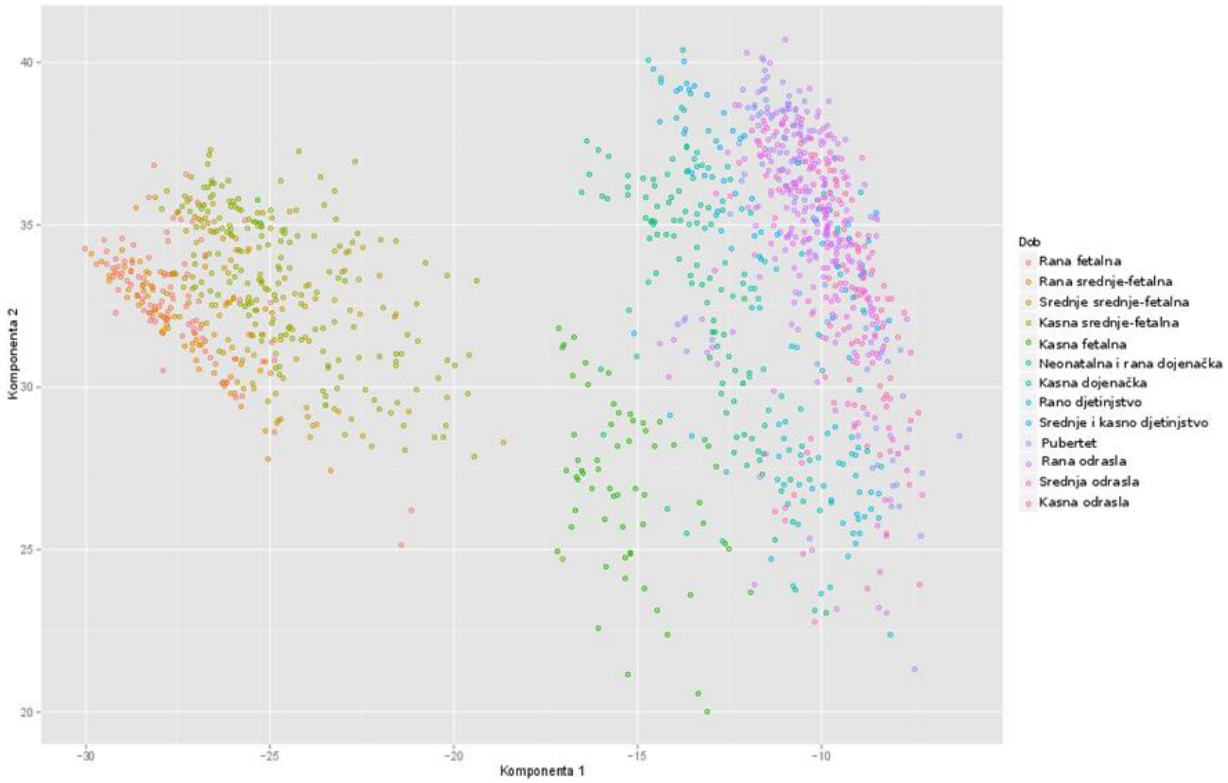


Slika 17. Analiza glavnih komponenti glikanskih profila svih odraslih jedinki uključenih u analizu. U analizu su uključene sve regije osim malog mozga. Svaka boja i simbol predstavlja određenu vrstu kako je navedeno u legendi.

Analiza glavnih komponenti za glikanske profile odraslih ljudi i fetusa (slika 18) pokazuje jasnu promjenu glikanskog profila mozga čovjeka sa starenjem, a osobito je jasna razlika između fetalnog i odraslog razdoblja; glikanski profili analiziranih fetalnih uzoraka se nalaze između štakora i primata nakon analize glavnih komponenti svih vrsta i razvoja (dodatak 5). Također, i u ovom slučaju glikanski profil malog mozga se razlikuje od ostalih regija mozga grupirajući se odvojeno. Nakon što je uočeno takvo ponašanje glikanskog profila tijekom razvoja, napravljena je ista analiza za 344 gena uključena u glikozilaciju[98]. Kao što je vidljivo na Slici 18 i Slici 19 postoji preklapanje između analiziranih N-glikanskih profila i ekspresije gena uključenih u glikozilaciju tijekom razvoja. Također, isto se vidi grupiranje fetalnih uzoraka u zasebnu skupinu od skupine gdje se nalaze uzorci nakon rođenja.



Slika 18. Analiza glavnih komponenti glikanskih profila različitih stadija razvoja čovjeka. Svaka boja predstavlja određenu dob, kako je navedeno u legendi. Skupinu "Stari" čini samo jedna osoba od 82 godine, dok su ostale osobe bile mlađe od 40 godina. DFC – kora velikog mozga (eng. ***d****orsal* ***f****rontal* ***c****ortex*), HIP – **hip**okampus, STR – **str**ijatum, CBC – mali mozak (eng. ***c****ere****b****ellum* ***c****ortex*).

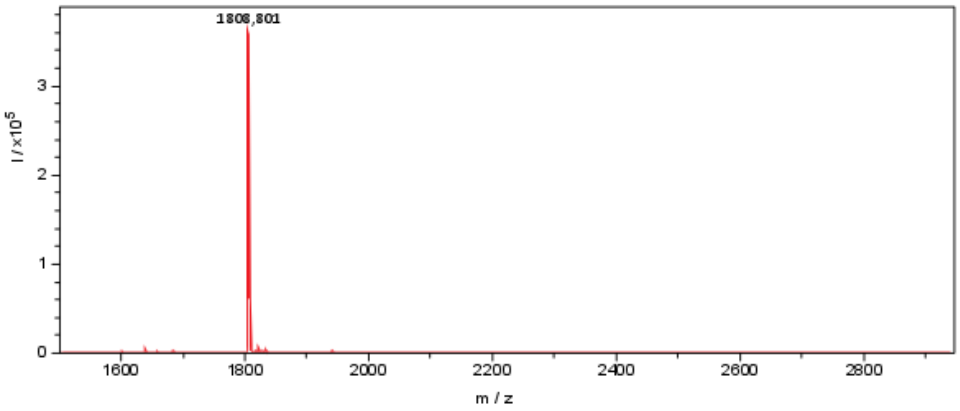


Slika 19. Analiza glavnih komponenti ekspresije 344 gena uključenih u glikozilaciju[98] tijekom razvoja čovjeka. Svaka boja predstavlja određenu dob: Rana fetalna (8 – 13 postkoncepcijskih tjedana), Rana srednje-fetalna (13 – 16 postkoncepcijskih tjedana), Srednja srednje-fetalna (16 – 19 postkoncepcijskih tjedana), Kasna srednje-fetalna (19 – 24 postkoncepcijskih tjedana), Kasna fetalna (24 – 38 postkoncepcijskih tjedana), Neonatalna i rana dojenačka (rođenje – 6 mjeseci), Kasna dojenačka (6 – 12 mjeseci), Rano djetinjstvo (1 – 6 godina), Srednje i kasno djetinjstvo (6 -12 godina), Pubertet (12 – 20 godina), Rana odrasla (20 -40 godina), Srednja odrasla (40 – 60 godina), Kasna odrasla (60 i više godina).

4.5. Analiza N-glikana mozga spektrometrijom masa

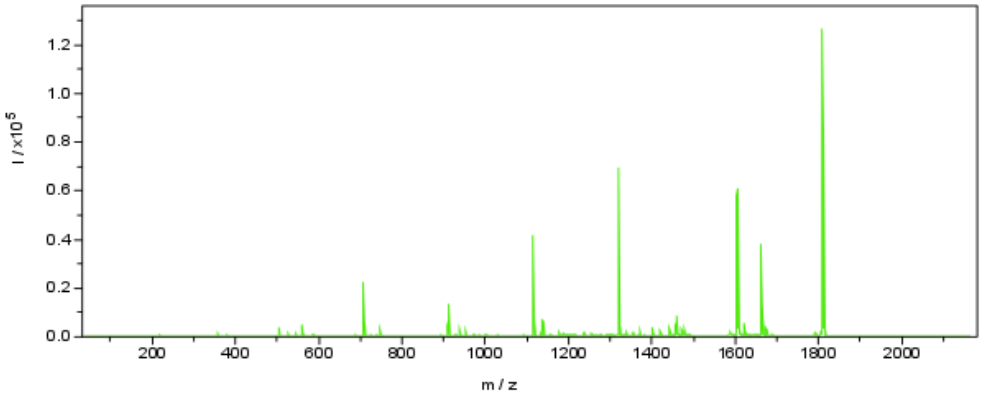
Nakon HILIC–UPLC analize, frakcije pojedinačnih kromatografskih pikova su skupljene kako je to opisano u Poglavlju 3.3.7.2. i prema integriranju prikazanom na Slici 14. Svaka pojedinačna frakcija je osušena do suha te esterificirana (Poglavlje 3.5.1.) radi stabilizacije, neutralizacije i razlikovanja sialinske kiseline vezane α2,3 i α2,6 vezom. Esterifikacija je provedena etanolom uz pomoć EDC i HOBt. Nakon esterifikacije uzorci su pročišćeni vezanjem na pamuk i pročišćeni 85 %-tnom acetonitrilom u ultra čistoj vodi, te eluirani ultra čistom vodom. Pročišćeni esterificirani glikani su osušeni do suha te analizirani MALDI–TOF–MS-om kako je to opisano u Poglavlju 3.5.3., a za kalibraciju je korištena humana plazma (Poglavlja 3.5.1. – 3.5.2.). Ista analiza je napravljena za svaki kromatografski pik bez prethodne esterifikacije s obzirom da ona nema utjecaja na neutralne glikanske strukture. Na

taj način je snimljeno ukupno 2 000 MS spektara te su svi korišteni kako bi se dobio što bolji uvid u N-glikanske strukture prisutne u mozgu (slika 20).



Slika 20. Reprezentativni spektar masa za kromatografski pik GP7 kore velikog mozga čovjeka. Masa 1808,801 je masa dominantne glikanske strukture u navedenom kromatografskom piku. I – intenzitet; m/z – omjer mase i naboja (z = 1).

Za svaku masu za koju je to bilo moguće, ovisno o intenzitetu za određenu masu na MS spektru i o broju masa koje su vidljive u MS spektru za pojedinačan kromatografski pik, napravljena je tandemska spektrometrija masa. Na taj je način snimljeno 5698 MS/MS spektara, a s obzirom da su se jednake glikanske strukture nalazile u istim kromatografskim pikovima, ali u različitim vrstama i regijama, za svaku je glikansku strukturu odabran MS/MS spektar kod kojeg je bilo najviše fragmenata koji su kasnije bili korisni pri određivanju strukture (slika 21).



Slika 21. Reprezentativni spektar masa nakon tandemske spektrometrije masa za masu 1808,801 kromatografskog pika GP7 kore velikog mozga čovjeka. I – intenzitet; m/z – omjer mase i naboja (z = 1).

Strukture su se asignirale na način kako je to opisano u Poglavlju 3.5.4., tj. osim informacije dobivene tandemskom spektrometrijom masa (tablica 10) korištene su informacije o glukoznim jedinicama kako je to opisano u Poglavlju 3.3.7.1., a GU jedinice su dane u Tablici 11 za svaki kromatografski pik.

Tablica 10. Strukturno informativni fragmenti i gubitci mase nakon tandemske spektrometrije masa opisane u Poglavlju 3.5.4. GlcNAc – *N*-acetil glukozamin, AB – aminobenzamid.

Strukturno informativni fragmenti / m/z	**Kompozicija**	**Interprentacija**
296,0741	laktonizirana sialinska kiselina	α2,3 sialinska kiselina
342,1159	etil-esterificirana sialinska kiselina	α2,6 sialinska kiselina
372,1265	fukozilirani antenarni GlcNAc	antenarna fukoza
458,1269	laktonizirana sialinska kiselina s jednom heksozom	α2,3-sialinizirana galaktoza
504,1688	etil-esterificirana sialinska kiselina s jednom heksozom	α2,6-sialinizirana galaktoza
510,1371	fukozilirani kraj s 2-AB	sržna fukoza
534,1793	dvije heksoze s jednim GlcNAc-om	fukozilirana antena
713,2164	dva GlcNAc-a s fukozom i 2-AB-om	sržna fukoza
661,2063	laktonizirana sialinska kiselina s heksozom i GlcNAc-om	α2,3-sialinizirana antena
707,2481	etil-esterificirana sialinska kiselina s heksozom i GlcNAc-om	α2,6-sialinizirana antena
807,2642	laktonizirana sialinska kiselina s hekozom, fukozom i GlcNAc-om	α2,3-sialinizirana i fukozilirana antena
932,2907	tri GlcNAc-a s jednom fukozom i 2-AB-om	struktura s račvajućim GlcNAc-om
Strukturno informativni gubitak mase / Da	**Kompozicija**	**Interprentacija**
-341,0899	GlcNAc s 2-AB-om	bez sržne fukoze
-435,1377	laktonizirana sialinska kiselina s jednom heksozom	α2,3-sialinizirana galaktoza
-481,1795	etil-esterificirana sialinska kiselina s jednom heksozom	α2,6-sialinizirana galaktoza
-487,1478	GlcNAc s 2-AB-om i fukozom	sržna fukoza
-638,217	laktonizirana sialinska kiselina s heksozom i GlcNAc-om	α2,3-sialinizirana antena
-684,2589	etil-esterificirana sialinska kiselina s heksozom i GlcNAc-om	α2,6-sialinizirana antena
-784,275	laktonizirana sialinska kiselina s heksozom, fukozom i GlcNAc-om	α2,3-sialinizirana i fukozilirana antena

Tablica 11. Glukozne jedinice za svaki kromatografski pik nakon HILIC–UPLC analize. Vremena zadržavanja pojedinih glikana pretvorena su u glukozne jedinice nakon što je sustav kalibriran prema vanjskom standardu hidroliziranih i fluorescentno obilježenih oligomera glukoze (2-AB obilježenim dekstranom) kao što je opisano u Poglavlju 3.3.7.1. GU–glikozne jedinice (eng. ***g****lucose* ***u****nits*).

Kromatografski pik	GU	Kromatografski pik	GU	Kromatografski pik	GU
GP1	4,43	**GP21**	8,34	**GP41**	11,13
GP2	4,79	**GP22**	8,39	**GP42**	11,23
GP3	5,10	**GP23**	8,52	**GP43**	11,44
GP4	5,37	**GP24**	8,62	**GP44**	11,53
GP5	5,70	**GP25**	8,66	**GP45**	11,65
GP6	6,03	**GP26**	8,75	**GP46**	11,73
GP7	6,22	**GP27**	8,84	**GP47**	12,09
GP8	6,44	**GP28**	8,91	**GP48**	12,31
GP9	6,66	**GP29**	9,04	**GP49**	12,42
GP10	6,85	**GP30**	9,10	**GP50**	12,53
GP11	6,99	**GP31**	9,28	**GP51**	12,67
GP12	7,11	**GP32**	9,40	**GP52**	12,75
GP13	7,23	**GP33**	9,57	**GP53**	12,97
GP14	7,44	**GP34**	9,65	**GP54**	13,17
GP15	7,54	**GP35**	9,75	**GP55**	13,36
GP16	7,67	**GP36**	9,91	**GP56**	13,51
GP17	7,87	**GP37**	10,12	**GP57**	13,67
GP18	8,00	**GP38**	10,31	**GP58**	13,97
GP19	8,11	**GP39**	10,69	/	/
GP20	8,25	**GP40**	10,95	/	/

Prvi korak prilikom određivanja struktura je bilo traženje svih mogućih kompozicija pomoću računalnog alata GlycoMod unoseći masu u Daltonima te indicirajući adukta, u ovom slučaju je to bio ion natrija, i modifikaciju, glikani su bili obilježeni 2-AB-om. Nakon dobivanja najizglednije šećerne kompozicije, korišten je računalni alat GlycoWorkbench u kojem bi se moguća šećerna kompozicija prikazala s modifikacijom i aduktom te izračunali svi mogući fragmenti za takvu strukturu ukoliko je za nju bio snimljen MS/MS spektar. Na MS/MS spektru za analiziranu strukturu bi se tražili fragmenti ili gubitci mase koji bi mogli uputiti na određenu glikansku strukturu, a kad bi se došlo do glikanske strukture onda bi se pretražila NIBRT GlycoBase baza podataka gdje bi se pomoću GU jedinica vidjelo je li moguće da takva struktura eluira u navedenom kromatografskom piku, tj. da se dokaže da ta struktura nije kontaminacija nekog od prethodnih ili sljedećih kromatografskih pikova, kao niti fragment od glikanskih struktura koje eluiraju u analiziranom kromatografskom piku. Na

navedeni način su od početne 3504 mase snimljene nakon MALDI-TOF-MS analize dobivene 702 glikanske strukture raspoređene prema kromatografskom piku, regiji i vrsti. Za svaku glikansku strukturu je izračunat njen udio za svaki kromatografski pik te su sve glikanske strukture koje su činile manje od 10 % udjela u kromatografskom piku za sve regije, vrste i stupnjeve razvoja uklonjene iz tablice te je tako dobivena konačna tablica s 296 glikanskih struktura (tablica 12) kojima se mogu pripisati rezultati nakon HILIC-UPLC analize (Poglavlje 4.4.). Od navedenih 296 glikanskih struktura, najveći broj prisutnih struktura, njih 154, sadržava sialinsku kiselinu od kojih samo 19 (6,5 % svih struktura) ima isključivo α2,6 dok je njih 56 (19,0 % svih struktura) ima isključivo α2,3 vezanu sialinsku kiselinu. Ostatak, njih 79 (26,9 % svih struktura) ima kombinaciju tih dviju veza sialinskih kiselina, ali u tim kombinacijama može se vidjeti puno veći broj sialinskih kiselina vezanih α2,3 vezom. Od neutralnih glikanskih struktura njih 106 (35,7 % svih glikanskih struktura) pripada skupini neutralnih kompleksnih struktura, dok ih je samo 35 (11,9 % svih glikanskih struktura) u skupini hibridnih i oligomanoznih struktura. Jedina struktura sa sulfatom koja je činila više od 10 % udjela u kromatogramu je FA3SulfatG1 kromatografskog pika GP10.

Tablica 12. Glikanske strukture prisutne u mozgu nakon analize metodama opisanim u Poglavlju 3. Prikazane su sve glikanske strukture koje su činile više od 10 % određenog kromatografskog pika prema analiziranoj vrsti i regiji mozga. Za sve strukture gdje je to bilo moguće dan je opis prema Oxford nomenklaturi[91], a za ostale je dan samo sastav. Na mjestu gdje nije detektirana određena glikanska struktura se nalazi prazna siva ćelija. DFC – kora velikog mozga (eng. ***d**orsal **f**rontal **c**ortex*), HIP – **hip**okampus, STR – **str**ijatum, CBC – mali mozak (eng. ***c**ere**b**ellum **c**ortex*); H-heksoza, N–*N*-acetilglukozamin, F-fukoza, E–esterificirana sialinska kiselina, L–laktonizirana sialinska kiselina.

Kromatografski pik	Masa / Da	Glikanska struktura	Udio glikanske strukture u MS spektru pojedinačnog kromatografskog pika / %																			
			Odrasli čovjek				Fetus				Čimpanza				Makaki majmun				Štakor			
			HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC
GP1	1199,5	FM3	99	98	95	45	92	91	94	97	96	98	99	98	97	84	99	98	86	89	90	
	1256,5	BM3				55										16			14	11	10	
GP2	1215,4	M4	100	61	78	83	44	70	45	70	88	100	100	90	100	76	89	89	20	36	44	55
	1402,5	FA1		39	22	17	56	30	55	30	12			10		24	11	11	80	64	56	45
GP3	1402,6	FA1	91	78	78	96	82	98	95	98	89	95	92	97	83	68	76	87	46	32	49	47
	1459,6	A2		22	22		18				11				17	32	24	13	54	68	51	53
GP4	1361,5	FM4	94	93	85	81	77	67	83	67	69	78	77	85	78	91	76	89	67	57	69	56
	1418,5	A1M4			15	19	23	33	17	33	31	22	23	15	22		24	11	33	43	31	44
GP5	1605,6	FA2	64	76	75	89	40	33	39	34	50	73	90	86	85	69	86	84	97	93	93	94
	1662,6	A2B	36	24	25	11	60	67	61	66	50	27		14	15	31	14	16				
GP6	1377,5	M5	100	99	99	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	98	99	100
GP7	1808,7	FA2B	99	98	94	99	98	99	100	100	100	100	53	100	94	93	88	92	99	97	95	92
	1824,7	A2[6]BG1											47				12					
GP8	1523,7	FM5	68	37	82		74	78	60	82		12		38		47		39	66	80	69	73
	1767,7	FA2[6]G1				14													13			
	1824,7	A2[3]BG1	29			11	15	17	26			35	43	19	78	30		24	15		16	
	1865,7	A4		52		57	12				100	53	57	37	15	23		31				15

Nastavak tablice 12.

Kromatografski pik	Masa / Da	Glikanska struktura	Udio glikanske strukture u MS spektru pojedinačnog kromatografskog pika / %																			
			Odrasli čovjek				Fetus				Čimpanza				Makaki majmun				Štakor			
			HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC
GP9	1580,6	A1M5																		11	12	
	1767,7	FA2[3]G1	96	91	88	90	95	97	99	96	97	97	97	95	94	94	97	94	88	85	81	89
GP10	1539,5	M6D3	12	30	42	58			18	14	54	22	24	72		31		67	68		96	62
	1971,0	FA2BG1								11					81							
	2011,9	FA4		66	47		31		23	16	25	70	67			55				95		
	2072,7	FA3SulfatG1	75			27	69		52	59	20			20	14			27	32			31
GP11	1539,6	M6D1			17		21			13		10			15	18		19	53	65	69	45
	1783,8	A2G2	30				11			15	31				12				13			
	1970,9	FA3G1	34	14	16	11	55		75	38	37	26	42	23	25	25	22	14	16			11
	2011,9	FA3B	29	78	61	78	13		12	33	25	55	53	65	48	49	59	58	17	20	18	42
GP12	1539,8	M6D2	86	91	82	98	98	94	93	98	94	93	87	95	92	94	92	93	97	95	94	98
	1971,1	FA3G1	13		10								12									
GP13	1710,7	H4N3F2		25	27	17	13	15		22	18	20								10	10	
	1726,7	FA1M5	14	20	29	21	23	15	18	16	20	17	11	23	29	35	36	26	75	70	68	44
	1783,7	A1BM5	19		12	33	29	29	37	32	22	18		34	37	33	14	57				31
	1970,8	FA3G1	64	47	33	29	35	41	39	31	40	45	79	37	29	23	43	17	16	13	15	23
GP14	1970,9	A3F1G1	100	100	99	100	100	98	99	100	100	99	100	100	96	96	96	94	100	94	96	98
GP15	1913,9	FA2F1G1	93	82	82	95	50	56	77	51	82	75	93	92	79	71	95	80	97	97	96	94
	1945,8	H6N4					17															
	1970,9	A3F1G1					33	31	14	34	12	14										
	2173,9	FA4G1														16						
GP16	1929,9	FA2M5	99	95	83	99	93	90	99	99	98	97	99	99	84	87	95	97	89	86	92	97
GP17	2116,8	FA1F1G1LacDiNAc	98	96	93	96	97	96	99	100	99	99	99	96	92	100	97	92	95	96	93	97

Nastavak tablice 12.

Kromatografski pik	Masa / Da	Glikanska struktura	Udio glikanske strukture u MS spektru pojedinačnog kromatografskog pika / %																			
			Odrasli čovjek				Fetus				Čimpanza				Makaki majmun				Štakor			
			HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC
GP18	1701,9	M7	95	90	80	92	96	96	95	99	89	94	91	95	85	84	77	95	91	91	89	99
	1873,0	FA1F1G1M4			19						10				14	14	21					
GP19	2000,4	FA1G1S[3]1M4					17	13														
	2075,7	FA1F1G1BM4	95	98	99	100	83	79	96	92	97	96	100	100	98	99	99	100			100	84
GP20	2087,0	FA2G1S[6]1			11			30	20													
	1888,7	A1F1G1M5						20	10	15	25			35	13			61	32	52	49	13
	2075,8	FA1F1G1BM4		11	24	17		10	15	23			28		18		20	11		12		
	2091,8	FA2G1M5	92		12	19		20	30	23	60		12		47		47	23	56	21	25	71
	2116,8	FA1F1G1LacDiNAc		47	28	32		10	10	15			35	12						12		
	2319,9	H4N6F2		29	19	17		10	15	15			21	33	10		15					
GP21	2447,0	H4N6F1L1	23	17								23			46	28						
	1888,8	A1F1G1M5	54	50	91	60	85	77	76	67	85	68	97	45		39	93	46	65	69	38	18
	2320,0	H4N6F2	23	27		21	15	11	19	30				54	38	25		53	35	30	56	80
GP22	2446,9	H4N6F1L1	24												12							
	2091,8	FA2G1M5																	14	20	26	
	2320,0	H4N6F2	74	95	89	89	85	100	90	100	84	82	94	95	76	83	91	94	86	80	69	93
GP23	2103,2	A2G2S[6]1	16		18		57	50	35	44												
	2447,3	H4N6F1L1																				12
	1863,5	M8D2,D3	25	71	53	28	13	20		29	31	36	39	73	34	25	47	66		58	86	57
	2278,9	FA2F1BG2	46	17	19	30	13	17	30	13	50	29	48	12	36	45	46	24		30		13
GP24	1863,7	M8D1,D3	100	100	100	99	100	100	100	100	100	100	100	100	99	100	100	100	100	100	100	100

Nastavak tablice 12.

Kromatografski pik	Masa / Da	Glikanska struktura	Udio glikanske strukture u MS spektru pojedinačnog kromatografskog pika / %																			
			Odrasli čovjek				Fetus				Čimpanza				Makaki majmun				Štakor			
			HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC
GP25	2145,9	H5N3F2L1			15									18								
	2162,3	FA1G1S[3]1M5						28	11													32
	2034,9	H6N3F2	35		59	41	82	36	59	63	84	25	76		37	38	68	33	35	15	57	23
	2075,8	A2F2G2	32			32		14		38				57					14		14	
	2222,1	FA2F2G2										38							15			10
	2237,8	FLacDiNacF1M6	14	66			11								28	17	28	21		44		
	2279,1	H5N5F2				17												11	35	25	23	12
	2482,1	A4F2G2														19						
GP26	2161,8	FA1G1S[3]1M5	26					49	57		26				10							
	2117,7	H4N5F2																16				
	2238,0	FLacDiNacF1M6	73	97	91	82	100	44	43	74	70	86	97	90	82	79	96	68	93	93	91	94
	2481,9	A4F2G2								15												
	2523,1	H4N7F2														21						
GP27	2118,9	H4N5F2													22	23	17	40				
	2249,0	A2F1G2S[6]1	84	52	77	38		100	60	29	66		85	26			21			15		
	2650,0	FLacDiNAc2S[6,6]2															13					
	2237,9	FLacDiNacF1M6								21		15			17		17					18
	2262,9	H4N5F3	14	31	11	29			23		22	33		28			17					16
	2424,9	FA2F2BG2										29					17		45	37	73	28
	2481,9	A4F2G2				33	100			50		18		29	13	26		29	55	14	27	38

Nastavak tablice 12.

Kromatografski pik	Masa / Da	Glikanska struktura	Udio glikanske strukture u MS spektru pojedinačnog kromatografskog pika / %																			
			Odrasli čovjek				Fetus				Čimpanza				Makaki majmun				Štakor			
			HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC
GP28	2349,3	FA2F1G2S[3]1						18		14							50					
	2452,4	FA3G2S[6]1	16	13	13		33	32	18	14												
	2221,8	FA2F2G2	11	33	34	33							17	18			13			26	34	
	2237,8	H6N4F2	21	12	16	21	33		15	21	35	20	19	42	30	22		40		23	29	38
	2482,0	A4F2G2	32	33	22	31	33	32	45	50	24	36	45	27	27	55	20	47		40	21	25
GP29	2348,9	FA2F1G2S[3]1					40	40	14	17					12	17						10
	2365,5	FA2G3S[3]1																12				
	2025,8	M9			24					17	39	11	46	14	26	24	18	22	57	27	66	51
	2222,0	FA2F2G2	93	91	71	94	60	53	81	67	55	79	53	84	46	41	77	34	32	61	29	26
GP30	2025,8	M9	91	89	92	77	69	62	71	88	86	90	86	93	60	70	81	70	93	70	80	87
	2424,9	FA3F2G2		11		19	30	35	29	12	13		14		28	29	19	29		29	19	12
GP31	2476,3	FA2G2S[3,3]2									12											
	2551,9	FA3F1G2S[3]1									27	10			15			18			12	16
	2754,9	FA4F1G2S[3]1													38						16	
	2025,7	M9			35			17	39	56	15	26	88	12	17	13	11	23			14	38
	2424,9	FA3F2G2	84	86	54			60	40	28	46	42		49	14	32	35	12		97	54	16
	2440,9	H6N5F2														12	11					
	2628,0	H5N6F3							12					24			11	17				14
	2643,9	FA4F1G3														18	21					

Nastavak tablice 12.

Kromatografski pik	Masa / Da	Glikanska struktura	Udio glikanske strukture u MS spektru pojedinačnog kromatografskog pika / %																			
			Odrasli čovjek				Fetus				Čimpanza				Makaki majmun				Štakor			
			HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC
GP32	2440,9	FA3F1G3															40					
	2552,4	FA3F1G2S[3]1		17		14		11	11	25	14	14									33	12
	2627,9	FA4F2G2		22	14	65				25	23	20	12	88	21	25		81		79	30	37
	2755,1	FA4F1G2S[3]1	32	56	72	20		79	83	50	64	63	79		77	50		11			33	41
	2498,2	H6N6F1	26														29					
	2644,3	FA4F1G3	26														31					
	2701,3	FA4G3B	16																			
GP33	2422,1	A2G2S[6,6]2	22					36	11		10											
	2754,9	FA4F1G2S[3]1	33	15	25				16		42	38	39		44	37	38	16		20	25	14
	2628,2	H5N6F3	44	77	65	92	91	54	70	95	45	47	54	92	36	57	59	78	87	77	70	82
GP34	2422,4	A2G2S[6,6]2	70	43	59		98	98	88	98	22	17		61								13
	2598	FA3F1G2S[6]1									24	21			38	22	53	43			42	
	2755,1	FA4F1G2S[3]1		18							15	27		18	26	27	16	26		32	18	47
	2628,0	H5N6F3	22	28	26						36	30	100	15	36	37	32	25	100	63	38	25
	2644,2	H6N6F2														14						
GP35	2494,9	H5N4F3L1				12														11		
	2598,9	FA3F1G2S[6]1						94	31	100												
	2714,3	FA3F1G3S[3]1				24						33		15	35	29		25				
	2755,4	FA4F1G2S[3]1														19						
	2882,4	H5N6F1L2													15	25						
	2187,9	M10 /M9Gluc1	99		92	16	100		63		100	67	93	59	31		100	51	100	73	96	72
	2831,1	H5N7F3				32								15				13				

Nastavak tablice 12.

Kromatografski pik	Masa / Da	Glikanska struktura	Udio glikanske strukture u MS spektru pojedinačnog kromatografskog pika / %																			
			Odrasli čovjek				Fetus				Čimpanza				Makaki majmun				Štakor			
			HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC
GP36	2494,9	H5N4F3L1									43									33	32	
	2614,3	A3F1G3S[6]1	33		14						19	21										
	2638,2	H6N4F1L2	33		23						24			16				36		27		
	2668,3	FA2F1G2S[3,6]2	33		35							38			87					40		
	2881,9	H5N6F1L2									14			11				15				
	2187,8	M10 /M9Gluc1		66			100	95	100	100			100	18		87	100				37	
	2831,3	H5N7F3												49				17				100
GP37	2568,1	A3F1G3S[3]1	16		20			24	18	53		19		36								26
	2587,1	FA3F2G3				10			12				19			14		13	39	62	50	
	2668,1	FA2F1G2S[3,6]2	23	22	21			36	35	13	29	21			29	13						
	2702,0	H6N7F1																	16			
	2790,2	H6N6F3										12	47		33	45	58	13	37	16	18	12
	2831,2	H5N7F3				55								28				23				
	2546,0	H7N4F3													10		42				13	13
	2669,4	H4N7F3	49	61	39			36	35	13	29	21				13						
GP38	2714,1	FA3F1G3S[3]1	26	18	21			20	22	100	24	24		22	18	63	38	18			32	
	2794,8	FA2G2S[3,3,6]3	13	14				75	56			12			12						13	
	3074,3	H5N6F2E1L1	17	25	35						30	18			29	12	13				26	
	2546,3	H7N4F3													24		31	14				
	2587,2	FA3F2G3	30	23	18	100			22		18	16	40	30				17		49	12	
	2733,3	FA3F3G3									12		13	22						34		
	2790,3	FA4F2G3										12	27	22	12		13	43		14		
GP39	2790,3	FA4F2G3	100	100		100		100		100	100	100		100	100	100	100	100	100	100	100	100

Nastavak tablice 12.

