Analiza glikolizacije imunoglobulina G u upalnoj bolesti crijeva tekućinskom kromatografijom

Trbojević Akmačić, Irena

Doctoral thesis / Disertacija

2015

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:217:966604

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

Irena Trbojević Akmačić

ANALIZA GLIKOZILACIJE IMUNOGLOBULINA G U UPALNOJ BOLESTI CRIJEVA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Irena Trbojević Akmačić

GLYCOSYLATION ANALYSIS OF IMMUNOGLOBULIN G IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Irena Trbojević Akmačić

ANALIZA GLIKOZILACIJE IMUNOGLOBULINA G U UPALNOJ BOLESTI CRIJEVA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Gordan Lauc

Zagreb, 2015.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Irena Trbojević Akmačić

GLYCOSYLATION ANALYSIS OF IMMUNOGLOBULIN G IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Dr. Gordan Lauc, Professor

Zagreb, 2015

Zahvala

Hvala mentoru prof. dr. sc. Gordanu Laucu, na pruženoj prilici, iskazanom povjerenju, stručnim savjetima i poticanju istraživačkog duha.

Thank you prof. Yuan Chuan Lee, for giving me the opportunity to spend four months in your laboratory at Johns Hopkins University. I can not thank you enough for your kindness, guidance and patience for all my questions. Thank you for giving me the new perspective on science, but also on life.

Hvala Maji, na strpljivosti, savjetima, toleranciji za moj perfekcionizam i dobre (i loše dane), te što je uvijek podupirala moje ideje.

Thank you Urška, Jana and Urh, for giving me the opportunity to spend some time in your laboratory in Ajdovščina and for all constructive discussions of the results.

Hvala Mirni, na podršci, prijateljstvu i inspiraciji.
Veliko hvala Jerku, Jasminki i Ivanu na kreativnom riješavanju problema, šalama i podršci kad je trebalo izboriti opremu, izgurati rokove i dogovoriti radne vikende.
Hvala Mislavu, na pomoći oko eksperimenata, statistike i zanimljivim razgovorima.
Frani, Ivi i Luciji na pomoći oko statistike i dizajna eksperimenata.
Hvala Ivoni i Dajani na ozbiljnim, neozbiljnim i filozofskim raspravama.
Puno hvala cijeloj Genos ekipi i pridruženim članovima na ugodnoj radnoj i prijateljskoj atmosferi i pomoći.

Neizmjerno hvala mojim roditeljima, što su uvijek vjerovali u mene, poticali me da slijedim svoj put i naučili me da su djela ono što definira čovjeka. Braći, što mi uljepšavaju svaki dan svojim idejama i pogledom na svijet.

Đuri, hvala na beskrajnom strpljenju, ljubavi, razgovorima, savjetima, te uvijek vedrom pogledu na život. Moj svijet ne bi bio isti bez tebe.

Od srca hvala Ivani, Jasni i Dariji što su uvijek tu.

Sadržaj

SAŽETAK ..... **XV**
ABSTRACT ..... **XVII**
§ 1. UVOD **1**
1.1. Svrha i cilj rada **3**
§ 2. LITERATURNI PREGLED **4**
2.1. Glikozilacija proteina **4**
2.1.1. Važnost i funkcija glikozilacije proteina *4*
2.1.2. Vrste glikozilacije *5*
2.2. *N*-glikozilacija proteina **5**
2.2.1. Struktura i heterogenost N-vezanih glikana *6*
2.2.1.1. Učinkovitost glikozilacije i mikroheterogenost glikana *7*
2.2.2. Biosinteza N-vezanih glikana *7*
2.2.2.1. Sinteza prekursora dolikol-P-P-glikan *8*
2.2.2.2. Prijenos prekursora na protein *9*
2.2.2.3. Početni koraci obrade prekursora *9*
2.2.2.4. Obrada $Man_5GlcNAc_2$ u složene i hibridne N-glikane *11*
2.2.2.5. Završna obrada N-vezanih glikana u trans-Golgiju *11*
2.2.3. Glikani kao biomarkeri *12*
2.3. Analiza glikozilacije proteina **13**
2.3.1. Analiza N- i O-glikozilacije proteina *13*
2.3.2. Visokoprotočna analiza N-vezanih glikana *15*
2.3.3. Analiza N-vezanih glikana metodom UPLC *16*
2.4. Imunoglobulin G **17**
2.4.1. Struktura i glikozilacija imunoglobulina G *17*
2.5. Upalna bolest crijeva **19**
2.5.1. Karakteristike Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa *21*
2.5.2. Liječenje pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva *22*
2.5.3. Imunoglobulin G i upalna bolest crijeva *22*
2.5.3.1. Glikozilacija IgG-a u upalnoj bolesti crijeva *23*
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO **24**
3.1. Ispitanici **24**
3.2. Materijali **25**

3.2.1. Standardne kemikalije *25*
3.2.2. Enzimi *25*
3.2.3. Afinitetne i filtar pločice korištene prilikom priprave uzoraka *25*
3.2.4. Čvrste faze korištene za pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana *26*
3.3. Izolacija imunoglobulina G iz krvne plazme ili seruma **26**
3.3.1. Izolacija imunoglobulina G iz krvne plazme ili seruma *26*
3.3.1.1. Određivanje koncentracije IgG-a nakon izolacije iz seruma ili plazme *28*
3.4. Metode denaturacije **28**
3.4.1. Denaturacija u prisutnosti SDS-a i igepala CA-630 ..... *28*
3.4.2. Denaturacija u prisutnosti GuHCl-a i DTT-a *28*
3.4.3. Denaturacija u prisutnosti GuHCl-a i TCEP-a *28*
3.4.4. Denaturacija u prisutnosti SDS-a, DTT-a i IAA *29*
3.5. Metode deglikozilacije **29**
3.5.1. Deglikozilacija u otopini *29*
3.5.2. Deglikozilacija na hidrofobnoj Immobilon-P PVDF membrani *29*
3.5.3. Deglikozilacija uzoraka IgG-a na Omega 10k membrani *31*
3.5.3.1. Metode deglikozilacije IgG-a na Omega 10k membrani *31*
3.5.3.2. Utjecaj ispiranja deterdženata prije deglikozilacije na Omega 10k membrani *32*
3.5.3.3. Kompatibilnost korištenih otopina i Omega 10k membrane *33*
3.6. Uklanjanje IgG-a iz reakcijske smjese nakon deglikozilacije **34**
3.6.1. Filtriranje deglikozilacijske reakcijske smjese kroz hidrofobnu Immobilon-P PVDF membranu *34*
3.6.2. Filtriranje deglikozilacijske reakcijske smjese kroz Omega 10k MWCO membranu *34*
3.7. Obilježavanje slobodnih glikana fluorescentnom bojom **34**
3.8. Pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana **35**
3.8.1. Pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na celulozi *35*
3.8.2. Pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na BioGelu P-6 i silikagelu *36*
3.8.3. Pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom GHP filtru *36*
3.8.3.1. Provjera kapaciteta GHP AcroPrep filtra *37*
3.9. Robusnost metoda deglikozilacije, fluorescentnog obilježavanja i pročišćavanja glikana **37**
3.9.1. Robusnost metode korištene za pripravu glikana IgG-a pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva *37*
3.9.1.1. Utjecaj pojedinih parametara na površinu pika i koeficijent varijacije *39*
3.9.1.2. Testiranje vremena inkubacije s vodom prilikom eluiranja glikana s celuloze *39*
3.9.2.Robusnost deglikozilacije IgG-a na Omega 10k membrani uz pročišćavanje obilježenih glikana na GHP filtru uz 100 %-tni acetonitril *40*

3.10. Usporedba metoda deglikozilacije i pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana 41
3.11. Analiza fluorescentno obilježenih glikana IgG-a tekućinskom kromatografijom 42
3.11.1. Izračun deriviranih parametara glikozilacije IgG-a 44
3.12. Validacija metode analize glikana IgG-a tekućinskom kromatografijom 46
3.13. Validacija metode deglikozilacije IgG-a u otopini uz pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom *GHP* filtru.....48
3.13.1. Analiza izvora varijacije 48
3.13.2. Ponovljivost i rigidnost metode – utjecaj dana i analitičara na varijaciju metode 49
3.13.2.1. Izolacija IgG-a iz uzoraka plazme.....50
3.13.2.2. Deglikozilacija.....50
3.13.2.3. Obilježavanje glikana fluorescentnom bojom i njihovo pročišćavanje 50
3.14. Statističke metode 51
§ 4. REZULTATI..... 52
4.1. Validacija kromatografske metode za analizu glikana IgG-a.....52
4.2. Analiza glikana IgG-a u upalnoj bolesti crijeva.....60
4.2.1. Zastupljenost N-glikanskih struktura IgG-a u upalnoj bolesti crijeva.....64
4.2.2. Zastupljenost skupina strukturno sličnih N-glikana IgG-a u upalnoj bolesti crijeva 70
4.3. Nedostatci metode korištene za pripravu glikana IgG-a za analizu kod upalne bolesti crijeva.....77
4.4. Robusnost metode korištene za pripravu glikana IgG-a za analizu kod upalne bolesti crijeva.....80
4.5. Optimizacija postupka deglikozilacije 83
4.5.1. Deglikozilacija IgG-a na hidrofobnoj Multiscreen Immobilon-P PVDF membrani.....84
4.5.2. Deglikozilacija IgG-a na Omega 10k membrani 87
4.6. Optimizacija postupka pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana.....89
4.6.1. Kapacitet GHP AcroPrep filtra za pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana.....93
4.6.2. Osjetljivost metode deglikozilacije IgG-a na Omega 10k membrani uz pročišćavanje na GHP filtru.....94
4.7. Robusnost metode deglikozilacije IgG-a na *Omega 10k* membrani 96
4.8. Nedostatci metode deglikozilacije IgG-a na *Omega 10k* membrani 98
4.8.1. Inertnost Omega 10k membrane u prisustvu deterdženata 103
4.9. Usporedba deglikozilacije u otopini i na *Omega 10k* membrani uz pročišćavanje na celulozi i hidrofilnom *GHP* filtru.....106
4.10. Pokušaj povećanja osjetljivosti metode priprave glikana IgG-a za analizu tekućinskom kromatografijom 108
4.11. Validacija razvijene metode deglikozilacije IgG-a u otopini uz pročišćavanje

obilježenih glikana na hidrofilnom filtru 110

4.11.1. Analiza varijacije pojedinih koraka razvijene metode priprave glikana IgG-a za analizu tekućinskom kromatografijom 110

4.11.2. Ponovljivost i rigidnost metode – utjecaj dana i analitičara na varijaciju metode 114

§ 5. RASPRAVA 126

5.1. Metoda HILIC-UPLC omogućuje reproducibilnu i brzu analizu *N*-glikana IgG-a 126

5.2. Glikozilacija IgG-a je kod upalne bolesti crijeva promijenjena 128

5.3. Reproducibilnost metoda za analizu glikana potrebno je ispitati na većem broju uzoraka 133

5.4. Optimirana metoda deglikozilacije u otopini uz pročišćavanje na hidrofilnom filtru stabilna je u duljem periodu 138

5.5. Smjernice za buduća istraživanja 141

§ 6. ZAKLJUČAK 143

§ 7. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ 145

§ 8. LITERATURNI IZVORI 148

§ 9. ŽIVOTOPIS XIX

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

ANALIZA GLIKOZILACIJE IMUNOGLOBULINA G U UPALNOJ BOLESTI CRIJEVA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM

Irena Trbojević Akmačić
Genos, d.o.o., Laboratorij za glikobiologiju, Hondlova 2/11, 10 000 Zagreb

Upalna bolest crijeva je kronični upalni poremećaj gastrointestinalnog trakta za koji se smatra da je rezultat međudjelovanja genskih i okolišnih čimbenika. Genetička israživanja su pokazala da postoji povezanost gena koji sudjeluju u regulaciji glikozilacije IgG-a i upalne bolesti crijeva. *N*-glikozilacija IgG-a utječe na njegovu strukturu i imunološku funkciju. U ovoj disertaciji analizirana je *N*-glikozilacija IgG-a kod 804 pacijenta s upalnom bolesti crijeva i zdravih ispitanika, što je dosad najveće istraživanje glikana u upalnoj bolesti crijeva. Pokazano je da su galaktozilirane glikoforme IgG-a statistički značajno manje zastupljene kod pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa u odnosu na zdrave ispitanike. Monosijalinizirane glikoforme su statistički značajno manje zastupljene kod pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti. Uočena je veća zastupljenost glikoformi s račvajućim GlcNAc-om u upalnoj bolesti crijeva u odnosu na zdrave ispitanike. IgG ima potencijal kao dijagnostički i prognostički biomarker za upalnu bolest crijeva. Tijekom studije evaluirana je metoda HILIC-UPLC, te je razvijena, optimirana i validirana nova visoko-protočna metoda priprave *N*-glikana za analizu tekućinskom kromatografijom. Poboljšanje metodologije će omogućiti točniju i informativniju analizu *N*-vezanih glikana u budućnosti.

(154 + XXI stranica, 58 slika, 25 tablica, 92 literaturna 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: Crohnova bolest/ HILIC/ imunoglobulin G/ *N*-glikozilacija/ tekućinska kromatografija/ ulcerozni kolitis/ upalna bolest crijeva

Mentor: Prof. dr. sc. Gordan Lauc

Rad prihvaćen: 4. studenog 2015.

Ocjenitelji: Doc. dr. sc. Boris Mildner
Doc. dr. sc. Olga Gornik
Prof. dr. sc. Vlasta Drevenkar

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

GLYCOSYLATION ANALYSIS OF IMMUNOGLOBULIN G IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY

Irena Trbojević Akmačić
Genos Ltd, Glycobiology laboratory, Hondlova 2/11, 10 000 Zagreb

Inflammatory bowel disease is chronic inflammatory disorder of the gastrointestinal tract which is considered to be the result of the interaction of genetic and environmental factors. Genetic studies have shown pleiotropy between IgG glycosylation and inflammatory bowel disease. IgG *N*-glycosylation affects its structure and immune function. IgG *N*-glycosylation in 804 inflammatory bowel disease patients and healthy controls was analyzed within this dissertation, which makes it the largest study of glycans in inflammatory bowel disease. The results demonstrated statistically significant decrease in IgG galactosylation in Crohn's disease and ulcerative colitis compared to healthy controls, as well as statistically significant decrease in IgG monosialylation in Crohn's disease. Increase in proportion of structures with bisecting GlcNAc was observed in inflammatory bowel disease patients compared to healthy controls. Therefore, IgG has a potential as diagnostic and prognostic biomarker for inflammatory bowel disease. Within this dissertation HILIC-UPLC method was validated, and new high-throughput preparation method for *N*-glycan analysis by liquid chromatography was developed, optimized, and validated. Improved methodology will enable more accurate and informative *N*-glycan analysis in the future.

(154 + XXI pages, 58 figures, 25 tables, 92 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: Crohn's disease/ HILIC/ immunoglobulin G/ inflammatory bowel disease/ liquid chromatography/ *N*-glycosylation/ ulcerative colitis

Supervisor: Dr. Gordan Lauc, Professor

Thesis accepted: November 4th, 2015

Reviewers: Dr. Boris Mildner, Assistant Professor
Dr. Olga Gornik, Assistant Professor
Dr. Vlasta Drevenkar, Professor

§ 1. UVOD

Upalna bolest crijeva je kronični upalni poremećaj gastrointestinalnog trakta, čiji uzrok nastanka nije u potpunosti poznat, te se smatra da je rezultat interakcije genskih i okolišnih čimbenika. Većina mikroorganizama ljudskih crijeva živi u vanjskom sloju sluznice, dok unutarnji sloj sluznice sprječava kontakt bakterija s epitelnim stanicama crijeva. Smatra se da oštećena sluznica crijeva omogućava direktan kontakt mikroorganizama i epitelnih stanica crijeva te na taj način dovodi do upale.[1]

Dosadašnja istraživanja su pokazala da u brojnim upalnim bolestima važnu ulogu imaju glikani,[2] složeni oligosaharidi vezani na velik broj membranskih i sekretornih proteina, modulirajući njihovu funkciju.[3] Glikozilacija je kotranslacijska i posttranslacijska modifikacija za koju, u odnosu na npr. sintezu proteina, ne postoji izravna uputa zapisana u molekuli DNA, nego je specifična glikozilacija rezultat složenog međudjelovanja više različitih enzima i metabolita. Glikozilacija proteina je sve donedavno bila slabo proučavana, a otežavajuća činjenica je sama složenost i raznovrsnost glikana koja je predstavljala izazov za razvoj učinkovitih analitičkih metoda. Glikozilacija proteina se odvija u endoplazmatskom retikulumu (ER) i Golgijevom kompleksu (GK) nizom reakcija dodavanja šećera na novosintetizirani protein. Modificirani glikoprotein se zatim transportira u organele, na površinu stanice ili se iz nje izlučuje. Još uvijek nisu razjašnjeni mehanizmi djelovanja svih enzima koji sudjeluju u sintezi glikana. Do danas je otkriveno nekoliko tipova glikozilacije, no daleko najproučavanija je *N*-glikozilacija proteina, tj. vezanje glikana preko *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) na dušikov atom asparagina u evolucijski očuvanom aminokiselinskom slijedu asparagin-X-serin ili asparagin-X-treonin (Asn-X-Ser/Thr, gdje je X bilo koja aminokiselina osim prolina). Razlog tome je jednostavnost uklanjanja *N*-vezanih glikana od proteinskog dijela glikoproteina inkubacijom sa specifičnim enzimom.

Među najzastupljenijim glikoproteinima u krvi su imunoglobulini, koji imaju ulogu obrane organizma prepoznavajući strane antigene. Glikozilacija imunoglobulina G (IgG) je dosad vrlo dobro proučena, a istraživanja su pokazala da značajno utječe na njegovu funkciju. Poznato je na primjer da molekule IgG-a koje sadrže glikane bez sržne fukoze imaju povećani afinitet za receptore FcγRIIIA u odnosu na fukozilirane molekule IgG-a, te su prema tome učinkovitije u aktiviranju stanične citotoksičnosti ovisne o antitijelima (ADCC, eng.

***A**ntibody-**D**ependent **C**ell-mediated **C**ytotoxicity*).[4,5] Osim toga, istraživanja su pokazala da IgG može djelovati proupalno i protuupalno, ovisno o tome sadrži li njegov glikanski dio terminalno vezanu sijalinsku kiselinu ili ne. Tako IgG djeluje proupalno ako nije sijaliniziran, odnosno protuupalno ako je sijaliniziran.[6,7]

Dosadašnje genetičke studije su pokazale da postoji povezanost gena koji sudjeluju u glikozilaciji proteina i upalne bolesti crijeva. Geni *HNF4A* (kodira transkripcijski faktor koji regulira sintezu gvanozin-5'-difosfat-fukoze (GDP-fukoze) i ekspresiju nekoliko fukozil-transferaza) i *FUT2* (kodira glikozil-transferazu koja veže fukozu na proteine) su povezani s Crohnovom bolesti[8] i ulceroznim kolitisom.[9] Isto tako, genetičke studije su pokazale i da je pet od ukupno šesnaest gena koji sudjeluju u regulaciji glikozilacije IgG-a povezano s upalnom bolesti crijeva.[10] Dosad je provedeno nekoliko istraživanja čiji rezultati su uputili na smanjenu galaktozilaciju IgG-a pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva.[11,12] Međutim, smanjena galaktozilacija IgG-a je pronađena samo u 54, tj. 72 % pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i u samo 28, tj. 33 % pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa. Osim toga, proučavane su isključivo nesijalinizirane glikoforme, a kao što je ranije navedeno, sijalinska kiselina modulira upalno djelovanje IgG-a,[6,7] te bi svakako bilo zanimljivo istražiti potencijalnu povezanost sijaliniziranih glikoformi IgG-a s upalnom bolesti crijeva, što je ujedno i jedan od ciljeva ovog rada. Nedavno je prvi put objavljeno istraživanje glikozilacije ukupnih proteina u serumu pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa,[13] te je potvrđena smanjena galaktozilacija proteina seruma pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike. Isto tako, prvi put je proučena glikozilacija u smislu sijalinizacije, te se pokazalo da su sijalinizirane višestruko razgranate glikoforme ukupnih proteina seruma zastupljenije u slučaju ulceroznog kolitisa, u odnosu na kontrolne uzorke. Međutim, navedena istraživanja su provedena na malom broju uzoraka, te kao posljedica strukturne složenosti glikana i ograničenja korištenih analitičkih metoda postoji mogućnost lažno negativnih i lažno pozitivnih rezultata. I sami autori ovih istraživanja navode neke proturječne rezultate. Zbog toga je od velike važnosti provoditi ovakav tip istraživanja na velikom broju uzoraka kako bi se smanjio utjecaj eksperimentalne pogreške. Zadnjih nekoliko godina se radi intenzivno na razvoju metoda za analizu glikana velikog broja uzoraka, takozvanim visokoprotočnim metodama (eng. *high-throughput methods*). U upotrebi su najčešće tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC, eng. ***U**ltra **P**erformance **L**iquid **C**hromatography*), spektrometrija masa (MS, eng. ***M**ass **S**pectrometry*), te kapilarna gel-elektroforeza (CGE, eng. ***C**apillary **G**el*

***E**lectrophoresis*).[14] Ove metode su omogućile dobivanje točnijih i robustnijih rezultata u kraćem vremenu, što je izrazito važno u velikim populacijskim studijama, posebice u svrhu otkrivanja učinkovitih dijagnostičkih i prognostičkih markera.

1.1. Svrha i cilj rada

Glikozilacija IgG-a u upalnoj bolesti crijeva je dosad vrlo slabo istražena. Iako je nekoliko istraživanja uputilo na potencijal IgG-a kao biomarkera za upalnu bolest crijeva, proučavana je isključivo njegova galaktozilacija zbog nedovoljno razvijene metodologije, i to na malom broju uzoraka. Cilj ove doktorske disertacije je analizirati glikozilaciju IgG-a kod pacijenata s upalnom bolesti crijeva i zdravih ispitanika u sklopu istraživanja na oko tisuću ljudi, što će ujedno biti i dosad najveće istraživanje glikana u upalnoj bolesti crijeva. U tu svrhu će se afinitetnom kromatografijom izolirati IgG iz uzoraka seruma pacijenata s Crohnovom bolesti ili ulceroznim kolitisom te zdravih ispitanika, analizirati fluorescentno obilježeni glikani IgG-a metodom tekućinske kromatografije, a dobiveni rezultati će se usporediti s rezultatima dosadašnjih istraživanja provedenima na malom broju ljudi. Prvi put će biti analizirane i sijalinizirane glikoforme IgG-a, te glikoforme koje sadrže sržnu fukozu i račvajući GlcNAc.

Velik dio ove disertacije obuhvaća i razvoj, optimizaciju i validaciju visoko-protočnih analitičkih metoda koje će omogućiti da se glikani IgG-a iz velikog broja uzoraka analiziraju u relativno kratkom vremenu, a istovremeno uz dobivanje pouzdanih rezultata. Poboljšanje metodologije će omogućiti točniju i informativniju analizu *N*-vezanih glikana, i to ne samo IgG-a nego *N*-vezanih glikana općenito.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Glikozilacija proteina

Glikozilacija proteina je kotranslacijska i posttranslacijska modifikacija za koju ne postoji kalup za sintezu, kao što je to npr. slučaj sa sintezom DNA ili proteina, nego je rezultat djelovanja različitih enzima i metabolita. Tako glikozilaciju proteina određuje zastupljenost i količina glikozil-transferaza, glikozidaza, enzima koji sudjeluju u sintezi šećernih prekursora, transportera šećera; te samih šećernih prekursora.[15] Ranije se na glikane gledalo više kao na „ukras“ proteina, koji ili nemaju bitan utjecaj na strukturu i funkciju proteina ili je taj utjecaj vrlo mali; dok je danas opće poznato da glikani imaju izrazito važnu strukturnu i funkcionalnu ulogu. Glikoproteini su zastupljeni u gotovo svim dijelovima stanice kao membranski proteini, proteini koji se izlučuju iz stanice, proteini unutar ER-a, GK, endosoma i lizosoma,[15] a odnedavno se sve više govori i o postojanju citoplazmatskih glikoproteina te glikoproteina unutar jezgre.[16–18]

2.1.1. Važnost i funkcija glikozilacije proteina

Glikani utječu prije svega na strukturu glikoproteina, njihovo pravilno smatanje, te samim time osiguravaju i pravilnu funkciju sintetiziranog glikoproteina.[19] Istraživanja su pokazala da glikozilacija omogućava veću otpornost glikoproteina na razgradnju proteazama,[20–22] poboljšavajući stabilnost glikoproteina. *O*-vezani glikani su uzrok antigenog djelovanja u krvnim grupama AB0.[23,24] Isto tako, glikani omogućavaju međusobne interakcije proteina na površini stanica, sudjeluju u signalizaciji, te interakciji, prepoznavanju i usmjeravanju dvaju stanica.[24]

Važnost točne sinteze glikoproteina se očituje u nasljednim poremećajima glikozilacije (CDG, eng. ***C**ongenital **D**isorders of **G**lycosylation*), koji obuhvaćaju širok spektar bolesti čiji uzrok su poremećaji u sintezi *N*-vezanih glikana, *O*-vezanih glikana, glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) sidra, dolikola ili samih prekursora.[25–27]

2.1.2. Vrste glikozilacije

Glikani na proteine (ili lipide) mogu biti vezani na različite načine. Najbolje proučene su:

a) *N*-glikozilacija - glikan je vezan na dušikov atom asparagina u slijedu aminokiselina Asn-X-Ser/Thr (gdje je X bilo koja aminokiselina osim Pro), te u nekim slučajevima na asparagin u slijedu aminokiselina Asn-X-Cys_{red}. Glikan je na protein vezan najčešće preko *N*-acetilglukozamina *β*-glikozidnom vezom (GlcNAc*β*1-Asn). Rjeđe je *N*-glikan na protein vezan preko glukoze na Asn (glikani laminina sisavaca i arhea), *N*-acetilgalaktozamina (GalNAc) na Asn (arhee), preko ramnoze na Asn (bakterije) ili preko glukoze na Arg (protein slatkog kukuruza).

b) *O*-glikozilacija - glikan je vezan na kisikov atom serina ili treonina proteina i to najčešće preko GalNAc-a *α*-glikozidnom vezom (mucini), a rjeđe preko fukoze ili manoze *α*-glikozidnom vezom, preko ksiloze *β*-glikozidnom vezom, te preko GlcNAc-a, galaktoze ili glukoze *α*- ili *β*-glikozidnom vezom.

Ostale vrste glikozilacije su:

c) *C*-glikozilacija - jedna manoza je vezana *C*-*C* *α*-„glikozidnom“ vezom na ugljikov atom prvog Trp u aminokiselinskom slijedu W-X-X-W (gdje je X bilo koja aminokiselina). Iako baze podataka pokazuju da oko 300-tinjak proteina u stanicama sisavaca ima ovu modifikaciju, njezina biosinteza i funkcija do danas nisu razjašnjeni.[28]

d) *P*-glikozilacija (fosfoglikozilacija) - glikani su vezani na kisik fosfatne skupine fosfoserina.[29]

e) GPI sidra - proteini su usidreni u membranu preko glikanskog dijela koji povezuje C-kraj proteina s lipidima iz membrane.

f) Glikozaminoglikani - linearne ponavljajuće disaharidne jedinice (heksozamin i heksoza ili heksuronska kiselina) vezane na proteine, čime nastaju tzv. proteoglikani.

2.2. *N*-glikozilacija proteina

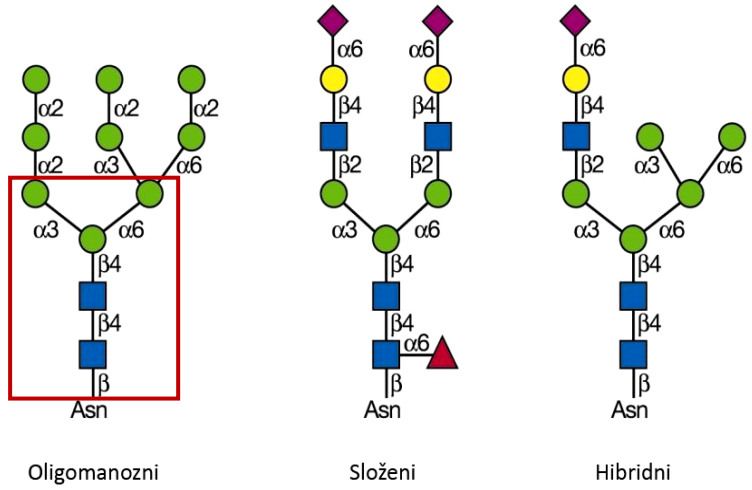
Mnogi glikoproteini vezani za membranu, te proteini koji se izlučuju iz stanice imaju *N*-vezane glikane. Do prijenosa *N*-glikana na asparagin dolazi na lumenalnoj strani membrane ER-a za vrijeme dok se proteinski dio još sintetizira na ribosomima vezanima za ER i translocira kroz membranu ER-a (Poglavlje 2.2.2.). Membranski glikoproteini ostaju usidreni

u membranu ER-a, s *N*-glikanima vezanima na domene proteina koje se nalaze u lumenu ER-a. Nasuprot tome, glikoproteini koji nemaju transmembransku domenu će se nakon kotranslacijskog vezanja *N*-glikana u konačnici cijeli transportirati u lumen ER-a.[28]

2.2.1. Struktura i heterogenost *N*-vezanih glikana

Svi *N*-vezani glikani imaju jednak sržni dio strukture koji se sastoji od tri manoze (Man) i dva GlcNAc-a: Manα1–6(Manα1–3)Manβ1–4GlcNAcβ1–4GlcNAcβ1-Asn. Ovisno o vrsti šećera i načinu grananja, *N*-vezani glikani se dijele na tri vrste (Slika 1):[28]

- Oligomanozni - na sržnu strukturu su vezane samo manoze
- Složeni - na sržnu strukturu su vezane "antene" koje započinju vezanjem GlcNAc-a na svaku od krajnjih manoza
- Hibridni - jedna ili dvije antene su vezane na Manα1–3 ruku, dok su na Manα1–6 ruku sržne strukture vezane samo manoze



Slika 1. Tri osnovna tipa *N*-vezanih glikana, od kojih svaki sadrži jednaku sržnu strukturu $Man_3GlcNAc_2$-Asn označenu crvenim pravokutnikom krajnje lijevo. Zeleni krug – manoza, plavi kvadrat – *N*-acetilglukozamin, ružičasti romb – *N*-acetilneuraminska kiselina (sijalinska kiselina), žuti krug – galaktoza, crveni trokut – fukoza[28]

U različitim dijelovima proteina mogu biti prisutni različiti tipovi *N*-glikozilacije. Smatra se da to ovisi o pristupačnosti šećera: što je šećer pristupačniji to je veća vjerojatnost da će enzimi odcijepiti većinu manoza te će na sržnu strukturu biti vezani dodatni šećeri. Nasuprot tome, ako je glikan prvobitno vezan na protein manje pristupačan, to je veća vjerojatnost da će ostati u visoko-manoznom obliku.

2.2.1.1. Učinkovitost glikozilacije i mikroheterogenost glikana

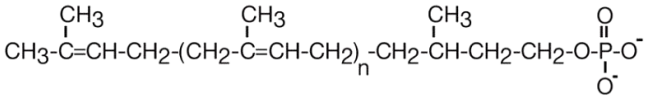
Iako je ranije navedeni slijed aminokiselina Asn-X-Ser/Thr u proteinu nužan za vezanje *N*-glikana, sama prisutnost slijeda ne znači da će se na asparagin zaista i vezati glikan. Razlog tome je konformacija i pristupačnost navedenog asparagina za vrijeme smatanja glikoproteina. Osim toga, učinkovitost glikozilacije ovisi o aminokiselini X,[30] te o okolnim aminokiselinama.[31] S druge strane, različite molekule istog glikoproteina često na jednom aminokiselinskom slijedu Asn-X-Ser/Thr imaju vezane različite *N*-glikanske strukture. Isto tako, ako glikoprotein ima više od jednog gore navedenog aminokiselinskog slijeda, različite molekule glikoproteina mogu imati različite *N*-glikane na različitim potencijalnim veznim mjestima. Ovaj fenomen je poznat pod nazivom mikroheterogenost ili heterogenost glikana. Glikoforma je, prema tome, specifični oblik glikoproteina s obzirom na vezane šećere. Različitost *N*-vezanih glikana određuje aminokiselinski slijed u proteinu,[32] konformacija proteina,[31] kao i metabolizam šećera vezanih na nukleotid, brzina transporta glikoproteina kroz ER i Golgijev kompleks, smještaj glikozil-transferaza u pododjeljcima GK.[33] Isto tako, mnoge glikozil-transferaze i glikozidaze ovise o prethodnoj aktivnosti drugih, kako je ranije navedeno, te različiti enzimi međusobno kompetiraju za isti supstrat.[28]

2.2.2. Biosinteza *N*-vezanih glikana

Biosinteza svih eukariotskih *N*-vezanih glikana započinje na citoplazmatskoj strani membrane ER-a prijenosom *N*-acetilglukozamin fosfata (GlcNAc-P) s uridin-5'-difosfat-*N*-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc) na prekursor dolikol fosfat (Dol-P), čime nastaje dolikol pirofosfat-*N*-acetilglukozamin (Dol-P-P-GlcNAc). Na isti način se na Dol-P uzastopno veže četrnaest šećera, nakon čega se cijeli glikan prenosi na aminokiselinski slijed Asn-X-Ser/Thr u proteinu, koji se u to vrijeme sintetizira i translocira kroz membranu ER-a. *N*-vezani glikan se zatim dodatno modificira u ER-u i GK-u djelovanjem glikozidaza i glikozil-transferaza vezanih za membranu ER-a. Budući da je većina ovih enzima osjetljiva na biokemijsko i fiziološko stanje stanice u kojoj se glikoprotein eksprimira, sastav šećera u glikanu zrelog glikoproteina će ovisiti o tipu i fiziološkom stanju stanice u kojoj je taj glikoprotein eksprimiran. Upravo zbog toga se tijekom razvoja i diferencijacije te u bolesti sastav glikana može promijeniti.[28]

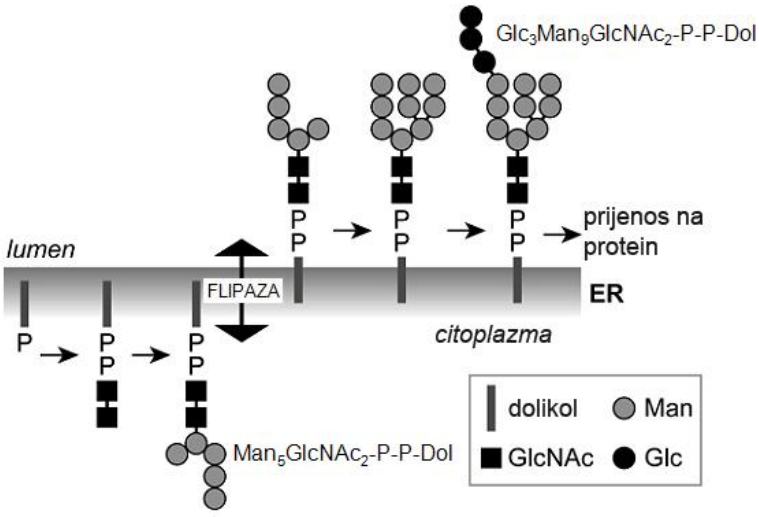
2.2.2.1. Sinteza prekursora dolikol-P-P-glikan

Prekursor u biosintezi *N*-vezanih glikana je Dol-P (Slika 2). Dolikol je poliizoprenolni lipid sastavljen od linearno povezanih izoprenskih jedinica (C_5H_8), čiji broj varira u stanici, među različitim tipovima stanica i među organizmima.



Slika 2. Struktura dolikol fosfata (Dol-P)

Sinteza prekursora *N*-vezanih glikana započinje prijenosom GlcNAc-P-a s UDP-GlcNAc-a na Dol-P koji je vezan na membranu ER-a, te time nastaje Dol-P-P-GlcNAc. Ovu reakciju katalizira GlcNAc-1-fosfo-transferaza. Drugi GlcNAc i pet manoza se uzastopno prenose s UDP-GlcNAc-a, odnosno s gvanozin-5'-difosfat-manoze (GDP-Man). U konačnici na citoplazmatskoj strani ER-a nastaje $Man_5GlcNAc_2$-P-P-Dol. Pojedine korake u sintezi ovog prekursora kataliziraju specifične glikozil-transferaze. Sve glikozil-transferaze prenose samo šećer, dok jedino GlcNAc-1-fosfo-transferaza prenosi šećer vezan na fosfat (GlcNAc-P). Nastali prekursor $Man_5GlcNAc_2$-P-P-Dol se pomoću flipaze translocira preko membrane ER-a, tako da je glikan izložen lumenu ER-a. Na $Man_5GlcNAc_2$-P-P-Dol se djelovanjem manozil-transferaza dodaju još četiri manoze prijenosom s Dol-P-Man, te djelovanjem glukozil-transferaza tri glukoze s Dol-P-Glc. Zreli prekursor $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-P-P-Dol (Slika 3) se u sljedećem koraku prenosi na asparagin u slijedu aminokiselina Asn-X-Ser/Thr proteina.[28]



Slika 3. Biosinteza prekursora dolikol-P-glikan. Man – manoza, GlcNAc – *N*-acetilglukozamin, Glc – glukoza[34]

2.2.2.2. Prijenos prekursora na protein

Prijenos $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ s Dol-P-P na Asn u novosintetiziranom proteinu koji izlazi iz translokona u membrani ER-a katalizira enzim oligosaharil-transferaza (OST).[35] OST je proteinski kompleks u membrani ER-a koji se sastoji od više podjedinica, koje su transmembranski proteini s jednom do osam transmembranskih domena. OST kompleks se veže na $Glc_3Man_9GlcNAc_2$-P-P-Dol, cijepa visokoenergetsku vezu GlcNAc-P i prenosi glikan na novosintetizirani protein, oslobađajući pri tome Dol-P-P (Slika 4).[28,35]

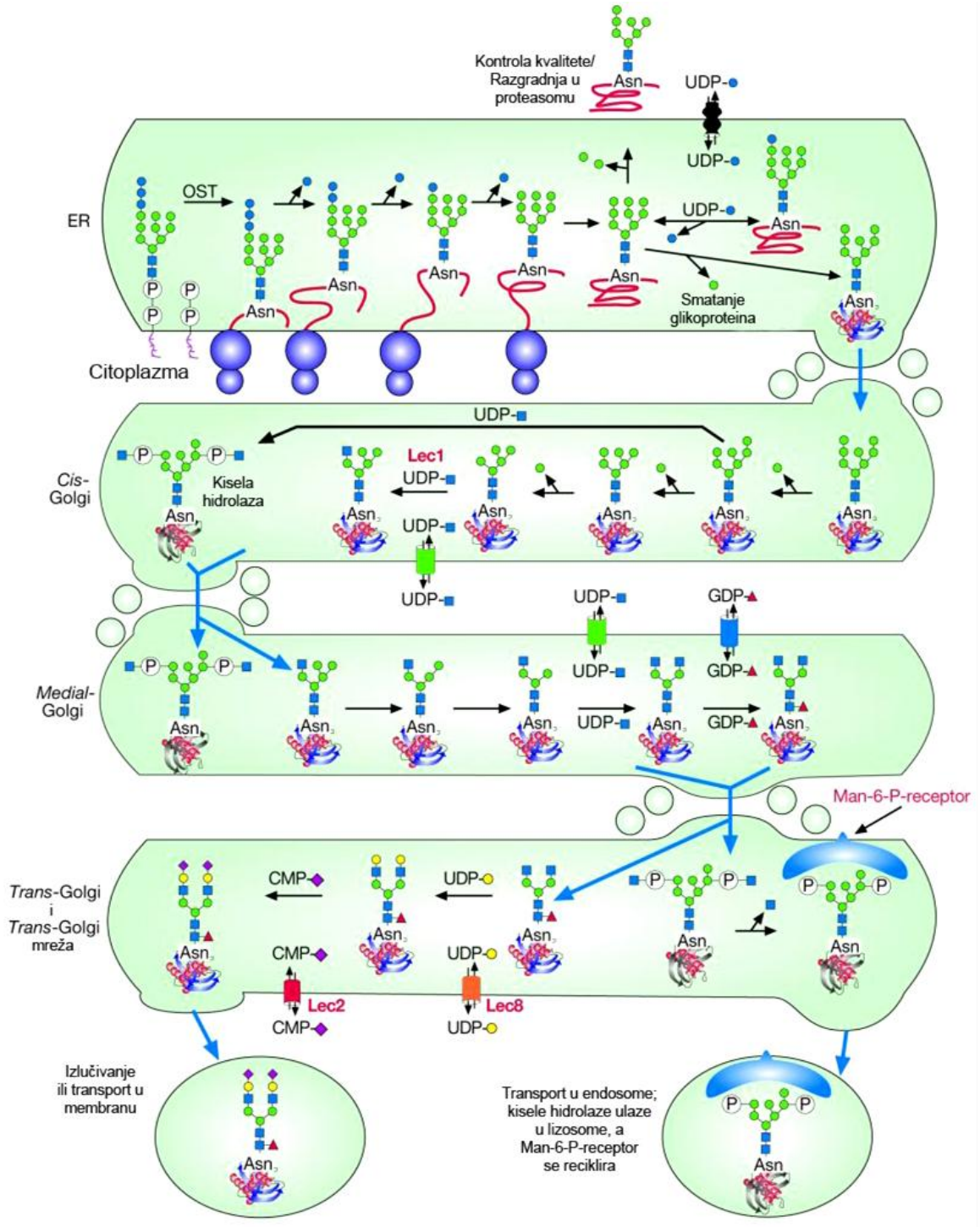
Kod sisavaca su identificirana tri OST kompleksa (OST-I, OST-II i OST-III), koji se međusobno razlikuju po sposobnosti prenošenja Dol-P-P-glikana koji imaju manje od četrnaest šećera, te po svojim kinetičkim svojstvima.

2.2.2.3. Početni koraci obrade prekursora

Nakon prijenosa glikana $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ na Asn u proteinu, *N*-vezani glikan se obrađuje u ER-u nizom reakcija (Slika 4). Prvi koraci su evolucijski očuvani među eukariotima i imaju ključnu ulogu u smatanju glikoproteina stvaranjem interakcija sa šaperonima ER-a kalneksinom i kalretikulinom.[33] $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ se postupno skraćuje uklanjanjem glukoza djelovanjem α-glukozidaze I i II. Obje α-glukozidaze djeluju u lumenu ER-a, s tim da α-glukozidaza I specifično uklanja terminalnu α1–2Glc, dok α-glukozidaza II postupno uklanja preostale dvije α1–3Glc.[28]

Terminalnu α1–2Man sa sržne ruke $Man_9GlcNAc_2$ u lumenu ER-a uklanja α-manozidaza I, te time nastaje $Man_8GlcNAc_2$. Protein sličan α-manozidazi I, ali koji nema enzimsku aktivnost nego prepoznaje krivo smotane glikoproteine je protein EDEM (eng. ***ER Degradation-Enhancing α-Mannosidase I–like protein***). Ovaj lektin se veže na manoze krivo smotanih glikoproteina te ih usmjerava retrotranslokacijom u citoplazmu radi razgradnje.[36] Ovisno o tome je li α-manozidaza I uklonila ili nije uklonila terminalnu manozu, *N*-glikani većine glikoproteina koji izlaze iz ER-a imaju vezano osam ili devet manoza. Međutim, neki glikoproteini nakon izlaska iz ER-a i dalje imaju vezanu glukozu zbog nepotpunog uklanjanja u ER-u. Takve *N*-vezane glikane prepoznaje endo-α-manozidaza u GK-u te uklanja terminalnu glukozu zajedno s manozom na koju je vezana. Na taj način nastaje drugačiji izomer $Man_8GlcNAc_2$ od onog koji nastaje djelovanjem α-manozidaze I u lumenu ER-a.[28]

Uklanjanje α1–2Man se kod višestaničnih organizama nastavlja u *cis*-GK-u djelovanjem α1–2 manozidaza IA, IB i 1C. Time nastaje međuprodukt u biosintezi složenih i hibridnih *N*-vezanih glikana, $Man_5GlcNAc_2$. Neki glikani $Man_5GlcNAc_2$ se dalje ne modificiraju, a dio *N*-vezanih glikana ne dođe niti do ovog stupnja, nego ostane u oligomanoznom obliku $Man_{5–9}GlcNAc_2$, što je čest slučaj kod većine zrelih glikoproteina.[28]



Slika 4. Biosinteza *N*-vezanih glikana u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom kompleksu[28]

2.2.2.4. Obrada $Man_5GlcNAc_2$ u složene i hibridne N-glikane

Daljnja biosinteza složenih i hibridnih *N*-vezanih glikana se zbiva u srednjem dijelu GK-a (*medial*-Golgi) (Slika 4). *N*-acetilglukozaminil-transferaza GlcNAcT-I veže GlcNAc na ugljikov atom C2 α1–3-vezane manoze sržnog dijela $Man_5GlcNAc_2$ (Slika 4). Sa većine *N*-vezanih glikana se aktivnošću α-manozidaze II u srednjem dijelu GK-a uklanjaju terminalne α1–3- i α1–6-vezane manoze s $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$. Time nastaje $GlcNAcMan_3GlcNAc_2$ i to samo ako je prethodno djelovanjem GlcNAcT-I vezan GlcNAc.[28]

U sljedećem koraku se aktivnošću GlcNAcT-II na ugljikov atom C2 α1-6-vezane manoze također veže GlcNAc. Ovom reakcijom nastaje prekursor za sve složene biantenarne *N*-vezane glikane. Nasuprote tome, hibridni *N*-vezani glikani se sintetiziraju ako α-manozidaza II ne ukloni α1–3- i α1–6-vezane manoze s $GlcNAcMan_5GlcNAc_2$. Isto tako, djelomičnom aktivnošću α-manozidaze II može nastati $GlcNAcMan_4GlcNAc_2$.[28]

Dodatne antene (grane) u složenim *N*-vezanim glikanima mogu nastati vezanjem GlcNAc-a na α1–3-vezanu sržnu manozu aktivnošću GlcNAcT-IV, te vezanjem na α1–6-vezanu sržnu manozu aktivnošću GlcNAcT-V. Na ovaj način nastaju triantenarni i tetraantenarni *N*-vezani glikani (Slika 4).

Složeni razgranati *N*-vezani glikani s račvajućim (eng. *bisecting*) GlcNAc-om vezanim na β1–4-vezanu sržnu manozu nastaju aktivnošću GlcNAcT-III, i to nakon uklanjanja terminalnih manoza α-manozidazom II i inicijacijom antena aktivnošću GlcNAcT-II, GlcNAcT-IV i/ili GlcNAcT-V. Razlog tome je što aktivnost GlcNAcT-III inhibira aktivnost α-manozidaze II. Osim toga, istraživanja *in vitro* su pokazala da račvajući GlcNAc inhibira i aktivnost GlcNAcT-II, GlcNAcT-IV i GlcNAcT-V.

2.2.2.5. Završna obrada N-vezanih glikana u trans-Golgiju

Složeni *N*-vezani glikani nastaju završnim vezanjem šećera u *trans*-GK-u, te se ove reakcije mogu podijeliti u tri vrste:[28]

a) Vezanje šećera na sržni dio strukture - Osnovna modifikacija *N*-vezanih glikana kod kralješnjaka je vezanje fukoze α1–6-glikozidnom vezom na GlcNAc kojim je glikan vezan na asparagin proteina. Beskralješnjaci također imaju vezanu fukozu u ovom položaju, ali se ona osim α1–6- može vezati i α1–3-glikozidnom vezom i to na oba GlcNAc-a sržne strukture

(ukupno četiri vezane fukoze). Nasuprot tome, biljke imaju α1–3-vezanu fukozu na GlcNAc-u kojim je glikan vezan na protein. Da bi se fukoza vezala na sržni GlcNAc potrebna je prethodna aktivnost GlcNAcT-I.

b) Vezanje šećera na terminalne GlcNAc-e, tj. produženje antena - Većina složenih i hibridnih *N*-vezanih glikana na GlcNAc-u u antenama ima vezanu galaktozu, te time nastaje slijed Galβ1-4GlcNAc. Antene se dalje produžuju uzastopnim vezanjem GlcNAc-a i galaktoze, čime nastaje slijed (-3Galβ1–4GlcNAcβ1-)$_n$. Osim toga, vezanjem galaktoze na ugljikov atom C3 nastaje Galβ1–3GlcNAc. Neki *N*-vezani glikani umjesto galaktoze na GlcNAc-u imaju vezan GalNAc, te nastaje slijed GalNAcβ1–4GlcNAc. Međutim za ovaj slijed nisu karakteristična uzastopna ponavljanja.

c) Završno vezanje šećera (eng. *capping*) na produžene antene - Uključuje vezanje sijalinske kiseline, fukoze, galaktoze, GalNAc-a i sulfata. Ovi krajnji šećeri su uglavnom vezani α-glikozidnom vezom, te su na taj način izloženi za stvaranje interakcija s antitijelima i lektinima. Mnogi od ovih krajnjih šećera su zajednički *N*-vezanim i *O*-vezanim glikanima, te glikolipidima.

2.2.3. Glikani kao biomarkeri

Glikozilacija proteina je jedna od najčešćih posttranslacijskih modifikacija te se smatra da je oko 50 % eukariotskih proteina glikozilirano,[37] što se posebice odnosi na membranske proteine te proteine koji se izlučuju iz stanice. Kao što je ranije spomenuto, specifična glikozilacija nije rezultat postojanja izravne upute u DNA prema kojem bi se glikani jednako sintetizirali u cijelom organizmu, nego je rezultat određene količine šećernih prekursora, količine proteina transportera, glikozil-transferaza i glikozidaza, te međusobne kompeticije enzima koji direktno sudjeluju u sintezi glikana. Prema tome, glikozilacija je specifična za pojedini protein, tip i stupanj razvoja stanice, te u krajnjoj liniji za pojedini organizam. S obzirom na navedeno, veća je vjerojatnost da će u bolesti biti izraženije promjene u glikozilaciji nego promjene u samoj ekspresiji nekog proteina. S obzirom da različite glikozil-transferaze i glikozidaze međusobno kompetiraju za isti supstrat u putu biosinteze glikana, promjena u ekspresiji nekog od enzima će dovesti do značajne promjene u glikozilaciji. Isto tako, u slučaju da se naruši ravnoteža u smislu količine šećernih prekursora, te količine i aktivnosti enzima koji sudjeluju u glikozilaciji, postoji vjerojatnost da će svi ili većina

glikoproteina biti pogrešno glikozilirana, budući da se glikozilacija svih glikoproteina odvija u istim staničnim odjeljcima (ER-u i GK-u). Promijenjena glikozilacija ne samo da može biti uzrok narušavanja ravnoteže u organizmu i nastanka bolesti, nego isto tako i sama bolest može uzrokovati promjene u glikozilaciji pojedinih proteina.

Osim CDG, koje same obuhvaćaju širok spektar poremećaja, sve veći broj istraživanja povezuje promjene u glikozilaciji s autoimunim bolestima, infektivnim bolestima te različitim oblicima raka.[2,15]

Analiza glikozilacije uključuje nekoliko razina složenosti: od analize sastava glikana (broja pojedinih šećera) i strukture glikana, sve do analize glikozilacije određenog proteina i analize glikozilacije na specifičnom mjestu određenog proteina.[38] Iako i sama analiza sastava glikana svih proteina plazme ili nekog tipa stanice može dati informacije o potencijalnom nastanku bolesti, analiza glikozilacije određenog proteina ima prednost u tome što se istovremeno identificira i karakterizira ciljni protein za razvoj novih lijekova, u slučaju da je njegova glikozilacija promijenjena u bolesti.

Razvoj novih tehnologija (Poglavlje 2.3.) u području glikobiologije omogućio je jednostavnije i brže rasvjetljavanje mehanizma nastanka različitih bolesti, pronalazak potencijalnih biomarkera za dijagnostiku i prognozu razvoja bolesti, te pronalazak ciljnih molekula za razvoj novih i učinkovitijih lijekova.

2.3. Analiza glikozilacije proteina

Glikozilacija proteina je sve donedavno bila slabo proučavana. Razlog tome je prije svega sama složenost i raznovrsnost glikana koja je predstavljala izazov za pronalazak učinkovitih analitičkih metoda, koje bi s podjednakom učinkovitošću omogućile istovremenu analizu nenabijenih i nabijenih glikana (manje hidrofilnih i izrazito hidrofilnih), a bez razgradnje složenih glikana na pojedinačne šećere.

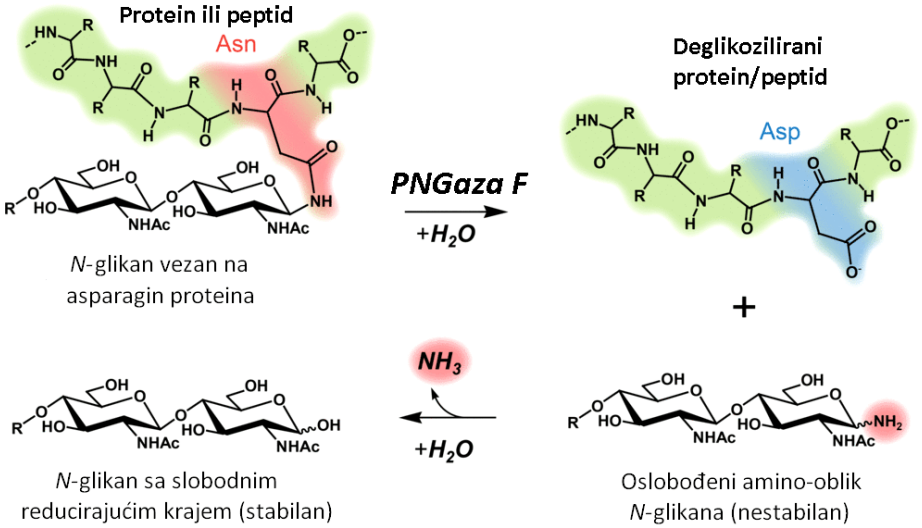
2.3.1. Analiza *N*- i *O*-glikozilacije proteina

Pojedine vrste glikana (Poglavlje 2.1.2.) se međusobno znatno razlikuju po svojim kemijskim svojstvima i stabilnosti, te unatoč velikom napretku u razvoju metodologije paralelna analiza

različitih tipova glikozilacije (uglavnom *N*- i *O*-vezanih glikana) i dalje predstavlja veliki izazov.

Iako je moguće istovremeno analizirati i *O*- i *N*-vezane glikane u nekom uzorku, ta analiza najčešće nije potpuna, često je nereproducibilna, te zahtijeva mnogo koraka priprave i pročišćavanja obje skupine glikana prije njihove same analize. Analiza *O*-glikana se oslanja na kemijske postupke oslobađanja s proteina, pri čemu su moguće sporedne reakcije, što dovodi do problema slabije učinkovitosti oslobađanja *O*-glikana te lošije reproducibilnosti. Osim toga, *O*-vezani glikani su kemijski manje stabilni od *N*-glikana, te se postupno razgrađuju u procesu koji se naziva „ljuštenje“ (eng. *peeling*), te tako dodatno otežavaju točnu i reproducibilnu analizu.[39–41]

Nasuprot tome, *N*-glikane je moguće osloboditi s proteina enzimskim putem, inkubacijom s enzimom peptid-*N*-glikozidazom F (PNGazom F). PNGaza F specifično cijepa vezu između *N*-vezanog sržnog GlcNAc-a i Asn u glikoproteinu, pri čemu se Asn prevodi u Asp i nastaje 1-aminooligosaharid, koji se u sljedećem koraku neenzimatski hidrolizira u amonijak i oligosaharid sa slobodnim reducirajućim krajem (Slika 5). S obzirom na veću zastupljenost *N*-glikozilacije u odnosu na druge tipove glikozilacije te jednostavniju analizu, većina istraživanja je fokusirana upravo na analizu *N*-glikozilacije proteina.



Slika 5. Reakcija oslobađanja *N*-vezanih glikana s glikoproteina upotrebom PNGaze F[42]

2.3.2. Visokoprotočna analiza *N*-vezanih glikana

S obzirom na ranije spomenuti potencijal glikana u otkriću biomarkera za različite bolesti, nametnula se potreba za razvojem metoda za analizu glikana velikog broja uzoraka, takozvanim visokoprotočnim metodama. Ove metode omogućavaju dobivanje točnijih i robustnijih rezultata u kraćem vremenu, što je izrazito važno u velikim populacijskim studijama u svrhu analize „normalnih" varijacija u glikozilaciji pojedinih proteina, te u svrhu otkrivanja učinkovitih dijagnostičkih i prognostičkih markera analizom glikozilacije pacijenata te kontrolnih zdravih ispitanika.

Trenutno je u upotrebi nekoliko pristupa visokoprotočnoj analizi *N*-glikana: tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti, tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC-MS, eng. ***L**iquid **C**hromatography **M**ass **S**pectrometry*), spektrometrija masa s matricom potpomognutom ionizacijom laserskom desorpcijom (MALDI-MS, eng. ***MA**trix-assisted **L**aser **D**esorption/**I**onization **M**ass **S**pectrometry*), te kapilarna gel-elektroforeza. Navedene metodologije su nedavno međusobno uspoređene za analizu glikozilacije IgG-a, s obzirom na njihove prednosti i nedostatke (Tablica 1).[14]

Tablica 1. Pregled metoda za visokoprotočnu analizu *N*-glikana[14]

	UPLC	**MALDI-MS**	**LC-MS**	**CGE**
Protočnost	Umjerena, približno 50 uzoraka po instrumentu u danu	Visoka, mjerenje uzorka u manje od minute	Umjerena, približno 100 uzoraka po instrumentu u danu	Visoka, korištenje do 96 kapilara omogućava mjerenje tisuća uzoraka
Razlučivost	Visoka	Vrlo visoka	Vrlo visoka	Visoka
Razdvajanje izomera	Dobro	-	Djelomično	Vrlo dobro
Kvantifikacija	Vro dobra	Umjerena	Dobra	Dobra
Potrebna razina stručnosti	Umjerena	Visoka	Vrlo visoka	Umjerena
Učestalost upotrebe	U širokoj upotrebi	U širokoj upotrebi	Umjereno korištena	Rijetko korištena
Cijena opreme	40 000 – 70 000 EUR	100 000 – 500 000 EUR	200 000 – 500 000 EUR	100 000 EUR (instrument s 4 kapilare)

	UPLC	**MALDI-MS**	**LC-MS**	**CGE**
Cijena po uzorku u visokoprotočnom načinu rada	Prilično visoka cijena, uglavnom zbog manje protočnosti i cijene kemikalija	Niska cijena, ulavnom zbog visoke protočnosti po instrumentu	Vrlo visoka cijena, uglavnom zbog skupe opreme i niže manje protočnosti po instrumentu	Niska cijena, uglavnom zbog niske cijene analize i mogućnosti paralelne analize
Glavne prednosti u genetičkim i epidemiološkim istraživanjima	Pouzdana kvantifikacija, robusnost	Niska cijena i visoka protočnost, analiza mjesno specifične glikozilacije, osjetljivost, omogućava određivanje strukture fragmentacijom	Pouzdana kvantifikacija, osjetljivost, analiza mjesno specifične glikozilacije, omogućava određivanje strukture fragmentacijom	Manje zahtjevna priprava uzoraka, niska cijena, velika robusnost i visoka protočnost, vrlo osjetljiva, pouzdana relativna kvantifikacija
Glavni nedostatci u genetičkim i epidemiološkim istraživanjima	Nemogućnost analize mjesno specifične glikozilacije, relativno niska protočnost i veća cijena	Manje pouzdana kvantifikacija, gubitak sijalinskih kiselina	Relativno visoka cijena	Nemogućnost analize mjesno specifične glikozilacije, mala baza podataka
Prednosti u analizi glikozilacije IgG-a	Mogućnost razlikovanja glikozilacije na ruci 3 i 6, točna kvantifikacija sijalinizacije IgG-a	Mogućnost razlikovanja glikana na pojedinim podklasama IgG-a, analiza jedino glikana s Fc* dijela	Mogućnost razlikovanja glikana na pojedinim podklasama IgG-a, analiza jedino glikana s Fc* dijela, točna kvantifikacija sijalinizacije IgG-a	Mogućnost razlikovanja glikozilacije na ruci 3 i 6, točna kvantifikacija sijalinizacije IgG-a

* Fc – fragment IgG-a koji kristalizira, vidi Poglavlje 2.4.1.

2.3.3. Analiza *N*-vezanih glikana metodom UPLC

Za analizu glikana se vrlo često koristi UPLC uz fluorescencijski detektor, budući da omogućava pouzdanu i robusnu kvantifikaciju, razdvajanje glikanskih izomera, te uz relativno nisku cijenu opreme. Standardni postupak analize glikana UPLC-om se sastoji od:

1) deglikozilacije proteina – u poliakrilamidnom gelu,[43] na membrani[43–45] ili u otopini,[46]
2) obilježavanja oslobođenih glikana fluorescentnom bojom (2-aminobenzojevom kiselinom;[47] 2-aminopiridinom;[48] prokainamidom;[49] a najčešće 2-aminobenzamidom, 2-AB),[47]
3) pročišćavanja obilježenih glikana radi uklanjanja suviška reagensa – najčešće ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE, eng. ***S**olid **P**hase **E**xtraction*) za što se koriste različite čvrste faze,

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

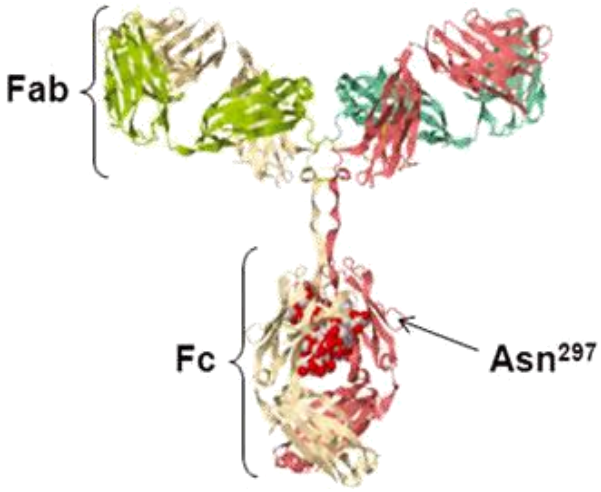
Za svaku od gore navedenih faza u analizi *N*-glikana tekućinskom kromatografijom do danas je objavljeno mnogo različitih analitičkih postupaka, od kojih svaki ima svoje prednosti i nedostatke. Donedavno najviše korištena metoda deglikozilacije proteina prethodno imobiliziranih u poliakrilamidnom gelu[43] (eng. *in-gel block method*) je zahtijevala intenzivan rad u periodu od tri dana uz veliki utrošak organskog otapala, za obilježavanje glikana se koristio toksičan natrijev cijanoborhidrid, a sama reproducibilnost metode je znatno ovisila o učinkovitosti izolacije oslobođenih glikana iz gela. Zbog zahtjeva za visokoprotočnom analizom glikana što većeg broja uzoraka u što kraćem vremenu razvijeni su alternativni pristupi koji su znatno skratili vrijeme priprave uzoraka i smanjili utrošak otapala, a danas se umjesto natrijevog cijanoborhidrida za redukciju koristi 2-pikolin boran (2-PB).[50]

2.4. Imunoglobulin G

Imunoglobulini su među najzastupljenijim glikoproteinima u krvi, a uloga im je da kao antitijela brane organizam prepoznavajući strane antigene. Antitijela tako promoviraju opsonizaciju antigena (označavanje patogena za unos i eliminaciju fagocitima), inicijaciju fagocitoze te vežu i neutraliziraju antigene aktivirajući ADCC. Od pet klasa imunoglobulina (A, D, E, G i M), imunoglobulin G je najzastupljeniji u krvi, a ljudski IgG se dijeli na četiri podklase – IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4.

