

Ponovljivost i reproducibilnost HILIC-UPLC i xCGE-LIF metoda u pripremi i analizi N-glikana proteina plazme i imunoglobulina G

Pavičić, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:733506>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ema Pavičić

**Ponovljivost i reproducibilnost HILIC-UPLC i
xCGE-LIF metoda u pripremi i analizi N-glikana
proteina plazme i imunoglobulina G**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Genos d.o.o laboratoriju za glikobiologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Gordana Lauca.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Gordanu Laucu na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici za stjecanje novih znanja i vještina te Maji Hanić, mag. pharm., na pomoći tijekom izrade diplomskog rada.

Veliko hvala mojim prijateljima i posebno mojoj obitelji na pruženom strpljenju, ljubavi, razumijevanju i velikoj podršci tijekom cijelog školovanja.

I za kraj, najveće hvala dragom Bogu.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Glikani	1
1.2. Glikozilacija proteina	4
1.3. N-glikozilacija	4
1.4. N-glikom krvne plazme	6
1.5. N-glikom imunoglobulina G	8
1.6. Metode analize N-glikana.....	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME	18
3. MATERIJALI I METODE	19
3.1 Materijali	19
3.1.1. Anorganske, organske kemikalije i enzimi	19
3.1.2. Otopine i puferi	20
3.1.3. Pribor i uređaji	24
3.2. Metode	25
3.2.1. Izolacija IgG-a iz krvne plazme pomoću pločice monolita s proteinom G	25
3.2.2. <i>In solutio</i> deglikozilacija IgG-a i proteina plazme za HILIC-UPLC analizu	27
3.2.3. <i>In solutio</i> obilježavanje N-glikana za HILIC-UPLC analizu.....	28
3.2.4. HILIC-UPLC analiza N-glikana IgG-a.....	29
3.2.5. HILIC-UPLC analiza N-glikana proteina plazme	30
3.2.6. <i>In solutio</i> deglikozilacija IgG-a i proteina plazme za xCGE-LIF analizu	31
3.2.7. Obilježavanje N-glikana otopinom APTS za xCGE-LIF analizu.....	32
3.2.8. HILIC-SPE čišćenje APTS obilježenih N-glikana za xCGE-LIF analizu.....	33
3.2.9. xCGE-LIF analiza N-glikana IgG-a i proteina plazme.....	35
3.2.10. Analiza podataka.....	35
4. REZULTATI.....	40

4.1. Ponovljivost i reproducibilnost HILIC-UPLC i xCGE-LIF metoda u pripremi i analizi N-glikana imunoglobulina G	40
4.2. Ponovljivost i reproducibilnost HILIC-UPLC i xCGE-LIF metoda u pripremi i analizi N-glikana proteina plazme.....	46
5. RASPRAVA.....	54
6. ZAKLJUČCI	57
7. LITERATURA	58
8. SAŽETAK/SUMMARY	65
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

Popis kratica

2-AA	antranilna kiselina
2-AB	2-aminobenzamid
2-PB	2-pikolin boran
ACN	acetonitril
ADCC	stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima (engl. <i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
APTS	8-aminopiren-1,3,6-trisulfonska kiselina (engl. <i>8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid</i>)
CDC	citotoksičnost ovisna o komplementu (engl. <i>complement-dependent cytotoxicity</i>)
CE	kapilarna elektroforeza (engl. <i>capillary electrophoresis</i>)
C _H	konstantna regija teškog lanca imunoglobulina
C _L	konstantna regija lakog lanca imunoglobulina
CV	koeficijent varijacije (engl. <i>coefficient of variation</i>)
DMSO	dimetil sulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
ER	endoplazmatski retikulum
EtOH	etanol
Fab	fragment koji veže antigen (engl. <i>fragment, antigen binding</i>)
Fc	kristalizirajući fragment (engl. <i>fragment, crystallizable</i>)
FLR	fluorescencija
Fuc	fukoza
GAG	glikozaminoglikan
Gal	galaktoza
GalNAc	N-acetilgalaktozamin
Glu	glukoza
GlcNAc	N-acetilglukozamin
GP	kromatografski vršak (engl. <i>glycan peak</i>)
GPI	glikozil-fosfatidil inozitol
GU	glukozna jedinica (engl. <i>glucose unit</i>)
HAc	octena kiselina, ledena

HILIC	kromatografija hidrofилnih interakcija (engl. <i>hidrophilic interaction chromatography</i>)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
IgA	imunoglobulin A
IgD	imunoglobulin D
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
Man	manoza
NK-stanice	prirodne stanice ubojice (engl. <i>natural-killer</i>)
MS	masena spektrometrija (engl. <i>mass-spectrometry</i>)
NMR	nuklearna magnetska rezonanca (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
OST	oligosaharil-transferaza
P	vršak (engl. <i>peak</i>)
PA	2-aminopiridin
PAMPS	molekularni obrasci prisutni na patogenima (engl. <i>patoghen associated molecular patterns</i>)
PCR	lančana reakcija polimeraze (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PBS	fosfatni pufer s dodatkom soli (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
SDS	natrijev lauril sulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Sia	sijalinska kiselina
SPE	ekstrakcija na čvrstoj stacionarnoj fazi (engl. <i>solid phase extraction</i>)
T	temperatura
TEA	trietanolamin
TRIS	tris-(hidroksimetil)-aminometan
V	volumen
V _H	varijabilna regija teškog lanca imunoglobulina
V _L	varijabilna regija lakog lanca imunoglobulina
UDP	uridin-difosfat
UPLC	tekućinska kromatografija ultra-visoke djelotvornosti (engl. <i>ultra-high performance liquid chromatography</i>)
\bar{x}	srednja vrijednost

xCGE-LIF	multipleksna kapilarna gel elektroforeza s laserom induciranom fluorescencijom (engl. <i>multiplexed capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence</i>)
Xyl	ksiloza
σ	standardna devijacija

1. UVOD

1.1. Glikani

Ugljikohidrati su, uz nukleinske kiseline, lipide i proteine, esencijalna skupina makromolekula koje nalazimo u svim oblicima života (Lauc i sur., 2014). Sve stanice i velik broj makromolekula nose kovalentno vezane šećere (monosaharide) ili lance šećera (oligosaharide) odnosno glikane (Varki i sur., 2015). Glikani imaju važnu ulogu u staničnoj adheziji, invaziji patogena te međudjelovanju makromolekula. Također, sudjeluju u procesu smatanja i sekrecije proteina te utječu na njihovu stabilnost, vrijeme poluživota i funkciju (Moremen i sur., 2012).

Glikom označava repertoar svih glikanskih struktura koje sadrži neki organizam, tkivo ili stanica. Osam je najčešćih monosaharida koji grade glikane u životinjskim stanicama, uključujući i ljudske, a to su: fukoza (Fuc), galaktoza (Gal), glukoza (Glu), manozna (Man), N-acetilgalaktozamin (GalNAc), N-acetilglukozamin (GlcNAc), sijalinska kiselina (Sia) i ksiloza (Xyl) (Lauc i sur., 2014).

Mogućnost povezivanja monomernih šećernih jedinica na različite načine uzrok je iznimne strukturne raznolikosti glikana u odnosu na oligonukleotide i peptide. Prvo, zbog različite konfiguracije na anomernom ugljikovom atomu (C1), ciklički monomeri tvore α ili β anomere. Zatim, anomerni C-atom reagira s jednom hidroksilnom skupinom drugog monomera stvarajući glikozidnu vezu. Ovisno o tome koja je hidroksilna skupina drugog monomera uključena u glikozidnu vezu, isti monomeri se mogu povezati na više različitih načina, stvarajući izomere koji imaju različitu trodimenzionalnu strukturu i biološku aktivnost. Enzimi koji kataliziraju stvaranje glikozidne veze specifični su za α , odnosno β anomer kao i za određenu hidroksilnu skupinu drugog monomera. Nadalje, jedan monomer može tvoriti više od dvije glikozidne veze, stvarajući tako točku grananja. Pojava grananja specifična je karakteristika glikana i uvelike doprinosi njihovoj strukturnoj raznolikosti. Važno je imati na umu i mogućnost rotacije oko glikozidne veze koja ovisi o načinu i vrsti vezanih monomera, a ključna je za biološke funkcije glikana. Konačno, mnogi složeni polisaharidi sadrže modificirane šećerne ostatke kovalentno povezane s malim molekulama kao što su amino, sulfatna ili acetilna skupina (Varki i sur., 2015; Lordish i sur., 2012).

Zbog kompleksne i razgranate strukture te nepostojanja genskog predloška za glikane (Lauc i sur., 2014), njihovo istraživanje predstavlja zahtjevan posao. Napretkom analitičkih metoda, glikani se sve više istražuju u svrhu otkrivanja biomarkera za različite bolesti, rane

dijagnoze ili prognoze ishoda te razvoja personalizirane medicine u konačnici (Russell i sur., 2018; Almeida i Kolarich, 2016).

Glikokonjugati su makromolekule koje sadrže šećerne jedinice odnosno glikane kovalentno vezane na lipide ili proteine. To su glikoproteini, glikolipidi, proteoglikani, glikozaminoglikani i glikosfingolipidi. Glikokonjugati nastaju procesom glikozilacije, a vezani glikani međusobno se razlikuju po sastavu monomera, vezama između monomera i u duljini lanca. Sinteza glikokonjugata je dinamički proces koji ovisi o prisutnosti i aktivnosti enzima u odgovarajućem staničnom odjeljku, dostupnosti prekursora šećera, tipu stanica u kojem se glikozilacija odvija te o signalima koje stanica prima (Reily i sur., 2019).

Glikolipidi nastaju u Golgijevom aparatu dodavanjem ugljikohidrata na ceramid. Poslije transporta vezikulama, oni se lociraju na odgovarajućoj vanjskoj polovici dvosloja stanične membrane tako da im polarne skupine (glave) vire sa stanične površine. Oligosaharidi glikolipida važni su površinski biljezi u procesu prepoznavanja između stanica (Cooper i sur., 2010). Posebna vrste glikolipida, točnije glikofosfolipida, su GPI sidra (glikozil-fosfatidil inozitolna sidra). Vežu se na C-terminalni kraj proteina u endoplazmatskom retikulumu (ER) i sidre proteine na staničnu membranu.

Proteoglikani su posebna skupina glikoproteina koji sadrže jedan ili više kovalentno povezanih glikozaminoglikana (GAG). GAG su dugi polimeri ponavljajućih disaharidnih jedinica koji su često modificirani amino, acetilnom ili sulfatnom skupinom, a mogu biti vrlo hidratizirani. Važne su sastavnice izvanstaničnog matriksa, npr. perlekan, hondroitin sulfat, keratan sulfat, a hijarulonska kiselina je jedini GAG koji nije vezan na šržni protein. Vežu na desetke različitih molekula, uključujući ostale komponente izvanstaničnog matriksa (laminin, nidogen), stanične receptore i faktore rasta (Cooper i sur., 2010).

Više od polovice proteina u našem organizmu je glikozilirano te ih nazivamo glikoproteinima (Krištić i sur., 2017). Udio glikana u proteinu je varijabilan, ovisi o vrsti proteina, tkivu i mjestu u organizmu gdje se izvorno nalazi. Primjerice, kolagen u koži sadrži 0,5% glikana, kolagen u hrskavici 4%, a kolagen koji gradi bazalnu membranu čak 10% (Bhagavan i sur., 2015). Glikoproteini se uglavnom izlučuju ili su smješteni na staničnoj membrani, premda su mnogi jezgreni i citosolni proteini također glikozilirani (Cooper i sur., 2010).

Za razliku od sinteze proteina koja se zasniva na temelju DNK predložka, sinteza glikana uvjetovana je složenom mrežom genetičkih i okolišnih čimbenika te omogućava organizmu brzu prilagodbu na promjene u okolini. Osim što glikani djeluju kao aktivacijski odnosno inaktivacijski prekidači (kao i većina posttranslacijskih modifikacija), sudjeluju u

stvaranju kompleksnih struktura s novim funkcijama (Lauc i sur., 2014). O-GlcNAc glikozilacija treonina ili serina na citosolnim ili jezgrinim proteinima može biti kompetitivna reakcija s fosforilacijom. Na taj način organizam fino regulira djelovanje proteina pod utjecajem različitih signalnih putova koji potiču jednu ili drugu reakciju modifikacije (Varki, 2017).

Mucini, O-glikozilirani proteini, nalaze se na površini sluznica probavnog, dišnog sustava i reproduktivnog trakta te pružaju fizičku barijeru sluznicama od prodora mikroorganizama, a djeluju i kao lubrikanti sluznica (Corfield, 2015; Bergstrom i Xia, 2013). Glikani zbog svoje hidrofilnosti značajno povećavaju topljivost proteina. Tjelesne tekućine, kao što je krvna plazma, sadrže mnogo glikoproteina (~50-70 mg/ml). Glikani pomažu smatanje proteina u nativnu konformaciju. To je dokazano u istraživanjima s tunikamicinom, inhibitorom prvog koraka u sintezi glikanske strukture, koja se posljedično ne bi vezala na asparaginski ostatak rastućeg polipeptidnog lanca u ER-u (Varki, 2017). U prisutnosti tunikamicina sinteza nekih funkcionalnih proteina znatno se smanjila. Vrlo glikozilirani proteini otporni su na djelovanje proteaza jer glikani sterički ometaju pristup proteinu, ali i zbog negativnog naboja glikana sa sijalinskom kiselinom. Veličina, broj grana i učestalost sijalinizacije N-glikana variraju što može stvoriti više glikoformi istog proteina. Svaka glikoforma ima različitu aktivnost prema ligandima ili receptorima te drugačiji klirens (Varki, 2017).

Bakterije, virusi, bakterijski i biljni otrovi često sadrže receptore za vezanje na glikane na stanicama domaćina. Virus gripe pričvrsti se za epitel sluznice dišnog sustava hemaglutininom, glikoproteinom koji veže sijalinsku kiselinu. Uz pomoć neuraminidaze, enzima poznatog i kao sijalidaza, cijepa sijalinsku kiselinu i omogućuje prodor u stanicu domaćina. Stoga su i razvijeni lijekovi protiv virusa gripe (oseltamivir, zanamivir) koji su strukturno slični sijalinskoj kiselini, a djeluju na način da inhibiraju prijelazno stanje enzima jer se jače vežu za enzim od sijalinske kiseline. No, postoji i obrnuta situacija. Naime, neke topljive plazmatske bjelančevine prepoznaju glikane na patogenima. Lektin koji veže manozu prepoznaje terminalne ostatke manoze glikoproteina i glikolipida na površini mikroorganizma i pokreće lektinski put aktivacije komplekta. Stanice urođene imunosti sadrže brojne receptore koji prepoznaju molekularne obrasce na patogenima (engl. *patoghen-associated molecular patterns*, PAMPS) i pokreću imunski odgovor protiv njih (Abbas i sur., 2018).

Funkcije glikana su izrazito raznovrsne i prisutne u gotovo svim procesima koji uključuju međusobnu interakciju stanica ili stanica i izvanstaničnog matriksa. U ovom

poglavlju nabrojane su samo neke od najvažnijih funkcija, a mnoge su još nepoznate i treba ih tek istražiti.

1.2. Glikozilacija proteina

Glikozilacija je najčešća i najkompleksnija kotranslacijska i posttranslacijska modifikacija proteina (Lauc i sur., 2014) i od velike je važnosti za strukturalna i funkcionalna svojstva glikokonjugata. Postoje različite vrste glikozilacija koje se imenuju prema atomu na polipeptidnoj okosnici proteina na kojeg se glikani vežu. Tako postoji N-, O-, C- i S-glikozilacija. N-, C- i S- glikozilaciju prolaze proteini koji grade staničnu membranu i sekretorni proteini, dok O-glikozilirane proteine nalazimo izvan stanice kao i unutar nje. S-glikozilacija i C-manozilacija se pojavljuju rijetko. C-manozilacija je kovalentno vezanje manoze na ugljikov atom na triptofanu (Trp) koji se nalazi u slijedu Trp-X-X-Trp (mogu biti manozilirana oba Trp) ili Trp-Ser/Thr-X-Cys, gdje je X bilo koja aminokiselina. S-glikani su vezani preko bočnog lanca cisteina (Cys) (www.uniprot.org). Otkriveno je oko 600 glikogena (geni koji kodiraju proteine koji sudjeluju u procesu glikozilacije), no pretpostavlja se da ih ima 2 do 3 puta više (Gornik i sur., 2012).

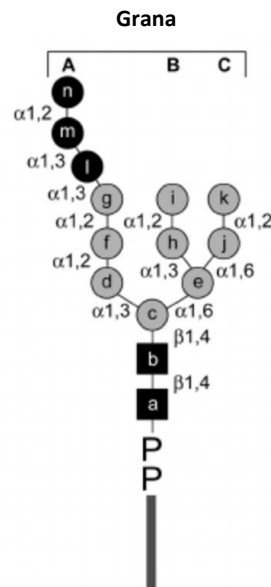
O-glikan je ugljikohidratni lanac koji je najčešće preko N-acetilgalaktozamina (GalNAc) vezan za hidroksilnu skupinu serinskog ili treoninskog ostatka polipeptidne okosnice. O-glikozilacija se događa u Golgijevom aparatu nakon N-glikozilacije i smatanja proteina. Grade se postupnim dodavanjem monosaharida glikozil-transferazama (Cooper i sur., 2010).

1.3. N-glikozilacija

Kod N-vezanih glikoproteina, ugljikohidrat je vezan za dušikov atom bočnog ogranka asparagina (Asn) unutar evolucijski očuvanog aminokiselinskog slijeda Asn-X-Ser/Thr, gdje je X bilo koja aminokiselina osim prolina (Cooper i sur., 2010).

Dolikol, poliizoprenolni lipid, nalazi se na membrani ER-a i ima funkciju nosača oligosaharida. Na citosolnoj strani ER-a dolikol-fosfat reagira s nukleotidom-aktiviranim šećerom, UDP-GlcNAc, u reakciji kataliziranoj glikozil-transferazama te nastaje dolikol pirofosfat-GlcNAc. Druge glikozil-transferaze dodaju sljedeći GlcNAc i pet manoznih ostataka na rastući ugljikohidratni lanac. Nastali oligosaharidni produkt vezan na dolikol pirofosfat je $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, a sljedeći korak se odvija na luminalnoj strani ER-a nakon što se cijeli kompleks translocira uz enzim flipazu.

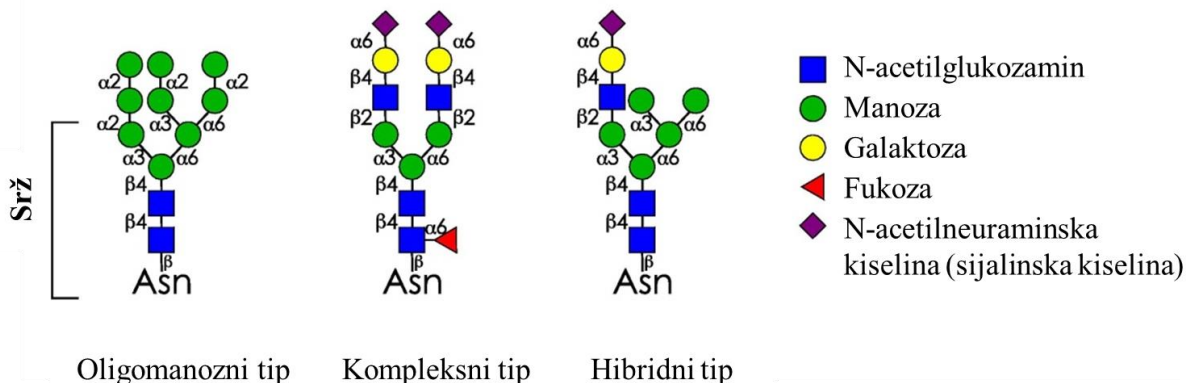
U lumenu dolikol-fosfat-Man i dolikol-fosfat-Glc ovisne glikozil-transferaze dodaju još četiri manoze i tri glukoze. Time je završena sinteza glikolipida koji sadrži 14 šećernih ostataka i dvije točke grananja, odnosno tri grane (A, B i C), $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Aebi, 2013). Struktura oligosaharidnog prekursora prikazana je na **Slici 1**. On se prenosi i kovalentno veže na dušik asparagina unutar Asn-X-Ser/Thr slijeda na rastućem polipeptidnom lancu u lumenu ER-a pomoću transmembranskog enzima oligosaharil-transferaze (OST).



Slika 1. Shematski prikaz oligosaharidnog prekursora vezanog na dolikol pirofosfat. Šećerne jedinice od a do f dodane su na citoplazmatskoj strani ER-a, a od h do n na luminalnoj strani membrane ER-a (preuzeto i izmijenjeno iz Sanyal i Menon, 2009).

Oligosaharidni kompleks se nakon vezanja na protein obrađuje različitim glikozil-transferazama i glikozidazama u ER-u i nadalje u Golgijevom aparatu. Glikozidaze hidroliziraju glikozidnu vezu i skidaju monosaharide s lanca, a glikozil-transferaze dodaju nove monosaharide na oligosaharidni lanac. Ovi enzimi se međusobno natječu za supstrate i njihova je lokalizacija u ER-u i Golgiju dobro regulirana (Sanyal i Menon, 2009; Hirschberg i Snider, 1987). Tri su glavna tipa N-glikana vezanih na polipeptidnu okosnicu. Razlikuju se prema monosaharidima vezanim na konstantnu pentasaharidnu srž građenu od dva N-acetilglukozamina i tri manoze. Oligomanozni tip sadrži vezane dodatne manoze na pentasaharidnoj srži kojih može biti od dvije do šest. Kompleksni tip sadrži dvije ili više grana te minimalno jedan N-acetilglukozamin i jednu galaktozu na svakoj grani, a hibridni tip je kombinacija prethodna dva tipa (Gornik i Lauc, 2008) i prikazani su na **Slici 2**.

Tipovi N-glikana



Slika 2. Shematski prikaz tri najčešća tipa N-glikana: oligomanozni, kompleksni i hibridni. Svi dijele istu pentasaharidnu srž od dva N-acetilglukozamina i tri manoze (preuzeto i izmijenjeno iz Higeli i sur., 2016).

Važno je naglasiti da nisu svi Asn-X-Ser/Thr sljedovi na proteinu glikozilirani. Pretpostavlja se da je oko 2/3 tih sljedova supstrat za OST. Utjecaj na proces glikozilacije određenog Asn-X-Ser/Thr imaju susjedne aminokiseline, udaljenost od transmembranske domene i udaljenost od susjednog slijeda za N-glikozilaciju (Aebi, 2013).

1.4. N-glikom krvne plazme

N-glikom ljudske krvne plazme predstavlja sve glikane proteina koji se mogu pronaći u krvnoj plazmi čovjeka. Glikani mogu biti različite strukture na istom proteinu i istom mjestu glikozilacije što rezultira različitim glikoformama istog proteina. Najvažnije svojstvo glikoproteina je njihova mikroheterogenost. Promjene u glikozilaciji reflektiraju fiziološke i biokemijske uvjete u stanici za vrijeme sinteze glikoproteina. Mogu biti minimalne ili značajno različite, a ispoljavaju se preko promijenjenog načina grananja glikana, gubitkom monosaharida na određenoj grani, prisustvom odnosno odsustvom pojedinih monosaharida poput fukoze, sijalinske kiseline i N-acetilglukozamina ili različitim tipu glikozidne veze između šećernih jedinica (Gornik i Lauc, 2008). Račvajući GlcNAc primjer je grananja glikana kada se na sržnu manozu veže GlcNAc β -1,4 glikozidnom vezom. Promjene profila glikozilacije zabilježene su u mnogim fiziološkim stanjima, kao što je primjerice trudnoća (Ruhaak i sur., 2014), kod djece i adolescenata (Pučić i sur., 2012) i kod raznih bolesti (Reily i sur., 2019). Najveći broj istraživanja glikana provodi se na području karcinoma,

neurodegenerativnih, metaboličkih, upalnih te autoimunih bolesti gdje se istražuju kao potencijalni biomarkeri (Gudelj i sur., 2018).

Treba uzeti u obzir činjenicu da su interindividualne varijacije u glikozilaciji značajne na razini populacije što je pokazalo istraživanje u kojem je analizirano 1008 uzoraka krvne plazme različitih ljudi s hrvatskog otoka Visa (Knežević i sur., 2009). No, također je pokazano da je N-glikom plazme zdravog ispitanika stabilan kroz period i do nekoliko godina te da je promjena u profilu glikana pojedinca odraz okolišnih čimbenika i patoloških stanja (Gornik i sur., 2009; Hennig i sur., 2016). Time je zaključeno da je profil glikana pod snažnom genskom kontrolom, iako glikani nisu primarni genski produkti.

Kako ne postoji genski kod za glikane, njihova struktura ovisi o ekspresiji i lokalizaciji glikozidaza i glikozil-transferaza što je značajno promijenjeno u nekim patofiziološkim procesima. Dokazana je promjena u N-glikomu plazme kod akutnih i kroničnih upalnih bolesti promatrajući plazmatske proteine poput α 1-kiselog glikoproteina, IgG-a, IgA-a, transferina, haptoglobina, α 2-makroglobulina, C-reaktivnog proteina i ostalih (Clerc i sur., 2016; Novokmet i sur., 2014; Gornik i Lauc, 2008).

Postoje značajne razlike u glikozilaciji plazmatskih proteina između ženskog i muškog spola te dobi. Otkriveno je da se s godinama kod oba spola povećava udio agalaktoziliranih glikana, a opada udio digalaktoziliranih biantenarnih glikana (Knežević i sur., 2010). Smanjena količina digalaktoziliranih glikana popraćena je njihovom povećanom sijalinizacijom. Kod ženskog spola smanjuje se udio fukoziliranih glikana s godinama, dok se kod muškog spola povećava udio istih glikana.

Promjena u profilu N-glikana uočena je kod pojedinaca s različitim lipidnim profilima. Kod pojedinaca s povećanim tjelesnim masnoćama i povišenim krvnim tlakom, uočena je povećana količina agalaktoziliranih, a smanjena količina digalaktoziliranih glikana, kao i povećana sijalinizacija biantenarnih struktura. Pušenje je povezano s povećanom učestalošću grananja i galaktozilacije glikana (Knežević i sur., 2010).

Kako je više od stotinu glikozil-transferaza uključeno u sintezu glikana, proces je neminovno osjetljiv na male promjene u fiziologiji stanica što se očituje na krajnjem produktu. Velike promjene u ekspresiji gena javljaju se kod malignih transformacija stanice i posljedično će promjene biti vidljive u N-glikomu (Lauc i sur., 2016). Primjerice, kolorektalni karcinom povezan je s nekoliko značajnih promjena u N-glikozilaciji: smanjenom količinom mono- i digalaktoziliranih glikana, povećanom količinom agalaktoziliranih, tri- i tetragalaktoziliranih glikana, smanjenom količinom monosijaliniziranih glikana te

povećanjem tri- i tetrasijaliniziranih glikana, povećanim grananjem glikana te smanjenjem sržne fukozilacije (Doherty i sur., 2018).

