

# Probir na mukopolisaharidoze iz uzorka suhe kapi mokračé

---

**Svatić, Rebeka**

**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:163:684507>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-13**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Rebeka Svatić**

**PROBIR NA MUKOPOLISAHARIDOZE IZ  
UZORKA SUHE KAPI MOKRAĆE**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ksenije Fumić.

*Zahvaljujem mentorici, izv. prof. dr. sc. Kseniji Fumić, na ukazanom povjerenju i ljubaznosti te svom znanju prenesenom tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Svim dragim prijateljima hvala na svakom osmjehu, zagrljaju i savjetu kao i na svim nezaboravnim uspomnama iz studentskih dana.*

*Hvala mojoj obitelji na neizmjerljivoj ljubavi, podršci i strpljenju tijekom cijelog školovanja, ali i dalje.*

## **KRATICE**

MPS – mukopolisaharidoze

GAG – glikozaminoglikan

HLA – humani leukocitni antigen

NMR – nuklearna magnetska rezonanca

DMB – 1,9-dimetilmetilen plavilo

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

RNA – ribonukleinska kiselina

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. RIJETKE BOLESTI .....	1
1.1.1. Lizosomske bolesti nakupljanja .....	1
1.2. MUKOPOLISAHARIDOZE .....	3
1.2.1. Klasifikacija bolesti.....	4
1.2.2. Dijagnostika mukopolisaharidoza .....	9
1.2.3. Mogućnosti liječenja lizosomskih bolesti nakupljanja .....	11
1.3. METODE ZA ODREĐIVANJE GLIKOZAMINOGLIKANA .....	12
1.3.1. Uzorak .....	13
1.3.2. Kvalitativni testovi .....	14
1.3.3. Kvantitativni testovi.....	15
2. OBRAZLOŽENJE TEME I CILJ RADA.....	20
3. MATERIJALI I METODE.....	21
3.1. ODREĐIVANJE GAG-OVA KOLORIMETRIJSKOM METODOM S BLYSCAN REAGENSOM .....	21
3.1.1. Načelo mjerenja .....	21
3.1.2. Uzorak .....	21
3.1.3. Oprema.....	21
3.1.4. Reagensi .....	21
3.2. ODREĐIVANJE KREATININA METODOM FOTOMETRIJE S KREATININAZOM NA UREĐAJU ROCHE COBAS C501/C311 .....	21
3.2.1. Načelo mjerenja .....	21
3.2.2. Oprema.....	22
3.2.3. Reagensi .....	22
3.3. <i>IN HOUSE</i> METODA ODREĐIVANJA GAG-OVA KOLORIMETRIJSKOM METODOM S DMB REAGENSOM .....	22
3.3.1. Načelo mjerenja .....	22
3.3.2. Uzorak suhe kapi mokraće.....	22
3.3.3. Oprema.....	23
3.3.4. Reagensi .....	23
3.3.5. Postupak izrade formijatnog pufera 0,2 M i pH 3,5 .....	24
3.3.6. Postupak pripreme DMB-a .....	24
3.4. <i>IN HOUSE</i> METODA ODREĐIVANJA KREATININA JAFFEOVOM METODOM U MIKROTITARSKOJ PLOČICI .....	24

3.4.1. Načelo mjerenja .....	24
3.4.2. Uzorak .....	24
3.4.3. Oprema.....	24
3.4.4. Reagensi .....	25
3.4.5. Priprema pikrinske kiseline.....	25
3.4.6. Priprema natrijeve lužine koncentracije 7,5 g/L .....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	27
4.1. REZULTATI MJERENJA GAG-OVA BLYSCAN REAGENSOM .....	27
4.1.1. Postupak mjerenja GAG-ova Blyscan reagensom .....	27
4.1.2. Izrada kalibracijske krivulje za kolorimetrijsku metodu određivanja GAG-ova s Blyscan reagensom.....	27
4.1.3. Rezultati mjerenja Blyscan metodom u uzorcima pacijenata .....	29
4.2. REZULTATI MJERENJA GAG-OVA I KREATININA <i>IN HOUSE</i> METODOM .....	30
4.2.1. Postupak mjerenja kreatinina <i>in house</i> Jaffeovom metodom u mikrotitarskoj pločici .....	30
4.2.2. Izrada kalibracijske krivulje za kreatinin za <i>in house</i> Jaffeovu metodu u mikrotitarskoj pločici .....	30
4.2.3. Postupak određivanja GAG-ova <i>in house</i> DMB metodom iz uzorka suhe kapi mokraće ....	33
4.2.4. Izrada kalibracijske krivulje za <i>in house</i> DMB metodu određivanja GAG-ova .....	33
4.2.5. Rezultati mjerenja kreatinina <i>in house</i> Jaffeovom metodom u mikrotitarskoj pločici u uzorcima pacijenata .....	45
4.2.6. Rezultati mjerenja <i>in house</i> metodom za određivanja GAG-ova s DMB-om.....	50
4.2.7. Usporedba rezultata dobivenih metodom s Blyscan reagensom i <i>in house</i> metodom .....	57
5. ZAKLJUČCI.....	64
6. LITERATURA.....	65
7. SAŽETAK / SUMMARY.....	68

# 1. UVOD

## 1.1. RIJETKE BOLESTI

Prema definiciji u Europi, rijetke bolesti su bolesti koje se javljaju u manje od 5 pojedinaca na 10 000 ljudi. Iako su pojedinačno rijetke, ukupno u Europi od njih boluje oko 6-8% cjelokupne populacije. Unutar grupe rijetkih bolesti, postoje one koje su “vrlo rijetke”, te pogađaju jednu osobu na 100,000 stanovnika ili i manje. Pored niske prevalencije, rijetke bolesti imaju i mnoga druga zajednička obilježja, pa ih u zdravstvenom sustavu možemo promatrati kao jedinstvenu skupinu. Zajedničko im je da se obično kasno dijagnosticiraju, kako zbog nedostatnog znanja medicinskih stručnjaka, tako i zbog činjenice da je dijagnostika nerijetko skupa i teže dostupna, pogotovo u manjim zemljama koje se u dijagnostici rijetkih poremećaja oslanjaju na dijagnostičke ustanove u inozemstvu. Kasna dijagnoza može dovesti do nepopravljivih posljedica i komplikacija osnovne bolesti što otežava liječenje i značajno utječe na prognozu bolesti. (<http://.zdravstvo.gov.hr>)

Rijetke bolesti karakterizirane su velikom raznovrsnošću simptoma, koji variraju ne samo od bolesti do bolesti, već i unutar same bolesti. Ista bolest može imati značajno drugačiju kliničku sliku za oboljele, a mnogi različiti simptomi se mogu pojaviti kod jedne oboljele osobe. 80% rijetkih bolesti imaju genetsko podrijetlo. Mogu se naslijediti ili razviti iz novih genskih mutacija ili kromosomskih abnormalnosti. Pogađaju oko 3-4% rođene djece. Ostale rijetke bolesti uzrokovane su infekcijama (bakterijskim ili virusnim), alergijama ili kemijskim i radijacijskim utjecajima. Neke rijetke bolesti uzrokovane su kombinacijom genetskih i okolišnih utjecaja. Za većinu rijetkih bolesti etiološki mehanizmi su nepoznati. (<http://www.rijetke-bolesti.hr/>)

### 1.1.1. Lizosomske bolesti nakupljanja

Lizosomi su organele okružene membranom, koje sadržavaju niz enzima sposobnih razgraditi sve vrste bioloških polimera – proteine, nukleinske kiseline, ugljikohidrate i lipide. Lizosomi djeluju kao probavni sustav stanice i služe kako u razgradnji tvari unesenih izvana u stanicu, tako i u probavi dotrajalih dijelova stanice. U svom najjednostavnijem obliku lizosomi izgledaju kao gusti okrugli mjehurići, ali mogu poprimiti vrlo različitu veličinu i oblik ovisno o svojstvima onoga što probavljaju. Lizosomi su stoga morfološki raznolike organele, koje su definirane zajedničkom ulogom u razgradnji unutarstaničnih sastojaka. Sadržavaju oko 50

različitih enzima za razgradnju, koji hidroliziraju proteine, DNA, RNA, polisaharide i lipide. Mutacije gena koji kodiraju ove enzime odgovorne su za lizosomske bolesti nakupljanja jer se neprobavljeni sastojci nakupljaju u lizosomima oboljelih osoba te oštećuju stanicu i okolno tkivo. (Cooper i Hausman, 2004) Taj osnovni patofiziološki mehanizam kao i izraz "lizosomske bolesti nakupljanja" prvi je opisao Hers 1965. godine u članku o nedostatku lizosomskog enzima  $\alpha$ -glukozidaze kao uzroku Pompeove bolesti. (Fumić i sur., 2004) Većina bolesti nastaje zbog nedostatka samo jednog enzima. Svi lizosomski enzimi su kisele hidrolaze koje su aktivne u kiselom pH (oko 5), a nisu aktivne pri neutralnom pH (oko 7,2) Enzimi postupno razgrađuju supstrate do produkata koji mogu proći kroz lizosomsku membranu (pasivnom difuzijom ili pomoću specifičnih transportera) te se u citoplazmi uključiti u razne metaboličke puteve. (Cooper i Hausman, 2004)

Lizosomske bolesti nakupljanja su podskupina nasljednih metaboličkih poremećaja i obuhvaćaju skupinu od 70 monogenских poremećaja lizosomskog katabolizma, od kojih se većina nasljeđuje autosomno recesivno, ali tri su X-vezana. Ovi poremećaji su uzrokovani mutacijama u genima koji kodiraju lizosomske proteine, poput lizosomskih glikozidaza, proteaza, proteina s integralnim membranama, transportera, modifikatora enzima ili aktivatora. Procijenjena učestalost ovih bolesti je od 1 u 5,000 do 1 u 5,500 za bolesti koje uključuju manjak lizosomskih enzima ili manjak proteina integralnih membrana. Međutim, pojedinačni slučajevi su rijetki, s procijenjenim incidencijama od 1 u 50 000 do 1 u 250 000 živorođenih. Najčešće lizosomske bolesti nakupljanja su Fabryjeva bolest (do 2,5 slučaja na 100 000 muškaraca), Gaucherova bolest (do 2 slučaja na 100 000 pojedinaca), metakromatska leukodistrofija (do 2,5 slučaja na 100 000 pojedinaca) i Pompeova bolest (do 2,5 slučaja na 100 000 pojedinci). (Platt i sur., 2018)

Uz vrstu mutacije odgovarajućeg gena i različitih utjecaja iz okoliša, najvažniju ulogu ima preostala katalitička aktivnost zahvaćenog enzima. (Fumić i sur., 2004) Aktivnost enzima se može smanjiti na niz načina. Točkaste mutacije u genu mogu utjecati na vezanje supstrata za genski produkt ili na „turnover rate“ supstrata, ili oboje. Insercije baznih parova ili delecije u DNA dovode do pomaka okvira čitanja što rezultira stvaranjem potpuno drugačijeg proteina bez katalitičke aktivnosti. Ostale mutacije mogu promijeniti topljivost polipeptida ili interferirati s posttranslacijskim procesima. U lizosomskim bolestima nakupljanja, tek kada ostatna aktivnost enzima padne ispod kritične razine, priljev supstrata premašuje brzinu razgradnje i višak supstrata kontinuirano se akumulira. Budući da nerazgrađeni supstrati ne mogu (ili samo vrlo sporo) napustiti lizosomski odjeljak, ove organele se pretvaraju u granule



za pohranu koje se neprestano povećavaju veličinom i brojem. U konačnici narastu do te mjere da interferiraju s normalnom funkcijom stanice, dovodeći do bolesti nakupljanja. U pojedinim stanicama pojedinih tkiva, aktivnost će možda biti dovoljna da razgradi supstrate, ako oni dolaze u manjim količinama. S druge strane, na drugom mjestu u tom istom organizmu ostatna razina aktivnosti može biti premala budući da je dotok supstrata veći. (Conzelmann i Sandhoff, 1983)

Sve lizosomske bolesti nakupljanja karakterizira progresivan klinički tijek. Brzina progresije razlikuje se ovisno o bolesti i individualnim čimbenicima svakog bolesnika. Klinički simptomi mogu se očitovati kao somatske promjene (hepatosplenomegalija, promjene na kostima, zglobovima, očima, facijalna dismorfija, respiratorni i srčani problemi i dr.) i/ili neurološke promjene (mentalne retardacije, epilepsije i dr.). Klinička slika lizosomskih bolesti nakupljanja izrazito je heterogena i može se pojaviti u svakom životnom razdoblju, a svaka od ovih bolesti klinički može varirati od sasvim blagih oblika do teške kliničke slike. (Fumić i sur., 2004)

## **1.2. MUKOPOLISAHARIDOZE**

Proteoglikani su se prije zvali mukopolisaharidi pa se skup bolesti uzrokovanih nemogućnošću razgradnje glikozaminoglikana nazivaju mukopolisaharidoze. (Stryer i sur., 2013) MPS su grupa lizosomskih bolesti nakupljanja uzrokovane nedostatkom jednog od 11 enzima koji kataliziraju postupnu razgradnju GAG-ova. Proteolitičkom razgradnjom proteoglikana nastaju svi GAG-ovi osim hijaluronske kiseline. (Couthino i sur., 2012) Mnogi GAG-ovi se sastoje od ponavljajuće disaharidne jedinice koja je derivat amino-šećera ili glukozamina ili galaktozamina. Najmanje jedan od šećera ima negativno nabijenu karboksiliranu ili sulfatnu skupinu. (Stryer i sur., 2013) Postoje 4 različita puta kojima se GAG-ovi razgrađuju u lizosomima, ovisno o GAG-u koji se razgrađuje: dermatan sulfat, heparan sulfat, keratan sulfat i hondroitin sulfat. Postepena razgradnja GAG-ova zahtjeva 10 različitih enzima: 4 glikozidaze, 5 sulfataza i jednu nehidrolitičku transferazu. (Couthino i sur., 2012) Glikozaminski fragmenti koji se razgrađuju alternativnim putevima se izlučuju mokraćom, nalaze se u krvi i cerebrospinalnoj tekućini. (Muenzer, 2011) MPS se prenose autosomno recesivno, osim MPS 2 koja je X-vezana. (Scriver i sur., 2000) GAG-ovi su izrazito negativno nabijene molekule koje daju veliku viskoznost tkivima i tekućinama. Uz visoku viskoznost veže se i mala kompresibilnost koja ove molekule čini idealnim lubrikantom za zglobove (sinovijalna tekućina). (Pandey i sur., 2015) Također, ovi spojevi

nalaze se u različitim tkivima (kosti, hrskavice, rožnica, srčani zalistci, krvne žile,...). (Andrade i sur., 2008) GAG-ovi i proteoglikani igraju veliku ulogu u staničnoj adheziji, rastu, migraciji i diferencijaciji. Također su uključeni u regulaciju enzima i remodeliranje tkiva u odgovoru na ozljedu ili destrukciju tkiva. (Pandey i sur., 2015)

Iako klinička svojstva variraju s bolešću, sve MPS rezultiraju deformacijama skeleta i skraćenim životnim vijekom. (Stryer i sur. 2013) MPS imaju razne kliničke oblike u različitim stupnjevima. Uključuju kronični progresivni tijek, uključenost više organskih sustava, organomegaliju, koštane deformacije i karakteristične grube izraze lica. (Scriver i sur., 2000) Pacijenti obično izgledaju normalno pri rođenju, ali tijekom ranog djetinjstva pojavljuju se klinički simptomi bolesti, uključujući bolesti kostiju, zglobova, dišnih puteva i srca, oštećenje sluha i vida te mentalnu zaostalost u teškim oblicima MPS I, MPS II i MPS VII i svim podvrstama podvrste MPS III. (Muenzer, 2011)

### **1.2.1. Klasifikacija bolesti**

U tablici 1. prikazan je sistematični prikaz svih tipova MPS, zahvaćenih enzima kao i GAG-ova koji se ne mogu razgraditi zbog zahvaćenosti enzima. (Scriver i sur., 2000) Budući da su MPS VIII i MPS IX uočeni svaki samo na jednom pacijentu, nisu sadržani u tablici.

### **Mukopolisaharidoza tipa I**

MPS I postoji u tri oblika temeljena na različitoj težini simptoma.

MPS I H poznata je kao i Hurlerov sindrom, nazvan po dr. Gertrudi Hurler koja ga je otkrila 1919. Dr Harold Scheie je otkrio blaži oblik ovog sindroma, MPS I S, koji je po njemu zato nazvan Scheieov sindrom. U početku se MPS I S zvao MPS V jer se smatralo da ima drugačiju etiologiju od Hurlerovog sindroma, međutim kasnije je otkriveno da oba poremećaja nastaju kao posljedica nedostatka  $\alpha$ -L-iduronaze. Također, vjerovalo se da srednji oblik bolesti, Hurler-Scheieov sindrom (MPS I H/S) imaju heterozigoti za ove bolesti. Danas je poznato da ima više od 100 različitih alela odgovornih za nastanak MPS I i da postoji niz ovih oblika bolesti – od teškog do atenuiranog oblika. (Muenzer, 2011)

<b>Klasifikacija bolesti</b>		
<b>Ime</b>	<b>Zahvaćeni enzim</b>	<b>Zahvaćeni GAG-ovi</b>
MPS I H (Hurler)	$\alpha$ -L-iduronaza	dermatan sulfat i heparan sulfat
MPS I S (Scheie)	$\alpha$ -1-iduronaza	dermatan sulfat i heparan sulfat
MPS H/S (Hurler-Scheie)	$\alpha$ -1-iduronaza	dermatan sulfat i heparan sulfat
MPS II (Hunter – teški)	iduronat sulfataza	dermatan sulfat i heparan sulfat
MPS II (Hunter - blagi)	iduronat sulfataze	dermatan sulfat i heparan sulfat
MPS III A (Sanfilippo A)	heparan-N-sulfataza	heparan sulfat
MPS III B (Sanfilippo B)	$\alpha$ -N-aceilglukozaminidaza	heparan sulfat
MPS III C (Sanfilippo C)	acetil CoA $\alpha$ -glukozaminid acetiltransferaza	heparan sulfat
MPS III D (Sanfilippo D)	N-acetilglukozamin 6-sulfataza	heparan sulfat
MPS IV A (Morquio A)	galaktoza-6-sulfataza	keratan sulfat i hondroitin 6-sulfat
MPS IV B (Morquio B)	$\beta$ -galaktozidaza	keratan sulfat
MPS VI (Maroteaux-Lany)	N-acetilgalaktozamin 4-sulfataza (arilsulfataza B)	dermatan sulfat
MPS VII (Sly)	$\beta$ -glukuronidaza	dermatan sulfat, heparan sulfat, hondroitin 4-,6 sulfati

**Tablica 1.** Klasifikacija mukopolisaharidoza (Scriver i sur., 2000)

Hurelrov sindrom je progresivna bolest koja uključuje više organa i tkiva. Simptomi uključuju karakteristične grube crte lica, zamagljenje rožnica, mentalnu retardaciju, hernije, koštane deformacije i hepatosplenomegaliju. Djeca sa Hurlerovim sindromom izgledaju normalno pri rođenju i razvijaju karakterističan izgled tijekom prvih godina života. Hurler-Scheieov sindrom često ima simptome kao i Hurlerov sindrom, ali se simptomi pojavljuju puno kasnije i puno su blaži. Počinju oko adolescentne dobi. Javljaju se srčane i dišne komplikacije. Simptomi Scheieova sindroma su koštane deformacije, bolna i kruta stopala. Srčane i dišne komplikacije su puno blaže nego kod Hurlerova sindroma, a bolest zalistaka je česta pojava. Inteligencija je normalna. (Couthino i sur., 2012)