2.4.1. Struktura i glikozilacija imunoglobulina G

Imunoglobulin G je građen od dva teška lanca (50 do 70 kDa) i dva laka lanca (oko 25 kDa) međusobno povezana disulfidnim vezama u strukturu u obliku slova Y (Slika 6). IgG ima dvije domene međusobno odvojene fleksibilnom regijom: fragment koji veže antigen, Fab (eng. ***F**ragment, **a**ntigen **b**inding*), te fragment koji kristalizira, Fc (eng. ***F**ragment, **c**rystallizable*). Fab regija određuje specifičnost molekule IgG-a prema antigenu, dok se preko Fc domene veže za receptore FcR na površini stanica imunološkog sustava.[7] Od tri skupine receptora u ljudskom organizmu, jedino FcγRI veže monomerni IgG, dok FcγRII i FcγRIII receptori vežu kompleks antitijela i antigena, pri čemu afinitet vezanja ovisi o podklasi vezanog IgG-a.[51]



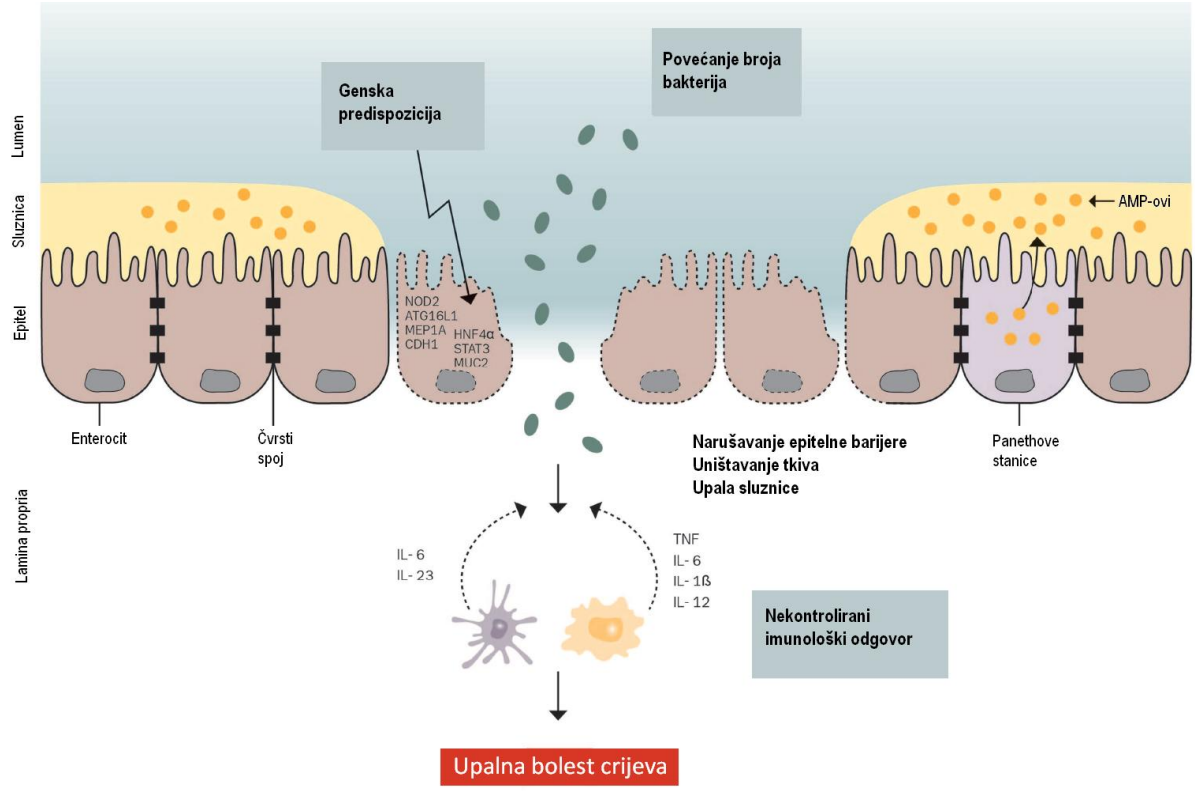
Slika 6. Struktura imunoglobulina G. Fab - fragment koji veže antigen, Fc – fragment koji kristalizira, Asn^{297} – asparagin 297 na koji je vezan *N*-glikan[7]

Svaki teški lanac u Fc domeni IgG-a ima vezan po jedan glikan na dušikovom atomu Asn297. Fc *N*-glikani su smješteni u šupljini između dva teška lanca, te se smatra da glikani održavaju otvorenu konformaciju domene Fc kako bi se omogućilo vezanje IgG-a na receptore FcγR, budući da deglikozilirani IgG nema mogućnost vezanja na receptore.[52] Osim glikana u Fc domeni 15-20 % molekula IgG-a ima glikane vezane i u Fab domeni, što je posljedica nastanka glikozilacijskih mjesta uslijed somatske hipermutacije (procesa kojim uvođenjem točkastih mutacija nastaju varijante imunoglobulina s povećanim afinitetom za određeni antigen).[53] Fab glikani se po svojem sastavu razlikuju od Fc glikana, te primjerice oko 45 % glikana vezanih u Fab domeni može biti sijalinizirano, a veći je i udio glikoformi s račvajućim GlcNAc-om u odnosu na glikane Fc fragmenta. Dok su glikani vezani na Fc fragment smješteni u hidrofobnom džepu poprilično rigidni, glikani vezani na Fab fragment su vrlo fleksibilni.[54,55]

Glikozilacija IgG-a je dosad vrlo dobro proučena,[56–63] a istraživanja su pokazala da značajno utječe ne samo na njegovu strukturu, nego i na njegovu funkciju. Poznato je na primjer da molekule IgG-a koje sadrže glikane bez sržne fukoze imaju povećani afinitet za receptore FcγRIIIA u odnosu na fukozilirane molekule IgG-a,[5] te su prema tome učinkovitije u aktiviranju ADCC-a.[4] Osim toga, istraživanja su pokazala da IgG može djelovati protuupalno ili proupalno, ovisno o tome sadrži li njegov glikanski dio terminalno vezanu sijalinsku kiselinu. Tako IgG djeluje proupalno ako nije sijaliziran, odnosno protuupalno ako je sijaliziran.[6,55,64]

2.5. Upalna bolest crijeva

Upalnu bolest crijeva karakterizira kronična upala crijeva za sad nepoznate patogeneze, a poznata su dva oblika ove bolesti – Crohnova bolest i ulcerozni kolitis. Ova dva oblika bolesti se općenito razlikuju po tome što Crohnova bolest može zahvatiti bilo koji dio gastrointestinalnog trakta, te može prodrijeti kroz stijenku organa, dok je ulcerozni kolitis ograničen na sluznicu debelog crijeva. Iako se Crohnova bolest i ulcerozni kolitis definiraju empirijski prema tipičnim laboratorijskim, kliničkim, patološkim, radiološkim i endoskopskim karakteristikama, kod nekih pacijenata je nemoguće odrediti radi li se o Crohnovoj bolesti ili ulceroznom kolitisu na temelju ovih navedenih kriterija.[65] Osnovna prepreka sigurnoj dijagnozi je nepoznavanje uzroka i patogeneze upalne bolesti crijeva, a prema sadašnjim saznanjima se pretpostavlja da je upalna bolest crijeva rezultat i genske predispozicije i okolišnih čimbenika. Cijelogenomske asocijacijske studije (GWAS, eng. *Genome-Wide Association Studies*) su identificirale ukupno 163 mjesta u genomu povezana s upalnom bolesti crijeva, od čega ih je 110 povezano i s Crohnovom bolešću i s ulceroznim kolitisom, sugerirajući zajedničke biokemijske putove nastanka bolesti, dok je njih 30 povezano specifično s Crohnovom bolešću i 23 specifično s ulceroznim kolitisom.[66–68] Unatoč genskoj predispoziciji mnogi pacijenti nikada ne razviju upalnu bolest crijeva, što govori u prilog tome da osim genskih čimbenika veliku ulogu imaju i okolišni čimbenici kao što su način prehrane, infekcije, stres, pušenje; a smatra se da je najvažniji okolišni čimbenik sastav crijevne mikroflore. Iako se za neke specifične patogene smatralo da uzrokuju razvoj upalne bolesti crijeva, niti jedan nije potvrđen kao uzročnik, te se smatra da su antigeni mikroorganizama koji su inače prisutni u lumenu crijeva ti koji uzrokuju upalu.[69] Prema tome, upalna bolest crijeva je najvjerojatnije rezultat pretjeranog imunološkog odgovora organizma s genskom predispozicijom na crijevnu mikrofloru, čime se narušava funkcija epitelne barijere te odgovor na patogene organizme (Slika 7).[66]



Slika 7. Mehanizam nastanka upalne bolesti crijeva kombinacijom genske predispozicije, sastava crijevne mikroflore te nekontroliranog imunološkog odgovora organizma, čime se oštećuje epitelna barijera i narušava njezina funkcija. TNF – faktor tumorske nekroze (eng. ***T**umor **N**ecrosis **F**actor*), IL - interleukin[66]

Unutrašnjost crijeva je složen ekosustav mikroorganizama (10^{12} po mililitru sadržaja crijeva) koji je vrlo dobro reguliran kako bi se održala ravnoteža u organizmu domaćina.[1,70] Iako postoji velika varijabilnost u sastavu crijevne mikroflore među ljudima, tijekom života ona je više-manje stabilna.[71] Epitel crijeva sadrži sloj stanica različitog tipa koje predstavljaju s jedne strane zaštitnu barijeru od štetnih tvari i patogenih organizama te njihova ulaska u krvotok, a s druge strane sprječavaju pretjerani imunološki odgovor na antigene prisutne u crijevu; zadržavajući pri tome selektivnu permeabilnost prema mikronutrijentima. Ova barijera ovisi o međustaničnim spojevima (eng. *intercellular junctions*) koji zatvaraju prostor između susjednih epitelnih stanica, te čvrstih spojeva (eng. *tight junctions*). Upalnu bolest crijeva karakterizira povećana permeabilnost između susjednih stanica epitela te narušena regulacija čvrstih spojeva, što dovodi do povećane izloženosti bakterijama iz lumena te do upale sluznice. U prilog tome govori činjenica da je pacijentima na anti-TNF terapiji ta permeabilnost ponovno smanjena.[72,73]

Važnu ulogu ima i sama sluznica koja sprječava kontakt bakterija s epitelnim slojem crijeva i interakciju s imunološkim sustavom. Za stvaranje sluznice, kao i faktore koji

reguliraju upalu i potpomažu popravak epitela odgovorne su specijalizirane epitelne stanice - goblet stanice. Dodatno, Panethove stanice luče proteine defenzine te druge molekule koji djeluju baktericidno, te na taj način sudjeluju u obrani organizma domaćina od neželjenih mikroorganizama iz lumena crijeva.[1,69]

S obzirom na konstantno stanje „imunološke spremnosti" prisutno u gastrointestinalnom traktu, smatra se da je upalna bolest crijeva zapravo preuveličani upalni odgovor koji je inače prisutan u rahlom vezivnom tkivu (lat. *lamina propria*), a koji je posljedica narušavanja jednog ili više faktora koji sudjeluju u održavanju ravnoteže i obrambenih mehanizama u crijevu. Tako primjerice stalna prisutnost infektivnog agensa ili unutarnje oštećenje sluznice može dovesti do stimulacije imunološkog odgovora. S druge strane, sama regulacija imunološkog odgovora može biti narušena te time dolazi do njegove pretjerane aktivacije na normalne podražaje, ili ne postoji mogućnost učinkovitog smanjenja aktivacije povratnom spregom (eng. *feedback down-regulation*).[65]

2.5.1. Karakteristike Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa

Crohnova bolest je naizgled složeniji upalni proces od ulceroznog kolitisa budući da ga karakteriziraju raznovrsnije kliničke manifestacije. Karakteristika Crohnove bolesti je nakupljanje makrofaga i limfocita, ne samo u sluznici gastrointestinalnog trakta, nego i (za razliku od ulceroznog kolitisa) prodiranje u dublje slojeve stijenke crijeva uz širenje upalnog procesa. Česta je pojava čireva koji u početku liče aftama dok se napredovanjem bolesti pojavljuju i duboki čirevi nalik pukotinama. Agregacija/taloženje makrofaga u oko 50 % pacijenata dovodi do razvoja nekazeoznog granuloma. Isto tako, česta pojava je i uklanjanje (eng. *deposition*) kolagena što može doprinijeti formiranju striktura (suženja).[65]

Crohnova bolest najčešće zahvaća završni dio ileuma i/ili debelo crijevo, ali može zahvatiti bilo koji dio gastrointestinalnog trakta te se proširiti i na okolna tkiva formirajući fistule (kanale između dvaju epitelnih površina). Za razliku od ulceroznog kolitisa koji karakterizira kontinuirana upala koja često obuhvaća i rektum, Crohnovu bolest karakterizira upala lokalizirana na pojedine dijelove gastrointestinalnog trakta. Upalni proces u slučaju ulceroznog kolitisa je ograničen na sluznicu i površinske dijelove stanica ispod sluznice (eng. *submucosa*) debelog crijeva. Unutar udubljenja dolazi do formiranja mikro čireva, uklanjanja sluznice s goblet stanica te prodiranja limfocita, neutrofila i ostalih čimbenika upale u *laminu propriu*. Formiranje pseudopolipa i široka područja zahvaćena površinskim čirevima su

karakteristična za ulcerozni kolitis, a stadij bolesti ovisi o količini zahvaćenog tkiva te intenzitetu upale.[65,74]

Pacijenti koji boluju od Crohnove bolesti ili ulceroznog kolitisa imaju narušenu ravnotežu crijevne flore, u smislu smanjenja raznovrsnosti, povećane zastupljenosti bakterija koje prodiru kroz sluznicu crijeva, te smanjenja zastupljenosti mikroorganizama koji imaju pozitivan utjecaj na organizam. Istraživanja su pokazala da pacijenti koji boluju od upalne bolesti crijeva imaju i pet puta veću vjerojatnost obolijevanja od raka debelog crijeva.[71]

2.5.2. Liječenje pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva

Liječenje pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva obuhvaća promjenu načina života, terapiju lijekovima te operativne zahvate. Dosad nije pronađena univerzalna terapija za Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis, kao niti za sve pacijente koji boluju od samo jednog oblika upalne bolesti crijeva. Protuupalni agensi su učinkoviti samo u nekim slučajevima, često im se s vremenom smanjuje učinkovitost ili imaju neželjene nuspojave kao što je povećani rizik za infekciju (primjerice primjenom anti-TNF-α monoklonskih antitijela se znatno povećava rizik obolijevanja od tuberkuloze).[69]

Razvoj novih vrsta terapija prije svega ovisi o novim saznanjima vezano uz mehanizme održavanja ravnoteže imunološkog odgovora u probavnom sustavu.

2.5.3. Imunoglobulin G i upalna bolest crijeva

Važnu ulogu u regulaciji imunološkog odgovora ima kontinuirano ispitivanje (uzorkovanje) mikroorganizama iz lumena crijeva, što se postiže transportom mikroorganizama iz lumena crijeva preko epitelnih stanica u sekundarne limfne organe (mezenterijalni limfni čvorovi, te Peyerove ploče, eng. *Peyer's patch*es).[69] U ovom procesu sudjeluju imunoglobulini i dendritične stanice.

Prvu obranu protiv mikroorganizama u sluznicama ljudskog organizma osiguravaju IgA, IgM i IgG. IgG se preko epitelnih stanica crijeva transcitozom prenosi putem neonatalnog receptora Fc za IgG (FcRn) iz krvi u lumen crijeva, gdje prepoznaje bakterijske antigene i veže ih. Vezani kompleks IgG-a i antigena se zatim ponovno transcitozom putem FcRn receptora transportira preko epitelnih stanica do $CD4^+$ T stanica u sekundarnim limfnim organima.[75,76] $CD4^+$ T stanice se zatim aktiviraju i proliferiraju u T_h1 stanice (eng. ***T h****elper*

cells, stanice koje potpomažu aktivnost drugih stanica imunološkog sustava lučeći citokine, male proteine koji sudjeluju u signalizaciji) ili u T_h2 stanice. T_h1 stanice pomažu u eliminaciji bakterija koje prodiru kroz barijeru, dok T_h2 stanice pomažu u diferencijaciji nezrelih B stanica u stanice plazme koje proizvode IgG specifičan za bakterijske antigene radi zaštite od njihove invazije.[76]

2.5.3.1. Glikozilacija IgG-a u upalnoj bolesti crijeva

Nedavne genetičke studije su pokazale da je pet od ukupno šesnaest gena koji sudjeluju u regulaciji glikozilacije IgG-a povezano s upalnom bolesti crijeva[10] (*IKZF1*[*], *LAMB1*[†], *MGAT3*[‡], *IL6ST*[§], *BACH2*[**]). Dosad je provedeno nekoliko istraživanja čiji rezultati su uputili na smanjenu galaktozilaciju IgG-a pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva.[11,12] Međutim, smanjena galaktozilacija IgG-a je pronađena samo u 54, tj. 72 % pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i u samo 28, tj. 33 % pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa. Osim toga, proučavane su isključivo nesijalinizirane glikoforme, a kao što je ranije navedeno, sijalinska kiselina modulira upalno djelovanje IgG-a,[6,55,64] te bi svakako bilo zanimljivo istražiti potencijalnu povezanost sijaliniziranih glikoformi IgG-a s upalnom bolesti crijeva. Nedavno je prvi put objavljeno i istraživanje glikozilacije ukupnih proteina u serumu pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa,[13] te je potvrđena smanjena galaktozilacija proteina seruma pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike. Ovim istraživanjem je prvi put proučena sijalinizacija ukupnih proteina seruma, te se pokazalo da su sijalinizirane višestruko razgranate glikoforme ukupnih proteina plazme zastupljenije u slučaju ulceroznog kolitisa, u odnosu na kontrolne uzorke.

---

[*] *IKZF1* - kodira transkripcijski faktor iz porodice DNA-vezujućih proteina koji sudjeluje u remodeliranju kromatina (http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IKZF1)
[†] *LAMB1* - kodira laminin beta 1 podjedinicu glikoproteina izvanstaničnog matriksa, laminina (http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LAMB1)
[‡] *MGAT3* - kodira GlcNAc-transferazu III, enzim koji dodaje račvajući GlcNAc (www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MGAT3)
[§] *IL6ST* - kodira protein koji sudjeluje u kompleksu citokina i receptora, te ima ulogu u provođenju signala (www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL6ST)
[**] *BACH2* - kodira za protein regulator transkripcije (www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BACH2)

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Ispitanici

Ovo istraživanje odobrila su Etička povjerenstva Dundeeja i Edinburgha te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Zagrebu, a svi ispitanici su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju.

Uzorci seruma prikupljeni su u sklopu projekta IBD-BIOM, Dijagnostički i prognostički biomarkeri za upalnu bolest crijeva (EU FP7 projekt broj: 305479) od ispitanika koji boluju od upalne bolesti crijeva (Crohnove bolesti ili ulceroznog kolitisa), te kontrolnih ispitanika (Tablica 2) u bolnici Ninewells u Dundeeju i Općoj zapadnoj bolnici (Western general hospital) u Edinburghu između 2001. i 2012. godine. Kontrolni ispitanici su simptomatski bolesnici kod kojih nakon pretraga nije uočena upalna bolest crijeva.

Tablica 2. Raspodjela ispitanika prema dijagnozi, dobi i spolu

Dijagnoza	Dobna skupina	Žene			Muškarci			Ukupno
		Ukupan broj	Dobni raspon / godine	Prosječna dob / godine	Ukupan broj	Dobni raspon / godine	Prosječna dob / godine	
Kontrolni ispitanici	18-65 godina	74	19-65	44,9	29	23-64	42,4	120
	stariji od 65 godina	5	68-82	74,4	12	66-85	76,8	
Crohnova bolest	18-65 godina	155	20-65	43,0	83	17-62	37,7	288
	stariji od 65 godina	29	66-89	74,5	21	66-87	75,0	
Ulcerozni kolitis	18-65 godina	262	19-65	44,0	196	20-65	45,8	590
	stariji od 65 godina	73	66-91	75,7	59	66-90	74,1	

3.2. Materijali

3.2.1. Standardne kemikalije

2-aminobenzamid (2-AB) (Sigma-Aldrich), 2-pikolin boran (2-PB) (Sigma-Aldrich), acetonitril (J. T. Baker), amonijev klorid (NH_4Cl) (Acros Organics), amonijev hidrogenkarbonat (NH_4HCO_3) (Acros Organics), dimetil sulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich), ditiotreitol (DTT) (Merck), etanol (Carlo Erba), formijatna kiselina (HCOOH) (Merck), gvanidin hidroklorid (GuHCl) (Sigma), igepal CA-630 (Sigma-Aldrich), jodoacetamid (IAA) (Sigma), kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) (Sigma-Aldrich), kalijev klorid (KCl) (EMD Milipore), kloridna kiselina (HCl) (Kemika), 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), trietilamonijev bikarbonat (TEAB) (Sigma), tris(2-karboksietil)fosfin (TCEP) (Thermo Scientific), tris(hidroksimetil)aminometan (Tris) (Acros Organics).

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.)[77]
- PNGaza F (Promega) - 10 U μL^{-1}
  (1 U - količina PNGaze F koja katalizira oslobađanje *N*-vezanih oligosaharida s 1 nmol denaturirane ribonukleaze B pri pH 7.5 i 37 °C u jednoj minuti.)[78]

3.2.3. Afinitetne i filtar pločice korištene prilikom priprave uzoraka

Protein G pločica (BIA Separations) – pločica s 96 jažica koja je razvijena za izolaciju IgG-a iz krvne plazme ili seruma u sklopu projekta High Glycan, Metode za visokoprotočnu analizu glikozilacije proteina (EU FP7 projekt broj: 278535). Volumen čvrste faze u svakoj jažici protein G pločice je 200 μL, a kapacitet vezanja IgG-a oko 0,8 mg po jažici.

0,45 µm *GHP AcroPrep* (Pall) - filtar pločica s 96 jažica volumena 1 mL i hidrofilnom polipropilenskom membranom veličine pora 0,45 µm. Korištena je za filtriranje uzoraka plazme ili seruma prije izolacije IgG-a, te prilikom pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana.

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.

0,45 µm hidrofobna *Multiscreen Immobilon-P PVDF*[††] (Milipore) - filtar pločica s 96 jažica volumena 350 µL i hidrofobnom membranom veličine pora 0,45 µm. Korištena je za deglikozilaciju IgG-a, te uklanjanje IgG-a iz reakcijske smjese nakon deglikozilacije.

Omega 10k MWCO AcroPrep (Pall) - filtar pločica s 96 jažica volumena 350 µL i modificiranom polietersulfonskom membranom, koja propušta molekule manje od 10 kDa. Korištena je za deglikozilaciju IgG-a, te uklanjanje IgG-a iz reakcijske smjese nakon deglikozilacije.

3.2.4. Čvrste faze korištene za pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana

- Bio-Gel P-6 (BioRad), veličina čestica: 50-100 mesh
- celuloza (Merck), gustoća: 1,5 g mL^{-1} pri 20 °C
- silikagel (Sigma-Aldrich), čistoća: 15, veličina čestica: 30-60 mesh

3.3. Izolacija imunoglobulina G iz krvne plazme ili seruma

3.3.1. Izolacija imunoglobulina G iz krvne plazme ili seruma

Imunoglobulin G je izoliran iz uzoraka krvne plazme ili seruma afinitetnom kromatografijom vezanjem na protein G pločicu (BIA Separations) s 96 jažica uz korištenje vakuum uređaja za

[††] PVDF – poliviniliden fluorid, nespecifično veže aminokiseline

pločice (eng. *vacuum manifold*, Milipore). Svi koraci izolacije IgG-a odvijali su se pri podtlaku od oko 380 mm Hg, osim pri nanošenju uzorka plazme/seruma i eluiranju IgG-a (pri oko 200 mm Hg). Sve korištene otopine su prije upotrebe filtrirane kroz 0,2 μm *Supor PES* filtar (Nalgene).

Prije nanošenja uzoraka protein G pločica je isprana s 2 mL ultra čiste vode (18 MΩ cm pri 25 °C), 2 mL 1x koncentriranog pufera PBS pH 7,4 (137 mmol L^{-1} NaCl; 2,7 mmol L^{-1} Na_2HPO_4; 9,7 mmol L^{-1} KH_2PO_4; 2,2 mmol L^{-1} KCl; titrirano s NaOH do pH 7,4), 1 mL 0,1 mol L^{-1} HCOOH pH 2,5; 2 mL 10x koncentriranog pufera PBS pH 6,6; te uravnotežena ispiranjem s 4 mL 1x koncentriranog pufera PBS pH 7,4.

Osim uzoraka seruma pacijenata i kontrolnih ispitanika (50 do 90 μL), na svaku pločicu je stavljeno i po tri alikvota standardnog uzorka plazme (50 μL) na položaje B2, D7 i F10; dok je položaj H12 ostavljen za negativnu kontrolu (eng. *blank*), kako je prikazano na Slici 8.

PLOČICA 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HC0015	HC0016	HC0020	HC0021	HC0024	HC0025	HC0026	HC0027	HC0029	HC0030	HC0031	HC0032
B	CD602	STAND	CD603	CD604	CD605	CD606	CD607	CD608	CD609	CD2005	CD611	CD612
C	CD613	CD645	CD615	CD616	CD617	CD619	CD620	CD621	CD622	CD623	CD624	CD625
D	CD629	CD630	CD646	CD647	CD648	CD652	STAND	CD653	CD654	CD656	CD658	CD663
E	CD665	CD666	CD667	CD668	CD670	CD671	CD672	CD664	CD503	CD504	CD473	CD559
F	CD565	CD572	CD552	CD553	CD579	CD571	CD561	CD568	CD570	STAND	CD492	CD719
G	CD720	CD721	CD723	CD725	CD727	CD728	CD730	CD732	CD733	CD734	CD735	CD736
H	CD737	CD738	CD740	CD741	CD742	CD743	CD744	CD745	CD747	CD748	CD749	BLANK

Slika 8. Prikaz rasporeda uzoraka na pločici prilikom analize glikana IgG-a u upalnoj bolesti crijeva. Na svaku pločicu je prije izolacije IgG-a stavljeno po tri standardna uzorka plazme na unaprijed određene položaje (B2, D7 i F10) - STAND, dok je na položaju H12 negativna kontrola – BLANK

Uzorci plazme ili seruma su centrifugirani 3 minute pri 12 100 *g* (centrifuga *miniSpin*, Eppendorf), razrijeđeni 1x koncentriranim puferom PBS pH 7,4 (ψ = 1:7) te filtrirani kroz 0,45 μm *GHP AcroPrep* filtar pločicu s 96 jažica (Pall) upotrebom vakuum uređaja za pločice. Filtrirani uzorci seruma naneseni su na protein G pločicu, te isprani tri puta s 2 mL 1x koncentriranog pufera PBS pH 7,4 kako bi se uklonili nevezani proteini. Vezani IgG je eluiran s protein G pločice ispiranjem s 1 mL 0,1 mol L^{-1} HCOOH te neutraliziran sa 170 μL 1 mol L^{-1} NH_4HCO_3.

Protein G pločica je regenerirana radi mogućnosti ponovnog korištenja ispiranjem s 1 mL 0,1 mol L^{-1} HCOOH, 2 mL 10x koncentriranog pufera PBS pH 6,6, 4 mL 1x koncentriranog pufera PBS pH 7,4 te 1 mL pufera za skladištenje protein G pločice (etanol φ = 20 %, 20

mmol L^{-1} Tris; 0,1 mol L^{-1} NaCl; titrirano s HCl do pH 7,4); nakon čega je dodan još 1 mL pufera za skladištenje i pločica spremljena na 4 °C.

3.3.1.1. Određivanje koncentracije IgG-a nakon izolacije iz seruma ili plazme

Koncentracija IgG-a je nakon izolacije iz seruma ili plazme izmjerena u svakom eluatu mjerenjem apsorbancije pri 280 nm korištenjem spektrofotometra *NanoDrop 8000* (Thermo Scientific). Od svakog eluata je odvojeno 350 do 400 μg IgG-a te osušeno u vakuum centrifugi (Thermo Scientific vakuum koncentrator *Savant SC210A* s hlađenom stupicom za paru *Savant RVT400* i vakuum pumpom *OFP400*) i spremljeno na -20 °C do daljnje upotrebe.

3.4. Metode denaturacije

3.4.1. Denaturacija u prisutnosti SDS-a i igepala CA-630

Suhim uzorcima IgG-a uz miješanje je dodano 30 μL SDS-a (γ = 13,3 g L^{-1}) nakon čega su uzorci inkubirani 10 minuta pri 65 °C radi denaturacije. Nakon hlađenja 15 ili 30 minuta na sobnoj temperaturi, uz miješanje je svakom uzorku dodano 10 μL igepala CA-630 (φ = 4 %) kako bi se deaktivirao preostali suvišak SDS-a te spriječila denaturacija PNGaze F. Uzorci su inkubirani s igepalom CA-630 uz miješanje na sobnoj temperaturi 5 ili 15 minuta.

3.4.2. Denaturacija u prisutnosti GuHCl-a i DTT-a

Svakom uzorku je uz miješanje dodano 100 μL svježe pripravljene otopine za redukciju s 5,8 mol L^{-1} GuHCl i 5 mmol L^{-1} DTT, nakon čega su uzorci naneseni na odgovarajuću membranu (u slučaju kad je početni uzorak bio suhi IgG).

3.4.3. Denaturacija u prisutnosti GuHCl-a i TCEP-a

Svakom uzorku je uz miješanje dodano 102 μL svježe pripravljene otopine za redukciju s 5,8 mol L^{-1} GuHCl i 10 mmol L^{-1} TCEP, nakon čega su uzorci naneseni na odgovarajuću membranu (u slučaju kad je početni uzorak bio suhi IgG).

3.4.4. Denaturacija u prisutnosti SDS-a, DTT-a i IAA

Pripravljena je smjesa za denaturaciju koja po uzorku sadrži 35 μL ultra čiste vode, 10 μL SDS u vodi (γ = 20 g L^{-1}), 5 μL 0,5 mol L^{-1} DTT. Svakom uzorku je uz miješanje dodano 50 μL smjese za denaturaciju nakon čega su uzorci inkubirani 10 minuta pri 65 °C, te zatim hlađeni na sobnoj temperaturi 15 ili 30 minuta. Uzorcima je uz miješanje dodano 5 μL 100 mmol L^{-1} IAA, te u mraku inkubirano pri sobnoj temperaturi 30 minuta kako bi se alkilirale reducirane disulfidne veze.

3.5. Metode deglikozilacije

3.5.1. Deglikozilacija u otopini

Nakon denaturacije sa SDS-om i kratke inkubacije s igepalom CA-630 uz miješanje na sobnoj temperaturi dodano je 10 μL 5x koncentriranog pufera PBS i 1,25 mU PNGaze F (Prozyme) ili 1,25 U PNGaze F (Promega). Uzorci su potom inkubirani 18 h pri 37 °C.

3.5.2. Deglikozilacija na hidrofobnoj *Immobilon-P PVDF* membrani

Deglikozilacija IgG-a je testirana na hidrofobnoj *Multiscreen Immobilon-P PVDF* pločici (Milipore) kako bi se nakon cijepanja PNGazom F filtriranjem dobili slobodni glikani, bez proteinskog dijela molekule IgG-a koji bi teorijski trebao ostati vezan na membranu.[44] Paralelno je napravljeno 6 različitih protokola, svaki po tri puta, te je korišten isti uzorak suhog IgG-a (oko 350 μg):

a) **Redukcija s alkilacijom** – uzorci su denaturirani kako je opisano u Poglavlju 3.4.4. Za to vrijeme hidrofobna membrana je isprana s 200 μL etanola u vodi (φ = 70 %), te dva puta s 200 μL otopine za deglikozilaciju (20 mmol L^{-1} $NaHCO_3$) centrifugiranjem u svakom koraku 1 minutu pri 500 *g* (Eppendorf centrifuga, model 5804, rotor A-2-DWP).

Uzorci su zatim naneseni na membranu, centrifugirani 1 minutu pri 500 *g*, te isprani još dva puta s 200 μL 20 mmol L^{-1} $NaHCO_3$ uz centrifugiranje u istim uvjetima. Svakom uzorku je zatim dodano 49,5 μL 20 mmol L^{-1} $NaHCO_3$ + 1,25 mU PNGaze F (Prozyme), te su uzorci,

nakon zatvaranja prozirnom folijom (Mettler Toledo), deglikozilirani 18 h pri 37 °C u prethodno pripravljenoj komorici za inkubaciju.

Komorica za inkubaciju je zatvorena plastična posuda čije dno je ispunjeno destiliranom vodom. Komorica je stavljena na temperaturu od 37 °C nekoliko sati prije upotrebe kako bi se atmosfera u njoj zasitila vodenom parom te na taj način spriječilo isparavanje uzoraka iz jažica pločice.

b) i c) **Denaturacija s GuHCl-om i DTT-om** – uzorci su pripravljeni kako je opisano u Poglavlju 3.4.2., te naneseni na membranu (prethodno ispranu s 200 μL etanola u vodi (φ = 70 %), te dva puta s 200 μL otopine za deglikozilaciju [100 mmol L^{-1} $NaHCO_3$ u slučaju **b)**, 50 mmol L^{-1} $(NH_4)HCO_3$ u slučaju **c)**] i na membrani inkubirani 10 minuta pri 65 °C. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 1 minutu pri 500 *g*, te isprani još dva puta s 200 μL 100 mmol L^{-1} $NaHCO_3$ ili 50 mmol L^{-1} $(NH_4)HCO_3$ uz centrifugiranje u istim uvjetima.

Svakom uzorku je zatim dodano 49,5 μL 100 mmol L^{-1} $NaHCO_3$ ili 50 mmol L^{-1} $(NH_4)HCO_3$ + 1,25 mU PNGaze F (Prozyme). Nakon zatvaranja prozirnom folijom uzorci su deglikozilirani 18 h pri 37 °C u prethodno pripravljenoj komorici za inkubaciju, kao što je ranije opisano.

d) **Denaturacija s GuHCl-om i TCEP-om** – uzorci su pripravljeni kako je opisano u Poglavlju 3.4.3., nakon čega su naneseni na membranu (prethodno isprana s 200 μL etanola u vodi (φ = 70 %), te dva puta s 200 μL otopine za deglikozilaciju (100 mmol L^{-1} TEAB pH 8,5) i na membrani inkubirani 10 minuta pri 65 °C. Nakon inkubacije uzorci su obrađeni na jednak način kako je to opisano pod **b)** i **c)**, ali je kao pufer za ispiranje pločice i deglikozilaciju korišten 100 mmol L^{-1} TEAB pH 8,5.

e) i f) **Denaturacija sa SDS-om i igepalom CA-630** – uzorci su denaturirani kako je to opisano u Poglavlju 3.4.1., s razlikom da su nakon inkubacije sa SDS-om hlađeni 30 minuta na sobnoj temperaturi, te nakon dodatka igepala inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije s igepalom uzorci su preneseni na membranu (prethodno ispranu s 200 μL etanola u vodi (φ = 70 %), te dva puta s 200 μL otopine za deglikozilaciju [1x PBS u slučaju **e)**, tj. 20 mmol L^{-1} $NaHCO_3$ u slučaju **f)**], centrifugirani 1 minutu pri 500 *g*, te isprani s odgovarajućim puferom i deglikozilirani kako je opisano u **a)** do **d)**.

Slobodni glikani su nakon deglikozilacije skupljeni u čistu pločicu za sakupljanje centrifugiranjem 1 minutu pri 1000 *g*. Obilježavanje fluorescentnom bojom i pročišćavanje glikana provedeno je kako je to opisano u Poglavljima 3.7. i 3.8., s tim da su korišteni 100 %-

tni acetonitril i acetonitril u vodi (φ = 96 %) prethodno ohlađeni na 4 °C. Obilježeni glikani su analizirani tekućinskom kromatografijom na isti način kako je to opisano u Poglavlju 3.11.

3.5.3. Deglikozilacija uzoraka IgG-a na *Omega 10k* membrani

Deglikozilacija IgG-a je testirana na *Omega 10k MWCO AcroPrep* filtar pločici (Pall) koja propušta molekule manje od 10 kDa. Time bi se nakon cijepanja PNGazom F filtriranjem dobili slobodni glikani, bez proteinskog dijela molekule IgG-a koji teorijski ne bi trebao proći kroz filtar, budući da su veličine teškog i lakog lanca oko 50 do 70 kDa i 25 kDa.

Osnovni protokol je sličan ranije opisanom, te su uzorci IgG-a (oko 250 μg) resuspendirani u 30 μL SDS-a u vodi (γ = 13,3 g L^{-1}) i naneseni na pločicu. Nakon zatvaranja prozirnom folijom uzorci su denaturirani inkubacijom pri 65 °C 10 minuta, nakon čega su hlađeni 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Zatim je dodano 10 μL igepala CA-630 u vodi (φ = 4 %) i inkubirano uz miješanje 15 minuta na sobnoj temperaturi. Vremena inkubacija su eksperimentalno određena testiranjem robusnosti metode (Poglavlje 4.4. Rezultata). Kako bi se uklonili deterdženti pločica je centrifugirana 20 minuta pri 2013 *g* (Eppendorf centrifuga, model 5804, rotor A-2-DWP), nakon čega je dodano 100 μL ultra čiste vode i ponovljen korak centifugiranja. U svaku jažicu je uz miješanje dodano 49,5 μL 1x koncentriranog PBS-a i 0,5 μL (1,25 mU) PNGaze F (Prozyme), nakon čega su uzorci inkubirani 18 h pri 37 °C radi deglikozilacije.

Glikani su eluirani s *Omega 10k* pločice centrifugiranjem 20 minuta pri 2013 *g*, nakon čega je dodano 50 μL ultra čiste vode i ponovljen korak centrifugiranja. Uzorci slobodnih glikana su obilježavani fluorescentnom bojom po standardnom protokolu (Poglavlje 3.7.). Obilježeni glikani su zatim pročišćeni kako je opisano u Poglavlju 3.8.

3.5.3.1. Metode deglikozilacije IgG-a na Omega 10k membrani

Paralelno je napravljeno 8 različitih protokola, te je korišten isti uzorak suhog IgG-a ili IgG-a u 0,1 mol L^{-1} amonijevom formijatu (u otopini) (svaki mase oko 300 μg i obrađen po tri puta). Suhom IgG-u je uz miješanje dodana pojedina smjesa za denaturaciju, nakon čega je nanesen na *Omega 10k* pločicu. U slučaju kad je početni uzorak bio IgG u otopini, na pločicu je naneseno 2x 250 μL IgG-a uz centrifugiranje 20 minuta pri 2013 *g* u svakom koraku. Soli su

zatim isprane dodatkom 100 μL ultra čiste vode i ponovljenim centrifugiranjem, nakon čega je uz miješanje uzorku koji je na pločici dodana smjesa za denaturaciju.

a) i b) **Redukcija s alkilacijom** – uzorci su denaturirani, reducirani i alkilirani na isti način kako je to opisano u Poglavlju 3.4.4.

c) i d) **Denaturacija s GuHCl-om i DTT-om** – uzorci su pripravljeni kako je opisano u Poglavlju 3.4.2., te naneseni na filtar pločicu i inkubirani 10 minuta pri 65 °C.

e) i f) **Denaturacija s GuHCl-om i TCEP-om** – uzorci su pripravljeni kako je opisano u Poglavlju 3.4.3., te naneseni na filtar pločicu i inkubirani 10 minuta pri 65 °C.

g) i h) **Denaturacija sa SDS-om i igepalom CA-630** – uzorci su denaturirani kako je to opisano u Poglavlju 3.4.1., s razlikom da su nakon inkubacije sa SDS-om hlađeni 30 minuta na sobnoj temperaturi, te nakon dodatka igepala inkubirani 15 minuta uz miješanje na sobnoj temperaturi.

Nakon svakog od postupaka denaturacije, redukcije i alkilacije reagensi su uklonjeni centrifugiranjem pločice 20 minuta pri 2013 *g*, nakon čega je dodano 100 μL ultra čiste vode i dva puta ponovljen korak centrifugiranja. Svakom uzorku je uz miješanje dodano 49,5 μL pufera za denaturaciju [1x PBS u slučaju **a), c), e) i g)**, tj. 20 mmol L^{-1} $NaHCO_3$ u slučaju **b), d), f) i h)**] + 1,25 mU PNGaze F (Prozyme). Nakon zatvaranja prozirnom folijom uzorci su deglikozilirani 18 h pri 37 °C u prethodno pripravljenoj komorici za inkubaciju, kao što je ranije opisano (Poglavlje 3.5.2.).

Slobodni glikani su nakon deglikozilacije skupljeni, obilježeni fluorescentnom bojom, pročišćeni i analizirani tekućinskom kromatografijom na isti način kako je to opisano u Poglavlju 3.5.3, s tim da je celuloza nanesena na 0,20 μm *GHP AcroPrep* pločicu (Pall).

3.5.3.2. Utjecaj ispiranja deterdženata prije deglikozilacije na Omega 10k membrani

Utjecaj ispiranja deterdženata (SDS-a i igepala CA-630) prije deglikozilacije IgG-a na *Omega 10k* membrani (prethodno ispranoj s 2x 100 μL ultra čiste vode uz upotrebu uređaja za filtriranje uz pomoć vakuuma – oko 250 mm Hg) ispitan je na uzorcima IgG-a u 0,1 mol L^{-1} amonijevom formijatu (svaki uzorak mase oko 300 μg, svaki od uvjeta je testiran u 8 ili 12 replikata) primjenjujući protokol **g)** opisan u Poglavlju 3.5.3.1. (s ispiranjem deterdženata). U eksperimentima bez ispiranja deterdženata uzorcima je nakon inkubacije s igepalom 15

minuta na sobnoj temperaturi dodano uz miješanje 10 μL 5x koncentriranog pufera PBS i 1,25 U PNGaze F (Promega).

Nakon deglikozilacije oslobođeni glikani su skupljeni kako je prethodno opisano te zatvoreni ljepljivom prozirnom folijom u koracima centrifugiranja kako bi se spriječilo isparavanje uzoraka. Glikani su fluorescentno obilježeni 2-AB-om i pročišćeni na 0,2 μm *GHP* filtru uz 96 %-tni, 98 %-tni ili 100 %-tni hladni acetonitril kako je opisano u Poglavlju 3.8.

3.5.3.3. Kompatibilnost korištenih otopina i Omega 10k membrane

Kompatibilnost otopina korištenih za standardni postupak denaturacije i deglikozilacije (opisan u Poglavlju 3.5.3.1., protokol **g)**) i *Omega 10k* filtar pločice ispitana je nakon što je uočen problem s pomakom nagiba bazne linije u kromatogramima na sljedeći način:

a) Jedna jažica pločice je isprana s 5x 100 μL ultra čiste vode upotrebom uređaja za filtriranje uz pomoć vakuuma, pri čemu su svi ispirci skupljeni, osušeni u vakuum centrifugi, resuspendirani u 75 μL vode te fluorescentno obilježeni po standardnom, ranije opisanom protokolu.

b) Jedna jažica pločice je isprana s 2x 100 μL ultra čiste vode upotrebom uređaja za filtriranje uz pomoć vakuuma. Nakon toga je uz miješanje dodano 30 μL SDS (γ = 13,3 g L^{-1}) i 10 μL igepala CA-630 (φ = 4 %) te je pločica inkubirana uz miješanje 5 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je dodano 10 μL 5x koncentriranog pufera PBS, i pločica je centrifugirana 15 minuta pri 2013 *g* (Eppendorf, model 5804) te je eluat prikupljen, nakon čega je dodano još 50 μL ultra čiste vode. Postupak centrifugiranja je ponovljen nakon inkubacije od 5 minuta na sobnoj temperaturi uz miješanje. Eluati su spojeni i fluorescentno obilježeni.

c) U pojedinačne jažice je stavljen samo SDS (γ = 13,3 g L^{-1}) (30 μL + 20 μL ultra čiste vode), ili samo igepal CA-630 (φ = 4 %) (10 μL + 40 μL ultra čiste vode) ili samo 5x koncentrirani pufer PBS (10 μL + 40 μL ultra čiste vode), te je obrađeno kako je opisano pod b).

Obilježeni eluati su pročišćeni na celulozi uz ispiranje hladnim 80 %-tnim acetonitrilom. Prilikom eluiranja uzorci su inkubirani u vodi 5 minuta.

3.6. Uklanjanje IgG-a iz reakcijske smjese nakon deglikozilacije

3.6.1. Filtriranje deglikozilacijske reakcijske smjese kroz hidrofobnu *Immobilon-P PVDF* membranu

Uzorci IgG-a (svaki mase oko 250 do 300 μg) su denaturirani sa SDS-om i igepalom prema postupku opisanom pod **e)** u Poglavlju 3.5.2. Nakon denaturacije i deglikozilacije u otopini, uzorci su naneseni na hidrofobnu *Multiscreen Immobilon-P PVDF* membranu (prethodno ispranu s 200 μL otopine etanola u vodi (φ = 70 %), te dva puta s 200 μL ultra čiste vode, uz centrifugiranje 1 minutu pri 500 *g* u svakom koraku). Slobodni glikani su odvojeni od proteinskog dijela IgG-a centrifugiranjem membrane 1 minutu pri 1000 *g*. Zatim je na membranu dodano još 25 μL ultra čiste vode, miješano na sobnoj temperaturi 10 minuta te je ponovljen korak centrifugiranja, a filtrati sa slobodnim glikanima spojeni, obilježeni fluorescentnom bojom prema standardnom protokolu i pročišćeni na celulozi uz acetonitril u vodi (φ = 80 %) ili hidrofilnom 0,2 μm *GHP* filtru uz hladni acetonitril u vodi (φ = 96 %). Obilježeni glikani analizirani su tekućinskom kromatografijom na isti način kako je to opisano u Poglavlju 3.11.

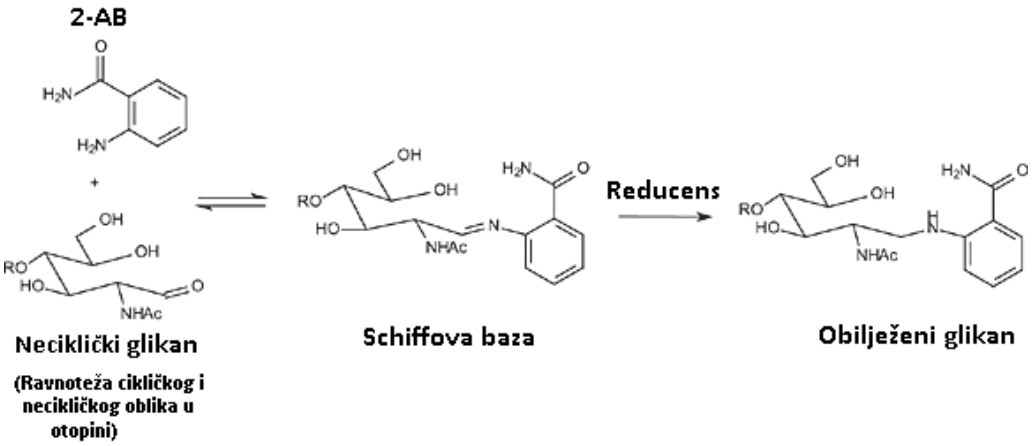
3.6.2. Filtriranje deglikozilacijske reakcijske smjese kroz *Omega 10k MWCO* membranu

Filtriranje uzoraka kroz *Omega 10k* membranu nakon deglikozilacije je napravljeno prema postupku prikupljanja oslobođenih glikana nakon deglikozilacije na *Omega 10k* membrani, kako je opisano u Poglavlju 3.5.3., s tim da su uzorci zatvoreni ljepljivom prozirnom folijom prilikom centrifugiranja. *Omega 10k* membrana je prije prenošenja uzoraka isprana s 2x 100 μL ultra čiste vode upotrebom uređaja za filtriranje uz pomoć vakuuma.

3.7. Obilježavanje slobodnih glikana fluorescentnom bojom

Oslobođeni glikani su radi detekcije obilježeni fluorescentnom bojom 2-aminobenzamidom, prema dolje prikazanoj reakciji (Slika 9). 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. Svakom

uzorku je dodano 25 μL pripravljene smjese za obilježavanje, te je pločica s uzorcima zatvorena ljepljivom prozirnom folijom. Nakon što su uzorci uz protresanje inkubirani pri sobnoj temperaturi 10 minuta, reakcija obilježavanja glikana provođena je 2 sata pri 65 °C.



Slika 9. Reakcija obilježavanja slobodnih glikana fluorescentnom bojom, 2-AB-om

3.8. Pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana

3.8.1. Pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na celulozi

Prije analize glikana tekućinskom kromatografijom, fluorescentno obilježene glikane je potrebno pročistiti od viška fluorescentne boje, neobilježenih glikana, proteina i suviška reagensa. Za pročišćavanje je korištena tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama uz ekstrakciju na čvrstoj fazi (HILIC-SPE, eng. ***H**ydrophilic **I**nteraction **LI**quid **C**hromatography - **S**olid **P**hase **E**xtraction)*. Kao čvrsta faza korištena je celuloza na 0,20 μm ili 0,45 μm *GHP AcroPrep* filtar pločici s 96 jažica. S obzirom da je celuloza bogata hidrofilnim hidroksilnim skupinama vezat će fluorescentno obilježene glikane, dok će se proteini i višak reagensa isprati. Za pročišćavanje je korišten vakuum uređaj za pločice pri podtlaku od oko 25 mm Hg. Čvrsta faza je pripravljena nanošenjem 200 μL homogene suspenzije celuloze u vodi (0,1 g mL^{-1}) u svaku jažicu filtar pločice, nakon čega su jažice isprane uz miješanje s 5x 200 μL ultra čiste vode (18 MΩ cm pri 25 °C) kako bi se uklonile manje čestice celuloze, i s 3x 200 μL 80 %-tnog, 90 %-tnog ili 100 %-tnog acetonitrila radi uravnotežavanja čvrste faze u uvjetima vezanja analita.

Uzorci su nakon reakcije obilježavanja ohlađeni na sobnu temperaturu te im je uz miješanje dodano 300 μL ili 700 μL acetonitrila (do volumnog udjela acetonitrila od 80 %, tj.

približno 90 %). Uzorci su naneseni na čvrstu fazu uz lagano miješanje, te isprani sa 7x 200 μL 80 %-tnog, 90 %-tnog ili 100 %-tnog acetonitrila, s tim da su u četvrtom koraku ispiranja uzorci nakon dodatka acetonitrila promiješani pipetom. Zadnja frakcija ispiranja acetonitrilom je uklonjena centrifugiranjem pločice 5 minuta pri 164 *g*. Glikani su s celuloze eluirani upotrebom uređaja za filtriranje uz pomoć vakuuma dodatkom 100 μL ultra čiste vode uz inkubaciju od 5 ili 15 minuta uz potresanje. Korak eluiranja je ponovljen te drugi eluat prikupljen u istu pločicu za sakupljanje centrifugiranjem 5 minuta pri 164 *g* (Eppendorf centrifuga, model 5804, rotor A-2-DWP). Spojeni eluati su do analize čuvani na -20 °C.

3.8.2. Pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na BioGelu P-6 i silikagelu

Fluorescentno obilježeni glikani su pročišćeni na Bio-Gelu P-6 ili silikagelu prema protokolu sličnom kao u prethodnom poglavlju uz korištenje vakuum uređaja za pločice pri podtlaku od oko 25 mm Hg. Suspenzija Bio-Gela ili silikagela (200 μL) u vodi ili smjesi otapala ψ(voda, etanol, acetonitril) = 70:20:10 (0,1 ili 0,2 g mL^{-1}) je nakon inkubacije 4 sata pri sobnoj temperaturi nanesena u svaku jažicu 0,20 μm ili 0,45 μm *GHP AcroPrep* filtar pločice. Jažice su isprane uz miješanje s 5x 200 μL ultra čiste vode (18 MΩ cm pri 25 °C) i s 3x 200 μL 80 %-tnog, 90 %-tnog ili 100 %-tnog acetonitrila radi uravnotežavanja čvrste faze u uvjetima vezanja analita.

Uzorci su nakon reakcije obilježavanja ohlađeni na sobnu temperaturu (30 minuta) te pročišćeni kako je opisano u prethodnom poglavlju, uz inkubaciju od 15 minuta uz potresanje u koraku eluiranja glikana vodom. Uzorcima pročišćenima na Bio-Gelu je nakon eluiranja dodano još 50 μL (u slučaju 0,1 g mL^{-1} suspenzije Bio-Gela), odnosno 150 μL ultra čiste vode (u slučaju 0,2 g mL^{-1} suspenzije Bio-Gela), kako bi se uklonila razlika u konačnom volumenu nastala kao posljedica različitog volumena zadržavanja Bio-Gela i ostalih čvrstih faza. Spojeni eluati su do analize čuvani na -20 °C.

U svim koracima i uvjetima ispiranja korišten je acetonitril prethodno ohlađen na 4 °C.

3.8.3. Pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom *GHP* filtru

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) ispran s 200 μL etanola u vodi (φ = 70 %), 200 μL ultra čiste vode i 200 μL 80 %-tnog, 90 %-tnog, 96 %-

tnog, 98 %-tnog ili 100 %-tnog acetonitrila. Nakon reakcije obilježavanja i hlađenja reakcijske smjese na sobnoj temperaturi 30 minuta, glikanima je dodano 300 μL (u slučaju pročišćavanja s 80 %-tnim acetonitrilom) ili 700 μL acetonitrila (u svim ostalim slučajevima), te su premješteni na hidrofilni 0,2 μm *GHP AcroPrep* filtar i inkubirani 2 minute. Suvišak reagensa je uklonjen ispiranjem s hladnim acetonitrilom odgovarajućeg volumnog udjela. Uzorci su inkubirani 2x 15 minuta uz potresanje u koracima eluiranja glikana vodom.

U svim koracima i uvjetima ispiranja korišten je acetonitril prethodno ohlađen na 4 °C.

3.8.3.1. Provjera kapaciteta GHP AcroPrep filtra

Kako bi se provjerio kapacitet 0,2 μm *GHP AcroPrep* filtar pločice, te ustanovilo veže li možda selektivno samo neke glikane, napravljeno je pročišćavanje standarda glikana IgG-a (već fluorescentno obilježeni i pročišćeni glikani IgG-a), budući da mu je poznat kromatografski profil. U tu svrhu je napravljeno tri različita razrjeđenja (svaki u 12 replikata) standarda glikana tako da odgovaraju količini glikana koja bi se teorijski dobila iz 35 μg, 300 μg i 750 μg početnog uzorka IgG-a. Volumen svakog uzorka bio je 75 μL, što je inače volumen koji se dobije nakon fluorescentnog obilježavanja glikana, a prije pročišćavanja. Navedeni uzorci glikana su zatim „pročišćeni" kako je o opisano u Poglavlju 3.8.3. uz 100 %-tni acetonitril. Uzorci su na *GHP* preneseni nakon što im je uz miješanje dodano 700 μL hladnog acetonitrila, te su ispirani 5x sa 100 %-tnim hladnim acetonitrilom. Pročišćeni glikani su analizirani kako je opisano u Poglavlju 3.11.

3.9. Robusnost metoda deglikozilacije, fluorescentnog obilježavanja i pročišćavanja glikana

3.9.1. Robusnost metode korištene za pripravu glikana IgG-a pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva

Robusnost metode korištene za pročišćavanje obilježenih glikana na celulozi uz 80 %-tni acetonitril (Poglavlja 3.4.1. i 3.8.1.) testirana je upotrebom Plackett-Burmanovog dizajna eksperimenta za probir (eng. *screening*) parametara koji imaju značajan utjecaj na rezultat

eksperimenta, kako su ranije opisali Novokmet i suradnici.[79] Za eksperiment je odabrano 7 parametara za koje je pretpostavljeno da bi mogli znatno utjecati na kvalitetu rezultata (površinu kromatografskih pikova i reproducibilnost metode). Po dvije vrijednosti su odabrane za svaki od parametara, te je ukupno izvedeno 16 različitih reakcija, kako je prikazano u Tablici 3. Svaka reakcija provedena je pet puta, a svi ostali koraci koji nisu navedeni u Tablici 3 izvedeni su kako je to opisano ranije (Poglavlja 3.4.1. i 3.8.1.).

U svih 80 reakcija (16 x 5) korišten je isti uzorak IgG-a koji je pripravljen na način da su pomiješane male količine oko 300 uzoraka IgG-a, kako bi se dobila dovoljna masa početnog uzorka za eksperiment. Nakon miješanja priređeni su alikvoti mase oko 280 μg IgG-a koji su osušeni uz pomoć vakuuma i spremljeni na -20 °C do početka eksperimenta.

Tablica 3. Plackett-Burmanov dizajn eksperimenta za testiranje robusnosti metode korištene za pročišćavanje glikana IgG-a na celulozi uz 80 %-tni acetonitril (φ). U ukupno 16 reakcija (R01 do R16) testirani su sljedeći parametri: P01 – vrijeme inkubacije sa SDS-om pri 65 °C, min; P02 – vrijeme hlađenja uzoraka na sobnoj temperaturi nakon inkubacije sa SDS-om, min; P03 – vrijeme inkubacije s igepalom CA-630, min; P04 – količina dodane PNGaze F, mU; P05 – vrijeme reakcije obilježavanja slobodnih glikana s 2-AB-om, h; P06 – temperatura acetonitrila korištenog za pročišćavanje obilježenih glikana, °C; P07 – vrijeme inkubacije s vodom u pojedinom koraku eluiranja glikana s celuloze, min. Niža vrijednost svakog od parametara je prikazana neobojano, a viša vrijednost obojano sivom bojom

Reakcija	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07
R01	10	10	5	1,5	2	4	5
R02	30	10	5	1,5	3	4	15
R03	10	30	5	1,5	3	25	5
R04	30	30	5	1,5	2	25	15
R05	10	10	15	1,5	3	25	15
R06	30	10	15	1,5	2	25	5
R07	10	30	15	1,5	2	4	15
R08	30	30	15	1,5	3	4	5
R09	10	10	5	2,5	2	25	15
R10	30	10	5	2,5	3	25	5
R11	10	30	5	2,5	3	4	15
R12	30	30	5	2,5	2	4	5
R13	10	10	15	2,5	3	4	5
R14	30	10	15	2,5	2	4	15
R15	10	30	15	2,5	2	25	5
R16	30	30	15	2,5	3	25	15

3.9.1.1. Utjecaj pojedinih parametara na površinu pika i koeficijent varijacije

Utjecaj koji svaki od parametara ima na površinu pojedinih kromatografskih pikova, te koeficijent varijacije postotka površine koju zauzima pojedini pik u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu određen je prema sljedećoj jednadžbi (1):

$$U_{\mathrm{p}} = \frac{2}{\mathrm{r}} \left(\sum X_{\mathrm{i}}^{+} - \sum X_{\mathrm{i}}^{-} \right) \qquad (1)$$

gdje je *U* utjecaj svakog od 7 faktora označenih indeksom p, *r* je broj reakcija (u ovom slučaju 16), X_{i}^{+} srednja vrijednost površine pika ili koeficijent varijacije postotka površine pika za svaku od viših vrijednosti pojedinog faktora, a X_{i}^{-} srednja vrijednost površine pika ili koeficijent varijacije postotka površine pika za svaku od nižih vrijednosti pojedinog faktora. Da bi se procijenio statistički značaj dobivenih utjecaja korišten je Mann-Whitneyjev U test. Statistički značajnim se smatra vrijednost $p < 0{,}05$.

Utjecaj svakog od parametara je procijenjen za kromatografske pikove GP4, GP8, GP14, GP18 i GP24 (vidi Sliku 28).

3.9.1.2. Testiranje vremena inkubacije s vodom prilikom eluiranja glikana s celuloze

Vrijeme inkubacije s ultra čistom vodom prilikom eluiranja fluorescentno obilježenih glikana s celuloze je testirano nakon eksperimenta robusnosti metode (Poglavlje 3.9.1.) s obzirom da su rezultati pokazali da može imati utjecaj na reproducibilnost metode. Ukupno 16 uzoraka IgG-a (mase oko 250 μg svaki) je deglikozilirano kako je to opisano u Poglavlju 3.4.1., s tim da su uzorci hlađeni 30 minuta na sobnoj temperaturi nakon denaturacije SDS-om i inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi nakon dodatka igepala CA-630; što se pokazalo boljim nakon ispitivanja robusnosti metode.

Obilježavanje slobodnih glikana i pročišćavanje na celulozi su provedeni kako je opisano ranije (Poglavlja 3.7. i 3.8.1.). Od ukupno 16 uzoraka njih osam je inkubirano s vodom 5 minuta, a drugih osam 15 minuta u pojedinim koracima eluiranja glikana s celuloze. Uzorci fluorescentno obilježenih glikana su nakon pročišćavanja spremljeni na -20 °C do kromatografske analize, koja je opisana u Poglavlju 3.11.

3.9.2. Robusnost deglikozilacije IgG-a na *Omega 10k* membrani uz pročišćavanje obilježenih glikana na *GHP* filtru uz 100 %-tni acetonitril

Robusnost razvijene metode za deglikozilaciju IgG-a na *Omega 10k MWCO AcroPrep* pločici (Pall) uz pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnoj 0,20 μm *GHP AcroPrep* pločici (Pall) uz 100 %-tni acetonitril testirana je kao što je opisano u prethodnom poglavlju. Odabrano je 7 parametara te po dvije vrijednosti za svaki od njih, kako je to prikazano u Tablici 4. Svaka od 16 reakcija provedena je osam puta, a svi ostali koraci koji nisu navedeni u Tablici 4 izvedeni su kako je to opisano ranije (Poglavlja 3.5.3. i 3.8.3.).

Tablica 4. Plackett-Burmanov dizajn eksperimenta za testiranje robusnosti metode deglikozilacije IgG-a na *Omega 10k MWCO AcroPrep* pločici uz pročišćavanje obilježenih glikana na 0,20 μm *GHP AcroPrep* pločici uz 100 %-tni acetonitril. U ukupno 16 reakcija (R01 do R16) testirani su sljedeći parametri: P01 – tip početnog uzorka – suhi ili IgG u 0,1 mol L^{-1} amonijevom formijatu (u otopini); P02 – volumeni dodanog SDS-a i igepala CA-630, μL; P03 – volumen vode za ispiranje deterdženata prije dodatka PNGaze F, μL; P04 – miješanje oslobođenih glikana prije eluiranja s *Omega 10k* pločice, min; P05 – volumen vode za eluiranje oslobođenih glikana s *Omega 10k* pločice, μL; P06 – temperatura acetonitrila korištenog za pročišćavanje obilježenih glikana, °C; P07 – broj koraka ispiranja suviška reagensa prilikom pročišćavanja obilježenih glikana na *GHP AcroPrep* pločici, *x*. Niža vrijednost svakog od parametara je prikazana neobojano, a viša vrijednost obojano sivom bojom

Reakcija	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07
R01	suhi	30 i 10	50	0	50	4	5
R02	u otopini	30 i 10	50	0	100	4	7
R03	suhi	100 i 35	50	0	100	25	5
R04	u otopini	100 i 35	50	0	50	25	7
R05	suhi	30 i 10	200	0	100	25	7
R06	u otopini	30 i 10	200	0	50	25	5
R07	suhi	100 i 35	200	0	50	4	7
R08	u otopini	100 i 35	200	0	100	4	5
R09	suhi	30 i 10	50	5	50	25	7
R10	u otopini	30 i 10	50	5	100	25	5
R11	suhi	100 i 35	50	5	100	4	7
R12	u otopini	100 i 35	50	5	50	4	5
R13	suhi	30 i 10	200	5	100	4	5
R14	u otopini	30 i 10	200	5	50	4	7
R15	suhi	100 i 35	200	5	50	25	5
R16	u otopini	100 i 35	200	5	100	25	7

U svim reakcijama korišten je isti uzorak IgG-a koji je pripravljen na način da su pomiješane male količine oko 400 uzoraka IgG-a, kako bi se dobila dovoljna masa početnog uzorka za eksperiment. Nakon miješanja priređeni su alikvoti mase oko 330 μg IgG-a od kojih je polovica smrznuta na -20 °C (IgG u otopini), a druga polovica osušena uz pomoć vakuuma i spremljena na -20 °C do početka eksperimenta (suhi IgG).

Utjecaj koji svaki od parametara ima na površinu pojedinih kromatografskih pikova, te koeficijent varijacije postotka površine koju zauzima pojedini pik u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu određen je prema jednadžbi (1), kako je opisano u Poglavlju 3.9.1.1.