U nedavnom istraživanju dokazano je da pojedinci s povećanim rizikom za razvoj dijabetesa tipa 2 imaju promijenjen N-glikom krvne plazme (Keser i sur., 2017). Povećano je grananje glikana, sijalinizacija na bi- i triantenarnim glikanima i galaktozilacija nekih tipova glikana. Povećana sijalinizacija je zapravo posljedica α -2,6-sijalinizacije, dok je α -2,3-sijalinizacija smanjena (Dotz i Wuhler, 2019). Zaključno, povećanje složenosti N-glikana plazme je u korelaciji s povećanim rizikom za razvoj dijabetesa tipa 2 i manje učinkovitu regulaciju glukoze u krvi. Iako su potrebna dodatna istraživanja, postavljen je temelj za otkrivanje novih pristupa za rano otkrivanje dijabetesa i sprječavanje komplikacija bolesti.

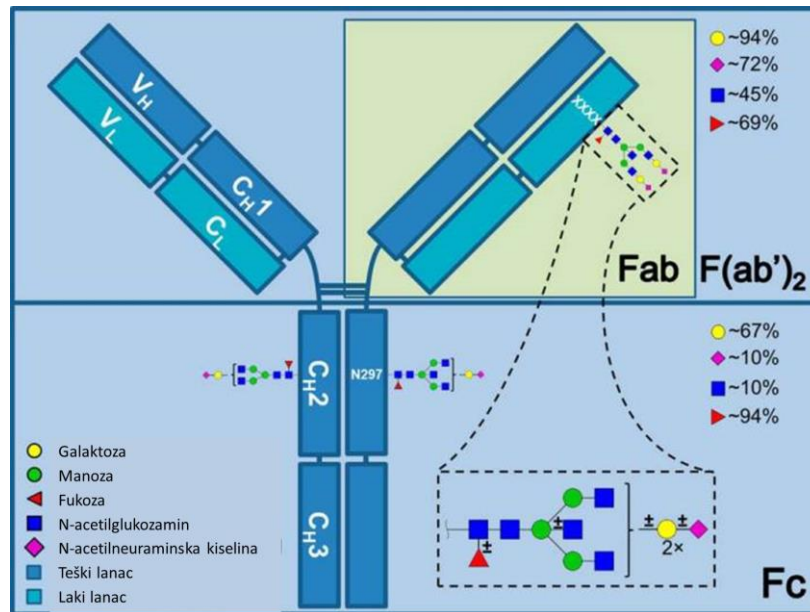
Promjene u N-glikomu plazme dokazane su za mnoge upalne bolesti poput ulceroznog kolitisa i Cronhove bolesti. Povećana sijalinizacija i grananje glikana u najvećoj mjeri su posljedica promijenjene glikozilacije na α 1-kiselom glikoproteinu i ostalim proteinima akutne faze koji se sintetiziraju najvećim dijelom u jetri. Promjene udjela fukoze i galaktoze na biantenarnim glikanima pripisuje se promijenjenoj razini i glikozilaciji IgG-a, a neke od navedenih promjena omogućuju razlikovanje Cronhove bolesti od ulceroznog kolitisa i obrnuto (Dotz i Wuhler, 2019).

1.5. N-glikom imunoglobulina G

Imunoglobulini ili protutijela su cirkulirajući glikoproteini koje proizvode kralježnjaci kao odgovor na izloženost stranim molekulama koje zovemo antigeni. Iznimno su raznovrsna, ali su pritom specifična u svojoj sposobnosti prepoznavanja stranih molekularnih struktura te djeluju kao posrednici humoralne imunosti (Abbas i sur., 2018). Proizvode ih samo stanice B-limfocitne loze i postoje u dvama oblicima: protutijela vezana na membrane na površini limfocita B koja djeluju kao antigenski receptori i izlučena protutijela koja neutraliziraju toksine, sprječavaju ulazak i širenje patogena te uklanjaju mikroorganizme. Molekule imunoglobulina dijele se u posebne razrede i podrazrede (izotipove) na osnovi razlike u građi konstantne regije teškog lanca. To su IgA, IgD, IgE, IgG i IgM, a izotipovi IgG i IgA se u ljudi dodatno dijele u blisko povezane podrazrede IgA1, IgA2, odnosno IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4 (Maverakis i sur., 2015; Zauner i sur., 2013). Različiti izotipovi i podrazredi imunoglobulina imaju različite izvršne uloge jer je većina izvršnih funkcija posredovana vezanjem konstantne regije teškog lanca za Fc-receptore na različitim stanicama poput fagocita, NK-stanica (engl. *natural-killer*) i mastocita, odnosno za plazmatske bjelančevine poput komponenti komplementa (Abbas i sur., 2018). Imunoglobulin G je najzastupljenije

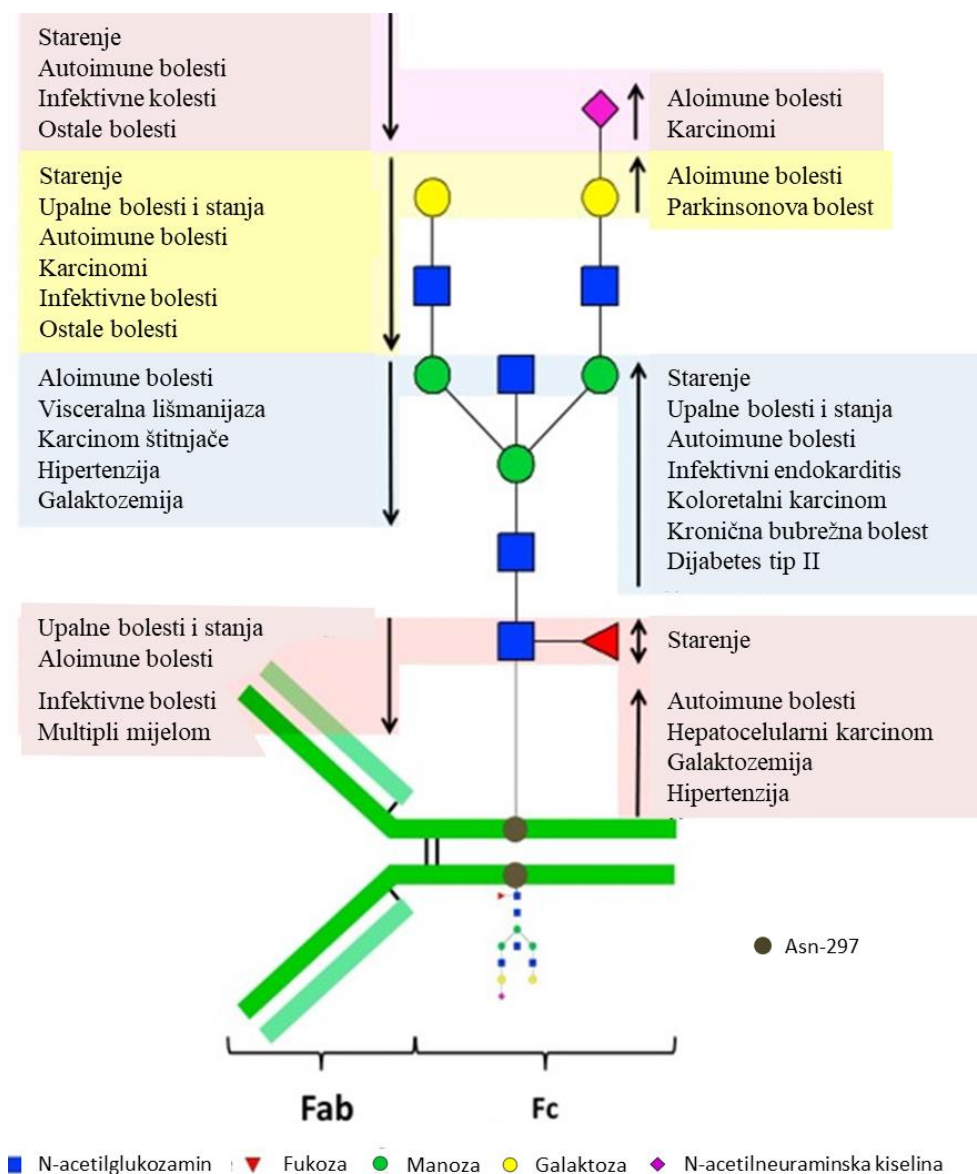
protutijelo u ljudskom tijelu u koncentraciji koja se kreće od 7 do 18 mg/ml u zdravim odraslim ljudima (Gonzalez-Quintela i sur., 2008).

IgG je uključen u mnoge imunološke procese kao što su neutralizacija antigena, aktivacija komplementa i citotoksičnost ovisna o komplementu (engl. *complement-dependent cytotoxicity*, CDC), opsonizacija za olakšanu fagocitozu, stanična citotoksičnost ovisna o protutijelu (engl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) i reakcije preosjetljivosti. Veze između lanaca unutar molekula protutijela te uloge različitih regija protutijela otkrivene su tijekom pokusa cijepanja kunićjeg IgG-a proteolitičkim enzimima u regije s različitim funkcionalnim i strukturnim svojstvima. Fab (engl. *fragment, antigen binding*) i Fc regije (engl. *fragment, crystallizable*) dobile su naziv prema funkciji koju su obavljali fragmenti nastali cijepanjem kunićjeg IgG-a papainom (Abbas i sur., 2018). Molekule protutijela, pa tako i molekula IgG-a, imaju simetričnu osnovnu građu koju čine dva istovrsna laka i dva istovrsna teška lanca. Lanci su međusobno povezani kovalentnim disulfidnim vezama, a povezivanju pridonose i nekovalentne interakcije između C_{H3} domena. Teški i laki lanci sastoje se od amino odnosno N-terminalne varijabilne regije koja sudjeluje u prepoznavanju antigena i karboksi odnosno C-terminalne konstantne regije koje imaju izvršne uloge (Abbas i sur., 2018). Teški lanci imaju četiri IgG-domene (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} i V_H), a laki lanci imaju dvije IgG-domene (C_L i V_L). IgG-domena je globularna (kuglasta) struktura koju gradi niz ponavljajućih homolognih jedinica dužine oko 110 aminokiselina. Jedna IgG-domena sadržava dva sloja građena od β -nabranih ploha, a svaki se sloj sastoji od tri do pet nabora antiparalelnih polipeptidnih lanaca. $C_{H(1-3)}$ i C_L su konstantne regije, a V_H i V_L su varijabilne regije teških i lakih lanaca IgG-a. Između C_{H2} i C_{H1} domene teških lanaca nalazi se zglobna regija koja ima mogućnost djelomične rotacije. Svaki teški lanac imunoglobulina kovalentno je povezan s jednim biantenarnim N-glikanom na Asn-297 u svakoj C_{H2} domeni Fc regije molekule, a razlikuje se 36 različitih glikana koji mogu biti povezani na Asn-297 (Lauc i sur., 2013). N-glikani su smješteni u šupljini između dva teška lanca i utječu na konformaciju IgG-a (Zauner i sur., 2013). Fab regija nema evolucijski očuvanih mjesta za glikozilaciju, ali procijenjeno je da 15-20% molekula IgG-a sadrži jedno ili više glikozilacijskih mjesta na Fab regiji koja su posljedica somatske hipermutacije tijekom antigen specifičnog imunogenog odgovora (Dunn-Walters i sur., 2000). Struktura IgG-a prikazana je na **Slici 3**.



Slika 3. Shematski prikaz IgG-a i N-glikana. Označeni su Fab i Fc fragmenti. Prikazani su postotci galaktoziliranih, sijaliniziranih, fukoziliranih glikana te glikana s račvujućim GlcNAc za svaki fragment. Izdvojeno je prikazana pentasaharidna srž N-glikana Fab fragmenta s mogućim dodacima (preuzeto i izmijenjeno iz Bondt i sur., 2014).

Mnoga istraživanja su pokazala varijacije u glikozilaciji IgG-a, pogotovo galaktozilaciji, s obzirom na dob, spol, nasljedstvo, trudnoću, ali isto tako u raznim autoimunim, infektivnim bolestima i karcinomima. **Slika 4.** sažeto prikazuje promjene u udjelu pojedinih glikanskih struktura kod starenja i u nekim bolestima. Glikozilacija mnogih proteina, posebice IgG-a, strogo je regulirana, a kada se podvrgne djelovanju citokina ili drugih okolišnih čimbenika, B-stanice mijenjaju proces glikozilacije na specifičan način (Gornik i sur., 2011).



Slika 4. Promjene u glikozilaciji IgG-a na Fc regiji u starenju i bolesti. Navedene promjene odnose se na odrasle ljudske jedinke. Strelica prema dolje označava smanjenje udjela, a strelica prema gore povećanje udjela odgovarajuće N-glikanske strukture IgG-a (preuzeto i izmijenjeno iz Gudelj i sur., 2018).

Galaktozilacija se smanjuje postepeno tijekom starenja, a skokovito kod akutnih upala. Gledajući N-glikane prisutne na Fc regiji IgG-a, kod zdravih odraslih osoba prosječan udio agalaktoziliranih i monogalaktoziliranih je 35%, dok digalaktozilirani N-glikani čine oko 15% (Huffman i sur., 2014). Estrogeni potiču galaktozilaciju IgG-a što je dokazano u istraživanjima na trudnicama gdje je količina estrogena povećana (Bondt i sur., 2016) odnosno kod žena u menopauzi gdje je razina estrogena smanjena (Krištić i sur., 2014).

Nadalje, kod zdravih odraslih osoba mono- i disijalinizirane strukture čine od 10% do 15% ukupnog glikoma IgG-a. Najznačajniji učinak desijalinizacije glikana je promjena aktivnosti IgG-a iz protuupalne u proupalnu u slučaju poremećaja homeostaze (Gudelj i sur., 2018).

Prosječno 95% cirkulirajućih IgG-a posjeduje sržnu fukožu na prvom GlcNAc što sprječava potencijalno destruktivnu aktivnost ADCC (Gornik i sur., 2011). Mali udio glikana IgG-a (10-15%) sadrži račvajući GlcNAc. Na razini sinteze glikana dodatak račvajućeg GlcNAc i dodatak fukoze na prvi GlcNAc su suprotstavljeni procesi pa je teško utvrditi funkciju ovih modifikacija i njihovu ulogu u pojedinim bolestima (Schuster i sur., 2005). IgG s većim udjelom račvajućeg GlcNAc ima veći afinitet za Fc γ receptore i posljedično pojačanu aktivnost ADCC i funkciju imunskih stanica.

Najviše studija koje su istraživale o dobi ovisne promjene u glikozilaciji IgG-a, dokazale su da je kod mlađih odraslih osoba najveći udio digalaktoziliranih, a najmanji udio agalaktoziliranih glikana, a da se starenjem primjećuje porast agalaktoziliranih, a smanjenje digalaktoziliranih glikana (Krištić i sur., 2014). S godinama se povećava i udio IgG-a s račvajućim GlcNAc u strukturi glikana koja neovisna o spolu. Sržna fukozilacija i sijalinizacija se također mijenjaju s godinama, ali nisu dobiveni jednoznačni rezultati studija (Vanhooren i sur., 2007). N-glikani IgG-a mogu služiti i za predviđanje biološke dobi, a ne samo kronološke. Razlika između kronološke i biološke dobi posljedica je utjecaja okolišnih čimbenika i životnog stila na glikozilaciju IgG-a kod pojedinca. Struktura glikana pojedinca uvijek treba biti uspoređena s onom zdrave populacije, istog spola, dobi i etničke grupe jer se navedene promjene kod starenja često uočavaju i kod raznih bolesti (Gudelj i sur., 2018).

N-glikom IgG-a se mijenja u mnogim autoimunim bolestima, a među prvim promjenama uočena je ona kod reumatoidnog artritisa 1985. godine te je povezana ne samo povezana s kliničkim parametrima (poput težine bolesti), već i s predviđanjem progresije bolesti i odgovora na terapiju (Tomana i sur., 1988). Protutijelo na citrulinirane proteine podrazreda IgG1 ima drugačije glikanske strukture od ostalih IgG1 u serumu. Činjenica da glikani IgG-a imaju značajnu ulogu u razvoju autoimunih bolesti, otvara se mogućnost terapijske primjene enzima koji bi deglikozilirali Fc domenu IgG-a (Seeling i sur., 2017).

1.6. Metode analize N-glikana

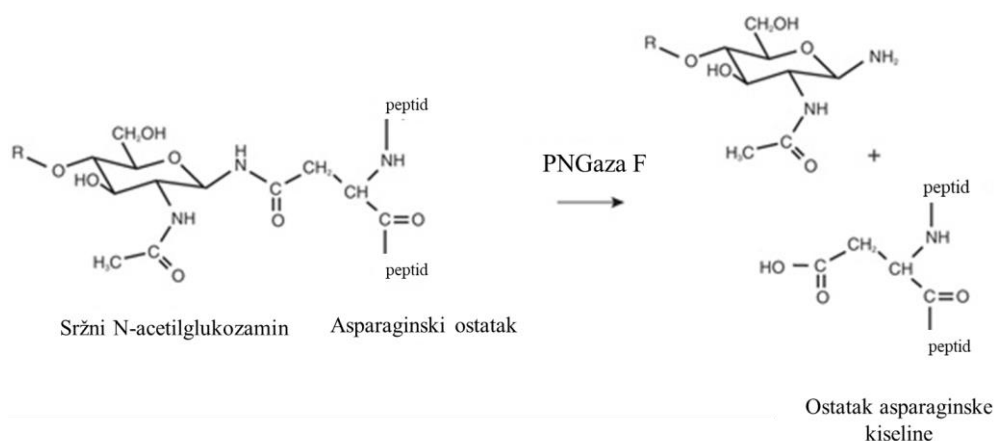
S obzirom na rast spoznaja o biološkoj i kliničkoj važnosti N-glikana, raste i interes za njihovo istraživanje u opsežnim kliničkim i populacijskim studijama. Kontinuirano se radi na razvoju i poboljšanju postojećih visokoprotočnih analitičkih tehnika za analizu velikog broja uzoraka glikana. Profiliranje glikana je određivanje relativne količine strukturno različitih glikana prisutnih u glikokonjugatu, a proces se sastoji od nekoliko koraka: izolacije željenog glikoproteina (osim u slučaju krvne plazme), deglikozilacije, fluorescentnog obilježavanja, pročišćavanja i ukocentriranja te analize masenom spektrofotomerijom (engl. *mass spectrometry*, MS), kapilarnom elektroforezom (engl. *capillary electrophoresis*, CE) s fluorescencijskim detektorom te tekućinskom kromatografijom visoke ili vrlo visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC ili *ultra performance liquid chromatography*, UPLC) s fluorescencijskim detektorom. Vrlo su korisne spregnute tehnike, kada se nakon odvajanja na kromatografskoj koloni frakcije uzorka podvrgnu analizi na MS ili nuklearnoj magnetskoj rezonanci (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR). MS i NMR su tehnike kojima se može odrediti struktura glikana. Za NMR su potrebne veće količine uzoraka nego za ostale navedene tehnike (Szabo i sur., 2010). Detaljniji osvrt će biti na dvije metode korištene u ovom radu, tj. na tekućinsku kromatografiju ultra-visoke djelotvornosti s fluorescencijskim detektorom baziranoj na hidrofiličnim interakcijama (engl. *hydrophilic interaction chromatography - ultra-high performance liquid chromatography - fluorescence*, HILIC-UPLC-FLR) i multipleks kapilarnoj gel elektroforezi s laserski induciranom fluorescencijom (engl. *multiplexed capillary gel electrophoresis - laser induced fluorescence*, xCGE-LIF).

Za potrebe ovog rada, proučavani su N-glikani proteina plazme te IgG-a. Da bi se mogla utvrditi glikozilacija nekog glikoproteina (poput IgG-a), najprije ga je potrebno izolirati iz krvne plazme odnosno seruma. Jedna od metoda jest izolacija IgG-a uz pomoć pločice monolita s vezanim proteinom G. Monoliti su građeni od velikih i međusobno dobro povezanih pora koje ga čine poroznim. Osim poroznosti, odlikuju se i svojstvima pH rezistencije, mehaničke čvrstoće, velike dodirne površine i jednostavnog vezanja liganada (poput proteina G) za epoksi skupine monolita (Pučić i sur., 2012). Protein G je protein stanične stijenke bakterije *Streptococcus* grupe G. Izolacija IgG-a temelji se na afinitetnom vezanju Fc regije IgG-a na rekombinantni protein G i definiranoj veličini pora (0,2 μm) i kanala stacionarne faze monolita. Ova metoda pokazala se učinkovitom i robusnom za

odjeljivanje IgG-a iz kompleksnih uzoraka poput krvne plazme ili seruma (www.biaseparations.com).

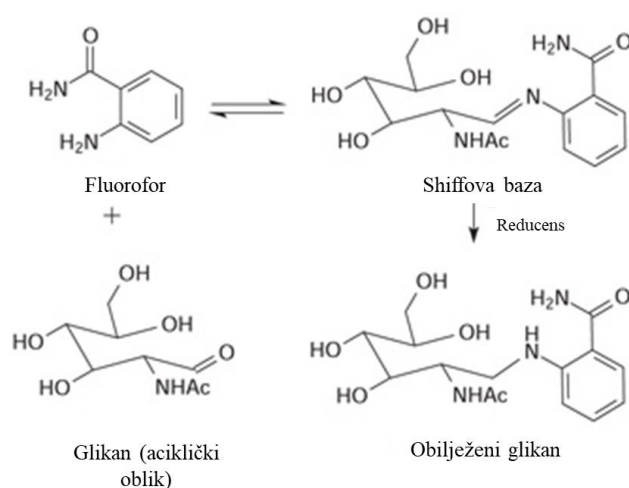
Bilo da se radi o izoliranim glikoproteinima ili kompleksnim uzorcima plazme/seruma, sljedeći korak u pripremi uzoraka za analizu je denaturacija glikoproteina. Zbog tercijarne i kvartarne strukture proteina, pojedini glikani mogu biti nedostupni djelovanju enzima koji oslobađa glikane pa se pristupa denaturaciji pomoću detergenta natrijevog lauril sulfata, (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS). Veća koncentracija SDS se koristi za kompleksnije uzorke plazme/seruma jer sadrže veću količinu proteina.

Deglikozilacija, odnosno oslobađanje glikana vezanih za protein, postiže se enzimski ili, rjeđe, kemijski. Za kemijsko oslobađanje glikana koristi se hidrazin kojim se osim N-glikana oslobađaju i O-glikani. No, to je vrlo grubi proces te dolazi i do deacetilacije modificiranih šećernih jedinica (Huhn i sur., 2009). PNGaza F [peptid-N-(N-acetil- β -glukozaminil) asparagin amidaza F] je rekombinantna endoglikozidaza, amidaza, koja djeluje vrlo učinkovito i specifično. Katalizira hidrolizu amidne veze između bočnog lanca asparagina i prvog GlcNAc na glikanu (**Slika 5**). PNGaza F neće pokidati vezu ako je na prvom GlcNAc vezana α -1,3-fukoza, no ta se modifikacija nalazi uglavnom kod biljaka. Osim PNGaze F, za deglikozilaciju koriste se PNGaza A (može pokidati amidnu vezu i ako je na prvom GlcNAc vezana fukoza, no neučinkovita je ako je prisutna sijalinska kiselina u strukturi glikana) i endoglikozidaza H ili F (rjeđe se upotrebljavaju jer ostavljaju jedan GlcNAc vezan za asparaginski ostatak).



Slika 5. PNGaza F kida amidnu vezu između prvog GlcNAc na glikanu i asparaginskog ostatka na proteinskoj okosnici. Produkti su nepromijenjeni glikan i deaminirani asparaginski ostatak odnosno asparaginska kiselina (preuzeto i izmijenjeno sa stranice: <https://www.sigmaaldrich.com>).

U metodama analize koje se koriste u ovom radu, detekcija se provodi fluorescencijskim detektorima. Glikani nemaju svojstvo fluorescencije pa se deriviraju s fluoroforima (kemijskim skupinama koje pokazuju fluorescenciju). Izbor fluorofora ovisi o tehnici koja se koristi. Fluorescencija je jedan od mehanizama kojim se molekula vraća u osnovno stanje nakon pobuđivanja apsorpcijom zračenja. Duljina emitiranog zračenja pomaknuta je za 50-150 nm prema većim valnim duljinama u usporedbi s valnom duljinom zračenja koje uzrokuje pobuđivanje. Molekule s više kromofora (dvostruke konjugirane veze, spojevi koji sadrže aromatske prstene, ciklički karbonilni spojevi) i rigidne strukture pokazuju fluorescenciju i relativno ih je malo u prirodi. Fluorofori koji se koriste za UPLC analizu su najčešće derivati anilina: 2-aminobenzamid (engl. *2-aminobenzamide*, 2-AB), antranilna kiselina (engl. *anthranilic acid*, 2-AA) i prokainamid, a mogu i neki drugi kao 2-aminopiridin (engl. *2-aminopyridine*, PA). Reagiraju s glikanom u reakciji reduktivne aminacije prikazane na **Slici 6**. Fluorofor sadrži primarni amin u strukturi koji reagira s aldehidnom skupinom glikana dajući reaktivni imin ili Shiffovu bazu, preko međuprodukta karbinolamina, koji se zatim reducira (primjenom reducirajućeg agensa) u stabilni sekundarni amin. Neki imini su iznimno podložni hidrolizi pa su neophodna bezvodna otapala. Stehiometrijski se veže na glikan u omjeru 1:1 što omogućava kvantitativnu analizu različitih glikana na osnovi intenziteta fluorescencije (Ruhaak i sur., 2010a; Keser i sur., 2018). Reduktivni agensi koji se koriste su natrijev cijanoborohidrid (NaBH₃CN) i 2-pikolin boran (engl. *2-picoline borane complex*, 2-PB) koji je češće u primjeni jer je manje toksičan.



Slika 6. Reakcijom fluorofora (2-AB) i acikličkog oblika glikana nastaje nestabilna Shiffova baza ili imin koji se u sljedećem koraku primjenom reducensa reducira u stabilan obilježeni glikan (preuzeto i izmijenjeno sa stranice: <https://www.sigmaaldrich.com>).