Kromatografski pik	Masa / Da	Glikanska struktura	Udio glikanske strukture u MS spektru pojedinačnog kromatografskog pika / %																			
			Odrasli čovjek				Fetus				Čimpanza				Makaki majmun				Štakor			
			HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC
GP40	2841,2	FA3G3S[3,3]2																			12	24
	2887,3	H6N5F1E1L1		18																		
	2933,3	H6N5F1E2				33																
	3044,4	H6N6F1L2																		12		38
	3090,4	H6N6F1E1L1				17																
	2790,2	FA4F2G3		31	27								25	12	25	15					16	
	2847,2	H6N7F2		18																		
	2993,1	H6N7F3		14	17								75	80	25	47		53		67	27	39
GP41	2906,2	H6N5F3E1														17				43	18	
	2933,3	H6N5F1E2	13	21	17	29								47	17	25						
	3044,4	H6N6F1L2														19		14		23		21
	3063,4	H6N6F3L1			20			100							31	25					17	25
	3090,5	H6N6F1E1L1	11																			
	2587,1	FA3F2G3											11						19			
	2733,2	FA3F3G3	43										22						81	33	36	18
	2790,2	H6N6F3											11									
	2847,2	H6N7F2											17									
	2936,3	FA4F3G3	24	39	29				100		65		33	47	17			62				36
GP42	2749,4	H5N4F1L3						14														
	3063,5	FA3F2BG3S[3]1		36	31	18			100	79	41	46		18	66	63	78	59			26	59
	2733,2	FA3F3G3	96	62	66	82		61		14	56	46	92	80	10	20	13	23		96	65	22
	2847,2	H6N7F2						14														

Nastavak tablice 12.

Kromatografski pik	Masa / Da	Glikanska struktura	Udio glikanske strukture u MS spektru pojedinačnog kromatografskog pika / %																			
			Odrasli čovjek				Fetus				Čimpanza				Makaki majmun				Štakor			
			HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC
GP43	2860,3	H6N5F3L1	32	60	62	27		55	69	88	70	66	94	68	33	37	81	21	70		89	
	2987,3	H5N4F2E2L1						24	15	13		13							11			
	3033,3	H6N5F2E1L1														13						
	3114,4	H6N5F1L3	12					11				12			19							
	3247,5	H5N6F1E2L1																25				
	2733,2	FA3F3G3	12			44					21											
GP44	2987,5	H6N5F2L2						49			12		15		13	11			30		41	19
	3063,3	H6N6F3L1																19				17
	3190,4	H6N6F2L2													12				10			13
	2847,3	H6N7F2																11				
	2936,4	H6N6F4	92	95	92	64		25	100	100	64	68	62	86	44	53		59	31	81	43	41
	2952,1	H7N6F3																10		19		
GP45	2979,3	A4F1G4S[6]1	40					14			20	13	25									
	2987,7	FA2F1G2S[3,6,6]3						18			27	21	20	13	27	14				17		27
	3063,2	H6N6F3L1		22				25			13	25	15	24	18	21		37	34	45	19	36
	3114,5	H6N5F1L3						25							12							
	3160,2	H6N5F1E1L2													14	17						
	2847,4	H6N7F2																			13	
	2936,3	FA4F3G3	60	56	79						40	31	30	56		10	100	19	66	10	44	11
	2952,2	H7N6F3														12						
	2993,3	H6N7F3																			16	

Nastavak tablice 12.

Kromatografski pik	Masa / Da	Glikanska struktura	Udio glikanske strukture u MS spektru pojedinačnog kromatografskog pika / %																			
			Odrasli čovjek				Fetus				Čimpanza				Makaki majmun				Štakor			
			HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC
GP46	2906,5	FA3F2G3S[6]1	32	34	26			20			21		33		17	16	25		62		56	
	3063,4	H6N6F3L1		24	35						29		33	13		13						15
	3082,5	H6N6F5																12				
	3114,7	FA3G3S[3,3,3]3						53			21		17			17	25					22
	3190,8	H6N6F2L2		18				12			17		17			22	38					42
	2512,0	H12N2	12																22			
	2936,4	H6N6F4													19						11	
	2952,4	H7N6F3														13			16		14	
	3119,5	H7N6F2S1															13					
	3139,6	FA4F3BG3	40		10	84					13			75	18			49			12	11
GP47	3033,4	FA3F1G3S[3,6]2						54	30													
	3079,3	H6N5F2E2														13						
	3155,4	H7N7F3										14										
	3236,1	H6N6F2E1L1						12	20													
	3266,7	FA4F2BG3S[3]1		56	45	51		25	50	100			100	33	60	46		63		39	52	24
	2936,4	H6N6F4	56	14	25						39	52								35		24
	3139,6	H6N7F4	44		11	44					61	34		64				12		11		52

Nastavak tablice 12.

Kromatografski pik	Masa / Da	Glikanska struktura	Udio glikanske strukture u MS spektru pojedinačnog kromatografskog pika / %																			
			Odrasli čovjek				Fetus				Čimpanza				Makaki majmun				Štakor			
			HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC
GP48	3179,5	FA3F2G3S[3,6]2	50	48	64			64					36		23	18					19	
	3206,4	A3F1G3S[3,6,6]3											18			21		27				
	3317,4	FA3BG3S[3,3,3]3	33	17		25									17							22
	3393,5	H6N7F2L2	17			38							18	62	28	16		31			12	45
	3394,6	H4N9F3E1		17																		
	3421,6	H5N10F1L1				13																
	3440,1	H3N9F1L3				13																
	3510,2	H4N8F3E2				13																
	2936,4	H6N6F4									100											
GP49	3133,5	FA3F2G3S[3,3]2			10									14	10							25
	3206,8	H7N6F1L2																15				
	3266,5	H6N7F3L1			10									14	12	13						
	3520,7	H6N7F1L3												71	22							75
	2936,4	H6N6F4																			48	
	2952,3	H7N6F3																			14	
	3139,4	H6N7F4		75	70								100		41	60		66			20	
GP50	3225,7	H7N6F3L1																				21
	3308,0	A3BG3S[3,3,3]3		14	18										41							27
	3336,6	H6N6F3L2		22	35										19							11
	3382,6	H6N6F3E1L1		18	22																	14
	2952,4	H7N6F3												14								
	3098,2	H7N6F4	91	24	20									54	13	78			100			22
	3139,6	H6N7F4												13								

Nastavak tablice 12.

Kromatografski pik	Masa / Da	Glikanska struktura	Udio glikanske strukture u MS spektru pojedinačnog kromatografskog pika / %																			
			Odrasli čovjek				Fetus				Čimpanza				Makaki majmun				Štakor			
			HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC
GP51	3225,5	H5N5F1L4		25		60							29		23	44					17	
	3266,5	H6N7F3L1						23													50	
	3393,6	H5N6F2E2L1				20															12	
	3429,1	H6N6F3E2				20																
	2613,2	A4F4G1	60					38			67		43	22	22				67	77		
	2952,4	H7N6F3												14				24				
	3009,8	H7N7F2						15										14				
	3098,4	H7N6F4	40	26	100						24		29	22	20	22		18	33			
	3301,5	H7N7F4		25										22	15	15		22				
GP52	2707,7	H8N4F3						11														
	2952,3	H7N6F3																		55		
	3098,4	H7N6F4									12								100	45		
	3206,3	H6N5F1E2L1		16	27			13														
	3225,6	H5N5F1L4				11					26	16									16	
	3352,5	FA3F1G3S[3,6,6]3		24	22	27		38			43	31		32	26	35		34			24	31
	3428,6	H7N7F3L1				16								11								
	3463,8	H6N6F2L3																				16
	3479,6	H7N6F1L3										20										
	3525,6	H7N6F1E1L2														16		15				

Nastavak tablice 12.

Kromatografski pik	Masa / Da	Glikanska struktura	Udio glikanske strukture u MS spektru pojedinačnog kromatografskog pika / %																			
			Odrasli čovjek				Fetus				Čimpanza				Makaki majmun				Štakor			
			HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC
GP53	3019,4	H7N4E2L1				90								49						19		
	3098,4	H7N6F4				10														55		
	3225,5	H5N5F1L4																			14	
	3260,5	H5N4F2E2L2									32				14							
	3265,7	H4N6F1L4																			22	
	3273,6	H4N5F4E1L2													14							14
	3417,2	FA4F3G4S[6]1		20							16					28						
	3479,6	FA4G4S[3,3,3]3		31						100	53			39	28	25		52				49
GP54	3098,4	A4F4G4				14														28		
	3225,5	H5N5F1L4																			13	
	3244,1	FA4F4G4	72	29	45	67					54	48	46	23	17	27			12	20		
	3266,5	H4N6F1L4																			19	
	3352,5	H6N5F2E2L1																			19	
	3370,9	FA3F1G2S[3,3,8,8]4	23	61	47			47	100	95	40	45	50	52	61	58		36	83	21		61
	3411,9	H7N4F3E1L2																		19		
	3497,7	H6N5F3E2L1						18														
	3526,7	H7N6F1E1L2						13										13				

Nastavak tablice 12.

Kromatografski pik	Masa / Da	Glikanska struktura	Udio glikanske strukture u MS spektru pojedinačnog kromatografskog pika / %																			
			Odrasli čovjek				Fetus				Čimpanza				Makaki majmun				Štakor			
			HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC
GP54b	3225,5	H5N5F1L4																			16	
	3266,5	H4N6F1L4																			27	
	3352,6	H6N5F2E2L1																			24	
	3448,0	H5N6F3L3	29			73								18								
	3498,7	H6N5F3E2L1	43	46	56			34		65	72	61		40	33	23		18				53
	3574,7	H5N6F2L4	29	17	20			25		24	10	18		22	44	27		23				
	3671,8	H6N5F2E3L1														14		15				
	3701,6	H6N6F3E2L1		17				21		12		11		11	24	14		18				24
GP55	3133,4	H5N4F3E2L1																			24	
	3225,5	H5N5F1L4																			60	
	3405,6	H7N5L4														19						
	3428,4	H5N6F1L4																			16	
	3625,6	H7N6F2L3	60	65	54			59		100	81	100		89	35	19		26				72
	3753,3	FA4G4S[3,3,3,3]4	20					14							15							10
	3798,3	FA4G4S[3,3,3,6]4						17			19				23	17		48				
	3828,7	H7N7F2L3	20					10														18

Nastavak tablice 12.

Kromatografski pik	Masa / Da	Glikanska struktura	Udio glikanske strukture u MS spektru pojedinačnog kromatografskog pika / %																			
			Odrasli čovjek				Fetus				Čimpanza				Makaki majmun				Štakor			
			HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC	HIP	DFC	STR	CBC
GP56	3359,6	H5N4F3E1L3						18							14	18		16				
	3516,9	H5N5F3L4									38											
	3671,7	H6N5F2E3L1		13				24										16				10
	3752,5	FA4G4S[3,3,3,3]4		15	13			32		100	38			67	16			13				44
	3817,7	H6N5F3E3L1		35	43						25				21	33						
	3844,6	H7N6F1E2L2																26				
GP57	3404,2	H7N5L4			36									28		26		15				16
	3428,4	H5N6F1L4																			100	
	3798,6	FA4G4S[3,3,3,6]4						69						16								29
	3817,7	H6N5F3E3L1		51							69				19	23		16				13
	3845,6	H8N4F3E1L3												13		15		58				18
	3944,9	FA4F1G4S[3,3,3,6]4		35	49			13			31			30	57	34						24
GP58	3532,0	H5N7E1L3												21	35	82						
	3798,8	FA4G4S[3,3,3,6]4																69				
	3844,7	H7N6F1E2L2												71				31				
	4071,9	H5N8F2E2L2		100				100							57	14			100	100		

U Tablici 12 se vidi da veliki broj kromatografskih pikova ima jednake glikanske strukture bez obzira na različite vrste, regije i stupnjeve razvoja. Tako se može vidjeti da u 38 kromatografskih pikova dominiraju neutralne glikanske strukture. Od neutralnih glikanskih struktura u 17 kromatografskih pikova dominantna struktura je oligomanozna ili hibridna; to su kromatografski pikovi GP1, GP2, GP4, GP6, GP8, GP12, GP16, GP18, GP19, GP20, GP21, GP23, GP24, GP26, GP30, GP35 i GP36. U kromatografskom piku GP8 oligomanozna struktura FM5 je glavna glikanska struktura u svim regijama osim u kori velikog mozga i malom mozgu odraslog čovjeka, hipokampusu makaki majmuna te u svim regijama mozga čimpanze; u svim navedenim regijama su glavne kompleksne strukture (uglavnom A4). Kod kromatografskog pika GP20 je prisutno nekoliko hibridnih struktura; FA2G1M5 je glavna struktura za većinu regija, osim kore velikog mozga i strijatuma štakora, malog mozga makaki majmuna i čimpanze gdje je glavna struktura A1F1G1M5, dok je kompleksna struktura FA1F1G1LacDiNAc glavna struktura u kori velikog mozga i malom mozgu čovjeka i strijatumu čimpanze. Glikanska struktura FA2G1S[6]1 je jedino glavna u kori velikog mozga fetusa te je to jedina regija gdje je kompleksa nabijena struktura dominantna za navedeni kromatografski pik.

U kromatografskom piku GP21 glavna glikanska struktura je hibridna A1F1G1M5 osim u malom mozgu čimpanze, makaki majmuna i štakora te strijatumu štakora gdje je glavna kompleksna struktura H4N6F2; nabijena kompleksna struktura H4N6F1L1 je jedino dominantna u hipokampusu makaki majmuna. Oligomanozna glikanska struktura M8 je glavna struktura kromatografskog pika GP32, osim u svim regijama mozga fetusa gdje je glavna nabijena kompleksna struktura A2G2S[6]1, a kod čimpanze i makaki majmuna je u svim regijama mozga osim u malom mozgu glavna kompleksna struktura FA2F1BG2. U kromatografskom piku GP35 glavna je struktura M9Gluc1 u svim regijama i vrstama, osim u kori velikog mozga i malom mozgu fetusa gdje je glavna kompleksa nabijena struktura FA3F1G2S[6]1. Glavna struktura kromatografskog pika GP36 je jednaka onoj u kromatografskom piku GP35 s tim da u hipokampusu i strijatumu čovjeka podjednako dominira nekoliko različitih kompleksnih nabijenih glikanskih struktura, kao i u hipokampusu i kori velikog mozga čimpanze, hipokampusu i malom mozgu makaki majmuna te kori velikog mozga štakora. Neutralna kompleksna struktura H5N7F3 je glavna jedino u malom mozgu štakora i čimpanze za navedeni kromatografski pik. Od ostalih kromatografskih pikova u kojima dominiraju neutralne strukture, u njih 19 su glavne bile kompleksne

neutralne glikanske strukture. Ti kromatografski pikovi su GP3, GP5, GP7, GP9, GP11, GP14, GP15, GP17, GP22, GP25, GP29, GP31, GP33, GP39, GP40, GP44, GP45, GP50 i GP51. U većini navedenih kromatografskih pikova je dominantna jedna neutralna kompleksna struktura, ali to nije slučaj sa svima.

Tako u kromatografskom piku GP11 glikanska struktura FA3B je glavna u svim vrstama osim u mozgu štakora gdje je to M6, a u fetalnom mozgu je to FA3G1. Kod kromatografskog pika GP25 glavna je struktura H6N3F2, osim u kori velikog mozga čovjeka i štakora gdje je to hibridna struktura FLacDiNAcF1M6, a u malom mozgu čimpanze je kompleksna struktura A2F2G2. Za sve vrste je dominantna glikanska struktura u kromatografskom piku GP29 FA2F2G2, osim za hipokampus, strijatum i mali mozak štakora kod kojih je glavna oligomanozna struktura M9. U kromatografskom piku GP31 glavna neutralna kompleksna struktura je FA3F2G2, osim u malom mozgu fetusa i štakora te strijatumu čimpanze gdje je to oligomanozna struktura M9. Kod kromatografskog pika GP44 jedino je u kori velikog mozga fetusa glavna kompleksna nabijena glikanska struktura H6N5F2L2, dok je kod svih ostalih to neutralna kompleksna struktura H6N6F4. Glavna glikanska struktura u kromatografskom piku GP45 je neutralna kompleksna struktura FA4F3G3, osim za hipokampus, koru velikog mozga i mali mozak štakora te mali mozak makaki majmuna gdje je glavna nabijena kompleksna struktura H6N6F3L1 koja je, također, glavna struktura zajedno s H6N5F1L3 u kori velikog mozga fetusa. U kromatografskom piku GP50 glavna neutralna kompleksna struktura je H7N6F4, osim u hipokampusu makaki majmuna gdje je to nabijena kompleksna glikanska struktura A3BG3S[3,3,3]3 i u strijatumu odraslog čovjeka u kojem je glavna nabijena kompleksna glikanska struktura H6N6F3L2.

Kromatografski pik GP51 uglavnom sačinjavaju neutralne kompleksne glikanske strukture kao što je A4F4G1 u hipokampusu odraslog čovjeka, kori velikog mozga fetusa, hipokampusu i strijatumu čimpanze te hipokampusu i kori velikog mozga štakora. U strijatumu odraslog čovjeka je glavna neutralna glikanska struktura H7N6F4, dok su kod ostalih prisutne nabijene kompleksne glikanske strukture kao što je H5N5F1L4 u malom mozgu odraslog čovjeka i strijatumu makaki majmuna; u strijatumu štakora je glavna druga nabijena kompleksna glikanska struktura H6N7F3L1. U kromatografskim pikovima GP10 i GP13 su podjednako zastupljene oligomanozne, hibridne i kompleksne neutralne glikanske strukture. Tako je u kromatografskom piku GP10 u hipokampusu i malom mozgu odraslog čovjeka, čimpanze i štakora, kao i u malom mozgu makaki majmuna glavna oligomanozna

M6 glikanska struktura, dok je u ostalim regijama neutralna kompleksna FA4, osim u hipokampusu makaki majmuna gdje je to FA2BG1. U kromatografskom piku GP13 odnosi su još kompleksniji; jedino u mozgu štakora za navedeni kromatografski pik dominira samo jedna glikanska struktura u svim regijama – hibridna FA1M5, a kod ostalih vrsta i regija su sve glikanske strukture pronađene u navedenom kromatografskom piku podjednako zastupljene, osim u hipokampusu i kori velikog mozga odraslog čovjeka i čimpanze, strijatumu čimpanze i kori velikog mozga fetusa u kojima je glavna neutralna kompleksna glikanska struktura FA3G1, a u malom mozgu čimpanze je to hibridna struktura A1BM5.

Nabijene kompleksne glikanske strukture su bile dominantne u 12 kromatografskih pikova: GP27, GP32, GP34, GP43, GP47, GP48, GP53, GP54b, GP55, GP56, GP57 i GP58. Za razliku od kromatografskih pikova s dominantnim neutralnim glikanskim strukturama gdje je u pojedinom kromatografskom piku dominirala samo jedna glikanska struktura u svim regijama i vrstama, kod kromatografskih pikova kod kojih dominiraju nabijene strukture takvih slučajeva nema, nego dominacija određene glikanske strukture ovisi o vrsti, regiji i razvoju. Tako se može vidjeti u kromatografskom piku GP27 da je nabijena kompleksna glikanska struktura A2F1G2S[6]1 glavna u svim regijama odraslog čovjeka, kori velikog mozga i strijatumu fetusa, kao i hipokampusu i strijatumu čimpanze, a u malom mozgu čimpanze je najviše zastupljena neutralna kompleksna glikanska struktura H4N5F2; u hipokampusu i malom mozgu fetusa i štakora dominira neutralna kompleksna glikanska struktura A4F2G2, a u ostalim regijama štakora neutralna kompleksna glikanska struktura FA2F2BG2. U ostalim regijama je više različitih neutralnih i nabijenih kompleksnih glikanskih struktura podjednako zastupljeno.

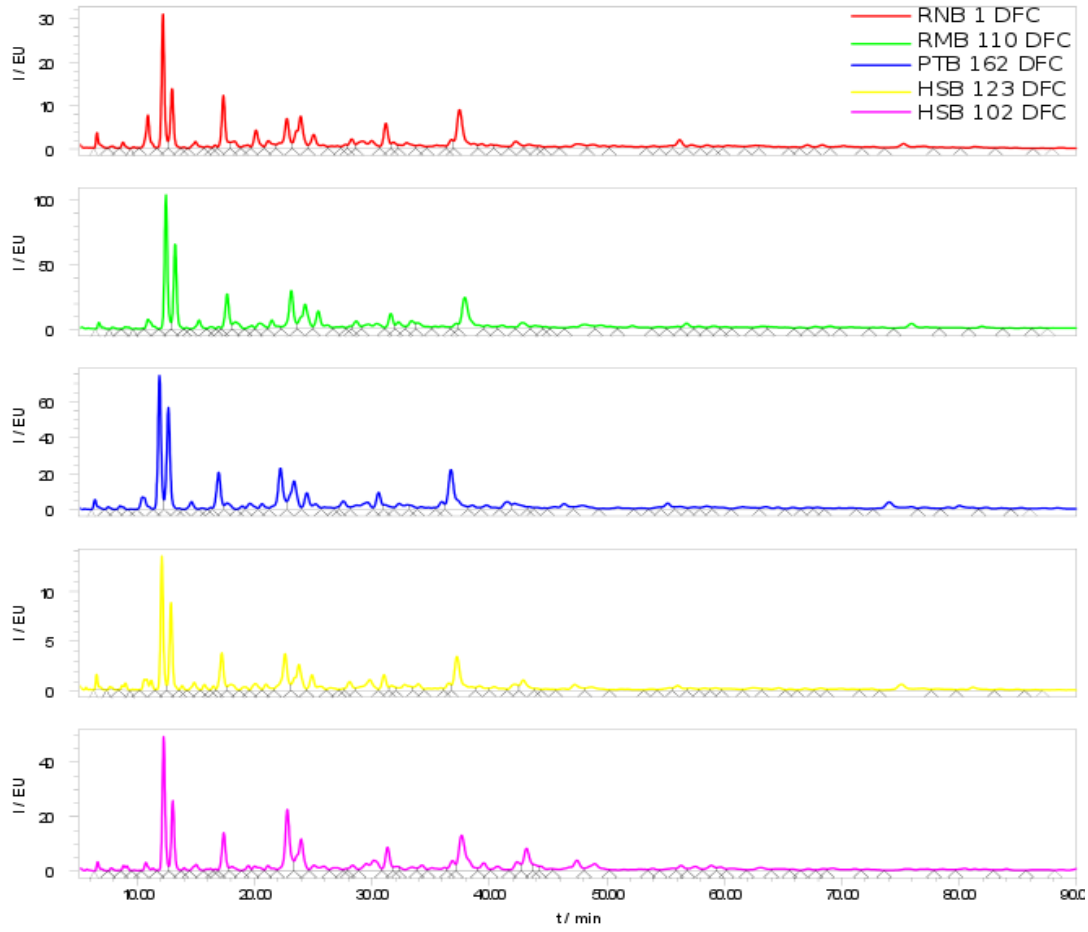
U kromatografskom piku GP32 glavna struktura u svim regijama i vrstama je nabijena kompleksna glikanska struktura FA4F1G2S[3]1 osim u malom mozgu odraslog čovjeka, čimpanze i makaki majmuna te kori velikog mozga štakora gdje je to neutralna kompleksna struktura FA4F2G2 te strijatumu makaki majmuna u kojem je dominantna neutralna glikanska struktura FA3F1G3. Nabijena kompleksna glikanska struktura A2G2S[6,6]2 je glavna struktura u kromatografskom piku GP34 u svim vrstama osim makaki majmuna gdje je glavna u hipokampusu, strijatumu i malom mozgu nabijena kompleksna glikanska struktura FA3F1G2S[6]1 koja je isto glavna struktura strijatuma štakora; u strijatumu čimpanze, hipokampusu i kori velikog mozga štakora glavna je neutralna kompleksna struktura H5N6F3. U kromatografskom piku GP43 glavna je nabijena kompleksna glikanska struktura

H6N5F3L1 u svim vrstama i regijama osim u malom mozgu odraslog čovjeka gdje je to neutralna kompleksna glikanska struktura FA3F3G3, a u malom mozgu makaki majmuna je podjednako zastupljena s nabijenom kompleksnom glikanskom strukturom H5N6F1E2L1. Za većinu regija i vrsta kromatografskog pika GP47 glavna je nabijena kompleksna struktura FA4F2BG3S[3]1; u kori velikog mozga fetusa glavna struktura je nabijena kompleksna glikanska struktura FA3F1G3S[3,6]2, a u hipokampusu odraslog čovjeka i kori velikog mozga čimpanze dominira neutralna kompleksna glikanska struktura H6N6F4, dok je u hipokampusu i malom mozgu čimpanze te malom mozgu štakora glavna neutralna kompleksna struktura H6N7F4.

U kromatografskom piku GP48 glavna glikanska struktura u svim regijama odraslog čovjeka osim malog mozga, kori velikog mozga fetusa i strijatumu čimpanze je nabijena kompleksna struktura FA3F3G3S[3,6]2, dok je u malom mozgu odraslog čovjeka, hipokampusu makaki majmuna i malom mozgu štakora glavna nabijena kompleksna struktura H6N7F2L2, a u hipokampusu čimpanze neutralna kompleksna struktura H6N6F4. Kromatografskim pikom GP53 dominira više različitih glikanskih struktura ovisno o vrsti i regiji, tako u malom mozgu odraslog čovjeka i čimpanze glavna struktura je nabijena kompleksna struktura H7N4E2L1; u kori velikog mozga štakora glavna struktura je neutralna kompleksna struktura H7N6F4, a u svim ostalim nabijena kompleksna struktura FA4G4S[3,3,3]3. U kromatografskom piku GP54b prisutne su isključivo nabijene kompleksne strukture od kojih je H6N5F3E2L1 glavna u većini regija, osim u malom mozgu odraslog čovjeka gdje je glavna H5N6F3L3, a u kori velikog mozga, strijatumu i malom mozgu makaki majmuna H5N6F2L4; u strijatumu štakora podjednako je prisutno više različitih glikanskih struktura. Nabijena kompleksna struktura H7N6F2L3 je glavna glikanska struktura u svim regijama i vrstama, osim u strijatumu štakora gdje je to nabijena kompleksna struktura H5N5F1L4 i u malom mozgu makaki majmuna gdje dominira nabijena kompleksna struktura FA4G4S[3,3,3,6]4. U kromatografskim pikovima GP56 i GP57 se nalaze isključivo nabijene kompleksne strukture, međutim niti jedna od njih nije glavna u većini vrsta i regija. Za razliku od njih, u kromatografskom piku GP58, iako su također prisutne samo nabijene kompleksne strukture, H5N8F2E1L3 je glavna u većini regija i vrsta osim u kori velikog mozga makaki majmuna gdje je to H5N7F2E1L3, a u malom mozgu makaki majmuna FA4G4S[3,3,3,6]4 te u malom mozgu čimpanze H7N6F1E2L2. U preostalih devet kromatografskih pikova, točnije u GP28, GP37, GP38, GP41, GP42, GP46, GP49, GP52 i

GP54, nema neke zajedničke glikanske strukture ili skupine glikanskih struktura za većinu regija i vrsta, kao što je to bio slučaj u prethodno navedenim kromatografskim pikovima, nego je više različitih skupina glikanskih struktura podjednako prisutno u pojedinoj regiji i vrsti za određeni kromatografski pik.

Ukoliko se pogleda kolika je bila zastupljenost (slika 22, dodatak 6) glikanskih struktura prema udjelu u kromatogramu nakon HILIC–UPLC analize, može se vidjeti da iako najmanji broj glikanskih struktura pripada u skupinu oligomanoznih i hibridnih one čine oko 45 % (od 43,6 % u mozgu odraslog čovjeka do 46,7 % u mozgu štakora) površine kromatograma nakon HILIC–UPLC analize, a glikanske strukture sa sialinskom koje čine većinu struktura pripada samo oko 10 % (od 8,7 % u mozgu štakora do 12,0 % u mozgu odraslog čovjeka) površine kromatograma nakon HILIC–UPLC analize. Ostatak površine čine kromatografski pikovi s neutralnim kompleksnim strukturama i kromatografski pikovi u kojima ne dominira samo jedna skupina glikanskih struktura, nego više njih.



Slika 22. Kromatogrami fluorescentno obilježenih glikana kore velikog mozga odraslog čovjeka, fetusa, čimpanze, makaki majmuna i štakora. U kromatogramu je integrirano ukupno 58 kromatografskih pikova (označeni rombom). Imenovanje uzoraka: HS – čovjek, ***H**omo **s**apiens*, PT – čimpanza, ***P**an **t**roglodytes*, RM – makaki majmun, ***R**hesus **m**acaque*, RN- štakor, ***R**attus **n**orvegicus*, B – mozak (eng. ***b**rain*); DFC – kora velikog mozga (eng. ***d**orsal **f**rontal **c**ortex*).

§ 5. RASPRAVA

Proteini su najčešće postranslacijski modificirani glikozilacijom[1], a raznovrsnost N-glikana koji se mogu nalaziti na određenom proteinu je poprilično velika te se može značajno razlikovati između različitih vrsta stanica i tkiva, kao i utjecati na njihov razvoj i funkciju pri čemu živčani sustav nije iznimka[27]. Međutim, istraživanja N-glikozilacije živčanog sustava su uglavnom svedena na proučavanje N-glikozilacije mozga glodavaca i na pojedinačne proteine[69], te i dalje nedostaje cjelokupan N-glikom mozga. Problem nepoznavanja N-glikoma postaje puno izraženiji kad se govori o nehumanim primatima kao i tijekom čovječjeg prenatalnog razvoja gdje nedostaje skoro pa cijela slika o strukturama N-glikana. Najveći uzrok tome leži u činjenici da za razliku od proteinskih sekvenci koje su primarno produkti gena, glikanske lančane strukture nisu direktno kodirane genomom te su sekundarni produkti gena, tj. nastaju kao posljedica kompeticijskih i sekvencijalno djelujućih glikozidaza i glikoziltransferaza. Tako da unatoč poznavanju razina ekspresije svih relevantnih genskih produkata, i dalje nisu u potpunosti razjašnjene strukture i biosintetski putovi kako bismo mogli precizno predvidjeti glikanske strukture u određenom tipu stanica, a k tome male promijene u okolišu mogu uzrokovati dramatične promjene u glikanima određene stanice. Naravno, to čini istraživanje glikana puno zahtjevnijim i težim od npr. nukleinskih kiselina i proteina. Također, trenutno korištene metode za analizu N-glikana tkiva omogućuju analizu relativno malog broja uzoraka istovremeno, a neponovljivost, tj. nereproducibilnost takvih analitičkih metoda predstavlja veliki problem jer onemogućava opažanje manjih razlika unutar ili između različitih vrsta tkiva.

5.1. Analiza N-glikana mozga je moguća reproducibilnom HILIC-UPLC metodom

Nekoliko metoda je razvijeno u posljednje vrijeme za visokoprotočne analize glikana s time da svaka od njih ima svoje prednosti i nedostatke. Tako kromatografske metode s fluorescencijskim ili MS detektorom su pogodnije za analize u kojima je potrebno napraviti kvantifikaciju, ali zbog toga su ograničene na analizu manjeg broja uzoraka uz veću cijenu analize po uzorku[58]. Reproducibilnost HILIC-UPLC analize je već prije testirana[97] te je

pokazano da uzrok nereproducibilnosti metode leži u koracima prije same analize na UPLC stroju, tj. najveći udio varijacije je dolazio od koraka pročišćavanja N-glikana na GHP filteru. Metoda na kojoj je provedeno testiranje koraka koji su izvor varijacije se koristi za analizu uzoraka plazme, seruma i pročišćenog IgG-a koji za razliku od analize tkiva zahtijevaju puno manje prethodnih koraka priprave uzoraka. Zbog svega navedenog, u ovom radu je upravo HILIC-UPLC metoda korištena kao glavna metoda za kvantifikaciju udjela određenih glikanskih struktura u N-glikomu različitih regija mozga, vrsta i stupnjeva razvoja čovjeka, što je u konačnici omogućilo usporedbu različitih N-glikoma mozga i opažanje razlika koje ne bi bilo moguće detektirati da metoda nije bila dovoljno reproducibilna.

Razvijanje HILIC-UPLC metode za analizu N-glikana koja bi bila reproducibilna i omogućila analizu relativno većeg broja uzoraka je jedan od ciljeva ovog rada jer do sada metode koje bi omogućile takvu analizu nisu postojale. Tako metoda za analizu N-glikana tkiva nuklearnom magnetskom rezonancom (NMR) traje devet dana za pripravu samo jednog uzorka za analizu[67], što u ovom slučaju nije bilo prihvatljivo jer je broj uzoraka sa standardima bio veći od 100 pa bi sama analiza trajala predugo uz upitnu reproducibilnost s obzirom da se objavljeno istraživanje temelji na malom broju uzoraka. Međutim, navedena NMR metoda je omogućila paralelnu usporedbu N- i O-glikana kao i glikosfingolipida, glikozaminoglikana i glikozilfosfatidilinozitolnih sidara što HILIC-UPLC metoda razvijena u ovom radu ne omogućuje. Yoshimura i suradnici[17] su razvili metodu za analizu glikana tkiva mozga HPLC-om koja omogućuje analizu uzoraka unutar jednog dana što je svakako prednost u odnosu na metodu korištenu u ovom radu. Nedostatak navedene metode je u tome što je deglikozilacija provedena kemijski, tj. hidrazinolizom. Kemijska deglikozilacija ima brojne nedostatke: 1) uvjeti pod kojima se provodi kemijska reakcija dovode do deacetilacije N-acetil aminošećera što za posljedicu ima gubitak informacije o acetilaciji ili glikozilaciji sialinskih kiselina i dodatni korak acetilacije, 2) provođene kemijske reakcije pod tim uvjetima može dovesti do gubitka GlcNAc-a s reducirajućim krajem, 3) kemijska deglikozilacija se mora provoditi u strogo bezvodnim uvjetima što nije uvijek jednostavno postići. Zbog svega gore navedenog, kemijska deglikozilacija je pristup koji se sve više napušta i prelazi se na enzimsku deglikozilaciju, najčešće PNGazom F. Također, u metodi opisanoj od strane Yoshimura i suradnika[17] koristi se pročišćavanje N-glikana celulozom što dovodi do velikog gubitka glikana, kao i onečišćenja uzorka fragmentima celuloze[97]. Metoda za analizu N-glikana mozga opisana od strane Chena i suradnika[68], također, koristi kemijsku

deglikozilaciju zbog čega nije bila pogodna zbog prethodno navedenih razloga, a metoda korištena za analizu N-glikana kolonorektalnog karcinoma opisana od strane Baloga i suradnika[88] je metoda koja se koristila kao osnova za metodu korištenu u ovom radu. Nekoliko je razlika između navedene metode i metode razvijene za potrebe ovog rada: 1) homogenizacija u navedenoj metodi je provedena soniciranjem, dok je u opisanoj metodi (Poglavlje 3.3.) provedena pomoću keramičkih kuglica, 2) tijekom kloroform/metanol ekstrakcije proteina uklonjeni su koraci soniciranja (Poglavlje 4.2.1.) što je dovelo do značajnog skraćivanja metode, 3) obilježavanje glikana u navedenom radu je provedeno 2-aminobenzojevom kiselinom (2-AA), dok u metodi opisanoj u Poglavlju 3.3. 2-aminobenzamidom (2-AB); svaki od ova dva načina obilježavanja ima određene prednosti, pa tako je za 2-AB obilježene glikane dostupno više baza podataka s vremenima zadržavanja te lakše otkrivanje sastava glikanske strukture, dok 2-AA obilježeni glikani nose jedan negativan naboj pa je moguća analiza istih glikana osim kromatografijom još i gel elektroforezom što, također, daje dodatnu informaciju o strukturi[99], 4) pročišćavanje obilježenih N-glikana u metodi iz rada je napravljeno pomoću grafitne SPE, a u metodi iz Poglavlja 3.3. preko GHP filtera za što je u prethodnim testiranjima pokazana velika reproducibilnost kod analize većeg broja uzoraka[97]. Za navedenu metodu nigdje nije navedena njezina reproducibilnost jer je u radu analizirano samo 13 uzoraka i isto toliko kontrola, što je mali broj uzoraka koje je moguće paralelno analizirati navedenom metodom i na taj način smanjuje izvore koji mogu utjecati na varijaciju među uzorcima.