3.10. Usporedba metoda deglikozilacije i pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana

Uspoređene su četiri različite metode:

a) deglikozilacija u otopini + pročišćavanje obilježenih glikana na celulozi s 80 %-tnim acetonitrilom
b) deglikozilacija u otopini + pročišćavanje obilježenih glikana na hidrofilnom *GHP AcroPrep* filtru s 96 %-tnim acetonitrilom
c) deglikozilacija u otopini + filtriranje uzoraka kroz *Omega 10k* membranu prije fluorescentnog obilježavanja glikana + pročišćavanje obilježenih glikana na hidrofilnom *GHP AcroPrep* filtru s 96 %-tnim acetonitrilom
d) deglikozilacija na *Omega 10k* membrani + pročišćavanje obilježenih glikana na hidrofilnom *GHP AcroPrep* filtru s 96 %-tnim acetonitrilom

Svaka od metoda je testirana osam puta obradom približno 300 μg suhog IgG-a (u slučaju deglikozilacije u otopini) ili 300 μg IgG-a u 0,1 mol L^{-1} amonijevom formijatu (u slučaju deglikozilacije na *Omega 10k* membrani). Sve deglikozilacije u otopini su napravljene kako je opisano u Poglavlju 3.4.1., s razlikom da su nakon inkubacije sa SDS-om uzorci hlađeni 30 minuta na sobnoj temperaturi, te nakon dodatka igepala inkubirani 15 minuta uz miješanje na sobnoj temperaturi, kako je određeno testiranjem robusnosti metode (Poglavlje 4.7. Rezultata). Deglikozilacija na *Omega 10k* membrani je napravljena bez ispiranja deterdženata prije deglikozilacije prema protokolu opisanom u Poglavlju 3.5.3.2. (utjecaj ispiranja deterdženata prije deglikozilacije). Za deglikozilaciju je korišteno 1,25 U PNGaze F

(Promega). Filtriranje uzoraka kroz *Omega 10k* membranu nakon deglikozilacije je napravljeno prema postupku opisanom u Poglavlju 3.6.2.

Slobodni glikani su obilježeni 2-AB-om prema standardnom protokolu kako je opisano u Poglavlju 3.7., te pročišćeni na celulozi s 80 %-tnim acetonitrilom (ohlađenim na 4 °C) kako je opisano u Poglavlju 3.8.1, odnosno na hidrofilnom 0,2 μm *GHP AcroPrep* filtru s 96 %-tnim acetonitrilom (ohlađenim na 4 °C) kako je opisano u Poglavlju 3.8.3. Glikani su inkubirani u ultra čistoj vodi 15 minuta prije svakog koraka eluiranja.

3.11. Analiza fluorescentno obilježenih glikana IgG-a tekućinskom kromatografijom

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) = 20:80, na način da je pripravljeni volumen veći za 10 μL od injektiranog (V_{inj}). Svaki set uzoraka je analiziran na sljedeći način (osim ako je navedeno drugačije):

1. Ultra čista voda (18 MΩ cm pri 25 °C), V_{inj} = 10 μL

2. Dekstran (vanjski standard, vidi dolje), V_{inj} = 10 μL

3. Standard IgG glikana (interni standard obilježenih i pročišćenih glikana), V_{inj} = 20 μL

4. – 19. 16 uzoraka, V_{inj} = 40 μL

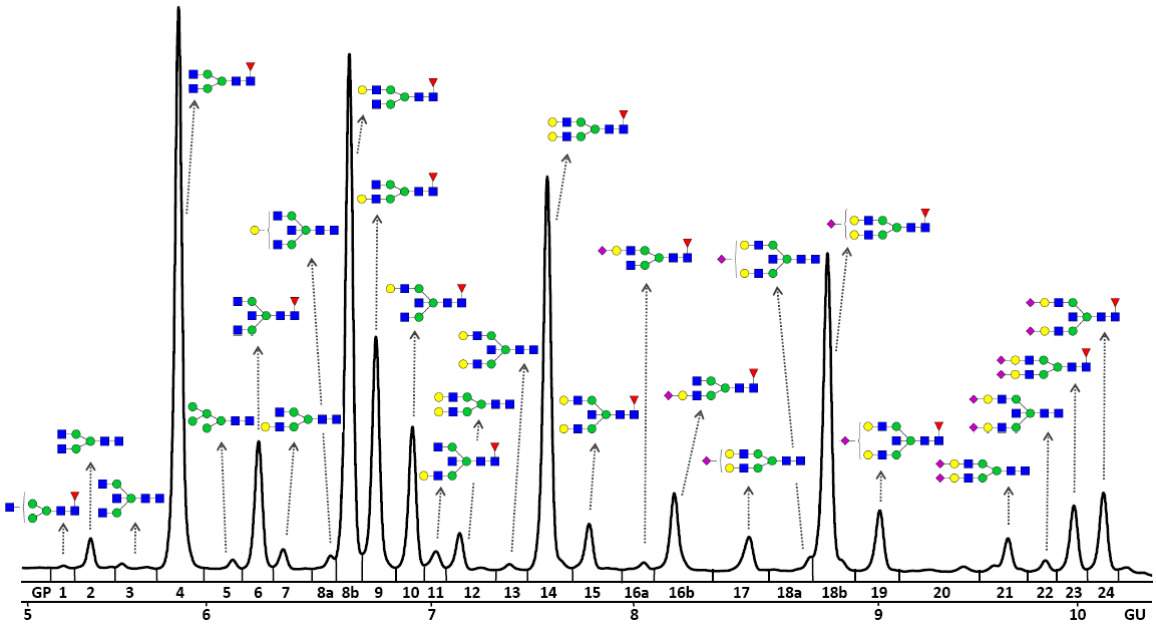
20. Standard IgG glikana (interni standard obilježenih i pročišćenih glikana), V_{inj} = 20 μL

21. – 36. 16 uzoraka, V_{inj} = 40 μL

Za razdvajanje je korištena kolona *Acquity BEH Glycan* (Waters) duljine 100 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 25 % do 38 % volumnog udjela otapala A pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. U sljedećoj minuti je sastav pokretne faze postupno promijenjen do 100 % otapala A, te je kolona ispirana 3 minute pri protoku 0,4 mL min^{-1}. Zatim je sastav pokretne faze postupno u jednoj minuti promijenjen na volumni udjel otapala A od 25 %, što odgovara početnim

uvjetima sljedećeg injektiranja uzorka, te je kolona ispirana 5 minuta u tim uvjetima uz protok od 0,4 mL min^{-1}. Ukupno trajanje analize pojedinog uzorka bilo je 34 minute. Kao otapalo za ispiranje kromatografskog sustava (eng. *seal wash*) korišten je acetonitril u vodi (φ = 75 %). Temperatura kolone bila je 60 °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. ***g****lucose* ***u****nits*). 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 24 kromatografska pika (Slika 10, Tablica 5), te je udio površine svakog pika izražen kao postotak ukupne površine svih pikova koji odgovaraju glikanskim strukturama.



Slika 10. Kromatografski profil *N*-glikana IgG-a razdvojenh u 24 kromatografska pika (GP1 do GP24) metodom HILIC-UPLC. Prikazane su glavne glikanske strukture koje odgovaraju svakom piku, prema **Tablici 5**. GlcNAc – plavi kvadrat, manoza – zeleni krug, galaktoza – žuti krug, sijalinska kiselina – ružičasti romb, sržna fukoza – crveni trokut

Strukture glikana koje odgovaraju svakom od kromatografskih pikova određene su ranije na temelju rezultata dobivenih razgradnjom glikana egzoglikozidazama i analizom glikana spektrometrijom masa, pri čemu je identificirano 23 glavnih i 10 manje zastupljenih struktura (Tablica 5).[56]

Tablica 5. Sastav glikoma IgG-a. *N*-glikani IgG-a razdvojeni su u 24 kromatografska pika (GP1 do GP24) metodom HILIC-UPLC, a strukture glikana i njihov prosječan udio u svakom piku određene su spektrometrijom masa. F – sržna fukoza vezana α1–6-vezom na unutarnji GlcNAc, Mx – broj (x) manoza vezan na GlcNAc-e sržne strukture, Ax – broj (x) antena (GlcNAc-ova) vezanih na manoze sržne strukture, B – račvajući GlcNAc vezan β1–4-vezom na β1–3-vezanu manozu, Gx – broj (x) β1–4-vezanih galaktoza na antenama, [3]G1 i [6]G1 označava galaktozu vezanu na antenu β1–3- ili β1–6-vezane manoze, Sx – broj (x) sijalinskih kiselina vezanih na galaktoze.[56] n. o. – nije određeno

Kromatografski pik	Glikanska struktura	Udio glikanske strukture / %
GP1	FA1	100
GP2	A2	100
GP3	A2B	100
GP4	FA2	100
GP5	M5	63
	FA2	37
GP6	FA2B	97
	A2[6]G1	3
GP7	A2[3]G1	75
	FA2B	25
GP8a	A2BG1	93
	FA2[6]G1	7
GP8b	FA2[6]G1	100
GP9	FA2[3]G1	100
GP10	FA2[6]BG1	100
GP11	FA2[3]BG1	100
GP12	A2G2	91
	FA2[3]BG1	9
GP13	A2BG2	87
	FA2G2	13
GP14	FA2G2	100

Kromatografski pik	Glikanska struktura	Udio glikanske strukture / %
GP15	FA2BG2	83
	FA1G1S1	8
	A2G1S1	5
	FA2G2	4
GP16a	FA2[6]G1S1	63
	M4A1G1S1	25
	A2BG1S1	12
GP16b	FA2[3]G1S1	91
	FA2[6]BG1S1	9
GP17	A2G2S1	89
	FA2[3]BG1S1	11
GP18a	A2BG2S1	91
	FA2G2S1	9
GP18b	FA2G2S1	100
GP19	FA2BG2S1	100
GP20	n. o.	n. o.
GP21	A2G2S2	100
GP22	A2BG2S2	100
GP23	FA2G2S2	100
GP24	FA2BG2S2	100

3.11.1. Izračun deriviranih parametara glikozilacije IgG-a

Osim analize udjela koji svaki kromatografski glikanski pik zauzima u ukupnom glikomu IgG-a, određeni su i derivirani parametri koji predstavljaju udio skupine glikana sličnih strukturnih obilježja u ukupnom glikomu IgG-a (Tablica 6).

Tablica 6. Derivirani parametri glikozilacije IgG-a. Određeno je ukupno 27 deriviranih parametara. Ukupne glikane (GP) čine kromatografski pikovi GP1 do GP24. F – fukoza, G – galaktoza, S – sijalinska kiselina, B – račvajući GlcNAc

Derivirani parametar	Opis	Formula
G0	Udio negalaktoziliranih struktura u ukupnim glikanima IgG-a	(GP1 + GP2 + GP3 + GP4 + GP6) / GP
G	Udio svih galaktoziliranih struktura u ukupnim glikanima IgG-a	(GP7 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP12 + GP13 + GP14 + GP15) / GP
G1	Udio monogalaktoziliranih struktura u ukupnim glikanima IgG-a	(GP7 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11) / GP
G2	Udio digalaktoziliranih struktura u ukupnim glikanima IgG-a	GP12 + GP13 + GP14 + GP15) / GP
F	Udio svih fukoziliranih struktura u ukupnim glikanima IgG-a	(GP1 + GP4 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP14 + GP15 + GP16 + GP18 + GP19 + GP23 + GP24) / GP
B	Udio svih struktura koji sadrže račvajući GlcNAc u ukupnim glikanima IgG-a	(GP3 + GP6 + GP10 + GP11 + GP13 + GP15 + GP19 + GP22 + GP24) / GP
S	Udio svih sijaliniziranih struktura u ukupnim glikanima IgG-a	(GP16 + GP17 + GP18 + GP19 + GP21 + GP22 + GP23 + GP24) / GP
S1	Udio svih monosijaliniziranih struktura u ukupnim glikanima IgG-a	(GP16 + GP17 + GP18 + GP19) / GP
S2	Udio svih disijaliniziranih struktura u ukupnim glikanima IgG-a	(GP21 + GP22 + GP23 + GP24) / GP
$FG0^{total}$	Udio svih fukoziliranih negalaktoziliranih struktura bez i s račvajućim GlcNAc-om u ukupnim glikanima IgG-a	(GP1 + GP4 + GP6) / GP
FG0	Udio svih fukoziliranih negalaktoziliranih struktura bez račvajućeg GlcNAc-a u ukupnim glikanima IgG-a	(GP1 + GP4) / GP
$FG1^{total}$	Udio svih fukoziliranih monogalaktoziliranih struktura bez i s račvajućim GlcNAc-om u ukupnim glikanima IgG-a	(GP8 + GP9 + GP10 + GP11) / GP
FG1	Udio svih fukoziliranih monogalaktoziliranih struktura bez račvajućeg GlcNAc-a u ukupnim glikanima IgG-a	(GP8 + GP9) / GP
FBG1	Udio svih fukoziliranih monogalaktoziliranih struktura s račvajućim GlcNAc-om u ukupnim glikanima IgG-a	(GP10 + GP11) / GP
$FG2^{total}$	Udio svih fukoziliranih digalaktoziliranih struktura bez i s račvajućim GlcNAc-om u ukupnim glikanima IgG-a	(GP14 + GP15) / GP
FG^{total}	Udio svih fukoziliranih galaktoziliranih struktura bez i s račvajućim GlcNAc-om u ukupnim glikanima IgG-a	(GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP14 + GP15) / GP
FG	Udio svih fukoziliranih galaktoziliranih struktura bez račvajućeg GlcNAc-a u ukupnim glikanima IgG-a	(GP8 + GP9 + GP14) / GP
FBG	Udio svih fukoziliranih galaktoziliranih struktura s račvajućim GlcNAc-om u ukupnim glikanima IgG-a	(GP10 + GP11 + GP15) / GP
$FS1^{total}$	Udio svih fukoziliranih monosijaliniziranih struktura u ukupnim glikanima IgG-a	(GP16 + GP18 + GP19) / GP
FS1	Udio fukoziliranih monosijaliniziranih struktura bez račvajućeg GlcNAc-a u ukupnim glikanima IgG-a	(GP16 + GP18) / GP

Derivirani parametar	Opis	Formula
$FS2^{total}$	Udio svih fukoziliranih disijaliniziranih struktura u ukupnim glikanima IgG-a	(GP23 + GP24) / GP
FS^{total}	Udio svih fukoziliranih sijaliniziranih struktura u ukupnim glikanima IgG-a	(GP16 + GP18 + GP19 + GP23 + GP24) / GP
FS	Udio fukoziliranih sijaliniziranih struktura bez račvajućeg GlcNAc-a u ukupnim glikanima IgG-a	(GP16 + GP18 + GP23) / GP
FBS	Udio svih fukoziliranih sijaliniziranih struktura s račvajućim GlcNAc-om u ukupnim glikanima IgG-a	(GP19 + GP24) / GP
G0 / G	Omjer negalaktoziliranih i galaktoziliranih struktura u ukupnim glikanima IgG-a	(GP1 + GP2 + GP4 + GP6) / (GP7 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP12 + GP13 + GP14 + GP15)
$FG0^{total}$ / $FG2^{total}$	Omjer svih fukoziliranih agalaktoziliranih i fukoziliranih digalaktoziliranih struktura bez i s račvajućim GlcNAc-om u ukupnim glikanima IgG-a	(GP1 + GP4 + GP6) / (GP14 + GP15)
G / S	Omjer svih galaktoziliranih i svih sijaliniziranih struktura u ukupnim glikanima IgG-a	(GP7 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP12 + GP13 + GP14 + GP15) / (GP16 + GP17 + GP18 + GP19 + GP21 + GP22 + GP23 + GP24)

3.12. Validacija metode analize glikana IgG-a tekućinskom kromatografijom

Analiza oko 1000 uzoraka glikana IgG-a teorijski vremenski zahtijeva oko mjesec dana neprekidnog rada kromatografskog sustava (24 sata, 7 dana u tjednu), što je u praksi znatno duže, te je zbog toga potrebno ispitati ponovljivost, robusnost i rigidnost kromatografske metode. Svi uzorci za analizu metodom HILIC-UPLC pripravljeni su kako je opisano u Poglavlju 3.11. U svrhu validacije ranije opisane kromatografske metode za analizu glikana IgG-a ispitane su sljedeće karakteristike:

a) **Robusnost analize** je ispitana na način da su za određenu malu vrijednost namjerno promijenjeni parametri analize i to: temperatura kolone, protok otapala, te valne duljine detekcije (Tablica 7). Pri svakoj vrijednosti navedenih parametara analiziran je isti standard glikana IgG-a pripravljen pet puta.

b) **Ponovljivost analize** je ispitana na način da je isti uzorak analiziran 10 puta iz iste bočice (V_{inj} = 30 μL), te isto tako iz različitih bočica (V_{inj} = 40 μL), kako bi se odredile

potencijalne razlike prilikom ponovljenog injektiranja uzoraka, što je osobito važno za pripravu standarda te kontrolu kvalitete kromatografije.

c) **Rigidnost analize** je određena na način da su dva analitičara pripravila i analizirala isti standard glikana IgG-a na istoj kromatografskoj koloni, ali upotrebom dvaju kromatografskih sustava u dva različita dana. Uzorak je pripravljen u ukupnom volumenu od 150 μL te alikvotiran u 5 bočica koje su uzastopno analizirane (V_{inj} = 15 μL).

d) **Stabilnost pokretnih faza i kromatografskog sustava** procijenjena je analizom istog standarda glikana IgG-a injektiranog u trenutku 0, te 3 sata, 6 sati i 24 sata nakon svježe priprave svih pokretnih faza. Uzorak je svaki put svježe pripravljen na identičan način i stavljen u kromatografski sustav na 5 °C 30 minuta prije trenutka injektiranja. Između uzoraka su injektirani uzorci ultra čiste vode.

e) **Maksimalan broj uzoraka** koji se može analizirati u jednom setu određen je analizom istog standarda glikana IgG-a 45 puta. V_{inj} = 40 μL.

f) **Utjecaj kolone i kromatografskog sustava** su ispitani na način da je na jednom kromatografskom sustavu analizirano po pet istih uzoraka standarda glikana IgG-a i to na dvije kolone različite proizvodne serije (eng. *lot*). Osim toga, isti uzorak je analiziran i paralelno na tri kromatografska sustava, s time da su u dva od njih stavljene kolone iz iste serije proizvodnje, dok je u treći sustav stavljena kolona iz druge serije proizvodnje.

Svi uzorci su obrađeni na način kako je to opisano u Poglavlju 3.11.

Tablica 7. Ispitivanje robusnosti UPLC metode za analizu glikana IgG-a

Parametar analize	Standardne vrijednosti	Snižene vrijednosti	Povišene vrijednosti
Temperatura kolone / °C	60	58	62
Protok otapala / mL min^{-1}	0,400	0,395	0,405
Valne duljine detekcije / nm	250 (pobuda), 428 (emisija)	248 (pobuda), 426 (emisija)	252 (pobuda), 430 (emisija)

3.13. Validacija metode deglikozilacije IgG-a u otopini uz pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom *GHP* filtru

3.13.1. Analiza izvora varijacije

Kako bi se odredilo koji od glavnih koraka u pripravi uzoraka glikana IgG-a za analizu tekućinskom kromatografijom unosi najviše varijacije, te potencijalno zahtijeva daljnju optimizaciju, uzorci su spojeni u različitim koracima analize te nakon miješanja ponovno razdijeljeni, kako bi se uklonila varijacija svih prethodnih koraka. U tu svrhu je po 24 uzorka spojeno: nakon deglikozilacije (uzorci A), nakon obilježavanja slobodnih glikana 2-AB-om (uzorci B) i nakon pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana (uzorci C). Uzorci D nisu spajani niti u jednom koraku te, prema tome, sadrže varijaciju ukupnog postupka priprave glikana za analizu. Svi uzorci su nakon priprave, a prije analize metodom UPLC nasumično raspoređeni u PCR pločicu na način da je po 8 uzoraka iz svake skupine (A do D) analizirano u jednom setu uzoraka, kako bi se uklonile potencijalne lažne razlike među uzorcima nastale zbog kromatografije (Slika 11).

Paralelno je pripravljena i cijela pločica s 96 uzoraka koji su nakon cjelokupne priprave spojeni, promiješani i alikvotirani u novu PCR pločicu. Na taj način su uklonjene razlike među uzorcima koje su rezultat priprave uzoraka, te je testirana samo varijacija koju unosi postupak kromatografske analize triju setova uzoraka (u svakom je analizirano po 32 uzorka) u ukupnom približnom trajanju od tri dana (Slika 11).

Svaki uzorak je sadržavao 100 μg IgG-a, a uzorci su pripravljeni nakon optimizacije cjelokupnog postupka priprave glikana IgG-a, prema protokolu opisanom u Poglavljima 3.13.2.2. i 3.13.2.3.

PLOČICA 1 - priprema uzoraka

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A_01	A_09	A_17	B_01	B_09	B_17	C_01	C_09	C_17	D_01	D_09	D_17
B	A_02	A_10	A_18	B_02	B_10	B_18	C_02	C_10	C_18	D_02	D_10	D_18
C	A_03	A_11	A_19	B_03	B_11	B_19	C_03	C_11	C_19	D_03	D_11	D_19
D	A_04	A_12	A_20	B_04	B_12	B_20	C_04	C_12	C_20	D_04	D_12	D_20
E	A_05	A_13	A_21	B_05	B_13	B_21	C_05	C_13	C_21	D_05	D_13	D_21
F	A_06	A_14	A_22	B_06	B_14	B_22	C_06	C_14	C_22	D_06	D_14	D_22
G	A_07	A_15	A_23	B_07	B_15	B_23	C_07	C_15	C_23	D_07	D_15	D_23
H	A_08	A_16	A_24	B_08	B_16	B_24	C_08	C_16	C_24	D_08	D_16	D_24

PLOČICA 1 - HILIC-UPLC analiza

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A_01	B_01	C_01	D_01	B_09	A_09	D_09	C_09	C_17	D_17	B_17	A_17
B	A_02	B_02	C_02	D_02	B_10	A_10	D_10	C_10	C_18	D_18	B_18	A_18
C	A_03	B_03	C_03	D_03	B_11	A_11	D_11	C_11	C_19	D_19	B_19	A_19
D	A_04	B_04	C_04	D_04	B_12	A_12	D_12	C_12	C_20	D_20	B_20	A_20
E	A_05	B_05	C_05	D_05	B_13	A_13	D_13	C_13	C_21	D_21	B_21	A_21
F	A_06	B_06	C_06	D_06	B_14	A_14	D_14	C_14	C_22	D_22	B_22	A_22
G	A_07	B_07	C_07	D_07	B_15	A_15	D_15	C_15	C_23	D_23	B_23	A_23
H	A_08	B_08	C_08	D_08	B_16	A_16	D_16	C_16	C_24	D_24	B_24	A_24

PLOČICA 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E_01	E_09	E_17	E_25	E_33	E_41	E_49	E_57	E_65	E_73	E_81	E_89
B	E_02	E_10	E_18	E_26	E_34	E_42	E_50	E_58	E_66	E_74	E_82	E_90
C	E_03	E_11	E_19	E_27	E_35	E_43	E_51	E_59	E_67	E_75	E_83	E_91
D	E_04	E_12	E_20	E_28	E_36	E_44	E_52	E_60	E_68	E_76	E_84	E_92
E	E_05	E_13	E_21	E_29	E_37	E_45	E_53	E_61	E_69	E_77	E_85	E_93
F	E_06	E_14	E_22	E_30	E_38	E_46	E_54	E_62	E_70	E_78	E_86	E_94
G	E_07	E_15	E_23	E_31	E_39	E_47	E_55	E_63	E_71	E_79	E_87	E_95
H	E_08	E_16	E_24	E_32	E_40	E_48	E_56	E_64	E_72	E_80	E_88	E_96

Slika 11. Analiza varijacije novorazvijene metode priprave glikana IgG-a za analizu tekućinskom kromatografijom (HILIC-UPLC). Uzorci su spajani u različitim koracima analize te nakon miješanja ponovno razdijeljeni u novu pločicu, kako bi se uklonila varijacija svih prethodnih koraka (PLOČICA 1 – priprava uzoraka). Uzorci **A** – spojeni nakon deglikozilacije u otopini, uzorci **B** – spojeni nakon obilježavanja slobodnih glikana 2-AB-om, uzorci **C** - spojeni nakon pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom *GHP* filtru uz hladni 96 %-tni acetonitril u vodi. Uzorci **D** - nisu spajani niti u jednom koraku. Svi uzorci su nakon priprave, a prije analize metodom UPLC „nasumično" raspoređeni u PCR pločicu na način da je po 8 uzoraka iz svake skupine (**A** do **D**) analizirano u jednom setu uzoraka (PLOČICA 1 – HILIC-UPLC analiza). PLOČICA 2 - uzorci koji su nakon cjelokupne priprave spojeni, promiješani i alikvotirani u novu PCR pločicu, radi testiranja varijacije koju unosi samo kromatografska analiza. Uzorci koji su zajedno analizirani tekućinskom kromatografijom u jednom setu (po 4 stupca) odijeljeni su podebljanom linijom

3.13.2. Ponovljivost i rigidnost metode – utjecaj dana i analitičara na varijaciju metode

Ponovljivost optimirane metode (utjecaj dana), te njezina rigidnost (utjecaj analitičara) određena je analizom po jedne pločice s 96 uzoraka od strane triju analitičara u istim danima

u razmaku od tri tjedna. Prije eksperimenata svi uzorci plazme su isti dan raspoređeni u jednakom rasporedu u svih 6 pločica od strane jednog analitičara kako bi se varijacije zbog pipetiranja prije samog testiranja metode smanjile na najmanju moguću mjeru. Nakon toga svi uzorci su smrznuti na -20 °C do dana eksperimenta.

3.13.2.1. Izolacija IgG-a iz uzoraka plazme

Izolacija IgG-a iz uzoraka plazme provedena je kako je opisano u Poglavlju 3.3. Po 300 μL (180 do 250 μg) svakog uzorka je osušeno u vakuum centrifugi te deglikozilirano prema optimiranom protokolu, a kako je opisano u nastavku.

3.13.2.2. Deglikozilacija

Uzorci suhog IgG-a denaturirani su i deglikozilirani u otopini kako je opisano u Poglavlju 3.4.1. i 3.5.1., s tim da su uzorci nakon denaturacije sa SDS-om hlađeni uz miješanje 30 min pri sobnoj temperaturi, te inkubirani s igepalom CA-630 uz miješanje na sobnoj temperaturi 15 minuta prije dodatka 1,25 U PNGaze F (Promega).

3.13.2.3. Obilježavanje glikana fluorescentnom bojom i njihovo pročišćavanje

Slobodni glikani su obilježeni fluorescentnom bojom 2-AB-om kako je opisano u Poglavlju 3.7., te pročišćeni na hidrofilnom 0,2 μm *GHP* filtru kako je opisano u Poglavlju 3.8.3. Ukratko, ohlađenim uzorcima (30 minuta pri sobnoj temperaturi) je nakon fluorescentnog obilježavanja dodano 700 μl acetonitrila, promiješano, te su uzorci naneseni na *GHP* filtar pločicu s 96 jažica prethodno ispranu s 200 μL otopine etanola u vodi (φ = 70 %), 200 μL ultra čiste vode, te 200 μL otopine acetonitrila u vodi (φ = 96 %). Nakon inkubacije od 2 minute, uzorci su isprani 5 puta s po 200 μL 96 %-tnog acetonitrila u vodi, te su fluorescentno obilježeni glikani eluirani s filtra u 2 x 100 μL ultra čiste vode s inkubacijom od 15 minuta pri sobnoj temperaturi uz miješanje. Spojeni eluati su smrznuti na -20 °C prije analize tekućinskom kromatografijom, kako je opisano u Poglavlju 3.11.

3.14. Statističke metode

U svim UPLC kromatogramima integrirana su 24 kromatografska pika, čije površine su normalizirane na način da je površina svakog pika podijeljena s ukupnom površinom svih pikova u kromatogramu (eng. *total area normalization*), čime je određen udio površine koji pojedini kromatografski pik zauzima u ukupnom kromatogramu, izražen u obliku postotka.

Statistička analiza provedena je u programskim paketima *SigmaPlot 12.5* (Systat Software, Inc.) i *GraphPad Prism 6.05* (GraphPad Software). Budući da glikani IgG-a nemaju normalnu Gaussovu raspodjelu, korišteni su neparametrijski testovi.

Mann-Whitneyjev U-test (test sume rangova) korišten je prilikom testiranja robusnosti metoda, kako bi se odredilo ima li pojedini faktor statistički značajan utjecaj na površinu pikova. Osim toga, ovaj test je korišten za analizu glikozilacije IgG-a u upalnoj bolesti crijeva pri čemu su uspoređena glikanska svojstva dviju nezavisnih skupina: zdravih ispitanika u odnosu na pacijente koji boluju od Crohnove bolesti (K u odnosu na C) ili ulceroznog kolitisa (K u odnosu na U), te pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa (C u odnosu na U).

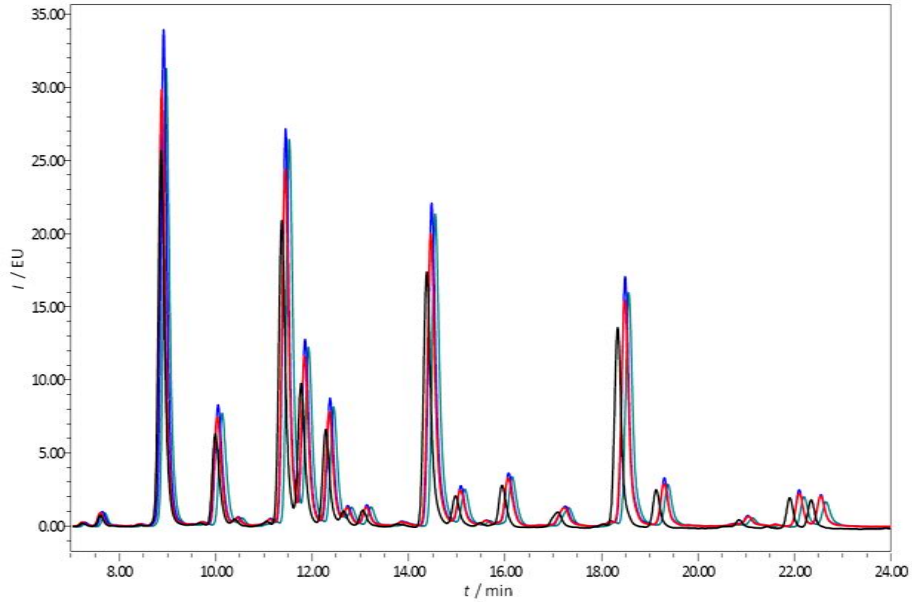
Razina značajnosti za vrijednost p je korigirana prema Bonferronijevoj korekciji gdje je u slučaju Mann-Whitneyjevog U-testa kao granica značajnosti uzeta vrijednost p / m, gdje je m broj postavljenih hipoteza. Za usporedbu glikanskih struktura prilikom analize 24 kromatografska pika i 27 deriviranih parametara glikana IgG-a u upalnoj bolesti crijeva je prema tome uzeta vrijednost $p / ((24 + 27) \times 3) = p / 153 = 0,05 / 153 = 0,0003$, gdje se broj 3 odnosi na tri nulte hipoteze (K = C, K = U, te C = U), a svaka od njih za ukupno 24 kromatografska pika i 27 deriviranih parametara.

§ 4. REZULTATI

4.1. Validacija kromatografske metode za analizu glikana IgG-a

Fluorescentno obilježeni glikani IgG-a analizirani su kromatografskom metodom HILIC-UPLC paralelno na dva kromatografska sustava u periodu od sedam tjedana (24 h, 7 dana u tjednu), te je prethodno bilo nužno validirati metodu kako bi se osigurala kvaliteta dobivenih rezultata, te spriječio eventualni nastanak lažnih razlika između pojedinih kromatografskih profila glikana zbog potencijalne nestabilnosti kromatografskog sustava. Kromatografska metoda je stoga validirana kako je to opisano u Poglavlju 3.12.

Stabilnost pokretnih faza i kromatografskog sustava ispitana je na način da je nakon svježe priprave svih pokretnih faza analiziran isti standard glikana IgG-a koji je injektiran u trenutku 0, nakon 3 sata, 6 sati i 24 sata, kako je to opisano u Poglavlju 3.12. Zapažen je blagi pomak u vremenu zadržavanja kromatografskih pikova i to veći za spojeve koji kasnije eluiraju s kolone (Tablica 8, Slika 12), ali nisu uočene nikakve promjene u kvaliteti kromatografskog razdvajanja (Slika 13).

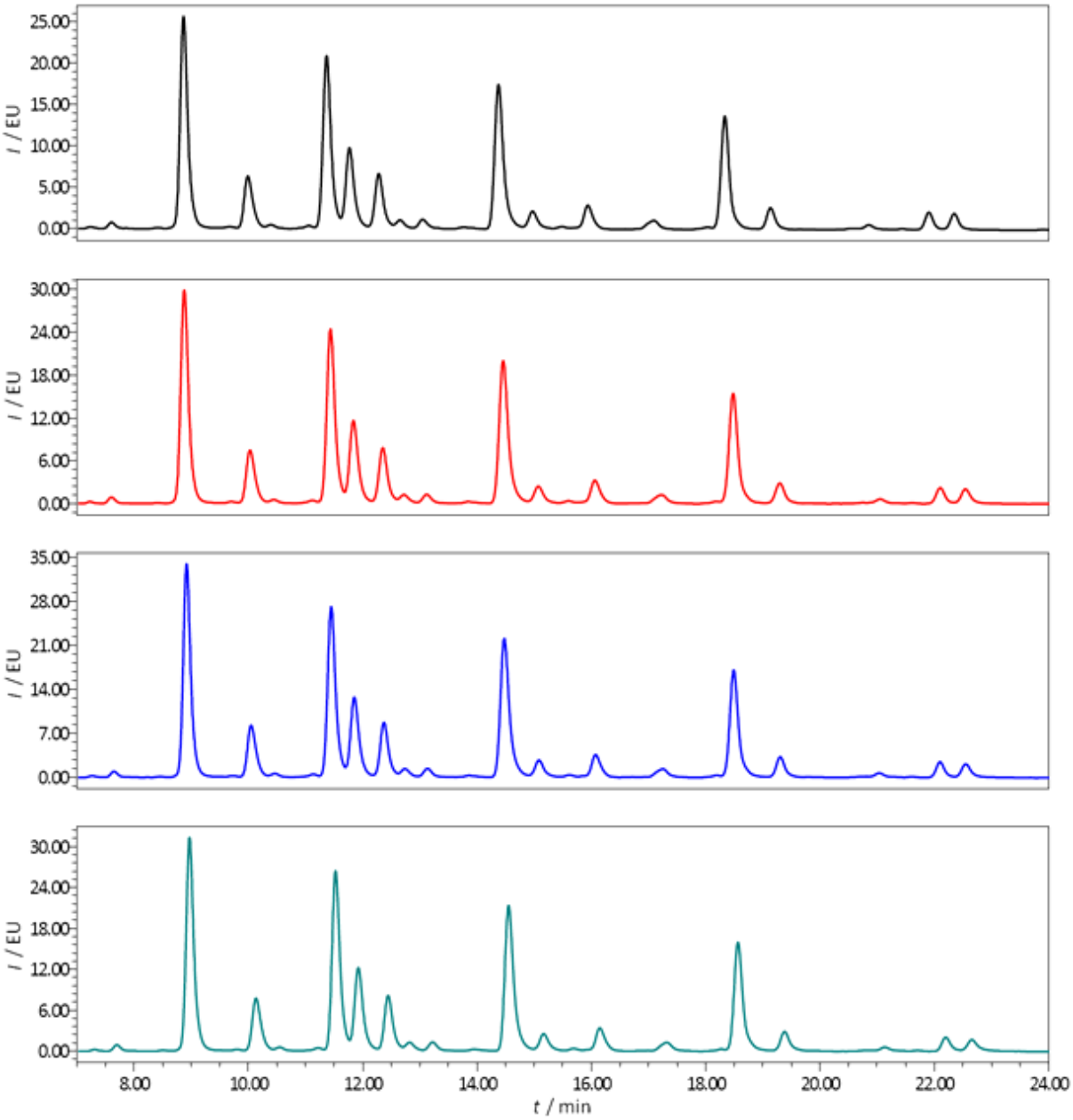


Slika 12. Pomak u vremenu zadržavanja pikova pojedinih spojeva prilikom testiranja stabilnosti pokretnih faza i kromatografskog sustava. Prikazan je standard glikana IgG-a koji je injektiran (V_{inj} = 40 µL) netom nakon svježe priprave pokretnih faza – 0 h (crno), nakon 3 h (crveno), nakon 6 h (plavo) i nakon 24 h (zeleno). Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani uz linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije (eng. *emission unit*)

Tablica 8. Utjecaj stabilnosti pokretnih faza i kromatografskog sustava na udio i vrijeme zadržavanja pojedinog glikana. Standard glikana IgG-a je injektiran netom nakon svježe priprave pokretnih faza – 0 h, nakon 3 h, nakon 6 h i nakon 24 h. Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani uz linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 µL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm

Kromatografski pik	Udio kromatografskog pika (n = 4)			Vrijeme zadržavanja kromatografskog pika (n = 4)		
	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %	$\overline{t_R}$ / min	SD / min	CV / %
GP1	0,16	0,01	6,08	7,26	0,04	0,52
GP2	0,57	0,01	2,03	7,64	0,04	0,57
GP3	0,13	0,01	10,33	8,45	0,04	0,50
GP4	19,24	0,06	0,31	8,91	0,05	0,53
GP5	0,30	0,03	9,65	9,73	0,05	0,55
GP6	5,39	0,01	0,26	10,05	0,06	0,59
GP7	0,50	0,01	2,61	10,46	0,06	0,61
GP8	16,97	0,10	0,59	11,45	0,06	0,57
GP9	8,35	0,03	0,37	11,85	0,06	0,54
GP10	5,55	0,01	0,15	12,36	0,07	0,55
GP11	0,99	0,01	1,43	12,73	0,07	0,54
GP12	1,11	0,04	3,35	13,13	0,07	0,54
GP13	0,39	0,01	3,21	13,86	0,08	0,55
GP14	15,09	0,05	0,32	14,47	0,07	0,51
GP15	2,05	0,01	0,61	15,08	0,08	0,53
GP16	3,17	0,03	0,95	16,06	0,09	0,55
GP17	1,44	0,02	1,43	17,22	0,10	0,56
GP18	11,71	0,06	0,53	18,47	0,10	0,52
GP19	2,31	0,01	0,54	19,28	0,10	0,53
GP20	0,35	0,05	15,30	20,73	0,13	0,65
GP21	0,70	0,04	6,19	21,02	0,12	0,56
GP22	0,14	0,01	10,10	21,59	0,11	0,52
GP23	1,65	0,08	4,75	22,08	0,12	0,56
GP24	1,77	0,06	3,23	22,53	0,13	0,57

n = broj injektiranja



Slika 13. Kvaliteta kromatografskog razdvajanja prilikom testiranja stabilnosti pokretnih faza i kromatografskog sustava. Prikazan je standard glikana IgG-a koji je injektiran (V_{inj} = 40 µL) netom nakon svježe priprave pokretnih faza – 0 h (crno), nakon 3 h (crveno), nakon 6 h (plavo) i nakon 24 h (zeleno). Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani uz linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije (eng. *emission unit*)

Ponovljivost analize je ispitana injektiranjem istog uzorka – standarda glikana IgG-a – iz iste bočice uzastopno 10 puta (V_{inj} = 30 µL), te iz različitih bočica (V_{inj} = 40 µL). Maksimalni broj uzoraka u analiziranom setu uzoraka ispitan je injektiranjem standarda glikana IgG-a uzastopno iz 45 bočica (Tablica 9).

Tablica 9. Ponovljivost metode HILIC-UPLC i maksimalni broj uzoraka u analiziranom setu. Standard glikana IgG-a injektiran je 10x iz iste bočice (V_{inj} = 30 μL) te 10x iz različitih bočica (V_{inj} = 40 μL). Maksimalan broj uzoraka ispitan je analizom 45 standarda glikana IgG-a (V_{inj} = 40 μL). Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani uz linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. 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)

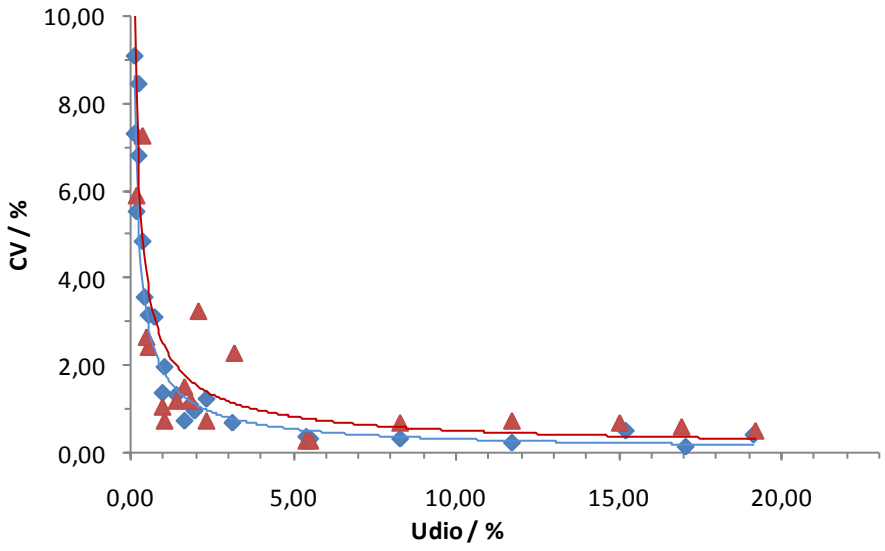
Kromatografski pik	Iz iste bočice (n = 10)			Iz različitih bočica (n = 10)			Maksimalan broj uzoraka (n = 45)		
	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %	$\overline{\text{Udio}}$ / %	SD / %	CV / %	$\overline{\text{Udio}}$ /%	SD / %	CV / %
GP1	0,18	0,01	5,56	0,17	0,01	5,88	0,17	0,01	5,47
GP2	0,59	0,02	3,17	0,58	0,01	2,45	0,58	0,03	4,42
GP3	0,14	0,01	9,12	0,12	0,02	12,16	0,12	0,02	16,17
GP4	19,18	0,08	0,40	19,23	0,10	0,50	19,25	0,13	0,69
GP5	0,24	0,02	8,46	0,28	0,03	10,89	0,28	0,04	13,70
GP6	5,39	0,02	0,36	5,38	0,01	0,27	5,39	0,04	0,67
GP7	0,46	0,02	3,59	0,48	0,01	2,64	0,49	0,03	5,66
GP8	17,07	0,03	0,17	16,94	0,10	0,59	16,96	0,13	0,78
GP9	8,32	0,03	0,34	8,31	0,06	0,68	8,33	0,06	0,72
GP10	5,52	0,02	0,33	5,54	0,02	0,29	5,54	0,03	0,56
GP11	0,96	0,01	1,38	0,99	0,01	1,07	0,99	0,02	1,71
GP12	1,06	0,02	1,97	1,08	0,01	0,72	1,08	0,02	2,01
GP13	0,38	0,02	4,86	0,39	0,03	7,25	0,39	0,03	6,63
GP14	15,21	0,08	0,50	15,02	0,11	0,70	15,05	0,10	0,69
GP15	2,00	0,02	0,98	2,07	0,07	3,25	2,07	0,06	2,93
GP16	3,13	0,02	0,70	3,18	0,07	2,31	3,17	0,05	1,68
GP17	1,44	0,02	1,34	1,45	0,02	1,20	1,44	0,03	2,00
GP18	11,74	0,03	0,26	11,74	0,09	0,73	11,71	0,18	1,50
GP19	2,32	0,03	1,26	2,32	0,02	0,76	2,32	0,03	1,50
GP20	0,28	0,02	6,83	0,29	0,03	11,03	0,30	0,06	20,56
GP21	0,74	0,02	3,13	0,78	0,08	10,40	0,76	0,07	9,37
GP22	0,14	0,01	7,32	0,15	0,02	15,40	0,14	0,02	15,58
GP23	1,70	0,01	0,72	1,69	0,03	1,53	1,67	0,04	2,67
GP24	1,82	0,02	1,11	1,82	0,02	1,20	1,79	0,05	2,85

n = broj injektiranja

Vidljivo je da je ponovljivost kromatografske analize fluorescentno obilježenih glikana IgG-a izrazito dobra, bez obzira radi li se o injektiranju iz iste ili različitih bočica. Prilikom

injektiranja uzoraka iz iste bočice za 19 od 24 kromatografskih pikova CV udjela njihove površine u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu bio je < 5 %, a za 5 pikova od 5 % do 10 %. Pri analizi uzoraka iz različitih bočica, CV udjela površine pojedinog kromatografskog pika u ukupnoj površini svih pikova bio je < 5 % za 17 pikova, dok je za 2 pika bio od 5 do 10 %, za 4 pika od 10 do 15 %, te za 1 pik > 15 %. Nešto više vrijednosti CV-ova pri injektiranju uzoraka iz različitih bočica se može pripisati pogrešci pipete. Isto tako, uzastopnom analizom do 45 uzoraka (za što je otprilike potreban jedan cijeli dan) ne dolazi do vidljive izmjene kromatografskog profila uzoraka u kromatografskom sustavu nakon njihove priprave, ali su vrijednosti CV-ova ipak nešto više (za 16 pikova CV je bio < 5 %, za 4 pika od 5 do 10 %, za 1 pik od 10 do 15 %, te za 3 pika > 15 %) što je najvjerojatnije uzrokovano isparavanjem acetonitrila stajanjem uzoraka pri temperaturi od 5 °C prije same analize.

Varijabilnost udjela površine pojedinog kromatografskog pika u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu povezana je s veličinom tog pika na način da su manji pikovi podložniji većoj varijaciji (Slika 10 i 14).



Slika 14. Povezanost veličine pika, tj. udjela površine pojedinog kromatografskog pika u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu, i koeficijenta varijacije, prema podatcima iz **Tablice 9**. Plavi rombovi – injektiranje uzoraka iz iste bočice (n = 10), crveni trokutovi – injektiranje uzoraka iz različitih bočica (n = 10). Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani uz linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 µL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm

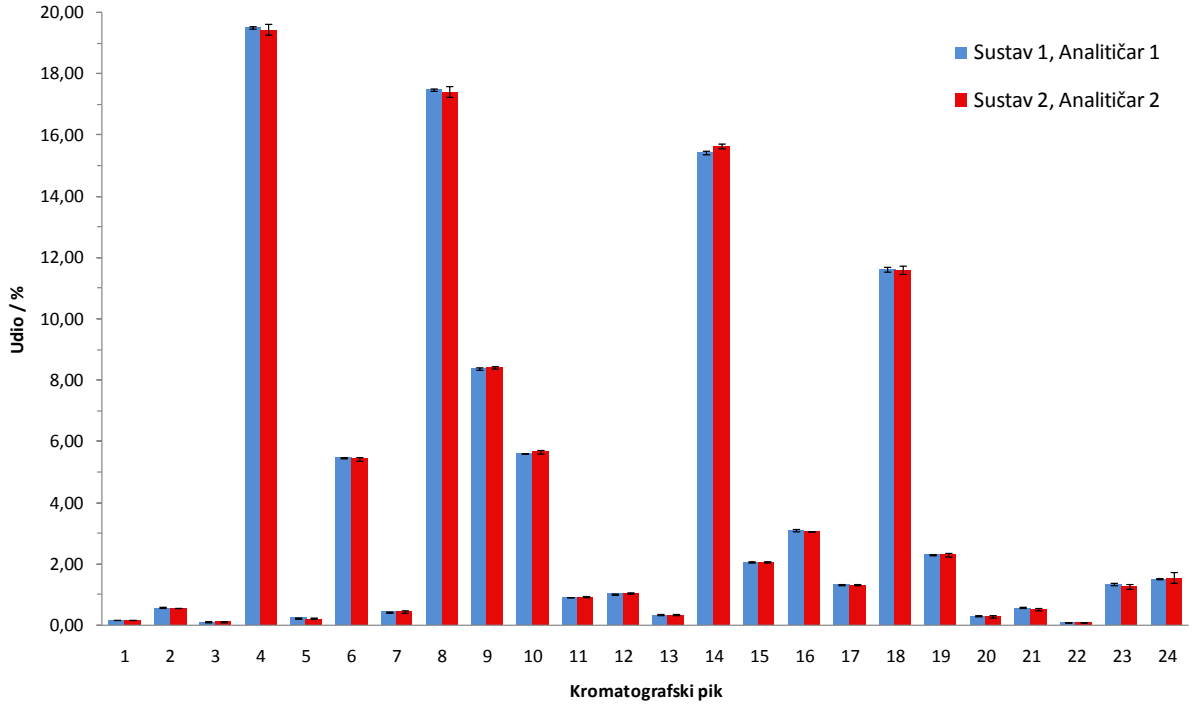
Robusnost kromatografske metode je ispitana promjenom temperature kolone (60 ± 2 °C), protoka pokretnih faza (0,400 ± 0,005 mL min^{-1}), te valnih duljina detekcije (λ_{ex} = 250 ± 2 nm, λ_{em} = 428 ± 2 nm). Korištena metoda HILIC-UPLC pokazala se izrazito robusnom sa standardnim devijacijama udjela površina pojedinih pikova ≤ 0,38 %, s tim da je u većini mjerenja bila ≤ 0,04 % (Tablica 10).

Tablica 10. Robusnost kromatografske metode za analizu glikana IgG-a. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost udjela površine (%) koju svaki kromatografski pik (GP1 – GP24) zauzima u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu ± standardna devijacija (n = 5). Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani uz linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 µL, $T_{uzoraka}$ = 5 °C

Kromatografski pik	**Temperatura kolone / °C**			**Valna duljina pobude (λ_{ex}) i emisije (λ_{em}) / nm**			**Protok / mL min^{-1}**		
	58	**60**	**62**	**λ_{ex} = 248 λ_{em} = 426**	**λ_{ex} = 250 λ_{em} = 428**	**λ_{ex} = 252 λ_{em} = 430**	**0,395**	**0,400**	**0,405**
GP1	0,17 ± 0,01	0,19 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,03	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,19 ± 0,03	0,17 ± 0,01
GP2	0,56 ± 0,03	0,61 ± 0,04	0,57 ± 0,01	0,61 ± 0,01	0,61 ± 0,04	0,62 ± 0,02	0,57 ± 0,01	0,61 ± 0,04	0,58 ± 0,01
GP3	0,11 ± 0,02	0,15 ± 0,04	0,12 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,04	0,16 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,15 ± 0,04	0,12 ± 0,00
GP4	19,11 ± 0,05	19,11 ± 0,23	19,16 ± 0,02	19,06 ± 0,35	19,11 ± 0,23	19,04 ± 0,13	19,24 ± 0,10	19,11 ± 0,23	19,23 ± 0,07
GP5	0,22 ± 0,02	0,26 ± 0,03	0,24 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,26 ± 0,03	0,28 ± 0,02	0,26 ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,27 ± 0,02
GP6	5,37 ± 0,03	5,48 ± 0,15	5,36 ± 0,00	5,43 ± 0,13	5,48 ± 0,15	5,37 ± 0,35	5,39 ± 0,02	5,48 ± 0,15	5,38 ± 0,02
GP7	0,44 ± 0,02	0,50 ± 0,03	0,44 ± 0,02	0,51 ± 0,04	0,50 ± 0,03	0,49 ± 0,03	0,50 ± 0,01	0,50 ± 0,03	0,49 ± 0,01
GP8	17,00 ± 0,02	16,71 ± 0,18	17,04 ± 0,02	16,65 ± 0,18	16,71 ± 0,18	16,71 ± 0,18	16,87 ± 0,06	16,71 ± 0,18	16,90 ± 0,04
GP9	8,28 ± 0,05	8,35 ± 0,19	8,33 ± 0,02	8,31 ± 0,21	8,35 ± 0,19	8,23 ± 0,38	8,33 ± 0,03	8,35 ± 0,19	8,35 ± 0,02
GP10	5,52 ± 0,01	5,69 ± 0,09	5,52 ± 0,02	5,51 ± 0,26	5,69 ± 0,09	5,55 ± 0,13	5,52 ± 0,02	5,69 ± 0,09	5,53 ± 0,02
GP11	0,97 ± 0,01	0,97 ± 0,02	0,96 ± 0,01	0,96 ± 0,03	0,97 ± 0,02	0,96 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,97 ± 0,02	1,01 ± 0,01

Kromatografski pik	Temperatura kolone / °C			Valna duljina pobude (λ_{ex}) i emisije (λ_{em}) / nm			Protok / mL min^{-1}		
	58	60	62	λ_{ex} = 248 λ_{em} = 426	λ_{ex} = 250 λ_{em} = 428	λ_{ex} = 252 λ_{em} = 430	0,395	0,400	0,405
GP12	1,04 ± 0,02	1,11 ± 0,03	1,06 ± 0,01	1,12 ± 0,04	1,11 ± 0,03	1,11 ± 0,03	1,09 ± 0,02	1,11 ± 0,03	1,09 ± 0,02
GP13	0,36 ± 0,04	0,42 ± 0,04	0,37 ± 0,01	0,43 ± 0,03	0,42 ± 0,04	0,41 ± 0,01	0,39 ± 0,02	0,42 ± 0,04	0,39 ± 0,01
GP14	15,19 ± 0,05	14,73 ± 0,19	15,24 ± 0,03	14,84 ± 0,19	14,73 ± 0,19	15,03 ± 0,24	14,92 ± 0,04	14,73 ± 0,19	14,97 ± 0,07
GP15	2,02 ± 0,00	1,99 ± 0,10	2,03 ± 0,02	2,04 ± 0,08	1,99 ± 0,10	2,15 ± 0,09	2,06 ± 0,01	1,99 ± 0,10	2,05 ± 0,01
GP16	3,12 ± 0,02	3,19 ± 0,18	3,11 ± 0,02	3,15 ± 0,15	3,19 ± 0,18	3,29 ± 0,24	3,20 ± 0,04	3,19 ± 0,18	3,20 ± 0,01
GP17	1,46 ± 0,03	1,48 ± 0,02	1,44 ± 0,02	1,54 ± 0,02	1,48 ± 0,02	1,53 ± 0,03	1,46 ± 0,02	1,48 ± 0,02	1,45 ± 0,01
GP18	11,83 ± 0,02	11,79 ± 0,12	11,79 ± 0,02	11,79 ± 0,22	11,79 ± 0,12	11,68 ± 0,27	11,81 ± 0,02	11,79 ± 0,12	11,78 ± 0,03
GP19	2,37 ± 0,01	2,37 ± 0,05	2,32 ± 0,01	2,42 ± 0,10	2,37 ± 0,05	2,38 ± 0,04	2,34 ± 0,01	2,37 ± 0,05	2,33 ± 0,01
GP20	0,27 ± 0,03	0,30 ± 0,05	0,28 ± 0,01	0,35 ± 0,03	0,30 ± 0,05	0,29 ± 0,02	0,28 ± 0,03	0,30 ± 0,05	0,27 ± 0,02
GP21	0,79 ± 0,03	0,79 ± 0,02	0,76 ± 0,01	0,82 ± 0,03	0,79 ± 0,02	0,77 ± 0,02	0,77 ± 0,03	0,79 ± 0,02	0,76 ± 0,02
GP22	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,00	0,17 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,01
GP23	1,74 ± 0,03	1,80 ± 0,10	1,72 ± 0,02	1,81 ± 0,15	1,80 ± 0,10	1,66 ± 0,17	1,72 ± 0,02	1,80 ± 0,10	1,70 ± 0,02
GP24	1,90 ± 0,02	1,84 ± 0,14	1,82 ± 0,02	1,87 ± 0,13	1,84 ± 0,14	1,96 ± 0,18	1,87 ± 0,03	1,84 ± 0,14	1,83 ± 0,02

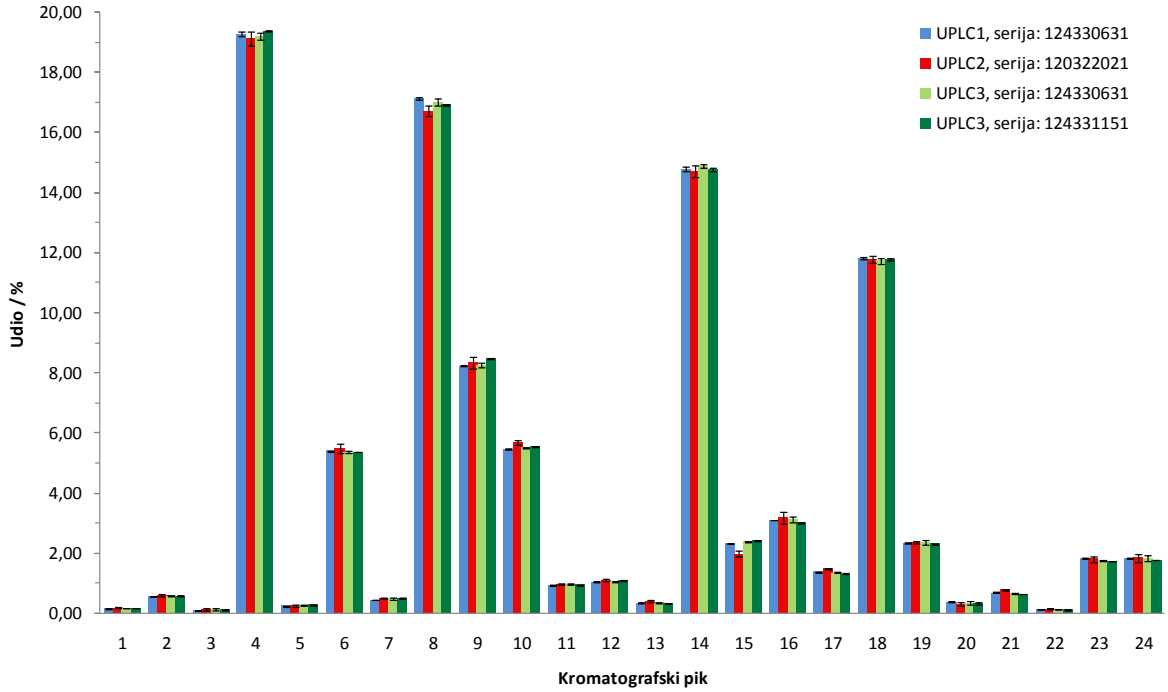
Rigidnost analize određena je analizom istog standarda glikana IgG-a pet puta na istoj koloni, ali od strane dvaju analitičara upotrebom dva različita kromatografska sustava u dva različita dana (Slika 15). Kromatografska metoda HILIC-UPLC je vrlo robusna s obzirom na vrijeme analize, analitičara koji pripravlja uzorke te kromatografski sustav korišten za analizu, u slučaju kad su uzorci analizirani na istoj kromatografskoj koloni.



Slika 15. Rigidnost analize glikana IgG-a. Uzorci su pripravljeni od strane dvaju analitičara u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani u dva različita dana na dva kromatografska sustava, ali upotrebom iste kromatografske kolone. Korišten je linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. Prikazane su srednje vrijednosti i standardna devijacija udjela površine pojedinog pika u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu (n = 5). V_{inj} = 15 µL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm

Kako bi se ispitala mogućnost analize uzoraka paralelno na više kromatografskih sustava istovremeno je analiziran standard glikana IgG-a na tri kromatografska sustava, s tim da su u dva stavljene kolone iz iste proizvodne serije, a u treći sustav stavljena je kolona iz druge proizvodne serije. Osim toga, isti uzorci su analizirani i po pet puta na istom kromatografskom sustavu, ali na kolonama različite proizvodne serije, kako bi se ispitao utjecaj same kolone (Slika 16).

Vidljivo je da se najsličniji rezultati s obzirom na udio površine pojedinog kromatografskog pika u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu postižu analizom glikana IgG-a na kolonama koje su iz iste proizvodne serije (124330631) s podjednakim brojem prethodno analiziranih uzoraka (kolone podjednake starosti) i to na dva kromatografska sustava (UPLC1 i UPLC3). Stoga su za kromatografsku analizu fluorescentno obilježenih i pročišćenih glikana IgG-a u upalnoj bolesti crijeva korišteni navedeni kromatografski sustavi, s novim testiranim kolonama iz proizvodne serije 124330631.

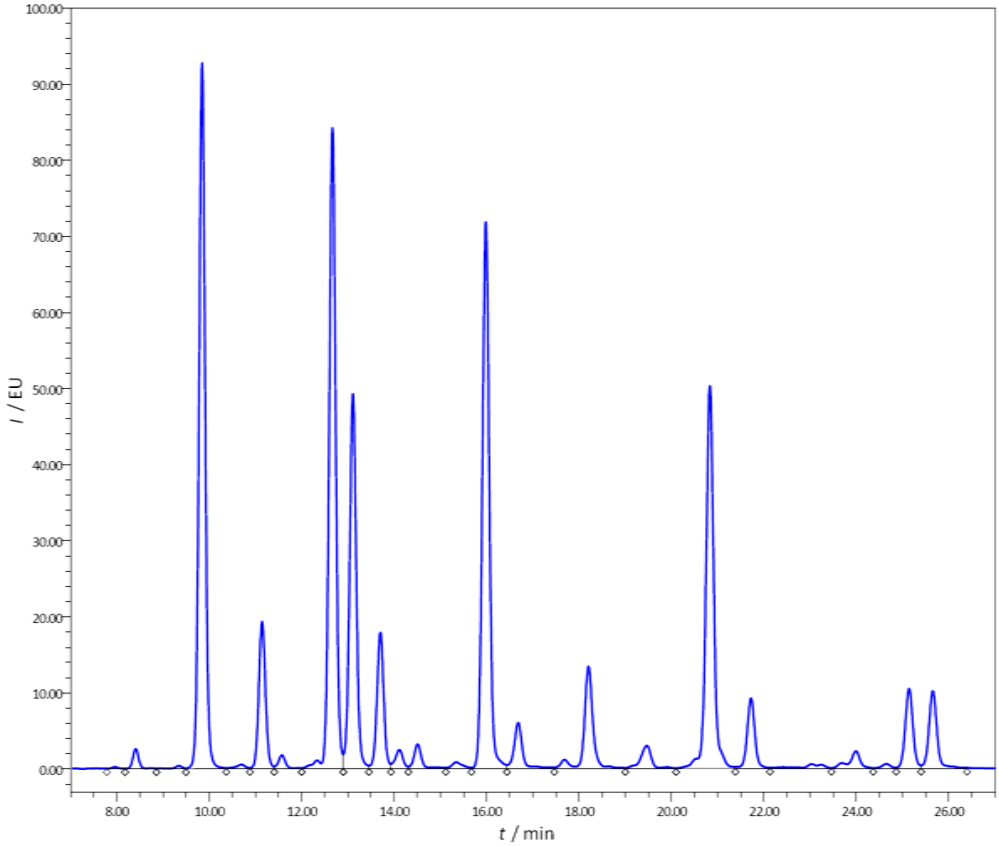


Slika 16. Utjecaj kromatografskog sustava (UPLC1, UPLC2 i UPLC3) i proizvodne serije kolone (124330631, 120322021, 124331151) na analizu glikana IgG-a. Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani uz linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. Prikazane su srednje vrijednosti i standardna devijacija udjela površine pojedinog pika u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu (n = 5). V_{inj} = 40 µL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm

4.2. Analiza glikana IgG-a u upalnoj bolesti crijeva

Glikani imunoglobulina G u upalnoj bolesti crijeva analizirani su na način da je iz ukupno 998 uzoraka seruma (120 kontrolnih ispitanika, 288 CD, te 590 UC, Tablica 2) izoliran imunoglobulin G afinitetnom kromatografijom upotrebom protein G pločice, kako je to opisano u Poglavlju 3.3. Time je iz oko 50 µL do 70 µL seruma dobiveno oko 700 µg do 800 µg IgG-a u svakom uzorku, od čega je za analizu uzeta polovica eluata (350 µg do 400 µg). Suhi uzorci su denaturirani u prisutnosti SDS-a i igepala CA-630 (Poglavlje 3.4.1.) s hlađenjem 15 minuta na sobnoj temperaturi nakon denaturacije IgG-a sa SDS-om i inkubacijom s igepalom 5 minuta uz miješanje na sobnoj temperaturi. Denaturirani IgG je deglikoziliran u otopini pomoću enzima PNGaze F (Prozyme) (Poglavlje 3.5.1.), a oslobođeni glikani su obilježeni reduktivnom aminacijom fluorescentnom bojom, 2-AB, prema postupku opisanom u Poglavlju 3.7. Fluorescentno obilježene glikane je prije analize tekućinskom kromatografijom potrebno pročistiti od suviška fluorescentne boje i reagensa, neobilježenih

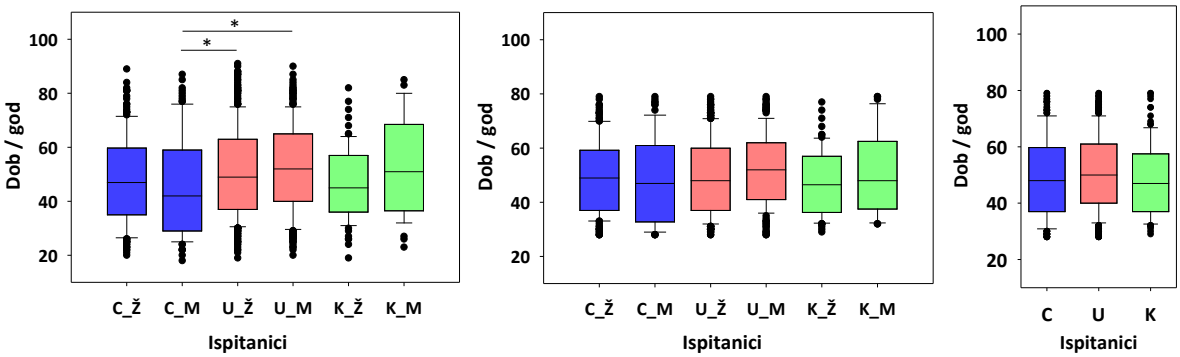
glikana i proteina, te je u tu svrhu napravljeno HILIC-SPE pročišćavanje na celulozi (0,1 g mL^{-1}) nanesenoj na 0,45 μm *GHP AcroPrep* filtar pločicu s 96 jažica, kako je to opisano u Poglavlju 3.8.1. Za ispiranje je korišten 80 %-tni acetonitril u vodi sobne temperature. Fluorescentno obilježeni pročišćeni glikani analizirani su prethodno validiranom kromatografskom metodom (Poglavlje 4.1.) HILIC-UPLC prema postupku opisanom u Poglavlju 3.11. U svim kromatogramima su na identičan način integrirana 24 kromatografska pika (Slika 17), te su rezultati statistički obrađeni Mann-Whitneyjevim U-testom, kako je opisano u Poglavlju 3.14.