Fluorofori koji se koriste za xCGE-LIF analizu moraju biti nabijeni da bi se mogli kretati u električnom polju, a većina glikana nije nabijena pri fiziološkom pH. Najčešće se koriste sulfonirani poliaromatski spojevi kao što je 8-aminopiren-1,3,6-trisulfonska kiselina (engl. *8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid*, APTS) zbog izraženog svojstva fluorescencije i tri negativna naboja u širokom pH rasponu. Reakcija derivatizacije APTS i glikana također je reakcija reduktivne aminacije u prisutnosti kiseline kao katalizatora. Iskorištenje je veće uz jače kiseline poput limunske ili sukcinatne (Szabo i sur., 2010). Također, iskorištenje reakcije se povećava dodatkom molekula za derivatizaciju i reduktivnog agensa u suvišku pa se prije analize APTS obilježni glikani najčešće čiste od suviška kemikalija (Ruhaak i sur., 2010b). Za pročišćavanje glikana često se koristi metoda kromatografije hidrofilnih interakcija-ekstrakcije na čvrstu fazu (engl. *hydrophilic interaction chromatography - solid phase extraction*, HILIC-SPE). U ovom radu je za čvrstu fazu upotrijebljen Bio-Gel P-10. Bio-Gel P-10 je hidrofilna stacionarna faza polikrilamidnih zrnaca u smjesi otapala (voda:etanol:acetonitril=70:20:10). Odvajanje se temelji na hidrofilnim interakcijama stacionarne faze i glikana u uzorku pa se oni zadržavaju na gelu, dok se hidrofobne molekule i soli ispiru pogodnim otopinama. Vrlo učinkovito se pokazalo ispiranje 100 mM otopinom trietanolamina (engl. *triethanolamine*, TEA) u 80% acetonitrilu (engl. *acetonitrile*, ACN) (pH 8,5). Ionske interakcije između pozitivno nabijenog TEA i negativno nabijenog APTS stvaraju ionski par koji se ispire. Dodatno, otopinom 80% ACN ispiru se soli prije elucije glikana vodom sa čvrste faze (Ruhaak i sur., 2010b).

HILIC-UPLC je varijacija kromatografije normalnih faza gdje je stacionarna faza polarna i tehnika se često koristi za analizu vrlo polarnih molekula. Stacionarnu fazu čini silikagel, silikagel modificiran amino ili hidroksilnim skupinama, amidnim vezama ili zwitterionima (ZIC-HILIC) ili monolit. S obzirom da je HILIC-UPLC separacijska tehnika, za separaciju glikana najčešće se koristi gradijentna elucija smjesom vode i organskog otapala s postupnim povećanjem udjela vode u smjesi da bi se eluirali hidrofilni glikani (Zauner i sur., 2010). Čestice stacionarne faze u UPLC su manje ili jednake 1,7 μm što je donijelo poboljšanje s obzirom na ranije korištene veličine čestica od 3 do 10 μm kod HPLC. UPLC tehnika može funkcionirati pod većim tlakom i s bržim protocima mobilne faze ne narušavajući rezoluciju i povećavajući učinkovitost kolone obrnuto proporcionalno veličini čestica. Potrošnja mobilne faze je manja, vrijeme analize kraće, a bolja je osjetljivost i povećana je rezolucija. Vrijeme zadržavanja glikana na koloni ovisi o njihovoj veličini, razgranatosti, polarnosti, prisutnosti nabijenih skupina (sijalinske kiseline, glukuronske kiseline, sulfatne i fosfatne skupine), a odjeljuje i strukturne izomere. Razvijena je opsežna

baza podataka koja sadrži standardizirana retencijska vremena 2-AB obilježenih glikana koja može pomoći u strukturnoj karakterizaciji glikana (<https://glycostore.org>). Fluktuacije u retencijskim vremenima glikana su neizbježne u eksperimentalnim uvjetima pa se provodi kalibracija sustava pomoću standarda dekstroze kao vanjskog standarda. Vrijeme zadržavanja svakog glikana prevodi se u glukozne jedinice (engl. *glucose unit*, GU) pa se dobivani podaci mogu uspoređivati.

Kapilarna gel elektroforeza (CGE) također je separacijska tehnika. Nabijene čestice u otopini se odvajaju primjenom visokih potencijala (10-30 kV) u uskoj kapilari ispunjenoj gelom. Najčešće se koristi unakrsno povezani poliakrilamidni gel. Gel djeluje kao molekularno sito što omogućava razdvajanje glikana po veličini i obliku u odjeljene zone. Djelovanjem električnog polja glikani se raspodjeljuju po zonama koje putuju različitom brzinom ovisno o njihovom naboju i hidrodinamičkom radijusu (Damić i Nigović, 2010). Multipleksna CGE omogućava paralelnu analizu i do 96 uzoraka.

Flourescencija ovisi o koncentraciji glikana i proporcionalna je snazi pobudnog zračenja. Stoga se u uzorcima s malom količinom fluorescentno obilježenih glikana optimira snaga pobudnog zračenja da bi količina flourescencije bila dostatna za detekciju. Flourescencijski detektori su od 10 do 10000 puta osjetljiviji od apsorpcijskih metoda.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Glikomika je područje znanosti koje se bavi sveobuhvatnim proučavanjem glikoma (skupa svih glikana) stanica ili tkiva u određenom vremenu, lokaciji i uvjetima okoliša (Rudd i sur., 2015). Saznanja o ulozi glikana u razvoju pojedinih bolesti i njihovoj potencijalnoj uporabi kao biomarkera potaknula su znanstvenike na daljnja istraživanja na tom području. Znanje glikomike neophodno je za točnu interpretaciju i primjenu znanja iz proteomike i genomike te provedbu personalizirane medicine. Istraživanje glikana zaostaje za istraživanjima sličnih biomolekula kao što su proteini i nukleinske kiseline zbog njihove kompleksnosti i raznolikosti strukture glikana, ali i poteškoćama u analizi vrlo malih količina glikana prisutnima u uzorcima (Lauc i sur., 2016). Visokoprotočne metode su neizostavan alat za analizu velikih količina uzoraka. Do sada je već razvijeno nekoliko takvih metoda s osjetljivim detektorima za specifičnu analizu glikana, uzimajući u obzir njihova fizikalno-kemijska i strukturna svojstva.

Da bi neku metodu koristili u analizi glikana, važno je odrediti ponovljivost odnosno odrediti analitičku varijaciju koju metoda pripreme i analize od izbora unosi u naš uzorak. To je važno radi daljnjeg usavršavanja metoda, utvrđivanja njihovih prednosti i nedostataka, a ponajviše da bi bili sigurni da su uočene razlike između analiziranih bioloških uzoraka zaista posljedica same razlike među uzorcima (primjerice radi inter- ili intraindividualne biološke varijabilnosti), a ne odraz pogreške metode. Također, da bi saznali podudarnost rezultata ispitivanja u određenom vremenskom periodu, važno je znati koliko je metoda reproducibilna.

Stoga je cilj ovog diplomskog rada utvrditi ponovljivost i reproducibilnost HILIC-UPLC metode i xCGE-LIF metode za analizu N-glikana uzimajući u obzir tri biološki različita standardna uzorka plazme (svaki u osam tehničkih replikata) u tri vremenske točke t_0 , t_1 (7 dana nakon t_0) i t_2 (14 dana nakon t_0).

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1. Anorganske, organske kemikalije i enzimi

Tablica 1. Anorganske, organske kemikalije i enzimi

Anorganske kemikalije		Proizvođač
Amonijev hidrogenkarbonat	NH_4HCO_3	Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Belgija
Kalijev dihidrogenfosfat	KH_2PO_4	Sigma-Aldrich, SAD
Kalijev klorid	KCl	Gram mol, Hrvatska
Klorovodična kiselina 37%	HCl	Carlo Erba, Italija
Natrijev klorid	NaCl	VWR Chemicals, SAD
Natrijev hidrogenfosfat	Na_2HPO_4	Honeywell, SAD
Natrijev hidroksid	NaOH	Sigma-Aldrich, SAD
Ultra-čista voda (18,2 M Ω na 25°C)		/
Organske kemikalije		Proizvođač
2-aminobenzamid (2-AB)		Sigma-Aldrich, SAD
2-pikolin boran (2-PB)		Sigma-Aldrich, SAD
Apsolutni etanol (EtOH)		Carlo Erba, Italija
Acetonitril (ACN)		Carlo Erba, Italija
APTS (natrijeva sol 8-aminopiren-1,3,6-trisulfonske kiseline)		MiliporeSigma, SAD
Bio-Gel P-10		Bio-Rad, SAD
DMSO (dimetil sulfoksid)		Sigma-Aldrich, SAD
Formamid		Applied Biosystems brand, Thermo Fisher Scientific, SAD
Igepal CA-630 (oktil-fenoksipolietoksi-etanol)		Sigma-Aldrich, SAD
Limunska kiselina (monohidrat)		Sigma-Aldrich, SAD
Mravlja kiselina		Sigma-Aldrich, SAD
Octena kiselina (HAc)		Honeywell, SAD

POP-7 polimer za analizu na ABI3130 Genetic Analyzer uređaju	Applied Biosystems brand, Thermo Fisher Scientific, SAD
Pufer s EDTA za analizu na ABI3130 Genetic Analyzer uređaju (10x)	Applied Biosystems brand, Thermo Fisher Scientific, SAD
SDS (natrij dodecil sulfat)	Sigma-Aldrich, SAD
Trietilamin (TEA)	Sigma-Aldrich, SAD
TRIS [tris(hidroksimetil)-aminometan]	Acro Organics, Thermo Fisher Scientific, SAD
Enzimi	Proizvođač
Peptidna N-glikozidaza F (10 U/μl)	PNGaza F Promega, SAD

3.1.2. Otopine i puferi

Tablica 2. Otopine, puferi i njihova priprema

Otopine i puferi	Priprema
10xPBS, pH 6,6-6,8	<p><u>Za 1 l:</u></p> <p>m(NaCl)= 80,028 g m(Na₂HPO₄)= 13,832 g m(KH₂PO₄)= 2,964 g m(KCl)= 1,976 g</p> <p>Krutine se redom važu i dodaju u čašu s destiliranom vodom (V ~ 800 ml) koja je na magnetnoj miješalici. Nakon otapanja izmjeri se i zabilježi pH otopine. U menzuri se nadopuni do 1 l destiliranom vodom, promućka, filtrira kroz PES filter veličine pora 0,2 μm i pohrani u tamnu bocu na sobnu temperaturu (T=23 ± 3°C). Konačne koncentracije: 1,37M NaCl; 0,097 M Na₂HPO₄; 0,022 M KH₂PO₄; 0,027 M KCl.</p>
5xPBS, pH 6,6-6,8	<p><u>Za 100 ml:</u></p> <p>U 50 ml 10xPBS doda se 50 ml destilirane vode, filtrira kroz 0,2 μm PES filter i pohrani se u hladnjak na 4°C.</p>

<p>1xPBS, pH 7,4</p>	<p><u>Za 2 l:</u> 200 ml 10xPBS razrijedi se destiliranom vodom do volumena ~1800 ml, izmjeri se pH, podesi (ukoliko je potrebno) otopinom 1 M NaOH na vrijednost 7,40 i nadopuni u menzuri destiliranom vodom do 2 l. Otopina se filtrira kroz 0,2 µm PES filter i pohrani u hladnjak na 4°C.</p>
<p>0.1 M mravlja kiselina, pH 2,5</p>	<p><u>Za 500 ml:</u> U destiliranu vodu (V ~ 400 ml) doda se 1,885 ml mravlje kiseline i nadopuni u menzuri vodom do 500 ml, promućka, izmjeri i zabilježi pH. Filtrira se kroz 0,2 µm PES filter i pohrani se u hladnjak na 4°C.</p>
<p>1 M amonijev hidrogenkarbonat</p>	<p><u>Za 100 ml:</u> 7,9 g amonijeva hidrogenkarbonata se otopi u 100 ml destilirane vode i pohrani u tamnu bočicu na sobnu temperaturu (T= 23 ± 3°C).</p>
<p>20% (v/v) EtOH u 20mM TRIS + 0,1 M NaCl, pH 7,4</p>	<p><u>Za 1 l:</u> V(EtOH)= 200 ml m(TRIS)= 2,24 g m(NaCl)= 5,844 g Izmjeri se 200 ml etanola i razrijedi destiliranom vodom do volumena ~ 800 ml. Otopina se prebaci u čašu koja se nalazi na magnetnom mješaću pa se u nju dodaju krutine: TRIS i NaCl. Nakon otapanja krutina, izmjeri se pH, prilagodi dodatkom 1 M HCl na traženu vrijednost, u menzuri nadopuni destiliranom vodom do volumena 1 l, filtrira kroz PES filter i pohrani u hladnjak na 4°C. Konačne koncentracije: 20% apsolutnog etanola; 20 mM TRIS; 0,1M NaCl.</p>
<p>0,5% SDS (w/v)</p>	<p><u>Za 50 ml:</u> Otopi se 250 mg SDS u 50 ml ultra-čiste vode na magnetnom mješaću i promućka. Čuva se na temperaturi 37°C.</p>
<p>1,33% SDS (w/v)</p>	<p><u>Za 100 ml:</u> Otopi se 1,33 g SDS-a u 100 ml ultra-čiste vode. Pohrani se na 37°C.</p>

2% SDS (w/v)	<u>Za 100 ml:</u> Otopi se 2 g SDS-a u ~ 80 ml ultra-čiste vode i nadopuni u menzuri do 100 ml. Čuva se na 37°C.	
4% Igepal CA-630 (v/v)	<u>Za 50 ml:</u> Otopi se 2 ml Igepal-a u ~ 40 ml ultra-čiste vode. Otopina se neko vrijeme može staviti u inkubator na 65°C da se Igepal brže otopi. Nadopuni se u menzuri ultra-čistom vodom do 50 ml i promućka. Pohrani se na 4°C.	
8% Igepal CA-630 (v/v)	<u>Za 50 ml:</u> Otopi se 4 ml Igepal-a u ~ 40 ml ultra-čiste vode. Otopina se neko vrijeme može staviti u inkubator na 65°C da se brže otopi Igepal. Nadopuni se u menzuri ultra-čistom vodom do 50 ml i promućka. Pohrani se na 4°C.	
2-AB otopina za obilježavanje N-glikana za UPLC	<u>Za 1 uzorak:</u> V(30% HAc u DMSO)= 25 µl m(2-AB)= 0,48 mg m(PB)= 1,12 mg	<u>Za 60 uzoraka:</u> V(30% HAc u DMSO)=1500 µl m(2-AB)= 28,8 mg m(PB)= 67,2 mg
	Otopina se priređuje netom prije primjene. U digestoru se doda 450 µl HAc u 1050 µl DMSO i promućka. Smjesa se doda u tubicu s izvaganim 2-AB i promućka dok se 2-AB ne otopi. Zatim se ta otopina doda PB i promućka dok se ne otopi. Smjesa je stabilna ~ 1 sat i potrebno ju je zaštititi od svjetlosti jer je 2-AB fotoosjetljiv.	
1,2 M otopina 2-pikolin boran kompleksa (1,2M 2-PB)	<u>Za 600 µl:</u> Izvaže se 77 mg 2-PB koji se otopi u 600 µl DMSO i promućka. Pohrani se na -20°C.	
30 mM APTS u 3,6 M limunskoj kiselini	<u>Za 640 µl:</u> Za pripremu 3,6 M otopine limunske kiseline otopi se 18,91 g monohidrata limunske kiseline u 15 ml ultra-čiste vode te nadopuni do 25 ml u menzuri. 640 µl pripremljene otopine doda se u tubicu s 10 mg APTS i promiješa da se APTS otopi. Otopina APTS podijeli se u manje tubice i čuva se na -20°C.	

Bio-Gel P-10 suspenzija 100 mg/ml	<u>Za 100 ml:</u> 10 g Bio-Gel P-10 dispergira se u smjesi otapala koja se sastoji od ultra-čiste vode, apsolutnog etanola i acetonitrila u omjerima 70:20:10. Nakon dispergiranja slijedi hidratacija sintetičkih čestica gela pa stoji na sobnoj temperaturi 4 sata. Suspenzija se pohrani na 4°C. Konačne koncentracije: 100 mg/ml Bio-Gel P-10; 20% (v/v) apsolutni etanol; 10% (v/v) ACN.
80% ACN, 100 mM TEA, pH=8,50	<u>Za 100 ml:</u> U 80 ml ACN doda se 1,385 ml trietilamina i miješa na magnetnom mješaču. Potom se doda 0,24 ml octene kiseline i nadopuni u menzuri ultra-čistom vodom do 100 ml te pohrani na 4°C.
70% EtOH (v/v)	<u>Za 30 ml:</u> Pomiješa se 21 ml EtOH i 7 ml ultra-čiste vode. Pohrani se u hladnjak na 4°C.
80% ACN (v/v)	<u>Za 250 ml:</u> Pomiješa se 200 ml ACN (LC-MS kvalitete) i 50 ml ultra-čiste vode te pohrani se u hladnjak na 4°C.
96% ACN (v/v)	<u>Za 250 ml:</u> Pomiješa se 240 ml ACN (LC-MS kvalitete) i 10 ml ultra-čiste vode te pohrani se u hladnjak na 4°C.

3.1.3. Pribor i uređaji

Tablica 3. Pribor i uređaji

Pribor i uređaji	Proizvođač
MiniSpin centrifuga	Eppendorf, SAD
Centrifuga (model 5804)	Eppendorf, SAD
Uređaj za vakuum filtraciju i vakuum pumpa	Pall Corporation, SAD
Analitička vaga	Mettler Toledo, SAD
pH metar	Mettler Toledo, SAD
Magnetni mješač (MR3000)	Heidolph, Njemačka
Adhezivna naljepnica	Mettler Toledo, SAD
Rotacijski vakuum koncentrator	GeneVac, UK
Tresilica (model 3023)	GFL, Njemačka
Pločica monolita s proteinom G	BIA Separations, Slovenija
Pločice za skupljanje uzoraka (zapremnine 1 ml i 2 ml)	Waters, SAD
ABgene PCR pločice	Thermo Fisher Scientific, SAD
PES filtar 0,2 µm	Nalgene, SAD
1 mL AcroPrep GHP 0,45µm filtar pločica	Pall Corporation, SAD
1 mL AcroPrep GHP 0,2µm filtar pločica	Pall Corporation, SAD
350µL AcroPrep GHP 0,2µm filtar pločica	Pall Corporation, SAD
Pipete (jedokanalne i multikanalne)	Rainin, Mettler Toledo, SAD
Nastavci za pipete	Rainin, Mettler Toledo, SAD
Nastavci s filterom za pipete	Rainin, Mettler Toledo, SAD
Tubice (različite zapremnine)	Sarstedt, Njemačka
Inkubator DNI 30 (37°C)	MRC, Izrael
Pećnica DNO 30 (65°C)	MRC, Izrael
Spektrofotometar NanoDrop™ 8000	Thermo Fisher Scientific, SAD
Acquity UPLC H-class uređaj	Waters, SAD
3130 Gentic Analyzer uređaj (DNA sekvencer)	Applied Biosystems brand, Thermo Fisher Scientific, SAD

3.2. Metode

Postupak izolacije IgG-a i sve daljenje korake analize N-glikana HILIC-UPLC i xCGE-LIF metodom preuzete su iz rada Hanić i sur., 2019.

3.2.1. Izolacija IgG-a iz krvne plazme pomoću pločice monolita s proteinom G

Svi koraci izolacije IgG-a iz krvne plazme provode se u digestoru. Puferi, otopine i pločica monolita s proteinom G koja se koristi u metodi trebaju biti sobne temperature. Pločica monolita s proteinom G može se koristiti više puta. Čuva se u hladnjaku na temperaturi 4°C u puferu za skladištenje (20% (v/v) EtOH u 20 mM TRIS + 0,1 M NaCl).

Potrebni puferi su:

Pufer za vezanje: 1xPBS, pH 7,4

Pufer za neutralizaciju: 10xPBS, pH 6,6-6,8

Pufer za eluciju: 0,1 M mravlja kiselina, pH 2,5

Pufer za neutralizaciju eluata: 1 M amonijev hidrogenkarbonat

Pufer za skladištenje: 20% (v/v) EtOH u 20 mM TRIS + 0,1 M NaCl, pH 7,4

Priprema uzoraka

Uzorci plazme promućkaju se i centrifugiraju 3 min na 13400 okretaja/min ili 10 min na 3000 okretaja/min da se odvoje lipidi od ostatka plazme te se u unaprijed određene jažice na pločici za skupljanje zapremnine 2 ml nanosi 100 µl uzorka plazme.

Uzorci se razrijede u omjeru 1:7 (v/v) puferom za vezanje i nanose na AcroPrep GHP 0,45 µm filter pločicu zapremnine 1 ml te filtriraju koristeći uređaj za vakuum filtraciju i vakuum pumpu. Filtrat se skuplja u čistu pločicu za skupljanje zapremnine 2 ml i stavlja na tresilicu do nanošenja na pločicu s proteinom G.

Priprema pločice monolita s proteinom G za nanošenje uzoraka plazme

Pločica s proteinom G stavi se na uređaj za vakuum filtraciju pazeći da ne dotakne radnu površinu i tako spriječi moguća kontaminacija. Primijenjeni vakuum tijekom postupka pripreme pločice ne smije prelaziti 17 inHg. Također, tijekom cijelog postupka izolacije potrebno je obratiti pažnju na pražnjenje kadice u koju se skupljaju odsisane otopine ili plazma. Pločica se odsisava poslije dodatka svake otopine.

Primjeni se vakuum da se ukloni pufer za skladištenje koji se nalazi u pločici. Jažice se isperu s 2 ml ultra-čiste vode i 2 ml 1xPBS da se uklone prisutne mehaničke nečistoće.

Zatim se doda 1 ml 0,1 M mravlje kiseline koja uklanja eventualno zaostale vezane proteine za protein G iz prethodnog korištenja pločice. Pločica se neutralizira dodatkom 2 ml 10xPBS te dodatno ispere s 4 ml 1xPBS. Nakon toga pločica je spremna za nanošenje uzoraka.

Vežanje IgG-a i ispiranje pločice

Koristeći nastavke za pipetu s filterom, kako bi se onemogućila kontaminacija pipete, prenesu se uzorci plazme na pločicu monolita s proteinom G i odsišu. U ovom koraku primijenjeni vakuum ne smije biti veći od 10 inHg. Vakuum je u ovom koraku manji kako bi se omogućilo što kvantitativnije vežanje IgG-a za protein G na pločici. Odsisana plazma se baci u infektivni otpad ili pohrani u pločicu za skupljane zapremnine 2 ml radi analize preostalih proteina plazme.

Uzorci se isperu dodatkom 2 ml 1xPBS u tri navrata i primjenom vakuuma koji ne smije prijeći vrijednost 17 inHg. Na taj način se ispiru proteini koji se nisu vezali za protein G na pločici.

Elucija IgG-a

Prije same elucije IgG-a s pločice, potrebno je u čistu pločicu za skupljanje uzorka zapremnine 2 ml dodati 170 µl pufera za neutralizaciju eluata. Pločica s puferom stavi se ispod pločice monolita na uređaj za vakuum filtraciju.

Elucija se provodi dodatkom 1 ml 0,1 M mravlje kiseline u svaku jažicu i odsisavanjem pod tlakom koji ne smije prijeći vrijednost od 10 inHg da elucija bude što kvantitativnija. U pločici za sakupljanje dolazi do reakcije neutralizacije koju pratimo pojavom mjehurića ugljikovog dioksida. Brza neutralizacija je neophodna kako bi se spriječila desijalinizacija glikana IgG-a radi niske pH vrijednosti mravlje kiseline.

Obnavljanje i skladištenje pločice monolita s proteinom G

Vakuum ne prelazi vrijednost 17 inHg tijekom postupka obnove pločice i odsisava se nakon dodatka svake otopine. Obnavljanje pločice započinje dodavanjem 2 ml 0,1 M mravlje kiseline koja uklanja eventualno zaostali IgG vezan na protein G, neutralizira se dodatkom 2 ml 10xPBS i ispere s 4 ml 1xPBS. Zatim se ispere s 1 ml 20% EtOH u 20 mM TRIS + 0,1 M NaCl koji se odsisa, a drugi mililitar istog pufera se doda, kratko primijeni vakuum i ostavi u jažicama. Tako obnovljena pločica pohrani se u hladnjak na 4°C do sljedećeg korištenja.

Mjerenje koncentracije i skladištenje IgG-a

Koncentracija IgG-a u eluatu mjeri se na spektrofotometru NanoDrop™ 8000.

U slučaju UPLC analize, uzima se alikvot od 300 µl svakog uzorka u pločicu za sakupljanje zapremnine 1 ml, suši u rotacijskom vakuum uparivaču i čuva na -20°C. Za xCGE-LIF uzima se alikvot 20 µl u PCR pločicu, suši i pohranjuje po istim uvjetima.

3.2.2. *In solutio* deglikozilacija IgG-a i proteina plazme za HILIC-UPLC analizu

Priprema uzoraka

Uzorci plazme se centrifugiraju 3 min na 13400 okretaja/min ili 10 min na 3000 okretaja po minuti i nanose na pločice za sakupljanje uzoraka zapremnine 1 ml u volumenu 10 µl.

Uzorci IgG-a, koji su osušeni i pohranjeni prema postupku opisanom u **3.2.1 Izolacija IgG-a iz krvne plazme pomoću monolitske pločice s proteinom G**, izvade se iz zamrzivača i ostave stajati na sobnoj temperaturi.

Denaturacija

Denaturacija uzoraka plazme provodi se u digestoru dodavanjem 20 µl 2% SDS u svaku jažicu s uzorkom i resuspendiranjem pipetom. Pločice se dobro zatvore adhezivnom naljepnicom.

U uzorke osušenog IgG-a doda se 30 µl 1,33% SDS i dobro resuspendira pipetom. Pločice se, također, zatvore adhezivnom naljepnicom.

SDS je detergent kojim se denaturiraju proteini pa glikozilirana mjesta na njima postanu dostupnija enzimima i olakšano je cijepanje N-glikana u sljedećem koraku. Plazma zahtijeva dodatak otopine SDS veće koncentracije jer sadrži veću koncentraciju proteina.

Inkubacija se provodi u pećnici na 65°C 10 min. Zatim se pločice hlade na tresilici 30 min do ohlađenja na sobnu temperaturu.

Doda se 10 µl 4% Igepal u svaki uzorak, resuspendira pipetom i ostavi na tresilici 15 min. Igepal reagira s SDS i sprječava njegovo denaturirajuće djelovanje na enzim koji se dodaje u sljedećem koraku.

Deglikozilacija (oslobađanje N-glikana)

Enzim kratko centrifugiramo na Mini centrifugi. Pripravi se smjesa enzima tako da se po uzorku pomiješa 10 µl 5xPBS s 0,12 µl PNGaze F. Izračuna se potrebna količina pufera i enzima za postojeći broj uzoraka i dodatno se uračuna 30 µl 5xPBS pufera za cijelu pločicu jer se uzima u obzir greška pipeta.

U svaki uzorak doda se 10 µl pripravljene smjese enzima i promiješa pipetom, pločice se zatvore adhezivnom naljepnicom i ostave se inkubirati 18 sati na 37°C.

3.2.3. *In solutio* obilježavanje N-glikana za HILIC-UPLC analizu

Potrebne puferi i otopine trebaju biti sobne temperature, osim ACN koji se treba primijeniti ohlađen na 4°C kako bi se smanjilo njegovo isparavanje.