S obzirom da je u ovom radu analiziran značajno veći broj uzoraka i analiza je trajala nekoliko tjedana tijekom kojih nije moguće imati jednake uvjete u laboratoriju, kemikalije i materijale, trebalo je testirati reproducibilnost metode. Rezultati testiranja su pokazali da je metoda ponovljiva (tablica 8, slika 13) unutar nekoliko tjedana, u okviru kojih dolazi do promijene analitičara i materijala koji se mijenjaju tijekom izvođenja eksperimenta, kao što su npr. tubice, GHP pločice i 30 kDa filteri. Također, jedan od mogućih pristupa analizi ovog tipa uzoraka je bila MALDI analiza oslobođenih N-glikana nakon direktnog nanošenja PNGaze F na tkivo mozga[100] što omogućuje relativno brzu i jednostavnu analizu većeg broja uzoraka te precizniju analizu određene regije mozga. Međutim, analiza N-glikana MALDI-jem nije dobra u kvantificiranju N-glikanskih struktura kao što je to analiza UPLC-om[58] te priprema tkiva mozga zahtjeva određenu vještinu i dobro poznavanje anatomije mozga jer uslijed nejednakog sekcioniranja mogu nastati velike razlike zbog različite stanične strukture

različitih regija (Poglavlje 2.4.1.) što je dosta zahtjevno, ako imamo tkivo različitih vrsta i stupnjeva razvoja.

5.2. Rezultati nakon MALDI-TOF-MS analize otkrivaju veliku raznolikost N-glikanskih struktura mozga

S obzirom na specifičnost uloge koju glikani igraju u središnjem živčanom sustavu (Poglavlje 2.2.2.), ne iznenađuje veliki spektar glikanskih struktura koje su prisutne u njemu (Poglavlje 4.5., tablica 12). Miš i štakor su do sad bile jedine dvije vrste kojima je istražen N-glikom mozga[68,69], a kod ljudi je uglavnom N-glikozilacija mozga karakterizirana kroz pojedinačne proteine[101,102]. U tim istraživanjima je primijećeno da većina glikanskih struktura u mozgu ima jedan za mozak specifični obrazac N-glikozilacije[69,101,102], tj. N-glikanske strukture imaju veliki udio sržne α1-6 vezane fukoze, antenarne fukoze, račvajućeg GlcNAc-a, a sialinska kiselina je vezana α2-3 vezom za β1-4 vezanu galaktozu puno češće nego α2-6 vezom koja je karakteristična za serumsku vrstu N-glikozilacije. Kao što je moguće vidjeti u Tablici 12 većina pronađenih struktura ima upravo navedene karakteristike. Točnije, samo 14 (manje od 5 % svih N-glikanskih struktura) N-glikanskih struktura pronađenih u tkivu mozga nema vezanu fukozu, ako se isključe hibridne i oligomanozne strukture; to je velika razlika u odnosu na N-glikom plazme, uz N-glikom IgG-a najproučavaniji N-glikom, gdje se antenarana fukoza dominantno nalazi u samo četiri kromatografska pika od njih 46, a sržna fukoza je prisutna uglavnom na glikanima koji potječu s IgG-a[103].

Razlika između N-glikoma plazme i N-glikoma mozga postaje još naglašenija ukoliko usporedimo oligomanozne i hibridne strukture; u samo jednom kromatografskom piku plazme je glavna oligomanozna struktura (glikanska struktura M6), a hibridne strukture ne prevladavaju u niti jednom kromatografskom piku. U N-glikomu mozga oko 30 % udjela kromatografskih pikova nakon HILIC-UPLC analize pripada oligomanoznim strukturama (M4 – M9), a oko 15 % hibridnim N-glikanskim strukturama (Poglavlje 4.5.). Ukoliko se navedeni udjeli usporede s dosadašnjim istraživanjima, može se primijetiti da je u ovom istraživanju udio oligomanoznih struktura veći. Tako je HPLC analizom bilo pokazano da oligomanozne strukture čini oko 15 % N-glikoma mozga glodavaca[68] te je to jedina studija, koliko je poznato, da je korištena neka kromatografska metoda za određivanje N-glikanskih struktura u N-glikomu mozga. Razlog za ovu razliku u različitim udjelima oligomanoznih

struktura može biti u razlici između metoda; uslijed nekoliko uzastopnih skupljanja frakcija nakon normalno fazne i obrnuto fazne kromatografije HPLC-om postoji vjerojatnost gubitaka dijela glikana, što je zajedno s lošim odvajanjem glikanskih struktura HPLC-om u konačnici dovelo do podcjenjivanja udjela oligomanoznih struktura u kromatogramu. Za razliku od te metode, metodom korištenom u ovom radu je moguće da je udio oligomanoznih struktura precijenjen; naime, korištenom metodom nije postignuto potpuno odvajanje glikanskih struktura što može dovesti da se udio određene strukture pripisuje drugoj. Također, ovim istraživanjem je pokazana prisutnost određenih oligomanoznih struktura koje do sad nisu bile pronađene u mozgu kao što su oligomanozne strukture s račvajučim GlcNAc-om, BM3, i sržnom fukozom, FM3 i FM4.

Veliki udio oligomanoznih struktura u mozgu, u usporedbi s ostalim tkivima, nije novost. Naime, za razliku od ostalih tkiva gdje se oligomanozne strukture ne nalaze na površini stanica zbog procesiranja tijekom sazrijevanja glikana (Poglavlje 2.2.1.), oligomanozni glikani su uključeni u molekulsko prepoznavanje te su prisutni na receptorima u sinapsama gdje se mogu pronaći i lektini koji ih prepoznaju, a igraju važnu ulogu u plastičnosti mozga[38]. Također, hibridne strukture koje nisu ili su slabo zastupljene u ostalim tkivima u mozgu čine značajan dio struktura (Poglavlje 4.5.). Svakako je zanimljivo da su pronađene hibridne strukture koje imaju za N-glikane mozga karakteristične elemente: sržnu fukozu (npr. FA1M5), antenarnu fukozu (npr. FA1F1G1M4), račvajući GlcNAc (npr. FA1F1G1BM4) i α2-3 vezanu sialinsku kiselinu (npr. FA1G1S[3]1M4). Najveći broj takvih hibridnih struktura N-glikana je bio poznat do sada, međutim u ovom radu ih je otkriveno nekoliko novih, a razlog za to najvjerojatnije leži u činjenici da je u ovom istraživanju obuhvaćeno više različitih regija mozga i vrsta. Tako za glikanske strukture FA2M5, FA2G1M5 i FLacDiNAcF1M6 nije pronađeno da je dosadašnjim istraživanjem pokazana njihova prisutnost u tkivu mozga. Kod kompleksnih struktura sa sialinskom kiselinom dominira α2-3 vezana sialinsku kiselina (Poglavlje 4.5.), što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima, najčešće tvoreći sialil–Lewis^x epitop (NeuAcα2-3Galβ1-4(Fuc α1-3)GlcNAc). Važnost α2-3 vezanih sialinskih kiselina u mozgu je pokazana za nekoliko različitih procesa. Tako su važne za stvaranje i održavanje mijelina preko MAG lektina (MAG, eng. *myelin-associated glycoprotein*) koji isključivo vežu α2-3 vezanu sialinsku kiselinu[104,105]. Osim navedene uloge, isti lektin ima ulogu u ranom rastu neurita tijekom razvoja[106], a sprječava njihov rast u odrasloj dobi[107]. Također, α2-3 vezane sialinske kiseline su važne za brojne

druge funkcije, kao što su interakcije neurona i glija stanica (Poglavlje 2.4.1.), neurogeneza i vođenje aksona[38]. Polisialinska kiselina (Poglavlje 2.2.2.) se sastoji od više sialinskih kiselina međusobno povezanih α2-8 glikozidnom vezom i za nju je poznato da je bitna za regeneraciju[108] i razvoj mozga[109] kao i za njegovu plastičnost[110]. Jedina struktura sa PSA pronađena u ovom radu je FA3F1G2S[3,3,8,8]4 u kromatografskom piku GP54 (Poglavlje 4.5.). Zbog nedostatka MS/MS spektara za veliki broj glikanskih struktura nije moguće reći koliko točno glikanskih struktura ima PSA. Osim glikanskih struktura koje se nalaze u Tablici 12, pronađene su i strukture koje su činile manje od 10 % svih glikanskih struktura određenog kromatografskog pika (Poglavlje 4.5.). Tako se može vidjeti da se u navedenoj tablici nalazi samo jedna struktura koje sadrže sulfat, glikanska struktura FA3SulfatG1 kromatografskog pika GP10, iako je poznato da se više takvih struktura nalazi u tkivu mozga[69]. Naime, navedeni kromatografski pik je jedini u kojem je struktura sa sulfatom činila više od 10 % svih glikanskih struktura koje su se nalazile u tome kromatografskom piku, dok u ostalim kromatografskim pikovima u kojima su se nalazile takve strukture one nisu prelazile navedeni prag pa su uklonjene iz Tablice 12, iako su pronađene MALDI-MS analizom (Poglavlje 3.5.3).

Za razliku od glikanskih struktura sa sulfatom koje su pronađene, ali su činile zanemariv dio ukupnog N-glikoma, strukture koje imaju glukuronsku kiselinu nisu pronađene ovom metodom, iako se zna da su prisutne u tkivu mozga[38]. Razlog najvjerojatnije leži u činjenici da su glikanske strukture s glukuronskom kiselinom relativno slabo zastupljene. Do sad je poznato da se glukuronska kiselina nalazi u sastavu HNK1 (eng. *human natural killer cell glycan*) koji je uključen u mijelinizaciju[111], razvoj mozga[112], periferni rast motornih neurona[113] i plastičnost mozga[16,114]. Iako glukuronska kiselina nije pronađena tijekom ovog eksperimeta, prilikom proučavanja MS spektra prije HILIC-UPLC analize pronađena je masa koja odgovara strukturi HNK-1 (podaci nisu pokazani). Najvjerojatnije je gubitak glikana u svakom koraku prije same MS analize bio dovoljan da se količina HNK-1 smanji ispod razine detekcije. Također, u mozgu je pronađena sialil–Lewis^C struktura (Galβ1-3-(NeuAcα2-6)GlcNAc) koja može biti još dodatno sialinizirana na galaktozi α2-3 vezanom sialinskom kiselinom i za nju je pokazano da njen udio u N-glikomu mozga štakora raste tijekom razoja[72]. Međutim, koliki udio α2-6 vezanih sialinskih kiselina u Tablici 12 pripada sialil–Lewis^C strukturi, a koliki je vezan za galaktozu tipa-2 LacNAc strukture (Poglavlje 2.2.1.4.)

ovom metodom to nije moguće znati jer se sialinska kiselina u oba navedena slučaja ponaša jednako tijekom esterifikacije (Poglavlje 3.5.1.).

5.3. N-glikozilacija mozga se mijenja tijekom razvoja čovjeka

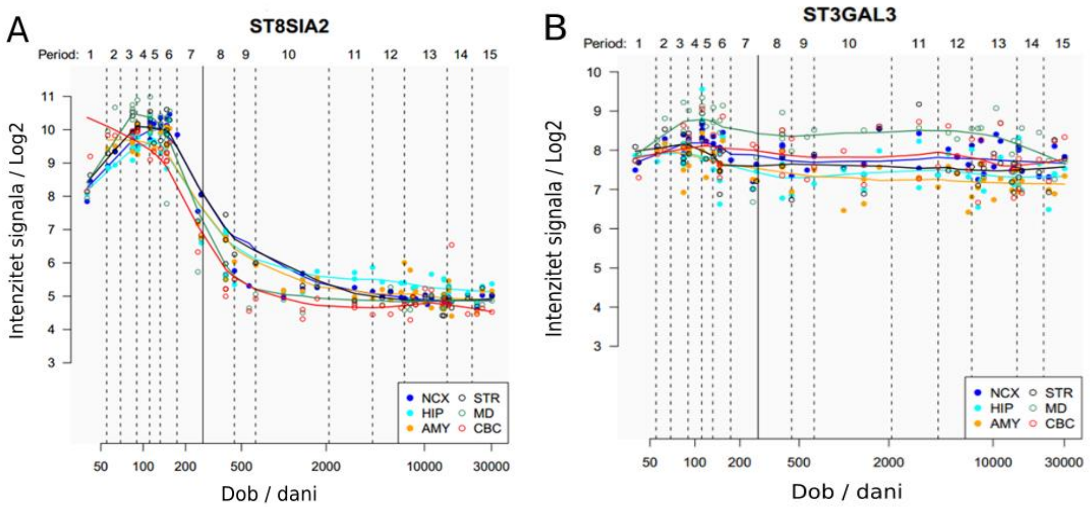
Kao što je vidljivo na Slici 18 (Poglavlju 4.4.1.) postoji jasna razlika između N-glikozilacije mozga odraslog čovjeka i mozga fetusa. Ukoliko se pogledaju kromatografski pikovi koji se statistički značajno razlikuju između navedena dva stupnja razvoja (dodatak 4), može se primijetiti da glikanske strukture (tablica 12) koje se nalaze u tim kromatografskim pikovima obuhvaćaju sve tri vrste N-glikana. Kromatografski pik koji se najviše razlikuje između ta dva stupnja razvoja je GP5; glikanske strukture FA2 i A2B koje su prisutne u tom kromatografskom piku su više zastupljene u mozgu odraslog čovjeka, nego što su u mozgu fetusa. Također, osim što je površina kromatografskog pika različita, može se vidjeti da u mozgu fetusa prevladava A2B glikanska struktura dok je u mozgu odraslog čovjeka glavna struktura u tom kromatografskom piku FA2. Slično je i s kromatografskim pikovima GP38, GP37, GP36, GP35, GP54, GP29 i GP42 (kromatografski pikovi su poredani po statističkoj značajnosti, a ne po vremenu izlaženja) gdje postoji razlika u glikanskoj strukturi koja se nalazi ili prevladava u određenom kromatografskom piku, ovisno o stupnju razvoja.

Tako u kromatografskim pikovima GP29, GP35, GP36, GP37 i GP38, koji zauzimaju značajno veći udio površine kromatograma kod fetusa nego kod odraslog čovjeka, može se uočiti da u svim navedenim kromatografskim pikovima postoji porast glikanskih struktura sa sialinskim kiselinama; u kromatografskom piku GP29 u mozgu fetusa glikanska struktura FA2F1G2S[3]1 je značajno zastupljena dok u mozgu odraslog čovjeka uopće nije pronađena, a slično se može vidjeti u kromatografskom piku GP35 gdje je FA3F1G2S[6]1 glavna glikanska struktura toga kromatografskog pika u mozgu fetusa, dok se M9Gluc1 nalazi kao glavna struktura u mozgu odraslog čovjeka. U kromatografskom piku GP37 se može primijetiti slična pojava gdje u mozgu fetusa dominiraju nabijene kompleksne strukture A3F1G3S[3]1 i FA2F1G2S[3,6]2, a u mozgu odraslog čovjeka neutralna struktura H4N7F3. Također, strukture sa sialinskom kiselinom FA3F1G3S[3]1 i FA2G2S[3,3,6]3 su dominantne u mozgu fetusa, a neutralna glikanska struktura FA3F2G3 je to u mozgu odraslog čovjeka za kromatografski pik GP38. Zanimljivo je da se kod kromatografskih pikova koji imaju značajno veći udio površine kromatograma u mozgu odraslog čovjeka u odnosu na mozak

fetusa, kromatografskim pikovima GP42 i GP54, može opaziti isto što i u prethodno navedenim kromatografskim pikovima, tj. u kromatografskom piku GP42 glikanska struktura FA3F2BG3S[3]1 je više zastupljena od strukture FA3F3G3 u mozgu fetusa u odnosu na mozak odraslog čovjeka, dok je u kromatografskom piku GP54 glikanska struktura FA3F1G2S[3,3,8,8]4 dominantnija od glikanske strukture FA4F4G4. Iako kromatografski pikovi GP23 i GP45 nemaju statistički značajnu razliku u udjelima površine između odraslog čovjeka i fetusa, ovisno o stupnju razvoja u njima su prisutne različite glikanske strukture; u kromatografskom piku GP23 je u mozgu fetusa dominantna struktura A2G2S[6]1, a u mozgu odraslog čovjeka oligomanozna struktura M8. U kromatografskom piku GP45 prevladava nekoliko sialiniziranih struktura u mozgu fetusa, od kojih je najvažnije istaknuti A4F1G4S[6]1 i FA2F1G2S[3,6,6]3, a u mozgu odraslog čovjeka je to jedna neutralna glikanska struktura FA4F3G3. Osim za navedene kromatografske pikove gdje je se vidi drugačiji sastav između različitih stupnjeva razvoja, svi ostali statistički značajni kromatografski pikovi koji sadržavaju strukture sa sialinskom kiselinom imaju veći udio površine kromatograma u mozgu fetusa, osim kromatografskih pikova GP32 i GP56 (iako su promjene puno manje u usporedbi s ostalim statistički značajnim promjenama). Stoga ne čudi da je obrnuti slučaj s kromatografskim pikovima u kojima dominiraju neutralne kompleksne strukture, tj. svim takvim statistički značajnim kromatografskim pikovima udio površine je veći u mozgu odraslog čovjeka u odnosu na mozak fetusa, osim za kromatografske pikove GP3 i GP16.

Ovo sve prethodno navedeno pokazuje da sialinska kiselina igra izrazito važnu ulogu tijekom razvoja. Polisialinska kiselina (PSA, Poglavlje 2.2.2.), koja je prethodno navedena kao jedna od struktura koja je značajno više zastupljena u mozgu fetusa, zbog velike količine negativnog naboja i posljedično vezanja velike količine vode zauzima veliki volumen prostora u kojem se nalazi. To sve sprječava vezanje stanica koje eksprimiraju PSA s drugim stanicama te na taj način PSA djeluje kao antiadheziv za homofilno i heterofilno vezanje[115]. Na navedeni način PSA utječe i omogućava broje stanične aktivnost tijekom razvoja, kao što su kretanje stanica, produživanje aksona[116], rast neurita[117], regeneriranja i formiranja sinapsi[118]. Osim PSA, vidljiv je značajan porast α2-3 i α2-6 vezanih sialinskih kiselina. Važnost α2-3 vezanih sialinskih kiselina za razvoj je opisana u Poglavlju 5.2. Međutim, kao što se vidi iz prethodno navedenih promjena u glikanskom sastavu mozga tijekom razvoja, u fetalnom mozgu se također nalazi povećana ekspresija α2-6 vezanih sialinskih kiselina. Dok

za α2-3 vezane sialinske kiseline postoje neka saznanja vezana za ulogu u razvoju i funkciji mozga, s α2-6 vezanim sialinskim kiselinama je slučaj puno kompleksniji. Dosadašnja istraživanja pokazuju da ST6Gal I koja katalizira vezanje sialinske kiseline α2-6 vezom na tip II N-acetillaktozamina (Poglavlje 2.2.1.4.) nije eksprimirana u tkivu mozga te nije pronađena takva struktura u samom neuralnom tkivu, nego u isključivo u krvnim žilama, dok je ST6Gal II eksprimirana najviše u tkivu mozga te katalizira vezanje sialinske kiseline α2-6 vezom na LacDiNAc[119]. Nadalje, uloga glikanskih struktura s α2-6 vezanom sialinskom kiselinom u mozgu je u potpunosti nepoznata. Naime, primijećeno je da se ekspresija sialil–Lewis^C strukture povećava tijekom razvoja mozga[72] te da je povećana ekspresija ST6Gal povezna s malignitetom tumora mozga[120]. Uzorcima čovjeka, analiziranim u ovom radu, prethodno je analiziran transkriptom[98]. U transkriptomu se može primijetiti da je ekspresija ST8Sia II i ST8Sia IV uključenih u sintezu PSA te ST6Gal I i ST6Gal II znatno veća tijekom prenatalnog razvoja, nego u odrasloj dobi (slika 23) što se u potpunosti poklapa s prethodno navedenim opažanjima u promjenama glikanskih struktura tijekom razvoja. Međutim, iako se vidi, kao što je prethodno opisano, značajan porast glikanskih struktura s vezanom α2-3 sialinskom kiselinom to nije moguće vidjeti u transkriptomu jer ekspresija gena uključenih u njihovu sintezu ostaje nepromijenjena kroz čovjekov razvoj (slika 23).



Slika 23. Primjeri ekspresija gena tijekom razvoja i kroz različite regije za glikoziltransferaze kod kojih dolazi do promjene (A) ili se ne mijenja ekspresija (B) tijekom razvoja. Puna crta označava dob rođenja. NCX – kora velikog mozga, STR – strijatum, HIP – hipokampus, MD – međumozak, AMY – amigdala, CBC – mali mozak (Preuzeto i prilagođeno iz Kang i suradnici[98])

Nadalje, osim kromatografskih pikova koje sadržavaju strukture sa sialinskom kiselinom, može se vidjeti da svi kromatografski pikovi koji sadržavaju oligomanozne strukture

statistički značajno imaju veći udio površina kromatograma u mozgu fetusa, nego u mozgu odraslog čovjeka, osim glikanskih struktura M3 i M5 s tim da ukupni udio oligomanoznih struktura je veći u mozgu odraslog čovjeka zbog velikog udjela navedenih struktura u kromatogramu. Veći udio površina zadnjih dviju glikanskih struktura u mozgu odraslog čovjeka u odnosu na fetalni mozak može se pripisati jednostavnoj kompeticiji manozidaza i glikoziltransferaza (Poglavlje 2.2.). Važnost oligomanoznih glikana u razvoju mozga je opisana u Poglavlju 5.2. S obzirom da kod sisavaca tri gena kodiraju za α-manozidazu I (geni MAN1A1, MAN1A2 i MAN1C1) i dva za α-manozidazu II (geni MAN2A1 i MAN2A2), a mogu biti paralelno eksprimirani[121], predviđanje glikanskih struktura na osnovu transkriptoma je znatno otežano. Od navedenih, jedina dva koja pokazuju neku razliku tijekom razvoja su MAN1C1 i MAN2A2 kojima je manja ekspresija u fetalnom mozgu, nego u mozgu odraslog čovjeka što bi donekle moglo objasniti porast oligomanoznih struktura u ranom stadiju razvoja mozga.

Jedina pronađena struktura sa sulfatom, glikanska struktura FA3SulfatG1 kromatografskog pika GP10, također pokazuje promijene tijekom razvoja. Navedena struktura je više zastupljena tijekom fetalnog razvoja mozga nego što je u mozgu odraslog čovjeka u navedenom kromatografskom piku (tablica 12), iako se taj kromatografski pik nije pokazao statistički značajnim (dodatak 4). O potencijalnoj ulozi navedene strukture za vrijeme razvoja trenutačno nije moguće ništa reći jer se općenito o ulozi glikana sa sulfatom u mozgu malo zna, tj. jedina glikanska struktura sa sulfatom za koju se zna neka uloga u mozgu je već ranije spomenuti HNK-1[122] (Poglavlje 5.2.). Ukoliko se pogleda ekspresija sulfotransferaza koje imaju mogućnost prijenosa sulfata na N-glikane, može se vidjeti da jedino CHST3 pokazuje promijene tijekom razvoja, tj. ima povećanu ekspresiju u fetalnom mozgu u odnosu na mozak odraslog čovjeka, dok sa ostalim sulfotransferazama (CHST8 i CHST9) to nije slučaj[98].

5.4. N-glikozilaciji mozga je različita između različitih vrsta

Velike promjene u N-glikozilaciji mozga između primata i glodavaca se mogu vidjeti na Slici 16 gdje je jasno vidljivo da postoji značajna razlika između njih. U skupini primata postoji preklapanje između N-glikanskih profila čovjeka i čimpanze, a značajno različit N-glikanski profil je između makaki majmuna i prethodno navedenih primata. Međutim, ukoliko se pogledaju razlike između pojedinačnih kromatografskih pikova, može se uočiti da one postoje između svih analiziranih vrsta pa tako i čovjeka i čimpanze (tablica 9, dodatak 4). Može se

primijetiti da su najznačajniji kromatografski pikovi koji se razlikuju između primata i štakora jednaki, iako nisu nužno jednako poredani po značajnosti. Dvanaest takvih pikova je zajedničko svim primatima: GP2, GP7, GP12, GP15, GP16, GP17, GP19, GP24, GP27, GP46 i GP48. Također, navedeni kromatografski pikovi pokazuju jednak „smjer“ u smislu smanjenja, odnosno povećanja udjela u kromatogramu. Naime, ukoliko se pogledaju glikanske strukture koje se nalaze u navedenim pikovima ne može se naći nikakva poveznica između navedenih struktura jer pripadaju svim vrstama N-glikana, a s obzirom da su istraživanja na tom području bazirana na razlikama između razreda ili podrazreda, odnosno samo određenih karakteristika glikana (Poglavlje 2.2.3.), nije moguće napraviti usporedbu s prethodnim istraživanjima. Stoga postoji mogućnost da značajne promjene u proteomu između mozga štakora i primata[13] dovode do opažene promjene u N-glikomu. Naravno, što se evolucijski više udaljavamo od štakora, to broj značajnih kromatografskih pikova raste. Tako se mozak čovjeka i štakora značajno razlikuju u 42, mozak čimpanze i štakora u 40, a mozak makaki majmuna i štakora u 34 kromatografska pika. Ukoliko se pogleda glikanski sastav najznačajnijih kromatografskih pikova (tablica 12) može se vidjeti da se jednake glikanske strukture nalaze unutar istog kromatografskog pika, osim u kromatografskim pikovima GP2, GP3, GP11 i GP13 kod kojih se može vidjeti da je samo kod štakora dominantna druga glikanska struktura. Tako u kromatografskom piku GP2 mozga primata glavna je oligomanozna M4 glikanska struktura, a u mozgu štakora FA1. U kromatografskom piku GP3 je FA1 dominanta struktura u mozgu primata, a glikanska struktura A2 u mozgu štakora. Kompleksna struktura FA3B je glavna struktura u mozgu primata u kromatografskom piku GP11, dok u mozgu štakora je u istom kromatografskom piku dominanta oligomanozna struktura M6. U kromatografskom piku GP13 u mozgu štakora je glavna hibridna struktura FA1M5, dok u mozgu primata je to glikanska struktura FA3G1. Od navedenih kromatografskih pikova jedino se kromatografskom piku GP2 značajno smanjuje udio površine u kromatogramu kad se usporedi s udjelima koje zauzima u mozgu čovjeka i čimpanze što može biti zbog smanjenja udjela glikanske strukture FA1 ili općenitog smanjenja oligomanoznih struktura.

Naime, ukoliko se samo gledaju udjeli kromatografskih pikova, može se vidjeti da se udio oligomanoznih i hibridnih glikanskih struktura smanjuje, evolucijski gledano, od štakora do čovjeka (Poglavlje 4.5.), dok drastično raste udio sialiniziranih struktura; po jedan posto između svake vrste od štakora do čimpanze dok je između čimpanze i čovjeka taj porast dva

posto. S obzirom da se N-glikom mozga čovjeka i čimpanze puno više razlikuje od makaki majmuna nego međusobno (slika 16), zanimljivo je primijetiti da se istih osam kromatografskih pikova u mozgu čovjeka i čimpanze značajno najviše razlikuje od makaki majmuna. To su kromatografski pikovi GP2, GP16, GP19, GP25, GP30, GP34, GP38 i GP39, s tim da su GP2, GP16 i GP38 tri kromatografska pika koja se najznačajnije razlikuju. Ukoliko se pogledaju strukture navedenih kromatografskih pikova može se primijetiti da jedine dvije glikanske strukture, ako se uzmu u obzir samo navedeni pikovi, kojima se udio površine povećava s evolucijom od makaki majmuna do čovjeka su M4 iz kromatografskog pika GP2 i A2G2S[6,6]2 iz kromatografskog pika GP34. Kod ostalih glikanskih struktura iz kromatografskih pikova kojima se udio površine s evolucijom od makaki majmuna do čovjeka smanjuje, može se vidjeti da su većina hibridne strukture; FA2M5 iz kromatografskog pika GP16, FA1F1G1BM4 iz kromatografskog pika GP19 i FLacDiNAcF1M6 iz kromatografskog pika GP25 s tim da ta struktura postaje dominantnija u navedenom kromatografskom piku u mozgu čovjeka u odnosu na mozak makaki majmuna. Oligomanozna struktura M9 iz kromatografskog pika GP30 je, također, jedna od glikanskih struktura kojima se udio površine smanjuje, a njezino smanjenje može se djelomično objasniti prethodno navedeno povećanjem udjela površine kromatografskog pika GP2, tj. glikanske strukture M4. Od ostalih kromatografskih pikova može se vidjeti da je prisutno smanjenje sialiniziranih struktura FA3F1G3S[3]1 i FA2G2S[3,3,6]3 kromatografskog pika GP38 i neutralne kompleksne strukture FA4F2G3 kromatografskog pika GP39.

Nadalje, između N-glikoma mozga čimpanze i čovjeka je statistički značajno samo devet kromatografskih pikova te od njih samo se kromatografskim pikovima GP38, GP39 i GP52 smanjuje udio površine u kromatogramu mozga čovjeka u odnosu na mozak čimpanze, dok je s kromatografskim pikovima GP22, GP41, GP46, GP47, GP49 i GP50 suprotan slučaj. Također, svi navedeni kromatografski pikovi, osim GP46, GP50 i GP52, koji se značajno razlikuju između N-glikoma mozga čovjeka i makaki majmuna pokazuju promjenu u istom smjeru kakva je u odnosu N-glikoma mozga čovjeka i čimpanze. Strukture kojima se udio površine kromatograma značajno smanjio u N-glikomu mozga čovjeka u odnosu na N-glikom mozga čimpanze su sialinizirane, kao što je u prethodno navedenom kromatografskom piku GP38 i u kromatografskom piku GP52 gdje je glavna sialinizirana struktura FA3F1G3S[3,6,6]3, te je vidljivo smanjenje udjela prethodno navedene neutralne kompleksne strukture kromatografskog pika GP39. Zanimljivo je da niti jedna glikanska struktura koja se

pokazala značajno različitom između N-glikoma mozga čovjeka i čimpanze ne pripada oligomanoznim i hibridnom strukturama nego isključivo kompleksnim sa i bez sialinske kiseline. Nažalost, kao što je već ranije spomenuto, s obzirom na dosadašnja istraživanja nije moguće znati koji bi bio evolucijski značaj navedenih struktura.

5.5. Različite regije mozga imaju različitu N-glikozilaciju

S obzirom da je transkriptom određen samo za humane uzorke korištene u ovom radu[98], različitost u N-glikomu između različitih regija je promatrana prvenstveno između različitih regija odraslog čovjeka kako bi se mogle uočene razlike usporediti s transkriptomom. Ukoliko se usporede N-glikanski profili svih analiziranih regija može se vidjeti da N-glikanski profil malog mozga pokazuje najveće odstupanje od svih ostalih regija neovisno o vrsti, a iza njega je to N-glikanski profil strijatuma dok se N-glikanski profili kore velikog mozga i hipokampusa ne razlikuju toliko značajno (slika 16). Najvjerojatniji uzrok tome je što je mali mozak evolucijski najstariji, a kora velikog mozga evolucijski najmlađi dio mozga dok se ostale regije nalaze negdje između[123]. Također, razlika bi mogla potjecati i od različitog staničnog sastava regija (Poglavlje 2.4.). Najveće promjene u razlici udjela površina kromatograma između malog mozga i ostalih regija se mogu vidjeti u četiri kromatografska pika GP12, GP16, GP17 i GP22. Od navedenih kromatografskih pikova može se vidjeti smanjenje udjela površine kromatograma u odnosu na ostale regije mozga u glikanskim strukturama FA1F1G1LacDiNac kromatografskog pika GP17 i H4N6F2 kromatografskog pika GP22. Ukoliko se pogleda transkriptom, može se vidjeti da u malom mozgu postoji pojačana ekspresija gena FUT1 i FUT2 čiji su produkti zaduženi za dodavanje antenarne fukoze koja je prisutna na obje strukture čiji je udio površine manji u odnosu na ostale regije mozga (slika 24). Nadalje, smanjena ekspresija gena MAN2A1 koji kodira za α-manozidazu II (Poglavlje 2.2.) može objasniti povećani udio hibridne strukture FA2M5 iz kromatografskog pika GP16, ali s obzirom da u kromatografskom piku GP17 se nalazi isto hibridna struktura, čiji je udio površine u kromatogramu manji u malom mozgu kad se usporedi s ostalim regijama, dolazimo do zaključka da je na osnovu samog transkriptoma nemoguće predvidjeti glikanske strukture koje će se nalaziti u određenoj stanici.