### **Mukopolisaharidoza tipa II**

MPS II, Hunterov sindrom je X-vezana recesivna bolest koja generalno zahvaća samo muškarce iako je opisano i nekoliko pacijentica s MPS II. Oboljenje kod ženskog spola može biti uzrokovano s X-autosomnom translokacijom i X-kromosomskom inaktivacijom kod žene nositeljice gena. (Muenzer, 2011) Zahvaćen je enzim iduronat sulfataza koji je ključan za degradaciju heparan i dermatan sulfata, a djeluje tako što cijepa njihov O-vezani sulfat. (Couthino i sur., 2012) Prvo su opisana dva oblika bolesti – blagi i teški. Teški oblik uključuje progresivnu mentalnu retardaciju i fizički invaliditet te smrt prije petnaeste godine života, dok u blagom obliku dolazi do preživljenja do odraslosti, a intelekt je minimalno zahvaćen ili uopće nije. Kasnije se odustalo od ovako stroge podjele budući da je utvrđeno da se MPS II karakterizira kao spektar različitih stadija bolesti između ova dva ekstrema. (Couthino i sur., 2012) Također, pacijenti s MPS II imaju karakteristične kožne lezije koje se opisuju kao papule boje slonovače. (Muenzer, 2011)

### **Mukopolisaharidoza tipa III**

MPS III, Sanfilippo sindrom ima izraženu mentalnu retardaciju s malim ili nikakvim tjelesnim poteškoćama. Pacijenti teško razvijaju socijalne i komunikacijske vještine. Ovi pacijenti najčešće žive do trećeg desetljeća života. (Muenzer, 2011) Sanfilippo A ili MPS IIIA je uzrokovan mutacijom u genu koji kodira N-sulfoglukozamin sulfohidrolazu, također zvanu heparan sulfat sulfataza. Simptomi bolesti su teška mentalna retardacija s relativno blagim tjelesnim poremećajima – blago zamućenje rožnice, male promjene kralježnice. MPS IIIB je karakteriziran nedostatkom  $\alpha$ -N-acetil glukozaminidaze uzrokovane mutacijama u *NAGLU* genu koji kodira enzim. Ovaj enzim potreban je kako bi se uklonio ostatak N-acetilglukozamina koji postoji u heparan sulfatu. Prema simptomima, bolest je slična MPS

IIIA. MPS IIIC također ima iste simptome kao MPS IIIA, ali je razlika u zahvaćenom enzimu. Zahvaćen je gen koji kodira heparan acetil-coA  $\alpha$  glukozaminid N-acetiltransferazu. Ovo je jedini poznati lizosomski enzim koji nije hidrolaza. Ovaj enzim katalizira acetilaciju glukozamina amino grupa koje su postale izložene djelovanjem heparan-N-sulfataza. MPS IIID ima slične simptome kao MPS IIIA, a mutacija je u genu za enzim N-acetilglukozamin-6-sulfatazu. (Couthino i sur., 2012)

#### **Mukopolisaharidoza tipa IV**

MPS IV, Moriquo sindrom ima dva oblika, a oba su karakterizirana koštanom displazijom, hiper-pokretljivošću ligamenata i zglobova te niskim rastom bez mentalne retardacije. Koštana displazija razlikuje se od koštanih deformacija koje se manifestiraju kod MPS I, II i VII. Pacijenti s teškim oblikom bolesti žive do otprilike trećeg desetljeća, a oni koji imaju atenuirani oblik bolesti mogu živjeti puno duže. (Muenzer, 2011) Enzimi koji su zahvaćeni odgovorni su za degradaciju keratan sulfata. U Moriquo A sindromu prisutan je nedostatak galaktozamin-6-sulfat sulfataze, a u Moriquo B sindromu nedostatak  $\beta$ -galaktozidaze. (Couthino i sur., 2012)

#### **Mukopolisaharidoza tipa V**

MPS V se više ne naziva tim imenom budući da je zaključeno da se radi o Scheieovom sindromu, koji je klasificiran kao MPS I uzrokovan nedostatkom  $\alpha$ -L-iduronaze. (Couthino i sur., 2012)

#### **Mukopolisaharidoza tipa VI**

MPS VI se kao i MPS IV manifestira se uglavnom tjelesnim poteškoćama uz male ili nikakve kognitivne poteškoće. Javlja se niski rast, hepatosplenomegalija, koštane deformacije, zamagljenje rožnice. Zahvaćena je razgradnja dermatan sulfata zbog nedostatka enzima N-acetilgalaktozamin 4-sulfataze (arilsulfataze B). (Couthino i sur., 2012) Tjelesne poteškoće su slične onima koje se pojavljuju u MPS I, II i VII. U teškim oblicima bolesti, bolest se pojavljuje do treće godine života a pacijenti gube pokretljivost do desete godine života i žive do tridesete godine. Kod atenuiranih ili sporo progresivnih oblika bolesti, do manifestacije dolazi tek u adolescentnoj ili ranoj odrasloj dobi, kada se razvijaju komplikacije s kostima koje dovode do pada ukupnog funkcionalnog statusa pacijenta. Kod većine ovakvih pacijenata će u nekom trenutku doći do razvoja teškog oblika bolesti. Najčešće je to

degeneracija zglobova, bolest srčanih zalistaka, apneja pri spavanju ili smanjenje plućne funkcije. (Muenzer, 2011)

### **Mukopolisaharidoza tipa VII**

MPS VII, Slyev sindrom karakteriziran je nemogućnošću razgradnje GAG-ova koji sadrže glukuronsku kiselinu zbog nedostatka  $\beta$ -glukuronidaze. Kliničke manifestacije su jako varijabilne s fenotipima koji variraju od fetalnog hidropsa, koji rezultira smrću novorođenčeta to blagih oblika koji omogućuju život do odrasle dobi. Tipični znakovi su povećanje jetre, skeletne abnormalnosti, karakteristične grube crte lica i varijabilni stupnjevi mentalne retardacije. (Couthino i sur., 2012)

MPS I, II i VII imaju puno sličnih kliničkih značajki, iako je fetalni hidrops koji rezultira neonatalnom smrću možda i najčešća prezentacija MPS VII. Ova pojava se generalno ne primjećuje kod MPS I i II. Kod ovih pacijenata javljaju se koštane deformacije koje rezultiraju gubitkom pokretljivosti zglobova, ograničenom pokretljivošću, usporavanjem rasta i niskim rastom. Može doći i do gubitka funkcije ruku. Djeca osim tjelesnih poteškoća imaju i mentalne poremećaje koji se pojavljuju rano u bolesti. Životni vijek kod neliječenih pacijenata je skraćen, najčešće manje od 10 godina života kod teških oblika MPS I i adolescentno razdoblje kod MPS II. Pacijenti s atenuiranim oblicima bolesti nemaju ili imaju minimalne mentalne poteškoće i često žive do odrasle dobi, međutim mogu se razviti srčane i dišne komplikacije zbog čega dolazi do ranije smrti. (Muenzer 2011)

### **Mukopolisaharidoza tipa VIII**

Samo je jedan pacijent je opisan s ovim oblikom bolesti u kasnim sedamdesetima. Pacijent je bio petogodišnje dijete s niskim rastom, grubom kosom, hepatomegalijom, koštanim deformacijama, mentalnom retardacijom i bez znakova zamagljenja rožnice. Biokemijska analiza mokraće pokazala je visoku razinu izlučivanja keratan i heparan sulfata zbog čega se razvila ideja postojanja novog oblika MPS, uzorkovanog nedostatkom glukozamin-6-sulfataze. (Couthino i sur., 2012)

### **Mukopolisaharidoza tipa IX**

MPS IX poznata je i kao nedostatak hijaluronidaze. Otkrivena je kod četrnaestogodišnje djevojčice niskog rasta i više periartikularnih masa mekog tkiva. Dokazano je da ima poremećaj skladištenja hijaluronana, koji se u njenoj obitelji nasljeđivao

autosomno recesivno. Ona je jedina pacijentica opisana s ovim oblikom MPS. (Couthino i sur., 2012)

### **1.2.2. Dijagnostika mukopolisaharidoza**

Velika su preklapanja u fenotipu između različitih MPS, kao i između MPS i drugih lizosomskih bolesti nakupljanja, ali i između MPS i nekih ne-lizosomskih bolesti što otežava kliničarima postavljanje kliničke sumnje. Nakon postavljene kliničke sumnje neophodna je daljnja specijalistička i laboratorijska obrada. Laboratorijska obrada započinje nespecifičnim pretragama mokraće koje uključuju kvalitativnu i kvantitativnu analizu GAG-ova. Na taj se način sužava izbor lizosomskih enzima neophodnih za postavljanje dijagnoze. Dijagnoza MPS može se postići samo enzimskom analizom, a nakon toga neophodno je analizirati i odgovarajući gen. (Andrade i sur., 2008)

Novorođenački probir također bi bio jedna od mogućnosti za rano postavljanje dijagnoze, no za sada jedino MPS tipa 1 zadovoljava kriterije uvrštavanja u novorođenačke programe. (Muenzer, 2011)

Poznato je da sve MPS dovode do pojačanog izlučivanja GAG-ova u mokraći: heparan-sulfata, dermatan-sulfata, keratan-sulfat i hondroitin-sulfata. (Andrade i sur., 2008) Pozitivan rezultat GAG-ova u mokraći upućuje na moguću MPS, ali česti su i lažno negativni rezultati zbog neodgovarajuće kvalitete uzorka mokraće (npr. porcija mokraće). Negativan test probira ne isključuje moguće postojanje MPS ako je prisutna klinička slika, već je neophodno ponoviti analizu iz novog uzorka 24-h mokraće. Određivanje enzimске aktivnosti u kulturi fibroblasta i leukocita služi za konačnu potvrdu određenog tipa MPS. Moguće je i mjerenje enzimске aktivnosti u kultiviranim korionskim resicama ili amniocitima za prenatalnu dijagnostiku. (Muenzer, 2011)

U proteklih 30 godina, Sanger-ova tehnologija sekvenciranja smatrana je zlatnim standardom za identificiranje promjena sekvenci u ciljnoj regiji. Ova metoda se oslanja na analizu pojedinih gena, obično „exon-by-exon“, što je skupo i dugotrajno. (Brusius-Facchin i sur., 2019) Zbog toga, molekularno genetsko ispitivanje se nije široko koristilo kao primarni dijagnostički test za lizosomske bolesti nakupljanja, ali to se promijenilo pojavom brzog, pouzdanog i pristupačnog sekvenciranja DNA – tzv. sekvenciranja nove generacije. Ova tehnologija omogućava sekvenciranje cjelokupnog genoma i eksona ili genoma i eksona odabranog panela gena. Sekvenciranje cjelokupnog eksona podrazumijeva njegovo izoliranje,

amplificiranje i sekvenciranje, nakon čega slijedi identifikacija potencijalno uzrokovanih bolesti uz korištenje bioinformatičkog algoritma. Iako sekvenciranje cjelokupnog eksona neće identificirati sve mutacije zbog različitih tehničkih razloga, uspješno se primjenjuje na rješavanju nekoliko dijagnostičkih problema u lizosomskim bolestima nakupljanja. (Winchester, 2014)

Umjesto razvijanja sveobuhvatnog panela za sve vrste bolesti, kako bi se izbjeglo nepotrebno sekvenciranje gena koji ne odgovaraju kliničkoj hipotezi, razvijeno je tri različita panela. Jedanaest gena povezanih s MPS podijeljeno je u tri različita panela prema kliničkom fenotipu. Panel 1 koji sadržava gene *IDUA*, *IDS*, *ARSB*, *GUSB*, prvo se sastojao od MPS tipova I, II, VI i VII, a kasnije je redizajniran te uključuje i MPS IX. Panel 2 koji sadržava gene *SGSH*, *NAGLU*, *HGSNAT*, *GNS* uključuje sve MPS III tipove, a Panel 3 koji sadržava gene *GALNS* i *GLB1* obuhvaća MPS IV tipove A i B. Iako su biokemijski testovi (enzimska analiza i analiza GAG-ova) dovoljni za potvrdu dijagnoze MPS, potrebna je genetička analiza specifičnih gena za karakterizaciju molekularnog defekta i predviđanje prognoze. Također, molekularna analiza omogućava otkrivanje statusa nositelja što je posebno važno za ženske rođake osobe oboljele od MPS II i genetsko savjetovanje. (Brusius-Facchin i sur., 2019)

Sekvenciranje sljedeće generacije može se koristiti i za prenatalnu dijagnostiku. Ako su roditelji nositelji gena ili sami oboljeli od neke lizosomske bolesti, analiza tih mutacija se preporučuje, a provodi se uzorkovanjem i analiziranjem korionskih resica. Ovakav način testiranja je atraktivna opcija za neke obitelji jer se testovi mogu provesti i na oocitima prije in vitro oplodnje. (Winchester, 2014)

Treba imati na umu da se izrazito povišene razine GAG-ova u mokraći, osim u MPS, mogu pronaći i u glomerularnim bolestima, intersticijskom cistitisu, mokraćnim infekcijama i sepsi. Kod zdravih pojedinaca GAG-ovi su uglavnom u niskim koncentracijama u mokraći, ali postoji velika individualna varijabilnost. Varijabilnost nije specifična za spol, ali varira ovisno o dobi. Kod zdravih pojedinaca se najviše izlučuju hondroitin sulfat (oko 70%) i heparan sulfat (10-30%). Nakon njih slijede dermatan sulfat i hijaluronska kiselina koji se izlučuju u tragovima. (Han X. i sur., 2020)

Dokazano je da se razina izlučenih GAG-ova u mokraći snižava s dobi. Kod najmlađih skupina djece primijećen je najveći omjer GAG-ova i kreatinina u usporedbi sa starijim osobama. Što je osoba starija, niža je razina izlučivanja hondroitin/dermatan sulfata, kao i frakcije heparan sulfata i hijaluronske kiseline.



Pokazalo se da djeca do 3 godine izlučuju više GAG-ova od starijih osoba i to najviše hondroitin sulfat i dermatan sulfat, a manje heparan sulfat. Primijećene razlike mogu se dijelom objasniti činjenicom da kod novorođenčadi i dojenčadi dolazi do najizraženijeg rasta u usporedbi s bilo kojim drugim stadijem razvoja djeteta. Također, brzi metabolizam vezivnog tkiva tijekom postnatalnog razvoja može biti glavni izvor pojačanog izlučivanja mokraćnih GAG-ova.

Nisu primijećene značajne razlike u izlučivanju hondroitin/dermatan sulfata i hijaluronske kiseline između muškaraca i žena. Međutim, spol značajno utječe na razinu heparan sulfata u mokraći. Razina heparan sulfata je značajno obrnuto povezana s dobi muškarca, dok to kod žena nije slučaj. Ova razlika pripisuje se spolnim hormonima. (Vassev i sur., 2014)

Budući da se GAG-ovi izlučuju sve manje što je osoba starija, tako se i referentni rasponi mijenjaju ovisno o dobi, a prikazani su u Tablici 2.. (de Jong i sur., 1992)

Godine	n	Srednja vrijednost GAG-ovi/mmol kreatinina	SD	CV
0-5 mjeseci	102	33,6	9	0,27
6-12 mjeseci	34	23,3	4	0,18
1 godina	43	19,5	5	0,27
2-3 godina	55	14,5	3	0,23
4-5 godina	45	11,0	2	0,15
6-7 godina	30	9,3	2	0,20
8-9 godina	16	8,4	2	0,19
10-14 godina	27	7,0	2	0,25
15-19 godina	10	4,1	1	0,32
>20 godina	31	3,3	1	0,28

**Tablica 2.** Prikaz referentnih raspona omjera GAG-ovi/mmol kreatinina prema dobi (de Jong i sur., 1992)

### 1.2.3. Mogućnosti liječenja lizosomskih bolesti nakupljanja

Pristup terapiji lizosomskih bolesti nakupljanja može se temeljiti na dva osnovna principa: zamjena proteina izmijenjenog mutacijom katalitički aktivnim enzimom (transplantacija koštane srži, enzimska nadomjesna terapija, terapija genima) ili na smanjenju sinteze supstrata u lizosomima (niskomolekularni inhibitori sinteze glikoziltransferaza). Uspješnosti transplantacije koštane srži kao terapija ovisi o nizu čimbenika, a najvažnije je da se zahvat izvede dovoljno rano i prije početka neuroloških simptoma. Nakon transplantacije

koštane srži, tkivni makrofazi odgovarajućeg donora u periodu od oko 6 mjeseci do 2 godine savladaju krvno moždanu barijeru i kao mikroglija stanice unutar središnjeg živčanog sustava počinju stvarati dovoljnu količinu katalitički aktivnih lizosomskih enzima. Do sada je najviše uspješnih transplantacija provedeno u pacijenata s MPS I, Gaucherovom bolesti tip I i III, Krabbeovom bolesti i metakromatskom leukodistrofijom. Uspješnost enzimske nadomjesne terapije Gaucherove bolesti otvorila je mogućnosti takvog pristupa liječenju i u drugih lizosomskih bolesti nakupljanja. Do sada je takva terapija odobrena za liječenje Pompeove bolesti, Fabryeve bolesti, Ceroidne lipofuscinoze CLN2, Wolmanove bolesti, MPS tipa I, II, IV, VI, VII. U kliničkim pokusima nalazi se i enzimska nadomjesna terapija za MPS IIIA. (Fumić i sur., 2004).