Priprema 2-AB otopine za označavanje N-glikana

Otopina se priprema neposredno prije primjene, a njezima priprema je opisana u poglavlju **3.1.2. Puferi i otopine**

2-AB je boja koja pokazuje fluorescenciju pa je pogodna za označavanje glikana za analizu na UPLC uređaju s fluorescencijskim detektorom. Sami glikani nemaju svojstvo fluorescencije.

Označavanje N-glikana 2-AB

Korak obilježavanja glikana 2-AB izvodi se u digestoru. Skine se adhezivna naljepnica s pločice nakon inkubacije uzoraka i doda 25 µl 2-AB otopine za označavanje u svaki uzorak IgG-a i plazme. Ponovno se zatvori novom adhezivnom naljepnicom, stavi na tresilicu 10 min pa u pećnicu na 65°C 2 sata. Ne preporuča se inkubacija duže od 2 sata jer dolazi do desijalinizacije glikana. Hladi se 30 min na sobnoj temperaturi.

Priprema GHP pločice

Postupak se provodi pomoću uređaja za vakuum filtraciju i vakuum pumpe. Koristi se AcroPrep hidrofилна GHP filter pločica zapremnine 1 ml i veličine pora 0,2 µm koja se postavi na uređaj i redom ispiri s 200 µl 70% EtOH, 200 µl ultra-čiste vode i 200 µl hladnog 96% ACN. Vakuumom se odsisava između svakog ispiranja i ne smije prelaziti vrijednost 2 inHg.

Nanošenje i čišćenje obilježenih N-glikana na GHP pločici

Svaki uzorak s obilježenim N-glikanima razrijedi se dodatkom 700 μl hladnog 100% ACN, resuspendira u jažici i odmah nanosi na pripremljenu GHP pločicu. Inkubira se 2 min na sobnoj temperaturi da se omogući vezanje glikana na hidrofилnu membranu GHP pločice, a potom se primjenom vakuuma odsiše. Vakuum i u ovom koraku ne smije prelaziti vrijednost 2 inHg.

N-glikani imaju hidrofилna svojstva pa u prisutnosti organskog otapala imaju veći afinitet prema hidrofилnoj membrani GHP pločice nego prema organskom otapalu.

Čišćenje obilježenih N-glikana provodi se dodatkom i odsisavanjem 200 μl hladnog 96% ACN. Taj korak se ponovi još tri puta. Ponovno se doda 200 μl ACN i centrifugira 5 min na 1000 okretaja/min. Za vrijeme centrifugiranja se ispod GHP pločice postavi pločica za skupljanje uzoraka zapremnine 1 ml.

ACN ispire nepolarne onečišćenja koje se nisu vezale za hidrofилni filter, a to su reducirajući agens (PB), nevezana boja (2-AB) i sol iz uzoraka dok će glikani ostati vezani za membranu GHP pločice.

Elucija obilježenih N-glikana

GHP pločica se postavi na PCR pločicu u koju će se skupljati eluat. Doda se 90 μl ultra-čiste vode u svaki uzorak, stavi na tresilicu 15 min i centrifugira 5 min na 1000 okretaja/min. Postupak se ponovi još jednom. Provjeri se ima li zaostalih kapljica na podnožju GHP filtera. Ukupan volumen eluata je 180 μl .

PCR kapticama zatvorimo jažice na PCR pločici. Eluat fluorescentno obilježenih N-glikana može se odmah koristiti za daljnu analizu na UPLC uređaju ili se pohrani u zamrzivač na -20°C .

3.2.4. HILIC-UPLC analiza N-glikana IgG-a

Fluorescentno obilježeni N-glikani IgG-a analiziraju se na Acquity UPLC uređaju koji se sastoji od kvartarne jedinice za pripravu mobilne faze (engl. *quartenary solvent manager*, QSM), automatskog injektora uzoraka (engl. *flow trough needle*, FTN), grijača kolone i fluorescentnog (FLR) detektora ($\lambda_{\text{ekscitacija}} = 250 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisija}} = 428 \text{ nm}$). Uređaj se kontrolirao računalnim programom Empower 3 (Waters, SAD).

Stacionarna faza je hidrofилna ACQUITY UPLC BEH Glycan kolona dimenzije 2.1x100 mm i promjera BEH čestica 1,7 μm . Odjeljivanje se temelji na kromatografiji

hidrofilnih interakcija. Mobilna faza sastoji se od 100 mM amonijeva formijata, pH 4.4 (otapalo A) te acetonitrila LC-MS kvalitete (otapalo B). Otapala se miješaju u QSM u različitim omjerima tijekom analize uzorka. Za odjeljivanje glikana, koristi se linearni gradijent otapala A 25%-38%, brzine protoka 0,40 mL/min, tijekom 27 min. Uzorci su prije odjeljivanja na koloni držani na 10°C, a odjeljivanje se odvija na temperaturi od 60°C.

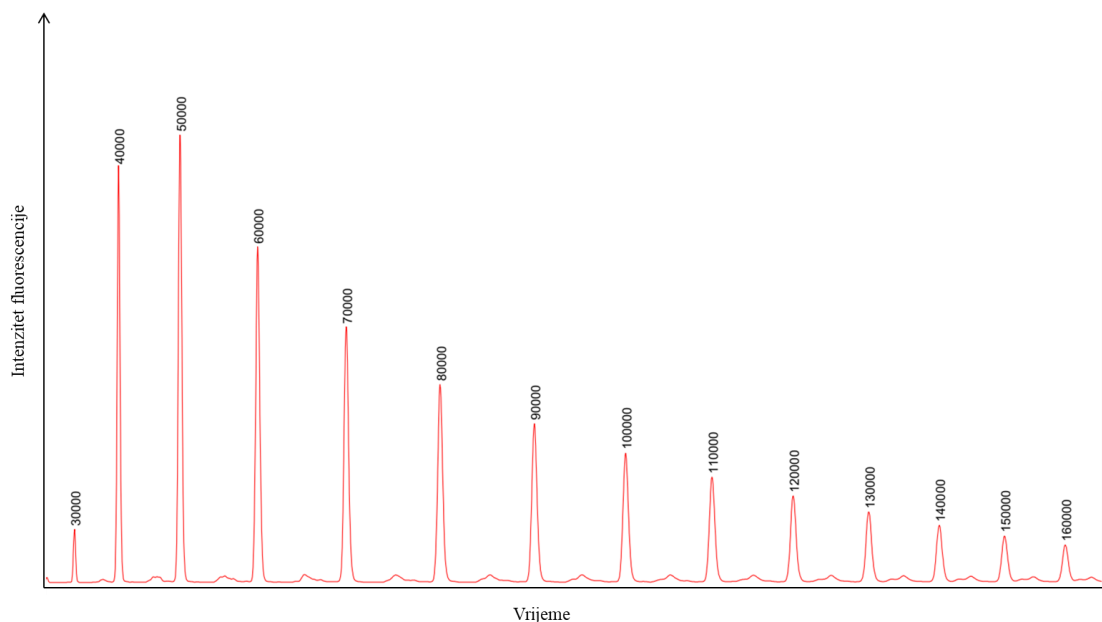
Prije nanošenja uzoraka na kolonu pušta se uzorak ultra-čiste vode, a dobiveni kromatogram ne bi trebao imati vrške niti anomalije bazne linije. Potom se sustav kalibrira fluorescentno obilježenim (2-AB) oligomerima glukoze u 80% ACN dobivenih hidrolizom dekstrana, a prema kojima su vremena zadržavanja pojedinih glikana prevedena u glukozne jedinice (engl. *glucose unit*, GU). Treći uzorak je standardni uzorak IgG-a u 80% ACN kojim se prati separacija i životni vijek kolone. Zatim se puštaju uzorci IgG-a pripremljeni u 80% ACN. Obično se nakon 16 uzoraka ponovno pusti uzorak oligomera glukoze na uređaj. Oba kromatograma oligomera glukoze bi se trebala preklapati u vršcima uz dopušten mali pomak u retencijskim vremenima. Naposljetku se ponovno analiziraju uzorci standarda IgG-a i vode kako bi se osigurao da je s kolonom i tlakom u instrumentu sve u prihvatljivim granicama. Volumen injektiranja za uzorke je 10 µl, a princip injektiranja je hidrodinamički.

3.2.5. HILIC-UPLC analiza N-glikana proteina plazme

U odnosu na HILIC-UPLC analizu N-glikana IgG-a, koristi se ACQUITY UPLC BEH Glycan kolona dimenzije 2.1x150 mm i promjera BEH čestica 1,7 µm. Način odjeljivanja i korištena otapala su ista. Korišten je linearni gradijent otapala A od 30-47%, brzine protoka 0,561 ml/min, tijekom 23 min. Uzorci su držani na 10°C prije injektiranja, a temperatura kolone na kojoj se odvija odjeljivanje je 25°C.

Prije nanošenja uzoraka na kolonu pušta se uzorak ultra-čiste vode, a dobiveni kromatogram ne bi trebao imati vrške niti anomalije bazne linije. Sustav se kalibrira fluorescentno obilježenim (2-AB) oligomerima glukoze u 75% ACN dobivenih hidrolizom dekstrana, a prema kojima su vremena zadržavanja pojedinih glikana prevedena u glukozne jedinice (GU) (**Slika 7.**). Treći uzorak je uzorak standarda plazme u 75% ACN čiji bi kromatogram trebao pokazivati simetrične vrške bez deformacije. Zatim se puštaju uzorci plazme u 75% ACN. Obično se nakon 16 uzoraka ponovno pusti uzorak oligomera glukoze na uređaj. Oba kromatograma oligomera glukoze bi se trebala preklapati u vršcima uz dopušten mali pomak u retencijskim vremenima. Naposljetku ponovno se analiziraju kromatogrami

jednog uzorka standarda plazme i vode kako bi se osigurao da je s kolonom i postupkom sve u prihvatljivim granicama. Volumen injektiranja za uzorke je 20 μ l, a princip hidrodinamički.



Slika 7. Kromatogram 2-AB obilježenih oligomera glukoze dobivenih hidrolizom dekstrana, korištenih za kalibraciju sustava neposredno prije analize N-glikoma krvne plazme. Svakom vršku, odnosno oligomeru glukoze, pridružena je odgovarajuća vrijednost koja odgovara glukoznim jedinicama (GU vrijednost nakon dijeljenja s 10000).

3.2.6. *In solutio* deglikozilacija IgG-a i proteina plazme za xCGE-LIF analizu

Priprema uzoraka

PCR pločicu sa osušenim izoliranim IgG izvadi se na sobnu temperaturu. Izolacija i sušenje IgG-a opisano je u poglavlju **3.2.1. Izolacija IgG-a iz krvne plazme pomoću monolitske pločice s proteinom G.**

U uzorcima plazme su nakon centrifugiranja 3 min 13400 okretaja/min ili 10 min na 3000 okretaja/min odvojeni lipidi. Supernatant plazme je raspodjeljen u PCR pločicu u unaprijed određene jažice u volumenu od 2 μ l po uzorku.

Pripremi se pufer 1,66xPBS miješanjem 2 ml ultra-čiste vode i 1 ml 5xPBS.

Denaturacija

Svakom osušenom uzorku IgG-a doda se 3 μ l 1,66xPBS i resuspendira pipetom. Sljedeći korak je dodavanje 4 μ l 0,5% otopine SDS i ponovno miješanje pipetom.

Pločica se zatvori adhezivnom naljepnicom i ostavi u pećnici na 65°C 10 min nakon čega se skine naljepnica i doda 2 μ l 4% Igepal u svaku jažicu s uzorkom te resuspendira pipetom. Ostavi se na tresilici dok otopina enzima ne bude spremna.

Uzorci plazme obrađuju se na vrlo sličan način. Isti su postupci i redoslijed. Razlika je što se umjesto 4 μ l 0,5% SDS otopine dodaje 2 μ l 2% SDS otopina i umjesto 2 μ l 4% Igepal dodaje se 4 μ l 8% Igepal.

Deglikozilacija (oslobađanje N-glikana)

Enzim kratko centrifugiramo na Mini centrifugi. Pripravi se smjesa enzima tako da se po uzorku IgG-a pomiješa 1 μ l 5xPBS s 0,12 μ l PNGaze F, a po uzorku plazme pomiješa se 2 μ l 5xPBS s 0,12 μ l PNGaze F. Izračuna se potrebna količina pufera i enzima za postojeći broj uzoraka.

U svaki uzorak IgG-a doda se 1 μ l smjese enzima, a u uzorke plazme po 2 μ l iste smjese. Pločice se termalno zatvore folijom i stave u inkubator na 37°C na 3 sata.

Nakon 3 sata inkubacije, proces deglikozilacije je završen i smjesa se osuši u rotacijskom vakuum uparivaču u slučaju uzoraka IgG-a, dok se kod uzoraka plazme odmah nastavlja s daljnjim koracima u pripremi.

3.2.7. Obilježavanje N-glikana otopinom APTS za xCGE-LIF analizu

Obilježavanje N-glikana otopinom APTS

U svaku jažicu s uzorkom IgG-a doda se 2 μ l ultra-čiste vode i dobro resuspendira pipetom. Kod uzoraka plazme, 2 μ l deglikozilacijske smjese prenese se u čistu PCR pločicu.

APTS/PB otopina za označavanje priprema se miješanjem 2 μ l APTS otopine za označavanje (30 mM APTS u 3,6 M limunskoj kiselini) i 2 μ l 1,2 M 2-PB (1,2 M 2-pikolin boran u DMSO) po uzorku. Priprema otopina navedena je u poglavlju 3.1.2. **Otopine i puferi.** Izračuna se potreban volumen otopina za odgovarajući broj uzoraka i priprema se netom prije korištenja. Nakon pripreme APTS/PB otopine, nanosi se 4 μ l u svaku jažicu s uzorkom. Pazi se pritom da nastavak pipete ne dira dno jažice jer može doći do precipitacije IgG-a u prisutnosti limunske kiseline u nastavcima za pipete.

Pločica se termalno zatvori folijom i vorteksira 10 sekundi na srednjoj brzini. Potom se ostavlja 16 sati u inkubator na 37°C.

3.2.8. HILIC-SPE čišćenje APTS obilježenih N-glikana za xCGE-LIF analizu

Zaustavljanje reakcije obilježavanja

Reakcija se zaustavlja dodavanjem hladnog 80% ACN u svaku jažicu PCR pločice. Pokrije se aluminijskom folijom i može se pohraniti na 4°C maksimalno 1 sat do nanošenja na pripremljenu 0,2 µm AcroPrep GHP filter pločicu zapremnine 350 µl koja sadržava Bio-Gel P-10.

Mehanizam zaustavljanja reakcije je povećanje volumena i snižavanje temperature reakcijske smjese.

Priprema i obrada Bio-Gel P-10 prije nanošenja uzoraka

Suspenzija Bio-Gel P-10 (100 mg/ml, ultra-čista voda/etanol/ACN=70:20:10, v/v) stavi se na sobnu temperaturu na magnetni mješač. Miješa se na niskim brzinama da ne dođe do pucanja sintetičkih čestica. Bio-Gel P-10 je hidrofilna stacionarna faza koja pogodna za vezanje hidrofilnih N-glikana i omogućuje uspješno uklanjanje hidrofobnih onečišćenja i soli.

GHP pločica se postavi na uređaj za vakuum filtraciju i u svaku jažicu se doda 190 µl Bio-Gel P-10 suspenzije. Odsiše se primjenom vakuuma koji ne prelazi vrijednost 2 inHg.

Prvi korak kondicioniranja Bio-Gel P-10 je dodavanje 200 µl ultra-čiste vode u svaku jažicu GHP pločice uz resuspendiranje pipetom, inkubacija 1 minutu i odsisavanje. Gel se resuspendira da bi se postiglo bolje pakiranje čestica u gelu. Ovaj korak ponovi se još dva puta, ali bez resuspendiranja gela.

Zatim se doda 200 µl hladnog 80% ACN u svaku jažicu uz resuspendiranje pipetom, inkubira 1 minutu i odsiše. Ispiranje s 80% ACN ponovi se još dva puta, ali bez resuspendiranja gela. Koristi se hladna otopina ACN da bi se spriječilo isparavanje otapala i gubitak sijalinskih kiselina s glikana.

Odmah se prelazi na sljedeći korak nanošenja uzoraka na pripremljenu pločicu.

Nanošenje i čišćenje APTS-obilježenih N-glikana u GHP pločici

Pažljivo se na GHP pločicu s Bio-Gel P-10 nanese uzorci u ukupnom volumenu 106 μl (6 μl uzorka + 100 μl 80% ACN) i miješaju se na tresilici 5 minuta na brzini 450 rpm. Potom se odsiše na uređaju za vakuum filtraciju, a primjenjeni vakuum ne smije prelaziti vrijednost 2 inHg kao i za cijeli postupak čišćenja glikana.

Čišćenje glikana se započinje ispiranjem jažica s 200 μl otopinom 80% ACN i 100 mM TEA. Miješaju se na tresilici 2 min prije odsisavanja. Ispiranje s 200 μl otopinom 80% ACN i 100 mM TEA se ponovi još 4 puta. Trietilamin je pozitivno nabijen pa ulazi u interakciju s negativno nabijenim APTS te ga uklanja iz smjese.

Čišćenje se nastavlja dodavanjem 200 μl hladnog 80% ACN u svaku jažicu, miješanjem na tresilici 2 min i odsisavanjem. Još dva puta ponovimo korak ispiranja s hladnim 80% ACN. Acetonitril uklanja suvišak trietilamina iz prethodnog koraka i reducira udio soli.

Pločica se potom kratko centrifugira i provjeri ima li zaostalih kapljica na podnožju pločice.

Elucija APTS-obilježenih N-glikana

Ispod GHP pločice postavi se pločica za sakupljanje uzoraka zapremnine 1 ml u kojoj će se skupljati eluat.

U jažice na GHP pločici doda se 100 μl ultra-čiste vode, miješa na tresilici 5 min pri brzini 450 rpm da bi se osiguralo bubrenje čestica gela i otpuštanje vezanih N-glikana. Odsiše se vakuumom. Tijekom cijelog postupka elucije primjenjeni vakuum također ne smije prelaziti vrijednost 2 inHg.

Dodavanjem 200 μl ultra-čiste vode u svaku jažicu započinje se postupak same elucije obilježenih N-glikana. Miješa se na tresilici 5 min pri brzini 450 rpm i odsiše u pločicu za sakupljanje uzoraka. Skupljena je prva frakcija eluata. Ponovno se doda 200 μl ultra-čiste vode, miješa na tresilici 5 min pri 450 rpm i odsiše u istu pločicu.

Ukupan volumen eluata u pločici za skupljanje uzoraka je ~ 400 μl koji je spreman za analizu na xCGE-LIF uređaju, a može se pohraniti na -20°C za kasnije analize.

3.2.9. xCGE-LIF analiza N-glikana IgG-a i proteina plazme

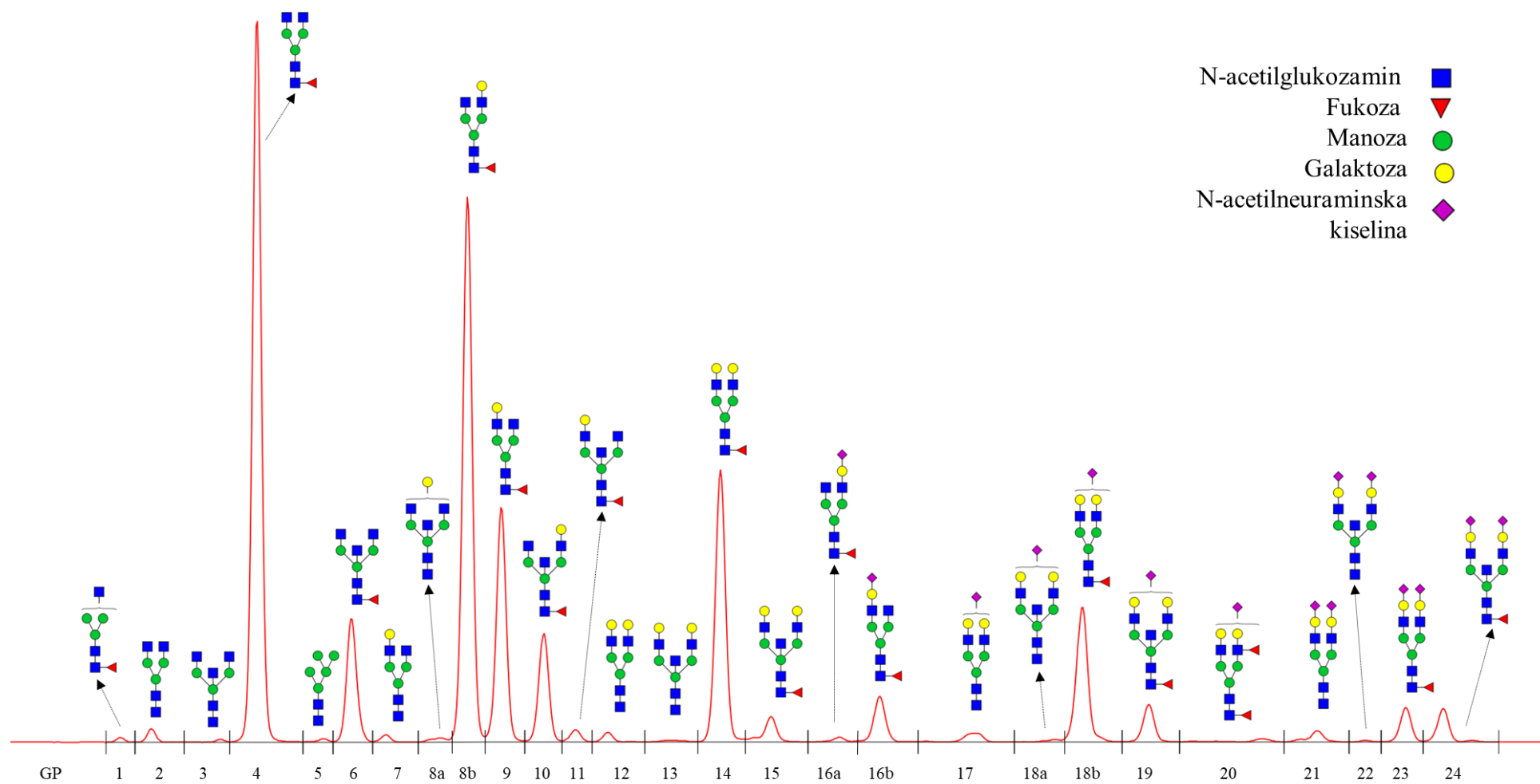
Fluorescentno obilježeni N-glikani IgG-a ili plazme analiziraju se xCGE-LIF metodom na DNA sekvenceru (ABI3130 genetički analizator) koji ima 4 kapilare duljine 50 cm. Kapilare su na oba kraja umočene u pufer s EDTA (koncentracije 1x) te zatvaraju strujni krug. Jakost električnog polja tijekom analize je 15 kV, vrijeme elektrokinetičkog injektiranja je 5 ili 10 sekundi (radi postizanja zadovoljavajućeg intenziteta uzorka), temperatura pećnice tijekom analize 30°C, a vrijeme analize jednog uzorka 1800 sekundi. POP-7 polimer oblaže stijenku kapilare i djeluje kao sito koje razdvaja glikane na temelju njihove mase, hidrodinamičkog radijusa i naboja. Argonskim laserom se pobuđuju obilježeni glikani (488 nm) i detektor očitava intenzitet emitirane svjetlosti određenih valnih duljina. Uređaj se kontrolirao računalnim programom Data Collection 1 (Thermo-Fisher Scientific, SAD).

U analizu se uzima 1-3 µl APTS-obilježenih N-glikana ovisno o količini glikana u uzorku i pomiješa s formamidom do ukupnog volumena 10 µl. Koristi se HiDi formamid (engl. *highly deionised formamide*) niske provodljivosti koji umanjuje sušenje uzoraka tijekom analize te smanjuje varijabilnost među njima.

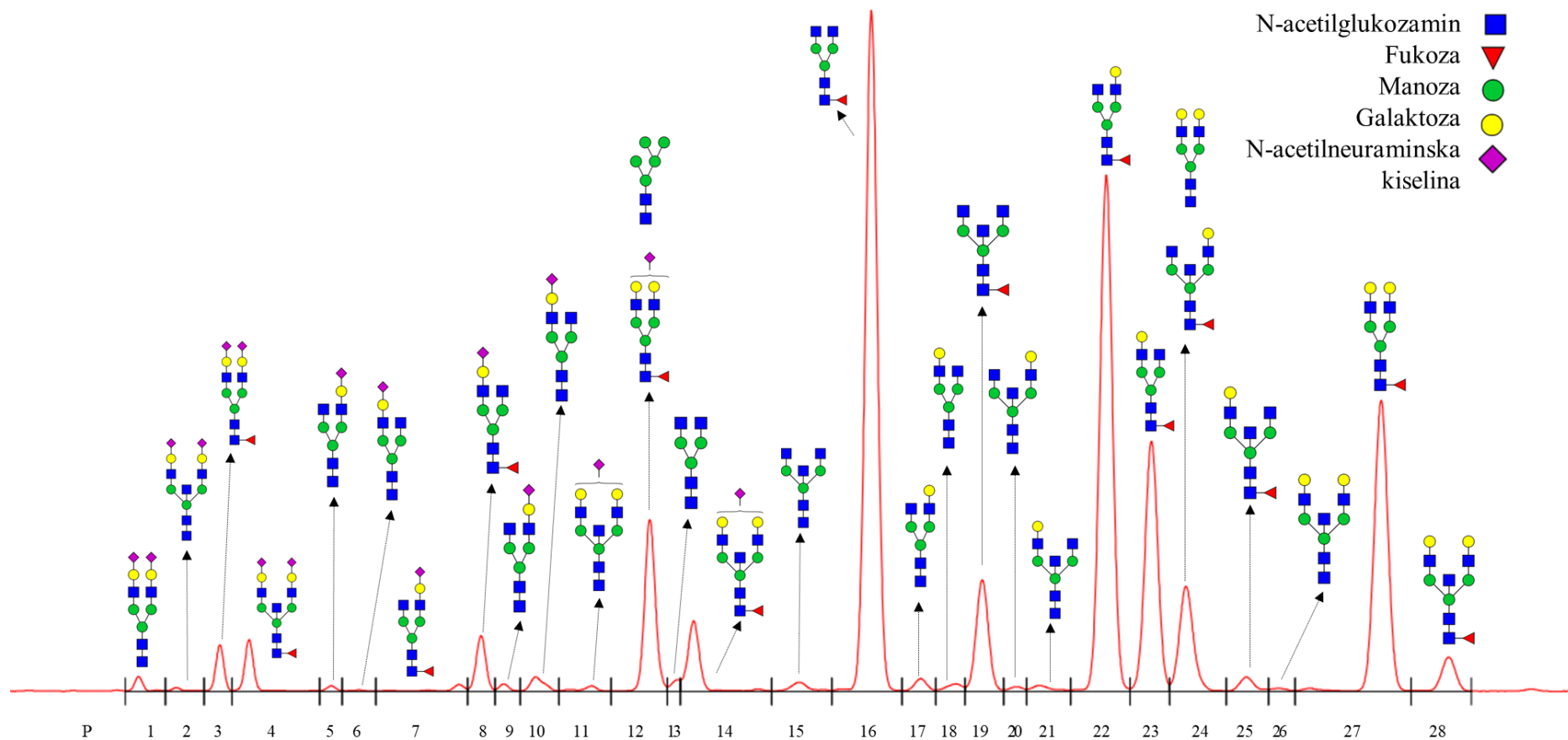
3.2.10. Analiza podataka

U statističkoj obradi korišten je računalni program Microsoft Excel®. Kromatogram dobiven HILIC-UPLC analizom N-glikoma IgG-a podijeljen je na 24 kromatografska vrška (**Slika 8.**), a kromatogram N-glikoma krvne plazme dobiven istom metodom na 39 vršaka (**Slika 10.**). Elektroferogram dobiven xCGE-LIF analizom N-glikoma IgG-a podijeljen je na 28 elektroforetskih vršaka (**Slika 9.**), a elektroferogram N-glikoma plazme na njih 45 (**Slika 11.**). Svaki vršak na kromatogramima i elektroferogramima plazme i IgG-a je integriran i predstavlja jednu ili više glikanskih struktura čiji je udio izražen postotkom površine (%) od ukupne integrirane površine.