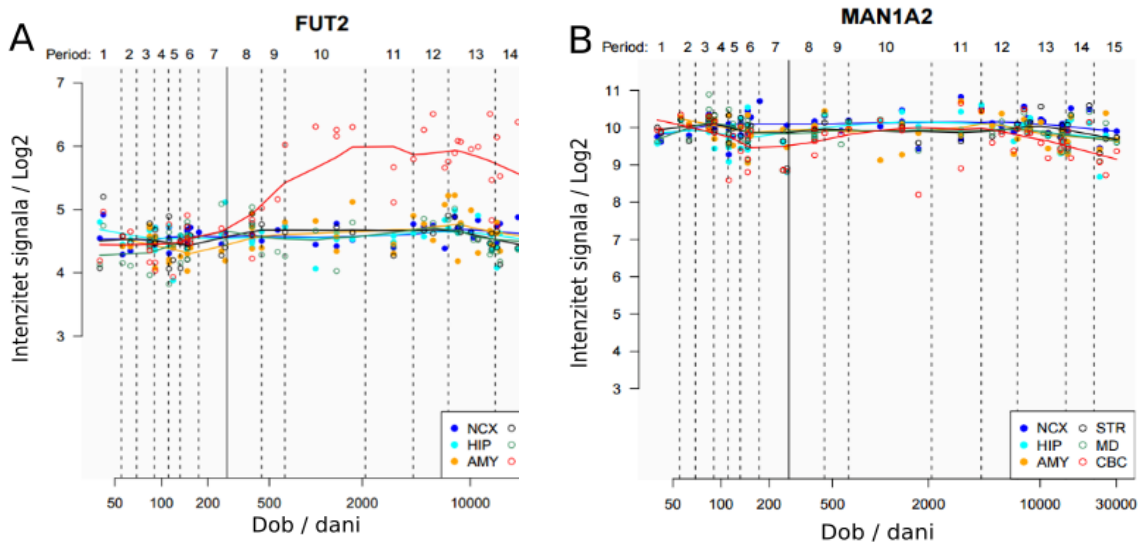
Slično se može vidjeti i kod drugog kromatografskog pika čiji je udio površine veći u odnosu na isti kromatografski pik drugih regija, tj. kromatografski pik GP12 u kojem se nalazi

oligomanozna struktura M6. Ukoliko se pogleda transkriptom, može se vidjeti da je u malom mozgu pojačana ekspresija gena MAN1C1 koji kodira za α-manozidazu I (Poglavlje 2.2.) te se na taj način smanjuje udio oligomanoznih struktura; to vrijedi za sve značajne kromatografske pikove koji sadrže oligomanozne strukture osim kromatografskog pika GP30 u kojem se nalazi glikanska struktura M9. Međutim to ne vrijedi za sve gene koji kodiraju za α-manozidazu I, npr. MAN1A2 (slika 24). Također, zanimljivo je primijetiti da se kromatografski pikovi koji su pokazali najveću razliku u usporedbi malog mozga i ostalih regija odraslog čovjeka, jednako ponašaju i kod ostalih analiziranih vrsta (dodatak 3). Ukoliko se usporedi N-glikanski profil kore velikog mozga s hipokampusom može se vidjeti da veći udio površine kromatograma u N-glikomu hipokampusa u odnosu na koru velikog mozga pripada hibridnim i kompleksnim strukturama, dok je sa sialiniziranim obrnut slučaj. Najznačajnija tri kromatografska pika čiji je udio površine veći u kori velikog mozga i koji pokazuju općenito najveću razliku u odnosu na N-glikom hipokampusa su kromatografski pik GP14 u kojem je glavna struktura A3F1G1, kromatografski pik GP22 u kojem je glavna glikanska struktura H4N6F2 sa značajnim udjelom H4N6F1L1 u hipokampusu te kromatografski pik GP32 u kojem je glavna glikanska struktura FA4F1G2S[3]1. Iako je udio struktura sa sialinskom kiselinom bio veći u kori velikog mozga ne može se zanemariti važnost tih struktura za učenje i pamćenje u hipokampusu[124], a veći udio kompleksnih struktura u hipokampusu smanjuje međusobno spajanje stanica i omogućuju njihovu migraciju[125] što je izuzetno bitno za održavanje plastičnosti hipokampusa. Također je zanimljivo primijetiti da je udio oligomanozne strukture M9Gluc1 kromatografskog pika GP35 značajno manji u kori velikog mozga nego što je to u hipokampusu, a isto vrijedi za strijatum. Nažalost, niti jedno od dosadašnjih istraživanja nije proučavalo važnost oligomanoznih glikana za koru velikog mozga te su dosadašnja istraživanja bila usmjerena na proučavanje glikozilacije svega nekoliko receptora navedene regije[126]. Uz navedeni kromatografski pik, među statistički značajnim kromatografskim pikovima koji imaju manji udio površine u kori velikog mozga u odnosu na strijatum može se vidjeti smanjenje kromatografskog pika GP21 u kojem se nalazi hibridna glikanska struktura A1F1G1M5. Hibridne glikanske strukture zajedno s oligomanoznim su bitne za međusobnu staničnu interakciju i migraciju[125] čime najvjerojatnije, uz sialinizirane glikane, utječu na plastičnost kore velikog mozga[127].

Statistički značajni kromatografski pikovi koji imaju manji udio u N-glikomu strijatuma nego u kori velikog mozga sadrže kraće oligomanozne strukture kao što se vidi za ranije navedeni kromatografski pik GP12 i kompleksne strukture s više sialinskih kiselina kao što su one prisutne u kromatografskim pikovim GP36, GP57 i GP58. Zanimljivo je da je razlika između N-glikoma strijatuma i hipokampusa najizraženija u kromatografskom piku GP12 koji ima manji udio u N-glikomu strijatuma i koji se, kao što je prethodno navedeno, pokazao značajnim i između svih ostalih regija. Potencijalni razlog tome bi mogao biti određeni protein s navedenom strukturom koji je prisutan u svim regijama mozga, ali ima značajno različitu zastupljenost. Ostale glikanske strukture koje imaju značajno različite udjele u N-glikomima strijatuma i hipokampusa uglavnom pripadaju neutralnim kompleksnim glikanima kao što je to slučaj za GP14, GP25 i GP45 i sialiniziranim kompleksnim strukturama kao što su one prisutne u kromatografskim pikovima GP32 i GP48.

Uvidom u transkriptom, može se vidjeti da nema tako značajnih promjena u ekspresiji glikoziltransferaza i glikozidaza između navedenih regija kao što je to bilo prilikom usporedbe transkriptoma malog mozga i ostalih regija. Tako je samo povećana ekspresija gena B4GALT2 u kori velikog mozga, jedina promjena u odnosu na ostale regije. Prethodna istraživanja su pokazala da miš kojem nedostaje navedena glikoziltransferaza ima značajno smanjenje kore velikog mozga, poremećenu sinaptogenezu te probleme s učenjem i motornom koordiancijom[128]. Nažalost, metodom korištenom u ovom radu nije moguće znati vezu galaktoze s *N*-acetilglukozaminom te vidjeti postoji li razlika u regijama s obzirom na vezu galaktoze. Isti je problem s N-glikomom hipokampusa gdje je jedino značajno smanjena ekspresija FUT7, koji dodaje antenarnu fukozu tvoreći isključivo siali-Lewis^x strukturu, u usporedbi s ostalim regijama. U strijatumu je povećana ekspresija ST8SIA3 u odnosu na ostale regije te se u N-glikomu mozga može vidjeti da je udio strukture koja nastaje tim enzimom FA3F1G2S[3,3,8,8]4 kromatografskog pika GP54 upravo povećana u navedenoj regiji mozga (dodatak 3). Nadalje, u transkriptomu se može vidjeti da je povećana ekspresija sulfotransferaze CHST9 u hipokampusu u odnosu na ostale regije, a glikanska struktura FA3SulfatG1 kromatografskog pika GP10, koja je jedina glikanska struktura sa sulfatom zastupljena više od 10 % u pojedinom kromatografskom piku (Poglavlje 4.5.), je također najviše zastupljena u hipokampusu u odnosu na ostale regije u navedenom kromatografskom piku što može biti posljedica navedenog gena. Uloga glikana sa sulfatom je poprilično nepoznata te je stoga teško reći koji bi bio njihov značaj za funkciju hipokampusa[122].

Za ostale glikanske strukture koje su pokazale značajnu razliku u zastupljenosti između različitih regija ne postoji promjena u transkriptomu koja bi indicirala da bi dana struktura bila više zastupljena u jednoj u odnosu na druge regije.



Slika 24. Primjeri ekspresija gena tijekom razvoja i kroz različite regije za glikoziltransferaze kod kojih dolazi do promjene (A) ili se ne mijenja ekspresija (B) između različitih regija. Puna crta označava dob rođenja. NCX – kora velikog mozga, STR – strijatum, HIP – hipokampus, MD – međumozak, AMY – amigdala, CBC – mali mozak (Preuzeto i prilagođeno iz Kang i suradnici[98])

5.6. Smjernice za buduća istraživanja

Provedeno istraživanje u sklopu ove doktorske disertacije je prvo istraživanje u kojem je paralelno analiziran N-glikom više različitih regija mozga, vrsta i različitih stupnjeva razvoja. Naime, dosadašnja istraživanja su uglavnom obuhvaćala analizu N-glikoma mozga miša ili štakora, a N-glikom mozga primata je promatran isključivo kroz glikozilaciju određenih proteina. Također, promjene u N-glikomu mozga su proučavane uglavnom kod glodavaca. Stoga ovo istraživanje je prvo koje je omogućilo usporedbu navedenih N-glikoma i time je otvorilo niz pitanja te stvorilo potrebu za daljnja istraživanja. S obzirom da N-glikom nije moguće u potpunosti predvidjeti iz transkriptoma (Poglavlja 5.3. – 5.5.), ostaje otvoreno pitanje kako je N-glikozilacija unutar stanice regulirana. Nadalje, uočene su brojne razlike između N-glikoma mozga različitih vrsta, regija mozga i za vrijeme razvoja čovjeka, ali za većinu struktura čiji se udio u N-glikomu mozga mijenja nije poznato koja bi mogla biti njihova uloga. Također, podrijetlo navedenih struktura ostaje nepoznato; ovim istraživanjem nije moguće reći dolaze li te razlike zbog različitog staničnog sastava mozga, proteinskog sastava, promjena u glikozilaciji unutar pojedinačne stanice ili, što je najvjerojatnije, da su

uočene promjene kombinacija navedenih opcija. Osim što se ovim istraživanjem otvaraju brojna pitanja, ovo istraživanje daje mogućnost novog pristupa u istraživanju evolucije i razvoja mozga. Naime, ukoliko se zna kojim se glikanskim strukturama mijenja udio tijekom evolucije ili razvoja, moguće je različitim tehnikama, kao što je npr. afinitetna kromatografija s lektinima[129], izdvojiti sve proteine koji nose navedene strukture te tako otkriti kod kojih proteina dolazi do promjene u količini, aminokiselinskom slijedu i promjena u postranslacijskim modifikacijama.

Također, za potrebe ovog istraživanja je razvijena HILIC-UPLC metoda za analizu N-glikana tkiva mozga koja se pokazala reproducibilnom za analizu većeg broja uzoraka kroz duži vremenski period i uz očekivane promijene tijekom rada u laboratoriju. Stoga je navedenu metodu moguće koristiti u analizi tkiva mozga da bi se dobili novi podaci koji nisu pokriveni tijekom ovog istraživanja; u ovom istraživanju nije bilo uzoraka iz predpubertetskog razvoja mozga, kao i veliki evolucijski razmak između štakora i makaki majmuna koji bi valjalo popuniti vrstama koje se evolucijski nalaze između te dvije vrste. Nadalje, u ovom istraživanju je korišteno tkivo mozga različitih jedinki koje su se razvijale različitim okolišnim uvjetima, osim jedinki štakora, a poznato je da okolišni čimbenici imaju značajan učinak na N-glikozilaciju organizma[2,130]. Stoga bi bilo zanimljivo napraviti istraživanje s neuronima razvijenim iz induciranih pluripotentnih stanica jer bi se na taj način isključili okolišni čimbenici koje u ovom istraživanju nije bilo moguće ukloniti. Također, razvijena HILIC-UPLC metoda bi se, najvjerojatnije, mogla koristiti za analizu drugih tkiva i stanica uz minimalne izmjene što bi trebalo omogućilo daljnje otkrivanje novih N-glikanskih struktura, promjene N-glikozilacije koje nastaju pod različitim uvjetima te popunjavanje N-glikoma različitih stanica, tkiva i organizama.

§ 6. ZAKLJUČAK

- Uspostavljena metoda priprave uzoraka tkiva mozga i analize kromatografskom metodom HILIC-UPLC je reproducibilna i robusna te omogućava analizu većeg broja uzoraka tkiva u kraćem periodu.

- Razvijena metoda je dovoljno osjetljiva za detekciju bioloških razlika u N-glikozilaciji tkiva mozga.

- MALDI-TOF MS analiza frakcija kromatografskih pikova nakon HILIC-UPLC analize otkriva veliku raznolikost N-glikanskih struktura u tkivu mozga, 296 različitih glikanskih struktura. Najveći broj glikanskih struktura pronađenih u tkivu mozga ima sialinsku kiselinu, od kojih je najveći udio s α2,3 vezanom sialinskom kiselinom, s tim da najveći udio čine neutralne glikanske strukture, od kojih najveći udio pripada oligomanoznim glikanskim strukturama.

- Tijekom razvoja N-glikom mozga čovjeka se mijenja. Udio sialiniziranih i većih oligomanoznih struktura je značajno veći u mozgu fetusa, a udio neutralnih kompleksnih struktura je značajno manji u odnosu na mozak odraslog čovjeka.

- N-glikom mozga štakora, makaki majmuna, čimpanze i čovjeka se značajno razlikuje. Razlika između N-glikoma mozga primata i štakora je značajno veća nego što je to između samih primata, s tim da je ta razlika najmanja između čovjeka i čimpanze. Primati se razlikuju od štakora u istih dvanaest kromatografskih pikova, a udio sialiniziranih struktura se značajno povećava za svaku vrstu od štakora do čovjeka.

- Mali mozak, strijatum, hipokampus i kora velikog mozga se značajno razlikuju u udjelima različitih N-glikanskih struktura. Najveća je razlika u N-glikomu između malog mozga i ostalih analiziranih regija, neovisno o vrsti kojoj pripadaju.

- Na osnovu transkriptoma mozga nije moguće predvidjeti njegov N-glikom.

§ 7. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

Šećeri:

Fuc	F		fukoza
Gal	G		galaktoza
GalA	-		galakturonska kiselina
GalN	-		galaktozamin
GalNAc	-		*N*-acetilgalaktozamin
Glc	-		glukoza
GlcA	-		glukuronska kiselina
GlcN	-		glukozamin
GlcNAc	B		*N*-acetilglukozamin
IdoA	-		iduronska kiselina
Kdn	-		2-keto-3-deoksinononska kiselina
Man	M		manoza
ManA	-		manuronska kiselina
ManN	-		manozamin
ManNAc	-		*N*-acetilmanozamin
Neu5Ac	S		*N*-acetilneuraminska kiselina
Neu5Gc	-		*N*-glikolilneuraminska kiselina
Xyl	-		ksiloza

Aminokiseline:

Ala	A	alanin
Arg	R	arginin
Asn	N	asparagin
Asp	D	aspartat

Cys	C	cistein
Gln	Q	glutamin
Glu	E	glutamat
Gly	G	glicin
His	H	histidin
Ile	I	izoleucin
Leu	L	leucin
Lys	K	lizin
Met	M	metionin
Phe	F	fenilalanin
Pro	P	prolin
Ser	S	serin
Thr	T	treonin
Trp	W	triprofan
Tyr	Y	tirozin
Val	V	valin

Kratice

2,5-DHB	2,5-dihidroksibenzojeva kiselina
2-AB	2-aminobenzamid
2-PB	2-pikolin boran
cAMP	ciklički adenozin monofosfat
CDG	nasljedni poremećaji glikozilacije (eng. *congenital disorders of glycosylation*)
CGE	kapilarna gel-elektroforeza (eng. *capillary gel electrophoresis*)
CMAH	hidroksilaza citidin monofosfat-*N*-acetilneraminske kiseline (eng. *cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase*)
CNS	središnji živčani sustav (eng. *central nervous system*)
CV	koeficijent varijacije (eng. *coefficient of variation*)
Dol-P	dolikol fosfat
Dol-P-P	dolikol pirofosfat
ER	endoplazmatski retikulum

EU	jedinica emisije (eng. *emission unit*)
GDP	gvanozin-5'-difosfat
GK	Golgijev kompleks
GP	glikanski pik
GPI	glikozilfosfatidilinozitolno sidro
GU	jedinica glukoze (eng. *glucose units*)
HILIC	tekućinska kromatografija koja se temelji na hidrofilnim interakcijama (eng. *hydrophilic interaction liquid chromatography*)
HOBt	hidroksibenzotriazol monohidrat
IgG	imunoglobulin G
LC	tekućinska kromatografija (eng. *liquid chromatography*)
MALDI	matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (eng. *matrix- assisted laser desorption/ionization*)
MS	spektrometrija masa (eng. *mass spectrometry*)
NCAM	adhezijska molekula živčanih stanica (eng. *neural cell adhesion molecule*),
OST	oligosaharil-transferaza
PBS	fosfatni pufer (eng. *phosphate buffered saline*)
PCA	analiza glavnih komponenti (eng. *principal component analysis*)
PLN	poli-*N*-acetillaktozamin
PSA	polisialinska kiselina (eng. *polysialic acid*)
SD	standardna devijacija
SDS	natrijev dodecil-sulfat (eng. *sodium dodecyl sulphate*)
SPE	ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. *solid phase extraction*)
SV2	sinaptički vezikularni protein 2
synCAMs	sinaptičke molekule koje povezuju stanice (eng. *synaptic cell adhesion molecules*)
TOF	vrijeme leta (eng. *time of flight*)
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
UDP	uridin-5'-difosfat
UPLC	tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (eng. *ultra performance liquid chromatography*)

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart i M. E. Etzler, *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
2. A. Knežević, O. Gornik, O. Polašek, M. Pučić, I. Redžić, M. Novokmet, P. M. Rudd, A. F. Wright, H. Campbell, I. Rudan i G. Lauc, *Glycobiology* **20** (2010) 959–969.
3. M. A. Ferguson, T. Kinoshita i G. W. Hart, *Essentials of Glycobiology. 2nd edition*, 2009.
4. A. P. Corfield i M. Berry, *Trends Biochem. Sci.*, 2015.
5. E. M. Sletten i C. R. Bertozzi, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2009, 48, 6974–6998.
6. K. Taylor, M.E. i Drickamer, *Oxford Univ. Press* **2nd ed.** (2006) 1733.
7. C. Boscher, J. W. Dennis i I. R. Nabi, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2011, 23, 383–392.
8. J. W. Dennis, K. S. Lau, M. Demetriou i I. R. Nabi, *Traffic*, 2009, 10, 1569–1578.
9. P. Lajoie i I. R. Nabi, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **282** (2010) 135–163.
10. S. Š. Goreta, S. Dabelić i J. Dumić, *Biochem. Med. (Zagreb).* **22** (2012) 156–70.
11. C. W. Fung, G. Matthijs, L. Sturiale, D. Garozzo, K. Y. Wong, R. Wong, V. Wong i J. Jaeken, *JIMD Rep* **3** (2012) 67–70.
12. J. D. Cahoy, B. Emery, A. Kaushal, L. C. Foo, J. L. Zamanian, K. S. Christopherson, Y. Xing, J. L. Lubischer, P. a Krieg, S. a Krupenko, W. J. Thompson i B. a Barres, *J. Neurosci.* **28** (2008) 264–78.
13. A. Bayés, L. N. van de Lagemaat, M. O. Collins, M. D. R. Croning, I. R. Whittle, J. S. Choudhary i S. G. N. Grant, *Nat. Neurosci.* **14** (2011) 19–21.
14. M. Somel, X. Liu i P. Khaitovich, *Nat. Rev. Neurosci.* **14** (2013) 1–16.
15. G. Kochlamazashvili, O. Senkov, S. Grebenyuk, C. Robinson, M.-F. Xiao, K. Stummeyer, R. Gerardy-Schahn, A. K. Engel, L. Feig, A. Semyanov, V. Suppiramaniam, M. Schachner i A. Dityatev, *J. Neurosci.* **30** (2010) 4171–83.
16. S. Yamamoto, S. Oka, M. Inoue, M. Shimuta, T. Manabe, H. Takahashi, M. Miyamoto, M. Asano, J. Sakagami, K. Sudo, Y. Iwakura, K. Ono i T. Kawasaki, *J. Biol. Chem.*

277 (2002) 27227–27231.

17. T. Yoshimura, G. Yamada, M. Narumi, T. Koike, A. Ishii, I. Sela, S. Mitrani-Rosenbaum i K. Ikenaka, *Anal. Biochem.* **423** (2012) 253–260.
18. Y. Hu, S. Zhou, S. I. Khalil, C. L. Renteria i Y. Mechref, *Anal. Chem.* **85** (2013) 4074–4079.
19. K. W. Moremen, M. Tiemeyer i A. V Nairn, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13** (2012) 448–62.
20. I. J. Ji, S. Hua, D. H. Shin, N. Seo, J. Y. Hwang, I. S. Jang, M. G. Kang, J. S. Choi i H. J. An, *Anal. Chem.* **87** (2015) 2869–2877.
21. C. R. Bertozzi i D. Rabuka, *Essentials Glycobiol.* (2009) 23–36.
22. M. Miljković, *Carbohydrates: Synthesis, mechanisms, and stereoelectronic effects*, 2009.
23. D. Voet i J. G. Voet, *Biochemistry 4e*, 2010.
24. Y. Maeda, H. Ashida i T. Kinoshita, *Methods Enzymol.*, 2006, 416, 182–205.
25. P. A. Haynes, *Glycobiology*, 1998, 8, 1–5.
26. E. Bieberich, *Adv. Neurobiol.* **9** (2014) 47–70.
27. J. W. Dennis, I. R. Nabi i M. Demetriou, *Cell*, 2009, 139, 1229–1241.
28. H. H. Freeze, E. A. Eklund, B. G. Ng i M. C. Patterson, *Lancet Neurol.*, 2012, 11, 453–466.
29. J. B. Lowe i J. D. Marth, *Annu. Rev. Biochem.* **72** (2003) 643–691.
30. Z. Ye i J. D. Marth, *Glycobiology* **14** (2004) 547–558.
31. B. Weinhold, R. Seidenfaden, I. Röckle, M. Mühlenhoff, F. Schertzinger, S. Conzelmann, J. D. Marth, R. Gerardy-Schahn i H. Hildebrandt, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 42971–42977.
32. K. Angata, V. Huckaby, B. Ranscht, A. Terskikh, J. D. Marth i M. Fukuda, *Mol. Cell. Biol.* **27** (2007) 6659–6668.
33. H. Hildebrandt, M. Mühlenhoff, I. Oltmann-Norden, I. Röckle, H. Burkhardt, B. Weinhold i R. Gerardy-Schahn, *Brain* **132** (2009) 2831–2838.
34. M. Mühlenhoff, M. Eckhardt i R. Gerardy-Schahn, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8** (1998) 558–64.
35. U. Rutishauser, *Nat. Rev. Neurosci.* **9** (2008) 26–35.
36. D. Zhou, A. Dinter, R. Gutiérrez Gallego, J. P. Kamerling, J. F. Vliegenthart, E. G.

Berger i T. Hennet, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96** (1999) 406–411.

37. T. R. Henion, A. A. Faden, T. K. Knott i G. A. Schwarting, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31** (2011) 6576–6586.
38. R. Kleene i M. Schachner, *Nat. Rev. Neurosci.* **5** (2004) 195–208.
39. A. Dityatev, M. Schachner i P. Sonderegger, *Nat. Rev. Neurosci.* **11** (2010) 735–746.
40. N. Dani i K. Broadie, *Dev. Neurobiol.* **72** (2012) 2–21.
41. R. Janz, Y. Goda, M. Geppert, M. Missler i T. C. Südhof, *Neuron* **24** (1999) 1003–1016.
42. L. Chen, *J. Physiol.* **588** (2010) 557–564.
43. I. Kadurin, A. Golubovic, L. Leisle, H. Schindelin i S. Gründer, *Biochem. J.* **412** (2008) 469–475.
44. L. Jing, X.-P. Chu, Y.-Q. Jiang, D. M. Collier, B. Wang, Q. Jiang, P. M. Snyder i X.-M. Zha, *J. Neurosci.* **32** (2012) 4080–91.
45. Q. Gong, C. L. Anderson, C. T. January i Z. Zhou, *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **283** (2002) H77–H84.
46. J. Zhu, J. Yan i W. B. Thornhill, *FEBS J.* **279** (2012) 2632–44.
47. N. Weiss, S. A. G. Black, C. Bladen, L. Chen i G. W. Zamponi, *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **465** (2013) 1159–1170.
48. P. Stanley, H. Schachter i N. Taniguchi, *Chapter 8. N-Glycans, Essentials of Glycobiology, 2nd Edition*, 2009.
49. U. Galili, S. B. Shohet, E. Kobrin, C. L. Stults i B. A. Macher, *J. Biol. Chem.* **263** (1988) 17755–17762.
50. H.-H. Chou, T. Hayakawa, S. Diaz, M. Krings, E. Indriati, M. Leakey, S. Paabo, Y. Satta, N. Takahata i A. Varki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99** (2002) 11736–11741.
51. D. Ghaderi, S. a Springer, F. Ma, M. Cohen, P. Secrest, R. E. Taylor, A. Varki i P. Gagneux, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108** (2011) 17743–8.
52. S. A. Springer, S. L. Diaz i P. Gagneux, *Immunogenetics* **66** (2014) 671–674.
53. P. S. K. Ng, R. Böhm, L. E. Hartley-Tassell, J. A. Steen, H. Wang, S. W. Lukowski, P. L. Hawthorne, A. E. O. Trezise, P. J. Coloe, S. M. Grimmond, T. Haselhorst, M. von Itzstein, A. W. Paton, J. C. Paton i M. P. Jennings, *Nat. Commun.* **5** (2014) 5750.
54. R. P. Kozak, L. Royle, R. A. Gardner, D. L. Fernandes i M. Wuhrer, *Anal. Biochem.* **423** (2012) 119–128.

55. G. Zauner, R. P. Kozak, R. A. Gardner, D. L. Fernandes, A. M. Deelder i M. Wuhrer, *Biol. Chem.*, 2012, 393, 687–708.
56. R. P. Kozak, L. Royle, R. A. Gardner, A. Bondt, D. L. Fernandes i M. Wuhrer, *Anal. Biochem.* **453** (2014) 29–37.
57. T. Wang, Z. P. Cai, X. Q. Gu, H. Y. Ma, Y. M. Du, K. Huang, J. Voglmeir i L. Liu, *Biosci. Rep.* **34** (2014) 673–684.
58. J. E. Huffman, M. Pučić, L. Klarić, M. Novokmet, J. Krištić, M. H. J. Selman, F. Vučković, M. Borowiak, T. Muth, O. Polašek, G. Razdorov, O. Gornik, R. Plomp, E. Theodoratou, A. F. Wright, I. Rudan, C. Hayward, H. Campbell, M. Deelder, U. Reichl, Y. S. Aulchenko, E. Rapp, M. Wuhrer i G. Lauc, *Mol. Cell. Proteomics* **13** (2014) 1598–1610.
59. L. Royle, M. P. Campbell, C. M. Radcliffe, D. M. White, D. J. Harvey, J. L. Abrahams, Y. G. Kim, G. W. Henry, N. A. Shadick, M. E. Weinblatt, D. M. Lee, P. M. Rudd i R. A. Dwek, *Anal. Biochem.* **376** (2008) 1–12.
60. A. Shubhakar, K. R. Reiding, R. A. Gardner, D. I. R. Spencer, D. L. Fernandes i M. Wuhrer, *Chromatographia*, 2014, 78, 321–333.
61. H. Stockmann, B. Adamczyk, J. Hayes i P. M. Rudd, *Anal. Chem.* **85** (2013) 8841–8849.
62. S. H. Walker, B. C. Carlisle i D. C. Muddiman, *Anal. Chem.* **84** (2012) 8198–8206.
63. J. C. Bigge, T. P. Patel, J. A. Bruce, P. N. Goulding, S. M. Charles i R. B. Parekh, *Anal. Biochem.* **230** (1995) 229–38.
64. Y. Takegawa, K. Deguchi, T. Keira, H. Ito, H. Nakagawa i S. I. Nishimura, *J. Chromatogr. A* **1113** (2006) 177–181.
65. S. Klapoetke, J. Zhang, S. Becht, X. Gu i X. Ding, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53** (2010) 315–324.
66. L. R. Ruhaak, E. Steenvoorden, C. A. M. Koeleman, A. M. Deelder i M. Wuhrer, *Proteomics* **10** (2010) 2330–2336.
67. A. E. Manzi, K. Norgard-Sumnicht, S. Argade, J. D. Marth, H. van Halbeek i A. Varki, *Glycobiology* **10** (2000) 669–89.
68. Y.-J. Chen, D. R. Wing, G. R. Guile, R. a. Dwek, D. J. Harvey i S. Zamze, *Eur. J. Biochem.* **251** (1998) 691–703.
69. S. Zamze, D. J. Harvey, Y.-J. Chen, G. R. Guile, R. a. Dwek i D. R. Wing, *Eur. J.*

Biochem. **258** (1998) 243–270.

70. I. J. Ji, S. Hua, D. Shin, N. Seo, J. Y. Hwang, I.-S. Jang, M.-G. Kang, J.-S. Choi i H. J. An, *Anal. Chem.* (2015).
71. B. L. Parker, M. Thaysen-andersen, N. Solis, N. E. Scott, M. R. Larsen, M. E. Graham, N. H. Packer i S. J. Cordwell, (2013).
72. T. Torii, T. Yoshimura, M. Narumi, S. Hitoshi, Y. Takaki, S. Tsuji i K. Ikenaka, *Glycoconj. J.* **31** (2014) 671–83.
73. Y. Hu, S. Zhou, S. I. Khalil, C. L. Renteria i Y. Mechref, *Anal. Chem.* **85** (2013) 4074–9.
74. R. Nieuwenhuys, J. Voogd i C. Van Huijzen, *The human central nervous system*, 2008.
75. A. I. Fogel, Y. Li, J. Giza, Q. Wang, T. T. Lam, Y. Modis i T. Biederer, *J. Biol. Chem.* **285** (2010) 34864–34874.
76. M. V. Sofroniew i H. V. Vinters, *Acta Neuropathol.*, 2010, 119, 7–35.
77. J. E. Rash i T. Yasumura, *Cell Tissue Res.* **296** (1999) 307–321.
78. A. Rolls, R. Shechter i M. Schwartz, *Nat. Rev. Neurosci.* **10** (2009) 235–41.
79. K.-A. Nave, *Nature* **468** (2010) 244–252.
80. A. Nimmerjahn, F. Kirchhoff i F. Helmchen, *Neuroforum* **11** (2005) 95–96.
81. A. Miyamoto, H. Wake, A. J. Moorhouse i J. Nabekura, *Front. Cell. Neurosci.* **7** (2013) 70.
82. O. Pascual, S. Ben Achour, P. Rostaing, A. Triller i A. Bessis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109** (2012) E197–E205.
83. M. A. England, *J. Anat.* **166** (1989) 270.
84. R. A. Barton i P. H. Harvey, *Nature* **405** (2000) 1055–1058.
85. R. A. Barton, *Evol. Nerv. Syst.* (2007) 97–102.
86. J. H. Kaas i C. E. Collins, *Behav. Brain Sci.* **24** (2001) 288–290.
87. http://prozyme.com/collections/pngase-f/products/gke-5006b(preuzeto 26. siječnja 2017. god.)
88. C. I. a Balog, K. Stavenhagen, W. L. J. Fung, C. a Koeleman, L. a McDonnell, A. Verhoeven, W. E. Mesker, R. a E. M. Tollenaar, A. M. Deelder i M. Wuhrer, *Mol. Cell. Proteomics* **11** (2012) 571–85.
89. K. R. Reiding, D. Blank, D. M. Kuijper, A. M. Deelder i M. Wuhrer, *Anal. Chem.* **86** (2014) 5784–5793.