Slika 17. Reprezentativni kromatogram fluorescentno obilježenih glikana IgG-a u uzorku seruma pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva. Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani uz linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. U kromatogramu su integrirana ukupno 24 kromatografska pika (označeni rombom). V_{inj} = 40 μL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije

Iz analize su isključeni uzorci kontaminirani ostatcima celuloze (vidi Poglavlje 4.3.), a zatim su Mann-Whitneyjevim U-testom prema dobi međusobno uspoređeni pacijenti obaju spolova koji boluju od Crohnove bolesti ili ulceroznog kolitisa i kontrolni ispitanici. Kao statistički značajna granična vrijednost uzeta je vrijednost p = 0,0033 (korigirana

Bonferronijevom korekcijom, m = 15, kako je opisano u Poglavlju 3.14.). Ustanovljeno je da postoji statistički značajna razlika u dobi između populacije muškaraca koji boluju od Crohnove bolesti (C_M) i populacija pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa obaju spolova (U_Ž, U_M; Slika 18). Budući da su ranija istraživanja pokazala da se određeni glikani mijenjaju s dobi,[58] a preliminarna analiza je pokazala da postoji razlika u dobnim skupinama ispitivanih populacija, u sljedećem koraku su ulazni podatci pročišćeni na način da su iz analize isključeni svi ispitanici čija dob je ≤ 27 godina, te ispitanici čija dob je ≥ 80 godina (Slika 18), kako bi se dobile populacije istog raspona godina. Pročišćene populacije nisu pokazale statistički značajnu razliku u dobi niti za jednu od 15 mogućih i uspoređenih kombinacija (Tablica 11). Na ovaj način je isključena mogućnost da su potencijalne razlike u glikozilaciji između tri ispitivane populacije zapravo posljedica razlike u godinama. Isto tako, budući da je jedino u populaciji pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa, a koja je ujedno i sadržavala najveći broj ispitanika, bio drugačiji udio žena i muškaraca u odnosu na populaciju pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i populaciju zdravih ispitanika, nasumično je prije analize isključeno 40 muškaraca koji boluju od ulceroznog kolitisa. Time je dobiven podjednak postotak žena u svakoj od tri ispitivane populacije (65,8 % pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti, 61,6 % pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa, te 68,6 % kontrolnih ispitanika, Tablica 12).



Slika 18. Usporedba dobi žena (Ž) i muškaraca (M) unutar svake analizirane populacije (pacijenti koji boluju od Crohnove bolesti – C, pacijenti koji boluju od ulceroznog kolitisa – U, te kontrolni ispitanici – K). Lijevo: početni nepročišćeni podatci. Sredina: pročišćeni podatci bez ispitanika čija dob je ≤ 27 godina i ≥ 80 godina, bez uzoraka onečišćenih celulozom te korigirani na udio žena i muškaraca. Desno: konačni pročišćeni podatci prije analize glikana IgG-a; ispitanici obaju spolova su zajedno analizirani. Skupine ispitanika koje se statistički značajno razlikuju po godinama označene su zvjezdicom. Mann-Whitneyjev U-test, p < 0,0033

Kako preliminarnom analizom nije ustanovljena statistički značajna razlika u dobi između žena i muškaraca u svakoj od skupina, a omjer broja ženskih i muških ispitanika je bio podjednak u sve tri populacije, ispitanici obaju spolova iz iste populacije su zajedno dalje

analizirani kao jedna skupina. U konačnici su nakon pročišćavanja podataka analizirani glikani od ukupno 471 pacijenta koji boluju od ulceroznog kolitisa, 228 pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti, te 105 kontrolnih zdravih ispitanika (ukupno 804 ispitanika, Tablica 12).

Tablica 11. Usporedba dobi žena (Ž) i muškaraca (M) unutar svake analizirane populacije (pacijenti koji boluju od Crohnove bolesti – C, pacijenti koji boluju od ulceroznog kolitisa – U, te kontrolni ispitanici – K) Mann-Whitneyjevim U-testom. Prikazane su *p* vrijednosti prije i nakon pročišćavanja podataka, te nakon zajedničke analize ispitanika obaju spolova nakon pročišćavanja podataka unutar svake populacije. Početni uzorci: *n* (C_Ž) = 184, *n* (C_M) = 104, *n* (U_Ž) = 335, *n* (U_M) = 225, *n* (K_Ž) = 79, *n* (K_M) = 45. Pročišćeni uzorci: *n* (C_Ž) = 150, *n* (C_M) = 78, *n* (U_Ž) = 290, *n* (U_M) = 181, *n* (K_Ž) = 72, *n* (K_M) = 33. Statistički značajnim se smatra *p* vrijednost < 0,0033 (označene podebljano). n. o. – nije određeno

Uspoređene skupine ispitanika	***p*, početni podatci**	***p*, pročišćeni podatci**
C_Ž, C_M	0,1151	0,3889
C_Ž, U_Ž	0,0854	0,9259
C_Ž, U_M	0,0046	0,0516
C_Ž, K_Ž	0,7204	0,4410
C_Ž, K_M	0,2010	0,8276
C_M, U_Ž	**0,0014**	0,2838
C_M, U_M	**0,0003**	0,0331
C_M, K_Ž	0,1865	0,7690
C_M, K_M	0,0252	0,3862
U_Ž, U_M	0,1714	0,0364
U_Ž, K_Ž	0,0913	0,3701
U_Ž, K_M	0,6801	0,8405
U_M, K_Ž	0,0064	0,0182
U_M, K_M	0,8237	0,3626
K_Ž, K_M	0,1735	0,5169
C, U	n. o.	0,1213
C, K	n. o.	0,9302
U, K	n. o.	0,1638

Tablica 12. Podatci o broju i dobi ispitanika obaju spolova unutar svake od triju ispitivanih populacija nakon pročišćavanja podataka, a prije analize glikana IgG-a. C - pacijenti koji boluju od Crohnove bolesti, U - pacijenti koji boluju od ulceroznog kolitisa, K - kontrolni ispitanici

	C	**U**	**K**
Ukupan broj ispitanika	228	471	105
Broj ženskih ispitanika	150	290	72
Broj muških ispitanika	78	181	33
Udio ženskih ispitanika, %	65,8	61,6	68,6
Udio muških ispitanika, %	34,2	38,4	31,4
Medijan dobi / god	48	50	47
Raspon dobi (min – maks) / god	28 do 79	28 do 79	29 do 79
Interkvartilni raspon dobi / god	37 do 60	40 do 61	37 do 57
Srednja vrijednost dobi / god	49,13	50,73	48,67
Standardna devijacija dobi / god	14,28	13,50	13,01

4.2.1. Zastupljenost *N*-glikanskih struktura IgG-a u upalnoj bolesti crijeva

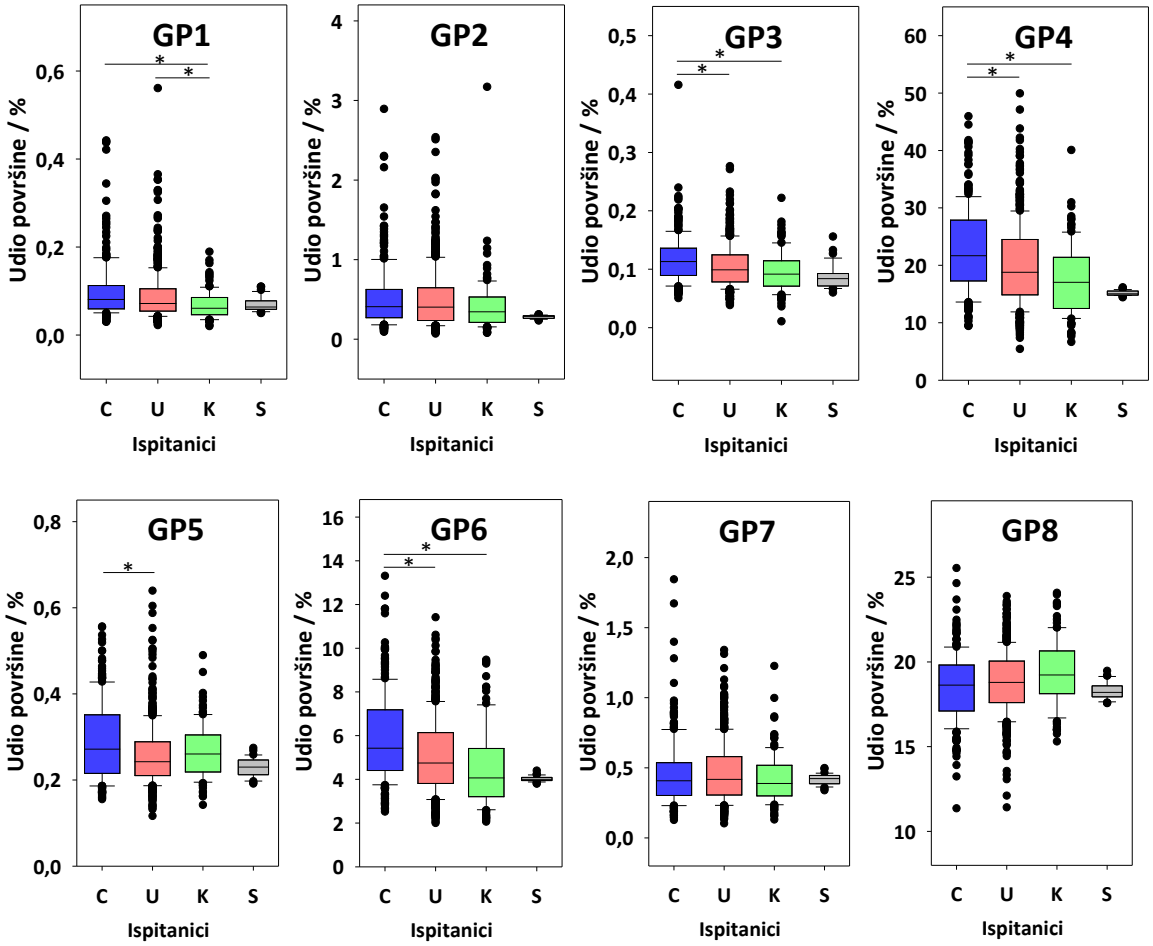
Cilj ovog istraživanja bio je analizirati glikozilaciju IgG-a u upalnoj bolesti crijeva. U tu svrhu glikani IgG-a pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti, pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa, te zdravih ispitanika analizirani su tekućinskom kromatografijom temeljenom na hidrofilnim interakcijama, te nakon pročišćavanja podataka međusobno uspoređeni. Udio koji svaki kromatografski glikanski pik IgG-a zauzima u ukupnom glikomu IgG-a u svakoj od triju analiziranih populacija prikazan je na Slikama 19 do 21, te je provedena statistička analiza kako bi se utvrdilo jesu li vidljive razlike statistički značajne. Svaki kromatografski pik (GP1 do GP24) uspoređen je neparametrijskim Mann-Whitneyjevim U-testom između pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i kontrolnih ispitanika, između pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa i kontrolnih ispitanika, te međusobno između pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa. S obzirom da se radi o ukupno (24 + 27) x 3 nulte hipoteze (za svaki od 24 kromatografska pika i 27 deriviranih svojstava po tri nulte hipoteze: C = K, U = K, te C = U), vrijednost *p* koja određuje statističku značajnost je s 0,05 korigirana na 0,0003, kako je opisano u Poglavlju 3.14. Osim udjela koji površina svakog

kromatografskog pika zauzima u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramima uzoraka unutar pojedine populacije pacijenata ili zdravih kontrola prikazani su i udjeli površine svakog pika u kromatogramima standarda koji su obrađeni kao i analizirani uzorci, te daju informaciju o varijabilnosti same metode priprave *N*-glikana IgG-a, od izolacije IgG-a iz seruma do analize metodom HILIC-UPLC.

Rezultati su pokazali da je udio negalaktoziliranih glikanskih struktura FA1 (GP1), A2B (GP3), FA2 (GP4), te FA2B (GP6) statistički značajno veći u Crohnovoj bolesti nego u zdravim kontrolnim ispitanicima, a udio glikanske strukture FA1 (GP1) i u pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa u odnosu na zdrave ispitanike (Slika 19, Tablica 13). Glikanske strukture A2B (GP3), FA2 (GP4), M5 (GP5), te FA2B (GP6) su pokazale statistički značajno veći udio u glikomu IgG-a pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti u odnosu na glikom IgG-a pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa. Na Slici 19 je vidljivo da strukture A2B (GP3), FA2 (GP4) i FA2B (GP6) isto tako imaju i veću zastupljenost u glikomu IgG-a pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa u odnosu na glikom IgG-a zdravih kontrolnih ispitanika, iako se ove promjene nisu pokazale statistički značajnima (p_{GP3} = 0,0111, p_{GP4} = 0,0012, p_{GP6} = 0,0011).

Nasuprot tome, fukozilirane digalaktozilirane strukture FA2G2 (GP14) i FA2BG2 (GP15) imaju statistički značajno manji udio u glikomu IgG-a pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti, u odnosu na glikom IgG-a zdravih ispitanika, a struktura FA2[3]G1 (GP9) statistički značajno manji udio u glikomu IgG-a pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa u odnosu na glikom IgG-a zdravih ispitanika. Fukozilirana monogalaktozilirana struktura FA2[6]G1 (GP8) je manje zastupljena u glikomu IgG-a pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti u odnosu na zdrave ispitanike, ali se ova razlika nije pokazala statistički značajnom (p_{GP8} = 0,0006). Iako su strukture FA2[6]G1 (GP8), FA2G2 (GP14) i FA2BG2 (GP15) manje zastupljene i u glikomu IgG-a pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa u odnosu na zdrave ispitanike, ova razlika se nije pokazala statistički značajnom (p_{GP8} = 0,0179, p_{GP14} = 0,0024, p_{GP15} = 0,0827, Slika 20, Tablica 13). Slično tome, struktura FA2[3]G1 (GP9) se nije pokazala statistički značajno manje zastupljenom u pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti u odnosu na zdrave ispitanike (p_{GP9} = 0,0012), iako njezin udio jest manji. Obje fukozilirane digalaktozilirane strukture FA2G2 (GP14) i FA2BG2 (GP15) su statistički značajno manje zastupljene u glikomu IgG-a pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti u usporedbi s glikomom IgG-a pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa. Fukozilirana

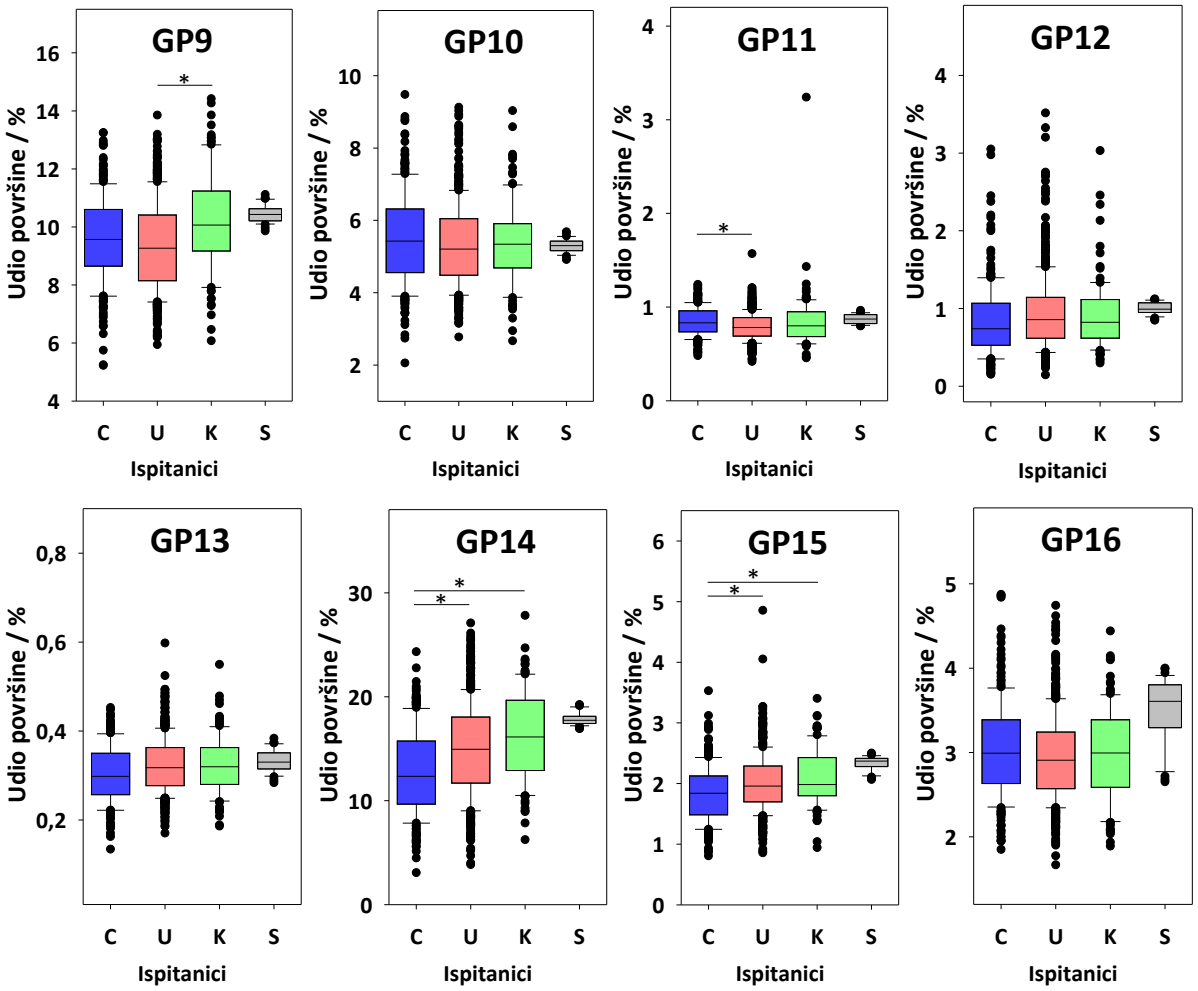
monogalaktozilirana struktura s račvajućim GlcNAc-om, FA2[3]BG1 (GP11) je statistički značajno zastupljenija u glikomu IgG-a pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti u odnosu na glikom IgG-a pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa (p_{GP11} < 0,0001).



Slika 19. Usporedba udjela površine kromatografskih pikova glikana (GP1 do GP8) IgG-a u ukupnoj površini svih pikova između pojedinih skupina ispitanika. Skupine ispitanika koje se međusobno statistički značajno razlikuju po udjelu površine svakog od kromatografskih pikova označene su zvjezdicom. Mann-Whitneyjev U-test, p < 0,0003. C - pacijenti koji boluju od Crohnove bolesti, n = 228; U - pacijenti koji boluju od ulceroznog kolitisa, n = 471; K - kontrolni ispitanici, n = 105. Prikazana je i varijacija udjela površine pojedinih kromatografskih pikova u kromatogramima standarda (S) koji su pripravljeni iz plazme zajedno s uzorcima (n = 36), po tri standarda na svakoj od 12 pločica uzoraka

Fukozilirane monosijalinizirane glikoforme bez i s račvajućim GlcNAc-om, FA2G2S1 (GP18) i FA2BG2S1 (GP19), kao i fukozilirane galaktozilirane forme (GP14 i GP15), imaju statistički značajno (p_{GP18} < 0,0001) i granično statistički značajno (p_{GP19} = 0,0003) manji udio u glikomu IgG-a pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti u odnosu na glikom IgG-a zdravih ispitanika, te isto tako statistički značajno manju zastupljenost kod pacijenata koji

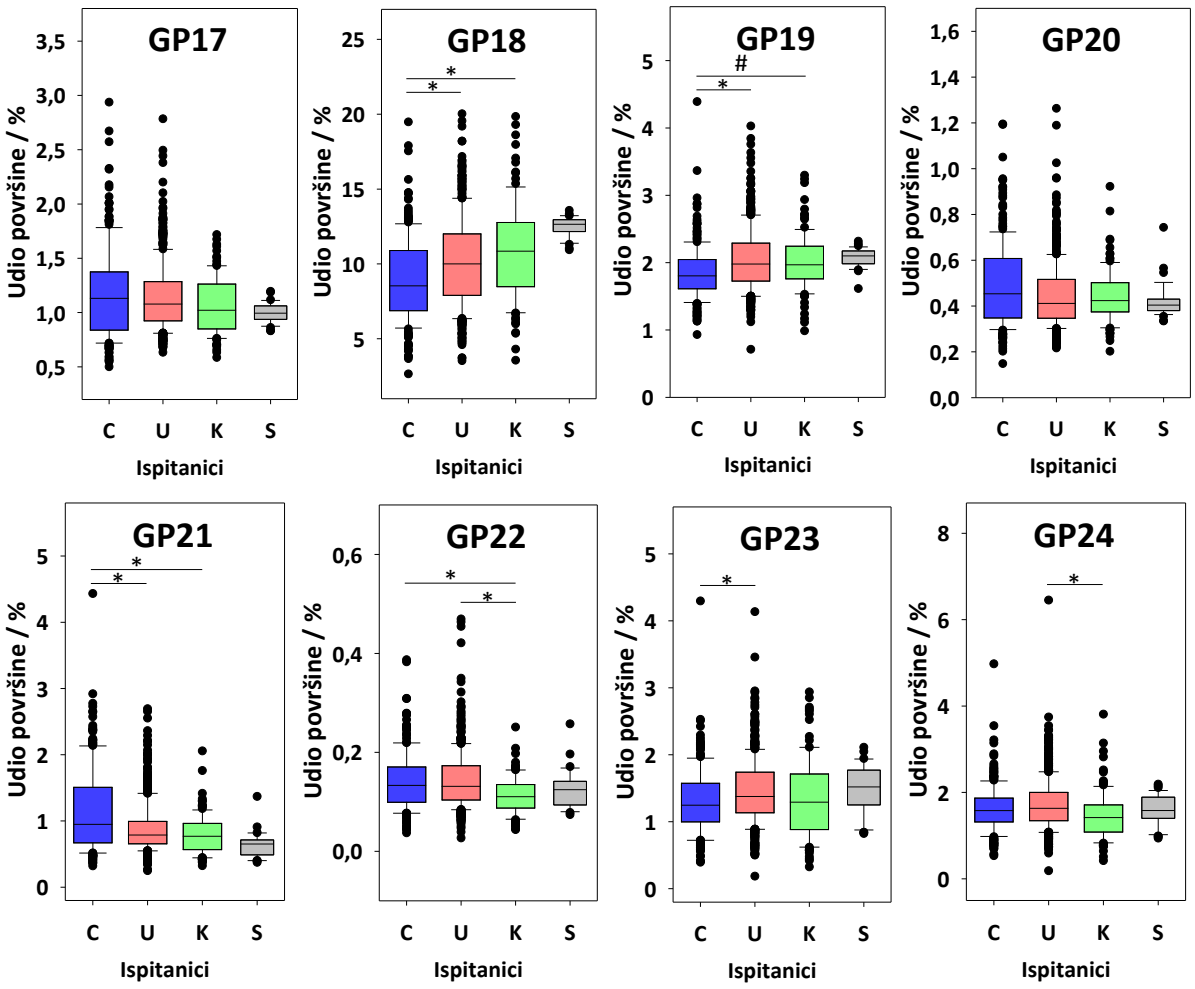
boluju od Crohnove bolesti u usporedbi s pacijentima koji boluju od ulceroznog kolitisa (p_{GP18} < 0,0001, p_{GP19} < 0,0001; Slika 21, Tablica 13).



Slika 20. Usporedba udjela površine kromatografskih pikova glikana (GP9 do GP16) IgG-a u ukupnoj površini svih pikova između pojedinih skupina ispitanika. Skupine ispitanika koje se međusobno statistički značajno razlikuju po udjelu površine svakog od kromatografskih pikova označene su zvjezdicom. Mann-Whitneyjev U-test, p < 0,0003. C - pacijenti koji boluju od Crohnove bolesti, n = 228; U - pacijenti koji boluju od ulceroznog kolitisa, n = 471; K - kontrolni ispitanici, n = 105. Prikazana je i varijacija udjela površine pojedinih kromatografskih pikova u kromatogramima standarda (S) koji su pripravljeni iz plazme zajedno s uzorcima (n = 36), po tri standarda na svakoj od 12 pločica uzoraka

Disijalinizirane glikoforme bez i s račvajućim GlcNAc-om, A2G2S2 (GP21) i A2BG2S2 (GP22) su statistički značajno zastupljenije u glikomu IgG-a pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti u odnosu na glikom IgG-a zdravih ispitanika (p_{GP21} < 0,0001, p_{GP22} < 0,0001; Slika 21, Tablica 13), a glikoforma A2G2S2 (GP21) je statistički značajno zastupljenija i u glikomu IgG-a pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti u odnosu na pacijente koji boluju od ulceroznog kolitisa (p_{GP21} < 0,0001). Nasuprot tome, disijalinizirane

glikoforme s račvajućim GlcNAc-om i to bez i sa sržnom fukozom, A2BG2S2 (GP22) i FA2BG2S2 (GP24), su statistički značajno zastupljenije u glikomu IgG-a pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa u odnosu na zdrave ispitanike ($p_{GP22} < 0{,}0001$, $p_{GP24} < 0{,}0001$; Slika 21, Tablica 13). Uočena je i statistički značajno veća zastupljenost fukozilirane disijalinizirane glikoforme FA2G2S2 (GP23) u glikomu IgG-a pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa u odnosu na glikom pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti ($p_{GP23} = 0{,}0001$; Slika 21, Tablica 13).



Slika 21. Usporedba udjela površine kromatografskih pikova glikana (GP17 do GP24) IgG-a u ukupnoj površini svih pikova između pojedinih skupina ispitanika. Skupine ispitanika koje se međusobno statistički značajno razlikuju po udjelu površine svakog od kromatografskih pikova označene su zvjezdicom. Mann-Whitneyjev U-test, $p < 0{,}0003$. # - granična vrijednost statističke značajnosti, $p = 0{,}0003$. C - pacijenti koji boluju od Crohnove bolesti, $n = 228$; U - pacijenti koji boluju od ulceroznog kolitisa, $n = 471$; K - kontrolni ispitanici, $n = 105$. Prikazana je i varijacija udjela površine pojedinih kromatografskih pikova u kromatogramima standarda (S) koji su pripravljeni iz plazme zajedno s uzorcima ($n = 36$), po tri standarda na svakoj od 12 pločica uzoraka

Tablica 13. Usporedba medijana udjela površine koju zauzima svaki kromatografski pik glikana (GP1 do GP24) IgG-a u ukupnoj površini svih pikova između pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i kontrolnih ispitanika (C i K), između pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa i kontrolnih ispitanika (U i K), te između pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa (C i U) Mann-Whitneyjevim U-testom. Prikazane su *p* vrijednosti. Statistički značajnim se smatra *p* vrijednost < 0,0003 (označene podebljano). Granična vrijednost statističke značajnosti, *p* = 0,0003, označena je kosim slovima. *n* (C) = 228, *n* (U) = 471, *n* (K) = 105

Kromatografski pik	C i K	U i K	C i U
GP1	< **0,0001**	< **0,0001**	0,0075
GP2	0,0092	0,0189	0,5656
GP3	< **0,0001**	0,0111	**0,0001**
GP4	< **0,0001**	0,0012	< **0,0001**
GP5	0,1202	0,0807	< **0,0001**
GP6	< **0,0001**	0,0011	< **0,0001**
GP7	0,5652	0,1537	0,3123
GP8	0,0006	0,0179	0,0316
GP9	0,0012	< **0,0001**	0,0237
GP10	0,4024	0,5525	0,0694
GP11	0,1968	0,1035	< **0,0001**
GP12	0,0780	0,6003	0,0021
GP13	0,0177	0,9122	0,0011
GP14	< **0,0001**	0,0024	< **0,0001**
GP15	< **0,0001**	0,0827	< **0,0001**
GP16	0,9234	0,2121	0,0679
GP17	0,0505	0,0299	0,5698
GP18	< **0,0001**	0,0354	< **0,0001**
GP19	*0,0003*	0,6569	< **0,0001**
GP20	0,1657	0,4163	0,0135
GP21	< **0,0001**	0,0873	< **0,0001**
GP22	< **0,0001**	< **0,0001**	0,7635
GP23	0,7758	0,0430	**0,0001**
GP24	0,0025	< **0,0001**	0,0580

Važno je naglasiti da je varijacija udjela disijaliniziranih glikanskih pikova GP21 do GP24 u kromatogramima standarda gotovo na razini varijacije barem kod jedne od ispitivanih populacija (Slika 21), što znači da uočene razlike u zastupljenosti navedenih kromatografskih

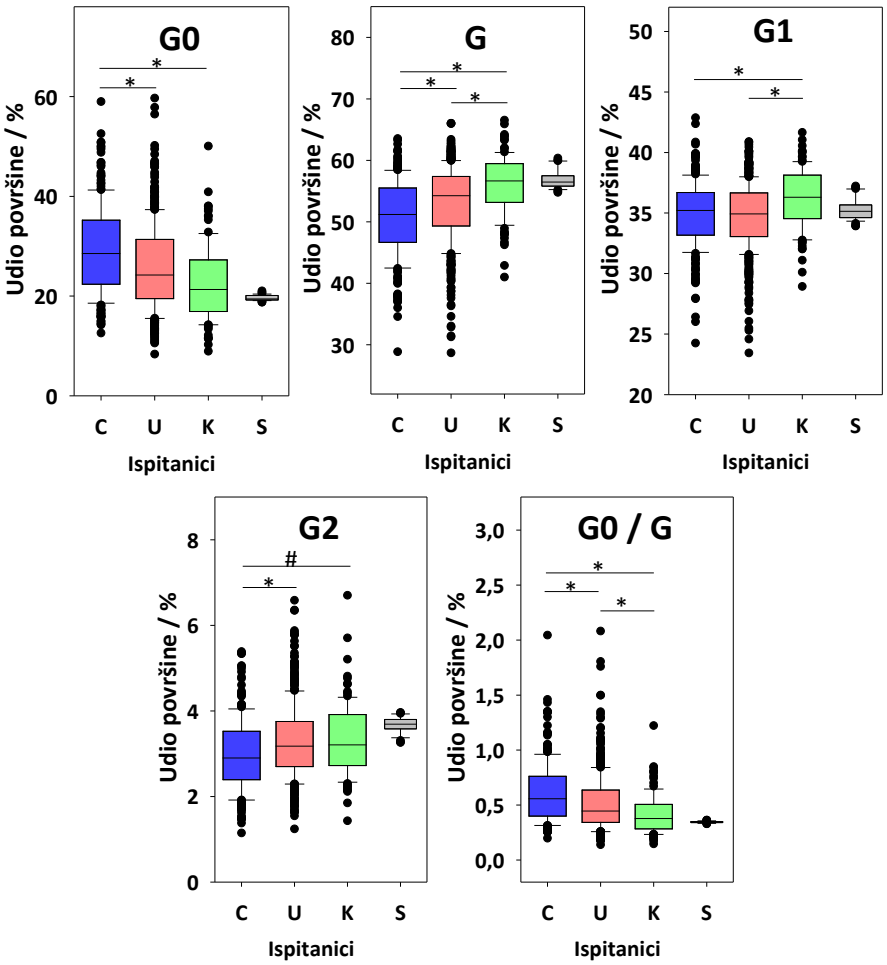
pikova možda nisu rezultat stvarnih razlika između glikoma IgG-a pacijenata i zdravih ispitanika, nego rezultat povećane varijacije koju unosi sama metoda (vidi Poglavlje 4.3. Nedostatci metode).

4.2.2. Zastupljenost skupina strukturno sličnih *N*-glikana IgG-a u upalnoj bolesti crijeva

Kako bi se analizirala glikozilacija IgG-a u upalnoj bolesti crijeva ne samo na razini pojedinačnih kromatografskih pikova, nego na razini strukturno sličnih glikanskih skupina, izračunato je ukupno 27 deriviranih parametara, odnosno udjela površine koju određeni glikani slične strukture zauzimaju u ukupnom glikomu IgG-a, prema formulama navedenim u Poglavlju 3.11.1. Kao i za pojedinačne kromatografske pikove provedena je statistička analiza kako bi se utvrdilo postoje li statistički značajne razlike u zastupljenosti pojedinih parametara između pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i zdravih ispitanika, pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa i zdravih ispitanika, te pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa. Proveden je Mann-Whitneyjev U-test s vrijednošću p korigiranom na 0,0003, s obzirom da se radi o ukupno (24 + 27) x 3 nulte hipoteze (za svaki od 24 kromatografska pika i svaki od 27 deriviranih parametara po tri nulte hipoteze: C = K, U = K, te C = U), kako je opisano u Poglavlju 3.14.

Rezultati su pokazali da su negalaktozilirane glikoforme statistički značajno zastupljenije kod pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti u odnosu na zdrave ispitanike, i u odnosu na pacijente koji boluju od ulceronzog kolitisa ($p < 0,0001$ u oba slučaja, Tablica 14). Iako je uočena zastupljenija količina negalaktoziliranih glikoformi IgG-a i kod pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa u odnosu na zdrave ispitanike, ova razlika se nije pokazala statistički značajnom ($p = 0,0005$, Tablica 14). Suprotno od toga, sve galaktozilirane glikoforme su statistički značajno manje zastupljene u IgG-u pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti ili ulceroznog kolitisa u odnosu na zdrave ispitanike, te u IgG-u pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti u odnosu na pacijente koji boluju od ulceroznog kolitisa ($p < 0,0001$ u sva tri slučaja, Tablica 14). Zanimljivo je da pacijenti koji boluju od upalne bolesti crijeva imaju statistički značajno smanjenu razinu monogalaktoziliranih glikoformi u odnosu na zdrave ispitanike, dok se zastupljenost monogalaktoziliranih formi ne razlikuje u IgG-u pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti u odnosu na pacijente koji boluju od ulceroznog kolitisa. Ova dva oblika bolesti se međusobno statistički značajno razlikuju po zastupljenosti digalaktoziliranih glikoformi, koja je znatno niža kod pacijenata koji boluju od Crohnove

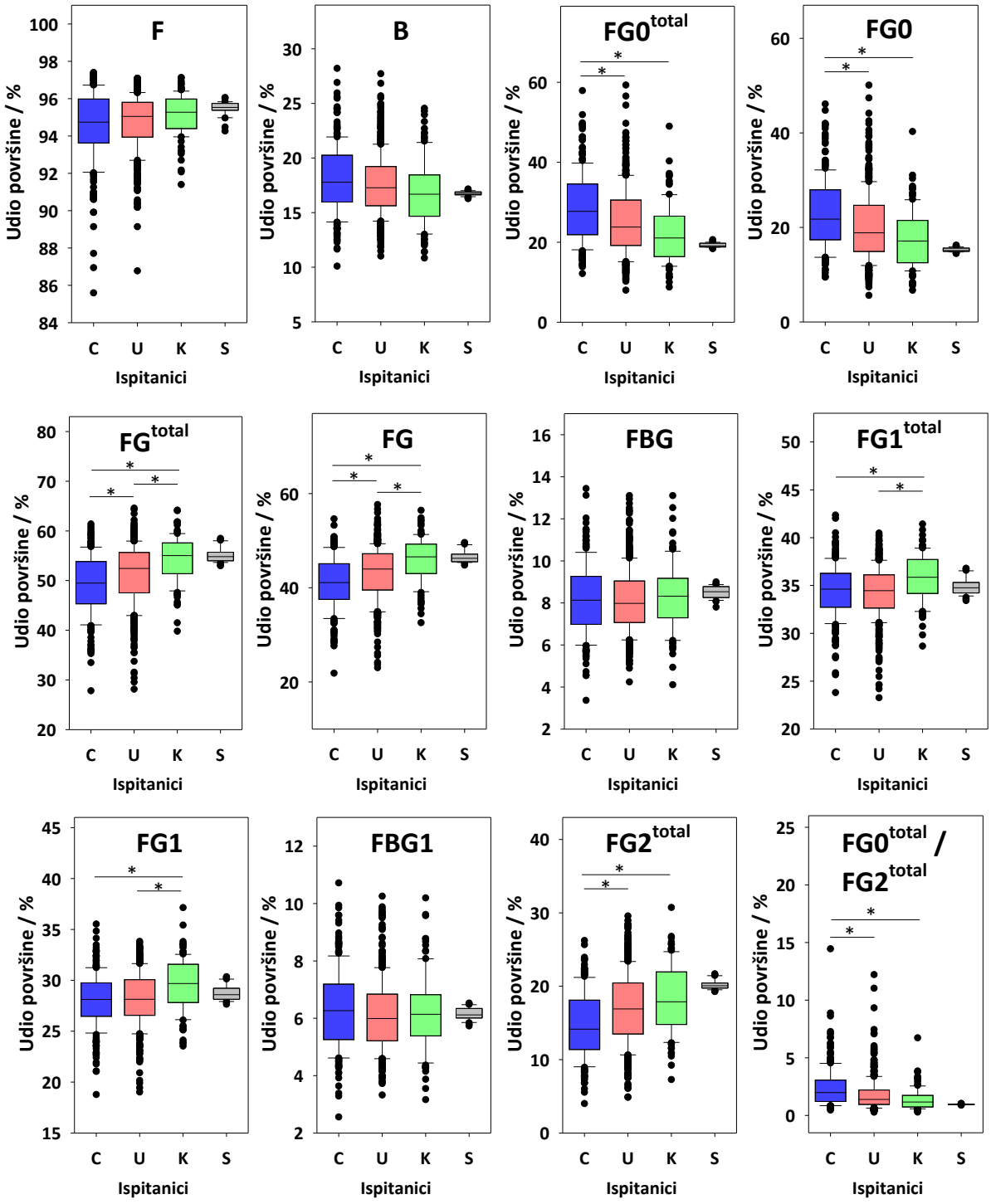
bolesti u odnosu na pacijente koji boluju od ulceroznog kolitisa. S obzirom na navedeno, bilo je za očekivati da će se omjer negalaktoziliranih (G0) i galaktoziliranih (G) glikoformi IgG-a razlikovati kod pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva i kontrolnih zdravih ispitanika, što su rezultati i potvrdili, te je uočen statistički značajno povećan omjer G0/G kod pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti ili ulceroznog kolitisa u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike, te isto tako povećan omjer G0/G kod pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti u odnosu na pacijente koji boluju od ulceroznog kolitisa (Slika 22, Tablica 14).



Slika 22. Usporedba udjela površine pikova negalaktoziliranih i galaktoziliranih glikana IgG-a u ukupnoj površini svih pikova između pojedinih skupina ispitanika. G0 – negalaktozilirane strukture, G – sve galaktozilirane strukture, G1 – monogalaktozilirane strukture, G2 – digalaktozilirane strukture. Skupine ispitanika koje se međusobno statistički značajno razlikuju po udjelu površine svakog deriviranog parametra označene su zvjezdicom. Mann-Whitneyjev U-test, $p < 0{,}0003$. # - granična vrijednost statističke značajnosti, $p = 0{,}0003$. C - pacijenti koji boluju od Crohnove bolesti, $n = 228$; U - pacijenti koji boluju od ulceroznog kolitisa, $n = 471$; K - kontrolni ispitanici, $n = 105$. Prikazana je i varijacija udjela površine svakog deriviranog parametra u kromatogramima standarda (S) koji su pripravljeni iz plazme zajedno s uzorcima ($n = 36$), po tri standarda na svakoj od 12 pločica uzoraka

Razina svih fukoziliranih glikoformi nije se pokazala značajno različitom niti u jednoj skupini pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva u odnosu na zdrave ispitanike, dok fukozilirane negalaktozilirane glikoforme s i bez račvajućeg GlcNAc-a ($FG0^{total}$), te bez račvajućeg GlcNAc-a (FG0) prate isti trend kao u slučaju analize negalaktoziliranih glikoformi (G0) – statistički su značajno zastupljenije u IgG-u pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti u odnosu na zdrave ispitanike, te u odnosu na pacijente koji boluju od ulceroznog kolitisa. Razlog tome leži u činjenici da je najzastupljenija negalaktozilirana glikoforma (kromatografski pik GP4), ujedno i fukozilirana (glikanska struktura FA2). Slična situacija je i s fukoziliranim galaktoziliranim glikoformama (FG^{total}, FG), koje također prate trend svih galaktoziliranih struktura koje su statistički značajno manje zastupljene u IgG-u pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa u odnosu na zdrave ispitanike, te u IgG-u pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti u odnosu na pacijente koji boluju od ulceroznog kolitisa.

Fukozilirane monogalaktozilirane glikoforme ($FG1^{total}$, FG1) su podjednako zastupljene u IgG-u obje skupine pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva, te statistički značajno manje zastupljene u odnosu na zdrave ispitanike, dok su fukozilirane digalaktozilirane glikoforme s i bez račvajućeg GlcNAc-a ($FG2^{total}$), statistički značajno manje zastupljene u IgG-u pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti u odnosu na one koji boluju od ulceroznog kolitisa, te u odnosu na zdrave ispitanike. Za razliku od omjera G0/G koji se statistički značajno razlikuje između svih triju skupina ispitanika, omjer fukoziliranih negalaktoziliranih i fukoziliranih digalaktoziliranih glikoformi ($FG0^{total}/FG2^{total}$) se statistički značajno razlikuje između IgG-a pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i zdravih ispitanika, odnosno pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa, ali ne i između IgG-a pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa te zdravih ispitanika (Slika 23).

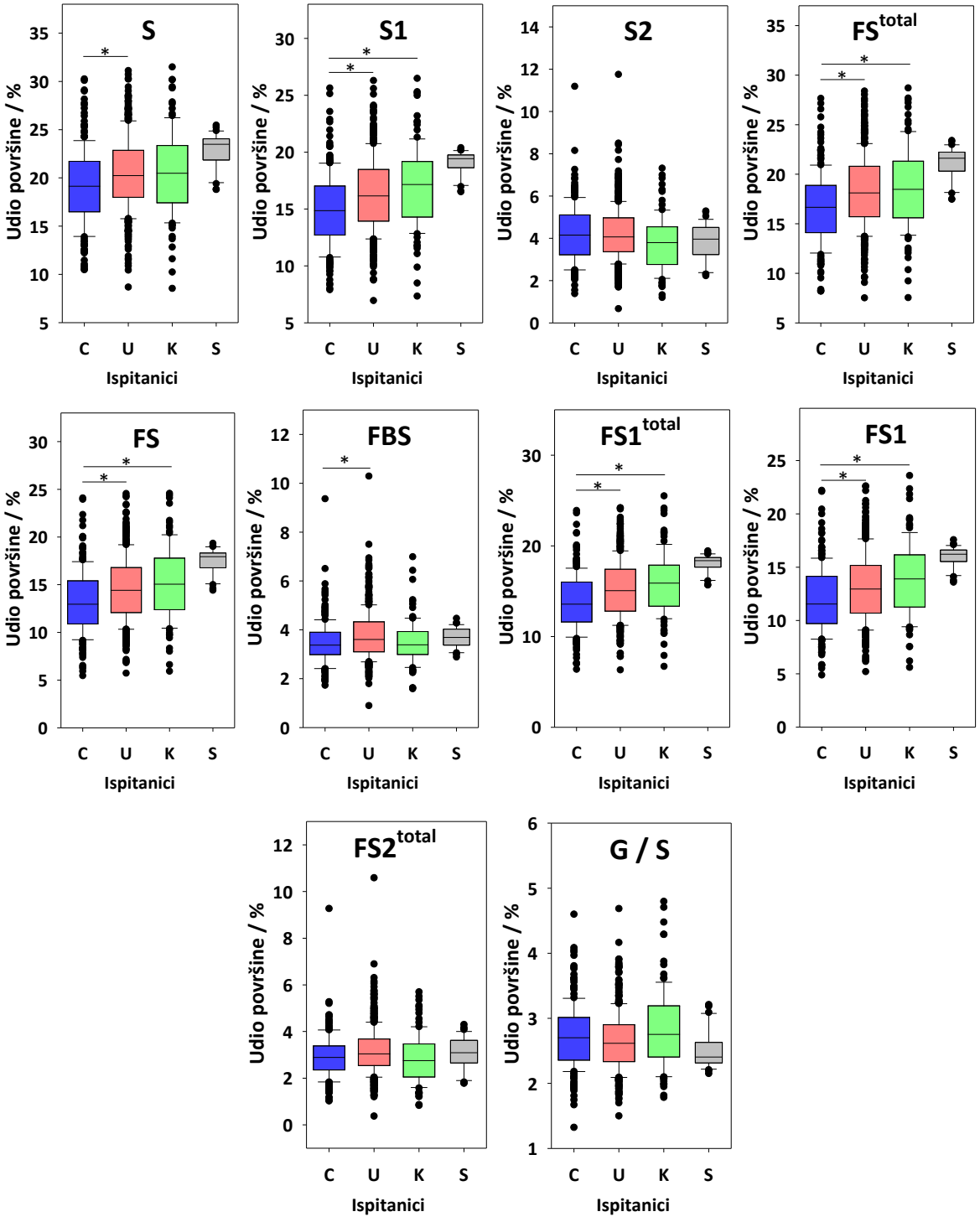


Slika 23. Usporedba udjela površine pikova fukoziliranih negalaktoziliranih i galaktoziliranih glikana IgG-a s i bez račvajućeg GlcNAc-a u ukupnoj površini svih pikova između pojedinih skupina ispitanika. Skupine ispitanika koje se međusobno statistički značajno razlikuju po udjelu površine svakog deriviranog parametra označene su zvjezdicom. Mann-Whitneyjev U-test, $p < 0{,}0003$. F – fukozilirane strukture, G0 – negalaktozilirane strukture, G – sve galaktozilirane strukture, G1 – monogalaktozilirane strukture, G2 – digalaktozilirane strukture, ^{total} – strukture s i bez račvajućeg GlcNAc-a, B – samo strukture s račvajućim GlcNAc-om. C - pacijenti koji boluju od Crohnove bolesti, $n = 228$; U - pacijenti koji boluju od ulceroznog kolitisa, $n = 471$; K - kontrolni ispitanici, $n = 105$. Prikazana je i varijacija udjela površine svakog deriviranog parametra u kromatogramima standarda (S) koji su pripravljeni iz plazme zajedno s uzorcima ($n = 36$), po tri standarda na svakoj od 12 pločica uzoraka

Rezultati su pokazali da je račvajući GlcNAc općenito zastupljeniji u glikoformama IgG-a pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti u odnosu na IgG pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa te u odnosu na IgG zdravih ispitanika. Međutim, ove razlike se nisu pokazale statistički značajnima ($p_{C\,i\,K}$ = 0,0008, $p_{U\,i\,K}$ = 0,0282, $p_{C\,i\,U}$ = 0,0215). Usporedbom pojedinačnih skupina koje sadrže račvajući GlcNAc, npr. svih fukoziliranih galaktoziliranih glikoformi (FBG), fukoziliranih monogalaktoziliranih glikoformi (FBG1), te svih fukoziliranih sijaliniziranih glikoformi (FBS) u IgG-u pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva i zdravih ispitanika, jedino je u slučaju FBS glikoformi uočena statistički značajno manja zastupljenost kod pacijenata koji boluju od Chronove bolesti u odnosu na pacijente koji boluju od ulceroznog kolitisa. Za ostale glikoforme (FBG i FBG1) ne uočava se određeni trend manje ili veće zastupljenosti u nekoj od ispitivanih skupina (Slike 23 i 24, Tablica 14).

Analizom sijaliniziranih glikoformi IgG-a ustanovljeno je da su ukupne sijalinizirane glikoforme IgG-a statistički značajno manje zastupljene kod pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti u odnosu na pacijente koji boluju od ulceroznog kolitisa. Daljnjom analizom monosijaliniziranih i disijaliniziranih glikoformi uočeno je da se disijalinizirane glikoforme iako nešto zastupljenije u IgG-u pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva u odnosu na zdrave ispitanike, statistički značajno ne razlikuju usporedbom bilo koje dvije skupine ispitanika. Nasuprot tome, sve monosijalinizirane glikoforme IgG-a su statistički značajno manje zastupljene u IgG-u pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti u odnosu na IgG zdravih kontrolnih ispitanika, te isto tako i u odnosu na IgG pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa. Isti trend uočen je i za sve fukozilirane sijalinizirane glikoforme i fukozilirane monosijalinizirane glikoforme s i bez račvajućeg GlcNAc-a (FS^{total}, $FS1^{total}$), te za fukozilirane sijalinizirane i fukozilirane monosijalinizirane glikoforme bez račvajućeg GlcNAc-a (FS, FS1) (Slika 24, Tablica 14).

Budući da se samo galaktozilirani glikani mogu sijalinizirati, uspoređen je omjer galaktoziliranih i sijaliniziranih glikana (G/S) u sve tri populacije ispitanika, kako bi se utvrdilo postoji li razlika u zastupljenosti galaktoziliranih nesijaliniziranih i galaktoziliranih sijaliniziranih glikoformi. Nije uočena statistički značajna razlika u omjeru galaktoziliranih nesijaliniziranih i galaktoziliranih sijaliniziranih glikoformi između bilo koje dvije ispitivane populacije (Slika 24, Tablica 14).



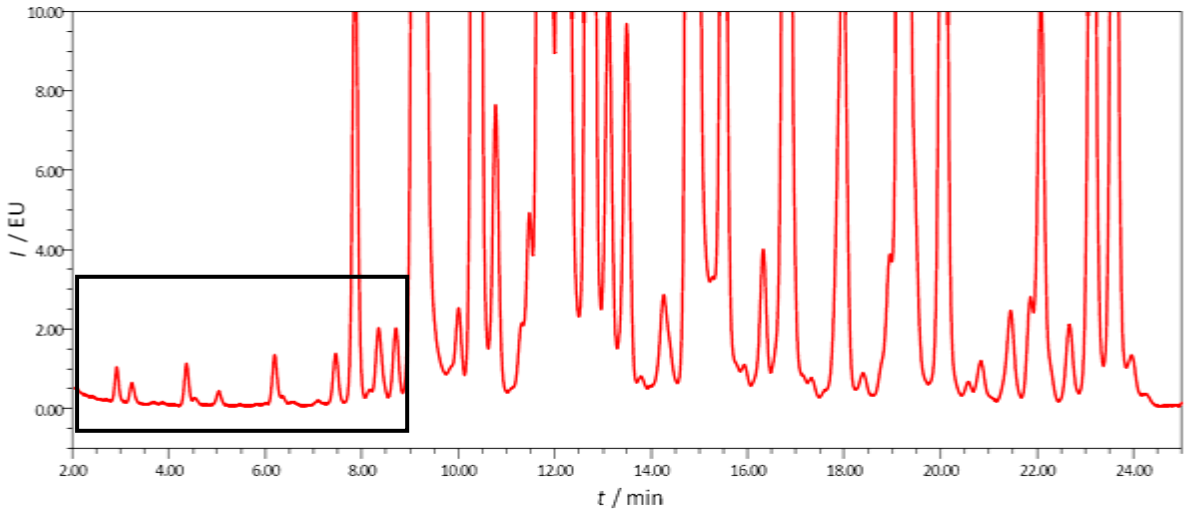
Slika 24. Usporedba udjela površine pikova fukoziliranih i nefukoziliranih sijaliniziranih glikani IgG-a s i bez račvajućeg GlcNAc-a u ukupnoj površini svih pikova između pojedinih skupina ispitanika. Skupine ispitanika koje se međusobno statistički značajno razlikuju po udjelu površine svakog deriviranog parametra označene su zvjezdicom. Mann-Whitneyjev U-test, $p < 0{,}0003$. F – fukozilirane strukture, S – sve sijalinizirane strukture, S1 – monosijalinzirane strukture, S2 – disijalinizirane strukture, ^{total} – strukture s i bez račvajućeg GlcNAc-a, B – samo strukture s račvajućim GlcNAc-om, G – sve galaktozilirane nesijalinizirane strukture. C - pacijenti koji boluju od Crohnove bolesti, $n = 228$; U - pacijenti koji boluju od ulceroznog kolitisa, $n = 471$; K - kontrolni ispitanici, $n = 105$. Prikazana je i varijacija udjela površine svakog deriviranog parametra u kromatogramima standarda (S) koji su pripravljeni iz plazme zajedno s uzorcima ($n = 36$), po tri standarda na svakoj od 12 pločica uzoraka

Tablica 14. Usporedba medijana udjela površine pikova pojedinih deriviranih parametara IgG-a u ukupnoj površini svih pikova između pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i kontrolnih ispitanika (C i K), između pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa i kontrolnih ispitanika (U i K), te između pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa (C i U) Mann-Whitneyjevim U-testom. Prikazane su *p* vrijednosti. Statistički značajnim se smatra *p* vrijednost < 0,0003 (označene podebljano). Granična vrijednost statističke značajnosti, *p* = 0,0003, označena je kosim slovima. Opis deriviranih parametara naveden je u **Tablici 6**. *n* (C) = 228, *n* (U) = 471, *n* (K) = 105

Derivirani parametar	C i K	U i K	C i U
G0	< **0,0001**	0,0005	< **0,0001**
G	< **0,0001**	< **0,0001**	< **0,0001**
G1	< **0,0001**	< **0,0001**	0,6338
G2	*0,0003*	0,4724	< **0,0001**
F	0,0133	0,0513	0,2081
B	0,0008	0,0282	0,0215
S	0,002	0,6611	< **0,0001**
S1	< **0,0001**	0,0721	< **0,0001**
S2	0,0028	0,0006	0,8913
$FG0^{total}$	< **0,0001**	0,0006	< **0,0001**
FG0	< **0,0001**	0,0012	< **0,0001**
$FG1^{total}$	< **0,0001**	< **0,0001**	0,6042
FG1	< **0,0001**	< **0,0001**	0,779
FBG1	0,3888	0,4012	0,0263
$FG2^{total}$	< **0,0001**	0,0031	< **0,0001**
FG^{total}	< **0,0001**	< **0,0001**	< **0,0001**
FG	< **0,0001**	< **0,0001**	< **0,0001**
FBG	0,5237	0,2238	0,5728
$FS1^{total}$	< **0,0001**	0,0463	< **0,0001**
FS1	< **0,0001**	0,033	< **0,0001**
$FS2^{total}$	0,2117	0,0009	0,0026
FS^{total}	< **0,0001**	0,3806	< **0,0001**
FS	< **0,0001**	0,0908	< **0,0001**
FBS	0,9976	0,0053	**0,0002**
G0 / G	< **0,0001**	**0,0001**	< **0,0001**
$FG0^{total}$ / $FG2^{total}$	< **0,0001**	0,0012	< **0,0001**
G / S	0,3196	0,0116	0,0367

4.3. Nedostatci metode korištene za pripravu glikana IgG-a za analizu kod upalne bolesti crijeva

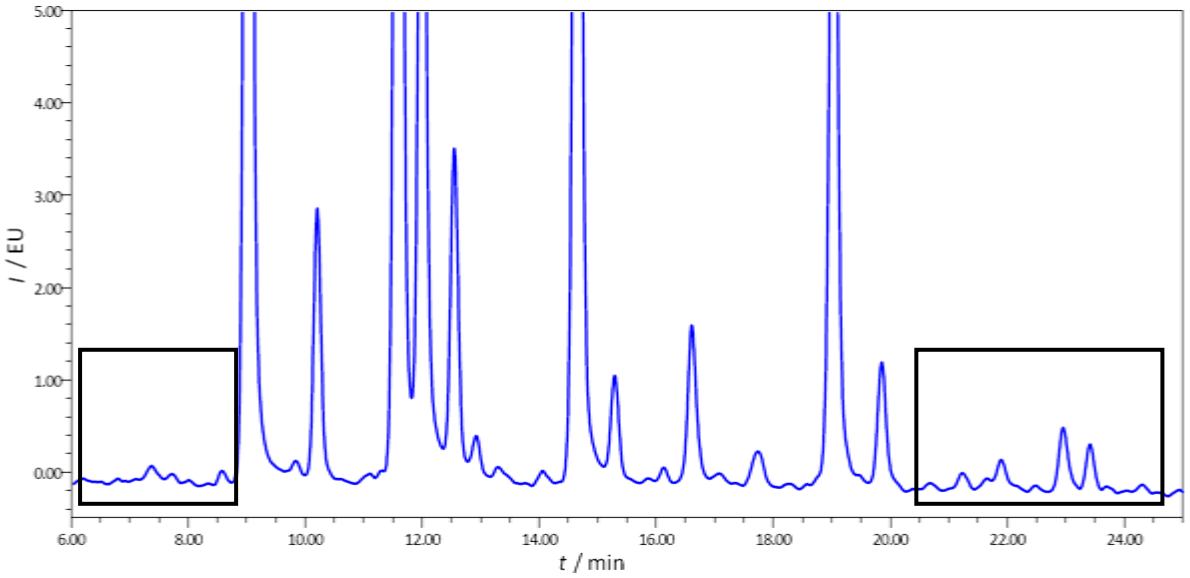
Prilikom analize fluorescentno obilježenih glikana IgG-a kod upalne bolesti crijeva uočeni su određeni problemi koji se nisu pojavljivali prilikom analize manjeg broja uzoraka upotrebom iste metode deglikozilacije, obilježavanja fluorescentnom bojom i pročišćavanja obilježenih glikana. Primjerice, u nekim kromatogramima povremeno su uočeni pikovi koji su pripisani kontaminaciji fluorescentno obilježenim ostatcima celuloze koja je korištena kao čvrsta faza prilikom pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana (Slika 25). Budući da se navedeni pikovi pojavljuju periodično, vrlo vjerojatno se protežu i kroz ostatak kromatograma te povisuju intenzitet pojedinih pikova, i tako utječu na konačni rezultat kvantifikacije pojedinih glikanskih struktura.



Slika 25. Kromatogram uzorka kontaminiranog fluorescentno obilježenim ostatcima celuloze. Uzorak je pripravljen u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analiziran uz linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 µL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije

U pojedinim kromatogramima su pikovi spojeva koji rano i/ili kasno eluiraju s kolone bili izrazito mali, čak i u slučaju uzoraka relativno visokih intenziteta ostalih pikova. S obzirom da se u slučaju „gubitka“ zadnjih pikova radi o sijaliniziranim glikanima (ponajviše GP23 i GP24, Slika 10 i 26), za koje je poznato da su osjetljivi na promjenu eksperimentalnih uvjeta kao što su pH[80] i temperatura,[47] pri čemu se sijalinska kiselina odcjepljuje s glikana, pretpostavljeno je da tako mali pikovi sijaliniziranih glikoformi najvjerojatnije nisu odraz

njihove varijacije u analiziranoj populaciji, nego su rezultat malih varijacija u korištenoj metodi priprave glikana.

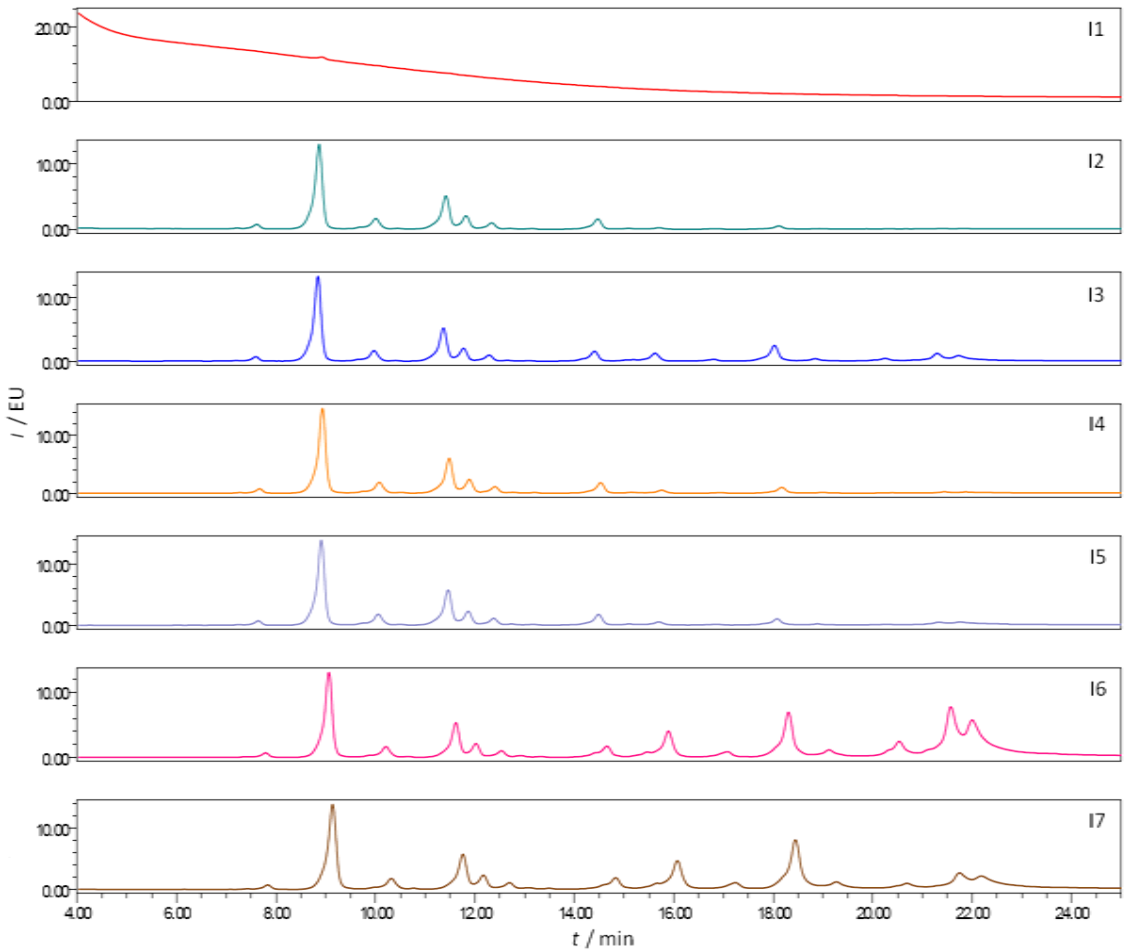


Slika 26. Nedostatak i slaba zastupljenost glikoformi koje rano i kasno eluiraju s kolone tijekom kromatografske analize (označeno pravokutnikom). Uzorak je pripravljen u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analiziran uz linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 µL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije

Budući da se deglikozilacija i fluorescentno obilježavanje slobodnih glikana IgG-a odvijaju jedno iza drugog, te je pročišćavanje glikana nakon njihovog fluorescentnog obilježavanja prvi korak u metodi priprave gdje se 2-AB obilježeni glikani ispiru od suviška reagensa, taj se korak nametnuo kao najvjerojatniji za gore navedeni gubitak glikana. U kojoj mjeri dolazi do gubitka glikana u svakom od koraka ispiranja suviška reagensa prilikom njihova pročišćavanja na celulozi uz 80 %-tni acetonitril u vodi ispitano je na način da su skupljeni i analiziranai pojedini ispirci. Nakon sušenja u vakuum centrifugi, svakom uzorku je uz miješanje dodano 200 µL ultra čiste vode, nakon čega su uzorci analizirani metodom HILIC-UPLC kako je to opisano u Poglavlju 3.11. Za analizu je korištena stara kolona budući da su uzorci sadržavali suvišak svih reagensa korištenih u prethodnim postupcima deglikozilacije i fluorescentnog obilježavanja glikana, proteinski ostatak IgG-a, te neobilježene glikane, dakle sve ono čega se prije uobičajene kromatografske analize postupkom pročišćavanja želimo riješiti. S obzirom na navedeno, naglasak nije na simetričnosti pikova i njihovom kvalitetnom razdvajanju nego na njihovoj zastupljenosti u pojedinim frakcijama ispiranja. Rezultati su pokazali ne samo značajan gubitak fluorescentno obilježenih glikana u svakom od ispiranja,

nego je taj gubitak neravnomjeran, te se u prvih nekoliko ispiranja gube uglavnom neutralni glikani, a u kasnijim ispiranjima i sijalinizirani glikani (Slika 27).