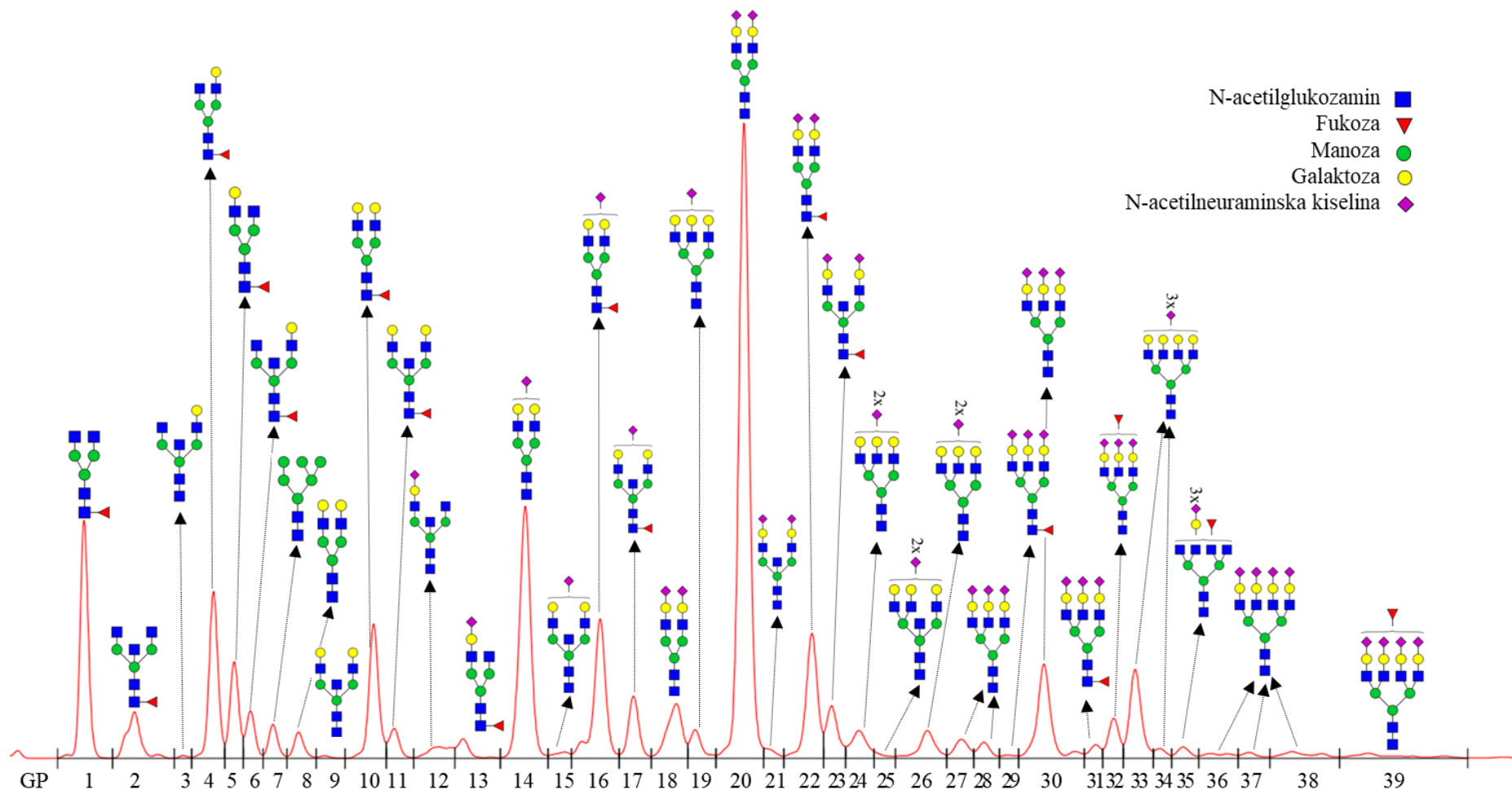
Za potrebe ovog diplomskog rada, ponovljivost je izražena kao koeficijent varijacije (engl. *coefficient of variation*, CV) izražen u postotcima (%) za svaki od tri analizirana standarda u pojedinoj vremenskoj točki. CV vrijednost dobiva se dijeljenjem standardne devijacije (engl. *standard deviation*, σ) sa srednjom vrijednosti (\bar{X}). Reproducibilnost metode izražena je kao CV vrijednost uzimajući u obzir sve vremenske točke jednog standarda, za svaki glikanski vršak.



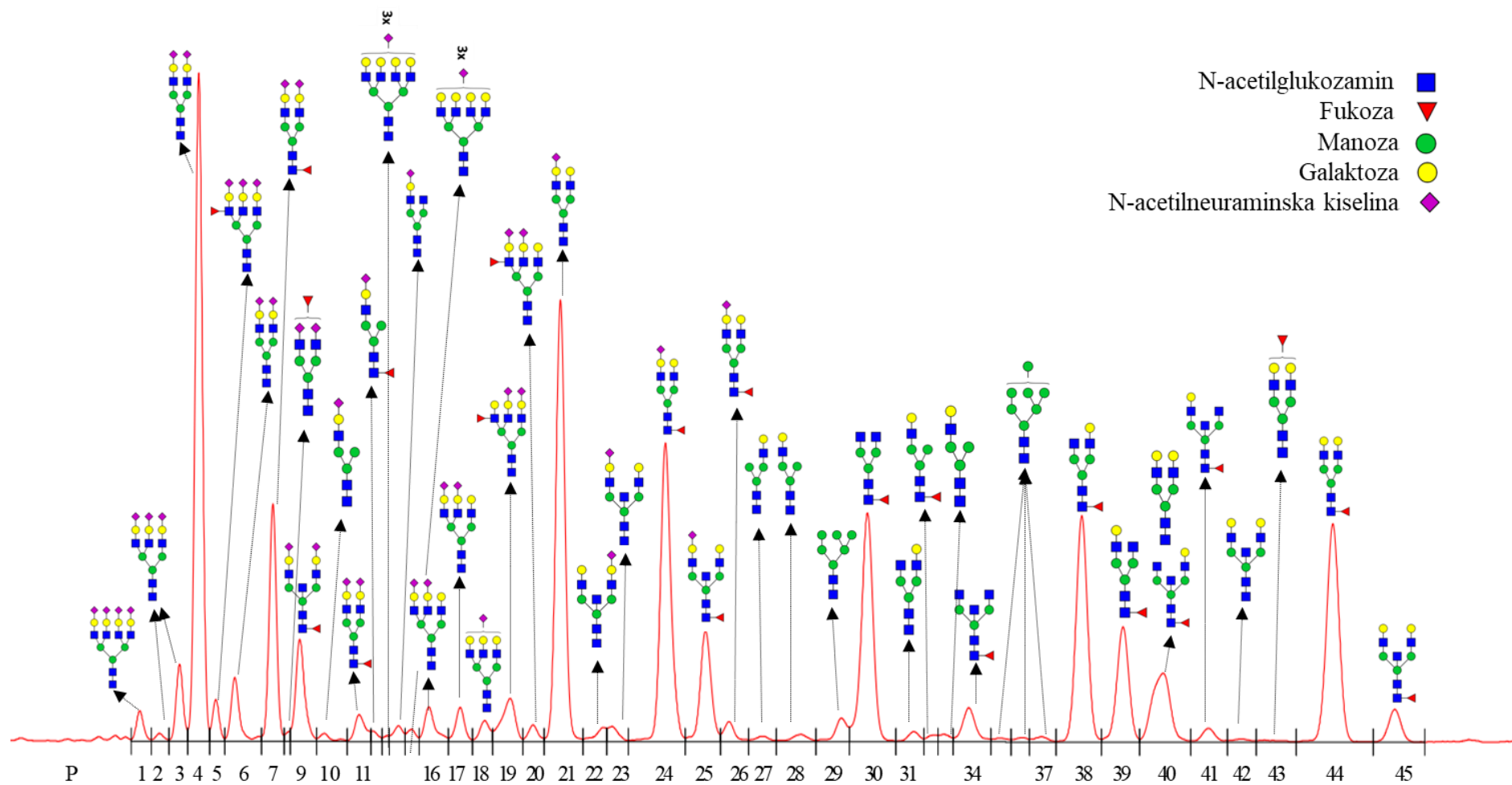
Slika 8. Reprezentativan kromatogram N-glikoma IgG-a dobiven HILIC-UPLC metodom. Svakom od 24 vrška pridružene su glavne (najzastupljenije) glikanske strukture prema Pučić i sur., 2011.



Slika 9. Reprezentativan elektroferogram N-glikoma IgG-a dobiven xCGE-LIF metodom. Svakom od 28 vršaka pridružene su glavne (najzastupljenije) glikanske strukture prema Huffman i sur., 2014.



Slika 10. Reprezentativan kromatogram N-glikoma krvne plazme dobiven HILIC-UPLC metodom. Svakom od 39 vršaka pridružene su glavne (najzastupljenije) glikanske strukture prema Saldova i sur., 2014.



Slika 11. Reprezentativan elektroferogram N-glikoma krvne plazme dobiven xCGE-LIF metodom. Svakom od 45 vršaka pridružene su glavne (najzastupljenije) glikanske strukture prema Reiding i sur., 2018.

4. REZULTATI

Za potrebe ovog diplomskog rada izračunata je ponovljivost i reproducibilnost HILIC-UPLC i xCGE-LIF metoda i to na tri standardna uzorka (svaki u 8 tehničkih replikata) koja su pripremljena i analizirana dvjema metodama u razmacima od tjedan dana (vremenske točke t_0 , t_1 i t_2). Za analizu HILIC-UPLC metodom, N-glikani su oslobođeni pomoću enzima PNGaze F, fluorescentno obilježeni s 2-AB bojom, pročišćeni i odijeljeni kromatografijom hidrofilnih interakcija, čime su dobiveni kromatogrami koji predstavljaju profil N-glikana IgG-a, odnosno N-glikana proteina plazme. N-glikani proteina plazme i IgG-a, koji su analizirani xCGE-LIF metodom, su nakon oslobađanja od proteina pomoću PNGaze F, fluorescentno obilježeni APTS bojom te analizirani nakon pročišćavanja. Dobiveni elektroferogrami predstavljaju profil N-glikana IgG-a, odnosno N-glikana proteina plazme. Svakom vršku pridružene su najzastupljenije glikanske strukture i prikazane su na **Slika 8.**, **Slika 9.**, **Slika 10.** i **Slika 11.**

4.1. Ponovljivost i reproducibilnost HILIC-UPLC i xCGE-LIF metoda u pripremi i analizi N-glikana imunoglobulina G

Detaljan prikaz ponovljivosti i reproducibilnosti HILIC-UPLC metode u pripremi i analizi N-glikana IgG-a dan je u **Tablici 4.**, dok su vrijednosti dobivene xCGE-LIF metodom prikazane u **Tablici 5.** Iz **Tablice 4.** može se iščitati da je ponovljivost HILIC-UPLC metode izuzetno dobra i podudarna u svakoj vremenskoj točki za sve analizirane standarde te da najmanje 17 od 24 kromatografskih vrška ima CV vrijednost manju od 7%. Kromatografski vršci čije strukture predstavljaju glavninu N-glikoma imaju manje koeficijente varijacije, vidljivo kod standarda br. 2 (t_0) na primjeru GP4 (zastupljenost $26,55\% \pm 0,13\%$) čija CV vrijednost iznosi samo 0,48%. Sukladno tome, izrazito slabo zastupljene glikanske strukture pokazuju najveće CV vrijednosti poput GP3 (zastupljenost $0,12\% \pm 0,04\%$) standarda br. 1 (t_0) čija CV vrijednost može iznositi čak 30,75%. Nadalje, na primjeru standarda br. 2 (t_2) može se iščitati da varijacija može biti veća kod glikanskih vršaka koji sadrže sijalinizirane strukture (od GP19 do GP24) te se kretati između 7% i 15%. Dobivena ponovljivost za takve glikanske vrške očekivana je s obzirom da se radi o manje zastupljenim glikanskim strukturama koje sadrže labilne sijalinske kiseline na svojim nereducirajućim krajevima, osjetljive ponajviše na nizak pH i povišenu temperaturu tijekom pripreme uzoraka.

Reproducibilnost HILIC-UPLC metode u pripremi i analizi N-glikana IgG-a kroz zadani vremenski period je također vrlo dobra te najmanje 14 od 24 kromatografskih vršaka

ima CV vrijednost manju od 7%, najviše osam glikanskih vršaka CV vrijednost između 7 i 15% te četiri vrška veću od 15%. Također, ponovno CV vrijednosti najveće su za slabo zastupljene strukture poput GP3 (zastupljenost $0,13\% \pm 0,04\%$) kod standarda br. 2 čiji koeficijent varijacije stoga iznosi 27,83%, ali i za GP1 i GP5 te vrškove koji predstavljaju sijalinizirane strukture (GP17, GP19 - GP24).

Promatrajući ponovljivost xCGE-LIF metode u pripremi i analizi N-glikana IgG-a (**Tablica 5.**) vidimo da najmanje 21 od 28 glikanskih vršaka ima CV vrijednost manju od 7%, dok najviše 4 od 28 glikanskih vršaka ima vrijednost veću od 15% (standard br. 3 u t_2). Čini se da je ponovljivost ove metode neznatno lošija. Dobivene CV vrijednosti su u pravilu veće u odnosu na HILIC-UPLC te mogu, primjerice, kod standarda br. 3 (t_0) dostići 64,23% za elektroforetski vršak P2 (zastupljenost $0,16\% \pm 0,10\%$). No, ponovno se prvenstveno radi o vršcima koji predstavljaju vrlo slabo zastupljene strukture s relativnim udjelima manjima od 0,6%, ali ne nužno i sijaliniziranim strukturama.

Reproducibilnost xCGE-LIF metode u pripremi i analizi N-glikana pojedinog standarda IgG-a također je nešto lošija u odnosu na UPLC. Iako je broj elektroforetskih vršaka koji imaju CV vrijednost između 7 i 15% i broj vršaka s CV vrijednošću većom od 15% podjednak onoj kod HILIC-UPLC metode, te su vrijednosti uglavnom nešto izraženije. Možemo iščitati da u nekim slučajevima CV vrijednosti kod xCGE-LIF metode prelaze 30% što ne nalazimo kod HILIC-UPLC metode. Primjerice kod standarda br. 1 vršak P21 (zastupljenost $0,26\% \pm 0,01\%$) pokazuje CV vrijednost 42,24%, a kod standarda br. 3 vršak P6 (zastupljenost $0,06\% \pm 0,00\%$) čak 47,27%.

Tablica 4. Deskriptivna analiza N-glikana IgG-a HILIC-UPLC metodom svakog od tri biološka uzorka (svaki u osam tehničkih replikata) u trima vremenskim točkama (t_0 , t_1 i t_2). \bar{x} – srednja vrijednost udjela površine pojedinog kromatografskog vrška u ukupnoj površini svih vršaka u kromatogramu, σ – standardna devijacija tog udjela, CV – koeficijent varijacije. Sve tri vrijednosti izražene su u postotcima (%). Ako je koeficijent varijacije između 7 i 15%, naglašen je žutom bojom, a ako je veći od 15%, crvenom.

	Standard br. 1											
	Ponovljivost									Reproducibilnost		
	t_0			t_1			t_2			\bar{x}	σ	CV
	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV			
GP1	0,07	0,01	8,39	0,08	0,01	18,64	0,07	0,00	3,40	0,07	0,01	12,03
GP2	0,42	0,03	7,53	0,40	0,02	6,11	0,40	0,01	1,92	0,41	0,02	6,10
GP3	0,12	0,04	30,75	0,11	0,02	14,46	0,10	0,01	7,71	0,11	0,03	22,86
GP4	20,12	0,23	1,13	20,26	0,17	0,84	21,22	0,29	1,36	20,53	0,55	2,67
GP5	0,11	0,01	6,26	0,10	0,00	4,11	0,10	0,01	5,88	0,10	0,01	8,63
GP6	3,47	0,04	1,16	3,47	0,05	1,47	3,60	0,04	1,10	3,51	0,08	2,24
GP7	0,33	0,01	2,83	0,32	0,01	2,95	0,33	0,01	1,67	0,33	0,01	2,66
GP8	21,40	0,12	0,55	21,56	0,12	0,55	21,79	0,41	1,90	21,58	0,30	1,37
GP9	9,66	0,10	1,00	9,74	0,04	0,37	10,33	0,11	1,05	9,91	0,31	3,17
GP10	3,62	0,02	0,64	3,68	0,02	0,42	3,71	0,04	1,03	3,67	0,04	1,22
GP11	0,44	0,01	1,72	0,44	0,00	0,91	0,45	0,01	2,60	0,45	0,01	2,00
GP12	0,77	0,01	1,74	0,74	0,02	2,48	0,73	0,01	1,41	0,75	0,02	3,21
GP13	0,19	0,01	2,79	0,20	0,01	4,13	0,19	0,01	2,92	0,19	0,01	3,56
GP14	15,54	0,18	1,13	15,72	0,12	0,79	15,76	0,15	0,98	15,67	0,18	1,12
GP15	1,32	0,03	1,93	1,34	0,02	1,46	1,28	0,03	2,43	1,31	0,04	2,73
GP16	3,08	0,03	0,99	3,07	0,02	0,62	3,15	0,04	1,41	3,10	0,05	1,52
GP17	0,99	0,01	1,28	0,90	0,01	1,34	0,79	0,03	4,17	0,89	0,09	9,73
GP18	11,00	0,10	0,91	10,84	0,08	0,76	10,34	0,25	2,45	10,73	0,33	3,05
GP19	1,66	0,05	3,24	1,65	0,04	2,70	1,34	0,14	10,20	1,55	0,18	11,31
GP20	0,31	0,01	4,55	0,29	0,02	5,22	0,23	0,02	8,75	0,28	0,04	13,31
GP21	0,81	0,02	2,09	0,67	0,02	3,56	0,51	0,04	7,99	0,66	0,13	19,14
GP22	0,11	0,00	3,25	0,10	0,00	2,86	0,08	0,01	12,59	0,10	0,01	14,72
GP23	2,74	0,05	1,88	2,67	0,05	2,02	2,15	0,19	8,79	2,52	0,29	11,54
GP24	1,71	0,05	3,07	1,68	0,05	3,04	1,36	0,17	12,14	1,58	0,19	11,97
	Standard br. 2											
	Ponovljivost									Reproducibilnost		
	t_0			t_1			t_2			\bar{x}	σ	CV
	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV			
GP1	0,16	0,00	1,69	0,17	0,01	3,44	0,18	0,02	8,90	0,17	0,01	7,81
GP2	0,51	0,01	1,98	0,51	0,01	2,61	0,53	0,02	3,36	0,52	0,02	3,05
GP3	0,12	0,00	3,05	0,13	0,01	11,37	0,13	0,01	8,33	0,13	0,04	27,83
GP4	26,55	0,13	0,48	27,02	0,23	0,87	27,95	0,41	1,48	27,17	0,66	2,42
GP5	0,19	0,01	3,07	0,18	0,02	10,19	0,18	0,01	3,83	0,18	0,01	6,97
GP6	5,23	0,04	0,78	5,29	0,05	1,01	5,48	0,05	0,95	5,33	0,12	2,25
GP7	0,33	0,01	2,10	0,33	0,01	3,47	0,33	0,01	1,69	0,33	0,01	2,55
GP8	21,47	0,09	0,43	21,96	0,18	0,82	21,96	0,26	1,17	21,80	0,30	1,36
GP9	9,71	0,05	0,54	9,69	0,07	0,68	10,14	0,13	1,25	9,84	0,23	2,36
GP10	4,45	0,02	0,48	4,51	0,03	0,58	4,51	0,04	0,89	4,49	0,04	0,94
GP11	0,59	0,01	1,35	0,57	0,01	1,91	0,57	0,01	2,50	0,58	0,01	2,47
GP12	0,47	0,01	2,05	0,46	0,01	2,35	0,44	0,01	1,90	0,46	0,02	3,30
GP13	0,21	0,01	3,05	0,20	0,01	6,56	0,20	0,01	4,11	0,20	0,01	4,77
GP14	11,50	0,10	0,90	11,56	0,12	1,06	11,42	0,16	1,39	11,49	0,13	1,17

GP15	1,44	0,01	0,86	1,40	0,04	2,60	1,32	0,05	3,93	1,39	0,06	4,60
GP16	2,57	0,02	0,59	2,52	0,02	0,90	2,57	0,03	1,18	2,55	0,03	1,26
GP17	0,87	0,02	2,39	0,75	0,04	4,68	0,66	0,03	5,16	0,76	0,09	12,06
GP18	6,82	0,04	0,60	6,59	0,08	1,26	6,25	0,14	2,26	6,55	0,26	3,92
GP19	2,00	0,04	1,80	1,83	0,06	3,49	1,55	0,11	7,39	1,79	0,20	11,31
GP20	0,39	0,03	8,15	0,32	0,03	9,13	0,25	0,03	13,57	0,32	0,06	19,64
GP21	0,83	0,03	4,10	0,67	0,04	6,68	0,52	0,05	10,40	0,68	0,14	20,29
GP22	0,11	0,00	3,97	0,10	0,00	4,41	0,08	0,01	9,18	0,10	0,02	15,74
GP23	1,69	0,02	1,09	1,60	0,03	1,92	1,36	0,07	4,83	1,55	0,15	9,77
GP24	1,80	0,02	0,96	1,67	0,06	3,30	1,42	0,11	7,61	1,63	0,18	10,78
	Standard br. 3											
	Ponovljivost									Reproducibilnost		
	t_0			t_1			t_2					
	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV			
GP1	0,14	0,01	7,05	0,14	0,01	8,27	0,14	0,01	3,66	0,14	0,01	6,72
GP2	0,74	0,02	2,68	0,73	0,02	2,45	0,75	0,02	2,70	0,74	0,02	2,77
GP3	0,11	0,01	9,90	0,12	0,02	20,43	0,12	0,01	11,85	0,12	0,02	14,75
GP4	23,69	0,26	1,09	24,01	0,28	1,15	25,18	0,32	1,29	24,29	0,71	2,91
GP5	0,15	0,01	4,46	0,14	0,01	4,27	0,13	0,01	7,04	0,14	0,01	7,32
GP6	4,97	0,04	0,80	5,01	0,05	1,01	5,13	0,04	0,77	5,04	0,08	1,58
GP7	0,31	0,01	2,15	0,30	0,00	1,34	0,30	0,01	2,71	0,30	0,01	2,16
GP8	18,36	0,15	0,81	18,60	0,15	0,81	18,84	0,16	0,88	18,60	0,25	1,34
GP9	10,19	0,11	1,05	10,37	0,08	0,80	10,82	0,09	0,81	10,46	0,29	2,73
GP10	4,43	0,03	0,70	4,49	0,02	0,51	4,39	0,04	0,84	4,44	0,05	1,15
GP11	0,70	0,01	1,61	0,70	0,01	1,16	0,68	0,01	1,67	0,69	0,02	2,19
GP12	0,59	0,01	1,50	0,57	0,01	1,46	0,55	0,01	2,71	0,57	0,02	3,48
GP13	0,21	0,01	4,70	0,21	0,01	2,65	0,19	0,02	8,14	0,20	0,01	6,78
GP14	13,36	0,10	0,75	13,53	0,12	0,86	13,32	0,19	1,44	13,40	0,16	1,23
GP15	1,89	0,04	2,23	1,88	0,03	1,86	1,68	0,06	3,62	1,82	0,11	5,86
GP16	2,34	0,02	1,03	2,33	0,02	0,88	2,37	0,03	1,10	2,35	0,03	1,16
GP17	1,02	0,03	3,38	0,92	0,02	2,54	0,82	0,02	2,95	0,92	0,09	9,57
GP18	8,05	0,12	1,43	7,80	0,13	1,66	7,48	0,11	1,41	7,77	0,26	3,40
GP19	2,95	0,11	3,74	2,84	0,10	3,42	2,41	0,09	3,88	2,73	0,26	9,42
GP20	0,35	0,04	10,75	0,31	0,03	8,43	0,24	0,02	9,87	0,30	0,05	17,93
GP21	0,82	0,04	4,40	0,66	0,03	4,12	0,58	0,02	3,89	0,69	0,11	15,72
GP22	0,14	0,01	5,78	0,13	0,01	6,19	0,11	0,01	4,93	0,13	0,01	10,69
GP23	2,28	0,05	2,39	2,14	0,07	3,40	1,94	0,06	2,93	2,12	0,16	7,33
GP24	2,20	0,11	4,80	2,06	0,10	4,97	1,83	0,09	5,14	2,03	0,18	9,06

Tablica 5. Deskriptivna analiza N-glikana IgG-a analiziranih xCGE-LIF metodom svakog od tri biološka uzorka (svaki u osam tehničkih replikata) u trima vremenskim točkama (t_0 , t_1 i t_2). \bar{x} – srednja vrijednost udjela površine pojedinog elektroferotskog vrška u ukupnoj površini svih vršaka u elektroferogramu, σ – standardna devijacija tog udjela, CV – koeficijent varijacije. Sve tri vrijednosti izražene su u postocima (%). Ako je vrijednost koeficijenta varijacije između 7 i 15%, naglašen je žutom bojom, a ako je veći od 15%, crvenom.