90. M. H. J. Selman, M. Hemayatkar, A. M. Deelder i M. Wuhrer, *Anal. Chem.* **83** (2011) 2492–2499.
91. M. P. Campbell, L. Royle i P. M. Rudd, *Methods Mol. Biol.* **1273** (2015) 17–28.
92. C. a Cooper, E. Gasteiger i N. H. Packer, *Proteomics* **1** (2001) 340–349.
93. A. Ceroni, K. Maass, H. Geyer, R. Geyer, A. Dell i S. M. Haslam, *J. Proteome Res.* **7** (2008) 1650–1659.
94. R. R Development Core Team, *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, 2011, vol. 1.
95. H. Abdi i L. J. Williams, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.*, 2010, 2, 433–459.
96. Y. Benjamini i Y. Hochberg, *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, 1995, 57, 289–300.
97. I. Trbojević Akmačić, I. Ugrina, J. Štambuk, I. Gudelj, F. Vučković, G. Lauc i M. Pučić-Baković, *Biochem.* **80** (2015) 934–942.
98. H. J. Kang, Y. I. Kawasawa, F. Cheng, Y. Zhu, X. Xu, M. Li, A. M. M. Sousa, M. Pletikos, K. A. Meyer, G. Sedmak, T. Guennel, Y. Shin, M. B. Johnson, Z. Krsnik, S. Mayer, S. Fertuzinhos, S. Umlauf, S. N. Lisgo, A. Vortmeyer, D. R. Weinberger, S. Mane, T. M. Hyde, A. Huttner, M. Reimers, J. E. Kleinman i N. Sestan, *Nature* **478** (2011) 483–9.
99. L. R. Ruhaak, G. Zauner, C. Huhn, C. Bruggink, A. M. Deelder i M. Wuhrer, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 397, 3457–3481.
100. S. T. Eshghi, S. Yang, X. Wang, P. Shah, X. Li i H. Zhang, *ACS Chem. Biol.* **9** (2014) 2149–2156.
101. A. Hoffmann, M. Nimtz, U. Wurster i H. S. Conradt, *J. Neurochem.* **63** (1994) 2185–96.
102. A. Hoffmann, M. Nimtz, R. Getzlaff i H. S. Conradt, *FEBS Lett.* **359** (1995) 164–168.
103. R. Saldova, A. Asadi Shehni, V. D. Haakensen, I. Steinfeld, M. Hilliard, I. Kifer, Å. Helland, Z. Yakhini, A. L. Børresen-Dale i P. M. Rudd, *J. Proteome Res.* **13** (2014) 2314–2327.
104. S. Tang, Y. J. Shen, M. E. DeBellard, G. Mukhopadhyay, J. L. Salzer, P. R. Crocker i M. T. Filbin, *J. Cell Biol.* **138** (1997) 1355–1366.
105. M. Schachner i U. Bartsch, *Glia*, 2000, 29, 154–165.
106. U. Bartsch, C. E. Bandtlow, L. Schnell, S. Bartsch, A. A. Spillmann, B. P. Rubin, R. Hillenbrand, D. M. M. E. Schwab i M. Schachner, *Neuron* **15** (1995) 1375–1381.

107. M. T. Filbin, *Curr. Opin. Neurobiol.* **5** (1995) 588–595.
108. D. Muller, L. Stoppini, C. Wang i J. Z. Kiss, *Neuroscience* **61** (1994) 441–445.
109. T. Seki, *Anat. Sci. Int.*, 2003, 78, 69–78.
110. G. B. Fox, A. W. O'Connell, K. J. Murphy i C. M. Regan, *J. Neurochem.* **65** (1995) 2796–2799.
111. Y. Maeda, J. W. Bigbee, R. Maeda, N. Miyatani, R. G. Kalb i R. K. Yu, *Exp. Neurol.* **113** (1991) 221–225.
112. M. Vogel, H. Zimmermann i W. Singer, *Eur. J. Neurosci.* **5** (1993) 1423–1425.
113. R. Martini, Y. Xin, B. Schmitz i M. Schachner, *Eur. J. Neurosci.* **4** (1992) 628–639.
114. G. Pradel, M. Schachner i R. Schmidt, *J. Neurobiol.* **39** (1999) 197–206.
115. P. Yang, D. Major i U. Rutishauser, *J Biol Chem* **269** (1994) 23039–23044.
116. J. Tang, U. Rutishauser i L. Landmesser, *Neuron* **13** (1994) 405–414.
117. P. Doherty, J. Cohen i F. S. Walsh, *Neuron* **5** (1990) 209–219.
118. D. Muller, C. Wang, G. Skibo, N. Toni, H. Cremer, V. Calaora, G. Rougon i J. Z. Kiss, *Neuron* **17** (1996) 413–422.
119. K. Honke i N. Taniguchi, *Handb. Glycosyltransferases Relat. Genes* **2** (2002) 102–106.
120. Y. Kaneko, H. Yamamoto, D. S. Kersey, K. J. Colley, J. E. Leestma i J. R. Moskal, *Acta Neuropathol.* **91** (1996) 284–292.
121. H. L. Chen, C. F. Li, A. Grigorian, W. Tian i M. Demetriou, *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 32454–32461.
122. N. Kawasaki, Y. Haishima, M. Ohta, S. Itoh, M. Hyuga, S. Hyuga i T. Hayakawa, *Glycobiology* **11** (2001) 1043–1049.
123. Y. E. Zhang, P. Landback, M. D. Vibranovski i M. Long, *PLoS Biol.* **9** (2011).
124. C. Manrique, M. Migliorati, V. Gilbert, J. M. Brezun, F. A. Chaillan, B. Truchet, M. Khrestchatisky, G. Guiraudie-Capraz i F. S. Roman, *Hippocampus* **24** (2014) 979–989.
125. M. K. Hall, D. A. Weidner, Y. Zhu, S. Dayal, A. A. Whitman i R. A. Schwalbe, *Int. J. Mol. Sci.* **17** (2016).
126. J. Tucholski, M. S. Simmons, A. L. Pinner, L. D. McMillan, V. Haroutunian i J. H. Meador-Woodruff, *Neuroreport* **24** (2013) 688–691.
127. D. V Buonomano i M. M. Merzenich, *Annu. Rev. Neurosci.* **21** (1998) 149–186.
128. T. Yoshihara, K. Sugihara, Y. Kizuka, S. Oka i M. Asano, *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 12550–12561.

129. R. D. Cummings i M. E. Etzler, in *Essentials of Glycobiology 2nd Edition*, 2009, pp. 633–648.

130. A. Knežević, O. Polašek, O. Gornik, I. Rudan, H. Campbell, C. Hayward, I. Kolčić, N. O. Donoghue, J. Bones, P. M. Rudd, G. Lauc, A. Knez, O. Polašek, A. Wright i I. Kolc, *J. Proteome Res.* **8** (2009) 694–701.

§ 9. DODATAK

Dodatak 1. Raspored uzoraka nakon randomizacije u deset serija. Svaka serija ima sličan odnos između vrsta, regija, dobi i spola. Imenovanje uzoraka, označavanje dobi i spola: HS – čovjek, ***H**omo **s**apiens*, PT – čimpanza, ***P**an **t**roglodytes*, RM – makaki majmun, ***R**hesus **m**acaque*, RN- štakor, ***R**attus **n**orvegicus*, B – mozak (eng. ***b**rain*); DFC – kora velikog mozga (eng. ***d**orsal **f**rontal **c**ortex*), HIP – **hip**okampus, STR – **str**ijatum, CBC – mali mozak (eng. ***c**ere**b**ellum **c**ortex*), F – **f**etus, M- **m**uški spol, Ž – **ž**enski spol, NA – nepoznato (eng. ***n**ot **a**vailable*).

Uzorak	Vrsta	Dob / god	Spol	Serija	Uzorak	Vrsta	Dob / god	Spol	Serija
RMB 219 STR	makaki	7	M	1	RMB 218 CBC	makaki	7	M	6
RNB 4 DFC	štakor	10*	M	1	Standard 8	NA	NA	NA	6
RMB 110 CBC	makaki	10	Ž	1	PTB 167 CBC	čimpanza	23	M	6
Standard 9	NA	NA	NA	1	HSB 123 DFC	čovjek	37	M	6
HSB 102 CBC	čovjek	F	Ž	1	RNB 1 STR	štakor	10*	Ž	6
RNB 5 HIP	štakor	10*	M	1	PTB 167 HIP	čimpanza	23	M	6
HSB 156 STR	čovjek	82	Ž	1	HSB 145 STR	čovjek	36	M	6
HSB 159 HIP	čovjek	F	M	1	RNB 1 DFC	štakor	10*	Ž	6
RNB 6 CBC	štakor	10*	M	1	HSB 135 DFC	čovjek	40	Ž	6
HSB 156 DFC	čovjek	82	Ž	1	RNB 4 CBC	štakor	10*	M	6
HSB 123 STR	čovjek	37	M	2	HSB 126 STR	čovjek	30	Ž	7
RMB 196 CBC	makaki	11	Ž	2	PTB 167 DFC	čimpanza	23	M	7
Standard 5	NA	NA	NA	2	RMB 196 STR	makaki	11	Ž	7
HSB 135 HIP	čovjek	40	Ž	2	RNB 4 HIP	štakor	10*	M	7
PTB 167 STR	čimpanza	23	M	2	HSB 156 CBC	čovjek	82	Ž	7
HSB 135 CBC	čovjek	40	Ž	2	RMB 110 DFC	makaki	10	Ž	7
PTB 162 HIP	čimpanza	23	Ž	2	RNB 2 DFC	štakor	10*	Ž	7
RMB 160 HIP	makaki	11	Ž	2	Standard 3	NA	NA	NA	7
RNB 4 STR	štakor	10*	M	2	HSB 136 HIP	čovjek	23	M	7
RNB 5 CBC	štakor	10*	M	2	HSB 126 CBC	čovjek	30	Ž	7
RMB 219 DFC	makaki	7	M	2	RNB 3 STR	štakor	10*	Ž	8
PTB 164 HIP	čimpanza	31	Ž	3	HSB 102 DFC	čovjek	F	Ž	8
RNB 1 HIP	štakor	10*	Ž	3	HSB 159 CBC	čovjek	F	M	8
HSB 145 HIP	čovjek	36	M	3	PTB 164 STR	čimpanza	31	Ž	8
RNB 3 CBC	štakor	10*	Ž	3	RNB 2 HIP	štakor	10*	Ž	8
RNB 6 STR	štakor	10*	M	3	HSB 126 DFC	čovjek	30	Ž	8
Standard 4	NA	NA	NA	3	HSB 100 HIP	čovjek	F	Ž	8
PTB 162 CBC	čimpanza	23	Ž	3	EMPTY	NA	NA	NA	8

Uzorak	Vrsta	Dob / god	Spol	Serija	Uzorak	Vrsta	Dob / god	Spol	Serija
RMB 218 STR	makaki	7	M	3	RMB 110 STR	makaki	10	Ž	8
RMB 161 CBC	makaki	11	M	3	PTB 166 DFC	čimpanza	27	M	8
RMB 161 DFC	makaki	11	M	3	PTB 166 HIP	čimpanza	27	M	8
HSB 100 CBC	čovjek	F	Ž	3	RNB 1 CBC	štakor	10*	Ž	8
PTB 162 STR	čimpanza	23	Ž	3	Standard 7	NA	NA	NA	8
HSB 123 CBC	čovjek	37	M	4	RMB 219 HIP	makaki	7	M	9
RNB 5 STR	štakor	10*	M	4	RMB 110 HIP	makaki	10	Ž	9
HSB 145 CBC	čovjek	36	M	4	Standard 1	NA	NA	NA	9
HSB 159 STR	čovjek	F	M	4	HSB 145 DFC	čovjek	36	M	9
PTB 164 CBC	čimpanza	31	Ž	4	HSB 100 DFC	čovjek	F	Ž	9
RMB 160 DFC	makaki	11	Ž	4	RNB 2 STR	štakor	10*	Ž	9
Standard 6	NA	NA	NA	4	PTB 164 DFC	čimpanza	31	Ž	9
RMB 196 DFC	makaki	11	Ž	4	HSB 102 STR	čovjek	F	Ž	9
HSB 123 HIP	čovjek	37	M	4	PTB 166 CBC	čimpanza	27	M	9
RMB 161 HIP	makaki	11	M	4	RNB 5 DFC	štakor	10*	M	9
HSB 136 CBC	čovjek	23	M	5	RMB 160 CBC	makaki	11	Ž	9
RNB 6 DFC	štakor	10*	M	5	HSB 136 STR	čovjek	23	M	10
HSB 156 HIP	čovjek	82	Ž	5	HSB 102 HIP	čovjek	F	Ž	10
HSB 135 STR	čovjek	40	Ž	5	HSB 159 DFC	čovjek	F	M	10
RNB 6 HIP	štakor	10*	M	5	RMB 219 CBC	makaki	7	M	10
RMB 161 STR	makaki	11	M	5	RNB 3 DFC	štakor	10*	Ž	10
RNB 2 CBC	štakor	10*	Ž	5	HSB 136 DFC	čovjek	23	M	10
Standard 2	NA	NA	NA	5	RMB 218 HIP	makaki	7	M	10
RNB 3 HIP	štakor	10*	Ž	5	RMB 160 STR	makaki	11	Ž	10
HSB 100 STR	čovjek	F	Ž	5	PTB 162 DFC	čimpanza	23	Ž	10
RMB 218 DFC	makaki	7	M	5	PTB 166 STR	čimpanza	27	M	10
RMB 196 HIP	makaki	11	Ž	6	Standard 10	NA	NA	NA	10

*postnatalni tjedni

Dodatak 2. Ponovljivost metode HILIC-UPLC tijekom analize uzoraka. Usporedba devet standarada koji su prošli sve jednake korake analize kao i uzorci; svaki standard je analiziran sa svojom serijom uzoraka. Prikazana je srednja vrijednost udjela površine pojedinog kromatografskog pika u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu ($\overline{\text{Udio}}$), standardna devijacija udjela površine (SD) te koeficijent varijacije (CV).

Kromatografski pik	Udio kromatografskog pika (n = 9)			Kromatografski pik	Udio kromatografskog pika (n = 9)		
	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %		$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %
GP1	1,25	0,09	7,15	**GP30**	7,06	0,13	1,79
GP2	0,42	0,02	5,88	**GP31**	1,38	0,07	4,93
GP3	0,67	0,12	18,42	**GP32**	1,05	0,04	3,5
GP4	0,17	0,01	7,5	**GP33**	1,18	0,02	1,58
GP5	1,53	0,05	3,31	**GP34**	1,75	0,23	13,1
GP6	10,76	0,28	2,58	**GP35**	0,6	0,03	5,59
GP7	6,98	0,34	4,92	**GP36**	0,94	0,05	4,9
GP8	0,2	0,15	73,36	**GP37**	1,95	0,09	4,63
GP9	1,46	0,05	3,24	**GP38**	1,49	0,12	8,13
GP10	0,19	0,04	18,42	**GP39**	1,3	0,21	15,77
GP11	0,24	0,04	18,09	**GP40**	0,4	0,05	13,69
GP12	6,42	0,2	3,06	**GP41**	1,05	0,25	23,89
GP13	1,46	0,12	8,23	**GP42**	0,7	0,11	15,34
GP14	0,34	0,05	14,12	**GP43**	1,07	0,04	3,88
GP15	0,99	0,09	9,08	**GP44**	0,78	0,05	6,23
GP16	1,64	0,03	1,99	**GP45**	0,95	0,08	8,15
GP17	4,94	0,15	2,96	**GP46**	1,41	0,05	3,25
GP18	6,39	0,16	2,43	**GP47**	1,23	0,12	10,07
GP19	2,5	0,05	2,2	**GP48**	1,68	0,17	10,19
GP20	0,92	0,02	2,32	**GP49**	0,52	0,03	6,38
GP21	0,33	0,03	9,33	**GP50**	0,5	0,06	12,66
GP22	0,99	0,04	4,33	**GP51**	0,76	0,06	8,14
GP23	2,36	0,2	8,64	**GP52**	1,33	0,38	28,98
GP24	2,65	0,06	2,44	**GP53**	0,97	0,18	18,5
GP25	0,54	0,04	7,71	**GP54**	2,61	0,18	6,87
GP26	1,48	0,1	6,92	**GP55**	1,24	0,09	7,48
GP27	1,04	0,13	13,01	**GP56**	1,58	0,28	17,6
GP28	0,94	0,08	8,18	**GP57**	0,72	0,1	13,6
GP29	1,39	0,03	2,06	**GP58**	0,65	0,27	41,54

n = broj uspješno analiziranih standarada

Dodatak 3. Statistički značajni kromatografski pikovi nakon prilagodbe na višestruko testiranje (Poglavlje 3.6.) između N-glikoma različitih regija mozga. Utjecaj govori koliko je puta veća/manja srednja vrijednost prva regija/druga regija za određeni kromatografski pik kad se vrijednost utjecaja stavi u eksponent baze prirodnog logaritma *e*. Kromatografski pikovi su poredani po značajnosti. C – čimpanza, H – odrasli čovjek, M – makaki majmun, R – štakor, DFC – kora velikog mozga, HIP – hipokampus, STR – strijatum, CBC – mali mozak.

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP1	H_CBC_DFC	-0,41098	0,129697	**GP1**	H_CBC_STR	-0,16341	0,526336
GP2	H_CBC_DFC	0,023721	0,786826	**GP2**	H_CBC_STR	-0,02038	0,812908
GP3	H_CBC_DFC	-0,13579	0,237255	**GP3**	H_CBC_STR	-0,12505	0,253117
GP4	H_CBC_DFC	-0,05236	0,061872	**GP4**	H_CBC_STR	-0,05586	0,061421
GP5	H_CBC_DFC	0,342474	0,251001	**GP5**	H_CBC_STR	0,679041	0,060978
GP6	H_CBC_DFC	0,350833	0,675522	**GP6**	H_CBC_STR	0,957447	0,302552
GP7	H_CBC_DFC	1,545245	0,063839	**GP7**	H_CBC_STR	1,663316	0,068713
GP8	H_CBC_DFC	0,07769	0,212568	**GP8**	H_CBC_STR	0,059732	0,03689
GP9	H_CBC_DFC	-0,40989	0,001135	**GP9**	H_CBC_STR	-0,41835	0,000572
GP10	H_CBC_DFC	0,035782	0,714017	**GP10**	H_CBC_STR	0,021459	0,782638
GP11	H_CBC_DFC	-0,05794	0,242345	**GP11**	H_CBC_STR	-0,08179	0,149116
GP12	H_CBC_DFC	-1,64209	6,69E-05	**GP12**	H_CBC_STR	-2,19103	1,46E-06
GP13	H_CBC_DFC	-0,29118	0,001804	**GP13**	H_CBC_STR	-0,23947	0,036435
GP14	H_CBC_DFC	0,177893	0,001292	**GP14**	H_CBC_STR	0,276305	0,002617
GP15	H_CBC_DFC	0,181863	0,001015	**GP15**	H_CBC_STR	0,387022	0,000285
GP16	H_CBC_DFC	-0,61598	1,78E-09	**GP16**	H_CBC_STR	-0,60671	5,09E-07
GP17	H_CBC_DFC	1,198123	1,59E-06	**GP17**	H_CBC_STR	1,188054	1,04E-05
GP18	H_CBC_DFC	-0,77556	6,69E-05	**GP18**	H_CBC_STR	-0,61188	0,000464
GP19	H_CBC_DFC	0,637209	3,27E-06	**GP19**	H_CBC_STR	0,577334	0,000727
GP20	H_CBC_DFC	-0,24714	1,36E-05	**GP20**	H_CBC_STR	-0,28858	0,001479
GP21	H_CBC_DFC	-0,07265	0,003929	**GP21**	H_CBC_STR	0,048584	0,046563
GP22	H_CBC_DFC	0,473756	3,78E-10	**GP22**	H_CBC_STR	0,353729	7,94E-06
GP23	H_CBC_DFC	0,24563	0,125207	**GP23**	H_CBC_STR	0,463979	0,12194
GP24	H_CBC_DFC	-0,10421	0,489704	**GP24**	H_CBC_STR	0,039223	0,797663
GP25	H_CBC_DFC	0,269091	0,00154	**GP25**	H_CBC_STR	0,532357	0,000308
GP26	H_CBC_DFC	0,342318	0,011771	**GP26**	H_CBC_STR	0,574481	0,002029
GP27	H_CBC_DFC	0,237629	0,05528	**GP27**	H_CBC_STR	0,061469	0,615129
GP28	H_CBC_DFC	0,052746	0,344051	**GP28**	H_CBC_STR	0,044114	0,519723
GP29	H_CBC_DFC	-0,23622	0,000998	**GP29**	H_CBC_STR	-0,3472	0,001729
GP30	H_CBC_DFC	1,029435	0,006853	**GP30**	H_CBC_STR	1,371148	0,001189
GP31	H_CBC_DFC	-0,21056	0,027672	**GP31**	H_CBC_STR	-0,30719	0,009739
GP32	H_CBC_DFC	0,299335	8,53E-06	**GP32**	H_CBC_STR	0,24438	0,000346
GP33	H_CBC_DFC	0,553026	6,85E-06	**GP33**	H_CBC_STR	0,468905	0,000118
GP34	H_CBC_DFC	-0,08022	0,80025	**GP34**	H_CBC_STR	-0,3839	0,093099
GP35	H_CBC_DFC	-0,1859	0,001274	**GP35**	H_CBC_STR	-0,1027	0,03509

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP36	H_CBC_DFC	-0,14779	0,008346	**GP36**	H_CBC_STR	-0,27802	0,000165
GP37	H_CBC_DFC	0,282681	0,053575	**GP37**	H_CBC_STR	0,331142	0,031909
GP38	H_CBC_DFC	0,189401	0,042622	**GP38**	H_CBC_STR	0,158537	0,152989
GP39	H_CBC_DFC	-0,29906	0,030071	**GP39**	H_CBC_STR	-0,14746	0,479756
GP40	H_CBC_DFC	0,083328	0,065565	**GP40**	H_CBC_STR	0,143716	0,020892
GP41	H_CBC_DFC	-0,36845	0,001347	**GP41**	H_CBC_STR	-0,36431	0,001519
GP42	H_CBC_DFC	0,601003	6,85E-06	**GP42**	H_CBC_STR	0,543512	0,000452
GP43	H_CBC_DFC	-0,12235	0,095342	**GP43**	H_CBC_STR	-0,21914	0,004225
GP44	H_CBC_DFC	-0,18552	0,019487	**GP44**	H_CBC_STR	-0,23416	0,006861
GP45	H_CBC_DFC	-0,08421	0,088222	**GP45**	H_CBC_STR	-0,06114	0,181029
GP46	H_CBC_DFC	-0,41331	0,002579	**GP46**	H_CBC_STR	-0,47443	0,001227
GP47	H_CBC_DFC	-0,06845	0,479756	**GP47**	H_CBC_STR	-0,10711	0,288343
GP48	H_CBC_DFC	-0,57934	0,001709	**GP48**	H_CBC_STR	-0,75691	0,000124
GP49	H_CBC_DFC	-0,01554	0,845136	**GP49**	H_CBC_STR	0,004079	0,950551
GP50	H_CBC_DFC	0,105737	0,069074	**GP50**	H_CBC_STR	0,091188	0,125715
GP51	H_CBC_DFC	-0,13375	0,055093	**GP51**	H_CBC_STR	-0,08427	0,26797
GP52	H_CBC_DFC	-0,28384	0,091031	**GP52**	H_CBC_STR	-0,3438	0,027749
GP53	H_CBC_DFC	-0,28495	0,008516	**GP53**	H_CBC_STR	-0,29697	0,009206
GP54	H_CBC_DFC	-0,04115	0,899782	**GP54**	H_CBC_STR	-0,29603	0,373506
GP55	H_CBC_DFC	-0,38316	0,024878	**GP55**	H_CBC_STR	-0,57333	0,001804
GP56	H_CBC_DFC	-0,03685	0,854274	**GP56**	H_CBC_STR	-0,37296	0,057901
GP57	H_CBC_DFC	0,09791	0,398999	**GP57**	H_CBC_STR	-0,20093	0,065157
GP58	H_CBC_DFC	-0,16673	0,176241	**GP58**	H_CBC_STR	-0,31078	0,019869
GP1	C_CBC_DFC	-0,27473	0,046242	**GP1**	C_CBC_STR	0,195215	0,268867
GP2	C_CBC_DFC	0,032005	0,360763	**GP2**	C_CBC_STR	0,080173	0,017684
GP3	C_CBC_DFC	0,14199	0,052341	**GP3**	C_CBC_STR	0,286245	0,02148
GP4	C_CBC_DFC	-0,0608	0,00044	**GP4**	C_CBC_STR	-0,01811	0,014057
GP5	C_CBC_DFC	0,560446	0,006275	**GP5**	C_CBC_STR	1,517195	0,002123
GP6	C_CBC_DFC	0,661346	0,026988	**GP6**	C_CBC_STR	0,863235	0,093844
GP7	C_CBC_DFC	2,859014	0,001479	**GP7**	C_CBC_STR	3,612332	0,002548
GP8	C_CBC_DFC	0,185485	0,016627	**GP8**	C_CBC_STR	0,008852	0,559264
GP9	C_CBC_DFC	-0,32515	3,39E-05	**GP9**	C_CBC_STR	-0,20854	0,002378
GP10	C_CBC_DFC	0,037038	0,207883	**GP10**	C_CBC_STR	0,203131	0,08917
GP11	C_CBC_DFC	0,014806	0,4222	**GP11**	C_CBC_STR	0,10023	0,013495
GP12	C_CBC_DFC	-1,76447	3,19E-08	**GP12**	C_CBC_STR	-1,99857	3,78E-10
GP13	C_CBC_DFC	-0,13458	0,092963	**GP13**	C_CBC_STR	0,050101	0,09214
GP14	C_CBC_DFC	0,212628	0,0003	**GP14**	C_CBC_STR	0,21556	0,000414
GP15	C_CBC_DFC	0,316738	0,004457	**GP15**	C_CBC_STR	0,354306	4,47E-07
GP16	C_CBC_DFC	-0,59839	1,42E-06	**GP16**	C_CBC_STR	-0,68116	9,78E-06
GP17	C_CBC_DFC	1,285251	0,000587	**GP17**	C_CBC_STR	1,314197	0,002871
GP18	C_CBC_DFC	-0,96678	0,0001	**GP18**	C_CBC_STR	-0,84858	0,012158

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP19	C_CBC_DFC	0,410343	0,000546	**GP19**	C_CBC_STR	-0,02084	0,889281
GP20	C_CBC_DFC	-0,10578	0,001976	**GP20**	C_CBC_STR	-0,29096	0,002031
GP21	C_CBC_DFC	-0,0969	3,19E-05	**GP21**	C_CBC_STR	0,021777	0,072803
GP22	C_CBC_DFC	0,498547	9,52E-05	**GP22**	C_CBC_STR	-0,09865	0,14579
GP23	C_CBC_DFC	0,32425	0,033754	**GP23**	C_CBC_STR	1,192442	0,001013
GP24	C_CBC_DFC	-0,3557	0,00884	**GP24**	C_CBC_STR	-0,19423	0,208825
GP25	C_CBC_DFC	0,247993	0,000514	**GP25**	C_CBC_STR	0,27032	0,000118
GP26	C_CBC_DFC	0,041027	0,774194	**GP26**	C_CBC_STR	0,021759	0,914154
GP27	C_CBC_DFC	0,125575	0,396381	**GP27**	C_CBC_STR	0,320614	0,108663
GP28	C_CBC_DFC	-0,05493	0,497296	**GP28**	C_CBC_STR	-0,11334	0,221628
GP29	C_CBC_DFC	0,167957	0,056063	**GP29**	C_CBC_STR	-0,10728	0,28183
GP30	C_CBC_DFC	-0,19627	0,153369	**GP30**	C_CBC_STR	-0,12948	0,624183
GP31	C_CBC_DFC	-0,03568	0,566583	**GP31**	C_CBC_STR	0,028963	0,733689
GP32	C_CBC_DFC	0,237459	0,00044	**GP32**	C_CBC_STR	-0,06065	0,54083
GP33	C_CBC_DFC	0,297282	0,001776	**GP33**	C_CBC_STR	-0,13719	0,290959
GP34	C_CBC_DFC	-0,71534	0,002244	**GP34**	C_CBC_STR	0,683602	0,544619
GP35	C_CBC_DFC	-0,29039	7,35E-08	**GP35**	C_CBC_STR	-0,19779	9,09E-07
GP36	C_CBC_DFC	-0,14459	0,020938	**GP36**	C_CBC_STR	-0,24615	0,003273
GP37	C_CBC_DFC	0,19125	0,005493	**GP37**	C_CBC_STR	0,423819	0,118947
GP38	C_CBC_DFC	0,456722	0,000278	**GP38**	C_CBC_STR	0,302929	0,010268
GP39	C_CBC_DFC	-0,27907	0,012395	**GP39**	C_CBC_STR	-0,16154	0,188687
GP40	C_CBC_DFC	0,075629	0,028906	**GP40**	C_CBC_STR	-0,0389	0,348831
GP41	C_CBC_DFC	-0,33652	0,001229	**GP41**	C_CBC_STR	-0,42491	0,001425
GP42	C_CBC_DFC	0,362118	5,45E-05	**GP42**	C_CBC_STR	0,178211	0,000244
GP43	C_CBC_DFC	-0,29834	0,001111	**GP43**	C_CBC_STR	-0,37692	0,001013
GP44	C_CBC_DFC	-0,09312	0,043522	**GP44**	C_CBC_STR	-0,22792	0,000693
GP45	C_CBC_DFC	-0,08332	0,016115	**GP45**	C_CBC_STR	-0,04726	0,453108
GP46	C_CBC_DFC	-0,31392	1,96E-07	**GP46**	C_CBC_STR	-0,48078	0,000204
GP47	C_CBC_DFC	-0,12715	0,255882	**GP47**	C_CBC_STR	-0,37142	0,002304
GP48	C_CBC_DFC	-0,32422	0,002379	**GP48**	C_CBC_STR	-0,57437	0,000318
GP49	C_CBC_DFC	-0,02705	0,261801	**GP49**	C_CBC_STR	-0,07152	0,095987
GP50	C_CBC_DFC	0,101752	0,004844	**GP50**	C_CBC_STR	-0,06232	0,114175
GP51	C_CBC_DFC	-0,08498	0,158504	**GP51**	C_CBC_STR	-0,1449	0,015081
GP52	C_CBC_DFC	-0,21932	0,096352	**GP52**	C_CBC_STR	-0,32618	0,027049
GP53	C_CBC_DFC	-0,17717	0,264592	**GP53**	C_CBC_STR	-0,2196	0,025186
GP54	C_CBC_DFC	-0,38247	0,018161	**GP54**	C_CBC_STR	-1,51768	2,91E-09
GP55	C_CBC_DFC	-0,21872	0,062018	**GP55**	C_CBC_STR	-0,5335	0,000897
GP56	C_CBC_DFC	-0,57801	0,004271	**GP56**	C_CBC_STR	-0,95845	0,000179
GP57	C_CBC_DFC	-0,10749	0,152403	**GP57**	C_CBC_STR	-0,3916	0,000285
GP58	C_CBC_DFC	-0,11036	0,082218	**GP58**	C_CBC_STR	-0,24204	0,002081
GP1	M_CBC_DFC	-0,40452	0,046563	**GP1**	M_CBC_STR	-0,32512	0,118947

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP2	M_CBC_DFC	0,044089	0,232516	**GP2**	M_CBC_STR	0,064006	0,033433
GP3	M_CBC_DFC	0,021956	0,842807	**GP3**	M_CBC_STR	0,068626	0,513557
GP4	M_CBC_DFC	-0,03665	0,028298	**GP4**	M_CBC_STR	-0,04026	0,036545
GP5	M_CBC_DFC	0,356195	0,240253	**GP5**	M_CBC_STR	0,821765	0,036545
GP6	M_CBC_DFC	0,718059	0,251001	**GP6**	M_CBC_STR	0,48195	0,359948
GP7	M_CBC_DFC	1,449142	0,0927	**GP7**	M_CBC_STR	2,64827	0,003091
GP8	M_CBC_DFC	0,015705	0,889727	**GP8**	M_CBC_STR	0,002553	0,97546
GP9	M_CBC_DFC	-0,82642	5,46E-05	**GP9**	M_CBC_STR	-0,7628	2,09E-05
GP10	M_CBC_DFC	-0,03867	0,38903	**GP10**	M_CBC_STR	-0,04256	0,339935
GP11	M_CBC_DFC	-0,07597	0,012787	**GP11**	M_CBC_STR	-0,0605	0,019761
GP12	M_CBC_DFC	-2,2967	1,58E-05	**GP12**	M_CBC_STR	-2,6801	1,42E-06
GP13	M_CBC_DFC	-0,58383	0,002123	**GP13**	M_CBC_STR	-0,49892	0,00159
GP14	M_CBC_DFC	0,093658	0,025364	**GP14**	M_CBC_STR	0,004083	0,91621
GP15	M_CBC_DFC	-0,04261	0,778781	**GP15**	M_CBC_STR	0,203368	0,087998
GP16	M_CBC_DFC	-1,54482	6,11E-06	**GP16**	M_CBC_STR	-1,49244	1,07E-05
GP17	M_CBC_DFC	1,359371	0,019213	**GP17**	M_CBC_STR	1,257386	0,003706
GP18	M_CBC_DFC	0,421802	0,170914	**GP18**	M_CBC_STR	0,422125	0,000857
GP19	M_CBC_DFC	0,24347	0,088694	**GP19**	M_CBC_STR	0,42141	0,008992
GP20	M_CBC_DFC	-0,12458	0,084724	**GP20**	M_CBC_STR	-0,10093	0,070703
GP21	M_CBC_DFC	-0,17422	0,001059	**GP21**	M_CBC_STR	-0,09865	0,237524
GP22	M_CBC_DFC	-0,03373	0,75365	**GP22**	M_CBC_STR	-0,17568	0,043571
GP23	M_CBC_DFC	-0,15697	0,367544	**GP23**	M_CBC_STR	0,358917	0,128103
GP24	M_CBC_DFC	-0,12967	0,371276	**GP24**	M_CBC_STR	-0,01696	0,876867
GP25	M_CBC_DFC	0,595304	0,000667	**GP25**	M_CBC_STR	0,615971	0,000485
GP26	M_CBC_DFC	-0,129	0,30167	**GP26**	M_CBC_STR	0,152989	0,070472
GP27	M_CBC_DFC	0,067451	0,705964	**GP27**	M_CBC_STR	0,031506	0,844137
GP28	M_CBC_DFC	-0,2036	0,000378	**GP28**	M_CBC_STR	-0,23311	0,001276
GP29	M_CBC_DFC	0,620196	0,000994	**GP29**	M_CBC_STR	0,442971	0,002439
GP30	M_CBC_DFC	0,129621	0,788513	**GP30**	M_CBC_STR	0,13901	0,523262
GP31	M_CBC_DFC	0,057755	0,198678	**GP31**	M_CBC_STR	-0,05468	0,307982
GP32	M_CBC_DFC	0,319802	3,51E-05	**GP32**	M_CBC_STR	0,303374	0,00148
GP33	M_CBC_DFC	0,232399	0,021536	**GP33**	M_CBC_STR	-0,10224	0,379583
GP34	M_CBC_DFC	-0,26036	0,024803	**GP34**	M_CBC_STR	-0,45061	0,003071
GP35	M_CBC_DFC	-0,14893	0,000188	**GP35**	M_CBC_STR	-0,13178	0,000596
GP36	M_CBC_DFC	-0,09757	0,153369	**GP36**	M_CBC_STR	-0,18033	0,001091
GP37	M_CBC_DFC	0,572892	0,009365	**GP37**	M_CBC_STR	0,268117	0,084206
GP38	M_CBC_DFC	0,38877	0,003536	**GP38**	M_CBC_STR	0,590485	0,000281
GP39	M_CBC_DFC	-0,23086	0,126594	**GP39**	M_CBC_STR	-0,38681	0,000691
GP40	M_CBC_DFC	-0,0721	0,144969	**GP40**	M_CBC_STR	-0,08257	0,04433
GP41	M_CBC_DFC	-0,15258	0,127789	**GP41**	M_CBC_STR	-0,23343	0,018707
GP42	M_CBC_DFC	0,552835	1,46E-06	**GP42**	M_CBC_STR	0,341694	8,22E-06