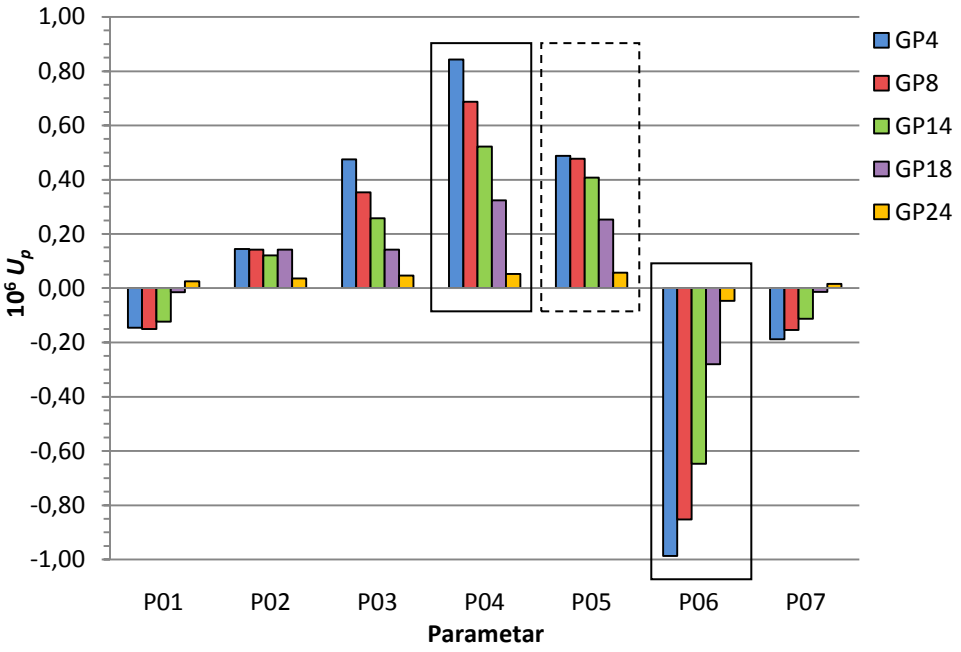
Navedeni nedostatci korištene metode za pripravu glikana IgG-a za analizu tekućinskom kromatografijom umanjuju njezinu moć razlučivanja manjih bioloških razlika među ispitivanim uzorcima, te omogućavaju praćenje samo izrazitijih promjena u glikanskom profilu, koje su veće od varijacije koju unosi sama metoda. U svrhu dobivanja pouzdanijih rezultata, potrebno je prema tome razviti bolju metodu koja će biti robusnija i omogućiti detekciju manjih promjena u glikanskom profilu. Ostatak istraživanja u sklopu ove doktorske disertacije se stoga bavi razvojem, optimizacijom i validacijom učinkovitije metode priprave glikana za analizu tekućinskom kromatografijom, koja će se u budućnosti koristiti za analizu uzoraka.



Slika 27. Gubitak fluorescentno obilježenih glikana u pojedinim koracima ispiranja (I1-I7) prilikom njihova pročišćavanja na celulozi (0,1 mg mL^{-1}) uz 80 %-tni acetonitril u vodi. Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani uz linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 µL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije

4.4. Robusnost metode korištene za pripravu glikana IgG-a za analizu kod upalne bolesti crijeva

S obzirom na prethodno navedene nedostatke metode priprave glikana IgG-a za analizu tekućinskom kromatografijom, željelo se ispitati koliko je zaista robusna korištena metoda, odnosno koji eksperimentalni faktori najviše utječu na konačni rezultat. U tu svrhu ispitan je utjecaj 7 parametara u ukupno 16 reakcija (svaka provedena pet puta) upotrebom Plackett-Burmanovog dizajna eksperimenta, kako je opisano u Poglavlju 3.9.1., a ranije su opisali Novokmet i suradnici.[79] Ovakav dizajn eksperimenta se koristi radi identifikacije parametara analize koji imaju najveći utjecaj na rezultate u samo jednom eksperimentu. Treba međutim voditi računa o tome da pojedini utjecaji mogu biti kombinacija više ispitanih parametara, te isto tako i parametara koji nisu direktno uzeti u obzir. Stoga se ovakav eksperiment koristi kao indikacija potencijalnih kritičnih koraka metode. Utjecaj svakog od parametara procijenjen je za najzastupljenije kromatografske pikove različitog stupnja složenosti (vidi Sliku 10): GP4, GP8, GP14, GP18 i GP24 prema jednadžbi (1).

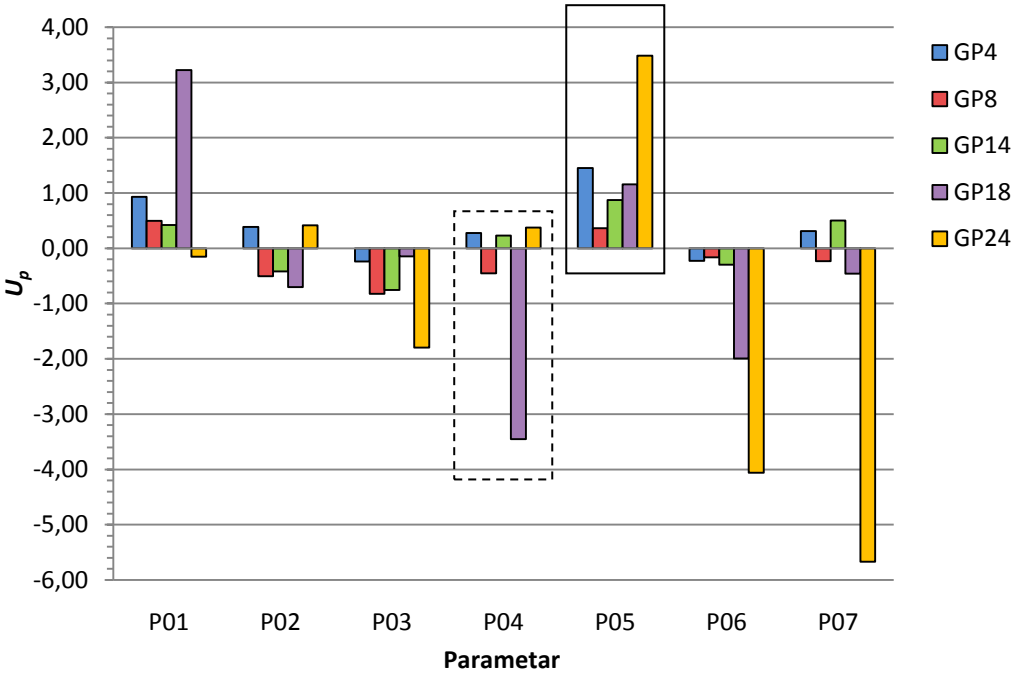


Slika 28. Utjecaj pojedinog parametra (U_p) na površinu pikova GP4, GP8, GP14, GP18 i GP24 određen Plackett-Burmanovim dizajnom eksperimenta za testiranje robusnosti metode korištene za pročišćavanje glikana IgG-a na celulozi uz 80 %-tni acetonitril. U ukupno 16 reakcija (svaka provedena pet puta) testirani su sljedeći parametri: P01 – vrijeme inkubacije sa SDS-om pri 65 °C, min; P02 – vrijeme hlađenja uzoraka na sobnoj temperaturi nakon inkubacije sa SDS-om, min; P03 – vrijeme inkubacije s igepalom CA-630, min; P04 – količina dodane PNGaze F, mU; P05 – vrijeme reakcije obilježavanja slobodnih glikana s 2-AB, h; P06 – temperatura acetonitrila korištenog za pročišćavanje obilježenih glikana, °C; P07 – vrijeme inkubacije s vodom u pojedinom koraku eluiranja glikana s celuloze, min. Statistički značajan utjecaj na površinu pikova GP4 i GP24 imaju parametri uokvireni punom linijom, a statistički značajan utjecaj na površinu GP24 ima parametar uokviren iscrtkanom linijom – Mann-Whitneyjev U-test, $p < 0,05$

Pozitivan utjecaj označava povećanje površine pika pri većoj vrijednosti ispitivanog parametra, i obratno – negativan utjecaj označava povećanje površine pika pri nižoj vrijednosti ispitivanog parametra. Općenito površinu pikova, tj. njihov intenzitet povećava produljeno vrijeme hlađenja uzoraka nakon denaturacije sa SDS-om, dulja inkubacija s igepalom CA-630, veća količina dodanog enzima, te vrijeme reakcije obilježavanja glikana fluorescentnom bojom. Izrazito negativan utjecaj na površinu navedenih pikova ima temperatura 80 %-tnog acetonitrila korištenog prilikom pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana na celulozi, što znači da se veći intenziteti pikova postižu upotrebom acetonitrila ohlađenog na 4 °C. Primjenom Mann-Whitneyjeva U-testa za parametre koji imaju najveći utjecaj na GP4 (neutralni glikan) i GP24 (negativno nabijeni glikan) statistički značajnim su se pokazali P04 (količina dodane PNGaze F, p_{GP4} = 0,001, p_{GP24} = 0,010) i P06 (temperatura acetonitrila korištenog za pročišćavanje obilježenih glikana, $p_{GP4} \leq 0{,}001$, p_{GP24} = 0,002), dok je P05 (vrijeme reakcije obilježavanja slobodnih glikana s 2-AB) statistički značajan samo za GP24 (p_{GP4} = 0,089, p_{GP24} = 0,018).

Osim utjecaja pojedinih parametara na površinu pikova, na isti način je ispitan i njihov utjecaj na koeficijent varijacije udjela površine pojedinih pikova u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu (Slika 29). Pri tom također vrijedi da pozitivan utjecaj označava povećanje koeficijenta varijacije pri višoj vrijednosti ispitivanog parametra, i obratno – negativan utjecaj označava povećanje koeficijenta varijacije pri nižoj vrijednosti ispitivanog parametra. Rezultate je u ovom slučaju teže interpretirati s obzirom da neki pikovi standardno imaju manju, odnosno veću varijabilnost. Primjerice, veliki pikovi imaju relativno nizak koeficijent varijacije, čak i ako im se udio u ukupnom kromatogramu promijeni za par postotaka, te je utjecaj pojedinog parametra na CV teže uočiti u slučaju npr. GP4, GP8, GP14. Za razliku od toga sijalinizirani glikani redovito imaju više CV-ove i znatno su osjetljiviji na promjene u eksperimentalnim uvjetima, te je utjecaj pojedinih parametara izraženiji u slučaju npr. GP18 i GP24 (Slika 29). Vidljivo je da velik pozitivan utjecaj na CV GP18 ima vrijeme inkubacije sa SDS-om, što znači da s duljim vremenom denaturacije raste CV, te je za reproducibilnost rezultata povoljnija kraća inkubacija sa SDS-om (10 minuta). Isto tako, izražen pozitivan utjecaj za svih pet ispitanih glikana ima i vrijeme reakcije obilježavanja slobodnih glikana 2-AB-om, što znači da su CV-ovi veći kad se glikani obilježavaju fluorescentnom bojom 3 h umjesto 2 h. Izrazit negativan utjecaj na svih pet glikana ima vrijeme inkubacije s igepalom CA-630, što znači da su CV-ovi veći u slučaju kraće inkubacije

(5 minuta). Temperatura acetonitrila korištenog za pročišćavanje obilježenih glikana i vrijeme inkubacije s vodom prilikom eluiranja glikana s celuloze imaju izrazito negativan utjecaj na GP18 i GP24, što upućuje na to da acetonitril ohlađen na 4 °C i inkubacija 5 minuta s vodom prilikom eluiranja glikana povećavaju CV udjela površine navedenih pikova u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu. Zanimljivo je da su se primjenom Mann-Whitneyjeva U-testa za po tri parametra koji imaju najveći utjecaj na CV površine pikova GP4 (neutralni glikan), te GP18 i GP24 (negativno nabijeni glikani) statistički značajnim pokazali samo P04 (količina dodane PNGaze F), i to granično za GP18 (p_{GP18} = 0,050), te P05 (vrijeme reakcije obilježavanja slobodnih glikana s 2-AB) za GP4 (p_{GP4} = 0,007).



Slika 29. Utjecaj pojedinog parametra (U_p) na koeficijent varijacije udjela površine pikova GP4, GP8, GP14, GP18 i GP24 u ukupnoj površini svih pikova, određen Plackett-Burmanovim dizajnom eksperimenta za testiranje robusnosti metode korištene za pročišćavanje glikana IgG-a na celulozi uz 80 %-tni acetonitril. U ukupno 16 reakcija (svaka provedena pet puta) testirani su sljedeći parametri: P01 – vrijeme inkubacije sa SDS-om pri 65 °C, min; P02 – vrijeme hlađenja uzoraka na sobnoj temperaturi nakon inkubacije sa SDS-om, min; P03 – vrijeme inkubacije s igepalom CA-630, min; P04 – količina dodane PNGaze F, mU; P05 – vrijeme reakcije obilježavanja slobodnih glikana s 2-AB, h; P06 – temperatura acetonitrila korištenog za pročišćavanje obilježenih glikana, °C; P07 – vrijeme inkubacije s vodom u pojedinom koraku eluiranja glikana s celuloze, min. Statistički značajan utjecaj na CV udjela površine pika GP4 ima parametar uokviren punom linijom, a statistički značajan utjecaj na CV udjela površine pika GP18 ima parametar uokviren iscrtkanom linijom – Mann-Whitneyjev U-test, $p < 0,05$

Na temelju dobivenih rezultata u sljedećim eksperimentima korištene su sljedeće vrijednosti ispitanih parametara:

- Vrijeme inkubacije sa SDS-om pri 65 °C: 10 min

- Vrijeme hlađenja na sobnoj temperaturi nakon inkubacije sa SDS-om: 30 min
- Vrijeme inkubacije s igepalom CA-630: 15 min
- Količina dodane PNGaze F (Prozyme): 1,25 mU
- Vrijeme reakcije obilježavanja slobodnih glikana s 2-AB: 2 h
- Temperatura acetonitrila korištenog za pročišćavanje obilježenih glikana: 4 °C

Vrijeme inkubacije s vodom u koracima eluiranja glikana s celuloze ispitano je u posebnom eksperimentu, kako je opisano u Poglavlju 3.9.1.1, te pri optimiranim gore navedenim uvjetima. Inkubacijom s vodom od 15 minuta postignuti su nešto veći intenziteti pikova (59 ± 18 EU, n = 8), u usporedbi s inkubacijom od 5 minuta (50 ± 22 EU, n = 8), te niži koeficijenti varijacije (Tablica 15). U daljnjim eksperimentima su svi uzorci inkubirani s vodom po 15 minuta prilikom eluiranja fluorescentno obilježenih glikana sa čvrste faze u postupku njihova pročišćavanja prije kromatografske analize.

Tablica 15. Utjecaj vremena inkubacije s vodom prilikom eluiranja fluorescentno obilježenih glikana IgG-a s celuloze, 0,1 g mL^{-1} (5 i 15 minuta). Naveden je broj kromatografskih pikova s određenim koeficijentom varijacije (CV). n = 8

CV / %	Inkubacija s vodom 5 min	Inkubacija s vodom 15 min
0 do 5	11	13
5 do 10	5	2
10 do 15	3	7
> 15	5	2

4.5. Optimizacija postupka deglikozilacije

Korištena metoda priprave glikana IgG-a za analizu metodom HILIC-UPLC oslanja se na samo jedan korak pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana od suviška reagensa i proteinskog dijela IgG-a i to prije analize tekućinskom kromatografijom. Time se i postupak deglikozilacije i fluorescentnog obilježavanja glikana odvijaju u istoj reakcijskoj smjesi, bez uklanjanja suviška reagensa zaostalih nakon deglikozilacije, a prije fluorescentnog obilježavanja slobodnih glikana. Uočeno je da prilikom pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana dodatkom acetonitrila dolazi do taloženja proteina u uzorcima, što otežava njihov prijenos na čvrstu fazu (celulozu), te možda utječe i na reproducibilnost metode.

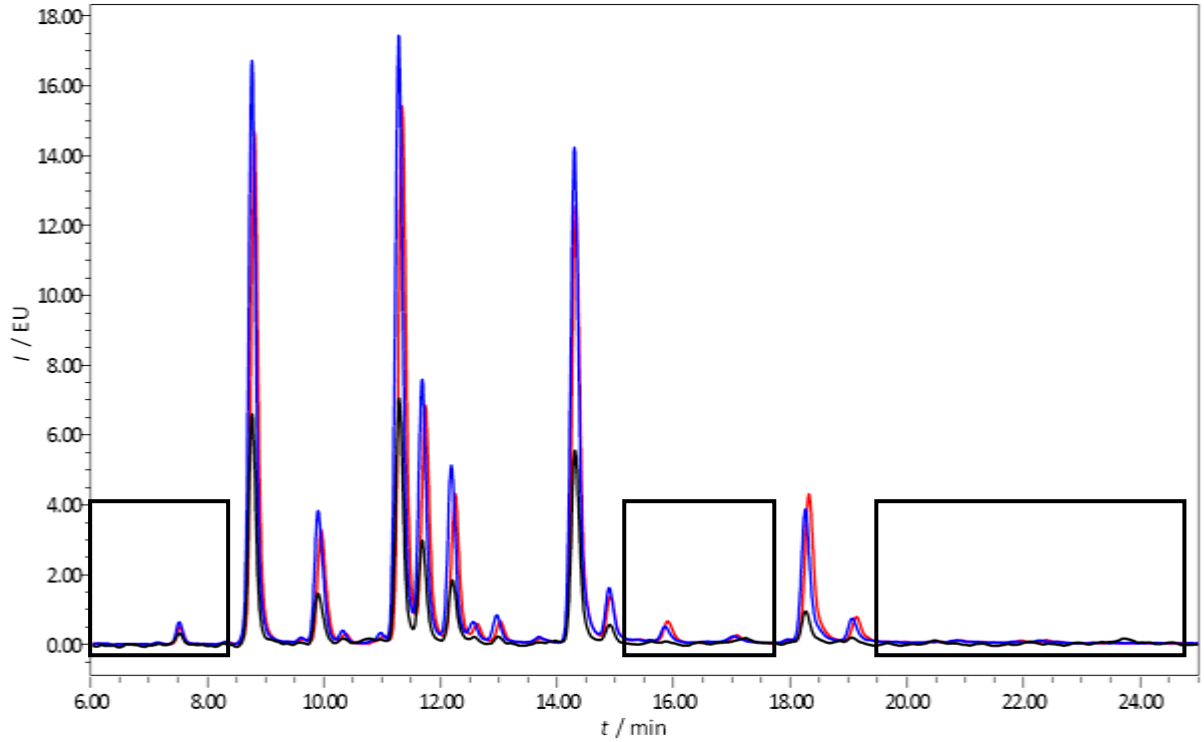
Postavilo se pitanje o mogućnosti povećanja osjetljivost metode na način da se nakon deglikozilacije ukloni proteinski ostatak iz reakcijske smjese, čime bi se u reakciju fluorescentnog obilježavanja glikana išlo sa znatno čišćim uzorkom te bi teorijski učinkovitost obilježavanja i osjetljivost metode bila veća. U tu svrhu testirani su različiti protokoli deglikozilacije na membranama (Poglavlja 3.5.2. i 3.5.3.), te filtriranja uzoraka nakon deglikozilacije radi uklanjanja proteinskog dijela IgG-a prije obilježavanja slobodnih glikana fluorescentnom bojom (Poglavlja 3.6.1. i 3.6.2.).

4.5.1. Deglikozilacija IgG-a na hidrofobnoj *Multiscreen Immobilon-P PVDF* membrani

Mogućnost deglikozilacije IgG-a na hidrofobnoj *Multiscreen Immobilon-P PVDF* pločici (Milipore) je već ranije objavljena.[44] U teoriji, ovakav način deglikozilacije bi trebao biti znatno učinkovitiji, budući da se uzorak nakon prenošenja na membranu ispire od suviška soli i reagensa korištenih za denaturaciju IgG-a, te bi reakcija deglikozilacije trebala biti „čišća“. Osim toga, budući da se radi o hidrofobnoj membrani, filtriranjem nakon deglikozilacije proteinski dio molekule IgG-a trebao bi ostati vezan na membranu, dok bi s membrane eluirali slobodni glikani, koji se dalje fluorescentno obilježavaju s puno manje smetajućih reagensa iz prethodnih koraka.

Paralelno je testirano 6 različitih protokola denaturacije (svaki proveden tri puta) na istom uzorku suhog IgG-a, kako je opisano u Poglavlju 3.5.2. Nakon denaturacije (i redukcije s alkilacijom) uzorci su naneseni na membranu, isprani puferom za deglikozilaciju (20 ili 100 mmol L^{-1} $NaHCO_3$, 50 mmol L^{-1} $(NH_4)HCO_3$, 100 mmol L^{-1} TEAB pH 8,5 ili 1x PBS) nakon čega je dodano 1,25 mU PNGaze F (Prozyme) u odgovarajućem puferu i ukupnom volumenu reakcijske smjese od 50 μL. Slobodni glikani su nakon deglikozilacije skupljeni u čistu pločicu, obilježeni fluorescentnom bojom i pročišćeni na celulozi kako je to opisano u Poglavlju 3.8.1., s tim da su korišteni 100 %-tni acetonitril i 80 %-tni acetonitril u vodi prethodno ohlađeni na 4 °C. Obilježeni glikani su analizirani tekućinskom kromatografijom na isti način kako je to opisano u Poglavlju 3.11.

Svi testirani protokoli su rezultirali kromatogramima izrazito niskih intenziteta pikova, uglavnom < 5 EU, s tim da su u kromatogramima 4 uzorka od ukupno 18 uzoraka intenziteti pikova bili od 5 do 18 EU. Osim toga, u svim je kromatogramima uočen nedostatak pikova manje zastupljenih glikoformi, posebice sijaliniziranih GP20 do GP24 (Slika 30).



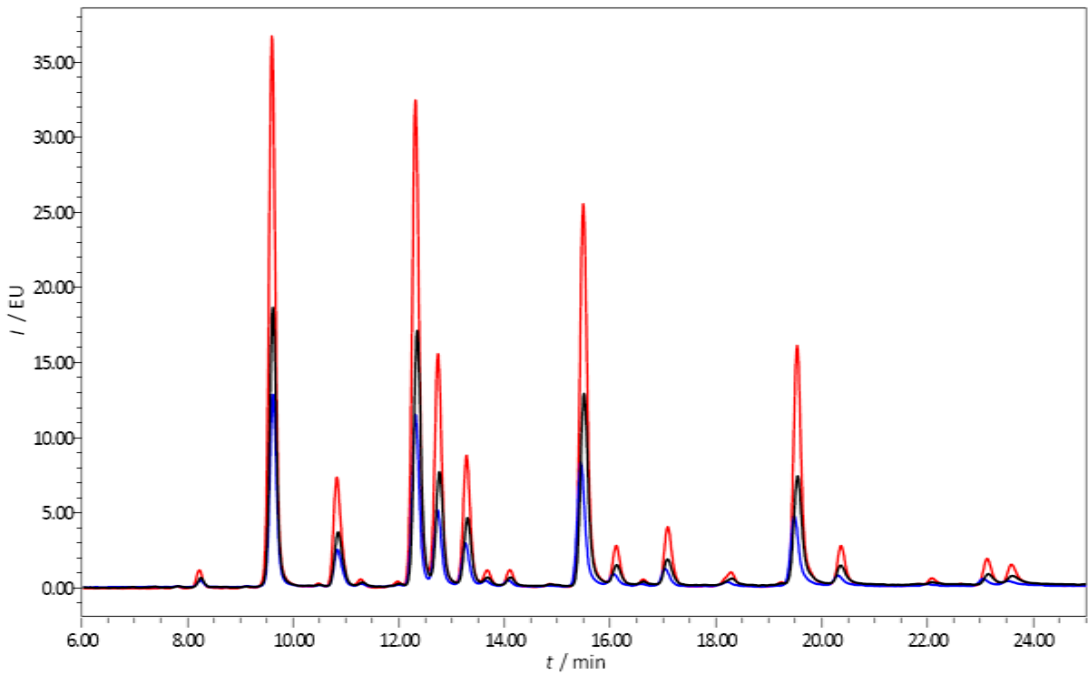
Slika 30. Nedostatak manje zastupljenih glikoformi (označeno pravokutnikom) prilikom deglikozilacije IgG-a na hidrofobnoj *Multiscreen Immobilon-P PVDF* membrani. Oko 250 µg IgG-a je denaturirano i reducirano na membrani s GuHCl i TCEP 10 minuta pri 65 °C, te isprano i deglikozilirano u 100 mmol L^{-1} TEAB pH 8,5. Fluorescentno obilježeni glikani su pročišćeni na celulozi (0,1 mg mL^{-1}) uz 80 %-tni acetonitril u vodi ohlađen na 4 °C, te analizirani metodom HILIC-UPLC. Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani uz linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 µL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije

Pretpostavljeno je da su mogući uzroci slabih intenziteta i niske zastupljenosti pikova pojedinih glikoformi u kromatogramima pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na celulozi (veliki gubitci glikana tijekom postupka ispiranja suviška reagensa), nepotpuno eluiranje slobodnih glikana nakon deglikozilacije s hidrofobne membrane i sama deglikozilacija na membrani. Navedene pretpostavke su ispitane kako je opisano u nastavku.

Utjecaj metode pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana i nepotpunog eluiranja slobodnih glikana s membrane na rezultate dobivene deglikozilacijom na hidrofobnoj *Multiscreen Immobilon-P PVDF* pločici ispitani su na ukupno 12 uzoraka IgG-a denaturacijom s GuHCl-om i redukcijom s DTT-om, kako je opisano u Poglavlju 3.5.2. U 6 uzoraka je nakon skupljanja slobodnih glikana dodano još 50 µL 100 mmol L^{-1} $NaHCO_3$, radi boljeg eluiranja slobodnih glikana koji su možda zaostali na membrani. Po tri uzorka iz svake skupine je nakon bojanja pročišćeno prema standardnom protokolu na celulozi (Poglavlje 3.8.1.) s tim da su korišteni 100 %-tni acetonitril i 80 %-tni acetonitril u vodi prethodno

ohlađeni na 4 °C, odnosno po tri uzorka su pročišćena na 0,45 μm *GHP AcroPrep* pločici kako su opisali Burnina i suradnici.[44] Obilježeni glikani analizirani su tekućinskom kromatografijom na isti način kako je ranije opisano.

U svim slučajevima dobiveni su podjednaki intenziteti pikova kao ranije (< 5 EU) za samo 8 od ukupno 24 kromatografska pika, te je pretpostavljeno da je problem u deglikozilaciji na hidrofobnoj membrani. To je potvrđeno u sljedećem eksperimentu u kojem je po tri uzorka IgG-a denaturirano sa SDS-om i igepalom prema standardnom postupku opisanom u Poglavlju 3.4.1. Denaturacija i brzi postupak deglikozilacije (30 minuta pri 50 °C u 1x PBS-u) su rađeni u otopini, nakon čega su uzorci samo profiltrirani kroz hidrofobnu *Multiscreen Immobilon-P PVDF* membranu radi odvajanja proteinskog dijela IgG-a od slobodnih glikana. Fluorescentno obilježeni glikani pročišćeni na celulozi zatim su analizirani tekućinskom kromatografijom. Intenziteti pikova bili su znatno viši, te su bila vidljiva sva 24 kromatografska pika (Slika 31), čak i nakon primjene znatno kraćeg postupka deglikozilacije u otopini. To upućuje da je deglikozilacija na membrani uzrok slabih intenziteta pikova, te da metoda nije dovoljno osjetljiva za analizu metodom HILIC-UPLC.



Slika 31. Uklanjanje proteinskog dijela IgG-a na hidrofobnoj *Multiscreen Immobilon-P PVDF* membrani nakon denaturiracije sa SDS-om i igepalom 10 minuta pri 65 °C i deglikozilacije u otopini 1h pri 50 °C u 1x PBS-u. Fluorescentno obilježeni glikani su pročišćeni na celulozi (0,1 mg mL^{-1}) uz 80 %-tni acetonitril u vodi ohlađen na 4 °C, te analizirani metodom HILIC-UPLC. Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani uz linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 μL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije

U kasnijoj fazi razvoja metode hidrofobna *Multiscreen Immobilon-P PVDF* membrana je dodatno testirana u svrhu povećanja osjetljivosti postupka fluorescentnog obilježavanja slobodnih glikana, što je opisano u Poglavlju (4.10.).

4.5.2. Deglikozilacija IgG-a na *Omega 10k* membrani

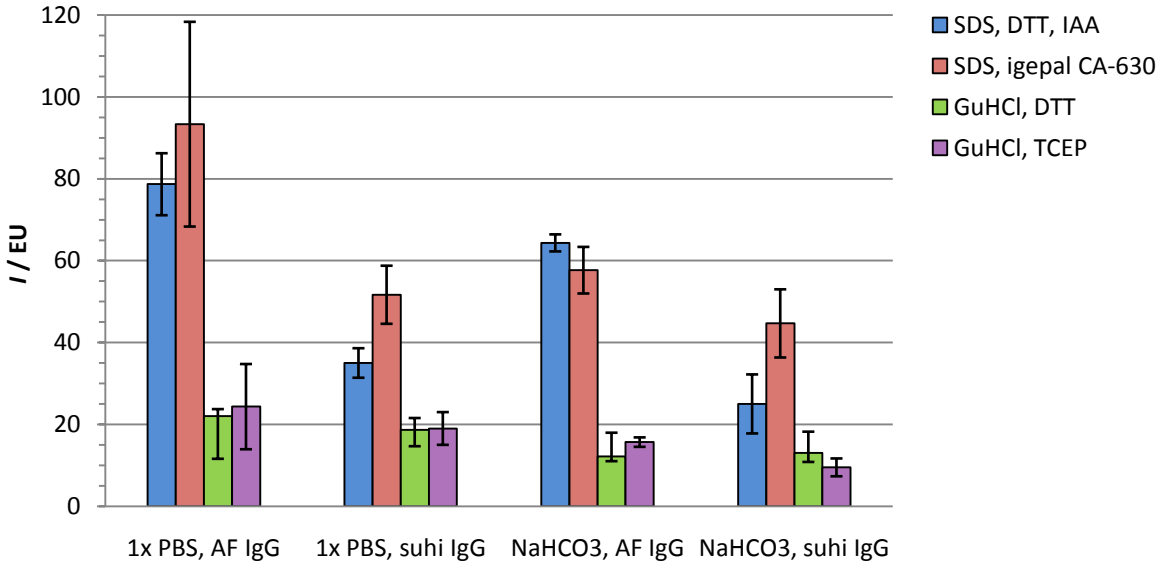
Budući da se deglikozilacija na hidrofobnoj *Immobilon-P PVDF* membrani pokazala nedovoljno osjetljivom, deglikozilacija IgG-a je testirana na *Omega 10k MWCO AcroPrep* filtar pločici (Pall) koja propušta molekule manje od 10 kDa. Po sličnom principu bi se nakon odcjepljivanja glikana PNGazom F filtriranjem dobili slobodni glikani, bez proteinskog dijela molekule IgG-a koji ne bi trebao proći kroz filtar, budući da su veličine teškog, odnosno lakog lanca oko 50 do 70 kDa, odnosno 25 kDa.

Preliminarni rezultati testiranja osnovnog protokola deglikozilacije u 1x PBS-u na *Omega 10k* membrani nakon denaturacije SDS-om i igepalom CA-630 (opisano u Poglavlju 3.5.3.) su se pokazali obećavajućima (intenziteti pikova oko 50 EU) te je paralelno ispitano 8 različitih protokola (4 različite metode denaturacije IgG-a, svaka u kombinaciji s deglikozilacijom u 1x PBS ili 20 mmol L^{-1} $NaHCO_3$, Poglavlje 3.5.3.1.). Za svaki protokol korišten je suhi IgG ili IgG u 0,1 mol L^{-1} amonijevom formijatu. Kako upotreba filtar pločice omogućava uklanjanje reagensa u pojedinim koracima, upotrebom IgG-a u otopini pokušalo se dodatno poboljšati osjetljivost metode na način da se nakon nanošenja uzorka amonijev formijat ukloni filtriranjem prije dodatka otopine za denaturaciju. Ovim postupkom bi se već u prvom koraku uklonile soli koje mogu ometati kasnije korake u pripravi.

Nakon svakog od postupaka denaturacije, redukcije i alkilacije reagensi su uklonjeni centrifugiranjem pločice i ispiranjem uzoraka ultra čistom vodom. Uzorci su zatim deglikozilirani u određenom puferu PNGazom F (1,25 mU, Prozyme). Slobodni glikani su nakon deglikozilacije skupljeni, obilježeni fluorescentnom bojom, pročišćeni na celulozi nanesenoj na 0,20 μm *GHP AcroPrep* pločicu (Pall) i analizirani tekućinskom kromatografijom na isti način kako je to ranije opisano.

Najviši intenziteti kromatografskih pikova postignuti su denaturacijom IgG-a sa SDS-om, DTT-om i IAA (79 ± 8 EU, 35 ± 4 EU, 64 ± 2 EU i 25 ± 7 EU), te SDS-om i igepalom (93 ± 25 EU, 52 ± 7 EU, 58 ±5 EU i 45 ± 8 EU; standardni protokol denaturacije, Slika 32). U svih 8 testiranih protokola čak i do dvostruko boljim se pokazao IgG otopljen u 0,1 mol L^{-1} amonijevom formijatu u odnosu na suhi IgG. Nije uočena bitna razlika u glikanskim profilima

kad je kao početni uzorak korišten otopljeni ili suhi IgG, ali je u svim eksperimentima deglikozilacije u 20 mmol L^{-1} $NaHCO_3$ uočena manja zastupljenost sijaliniziranih glikoformi (posebice GP24). S obzirom da se najboljim s obzirom na intenzitete pikova pokazala standardna denaturacija IgG-a otopljenog u 0,1 mol L^{-1} amonijevom formijatu sa SDS-om i igepalom CA-630 uz deglikozilaciju u 1x PBS-u, ovi uvjeti su korišteni prilikom daljnje optimizacije metode.



Slika 32. Deglikozilacija IgG-a na *Omega 10k MWCO AcroPrep* membrani. Testirani su različiti protokoli denaturacije (SDS, DTT i IAA; SDS i igepal CA-630; GuHCl i DTT; te GuHCl i TCEP) s deglikozilacijom u 1x PBS-u ili 20 mmol L^{-1} $NaHCO_3$. Kao početni uzorak korišten je IgG otopljen u 0,1 mol L^{-1} amonijevom formijatu (AF IgG) ili suhi IgG. Fluorescentno obilježeni glikani su pročišćeni na celulozi (0,1 mg mL^{-1}) uz 80 %-tni acetonitril u vodi ohlađen na 4 °C, te analizirani metodom HILIC-UPLC pripravom u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80. Korišten je linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 µL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije. Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija intenziteta najvećeg pika (n = 3)

Usporedbom rezultata deglikozilacije na *Omega 10k* membrani s rezultatima dobivenima deglikozilacijom istog uzorka IgG-a u otopini uočena je nešto manja zastupljenost sijaliniziranih glikoformi (GP16 do GP24), te je pretpostavljeno da *Omega 10k* membrana sadrži nešto što smanjuje učinkovitost priprave sijaliniziranih glikoformi. Kako bi se ta pretpostavka ispitala, testiran je utjecaj prethodnog ispiranja *Omega 10k* filtar pločice na deglikozilaciju uzoraka. Uzorci suhog IgG-a (mase oko 250 µg) denaturirani su kako je to opisano u Poglavlju 3.5.3.1. – protokol **g)**. Pet uzoraka je analizirano bez, a pet uzoraka s prethodnim ispiranjem filtar pločice s 2x 100 µL ultra čiste vode uz upotrebu uređaja za

filtriranje uz pomoć vakuuma (oko 250 mm Hg). Nakon ispiranja pločice uzorci u smjesi za denaturaciju naneseni su na pločicu i obrađeni kako je ranije opisano. Iako nisu postignuti veći udjeli pikova sijaliniziranih glikana primjenom ispiranja *Omega 10k* membrane prije nanošenja uzoraka, intenziteti kromatografskih pikova bili su nešto viši (36 ± 2 EU) nego kad pločica nije prethodno isprana vodom (23 ± 5 EU). Isto tako, uz prethodno ispiranje membrane koeficijenti varijacije udjela površine pojedinih pikova u ukupnoj površini svih pikova bili su nešto niži (za 12 od 24 kromatografskih pikova CV je bio < 5 %) nego kad membrana nije bila isprana vodom prije nanošenja uzoraka (samo za 7 od ukupno 24 kromatografskih pikova CV je bio < 5 %, Tablica 16). S obzirom na navedeno, u svim sljedećim eksperimentima *Omega 10k* membrana je prije nanošenja uzoraka isprana s 2x 100 μL ultra čiste vode.

Mogućnost selektivnog vezanja sijaliniziranih glikana na *Omega 10k* membranu, što bi uzrokovalo snižene udjele sijaliniziranih glikana u usporedbi s deglikozilacijom u otopini, isključena je nakon eksperimenta filtriranja standarda glikana IgG-a kroz *Omega 10k* membranu te usporedbom glikanskih profila prije i nakon filtriranja, budući da nisu uočene nikakve razlike u navedena dva profila.

Tablica 16. Utjecaj ispiranja *Omega 10k* membrane ultra čistom vodom prije deglikozilacije IgG-a. Naveden je broj kromatografskih pikova s određenim koeficijentom varijacije (CV). $n = 5$

CV / %	Ispiranje vodom	Bez ispiranja vodom
0 do 5	12	7
5 do 10	6	4
10 do 15	2	4
> 15	4	9

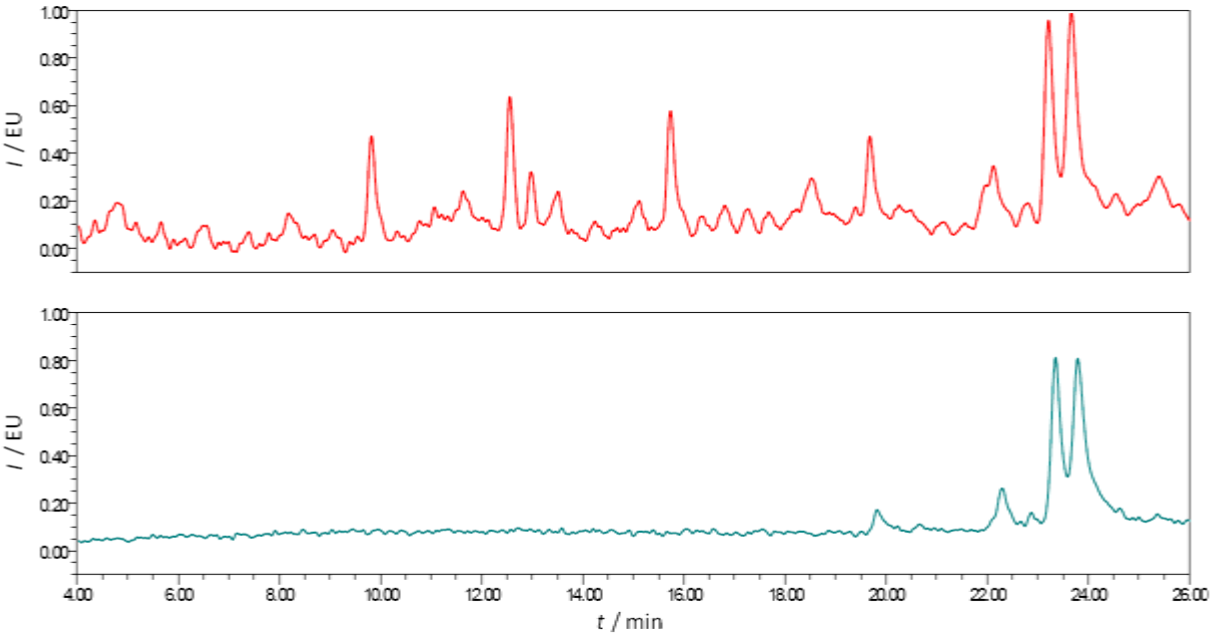
4.6. Optimizacija postupka pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana

Pročišćavanje na celulozi uz 80 %-tni acetonitril u vodi se pokazalo kao potencijalni uzrok smanjenja reproducibilnosti analize glikana IgG-a (vidi Poglavlje 4.3.). Stoga su za pročišćavanje fluorescento obilježenih glikana ispitane još tri čvrste faze – Bio-Gel P-6,

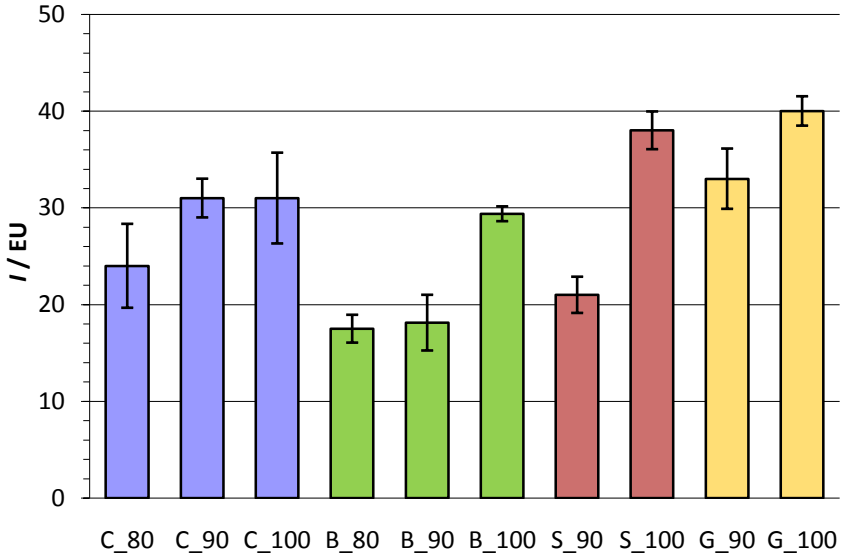
silikagel i sam 0,2 μm hidrofilni *GHP* filtar. Osim različitih čvrstih faza, testirani su i različiti volumni udjeli acetonitrila u vodi (80 % i 90 %), te čisti acetonitril kao otapala korištena u koracima ispiranja fluorescentno obilježenih glikana od viška reagensa.

U tu svrhu je oko 250 μg IgG-a (provedeno pet puta) denaturirano i deglikozilirano na *Omega 10k* membrani prema ranije opisanom postupku (protokol **g)**, Poglavlje 3.5.3.1. Membrana je prije nanošenja uzoraka isprana ultra čistom vodom, kako je prethodno određeno. Uzorci su nakon obilježavanja fluorescentnom bojom (opisano u Poglavlju 3.7.) ohlađeni na sobnoj temperaturi 30 minuta i pročišćeni od viška reagensa metodom HILIC-SPE. Za pročišćavanje su korišteni celuloza, Bio-Gel ili silikagel (svaka čvrsta faza u ultra čistoj vodi, 0,1 g mL^{-1}) na 0,2 μm *GHP AcroPrep* filtar pločici, te sam 0,2 μm *GHP AcroPrep* filtar, budući da se radi o hidrofilnom polipropilenu koji teorijski može vezati glikane. Obilježeni glikani su pročišćeni kako je opisano u Poglavljima 3.8.1.-3.8.3. U svim koracima i uvjetima ispiranja korišten je acetonitril prethodno ohlađen na 4 °C, a glikani su eluirani ultra čistom vodom nakon inkubacije od 15 minuta u svakom koraku, kako je ranije određeno testiranjem robusnosti metode pročišćavanja na celulozi (Poglavlja 3.9.1. i 4.4.).

Ispiranjem s 80 %-tnim acetonitrilom prilikom pročišćavanja obilježenih glikana uočeni su znatni gubitci upotrebom svih četiriju čvrstih faza, a posebno na silikagelu i *GHP* filtru, s kojih se ispiranjem gubi većina glikana, te ostaju vezani samo oni najhidrofilniji (Slika 33). Porastom volumnog udjela acetonitrila korištenog za ispiranje suviška reagensa povećavaju se i intenziteti kromatografskih pikova, koji su najveći pri ispiranju 100 %-tnim acetonitrilom *GHP* filtra (40 ± 2 EU), silikagela (38 ± 2EU), te celuloze (31 ± 5 EU) i Bio-Gela (29 ± 1 EU) (Slika 34). Najniži koeficijenti varijacije postignuti su pročišćavanjem na silikagelu, *GHP* filtru te Bio-Gelu uz 100 %-tni acetonitril, i pročišćavanjem na celulozi i *GHP* filtru uz 90 %-tni acetonitril u vodi (Tablica 17).



Slika 33. Gubitak fluorescentno obilježenih glikana IgG-a prilikom njihova pročišćavanja na silikagelu (0,1 g mL^{-1} u vodi, crveno) i 0,2 µm hidrofilnom *GHP* filtru (zeleno) uz 80 %-tni acetonitril u vodi (ohlađen na 4 °C) nakon deglikozilacije IgG-a na *Omega 10k MWCO AcroPrep* membrani. Pročišćeni glikani su analizirani metodom HILIC-UPLC pripravom u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80. Korišten je linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 µL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije



Slika 34. Pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na celulozi (C), Bio-Gelu P-6 (B), silikagelu (S) (svaka čvrsta faza u ultra čistoj vodi, 0,1 g mL^{-1}) i 0,2 µm hidrofilnom *GHP* filtru (G) uz 80 %-tni i 90 %-tni acetonitril u vodi te 100 %-tni acetonitril (ohlađeni na 4 °C) nakon deglikozilacije IgG-a na *Omega 10k MWCO AcroPrep* membrani. Pročišćeni glikani su analizirani metodom HILIC-UPLC pripravom u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80. Korišten je linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 µL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije. Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija intenziteta najvećeg pika (n = 5)

Tablica 17. Pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na celulozi (C), Bio-Gelu P-6 (B), silikagelu (S) (svaka čvrsta faza u ultra čistoj vodi, 0,1 g mL^{-1}) i 0,2 μm hidrofilnom *GHP* filtru (G) uz 80 %-tni i 90 %-tni acetonitril u vodi te 100 %-tni acetonitril (ohlađeni na 4 °C) nakon deglikozilacije IgG-a na *Omega 10k MWCO AcroPrep* membrani. Naveden je broj kromatografskih pikova s određenim koeficijentom varijacije udjela njihovih površina u ukupnoj površini svih pikova (CV). n = 5

CV / %	**C_80**	**C_90**	**C_100**	**B_80**	**B_90**	**B_100**	**S_90**	**S_100**	**G_90**	**G_100**
0 do 5	11	14	7	11	12	15	13	16	16	16
5 do 10	5	6	9	4	3	5	8	6	3	4
10 do 15	3	2	6	5	5	3	3	1	3	3
> 15	5	2	2	4	4	1	0	1	2	1

Testirane su i dvostruko veće količine Bio-Gel-a i silikagela (0,2 g mL^{-1}) u smjesi ψ(voda, etanol, acetonitril) = 70:20:10[81] uz 0,2 μm *GHP* filtar i ispiranje sa 100 %-tnim hladnim acetonitrilom s oko 120 μg (n = 3) i 370 μg (n = 5) početnog IgG-a. Dobiveni su podjednaki rezultati kao u prethodnom eksperimentu s manjim količinama čvrste faze, s tim da se *GHP* filtar pokazao nešto boljim (za 16 od ukupno 24 kromatografskih pikova CV je bio < 5 %, za 5 pikova od 5 % do 10 %, za 2 pika od 10 % do 15 % i za samo 1 kromatografski pik > 15 %, Tablica 18). Dobiveni rezultati odgovaraju onima dobivenim prilikom testiranja ponovljivosti metode HILIC-UPLC (Tablica 10), što znači da je pogreška metode izrazito mala. Budući da je hidrofilni 0,2 μm *GHP* filtar najpraktičnija i najjeftinija opcija, ova čvrsta faza je odabrana kao optimalna, te je korištena u daljnjim eksperimentima.

Tablica 18. Pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na Bio-Gelu P-6 (B), silikagelu (S) [svaka čvrsta faza u smjesi ψ(voda, etanol, acetonitril) = 70:20:10, 0,2 g mL^{-1}] i 0,2 μm hidrofilnom *GHP* filtru (G) uz 100 %-tni acetonitril (ohlađen na 4 °C) nakon deglikozilacije IgG-a [120 μg (n = 3) i 370 μg (n = 5)] na *Omega 10k MWCO AcroPrep* membrani. Naveden je broj kromatografskih pikova s određenim koeficijentom varijacije udjela njihovih površina u ukupnoj površini svih pikova (CV)

CV / %	**120 μg, n = 3**			**370 μg, n = 5**		
	B_100	**S_100**	***GHP* filtar**	**B_100**	**S_100**	***GHP* filtar**
0 do 5	14	12	12	14	14	16
5 do 10	5	7	7	5	9	5
10 do 15	2	5	4	1	1	2
> 15	3	0	1	4	0	1

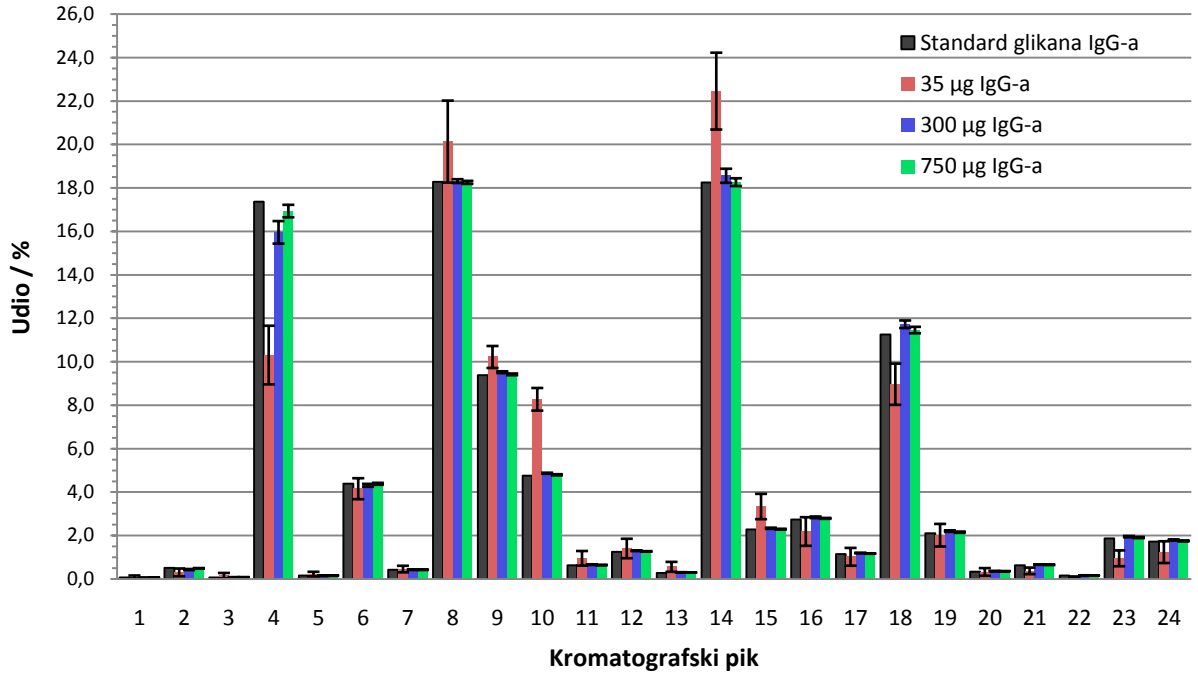
4.6.1. Kapacitet *GHP AcroPrep* filtra za pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana

Budući da je primarna namjena hidrofilne 0,2 μm *GHP AcroPrep* filtar pločice korištene za pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana zapravo filtriranje otopina radi uklanjanja čestica većih od 0,2 μm, ispitan je njezin kapacitet za vezanje glikana obradom približno 35 μg, 300 μg i 750 μg IgG-a, kako je to opisano u Poglavlju 3.8.3.1. Osim toga, željelo se provjeriti veže li *GHP* filtar selektivno bolje ili lošije neke glikane ovisno o njihovoj količini.

Najveći koeficijenti varijacije površine pikova (Tablica 19) dobiveni su „pročišćavanjem" fluorescentno obilježenih glikana koji potječu iz 35 μg IgG-a. Za samo 1 kromatografski pik CV je bio manji od 5 %, za 3 kromatografska pika od 5 % do 10 %, za 3 kromatografska pika od 10 % do 15 %, te za 17 kromatografskih pikova veći od 15 %. U slučaju glikana detektiranih nakon obrade približno 300 μg IgG-a, CV je bio manji od 5 % za 20 kromatografskih pikova, a u slučaju glikana detektiranih nakon obrade oko 750 μg IgG-a čak za 22 od ukupno 24 kromatografska pika. Ovi rezultati govore u prilog tome da korištena hidrofilna 0,2 μm *GHP AcroPrep* filtar pločica ima dovoljan kapacitet za vezanje i do 3 puta veće mase glikana od inače korištene (s 200 μg do 300 μg IgG-a), bez vidljivog utjecaja na glikanski profil. Visoki koeficijenti varijacije u slučaju najmanje ispitane mase glikana, te značajna promjena glikanskog profila u odnosu na standard glikana IgG-a (Tablica 19, Slika 35) najvjerojatnije su posljedica gubitka glikana u frakcijama ispiranja za vrijeme njihova „pročišćavanja", te niskih intenziteta kromatografskih pikova sa signalima pojedinih pikova ispod granice kvantifikacije.

Tablica 19. Ispitivanje kapaciteta hidrofilne 0,2 μm *GHP AcroPrep* pločice. Masa standarda glikana IgG-a koji odgovara masi glikana dobivenih obradom približno 35 μg, 300 μg i 750 μg IgG-a je „pročišćena" na hidrofilnoj 0,2 μm *GHP AcroPrep* pločici uz 100 %-tni acetonitril (ohlađen na 4 °C). Naveden je broj kromatografskih pikova s određenim koeficijentom varijacije udjela njihovih površina u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu (CV). $n = 12$

CV / %	35 μg IgG-a	300 μg IgG-a	750 μg IgG-a
0 do 5	1	20	22
5 do 10	3	2	2
10 do 15	3	0	0
> 15	17	2	0



Slika 35. Ispitivanje kapaciteta hidrofilne 0,2 µm *GHP AcroPrep* pločice. Masa standarda glikana IgG-a koji odgovara masi glikana dobivenih obradom približno 35 µg, 300 µg i 750 µg IgG-a je „pročišćena" na hidrofilnoj 0,2 µm *GHP AcroPrep* pločici uz 100 %-tni acetonitril (ohlađen na 4 °C). Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani uz linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. Prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije udjela površine pojedinog pika u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu (n = 12). V_{inj} = 40 µL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm

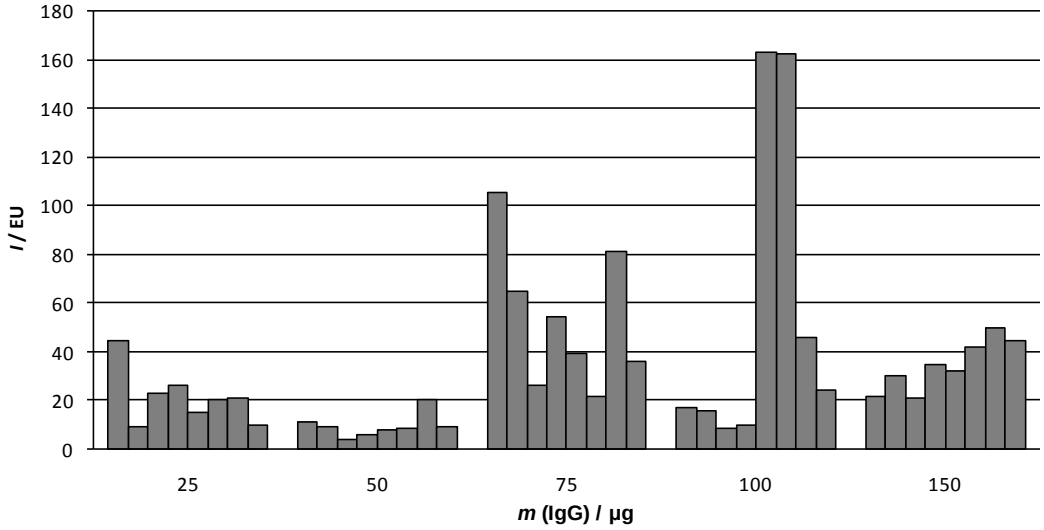
4.6.2. Osjetljivost metode deglikozilacije IgG-a na *Omega 10k* membrani uz pročišćavanje na *GHP* filtru

Osjetljivost razvijene metode deglikozilacije IgG-a u otopini (0,1 mol L^{-1} amonijev formijat) na *Omega 10k AcroPrep* filtar pločici uz pročišćavanje na 0,2 µm *GHP* filtru s ispiranjem 100 %-tnim hladnim acetonitrilom ispitana je testiranjem malih količina početnog uzorka – 25 µg, 50 µg, 100 µg i 150 µg (svaki uzorak pripravljen osam puta), kako je opisano u Poglavljima 3.5.3. i 3.8.3. Uzorci su u ovom eksperimentu ispirani acetonitrilom 5 puta, umjesto 7 puta prilikom uklanjanja suviška reagensa pročišćavanjem nakon fluorescentnog obilježavanja glikana, te su s *GHP* filtra eluirani u 2x 50 µL ultra čiste vode, kako bi se dobio koncentriraniji uzorak za UPLC analizu. Usporedbom svih srednjih vrijednosti udjela površina pojedinih pikova u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu dobiveni su koeficijenti varijacije na razini onih dobivenih prilikom testiranja ponovljivosti HILIC-UPLC analize (za 16 od 24 kromatografskih pikova CV je bio < 5 %, za 6 pikova od 5 % do 10 %, te

za 2 pika > 15 %, vidi Tablicu 9), što govori u prilog tome da se smanjenjem mase početnog uzorka općenito ne mijenja njegov kromatografski profil. Pojedinačno gledano, za svaku masu početnog IgG-a uočeni su nešto viši koeficijenti varijacije pri obradi 25 μg i 150 μg (Tablica 20). Za jedan uzorak početne mase od 150 μg uočena je promjena glikanskog profila u odnosu na sve ostale uzorke, što se nije moglo objasniti, budući da nisu opažene nikakve promjene tijekom priprave tog uzorka. Isto tako, iako je reproducibilnost udjela površina pojedinih kromatografskih pikova u ukupnoj površini svih pikova bila zadovoljavajuća, uočene su velike varijacije u intenzitetima kromatografskih pikova (Slika 36).

Tablica 20. Osjetljivost metode deglikozilacije IgG-a na *Omega 10k AcroPrep* filtar pločici uz pročišćavanje na 0,2 μm *GHP* filtru i ispiranje 100 %-tnim acetonitrilom (ohlađen na 4 °C). Naveden je broj kromatografskih pikova s određenim koeficijentom varijacije udjela njihovih površina u ukupnoj površini svih pikova (CV). n = 8

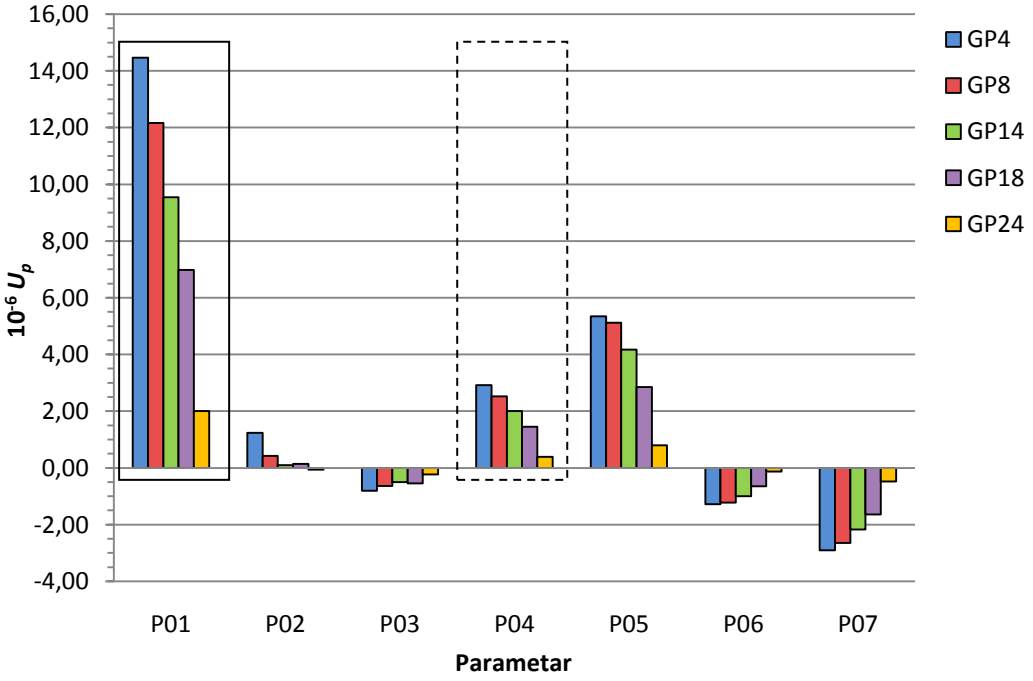
CV / %	25 μg	50 μg	75 μg	100 μg	150 μg
0 do 5	13	13	17	15	8
5 do 10	7	5	4	3	6
10 do 15	2	5	2	3	6
> 15	2	1	1	3	4



Slika 36. Osjetljivost metode deglikozilacije IgG-a na *Omega 10k AcroPrep* filtar pločici uz pročišćavanje na 0,2 μm *GHP* filtru i ispiranje 100 %-tnim acetonitrilom (ohlađen na 4 °C). Pročišćeni glikani su analizirani metodom HILIC-UPLC pripravom u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80. Korišten je linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 μL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije. Prikazan je intenzitet najvećeg pika

4.7. Robusnost metode deglikozilacije IgG-a na *Omega 10k* membrani

Iako je pripravom uzoraka na *Omega 10k* membrani u većini slučajeva postignuta dobra reproducibilnost, neki uzorci su u konačnici imali izmijenjen glikanski profil određen kromatografskom analizom, a uočena je i velika varijabilnost u intenzitetima. Radi testiranja stabilnosti metode i u ovom slučaju je korišten Plackett-Burmanov dizajn eksperimenta, kako je opisano u Poglavlju 3.9.2., a ranije su opisali Novokmet i suradnici.[79] Ispitan je utjecaj 7 parametara u ukupno 16 reakcija (svaka provedena po osam puta). Utjecaj svakog od parametara procijenjen je za najzastupljenije kromatografske pikove različitog stupnja složenosti prema jednadžbi (1) (vidi Sliku 10 i 37): GP4, GP8, GP14, GP18 i GP24.