Transplantacija hematopoetskih stanica je korisna kod nekih pacijenata, a rekombinantna intravenska enzimska nadomjesna terapija se pokazala korisnom kod MPS I, II i VI. Rana dijagnoza i tretman mogu pomoći ishodu terapije i smanjiti teret bolesti kako pacijentima tako i njihovim skrbnicima. (Muenzer, 2011) Transplantacija matičnih krvnih stanica iz koštane srži ili pupčane vrpce pokazala je da prevenira brojne kliničke simptome teških oblika MPS I, VI i VII. Uspješna transplantacija može značajno očuvati intelektualni razvoj kod većine djece koja bi mogla razviti teški oblik bolesti. Ovaj oblik transplantacije ne poboljšava kognitivne i intelektualne sposobnosti ako su se simptomi već pojavili. Također, ova terapija ne pokazuje obećavajuće rezultate za MPS II, III i IV. Postoji i određeni rizik od smrti prilikom ove terapije, najčešće zbog nemogućnosti pronalaska odgovarajućeg HLA donora. Enzimska nadomjesna terapija s rekombinantnim ljudskim enzimom za MPS I, II i VI se koristi širom svijeta. Isto kao i kod transplantacije hematopoetskih stanica, što se prije počne koristiti, to su veći benefiti ovakve terapije. Ova terapija poboljšava pokretljivost zglobova, sposobnost hodanja, plućnu i dišnu funkciju, smanjuje volumen jetre i slezene i smanjuje ekskreciju GAG-ova. (Muenzer, 2011)

Novi terapijski pristupi, kao terapija šaperonima, terapija redukcije supstrata, genska terapija i sprječavanje čitanje kodona testiraju se u kliničkim studijama i trenutno su u razvoju. (Colon i sur., 2017)

### **1.3. METODE ZA ODREĐIVANJE GLIKOZAMINOGLIKANA**

Prije se vjerovalo da bi se iz koncentracije GAG-ova u mokraći moglo predvidjeti koliko je teška bolest, međutim iako veća koncentracija GAG-a najčešće upućuje na teži klinički tijek bolesti, GAG-ovi iz mokraće ipak nisu odgovarajući biljeg za predviđanje

stupnja težine bolesti. (Muenzer, 2011) Kao što je ranije navedeno, definitivna dijagnoza MPS se postavlja mjerenjem aktivnosti lizosomskih enzima u homogenatu kožnih fibroblasta i leukocitima, a analiza GAG-ova u mokraći služi isključivo kao test probira. U posljednjih 10 godina razvile su se metode mjerenja aktivnosti nekih lizosomskih enzima iz uzoraka suhe kapi krvi na filter papiru što je omogućilo jeftinije, jednostavnije i manje invazivno dijagnosticiranje bolesti te je otvorio i nove mogućnosti selektivnog probiranja populacije visokog rizika. (Couthino i sur., 2012)

Tijekom vremena, razvijene su brojne metode analize GAG-ova. Koristili su tzv. se spot-testovi, kolorimetrijski testovi i NMR spektroskopija. Kolorimetrijski testovi su imali velik broj lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata. (Auray-Blais i sur., 2012) Razvijena je metoda tekućinske kromatografije u kombinaciji s masenom spektroskopijom za kvantitativnu analizu dermatan sulfata i heparan sulfata u mokraći i cerebrospinalnoj tekućini. (Auray-Blais i sur., 2012)

Kod testova probira važno je zadovoljiti nekoliko kriterija:

1. test nikada ne bi trebao davati lažno negativne rezultate
2. test mora biti jednostavan za izvođenje
3. test mora imati minimalan broj lažno pozitivnih rezultata

Većina testova ne zadovoljava barem jedan od ovih kriterija, najčešće zato što ne uzima u račun koncentraciju mokraće. Kada bi se uzeo jednak volumen mokraće svih uzoraka, koncentrirani uzorak mokraće zdrave osobe bi mogao dati lažno pozitivni rezultat dok bi razrijeđeni uzorak bolesnog pacijenta mogao dati lažno negativan rezultat. (Pennock, 1976)

### **1.3.1. Uzorak**

Problem prikupljanja 24-satne mokraće moguće je zaobići tako da se izlučivanje GAG-ova izrazi prema kreatininu. Iako dinamika izlučivanja kreatinina varira tijekom 24-sata i omjer GAG-ova i kreatinina je veći preko noći, izlučivanje im je prilično konstantno tijekom dana (od 9 do 18 sati). Uzorci skupljeni u ovom periodu najbolje predstavljaju uzorak skupljen unutar 24 sata. Uzorci pacijenata koji trenutno imaju infekciju se ne bi trebali koristiti, ali također treba imati na umu i da neki konzervansi mogu interferirati s analizom. Preporučeno je da se uzorak koji nije moguće odmah analizirati zamrzne i drži zamrznutim do analize. Uzorak se treba centrifugirati i uzeti supernatant za analizu. (Pennock, 1976)

Testovi za GAG-ove se baziraju na reakciji negativno nabijenih GAG-ova s pozitivno nabijenim reagensom - kationski reagensi poput cetilpiridinijevog klorida ili cetiltrimetilamonijeva bromida u turbidimetrijskim testovima ili pozitivno nabijeni reagensi poput toluidin plavog, Azurnog A i DMB u spektrofotometrijskim mjerenjima. Kiseli pH se koristi kako bi se zaobišla potencijalna reakcija DNA ili RNA s reagensom. Ipak, u kiselim uvjetima bazične skupine na proteinima postaju pozitivno nabijene i mogu reagirati s GAG-ovima te tako mogu spriječiti GAG-ove da reagiraju s reagensom. (de Jong i sur., 1992)

### **1.3.2. Kvalitativni testovi**

#### 1.3.2.a „Spot- test“

Spot-testovi su u početku korišteni kao testovi probira. To su jako jednostavni, kvalitativni testovi, ali nisu dovoljno osjetljivi i postoji vjerojatnost lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata. (Pandey i sur., 2015) Postoji nekoliko spot-testova u kojima se fiksni volumen mokraće nanosi na filter papir, osuši i boja s odgovarajućom bojom. Korištene boje su toluidin plava, Alcian plavilo i azurna A.

Niti jedan od ovih testova ne uzima koncentraciju mokraće ili promjene vezane s dobi i izlučivanjem GAG-ova u obzir. Zbog velikog broja lažno negativnih rezultata, ovi testovi se ne koriste kao testovi probira za MPS. (Pennock, 1976) Primjer ovakvog testa je Berryev spot test, koji je do prije 30 godina bio temelj ispitivanja MPS. Mokraća se nanosi na filter papir obojen plavim toluidinom i odbojava se pomoću octene kiseline. Međutim, test nije kvantitativan i ne procjenjuje sadržaj GAG-ova u odnosu na sadržaj kreatinina u mokraći. (Andrade i sur, 2008)

#### 1.3.2.b. Precipitacijski testovi:

Vezanje GAG-ova sa zakiseljenim goveđim albuminom s ciljem stvaranja fluorescentnog precipitata se također koristilo kao test probira.

Ovaj test kao ni Berryev spot test ne uzima koncentraciju mokraće u obzir i mogući su lažno negativni rezultati. (Pennock, 1976)

#### 1.3.2.c. Test s cetiltrimetil amonijevim bromidom

Saznanje da GAG-ovi reagiraju s kvarternim amonijevim solima i daju precipitat se također iskoristilo za dizajn probirnog testa. Pufferirana otopina cetiltrimetil amonijevog

bromida se dodavala mokraći i nakon 30 minuta se promatrao fluorescentni precipitat u uzorcima s visokim sadržajem GAG-ova.

Rezultate ovog testa je teško interpretirati budući da i normalne mokraće često daju svojstvene precipitate a patološki precipitat je rijetko viđen i teško je neiskusnim analitičarima opisati njegov izgled. (Pennock, 1976)

#### 1.3.2.c. Test cetilpiridinijevim kloridom

Ovaj test se temelji na mjerenju zamućenja koje je posljedica stvaranja netopljivog taloga GAG-ova s cetilpiridinijevim kloridom. U prisutnosti citratnog pufera (0.1 mol/L, pH 4.8), talog je prilično stabilan za mjerenje apsorbancije na valnoj duljini od 680 nm. (Afyoncu i sur., 2013)

Na precipitaciju utječe ionska jakost, pH i koncentracija. Ako se ove značajke ne uzimaju u obzir, rezultati mogu biti lažno pozitivni ili lažno negativni. Utjecaj ionske jakosti i pH može se prevladati puferiranjem otopine cetilpiridinijeva klorida citratnim puferom (0,1 mol/L pH 4,8) koji stabilizira precipitat. Ovaj test u obzir ne uzima koncentraciju mokraće (Pennock, 1976).

Testovi s cetilpiridinijevim kloridom i cetiltrimetil amonijevim bromidom slabo precipitiraju GAG-ove ako nisu u prisustvu soli i zato se preporučuje u uzorke mokraće dodati sol. Cetilpiridinijev klorid je najbolji agens za precipitaciju u prisutnosti mokraćnih soli iako glikoproteini mogu biti i ko-precipitirani. Ovaj problem se nadilazi tako da se stavi veća količina cetilpiridinijeva klorida od propisane kako bi precipitati bili stabilni. (Pennock, 1976)

### 1.3.3. Kvantitativni testovi

#### 1.3.3.a. Test s Alcian plavilom

Test s Alcian plavilom je najbrži način za kvantificiranje GAG-ova. Alcian plavilo je četverovalentna kationska boja s hidrofobnom jezgrom koja sadrži bakar. Ova boja se pri dovoljno niskom pH (koji neutralizira sve karboksile i fosforne skupine) i dovoljnoj ionskoj jakosti (koja eliminira sve ionske interakcije osim onih između boje i sulfatiranih GAG-ova) veže sa sulfatiranim GAG-ovima velikom specifičnošću. (Frazier i sur., 2008)

Kako bi se GAG-ovi mogli kvantitativno izmjeriti u kompleksima nastalim pomoću vezanja Alcian plavila, važno je imati reagens koji brzo i u potpunosti disocira te komplekse

ali također osigurava i dobar medij za spektrofotometrijsko mjerenje boje. 40%-tna otopina anionskog surfaktanta Manoxol IB ispunila je oba ta kriterija. Interakcija organskih kationa ili polikationa s polianionima je povezana s pH i ionskom jakosti medija. Maksimalno vezanje GAG-ova za Alcian plavilo se postiže kada se formiranje kompleksa odvija na pH 5,8 u prisutnosti niskih koncentracija soli, npr 50 mM MgCl<sub>2</sub>. Neki proteini prisutni u biološkim tekućinama mogu se vezati za GAG-ove u kiseloj sredini i blokirati interakciju s Alcian plavilom. (Whiteman, 1972)

Ovaj test ima prednost pred testom sa cetilpiridinijevim kloridom zbog toga što je prinos boje za jednake količine različitih GAG-ova gotovo identičan i keratan sulfat se precipitira. Rezultati ovog testa nešto su viši od rezultata dobivenih testom s cetilpiridinijevim kloridom. Ipak, koristi se samo u nekoliko laboratorija. (Pennock, 1976)

Nedostatak je teško prikupljanje fino dispergiranog taloga kao i interferencija drugih negativno nabijenih molekula u mokraći. (Withley i sur, 1989) Također, boja se ne veže na ne-sulfatirane GAG-ove i mogu se otkriti samo sulfatirani polisaharidi tako da ne postoji monosaharidni ili oligosaharidni standard koji bi se mogao upotrijebiti za izradu kalibracijskih krivulja. Alcian plavilo je brz i jednostavan način kvantifikacije GAG-ova, ali vrijednosti dobivene ovim testom trebaju se pažljivo tumačiti zbog njegove ovisnosti o sulfataciji. (Frazier i sur., 2008)

Alcian plavilo se koristilo i za kvantifikaciju nakon razdvajanja elektroforezom, ali metoda je dugotrajna i zahtjeva precipitate formirane pomoću cetilpiridinijevog klorida (Withley i sur., 1989)

#### 1.3.3.b. Test s karbazolom

Test s karbazolom temelji se na reakciji između karbazola i uronske kiseline. Dolazi do obojenja čiji je intenzitet ovisan o koncentraciji uronske kiseline. Karbazol test je pouzdan kao i HPLC test za kvantifikaciju GAG-ova koji sadrže uronsku kiselinu, ali GAG-ovi moraju biti bez prisutnosti soli i drugih šećera, poput glukoze, budući da oni daju lažno pozitivne rezultate. Obavezno je ukloniti sol iz uzorka putem gel filtracije prije korištenja ovog testa.

Ovaj test ne detektira keratan sulfat, koji ne sadržava heksauronsku kiselinu. Također, pokazuje previsoku koncentraciju GAG-ova u uzorcima kontaminiranim solima ili otopljenim u fosfatnom puferu. Ovaj test može se primjenjivati u svim laboratorijima, ali kao ni test s

Alcain plavilom, ne razlikuje GAG-ove s galaktozaminom od onih sa glukozaminom. (Frazier i sur., 2008)

### 1.3.3.c. Spektrofotometrijski test s 1,9-dimetilmetilen plavilom

Izravno spektrofotometrijsko određivanje GAG-ova u centrifugiranim uzorcima mokraće s DMB najčešći je postupak u današnjim laboratorijima. Ova je metoda najpouzdanija u pogledu lažno negativnih rezultata, iako ih nije u potpunosti lišena u vrstama MPS-a u kojima je manje izraženo izlučivanje GAG-ova mokraćom (Sanfilippo, Morquio, Scheie). Ovaj postupak zaobilazi dugotrajnu proceduru razdvajanja GAG-ova od ostalih komponenti mokraće, a pedijatrijski farmaceutski pripravci ne interferiraju s metodom, kao što ne interferiraju ni proteini. Rezultati se izražavaju prema kreatininu, a za analizu se mogu koristiti uzorci i od samo 0,1 mL što je vrlo korisno kod novorođenačke populacije. Odmah u prvih nekoliko sekundi reakcije boje s heparan sulfatom vidljiva je promjena boje reagensa. Referentna razrjeđenja koja sadrže 60 µg/mL ili manje GAG-ova ostaju plavo obojena kao reagens, razrjeđenja od 70 do 90 µg/mL poprimaju ljubičastu boju, a uzorci sa 100 do 1000 µg/mL poprimaju izrazito ružičastu boju i precipitiraju tijekom vremena. Rezultati se izražavaju se kao količina GAG-ova prema količini kreatinina. Kreatinin se određuje Jaffe-ovom reakcijom u kojoj se mokraća razrjeđuje vodom i dodaje mu se zasićena pikrinska kiselina i natrijev hidroksid. Nakon 20 minuta očitava se apsorbancija na 535 nm i uspoređuje s kalibracijskom krivuljom napravljenom iz kalibracijskih točaka. (Whitley i sur., 1989)

Za rutinsku analizu, kalibracijske krivulje se izrađuju od serije razrjeđenja hondroitin-6-sulfata i paralelno uspoređuju s testnim uzorcima. Otopina koja sadržava 0,35 mmol/L DMB napravljena je razrjeđenjem 122 mg boje u 10 mL 95% etanola. Takva otopina se zatim razrjeđuje s 1 L natrijevog formijatnog pufera (pH 3,5, 0,2 mmol/L) i stabilna je u tamnoj boci na sobnoj temperaturi do 2 mjeseca. (Whitley i sur., 1989)

Ova kvantitativna metoda savladava glavne tehničke probleme za razvoj novorođenačkog probira i daje potencijal ranom otkrivanju i liječenju MPS. (Whitley i sur., 1989) DMB test ima veću osjetljivost, a manji volumen potreban za analizu ga čini ju manje osjetljivom na interferirajuće tvari. Također, pokazuje bolju diskriminacijsku moć između mokraće pacijenata s MPS-om i normalnih mokraća. U usporedbi s testom s Alcian-plavilom, DMB se pokazao prikladnijim za mokraćno probiranje na MPS. (de Jong i sur., 1994)

DMB metoda ima dovoljno svojstava koja ju čine pogodnom za automatizaciju. Nema potrebe za inkubacijom i predtretmanom uzorka, boja je stabilna do 3 mjeseca ako se drži u mraku i apsorbancija se može čitati bez odgode nakon dodatka reagensa u uzorak. Automatizirana DMB metoda ispunjava uvjete potrebne da se koristi kao metoda probira kao i za praćenje pacijenata na terapiji. (Afyoncu i sur., 2013)

Ova metoda ne može razlikovati vrstu izlučenog GAG-a, pa su potrebne enzimске ili separacijske metode kako bi se postavila točna dijagnoza. (Andrade i sur., 2008).

#### 1.3.3.d. DMB test s komercijalnim reagensom

Na Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb koristi se Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan test za kvantitativno određivanje GAG-ova proizvođača Biocolor.

Boja sadržava DMB u anorganskom puferu koji sadrži i surfaktante. Disocijacijski reagens sadrži natrijevu sol anionskog surfaktanta i formuliran je tako da disocira kompleks GAG-ova i boje te omogući spektrofotometrijsko mjerenje slobodne boje koja je proporcionala koncentraciji GAG-ova u mokraći. Za slijepu probu uzima se voda. Mjerenje se vrši na 656 nm.

Test se može koristiti za mjerenje ukupne količine GAG-ova, ali može biti prilagođen i za određivanje omjera O- i N- sulfatiranih GAG-ova u testnim uzorcima. U uzorcima ne smiju biti prisutni nikakvi izvori zamućenja. Topljive komponente poput proteina i neutralnih ugljikohidrata ne interferiraju s testom. (Biocolor Ltd., 2010)

#### 1.3.3.e. Tekućinska kromatografija s masenom spektroskopijom (LC-MS/MS):

HPLC test je najosjetljivija raspoloživa metoda kvantifikacije GAG-ova. Korištenje metode LC-MS/MS se pokazalo napretkom u usporedbi s ostalim dostupnim metodama budući da je ova metoda brza, visoke specifičnosti, osjetljivosti i reproducibilnosti. Direktna analiza GAG-ova je kompleksna zbog njihove molekularne heterogenosti. Uzorke tekuće mokraće može se analizirati tekućinskom kromatografijom i masenom spektrometrijom na kvadripol mikrotandem instrumentu.

Za svaki GAG se odabire jedan specifičan disaharid kako bi se postigla najveća moguća specifičnost, a nakon toga se radi kvantifikacija pomoću računalnog softvera.



Kreatinin se mjeri spektrofotometrijskom Jaffe reakcijom. Konačni rezultat se izražava kao količina GAG-ova prema količini kreatinina kako bi se standardizirali rezultati kod mokraća koje nisu 24-satni uzorci. Ovom metodom mogu se analizirati MPS I, II i VI. Najveća prednost ove metode su niske razine dermatan sulfata i heparan sulfata pronađene u kontrolnim uzorcima što upućuje na veliku specifičnost ove metode u usporedbi sa spektrofotometrijskim i kolorimetrijskim metodama koje se koriste u brojnim laboratorijima. (Auray-Blais, 2011)

Ova metoda je unaprijeđena tako da se analizira mokraća prikupljena u obliku suhe kapi na filter papiru. Istraživanje i drugih lizosomskih bolesti iz suhe kapi mokraće na filter papiru se pokazalo korisnim i uporabljivim za testove probiranja. Utvrđeno je da su analiti prikupljeni na filter papiru i osušeni stabilni i za vrijeme standardnog transporta putem poštanske službe što ovu metodu čini vrlo jednostavnom. (Auray-Blais i sur., 2012) Uzorci se skupljaju na 10\*10 cm filter papirima i suše preko noći nakon čega se uzimaju diskovi od 5 cm i iz njih se ekstrahira mokraća uz pomoć  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Nakon toga slijedi tekućinska kromatografija i masena spektrometrija GAG-ova s elektrosprej ionizacijom uz argon kao kolizijski plin. Za svaki GAG se odabire jedan reprezentativni disaharid s namjerom da se omogući najveća specifičnost. Kvantifikacija se provodi analizom pikova putem računalnog softvera. Kreatinin se kvantificira također putem masene spektrometrije i konačni rezultat se izražava kao količina GAG-ova prema kreatininu.

U ovoj metodi primijećen je jak utjecaj matriksa koji se nadilazi korištenjem deuteriranog standarda dermatan i heparan sulfata. Ova metoda ima nisku raznu lažno pozitivnih rezultata u usporedbi sa spektrofotometrijskim i kolorimetrijskim metodama. (Auray-Blais i sur., 2012) Na ispitivanje ne utječe sol ili razina sulfatacije GAG-ova te metoda daje rezultate za sve vrste analiziranih GAG-ova. Također, raspoznaje GAG-ove s glukozaminom od GAG-ova s galaktozaminom. Ipak, tehnologija za ovu metodu nije dostupna u svim laboratorijima (Frazier i sur., 2008)

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME I CILJ RADA

Analiza ukupnih GAG-ova u mokraći je prva metoda probira nakon postavljene kliničke sumnje na mukopolisaharidoze. Rezultati probira utječu na daljnji tijek dijagnostičkog procesa i zbog toga je od velikog značaja koristiti optimalnu metodu. Metoda probira bi trebala biti dovoljno osjetljiva i specifična, a ujedno jednostavna za provođenje u rutinskom laboratorijskom radu. S obzirom na to da se za probir koristi validirana, no vremenski zahtjevna metoda, a uzorak je tekuća mokraća - cilj rada je bio ispitati pouzdanost *in house* metode iz uzorka suhe kapi mokraće. Metoda iz suhe kapi mokraće pojednostavila bi slanje uzoraka u laboratorij i time omogućila veću dostupnost dijagnostike mukopolisaharidoza. Temeljem dobivenih rezultata procijenila bi se prihvatljivost metode za rutinsku primjenu.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. ODREĐIVANJE GAG-OVA KOLORIMETRIJSKOM METODOM S BLYSCAN REAGENSOM**

##### **3.1.1. Načelo mjerenja**

Glikozaminoglikani stvaraju s bojom 1,9-dimetil-metilen plavilom obojeni kompleks. Nakon otapanja kompleksa intenzitet nastale boje mjeri se na 656 nm. Koncentracija glikozaminoglikana očita se iz standardne krivulje hondroitin-4-sulfata.

##### **3.1.2. Uzorak**

Uzorci mokraće su prikupljeni od travnja do prosinca 2019. godine. Korišteno je 47 uzoraka 24-satne mokraće prikupljene od pacijenata različitih dobnih skupina nakon postavljene kliničke sumnje na MPS.