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP43	M_CBC_DFC	0,261162	0,021859	**GP43**	M_CBC_STR	0,120802	0,099926
GP44	M_CBC_DFC	0,098561	0,051665	**GP44**	M_CBC_STR	0,002293	0,983707
GP45	M_CBC_DFC	0,154486	0,00174	**GP45**	M_CBC_STR	0,185686	0,00971
GP46	M_CBC_DFC	-0,04603	0,550179	**GP46**	M_CBC_STR	0,069576	0,587566
GP47	M_CBC_DFC	0,045936	0,437767	**GP47**	M_CBC_STR	-0,09167	0,103157
GP48	M_CBC_DFC	-0,42697	0,000358	**GP48**	M_CBC_STR	-0,42815	0,000122
GP49	M_CBC_DFC	0,014161	0,836882	**GP49**	M_CBC_STR	0,137844	0,092856
GP50	M_CBC_DFC	0,149915	0,041103	**GP50**	M_CBC_STR	0,052325	0,472039
GP51	M_CBC_DFC	0,01504	0,905009	**GP51**	M_CBC_STR	-0,01229	0,915224
GP52	M_CBC_DFC	-0,22219	0,010858	**GP52**	M_CBC_STR	-0,17758	0,072803
GP53	M_CBC_DFC	-0,13643	0,125603	**GP53**	M_CBC_STR	-0,05814	0,409975
GP54	M_CBC_DFC	0,01745	0,928633	**GP54**	M_CBC_STR	-0,2578	0,160472
GP55	M_CBC_DFC	-0,27859	0,001613	**GP55**	M_CBC_STR	-0,39049	5,45E-05
GP56	M_CBC_DFC	-0,24573	0,000786	**GP56**	M_CBC_STR	-0,33781	0,000439
GP57	M_CBC_DFC	-0,02719	0,718526	**GP57**	M_CBC_STR	-0,07583	0,259334
GP58	M_CBC_DFC	0,057684	0,523262	**GP58**	M_CBC_STR	-0,10562	0,173393
GP1	R_CBC_DFC	0,100579	0,250761	**GP1**	R_CBC_STR	0,095173	0,125207
GP2	R_CBC_DFC	0,015265	0,369588	**GP2**	R_CBC_STR	0,060555	0,001917
GP3	R_CBC_DFC	0,175057	0,00018	**GP3**	R_CBC_STR	0,403042	0,000716
GP4	R_CBC_DFC	-0,0671	4,17E-05	**GP4**	R_CBC_STR	-0,01452	0,448586
GP5	R_CBC_DFC	0,697934	1,71E-06	**GP5**	R_CBC_STR	1,678521	3,91E-09
GP6	R_CBC_DFC	-0,31421	0,263315	**GP6**	R_CBC_STR	1,727624	5,41E-05
GP7	R_CBC_DFC	-2,44771	2,27E-09	**GP7**	R_CBC_STR	-1,66781	1,93E-06
GP8	R_CBC_DFC	-0,01946	0,561599	**GP8**	R_CBC_STR	0,020538	0,741718
GP9	R_CBC_DFC	-0,52679	1,06E-07	**GP9**	R_CBC_STR	-0,45034	3,94E-06
GP10	R_CBC_DFC	-0,13185	0,000857	**GP10**	R_CBC_STR	-0,1378	0,000789
GP11	R_CBC_DFC	-0,01633	0,462978	**GP11**	R_CBC_STR	0,065384	0,048416
GP12	R_CBC_DFC	-2,58201	2,19E-10	**GP12**	R_CBC_STR	-2,79051	2,52E-08
GP13	R_CBC_DFC	-0,62251	6,85E-06	**GP13**	R_CBC_STR	-0,50185	0,000154
GP14	R_CBC_DFC	0,147292	0,001263	**GP14**	R_CBC_STR	0,050375	0,331228
GP15	R_CBC_DFC	0,873543	5,14E-12	**GP15**	R_CBC_STR	0,86554	2,79E-10
GP16	R_CBC_DFC	-1,14123	3,77E-09	**GP16**	R_CBC_STR	-1,15469	2,91E-09
GP17	R_CBC_DFC	0,541619	1,42E-07	**GP17**	R_CBC_STR	0,429276	0,000196
GP18	R_CBC_DFC	-0,30286	0,019554	**GP18**	R_CBC_STR	-0,70491	0,00088
GP19	R_CBC_DFC	-0,40323	9,20E-07	**GP19**	R_CBC_STR	-0,57175	3,03E-09
GP20	R_CBC_DFC	-0,20824	2,74E-05	**GP20**	R_CBC_STR	-0,25694	4,17E-05
GP21	R_CBC_DFC	0,113268	0,000474	**GP21**	R_CBC_STR	0,143962	2,86E-06
GP22	R_CBC_DFC	-0,15958	0,00308	**GP22**	R_CBC_STR	-0,34792	4,64E-08
GP23	R_CBC_DFC	-0,25929	0,126594	**GP23**	R_CBC_STR	-0,21818	0,127009
GP24	R_CBC_DFC	0,28333	0,001135	**GP24**	R_CBC_STR	-0,06927	0,427096
GP25	R_CBC_DFC	0,207062	0,000131	**GP25**	R_CBC_STR	0,11966	0,004554

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP26	R_CBC_DFC	-0,47243	7,84E-06	**GP26**	R_CBC_STR	-0,40106	2,90E-05
GP27	R_CBC_DFC	-0,1378	0,049316	**GP27**	R_CBC_STR	-0,19847	0,007204
GP28	R_CBC_DFC	-0,11574	0,003598	**GP28**	R_CBC_STR	-0,24548	0,002692
GP29	R_CBC_DFC	0,687193	4,77E-10	**GP29**	R_CBC_STR	0,71751	2,91E-09
GP30	R_CBC_DFC	0,014991	0,901579	**GP30**	R_CBC_STR	0,309394	0,043189
GP31	R_CBC_DFC	0,433247	8,38E-08	**GP31**	R_CBC_STR	0,212464	7,80E-05
GP32	R_CBC_DFC	0,027187	0,544147	**GP32**	R_CBC_STR	-0,06328	0,311988
GP33	R_CBC_DFC	0,573455	8,57E-08	**GP33**	R_CBC_STR	0,33671	4,91E-07
GP34	R_CBC_DFC	0,083255	0,184024	**GP34**	R_CBC_STR	-0,06463	0,068173
GP35	R_CBC_DFC	-0,07566	0,001416	**GP35**	R_CBC_STR	-0,12824	6,61E-05
GP36	R_CBC_DFC	-0,19049	1,72E-05	**GP36**	R_CBC_STR	-0,17438	0,000255
GP37	R_CBC_DFC	0,491238	4,49E-05	**GP37**	R_CBC_STR	0,36568	0,001347
GP38	R_CBC_DFC	0,210111	0,001887	**GP38**	R_CBC_STR	0,090716	0,246343
GP39	R_CBC_DFC	0,021549	0,862134	**GP39**	R_CBC_STR	-0,07457	0,538598
GP40	R_CBC_DFC	0,166318	0,000841	**GP40**	R_CBC_STR	0,063848	0,184024
GP41	R_CBC_DFC	-0,24488	0,001807	**GP41**	R_CBC_STR	-0,36925	0,000169
GP42	R_CBC_DFC	1,118421	5,14E-12	**GP42**	R_CBC_STR	0,638803	2,91E-09
GP43	R_CBC_DFC	0,329961	4,60E-06	**GP43**	R_CBC_STR	0,135308	0,002958
GP44	R_CBC_DFC	0,279965	2,90E-05	**GP44**	R_CBC_STR	0,12326	0,000979
GP45	R_CBC_DFC	0,138391	0,00106	**GP45**	R_CBC_STR	0,157501	8,97E-06
GP46	R_CBC_DFC	0,521956	3,77E-09	**GP46**	R_CBC_STR	0,34238	7,99E-08
GP47	R_CBC_DFC	0,349426	0,002373	**GP47**	R_CBC_STR	0,206918	0,014671
GP48	R_CBC_DFC	-0,01368	0,9329	**GP48**	R_CBC_STR	-0,50014	4,17E-05
GP49	R_CBC_DFC	0,142844	0,163464	**GP49**	R_CBC_STR	-0,02195	0,361782
GP50	R_CBC_DFC	0,297441	0,001729	**GP50**	R_CBC_STR	0,253262	5,37E-05
GP51	R_CBC_DFC	0,057487	0,440523	**GP51**	R_CBC_STR	-0,01634	0,800208
GP52	R_CBC_DFC	-0,05838	0,718526	**GP52**	R_CBC_STR	-0,01615	0,891348
GP53	R_CBC_DFC	-0,11556	0,09214	**GP53**	R_CBC_STR	-0,18237	0,006898
GP54	R_CBC_DFC	0,7575	0,000452	**GP54**	R_CBC_STR	0,869905	0,000191
GP55	R_CBC_DFC	0,071843	0,586786	**GP55**	R_CBC_STR	0,318849	0,010043
GP56	R_CBC_DFC	0,428048	0,031	**GP56**	R_CBC_STR	0,299389	0,052611
GP57	R_CBC_DFC	0,245294	0,039657	**GP57**	R_CBC_STR	0,223663	0,034435
GP58	R_CBC_DFC	0,049643	0,364638	**GP58**	R_CBC_STR	0,03184	0,575788
GP1	H_CBC_HIP	-0,3979	0,183347	**GP1**	H_DFC_HIP	0,068182	0,617125
GP2	H_CBC_HIP	-0,06931	0,414609	**GP2**	H_DFC_HIP	-0,08268	0,003005
GP3	H_CBC_HIP	-0,1192	0,288343	**GP3**	H_DFC_HIP	0,025858	0,78586
GP4	H_CBC_HIP	-0,07714	0,014951	**GP4**	H_DFC_HIP	-0,02337	0,004271
GP5	H_CBC_HIP	0,383823	0,241404	**GP5**	H_DFC_HIP	0,083242	0,679831
GP6	H_CBC_HIP	0,001409	0,99891	**GP6**	H_DFC_HIP	-0,04802	0,892833
GP7	H_CBC_HIP	2,388662	0,004473	**GP7**	H_DFC_HIP	1,025225	0,199358
GP8	H_CBC_HIP	0,107353	0,091486	**GP8**	H_DFC_HIP	0,019155	0,827931

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP9	H_CBC_HIP	-0,40953	0,002548	**GP9**	H_DFC_HIP	0,025927	0,702155
GP10	H_CBC_HIP	0,02638	0,676604	**GP10**	H_DFC_HIP	-0,02044	0,848733
GP11	H_CBC_HIP	-0,06227	0,173325	**GP11**	H_DFC_HIP	-0,00793	0,853484
GP12	H_CBC_HIP	-1,92828	1,06E-05	**GP12**	H_DFC_HIP	-0,20656	0,136114
GP13	H_CBC_HIP	-0,26343	0,008352	**GP13**	H_DFC_HIP	0,038236	0,525349
GP14	H_CBC_HIP	0,054987	0,281309	**GP14**	H_DFC_HIP	-0,13448	0,000267
GP15	H_CBC_HIP	0,505823	0,000191	**GP15**	H_DFC_HIP	0,329841	0,000409
GP16	H_CBC_HIP	-0,67989	1,92E-07	**GP16**	H_DFC_HIP	-0,06353	0,100978
GP17	H_CBC_HIP	0,842225	0,001111	**GP17**	H_DFC_HIP	-0,29982	0,039821
GP18	H_CBC_HIP	-1,10737	0,000182	**GP18**	H_DFC_HIP	-0,2961	0,129615
GP19	H_CBC_HIP	0,317217	0,021774	**GP19**	H_DFC_HIP	-0,3142	0,014057
GP20	H_CBC_HIP	-0,17446	0,025849	**GP20**	H_DFC_HIP	0,075001	0,31684
GP21	H_CBC_HIP	-0,04896	0,337419	**GP21**	H_DFC_HIP	0,021106	0,718526
GP22	H_CBC_HIP	0,22422	5,45E-05	**GP22**	H_DFC_HIP	-0,2523	3,07E-05
GP23	H_CBC_HIP	0,850518	0,00884	**GP23**	H_DFC_HIP	0,549964	0,021859
GP24	H_CBC_HIP	-0,00422	0,983707	**GP24**	H_DFC_HIP	0,07464	0,541566
GP25	H_CBC_HIP	0,187168	0,12194	**GP25**	H_DFC_HIP	-0,05821	0,535546
GP26	H_CBC_HIP	0,605708	0,006171	**GP26**	H_DFC_HIP	0,253904	0,128103
GP27	H_CBC_HIP	0,31117	0,15224	**GP27**	H_DFC_HIP	0,023561	0,899042
GP28	H_CBC_HIP	0,108079	0,151715	**GP28**	H_DFC_HIP	0,042278	0,524469
GP29	H_CBC_HIP	-0,39563	0,000152	**GP29**	H_DFC_HIP	-0,17788	0,017996
GP30	H_CBC_HIP	1,320777	0,002352	**GP30**	H_DFC_HIP	0,249989	0,237255
GP31	H_CBC_HIP	-0,32472	0,006488	**GP31**	H_DFC_HIP	-0,12356	0,031205
GP32	H_CBC_HIP	0,075233	0,068682	**GP32**	H_DFC_HIP	-0,22946	0,000192
GP33	H_CBC_HIP	0,316369	0,004966	**GP33**	H_DFC_HIP	-0,2486	0,028613
GP34	H_CBC_HIP	0,1954	0,664807	**GP34**	H_DFC_HIP	0,258236	0,603901
GP35	H_CBC_HIP	-0,06876	0,189689	**GP35**	H_DFC_HIP	0,105424	0,000746
GP36	H_CBC_HIP	-0,19198	0,006852	**GP36**	H_DFC_HIP	-0,06413	0,131566
GP37	H_CBC_HIP	0,441554	0,008623	**GP37**	H_DFC_HIP	0,127079	0,140864
GP38	H_CBC_HIP	0,253748	0,007924	**GP38**	H_DFC_HIP	0,039221	0,256615
GP39	H_CBC_HIP	-0,21667	0,114175	**GP39**	H_DFC_HIP	0,033011	0,644731
GP40	H_CBC_HIP	0,057077	0,313557	**GP40**	H_DFC_HIP	-0,02776	0,560309
GP41	H_CBC_HIP	-0,31159	0,029678	**GP41**	H_DFC_HIP	0,036571	0,710371
GP42	H_CBC_HIP	0,50434	0,002345	**GP42**	H_DFC_HIP	-0,12198	0,342048
GP43	H_CBC_HIP	-0,1364	0,023136	**GP43**	H_DFC_HIP	-0,02331	0,722752
GP44	H_CBC_HIP	-0,0725	0,359124	**GP44**	H_DFC_HIP	0,113131	0,103999
GP45	H_CBC_HIP	0,106745	0,128192	**GP45**	H_DFC_HIP	0,177057	0,001798
GP46	H_CBC_HIP	-0,40316	0,004517	**GP46**	H_DFC_HIP	-0,02876	0,206503
GP47	H_CBC_HIP	-0,26607	0,016914	**GP47**	H_DFC_HIP	-0,2263	0,012881
GP48	H_CBC_HIP	-0,6033	0,000967	**GP48**	H_DFC_HIP	-0,08222	0,210795
GP49	H_CBC_HIP	0,202922	0,068918	**GP49**	H_DFC_HIP	0,203475	0,047179

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP50	H_CBC_HIP	0,016109	0,762927	**GP50**	H_DFC_HIP	-0,10613	0,028633
GP51	H_CBC_HIP	-0,13181	0,065169	**GP51**	H_DFC_HIP	-0,01272	0,848733
GP52	H_CBC_HIP	-0,25463	0,106726	**GP52**	H_DFC_HIP	-0,02785	0,838589
GP53	H_CBC_HIP	-0,28055	0,002072	**GP53**	H_DFC_HIP	-0,02412	0,766866
GP54	H_CBC_HIP	-0,37085	0,242345	**GP54**	H_DFC_HIP	-0,35319	0,195314
GP55	H_CBC_HIP	-0,46482	0,007804	**GP55**	H_DFC_HIP	-0,10362	0,331228
GP56	H_CBC_HIP	0,002843	0,991377	**GP56**	H_DFC_HIP	0,025829	0,848845
GP57	H_CBC_HIP	-0,11813	0,325344	**GP57**	H_DFC_HIP	-0,22784	0,028452
GP58	H_CBC_HIP	-0,19023	0,182527	**GP58**	H_DFC_HIP	-0,02811	0,437088
GP1	C_CBC_HIP	-0,40876	0,019904	**GP1**	C_DFC_HIP	-0,13402	0,039905
GP2	C_CBC_HIP	-0,00777	0,867589	**GP2**	C_DFC_HIP	-0,03978	0,274268
GP3	C_CBC_HIP	-0,03509	0,554092	**GP3**	C_DFC_HIP	-0,17708	0,000778
GP4	C_CBC_HIP	-0,03644	0,063374	**GP4**	C_DFC_HIP	0,024363	0,110097
GP5	C_CBC_HIP	0,093212	0,584193	**GP5**	C_DFC_HIP	-0,46723	3,35E-05
GP6	C_CBC_HIP	1,467766	0,001169	**GP6**	C_DFC_HIP	0,80642	0,007616
GP7	C_CBC_HIP	2,095054	0,000967	**GP7**	C_DFC_HIP	-0,76396	0,09214
GP8	C_CBC_HIP	0,008893	0,579534	**GP8**	C_DFC_HIP	-0,17659	0,027428
GP9	C_CBC_HIP	-0,24237	0,001805	**GP9**	C_DFC_HIP	0,082773	0,039756
GP10	C_CBC_HIP	0,036284	0,012656	**GP10**	C_DFC_HIP	-0,00075	0,983707
GP11	C_CBC_HIP	0,070126	0,00103	**GP11**	C_DFC_HIP	0,05532	0,041529
GP12	C_CBC_HIP	-2,00818	2,79E-08	**GP12**	C_DFC_HIP	-0,2437	0,05022
GP13	C_CBC_HIP	-0,1648	0,027724	**GP13**	C_DFC_HIP	-0,03023	0,791059
GP14	C_CBC_HIP	0,099629	0,007933	**GP14**	C_DFC_HIP	-0,113	0,027819
GP15	C_CBC_HIP	0,429929	5,57E-06	**GP15**	C_DFC_HIP	0,113191	0,212125
GP16	C_CBC_HIP	-0,41228	4,17E-05	**GP16**	C_DFC_HIP	0,186108	0,003511
GP17	C_CBC_HIP	1,868251	2,31E-05	**GP17**	C_DFC_HIP	0,583	0,006319
GP18	C_CBC_HIP	-0,79471	0,000349	**GP18**	C_DFC_HIP	0,172061	0,152271
GP19	C_CBC_HIP	0,24651	0,037657	**GP19**	C_DFC_HIP	-0,16383	0,096021
GP20	C_CBC_HIP	-0,02563	0,561024	**GP20**	C_DFC_HIP	0,080144	0,020992
GP21	C_CBC_HIP	-0,02545	0,418093	**GP21**	C_DFC_HIP	0,071453	0,063516
GP22	C_CBC_HIP	-0,18522	0,000994	**GP22**	C_DFC_HIP	-0,68376	2,90E-05
GP23	C_CBC_HIP	0,498408	0,001787	**GP23**	C_DFC_HIP	0,174159	0,33872
GP24	C_CBC_HIP	-0,3765	0,007204	**GP24**	C_DFC_HIP	-0,02079	0,675522
GP25	C_CBC_HIP	0,449506	3,61E-05	**GP25**	C_DFC_HIP	0,201513	0,000136
GP26	C_CBC_HIP	0,586784	0,000695	**GP26**	C_DFC_HIP	0,545757	0,002841
GP27	C_CBC_HIP	-0,06379	0,385314	**GP27**	C_DFC_HIP	-0,18937	0,256615
GP28	C_CBC_HIP	0,062751	0,312145	**GP28**	C_DFC_HIP	0,117686	0,016841
GP29	C_CBC_HIP	0,158051	0,10459	**GP29**	C_DFC_HIP	-0,00991	0,892833
GP30	C_CBC_HIP	0,052261	0,689336	**GP30**	C_DFC_HIP	0,248531	0,016712
GP31	C_CBC_HIP	-0,17178	0,000181	**GP31**	C_DFC_HIP	-0,1361	0,023107
GP32	C_CBC_HIP	0,079263	0,089121	**GP32**	C_DFC_HIP	-0,1582	0,000155

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP33	C_CBC_HIP	0,061751	0,361805	**GP33**	C_DFC_HIP	-0,23553	0,000648
GP34	C_CBC_HIP	-0,61292	0,001059	**GP34**	C_DFC_HIP	0,102417	0,599093
GP35	C_CBC_HIP	-0,19701	4,41E-05	**GP35**	C_DFC_HIP	0,09338	0,000192
GP36	C_CBC_HIP	-0,25427	0,00103	**GP36**	C_DFC_HIP	-0,10968	0,000548
GP37	C_CBC_HIP	0,881558	4,79E-05	**GP37**	C_DFC_HIP	0,690308	7,37E-05
GP38	C_CBC_HIP	0,405358	0,000967	**GP38**	C_DFC_HIP	-0,05136	0,413589
GP39	C_CBC_HIP	-0,18844	0,021859	**GP39**	C_DFC_HIP	0,090634	0,145313
GP40	C_CBC_HIP	0,085194	0,05966	**GP40**	C_DFC_HIP	0,009565	0,540183
GP41	C_CBC_HIP	-0,4349	0,000362	**GP41**	C_DFC_HIP	-0,09837	0,009176
GP42	C_CBC_HIP	0,137477	0,010411	**GP42**	C_DFC_HIP	-0,22464	0,009243
GP43	C_CBC_HIP	-0,12283	0,177654	**GP43**	C_DFC_HIP	0,175515	0,018439
GP44	C_CBC_HIP	0,162323	0,001414	**GP44**	C_DFC_HIP	0,255444	0,000245
GP45	C_CBC_HIP	0,07077	0,000414	**GP45**	C_DFC_HIP	0,154088	0,000204
GP46	C_CBC_HIP	-0,37471	1,90E-06	**GP46**	C_DFC_HIP	-0,06079	0,027747
GP47	C_CBC_HIP	-0,37116	3,19E-05	**GP47**	C_DFC_HIP	-0,24401	0,044525
GP48	C_CBC_HIP	-0,45744	0,000339	**GP48**	C_DFC_HIP	-0,13322	0,019299
GP49	C_CBC_HIP	-0,10642	0,000156	**GP49**	C_DFC_HIP	-0,07937	0,00793
GP50	C_CBC_HIP	0,087854	0,021536	**GP50**	C_DFC_HIP	-0,0139	0,34205
GP51	C_CBC_HIP	-0,15077	0,003032	**GP51**	C_DFC_HIP	-0,06579	0,373056
GP52	C_CBC_HIP	-0,1603	0,268867	**GP52**	C_DFC_HIP	0,059018	0,121933
GP53	C_CBC_HIP	-0,27693	0,002038	**GP53**	C_DFC_HIP	-0,09976	0,338628
GP54	C_CBC_HIP	-0,37504	0,059076	**GP54**	C_DFC_HIP	0,007427	0,979665
GP55	C_CBC_HIP	-0,33992	0,002407	**GP55**	C_DFC_HIP	-0,1212	0,012262
GP56	C_CBC_HIP	-0,53103	0,006898	**GP56**	C_DFC_HIP	0,046982	0,771961
GP57	C_CBC_HIP	-0,21961	0,001503	**GP57**	C_DFC_HIP	-0,11213	0,028642
GP58	C_CBC_HIP	-0,03221	0,409536	**GP58**	C_DFC_HIP	0,078151	0,127789
GP1	M_CBC_HIP	-0,34756	0,05335	**GP1**	M_DFC_HIP	0,05696	0,528819
GP2	M_CBC_HIP	0,010201	0,601329	**GP2**	M_DFC_HIP	-0,03389	0,316818
GP3	M_CBC_HIP	-0,02766	0,702155	**GP3**	M_DFC_HIP	-0,04961	0,514419
GP4	M_CBC_HIP	-0,05875	0,000508	**GP4**	M_DFC_HIP	-0,0221	0,126837
GP5	M_CBC_HIP	0,329591	0,197585	**GP5**	M_DFC_HIP	-0,0266	0,947671
GP6	M_CBC_HIP	0,306345	0,577894	**GP6**	M_DFC_HIP	-0,41171	0,391253
GP7	M_CBC_HIP	1,717873	0,001362	**GP7**	M_DFC_HIP	0,268731	0,746819
GP8	M_CBC_HIP	-0,04314	0,361782	**GP8**	M_DFC_HIP	-0,05884	0,561073
GP9	M_CBC_HIP	-0,70864	4,49E-05	**GP9**	M_DFC_HIP	0,117781	0,335432
GP10	M_CBC_HIP	0,046657	0,26797	**GP10**	M_DFC_HIP	0,085324	0,095442
GP11	M_CBC_HIP	-0,05097	0,076172	**GP11**	M_DFC_HIP	0,025006	0,364638
GP12	M_CBC_HIP	-2,55627	1,44E-06	**GP12**	M_DFC_HIP	-0,25957	0,233687
GP13	M_CBC_HIP	-0,55664	0,001012	**GP13**	M_DFC_HIP	0,027192	0,867589
GP14	M_CBC_HIP	-0,01998	0,575788	**GP14**	M_DFC_HIP	-0,11364	0,004014
GP15	M_CBC_HIP	0,367758	0,089276	**GP15**	M_DFC_HIP	0,410363	0,127789

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP16	M_CBC_HIP	-1,41882	9,78E-06	**GP16**	M_DFC_HIP	0,125993	0,256615
GP17	M_CBC_HIP	0,726373	0,048982	**GP17**	M_DFC_HIP	-0,633	0,243047
GP18	M_CBC_HIP	-0,04225	0,858883	**GP18**	M_DFC_HIP	-0,46405	0,200104
GP19	M_CBC_HIP	0,385569	0,006737	**GP19**	M_DFC_HIP	0,142099	0,376867
GP20	M_CBC_HIP	0,055237	0,578441	**GP20**	M_DFC_HIP	0,179819	0,180666
GP21	M_CBC_HIP	-0,17097	0,004571	**GP21**	M_DFC_HIP	0,003245	0,933358
GP22	M_CBC_HIP	-0,16851	0,12181	**GP22**	M_DFC_HIP	-0,13478	0,269048
GP23	M_CBC_HIP	0,191724	0,237255	**GP23**	M_DFC_HIP	0,348698	0,175874
GP24	M_CBC_HIP	-0,1631	0,251001	**GP24**	M_DFC_HIP	-0,03343	0,863615
GP25	M_CBC_HIP	0,503967	0,012238	**GP25**	M_DFC_HIP	-0,09134	0,644731
GP26	M_CBC_HIP	0,534879	0,024878	**GP26**	M_DFC_HIP	0,663875	0,011552
GP27	M_CBC_HIP	-0,07722	0,449735	**GP27**	M_DFC_HIP	-0,14467	0,387877
GP28	M_CBC_HIP	-0,06815	0,225105	**GP28**	M_DFC_HIP	0,135453	0,012217
GP29	M_CBC_HIP	0,356384	0,004006	**GP29**	M_DFC_HIP	-0,26381	0,14345
GP30	M_CBC_HIP	0,128225	0,611953	**GP30**	M_DFC_HIP	-0,0014	0,998742
GP31	M_CBC_HIP	0,032843	0,110097	**GP31**	M_DFC_HIP	-0,02491	0,562106
GP32	M_CBC_HIP	0,218501	6,96E-05	**GP32**	M_DFC_HIP	-0,1013	0,107966
GP33	M_CBC_HIP	0,049055	0,654295	**GP33**	M_DFC_HIP	-0,18334	0,064318
GP34	M_CBC_HIP	-0,30506	0,009206	**GP34**	M_DFC_HIP	-0,0447	0,638427
GP35	M_CBC_HIP	-0,12357	0,000274	**GP35**	M_DFC_HIP	0,025358	0,437088
GP36	M_CBC_HIP	-0,16182	0,002434	**GP36**	M_DFC_HIP	-0,06425	0,360763
GP37	M_CBC_HIP	0,593477	0,001156	**GP37**	M_DFC_HIP	0,020585	0,922834
GP38	M_CBC_HIP	0,784739	3,19E-05	**GP38**	M_DFC_HIP	0,395969	0,002439
GP39	M_CBC_HIP	-0,19605	0,134185	**GP39**	M_DFC_HIP	0,034811	0,836882
GP40	M_CBC_HIP	-0,01035	0,79878	**GP40**	M_DFC_HIP	0,061756	0,136487
GP41	M_CBC_HIP	-0,2135	0,056927	**GP41**	M_DFC_HIP	-0,06092	0,236808
GP42	M_CBC_HIP	0,310351	0,000107	**GP42**	M_DFC_HIP	-0,24248	0,017114
GP43	M_CBC_HIP	0,295101	0,005086	**GP43**	M_DFC_HIP	0,033939	0,80736
GP44	M_CBC_HIP	0,206617	0,051665	**GP44**	M_DFC_HIP	0,108055	0,295436
GP45	M_CBC_HIP	0,251679	0,005569	**GP45**	M_DFC_HIP	0,097193	0,25002
GP46	M_CBC_HIP	-0,01062	0,892833	**GP46**	M_DFC_HIP	0,035413	0,579895
GP47	M_CBC_HIP	0,023328	0,812044	**GP47**	M_DFC_HIP	-0,02261	0,84672
GP48	M_CBC_HIP	-0,44019	3,64E-05	**GP48**	M_DFC_HIP	-0,01322	0,875128
GP49	M_CBC_HIP	0,086935	0,098595	**GP49**	M_DFC_HIP	0,072774	0,385314
GP50	M_CBC_HIP	0,146779	0,021539	**GP50**	M_DFC_HIP	-0,00314	0,956925
GP51	M_CBC_HIP	0,075633	0,519754	**GP51**	M_DFC_HIP	0,060592	0,361782
GP52	M_CBC_HIP	-0,0161	0,839125	**GP52**	M_DFC_HIP	0,206097	0,004457
GP53	M_CBC_HIP	-0,0793	0,30167	**GP53**	M_DFC_HIP	0,057131	0,428029
GP54	M_CBC_HIP	-0,00029	0,99891	**GP54**	M_DFC_HIP	-0,01774	0,932269
GP55	M_CBC_HIP	-0,27908	0,00106	**GP55**	M_DFC_HIP	-0,00048	0,99741
GP56	M_CBC_HIP	-0,33432	0,000227	**GP56**	M_DFC_HIP	-0,08859	0,203426