	Standard br. 1											
	Ponovljivost									Reproducibilnost		
	t_0			t_1			t_2					
	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV
P1	0,38	0,03	7,02	0,33	0,02	4,78	0,33	0,02	6,78	0,35	0,03	8,79
P2	0,11	0,01	6,07	0,13	0,02	14,21	0,11	0,01	8,35	0,12	0,01	12,09
P3	1,98	0,09	4,62	2,13	0,06	2,97	2,19	0,11	4,84	2,10	0,12	5,80
P4	1,46	0,06	3,93	1,58	0,05	3,03	1,64	0,07	4,19	1,56	0,09	5,98
P5	0,13	0,01	4,00	0,14	0,01	4,15	0,14	0,01	5,97	0,13	0,01	5,91
P6	0,06	0,00	6,00	0,06	0,01	14,47	0,06	0,01	14,76	0,06	0,01	12,75
P7	0,33	0,01	3,34	0,35	0,02	5,90	0,33	0,02	6,63	0,33	0,02	5,99
P8	2,09	0,05	2,63	2,16	0,03	1,51	2,17	0,08	3,74	2,14	0,07	3,15
P9	0,21	0,00	1,95	0,22	0,01	2,43	0,22	0,01	3,37	0,22	0,01	3,08
P10	0,76	0,03	3,37	0,70	0,03	3,80	0,71	0,03	4,11	0,72	0,04	5,41
P11	0,25	0,01	3,08	0,26	0,02	6,75	0,26	0,04	14,44	0,25	0,02	9,07
P12	9,74	0,17	1,76	10,06	0,19	1,86	10,16	0,22	2,18	9,98	0,26	2,60
P13	0,21	0,01	3,68	0,23	0,03	13,41	0,18	0,01	6,92	0,21	0,03	12,64
P14	2,56	0,05	1,77	2,63	0,06	2,42	2,71	0,09	3,14	2,63	0,09	3,34
P15	0,35	0,02	5,85	0,59	0,11	18,24	0,34	0,02	6,22	0,43	0,13	31,42
P16	19,23	0,18	0,91	18,48	0,40	2,17	18,64	0,55	2,97	18,79	0,51	2,70
P17	0,58	0,01	2,23	0,55	0,01	1,71	0,52	0,01	1,73	0,55	0,03	5,14
P18	0,30	0,01	2,98	0,30	0,01	3,57	0,27	0,02	7,97	0,29	0,02	6,56
P19	2,65	0,02	0,70	2,60	0,04	1,46	2,60	0,04	1,65	2,62	0,04	1,56
P20	0,16	0,01	4,51	0,14	0,01	6,55	0,16	0,01	9,20	0,15	0,01	8,60
P21	0,26	0,01	3,71	0,51	0,12	22,51	0,24	0,03	12,90	0,34	0,14	42,24
P22	20,88	0,13	0,64	20,50	0,17	0,83	20,68	0,18	0,85	20,69	0,22	1,09
P23	10,47	0,09	0,86	10,51	0,03	0,27	10,47	0,11	1,03	10,48	0,08	0,76
P24	4,30	0,04	1,00	4,25	0,03	0,62	4,23	0,06	1,47	4,26	0,05	1,22
P25	0,51	0,02	3,10	0,53	0,01	2,54	0,52	0,02	3,49	0,52	0,02	3,26
P26	0,18	0,01	3,20	0,17	0,01	5,64	0,17	0,02	11,35	0,18	0,01	7,24
P27	18,25	0,25	1,39	18,29	0,27	1,46	18,34	0,32	1,74	18,29	0,27	1,47
P28	1,59	0,06	3,67	1,60	0,03	1,82	1,62	0,09	5,67	1,60	0,06	3,84
	Standard br. 2											
	Ponovljivost									Reproducibilnost		
	t_0			t_1			t_2					
	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV
P1	0,46	0,04	7,86	0,35	0,02	5,89	0,37	0,05	12,69	0,39	0,06	15,56
P2	0,12	0,01	11,78	0,11	0,01	7,33	0,11	0,01	7,41	0,11	0,01	10,06
P3	1,22	0,05	3,83	1,28	0,04	2,99	1,27	0,05	3,72	1,26	0,05	4,08
P4	1,46	0,06	4,03	1,53	0,06	3,62	1,52	0,06	4,16	1,50	0,07	4,33
P5	0,17	0,00	2,84	0,19	0,01	3,78	0,18	0,01	3,69	0,18	0,01	5,10
P6	0,07	0,01	14,91	0,05	0,01	15,31	0,06	0,01	13,32	0,06	0,01	17,99
P7	0,34	0,03	8,51	0,33	0,01	4,09	0,33	0,01	4,39	0,33	0,02	6,02
P8	1,69	0,05	2,67	1,73	0,02	1,43	1,75	0,04	2,17	1,72	0,04	2,42
P9	0,23	0,01	3,04	0,24	0,00	2,03	0,23	0,01	2,24	0,23	0,01	2,62
P10	0,72	0,04	6,00	0,62	0,02	3,70	0,62	0,03	5,03	0,65	0,06	8,60

P11	0,28	0,02	5,73	0,29	0,01	4,17	0,27	0,01	5,08	0,28	0,02	5,47
P12	5,98	0,14	2,26	6,14	0,13	2,12	6,11	0,13	2,10	6,08	0,14	2,39
P13	0,31	0,01	3,09	0,26	0,02	9,30	0,24	0,02	7,08	0,27	0,03	12,26
P14	2,79	0,05	1,94	2,87	0,09	3,16	2,85	0,06	2,17	2,84	0,08	2,70
P15	0,50	0,04	7,36	0,89	0,07	8,39	0,48	0,02	4,49	0,62	0,20	31,78
P16	25,94	0,46	1,77	24,61	0,50	2,05	25,69	0,36	1,42	25,41	0,73	2,87
P17	0,52	0,02	3,95	0,49	0,03	6,18	0,47	0,01	1,63	0,49	0,03	5,62
P18	0,37	0,01	2,94	0,44	0,01	2,47	0,35	0,01	1,43	0,39	0,04	9,53
P19	4,43	0,03	0,60	4,45	0,07	1,46	4,45	0,02	0,48	4,44	0,04	0,93
P20	0,21	0,01	6,44	0,18	0,01	5,12	0,19	0,00	2,47	0,19	0,02	8,78
P21	0,33	0,03	9,50	0,67	0,06	8,92	0,32	0,02	5,92	0,44	0,17	38,28
P22	20,99	0,14	0,67	20,94	0,11	0,51	21,14	0,08	0,36	21,02	0,14	0,65
P23	10,41	0,08	0,81	10,52	0,08	0,76	10,51	0,05	0,43	10,48	0,09	0,82
P24	4,80	0,07	1,46	4,88	0,05	0,98	4,78	0,02	0,45	4,82	0,07	1,35
P25	0,67	0,02	3,13	0,68	0,02	2,92	0,65	0,01	1,90	0,67	0,02	3,13
P26	0,20	0,03	14,22	0,19	0,01	4,54	0,19	0,01	3,38	0,19	0,02	8,81
P27	13,14	0,26	1,98	13,37	0,26	1,95	13,23	0,13	1,01	13,25	0,24	1,79
P28	1,65	0,08	5,10	1,71	0,05	2,83	1,63	0,03	1,64	1,66	0,06	3,85
Standard br. 3												
Ponovljivost										Reproducibilnost		
t₀			t₁			t₂						
	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV
P1	0,37	0,02	5,66	0,35	0,03	9,66	0,29	0,02	6,43	0,34	0,04	13,30
P2	0,16	0,10	64,23	0,17	0,02	9,16	0,13	0,01	4,29	0,16	0,06	39,22
P3	1,67	0,06	3,57	1,87	0,04	2,14	1,71	0,07	4,07	1,75	0,10	5,72
P4	1,83	0,06	3,54	2,07	0,10	4,96	1,87	0,07	3,99	1,93	0,13	6,79
P5	0,15	0,01	4,74	0,17	0,02	13,03	0,15	0,01	4,61	0,16	0,02	12,17
P6	0,06	0,00	8,05	0,09	0,04	48,84	0,05	0,01	14,14	0,07	0,03	47,27
P7	0,32	0,08	26,27	0,37	0,07	17,87	0,27	0,02	8,59	0,32	0,07	22,37
P8	1,51	0,03	1,89	1,57	0,03	2,04	1,53	0,03	2,11	1,53	0,04	2,53
P9	0,27	0,01	3,44	0,29	0,02	6,83	0,26	0,01	1,96	0,27	0,02	6,46
P10	0,82	0,03	3,07	0,80	0,04	4,67	0,75	0,02	3,02	0,79	0,04	5,26
P11	0,33	0,01	4,00	0,38	0,05	12,70	0,33	0,01	3,89	0,35	0,04	10,56
P12	7,15	0,10	1,45	7,40	0,11	1,53	7,26	0,13	1,73	7,27	0,15	2,05
P13	0,44	0,01	2,29	0,37	0,07	17,82	0,35	0,02	4,98	0,39	0,06	14,35
P14	3,98	0,08	1,99	4,28	0,12	2,85	4,15	0,10	2,52	4,14	0,16	3,81
P15	0,49	0,03	6,21	0,81	0,08	9,29	0,52	0,01	2,46	0,61	0,15	25,50
P16	22,98	0,23	0,98	21,70	0,41	1,89	22,68	0,26	1,14	22,47	0,64	2,86
P17	0,53	0,01	1,81	0,50	0,03	5,93	0,47	0,01	2,52	0,50	0,03	5,99
P18	0,32	0,01	2,19	0,37	0,03	9,57	0,31	0,01	2,29	0,33	0,03	9,85
P19	4,08	0,02	0,49	4,00	0,05	1,28	4,05	0,03	0,74	4,05	0,05	1,20
P20	0,21	0,01	5,51	0,20	0,03	15,42	0,19	0,01	2,84	0,20	0,02	9,70
P21	0,32	0,02	5,05	0,53	0,05	8,91	0,34	0,01	3,34	0,40	0,10	26,47
P22	17,89	0,13	0,71	17,56	0,16	0,92	17,88	0,10	0,57	17,77	0,20	1,11
P23	10,70	0,08	0,71	10,64	0,10	0,94	10,86	0,05	0,43	10,73	0,12	1,14
P24	4,85	0,05	0,98	4,83	0,05	1,04	4,79	0,03	0,69	4,82	0,05	1,01
P25	0,76	0,01	1,78	0,78	0,03	3,73	0,76	0,01	1,65	0,77	0,02	2,91
P26	0,23	0,01	3,92	0,24	0,02	9,46	0,23	0,01	2,80	0,23	0,02	6,75
P27	15,23	0,23	1,53	15,20	0,21	1,36	15,40	0,20	1,32	15,26	0,23	1,50
P28	2,37	0,05	2,08	2,46	0,04	1,72	2,44	0,07	2,84	2,42	0,07	2,76

4.2. Ponovljivost i reproducibilnost HILIC-UPLC i xCGE-LIF metoda u pripremi i analizi N-glikana proteina plazme

Detaljan prikaz ponovljivosti i reproducibilnosti HILIC-UPLC metode u pripremi i analizi N-glikana proteina plazme dan je u **Tablici 6.**, dok su vrijednosti dobivene xCGE-LIF metodom prikazane u **Tablice 7.** Iz **Tablice 6.** vidljivo je da svi standardi pokazuju odličnu ponovljivost kroz sve vremenske točke te je maksimalno 5 od 39 kromatografskih vršaka imalo vrijednosti između 7-15%. Također, radilo se o vršcima manje zastupljenosti (manje od 1%). Među tim vršcima izdvajaju se oni od GP36 do GP39 koji pokazuju najčešće i najveće varijacije CV vrijednosti, a radi se o glikanskim strukturama koje sadrže čak četiri sijalinske kiseline. Primjerice, vršak GP39 (zastupljenost $0,75\% \pm 0,05\%$) standarda br. 3 (t_1) pokazuje CV vrijednost 10,72%. Nadalje, GP21 (zastupljenost $0,39\% \pm 0,01\%$) istog standarda u t_2 pokazuje CV vrijednost 11,34% što je najveći CV varijacije na analizi N-glikana krvne plazme ovom metodom. Niti jedan vršak ne pokazuje CV vrijednost veću od 15%.

Reproducibilnost HILIC-UPLC u pripremi i analizi N-glikana proteina plazme kroz zadani vremenski period je također odlična te je najviše 9 od 39 vršaka imalo CV vrijednost između 7 i 15% te niti jedan veću od 15%. Opet su najčešće varijacije kod struktura koje sadrže visoko sijalinizirane glikane, od GP36 do GP39, ili su slabo zastupljene.

Ponovljivost xCGE-LIF metode u pripremi i analizi N-glikana proteina plazme (**Tablica 7.**) u pojedinoj vremenskoj točki za sve standarde lošija je u odnosu na HILIC-UPLC metodu. Postoji više vršaka čije se CV vrijednosti kreću između 7 i 15% te nekoliko čije su vrijednosti i veće. Najmanje 21 od 49 elektroforetskih vršaka ima CV vrijednost manju od 7%, što je bilo izraženo kod standarda br. 2 u vremenskoj točki t_0 . Najviše 16 od 49 vršaka pokazuje CV vrijednost između 7 i 15% (standard br. 3 u t_1) i čak 11 vršaka može pokazati CV vrijednost iznad 15% (standard br. 2 u t_0). Ponovljivost u preostalim vremenskim točkama pojedinog standarda bila je daleko bolja. Najveću zabilježenu CV vrijednost od 28,32% ima vršak P33 (zastupljenost $0,47\% \pm 0,13\%$) standarda br. 2 u točki t_0 . Glikanske strukture u pojedinim vršcima koji su među najzastupljenijima također mogu pokazati relativno velike CV vrijednosti poput vrška P4 (zastupljenost $15,69\% \pm 1,83\%$) kod standarda br. 2 (t_0) čija je CV vrijednost 11,67%.

Reproducibilnost xCGE-LIF metode u pripremi i analizi N-glikana pojedinog standarda krvne plazme također je lošija u odnosu na HILIC-UPLC. Najmanje 10 od 49 elektroforetskih vršaka pokazuje CV vrijednost ispod 7% (standard br. 2), dok čak 24 elektroforetska vrška mogu pokazati CV vrijednost između 7 i 15% (standard br. 2 i 3), a čak

11 vršaka standarda br. 2 mogu pokazati CV vrijednost iznad 15%. Najveću CV vrijednost pokazuje vršak P22 (zastupljenost $0,45\% \pm 0,10\%$) i iznosi 21,96%. U pravilu, najmanje zastupljene glikanske strukture pokazuju najveću CV vrijednost, iako postoji izuzetak poput vršak P4 (zastupljenost $16,92\% \pm 1,68\%$) s CV vrijednošću 9,95%.

Tablica 6. Deskriptivna analiza N-glikana proteina plazme HILIC-UPLC metodom svakog od tri biološka uzorka (svaki u osam tehničkih replikata) u trima vremenskim točkama (t_0 , t_1 i t_2). \bar{x} – srednja vrijednost udjela površine pojedinog kromatografskog vrška u ukupnoj površini svih vršaka u kromatogramu , σ – standardna devijacija tog udjela, CV – koeficijent varijacije. Sve tri vrijednosti su izražene u postocima (%). Ako je koeficijent varijacije između 7 i 15%, naglašen je žutom bojom, a ako je veći od 15%, crvenom.

	Standard br. 1											
	Ponovljivost									Reproducibilnost		
	t_0			t_1			t_2			\bar{x}	σ	CV
	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV			
GP1	6,17	0,04	0,70	6,60	0,09	1,29	6,41	0,03	0,47	6,40	0,19	2,94
GP2	1,77	0,01	0,69	1,79	0,01	0,57	1,77	0,01	0,63	1,78	0,01	0,76
GP3	0,09	0,00	2,15	0,09	0,00	2,85	0,09	0,00	2,53	0,09	0,00	3,56
GP4	6,26	0,05	0,84	6,67	0,08	1,23	6,52	0,04	0,56	6,49	0,18	2,80
GP5	3,16	0,02	0,57	3,37	0,06	1,64	3,27	0,02	0,68	3,26	0,09	2,86
GP6	1,32	0,03	2,01	1,41	0,02	1,39	1,36	0,01	1,06	1,36	0,04	3,09
GP7	1,02	0,01	0,89	0,95	0,01	1,22	1,00	0,01	1,04	0,99	0,03	3,07
GP8	1,11	0,03	2,87	0,91	0,01	1,43	0,91	0,01	1,58	0,97	0,10	9,90
GP9	0,09	0,00	2,95	0,08	0,00	4,79	0,08	0,00	2,62	0,08	0,01	6,82
GP10	5,69	0,05	0,84	5,91	0,08	1,31	5,70	0,03	0,53	5,77	0,11	1,96
GP11	0,92	0,01	1,08	0,96	0,02	1,58	0,99	0,02	2,09	0,96	0,03	3,16
GP12	0,90	0,02	2,74	0,84	0,03	3,90	0,86	0,02	2,02	0,87	0,03	3,93
GP13	1,09	0,02	1,66	1,13	0,02	2,19	1,11	0,02	1,57	1,11	0,03	2,29
GP14	10,85	0,16	1,51	9,48	0,09	0,99	9,88	0,09	0,94	10,07	0,60	5,94
GP15	0,37	0,00	1,32	0,36	0,01	1,68	0,34	0,01	2,17	0,35	0,02	4,27
GP16	7,17	0,04	0,51	7,45	0,09	1,15	7,27	0,05	0,65	7,30	0,13	1,79
GP17	1,96	0,01	0,46	2,04	0,02	0,96	1,99	0,01	0,67	1,99	0,03	1,73
GP18	3,02	0,01	0,46	2,92	0,03	1,16	3,19	0,04	1,19	3,05	0,12	3,88
GP19	0,93	0,01	0,93	0,94	0,01	0,69	0,76	0,03	4,52	0,88	0,09	10,20
GP20	23,73	0,09	0,37	23,13	0,15	0,64	23,99	0,17	0,71	23,62	0,39	1,65
GP21	0,44	0,02	3,68	0,39	0,02	5,59	0,36	0,03	8,72	0,40	0,04	9,52
GP22	5,70	0,06	0,99	6,10	0,06	0,96	6,06	0,05	0,83	5,95	0,19	3,19
GP23	2,76	0,02	0,67	2,97	0,02	0,76	2,96	0,03	1,04	2,90	0,10	3,43
GP24	1,12	0,03	2,26	1,05	0,02	2,05	0,98	0,03	3,37	1,05	0,07	6,33
GP25	0,27	0,01	4,77	0,25	0,01	3,12	0,27	0,01	4,07	0,26	0,02	5,92
GP26	1,24	0,02	1,44	1,12	0,02	1,44	1,13	0,02	1,81	1,16	0,06	5,29
GP27	0,52	0,01	2,24	0,48	0,01	2,16	0,47	0,01	2,72	0,49	0,03	5,55
GP28	0,56	0,01	1,78	0,56	0,01	1,45	0,55	0,01	2,67	0,56	0,01	1,98
GP29	0,20	0,00	1,67	0,19	0,01	5,25	0,19	0,01	4,46	0,19	0,01	4,22
GP30	3,80	0,10	2,68	3,97	0,05	1,24	3,81	0,11	2,83	3,86	0,12	3,04
GP31	0,35	0,01	1,51	0,37	0,01	1,80	0,36	0,01	2,98	0,36	0,01	3,14
GP32	0,96	0,02	2,22	0,95	0,02	1,94	0,97	0,02	2,49	0,96	0,02	2,39
GP33	1,85	0,07	3,65	1,89	0,03	1,65	1,83	0,06	3,28	1,86	0,06	3,20
GP34	0,28	0,01	2,58	0,29	0,01	3,99	0,29	0,01	4,23	0,29	0,01	4,11
GP35	0,23	0,01	2,30	0,23	0,01	4,61	0,23	0,01	3,94	0,23	0,01	3,63
GP36	0,40	0,02	5,12	0,37	0,02	4,84	0,36	0,03	7,57	0,38	0,03	7,25
GP37	0,40	0,02	6,10	0,43	0,01	2,94	0,40	0,03	8,58	0,41	0,03	7,00
GP38	0,76	0,05	6,64	0,81	0,03	3,75	0,76	0,06	7,76	0,78	0,05	6,64
GP39	0,53	0,04	7,38	0,57	0,04	7,36	0,54	0,05	9,24	0,55	0,04	8,19

	Standard br. 2											
	Ponovljivost									Reproducibilnost		
	t ₀			t ₁			t ₂			x̄	σ	CV
	x̄	σ	CV	x̄	σ	CV	x̄	σ	CV			
GP1	6,01	0,05	0,85	6,48	0,08	1,30	6,21	0,04	0,72	6,24	0,21	0,00
GP2	2,15	0,02	0,71	2,15	0,02	0,95	2,19	0,03	1,25	2,16	0,03	1,23
GP3	0,08	0,00	3,04	0,08	0,00	2,10	0,08	0,00	1,91	0,08	0,00	2,98
GP4	4,75	0,03	0,54	5,07	0,07	1,41	4,94	0,03	0,52	4,92	0,14	2,94
GP5	2,26	0,03	1,29	2,43	0,03	1,29	2,33	0,03	1,31	2,34	0,08	3,28
GP6	1,31	0,01	0,65	1,39	0,02	1,70	1,36	0,01	1,00	1,35	0,04	2,65
GP7	1,41	0,01	0,76	1,33	0,01	0,77	1,41	0,02	1,32	1,38	0,04	2,90
GP8	0,97	0,02	1,89	0,77	0,01	1,35	0,79	0,03	3,47	0,84	0,09	11,06
GP9	0,10	0,00	3,76	0,10	0,00	2,14	0,10	0,00	3,01	0,10	0,00	3,96
GP10	3,26	0,03	0,93	3,41	0,05	1,35	3,27	0,02	0,51	3,31	0,08	2,33
GP11	1,09	0,02	1,55	1,09	0,02	1,58	1,11	0,01	1,18	1,10	0,02	1,86
GP12	0,97	0,01	1,38	0,88	0,02	1,85	0,88	0,02	2,60	0,91	0,05	4,97
GP13	0,71	0,01	1,41	0,77	0,01	1,70	0,78	0,02	2,95	0,75	0,04	4,68
GP14	11,27	0,13	1,15	9,87	0,05	0,49	10,40	0,17	1,67	10,51	0,60	5,72
GP15	0,40	0,01	2,18	0,39	0,01	1,70	0,37	0,01	2,33	0,39	0,01	3,66
GP16	4,66	0,02	0,47	4,80	0,05	0,98	4,76	0,02	0,50	4,74	0,07	1,46
GP17	2,58	0,02	0,72	2,72	0,02	0,87	2,68	0,01	0,37	2,66	0,07	2,44
GP18	3,08	0,03	1,10	3,03	0,02	0,64	3,22	0,04	1,21	3,11	0,09	2,81
GP19	1,13	0,01	1,17	1,17	0,02	1,65	1,06	0,02	2,14	1,12	0,05	4,39
GP20	27,10	0,28	1,02	26,61	0,20	0,77	27,66	0,20	0,73	27,12	0,49	1,81
GP21	0,50	0,01	2,39	0,52	0,01	2,65	0,49	0,04	9,21	0,50	0,03	6,14
GP22	3,71	0,03	0,70	3,87	0,04	1,03	3,94	0,03	0,81	3,84	0,10	2,69
GP23	2,01	0,03	1,42	2,16	0,02	0,97	2,14	0,02	1,15	2,10	0,07	3,49
GP24	1,21	0,02	1,67	1,11	0,03	2,37	1,05	0,02	1,63	1,12	0,07	6,29
GP25	0,25	0,01	5,38	0,23	0,01	2,66	0,26	0,01	4,80	0,25	0,01	5,81
GP26	1,44	0,01	0,80	1,30	0,02	1,37	1,31	0,02	1,34	1,35	0,07	5,12
GP27	1,12	0,02	2,02	1,03	0,02	2,32	0,98	0,02	2,17	1,04	0,07	6,28
GP28	0,56	0,01	1,66	0,56	0,01	1,81	0,55	0,01	1,75	0,56	0,01	1,83
GP29	0,15	0,01	3,47	0,14	0,01	4,50	0,15	0,01	3,73	0,15	0,01	4,85
GP30	4,32	0,07	1,61	4,51	0,10	2,20	4,25	0,11	2,51	4,36	0,14	3,32
GP31	0,34	0,01	2,41	0,36	0,01	2,02	0,36	0,01	1,40	0,35	0,01	2,94
GP32	1,58	0,02	1,33	1,62	0,04	2,33	1,60	0,03	2,01	1,60	0,03	2,05
GP33	4,18	0,09	2,15	4,45	0,12	2,59	4,15	0,14	3,27	4,26	0,17	4,08
GP34	0,32	0,01	4,45	0,34	0,01	2,64	0,33	0,01	2,28	0,33	0,01	4,03
GP35	0,45	0,01	1,38	0,47	0,01	1,80	0,46	0,01	1,99	0,46	0,01	2,40
GP36	0,47	0,02	4,92	0,45	0,03	6,20	0,41	0,02	5,44	0,44	0,04	7,98
GP37	0,36	0,02	6,44	0,39	0,02	5,81	0,34	0,03	7,68	0,36	0,03	8,87
GP38	0,84	0,05	5,47	0,91	0,05	5,98	0,78	0,06	8,03	0,84	0,08	9,21
GP39	0,91	0,06	6,45	1,04	0,06	6,18	0,86	0,07	7,60	0,94	0,10	10,46

	Standard br. 3											
	Ponovljivost									Reproducibilnost		
	t ₀			t ₁			t ₂			x̄	σ	CV
	x̄	σ	CV	x̄	σ	CV	x̄	σ	CV			
GP1	6,85	0,12	1,74	7,33	0,08	1,06	6,87	0,10	1,41	7,01	0,25	3,49
GP2	2,24	0,02	0,97	2,29	0,02	1,02	2,25	0,01	0,66	2,26	0,03	1,27
GP3	0,09	0,00	1,79	0,09	0,00	1,73	0,08	0,00	2,22	0,09	0,00	3,07
GP4	5,21	0,07	1,37	5,54	0,07	1,23	5,29	0,05	0,95	5,35	0,16	2,98
GP5	3,01	0,05	1,71	3,21	0,03	1,08	2,99	0,06	1,92	3,07	0,11	3,59
GP6	1,50	0,03	2,02	1,59	0,03	1,68	1,54	0,01	0,91	1,54	0,04	2,91
GP7	1,11	0,00	0,33	1,07	0,01	0,75	1,10	0,01	0,83	1,09	0,02	1,41
GP8	0,93	0,03	2,69	0,77	0,02	2,73	0,79	0,03	3,31	0,83	0,08	9,52
GP9	0,10	0,00	5,02	0,09	0,00	1,82	0,09	0,00	4,24	0,10	0,00	5,03
GP10	4,64	0,05	1,16	4,83	0,06	1,20	4,58	0,05	1,19	4,68	0,12	2,60
GP11	1,09	0,01	1,15	1,11	0,02	1,87	1,13	0,01	1,26	1,11	0,02	1,90