##### **3.1.3. Oprema**

- spektrofotometar Camspec M-508
- mikrocentrifuga Eppendorf 5415 R
- centrifuga Heraeus Megafuge 8
- tresalica PSU-2T i staklene reakcijske kivetice uskog unutarnjeg promjera
- varijabilne automatske pipete 10-100  $\mu\text{L}$  i 100-1000  $\mu\text{L}$

##### **3.1.4. Reagensi**

Reagens paket Blyscan koji se sastoji od komponenti:

3.1.4.a. Dye Reagent (1,9-dimetil-metilen plavilo u anorganskom puferu)

3.1.4.b. Dissociation Reagent

3.1.4.c. Reference Standard (sterilna otopina hondroitin-4-sulfata; 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

#### **3.2. ODREĐIVANJE KREATININA METODOM FOTOMETRIJE S KREATININAZOM NA UREĐAJU ROCHE COBAS C501/C311**

##### **3.2.1. Načelo mjerenja**

Enzimska metoda temelji se na pretvorbi kreatinina uz kreatininazu, kreatinazu i sarkozin oksidazu u glicin, formaldehid i vodikov peroksid. Vodikov peroksid reagira s HTIB

(2,4,6-trijodo-3-hidroksibenzoatna kiselina) i 4-aminofenazonom uz enzim peroksidazu i nastaje kromogen kinon-imin. Intenzitet nastalog kromogena direktno je proporcionalan koncentraciji kreatinina u uzorku i mjeri se fotometrijski.

### **3.2.2. Oprema**

- Mjerni instrument Cobas c501 / c311, Roche
- Pipeta, staklena: 5mL
- Propipeta gumena
- Varijabilna automatska pipeta: 100-1000  $\mu$ L

### **3.2.3. Reagensi**

3.2.3.a. C.f.a.s. kalibrator: 12 x 3 mL

3.2.3.b. 9% NaCl: diluent

## **3.3. IN HOUSE METODA ODREĐIVANJA GAG-OVA KOLORIMETRIJSKOM METODOM S DMB REAGENSOM**

### **3.3.1. Načelo mjerenja**

GAG-ovi su negativno nabijene molekule koje reagiraju s pozitivno nabijenim reagensima kao što je DMB i stvaraju obojeni kompleks. Što se više boje veže, odnosno što više GAG-ova ima u uzorku, to se apsorbancija više smanjuje. Mjerenjem apsorbancije i čitanjem rezultata iz kalibracijske krivulje dobivamo informaciju o količini GAG-ova u uzorku. Koncentracija GAG-ova se izračunava u mg GAG-ova/mmol kreatinina.

### **3.3.2. Uzorak suhe kapi mokraće**

Suhe kapi mokraće (iz točke 3.1.2.) pripremljene su na sljedeći način: filter papir je natopljen mokraćom i ostavljen je sušiti minimalno 4 sata na sobnoj temperaturi. Na isti se način postupalo s komercijalnim kontrolnim uzorcima 3.3.4.e. i 3.3.4.f. Iz osušenog uzorka mokraće na filter papiru pomoću ručne bušilice izbušeno je 8 diskova promjera 3,1 mm koji su stavljeni u staklene epruvete. U epruvete je dodano po 300  $\mu$ L redestilirane vode i diskovi su se na tresalici (3.3.1.f.) eluirali 3,5 sata. Ovako pripremljen uzorak (eluat) je spreman za analizu. GAG-ovi se izražavaju prema koncentraciji kreatinina kako bi se izbjegle eventualne pogreške koje mogu nastati zbog nepravilnog skupljanja 24-satne mokraće.

### 3.3.3. Oprema

- Filter papir Whatman 903TM
- Kapalica
- Ručna bušilica filter papira promjera 3,1 mm
- Vacutainer staklene epruvete
- Eppendorf pipete i nastavci
- Tresalica PSU-2T
- ClinMass mikrotitarska pločica (96 jažica, 370  $\mu$ L) bez poklopca
- Eppendorf pipete i nastavci
- Falcon epruvete
- Odmjerna tikvica (100 mL)
- Staklena boca (1 L)
- Tamna staklena boca (1 L)
- Eppendorf epruvete od 0,5 mL
- Tecan Sunrise uređaj za mjerenje apsorbancije u mikrotitarskim pločicama
- Vortex uređaj (Biovortex, Biosan)
- Magnetska miješalica
- pH – metar
- vaga

### 3.3.4. Reagensi

3.3.4.a. Formijatna kiselina (Merck, HCOOH, 1,22 kg/L)

3.3.4.b. DMB (Serva, M = 416,05 g/mol)

3.3.4.c. 95% Etanol

3.3.4.d. Hondroitin sulfat natrijeva sol (SIGMA, 123H1180)

3.3.4.e. Komercijalna kontrola SAU 1 (MCA Laboratory):

GAG: 89,4 – 135 mg/L + Kreatinin: 3,5 – 4,4 mmol/L; (mg GAG-ova/mmol Kn = 25,54 – 30,68)

3.3.4.f. Komercijalna kontrola SAU 2 (MCA Laboratory):

GAG: 24,7 – 40 mg/L + Kreatinin: 6,6-7,9 mmol/L; (mg GAG-ova/mmol Kn = 3,74 – 5,06)

3.1.4.c Reference Standard (sterilna otopina hondroitin-4-sulfata; 100  $\mu$ g/mL)

### **3.3.5. Postupak izrade formijatnog pufera 0,2 M i pH 3,5**

Formijatni pufer se priprema miješanjem 0,755 mL formijatne kiseline (3.3.4.a.) s 80 mL destilirane vode, nakon čega se mjeri pH, a potom se odmjerne tikvica dopuni do 100 mL.

### **3.3.6. Postupak pripreme DMB-a**

#### **3.3.6.a. Matična otopina DMB-a**

Matična otopina dimetilen plavila (DMB) pripremljena je tako da se 12,2 mg DMB-a (reagens 3.3.4.b.) pomiješa s 1 mL 95% etanola (reagens 3.3.4.c) i doda u 99 mL formijatnog pufera (reagens 3.3.5.). Otopina se mora čuvati u tamnoj boci zaštićenoj od svjetla na sobnoj temperaturi. Reagens je stabilan do 6 mjeseci.

#### **3.3.6.b. Radna otopina DMB-a**

Radna otopina boje se priprema miješanjem sedam dijelova formijatnog pufera (reagens 3.3.5.) s jednim dijelom matične otopine DMB (reagens 3.3.6.a).

## **3.4. IN HOUSE METODA ODREĐIVANJA KREATININA JAFFEOVOM METODOM U MIKROTITARSKOJ PLOČICI**

### **3.4.1. Načelo mjerenja**

Jaffeova metoda određivanja kreatinina temelji se na reakciji kreatina iz mokraće s alkalnim pikratom pri čemu nastaje narančasto obojeni produkt koji se mjeri spektrofotometrijski na valnoj duljini od 546 nm, a apsorbancija je izravno proporcionalna količini kreatinina.

### **3.4.2. Uzorak**

Uzorak je eluat mokraće iz filter papira dobiven postupkom opisanim u točki 3.3.2.

### **3.4.3. Oprema**

- Odmjerna tikvica (1000 mL)
- Odmjerna tikvica (100 mL)
- Graduirana pipeta
- ClinMass mikrotitarska pločica (96 jažica, 370  $\mu$ L) bez poklopca
- Eppendorf pipete i nastavci

- Eppendorf epruvete od 0,5 mL
- Vortex uređaj
- vaga
- Tecan Sunrise uređaj za mjerenje apsorbancije u mikrotitarskim pločicama

### **3.4.4. Reagensi**

3.4.4.a. NaOH (Merck, Mt = 40,00 g/mol)

3.4.4.b. Pikrinska kiselina (Mt = 229,11 g/mol)

3.4.4.c. Komercijalni kreatinin kalibrator Roche za automatizirane sustave Cobas koncentracije 0,036 mmol/dL - KALIBRATOR

3.4.4.d. Komercijalna kontrola BIO-RAD Liquichek Urine chemistry control koncentracije 0,579 mmol/dL – KOMERCIJALNA KONTROLA 1

3.4.4.e. Komercijalna kontrola PrecipathPUC Roche za automatizirane sustave Cobas koncentracije 0,360-0,516 mmol/dL - PRECIPATH

3.4.4.f. Komercijalna kontrola PrecinormPUC Roche za automatizirane sustave Cobas koncentracije 0,689-0,995 mmol/dL - PRECINORM

3.4.4.g. Komercijalna kontrola Liquichek Urine chemistry control koncentracijskog raspona 0,508 – 0,697 mmol/dL (odnosno 57,5 – 78,8 mg/dL) kreatinina (BIO-RAD, Lot 68561) – BIORAD 1

3.4.4.h. Komercijalna kontrola Liquichek Urine chemistry control koncentracijskog raspona 1,140 – 1,653 mmol/dL (odnosno 129 – 187 mg/dL) kreatinina (BIO-RAD, Lot 68562) – BIORAD 2

### **3.4.5. Priprema pikrinske kiseline**

3.4.5.a Zasićena otopina pikrinske kiseline

Zasićena otopina pikrinske kiseline se priprema tako da se u destiliranu vodu do zasićenja dodaje pikrinska kiselina (reagens 3.4.4.b.). Nakon toga se ostavi na sobnoj temperaturi još jedan dan.

3.4.5.b. Radna otopina pikrinske kiseline; 20 % otopina

Radna otopina pikrinske kiseline priprema se miješanjem 20 mL otopine zasićene pikrinske kiseline (reagens 3.4.5.a.) i 80 mL destilirane vode.

### **3.4.6. Priprema natrijeve lužine koncentracije 7,5 g/L**

Odvagne se 7,5 g NaOH (reagens 3.4.4.a.) i otopi u 900 mL destilirane vode nakon čega se odmerna tikvica dopuni do 1000 mL i dobro promiješa.



## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

### **4.1. REZULTATI MJERENJA GAG-OVA BLYSCAN REAGENSOM**

#### **4.1.1. Postupak mjerenja GAG-ova Blyscan reagensom**

Uzorci mokraće 3-5 mL su centrifugirani (5 min/ sobna temperatura/ 3200 okretaja) te je izmjerena koncentracija kreatinina prema postupku 4.1.1.a. Za uzorak u Eppendorf epruvetu od 2 mL pipetirano je 25  $\mu$ L mokraće i 75  $\mu$ L redestilirane vode. Za slijepu probu u Eppendorf epruvetu pipetirano je 100  $\mu$ L redestilirane vode. U sve epruvete je dodano 1 mL boje (3.1.4.a) te su stavljene na tresalicu 30 minuta. Odmah nakon centrifugiranja potrebno je pogledati nastali talog u epruvetama prema svjetlu i naglo odliti supernatant. Epruvete su preokrenute i ostavljene na staničevini da se upije ostatak supernatanta. Na talog je dodano 0,5 mL disocijacijskog reagensa (3.1.4.b.) te su stavljene na tresalicu 30 minuta. Nakon toga su epruvete centrifugirane da se uklone eventualni mjehurići. Izmjerena je apsorbancija na 656 nm (u staklenoj uskoj kivetu, nulirano redestiliranom vodom). Iz kalibracijske krivulje hondroitin-4-sulfata (opisane u točki 4.1.2.) izračunata je vrijednost koncentracije GAG-ova izražena u  $\mu$ g/100  $\mu$ L. S obzirom na to da je riječ o četverostrukom razrjeđenju (25  $\mu$ L mokraće i 75  $\mu$ L redestilirane vode), dobiveni rezultati koncentracije pomnoženi su s 4, ali i s 10 jer se rezultat izražava u mg/L. Dobivena vrijednost podijeljena je s vrijednosti kreatinina. Rezultat se izrazio kao mg GAG-ova/mmol kreatinina. Koncentracije kreatinina izmjerene su na Roche cobas c501/c311.

#### **4.1.2. Izrada kalibracijske krivulje za kolorimetrijsku metodu određivanja GAG-ova s Blyscan reagensom**

Za izradu kalibracijske krivulje korišten je referentni standard hondroitin-4-sulfata koncentracije 100  $\mu$ g/mL (reagens 3.1.4.c.). Postupak razrjeđenja prikazan je u tablici 3..

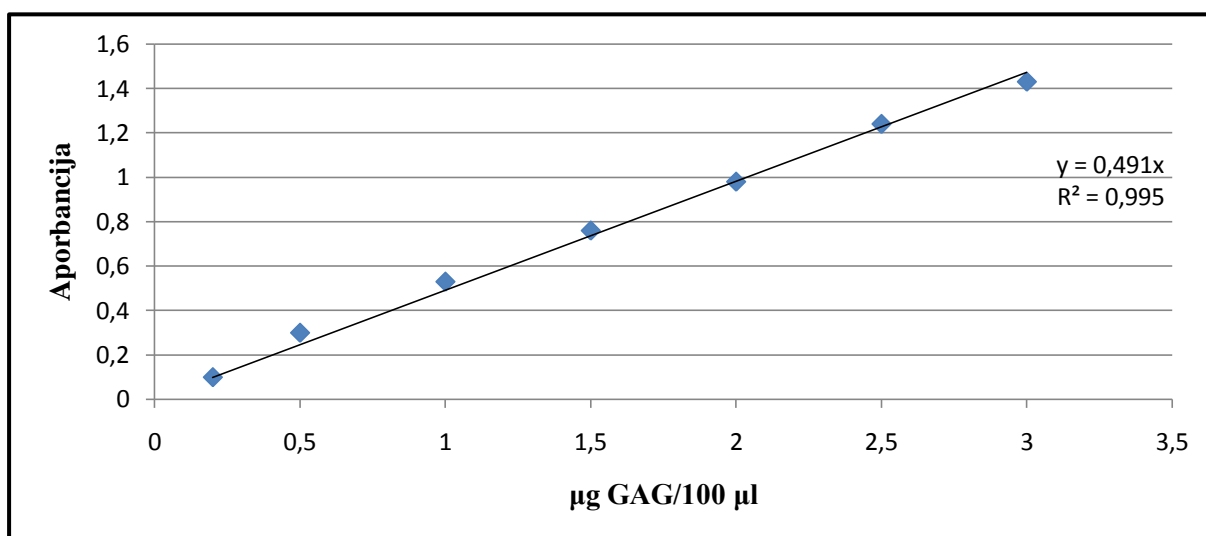
Uzorak	$\mu\text{g GAG-ova}/100 \mu\text{l}$	Volumen standarda ( $\mu\text{L}$ )	Volumen $\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )
Slijepa proba	/	/	100
1.	0,2	2	98
2.	0,5	5	95
3.	1,0	10	90
4.	1,5	15	85
5.	2,0	20	80
6.	2,5	25	75
7.	3,0	30	70

**Tablica 3.** Postupak razrjeđenja standarda hondroitin-4-sulfata za izradu kalibracijske krivulje od 7 točaka

Rezultati mjerenja za kalibracijsku krivulju prikazani su u tablici 4.. Kalibracijska krivulja prikazana je na Grafu 1. i jednadžba krivulje glasi:  $y = 0,491x$

Uzorak	$\mu\text{g GAG-ova}/100 \mu\text{l}$	A
Slijepa proba (Sp)	/	0,041
1.	0,2	0,1
2.	0,5	0,3
3.	1,0	0,53
4.	1,5	0,76
5.	2,0	0,98
6.	2,5	1,24
7.	3,0	1,43

**Tablica 4.** Rezultati mjerenja apsorbancije razrjeđenja standarda hondroitin-4-sulfata



**Graf 1.** Kalibracijska krivulja Blyscan testa

#### 4.1.3. Rezultati mjerenja Blyscan metodom u uzorcima pacijenata

U Tablici 5. prikazani su rezultati mjerenja GAG-ova u mokraći Blyscan reagensom dobiveni i izračunati postupkom opisanim u točki 4.1.1. Rezultati za kreatinin dobiveni su na mjernom instrumentu Cobas c501 / c311, Roche.

Uzorak	Izmjerena A	A- A(Sp)	GAG-ovi (mg/L)	Kreatinin (mmol/L)	Rezultat (mg/mmol Kn)
1	0,815	0,774	63,1	14,6	4,3
2	0,404	0,363	29,8	5,8	5,1
3	0,174	0,133	10,8	2,7	4,0
4	0,950	0,909	74,1	9,2	8,1
5	0,378	0,337	27,5	4,7	5,9
6	0,187	0,146	11,9	5,4	2,2
7	0,203	0,162	13,2	2,9	4,6
8	0,524	0,483	39,4	4,3	9,2
9	0,057	0,016	1,3	3,5	0,4
10	0,318	0,277	22,6	4,1	5,5
11	0,149	0,108	8,8	1,5	5,9
12	0,443	0,402	32,8	6,1	5,4
13	0,116	0,075	6,1	0,4	15,3
14	0,140	0,099	8,1	7,4	1,1
15	0,270	0,229	18,7	6,9	2,7
16	0,418	0,377	30,7	5,1	6,0
17	0,173	0,132	10,8	0,6	18,0
18	0,226	0,185	15,1	0,7	21,6
19	0,149	0,108	8,8	2,8	3,1
20	0,111	0,07	5,7	0,5	11,4
21	0,210	0,169	13,8	1,7	8,1
22	0,695	0,654	53,3	7,2	7,4
23	0,116	0,075	6,1	1,1	5,5
24	1,490	1,449	118,1	1,3	90,8
25	0,503	0,462	37,6	6,9	5,4
26	0,196	0,155	12,6	2,6	4,8
27	1,374	1,333	108,6	6,5	16,7
28	0,581	0,540	44,0	7,3	6,0
29	0,175	0,134	10,9	1,4	7,8
30	0,145	0,104	8,5	0,7	12,1
31	0,268	0,227	18,5	4,5	4,1
32	0,123	0,082	6,7	0,8	8,4
33	0,223	0,182	14,8	4,7	3,1
34	0,221	0,180	14,7	4,1	3,6
35	0,180	0,139	11,3	1,1	10,3
36	0,133	0,092	7,5	2,3	3,3
37	0,071	0,030	2,4	6,2	0,4

Uzorak	Izmjerena A	A- A(Sp)	GAG-ovi (mg/L)	Kreatinin (mmol/L)	Rezultat (mg/mmol Kn)
38	0,246	0,205	16,7	3,6	4,6
39	0,335	0,294	24,0	6,3	3,8
40	0,334	0,293	23,9	5,4	4,4
41	0,293	0,252	20,5	4,9	4,2
42	0,230	0,189	15,4	0,8	19,3
43	0,732	0,691	56,3	8,5	6,6
44	0,100	0,059	4,8	0,5	9,6
45	0,357	0,316	25,7	0,9	28,6
46	0,105	0,064	5,2	4,1	1,3
47	1,770	1,729	140,9	10,6	13,3

**Tablica 5.** Rezultati mjerenja GAG-ova i kreatinina Blyscan metodom

Usporedbom s referentnim rasponima prema dobi, u uzorcima 8, 17, 18, 24, 27 i 47 povišena je koncentracija GAG-ova. Ostale koncentracije GAG-ova s obzirom na dob pacijenta bile su ispod srednje vrijednosti GAG-ova/mmol kreatinina prikazane u Tablici 2.. U radu će kasnije za analizu i usporedbu biti odabrani uzorci povišenog omjera GAG-ova/mmol kreatinina, ali i izrazito niskog omjera GAG-ova/mmol kreatinina s obzirom na dob.