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP57	M_CBC_HIP	-0,0991	0,127861	**GP57**	M_DFC_HIP	-0,07191	0,207549
GP58	M_CBC_HIP	-0,01007	0,890563	**GP58**	M_DFC_HIP	-0,06775	0,349519
GP1	R_CBC_HIP	0,175214	0,166841	**GP1**	R_DFC_HIP	0,074634	0,558256
GP2	R_CBC_HIP	0,035989	0,240876	**GP2**	R_DFC_HIP	0,020724	0,461457
GP3	R_CBC_HIP	0,218679	0,000272	**GP3**	R_DFC_HIP	0,043622	0,325397
GP4	R_CBC_HIP	-0,00313	0,831569	**GP4**	R_DFC_HIP	0,063964	0,000807
GP5	R_CBC_HIP	1,243283	8,53E-06	**GP5**	R_DFC_HIP	0,545349	0,003418
GP6	R_CBC_HIP	0,580228	0,249173	**GP6**	R_DFC_HIP	0,894436	0,057086
GP7	R_CBC_HIP	-1,59623	2,35E-05	**GP7**	R_DFC_HIP	0,851477	0,001794
GP8	R_CBC_HIP	0,098536	0,00956	**GP8**	R_DFC_HIP	0,117999	0,000443
GP9	R_CBC_HIP	-0,29171	5,96E-05	**GP9**	R_DFC_HIP	0,235075	8,14E-06
GP10	R_CBC_HIP	0,083422	0,001405	**GP10**	R_DFC_HIP	0,215268	1,83E-06
GP11	R_CBC_HIP	0,05402	0,004673	**GP11**	R_DFC_HIP	0,070355	0,000363
GP12	R_CBC_HIP	-2,64523	2,91E-09	**GP12**	R_DFC_HIP	-0,06321	0,52692
GP13	R_CBC_HIP	-0,44142	3,45E-05	**GP13**	R_DFC_HIP	0,181098	0,001347
GP14	R_CBC_HIP	0,021301	0,561944	**GP14**	R_DFC_HIP	-0,12599	6,06E-07
GP15	R_CBC_HIP	0,804493	3,65E-11	**GP15**	R_DFC_HIP	-0,06905	0,003325
GP16	R_CBC_HIP	-1,03151	3,78E-10	**GP16**	R_DFC_HIP	0,109725	0,012347
GP17	R_CBC_HIP	-0,17486	0,003309	**GP17**	R_DFC_HIP	-0,71648	2,44E-09
GP18	R_CBC_HIP	-0,27484	0,022184	**GP18**	R_DFC_HIP	0,028025	0,780468
GP19	R_CBC_HIP	-0,74193	4,14E-09	**GP19**	R_DFC_HIP	-0,3387	1,06E-05
GP20	R_CBC_HIP	-0,03314	0,362392	**GP20**	R_DFC_HIP	0,175098	0,000272
GP21	R_CBC_HIP	-0,02004	0,472039	**GP21**	R_DFC_HIP	-0,1333	0,001009
GP22	R_CBC_HIP	-0,34616	2,92E-08	**GP22**	R_DFC_HIP	-0,18658	0,000472
GP23	R_CBC_HIP	-0,33855	0,008875	**GP23**	R_DFC_HIP	-0,07926	0,585829
GP24	R_CBC_HIP	0,810331	3,62E-07	**GP24**	R_DFC_HIP	0,527001	7,13E-05
GP25	R_CBC_HIP	-0,00074	0,988883	**GP25**	R_DFC_HIP	-0,2078	0,000204
GP26	R_CBC_HIP	-0,23995	0,000549	**GP26**	R_DFC_HIP	0,23248	0,000962
GP27	R_CBC_HIP	-0,1383	0,017833	**GP27**	R_DFC_HIP	-0,0005	0,992716
GP28	R_CBC_HIP	-0,05777	0,173325	**GP28**	R_DFC_HIP	0,057975	0,06368
GP29	R_CBC_HIP	0,193611	2,90E-05	**GP29**	R_DFC_HIP	-0,49358	2,22E-08
GP30	R_CBC_HIP	-1,14379	1,58E-05	**GP30**	R_DFC_HIP	-1,15878	2,79E-05
GP31	R_CBC_HIP	0,317862	6,94E-06	**GP31**	R_DFC_HIP	-0,11539	0,01875
GP32	R_CBC_HIP	-0,11642	0,034684	**GP32**	R_DFC_HIP	-0,14361	0,002367
GP33	R_CBC_HIP	0,302339	4,96E-07	**GP33**	R_DFC_HIP	-0,27112	0,000143
GP34	R_CBC_HIP	-0,16298	0,003023	**GP34**	R_DFC_HIP	-0,24623	0,001975
GP35	R_CBC_HIP	-0,09964	8,71E-05	**GP35**	R_DFC_HIP	-0,02398	0,225527
GP36	R_CBC_HIP	-0,13085	0,000414	**GP36**	R_DFC_HIP	0,059636	0,052341
GP37	R_CBC_HIP	0,389184	0,001106	**GP37**	R_DFC_HIP	-0,10205	0,129541
GP38	R_CBC_HIP	0,498947	0,000137	**GP38**	R_DFC_HIP	0,288835	0,001841
GP39	R_CBC_HIP	0,074085	0,467185	**GP39**	R_DFC_HIP	0,052536	0,637812

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP40	R_CBC_HIP	0,187715	0,00026	**GP40**	R_DFC_HIP	0,021397	0,600934
GP41	R_CBC_HIP	-0,27801	0,001227	**GP41**	R_DFC_HIP	-0,03313	0,600934
GP42	R_CBC_HIP	0,898396	3,78E-10	**GP42**	R_DFC_HIP	-0,22003	0,000725
GP43	R_CBC_HIP	0,2862	1,95E-06	**GP43**	R_DFC_HIP	-0,04376	0,285271
GP44	R_CBC_HIP	0,21313	0,002011	**GP44**	R_DFC_HIP	-0,06683	0,330207
GP45	R_CBC_HIP	0,219475	4,54E-05	**GP45**	R_DFC_HIP	0,081083	0,081418
GP46	R_CBC_HIP	0,442858	4,08E-06	**GP46**	R_DFC_HIP	-0,0791	0,144351
GP47	R_CBC_HIP	0,218656	0,004357	**GP47**	R_DFC_HIP	-0,13077	0,172605
GP48	R_CBC_HIP	-0,16232	0,016311	**GP48**	R_DFC_HIP	-0,14864	0,316818
GP49	R_CBC_HIP	-0,02815	0,264592	**GP49**	R_DFC_HIP	-0,17099	0,101488
GP50	R_CBC_HIP	0,321844	1,46E-06	**GP50**	R_DFC_HIP	0,024404	0,768125
GP51	R_CBC_HIP	0,11087	0,125025	**GP51**	R_DFC_HIP	0,053383	0,551173
GP52	R_CBC_HIP	0,202148	0,026856	**GP52**	R_DFC_HIP	0,260524	0,069118
GP53	R_CBC_HIP	-0,07184	0,273129	**GP53**	R_DFC_HIP	0,043715	0,492875
GP54	R_CBC_HIP	0,895982	2,90E-05	**GP54**	R_DFC_HIP	0,138482	0,140288
GP55	R_CBC_HIP	0,372712	0,000712	**GP55**	R_DFC_HIP	0,300869	0,005328
GP56	R_CBC_HIP	0,206527	0,103307	**GP56**	R_DFC_HIP	-0,22152	0,128103
GP57	R_CBC_HIP	0,134947	0,028903	**GP57**	R_DFC_HIP	-0,11035	0,307437
GP58	R_CBC_HIP	0,020226	0,611333	**GP58**	R_DFC_HIP	-0,02942	0,522497
GP1	H_HIP_STR	0,188807	0,169949	**GP1**	H_DFC_STR	0,247575	0,002749
GP2	H_HIP_STR	0,030052	0,016914	**GP2**	H_DFC_STR	-0,0441	0,049138
GP3	H_HIP_STR	-0,03133	0,677454	**GP3**	H_DFC_STR	0,010739	0,889727
GP4	H_HIP_STR	0,017933	0,262449	**GP4**	H_DFC_STR	-0,0035	0,836882
GP5	H_HIP_STR	0,199429	0,38903	**GP5**	H_DFC_STR	0,336567	0,070037
GP6	H_HIP_STR	0,71233	0,232516	**GP6**	H_DFC_STR	0,606613	0,245194
GP7	H_HIP_STR	-0,95036	0,267697	**GP7**	H_DFC_STR	0,118072	0,867589
GP8	H_HIP_STR	-0,05264	0,473444	**GP8**	H_DFC_STR	-0,01796	0,809461
GP9	H_HIP_STR	-0,03919	0,497337	**GP9**	H_DFC_STR	-0,00846	0,872135
GP10	H_HIP_STR	0,000858	0,992716	**GP10**	H_DFC_STR	-0,01432	0,892833
GP11	H_HIP_STR	-0,01798	0,746692	**GP11**	H_DFC_STR	-0,02385	0,675522
GP12	H_HIP_STR	-0,33045	0,004783	**GP12**	H_DFC_STR	-0,54894	0,000845
GP13	H_HIP_STR	0,007437	0,948276	**GP13**	H_DFC_STR	0,051706	0,575788
GP14	H_HIP_STR	0,233291	0,006647	**GP14**	H_DFC_STR	0,098411	0,129973
GP15	H_HIP_STR	-0,14326	0,172221	**GP15**	H_DFC_STR	0,205159	0,006009
GP16	H_HIP_STR	0,07197	0,332217	**GP16**	H_DFC_STR	0,00927	0,879266
GP17	H_HIP_STR	0,307162	0,128103	**GP17**	H_DFC_STR	-0,01007	0,941594
GP18	H_HIP_STR	0,481283	0,030858	**GP18**	H_DFC_STR	0,163679	0,218459
GP19	H_HIP_STR	0,235303	0,127789	**GP19**	H_DFC_STR	-0,05987	0,611953
GP20	H_HIP_STR	-0,11409	0,272041	**GP20**	H_DFC_STR	-0,04143	0,58296
GP21	H_HIP_STR	0,099032	0,040585	**GP21**	H_DFC_STR	0,121236	0,001382
GP22	H_HIP_STR	0,127179	0,036561	**GP22**	H_DFC_STR	-0,12003	0,019299

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP23	H_HIP_STR	-0,34387	0,317228	**GP23**	H_DFC_STR	0,218349	0,418766
GP24	H_HIP_STR	0,068591	0,567952	**GP24**	H_DFC_STR	0,143436	0,144883
GP25	H_HIP_STR	0,320371	0,02743	**GP25**	H_DFC_STR	0,263267	0,009243
GP26	H_HIP_STR	-0,03647	0,867589	**GP26**	H_DFC_STR	0,232163	0,114175
GP27	H_HIP_STR	-0,20726	0,278119	**GP27**	H_DFC_STR	-0,17616	0,059076
GP28	H_HIP_STR	-0,05447	0,514419	**GP28**	H_DFC_STR	-0,00863	0,856973
GP29	H_HIP_STR	0,076376	0,367544	**GP29**	H_DFC_STR	-0,11098	0,152425
GP30	H_HIP_STR	0,062291	0,80025	**GP30**	H_DFC_STR	0,341713	0,158963
GP31	H_HIP_STR	0,030565	0,714261	**GP31**	H_DFC_STR	-0,09663	0,174944
GP32	H_HIP_STR	0,16896	0,010176	**GP32**	H_DFC_STR	-0,05496	0,172579
GP33	H_HIP_STR	0,182023	0,129697	**GP33**	H_DFC_STR	-0,08412	0,348831
GP34	H_HIP_STR	-0,57207	0,220214	**GP34**	H_DFC_STR	-0,30368	0,352607
GP35	H_HIP_STR	-0,02218	0,344901	**GP35**	H_DFC_STR	0,083191	0,000331
GP36	H_HIP_STR	-0,06342	0,104154	**GP36**	H_DFC_STR	-0,13022	0,000991
GP37	H_HIP_STR	-0,09642	0,401874	**GP37**	H_DFC_STR	0,04846	0,446883
GP38	H_HIP_STR	-0,06186	0,31494	**GP38**	H_DFC_STR	-0,03086	0,50657
GP39	H_HIP_STR	0,127331	0,473444	**GP39**	H_DFC_STR	0,151592	0,295262
GP40	H_HIP_STR	0,090834	0,146963	**GP40**	H_DFC_STR	0,060388	0,204855
GP41	H_HIP_STR	-0,03839	0,718526	**GP41**	H_DFC_STR	0,004141	0,945859
GP42	H_HIP_STR	0,084401	0,560309	**GP42**	H_DFC_STR	-0,05749	0,560994
GP43	H_HIP_STR	-0,07271	0,196601	**GP43**	H_DFC_STR	-0,09679	0,027515
GP44	H_HIP_STR	-0,14897	0,031954	**GP44**	H_DFC_STR	-0,04865	0,274268
GP45	H_HIP_STR	-0,15576	0,005155	**GP45**	H_DFC_STR	0,023074	0,195314
GP46	H_HIP_STR	-0,02944	0,281309	**GP46**	H_DFC_STR	-0,06112	0,052341
GP47	H_HIP_STR	0,194589	0,028642	**GP47**	H_DFC_STR	-0,03866	0,506527
GP48	H_HIP_STR	-0,09236	0,025206	**GP48**	H_DFC_STR	-0,17757	0,015222
GP49	H_HIP_STR	-0,1899	0,050865	**GP49**	H_DFC_STR	0,019622	0,776114
GP50	H_HIP_STR	0,092278	0,070754	**GP50**	H_DFC_STR	-0,01455	0,68822
GP51	H_HIP_STR	0,061589	0,41043	**GP51**	H_DFC_STR	0,049472	0,489704
GP52	H_HIP_STR	-0,01937	0,741718	**GP52**	H_DFC_STR	-0,05996	0,514419
GP53	H_HIP_STR	0,017175	0,842807	**GP53**	H_DFC_STR	-0,01202	0,881493
GP54	H_HIP_STR	0,147365	0,607972	**GP54**	H_DFC_STR	-0,25488	0,282588
GP55	H_HIP_STR	-0,07867	0,382961	**GP55**	H_DFC_STR	-0,19016	0,044132
GP56	H_HIP_STR	-0,3392	0,033754	**GP56**	H_DFC_STR	-0,33611	0,003572
GP57	H_HIP_STR	-0,06712	0,482087	**GP57**	H_DFC_STR	-0,29884	0,002233
GP58	H_HIP_STR	-0,10973	0,07737	**GP58**	H_DFC_STR	-0,14406	0,002345
GP1	C_HIP_STR	0,594854	0,025364	**GP1**	C_DFC_STR	0,456734	0,028298
GP2	C_HIP_STR	0,084713	0,125603	**GP2**	C_DFC_STR	0,045204	0,310077
GP3	C_HIP_STR	0,311439	0,002213	**GP3**	C_DFC_STR	0,143247	0,004673
GP4	C_HIP_STR	0,012633	0,487363	**GP4**	C_DFC_STR	0,038404	0,002753
GP5	C_HIP_STR	1,391385	0,000373	**GP5**	C_DFC_STR	0,91585	0,003598

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP6	C_HIP_STR	-0,61745	0,361924	**GP6**	C_DFC_STR	0,158	0,800208
GP7	C_HIP_STR	1,429618	0,025206	**GP7**	C_DFC_STR	0,513054	0,367544
GP8	C_HIP_STR	0,003281	0,858954	**GP8**	C_DFC_STR	-0,16167	0,064341
GP9	C_HIP_STR	0,009059	0,797663	**GP9**	C_DFC_STR	0,102561	0,004571
GP10	C_HIP_STR	0,167619	0,122568	**GP10**	C_DFC_STR	0,180262	0,131566
GP11	C_HIP_STR	0,032122	0,197585	**GP11**	C_DFC_STR	0,093845	0,046624
GP12	C_HIP_STR	-0,00671	0,936374	**GP12**	C_DFC_STR	-0,21309	0,022708
GP13	C_HIP_STR	0,207509	0,05335	**GP13**	C_DFC_STR	0,190556	0,047777
GP14	C_HIP_STR	0,124007	0,017114	**GP14**	C_DFC_STR	0,012834	0,708555
GP15	C_HIP_STR	-0,08467	0,095245	**GP15**	C_DFC_STR	0,042732	0,660253
GP16	C_HIP_STR	-0,27107	0,002457	**GP16**	C_DFC_STR	-0,0763	0,09214
GP17	C_HIP_STR	-0,59286	0,004717	**GP17**	C_DFC_STR	-0,07912	0,575788
GP18	C_HIP_STR	-0,05842	0,778781	**GP18**	C_DFC_STR	0,108702	0,461457
GP19	C_HIP_STR	-0,22233	0,034189	**GP19**	C_DFC_STR	-0,42463	0,013944
GP20	C_HIP_STR	-0,28056	7,38E-05	**GP20**	C_DFC_STR	-0,1886	0,004517
GP21	C_HIP_STR	0,048671	0,131566	**GP21**	C_DFC_STR	0,117706	0,000222
GP22	C_HIP_STR	0,088916	0,046211	**GP22**	C_DFC_STR	-0,59214	0,001256
GP23	C_HIP_STR	0,717314	0,005485	**GP23**	C_DFC_STR	0,896032	0,021536
GP24	C_HIP_STR	0,157894	0,15244	**GP24**	C_DFC_STR	0,156339	0,125848
GP25	C_HIP_STR	-0,18137	0,019554	**GP25**	C_DFC_STR	0,01314	0,842807
GP26	C_HIP_STR	-0,50326	0,004518	**GP26**	C_DFC_STR	-0,0017	0,989195
GP27	C_HIP_STR	0,352502	0,019554	**GP27**	C_DFC_STR	0,228902	0,333303
GP28	C_HIP_STR	-0,16385	0,073692	**GP28**	C_DFC_STR	-0,03611	0,718526
GP29	C_HIP_STR	-0,27516	0,017321	**GP29**	C_DFC_STR	-0,27474	0,002315
GP30	C_HIP_STR	-0,1763	0,267697	**GP30**	C_DFC_STR	0,057286	0,790595
GP31	C_HIP_STR	0,213935	0,015461	**GP31**	C_DFC_STR	0,085877	0,509423
GP32	C_HIP_STR	-0,1497	0,038079	**GP32**	C_DFC_STR	-0,31461	0,002323
GP33	C_HIP_STR	-0,18621	0,038561	**GP33**	C_DFC_STR	-0,43642	0,000822
GP34	C_HIP_STR	1,279981	0,257727	**GP34**	C_DFC_STR	1,357225	0,181391
GP35	C_HIP_STR	-0,00931	0,664807	**GP35**	C_DFC_STR	0,089039	1,26E-05
GP36	C_HIP_STR	0,033722	0,626214	**GP36**	C_DFC_STR	-0,07708	0,249173
GP37	C_HIP_STR	-0,47227	0,194283	**GP37**	C_DFC_STR	0,227011	0,364638
GP38	C_HIP_STR	-0,06471	0,467827	**GP38**	C_DFC_STR	-0,13793	0,002123
GP39	C_HIP_STR	0,053841	0,447294	**GP39**	C_DFC_STR	0,15453	0,170331
GP40	C_HIP_STR	-0,11092	0,005485	**GP40**	C_DFC_STR	-0,10721	0,001111
GP41	C_HIP_STR	0,021873	0,360286	**GP41**	C_DFC_STR	-0,08901	0,002093
GP42	C_HIP_STR	0,051775	0,441177	**GP42**	C_DFC_STR	-0,17523	0,002095
GP43	C_HIP_STR	-0,23457	0,038912	**GP43**	C_DFC_STR	-0,07055	0,16125
GP44	C_HIP_STR	-0,38887	1,39E-06	**GP44**	C_DFC_STR	-0,12491	0,012238
GP45	C_HIP_STR	-0,11772	0,072645	**GP45**	C_DFC_STR	0,025067	0,556626
GP46	C_HIP_STR	-0,10659	0,129973	**GP46**	C_DFC_STR	-0,16532	0,033269

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP47	C_HIP_STR	0,020117	0,786236	**GP47**	C_DFC_STR	-0,24591	0,005877
GP48	C_HIP_STR	-0,08186	0,05888	**GP48**	C_DFC_STR	-0,21934	0,004357
GP49	C_HIP_STR	0,036641	0,401721	**GP49**	C_DFC_STR	-0,04869	0,263949
GP50	C_HIP_STR	-0,13169	0,001788	**GP50**	C_DFC_STR	-0,15051	5,41E-05
GP51	C_HIP_STR	0,015278	0,829795	**GP51**	C_DFC_STR	-0,03324	0,182932
GP52	C_HIP_STR	-0,10215	0,253598	**GP52**	C_DFC_STR	-0,04682	0,437088
GP53	C_HIP_STR	0,094605	0,019904	**GP53**	C_DFC_STR	0,039211	0,714201
GP54	C_HIP_STR	-1,2231	0,000463	**GP54**	C_DFC_STR	-1,13221	0,000382
GP55	C_HIP_STR	-0,16819	0,0002	**GP55**	C_DFC_STR	-0,27793	0,001189
GP56	C_HIP_STR	-0,47559	0,002929	**GP56**	C_DFC_STR	-0,38087	0,008834
GP57	C_HIP_STR	-0,17737	0,001059	**GP57**	C_DFC_STR	-0,28697	0,003051
GP58	C_HIP_STR	-0,21895	0,000464	**GP58**	C_DFC_STR	-0,1244	0,003071
GP1	M_HIP_STR	0,022443	0,811597	**GP1**	M_DFC_STR	0,079404	0,489704
GP2	M_HIP_STR	0,053805	0,064951	**GP2**	M_DFC_STR	0,019917	0,601329
GP3	M_HIP_STR	0,096283	0,242983	**GP3**	M_DFC_STR	0,04667	0,620305
GP4	M_HIP_STR	0,018489	0,281452	**GP4**	M_DFC_STR	-0,00361	0,858883
GP5	M_HIP_STR	0,492174	0,256615	**GP5**	M_DFC_STR	0,46557	0,268867
GP6	M_HIP_STR	0,175605	0,644731	**GP6**	M_DFC_STR	-0,23611	0,523262
GP7	M_HIP_STR	0,930397	0,240647	**GP7**	M_DFC_STR	1,199128	0,245944
GP8	M_HIP_STR	0,04569	0,511584	**GP8**	M_DFC_STR	-0,01315	0,901919
GP9	M_HIP_STR	-0,05416	0,561024	**GP9**	M_DFC_STR	0,063621	0,540183
GP10	M_HIP_STR	-0,08922	0,087545	**GP10**	M_DFC_STR	-0,0039	0,945775
GP11	M_HIP_STR	-0,00954	0,708432	**GP11**	M_DFC_STR	0,015471	0,523262
GP12	M_HIP_STR	-0,12383	0,411778	**GP12**	M_DFC_STR	-0,3834	0,05528
GP13	M_HIP_STR	0,057716	0,651721	**GP13**	M_DFC_STR	0,084908	0,579583
GP14	M_HIP_STR	0,024059	0,460824	**GP14**	M_DFC_STR	-0,08958	0,0097
GP15	M_HIP_STR	-0,16439	0,499002	**GP15**	M_DFC_STR	0,245974	0,053667
GP16	M_HIP_STR	-0,07362	0,434007	**GP16**	M_DFC_STR	0,052371	0,602231
GP17	M_HIP_STR	0,531014	0,173325	**GP17**	M_DFC_STR	-0,10199	0,861867
GP18	M_HIP_STR	0,464376	0,04433	**GP18**	M_DFC_STR	0,000324	0,99891
GP19	M_HIP_STR	0,035841	0,836882	**GP19**	M_DFC_STR	0,17794	0,240876
GP20	M_HIP_STR	-0,15617	0,199361	**GP20**	M_DFC_STR	0,023651	0,699158
GP21	M_HIP_STR	0,072324	0,382559	**GP21**	M_DFC_STR	0,075569	0,2765
GP22	M_HIP_STR	-0,00717	0,932269	**GP22**	M_DFC_STR	-0,14195	0,142418
GP23	M_HIP_STR	0,167194	0,554305	**GP23**	M_DFC_STR	0,515892	0,045372
GP24	M_HIP_STR	0,146138	0,319988	**GP24**	M_DFC_STR	0,112711	0,459333
GP25	M_HIP_STR	0,112004	0,584125	**GP25**	M_DFC_STR	0,020667	0,900161
GP26	M_HIP_STR	-0,38189	0,089538	**GP26**	M_DFC_STR	0,281986	0,032505
GP27	M_HIP_STR	0,108728	0,37643	**GP27**	M_DFC_STR	-0,03595	0,856618
GP28	M_HIP_STR	-0,16496	0,027672	**GP28**	M_DFC_STR	-0,02951	0,586786
GP29	M_HIP_STR	0,086587	0,58296	**GP29**	M_DFC_STR	-0,17723	0,333531

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP30	M_HIP_STR	0,010785	0,953956	**GP30**	M_DFC_STR	0,009389	0,983707
GP31	M_HIP_STR	-0,08753	0,084206	**GP31**	M_DFC_STR	-0,11244	0,085984
GP32	M_HIP_STR	0,084873	0,295436	**GP32**	M_DFC_STR	-0,01643	0,847086
GP33	M_HIP_STR	-0,1513	0,149146	**GP33**	M_DFC_STR	-0,33464	0,004707
GP34	M_HIP_STR	-0,14555	0,223193	**GP34**	M_DFC_STR	-0,19025	0,131356
GP35	M_HIP_STR	-0,00821	0,808464	**GP35**	M_DFC_STR	0,017152	0,403813
GP36	M_HIP_STR	-0,01851	0,708432	**GP36**	M_DFC_STR	-0,08276	0,190432
GP37	M_HIP_STR	-0,32536	0,033754	**GP37**	M_DFC_STR	-0,30477	0,134481
GP38	M_HIP_STR	-0,19425	0,113882	**GP38**	M_DFC_STR	0,201714	0,11599
GP39	M_HIP_STR	-0,19077	0,083645	**GP39**	M_DFC_STR	-0,15595	0,182192
GP40	M_HIP_STR	-0,07222	0,050895	**GP40**	M_DFC_STR	-0,01046	0,808025
GP41	M_HIP_STR	-0,01993	0,754083	**GP41**	M_DFC_STR	-0,08085	0,110097
GP42	M_HIP_STR	0,031343	0,561599	**GP42**	M_DFC_STR	-0,21114	0,010043
GP43	M_HIP_STR	-0,1743	0,1023	**GP43**	M_DFC_STR	-0,14036	0,232791
GP44	M_HIP_STR	-0,20432	0,120388	**GP44**	M_DFC_STR	-0,09627	0,293361
GP45	M_HIP_STR	-0,06599	0,517231	**GP45**	M_DFC_STR	0,0312	0,654429
GP46	M_HIP_STR	0,080195	0,508589	**GP46**	M_DFC_STR	0,115608	0,257629
GP47	M_HIP_STR	-0,115	0,261801	**GP47**	M_DFC_STR	-0,13761	0,033433
GP48	M_HIP_STR	0,01204	0,851455	**GP48**	M_DFC_STR	-0,00118	0,991377
GP49	M_HIP_STR	0,050908	0,58366	**GP49**	M_DFC_STR	0,123683	0,145073
GP50	M_HIP_STR	-0,09445	0,114438	**GP50**	M_DFC_STR	-0,09759	0,129973
GP51	M_HIP_STR	-0,08792	0,167073	**GP51**	M_DFC_STR	-0,02733	0,726245
GP52	M_HIP_STR	-0,16148	0,068918	**GP52**	M_DFC_STR	0,044615	0,664807
GP53	M_HIP_STR	0,021158	0,590941	**GP53**	M_DFC_STR	0,078289	0,213895
GP54	M_HIP_STR	-0,25751	0,110097	**GP54**	M_DFC_STR	-0,27525	0,131102
GP55	M_HIP_STR	-0,11142	0,178547	**GP55**	M_DFC_STR	-0,1119	0,145518
GP56	M_HIP_STR	-0,00349	0,972068	**GP56**	M_DFC_STR	-0,09209	0,195314
GP57	M_HIP_STR	0,023273	0,676148	**GP57**	M_DFC_STR	-0,04864	0,367544
GP58	M_HIP_STR	-0,09555	0,126792	**GP58**	M_DFC_STR	-0,1633	0,01811
GP1	R_HIP_STR	-0,06725	0,583043	**GP1**	R_DFC_STR	0,007787	0,914436
GP2	R_HIP_STR	0,02755	0,350129	**GP2**	R_DFC_STR	0,04617	0,001082
GP3	R_HIP_STR	0,191038	0,058224	**GP3**	R_DFC_STR	0,226508	0,018942
GP4	R_HIP_STR	-0,01161	0,608333	**GP4**	R_DFC_STR	0,051363	0,023512
GP5	R_HIP_STR	0,42247	0,028903	**GP5**	R_DFC_STR	0,968347	2,72E-07
GP6	R_HIP_STR	1,097678	0,040585	**GP6**	R_DFC_STR	1,975666	2,41E-07
GP7	R_HIP_STR	-0,07986	0,771127	**GP7**	R_DFC_STR	0,796066	0,000243
GP8	R_HIP_STR	-0,07463	0,196386	**GP8**	R_DFC_STR	0,040546	0,461457
GP9	R_HIP_STR	-0,16277	0,000401	**GP9**	R_DFC_STR	0,077245	0,017199
GP10	R_HIP_STR	-0,22069	1,93E-06	**GP10**	R_DFC_STR	-0,00194	0,955289
GP11	R_HIP_STR	0,01338	0,638427	**GP11**	R_DFC_STR	0,084483	0,017013
GP12	R_HIP_STR	-0,17105	0,249173	**GP12**	R_DFC_STR	-0,21667	0,1023

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP13	R_HIP_STR	-0,05382	0,302552	**GP13**	R_DFC_STR	0,125679	0,087917
GP14	R_HIP_STR	0,033491	0,358051	**GP14**	R_DFC_STR	-0,09237	0,021906
GP15	R_HIP_STR	0,058756	0,037863	**GP15**	R_DFC_STR	-0,00677	0,77316
GP16	R_HIP_STR	-0,11331	0,006879	**GP16**	R_DFC_STR	0,001421	0,983707
GP17	R_HIP_STR	0,605643	9,13E-06	**GP17**	R_DFC_STR	-0,10975	0,141477
GP18	R_HIP_STR	-0,43962	0,005807	**GP18**	R_DFC_STR	-0,39898	0,013495
GP19	R_HIP_STR	0,173707	0,001302	**GP19**	R_DFC_STR	-0,16042	0,000362
GP20	R_HIP_STR	-0,22684	0,000194	**GP20**	R_DFC_STR	-0,04726	0,19507
GP21	R_HIP_STR	0,163579	0,000107	**GP21**	R_DFC_STR	0,027783	0,221688
GP22	R_HIP_STR	0,000953	0,970192	**GP22**	R_DFC_STR	-0,17891	0,001015
GP23	R_HIP_STR	0,139838	0,337419	**GP23**	R_DFC_STR	0,064529	0,75365
GP24	R_HIP_STR	-0,89481	3,27E-06	**GP24**	R_DFC_STR	-0,35373	0,003596
GP25	R_HIP_STR	0,119837	0,006861	**GP25**	R_DFC_STR	-0,08821	0,023251
GP26	R_HIP_STR	-0,14876	0,010411	**GP26**	R_DFC_STR	0,082185	0,214556
GP27	R_HIP_STR	-0,05255	0,251001	**GP27**	R_DFC_STR	-0,04867	0,392689
GP28	R_HIP_STR	-0,18449	0,010074	**GP28**	R_DFC_STR	-0,1275	0,040984
GP29	R_HIP_STR	0,52441	8,24E-08	**GP29**	R_DFC_STR	0,028951	0,514419
GP30	R_HIP_STR	1,467424	2,66E-05	**GP30**	R_DFC_STR	0,302206	0,084263
GP31	R_HIP_STR	-0,10687	0,031602	**GP31**	R_DFC_STR	-0,21759	8,71E-05
GP32	R_HIP_STR	0,064487	0,128721	**GP32**	R_DFC_STR	-0,08363	0,090665
GP33	R_HIP_STR	0,032419	0,437767	**GP33**	R_DFC_STR	-0,24459	0,001135
GP34	R_HIP_STR	0,091145	0,089161	**GP34**	R_DFC_STR	-0,154	0,035862
GP35	R_HIP_STR	-0,0267	0,182932	**GP35**	R_DFC_STR	-0,05035	0,027873
GP36	R_HIP_STR	-0,04236	0,251254	**GP36**	R_DFC_STR	0,02193	0,473124
GP37	R_HIP_STR	-0,00683	0,933358	**GP37**	R_DFC_STR	-0,11196	0,070804
GP38	R_HIP_STR	-0,40611	0,00105	**GP38**	R_DFC_STR	-0,11319	0,016432
GP39	R_HIP_STR	-0,13738	0,268867	**GP39**	R_DFC_STR	-0,07821	0,572514
GP40	R_HIP_STR	-0,12104	0,019533	**GP40**	R_DFC_STR	-0,09642	0,028446
GP41	R_HIP_STR	-0,0774	0,272041	**GP41**	R_DFC_STR	-0,11593	0,114438
GP42	R_HIP_STR	-0,25681	0,000257	**GP42**	R_DFC_STR	-0,48582	3,10E-07
GP43	R_HIP_STR	-0,15122	0,001639	**GP43**	R_DFC_STR	-0,19493	0,001184
GP44	R_HIP_STR	-0,09009	0,175306	**GP44**	R_DFC_STR	-0,16326	0,002608
GP45	R_HIP_STR	-0,06317	0,133587	**GP45**	R_DFC_STR	0,010718	0,790595
GP46	R_HIP_STR	-0,10707	0,087917	**GP46**	R_DFC_STR	-0,18351	0,000257
GP47	R_HIP_STR	-0,00226	0,959935	**GP47**	R_DFC_STR	-0,1441	0,183347
GP48	R_HIP_STR	-0,33368	0,000464	**GP48**	R_DFC_STR	-0,48128	0,010583
GP49	R_HIP_STR	0,00896	0,751272	**GP49**	R_DFC_STR	-0,16364	0,149116
GP50	R_HIP_STR	-0,06477	0,084206	**GP50**	R_DFC_STR	-0,04266	0,624183
GP51	R_HIP_STR	-0,1152	0,22381	**GP51**	R_DFC_STR	-0,06574	0,50657
GP52	R_HIP_STR	-0,20684	0,014832	**GP52**	R_DFC_STR	0,050875	0,77316
GP53	R_HIP_STR	-0,11582	0,056507	**GP53**	R_DFC_STR	-0,07254	0,225527

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP54	R_HIP_STR	-0,05152	0,631643	**GP54**	R_DFC_STR	0,08154	0,554092
GP55	R_HIP_STR	-0,06716	0,440523	**GP55**	R_DFC_STR	0,224862	0,102377
GP56	R_HIP_STR	0,068982	0,427096	**GP56**	R_DFC_STR	-0,1582	0,344901
GP57	R_HIP_STR	0,083282	0,401864	**GP57**	R_DFC_STR	-0,03766	0,800208
GP58	R_HIP_STR	0,00629	0,899782	**GP58**	R_DFC_STR	-0,02636	0,663089

Dodatak 4. Statistički značajni kromatografski pikovi nakon prilagodbe na višestruko testiranje (Poglavlje 3.6.) između N-glikoma mozga različitih vrsta i tijekom razvoja čovjeka. Utjecaj govori koliko je puta veća/manja srednja vrijednost prva vrsta/druga vrsta za određeni kromatografski pik kad se vrijednost utjecaja stavi u eksponent baze prirodnog logaritma *e*. Kromatografski pikovi su poredani po značajnosti. C – čimpanza, F – fetus, H – odrasli čovjek, M – makaki majmun, R – štakor.