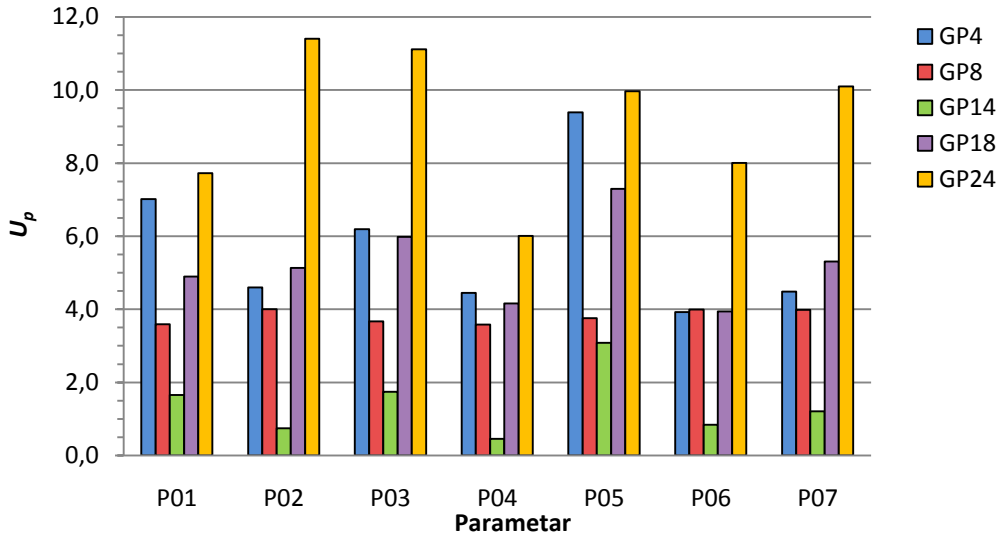
Slika 37. Utjecaj pojedinog parametra (U_p) na površinu pikova GP4, GP8, GP14, GP18 i GP24 određen Plackett-Burmanovim dizajnom eksperimenta za testiranje robusnosti metode deglikozilacije IgG-a na *Omega 10k* membrani uz pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnoj 0,2 μm *GHP AcroPrep* pločici uz 100 %-tni acetonitril. U ukupno 16 reakcija (svaka provedena osam puta) testirani su sljedeći parametri: P01 – tip početnog uzorka – suhi uzorak ili IgG u 0,1 mol L^{-1} amonijevom formijatu (u otopini); P02 – volumeni dodanog SDS-a i igepala CA-630, μL; P03 – volumen vode za ispiranje deterdženata prije dodatka PNGaze F, μL; P04 – miješanje oslobođenih glikana prije eluiranja s *Omega 10k* pločice, min; P05 – volumen vode za eluiranje oslobođenih glikana s *Omega 10k* pločice, μL; P06 – temperature acetonitrila korištenog za pročišćavanje obilježenih glikana, °C; P07 – broj koraka ispiranja suviška reagensa prilikom pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana na *GHP AcroPrep* pločici, x. Statistički značajan utjecaj na površinu pikova GP4 i GP24 ima parametar uokviren punom linijom, a statistički značajan utjecaj samo na površinu GP4 ima parametar uokviren iscrtkanom linijom – Mann-Whitneyjev U-test, $p < 0,05$

Veliki pozitivan utjecaj, odnosno povećanje površine kromatografskog pika uz korištenje „veće“ vrijednosti određenog parametra, uzrokuje početni uzorak IgG-a otopljen u 0,1 mol L^{-1} amonijevom formijatu, dok manji pozitivan utjecaj imaju još volumeni dodanog SDS-a i igepala CA-630, miješanje slobodnih glikana prije njihova eluiranja s *Omega 10k* membrane, te volumen vode za eluiranje slobodnih glikana s *Omega 10k* membrane. Suprotno tome, negativan utjecaj na površinu navedenih pikova ima volumen vode za ispiranje deterdženata prije dodatka PNGaze F, temperatura acetonitrila korištenog za pročišćavanje glikana, te broj koraka ispiranja suviška reagensa prilikom pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana na *GHP* filtru.

Primjenom Mann-Whitneyjeva U-testa za parametre koji imaju najveći utjecaj na površinu pikova GP4 (neutralni glikan) i GP24 (negativno nabijeni glikan) statistički značajnim su se pokazali parametar P01 (tip početnog uzorka IgG-a, $p_{GP4} < 0{,}001$, $p_{GP24} < 0{,}001$) i parametar P04 (miješanje slobodnih glikana prije eluiranja s *Omega 10k* membrane), ali samo za kromatografski pik GP4 ($p_{GP4} = 0{,}030$).

Iako je volumen vode za eluiranje slobodnih glikana pokazao pozitivan, ali statistički neznačajan utjecaj na intenzitet kromatografskih pikova, u konačnici je odabran manji volumen (50 μL) kako bi se reakcija fluorescentnog obilježavanja glikana odvijala u manjem volumenu te time teorijski bila učinkovitija. Osim toga, volumen *GHP AcroPrep* pločice korištene za pročišćavanje slobodnih glikana nakon njihova obilježavanja fluorescentnom bojom je 1 mL, te bi u slučaju većeg volumena reakcijske smjese [50 μL smjese za deglikozilaciju (25 μL u praksi zbog volumena koju zadržava pločica) + 100 μL + 25 μL smjese za obilježavanje] trebalo dodati barem 1,025 mL acetonitrila kako bi se zadržali isti uvjeti (volumni udio acetonitrila) kao u slučaju dodatka 50 μL vode. To bi zahtijevalo prenošenje uzoraka u dva koraka te povećavalo mogućnost kontaminacije i pogreške.

Na isti način je ispitan i utjecaj pojedinog parametra na koeficijent varijacije udjela površine pikova GP4, GP8, GP14, GP18 i GP24 u ukupnoj površini svih pikova (Slika 38). Međutim, nije uočeno da bilo koji od parametara ima izraženiji pozitivan ili negativan utjecaj na koeficijent varijacije udjela navedenih kromatografskih pikova u odnosu na ostale parametre, te prema tome nije rađena daljnja statistička analiza.



Slika 38. Utjecaj pojedinog parametra (U_p) na koeficijent varijacije udjela površine pikova GP4, GP8, GP14, GP18 i GP24 u ukupnoj površini svih pikova određen Plackett-Burmanovim dizajnom eksperimenta za testiranje robusnosti metode deglikozilacije IgG-a na *Omega 10k* membrani uz pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom 0,2 μm *GHP AcroPrep* filtru uz 100 %-tni acetonitril. U ukupno 16 reakcija (svaka provedena osam puta) testirani su sljedeći parametri: P01 – tip početnog uzorka – suhi uzorak ili IgG u 0,1 mol L^{-1} amonijevom formijatu (u otopini); P02 – volumeni dodanog SDS-a i igepala CA-630, μL; P03 – volumen vode za ispiranje deterdženata prije dodatka PNGaze F, μL; P04 – miješanje oslobođenih glikana prije eluiranja s *Omega 10k* pločice, min; P05 – volumen vode za eluiranje oslobođenih glikana s *Omega 10k* pločice, μL; P06 – temperature acetonitrila korištenog za pročišćavanje obilježenih glikana, °C; P07 – broj koraka ispiranja suviška reagensa prilikom pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana na *GHP AcroPrep* pločici, x

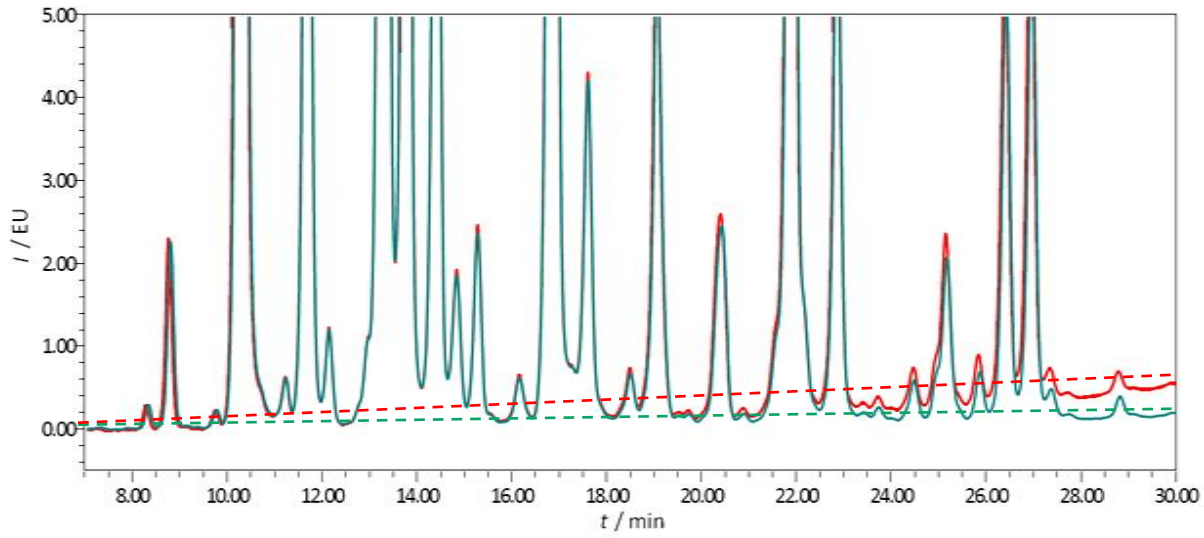
Na temelju dobivenih rezultata u sljedećim su eksperimentima korištene sljedeće vrijednosti ispitanih parametara:

- Tip početnog uzorka: IgG otopljen u 0,1 mol L^{-1} amonijevom formijatu
- Volumeni dodanog SDS-a i igepala CA-630: 30 μL i 10 μL
- Volumen vode za ispiranje deterdženata prije dodatka PNGaze F: 100 μL
- Miješanje slobodnih glikana prije eluiranja s *Omega 10k* pločice: 5 min
- Volumen vode za eluiranje slobodnih glikana s *Omega 10k* pločice: 50 μL
- Temperatura acetonitrila korištenog za pročišćavanje obilježenih glikana: 4 °C
- Broj koraka ispiranja tijekom pročišćavanja obilježenih glikana: 5

4.8. Nedostatci metode deglikozilacije IgG-a na *Omega 10k* membrani

Deglikozilacija IgG-a na *Omega 10k* membrani uz pročišćavanje na hidrofilnom *GHP* filtru uz 100 %-tni acetonitril pokazala se općenito osjetljivijom od prethodno korištene metode deglikozilacije u otopini uz pročišćavanje na celulozi uz 80 %-tni acetonitril u vodi. Međutim,

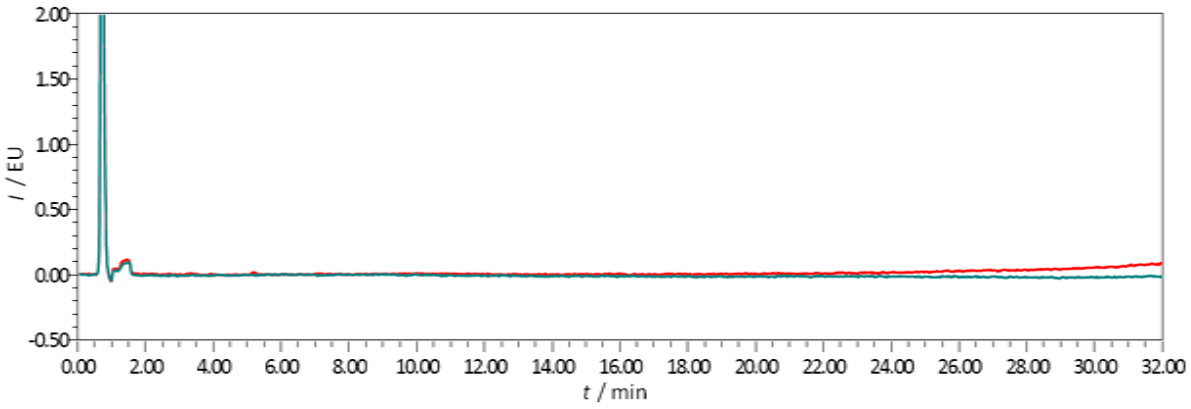
uz znatne varijacije u intenzitetima kromatografskih pikova u slučaju deglikozilacije na *Omega 10k* membrani, usporedbom navedenih metoda priprave glikana IgG-a za analizu metodom HILIC-UPLC s vremenom se pokazalo da reproducibilnost metode nije znatno poboljšana. Štoviše, nakon određenog broja uzoraka uočeni su problemi s pomakom nagiba kromatografske bazne linije (eng. *drift*), što je znatno utjecalo na zastupljenost kromatografskih pikova spojeva koji kasnije eluiraju s kolone (prividno smanjena zastupljenost), a s obzirom na normalizaciju i na zastupljenost ostalih pikova (koji imaju prividno povećanu zastupljenost). Analizom standardno pripravljenog seta za analizu tekućinskom kromatografijom od 32 uzorka (Poglavlje 3.11.) uočeno je povećanje pomaka nagiba kromatografske bazne linije s povećanjem broja analiziranih uzoraka, uključujući kromatograme dekstrana i standarda glikana IgG-a analiziranih nakon analize 16 uzoraka (Slika 39). Pomak nagiba bazne linije nije uočen u kromatogramu dekstrana i standarda glikana IgG-a koji su analizirani na početku seta uzoraka, te u kromatogramima uzoraka pripravljenih starom metodom. Pretpostavljeno je, prema tome, da je pomak nagiba bazne linije rezultat neučinkovitog pročišćavanja glikana, konkretno zaostalih deterdženata (SDS-a i igepala CA-630), koji se djelomično akumuliraju na koloni sa svakim analiziranim uzorkom.



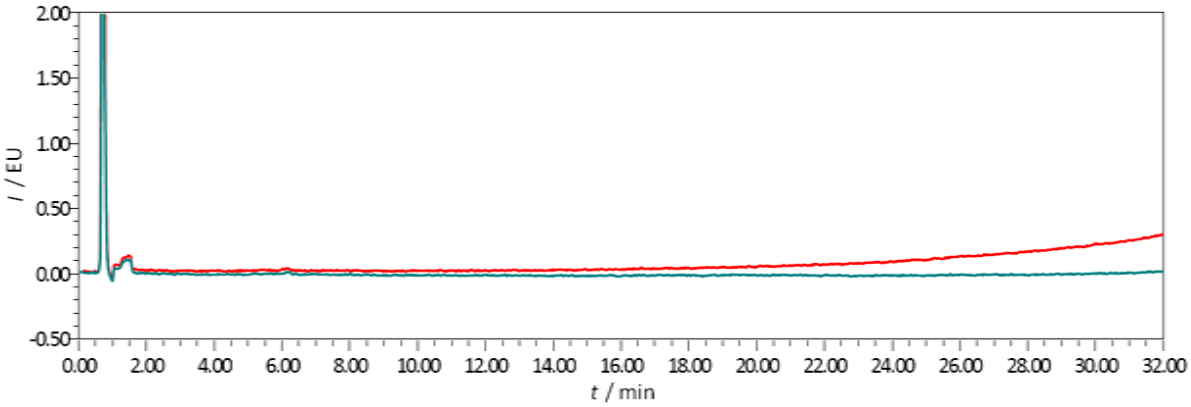
Slika 39. Pomak nagiba bazne linije u kromatogramu standarda glikana IgG-a analiziranog nakon 16 uzoraka (crveno), u odnosu na baznu liniju u kromatogramu standarda glikana IgG-a analiziranog na početku analize seta uzoraka (zeleno). Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani uz linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 µL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije

Kako bi se potvrdila gore navedena pretpostavka deglikozilacija IgG-a (300 μg, reakcija provedena osam puta) na *Omega 10k* membrani je napravljena s ispiranjem deterdženata prije dodatka PNGaze F (kao u prethodnim eksperimentima), te bez ispiranja deterdženata pri čemu je nakon inkubacije uzoraka s igepalom CA-630 na sobnoj temperaturi dodano 10 μL 5x koncentriranog PBS-a s 1,25 U PNGaze F (Promega). Slobodni glikani su obilježeni fluorescentnom bojom te pročišćeni od suviška reagensa na 0,2 μm *GHP* filtru uz 96 %-tni ili 98 %-tni acetonitril u vodi ili 100 %-tni acetonitril, kako je opisano u Poglavlju 3.8.3. Pročišćeni glikani su analizirani u dva seta uzoraka (uzorci pripravljeni s ispiranjem deterdženata i uzorci pripravljeni bez ispiranja deterdženata) kako je opisano ranije u Poglavlju 3.11., s tim da je redoslijed uzoraka u setu bio sljedeći: voda (Voda_**1**), dekstran, standard glikana IgG-a (IgG Pool 3_**1**), 8 uzoraka pročišćenih uz 96 %-tni acetonitril, 8 uzoraka pročišćenih uz 98 %-tni acetonitril, dekstran, standard glikana IgG-a (IgG Pool 3_**2**), 8 uzoraka pročišćenih uz 100 %-tni acetonitril, standard glikana IgG-a (IgG Pool 3_**3**), voda (Voda_**2**).

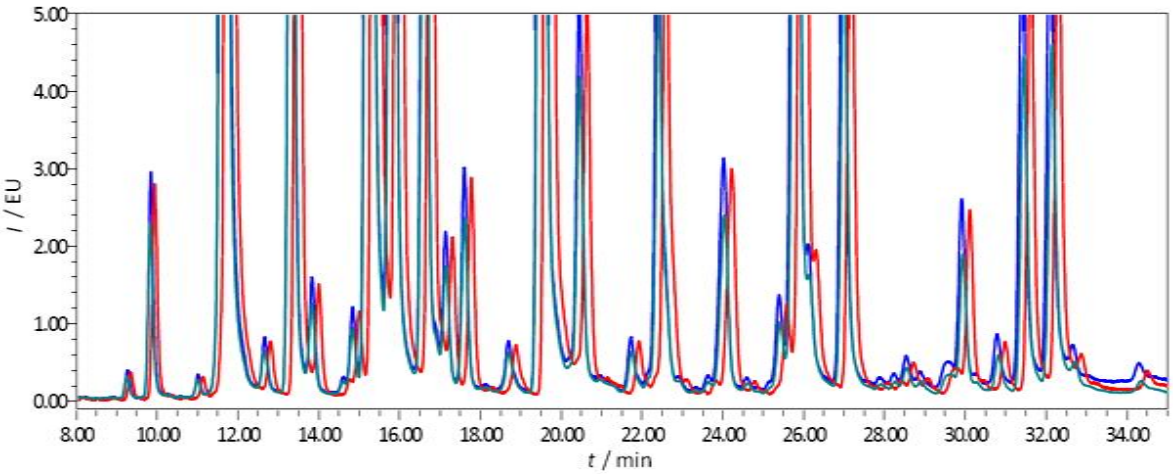
Usporedbom kromatograma uzorka vode analiziranog prije (Voda_**1**) i nakon svih uzoraka (Voda_**2**) vidljiv je pomak nagiba kromatografske bazne linije, koji je veći u slučaju kad su analizirani uzorci glikana pripravljeni bez ispiranja deterdženata prije deglikozilacije (Slika 40 i 41). Sličan rezultat je dobiven i usporedbom kromatograma standarda glikana IgG-a (Slika 42 i 43).



Slika 40. Pomak nagiba bazne linije u kromatogramu uzorka Voda_2 analiziranog nakon uzoraka pripravljenih **s ispiranjem deterdženata** prije deglikozilacije na *Omega 10k* membrani (crveno), u odnosu na baznu liniju u kromatogramu uzorka Voda_1 analiziranog na početku analize seta uzoraka (zeleno). Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani uz linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 μL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije



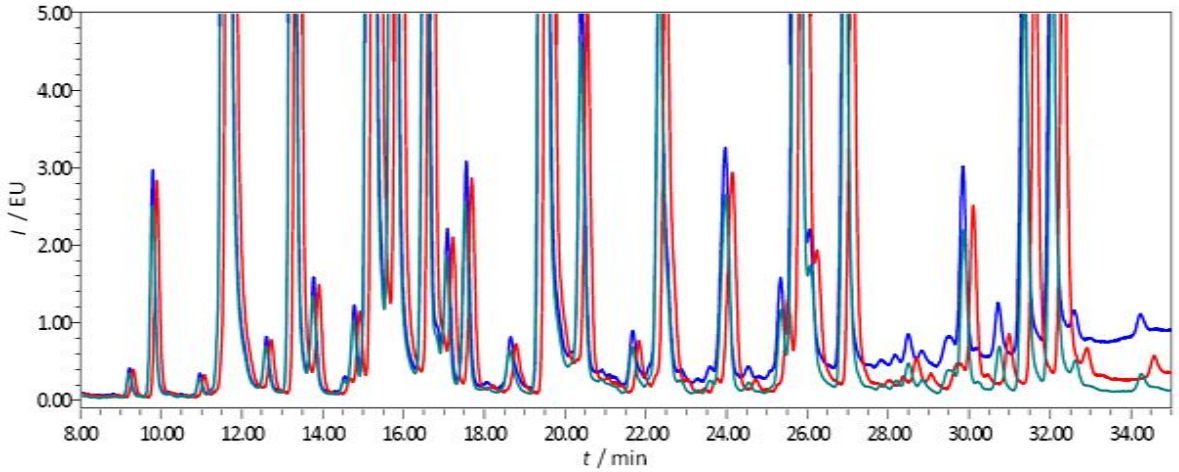
Slika 41. Pomak nagiba bazne linije u kromatogramu uzorka Voda_2 analiziranog nakon uzoraka pripravljenih **bez ispiranja deterdženata** prije deglikozilacije na *Omega 10k* membrani (crveno), u odnosu na baznu liniju u kromatogramu uzorka Voda_1 analiziranog na početku analize seta uzoraka (zeleno). Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani uz linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 µL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije



Slika 42. Pomak nagiba bazne linije u kromatogramu uzorka IgG Pool 3_3 analiziranog nakon uzoraka pripravljenih **s ispiranjem deterdženata** prije deglikozilacije na *Omega 10k* membrani (plavo), u odnosu na baznu liniju u kromatogramu uzorka IgG Pool 3_1 analiziranog na početku analize seta uzoraka (zeleno) i baznu liniju u kromatogramu uzorka IgG Pool 3_2 analiziranog nakon analize 16 uzoraka (crveno). Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani uz linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 µL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije

U kromatogramima samih uzoraka, u slučaju kad su uzorci pripravljeni s ispiranjem deterdženata, pomak nagiba kromatografske bazne linije je bio do 0,7 EU, dok je u kromatogramima uzoraka pripravljenih bez ispiranja deterdženata bio čak do 2,75 EU. Najveći pomak uočen je u kromatogramima uzoraka pročišćenih ispiranjem sa 100 %-tnim acetonitrilom. Međutim, kad su uzorci analizirani metodom HILIC-UPLC obrnutim redoslijedom – najprije oni pročišćeni sa 100 %-tnim acetonitrilom, a zatim uzorci pročišćeni s 98 %-tnim te 96 %-tnim acetonitrilom – također je uočen veći pomak nagiba bazne linije u

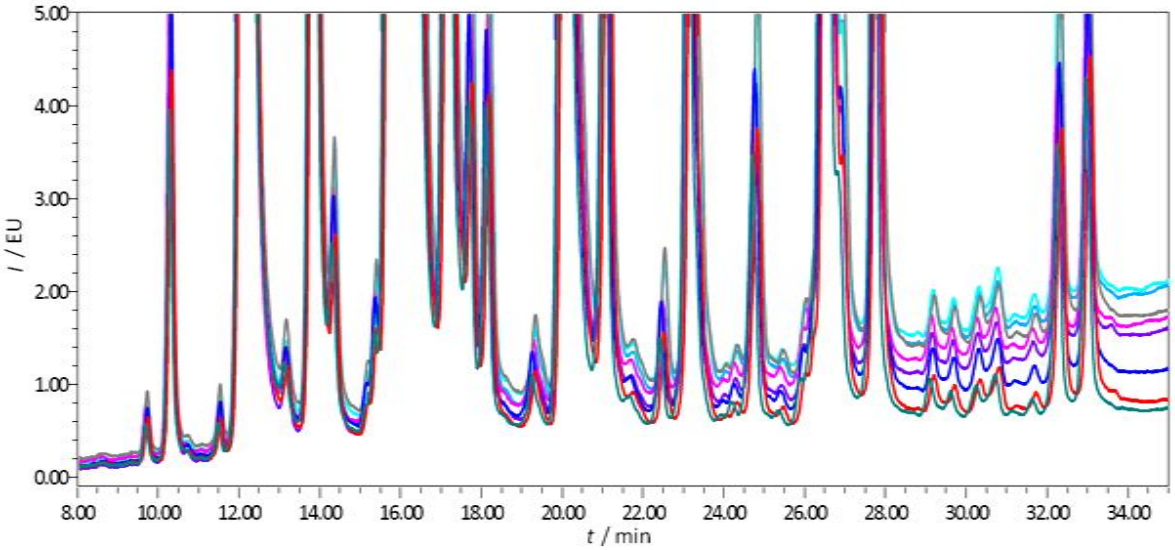
kromatogramima kasnije analiziranih uzoraka što upućuje na djelomično zaostajanje nečistoća na koloni. Zanimljivo je da su pikovi u kromatogramima svih uzoraka pripravljenih bez ispiranja deterdženata imali približno jednake intenzitete (236 ± 26 EU, n = 24), za razliku od pikova u kromatogramima uzoraka pripravljenih s ispiranjem deterdženata čiji su intenziteti znatno varirali (193 ± 68 EU, n = 24).



Slika 43. Pomak nagiba bazne linije u kromatogramu uzorka IgG Pool 3_3 analiziranog nakon analize uzoraka pripravljenih **bez ispiranja deterdženata** prije deglikozilacije na *Omega 10k* membrani (plavo), u odnosu na baznu liniju u kromatogramu uzorka IgG Pool 3_1 analiziranog na početku analize seta uzoraka (zeleno) i baznu liniju u kromatogramu uzorka IgG Pool 3_2 analiziranog nakon analize 16 uzoraka (crveno). Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani metodom HILIC-UPLC u linearnom gradijentu od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 µL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije

Navedeni problemi nisu bili prisutni u prijašnjoj metodi, te se postavilo pitanje jesu li nečistoće u uzorcima posljedica neučinkovitog pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnoj 0,2 µm *GHP* pločici. Da bi se to provjerilo, ponovljen je eksperiment deglikozilacije IgG-a (300 µg, provedeno osam puta) na *Omega 10k* membrani bez ispiranja deterdženata, ali s pročišćavanjem fluorescentno obilježenih glikana na celulozi (0,1 g mL^{-1} u vodi) uz ispiranje hladnim 96 %-tnim ili 98 %-tnim acetonitrilom u vodi te sa 100 %-tnim acetonitrilom. Dobiveni su podjednaki rezultati te je eksperiment još jednom ponovljen, ali s pročišćavanjem na hidrofilnom 0,2 µm *GHP* filtru i celulozi (0,1 g mL^{-1} u vodi) uz ispiranje hladnim 80 %-tnim acetonitrilom u vodi. Svaki uvjet je testiran po osam puta obradom oko 300 µg IgG-a, kao u ranijim eksperimentima. Čak i u slučaju pročišćavanja na celulozi uz 80 %-tni acetonitril u kromatogramima je uočen znatan pomak nagiba bazne linije (Slika 44), što

isključuje promjenu načina pročišćavanja u razvijenoj metodi kao uzrok novonastalog problema.



Slika 44. Pomak nagiba bazne linije u kromatogramima uzoraka glikana IgG-a pripravljenih **bez ispiranja deterdženata** prije deglikozilacije na *Omega 10k* membrani, te pročišćenih na celulozi (0,1 g mL^{-1} u vodi) uz ispiranje hladnim 80 %-tnim acetonitrilom u vodi. Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani metodom HILIC-UPLC u linearnom gradijentu od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 µL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije

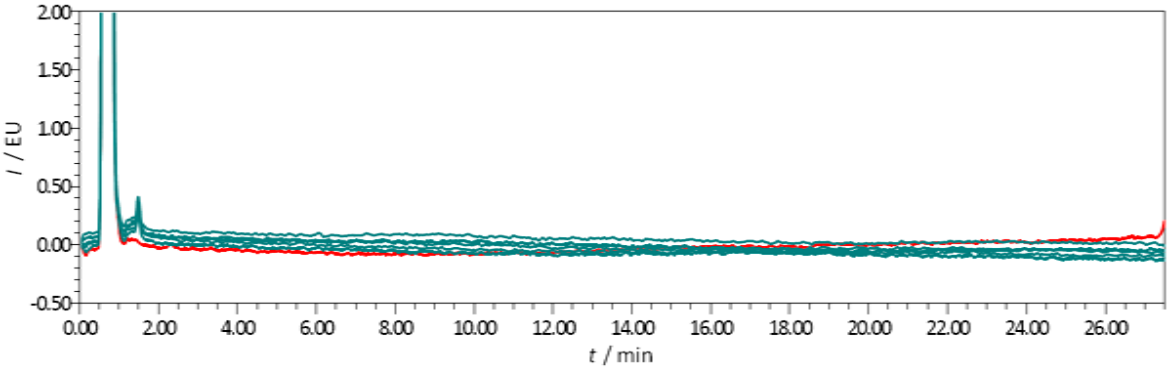
Budući da je jedina značajnija razlika između prijašnje metode deglikozilacije IgG-a u otopini uz pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na celulozi s 80 %-tnim acetonitrilom u vodi i novorazvijene metode deglikozilacije na *Omega 10k* membrani uz pročišćavanje na celulozi u istim uvjetima zapravo upotreba *Omega 10k* membrane, zaključeno je da je uzrok promjene nagiba kromatografske bazne linije sama membrana. Budući da je pomak bazne linije bio veći u kromatogramima uzoraka koji su deglikozilirani bez prethodnog uklanjanja deterdženata s membrane, pretpostavljeno je da neki od korištenih deterdženata nije kompatibilan s membranom u smislu njezine inertnosti na prisustvo deterdženta.

4.8.1. Inertnost *Omega 10k* membrane u prisustvu deterdženata

Kompatibilnost deterdženata za denaturaciju IgG-a (SDS u vodi (γ = 13,3 g L^{-1}) i igepal CA-630 u vodi (φ = 4 %)) te pufera za deglikozilaciju (1x koncentrirani pufer PBS) s *Omega 10k* filtar pločicom ispitana je nakon što je uočen problem s pomakom nagiba kromatografske bazne linije, kako je opisano u Poglavlju 3.5.3.3. Uzorci su pripravljeni bez IgG-a, pa svaki

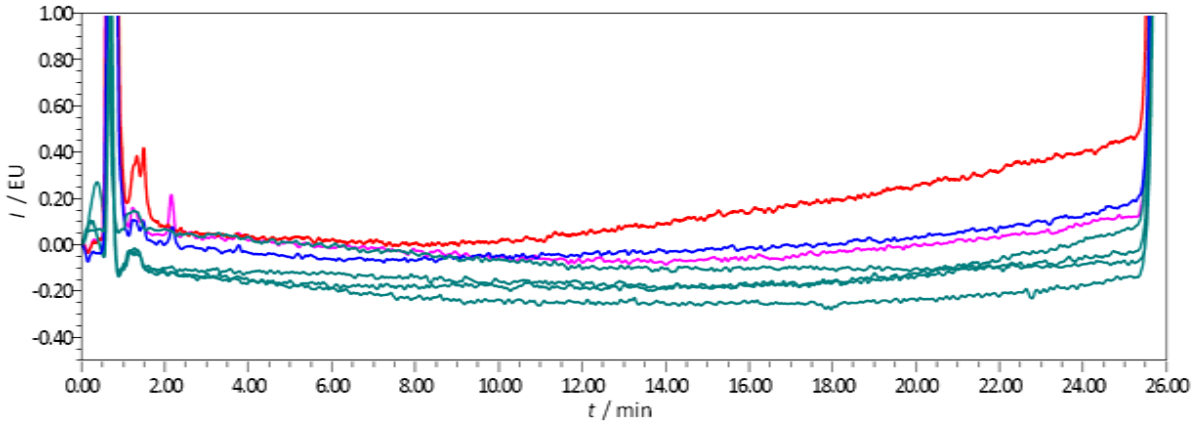
predstavlja svojevrsnu negativnu kontrolu. Fluorescentno obilježeni uzorci pročišćeni su na celulozi (0,1 g mL^{-1} u vodi) uz ispiranje hladnim 80 %-tnim acetonitrilom, budući da se sa sigurnošću može reći da ovaj način pročišćavanja ne uzrokuje pomak nagiba kromatografske bazne linije.

U kromatogramima svih pet skupljenih i fluorescentno obilježenih frakcija ispiranja *Omega 10k* pločice ultra čistom vodom bazna linija bila je ravna, dok je u kromatogramu uzorka koji je sadržavao sve otopine koje se inače koriste za denaturaciju i deglikozilaciju zabilježen mali pomak nagiba bazne linije (Slika 45).



Slika 45. Pomak nagiba bazne linije u kromatogramu uzorka koji sadrži otopine za denaturaciju i deglikozilaciju IgG-a (SDS, igepal CA-630, 5x koncentrirani PBS, crveno) obrađenog na *Omega 10k* membrani, u odnosu na baznu liniju u kromatogramima skupljenih frakcija ispiranja *Omega 10k* membrane ultra čistom vodom (zeleno). Uzorci su nakon fluorescentnog obilježavanja pročišćeni na celulozi (0,1 g mL^{-1} u vodi) uz ispiranje hladnim 80 %-tnim acetonitrilom u vodi. Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani metodom HILIC-UPLC uz linearni gradijent od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 µL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije

Nakon ispiranja kolone od zaostataka nečistoća koje uzrokuju pomak nagiba kromatografske bazne linije analiziran je sljedeći set uzoraka: Voda_1, uzorak koji sadrži samo SDS, Voda_2, uzorak koji sadrži samo igepal CA-630, Voda_3, uzorak koji sadrži samo 5x koncentrirani PBS, Voda_4. Na Slici 46 je vidljivo da igepal CA-630 uzrokuje najveći pomak nagiba kromatografske bazne linije. Sličan eksperiment je napravljen i deglikozilacijom uzorka koji je sadržavao samo SDS, igepal CA-630 i PBS na Milipore *Immobilon-P PVDF* membrani, te je kao rezultat dobivena ravna bazna linija. Tako je potvrđeno da je uzrok pomaka nagiba kromatografske bazne linije nekompatibilnost igepala CA-630 i *Omega 10k* membrane.



Slika 46. Pomak nagiba kromatografske bazne linije uzorka koji sadrži samo SDS (plavo), uzorka koji sadrži samo igepal CA-630 (crveno) te uzorka koji sadrži samo 5x koncentrirani PBS (ružičasto) obrađenih na *Omega 10k* membrani, u odnosu na kromatografsku baznu liniju uzoraka Voda_1, 2, 3 i 4 (zeleno). Nakon fluorescentnog obilježavanja uzorci su pročišćeni na celulozi (0,1 g mL^{-1} u vodi) uz ispiranje hladnim 80 %-tnim acetonitrilom u vodi. Uzorci su pripravljeni u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, te analizirani metodom HILIC-UPLC u linearnom gradijentu od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 µL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije

Budući da primjena *Omega 10k* membrane znatno povećava osjetljivost metode priprave glikana IgG-a za analizu tekućinskom kromatografijom, ali ta membrana nije inertna na prisustvo igepala CA-630, problem se pokušao riješiti ispiranjem membrane s 1x 10 µL, 3x 10 µL, 2x 50 µL ili 1x 100 µL otopine igepala CA-630 u vodi (φ = 4 %), nakon čega je membrana isprana još s 2x 100 µL ultra čiste vode. Potom su na membranu naneseni uzorci IgG-a u otopini (oko 25 µg, n = 24), koji su dalje obrađeni prema optimiranom protokolu. Ni u jednom kromatogramu uzoraka nije uočen pomak nagiba bazne linije, ali su koeficijenti varijacija udjela površina pikova u ukupnoj površini svih pikova bili izrazito visoki, čak i nakon ispiranja pločice s 10 µL 4 %-tnog igepala CA-630 u vodi, što se pokazalo najpovoljnijim (samo za 1 kromatografski pik CV je bio < 5 %, za 2 kromatografska pika od 5 % do 10 %, za 4 kromatografska pika od 10 % do 15 %, te za čak 17 kromatografskih pikova > 15 %, Tablica 21). U nekim eksperimentima su dobivene nešto bolje vrijednosti koeficijenata varijacije ako je *Omega 10k* membrana prethodno isprana s 10 µL 4 %-tnog igepala CA-630 u vodi, ali se ovaj postupak pokazao nereproducibilnim.

Tablica 21. Ispiranje *Omega 10k AcroPrep* filtar pločice s otopinom igepala CA-630 u vodi (φ = 4 %) prije deglikozilacije uzoraka IgG-a (25 μg) uz pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na 0,2 μm *GHP* filtru uz 95 %-tni acetonitril (ohlađen na 4 °C). Naveden je broj kromatografskih pikova s određenim koeficijentom varijacije (CV). n = 24

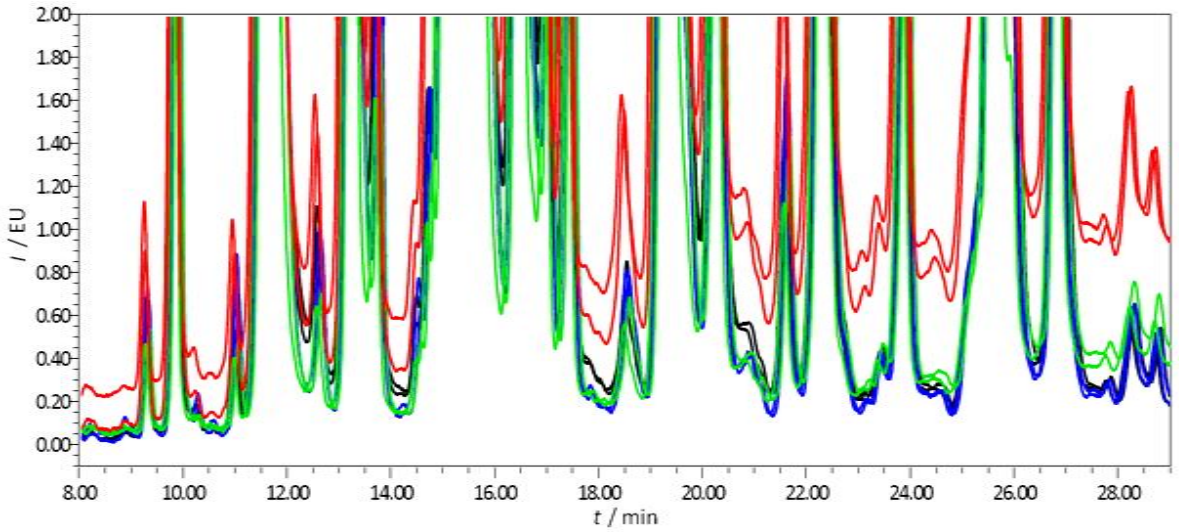
CV / %	1x 10 μL	3x 10 μL	2x 50 μL	1x 100 μL
0 do 5	1	0	0	0
5 do 10	2	2	2	2
10 do 15	4	3	5	4
> 15	17	19	17	18

4.9. Usporedba deglikozilacije u otopini i na *Omega 10k* membrani uz pročišćavanje na celulozi i hidrofilnom *GHP* filtru

Uspoređene su četiri različite metode priprave glikana IgG-a za njihovu analizu metodom HILIC-UPLC, kako je opisano u Poglavlju 3.10. Svaka od metoda je testirana po osam puta s približno 300 μg IgG-a, s tim da je u slučaju deglikozilacije na *Omega 10k* membrani korišten IgG u 0,1 mol L^{-1} amonijevom formijatu. Uspoređene su sljedeće metode: deglikozilacija u otopini uz pročišćavanje na celulozi s 80 %-tnim acetonitrilom u vodi (**A**) i pročišćavanje na hidrofilnom 0,2 μm *GHP* filtru uz 96 %-tni acetonitril u vodi (**B**), deglikozilacija u otopini uz filtriranje uzoraka kroz *Omega 10k* membranu radi uklanjanja proteina prije fluorescentnog obilježavanja glikana (**C**), te deglikozilacija na *Omega 10k* membrani bez ispiranja deterdženata (**D**). Svi uzorci koji su filtrirani ili deglikozilirani na *Omega 10k* membrani pročišćeni su nakon fluorescentnog obilježavanja glikana na hidrofilnom 0,2 μm *GHP* filtru uz 96 %-tni acetonitril u vodi.

U kromatogramima uzoraka koji su deglikozilirani na *Omega 10k* membrani uočen je značajan pomak u nagibu bazne linije, a isto tako, iako nešto manji, i u kromatogramima uzoraka koji su samo profiltrirani nakon deglikozilacije kroz *Omega 10k* membranu. Stoga ti kromatogrami nisu dalje obrađivani. Budući da su prilikom prve analize uzorci analizirani tekućinskom kromatografijom redoslijedom **A**, **B**, **C**, **D** (vidi iznad), postojala je mogućnost da je izraženi pomak u nagibu bazne linije u kromatogramima uzoraka **D** zapravo rezultat djelomično zaostalog i akumuliranog igepala na kromatografskoj koloni, a ne odraz zaostale

količine deterdženta u uzorcima. Zbog toga je po dva uzorka iz svake skupine analizirano obrnutim redoslijedom: **D**, **C**, **B**, **A**, između čega je po dva puta injektirana ultra čista voda, kako bi se vidjelo prenosi li se pomak u nagibu bazne linije u kromatograme kasnije injektiranih uzoraka. I u ovom slučaju je dobiven isti rezultat, s najvećim pomakom u nagibu bazne linije u kromatogramima uzoraka **D** (Slika 47).



Slika 47. Pomak nagiba bazne linije u kromatogramima uzoraka IgG-a deglikoziliranih na *Omega 10k* membrani (uzorci **D**, crveno), te u kromatogramima uzoraka deglikoziliranih u otopini i profiltriranih kroz *Omega 10k* membranu (uzorci **C**, zeleno) u odnosu na baznu liniju u kromatogramima uzoraka deglikoziliranih u otopini i pročišćenih na hidrofilnom 0,2 μm *GHP* filtru uz 96 %-tni acetonitril u vodi (uzorci **B**, plavo) ili na celulozi (0,1 g mL^{-1} u vodi) uz 80 %-tni acetonitril u vodi (uzorci **A**, crno). Uzorci **C** i **D** su nakon obilježavanja pročišćeni na hidrofilnom 0,2 μm *GHP* filtru uz 96 %-tni acetonitril u vodi. Pripravljeni uzorci pročišćenih fluorescentno obilježenih glikana u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, analizirani su metodom HILIC-UPLC u linearnom gradijentu od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 μL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije

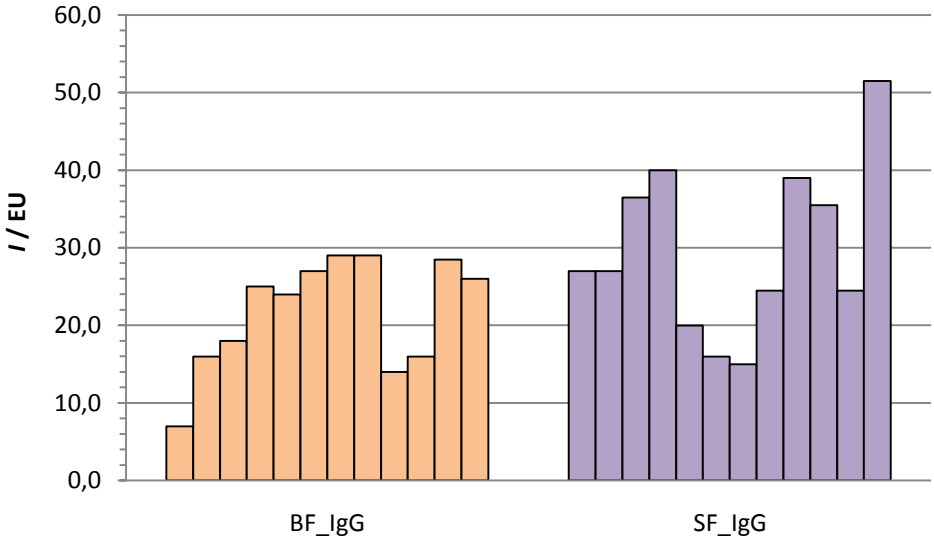
Pikovi u kromatogramima uzoraka deglikoziliranih u otopini imali su slične intenzitete (**A**: 121 ± 35 EU, **B**: 151 ± 55 EU, **C**: 119 ± 24 EU), dok je deglikozilacija na *Omega 10k* membrani rezultirala otprilike dvostruko većim intenzitetima pikova (**D**: 276 ± 48 EU), n = 8 u svim slučajevima. Pikovi u kromatogramima uzoraka **A** i **B** su integrirani i normalizirani prema standardnom postupku. U kromatogramima uzoraka pročišćenih na celulozi s hladnim 80 %-tnim acetonitrilom u vodi koeficijenti varijacije udjela površine pojedinih pikova u ukupnoj površini svih pikova su za 22 pika bili < 5 %, a za 2 pika od 5 % do 10 %, n = 8, dok su u kromatogramima uzoraka pročišćenih na hidrofilnom *GHP* filtru uz hladni 96 %-tni acetonitril koeficijenti varijacije bili za 16 pikova < 5 %, za 3 pika od 5 % do 10 %, te za 5 pikova od 10 % do 15 %, n = 8. Iako su pročišćavanjem na celulozi u ovom konkretnom

eksperimentu postignuti bolji koeficijenti varijacija nego pročišćavanjem na hidrofilnom *GHP* filtru, s obzirom na ranije navedene probleme s periodičnom pojavom pikova celuloze (Poglavlje 4.3.) u pojedinim kromatogramima, deglikozilacija u otopini s pročišćavanjem fluorescentno obilježenih glikana na 0,2 μm hidrofilnom *GHP* filtru uz hladni 96 %-tni acetonitril u vodi odabrana je kao optimalna i najjeftinija metoda priprave glikana IgG-a za analizu tekućinskom kromatografijom.

4.10. Pokušaj povećanja osjetljivosti metode priprave glikana IgG-a za analizu tekućinskom kromatografijom

U eksperimentima u kojima je deglikozilacija IgG-a rađena na *Omega 10k* membrani postignuti su i do dva puta veći intenziteti kromatografskih pikova u odnosu na pikove u kromatogramima uzoraka deglikoziliranih u otopini. Razlog tome je što se deglikozilacijom na *Omega 10k* membrani prilikom nanošenja uzorka uklanjaju soli (0,1 mol L^{-1} amonijev formijat) zbog čega je reakcija deglikozilacije teorijski učinkovitija, te nakon deglikozilacije filtrat sadrži slobodne glikane bez proteinskog dijela IgG-a, što za posljedicu ima i učinkovitiju reakciju obilježavanja fluorescentnom bojom. S obzirom na probleme s nekompatibilnošću *Omega 10k* membrane s igepalom CA-630, te razlike između pojedinih pločica, osjetljivost optimirane metode deglikozilacije IgG-a u otopini uz pročišćavanje na hidrofilnom *GHP* filtru se pokušala povećati dodatnim testiranjem Milipore *Immobilon-P PVDF* membrane, i to konkretno filtriranjem reakcijske smjese nakon deglikozilacije IgG-a radi uklanjanja proteinskog dijela prije fluorescentnog obilježavanja slobodnih glikana. Paralelno je napravljena deglikozilacija na *Immobilon-P PVDF* membrani, prema protokolu **e)** opisanom u Poglavlju 3.5.2, te filtriranje kroz *Immobilon-P* membranu nakon deglikozilacije u otopini opisane u Poglavlju 3.6.1. Za deglikozilaciju je korišteno 1,25 U PNGaze F (Promega). Oba eksperimenta su napravljena u po 16 puta obradom oko 300 μg IgG-a. Slobodni glikani su nakon obilježavanja fluorescentnom bojom pročišćeni od suviška reagensa na hidrofilnom 0,2 μm *GHP* filtru uz hladni 96 %-tni acetonitril u vodi. Deglikozilacija na membrani je kao i u ranijim eksperimentima rezultirala vrlo varijabilnim intenzitetima kromatografskih pikova (24 ± 19 EU, n = 16), s tim da je intenzitet pikova u

kromatogramima 5 od 16 uzoraka bio niži od 10 EU. Filtriranje kroz membranu je suprotno tome rezultiralo uniformnijim i višim intenzitetima kromatografskih pikova (96 ± 10 EU, n = 16), te niskim koeficijentima varijacije udjela površine pojedinih pikova u ukupnoj površini svih pikova (za 22 od 24 kromatografska pika CV je bio < 5 %, a za 2 kromatografska pika od 5 % do 10 %). U sljedećem eksperimentu je ispitano koliki utjecaj na osjetljivost metode ima filtriranje reakcijske smjese kroz *Immobilon-P* membranu nakon deglikozilacije na način da su paralelno pripravljeni uzorci koji nakon deglikozilacije jesu ili nisu filtrirani kroz *Immobilon-P* membranu (za svaki uvjet eksperiment je proveden 12 puta obradom oko 350 µg IgG-a). Rezultati su pokazali da, suprotno od očekivanog, samo neki od uzoraka koji su nakon deglikozilacije filtrirani kroz membranu imaju veći intenzitet kromatografskih pikova u odnosu na pikove u kromatogramima uzoraka koji nisu filtrirani kroz membranu (Slika 48).



Slika 48. Usporedba intenziteta pikova u kromatogramima uzoraka filtriranih kroz Milipore *Immobilon-P PVDF* hidrofobnu membranu (SF_IgG) nakon deglikozilacije IgG-a u otopini i kromatogramima uzoraka koji nisu filtrirani kroz membranu nakon deglikozilacije (BF_IgG). Slobodni glikani su nakon obilježavanja pročišćeni na hidrofilnom 0,2 µm *GHP* filtru uz hladni 96 %-tni acetonitril u vodi. Pripravljeni uzorci pročišćenih fluorescentno obilježenih glikana u acetonitrilu, ψ(uzorak, acetonitril) = 20:80, analizirani su metodom HILIC-UPLC u linearnom gradijentu od 25 do 38 % volumnog udjela 100 mmol L^{-1} amonijeva formijata pH 4,4 u acetonitrilu pri protoku od 0,4 mL min^{-1} tijekom 25 minuta. V_{inj} = 40 µL, T_{kolone} = 60 °C, $T_{uzoraka}$ = 5 °C, λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm. EU – jedinica emisije

Paralelno su na isti način deglikozilirani i uzorci cjelokupnih proteina plazme, za što je 10 µL plazme denaturirano nakon dodatka 20 µL SDS-a u vodi (γ = 20 g L^{-1}), te dalje obrađeno prema istom protokolu kao i IgG. Ni u ovom slučaju nije zamijećeno značajno poboljšanje intenziteta kromatografskih pikova. U uzorcima koji su profiltrirani kroz *Immobilon-P* membranu nakon deglikozilacije uočeno je nastajanje karakterističnog taloga proteina nakon

dodatka smjese za fluorescentno obilježavanje glikana, te dodatkom acetonitrila netom prije prenošenja na hidrofilnu *GHP* membranu, za što je razlog najvjerojatnije nizak kapacitet *Immobilon-P* membrane za vezanje proteina. S obzirom na neznatno povećanje intenziteta pikova u kromatogramima uzoraka koji su filtrirani nakon deglikozilacije kroz *Immobilon-P* membranu u odnosu na pikove u kromatogramima nefiltriranih uzoraka te na dodatni trošak koji predstavlja uvođenje ovog koraka (membrana se može koristiti samo jednom), uzorci su dalje pripravljani bez filtriranja, a razvijena metoda dodatno je testirana i validirana kako je opisano u nastavku.

4.11. Validacija razvijene metode deglikozilacije IgG-a u otopini uz pročišćavanje obilježenih glikana na hidrofilnom filtru

4.11.1. Analiza varijacije pojedinih koraka razvijene metode priprave glikana IgG-a za analizu tekućinskom kromatografijom

Varijacija koju unose pojedini koraci razvijene metode priprave i analize glikana IgG-a (deglikozilacija, obilježavanje slobodnih glikana fluorescentnom bojom, pročišćavanje obilježenih glikana od suviška reagensa, te analiza pročišćenih glikana metodom HILIC-UPLC) ispitana je na način da su uzorci spojeni u određenim koracima priprave, te nakon miješanja ponovno razdijeljeni, čime se uklanja varijacija koju unose svi prethodni koraci analize, kako je opisano u Poglavlju 3.13.1., Slika 11. Uzorak IgG-a je alikvotiran u dvije pločice tako da je u svakoj jažici bilo po 100 μg IgG-a. Alikvoti uzoka su osušeni u vakuum centrifugi prije deglikozilacije u otopini.

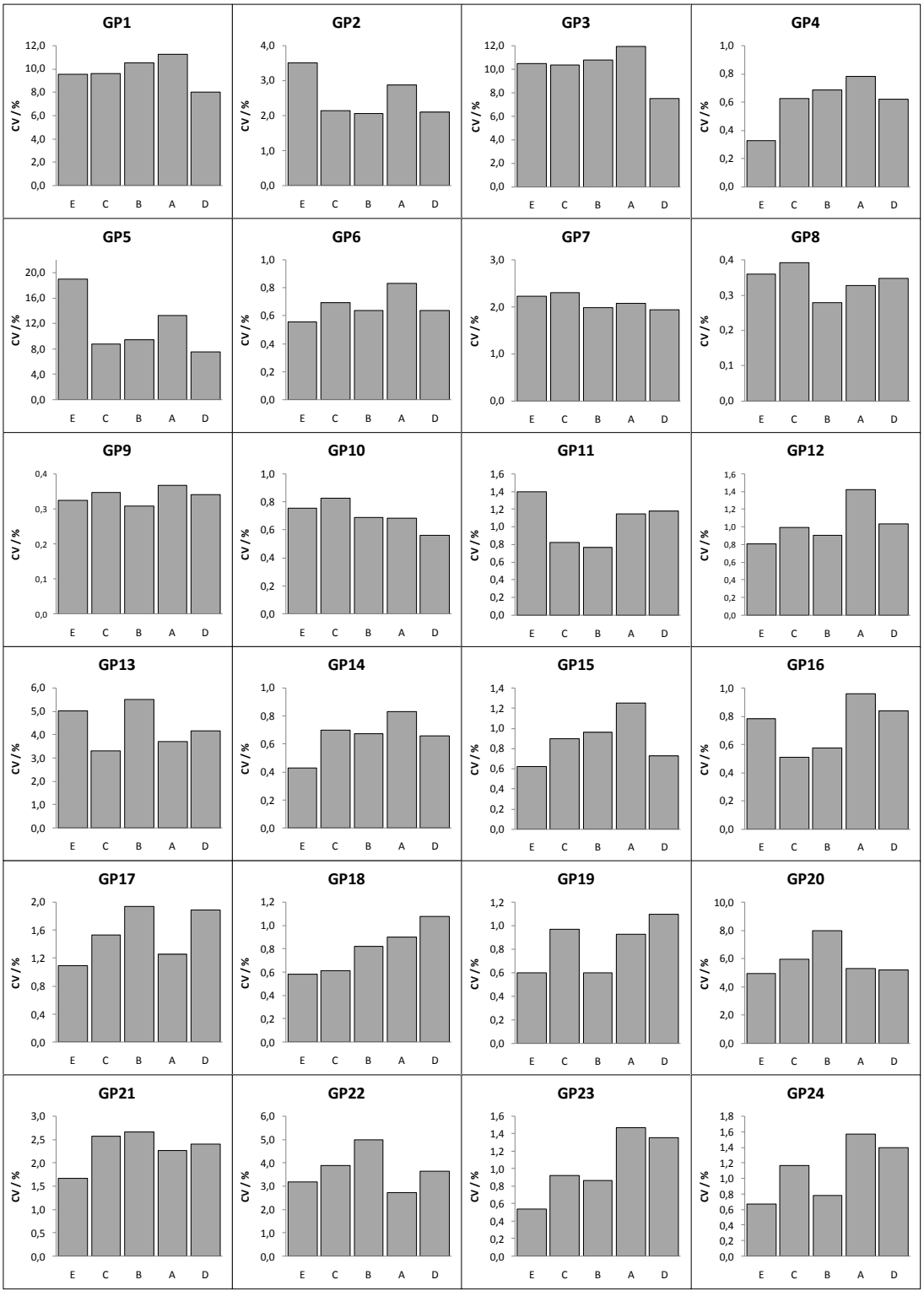
Rezultati analize uzoraka **D** bi teorijski trebali imati najviše koeficijente varijacije udjela površine pojedinih pikova u ukupnoj površini svih pikova s obzirom da uzorci nisu spojeni niti u jednom koraku, te konačni rezultat sadrži pogrešku cjelokupne metode. Međutim, iz Tablice 22 je vidljivo da ovi uzorci imaju najniže koeficijente varijacije udjela površine kromatografskih pikova. Usporedbom s pikovima u kromatogramima ostalih uzoraka (**A**, **B**, **C** i **E**) vidljivo je da svi odreda imaju vrlo niske koeficijente varijacije (za 18 do 20 kromatografskih pikova CV je bio < 5 %), koji su na razini pogreške kromatografske metode (vidi Tablicu 9 – Validacija metode HILIC-UPLC).

Usporedbom koeficijenata varijacije udjela površina pojedinačnih glikanskih pikova (GP1 do GP24) u kromatogramima svake skupine uzoraka općenito se ne uočava očekivani trend porasta koeficijenata varijacije u nizu **E** ≈ **C** < **B** < **A** < **D**, osim za GP18 (Slika 49). Međutim, vidljivo je da se radi o vrlo malim vrijednostima koeficijenata varijacije. Za samo 5 od ukupno 24 kromatografskih pikova neka od vrijednosti CV-a viša je od 5 %, te je očekivane razlike najvjerojatnije zbog toga teško uočiti. Vrlo niski koeficijenti varijacije i njihova raspodjela bez određenog trenda i/ili značajnih skokova između pojedine skupine uzoraka znače da niti jedan od koraka u pripravi uzoraka ne unosi značajnu pogrešku u konačni rezultat analize.

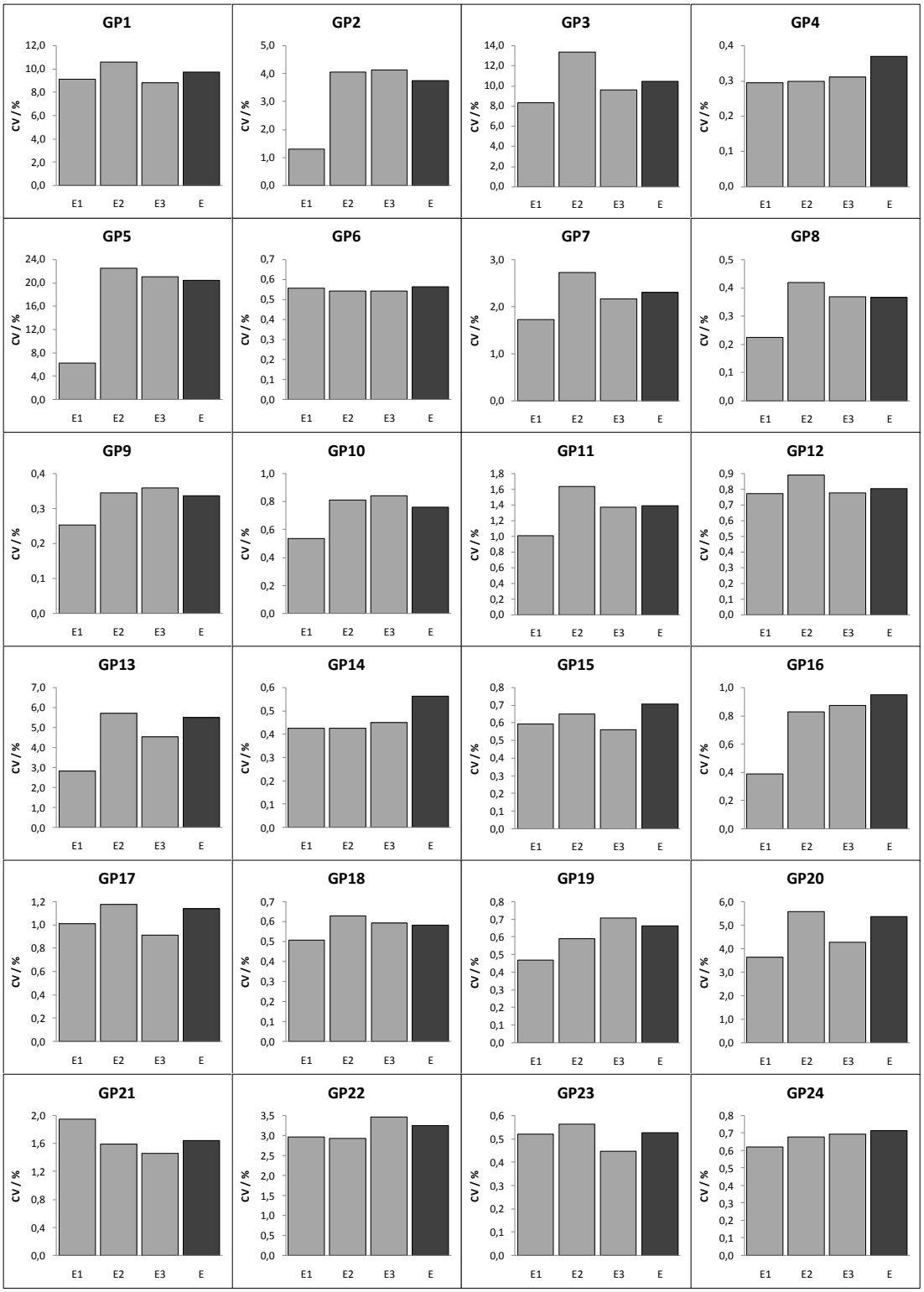
Tablica 22. Analiza varijacije novorazvijene metode priprave glikana IgG-a za analizu tekućinskom kromatografijom (HILIC-UPLC). Uzorci su spajani u različitim koracima analize te nakon miješanja ponovno razdijeljeni u novu pločicu, kako bi se uklonila varijacija svih prethodnih koraka. **A** – uzorci spojeni nakon deglikozilacije u otopini, **B** – uzorci spojeni nakon obilježavanja slobodnih glikana 2-AB-om, **C** – uzorci spojeni nakon pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom *GHP* filtru uz hladni 96 %-tni acetonitril u vodi, **D** – uzorci nisu spajani niti u jednom koraku, **E** - uzorci koji su nakon cjelokupne priprave spojeni, promiješani i alikvotirani u novu PCR pločicu, radi testiranja varijacije koju unosi samo kromatografska analiza. Naveden je broj kromatografskih pikova s određenim koeficijentom varijacije (CV). *n* = 24 (**A** do **D**), *n* = 96 (**E**)

CV / %	A	B	C	D	E
0 do 5	20	18	20	20	20
5 do 10	1	4	3	4	2
10 do 15	3	2	1	0	1
> 15	0	0	0	0	1

Kromatografskom analizom triju setova uzoraka **E** (**E1**, **E2** i **E3**) u periodu od tri dana uočeno je da su za udjele površina 12 kromatografskih pikova u kromatogramima seta **E2** koeficijenti varijacija nešto viši nego u ostala dva seta analiziranih uzoraka (Slika 50). Bitno je naglasiti da se radi o malim pikovima za koje je poznato da su podložniji većim varijacijama (vidi Sliku 14) budući da su njihove površine često na granici kvantifikacije, a nalaze se uz velike kromatografske pikove, zbog čega i male promjene u kromatografskom razdvajanju znatno utječu na udio površine koju navedeni mali pikovi zauzimaju u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu. Isto tako, budući da se radi o malim udjelima površine i promjene od primjerice 0,01 % ili 0,02 % znatno povećavaju koeficijent varijacije udjela površina navedenih pikova u ukupnoj površini.