## **4.2. REZULTATI MJERENJA GAG-OVA I KREATININA *IN HOUSE* METODOM**

### **4.2.1. Postupak mjerenja kreatinina *in house* Jaffeovom metodom u mikrotitarskoj pločici**

U svaku jažicu pipetirano je 35  $\mu$ L NaOH (reagens 3.4.6.) i 35  $\mu$ L radne otopine pikrinske kiseline (reagens 3.4.5.b.). U jažice s NaOH i pikrinskom kiselinom dodano je 20  $\mu$ L eluata (dobivenog prema postupku opisanom u točki 3.3.2.). Nakon 20 minuta apsorbancije su očitane na TECAN sunrise uređaju na valnoj duljini od 492 nm. Iz kalibracijske krivulje (opisane u točki 4.2.2.) očitana je koncentracija kreatinina.

### **4.2.2. Izrada kalibracijske krivulje za kreatinin za *in house* Jaffeovu metodu u mikrotitarskoj pločici**

Za izradu kalibracijske krivulje korištena je komercijalna kontrola (reagens 3.4.4.h.). Koncentracija kreatinina ove komercijalne kontrole izmjerena na uređaju Cobas c501 / c311, bila je 146 mg/dL. Ta je koncentracija uzeta kao najviša točka kalibracijske krivulje, a od nje

su se onda razrjeđivanjem izradile druge točke kalibracijske krivulje kako je prikazano u tablici 6..

Uzorak	Koncentracija kreatinina (mg/dL)	Volumen komercijalne kontrole (μl)	Volumen H <sub>2</sub> O (μL)
Slijepa proba	/	/	500
1.	3,1	10,5	489,5
2.	19,9	68	432
3.	29,7	101,5	398,5
4.	63,7	218	282
5.	146	500	/

*Tablica 6. Postupak razrjeđenja komercijalne kontrole kreatinina za izradu kalibracijske krivulje od 5 točaka*

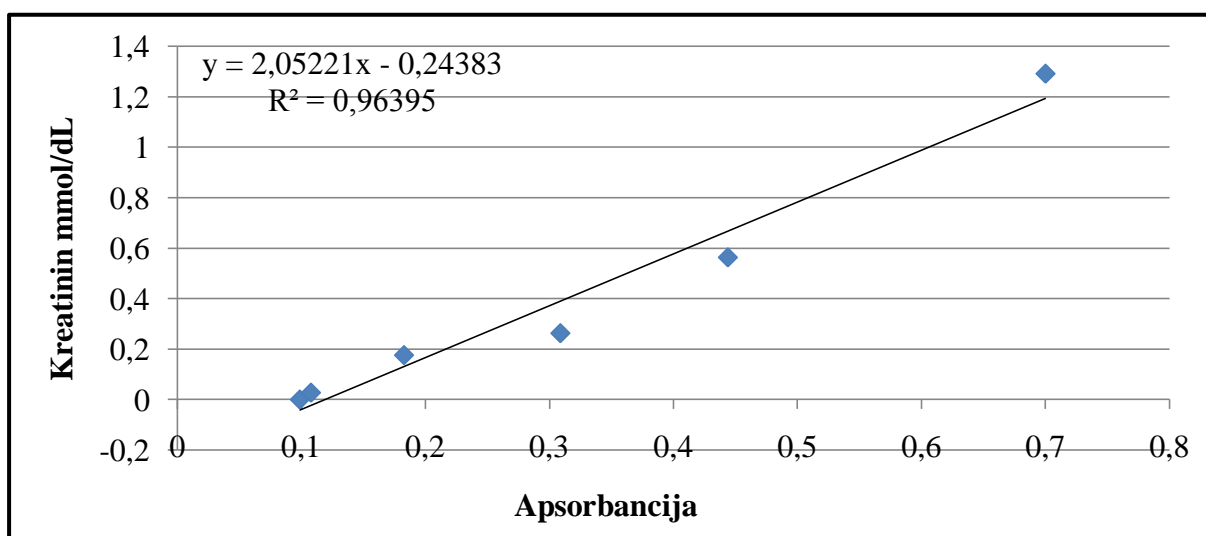
Kalibracijske točke su pripremljene za daljnji postupak (260 μL destilirane vode + 40 μL uzorka kalibracijske točke). Ova otopina je ekvivalentna eluatu iz diskova filter papira i s njom je postupano na isti način kao i s uzorcima (opisano u točki 4.2.1.).

Rezultati mjerenja za kalibracijsku krivulju prikazani su u tablici 7.. Kreatinin se iz mg/dL preračunava u mmol/dL što je neophodno za konačan prikaz rezultata GAG-ova/mmol kreatinina.

Kalibracijska krivulja prikazana je na Grafu 2. i jednadžba krivulje glasi:  $y = 2,05221x - 0,24383$ .

Kreatinin (mg/dL)	Apsorbancija	Kreatinin (mmol/dL)
0	0,099	0
3,1	0,108	0,03
19,9	0,183	0,18
29,7	0,309	0,26
63,7	0,444	0,56
146,0	0,700	1,29

*Tablica 7. Rezultati mjerenja apsorbancije razrjeđenja komercijalne kontrole kreatinina*



**Graf 2.** Kalibracijska krivulja kreatinina dobivena „in house“ Jaffeovom metodom

Kako bi se provjerila tačnost kalibracijske krivulje, izmjerena je apsorbancija nekoliko komercijalnih kontrola poznatih koncentracija (reagensi 3.5.4.c., 3.5.4.d., 3.5.4.e., 3.5.4.f.) koje su pripremljene istim načinom kao i kalibracijske točke – ranije opisano u točki 4.2.2. Rezultati mjerenja prikazani su u Tablici 8.. Svi rezultati mjerenja bili su prihvatljivi i krivulja se može koristiti za *in house* metodu određivanja kreatinina Jaffeovom metodom u mikrotitarskoj pločici.

Naziv	Apsorbancija	Kreatinin (mmol/dL)	Navod proizvođača (mmol/dL)
Kalibrator (3.5.4.c.)	0,136	0,05	0,04
	0,15		
Komercijalna kontrola 1 (3.5.4.d.)	0,376	0,53	0,58
	0,374		
Precipath (3.5.4.e.)	0,358	0,48	0,36 - 0,52
	0,351		
Precinorm (3.5.4.f.)	0,569	0,93	0,69 - 0,99
	0,575		
Biorad 1 (3.5.4.g.)	0,358	0,49	0,51 - 0,70
	0,353		
Biorad 2 (3.5.4.h.)	0,822	1,51	1,14 - 1,65
	0,889		

**Tablica 8.** Rezultati mjerenja kreatinina u komercijalnim kontrolama „in house“ Jaffeovom metodom

#### 4.2.3. Postupak određivanja GAG-ova *in house* DMB metodom iz uzorka suhe kapi mokraće

U jažice je dodano po 200  $\mu\text{L}$  radne otopine DMB-a (reagens 3.5.5.b.) i po 20  $\mu\text{L}$  eluata (dobivenog prema postupku opisanom u točki 3.3.2.). Nakon 15 minuta očitane su apsorbancije na TECAN analizatoru mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini od 620 nm. Iz kalibracijske krivulje očitana je koncentracija GAG-ova.

#### 4.2.4. Izrada kalibracijske krivulje za *in house* DMB metodu određivanja GAG-ova

Za izradu kalibracijske krivulje 500 mg natrijeve soli hondroitin sulfata (reagens 3.3.4.d.) otopljeno je u 1 L destilirane vode (konačna koncentracija 50 mg/dL).

Uzorak	Koncentracija GAG-ova (mg/dL)	Volumen standarda ( $\mu\text{l}$ )	Volumen $\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )
Slijepa proba	/	/	500
1.	3,12	31,25	468,75
2.	6,25	62,5	437,5
3.	12,5	125	375
4.	25	250	250
5.	50	500	/

**Tablica 9.** Postupak razrijeđenja standarda hondroitin-sulfata za izradu kalibracijske krivulje od 5 točaka

Kalibracijske točke su pripravljene za daljnji postupak (260  $\mu\text{L}$  destilirane vode + 40  $\mu\text{L}$  uzorka kalibracijske točke). Ova otopina je ekvivalentna eluatu iz diskova filter papira i s njom je postupano na isti način kao i s uzorcima (opisano u točki 4.2.3.).

##### 4.2.4.a. Ispitivanje stabilnosti radne otopine *in house* DMB

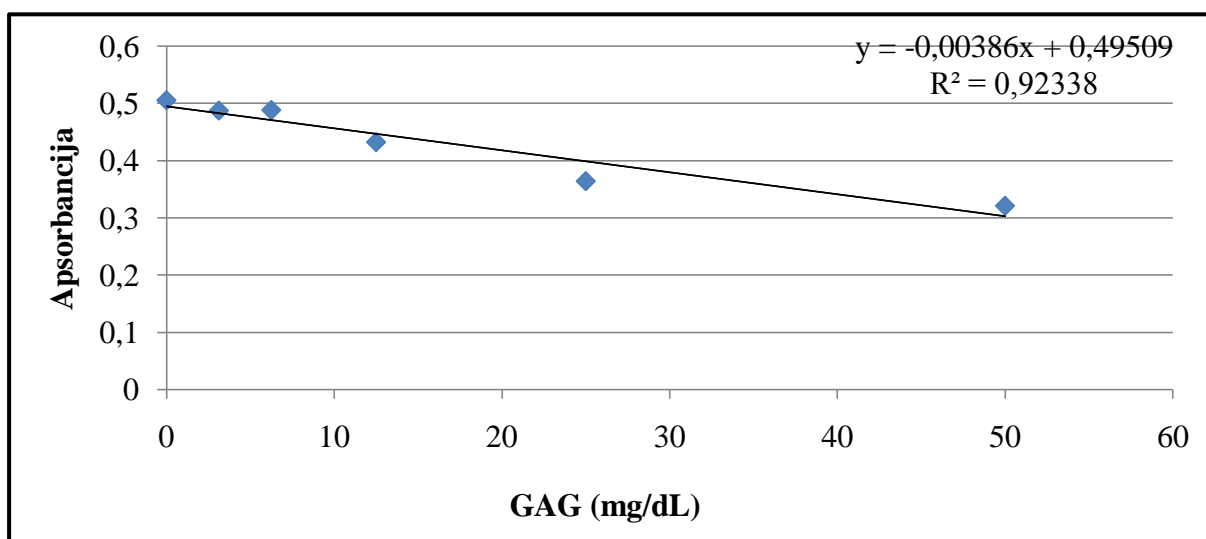
Radna otopina boje napravljena je u velikom volumenu prema točki 3.5.5.b. kako bi se njezina stabilnost mogla ispitati iz dana u dan. Stabilnost se ispitivala izradom kalibracijskih krivulja (opisane u točki 4.2.4.) tijekom nekoliko dana.

U tablici 10. prikazane su apsorbancije kalibracijskih točaka na dan izrade radne otopine reagensa i pripadajuća kalibracijska krivulja (Graf 3.). U tablici 11. prikazane su apsorbancije kalibracijskih točaka mjenjenih radnom bojom otopine nakon stajanja 4 dana na sobnoj temperaturi kao i pripadajuća kalibracijska krivulja (Graf 4.). U tablici 12. prikazane su apsorbancije kalibracijskih točaka mjenjenih s radnom otopinom boje nakon stajanja 10 dana na sobnoj temperaturi i pripadajuća kalibracijska krivulja (Graf 5.). U tablici 13.

prikazane su apsorbancije kalibracijskih točaka mjerenih s radnom otopinom boje nakon stajanja 13 dana na sobnoj temperaturi i pripadajuća kalibracijska krivulja (Graf 6.). Primjećuje se pad apsorbancije stajanjem radne otopine boje kao i promjena jednadžbe kalibracijske krivulje. Budući da se radi o izrazito niskim koncentracijama i male promjene jednadžbe kalibracijske krivulje značajno utječu na konačni izračun. Vidljivo je da je radna otopina boje nestabilna. Rezultati su pokazali da bi se za svako mjerenje trebala raditi nova radna otopina boje kao i pripadajuća kalibracijska krivulja.

Mjerenje 1 - na dan izrade radne otopine	
GAG-ovi (mg/dL)	Apsorbancija
0	0,505
3,125	0,487
6,25	0,488
12,5	0,432
25	0,364
50	0,321

**Tablica 10.** Rezultati mjerenja apsorbancije razrjeđenja hondroitin sulfata na dan izrade radne otopine

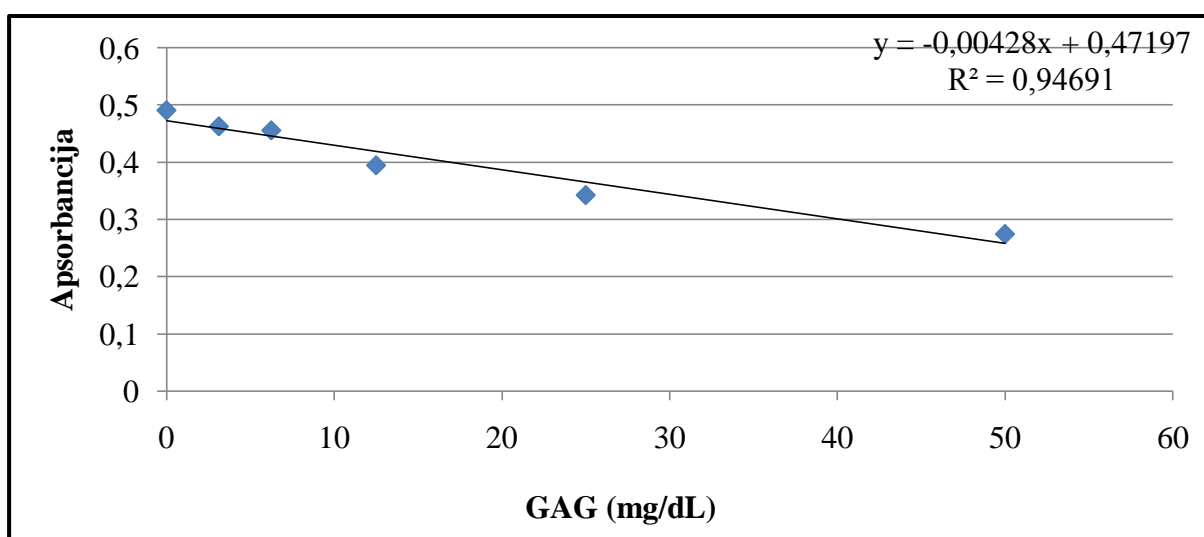


**Graf 3.** Kalibracijska krivulja za GAG-ove dobivena „in house“ DMB metodom na dan izrade radne otopine



Mjerenje 2 - 4 dana od izrade radne otopine	
GAG-ovi (mg/dL)	Apsorbancija
0	0,490
3,125	0,462
6,25	0,455
12,5	0,394
25	0,342
50	0,274

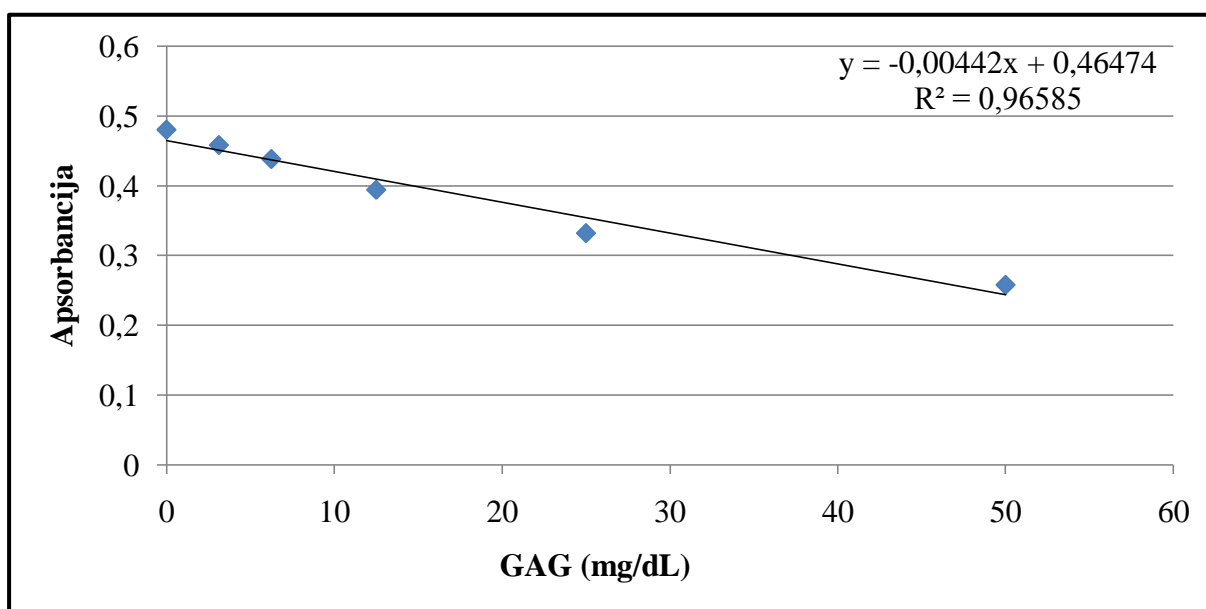
Tablica 11. Rezultati mjerenja razrjeđenja hondroitin sulfata 4 dana od izrade radne otopine



Graf 4. Kalibracijska krivulja za GAG-ove dobivena „in house“ DMB metodom 4 dana od izrade radne otopine

Mjerenje 3 - 10 dana od izrade radne otopine	
GAG-ovi (mg/dL)	Apsorbancija
0	0,480
3,125	0,458
6,25	0,438
12,5	0,394
25	0,332
50	0,258

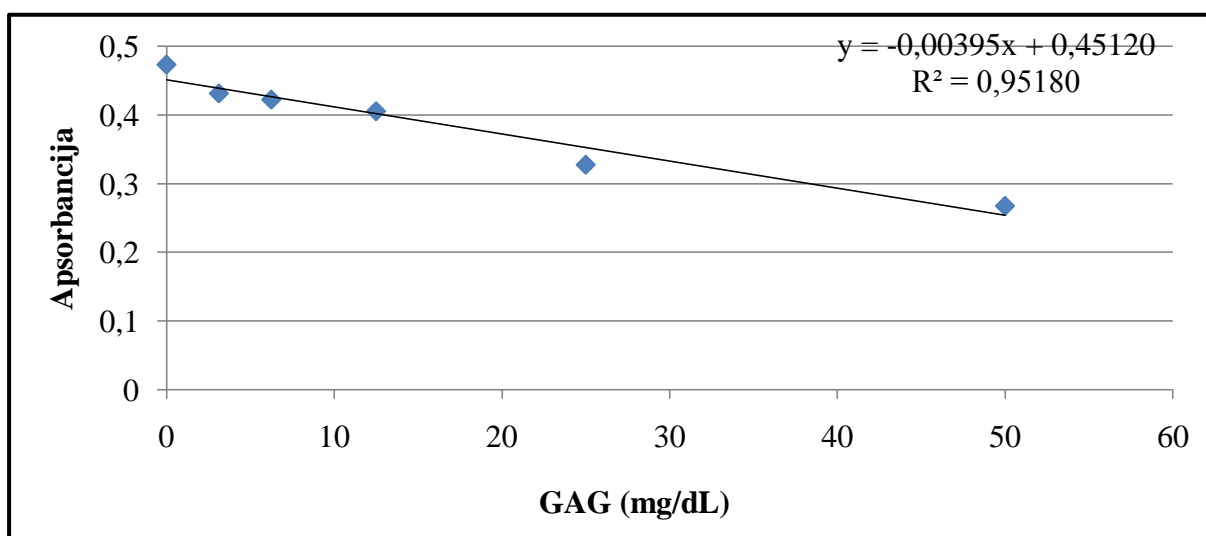
Tablica 12 Rezultati mjerenja razrjeđenja hondroitin sulfata 10 dana od izrade radne otopine



*Graf 5. Kalibracijska krivulja za GAG-ove dobivena „in house“ DMB metodom 10 dana od izrade radne otopine*

Mjerenje 4 - 13 dana od izrade radne otopine	
GAG-ovi (mg/dL)	Apsorbancija
0	0,473
3,125	0,431
6,25	0,422
12,5	0,405
25	0,327
50	0,267

*Tablica 13 Rezultati mjerenja razrjeđenja hondroitin sulfata 13 dana od izrade radne otopine*

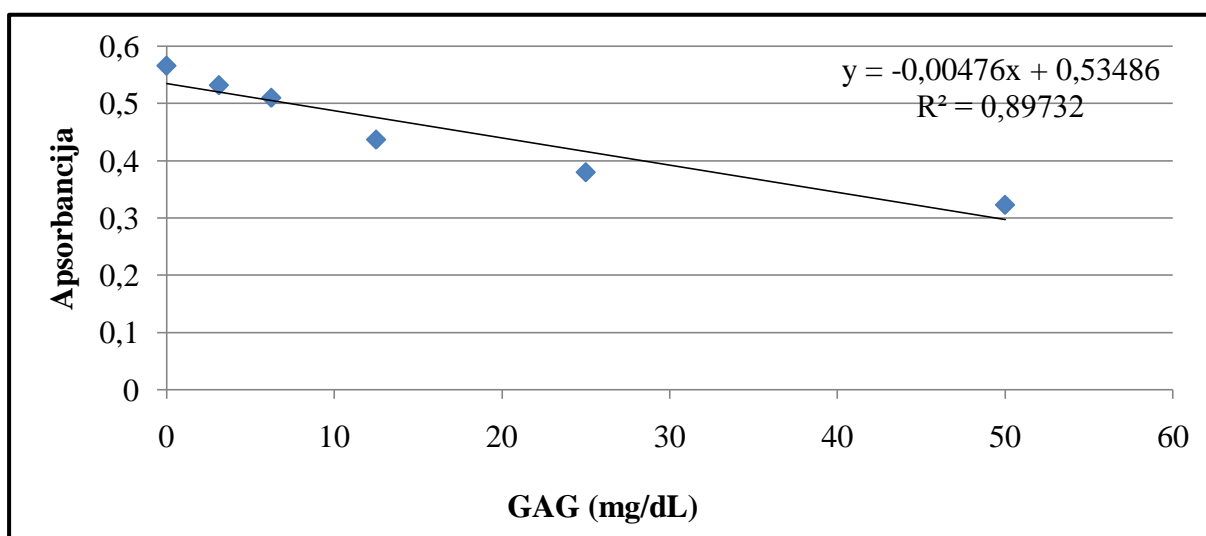


**Graf 6.** Kalibracijska krivulja za GAG-ove dobivena „in house“ DMB metodom 13 dana od izrade radne otopine

Nadalje, napravljena su mjerenja apsorbancije kalibracijskih točaka i pripadni kalibracijski dijagram i tako da se neposredno prije samog mjerenja kalibracijskih točaka napravila radna otopina boje (Tablice 14. i 15.; Grafovi 7. i 8.).