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP5	H-F	1,1288	7,74E-15	**GP39**	H-C	0,3058	0,0005
GP38	H-F	-0,4274	4,12E-12	**GP47**	H-C	-0,2266	0,0016
GP17	H-F	-0,3240	8,19E-12	**GP22**	H-C	-0,1676	0,0021
GP24	H-F	-0,3314	9,77E-11	**GP46**	H-C	-0,0977	0,0066
GP13	H-F	0,5554	1,30E-10	**GP50**	H-C	-0,1872	0,0139
GP37	H-F	-0,3663	4,86E-09	**GP52**	H-C	0,1439	0,0328
GP7	H-F	0,4704	1,71E-08	**GP41**	H-C	-0,1614	0,0376
GP44	H-F	-0,6996	2,74E-08	**GP49**	H-C	-0,2352	0,0392
GP36	H-F	-0,5679	4,04E-08	**GP38**	H-C	0,0549	0,0491
GP19	H-F	0,3533	7,80E-08	**GP37**	H-C	0,0972	0,0577
GP35	H-F	-0,4816	2,24E-07	**GP5**	H-C	-0,1228	0,0626
GP54	H-F	0,4797	7,52E-06	**GP55**	H-C	0,1746	0,0719
GP22	H-F	0,2438	8,05E-06	**GP26**	H-C	-0,1347	0,0756
GP43	H-F	-0,3258	1,70E-05	**GP48**	H-C	0,0813	0,0923
GP8	H-F	-1,5975	3,32E-05	**GP1**	H-C	-0,1555	0,1077
GP11	H-F	0,7033	0,0001	**GP33**	H-C	-0,0865	0,1323
GP29	H-F	-0,2547	0,0002	**GP2**	H-C	-0,1198	0,1548
GP49	H-F	0,6115	0,0002	**GP14**	H-C	-0,0863	0,1820
GP34	H-F	-0,6608	0,0002	**GP36**	H-C	-0,0861	0,1868
GP1	H-F	0,4963	0,0003	**GP19**	H-C	0,0424	0,2226
GP16	H-F	-0,2775	0,0004	**GP45**	H-C	0,0517	0,2335
GP26	H-F	0,3107	0,0006	**GP27**	H-C	0,1324	0,2724
GP3	H-F	-0,6233	0,0006	**GP24**	H-C	-0,0324	0,2881
GP6	H-F	0,1381	0,0008	**GP44**	H-C	0,0847	0,2947
GP18	H-F	-0,0964	0,0044	**GP58**	H-C	0,1639	0,3565
GP52	H-F	-0,2575	0,0054	**GP42**	H-C	-0,0591	0,3575
GP28	H-F	-0,1861	0,0062	**GP32**	H-C	-0,0545	0,3865
GP31	H-F	-0,1692	0,0088	**GP28**	H-C	0,0443	0,3914
GP30	H-F	-0,0777	0,0105	**GP13**	H-C	-0,0387	0,4004
GP32	H-F	0,1643	0,0191	**GP25**	H-C	0,1086	0,4228
GP56	H-F	0,1903	0,0232	**GP15**	H-C	0,0335	0,4278
GP42	H-F	0,1691	0,0500	**GP3**	H-C	-0,0850	0,4450
GP2	H-F	0,1759	0,0590	**GP53**	H-C	0,0809	0,4942
GP58	H-F	-0,3813	0,0813	**GP23**	H-C	0,0453	0,5225
GP27	H-F	0,1956	0,1378	**GP8**	H-C	-0,1708	0,5295

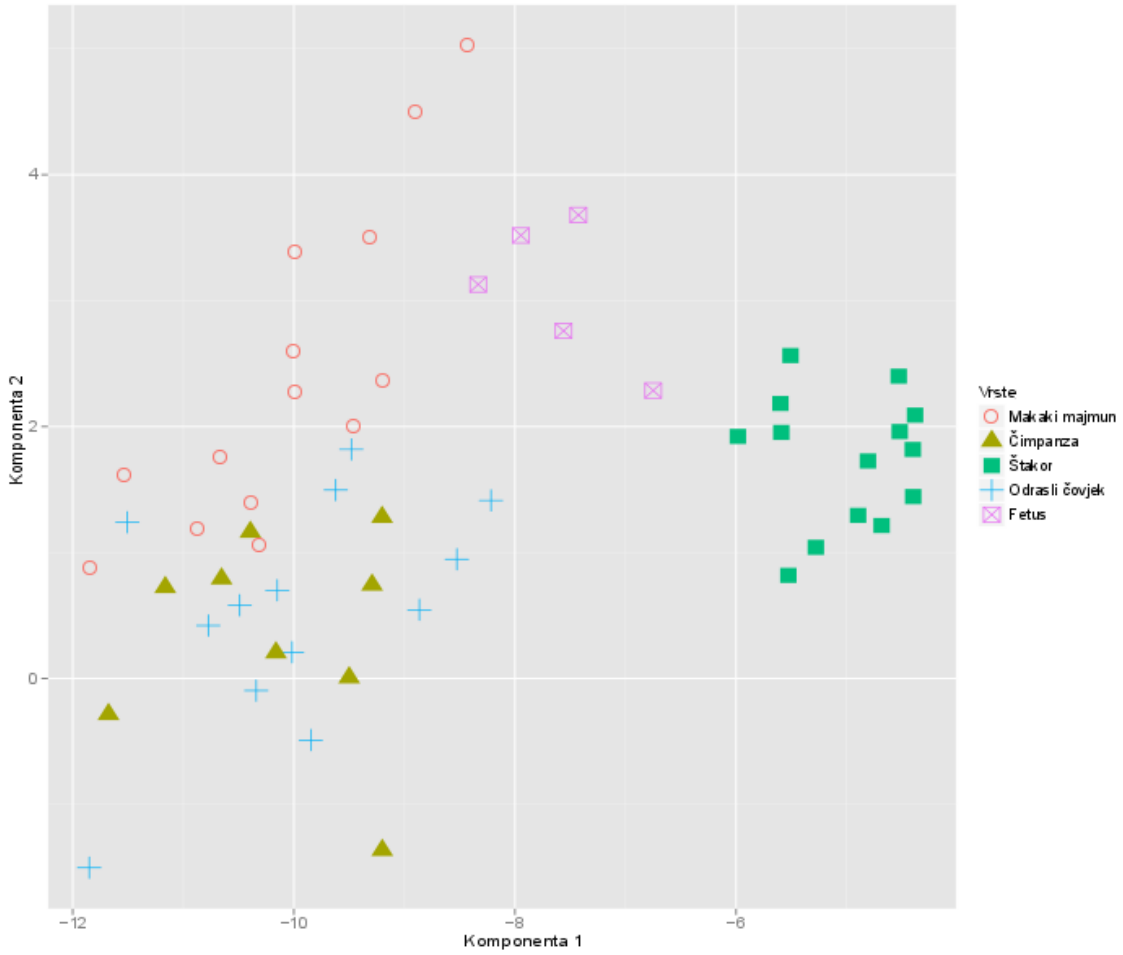
Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP50	H-F	0,1363	0,1733	**GP21**	H-C	0,0594	0,5295
GP23	H-F	-0,1098	0,1857	**GP31**	H-C	-0,0392	0,5295
GP51	H-F	0,1545	0,1919	**GP43**	H-C	0,0401	0,5295
GP21	H-F	0,1293	0,2758	**GP16**	H-C	-0,0354	0,5327
GP55	H-F	-0,1418	0,2998	**GP57**	H-C	0,0742	0,5603
GP39	H-F	-0,1189	0,2998	**GP56**	H-C	-0,0336	0,6246
GP57	H-F	0,1662	0,3184	**GP20**	H-C	0,0413	0,6443
GP48	H-F	0,0601	0,3493	**GP11**	H-C	0,0547	0,6945
GP10	H-F	-0,1977	0,3695	**GP12**	H-C	0,0106	0,6983
GP25	H-F	0,1410	0,3695	**GP54**	H-C	-0,0346	0,7222
GP4	H-F	0,1624	0,3822	**GP4**	H-C	0,0487	0,7457
GP46	H-F	0,0387	0,4013	**GP18**	H-C	-0,0077	0,8050
GP40	H-F	-0,0764	0,4708	**GP6**	H-C	0,0076	0,8208
GP33	H-F	-0,0438	0,5084	**GP9**	H-C	-0,0072	0,8295
GP14	H-F	0,0614	0,5190	**GP34**	H-C	0,0403	0,8337
GP9	H-F	0,0316	0,5429	**GP40**	H-C	-0,0173	0,9005
GP41	H-F	-0,0717	0,5429	**GP35**	H-C	0,0039	0,9171
GP15	H-F	-0,0521	0,5781	**GP29**	H-C	-0,0050	0,9509
GP45	H-F	-0,0369	0,5959	**GP10**	H-C	-0,0157	0,9520
GP53	H-F	0,0524	0,6411	**GP30**	H-C	0,0019	0,9532
GP12	H-F	0,0138	0,6536	**GP51**	H-C	-0,0058	0,9552
GP20	H-F	0,0418	0,7197	**GP7**	H-C	-0,0029	0,9600
GP47	H-F	-0,0158	0,8017	**GP17**	H-C	0,0008	0,9832
Kromatografski pik	**Vrste**	**Utjecaj**	**Prilagođena p-vrijednost**	**Kromatografski pik**	**Vrste**	**Utjecaj**	**Prilagođena p-vrijednost**
GP16	C-H	0,3708	4,63E-09	**GP15**	C-R	0,5030	1,46E-17
GP38	C-H	0,2467	2,27E-06	**GP46**	C-R	0,5689	3,48E-16
GP2	C-H	-0,4838	2,54E-06	**GP7**	C-R	-0,5186	1,11E-15
GP25	C-H	0,4572	1,39E-05	**GP24**	C-R	0,4274	2,31E-12
GP19	C-H	0,1512	4,59E-05	**GP16**	C-R	0,3507	1,11E-11
GP11	C-H	-0,4030	5,20E-05	**GP19**	C-R	-0,2393	6,03E-11
GP39	C-H	0,2769	7,12E-05	**GP42**	C-R	0,3449	6,03E-11
GP30	C-H	0,1119	9,11E-05	**GP12**	C-R	0,1502	1,14E-10
GP34	C-H	-0,5388	0,0001	**GP17**	C-R	-0,3335	1,25E-10
GP33	C-H	0,1806	0,0002	**GP27**	C-R	-0,7692	1,58E-10
GP37	C-H	-0,2773	0,0003	**GP50**	C-R	0,5426	1,73E-09
GP40	C-H	0,2717	0,0007	**GP5**	C-R	0,4298	5,42E-08
GP4	C-H	-0,4635	0,0011	**GP48**	C-R	0,3609	1,13E-07
GP26	C-H	0,1977	0,0020	**GP18**	C-R	0,1433	2,63E-07
GP1	C-H	-0,2930	0,0023	**GP55**	C-R	0,5560	3,18E-07
GP23	C-H	-0,1838	0,0028	**GP2**	C-R	-0,4769	3,35E-07
GP14	C-H	-0,2005	0,0028	**GP37**	C-R	-0,3004	1,88E-06

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP12	C-H	-0,0826	0,0029	**GP21**	C-R	0,3665	4,10E-06
GP24	C-H	0,1077	0,0041	**GP57**	C-R	0,5081	8,17E-06
GP18	C-H	0,0922	0,0060	**GP43**	C-R	0,2278	1,17E-05
GP56	C-H	-0,1699	0,0075	**GP33**	C-R	0,1882	1,40E-05
GP6	C-H	0,0662	0,0087	**GP31**	C-R	0,2303	1,81E-05
GP45	C-H	-0,2196	0,0110	**GP9**	C-R	-0,1194	2,13E-05
GP57	C-H	-0,2475	0,0116	**GP23**	C-R	-0,1997	5,07E-05
GP27	C-H	-0,2783	0,0124	**GP53**	C-R	0,3875	5,80E-05
GP54	C-H	-0,2163	0,0152	**GP47**	C-R	0,2691	0,0001
GP5	C-H	-0,3310	0,0176	**GP34**	C-R	-0,4805	0,0002
GP36	C-H	-0,1947	0,0225	**GP45**	C-R	-0,1797	0,0003
GP28	C-H	0,0928	0,0270	**GP54**	C-R	0,2530	0,0006
GP31	C-H	-0,1324	0,0365	**GP28**	C-R	0,1276	0,0017
GP48	C-H	-0,1303	0,0381	**GP39**	C-R	0,1898	0,0020
GP52	C-H	-0,1567	0,0392	**GP32**	C-R	-0,1538	0,0022
GP29	C-H	-0,2073	0,0577	**GP44**	C-R	0,2201	0,0024
GP17	C-H	0,0871	0,0615	**GP40**	C-R	0,2259	0,0048
GP8	C-H	0,4879	0,0769	**GP1**	C-R	-0,2220	0,0106
GP44	C-H	0,1651	0,0844	**GP36**	C-R	0,1485	0,0108
GP41	C-H	-0,1314	0,0866	**GP51**	C-R	0,2109	0,0173
GP53	C-H	-0,1609	0,1449	**GP25**	C-R	-0,1436	0,0266
GP47	C-H	0,1093	0,1528	**GP20**	C-R	-0,0909	0,0392
GP3	C-H	-0,1506	0,1553	**GP49**	C-R	-0,1834	0,0712
GP10	C-H	-0,2372	0,1582	**GP8**	C-R	0,3682	0,1019
GP42	C-H	0,0570	0,1868	**GP6**	C-R	-0,0436	0,1022
GP46	C-H	0,0905	0,1981	**GP38**	C-R	0,0550	0,1093
GP7	C-H	-0,0714	0,2369	**GP4**	C-R	0,1547	0,1372
GP51	C-H	-0,1177	0,2779	**GP26**	C-R	0,0561	0,2651
GP13	C-H	-0,0793	0,2928	**GP13**	C-R	-0,0455	0,2822
GP35	C-H	-0,0412	0,4295	**GP10**	C-R	-0,1474	0,3624
GP49	C-H	-0,0994	0,5015	**GP52**	C-R	0,0633	0,4278
GP20	C-H	-0,0670	0,5060	**GP41**	C-R	-0,0652	0,4494
GP58	C-H	0,0825	0,5975	**GP30**	C-R	0,0190	0,5287
GP50	C-H	0,0322	0,7715	**GP56**	C-R	0,0489	0,5623
GP32	C-H	-0,0165	0,8147	**GP22**	C-R	0,0294	0,5955
GP22	C-H	0,0185	0,8222	**GP29**	C-R	-0,0460	0,5955
GP43	C-H	0,0200	0,8295	**GP58**	C-R	0,0630	0,6626
GP15	C-H	-0,0064	0,9532	**GP3**	C-R	0,0387	0,6983
GP55	C-H	-0,0072	0,9532	**GP11**	C-R	0,0096	0,9171
GP9	C-H	-0,0005	0,9967	**GP35**	C-R	-0,0045	0,9509
GP21	C-H	-0,0004	0,9981	**GP14**	C-R	-0,0040	0,9532

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP38	H-M	0,3001	1,94E-10	**GP46**	H-R	0,4716	7,97E-21
GP2	H-M	-0,5967	5,74E-10	**GP17**	H-R	-0,3259	2,67E-19
GP16	H-M	0,3355	7,70E-10	**GP15**	H-R	0,5389	7,69E-18
GP39	H-M	0,5724	1,49E-09	**GP7**	H-R	-0,5231	4,45E-16
GP19	H-M	0,1930	5,60E-08	**GP24**	H-R	0,3830	1,01E-14
GP1	H-M	-0,4569	1,08E-06	**GP16**	H-R	0,3176	2,08E-11
GP25	H-M	0,5574	3,98E-06	**GP2**	H-R	-0,5962	7,80E-11
GP34	H-M	-0,4982	6,45E-06	**GP19**	H-R	-0,1939	7,80E-11
GP30	H-M	0,1131	7,14E-06	**GP48**	H-R	0,4349	1,36E-10
GP14	H-M	-0,3038	2,70E-05	**GP27**	H-R	-0,6436	3,46E-10
GP5	H-M	-0,4529	9,38E-05	**GP12**	H-R	0,1612	4,32E-10
GP36	H-M	-0,2785	0,0002	**GP55**	H-R	0,7400	2,92E-09
GP56	H-M	-0,1914	0,0005	**GP5**	H-R	0,2985	3,67E-09
GP41	H-M	-0,2985	0,0005	**GP43**	H-R	0,2704	1,57E-08
GP22	H-M	-0,1574	0,0005	**GP37**	H-R	-0,1982	1,77E-08
GP31	H-M	-0,1792	0,0005	**GP53**	H-R	0,4588	2,73E-08
GP37	H-M	-0,1849	0,0006	**GP39**	H-R	0,4887	3,33E-08
GP28	H-M	0,1347	0,0006	**GP22**	H-R	-0,1431	5,23E-08
GP18	H-M	0,0857	0,0007	**GP18**	H-R	0,1317	6,35E-08
GP54	H-M	-0,2537	0,0010	**GP32**	H-R	-0,2046	3,55E-07
GP40	H-M	0,2424	0,0011	**GP21**	H-R	0,4300	4,83E-07
GP11	H-M	-0,3414	0,0015	**GP50**	H-R	0,3567	1,29E-06
GP6	H-M	0,0731	0,0018	**GP57**	H-R	0,5979	1,85E-06
GP4	H-M	-0,4081	0,0025	**GP42**	H-R	0,2753	1,92E-06
GP44	H-M	0,2517	0,0034	**GP1**	H-R	-0,3921	4,33E-06
GP17	H-M	0,0914	0,0049	**GP44**	H-R	0,3176	6,22E-06
GP3	H-M	-0,2343	0,0059	**GP31**	H-R	0,1828	1,20E-05
GP12	H-M	-0,0703	0,0069	**GP28**	H-R	0,1699	2,30E-05
GP49	H-M	-0,3253	0,0108	**GP9**	H-R	-0,1312	3,46E-05
GP24	H-M	0,0754	0,0149	**GP34**	H-R	-0,4376	4,76E-05
GP29	H-M	-0,2079	0,0150	**GP54**	H-R	0,2296	4,92E-05
GP45	H-M	-0,1642	0,0169	**GP38**	H-R	0,1021	0,0008
GP23	H-M	-0,1336	0,0257	**GP49**	H-R	-0,4186	0,0009
GP47	H-M	-0,1326	0,0468	**GP45**	H-R	-0,1255	0,0014
GP13	H-M	-0,1174	0,0507	**GP23**	H-R	-0,1552	0,0028
GP33	H-M	0,0855	0,0595	**GP33**	H-R	0,1035	0,0042
GP50	H-M	-0,1711	0,0719	**GP52**	H-R	0,2048	0,0059
GP55	H-M	0,1690	0,0858	**GP41**	H-R	-0,2365	0,0064
GP58	H-M	0,2576	0,0878	**GP13**	H-R	-0,0892	0,0100
GP10	H-M	-0,2706	0,0955	**GP40**	H-R	0,1997	0,0176
GP32	H-M	-0,0714	0,1064	**GP51**	H-R	0,1934	0,0238

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP57	H-M	-0,1576	0,1442	**GP58**	H-R	0,2546	0,0862
GP51	H-M	-0,1398	0,1482	**GP14**	H-R	-0,1022	0,0968
GP27	H-M	-0,1372	0,1879	**GP4**	H-R	0,1973	0,1263
GP8	H-M	0,3196	0,1884	**GP26**	H-R	-0,0744	0,1286
GP7	H-M	-0,0694	0,2291	**GP6**	H-R	-0,0317	0,1884
GP26	H-M	0,0613	0,3339	**GP10**	H-R	-0,2005	0,1996
GP53	H-M	-0,0783	0,4058	**GP36**	H-R	0,0611	0,2413
GP35	H-M	-0,0384	0,4107	**GP30**	H-R	0,0278	0,2626
GP43	H-M	0,0583	0,4278	**GP8**	H-R	0,1809	0,3523
GP48	H-M	-0,0414	0,4997	**GP20**	H-R	-0,0505	0,4835
GP21	H-M	0,0528	0,5955	**GP11**	H-R	0,0690	0,5295
GP15	H-M	0,0259	0,7281	**GP47**	H-R	0,0371	0,5319
GP20	H-M	-0,0236	0,8217	**GP3**	H-R	-0,0453	0,5737
GP52	H-M	-0,0160	0,8525	**GP29**	H-R	-0,0253	0,6612
GP9	H-M	-0,0074	0,9005	**GP56**	H-R	0,0291	0,6894
GP42	H-M	-0,0050	0,9509	**GP25**	H-R	-0,0325	0,7568
GP46	H-M	0,0001	0,9981	**GP35**	H-R	-0,0030	0,9552
Kromatografski pik	**Vrste**	**Utjecaj**	**Prilagođena p-vrijednost**	**Kromatografski pik**	**Vrste**	**Utjecaj**	**Prilagođena p-vrijednost**
GP19	M-R	-0,3896	4,67E-17	**GP43**	M-R	0,2086	0,0011
GP17	M-R	-0,4186	1,23E-15	**GP26**	M-R	-0,1399	0,0013
GP12	M-R	0,2330	6,64E-13	**GP52**	M-R	0,2209	0,0031
GP7	M-R	-0,4485	1,02E-11	**GP47**	M-R	0,1621	0,0050
GP57	M-R	0,7629	1,83E-11	**GP9**	M-R	-0,1209	0,0052
GP31	M-R	0,3592	1,86E-11	**GP3**	M-R	0,1924	0,0150
GP46	M-R	0,4755	2,40E-11	**GP29**	M-R	0,1746	0,0507
GP24	M-R	0,3123	1,35E-10	**GP18**	M-R	0,0481	0,0595
GP25	M-R	-0,5997	1,36E-10	**GP39**	M-R	-0,0886	0,1103
GP42	M-R	0,2818	5,44E-10	**GP28**	M-R	0,0335	0,3215
GP54	M-R	0,4797	7,70E-10	**GP34**	M-R	0,0572	0,3245
GP53	M-R	0,5408	1,65E-09	**GP1**	M-R	0,0641	0,4107
GP48	M-R	0,4825	1,87E-09	**GP40**	M-R	-0,0482	0,4342
GP15	M-R	0,5089	2,16E-09	**GP44**	M-R	0,0603	0,4727
GP5	M-R	0,7567	8,30E-09	**GP41**	M-R	0,0618	0,4997
GP55	M-R	0,5746	2,06E-08	**GP35**	M-R	0,0327	0,5170
GP27	M-R	-0,4981	1,48E-07	**GP49**	M-R	-0,0933	0,5295
GP50	M-R	0,5185	3,73E-07	**GP10**	M-R	0,0754	0,5700
GP11	M-R	0,4150	5,94E-07	**GP8**	M-R	-0,1200	0,5975
GP38	M-R	-0,1961	1,37E-06	**GP16**	M-R	-0,0188	0,5975
GP36	M-R	0,3447	4,83E-06	**GP45**	M-R	0,0399	0,5975
GP21	M-R	0,3673	6,96E-06	**GP13**	M-R	0,0315	0,6195
GP4	M-R	0,6175	1,40E-05	**GP23**	M-R	-0,0201	0,7222

Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost	Kromatografski pik	Vrste	Utjecaj	Prilagođena p-vrijednost
GP6	M-R	-0,1056	2,97E-05	**GP37**	M-R	-0,0199	0,7222
GP56	M-R	0,2234	0,0001	**GP33**	M-R	0,0119	0,7390
GP14	M-R	0,1939	0,0003	**GP20**	M-R	-0,0244	0,7647
GP51	M-R	0,3267	0,0005	**GP22**	M-R	0,0123	0,8029
GP30	M-R	-0,0895	0,0006	**GP2**	M-R	0,0072	0,9509
GP32	M-R	-0,1347	0,0007	**GP58**	M-R	-0,0036	0,9832



Dodatak 5. Analiza glavnih komponenti glikankih profila svih odraslih jedinki i fetusa uključenih u analizu. U analizu su uključene sve regije osim malog mozga. Svaka boja i simbol predstavlja određenu vrstu kako je navedeno u legendi.

Dodatak 6. Prikazana je vrijednost udjela površine pojedinog kromatografskog pika u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu (Udio) nakon HILIC-UPLC analize za N-glikome kore velikog mozga (DFC) različitih vrsta i stupnjeva razvoja. C – čimpanza, F – fetus, H – odrasli čovjek, M – makaki majmun, R – štakor.

Kromatografski pik	Udio / %					Kromatografski pik	Udio / %				
	F_DFC	H_DFC	C_DFC	M_DFC	R_DFC		F_DFC	H_DFC	C_DFC	M_DFC	R_DFC
GP1	0,78	1,26	1,04	0,68	1,27	**GP30**	6,58	8,46	10,74	8,92	5,59
GP2	0,32	0,42	0,32	0,2	0,24	**GP31**	0,3	0,42	0,14	0,13	0,11
GP3	0,79	0,9	0,52	0,36	0,56	**GP32**	0,99	1,07	1,07	1,26	1,06
GP4	0,1	0,13	0,07	0,1	0,14	**GP33**	0,37	0,65	0,21	0,36	0,28
GP5	1,1	2,52	2,16	1,67	3,63	**GP34**	0,16	0,39	0,17	0,22	0,3
GP6	11,61	11,8	12,77	13,17	11,05	**GP35**	4,35	4,58	4,72	4,53	5,65
GP7	6,58	8,46	10,74	8,92	5,59	**GP36**	0,71	1,23	1,14	1,48	1,27
GP8	0,3	0,42	0,14	0,13	0,11	**GP37**	0,64	0,59	0,43	0,54	0,59
GP9	0,99	1,07	1,07	1,26	1,06	**GP38**	0,96	1,22	1,16	1,29	2,47
GP10	0,37	0,65	0,21	0,36	0,28	**GP39**	0,91	1	0,9	1,58	1,47
GP11	0,16	0,39	0,17	0,22	0,3	**GP40**	8,88	6,08	6,54	6,2	4,62
GP12	4,35	4,58	4,72	4,53	5,65	**GP41**	5,75	5,17	5,56	5,36	5,94
GP13	0,71	1,23	1,14	1,48	1,27	**GP42**	1,82	2,92	3,29	3,56	2,7
GP14	0,64	0,59	0,43	0,54	0,59	**GP43**	0,81	0,6	0,64	0,68	0,67
GP15	0,96	1,22	1,16	1,29	2,47	**GP44**	0,24	0,2	0,27	0,33	0,47
GP16	0,91	1	0,9	1,58	1,47	**GP45**	0,94	1,44	1,47	1,42	1,34
GP17	8,88	6,08	6,54	6,2	4,62	**GP46**	3,6	3,11	2,58	2,44	3,16
GP18	5,75	5,17	5,56	5,36	5,94	**GP47**	3,28	2,16	2,45	2,32	3,28
GP19	1,82	2,92	3,29	3,56	2,7	**GP48**	0,57	0,74	0,87	1,32	0,92
GP20	0,81	0,6	0,64	0,68	0,67	**GP49**	1,14	1,77	1,64	1,67	1,65
GP21	0,24	0,2	0,27	0,33	0,47	**GP50**	1	1,22	0,68	1,53	0,72
GP22	0,94	1,44	1,47	1,42	1,34	**GP51**	1,16	1,03	0,87	1,19	1,18
GP23	3,6	3,11	2,58	2,44	3,16	**GP52**	1,5	1,07	1,19	0,87	1,19
GP24	3,28	2,16	2,45	2,32	3,28	**GP53**	8,12	7,2	8,05	7,91	7,94
GP25	0,57	0,74	0,87	1,32	0,92	**GP54**	1,41	1,13	0,93	1,08	1,36
GP26	1,14	1,77	1,64	1,67	1,65	**GP55**	1,05	1,12	1,17	1,21	0,9
GP27	1	1,22	0,68	1,53	0,72	**GP56**	1,56	1,38	1,66	1,67	1,55
GP28	1,16	1,03	0,87	1,19	1,18	**GP57**	4,17	2,34	1,68	0,94	1,01
GP29	1,5	1,07	1,19	0,87	1,19	**GP58**	0,82	0,33	0,37	0,36	0,37

§ 10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 17.4.1989. u Travniku. Srednju Medicinsku i kemijsku školu završavam u Šibeniku 2008. godine te iste godine upisujem integrirani preddiplomski i diplomski studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu. Studij završavam 2013. godine diplomskim radom „Određivanje dobi analizom N-glikozilacije proteina iz krvne mrlje ispitanika“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Olge Gornik. Za vrijeme studija sam dobio Rektorovu nagradu 2012. godine te Dekanovu nagradu 2013. godine. Iste godine kad završavam studij sam zaposlen u Laboratoriju za glikobiologiju tvrtke Genos.

ZNANSTVENA USAVRŠAVANJA

2016. Odjel za Biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, gost istraživač (3 mjeseca)
2016. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, sudionik (usmeno priopćenje)
2015. 26th Joint Glycobiology Meeting, Lille, Francuska, sudionik (postersko priopćenje)
2015. Department of Neurobiology and Kavli Institute for Neuroscience, Yale University School of Medicine, New Haven, SAD, gost istraživač (4 mjeseca)

ZNANSTVENI RADOVI U ČASOPISIMA

1. Allegri M, De Gregori M, Minella CE, Klersy C, Wang W, Sim M, Gieger C, Manz J, Pemberton IK, MacDougall J, Williams FM, Van Zundert J, Buyse K, Lauc G, **Gudelj I,** Primorac D, Skelin A, Aulchenko YS, Karssen LC, Kapural L, Rauck R, Fanelli G; PainOMICS Group.. 'Omics' biomarkers associated with chronic low back pain: protocol of a retrospective longitudinal study. BMJ Open. 2016 Oct 19;6(10):e012070. doi: 10.1136/bmjopen-2016-012070

2. Klarić T, **Gudelj I**. HILIC-UPLC Analysis of Brain Tissue N-Glycans. Methods Mol Biol. 2017;1503:207-216. doi: 10.1007/978-1-4939-6493-2_16

3. **Gudelj I,** Baciarello M, Ugrina I, De Gregori M, Napolioni V, Ingelmo PM, Bugada D, De Gregori S, Đerek L, Pučić-Baković M, Novokmet M, Gornik O, Saccani Jotti G, Meschi T, Lauc G, Allegri M. Changes in total plasma and serum N-glycome composition and patient-controlled analgesia after major abdominal surgery. Sci Rep. 2016 Aug 9;6:31234. doi: 10.1038/srep31234

4. Freidin MB, Keser T, **Gudelj I,** Štambuk J, Vučenović D, Allegri M, Pavić T, Šimurina M, Fabiane SM, Lauc G, Williams FM. The Association Between Low Back Pain and Composition of IgG Glycome. Sci Rep. 2016 May 27;6:26815. doi: 10.1038/srep26815

5. Pavić T, **Gudelj I,** Keser T, Pučić-Baković M, Gornik O. Enrichment of hydrophobic membrane proteins using Triton X-114 and subsequent analysis of their N-glycosylation. Biochim Biophys Acta. 2016 Aug;1860(8):1710-5. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.12.025

6. Vučković F, Krištić J, **Gudelj I,** Teruel M, Keser T, Pezer M, Pučić-Baković M, Štambuk J, Trbojević-Akmačić I, Barrios C, Pavić T, Menni C, Wang Y, Zhou Y, Cui L, Song H, Zeng Q, Guo X, Pons-Estel BA, McKeigue P, Leslie Patrick A, Gornik O, Spector TD, Harjaček M, Alarcon-Riquelme M, Molokhia M, Wang W, Lauc G. Association of systemic lupus erythematosus with decreased immunosuppressive potential of the IgG glycome. Arthritis Rheumatol. 2015 Nov;67(11):2978-89. doi: 10.1002/art.39273

7. Barrios C, Zierer J, **Gudelj I,** Štambuk J, Ugrina I, Rodríguez E, Soler MJ, Pavić T, Šimurina M, Keser T, Pučić-Baković M, Mangino M, Pascual J, Spector TD, Lauc G, Menni C. Glycosylation Profile of IgG in Moderate Kidney Dysfunction. J Am Soc Nephrol. 2016 Mar;27(3):933-41. doi: 10.1681/ASN.2015010109

8. **Gudelj I**, Keser T, Vučković F, Škaro V, Goreta SŠ, Pavić T, Dumić J, Primorac D, Lauc G, Gornik O. Estimation of human age using N-glycan profiles from bloodstains. Int J Legal Med. 2015 Sep;129(5):955-61. doi:10.1007/s00414-015-1162-x

9. Akmačić IT, Ugrina I, Štambuk J, **Gudelj I**, Vučković F, Lauc G, Pučić-Baković M. High-throughput glycomics: optimization of sample preparation. Biochemistry (Mosc). 2015 Jul;80(7):934-42. doi: 10.1134/S0006297915070123

NAGRADE I PRIZNANJA

Dekanova nagrada 2013.
Rektorova nagrada 2012.