Slika 49. Analiza varijacije novorazvijene metode priprave glikana IgG-a za analizu tekućinskom kromatografijom (HILIC-UPLC). Uzorci su spajani u različitim koracima analize te nakon miješanja ponovno razdijeljeni u novu pločicu, kako bi se uklonila varijacija svih prethodnih koraka. **E** - uzorci koji su nakon cjelokupne priprave spojeni, promiješani i alikvotirani u novu PCR pločicu, radi testiranja varijacije koju unosi samo kromatografska analiza, **C** – uzorci spojeni nakon pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom *GHP* filtru uz hladni 96 %-tni acetonitril u vodi, **B** – uzorci spojeni nakon obilježavanja slobodnih glikana 2-AB-om, **A** – uzorci spojeni nakon deglikozilacije u otopini, **D** – uzorci nisu spajani niti u jednom koraku. $n = 24$ (**A** do **D**), $n = 96$ (**E**)

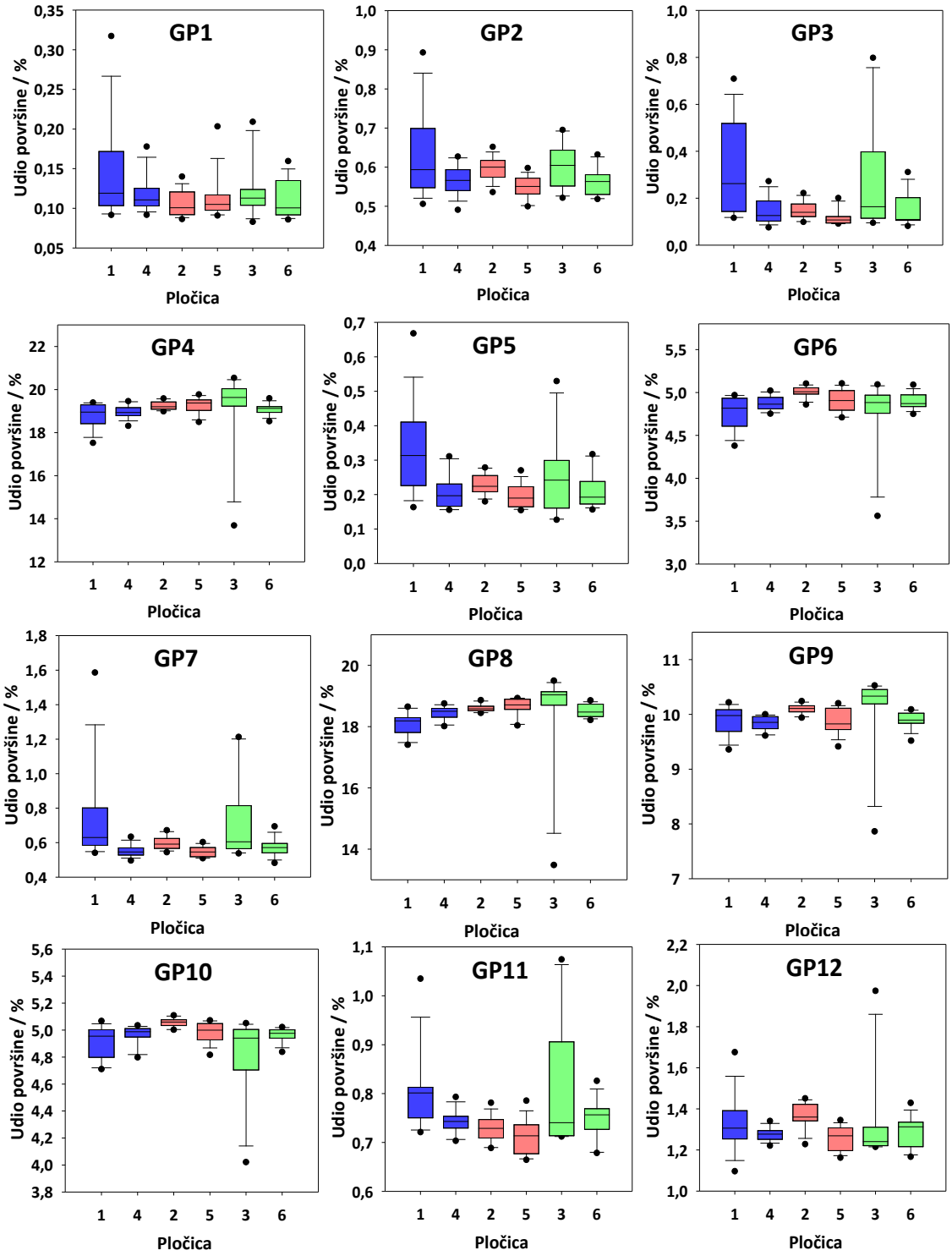


Slika 50. Analiza varijacije novorazvijene metode priprave glikana IgG-a za analizu tekućinskom kromatografijom (HILIC-UPLC). Svih 96 uzoraka je spojeno nakon deglikozilacije u otopini te pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom 0,2 μm *GHP* filtru s hladnim 96 %-tnim acetonitrilom u vodi, promiješano i alikvotirano u novu PCR pločicu, radi testiranja varijacije koju unosi samo kromatografska analiza (tamnosivo, **E**). Uzorci su analizirani u ukupno tri seta uzoraka (svijetlosivo, **E1** do **E3**) u periodu od tri dana. **E1** – prva četiri stupca uzoraka, analizirana prvi dan, **E2** – druga četiri stupca uzoraka, analizirana drugi dan, **E3** – zadnja četiri stupca uzoraka, analizirana treći dan. *n* = 32 (**E1** do **E3**), *n* = 96 (**E**)

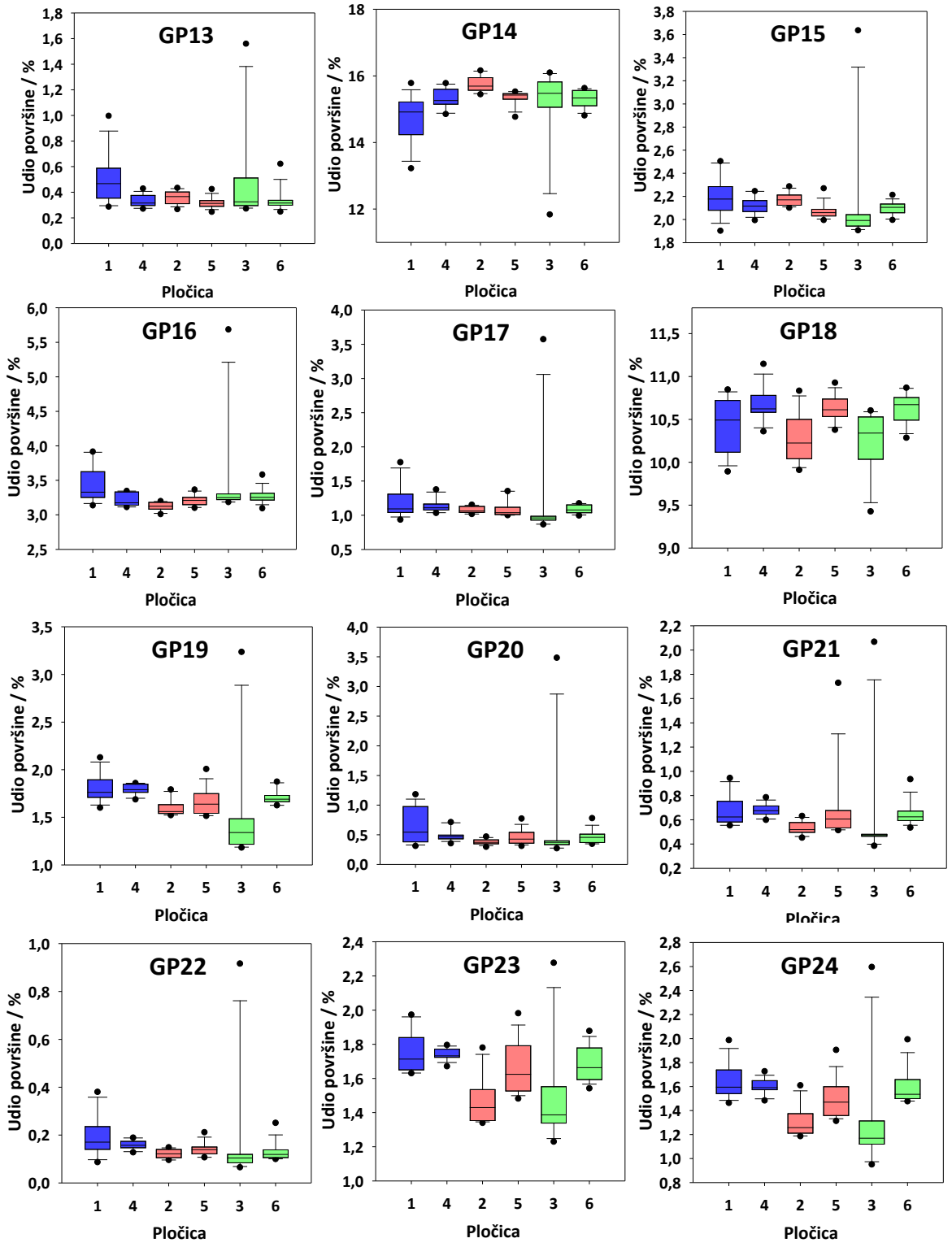
4.11.2. Ponovljivost i rigidnost metode – utjecaj dana i analitičara na varijaciju metode

Ponovljivost optimirane metode (utjecaj dana), te njezina rigidnost (utjecaj analitičara) određena je analizom po jedne pločice s 96 uzoraka od strane triju analitičara u istim danima u razmaku od tri tjedna (Poglavlje 3.13.2.). Svaki analitičar je napravio cjelovitu pripravu uzoraka: iz početnih uzoraka plazme izoliran je IgG, prema standardnoj metodi opisanoj u Poglavlju 3.13.2.1., a svaka pločica je sadržavala 14 standarda (istih početnih uzoraka plazme). IgG je nakon sušenja u vakuum centrifugi deglikoziliran u otopini uz 1,25 U PNGaze F (Promega), a fluorescentno obilježeni glikani su pročišćeni na hidrofilnom 0,2 μm *GHP AcroPrep* filtru (Pall) uz ispiranje s na 4 °C ohlađenim 96 %-tnim acetonitrilom u vodi optimiranom metodom opisanom u Poglavljima 3.13.2.2 i 3.13.2.3. Fluorescentno obilježeni pročišćeni glikani su analizirani validiranom metodom HILIC-UPLC.

Usporedbom kromatograma standarda analiziranih od strane triju analitičara u dva različita dana u razmaku od tri tjedna vidljivo je da standardi na pločicama 1 i 3 imaju nešto veću varijabilnost pikova GP1, GP2, GP3, GP5, GP7, GP10, GP11, GP13 i GP20 u odnosu na standarde na ostalim pločicama (Slike 51 i 52, Tablica 23). Isto tako, u kromatogramima standarda na pločici 3 uočava se širok raspon vrijednosti udjela površine gotovo svih glikanskih pikova u ukupnoj površini, što može biti posljedica jednog ili nekoliko mjerenja koja odstupaju od ostalih te povećavaju varijabilnost. Važno je napomenuti da su za usporedbu uzeti u obzir kromatogrami svih uzoraka, uključujući i one u kojima su površine pikova bile ispod granice kvantifikacije (omjer signala i šuma bazne linije < 10), što je najvjerojatnije razlog uočenih odstupanja.



Slika 51. Utjecaj analitičara i dana na ponovljivost razvijene metode deglikozilacije IgG-a u otopini uz pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom 0,2 µm *GHP* filtru s hladnim 96 %-tnim acetonitrilom u vodi. Prikazan je udio površine koji zauzimaju glikanski pikovi GP1 do GP12 standarda u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu s obzirom na analitičara i dan priprave uzoraka. Analitičar 1 - plavo, analitičar 2 – crveno, analitičar 3 – zeleno. Pločice 1, 2 i 3 su pripravljene isti dan, a pločice 4, 5 i 6 isti dan tri tjedna kasnije. n = 14

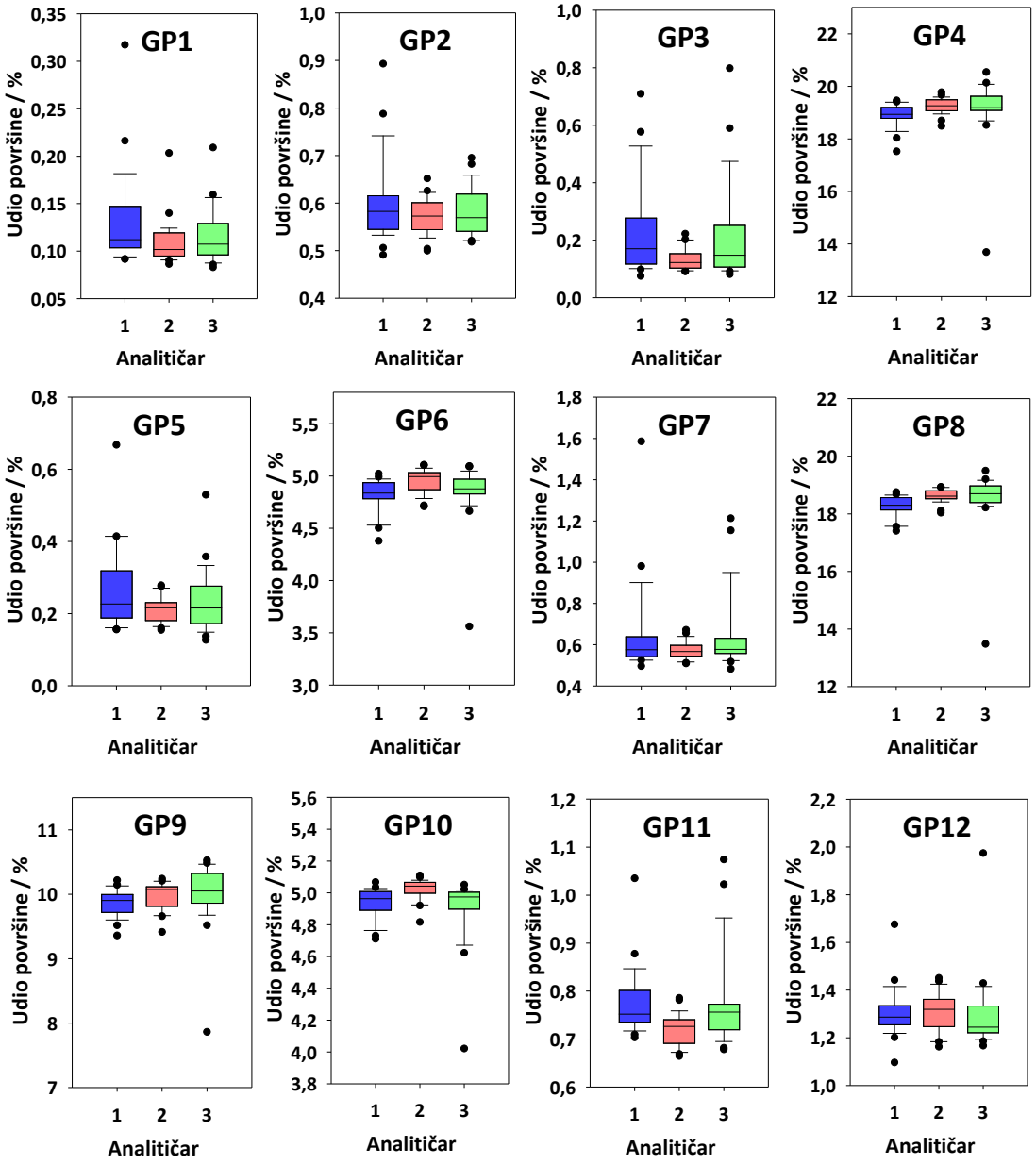


Slika 52. Utjecaj analitičara i dana na ponovljivost razvijene metode deglikozilacije IgG-a u otopini uz pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom 0,2 µm *GHP* filtru s hladnim 96 %-tnim acetonitrilom u vodi. Prikazan je udio površine koji zauzimaju glikanski pikovi GP13 do GP24 standarda u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu s obzirom na analitičara i dan priprave uzoraka. Analitičar 1 - plavo, analitičar 2 – crveno, analitičar 3 – zeleno. Pločice 1, 2 i 3 su pripravljene isti dan, a pločice 4, 5 i 6 isti dan tri tjedna kasnije. n = 14

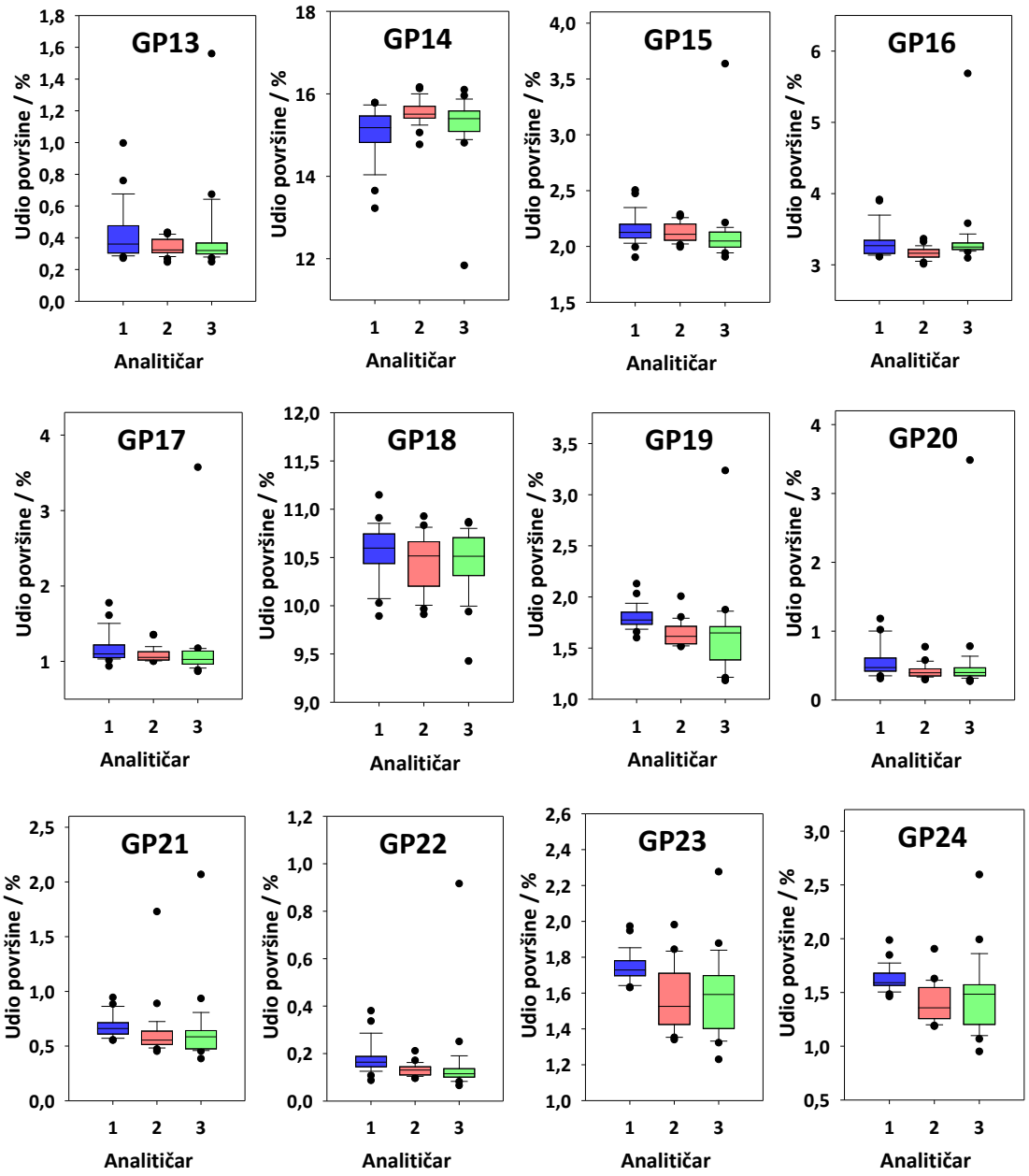
Tablica 23. Ponovljivost novorazvijene metode deglikozilacije IgG-a u otopini uz pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom 0,2 μm *GHP* filtru s hladnim 96 %-tnim acetonitrilom u vodi i analizu HILIC-UPLC-om obzirom na dan priprave i analize uzorka i na analitičara. Prikazana je srednja vrijednost udjela površine pojedinog kromatografskog pika u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu ± standardna devijacija tog udjela površine (SD). $n = 14$

Kromatografski pik	Analitičar 1		Analitičar 2		Analitičar 3	
	Dan 1	Dan 2	Dan 1	Dan 2	Dan 1	Dan 2
GP1	0,14 ± 0,06	0,12 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,02
GP2	0,63 ± 0,11	0,57 ± 0,04	0,60 ± 0,03	0,55 ± 0,03	0,60 ± 0,06	0,56 ±0,04
GP3	0,32 ± 0,19	0,14 ± 0,06	0,15 ± 0,04	0,12 ± 0,03	0,28 ± 0,23	0,15 ± 0,07
GP4	18,82 ± 0,55	18,98 ± 0,29	19,26 ± 0,20	19,27 ± 0,36	19,20 ± 1,87	19,10 ± 0,26
GP5	0,32 ± 0,13	0,21 ± 0,05	0,23 ± 0,03	0,20 ± 0,03	0,26 ± 0,11	0,21 ± 0,05
GP6	4,77 ± 0,19	4,88 ± 0,08	5,01 ± 0,06	4,91 ± 0,13	4,78 ± 0,42	4,90 ± 0,09
GP7	0,74 ± 0,28	0,55 ± 0,03	0,60 ± 0,04	0,55 ± 0,03	0,72 ± 0,24	0,57 ± 0,05
GP8	18,10 ± 0,37	18,45 ± 0,22	18,61 ± 0,13	18,66 ± 0,28	18,51 ± 1,69	18,51 ± 0,20
GP9	9,90 ± 0,26	9,84 ± 0,13	10,10 ± 0,08	9,89 ± 0,23	10,13 ± 0,76	9,91 ± 0,15
GP10	4,91 ± 0,12	4,97 ± 0,07	5,06 ± 0,03	4,99 ± 0,07	4,83 ± 0,30	4,97 ± 0,05
GP11	0,80 ± 0,08	0,74 ± 0,02	0,73 ± 0,03	0,71 ± 0,04	0,81 ± 0,13	0,75 ± 0,04
GP12	1,33 ± 0,13	1,28 ± 0,03	1,37 ± 0,06	1,26 ± 0,06	1,32 ± 0,22	1,28 ± 0,08
GP13	0,51 ± 0,20	0,33 ± 0,05	0,36 ± 0,05	0,32 ± 0,04	0,49 ± 0,38	0,34 ± 0,09
GP14	14,74 ± 0,71	15,34 ± 0,29	15,77 ± 0,23	15,35 ± 0,21	15,21 ± 1,17	15,32 ± 0,26
GP15	2,19 ± 0,17	2,12 ± 0,07	2,18 ± 0,06	2,07 ± 0,07	2,14 ± 0,50	2,10 ± 0,06
GP16	3,42 ± 0,25	3,22 ± 0,09	3,12 ± 0,06	3,21 ± 0,08	3,47 ± 0,74	3,27 ± 0,11
GP17	1,20 ± 0,25	1,14 ± 0,10	1,08 ± 0,05	1,09 ± 0,12	1,19 ± 0,79	1,09 ± 0,06
GP18	10,44 ± 0,31	10,68 ± 0,20	10,28 ± 0,28	10,63 ± 0,15	10,23 ± 0,34	10,63 ± 0,18
GP19	1,81 ± 0,15	1,79 ± 0,06	1,60 ± 0,08	1,67 ± 0,14	1,51 ± 0,58	1,71 ± 0,07
GP20	0,62 ± 0,29	0,49 ± 0,10	0,38 ± 0,05	0,46 ± 0,12	0,64 ± 0,94	0,46 ± 0,11
GP21	0,68 ± 0,13	0,68 ± 0,05	0,53 ± 0,05	0,70 ± 0,31	0,61 ± 0,48	0,65 ± 0,10
GP22	0,20 ± 0,08	0,16 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,14 ± 0,03	0,18 ± 0,25	0,13 ± 0,04
GP23	1,75 ± 0,11	1,74 ± 0,03	1,47 ± 0,14	1,67 ± 0,15	1,48 ± 0,28	1,68 ± 0,10
GP24	1,65 ± 0,15	1,60 ± 0,06	1,31 ± 0,13	1,50 ± 0,16	1,31 ± 0,44	1,59 ± 0,14

Kako bi se usporedili rezultati ovisno o tome koji analitičar je pripravljao uzorke zbrojene su vrijednosti udjela površine pika u ukupnoj površini svih pikova za svaki kromatografski pik standarda s obje pločice koje je pripravio isti analitičar: analitičar 1 – pločice 1 i 4, analitičar 2 – pločice 2 i 5, analitičar 3 – pločice 3 i 6. Rezultati su prikazani na Slikama 53 i 54, te u Tablici 24.



Slika 53. Utjecaj analitičara na ponovljivost razvijene metode deglikozilacije IgG-a u otopini uz pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom 0,2 µm *GHP* filtru s hladnim 96 %-tnim acetonitrilom u vodi. Prikazan je udio površine koji zauzimaju glikanski pikovi GP1 do GP12 standarda u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu s obzirom na analitičara. Svaki analitičar je pripravio po dvije pločice uzoraka u vremenskom razmaku od tri tjedna. $n = 28$

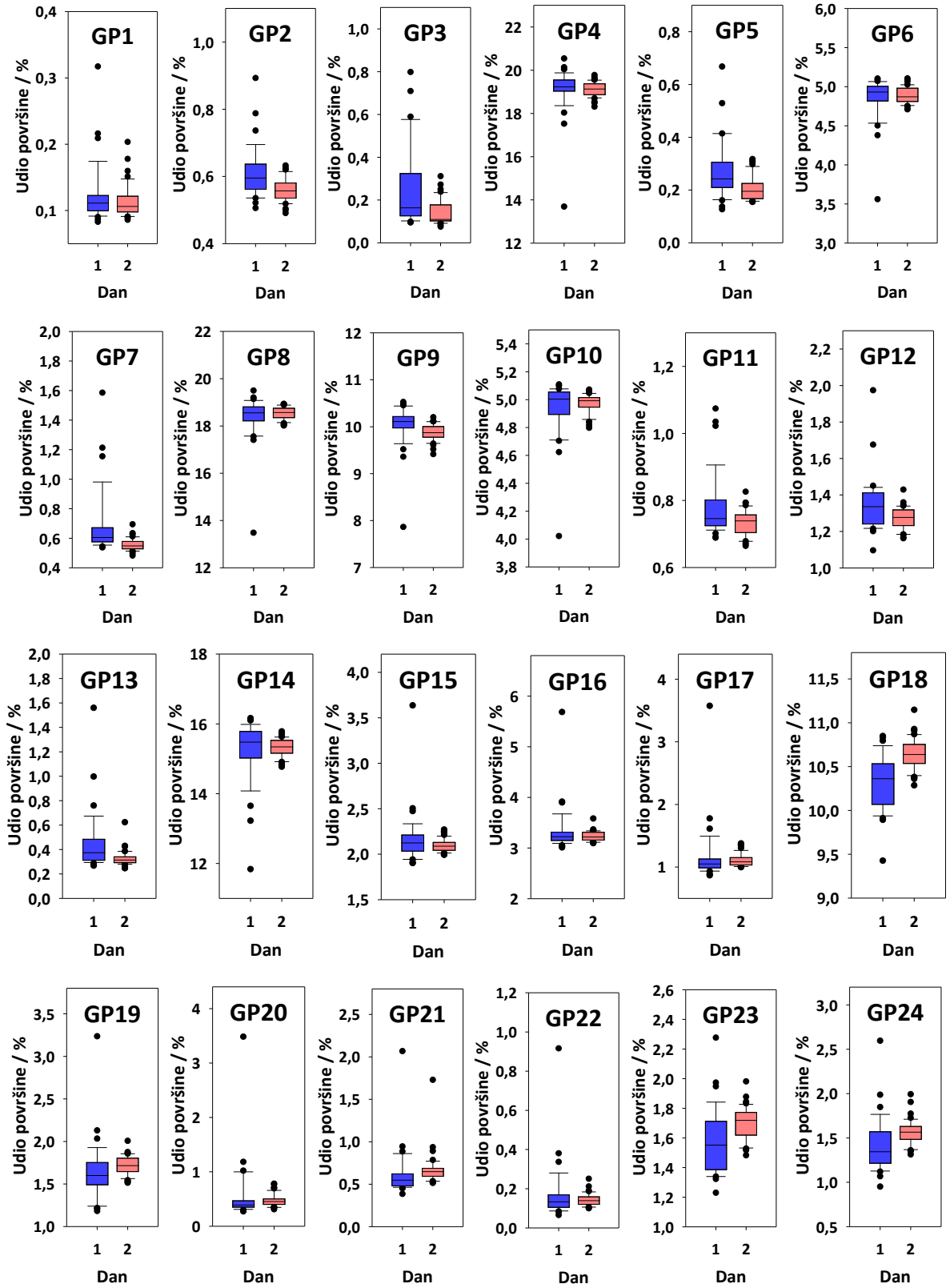


Slika 54. Utjecaj analitičara na ponovljivost razvijene metode deglikozilacije IgG-a u otopini uz pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom 0,2 µm *GHP* filtru s hladnim 96 %-tnim acetonitrilom u vodi. Prikazan je udio površine koji zauzimaju glikanski pikovi GP13 do GP24 standarda u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu s obzirom na analitičara. Svaki analitičar je pripravio po dvije pločice uzoraka u vremenskom razmaku od tri tjedna. $n = 28$

Tablica 24. Ponovljivost novorazvijene metode deglikozilacije IgG-a u otopini uz pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom 0,2 μm *GHP* filtru s hladnim 96 %-tnim acetonitrilom u vodi i analizu HILIC-UPLC-om obzirom na različite analitičare. Prikazana je srednja vrijednost udjela površine pojedinog kromatografskog pika u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu ± standardna devijacija tog udjela površine (SD). $n = 28$

Kromatografski pik	Analitičar 1	Analitičar 2	Analitičar 3
GP1	0,13 ± 0,05	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,03
GP2	0,60 ± 0,09	0,57 ± 0,04	0,58 ± 0,05
GP3	0,23 ± 0,17	0,13 ± 0,04	0,21 ± 0,17
GP4	18,90 ± 0,44	19,26 ± 0,29	19,14 ± 1,22
GP5	0,27 ± 0,11	0,21 ± 0,04	0,23 ± 0,09
GP6	4,82 ± 0,15	4,96 ± 0,11	4,84 ± 0,29
GP7	0,64 ± 0,21	0,57 ± 0,04	0,64 ± 0,18
GP8	18,28 ± 0,35	18,63 ± 0,22	18,51 ± 1,10
GP9	9,87 ± 0,20	9,99 ± 0,20	10,00 ± 0,51
GP10	4,94 ± 0,10	5,02 ± 0,06	4,91 ± 0,21
GP11	0,77 ± 0,07	0,72 ± 0,03	0,77 ± 0,09
GP12	1,30 ± 0,10	1,31 ± 0,08	1,30 ± 0,16
GP13	0,42 ± 0,17	0,34 ± 0,05	0,40 ± 0,26
GP14	15,04 ± 0,62	15,56 ± 0,31	15,27 ± 0,78
GP15	2,15 ± 0,13	2,12 ± 0,08	2,11 ± 0,33
GP16	3,32 ± 0,21	3,17 ± 0,08	3,36 ± 0,49
GP17	1,17 ± 0,19	1,09 ± 0,09	1,13 ± 0,52
GP18	10,56 ± 0,28	10,45 ± 0,28	10,45 ± 0,33
GP19	1,80 ± 0,11	1,63 ± 0,12	1,62 ± 0,39
GP20	0,56 ± 0,23	0,42 ± 0,10	0,54 ± 0,62
GP21	0,68 ± 0,10	0,61 ± 0,24	0,63 ± 0,32
GP22	0,18 ± 0,06	0,13 ± 0,02	0,15 ± 0,16
GP23	1,75 ± 0,08	1,57 ± 0,17	1,60 ± 0,22
GP24	1,63 ± 0,11	1,40 ± 0,17	1,47 ± 0,34

Kako bi se usporedili rezultati ovisno o danu priprave uzoraka u periodu od tri tjedna zbrojene su vrijednosti udjela površine pika u ukupnoj površini svih pikova za svaki kromatografski pik standarda s tri pločice koje su pripravljene isti dan od strane triju analitičara. Rezultati su prikazani na Slici 55 i u Tablici 25.



Slika 55. Utjecaj dana na ponovljivost razvijene metode deglikozilacije IgG-a u otopini uz pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom 0,2 µm *GHP* filtru s hladnim 96 %-tnim acetonitrilom u vodi. Prikazan je udio površine koji zauzima svaki glikanski pik (GP1 do GP24) standarda u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu s obzirom na dan priprave i analize uzorka. Između prvog i drugog dana protekla su tri tjedna. Svakog dana su pripravljene po tri pločice od strane triju analitičara. $n = 42$

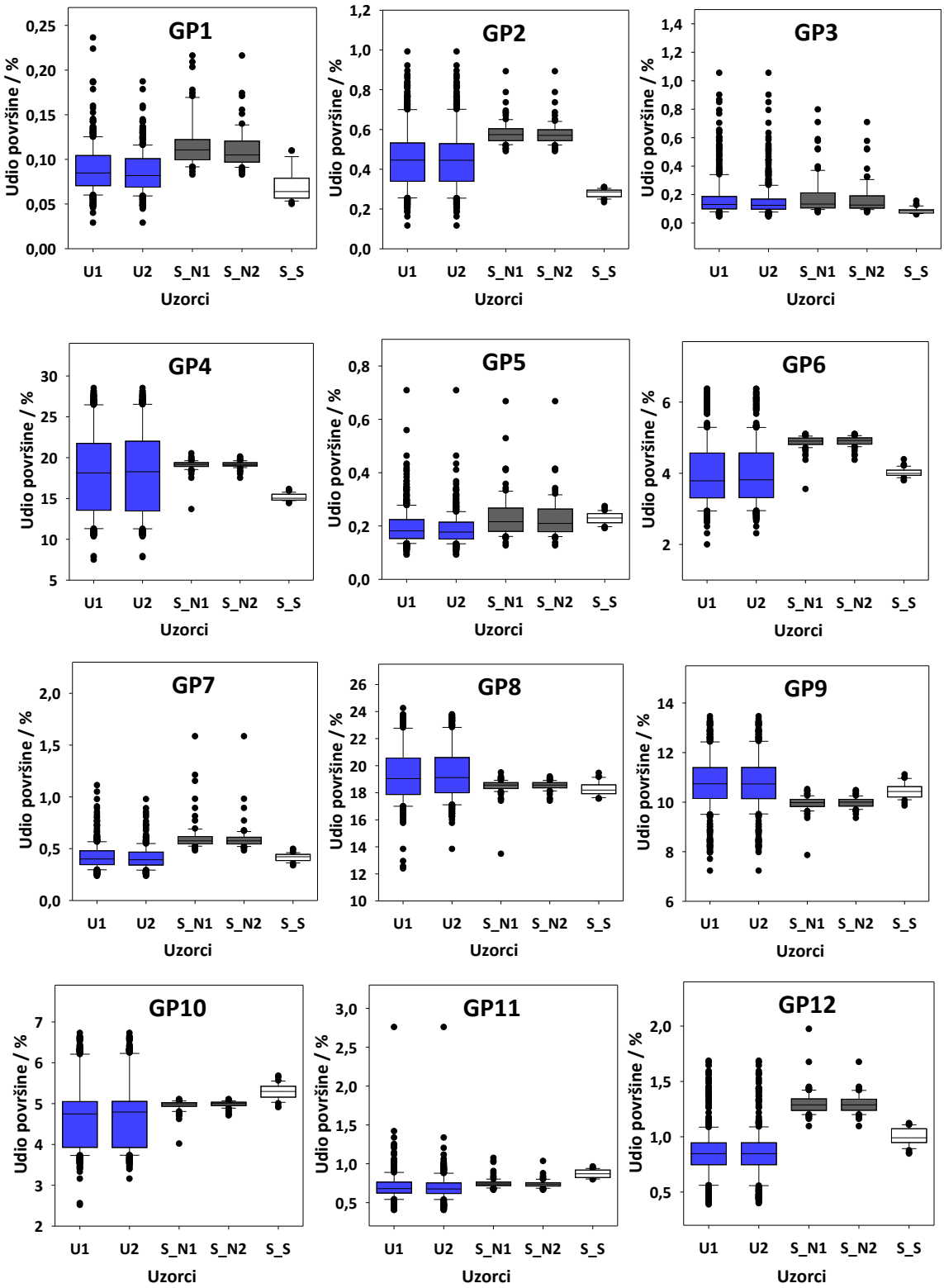
Tablica 25. Ponovljivost novorazvijene metode deglikozilacije IgG-a u otopini uz pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom 0,2 μm *GHP* filtru s hladnim 96 %-tnim acetonitrilom u vodi i analizu HILIC-UPLC-om unutar različitih dana, te ukupna ponovljivost u vremenskom razmaku od tri tjedna. Unutar svakog dana uzorke su pripravila tri različita analitičara. Prikazana je srednja vrijednost udjela površine pojedinog kromatografskog pika u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramu ± standardna devijacija tog udjela površine (SD). n = 42 (pojedini dan), n = 84 (ukupna ponovljivost)

Kromatografski pik	Dan 1	Dan 2	Ukupna ponovljivost
GP1	0,12 ± 0,04	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,04
GP2	0,61 ± 0,08	0,56 ± 0,03	0,58 ± 0,06
GP3	0,25 ±0,18	0,14 ± 0,06	0,19 ± 0,14
GP4	19,08 ± 1,04	19,12 ± 0,32	19,10 ± 0,75
GP5	0,27 ± 0,11	0,21 ± 0,05	0,24 ± 0,09
GP6	4,86 ± 0,27	4,89 ± 0,10	4,88 ± 0,20
GP7	0,68 ± 0,21	0,56 ±0,04	0,62 ± 0,16
GP8	18,40 ± 0,92	18,54 ± 0,25	18,47 ± 0,66
GP9	10,04 ± 0,43	9,88 ± 0,17	9,95 ± 0,33
GP10	4,94 ± 0,19	4,97 ± 0,06	4,96 ± 0,14
GP11	0,78 ± 0,09	0,73 ± 0,04	0,75 ± 0,07
GP12	1,34 ± 0,15	1,27 ± 0,06	1,31 ± 0,11
GP13	0,45v 0,24	0,33 ± 0,06	0,39 ± 0,18
GP14	15,24 ± 0,87	15,33 ± 0,25	15,29 ± 0,62
GP15	2,17 ± 0,28	2,10 ± 0,07	2,13 ± 0,20
GP16	3,33 ± 0,44	3,23 ± 0,10	3,28 ± 0,31
GP17	1,15 ± 0,44	1,11 ± 0,10	1,13 ± 0,31
GP18	10,32 ± 0,32	10,65 ± 0,17	10,49 ± 0,30
GP19	1,65 ± 0,34	1,72 ± 0,11	1,69 ± 0,25
GP20	0,54 ± 0,53	0,47 ± 0,11	0,50 ± 0,37
GP21	0,61 ± 0,27	0,67 ± 0,19	0,64 ± 0,23
GP22	0,16 ± 0,14	0,14 ± 0,03	0,15 ± 0,10
GP23	1,58 ± 0,22	1,70 ± 0,11	1,64 ± 0,18
GP24	1,43 ± 0,30	1,57 ± 0,13	1,50 ± 0,24

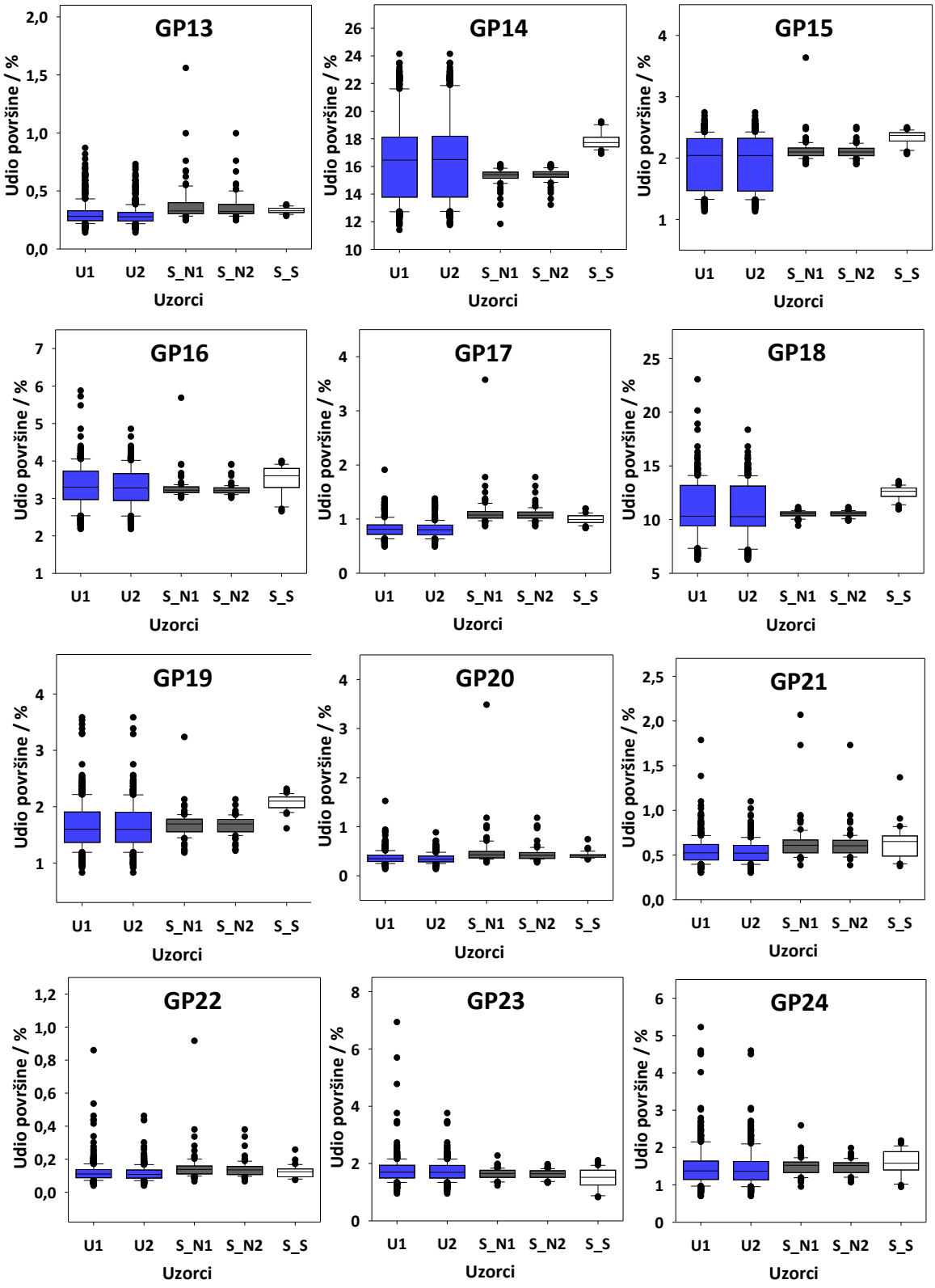
Budući da je svaka od šest pripravljenih i analiziranih pločica sadržavala i realne uzorke, varijacije rezultata analize tih uzoraka uspoređene su s varijacijama analize svih standarda kako bi se potvrdilo da metoda može detektirati biološke promjene u glikozilaciji. Osim toga, svi standardi pripravljeni novom metodom u razmaku od tri tjedna uspoređeni su sa standardima pripravljenima prilikom analize glikozilacije IgG-a kod upalne bolesti crijeva i zdravih ispitanika, kako bi se vidjelo je li nova metoda manje varijabilna, te može li

detektirati i manje biološke promjene u glikozilaciji. Važno je napomenuti da je omjer signala i šuma bazne linije za neke pikove u kromatogramima pojedinih uzoraka pripravljenih novom metodom bio na granici ili ispod granice kvantifikacije ($S/N < 10$), budući da je masa početnog IgG-a uzetog za analizu (150 μg do 250 μg) bila manja od mase uzete prilikom analize glikana IgG-a kod upalne bolesti crijeva (350 μg do 400 μg). Kako bi se nakon isključivanja navedenih uzoraka prije obrade podataka mogli dobiti prividno bolji rezultati, prikazani su svi uzorci (U1, S_N1) i samo oni čiji kromatografski pikovi su iznad granice kvantifikacije (U2, S_N2) (Slike 56 i 57).

Vidljivo je da je varijabilnost novorazvijene metode deglikozilacije IgG-a u otopini uz pročišćavanje glikana nakon fluorescentnog obilježavanja na hidrofilnom 0,2 μm *GHP* filtru s hladnim 96 %-tnim acetonitrilom u vodi dovoljno niska za detekciju bioloških promjena u glikozilaciji u periodu od tri tjedna, čak i kad uzorke pripravljaju tri analitičara. Varijacija udjela površine koju zauzima većina kromatografskih pikova u ukupnoj površini svih pikova glikoma IgG-a u standardnim uzorcima znatno je manja od varijacije udjela površine koju ti isti pikovi imaju u ukupnoj površini svih pikova glikoma IgG-a zdravih ljudi, osim u slučaju manjih kromatografskih pikova GP1, GP3, GP5, GP7, GP13 i pikova sijaliniziranih glikoformi GP17, GP20, GP21 i GP22 gdje je varijacija metode podjednaka biološkoj varijaciji u glikozilaciji testiranih uzoraka. Važno je napomenuti da su manje zastupljeni pikovi i inače podložniji većoj varijaciji (vidi Sliku 14), budući da su često vrlo blizu granice kvantifikacije. Usporedbom varijacija udjela površine pojedinih kromatografskih pikova u ukupnoj površini svih pikova u kromatogramima standarda pripravljenih novorazvijenom metodom te metodom prethodno korištenom za pripravu glikana IgG-a kod upalne bolesti crijeva može se uočiti poboljšanje u stabilnosti metode, odnosno manje varijacije kromatografskih pikova GP4, GP8, GP9, GP10, GP16, GP18, GP23, GP24 u odnosu na staru metodu, što omogućava pouzdaniju detekciju manjih promjena u zastupljenosti tih glikoformi. Izrazito je bitno smanjenje varijabilnosti analize sijaliniziranih glikoformi (kromatografski pikovi GP23 i GP24), budući da je razina sijalinizacije važna za proupalno, odnosno protuupalno djelovanje IgG-a, te je mogućnost osjetljivije kvantifikacije sijaliniziranih glikana od velikog značaja.



Slika 56. Usporedba biološke varijacije u glikozilaciji (U) i varijacije novorazvijene metode deglikozilacije IgG-a u otopini uz pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom 0,2 µm *GHP* filtru s hladnim 96 %-tnim acetonitrilom u vodi i analizu HILIC-UPLC-om (S_N). Prikazana je i varijacija standarda pripravljenih starom metodom prilikom analize glikozilacije IgG-a kod upalne bolesti crijeva (S_S, n = 35). 1 – prikazani su svi analizirani uzorci (n_{U1} = 473, n_{S_N1} = 81), 2 – prikazani su uzorci čiji kromatografski pikovi su iznad granice kvantifikacije(n_{U2} = 434, n_{S_N2} = 73)



Slika 57. Usporedba biološke varijacije u glikozilaciji (U) i varijacije novorazvijene metode deglikozilacije IgG-a u otopini uz pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom 0,2 µm *GHP* filtru s hladnim 96 %-tnim acetonitrilom u vodi i analizu HILIC-UPLC-om (S_N). Prikazana je i varijacija standarada pripravljenih starom metodom prilikom analize glikozilacije IgG-a kod upalne bolesti crijeva (S_S, n = 35). 1 – prikazani su svi analizirani uzorci (n_{U1} = 473, n_{S_N1} = 81), 2 – prikazani su uzorci čiji kromatografski pikovi su iznad granice kvantifikacije(n_{U2} = 434, n_{S_N2} = 73)

§ 5. RASPRAVA

Imunoglobulin G (IgG) je najzastupljenija vrsta antitijela u ljudskoj plazmi i ujedno najviše proučena u smislu glikozilacije. Brojna istraživanja uputila su na važnost glikozilacije IgG-a za njegovu funkciju, prvenstveno kao regulatora aktivacije ADCC-a (ovisno o fukozilaciji),[4,5] te proteina koji može djelovati proupalno ili protuupalno (ovisno o sijalinizaciji).[6,7] Glikozilacija IgG-a proučavana je u različitim kroničnim, upalnim i autoimunim bolestima, od reumatoidnog artritisa[82–84] i sistemskog eritemskog lupusa do alergija i upalne bolesti crijeva.[11,12,85] Iako su u mnogim istraživanjima uočene promjene u *N*-glikozilaciji IgG-a ili promjene na razini *N*-glikoma plazme ili seruma u nekoj od bolesti, nerijetka je pojava da se zbog nedovoljno razvijene metodologije, lošeg eksperimentalnog dizajna i/ili malog broja analiziranih uzoraka rezultati ne mogu u potpunosti ponoviti. Nereproducibilnost analitičkih rezultata predstavlja velik problem budući da je cilj većine istraživanja otkriti potencijalni biomarker na koji bi se u budućnosti trebala oslanjati dijagnoza bolesti i terapija. S obzirom na navedeno, zadnjih nekoliko godina intenzivno se radi na razvoju, optimizaciji i automatizaciji visokoprotočnih metoda analize glikozilacije koje omogućavaju analizu velikog broja uzoraka u relativno kratkom vremenu, prvenstveno tekućinskom kromatografijom (UPLC), spektrometrijom masa (LC-MS, MALDI-MS), te kapilarnom gel-elektroforezom (CGE). Osim razvoja novih analitičkih metoda, radi se i na razvoju statističkih metoda analize dobivenih podataka, koji se u današnje vrijeme broje u stotinama, a sve češće i u tisućama.

5.1. Metoda HILIC-UPLC omogućuje reproducibilnu i brzu analizu *N*-glikana IgG-a

Nedavnim razvojem metodologije za analizu *N*-glikana postalo je dostupno nekoliko različitih visokoprotočnih metoda, od kojih svaka ima svoje prednosti i nedostatke (Poglavlje 2.3.2.),[14] te se prema tome međusobno nadopunjuju. Za analizu *N*-glikana IgG-a u ovoj disertaciji korištena je metoda tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti, budući da su

metode deglikozilacije, fluorescentnog obilježavanja glikana i različite metode pročišćavanja glikana prije analize metodom UPLC bile razvijene, objavljene i u praktičnoj primjeni.

Analiza 1000 uzoraka (ne uzimajući u obzir analizu standarda) zahtijevala bi teorijski oko 25 dana neprestanog rada kromatografskog sustava, ne računajući vrijeme potrebno za promjenu otapala, kalibraciju i uravnotežavanje sustava na početne uvjete. Budući da se radi o tako dugom vremenu analize, treba uzeti u obzir faktore koji mogu utjecati na razdvajanje kromatografskih pikova i reproducibilnost analize, a možda ne dolaze do izražaja prilikom analize samo nekoliko uzoraka, kao što je primjerice starenje kolone. Posljedica su različiti rezultati na početku i pri kraju analize uzoraka istraživane populacije, što povećava pogrešku metode i smanjuje mogućnost detektiranja manjih bioloških promjena u glikozilaciji. Alternativa tako dugoj analizi na jednom kromatografskom sustavu je analiza uzoraka na dva ili više istih kromatografskih sustava, pri čemu se smanjuje vrijeme analize, a time i utjecaj starenja kolone na analitičke rezultate. Međutim, male razlike u rezultatima analize uzoraka na dva, iako jednaka, kromatografska sustava, prvenstveno zbog malih razlika u kolonama, također smanjuju pouzdanost i osjetljivost analize. Zbog svega navedenog, u sklopu ove doktorske disertacije je prije analize glikozilacije IgG-a napravljena validacija metode UPLC temeljene na hidrofilinim interakcijama (Poglavlje 4.1.).

Pokazano je da su korištene pokretne faze (100 mmol L^{-1} amonijev formijat pH 4,4 i 100 %-tni acetonitril) stabilne unutar 24 sata. Uočene su male varijacije u vremenu zadržavanja spojeva koji kasnije eluiraju s kolone, najvjerojatnije zbog malih promjena u koncentraciji i pH uslijed isparavanja amonijeva formijata,[86] ali bez očitog utjecaja na kvalitetu kromatografskog razdvajanja (Slike 12 i 13, Tablica 8). Ponovljivost analize bila je vrlo dobra, bez obzira radi li se o injektiranju uzorka iz iste bočice ili iz različitih bočica, s tim da su uočeni nešto viši koeficijenti varijacije u slučaju kromatografskih glikanskih pikova čije površine zauzimaju manje od 1 % ukupne površine svih pikova u kromatogramu (Slika 14). To je očekivano budući da su površine tih pikova blizu granice kvantifikacije te su stoga podložniji većim varijacijama uslijed varijacija u šumu kromatografske bazne linije. Validirana metoda se pokazala robusnom pri malim promjenama temperature kolone (60 ± 2 °C), valnih duljina detekcije (λ_{ex} = 250 ± 2 nm, λ_{em} = 428 ± 2 nm), te protoka pokretne faze (0,400 ± 0,005 mL min^{-1}), što omogućava pouzdanu analizu čak i u slučaju malih fluktuacija u stabilnosti kromatografskog sustava (Tablica 10). Robusnost metode je ispitana i s obzirom na analitičara koji pripravlja uzorke za analizu, te kromatografski sustav i proizvodnu seriju

kolone. Pokazalo se da je metoda robusna neovisno o analitičaru koji pripravlja uzorke ili samom kromatografskom sustavu, dok najveći utjecaj na rezultate ima proizvodna serija i starost kolone, pri čemu se na kolonama s podjednakim brojem prethodno analiziranih uzoraka postižu najsličniji rezultati. Glikozilacija IgG-a kod upalne bolesti crijeva je analizirana na dva kromatografska sustava s kolonama iz iste proizvodne serije i podjednakim brojem prethodnih injektiranja uzoraka. Time je znatno smanjeno cjelokupno vrijeme analize, a istovremeno je smanjen i utjecaj starenja kromatografske kolone na rezultate, što je provjeravano injektiranjem standardnog uzorka glikana IgG-a tijekom analize svih uzoraka.

5.2. Glikozilacija IgG-a je kod upalne bolesti crijeva promijenjena

Promjene u glikozilaciji IgG-a objavljene su u nekoliko ranijih istraživanja,[11,12] čiji rezultati su upućivali na smanjenu galaktozilaciju IgG-a pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva. Međutim, navedena istraživanja su rađena na malom broju ispitanika (67,[11] odnosno 160[12]), te su proučavane isključivo nesijalinizirane glikoforme, zbog čega u potpunosti nedostaje informacija o upalnoj aktivnosti IgG-a. Isto tako, budući da se navedena dva istraživanja međusobno ne slažu oko korelacije razine galaktozilacije s C-reaktivnim proteinom koji je pokazatelj upalne reakcije, dovodi se u pitanje pouzdanost navedenih rezultata. S obzirom na nedavni razvoj metodologije za analizu glikana, te rezultate genetičkih istraživanja koja su pokazala da su geni koji sudjeluju u glikozilaciji IgG-a (*IKZF1*, *LAMB1*, *MGAT3*, *IL6ST* i *BACH2*) povezani s upalnom bolesti crijeva,[10] cilj ove doktorske disertacije bio je analizirati glikozilaciju IgG-a na gotovo tisuću pacijenata koji boluju od Chronove bolesti ili ulceroznog kolitisa, te zdravih ispitanika validiranom metodom HILIC-UPLC. Nakon pročišćavanja podataka (detaljnije opisano u Poglavlju 4.2. Rezultata) analizirana je glikozilacija IgG-a kod ukupno 699 pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva (od kojih 471 pacijent boluje od ulceroznog kolitisa, a 228 pacijenata boluje od Crohnove bolesti), te kod 105 kontrolnih zdravih ispitanika.

Usporedbom zastupljenosti pojedinačnih glikanskih struktura i deriviranih parametara u glikomu IgG-a kod pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti, pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa te kod kontrolnih zdravih ispitanika, uočen je veći udio negalaktoziliranih struktura, odnosno manji udio galaktoziliranih struktura, u glikomu IgG-a pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva u odnosu na zdrave ispitanike. Općenito je veća i redovito

statistički značajna razlika uočena usporedbom pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i zdravih ispitanika, nego primjerice usporedbom pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa i zdravih ispitanika. Razlog tome može biti biološki – da je intenzitet promjene u ulceroznom kolitisu u odnosu na zdrave ispitanike manji, ali osim toga i metodološki – da se zbog varijacije primijenjene analitičke metode nije mogla sa statističkom značajnošću potvrditi razlika između ove dvije skupine ispitanika. Zanimljivo je da je analizom monogalaktoziliranih i digalaktoziliranih struktura uvrđeno da su pacijenti koji boluju od Crohnove bolesti i pacijenti koji boluju od ulceroznog kolitisa imali podjednak udio monogalaktoziliranih struktura (G1), statistički značajno niži nego kod kontrolnih ispitanika. Zastupljenost digalaktoziliranih struktura (G2) kod pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa i zdravih ispitanika je slična i viša je nego kod pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti (Slika 22). Omjer udjela negalaktoziliranih i galaktoziliranih glikoformi IgG-a (G0/G) statistički je značajno različit u sve tri analizirane skupine ispitanika, što djelomično potvrđuje rezultate prethodnih istraživanja, gdje je omjer G0F/G2F (koji bi u ovoj studiji odgovarao omjeru GP4/GP14) predložen kao dijagnostički marker za upalnu bolest crijeva, budući da je omogućio razlikovanje pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i zdravih ispitanika, te pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i onih koji boluju od ulceroznog kolitisa.[12] Važno je uočiti da omjer G0/G predstavlja omjer i fukoziliranih i nefukoziliranih negalaktoziliranih i svih galaktoziliranih glikoformi. Veća zastupljenost negalaktoziliranih glikoformi IgG-a (čak i > 55 %[55]) karakteristična je za stanje aktivne upale u organizmu te je uočena i u još nekim upalnim bolestima, primjerice reumatoidnom artritisu.[84] Poznato je i da udio negalaktoziliranih glikoformi raste starenjem,[58,60,87] ali je ovaj porast izraženiji kod žena, čiji IgG sadrži od 20 % negalaktoziliranih glikoformi u 20-im godinama do oko 40 % u 60-im godinama, dok je kod muškaraca taj udio oko 25 % i više-manje je konstantan.[55] Važno je napomenuti da porast negalaktoziliranih struktura u glikomu IgG-a starijih osoba ne doseže vrijednosti opažene u upalnim stanjima, ali upućuje na važnost eksperimentalnog dizajna istraživanja u smislu dobi i spola pacijenata i kontrolnih ispitanika. S obzirom da je povećanje udjela negalaktoziliranih glikoformi uočeno i u drugim bolestima, ova promjena, iako značajna, nije specifična isključivo za upalnu bolest crijeva. Pojedina istraživanja su sugerirala da negalaktozilirane glikoforme IgG-a povećavaju njegovu proupalnu aktivnost na način da nedostatak galaktoza povećava izloženost manoza sržne strukture te omogućava vezanje na manoza-vezujući lektin (eng. *mannose binding lectin*, MBL) koji aktivira put

komplementa.[82] Međutim, miševi bez MBL-a nisu pokazali različitu aktivnost negalaktoziliranih i galaktoziliranih glikoformi IgG-a u nekoliko različitih modelnih sustava *in vivo*,[55,88] te je utjecaj galaktoze na aktivnost IgG-a do danas nerazjašnjen.

Analizom zastupljenosti monogalaktozilirane glikoforme FA2[6]G1 (kromatografski pik GP8, Slika 19) također je opažen trend povećanja udjela u nizu C < U < K, s niskom, iako ne i statistički značajnom, vrijednošću $p_{C\ i\ K}$ = 0,0006. Nasuprot tome, udio slične glikoforme FA2[3]G1 (kromatografski pik GP9, Slika 20), s jedinom razlikom da je galaktoza vezana na drugu antenu, raste u nizu U < C < K. Kinetička istraživanja su pokazala da enzim β-1,4-galaktozil-transferaza I, koji veže krajnju galaktozu na GlcNAc glikana ima deset puta niži K_M za vezanje Gal na 1-6-antenu u odnosu na K_M za vezanje Gal na 1-3-antenu. U skladu s tim su i rezultati istraživanja strukture enzima, koji su pokazali da 1-6-antena ostvaruje maksimalan broj interakcija s enzimom, budući da ima veću konformacijsku stabilnost. Zbog velikog afiniteta enzima za vezanje 1-6-antene glikana pri visokim koncentracijama dolazi do inhibicije enzima supstratom. Pri niskim koncentracijama *N*-glikana se, prema tome, preferentno galaktozilira 1-6-antena, dok se pri visokim koncentracijama preferentno galaktozilira 1-3-antena.[89] Promjena koncentracije supstrata bi mogao biti jedan od mehanizama promijenjene galaktozilacije FA2 glikoforme IgG-a kod upalne bolesti crijeva u odnosu na zdrave ispitanike.

Zanimljivo je da su prethodna israživanja pokazala da se zastupljenost strukture FA2[6]G1 (GP8) smanjuje i sa starošću, dok to nije slučaj sa strukturom FA2[3]G1 (GP9).[58]

U sklopu ove doktorske disertacije prvi puta su proučena i druga svojstva glikozilacije IgG-a kod upalne bolesti crijeva osim galaktozilacije. Primjerice, iako je poznato da je sijalinizacija izrazito važna za aktivnost IgG-a, budući da vezanje sijalinske kiseline mijenja aktivnost IgG-a iz proupalne u protuupalnu,[6,7,55] ovo svojstvo nije prethodno analizirano. Razlog tome možda leži u činjenici da je sijalinska kiselina izrazito osjetljiva na varijacije u eksperimentalnim uvjetima, kao što su primjerice pH[80] i temperatura,[47] te razinu sijalinizacije nije jednostavno kvantificirati pojedinim metodama, primjerice MALDI-MS-om.[14] Rezultati su pokazali da je razina ukupne sijalinizacije statistički značajno niža u IgG-u pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti u odnosu na pacijente koji boluju od ulceroznog kolitisa, dok je razina ukupne sijalinizacije IgG-a pacijenata koji boluju od uceroznog kolitisa i kontrolnih ispitanika bila podjednaka. Detaljnijom analizom ustanovljeno je da su kod upalne bolesti crijeva manje zastupljene monosijalinizirane strukture i fukozilirane monosijalinizirane

strukture, i to u nizu C < U < K, što je u slučaju IgG-a pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti bilo i statistički značajno. Ova je promjena vidljivo izražena i u IgG-u pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa, ali nije dosegnula razinu statističke značajnosti. Nasuprot tome, udjeli disijaliniziranih i fukoziliranih disijaliniziranih struktura IgG-a pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva bili su ili na razini ili nešto viši u odnosu na njihove udjele u IgG-u kontrolnih ispitanika, što se može objasniti porastom udjela disijaliniziranih struktura koje imaju račvajući GlcNAc (vidi GP22 i GP24, Slika 21). U slučaju monosijaliniziranih glikoformi porast udjela račvajućeg GlcNAc-a je uočljiv samo u kromatografskom piku GP19 (struktura FA2BG2S1), budući da ostale monosijalinizirane strukture s račvajućim GlcNAc-om zauzimaju samo manji udio većih kromatografskih pikova GP16b i GP17 (vidi Tablicu 5). S obzirom na smanjeni udio sijaliniziranih glikoformi IgG-a kod upalne bolesti crijeva, može se reći da je povećano proupalno djelovanje IgG-a, pa se postavlja pitanje može li se intravenozni IgG (IVIg), za koji je pokazano da u dozama od 1 g kg^{-1} do 3 g kg^{-1} ima protuupalno djelovanje, koristiti kao terapija za liječenje upalne bolesti crijeva.[64,90,91] Jedino galaktozilirane glikoforme mogu se sijalinizirati, te je logično postaviti pitanje je li smanjenje sijalinizacije zapravo posljedica smanjene galaktozilacije u upalnoj bolesti crijeva. Kako bi se pokušalo odgovoriti na to pitanje uspoređen je omjer svih galaktoziliranih i svih sijaliniziranih glikoformi IgG-a (G/S, Slika 24). Nije uočena statistički značajna razlika u omjeru G/S između pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva i zdravih ispitanika, iako je omjer G/S malo niži kod pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa. Međutim, s obzirom na varijaciju analize standarda, ne može se isključiti mogućnost da je ova razlika posljedica pogreške same metode. S obzirom da nije uočena značajna promjena u omjeru može se pretpostaviti da je smanjenje sijalinizacije barem donekle, ako ne i većim dijelom, jednostavno posljedica smanjenja galaktozilacije. Budući da je manje molekula IgG-a galaktozilirano, time je i brzina sijalinizacije manja.