<b>Mjerenje 5 - radna otopina izrađena neposredno prije mjerenja</b>	
<b>GAG-ovi (mg/dL)</b>	<b>Apsorbancija</b>
0	0,566
3,125	0,532
6,25	0,510
12,5	0,437
25	0,380
50	0,323

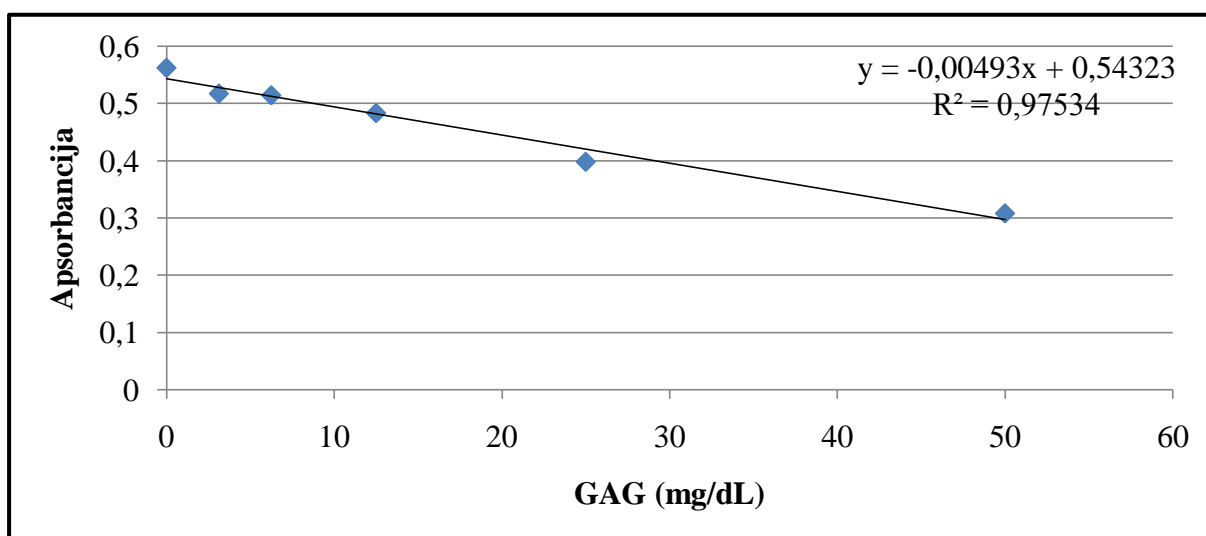
**Tablica 14.** Rezultati mjerenja apsorbancije razrjeđenja hondroitin sulfata s radnom otopinom izrađenom neposredno prije mjerenja



**Graf 7.** Kalibracijska krivulja za GAG-ove dobivena „in house“ DMB metodom s radnom otopinom izrađenom prije mjerenja

Mjerenje 6 - radna otopina izrađena neposredno prije mjerenja	
GAG-ovi (mg/dL)	Apsorbancija
0	0,562
3,125	0,517
6,25	0,514
12,5	0,483
25	0,398
50	0,308

**Tablica 15.** Rezultati mjerenja apsorbancije razrjeđenja hondroitin sulfata s radnom otopinom izrađenom neposredno prije mjerenja



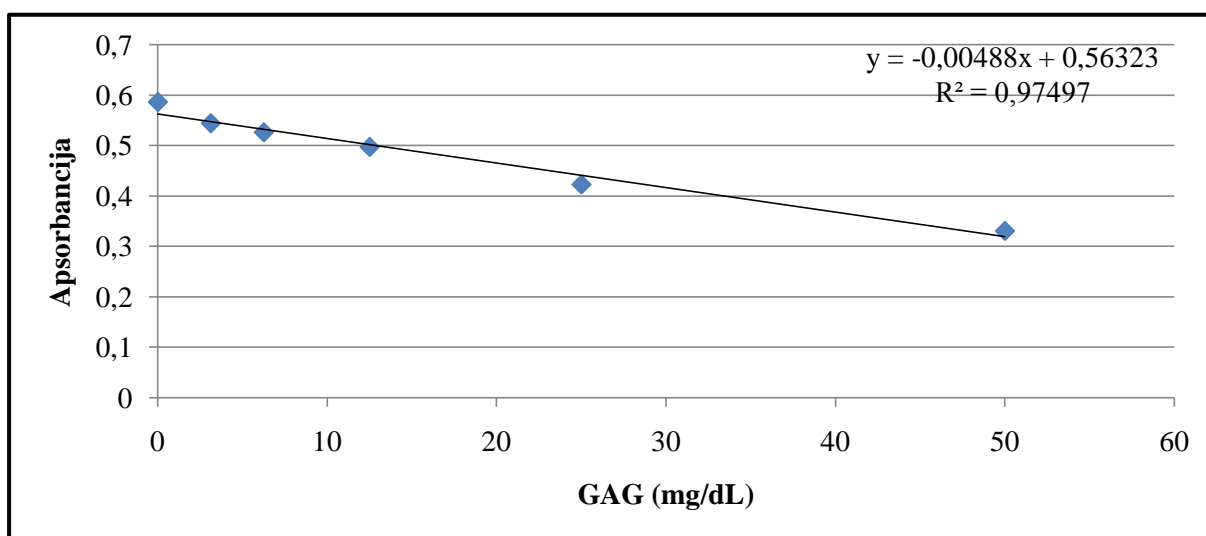
**Graf 8.** Kalibracijska krivulja za GAG-ove dobivena „in house“ DMB metodom s radnom otopinom izrađenom neposredno prije mjerenja

Između mjerenja 5. i 6. nema značajne razlike u apsorbancijama. Međutim, prisutna je velika razlika između apsorbancija u ovim mjerenjima i prethodno opisanim mjerenjima gdje je ispitivana stabilnost radne otopine tijekom nekoliko dana. Značajna razlika vidljiva je već kod apsorbancije same boje. Ovakvi rezultati upućuju na to da značajan utjecaj na kalibracijsku krivulju i posljedično tome na rezultate, ma priprema radne otopine boje.

Nadalje, napravljena su dva mjerenja apsorbancije kalibracijskih točaka s novoizrađenim formijatnim puferom. Rezultati se nalaze u tablicama 16. i 17., a pripadne kalibracijske krivulje su grafovi 9. i 10..

Mjerenje 7 - radna otopina izrađena s novim formijatnim puferom	
GAG-ovi (mg/dL)	Apsorbancija
0	0,586
3,125	0,544
6,25	0,526
12,5	0,497
25	0,423
50	0,331

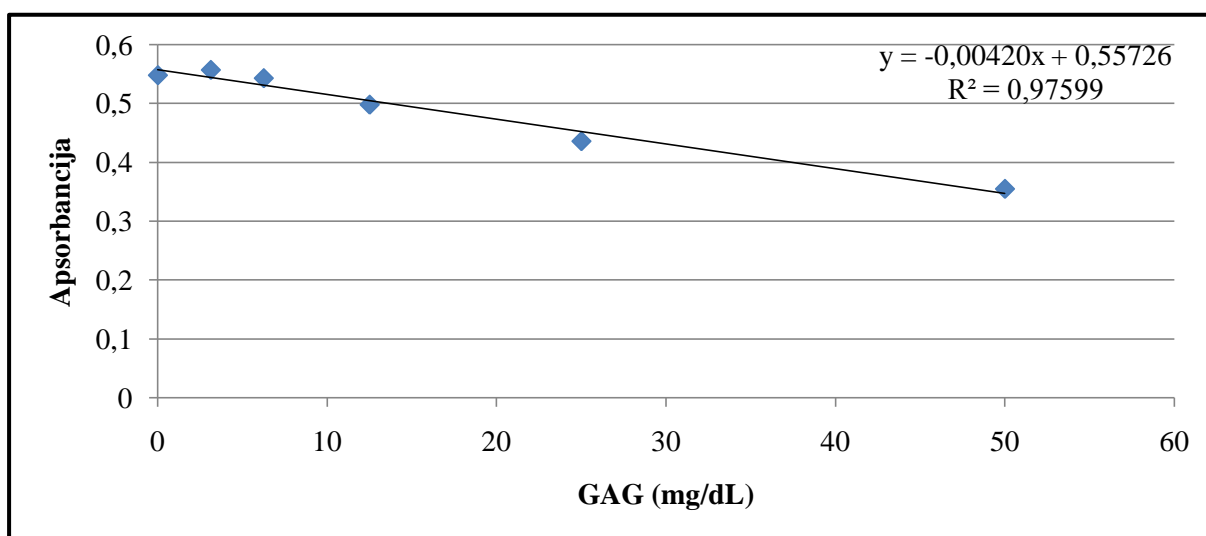
**Tablica 16.** Rezultati mjerenja apsorbancije razrjeđenja hondroitin sulfata s radnom otopinom izrađenom s novim formijatnim puferom



**Graf 9.** Kalibracijska krivulja za GAG-ove dobivena „in house“ DMB metodom s radnom otopinom izrađenom s novim formijatnim puferom

Mjerenje 8 - radna otopina izrađena s novim formijatnim puferom	
GAG-ovi (mg/dL)	Apsorbancija
0	0,548
3,125	0,557
6,25	0,543
12,5	0,498
25	0,436
50	0,355

**Tablica 17.** Rezultati mjerenja apsorbancije razrjeđenja hondroitin sulfata s radnom otopinom izrađenom s novim formijatnim puferom



**Graf 10.** Kalibracijska krivulja za GAG-ove dobivena „in house“ DMB metodom s radnom otopinom izrađenom s novim formijatnim puferom

Apsorbancije se neznatno razlikuju. Također, apsorbancije iz mjerenja 5 i 6 bliske su apsorbancijama izmjerenim u mjerenjima 7 i 8.

Uzimajući sva mjerenja u obzir, zaključuje se da radna otopina boje nije stabilna i potrebno je za svako mjerenje izraditi novo radno razrjeđenje boje, a formijatni pufer nema utjecaja na stabilnost radne otopine.

#### 4.2.4.b. Provjera kalibracijskih krivulja za GAG-ove

Nakon izrade svake kalibracijske krivulje očitane su koncentracije komercijalnih kontrola poznatih koncentracija (3.3.4.e., 3.3.4.f., 3.1.4.c.) kako bi se ispitala pouzdanost te kalibracijske krivulje. Komercijalne kontrole su stavljane u postupak u tekućem obliku, kao i kalibracijske točke (prema 4.2.4.). Rezultati su prikazani u tablicama 18. – 25.. Mjerenje apsorbancije komercijalnih uzoraka obavljano je istovremeno s izradom kalibracijskih krivulja za GAG-ove.

Mjerenje 1			
Naziv	Apsorbancija	GAG-ovi (mg/dL)	Proizvođačev navod (mg/dL)
SAU 1 (3.3.4.e.)	0,48	11,8	8,9 – 13,5
	0,49		
SAU 2 (3.3.4.f.)	0,54	2,2	2,5 – 4,0
	0,525		
REFERENCE STANDARD (3.1.4.c.)	0,455	19,7	10
	0,437		

**Tablica 18.** Rezultati mjerenja apsorbancije komercijalnih kontrola dobiveni jednadžbom kalibracijske krivulje iz Mjerenja 1 (Graf 3.) u usporedbi s proizvođačevim navodima

Mjerenje 2			
Naziv	Apsorbancija	GAG-ovi (mg/dL)	Proizvođačev navod (mg/dL)
SAU 1	0,419	13,1	8,9 – 13,5
	0,413		
SAU 2	0,461	3,0	2,5 – 4,0
	0,457		
REFERENCE STANDARD	0,451	6,2	10
	0,44		

**Tablica 19.** Rezultati mjerenja apsorbancije komercijalnih kontrola dobiveni jednadžbom kalibracijske krivulje iz Mjerenja 2 (Graf 4.) u usporedbi s proizvođačevim navodima

Mjerenje 3			
Naziv	Apsorbancija	GAG-ovi (mg/dL)	Proizvođačev navod (mg/dL)
SAU 1	0,403	13,4	8,9 – 13,5
	0,408		
SAU 2	0,44	5,8	2,5 – 4,0
	0,438		
REFERENCE STANDARD	0,431	10,0	10
	0,41		

**Tablica 20.** Rezultati mjerenja apsorbancije komercijalnih kontrola dobiveni jednadžbom kalibracijske krivulje iz Mjerenja 3 (Graf 5.) u usporedbi s proizvođačevim navodima



Mjerenje 4			
Naziv	Apsorbancija	GAG-ovi (mg/dL)	Proizvođačev navod (mg/dL)
SAU 1	0,402	10,7	8,9 – 13,5
	0,416		
SAU 2	0,442	1,6	2,5 – 4,0
	0,448		
REFERENCE STANDARD	0,409	8,5	10
	0,426		

**Tablica 21.** Rezultati mjerenja apsorbancije komercijalnih kontrola dobiveni jednadžbom kalibracijske krivulje iz Mjerenja 4 (Graf 6.) u usporedbi s proizvođačevim navodima

Mjerenje 5			
Naziv	Apsorbancija	GAG-ovi (mg/dL)	Proizvođačev navod (mg/dL)
SAU 1	0,492	7,9	8,9 – 13,5
	0,503		
SAU 2	0,525	3,7	2,5 – 4,0
	0,51		
REFERENCE STANDARD	0,475	10,1	10
	0,499		

**Tablica 22.** Rezultati mjerenja apsorbancije komercijalnih kontrola dobiveni jednadžbom kalibracijske krivulje iz Mjerenja 5 (Graf 7.) u usporedbi s proizvođačevim navodima

Mjerenje 6			
Naziv	Apsorbancija	GAG-ovi (mg/dL)	Proizvođačev navod (mg/dL)
SAU 1	0,482	12,9	8,9 – 13,5
	0,477		
SAU 2	0,535	2,8	2,5 – 4,0
	0,524		
REFERENCE STANDARD	0,467	15,2	10
	0,47		

**Tablica 23.** Rezultati mjerenja apsorbancije komercijalnih kontrola dobiveni jednadžbom kalibracijske krivulje iz Mjerenja 6 (Graf 8.) u usporedbi s proizvođačevim navodima

Mjerenje 7			
Naziv	Apsorbancija	GAG-ovi (mg/dL)	Proizvođačev navod (mg/dL)
SAU 1	0,518	9,3	8,9 – 13,5
	0,518		
SAU 2	0,54	4,8	2,5 – 4,0
	0,54		
REFERENCE STANDARD	0,507	10,7	10
	0,515		

**Tablica 24.** Rezultati mjerenja apsorbancije komercijalnih kontrola dobiveni jednadžbom kalibracijske krivulje iz Mjerenja 7 (Graf 9.) u usporedbi s proizvođačevim navodima

Mjerenje 8			
Naziv	Apsorbancija	GAG-ovi (mg/dL)	Proizvođačev navod (mg/dL)
SAU 1	0,496	12,9	8,9 – 13,5
	0,51		
SAU 2	0,527	6,9	2,5 – 4,0
	0,53		
REFERENCE STANDARD	0,51	9,5	10
	0,525		

**Tablica 25.** Rezultati mjerenja apsorbancije komercijalnih kontrola dobiveni jednadžbom kalibracijske krivulje iz Mjerenja 8 (Graf 10.) u usporedbi s proizvođačevim navodima

Može se uočiti da je većina rezultata unutar raspona proizvođačevih navoda, izuzev mjerenja apsorbancije standarda u mjerenju 1 i 6 za što se može pretpostaviti da je bila greška u razrjeđivanju ili pipetiranju uzorka. Na temelju ovih rezultata, može se zaključiti da se *in house* metoda iz tekućih uzoraka mokraće može koristiti za probir GAG-ova. Pri tome je potrebno izrazitu pažnju posvetiti pipetiranju kao i vorteksiranju otopina. To je jedan od ograničavajućih čimbenika za rutinsku primjenu metode, jer rezultati variraju i ovisno o analitičaru.

#### 4.2.5. Rezultati mjerenja kreatinina *in house* Jaffeovom metodom u mikrotitarskoj pločici u uzorcima pacijenata

Rezultati za koncentraciju kreatinina dobiveni su prema kalibracijskoj jednadžbi iz točke 4.2.2.:  $y = 2,05221 \bar{A} - 0,24383$ , gdje je  $y$  koncentracija kreatinina a  $x$ , odnosno  $\bar{A}$  srednja vrijednost izmjerenih apsorbancija.

U tablici 26. prikazani su rezultati mjerenja kreatinina za uzorke 1 - 25.