GP12	0,97	0,02	2,07	0,91	0,02	2,32	0,89	0,01	1,61	0,93	0,04	4,19
GP13	0,77	0,02	2,10	0,82	0,02	2,60	0,83	0,01	1,40	0,81	0,03	3,68
GP14	10,09	0,14	1,42	8,94	0,09	1,01	9,51	0,15	1,57	9,51	0,50	5,24
GP15	0,34	0,01	2,44	0,33	0,01	2,42	0,31	0,01	2,97	0,33	0,02	4,64
GP16	5,87	0,03	0,55	6,03	0,07	1,22	5,94	0,04	0,65	5,95	0,08	1,42
GP17	2,26	0,01	0,34	2,35	0,01	0,63	2,31	0,01	0,51	2,31	0,04	1,63
GP18	2,83	0,03	1,01	2,78	0,02	0,79	2,96	0,04	1,27	2,86	0,08	2,96
GP19	1,12	0,02	1,65	1,14	0,02	1,48	1,06	0,02	2,07	1,11	0,04	3,48
GP20	23,30	0,20	0,87	22,95	0,18	0,80	24,14	0,27	1,10	23,46	0,55	2,35
GP21	0,39	0,01	2,45	0,35	0,03	7,86	0,32	0,04	11,34	0,35	0,04	11,15
GP22	4,96	0,05	0,97	5,21	0,06	1,12	5,29	0,05	0,97	5,15	0,15	2,99
GP23	2,10	0,02	1,03	2,24	0,03	1,44	2,24	0,02	0,70	2,19	0,07	3,14
GP24	1,45	0,03	2,29	1,30	0,02	1,79	1,29	0,02	1,42	1,35	0,08	5,89
GP25	0,22	0,01	5,95	0,20	0,01	6,29	0,22	0,01	4,77	0,21	0,02	7,32
GP26	1,54	0,02	1,48	1,36	0,02	1,63	1,42	0,02	1,25	1,44	0,08	5,66
GP27	0,95	0,02	2,48	0,84	0,02	2,21	0,82	0,02	2,23	0,87	0,06	7,01
GP28	0,66	0,01	1,51	0,65	0,02	2,35	0,66	0,01	1,06	0,66	0,01	1,75
GP29	0,16	0,01	4,38	0,14	0,01	4,63	0,15	0,01	4,18	0,15	0,01	8,32
GP30	4,53	0,05	1,05	4,66	0,11	2,30	4,47	0,06	1,35	4,55	0,11	2,39
GP31	0,51	0,01	1,93	0,53	0,01	2,48	0,54	0,01	2,35	0,53	0,02	3,05
GP32	1,50	0,02	1,32	1,50	0,05	3,28	1,53	0,03	1,73	1,51	0,04	2,34
GP33	3,60	0,05	1,28	3,78	0,10	2,76	3,57	0,06	1,57	3,65	0,12	3,23
GP34	0,38	0,01	1,74	0,38	0,01	2,81	0,38	0,01	2,92	0,38	0,01	2,45
GP35	0,50	0,01	2,05	0,50	0,01	1,92	0,51	0,01	1,68	0,50	0,01	2,09
GP36	0,44	0,02	4,08	0,41	0,03	6,43	0,38	0,01	3,86	0,41	0,03	7,75
GP37	0,31	0,02	5,79	0,31	0,03	8,69	0,27	0,02	6,15	0,30	0,03	9,28
GP38	0,73	0,03	4,16	0,75	0,06	7,75	0,63	0,04	6,01	0,70	0,07	9,48
GP39	0,75	0,05	6,03	0,75	0,08	10,72	0,63	0,06	8,89	0,71	0,08	11,42

Tablica 7. Deskriptivna analiza N-glikana proteina plazme xCGE-LIF metodom svakog od tri biološka uzorka (svaki u osam tehničkih replikata) u trima vremenskim točkama (t_0 , t_1 i t_2). \bar{x} – srednja vrijednost udjela površine pojedinog vrška u ukupnoj površini svih vršaka u elektroferogramu, σ – standardna devijacija tog udjela, CV – koeficijent varijacije. Sve tri vrijednosti su izražene u postotcima (%). Ako je koeficijent varijacije između 7 i 15%, naglašen je žutom bojom, a ako je veći od 15%, crvenom.

	Standard br. 1											
	Ponovljivost									Reproducibilnost		
	t_0			t_1			t_2			\bar{x}	σ	CV
	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV			
P1	0,66	0,04	5,77	0,68	0,03	4,35	0,75	0,02	3,16	0,70	0,05	6,74
P2	0,21	0,02	9,90	0,22	0,01	3,52	0,23	0,01	5,52	0,22	0,02	8,04
P3	1,60	0,11	6,72	1,68	0,06	3,41	1,84	0,06	3,32	1,71	0,13	7,37
P4	14,41	0,54	3,74	15,06	0,77	5,12	15,73	0,28	1,79	15,06	0,77	5,12
P5	0,86	0,06	7,06	0,93	0,02	2,24	0,97	0,03	3,54	0,92	0,06	6,81
P6	1,67	0,08	4,67	1,76	0,09	5,22	1,81	0,03	1,81	1,74	0,09	5,24
P7	5,19	0,19	3,74	5,22	0,17	3,28	5,80	0,09	1,56	5,40	0,32	5,99
P8	0,15	0,02	11,99	0,16	0,02	11,37	0,15	0,02	15,97	0,15	0,02	12,85
P9	2,71	0,09	3,47	2,66	0,14	5,15	3,01	0,03	1,05	2,80	0,18	6,58
P10	0,29	0,02	5,38	0,28	0,01	4,64	0,25	0,01	5,63	0,27	0,02	8,45
P11	0,81	0,04	5,10	0,76	0,03	3,87	0,87	0,03	3,77	0,81	0,06	6,83
P12	0,24	0,02	7,01	0,28	0,02	6,32	0,26	0,01	5,44	0,26	0,02	8,08
P13	0,11	0,02	16,41	0,14	0,02	15,01	0,10	0,01	14,15	0,12	0,03	21,65
P14	0,44	0,02	5,50	0,45	0,01	3,15	0,45	0,03	5,57	0,45	0,02	4,81
P15	0,31	0,01	2,33	0,32	0,02	4,79	0,35	0,03	8,95	0,33	0,02	7,49
P16	1,11	0,03	3,15	1,15	0,04	3,64	1,05	0,01	0,72	1,10	0,05	4,59
P17	0,91	0,02	1,72	0,93	0,03	3,51	0,89	0,02	2,25	0,91	0,03	3,10
P18	0,63	0,02	2,40	0,70	0,02	3,31	0,57	0,01	1,75	0,63	0,06	8,80
P19	1,75	0,01	0,43	1,74	0,03	1,54	1,76	0,02	0,87	1,75	0,02	1,16
P20	0,50	0,01	2,69	0,52	0,02	4,66	0,47	0,01	2,18	0,50	0,03	5,24
P21	12,05	0,48	3,95	12,52	0,41	3,28	11,24	0,16	1,39	11,94	0,65	5,44
P22	0,49	0,02	5,11	0,53	0,03	4,76	0,42	0,03	7,07	0,48	0,05	11,21
P23	0,51	0,04	8,78	0,47	0,05	10,48	0,47	0,01	3,01	0,48	0,04	8,52
P24	9,44	0,07	0,75	9,53	0,08	0,85	9,43	0,11	1,17	9,47	0,10	1,02
P25	3,61	0,07	2,07	3,52	0,18	5,09	3,54	0,07	1,88	3,56	0,12	3,39
P26	0,67	0,01	1,67	0,66	0,04	5,53	0,66	0,02	2,65	0,66	0,02	3,60
P27	0,25	0,03	10,78	0,25	0,02	8,02	0,23	0,02	6,96	0,24	0,02	9,15
P28	0,38	0,01	2,64	0,38	0,02	4,71	0,35	0,02	4,31	0,37	0,02	5,39
P29	0,87	0,02	1,87	0,87	0,04	4,30	0,90	0,02	2,53	0,88	0,03	3,44
P30	7,90	0,11	1,42	7,36	0,32	4,34	7,52	0,13	1,74	7,59	0,30	4,01
P31	0,37	0,02	5,40	0,37	0,02	4,51	0,32	0,01	3,36	0,35	0,03	8,21
P32	0,20	0,02	7,52	0,21	0,01	6,13	0,20	0,02	9,66	0,20	0,02	8,29
P33	0,26	0,03	12,73	0,25	0,03	10,61	0,23	0,03	12,82	0,25	0,03	13,17
P34	1,36	0,04	2,67	1,29	0,05	4,12	1,30	0,01	1,04	1,32	0,05	3,70
P35	0,18	0,02	10,77	0,18	0,02	8,30	0,14	0,01	6,09	0,17	0,02	14,84
P36	0,19	0,01	6,91	0,17	0,02	9,12	0,17	0,01	6,01	0,18	0,01	8,07
P37	0,22	0,01	4,79	0,24	0,02	6,82	0,20	0,01	5,93	0,22	0,02	9,84
P38	7,86	0,11	1,35	7,45	0,32	4,26	7,76	0,06	0,76	7,69	0,26	3,35
P39	4,24	0,05	1,07	4,05	0,18	4,45	4,14	0,03	0,74	4,15	0,13	3,14
P40	3,83	0,26	6,88	3,75	0,16	4,33	3,34	0,09	2,83	3,64	0,28	7,80
P41	0,55	0,01	1,40	0,55	0,03	5,85	0,53	0,01	2,29	0,54	0,02	3,85
P42	0,16	0,01	8,90	0,16	0,02	10,84	0,14	0,01	8,69	0,15	0,02	10,44
P43	0,13	0,01	4,73	0,15	0,02	14,77	0,12	0,01	10,40	0,14	0,02	13,72

P44	8,45	0,17	2,06	8,20	0,47	5,78	8,15	0,15	1,86	8,27	0,32	3,87
P45	1,28	0,06	5,00	1,24	0,11	8,97	1,19	0,06	4,73	1,24	0,09	7,03
	Standard br. 2											
	Ponovljivost									Reproducibilnost		
	t_0			t_1			t_2					
	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV
P1	0,98	0,16	16,15	1,09	0,11	9,96	1,28	0,05	4,02	1,10	0,18	16,63
P2	0,20	0,04	18,81	0,23	0,03	12,27	0,27	0,01	3,51	0,23	0,04	18,04
P3	1,61	0,28	17,51	1,83	0,15	8,15	2,13	0,08	3,81	1,84	0,30	16,10
P4	15,69	1,83	11,67	16,76	0,53	3,17	18,56	0,45	2,45	16,92	1,68	9,95
P5	2,05	0,37	17,87	2,33	0,23	9,98	2,71	0,09	3,40	2,34	0,39	16,85
P6	1,53	0,22	14,34	1,68	0,06	3,60	1,87	0,03	1,83	1,69	0,19	11,22
P7	2,89	0,31	10,85	3,14	0,12	3,76	3,51	0,08	2,26	3,17	0,32	10,23
P8	0,33	0,05	15,80	0,37	0,03	8,05	0,38	0,02	4,21	0,36	0,05	13,56
P9	2,07	0,21	10,14	2,17	0,17	7,81	2,49	0,05	2,20	2,23	0,25	11,11
P10	0,28	0,04	14,62	0,32	0,09	27,21	0,30	0,01	4,35	0,30	0,05	18,16
P11	0,85	0,10	12,28	0,85	0,08	9,54	0,99	0,02	1,96	0,89	0,12	13,23
P12	0,29	0,02	8,33	0,34	0,02	4,67	0,34	0,01	2,67	0,32	0,03	7,91
P13	0,11	0,02	14,26	0,11	0,01	8,16	0,11	0,01	12,32	0,11	0,01	11,29
P14	0,40	0,04	9,15	0,41	0,02	6,04	0,45	0,02	4,50	0,42	0,04	9,62
P15	0,46	0,01	2,42	0,47	0,03	6,61	0,47	0,02	4,77	0,46	0,04	7,73
P16	1,45	0,05	3,48	1,44	0,09	6,44	1,37	0,02	1,48	1,41	0,10	6,86
P17	0,96	0,02	2,54	1,00	0,06	5,70	0,96	0,01	0,84	0,96	0,06	5,73
P18	0,69	0,02	2,21	0,74	0,04	5,46	0,63	0,01	1,89	0,68	0,05	8,00
P19	2,41	0,03	1,39	2,41	0,11	4,45	2,36	0,02	0,78	2,38	0,10	4,28
P20	0,91	0,03	3,45	0,92	0,06	6,73	0,85	0,01	1,58	0,88	0,07	7,89
P21	13,69	0,95	6,93	13,36	0,31	2,35	12,09	0,16	1,36	12,98	0,93	7,15
P22	0,53	0,03	6,34	0,50	0,07	13,35	0,33	0,05	14,56	0,45	0,10	21,96
P23	0,50	0,03	6,02	0,49	0,03	5,73	0,49	0,02	3,69	0,49	0,03	5,64
P24	6,52	0,10	1,48	6,58	0,16	2,50	6,36	0,04	0,69	6,50	0,16	2,54
P25	4,32	0,08	1,75	4,22	0,10	2,29	4,24	0,04	0,97	4,23	0,15	3,50
P26	0,84	0,02	2,92	0,83	0,03	3,89	0,83	0,01	1,24	0,83	0,04	4,71
P27	0,34	0,02	5,94	0,30	0,02	5,92	0,30	0,02	5,73	0,31	0,03	9,54
P28	0,49	0,01	2,67	0,49	0,02	4,66	0,47	0,01	1,77	0,48	0,02	3,54
P29	1,19	0,04	3,64	1,22	0,03	2,11	1,25	0,03	2,78	1,22	0,05	4,00
P30	8,72	0,49	5,63	8,02	0,36	4,47	8,00	0,12	1,54	8,35	0,68	8,10
P31	0,39	0,06	14,74	0,35	0,01	3,79	0,30	0,01	4,87	0,35	0,05	14,99
P32	0,18	0,03	16,67	0,16	0,02	11,49	0,14	0,02	12,30	0,16	0,03	16,81
P33	0,47	0,13	28,32	0,42	0,02	4,61	0,37	0,03	7,56	0,42	0,09	21,31
P34	2,08	0,19	9,24	1,91	0,03	1,73	1,80	0,04	2,15	1,94	0,17	8,55
P35	0,15	0,01	8,55	0,14	0,00	3,33	0,12	0,01	9,79	0,14	0,01	10,45
P36	0,27	0,01	5,42	0,26	0,01	3,52	0,25	0,01	5,62	0,26	0,02	7,43
P37	0,25	0,02	6,57	0,24	0,01	2,90	0,21	0,01	5,16	0,23	0,02	8,56
P38	6,41	0,16	2,57	6,23	0,36	5,82	6,21	0,08	1,30	6,39	0,55	8,55
P39	3,47	0,11	3,03	3,40	0,23	6,64	3,30	0,04	1,17	3,44	0,30	8,80
P40	4,46	0,87	19,53	3,95	0,21	5,25	3,34	0,12	3,56	3,93	0,68	17,42
P41	0,66	0,03	4,22	0,67	0,01	1,77	0,62	0,02	3,71	0,65	0,03	4,93
P42	0,21	0,04	19,91	0,18	0,01	5,53	0,15	0,02	11,98	0,18	0,04	19,88
P43	0,16	0,03	19,22	0,16	0,01	7,35	0,13	0,02	12,98	0,15	0,03	17,95
P44	5,89	0,43	7,38	5,81	0,38	6,59	5,33	0,12	2,28	5,75	0,55	9,59
P45	1,65	0,25	15,20	1,51	0,04	2,71	1,32	0,07	4,94	1,49	0,20	13,25
	Standard br. 3											
	Ponovljivost									Reproducibilnost		
	t_0			t_1			t_2					
	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV	\bar{x}	σ	CV
P1	0,99	0,09	9,60	1,03	0,09	8,50	1,19	0,03	2,44	1,07	0,12	10,89
P2	0,20	0,02	11,82	0,21	0,02	9,42	0,25	0,01	4,12	0,22	0,03	12,96
P3	1,74	0,17	9,80	1,90	0,16	8,30	2,14	0,04	2,01	1,93	0,21	11,10

P4	13,11	0,87	6,62	13,95	0,53	3,82	14,85	0,26	1,76	13,97	0,93	6,66
P5	1,78	0,17	9,64	1,96	0,13	6,76	2,18	0,05	2,27	1,98	0,21	10,47
P6	1,49	0,12	7,97	1,57	0,07	4,74	1,74	0,04	2,06	1,60	0,13	8,34
P7	4,09	0,27	6,69	4,22	0,27	6,51	4,79	0,06	1,24	4,37	0,38	8,65
P8	0,25	0,04	15,04	0,25	0,01	2,52	0,28	0,01	2,74	0,26	0,03	10,26
P9	2,15	0,13	5,97	2,18	0,12	5,44	2,49	0,03	1,16	2,27	0,18	8,14
P10	0,29	0,04	14,54	0,29	0,02	7,20	0,31	0,03	10,28	0,29	0,03	10,99
P11	0,84	0,06	7,01	0,81	0,06	7,62	0,96	0,04	4,36	0,87	0,08	9,73
P12	0,22	0,02	9,67	0,24	0,02	6,31	0,25	0,02	6,31	0,24	0,02	8,51
P13	0,12	0,02	17,40	0,13	0,01	5,18	0,12	0,01	8,83	0,12	0,01	11,24
P14	0,35	0,02	4,68	0,32	0,01	4,11	0,38	0,02	5,81	0,35	0,03	7,98
P15	0,43	0,01	2,25	0,43	0,03	6,18	0,43	0,01	2,45	0,43	0,02	3,96
P16	1,49	0,03	2,31	1,47	0,08	5,23	1,41	0,02	1,12	1,46	0,06	4,17
P17	1,01	0,02	2,30	1,04	0,06	5,67	1,02	0,02	1,53	1,02	0,04	3,73
P18	0,71	0,01	1,72	0,77	0,05	5,94	0,66	0,01	2,07	0,71	0,05	7,32
P19	2,27	0,02	0,97	2,29	0,07	3,19	2,25	0,01	0,58	2,27	0,04	1,98
P20	0,85	0,01	1,30	0,87	0,05	5,53	0,82	0,02	2,33	0,85	0,04	4,24
P21	11,73	0,31	2,66	11,88	0,26	2,22	10,76	0,07	0,64	11,46	0,56	4,86
P22	0,35	0,03	7,66	0,40	0,03	7,77	0,29	0,03	9,79	0,35	0,05	15,33
P23	0,52	0,03	5,94	0,49	0,02	4,30	0,51	0,02	3,48	0,51	0,03	5,42
P24	7,90	0,05	0,64	8,04	0,11	1,38	7,87	0,06	0,75	7,93	0,11	1,33
P25	3,95	0,04	0,99	3,90	0,05	1,39	3,91	0,03	0,87	3,92	0,05	1,22
P26	0,85	0,01	1,37	0,85	0,03	3,00	0,87	0,02	2,07	0,86	0,02	2,53
P27	0,25	0,02	10,02	0,22	0,01	5,80	0,24	0,02	9,92	0,23	0,02	9,84
P28	0,41	0,01	2,75	0,40	0,01	3,64	0,41	0,02	6,16	0,41	0,02	4,36
P29	0,77	0,02	2,70	0,80	0,03	4,00	0,79	0,03	3,25	0,79	0,03	3,67
P30	9,57	0,43	4,49	8,56	0,43	5,07	8,71	0,12	1,41	8,94	0,57	6,38
P31	0,44	0,03	5,90	0,42	0,02	4,97	0,37	0,02	4,23	0,41	0,03	8,19
P32	0,19	0,03	15,37	0,18	0,02	8,27	0,17	0,02	10,84	0,18	0,02	12,73
P33	0,39	0,05	14,19	0,38	0,01	3,95	0,35	0,02	6,05	0,37	0,04	10,27
P34	2,19	0,11	4,86	2,05	0,08	3,76	1,98	0,03	1,31	2,07	0,12	5,58
P35	0,15	0,02	13,17	0,15	0,01	8,57	0,14	0,01	9,85	0,15	0,02	11,30
P36	0,22	0,01	3,51	0,21	0,01	6,91	0,21	0,01	3,88	0,22	0,01	5,69
P37	0,28	0,01	4,23	0,30	0,01	3,57	0,26	0,01	4,29	0,28	0,02	7,81
P38	6,78	0,20	2,89	6,53	0,36	5,55	6,55	0,07	1,02	6,62	0,26	3,89
P39	4,28	0,12	2,83	4,13	0,19	4,54	4,12	0,05	1,15	4,18	0,15	3,48
P40	4,16	0,37	8,91	4,00	0,22	5,49	3,47	0,08	2,20	3,88	0,38	9,92
P41	0,65	0,02	2,67	0,67	0,03	4,09	0,63	0,02	3,00	0,65	0,03	3,97
P42	0,19	0,01	7,90	0,18	0,01	5,75	0,15	0,01	8,20	0,17	0,02	10,50
P43	0,14	0,02	12,25	0,15	0,01	5,17	0,12	0,02	14,48	0,14	0,02	13,65
P44	7,59	0,35	4,65	7,56	0,33	4,32	7,13	0,17	2,34	7,43	0,35	4,76
P45	1,68	0,12	7,09	1,64	0,08	5,01	1,48	0,05	3,54	1,60	0,12	7,68

5. RASPRAVA

Ispitivanje ponovljivosti određene metode od izuzetne je važnosti tijekom uporabe iste u analizi bioloških (ili drugih) uzoraka, kako bismo sa sigurnošću znali da dobivene vrijednosti udjela pojedinog glikana i moguća posljedična razlika između uzoraka zaista imaju pozadinu u biologiji uzorka, a da nisu posljedice pogreške metoda pripreme i analize. Također, važno je znati koliko je odabrana metoda reproducibilna, kako bismo opetovanim ponavljenjem mjerenja bili u stanju dobiti što podudarnije rezultate. U ovom radu ponovljivosti i reproducibilnost HILIC-UPLC i xCGE-LIF metoda ispitane su na tri biološka standardna uzoraka u osam replikata i tri vremenske točke (svaka u razmaku od tjedan dana).

Na ponovljivost i reproducibilnost pojedine metode utječe svaki korak pripreme i analize uzoraka te unosi određenu varijaciju u konačan rezultat. Iz ovog rada ne može se reći koji od tih koraka unosi najviše varijacije radi samog dizajna eksperimenta. Optimizacijom procesa pripreme uzoraka i analize moguće je poboljšati ponovljivost i reproducibilnost metode, no to može značiti i veće novčane izdatke ili veći utrošak vremena.

HILIC-UPLC analiza N-glikana plazme pokazala je izvanrednu ponovljivost i reproducibilnost u zadanom periodu te neznatno lošiju za N-glikane IgG-a, što je i za očekivati s obzirom da se radi samo o jednom proteinu koji uz to prolazi dodatni korak izolacije tijekom pripreme, što u konačnici utječe na CV vrijednosti. Ponovljivost metode u pripremi N-glikana plazme HILIC-UPLC metodom podudara se s dosad objavljenim rezultatima (Reiding i sur., 2018; Trbojević-Akmačić i sur., 2015) gdje je najmanja opažena varijacija za najveći vršak (GP20) 1,9%, dok su u ovom radu postignute vrijednosti još i bolje. Situacija se podudara i kod xCGE-LIF analize za najveći elektroforetski vršak P4, čija je varijacija u oko 5% (Reiding i sur., 2018), a slične vrijednosti su dobivene i u ovom radu (osim kod standarada br. 1 i 2 u t_0). Dobru ponovljivost u analizi N-glikana IgG-a xCGE-LIF metodom opisali su i Reusch i sur., 2014. Tijekom analize N-glikana plazme xCGE-LIF metodom za potrebe ovog rada, primijećeno je da uzorci nisu u potpunosti odbojani tijekom HILIC-SPE pročišćavanja što bi mogao biti jedan od uzroka lošije ponovljivosti. S obzirom da u literaturi često postoje manje razlike u pripremi uzorka po pitanju potrebnih koraka, odabira kemikalija, njihovih konačnih koncentracija i sl., teško je pronaći podatke o ponovljivosti i reproducibilnosti koji bi u potpunosti odgovarali protokolima navedenima u ovom radu, što je bio jedan od povoda ovakav tip eksperimenta.

Pripremu uzoraka za HILIC-UPLC analizu N-glikana IgG-a bilo bi moguće poboljšati korištenjem većeg volumena uzoraka plazme ili seruma s kojim se kreće u izolaciju IgG-a (što

često nije moguće radi dostupnosti uzorka) ili korištenjem manjeg volumena mravlje kiseline kod elucije IgG-a čime bi se povećala koncentracija i količina IgG-a u daljnjim koracima pripreme. Uporaba veće količine enzime tijekom deglikozilacije skratila bi vrijeme inkubacije te potencijalno povoljno djelovala na ponovljivost, no to znači veće troškove jer su enzimi skupi. Nadalje, povećanjem volumena injektiranja na kromatografsku kolonu poboljšao bi se intezitet uzoraka te smanjile CV vrijednosti pogotovo za manje kromatografske vrške čiji je omjer signala naspram šuma manji u odnosu na zastupljenije strukture.

U pripremi uzoraka za xCGE-LIF analizu deglikozilacija je kraća (3 sata umjesto 18 h kod pripreme za HILIC-UPLC) te bi se mogla dodatno vremenski skratiti, ponovno, dodavanjem više enzima, ali korak koji vjerojatno unosi najveću varijaciju u uzorak je fluorescentno obilježavanje APTS bojom, pogotovo iz razloga što se provodi dugo (16 sati) u kiselim uvjetima što nepovoljno utječe na sijalinizirane strukture. Ubrzanje postupka bojanja moguće je povišenjem temperature reakcijske smjese i korištenjem jačeg reducensa, npr. natrijevog cijanoborohidrida (koji je toksičan za razliku od korištenog 2-pikolin borana), no također treba biti svjestan moguće desijalinizacije (Szabo i sur., 2010). Također, korak čišćenja APTS obilježenih N-glikana proteina plazme trebalo bi dodatno optimirati s obzirom da zaostaje APTS koji se nije uspio odbojati, a koji bi mogao interferirati s elektrokinetičkim injektiranjem tijekom xCGE-LIF analize.

Iako se HILIC-UPLC analiza pokazala pouzdanijom i reproducibilnijom, ne treba isključiti ni xCGE-LIF metodu koja osim što je osjetljivija te može detektirati nekoliko pikomola N-glikana (Reusch i sur., 2014), paralelno može analizirati minimalno četiri uzorka (poput uređaja korištenog za potrebe ovog rada, ABI3130 genetičkog analizatora), a maksimalno čak 96 uzoraka (ABI3730xl genetički sekvencer, Thermo Fisher Scientific, SAD). Obrada velikog broja uzoraka u vrlo kratkom vremenu danas je gotovo imperativ u većini polja molekularne biologije, a pri donošenju odluke o odabiru metode mogu pripomoć i rezultati dobiveni ovim radom. Dodatna prednost xCGE-LIF metode je i nešto bolja separacija glikana gdje je većina vršaka odijeljena do bazne linije, posjeduju dobru simetriju te uglavnom jedan vršak predstavlja signal samo jednog glikana, što često nije slučaj kod HILIC-UPLC metode.