Već je ranije spomenut porast udjela disijaliniziranih (GP22, GP24) i monosijaliniziranih struktura (GP19) koje sadrže račvajući GlcNAc u upalnoj bolesti crijeva, iako je u slučaju navedenih pojedinačnih kromatografskih pikova ova promjena zamaskirana istovremenom promjenom u količini sijalinizacije. Međutim, usporedbom svih glikoformi koje sadrže račvajući GlcNAc (derivirani parametar B, Slika 23) uočljiv je jasan trend porasta udjela ovog parametra u nizu K < U < C. Iako se u sklopu ovog istraživanja promjena udjela račvajućeg GlcNAc-a nije pokazala statistički značajnom, najvjerojatnije zbog manje statističke snage

eksperimentalnog dijela istraživanja i/ili snage korištenog statističkog testa, vrijednost $p_{C\,i\,K}$ je bila vrlo niska (0,0008), te bi vrlo vjerojatno dosegnula statističku značajnost u slučaju manje pogreške metode i većeg broja analiziranih uzoraka. Uloga račvajućeg GlcNAc-a dosada nije u potpunosti razjašnjena, iako je očito da značajno mijenja prostorne karakteristike, odnosno sterička svojstva glikana na koji je vezan. Zanimljivo je da je gen *MGAT3*, koji kodira za enzim *N*-acetilglukozaminil-transferazu III, prethodno identificiran kao gen povezan s upalnom bolesti crijeva.[10]

Glikoforme IgG-a koje sadrže sržnu fukozu imaju manji afinitet vezanja na receptore FcγRIIIA,[5] čime se smanjuje ADCC.[4] Iako se udio svih fukoziliranih struktura nije značajno razlikovao u IgG-u pacijenata oboljelih od upalne bolesti crijeva u odnosu na IgG zdravih ispitanika, uočeno je smanjenje udjela sržne fukoze u nizu K > U > C. Kako je aktivnost enzima α-1,6-fukozil-transferaze koji dodaje sržnu fukozu inhibirana prethodnim vezanjem račvajućeg GlcNAc-a, za očekivati je da će povećanje udjela glikoformi koje sadrže račvajući GlcNAc za posljedicu imati smanjenje udjela tih istih glikoformi s vezanom sržnom fukozom. Iako je ova teza djelomično potvrđena usporedbom udjela ukupnih fukoziliranih glikoformi (F) i udjela svih glikoformi koje sadrže račvajući GlcNAc (B), ovaj obrnuto proporcionalan odnos nije direktno uočen usporedbom primjerice svih fukoziliranih galaktoziliranih struktura bez (FG) i s račvajućim GlcNAc-om (FBG), fukoziliranih monogalaktoziliranih struktura bez (FG1) i s račvajućim GlcNAc-om (FBG1), fukoziliranih sijaliniziranih struktura bez (FS) i s račvajućim GlcNAc-om (FBS), te fukoziliranih monosijaliniziranih struktura bez (FS1) i s račvajućim GlcNAc-om (GP19). Vidljivo je da su fukozilirane glikoforme bez račvajućeg GlcNAc-a u pravilu uvijek manje zastupljene kod pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva nego kod zdravih kontrolnih ispitanika, dok su, suprotno tome, pripadajuće fukozilirane strukture s račvajućim GlcNAc-om podjednako ili samo neznatno više zastupljene kod pacijenata koji boluju od upalne bolesti crijeva u usporedbi sa zdravim ispitanicima. S obzirom na uočeno (iako ne statistički značajno) smanjenje udjela sržne fukoze u upalnoj bolesti crijeva, može se pretpostaviti da je povećano vezanje IgG-a za FcγRIIIA receptore i ADCC, čime se potiče uklanjanje kompleksa antigena i antitijela makrofazima. Ovaj rezultat upućuje da je promijenjena glikozilacija IgG-a, barem u smislu smanjenja udjela glikoformi sa sržnom fukozom, odgovor na upalnu bolest crijeva, a ne njezin uzrok, budući da je u skladu sa scenarijem povećanog prodiranja bakterija kroz epitel crijeva čime se aktivira imunološki sustav. Omjer svih fukoziliranih negalaktoziliranih i

digalaktoziliranih glikoformi ($FG0^{total}$/$FG2^{total}$) pokazao se statistički značajno različitim samo prilikom usporedbe pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i zdravih ispitanika, odnosno pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa, ali ne i pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa sa zdravim ispitanicima (Slika 23). Time se pokazao lošijim za razlikovanje triju ispitivanih skupina u odnosu na omjer G0/G.

5.3. Reproducibilnost metoda za analizu glikana potrebno je ispitati na većem broju uzoraka

Visokoprotočne metode analize glikana podrazumijevaju analizu velikog broja uzoraka u relativno kratkom vremenu. Međutim, za nekoliko stotina ili tisuća uzoraka to i dalje podrazumijeva pripravu i analizu uzoraka u periodu od nekoliko tjedana, a najčešće mjeseci. Do danas su objavljene i validirane različite metode deglikozilacije, fluorescentnog obilježavanja i pročišćavanja glikana, koje sve uglavnom daju podjednako reproducibilne rezultate u uvjetima validacije. Prilikom izrade ove doktorske disertacije, a i u svakodnevnoj praksi Laboratorija za glikobiologiju tvrtke Genos, uočeno je da klasična validacija metoda, gdje se ispituje ponovljivost unutar dana ili između nekoliko dana u kratkom vremenu, na najčešće ne više od ukupno dvadesetak uzoraka jednostavno nije dovoljna kako bi se osigurala reproducibilnost metode tijekom perioda cjelokupne analize velikog broja uzoraka. Određeni nedostatci korištene metode često postaju vidljivi tek nakon analize kritičnog broja uzoraka od nekoliko stotina, uglavnom zbog načina izvođenja ovakvih eksperimenata. Naime, općenito se glikani za visokoprotočnu analizu pripravljaju upotrebom pločica s 96 jažica koje omogućuju paralelnu pripravu 96 uzoraka, u pravilu s istim otopinama i reagensima. Sljedeća pločica se pripravlja drugi dan sa svježe pripravljenim otopinama, i tako dalje. Iako se metoda priprave pokazala reproducibilnom unutar jednog dana i/ili na manjem broju uzoraka, najčešće prilikom validacije nije uzeta u obzir njezina sveukupna varijacija s obzirom na svježe priprave korištenih otopina i reagensa, eventualne varijacije u izvedbi korištenih komercijalnih pločica, dugo vrijeme analize i slično. Često se pojavljuje i tzv. efekt serije (eng. *batch effect*), koji karakterizira veća sličnost uzoraka pripravljenih u istoj seriji (isti dan na istoj pločici), nego uzoraka pripravljenih u različitim serijama (u različite dane na različitim pločicama), što se može uočiti usporedbom uzoraka standarda pripravljenih na

različitim pločicama. Stvarna reproducibilnost metode tako dolazi do izražaja tek nakon priprave većeg broja uzoraka tijekom duljeg vremena.

Prilikom analize glikozilacije IgG-a kod upalne bolesti crijeva, pri čemu je za analizu pripravljano blizu tisuću uzoraka u periodu od nekoliko mjeseci, uočeni su određeni nedostatci korištene metode (opisani u Poglavlju 4.3.), koji umanjuju njezinu osjetljivost za detekciju manjih bioloških razlika u analiziranim populacijama. Nakon testiranja robusnosti deglikozilacije IgG-a u otopini uz pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na celulozi uz 80 %-tni acetonitril u vodi, pokazalo se da vrijeme hlađenja na sobnoj temperaturi nakon denaturacije SDS-om, vrijeme inkubacije s igepalom CA-630, te poglavito temperatura 80 %-tnog acetonitrila korištenog za pročišćavanje obilježenih glikana znatno utječu na intenzitet i koeficijente varijacija udjela površina kromatografskih pikova. Osim navedenog, količina dodanog enzima za deglikozilaciju PNGaze F, te vrijeme obilježavanja glikana 2-AB-om također utječu na intenzitet kromatografskih pikova. S obzirom da veća količina dodanog enzima znači dvostruko veće troškove, a produljeno vrijeme inkubacije na 65 °C radi fluorescentnog obilježavanja glikana uz povećanje učinkovitosti ujedno uzrokuje desijalinizaciju,[47] optimizacija metode se temeljila na produženoj inkubaciji sa SDS-om i igepalom, te upotrebi acetonitrila ohlađenog na 4 °C. Igepal CA-630 se dodaje u reakcijsku smjesu prije PNGaze F kako bi se, dosad nepoznatim mehanizmom, inaktivirao SDS, koji bi u protivnom denaturirao i samu PNGazu F. Igepal CA-630 pri temperaturi od oko 60 °C tvori micele, te najvjerojatnije u slučaju prethodno nedovoljno ohlađene reakcijske smjese nakon denaturacije SDS-om nije u mogućnosti u potpunosti neutralizirati SDS, pri čemu dolazi do djelomične denaturacije PNGaze F. Prilikom upotrebe 80 %-tnog acetonitrila u vodi hlapljivost acetonitrila uzrokuje povećanje volumnog udjela vode te veći i neravnomjerni gubitak glikana prilikom ispiranja suviška reagensa u postupku pročišćavanja, budući da se povećanjem volumnog udjela vode s celuloze ispiru i hidrofilniji glikani (Slika 27). Upotrebom prethodno ohlađenog acetonitrila smanjuje se njegovo isparavanje i znatna promjena sastava korištene smjese acetonitril/voda.

Metoda korištena za pripravu glikana IgG-a prilikom analize glikozilacije kod upalne bolesti crijeva oslanja se na jednostavnu deglikozilaciju IgG-a u otopini, nakon čega se obilježavanje slobodnih glikana odvija u istoj reakcijskoj smjesi dodatkom smjese za obilježavanje glikana fluorescentnom bojom, bez međukoraka pročišćavanja radi uklanjanja reagensa iz prethodne reakcije. Iako ovakav pristup znatno olakšava i pojednostavljuje

pripravu glikana, s druge strane smanjuje učinkovitost sljedećih koraka u pripravi, s obzirom da prisutnost suviška pufera i deterdženata može ometati deglikozilaciju i/ili obilježavanje glikana fluorescentnom bojom. U svrhu povećanja osjetljivosti i potencijalno reproducibilnosti metode isprobani su različiti objavljeni i modificirani protokoli denaturacije alternativnim reagensima, te deglikozilacije na dva tipa membrana. Deglikozilacija na hidrofobnoj *Multiscreen Immobilon-P PVDF* membrani[44] se pokazala problematičnom budući da je, kako je zaključeno na temelju dobivenih rezultata, vezala i sam enzim PNGazu F korišten za deglikozilaciju, čime mu je pokretljivost, a time i aktivnost u reakcijskoj smjesi bila ograničena. Rezultat je bila deglikozilacija znatno smanjene učinkovitosti, a dobivena količina slobodnih glikana nije bila dovoljna za analizu tekućinskom kromatografijom. Prethodno objavljena metoda deglikozilacije na *Omega 10k MWCO AcroPrep* membrani[45] je također testirana s različitim varijacijama u sklopu ove disertacije. Prvobitni rezultati su bili vrlo obećavajući: metoda je omogućavala uklanjanje soli i deterdženata prije deglikozilacije, te proteinskog dijela molekule IgG-a nakon inkubacije s PNGazom F jednostavnim postupkom centrifugiranja, pri čemu bi se dobili „čisti" slobodni glikani prije reakcije obilježavanja 2-AB-om. Rezultat su bili kromatogrami puno viših intenziteta pikova, te je iz postupka priprave glikana isključen korak sušenja IgG-a nakon izolacije iz krvne plazme. Zanimljivo je da su se od različitih kombinacija reagensa za denaturaciju i pufera za deglikozilaciju najboljim pokazali oni koji su već rutinski korišteni u Laboratoriju za glikobiologiju (SDS i igepal CA-630, uz deglikozilaciju u 1x koncentriranom puferu PBS) (vidi npr. Sliku 32). Budući da su se ovi prvotni eksperimenti uglavnom bazirali na optimizaciji postupaka denaturacije, deglikozilacije i obilježavanja slobodnih glikana fluorescentnom bojom, a pročišćavanje na celulozi se pokazalo nereproducibilnim prilikom analize velikog broja uzoraka, cilj daljnjeg optimiranja metode priprave glikana bio je razvoj učinkovitije metode pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana. Osim celuloze,[46] testirani su i Bio-Gel P-6,[81] silikagel[81] i 0,2 μm hidrofilni *GHP* filtar[44] s različitim volumnim udjelima acetonitrila u vodi. Pokazano je da se ispiranjem s 80 %-tnim acetonitrilom u vodi gubi većina vezanih glikana sa silikagela i 0,2 μm hidrofilnog *GHP* filtra, što je vjerojatno razlog zašto silikagel nije ranije korišten kao čvrsta faza za pročišćavanje obilježenih glikana, budući da je dosad objavljena samo njegova potencijalna upotreba uz ispiranje s 80 %-tnim acetonitrilom u vodi. Smanjeni intenziteti glikanskih pikova, odnosno njihov povećani gubitak prilikom ispiranja s 80 %-tnim acetonitrilom uočen je i upotrebom celuloze i Bio-

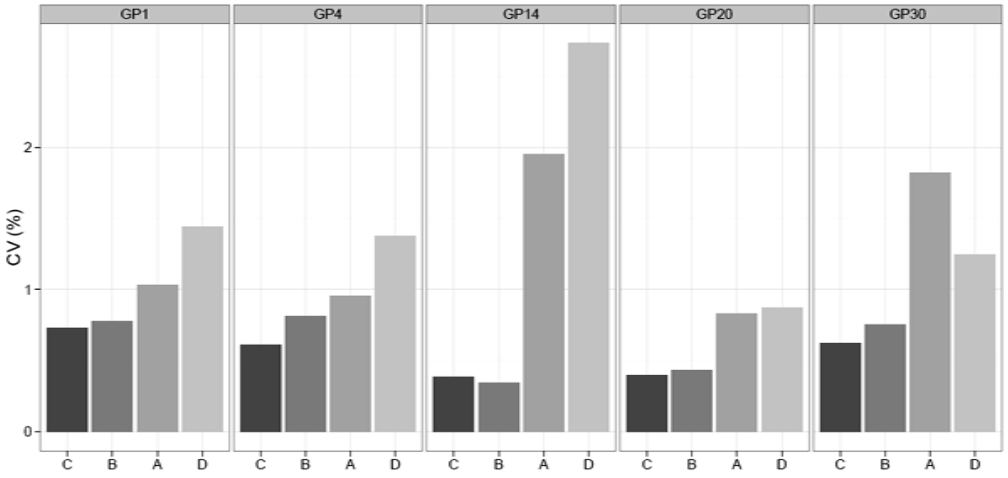
Gela P-6. Povećanjem volumnog udjela acetonitrila općenito su uočeni viši intenziteti i niži koeficijenti varijacije kromatografskih pikova (Slike 33 i 34, Tablica 17). Celuloza je u ovoj fazi optimizacije metode isključena kao moguća čvrsta faza zbog prethodnih problema s kontaminacijom uzoraka ostatcima celuloze (Slika 25). Silikagel i Bio-Gel su se pokazali manje praktičnima za upotrebu s obzirom da je prilikom njihovog nanošenja na *GHP* filtar pločicu i miješanja nakon dodatka otapala za ispiranje dolazilo do zaostajanja zrna na nastavcima i čepljenja nastavaka za pipetu, te prema tome i neravnomjernih gubitaka čvrste faze prilikom postupka pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana. Isto tako, budući da se radi o suspenziji, za očekivati je da se u slučaju dodatka otapala za ispiranje, a bez miješanja suspenzije dovodi u pitanje reproducibilnost pročišćavanja. S obzirom na navedeno, 0,2 μm hidrofilni *GHP* filtar je odabran kao najjednostavnija, najpraktičnija i najjeftinija opcija, s kapacitetom vezanja dovoljnim za pročišćavanje glikana iz približno 750 μg IgG-a (Slika 35).

Iako je razvijena metoda deglikozilacije na *Omega 10k MWCO AcroPrep* membrani omogućavala analizu glikana u samo 25 μg IgG-a (Slika 36), te se nakon testiranja robusnosti Plackett-Burmanovim dizajnom pokazala prilično robusnom, jedan od nedostataka bile su velike varijacije u intenzitetima kromatografskih pikova u pojedinim kromatogramima. Uočeno je da se svi filtri u 96 jažica pločice ne ponašaju jednako prilikom postupka priprave, te se pojedini filtri u potpunosti osuše prilikom centrifugiranja. Zapaženo je da upravo uzorci na tim položajima u pločici imaju izrazito niske intenzitete kromatografskih pikova (< 10 EU). Ovaj problem je uspješno riješen na način da je isključen korak ispiranja deterdženata centrifugiranjem nakon inaktivacije SDS-a igepalom, a prije deglikozilacije. Isto tako, s vremenom se pokazalo i da *Omega 10k* pločica nije kompatibilna s korištenim deterdžentima, konkretno igepalom CA-630, što je uzrokovalo pomak nagiba bazne linije u kromatogramima i nereproducibilnost metode (vidi Poglavlje 4.8.). Produkt reakcije igepala s filtrom *Omega 10k* pločice zaostajao je na kromatografskoj koloni što je zahtijevalo njezino četverosatno linearno gradijentno ispiranje u ciklusima od sat vremena. Pri tome je sastav pokretne faze mijenjan od 100 % vode do 100 % acetonitrila u periodu od 30 minuta, te sljedećih 30 minuta od 100 % acetonitrila do 100 % vode pri protoku od 0,2 mL min^{-1} i temperaturi kolone od 60 °C. Pomak nagiba kromatografske bazne linije bio je manje izražen u slučaju kad su deterdženti isprani s pločice prije dodatka PNGaze F, što je bila dodatna indikacija da su uzrok problema najvjerojatnije korišteni deterdženti. Međutim, nametnulo se i pitanje

učinkovitosti pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana, budući da je u novoj metodi korišten 100 %-tni acetonitril. Moguće je da se zaostali deterdženti nisu isprali prilikom pročišćavanja, te su s filtra eluirali tek u koraku eluiranja glikana dodatkom vode. Ova mogućnost je isključena nakon što su i u kromatogramima uzoraka IgG-a denaturiranih i deglikoziliranih na *Omega 10k* membrani i pročišćenih uz ispiranje s 80 %-tnim acetonitrilom u vodi i na celulozi i na hidrofilnom *GHP* filtru, uočeni pomaci nagiba bazne linije. Nakon što je serijom eksperimenata ustanovljeno da je igepal CA-630 odgovoran za navedene probleme, testirano je ispiranje *Omega 10k* pločice igepalom prije njezine upotrebe, čime je uklonjen smetajući produkt reakcije i riješen problem pomaka nagiba kromatografske bazne linije. Nažalost, dodatnim testiranjima se pokazalo da ovakav postupak nije reproducibilan niti unutar jedne pločice, niti između različitih pločica. Nereproducibilnost deglikozilacije na *Omega 10k* membrani zasjenjuje njezine prednosti što se tiče povećanja osjetljivosti metode, budući da se analizom velikog broja uzoraka u duljem periodu akumulira i pogreška metode, koja postaje neprihvatljivo velika ako metoda već u samom početku nije reproducibilna. Nakon usporedbe deglikozilacije IgG-a u otopini uz pročišćavanje na celulozi s 80 %-tnim acetonitrilom i pročišćavanje na 0,2 μm hidrofilnom *GHP* filtru s 96 %-tnim acetonitrilom te deglikozilacije na *Omega 10k* membrani i filtriranja kroz membranu nakon deglikozilacije u otopini (kako bi se samo uklonio proteinski dio molekule IgG-a), kao optimalna metoda odabrana je deglikozilacija u otopini uz pročišćavanje na 0,2 μm hidrofilnom *GHP* filtru s 96 %-tnim hladnim acetonitrilom u vodi. Iako je osjetljivost ove metode nešto niža u odnosu na deglikozilaciju na *Omega 10k* membrani, reproducibilnost je značajno bolja, što u konačnici znači manju kumulativnu pogrešku metode prilikom analize velikog broja uzoraka. Isto tako, budući da se za pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana ne koristi celuloza, uklonjena je mogućnost kontaminacije uzoraka šećernim ostatcima. Pokušajem povećanja osjetljivost metode filtriranjem uzoraka kroz *Milipore Immobilon-P PVDF* membranu nakon deglikozilacije u otopini (Poglavlje 4.10.) postignuti su neznatno bolji rezultati (nešto viši intenziteti kromatografskih pikova). Provođenjem istog eksperimenta na uzorcima plazme filtriranjem kroz membranu dobiveni su čak nešto manji intenziteti kromatografskih pikova, a talog proteina je i dalje bio prisutan u sljedećim koracima priprave uzorka, što je upućivalo na nizak kapacitet membrane za vezanje proteina. S obzirom na navedeno, rezultati nakon filtriranja uzoraka kroz *Immobilon-P* membranu nisu opravdali dodatni trošak uvođenja ovog koraka.

5.4. Optimirana metoda deglikozilacije u otopini uz pročišćavanje na hidrofilnom filtru stabilna je u duljem periodu

U svrhu potencijalne dodatne optimizacije razvijene metode analizirani su udjeli varijacije koju unose pojedini koraci u metodi priprave glikana IgG-a za analizu tekućinskom kromatografijom (Poglavlje 4.11.1.). Iznenađujuće, koeficijenti varijacija udjela površina pojedinačnih kromatografskih pikova u kromatogramima uzoraka koji su uključivali varijaciju samo pojedinih koraka metode, kao i kromatogramima uzoraka koji su uključivali varijaciju cjelokupne metode bili su izrazito niski (Slika 49). U slučaju da je neki od koraka metode priprave uzoraka izrazito varijabilan te zahtijeva dodatnu optimizaciju, varijabilnost uzoraka koji uključuju varijaciju tog koraka priprave bila bi znatno viša u odnosu na uzorke koji ne uključuju varijaciju istog koraka priprave. Ovakvim eksperimentom je moguće identificirati potencijalno problematične korake u metodi, odnosno one koji znatno povećavaju pogrešku metode. S obzirom na dobivene rezultate, može se pretpostaviti da svi koraci priprave podjednako pridonose cjelokupnoj pogrešci metode, koja je u konačnici izrazito mala (Tablica 22). Zanimljivo je da je sličnim eksperimentom prilikom analize ukupnih *N*-glikana plazme istom metodom priprave ustanovljeno da korak fluorescentnog obilježavanja glikana unosi najveću pogrešku, odnosno da je to korak koji je najpodložiji varijaciji (Slika 58).[92] Ovaj rezultat se može objasniti činjenicom da je uzorak plazme daleko složeniji od uzorka samo jednog proteina (IgG-a), budući da sadrži daleko veću koncentraciju različitih proteina (1 mg u 10 μL), te zbog toga najvjerojatnije zahtijeva „čišće“ reakcijske uvjete kako bi reakcija obilježavanja slobodnih glikana bila reproducibilnija. Osim usporedbom pojedinih koraka u metodi priprave glikana za analizu tekućinskom kromatografijom, usporedbom koeficijenata varijacije udjela površine kromatografskih pikova unutar pojedinih setova uzoraka analiziranih metodom HILIC-UPLC nije uočena značajna razlika ovisno o vremenu analize pojedinih uzoraka (Slika 50). To je izrazito bitno budući da se svaka pločica od 96 uzoraka prosječno tekućinskom kromatografijom analizira tri cijela dana.



Slika 58. Analiza varijacije novorazvijene metode priprave glikana za analizu tekućinskom kromatografijom (HILIC-UPLC). Uzorci plazme (10 μL) su spajani u različitim koracima analize te nakon miješanja ponovno razdijeljeni u novu pločicu, kako bi se uklonila varijacija svih prethodnih koraka. **C** – uzorci spojeni nakon pročišćavanja fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom *GHP* filtru uz hladni 96 %-tni acetonitril u vodi, **B** – uzorci spojeni nakon obilježavanja slobodnih glikana 2-AB-om, **A** – uzorci spojeni nakon deglikozilacije u otopini, **D** – uzorci nisu spajani ni u jednom koraku. n = 24 (**A** do **D**)[92]

Već je ranije spomenuta važnost korištenja reproducibilne i stabilne metode prilikom visokoprotočne analize glikana, budući da ona podrazumijeva analizu nekoliko stotina, a često i nekoliko tisuća uzoraka u periodu od više tjedana ili mjeseci. Optimirana metoda je, prema tome, validirana na način da dobiveni rezultati odražavaju dugoročnu stabilnost metode u okvirima spomenutih istraživanja. Ponovljivost i rigidnost optimirane metode priprave glikana za analizu tekućinskom kromatografijom određena je analizom po jedne pločice s 96 uzoraka od strane triju analitičara u istim danima u razmaku od tri tjedna (Poglavlje 4.11.2.), što približno odražava realnu situaciju priprave i analize više stotina do preko tisuću uzoraka. Pokazano je da je vrijednost standardne devijacije udjela površine pojedinih kromatografskih pikova u ukupnoj površini svih pikova za većinu pikova manja od 0,3 %. Samo su u kromatogramima uzoraka na pločici broj 3 (pripravljenoj prvog dana od strane Analitičara 3) za tri kromatografska pika određene nešto više standardne devijacije čija vrijednost ne prelazi 2 % (Tablica 23). Nešto veće varijacije u udjelima površina pojedinih kromatografskih pikova uočene su i u slučaju pločice broj 1 (pripravljene prvog dana od strane Analitičara 1). Razlog većih varijacija u rezultatima u ova dva slučaja nije se mogao pripisati poznatim faktorima. Budući da su prikazani svi uzorci, povećana varijabilnost je najvjerojatnije posljedica jednog ili nekoliko uzoraka koji značajno odstupaju od većine (najvjerojatnije zbog slabijeg intenziteta kromatografskih pikova), što je i vidljivo na Slikama 51 i 52. Usporedbom udjela površine pojedinih kromatografskih pikova u ukupnoj površini svih pikova u

kromatogramima uzoraka pripravljenih od strane različitih analitičara (Tablica 24), te u različite dane (Tablica 25) u periodu od tri tjedna, vidljivo je da je za većinu kromatografskih pikova standardna devijacija < 0,5 %. Za svaki kromatografski pik je određena ukupna ponovljivost pri čemu su analizirani svi pripravljeni uzorci od strane triju analitičara u periodu od tri tjedna na ukupno 6 pločica (14 uzoraka po pločici). Vidljivo je da je standardna devijacija udjela površine za 21 pik od ukupno 24 kromatografska pika < 0,4 %, dok je za 3 kromatografska pika između 0,6 % i 0,8 % (Tablica 25).

Konačni cilj ovog eksperimenta bio je pokazati mogućnost metode da detektira biološke razlike u glikozilaciji IgG-a te su u tu svrhu na svakoj pločici pripravljeni i realni uzorci IgG-a. Osim toga, varijacija udjela površine kromatografskih pikova standarda pripravljenih novorazvijenom i optimiranom metodom uspoređena je s varijacijom pikova standarda pripravljenih prijašnjom metodom prilikom analize glikozilacije IgG-a kod upalne bolesti crijeva. Rezultati su pokazali da su varijacije u kromatogramima standarda za većinu kromatografskih pikova znatno manje od biološke varijacije. Izuzetak su kromatografski pikovi GP1, GP3, GP5, GP7, GP13, GP17 i GP20, od kojih neki pokazuju i nešto veću varijaciju u odnosu na staru metodu (Slike 56 i 57). Međutim, važno je naglasiti da su ovo odreda pikovi koji zauzimaju vrlo mali udio ukupne površine svih pikova u kromatogramu te su podložniji eksperimentalnoj varijaciji. Osim toga, u slučaju nove optimirane metode masa početnog uzorka je bila nešto manja nego u slučaju analize glikozilacije u upalnoj bolesti crijeva starom metodom. Prema tome, djelomično se naizgled veća varijabilnost novorazvijene metode može pripisati razlici u masi početnog materijala, koja dolazi do izražaja kod analize manje zastupljenih pikova. Isto tako, uočljivo je da velik broj kromatografskih pikova ima manju varijabilnost u slučaju priprave uzoraka novom metodom, unatoč manjoj masi početnog uzorka, što je posebice važno za sijalinizirane glikoforme (kromatografski pikovi GP16, GP18, GP23 i GP24). Budući da su realni uzorci IgG-a izolirani iz krvne plazme zdravih ispitanika starih između 30 i 45 godina, nije neobično da je biološka varijacija pojedinih glikoformi (kromatografskih pikova) relativno mala i na razini varijacije same metode. Za očekivati je da će prilikom analize bolesnih i zdravih ispitanika biološka razlika u glikozilaciji IgG-a biti znatno veća, te će se moći i detektirati optimiranom metodom priprave glikana. Razvijena metoda je osim za analizu glikozilacije IgG-a primjenjiva i za analizu *N*-glikozilacije ukupnih proteina plazme,[92] te najvjerojatnije i za analizu glikozilacije drugih izoliranih proteina pod uvjetom da je biološka varijacija veća od

varijacije same metode. S obzirom da prilikom priprave glikana za analizu tekućinskom kromatografijom novorazvijenom metodom nije uočen gubitak sijalinskih kiselina, te je riješen problem kontaminacije uzoraka ostatcima celuloze, očekuje se da će se njezinom primjenom u budućnosti dobiti još informativniji rezultati, te da će se moći detektirati i manje promjene u glikozilaciji, nego što je to bilo moguće do sada.

5.5. Smjernice za buduća istraživanja

Istraživanje provedeno u sklopu ove doktorske disertacije je dosad najopsežnija analiza glikozilacije IgG-a kod upalne bolesti crijeva, na nešto manje od tisuću ispitanika. Po prvi put je korištena metoda HILIC-UPLC koja omogućuje razdvajanje glikanskih izomera, te su analizirana i druga svojstva IgG-a osim galaktozilacije – uspoređen je udio sijaliniziranih glikoformi, te glikoformi koje sadrže sržnu fukozu i račvajući GlcNAc između pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti, pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa, te zdravih ispitanika. Iako je ovim istraživanjem dobivena potpunija slika o glikozilaciji IgG-a u upalnoj bolesti crijeva u odnosu na prethodna istraživanja, neka pitanja su još uvijek ostala otvorena. Uzorci za ovo istraživanje su skupljani retrospektivno, u različitim stadijima bolesti i nakon što je već započela određena terapija, te detaljne informacije o pacijentima nisu bile dostupne, zbog čega nije bilo moguće pratiti eventualnu promjenu glikozilacije tijekom napredovanja bolesti ili za vrijeme specifične terapije. Isto tako, tekućinskom kromatografijom je analizirana glikozilacija ukupnog IgG-a, dok bi zanimljivo bilo analizirati i glikozilaciju pojedinih podklasa IgG-a, primjerice LC-MS-om,[62] kako bi se utvrdilo je li promijenjena glikozilacija IgG-a kod upalne bolesti crijeva rezultat promjene glikozilacije samo jedne ili nekoliko podklasa IgG-a. Treba naglasiti kako se trenutno već intenzivno radi upravo na pružanju odgovora na ova pitanja - glikozilacija podklasa IgG-a će biti analizirana spektrometrijom masa u oko tri tisuće uzoraka. Istovremeno se sakupljaju i novi uzorci plazme pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti ili ulceroznog kolitisa i zdravih ispitanika s detaljnijim kliničkim podatcima, što će upotpuniti sliku o ulozi IgG-a u nastanku i/ili napredovanju bolesti.

Analizom ove populacije uočeni su određeni nedostatci korištene metode koji nisu došli do izražaja prilikom analize manjeg broja uzoraka, što je pokazalo važnost validacije korištenih metoda unutar duljeg perioda, nego što je to inače uobičajeno. Od presudne je

važnosti stabilnost korištene metode u cjelokupnom periodu priprave uzoraka, budući da je porastom varijacije metode tijekom vremena nemoguće detektirati manje promjene u glikozilaciji. Idealno bi dakle bilo imati stabilnu metodu koja ne pokazuje efekt serije, te je robusna s obzirom na osobu koja pripravlja uzorke i vrijeme priprave uzoraka. U praksi je to često vrlo teško postići, budući da se određeni nedostatci metode mogu uočiti tek analizom velikog broja uzoraka, te ih nije uvijek jednostavno niti predvidjeti. Zbog toga je od presudnog značaja dobar dizajn eksperimenta u kojem uzorci trebaju biti analizirani na način da svaka pločica predstavlja presjek analizirane populacije, s nasumično raspoređenim podjednakim brojem primjerice pacijenata i kontrola, kako bi se izbjegle lažne razlike koje su zapravo samo posljedica efekta serije. Izrazito je važno na svakoj pločici imati barem nekoliko standardnih uzoraka koji omogućavaju kontrolu metode u duljem periodu te isto tako daju informaciju o postojanju efekta serije. Osim specifičnog dizajna eksperimenata, visokoprotočne metode zahtijevaju i posebne statističke metode obrade velike količine podataka. Budući da se radi o novom konceptu analize čiji izazovi se još trebaju pokazati u budućnosti, eksperimentalne i statističke metode su još uvijek u razvoju.

§ 6. ZAKLJUČAK

- Kromatografska metoda HILIC-UPLC je reproducibilna i robusna metoda za analizu *N*-glikana IgG-a, čak i u duljem periodu od nekoliko tjedana i mjeseci, pri čemu najveću varijabilnost u dobivenim rezultatima uzrokuje starenje kolone.
- Glikozilacija IgG-a je promijenjena u upalnoj bolesti crijeva i to izraženije kod pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti, nego kod pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa.
- U upalnoj bolesti crijeva je veća zastupljenost negalaktoziliranih glikoformi IgG-a u odnosu na zdrave ispitanike.
- Omjer svih negalaktoziliranih i svih galaktoziliranih glikoformi IgG-a (G0/G) statistički je značajno različit kod sve tri ispitivane populacije. Omjer G0/G najveći je kod pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti, a najmanji kod zdravih ispitanika.
- Udio monosijaliniziranih glikoformi IgG-a je smanjen u upalnoj bolesti crijeva, što je barem djelomično posljedica smanjene galaktozilacije.
- Iako ispod razine statističke značajnosti, udio glikoformi IgG-a sa sržnom fukozom je manji, a glikoformi s račvajućim GlcNAc-om veći u upalnoj bolesti crijeva u odnosu na zdrave ispitanike.
- Klasična validacija nije dovoljna kako bi se osigurala potrebna reproducibilnost metoda za visokoprotočnu analizu glikana, budući da se pojedini nedostatci metode uočavaju tek nakon priprave i analize nekoliko stotina uzoraka.
- Plackett-Burmanov dizajn eksperimenta za testiranje robusnosti metode je jednostavan i brz način identifikacije ključnih parametara koji utječu na robusnost metode.
- Metoda korištena za pripravu glikana IgG-a prilikom analize glikozilacije u upalnoj bolesti crijeva pokazala se u duljem periodu nedovoljno reproducibilnom za detekciju manjih promjena u *N*-glikozilaciji.
- Metode deglikozilacije na membranama pokazale su se nedovoljno osjetljivima ili nereproducibilnima za pripravu *N*-glikana za analizu tekućinskom kromatografijom.
- Razvijena i optimirana metoda deglikozilacije u otopini uz pročišćavanje fluorescentno obilježenih glikana na hidrofilnom *GHP* filtru uz 96 %-tni acetonitril u vodi stabilna je u duljem razdoblju čak i prilikom priprave uzoraka od strane triju analitičara.

- Novorazvijena metoda priprave glikana za analizu tekućinskom kromatografijom može detektirati biološke razlike u *N*-glikozilaciji IgG-a, kao i ukupnih proteina plazme, metoda je manje varijabilna pri detekciji udjela sijaliniziranh glikoformi, nego što je to bio slučaj s prethodno korištenom metodom priprave glikana.

§ 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 (sijalinska 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-AB	2-aminobenzamid
2-PB	2-pikolin boran
ADCC	stanična citotoksičnost ovisna o antitijelima (eng. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*)
CDG	nasljedni poremećaji glikozilacije (eng. *congenital disorders of glycosylation*)
CGE	kapilarna gel-elektroforeza (eng. *capillary gel electrophoresis*)
CV	koeficijent varijacije (eng. *coefficient of variation*)
Dol-P	dolikol fosfat
Dol-P-P	dolikol pirofosfat
DTT	ditiotreitol
ER	endoplazmatski retikulum
EU	jedinica emisije (eng. *emission unit*)
Fab	fragment koji veže antigen (eng. *fragment antigen binding*)

Fc	fragment koji kristalizira (eng. *fragment crystallizable*)
GDP	gvanozin-5'-difosfat
GK	Golgijev kompleks
GP	glikanski pik
GPI	glikozilfosfatidilinozitolno sidro
GU	jedinica glukoze (eng. *glucose unit*)
GuHCl	gvanidin hidroklorid
GWAS	cijelogenomske asocijacijske studije (eng. *genome-wide association studies*)
IAA	jodoacetamid
IL	interleukin
HILIC	tekućinska kromatografija koja se temelji na hidrofilnim interakcijama (eng. *hydrophilic interaction liquid chromatography*)
IgG	imunoglobulin G
LC	tekućinska kromatografija (eng. *liquid chromatography*)
MALDI	matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization*)
MBL	manoza-vezujući lektin (eng. *mannose-binding lectin*)
MS	spektrometrija masa (eng. *mass spectrometry*)
OST	oligosaharil-transferaza
PBS	fosfatni pufer (eng. *phosphate buffered saline*)
PNGaza F	peptidil-*N*-glikozidaza F
PVDF	polivinilidenski fluorid
SD	standardna devijacija
SDS	natrijev dodecil-sulfat (eng. *sodium dodecyl sulphate*)
SPE	ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. *solid phase extraction*)
TCEP	tris(2-karboksietil) fosfin
TEAB	trietilamonijev bikarbonat
TNF	faktor tumorske nekroze (eng. *tumor necrosis factor*)
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
UDP	uridin-5'-difosfat
UPLC	tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (eng. *ultra performance liquid chromatography*)

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. W. S. Garrett, J. I. Gordon i L. H. Glimcher, *Cell* **140** (2010) 859–870.

2. O. Gornik i G. Lauc, *Dis. Markers* **25** (2008) 267–278.

3. O. Gornik, T. Pavić i G. Lauc, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1820** (2012) 1318–1326.

4. K. Masuda, T. Kubota, E. Kaneko, S. Iida, M. Wakitani, Y. Kobayashi-Natsume, A. Kubota, K. Shitara i K. Nakamura, *Mol. Immunol.* **44** (2007) 3122–3131.

5. C. Ferrara, S. Grau, C. Jäger, P. Sondermann, P. Brünker, I. Waldhauer, M. Hennig, A. Ruf, A. C. Rufer, M. Stihle, P. Umaña i J. Benz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108** (2011) 12669–12674.

6. Y. Kaneko, F. Nimmerjahn i J. V Ravetch, *Science* **313** (2006) 670–673.

7. R. M. Anthony, F. Wermeling i J. V. Ravetch, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1253** (2012) 170–180.

8. D. P. B. McGovern, M. R. Jones, K. D. Taylor, K. Marciante, X. Yan, M. Dubinsky, A. Ippoliti, E. Vasiliauskas, D. Berel, C. Derkowski, D. Dutridge, P. Fleshner, D. Q. Shih, G. Melmed, E. Mengesha, L. King, S. Pressman, T. Haritunians, X. Guo, S. R. Targan i J. I. Rotter, *Hum. Mol. Genet.* **19** (2010) 3468–3476.

9. J. C. Barrett, J. C. Lee, C. W. Lees, N. J. Prescott, C. a Anderson, A. Phillips, E. Wesley, K. Parnell, H. Zhang, H. Drummond, E. R. Nimmo, D. Massey, K. Blaszczyk, T. Elliott, L. Cotterill, H. Dallal, A. J. Lobo, C. Mowat, J. D. Sanderson, D. P. Jewell, W. G. Newman, C. Edwards, T. Ahmad, J. C. Mansfield, J. Satsangi, M. Parkes, C. G. Mathew, P. Donnelly, L. Peltonen, J. M. Blackwell, E. Bramon, M. a Brown, J. P. Casas, A. Corvin, N. Craddock, P. Deloukas, A. Duncanson, J. Jankowski, H. S. Markus, C. G. Mathew, M. I. McCarthy, C. N. a Palmer, R. Plomin, A. Rautanen, S. J. Sawcer, N. Samani, R. C. Trembath, A. C. Viswanathan, N. Wood, C. C. a Spencer, J. C. Barrett, C. Bellenguez, D. Davison, C. Freeman, A. Strange, P. Donnelly, C. Langford, S. E. Hunt, S. Edkins, R. Gwilliam, H. Blackburn, S. J. Bumpstead, S. Dronov, M. Gillman, E. Gray, N. Hammond, A. Jayakumar, O. T. McCann, J. Liddle, M. L. Perez, S. C. Potter, R. Ravindrarajah, M. Ricketts, M. Waller, P. Weston, S. Widaa, P. Whittaker, P. Deloukas, L. Peltonen, C. G. Mathew, J. M. Blackwell, M. a Brown, A. Corvin, M. I. McCarthy, C. C. a Spencer, A. P. Attwood, J. Stephens, J. Sambrook, W. H. Ouwehand, W. L. McArdle, S. M. Ring i D. P. Strachan, *Nat. Genet.* **41** (2009) 1330–1334.

10. G. Lauc, J. E. Huffman, M. Pučić, L. Zgaga, B. Adamczyk, A. Mužinić, M. Novokmet, O. Polašek, O. Gornik, J. Krištić, T. Keser, V. Vitart, B. Scheijen, H. W. Uh, M.

Molokhia, A. L. Patrick, P. McKeigue, I. Kolčić, I. K. Lukić, O. Swann, F. N. van Leeuwen, L. R. Ruhaak, J. J. Houwing-Duistermaat, P. E. Slagboom, M. Beekman, A. J. M. de Craen, A. M. Deelder, Q. Zeng, W. Wang, N. D. Hastie, U. Gyllensten, J. F. Wilson, M. Wuhrer, A. F. Wright, P. M. Rudd, C. Hayward, Y. Aulchenko, H. Campbell i I. Rudan, *PLoS Genet.* **9** (2013).

11. R. Dubé, G. a Rook, J. Steele, R. Brealey, R. Dwek, T. Rademacher i J. Lennard-Jones, *Gut* **31** (1990) 431–434.

12. S. Shinzaki, H. Iijima, T. Nakagawa, S. Egawa, S. Nakajima, S. Ishii, T. Irie, Y. Kakiuchi, T. Nishida, M. Yasumaru, T. Kanto, M. Tsujii, S. Tsuji, T. Mizushima, H. Yoshihara, A. Kondo, E. Miyoshi i N. Hayashi, *Am. J. Gastroenterol.* **103** (2008) 1173–1181.

13. K. Miyahara, K. Nouso, S. Saito, S. Hiraoka, K. Harada, S. Takahashi, Y. Morimoto, S. Kobayashi, F. Ikeda, Y. Miyake, H. Shiraha, A. Takaki, H. Okada, M. Amano, K. Hirose, S. I. Nishimura i K. Yamamoto, *PLoS One* **8** (2013) 1–7.

14. J. E. Huffman, M. Pučić-Baković, L. Klarić, R. Hennig, M. H. J. Selman, F. Vučković, M. Novokmet, J. Krištić, M. Borowiak, T. Muth, O. Polašek, G. Razdorov, O. Gornik, R. Plomp, E. Theodoratou, A. F. Wright, I. Rudan, C. Hayward, H. Campbell, A. M. Deelder, U. Reichl, Y. S. Aulchenko, E. Rapp, M. Wuhrer i G. Lauc, *Mol. Cell. Proteomics* **13** (2014) 1598–610.

15. K. Ohtsubo i J. D. Marth, *Cell* **126** (2006) 855–867.

16. G. W. Hart, M. P. Housley i C. Slawson, *Nature* **446** (2007) 1017–1022.

17. L. Wells, K. Vosseller i G. W. Hart, *Science (80-.).* **291** (2001) 2376–2378.

18. K. W. Moremen, M. Tiemeyer i A. V. Nairn, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13** (2012) 448–462.

19. T. Ishino, M. Wang, L. Mosyak, A. Tam, W. Duan, K. Svenson, A. Joyce, D. M. O'Hara, L. Lin, W. S. Somers i R. Kriz, *J. Biol. Chem.* **288** (2013) 16529–16537.

20. T. S. Raju i B. J. Scallon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341** (2006) 797–803.

21. T. Sareneva, J. Pirhonen, K. Cantell i I. Julkunen, *Biochem. J.* **308** (1995) 9–14.

22. D. Russell, N. J. Oldham i B. G. Davis, *Carbohydr. Res.* **344** (2009) 1508–1514.

23. F. Yamamoto, H. Clausen, T. White, J. Marken i S. Hakomori, *Nature* **345** (1990) 229–233.

24. A. Varki, *Glycobiology* **3** (1993) 97–130.

25. T. Hennet, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1820** (2012) 1306–1317.

26. K. Scott, T. Gadomski, T. Kozicz i E. Morava, *J. Inherit. Metab. Dis.* **37** (2014) 609–617.

27. T. Hennet i J. Cabalzar, *Trends Biochem. Sci.* **40** (2015) 377–384.

28. 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. 2nd edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2nd editio., 2009.

29. P. A. Haynes, *Glycobiology* **8** (1998) 1–5.

30. S. H. Shakin-Eshleman, S. L. Spitalnik i L. Kasturi, *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 6363–6366.

31. E. Bause, *Biochem. J.* **209** (1983) 331–336.

32. J. L. Mellquist, L. Kasturi, S. L. Spitalnik i S. H. Shakin-Eshleman, *Biochemistry* **37** (1998) 6833–6837.

33. J. Jones, S. S. Krag i M. J. Betenbaugh, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1726** (2005) 121–137.

34. S. Sanyal, C. G. Frank i A. K. Menon, *Biochemistry* **47** (2008) 7937–7946.

35. E. Mohorko, R. Glockshuber i M. Aebi, *J. Inherit. Metab. Dis.* **34** (2011) 869–878.

36. M. Słomińska-Wojewódzka i K. Sandvig, *Molecules* **20** (2015) 9816–9846.

37. R. Apweiler, H. Hermjakob i N. Sharon, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1473** (1999) 4–8.

38. C. B. Lebrilla i H. J. An, *Mol. Biosyst.* **5** (2009) 17–20.

39. R. P. Kozak, L. Royle, R. a. Gardner, D. L. Fernandes i M. Wuhrer, *Anal. Biochem.* **423** (2012) 119–128.

40. G. Zauner, R. P. Kozak, R. a. Gardner, D. L. Fernandes, A. M. Deelder i M. Wuhrer, *Biol. Chem.* **393** (2012) 687–708.

41. R. P. Kozak, L. Royle, R. a. Gardner, A. Bondt, D. L. Fernandes i M. Wuhrer, *Anal. Biochem.* **453** (2014) 29–37.

42. 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.

43. 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.

44. I. Burnina, E. Hoyt, H. Lynaugh, H. Li i B. Gong, *J. Chromatogr. A* **1307** (2013) 201–206.

45. H. Stöckmann, B. Adamczyk, J. Hayes i P. M. Rudd, *Anal. Chem.* **85** (2013) 8841–8849.

46. L. R. Ruhaak, C. Huhn, W. Waterreus, A. R. De Boer, C. H. Hokke, M. Wuhrer, B. Mass i S. Unit, *Anal. Chem.* **80** (2008) 6119–6126.

47. J. C. Bigge, T. P. Patel, J. a Bruce, P. N. Goulding, S. M. Charles i R. B. Parekh, *Anal. Biochem.*, 1995, 230, 229–238.

48. Y. Takegawa, K. Deguchi, T. Keira, H. Ito, H. Nakagawa i S. I. Nishimura, *J. Chromatogr. A* **1113** (2006) 177–181.

49. S. Klapoetke, J. Zhang, S. Becht, X. Gu i X. Ding, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53** (2010) 315–324.

50. L. R. Ruhaak, E. Steenvoorden, C. a M. Koeleman, A. M. Deelder i M. Wuhrer, *Proteomics* **10** (2010) 2330–2336.

51. J. V. Ravetch i S. Bolland, *Annu. Rev. Immunol.* **19** (2001) 275–290.

52. J. N. Arnold, M. R. Wormald, R. B. Sim, P. M. Rudd i R. a Dwek, *Annu. Rev. Immunol.* **25** (2007) 21–50.

53. G. Teng i F. N. Papavasiliou, *Annu. Rev. Genet.* **41** (2007) 107–120.

54. K. R. Anumula, *J. Immunol. Methods* **382** (2012) 167–176.

55. S. Böhm, I. Schwab, A. Lux i F. Nimmerjahn, *Semin. Immunopathol.* **34** (2012) 443–453.

56. M. Pucic, A. Knezevic, J. Vidic, B. Adamczyk, M. Novokmet, O. Polasek, O. Gornik, S. Supraha-Goreta, M. R. Wormald, I. Redzic, H. Campbell, A. Wright, N. D. Hastie, J. F. Wilson, I. Rudan, M. Wuhrer, P. M. Rudd, D. Josic i G. Lauc, *Mol. Cell. Proteomics* **10** (2011) M111.010090–M111.010090.

57. M. Pučić, A. Mužinić, M. Novokmet, M. Škledar, N. Pivac, G. Lauc i O. Gornik, *Glycobiology* **22** (2012) 975–982.

58. J. Krištić, F. Vučković, C. Menni, L. Klarić, T. Keser, I. Beceheli, M. Pučić-Baković, M. Novokmet, M. Mangino, K. Thaqi, P. Rudan, N. Novokmet, J. Šarac, S. Missoni, I. Kolčić, O. Polašek, I. Rudan, H. Campbell, C. Hayward, Y. Aulchenko, A. Valdes, J. F. Wilson, O. Gornik, D. Primorac, V. Zoldoš, T. Spector i G. Lauc, *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **69** (2014) 779–789.

59. H. K. Einarsdottir, M. H. J. Selman, R. Kapur, S. Scherjon, C. a M. Koeleman, A. M. Deelder, C. E. Van Der Schoot, G. Vidarsson i M. Wuhrer, *Glycoconj. J.* **30** (2013) 147–157.

60. E. Yamada, Y. Tsukamoto, R. Sasaki, K. Yagyu i N. Takahashi, *Glycoconj. J.* **14** (1997) 401–405.

61. A. Bondt, Y. Rombouts, M. H. J. Selman, P. J. Hensbergen, K. R. Reiding, J. M. W. Hazes, R. J. E. M. Dolhain i M. Wuhrer, *Mol. Cell. Proteomics* **31** (2014) 1–30.

62. M. Wuhrer, J. C. Stam, F. E. Van De Geijn, C. a M. Koeleman, C. T. Verrips, R. J. E. M. Dolhain, C. H. Hokke i A. M. Deelder, *Proteomics* **7** (2007) 4070–4081.

63. M. Pucic, M. H. J. Selman, M. Ho, I. Rudan, H. Campbell, A. M. Deelder, G. Lauc i M. Wuhrer, *J. Proteome Res.* **12** (2013) 821–831.

64. R. M. Anthony i J. V. Ravetch, *J. Clin. Immunol.* **30** (2010) 9–14.

65. D. K. Podolsky, *N. Engl. J. Med.* **325** (1991) 928–937.

66. M. Coskun, *Front. Med.* **1** (2014) 1–5.

67. J. H. Cho, *Nat. Rev. Immunol.* **8** (2008) 458–466.

68. J. H. Cho i S. R. Brant, *Gastroenterology* **140** (2011) 1704–1712.

69. C. Abraham i J. H. Cho, *N. Engl. J. Med.* **361** (2009) 2066–2078.

70. A. P. Moran, A. Gupta i L. Joshi, *Gut* **60** (2011) 1412–1425.

71. C. T. Peterson, V. Sharma, L. Elmén i S. N. Peterson, *Clin. Exp. Immunol.* **179** (2014) 363–377.

72. P. Suenaert, V. Bulteel, L. Lemmens, M. Noman, B. Geypens, G. Van Assche, K. Geboes, J. L. Ceuppens i P. Rutgeerts, *Am. J. Gastroenterol.* **97** (2002) 2000–2004.

73. P. R. Gibson, *Gut* **53** (2004) 1724–1725.

74. R. M. Gore, E. J. Balthazar, G. G. Ghahremani i F. H. Miller, *Am. J. Roentgenol.* **167** (1996) 3–15.

75. T. Rath, T. T. Kuo, K. Baker, S. W. Qiao, K. Kobayashi, M. Yoshida, D. Roopenian, E. Fiebiger, W. I. Lencer i R. S. Blumberg, *J. Clin. Immunol.* **33** (2013) 9–17.

76. M. Yoshida, A. Masuda, T. T. Kuo, K. Kobayashi, S. M. Claypool, T. Takagawa, H. Kutsumi, T. Azuma, W. I. Lencer i R. S. Blumberg, *Springer Semin. Immunopathol.* **28** (2006) 397–403.

77. Prozyme, *N-glycanase*

http://www.prozyme.com/~prozyme/documents/GKE-5006.pdf (13. svibnja 2015.).

78. Promega, *PNGase F Prod. Information, 9PIV483*

https://www.promega.com/~/media/files/resources/protocols/product information sheets/n/pngase f protocol.pdf (1. siječnja 2015.).

79. M. Novokmet, M. Pučić, I. Redžić, A. Mužinić i O. Gornik, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1820** (2012) 1399–1404.

80. J. Karkas i E. Chargaff, *J. Biolo* **239** (1964) 949–957.

81. L. R. Ruhaak, R. Hennig, C. Huhn, M. Borowiak, R. J. E. M. Dolhain, A. M. Deelder, E. Rapp i M. Wuhrer, *J. Proteome Res.* **9** (2010) 6655–6664.

82. R. Malhotra, M. R. Wormald, P. M. Rudd, P. B. Fischer, R. a Dwek i R. B. Sim, *Nat. Med.* **1** (1995) 237–243.

83. F. H. Routier, E. F. Hounsell, P. M. Rudd, N. Takahashi, A. Bond, F. C. Hay, A. Alavi, J. S. Axford i R. Jefferis, *J. Immunol. Methods* **2013** (1998) 113–130.

84. R. Parekh, D. a Isenberg, B. M. Ansell, I. M. Roitt, R. a Dwek i T. W. Rademacher, *Lancet* **331** (1988) 966–969.

85. S. Nakajima, H. Iijima, S. Shinzaki, S. Egawa, T. Inoue, A. Mukai, Y. Hayashi, J. Kondo, T. Akasaka, T. Nishida, T. Kanto, E. Morii, T. Mizushima, E. Miyoshi, M. Tsujii i N. Hayashi, *Inflamm. Bowel Dis.* **17** (2011) 927–936.

86. Ludger, *Product Guide for LudgerSep N Buffer x40 Concentrate for Preparation of LS-N Buffer*

http://www.ludger.com/docs/products/ls/n-buffx40/ls-n-buffx40-guide-v1.9.pdf (16. lipnja 2015.).

87. R. Parekh, I. Roitt, D. Isenberg, R. Dwek i T. Rademacher, *J. Exp. Med.* **167** (1988) 1731–1736.

88. F. Nimmerjahn, R. M. Anthony i J. V Ravetch, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104** (2007) 8433–8437.

89. P. K. Qasba, B. Ramakrishnan i E. Boeggeman, *Curr. Drug Targets* **9** (2008) 292–309.

90. M. Rogosnitzky, R. Danks i D. Holt, *Autoimmun. Rev.* **12** (2012) 275–280.

91. I. Schwab i F. Nimmerjahn, *Nat. Rev. Immunol.* **13** (2013) 176–189.

92. I. Trbojević Akmačić, I. Ugrina, J. Štambuk, I. Gudelj, F. Vučković, G. Lauc i M. Pučić Baković, *Biochem.* **80** (2015) 934–942.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 14. kolovoza 1988. godine u Novoj Gradiški, gdje sam završila opću gimnaziju. Preddiplomski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2007. godine, te ga završila izradom završnog rada na temu „Infracrveni spektri aminokiselina“ pod vodstvom dr. sc. Snežane Miljanić. 2010. godine upisala sam Diplomski studij kemije, istraživački smjer, usmjerenja biokemija i analitička kemija. U periodu od rujna 2011. do ožujka 2012. godine volontirala sam na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za molekularnu genetiku Zavoda za molekularnu biologiju, u sklopu znanstvenog projekta istraživanja lipolitičkih enzima iz porodice GDS(L). Ondje sam izradila rad predan na natječaj za Rektorovu nagradu u ak. god 2011./2012. s temom „Heterologna ekspresija i biokemijska karakterizacija lipaze iz *Streptomyces rimosus* s proteinskim dodatkom na N-kraju“ pod vodstvom dr. sc. Dušice Vujaklije, više znanstv. suradnice, izv. prof., zatim komentorice s Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta dr. sc. Ite Gruić-Sovulj, izv. prof. te neposrednim vodstvom dr. sc. Ane Bielen. Diplomirala sam 2012. godine s radom „Kloniranje i izolacija elongacijskog faktora Tu iz bakterije *Escherichia coli* te ispitivanje interakcija s aminoaciliranom $tRNA^{Leu}$“ pod vodstvom dr. sc. Ite Gruić-Sovulj, izv. prof. i neposrednim vodstvom dr. sc. Nevene Cvetešić, asist. Od iste godine zaposlena sam u Laboratoriju za glikobiologiju tvrtke Genos. Neposredni sam voditelj jednog diplomskog rada, te jedne IAESTE stručne prakse.

ZNANSTVENA USAVRŠAVANJA

2015. 26th Joint Glycobiology Meeting, Lille, Francuska, sudionik (postersko priopćenje)
2015. Glyco23, 23rd International Symposium on Glycoconjugates, Split, Hrvatska, sudionik (3 posterska priopćenja)
2014. BIA Separations, Ajdovščina, Slovenija, gost istraživač
2014. 11th Waters Users' Meeting, Opatija, Hrvatska, sudionik
2014. Seminar HPLC i UPLC: Rješavanje i sprečavanje problema + DPS radionica, sudionik
2013. 19th International Symposium on Separation Sciences and 14th international chromatography school, Poreč, Hrvatska, sudionik (postersko priopćenje)

2013. 8th ISABS Conference on Forensic, Anthropologic and Medical Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine, Split, Hrvatska, sudionik

2013. 10th Waters Users' Meeting, Bohinjska Bistrica, Slovenija, sudionik

2012. Biology Department, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, SAD, gost istraživač (4 mjeseca)

ZNANSTVENI RADOVI U ČASOPISIMA

1. **I. Trbojević Akmačić**, N. T. Ventham, E. Theodoratou, F. Vučković, N. A. Kennedy, J. Krištić, E. R. Nimmo, R. Kalla, H. Drummond, J. Štambuk, M. G. Dunlop, M. Novokmet, Y. Aulchenko, O. Gornik, H. Campbell, M. Pučić Baković, J. Satsangi, G. Lauc, IBD-BIOM Consortium (2015)
   Inflammatory bowel disease associates with proinflammatory potential of the immunoglobulin G glycome, *Inflamm. Bowel Dis.* **21** (6) 1237-1247.
2. **I. Trbojević Akmačić**, I. Ugrina, J. Štambuk, I. Gudelj, F. Vučković, G. Lauc, M. Pučić Baković (2015)
   High-Throughput Glycomics: Optimization of Sample Preparation, *Biochemistry (Moscow)* **80** (7) 934-942.
3. F. Vučković, J. Krištić, I. Gudelj, M. Teruel Artacho, T. Keser, M. Pezer, M. Pučić-Baković, J. Štambuk, **I. Trbojević-Akmačić**, C. Barrios, T. Pavić, C. Menni, Y. Wang, Y. Zhou, L. Cui, H. Song, Q. Zeng, X. Guo, B. A. Pons-Estel, P. McKeigue1, A. Leslie Patrick, O. Gornik, T. D. Spector, M. Harjaček, M. Alarcon-Riquelme, M. Molokhia, W. Wang, G. Lauc (2015)
   Systemic lupus erythematosus associates with the decreased immunosuppressive potential of the IgG glycome, *Arthritis Rheumatol.* **67** (11) 2978-2989.
4. C. Menni, T. Keser, M. Mangino, J. T. Bell, I. Erte, **I. Akmačić**, F. Vučković, M. Pučić Baković, O. Gornik, M. I. McCarthy, V. Zoldoš, T. D. Spector, G. Lauc, A. M. Valdes (2013)
   Glycosylation of immunoglobulin G: Role of genetic and epigenetic influences, *PloS ONE* **8** (12).
5. N. Cvetešić, **I. Akmačić**, I. Gruić-Sovulj (2013)
   Lack of discrimination against non-proteinogenic amino acid norvaline by elongation factor Tu from *Escherichia coli*, *Croat. Chem. Acta* **86** (1) 73–82.

PRIOPĆENJA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA

2015. Urh Černigoj, Urška Vidic, Blaž Nemec, Jernej Gašperšič, Nika Lendero Krajnc, Jana Vidič, Aleš Štrancar, **Irena Trbojević Akmačić**, Maja Pučić Baković, Daily Hernández, Eduardo Sánchez, Miladys Limonta, Rodolfo Valdés, Use of monoliths for immunoaffinity chromatography – from analytical to preparative applications (usmeno priopćenje)

2015. **I. Trbojević Akmačić**, M. Albers, M. Pučić Baković, U. Vidič, J. Vidič, U. Černigoj, G. Lauc, Semi-high-throughput isolation and *N*-glycosylation analysis of human fibrinogen (poster)

2015. I. Ugrina, **I. Trbojević Akmačić**, J. Štambuk, I. Gudelj, M. Pučić Baković, Exploring the stability of IgG and Plasma glycosylation within healthy individuals (poster)

2015. T. Keser, **I. Trbojević Akmačić**, N. T. Ventham, E. Theodoratou, F. Vučković, N. A. Kennedy, E. R. Nimmo, R. Kalla, H. Drummond, J. Štambuk, H. Campbell, C. Hedin, M. D'Amato, J. Halfvarsson, J. Satsangi, G. Lauc, Changes in the IgG glycome associated with inflammatory bowel disease (poster)

2015. **I. Trbojević Akmačić**, N. Ventham, E. Theodoratou, F. Vučković, N. Kennedy, J. Krištić, E.R. Nimmo, R. Kalla, H. Drummond, J. Štambuk, M.G. Dunlop, M. Novokmet, Y. Aulchenko, O. Gornik, IBD- BIOM consortium, H. Campbell, M. Pučić Baković, J. Satsangi, G. Lauc, Inflammatory bowel disease associates with pro-inflammatory potential of the IgG glycome (poster)

2013. **I. Trbojević Akmačić**, J. Štambuk, F. Vučković, M. Novokmet, M. Pučić Baković, G. Lauc, Evaluation of the UPLC method for IgG glycans analysis for it's robustness and repeatability (poster)

NAGRADE

2012. Medalja Kemijskog odsjeka za izvrsnost u studiranju