Uzorak	Apsorbancija kreatinina	Koncentracija kreatinina (mmol/dL)
1	0,492	0,75
	0,479	
2	0,356	0,42
	0,288	
3	0,342	0,40
	0,289	
4	0,433	0,58
	0,367	
5	0,286	0,30
	0,243	
6	0,399	0,55
	0,372	
7	0,313	0,36
	0,276	
8	0,329	0,41
	0,303	
9	0,332	0,38
	0,278	
10	0,290	0,31
	0,251	
11	0,275	0,32
	0,270	
12	0,314	0,43
	0,342	
13	0,222	0,22
	0,226	
14	0,325	0,37
	0,276	
15	0,281	0,33
	0,274	
16	0,350	0,42
	0,292	
17	0,197	0,18
	0,213	

Uzorak	Apsorbancija kreatinina	Koncentracija kreatinina (mmol/dL)
18	0,248	0,21
	0,196	
19	0,232	0,24
	0,243	
20	0,239	0,22
	0,208	
21	0,229	0,20
	0,205	
22	0,323	0,42
	0,324	
23	0,221	0,20
	0,212	
24	0,290	0,30
	0,236	
25	0,305	0,41
	0,335	

*Tablica 26. Rezultati mjerenja apsorbancije kreatinina „in house“ Jaffeovom metodom za uzorke 1 - 25*

U tablici 27. prikazani su rezultati mjerenja kreatinina za uzorke 26 – 47.

Uzorak	Apsorbancija kreatinina	Koncentracija kreatinina (mmol/dL)
26	0,218	0,18
	0,190	
27	0,207	0,18
	0,201	
28	0,242	0,24
	0,225	
29	0,330	0,41
	0,310	
30	0,299	0,36
	0,287	
31	0,223	0,20
	0,209	
32	0,193	0,17
	0,205	
33	0,325	0,41
	0,308	
34	0,331	0,41
	0,303	
35	0,215	0,18
	0,194	

Uzorak	Apsorbancija kreatinina	Koncentracija kreatinina (mmol/dL)
36	0,277	0,30
	0,255	
37	0,314	0,38
	0,296	
38	0,236	0,22
	0,214	
39	0,237	0,24
	0,233	
40	0,390	0,56
	0,389	
41	0,267	0,28
	0,239	
42	0,292	0,33
	0,266	
43	0,280	0,32
	0,266	
44	0,252	0,27
	0,249	
45	0,273	0,25
	0,212	
46	0,298	0,36
	0,291	
47	0,209	0,17
	0,195	

**Tablica 27.** Rezultati mjerenja apsorbancije kreatinina „in house“ Jaffeovom metodom za uzorke 26 - 47

U sljedećem mjerenju izmjerene su komercijalne kontrole SAU 1 i SAU 2 iz eluata filter papira. Rezultati su prikazani u tablici 28..

Uzorak	Apsorbancija kreatinina	Koncentracija kreatinina (mmol/dL)
SAU 1	0,268	0,30
	0,260	
SAU2	0,303	0,35
	0,274	

**Tablica 28.** Rezultati mjerenja apsorbancije kreatinina „in house“ Jaffeovom metodom za komercijalne kontrole SAU 1 i SAU 2

Na kraju, odabrani su neki od uzoraka izrazito visokog i niskog omjera GAG-ova prema mmol kreatinina (3, 5, 17, 18, 19, 24, 27, 29, 37, 47; mjerenje Blyscan testom, opisano u 4.1.3.). Mjerenja su ponavljana tri puta (svaki puta uz novu kalibracijsku krivulju za GAG-

ove). Uz uzorke su mjerene i koncentracije komercijalnih kontrola SAU 1 i SAU 2 (eluati iz uzorka suhih kapi). Istovremeno su mjereni i tekući uzorci SAU 1 i SAU 2 te tekući uzorak mokraće br. 47 (pripremljeni prema postupku 4.2.4.). Rezultati mjerenja su prikazani u tablicama 29., 30. i 31..

Mjerenje 1		
Uzorak	Apsorbancija kreatinina	Koncentracija kreatinina (mmol/dL)
3	0,318	0,45
	0,362	
5	0,322	0,40
	0,308	
17	0,224	0,22
	0,227	
18	0,252	0,24
	0,215	
19	0,279	0,30
	0,255	
24	0,260	0,23
	0,203	
27	0,377	0,50
	0,349	
29	0,296	0,35
	0,283	
37	0,518	0,73
	0,427	
47	0,496	0,70
	0,419	
SAU 1	0,313	0,37
	0,287	
SAU 2	0,338	0,47
	0,360	
SAU1 – tekući	0,426	0,63
	0,426	
SAU2 – tekući	0,554	0,89
	0,554	
47 - tekući	1,140	2,00
	1,050	

**Tablica 29.** Rezultati 1. mjerenja apsorbancije kreatinina „in house“ Jaffeovom metodom za odabrane uzorke i komercijalne kontrole

Mjerenje 2		
Uzorak	Apsorbancija	Koncentracija kreatinina (mmol/dL)
3	0,305	0,41
	0,329	
5	0,273	0,31
	0,264	
17	0,207	0,16
	0,189	
18	0,231	0,23
	0,227	
19	0,232	0,23
	0,226	
24	0,219	0,19
	0,199	
27	0,308	0,38
	0,301	
29	0,309	0,35
	0,272	
37	0,495	0,75
	0,470	
47	0,412	0,61
	0,415	
SAU 1	0,349	0,45
	0,329	
SAU 2	0,337	0,43
	0,317	
SAU1 - tekući	0,425	0,63
	0,425	
SAU2 - tekući	0,592	0,97
	0,592	
47 - tekući	0,796	1,39
	0,796	

*Tablica 30. Rezultati 2. mjerenja apsorbancije kreatinina „in house“ Jaffeovom metodom za odabrane uzorke i komercijalne kontrole*

Mjerenje 3		
Uzorak	Apsorbancija	Koncentracija kreatinina (mmol/dL)
3	0,441	0,63
	0,408	
5	0,277	0,36
	0,314	
17	0,248	0,26
	0,239	
18	0,256	0,27
	0,244	

Uzorak	Apsorbancija	Koncentracija kreatinina (mmol/dL)
19	0,249	0,30
	0,278	
24	0,242	0,25
	0,238	
27	0,381	0,52
	0,362	
29	0,285	0,33
	0,274	
37	0,497	0,75
	0,472	
47	0,587	0,96
	0,581	
SAU 1	0,327	0,40
	0,296	
SAU 2	0,366	0,50
	0,357	
SAU 1 - tekući	0,439	0,66
	0,439	
SAU2 - tekući	0,613	1,01
	0,613	
47 - tekući	0,860	1,52
	0,796	

**Tablica 31.** Rezultati 3. mjerenja apsorbancije kreatinina „in house“ Jaffeovom metodom za odabrane uzorke i komercijalne kontrole

Temeljem dobivenih rezultata u 3 ponavljana mjerenja primjećuje se da su jedino tekući uzorci mokraće davali usporedive rezultate, dok su rezultati eluata iz filter papira varirali. Neki od uzoraka eluata su imali prihvatljive rezultate iz mjerenja u mjerenje, a neki potpuno neusporedive. Metoda je prihvatljiva jedino za tekuće uzorke.

#### 4.2.6. Rezultati mjerenja *in house* metodom za određivanja GAG-ova s DMB-om

Za GAG-ove se u obradi rezultata nije koristila uvijek ista kalibracijska krivulja, već ona koja je napravljena tog dana kada su se mjerili uzorci, za razliku od kalibracijske krivulje za kreatinin, koja se pokazala stabilnom i mogla se koristiti za svako mjerenje.

U tablici 32. prikazani su rezultati za uzorke 1-25. Rezultati za koncentraciju GAG-ova dobiveni su prema jednadžbi  $\bar{A} = -0,00493 x + 0,54323$  gdje je  $x$  količina GAG-ova, a  $\bar{A}$  srednja vrijednost izmjerenih apsorbancija. Ova kalibracijska krivulja odgovara onoj ranije prikazanoj u tablici 15. i na grafu 8..



Uzorak	Apsorbancija	mg GAG-ova
1	0,563	-2,8
	0,551	
2	0,554	-2,9
	0,561	
3	0,511	6,5
	0,511	
4	0,599	-6,9
	0,556	
5	0,562	-5,4
	0,578	
6	0,558	-1,7
	0,545	
7	0,511	6,0
	0,516	
8	0,620	-11,6
	0,581	
9	0,568	-4,4
	0,562	
10	0,548	2,8
	0,511	
11	0,531	1,8
	0,538	
12	0,621	-11,7
	0,581	
13	0,586	-7,2
	0,571	
14	0,513	6,1
	0,513	
15	0,531	2,7
	0,529	
16	0,593	-6,4
	0,556	
17	0,556	-2,1
	0,551	
18	0,544	3,1
	0,512	
19	0,518	5,4
	0,515	
20	0,613	-10,5
	0,577	
21	0,575	-6,8
	0,578	
22	0,547	-0,8
	0,547	
23	0,517	4,7
	0,523	

Uzorak	Apsorbancija	mg GAG-ova
24	0,572	-3,1
	0,545	
25	0,558	-3,1
	0,559	

**Tablica 32.** Rezultati mjerenja apsorbancije GAG-ova „in house“ DMB metodom za uzorke 1 - 25

Dobiveni rezultati upućuju na nedovoljno i nereproducibilno eluiranje mokraće iz uzorka suhe kapi mokraće na filter papiru za većinu uzoraka.

U tablici 33. prikazani su rezultati za uzorke 26-47. Rezultati za koncentraciju GAG-ova dobiveni su prema jednadžbi  $\bar{A} = -0,00386 x + 0,49509$  gdje je x količina GAG-ova, a  $\bar{A}$  srednja vrijednost izmjerenih apsorbancija. Ova kalibracijska krivulja odgovara onoj ranije prikazanoj u Tablici 10. i na Grafu 3..

Uzorak	Apsorbancija GAG-ova	mg GAG-ova
26	0,575	-18,6
	0,559	
27	0,553	-13,8
	0,544	
28	0,595	-23,8
	0,579	
29	0,570	-20,2
	0,576	
30	0,565	-19,3
	0,574	
31	0,582	-24,6
	0,598	
32	0,591	-24,5
	0,588	
33	0,578	-21,0
	0,574	
34	0,586	-23,0
	0,582	
35	0,584	-21,2
	0,570	
36	0,566	-17,5
	0,559	
37	0,562	-16,2
	0,553	
38	0,576	-21,6
	0,581	

Uzorak	Apsorbancija GAG-ova	mg GAG-ova
39	0,606	-24,9
	0,576	
40	0,577	-21,0
	0,583	
41	0,567	-16,8
	0,553	
42	0,561	-20,3
	0,586	
43	0,596	-23,8
	0,578	
44	0,582	-22,3
	0,580	
45	0,575	-21,9
	0,584	
46	0,575	-24,1
	0,601	
47	0,567	-19,7
	0,575	

**Tablica 33.** Rezultati mjerenja apsorbancije GAG-ova „in house“ DMB metodom za uzorke 26 - 47

Dobiveni rezultati upućuju na nedovoljno i nereproducibilno eluiranje mokraće iz uzorka suhe kapi mokraće na filter papiru.

U sljedećem mjerenju izmjerene su komercijalne kontrole SAU 1 i SAU 2 iz eluata filter papira. Rezultati su prikazani u tablici 34.. Rezultati za koncentraciju GAG-ova dobiveni su prema jednadžbi  $\bar{A} = -0,00493 x + 0,54323$  gdje je x količina GAG-ova, a  $\bar{A}$  srednja vrijednost izmjerenih apsorbancija. Ova kalibracijska krivulja odgovara onoj ranije prikazanoj u tablici 15. i na grafu 8..

Uzorak	Apsorbancija GAG-ova	mg GAG-ova
SAU 1	0,522	5,1
	0,514	
SAU2	0,532	4,0
	0,515	

**Tablica 34.** Rezultati mjerenja apsorbancije GAG-ova „in house“ DMB metodom za komercijalne kontrole SAU 1 i SAU 2

Dobiveni rezultati upućuju da je eluiranje iz kontrolnih uzorka suhe kapi mokraće na filter papiru bilo djelomično ili potpuno uspješno, što će se pokazati kada dobiveni rezultat

bude podijeljen s dobivenom koncentracijom kreatinina i konačni rezultat bude uspoređen s navodom proizvođača.

Završno, odabrani su neki od uzoraka izrazito visokog i niskog omjera GAG-ova prema mmol kreatinina (3, 5, 17, 18, 19, 24, 27, 29, 37, 47; mjerenje Blyscan testom, opisano u 4.1.3.) . Mjerenja su ponavljana tri puta (svaki puta uz novu kalibracijsku krivulju za GAG-ove). Uz uzorke su mjerene i koncentracije komercijalnih kontrola SAU 1 i SAU 2 (eluati iz uzorka suhih kapi). Istovremeno su mjereni i tekući uzorci SAU 1 i SAU 2 te tekući uzorak mokraće br. 47 (pripremljeni prema postupku 4.2.4.). Rezultati mjerenja su prikazani u tablicama 35., 36. i 37..

Rezultati za koncentraciju GAG-ova u tablici 35. dobiveni su prema jednadžbi  $\bar{A} = -0,00395 x + 0,4512$  gdje je x količina GAG-ova, a  $\bar{A}$  srednja vrijednost izmjerenih apsorbancija. Ova kalibracijska krivulja odgovara onoj ranije prikazanoj u tablici 13. i na grafu 6..

Mjerenje 1		
Uzorak	Apsorbancija GAG-ova	mg GAG-ova
3	0,457	-8,2
	0,510	
5	0,456	-3,1
	0,471	
17	0,498	-9,6
	0,480	
18	0,490	-8,9
	0,483	
19	0,470	-6,2
	0,481	
24	0,468	-2,5
	0,454	
27	0,477	-5,8
	0,471	
29	0,485	-9,7
	0,494	
37	0,477	-4,8
	0,463	
47	0,457	-1,6
	0,458	
SAU 1	0,459	-2,1
	0,460	
SAU 2	0,462	-2,7
	0,462	

Uzorak	Apsorbancija GAG-ova	mg GAG-ova
SAU1 - tekući	0,402	10,7
	0,416	
SAU2 - tekući	0,442	1,6
	0,448	
47 - tekući	0,320	34,5
	0,310	

**Tablica 35.** Rezultati 1. mjerenja apsorbancije GAG-ova „in house“ DMB metodom za odabrane uzorke i komercijalne kontrole

Dobiveni rezultati upućuju na nedovoljno i nereproducibilno eluiranje mokraće iz uzorka suhe kapi mokraće na filter papiru za većinu uzoraka. Za rezultate tekućih uzoraka će se vidjeti jesu li prihvatljivi nakon dijeljenja s dobivenom koncentracijom kreatinina i usporedbe s rezultatima Blyscan metode.

Rezultati za koncentraciju GAG-ova u tablici 36. dobiveni su prema jednadžbi  $\bar{A} = -0,00488x + 0,56323$  gdje je  $x$  količina GAG-ova, a  $\bar{A}$  srednja vrijednost izmjerenih apsorbancija. Ova kalibracijska krivulja odgovara onoj ranije prikazanoj u tablici 16. i na grafu 9..

Mjerenje 2		
Uzorak	Apsorbancija GAG-ova	mg GAG-ova
3	0,547	2,4
	0,556	
5	0,576	-1,6
	0,566	
17	0,56	0,8
	0,559	
18	0,597	-6,2
	0,59	
19	0,584	-4,6
	0,587	
24	0,556	1,0
	0,561	
27	0,583	-1,5
	0,558	
29	0,582	-3,9
	0,582	
37	0,584	-4,8
	0,589	
47	0,544	2,5
	0,558	

Uzorak	Apsorbancija GAG-ova	mg GAG-ova
SAU 1	0,584	-2,8
	0,57	
SAU 2	0,564	-0,1
	0,563	
SAU 1 – tekući	0,518	9,3
	0,518	
SAU 2 – tekući	0,54	4,8
	0,54	
47 - tekući	0,358	42,1
	0,358	

**Tablica 36.** Rezultati 2. mjerenja apsorbancije GAG-ova „in house“ DMB metodom za odabrane uzorke i komercijalne kontrole

Dobiveni rezultati upućuju na nedovoljno i nereproducibilno eluiranje mokraće iz uzorka suhe kapi mokraće na filter papiru za većinu uzoraka. Za rezultate tekućih uzoraka će se vidjeti jesu li prihvatljivi nakon dijeljenja s dobivenom koncentracijom kreatinina i usporedbe s rezultatima Blyscan metode.

Rezultati za koncentraciju GAG-ova u tablici 37. dobiveni su prema jednadžbi  $\bar{A} = -0,0042 x + 0,55726$  gdje je  $x$  količina GAG-ova, a  $\bar{A}$  srednja vrijednost izmjerenih apsorbancija. Ova kalibracijska krivulja odgovara onoj ranije prikazanoj u tablici 17. i na grafu 10..

Mjerenje 3		
Uzorak	Apsorbancija GAG-ova	mg GAG-ova
3	0,569	-11,7
	0,644	
5	0,568	-5,2
	0,59	
17	0,594	-7,6
	0,584	
18	0,561	-3,9
	0,586	
19	0,599	-8,6
	0,588	
24	0,569	-0,9
	0,553	
27	0,561	-3,6
	0,584	
29	0,586	-7,1
	0,588	

Uzorak	Apsorbancija GAG-ova	mg GAG-ova
37	0,607	-13,6
	0,622	
47	0,556	3,5
	0,529	
SAU 1	0,578	-6,0
	0,587	
SAU 2	0,587	-6,1
	0,579	
SAU 1 - tekući	0,496	12,9
	0,51	
SAU 2 - tekući	0,527	6,9
	0,53	
47 - tekući	0,339	51,9
	0,34	

**Tablica 37.** Rezultati 3. mjerenja apsorbancije GAG-ova „in house“ DMB metodom za odabrane uzorke i komercijalne kontrole

Dobiveni rezultati upućuju na nedovoljno i nereproducibilno eluiranje mokraće iz uzorka suhe kapi mokraće na filter papiru za većinu uzoraka. Za rezultate tekućih uzoraka će se vidjeti jesu li prihvatljivi nakon dijeljenja s dobivenom koncentracijom kreatinina i usporedbe s rezultatima Blyscan metode.

#### 4.2.7. Usporedba rezultata dobivenih metodom s Blyscan reagensom i *in house* metodom

U tablici 38., za uzorke 1-25, prikazani su konačni rezultati za mg GAG-ova i za koncentraciju kreatinina dobivenu *in house* metodom (podatci iz tablica 26. i 32.). Također, prikazan je konačan omjer mg GAG-ova/mmol kreatinina za *in house* metodu u usporedbi s rezultatima dobivenim metodom s Blyscan reagensom (podaci iz tablice 5.).

Uzorak	Rezultati <i>in house</i> metode			Blyscan metoda
	mg GAG-ova	Kreatinin (mmol/dL)	mg GAG-ova/ mmol kreatinina	mg GAG-ova/ mmol kreatinina
1	-2,8	0,75	-3,7	4,3
2	-2,9	0,42	-6,9	5,1
3	6,5	0,40	16,3	4,0
4	-6,9	0,58	-11,9	8,1
5	-5,4	0,30	-18,0	5,9
6	-1,7	0,55	-3,1	2,2
7	6,0	0,36	16,7	4,6
8	-11,6	0,41	-28,3	9,2

Uzorak	Rezultati <i>in house</i> metode			Blyscan metoda
	mg GAG-ova	Kreatinin (mmol/dL)	mg GAG-ova/ mmol kreatinina	mg GAG-ova/ mmol kreatinina
9	-4,4	0,38	-11,6	0,4
<b>10</b>	<b>2,8</b>	<b>0,31</b>	<b>9,0</b>	<b>5,5</b>
<b>11</b>	<b>1,8</b>	<b>0,32</b>	<b>5,6</b>	<b>5,9</b>
12	-11,7	0,43	-27,2	5,4
13	-7,2	0,22	-32,7	15,3
14	6,1	0,37	16,5	1,1
15	2,7	0,33	8,2	2,7
16	-6,4	0,42	-15,2	6,0
17	-2,1	0,18	-11,7	18,0
18	3,1	0,21	14,8	21,6
19	5,4	0,24	22,5	3,1
20	-10,5	0,22	-47,7	11,4
21	-6,8	0,20	-34,0	8,1
22	-0,8	0,42	-1,9	7,4
23	4,7	0,20	23,5	5,5
24	-3,1	0,30	-10,3	90,8
25	-3,1	0,41	-7,6	5,4

**Tablica 38.** Usporedba rezultata dobivenih Blyscan i „in house“ metodom za uzorke 1-25

Od 25 uspoređenih uzoraka, jedino uzorci 10 i 11 imaju rezultate slične rezultatu dobivenom Blyscan metodom. Ostali uzorci imaju potpuno neusporedive rezultate, što upućuje na to da se ne može pouzdano znati kada i koji uzorci su se dobro eluirali.