Na temelju rezultata možemo zaključiti da, iako je unutar neke vremenske točke ponovljivost dobra, relativni udjeli pojedine glikanske stukture mogu varirati između vremenskih točaka što najbolje vidimo po CV vrijednostima dobivenima za reproducibilnost metode. Iz tog razloga su dobar dizajn studije, randomizacija uzoraka, praćenje standardnih

procedura te korištenje kemikalija istih ili što sličnijih serijskih brojeva (ukoliko je to moguće) izuzetno važni za pripremu, analizu i u konačnici ispravnu interpretaciju rezultata.

6. ZAKLJUČCI

Za potrebe ispitivanja ponovljivosti i reproducibilnosti metoda pripreme te HILIC-UPLC i xCGE-LIF analize, pripremljena su tri biološka standarda uzorka krvne plazme, u osam replikata i tri vremenske točke. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. HILIC-UPLC metoda je bolje ponovljivosti i reproducibilnosti u analizi N-glikana proteina plazme i IgG-a.
2. xCGE-LIF metoda pruža dobru ponovljivost i reproducibilnost u analizi N-glikana IgG-a, dok za je za pripremu i analizu N-glikana plazme potrebna dodatna optimizacija parametara.
3. xCGE-LIF metoda je osjetljivija, zahtijeva manje početne količine proteina, može analizirati nekoliko pikomolova N-glikana te omogućuje paralelnu analizu i do 96 uzoraka.
4. xCGE-LIF metoda pruža bolju separaciju N-glikana.

7. LITERATURA

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Stanična i molekularna imunologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2018, str. 52-54, 65-68, 88-95.

Aebi M. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2013, 2430-2437.

Almeida A, Kolarich D. The promise of protein glycosylation for personalised medicine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2016, 1860(8), 1583-1595.

Applicability of CIM® Protein G 96-monolithic plate (Pores 2 um) for glycosylation analysis of human IgG isolated from blood, 2018., <https://www.biaseparations.com>, pristupljeno: 4.5.2020.

Bergstrom KS , Xia L. Mucin-type O-glycans and their roles in intestinal homeostasis. *Glycobiology*, 2013, 23(9), 1026–1037.

Bhagavan NV, Ha C. Essentials of Medical Biochemistry with clinical cases. New York, Academic Press, 2015, str. 75.

Bondt A, Wuhrer M, Kuijper TM, Hazes JM, Dolhain RJ. Fab glycosylation of immunoglobulin G does not associate with improvement of rheumatoid arthritis during pregnancy. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18(1), 274-280.

Bondt A, Rombouts Y, Selman MHJ Hensbergen PJ, Reiding KR, Hazes JMW, Dolhain, RJEM, Wuhrer M. Immunoglobulin G (IgG) Fab glycosylation analysis using a new mass spectrometric high-throughput profiling method reveals pregnancy-associated changes. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13(11), 3029-3039.

Clerc F, Reiding KR, Jansen BC, Kammeijer GS, Bondt A, Wuhrer M. Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconj J*, 2016, 33(3), 309–343.

Cooper GM, Hausmann RE. Stanica: molekularni pristup. Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 335-337, 396-416.

Corfield AP. Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2015, 1850(1), 236-252.

Damić M. i Nigović, B. Kapilarna elektroforeza u farmaciji. *Farmaceutski glasnik*, 2010, 66(4), 195-207.

Doherty M, Theodoratou E, Walsh I, Adamczyk B, Stöckman H, Agakov F, Timofeeva M, Trbojević-Akmačić I, Vučković F, Duffy F, McManus CA, Farrington SM, Dunlop MG, Perola M, Lauc G, Campbell H, Rudd PM. Plasma N-glycans in colorectal cancer risk. *Sci Rep*, 2018, 8(1), 1-12.

Dotz V i Wuhrer M. N-glycome signatures in human plasma: associations with physiology and major diseases. *FEBS letters*, 2019, 593(21), 2966-2976.

Dunn-Walters D, Boursier L, Spencer J. Effects of somatic hypermutation on potential N-glycosylation sites in human immunoglobulin heavy chain variable region. *Molecular Immunology*, 2000, 37(3-4), 107-113.

Glycan labeling, 2020., <https://www.sigmaaldrich.com>, pristupljeno: 4.5.2020.

Glycosilation, 2018., <https://www.uniprot.org>, pristupljeno: 10.2.2020.

Glycostore, 2020., <https://glycostore.org>, pristupljeno: 5.5.2020.

Gonzalez-Quintela A, Alende R, Gude F, Campos J, Rey J, Meijide LM, Fernandez-Merino C, Vidal C. Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clin Exp Immunol*, 2008, 151(1), 42-50.

Gornik O, Pavić T, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins - Implications on evolution and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2012, 1820(9), 1318-1326.

Gornik O, Wagner J, Pučić M, Knežević A, Redžić I, Lauc G. Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology*, 2009, 19(12), 1547–1553.

Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers*, 2008, 25(4-5), 267–278.

Gudelj I, Lauc G, Pezer M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cellular immunology*, 2018, 333, 65-79.

Hanić M, Lauc G, Trbojević-Akmačić I. N-glycan analysis by ultra-performance liquid chromatography and capillary gel electrophoreses with fluorescent labeling. *Current Protocols in Protein Science*, 2019, 97(1), e95.

Hennig R, Cajic S, Borowiak M, Hoffmann M, Kottler R, Reichl U, Rapp E. Towards personalized diagnostics via longitudinal study of the human plasma N-glycome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2016, 1860(8), 1728-1738.

Higel F, Seidl A, Sörgel F, Friess W. N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2016, 100, 94-100.

Hirschberg CB, Snider MD. Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem*, 1987, 56, 63–87.

Huffman JE, Pučić-Baković M, Klarić L, Hennig R, Selman MH, Vučković F, Novokmet M, Krištić J, Borowiak M, Muth T, Polašek O, Razdorov G, Gornik O, Plomp R, Theodoratou E, Wright AF, Rudan I, Hayward C, Campbell H, Deelder AM, Reichl U, Aulchenko YS, Rapp E, Wuhler M, Lauc G. Comparative performance of four methods for high-throughput glycosylation analysis of immunoglobulin G in genetic and epidemiological research. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2014, 13(6), 1598-1610.

Huhn C, Selman MH, Ruhaak LR, Deelder AM, Wuhler M. IgG glycosylation analysis. *Proteomics*, 2009, 9(4), 882-913.

Keser T, Pavić T, Lauc G, Gornik O. Comparison of 2-aminobenzamide, procainamide and RapiFluor-MS as derivatizing agents for high-throughput HILIC-UPLC-FLR-MS N-glycan analysis. *Frontiers in chemistry*, 2018, 6, 324-336.

Keser T, Gornik I, Vučković F, Selak N, Pavić T, Lukić E, Gudelj I, Gašparović H, Biočina B, Tilin T, Wennerstörn A, Männistö S, Salomaa V, Havulinna A, Wang W, Wilson JF, Chaturvedi N, Perola M, Campbell H, Lauc G, Gornik O. Increased plasma N-glycome complexity is associated with higher risk of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2017, 60(12), 2352–2360.

Knežević A, Gornik O, Polašek O, Pučić M, Redžić I, Novokmet M, Rudd PM, Wright AF, Campbell H, Rudan I, Lauc G. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology*, 2010, 20(8), 959–969.

Knežević A, Polašek O, Gornik O, Rudan I, Campbell H, Hayward C, Wright A, Kolčić I, O'Donoghue N, Bones J, Rudd PM, Lauc G. Variability, heritability and environmental determinants of human plasma N-glycome. *J Proteome Res*, 2009, 8(2), 694-701.

Krištić J, Lauc G. Ubiquitous Importance of Protein Glycosylation. U: High-Throughput Glycomics and Glycoproteomics. Methods in Molecular Biology. Lauc G, Wuhrer M., urednici, New York, Humana Press, 2017, str. 1-12.

Krištić J, Vučković F, Menni C, Klarić L, Keser T, Beceheli I, Pučić-Baković M, Novokmet M, Mangino M, Thaqi K, Rudan P, Novokmet N, Šarac J, Missoni S, Kolčić I, Polašek O, Rudan I, Campbell H, Hayward C, Aulchenko Y, Valdes A, Wilson JF, Gornik O, Primorac D, Zoldoš V, Spector T, Lauc G. Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2014, 69(7), 779-789.

Lauc G, Pezer M, Rudan I, Campbell H. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2016, 860(8), 1574-1582.

Lauc G, Krištić J, Zoldoš V. Glycans – the third revolution in evolution. *Front. Genet*, 2014, 5, 145.

Lauc G, Huffman JE, Pučić M, Zgaga L, Adamczyk B, Mužinić A, Novokmet M, Polašek O, Gornik O, Krištić J, Keser T, Vitart V, Scheijen B, Uh HW, Molokhia M, Patrick AL, McKeigue P, Kolčić I, Lukić IK, Swann O, van Leeuwen FN, Ruhaak LR, Houwing-Duistermaat JJ, Slagboom PE, Beekman M, de Craen AJ, Deelder AM, Zeng Q, Wang W, Hastie ND, Gyllensten U, Wilson JF, Wuhrer M, Wright AF, Rudd PM, Hayward C, Aulchenko Y, Campbell H, Rudan I. Loci associated with N-glycosylation of human immunoglobulin G show pleiotropy with autoimmune diseases and haematological cancers. *PLoS Genet.*, 2013, 9(1), 1-17.

Lordish H, Kaiser CA, Bretscher A, Amon A, Berk A, Krieger M, Ploegh H, Scott MP, Molecular Cell Biology, New York, W.H. Freeman and Company, 2012., str 38-39.

Maverakis E, Kim K, Shimoda M, Gershwin ME, Patel F, Wilken R, Raychaudhuri S, Ruhaak LR, Lebrilla CB. Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A critical review, *Journal of Autoimmunity*, 2015, 57, 1-13.

Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2012, 13(7), 448–462.

N-linked Glycan Strategies, Glycobiology Analysis Manual 2nd Edition, 2020, <https://www.sigmaaldrich.com>, pristupljeno: 15.2.2020.

Novokmet M, Lukić E, Vučković F, Durić Ž, Keser T, Rajšl K, Remondini D, Castellani G, Gašparović H, Gornik O, Lauc G. Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation. *Sci Rep*, 2014, 4, 1-10.

Pučić M, Mužinić A, Novokmet M, Škledar M, Picav N, Lauc G, Gornik O. Changes in plasma and IgG N-glycome during childhood and adolescence. *Glycobiology*, 2012, 22(7), 975–982.

Pučić M, Knezević A, Vidic J, Adamczyk B, Novokmet M, Polasek O, Gornik O, Supraha-Goreta S, Wormald MR, Redzić I, Campbell H, Wright A, Hastie ND, Wilson JF, Rudan I, Wuhrer M, Rudd PM, Josić Đ, Lauc G. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10(10), 1-15.

Reiding KR, Bondt A, Hennig R, Gardner RA, O’Flaherty R, Trbojević-Akmačić I, Shubhakar A, Hazes JM, Reichl U, Fernandes DL, Pučuć-Baković M, Rapp E, Spencer DIR, Dolhain RJEM, Rudd PM, Lauc G, Wuhrer M. High-throughput Serum N-Glycomics: Method Comparison and Application to Study Rheumatoid Arthritis and Pregnancy-associated Changes. *Mol Cell Proteomics*, 2019, 18(1), 3-15.

Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(6), 346–366.

Reusch D, Habegger M, Kailich T, Heidenreich A, Kampe M, Bulau P, Wuhrer M. High-throughput glycosylation analysis of therapeutic immunoglobulin G by capillary gel electrophoresis using a DNA analyzer. *MAbs*, 2014, 6(1), 185-196.

Rudd P, Karlsson NG, Khoo KH, Packer NH. Glycomics and Glycoproteomics. U: Essentials of Glycobiology. Varki A, Cummings RD, Esko JD i sur., urednici, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015, str. 653-666.

Ruhaak LR, Uh HW, Deelder AM, Dolhain REJM, Wuhrer M. Total plasma N-glycome changes during pregnancy. *J Proteome Res*, 2014, 13(3), 1657–1668.

Ruhaak LR, Hennig R, Huhn C, Borowiak M, Dolhain RJEM, Deelder AM, Rapp E, Wuhler M. Optimized workflow for preparation of APTS-labeled N-glycans allowing high-throughput analysis of human glycomes using 48-channel multiplexed CGE-LIF. *J Proteome Res*, 2010, 9(12), 6655-6664.

Ruhaak LR, Zauner G, Huhn C, Bruggink C, Deelder AM, Wuhler M. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397(8), 3457-3481.

Russell A, Adua E, Ugrina I, Laws S, Wang W. Unravelling Immunoglobulin G Fc N-Glycosylation: A Dynamic Marker Potentiating Predictive, Preventive and Personalised Medicine. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2), 103-121.

Saldova R, Asadi Shehni A, Haakensen VD, Steinfeld I, Kifer I, Helland A, Yakhini Z, Børresen-Dale A, Rudd PM. Association of N-glycosylation with breast carcinoma and systemic features using high-resolution quantitative UPLC. *J Proteome Res*, 2014, 13(5), 2314-2327.

Sanyal S, Menon AK. Specific transbilayer translocation of dolichol-linked oligosaccharides by an endoplasmic reticulum flippase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009, 106(3), 767–772.

Schuster M, Umana P, Ferrara C, Brunker P, Gredes C, Waxenecker G, Wiederkum S, Schwager C, Loibner H, Himmler G, Mudde CG. Improved effector functions of a therapeutic monoclonal Lewis Y-specific antibody by glycoform engineering. *Cancer Res*, 2005, 65(17), 7934-7941.

Seeling M, Brückner C, Nimmerjahn F. Differential antibody glycosylation in autoimmunity: sweet biomarker or modulator of disease activity?. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13(10), 621–630.

Szabo Z, Guttman A, Rejtar T, Karger BL. Improved sample preparation method for glycan analysis of glycoproteins by CE-LIF and CE-MS. *Electrophoresis*, 2010, 31(8), 1389-1395.

Tomana M, Schrohenloher RE, Koopman WJ, Alacron GS, Paul WA. Abnormal glycolysation of serum IgG from patients with chronic inflammatory diseases. *Arthritis Rheumatism*, 1988, 31(3), 333-338.

Trbojević-Akmačić I, Ugrina I, Štambuk J, Gudelj I, Vučković F, Lauc G, Pučić-Baković M. High-throughput glycomics: optimization of sample preparation. *Biochemistry (Mosc)*, 2015, 80(7), 934-942.

Vanhooren V, Desmyter L, Liu XE, Cardelli M, Franseschi C, Federico A, Libert C, Laroy W, Dewaele S, Contreras R, Chen C. N-glycome changes in serum proteins during human aging. *Rejuvenation Res*, 2007, 10(4), 521-531a.

Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology*, 2017, 27(1), 3–49.

Varki A, Gagneux P. Biological Functions of Glycans. U: Essentials of Glycobiology. Varki A, Cummings RD, Esko JD, i sur., urednici, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015, str. 77-88.

Zauner G, Koeleman CA, Deelder AM, Wuhrer M. Protein glycosylation analysis by HILIC-LC-MS of Proteinase K-generated N-and O-glycopeptides. *Journal of separation science*, 2010, 33(6-7), 903-910.

Zauner G, Selman MH, Bondt A, Rombouts Y, Blank D, Deelder AM, Wuhrer M. Glycoproteomic analysis of antibodies. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, 12(4), 856-865.

8. SAŽETAK/SUMMARY

SAŽETAK

Glikani na proteinima imaju značajnu ulogu u međudjelovanju makromolekula, sudjeluju u procesu smatanja i sekrecije proteina te utječu na njihovu stabilnost, vrijeme poluživota i funkciju. Najvažnije svojstvo glikokonjugata je njihova mikroheterogenost, odnosno postojanje različitih glikanskih struktura vezanih na isti protein. Najviše istraživanja je provedeno na N-glikanima te su promatrane promjene u N-glikomu bioloških uzoraka, najčešće krvne plazme ili pojedinačnih proteina poput IgG-a.

Uočene su promjene u N-glikozilaciji u različitim fiziološkim stanjima poput adolescencije, trudnoće i sl., ali i u mnogim bolestima. Napretkom analitičkih metoda, glikani se sve više istražuju kao potencijalni biomarkeri za različite bolesti. Javlja se potreba za razvojem novih metoda za pripremu i analizu N-glikana te unaprjeđivanjem i optimizacijom već postojećih. Metode analize moraju biti visokoprotodne kako bi omogućile analizu velikog broja uzoraka u realnom vremenu. HILIC-UPLC i xCGE-LIF su dvije takve visokoprotodne metode koje se koriste za analizu N-glikana. Korištene su i u ovom radu te je promatrana njihova ponovljivost i reproducibilnost unutar laboratorija na tri različita uzorka standarda. Važno je utvrditi ponovljivost i reproducibilnost metoda, između ostalog, da bi bili sigurni da su uočene razlike između analiziranih uzoraka posljedica same razlike među uzorcima, a ne odraz pogreške metode. Svaki korak metode unosi varijaciju u konačan rezultat.

Analizom dobivenih podataka i usporedbom koeficijenta varijacije (CV) utvrđeno je da su obe metode pouzdane za istraživanje N-glikana proteina plazme i IgG-a. HILIC-UPLC metoda pokazuje bolju ponovljivost i reproducibilnost u usporedbi s xCGE-LIF metodom. S druge strane, xCGE-LIF metoda omogućuje analizu većeg broja uzoraka u određenom vremenskom intervalu, bolje je odjeljivanje vršaka, metoda je osjetljivija te omogućuje analizu na manjoj količini uzorka. Važno je poznavati prednosti i nedostatke korištenih metoda kako bi se odabrala ona optimalna, ovisno o potrebama pojedinog istraživanja.

Optimizacijom svakog koraka u pripremi i analizi uzoraka smanjuju se CV vrijednosti pojedinog vrška što je važno radi ponovljivosti, a kasnije i reproducibilnosti metode. Da bi utjecaj pogreške metode dobivenim rezultatima bio što manji, dobar dizajn studije, nasumična raspodjela uzoraka te praćenje standardnih procedura od iznimne su važnosti za pravilnu interpretaciju rezultata. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se prepoznali koraci koji unose najviše varijacija u metode te istražili načini za još bolju optimizaciju i unaprijeđenje metoda analize.

SUMMARY

Glycans attached to proteins play a significant role in the interaction with other molecules. They also participate in processes like protein folding and secretion. Furthermore, glycans affect protein function, stability and half-life. The most important property of glycoproteins is their microheterogeneity because different glycans can bind to the same glycosylation site on a specific protein resulting in various glycoforms of the protein. Most research has been conducted on N-glycans and changes in N-glycoma of biological samples, such as blood plasma or individual proteins like IgGs.

Changes in N-glycosylation have been observed in various physiological conditions such as adolescence and pregnancy, but also in many diseases. Therefore, an increase in research has been observed for the purpose of detecting biomarkers for various diseases, early diagnosis or prognosis of outcomes and, ultimately, the development of personalized medicine. High-throughput methods are used to manage and analyze a large number of samples in a short period of time. HILIC-UPLC and xCGE-LIF are two such high-throughput methods used to analyze N-glycans. In this paper the repeatability and reproducibility of these two methods are observed on three different standard samples. It is important to determine the repeatability and reproducibility of the methods to ensure that the observed differences between the analyzed samples are indeed a consequence of the difference between the samples and not a reflection of the method error. Each step of the method has a variation that contributes to the final CV value.

After analyzing the obtained data and comparing calculated coefficients of variation (CV values), it was determined that both methods are reliable for study of both plasma protein and IgG N-glycans. HILIC-UPLC method in comparison to xCGE-LIF, shows better repeatability and reproducibility. On the other hand, xCGE-LIF method can analyse larger number of samples in given time. Moreover, xCGE-LIF shows better separation of the peaks, method is more sensitive and can analyse smaller sample quantities. It is useful to know the advantages and disadvantages of each method in order to select the optimal one for each research.

Optimisation of sample preparation can reduce CV values for each peak and influence repeatability and reproducibility of the method. To diminish the impact of a measurement error on obtained results, a good study design, sample randomisation, and following of standard operating procedures are of great importance. Further research is needed to identify the steps that bring the most variation to the methods and to explore ways to better and improve the methods for N-glycan analysis.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

PONOVLJIVOST I REPRODUCIBILNOST HILIC-UPLC I xCGE-LIF METODA U PRIPREMI I ANALIZI N-GLIKANA PROTEINA PLAZME I IMUNOGLOBULINA G

EMA PAVIČIĆ

SAŽETAK

Glikani na proteinima imaju značajnu ulogu u međudjelovanju makromolekula, sudjeluju u procesu smatanja i sekrecije proteina te utječu na njihovu stabilnost, vrijeme poluživota i funkciju. Najvažnije svojstvo glikokonjugata je njihova mikroheterogenost, odnosno postojanje različitih glikanskih struktura vezanih na isti protein. Najviše istraživanja je provedeno na N-glikanima te su promatrane promjene u N-glikomu bioloških uzoraka, najčešće krvne plazme ili pojedinačnih proteina poput IgG-a.

Uočene su promjene u N-glikozilaciji u različitim fiziološkim stanjima poput adolescencije, trudnoće i sl., ali i u mnogim bolestima. Napretkom analitičkih metoda, glikani se sve više istražuju kao potencijalni biomarkeri za različite bolesti. Javlja se potreba za razvojem novih metoda za pripremu i analizu N-glikana te unaprjeđivanjem i optimizacijom već postojećih. Metode analize moraju biti visokoprotočne kako bi omogućile analizu velikog broja uzoraka u realnom vremenu. HILIC-UPLC i xCGE-LIF su dvije takve visokoprotočne metode koje se koriste za analizu N-glikana. Korištene su i u ovom radu te je promatrana njihova ponovljivost i reproducibilnost unutar laboratorija na tri različita uzorka standarda. Važno je utvrditi ponovljivost i reproducibilnost metoda, između ostalog, da bi bili sigurni da su uočene razlike između analiziranih uzoraka posljedica same razlike među uzorcima, a ne odraz pogreške metode. Svaki korak metode unosi varijaciju u konačan rezultat.

Analizom dobivenih podataka i usporedbom koeficijenta varijacije (CV) utvrđeno je da su obe metode pouzdane za istraživanje N-glikana proteina plazme i IgG-a. HILIC-UPLC metoda pokazuje bolju ponovljivost i reproducibilnost u usporedbi s xCGE-LIF metodom. S druge strane, xCGE-LIF metoda omogućuje analizu većeg broja uzoraka u određenom vremenskom intervalu, bolje je odjeljivanje vršaka, metoda je osjetljivija te omogućuje analizu na manjoj količini uzorka. Važno je poznavati prednosti i nedostatke korištenih metoda kako bi se odabrala ona optimalna, ovisno o potrebama pojedinog istraživanja.

Optimizacijom svakog koraka u pripremi i analizi uzoraka smanjuju se CV vrijednosti pojedinog vrška što je važno radi ponovljivosti, a kasnije i reproducibilnosti metode. Da bi utjecaj pogreške metode dobivenim rezultatima bio što manji, dobar dizajn studije, nasumična raspodjela uzoraka te praćenje standardnih procedura od iznimne su važnosti za pravilnu interpretaciju rezultata. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se prepoznali koraci koji unose najviše varijacija u metode te istražili načini za još bolju optimizaciju i unaprjeđenje metoda analize.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 66 stranica, 11 grafičkih prikaza, 7 tablica i 65 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: N-glikani; N-glikom krvne plazme; N-glikom imunoglobulina G; Ponovljivost; Reproducibilnost; HILIC-UPLC; xCGE-LIF

Mentor: **Dr. sc. Gordan Lauc**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Gordan Lauc**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Lidija Bach Rojceky, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Olga Gornik Kljaić, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of biochemistry and molecular biology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

REPEATABILITY AND REPRODUCIBILITY OF HILIC-UPLC AND xCGE-LIF METHODS IN THE PREPARATION AND ANALYSIS OF PLASMA PROTEIN AND IMMUNOGLOBULIN G N-GLYCANES

Emma Pavičić

SUMMARY

Glycans attached to proteins play a significant role in the interaction with other molecules. They also participate in processes like protein folding and secretion. Furthermore, glycans affect protein function, stability and half-life. The most important property of glycoproteins is their microheterogeneity because different glycans can bind to the same glycosylation site on a specific protein resulting in various glycoforms of the protein. Most research has been conducted on N-glycans and changes in N-glycome of biological samples, such as blood plasma or individual proteins like IgGs.

Changes in N-glycosylation have been observed in various physiological conditions such as adolescence and pregnancy, but also in many diseases. Therefore, an increase in research has been observed for the purpose of detecting biomarkers for various diseases, early diagnosis or prognosis of outcomes and, ultimately, the development of personalized medicine. High-throughput methods are used to manage and analyze a large number of samples in a short period of time. HILIC-UPLC and xCGE-LIF are two such high-throughput methods used to analyze N-glycans. In this paper the repeatability and reproducibility of these two methods are observed on three different standard samples. It is important to determine the repeatability and reproducibility of the methods to ensure that the observed differences between the analyzed samples are indeed a consequence of the difference between the samples and not a reflection of the method error. Each step of the method has a variation that contributes to the final CV value.

After analyzing the obtained data and comparing calculated coefficients of variation (CV values), it was determined that both methods are reliable for study of both plasma protein and IgG N-glycans. HILIC-UPLC method in comparison to xCGE-LIF, shows better repeatability and reproducibility. On the other hand, xCGE-LIF method can analyse larger number of samples in given time. Moreover, xCGE-LIF shows better separation of the peaks, method is more sensitive and can analyse smaller sample quantities. It is useful to know the advantages and disadvantages of each method in order to select the optimal one for each research.

Optimisation of sample preparation can reduce CV values for each peak and influence repeatability and reproducibility of the method. To diminish the impact of a measurement error on obtained results, a good study design, sample randomisation, and following of standard operating procedures are of great importance. Further research is needed to identify the steps that bring the most variation to the methods and to explore ways to better and improve the methods for N-glycan analysis.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 66 pages, 11 figures, 7 tables and 65 references. Original is in Croatian language.

Keywords: N-glycans; Human plasma N-glycome; Immunoglobuline G N-glycome; Repeatability; Reproducibility; HILIC-UPLC; xCGE-LIF

Mentor: **Gordan Lauc, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Gordan Lauc, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lidija Bach Rojcky, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Olga Gornik Kljaić, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2020.