U tablici 39., za uzorke 26-47, prikazani su konačni rezultati za mg GAG-ova i za koncentraciju kreatinina dobivenu *in house* metodom (podatci iz tablica 27. i 33.). Također, prikazan je konačan omjer mg GAG-ova/mmol kreatinina za *in house* metodu u usporedbi s rezultatima dobivenim metodom s Blyscan reagensom (podatci iz tablice 5.).

Uzorak	Rezultati <i>in house</i> metode			Blyscan metoda
	mg GAG-ova	Kreatinin (mmol/dL)	mg GAG-ova/ mmol kreatinina	mg GAG-ova/ mmol kreatinina
26	-18,6	0,18	-103,3	4,8
27	-13,8	0,18	-76,7	16,7
28	-23,8	0,24	-99,2	6,0
29	-20,2	0,41	-49,3	7,8
30	-19,3	0,36	-53,6	12,1
31	-24,6	0,20	-123,0	4,1
32	-24,5	0,17	-144,1	8,4



	Rezultati <i>in house</i> metode			Blyscan metoda
Uzorak	mg GAG-ova	Kreatinin (mmol/dL)	mg GAG-ova/ mmol kreatinina	mg GAG-ova/ mmol kreatinina
33	-21,0	0,41	-51,2	3,1
34	-23,0	0,41	-56,1	3,6
35	-21,2	0,18	-117,8	10,3
36	-17,5	0,30	-58,3	3,3
37	-16,2	0,38	-42,6	0,4
38	-21,6	0,22	-98,2	4,6
39	-24,9	0,24	-103,8	3,8
40	-21,0	0,56	-37,5	4,4
41	-16,8	0,28	-60,0	4,2
42	-20,3	0,33	-61,5	19,3
43	-23,8	0,32	-74,4	6,6
44	-22,3	0,27	-82,6	9,6
45	-21,9	0,25	-87,6	28,6
46	-24,1	0,36	-66,9	1,3
47	-19,7	0,17	-115,9	13,3

**Tablica 39.** Usporedba rezultata dobivenih Blyscan i „in house“ metodom za uzorke 26 - 47

Od 21 uspoređenog uzorka, niti jedan ne daje usporediv rezultat. Eluiranje nije bilo uspješno.

U tablici 40., za komercijalne kontrole SAU 1 i SAU 2 prikazani su konačni rezultati za mg GAG-ova i za koncentraciju kreatinina dobivenu *in house* metodom (podaci iz tablica 28. i 34.). Također, prikazan je konačan omjer mg GAG-ova/mmol kreatinina za *in house* metodu u usporedbi s navodom proizvođača (navedeno u točkama 3.3.4.e. i 3.3.4.f.)

	Rezultati <i>in house</i> metode			Navod proizvođača
Uzorak	mg GAG-ova	Kreatinin (mmol/dL)	mg GAG-ova/ mmol kreatinina	mg GAG-ova/ mmol kreatinina
SAU 1	5,1	0,30	17,0	25,5 - 30,7
SAU 2	4,0	0,35	11,4	3,7 - 5,1

**Tablica 40.** Usporedba rezultata dobivenih „in house“ metodom s navodom proizvođača za komercijalne kontrole SAU 1 i SAU 2

Iz rezultata se primjećuje da je rezultat *in house* metode za komercijalnu kontrolu SAU 1 niži od raspona koji navodi proizvođač, dok je rezultat *in house* metode za komercijalnu kontrolu SAU 2 veći od raspona koji navodi proizvođač. Nije moguće pouzdano znati jesu li uzorci dobro eluirani.

U tablici 41., za uzorke 3, 5, 17, 18, 19, 24, 27, 29, 37, 47 i komercijalne kontrole SAU 1 i SAU 2, prikazani su konačni rezultati Mjerenja 1 za mg GAG-ova i za koncentraciju kreatinina dobivenu *in house* metodom (podaci iz tablica 29. i 35.). Također, prikazan je konačan omjer mg GAG-ova/mmol kreatinina za *in house* metodu u usporedbi s rezultatima dobivenim metodom s Blyscan reagensom (podatci iz tablice 5.) a za komercijalne kontrole napravljena je usporedba s navodom proizvođača (navedeno u točkama 3.3.4.e. i 3.3.4.f.).

Uzorak	Rezultati <i>in house</i> metode			Rezultat Blyscan metode/navod proizvođača
	mg GAG-ova	Kreatinin (mmol/dL)	mg GAG-ova/mmol kreatinina	mg GAG-ova/mmol kreatinina
3	-8,2	0,45	-18,2	4,0
5	-3,1	0,40	-7,8	5,9
17	-9,6	0,22	-43,6	18,0
18	-8,9	0,24	-37,1	21,6
19	-6,2	0,30	-20,7	3,1
24	-2,5	0,23	-10,9	90,8
27	-5,8	0,50	-11,6	16,7
29	-9,7	0,35	-27,7	7,8
37	-4,8	0,73	-6,6	0,4
47	-1,6	0,70	-2,3	13,3
SAU 1	-2,1	0,37	-5,7	25,5 - 30,7
SAU 2	-2,7	0,47	-5,7	3,7 - 5,1
SAU1 - tekući	10,7	0,63	17,0	25,5 - 30,7
SAU 2 - tekući	1,6	0,89	1,8	3,7 - 5,1
47 - tekući	34,5	2,00	17,3	13,3

**Tablica 41.** Usporedba rezultata 1. mjerenja dobivenih Blyscan i „in house“ metodom za odabrane uzorke i komercijalne kontrole

Iz rezultata se primjećuje da je rezultat *in house* metode za uzorak tekuće komercijalne kontrole SAU 1 niži od raspona koji navodi proizvođač, a takav je rezultat *in house* metode i za uzorak tekuće komercijalne kontrole SAU 2. Rezultat *in house* metode za tekući uzorak 47 je usporediv rezultatu Blyscan metode. Niti jedan rezultat iz eluata filter papira nije uspješan niti usporediv s rezultatom Blyscan metode.

U tablici 42., za uzorke 3, 5, 17, 18, 19, 24, 27, 29, 37, 47 i komercijalne kontrole SAU 1 i SAU 2, prikazani su konačni rezultati Mjerenja 2 za mg GAG-ova i za koncentraciju kreatinina dobivenu *in house* metodom (podaci iz tablica 30. i 36.). Također, prikazan je konačan omjer mg GAG-ova/mmol kreatinina za *in house* metodu u usporedbi s rezultatima dobivenim metodom s Blyscan reagensom (podatci iz tablice 5.) a za komercijalne kontrole napravljena je usporedba s navodom proizvođača (navedeno u točkama 3.3.4.e. i 3.3.4.f.).

Uzorak	Rezultati <i>in house</i> metode			Rezultat Blyscan metode/navod proizvođača
	mg GAG-ova	Kreatinin (mmol/dL)	mg GAG-ova/ mmol kreatinina	mg GAG-ova/ mmol kreatinina
3	2,4	0,41	5,9	4,0
5	-1,6	0,31	-5,2	5,9
17	0,8	0,16	5,0	18,0
18	-6,2	0,23	-27,0	21,6
19	-4,6	0,23	-20,0	3,1
24	1,0	0,19	5,3	90,8
27	-1,5	0,38	-3,9	16,7
29	-3,9	0,35	-11,1	7,8
37	-4,8	0,75	-6,4	0,4
47	2,5	0,61	4,1	13,3
SAU 1	-2,8	0,45	-6,2	25,5 - 30,7
SAU 2	-0,1	0,43	-0,2	3,7 - 5,1
SAU 1 - tekući	9,3	0,63	14,8	25,5 - 30,7
<b>SAU 2 - tekući</b>	<b>4,8</b>	<b>0,97</b>	<b>4,9</b>	<b>3,7 - 5,1</b>
47 - tekući	42,1	1,39	30,3	13,3

**Tablica 42.** Usporedba rezultata 2. mjerenja dobivenih Blyscan i „in house“ metodom za odabrane uzorke i komercijalne kontrole

Rezultat *in house* metode za eluat uzorka 3 je blizak rezultatu Blyscan metode, dok rezultati za ostale uzorke nisu. Rezultat *in house* metode za tekući uzorak komercijalne kontrole SAU 1 je niži od raspona koji navodi proizvođača, kao i u mjerenju 1, a rezultat *in house* metode za tekući uzorak komercijalne kontrole SAU 2 je unutar raspona koji navodi proizvođač. Rezultat *in house* metode za tekući uzorka 47 nije sličan rezultatu Blyscan metode.

U tablici 43., za uzorke 3, 5, 17, 18, 19, 24, 27, 29, 37, 47 i komercijalne kontrole SAU 1 i SAU 2, prikazani su konačni rezultati Mjerenja 3 za mg GAG-ova i za koncentraciju kreatinina dobivenu *in house* metodom (podatci iz tablica 31. i 37.). Također, prikazan je konačan omjer mg GAG-ova/mmol kreatinina za *in house* metodu u usporedbi s rezultatima dobivenim metodom s Blyscan reagensom (podatci iz tablice 5.) a za komercijalne kontrole napravljena je usporedba s navodom proizvođača (navedeno u točkama 3.3.4.e. i 3.3.4.f.).

Uzorak	Rezultati <i>in house</i> metode			Rezultat Blyscan metode/navod proizvođača
	mg GAG-ova	Kreatinin (mmol/dL)	mg GAG-ova/mmol kreatinina	mg GAG-ova/mmol kreatinina
3	-11,7	0,63	-18,6	4,0
5	-5,2	0,36	-14,4	5,9
17	-7,6	0,26	-29,2	18,0
18	-3,9	0,27	-14,4	21,6
19	-8,6	0,30	-28,7	3,1
24	-0,9	0,25	-3,6	90,8
27	-3,6	0,52	-6,9	16,7
29	-7,1	0,33	-21,5	7,8
37	-13,6	0,75	-18,1	0,4
47	3,5	0,96	3,6	13,3
SAU 1	-6,0	0,40	-15,0	25,5 - 30,7
SAU 2	-6,1	0,50	-12,2	3,7 - 5,1
SAU 1 - tekući	12,9	0,66	19,5	25,5 - 30,7
SAU 2 - tekući	6,9	1,01	6,8	3,7 - 5,1
47 - tekući	51,9	1,52	34,1	13,3

**Tablica 43.** Usporedba rezultata 3. mjerenja dobivenih Blyscan i „in house“ metodom za odabrane uzorke i komercijalne kontrole

Niti jedan rezultat *in house* metode za uzorke eluirane iz filter papira ne daje usporediv rezultat s rezultatom Blyscan metode. Rezultat *in house* metode za tekući uzorak komercijalne kontrole SAU 1 je ispod raspona koji navodi proizvođač, kao i u mjerenjima 1 i 2, a rezultat *in house* metode za tekući uzorak komercijalne kontrole SAU 2 je iznad raspona koji navodi proizvođač. Rezultat *in house* metode za tekući uzorak 47 nije slično rezultatu Blyscan metode, kao i kod mjerenja 2.

## 5. ZAKLJUČCI

1. U *in house* metodi za mjerenje GAG-ova radna otopina boje DMB nije stabilna i potrebno ju je pripremati neposredno prije svakog mjerenja. Tako pripremljena otopina stabilna je na sobnoj temperaturi najviše 10 sati. Formijatni pufer ne utječe na stabilnost radne otopine boje.

2. U *in house* metodi za mjerenje GAG-ova na pripremu kalibracijskih točaka i tekućih uzoraka značajno utječe pipetiranje i vorteksiranje, odnosno mjerenja se razlikuju u svakoj sekvenci, što znatno ovisi o analitičaru i načinu njegovog rukovanja s uzorcima.

3. Kalibracijska krivulja za kreatinin *in house* Jaffeovom metodom u mikrotitarskoj pločici je pouzdana i stabilna. Nije potrebno izrađivati novu krivulju za svaku novu sekvencu. Mjerenje koncentracije kreatinina u mikrotitarskoj pločici ovom metodom je pouzdana i prihvatljiva metoda.

4. Kalibracijska krivulja za GAG-ove *in house* metodom u mikrotitarskoj pločici nije pouzdana i potrebno je izrađivati novu krivulju prije svakog mjerenja. Krivulja je ovisna o pripremljenom radnom reagensu.

5. Ispitivana *in house* metoda za GAG-ove pouzdana je isključivo za probir iz tekućih uzoraka mokraće. Iz uzorka suhe kapi mokraće nije moguće reproducibilno ekstrahirati GAG-ove.

6. U Blyscan metodi za mjerenje GAG-ova se koristi manji volumen mokraće (25  $\mu$ L) nego u *in house* metodi (40  $\mu$ L). *In house* metoda je vremenski zahtjevnija. Uspoređujući *in house* metodu s Blyscan metodom, jedina prednost *in house* metode bila bi niža cijena reagensa. Određivanje GAG-ova kolorimetrijskom metodom s Blyscan reagensom je pouzdana metoda probira na mukopolisaharidoze.

7. Ispitivana *in house* metoda za mjerenje GAG-ova iz uzoraka suhe kapi mokraće prikupljene na filter papiru nije prihvatljiva za rutinski probir na mukopolisaharidoze..

8. Umjesto slanja suhe kapi mokraće na filter papiru, moguće bi bilo i slanje malog volumena uzoraka mokraće (oko 100  $\mu$ L) u manjim Eppendorf epruvetama (0,5 mL) u odgovarajućim kuvertama brzom poštom do laboratorija.

## 6. LITERATURA

Afyoncu E., Yılmaz G., Yılmaz F.M., Yücel D. Performance of different screening methods for the determination of urinary glycosaminoclycans. *Clin Chem Lab Med*, 2013, 51, 347-350.

Andrade F., Priero J.A., Elorz J., Martin S., Sanjurjo P., Aldamiz-Echevarria L. Stability of urinary glycosaminoglycans in patients with mucopolysaccharidoses. *Clin Chim Acta*, 2008, 388, 73–77.

Auray-Blais C., Bhérer P., Gagnon R., Young S. P., Zhang H. H., An Y., Clarke J.T.R., Millington D.S. Efficient analysis of urinary glycosaminoglycans by LC-MS/MS in mucopolysaccharidoses type I, II and VI. *Clin Chim Acta*, 2011, 102, 49 – 56.

Auray-Blais C., Lavoie P., Zhang H. H., Gagnon R., Clarke J.T.R., Maranda B., Young S. P., An Y., Millington D.S. An improved method for glycosaminoglycan analysis by LC–MS/MS of urine samples collected on filter paper. *Clin Chim Acta*, 2012, 413, 771-778.

Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. Biokemija. Zagreb, Školska knjiga, 2013, str. 319

Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay-uputa proizvođača dobivena uz reagense, Biocolor Ltd., 2010.

Brusius-Facchin A.C, Siebert M., Leão D., Rojas Malaga D., Pasqualim G., Trapp F., Matte U., Giugliani R., Leistner-Segal S. Phenotype-oriented NGS panels for mucopolysaccharidoses: Validation and potential use in the diagnostic flowchart. *Genet Mol Biol*, 2019, 42, 207-214.

Colón C., Alvarez J.V., Castaño C., Gutierrez-Solana L.G., Marquez A.M., O’Callaghan M., Sánchez-Valverde F., Yeste C., Couce M-L. A selective screening program for the early detection of mucopolysaccharidosis: Results of the FIND project – a 2-year follow-up study. *Medicine*, 2017, 96, 19.

Conzelmann E., Sandhoff K. Partial Enzyme Deficiencies: Residual Activities and the Development of Neurological Disorders. *Dev Neurosci*, 1983/84, 58-71.

Cooper G.M., Hausman R. E. Stanica : molekularni pristup. Medicinska naklada, 2004, str. 389.

Coutinho M.F., Lacerda L., Alves S. Glycosaminoglycan Storage Disorders: A Review. *Biochem Res Int*, 2012.

de Jong J.G.N. Heijs W.M.J., Wevers R.A. Mucopolysaccharidoses screening: dimethylmethylene blue versus Alcian blue. *Ann Clin Biochem*, 1994, 31, 267-271.

de Jong J. G. N., Wevers R. A., Liebrand-van Sambeek R. Measuring Urinary Glycosaminoglycans in the Presence of Protein: An Improved Screening Procedure for Mucopolysaccharidoses Based on Dimethylmethylene Blue. *Clin Chem*, 1992, 38, 803-807.

Frazier S. B., Roodhouse K. A., Hourcade D.E., Zhang L. The Quantification of Glycosaminoglycans: A Comparison of HPLC, Carbazole, and Alcian Blue Methods. *Open Glycosci*, 2008, 1, 31-39.

Fumić K., Barić I., Mrić M., Maradin M. Lizosomske bolesti nakupljanja - suvremena dijagnostika i nove mogućnosti liječenja. *Paediatr croat*, 2004, 48, 160-168.

Han X., Sanderson P., Nesheiwat S., Lin L., Yu Y., Zhang F., Amster J., Linhardt R. J. Structural analysis of urinary glycosaminoglycans from healthy human subjects. *Glycobiology*, 2020, 30, 143-151.

Muenzer J. Overview of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology*, 2011, 50, v4-v12.

Nacrt nacionalnog programa za rijetke bolesti za razdoblje 2014. – 2019., 2014., <http://zdravstvo.gov.hr>, pristupljeno 25.11.2019.

O bolestima, <http://www.rijetke-bolesti.hr/>, pristupljeno 25.11.2019.

Pandey S., Polipalli S. K., Kapoor S. Dimethyl methylene blue: a tool for mps screening. *Int. J. Bioassays*, 2015, 4, 4269-4271.

Pennock C. A. A review and selection of simple laboratory methods used for the study of glycosaminoglycan excretion and the diagnosis of the mucopolysaccharidoses. *J clin Path*, 1976, 29, 111-123.

Platt F.M., d'Azzo A., Davidson B.L., Neufeld E.F., Tiffit C.J. Lysosomal storage diseases. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4, 27.



Scriver C. R., Beaudet A.L, Sly W. S., Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease, vol. II, 8. edition. McGraw-Hill Professional, 2000, str. 2465.

Vassev K.K., Blat D., Olczyk P., Szeremeta A, Półtorak A.J., Winsz-Szczotka K., Klimek K., Olczyk K. Urinary glycosaminoglycan (uGAG) excretion in healthy pediatric and adolescent population. *Clin Biochem*, 2014, 47, 1341-1343.

Vodič kroz mukopolisaharidoze, 2014., <http://www.rijetke-bolesti.hr>, pristupljeno 25.11.2019.

Whiteman P. The Quantitative Measurement of Alcian Blue-Glycosaminoglycan Complexes. *Biochem J*, 1973, 131, 343 – 350.

Whitley C.B, Ridnour M.D., Draper K.A., Dutton C.M., Neglia J.P. Diagnostic Test for Mucopolysaccharidosis. I. Direct Method for Quantifying Glycosaminoglycan Excretion. *Clin Chem*, 1989, 35, 374-379.

Winchester B. Lysosomal diseases: diagnostic update. *J Inherit Metab Di*, 2014, 37, 599–608.

## 7. SAŽETAK / SUMMARY

Mukopolisaharidoze su podgrupa lizosomskih bolesti nakupljanja. Ove bolesti predstavljaju izazov suvremenoj kliničkoj i laboratorijskoj dijagnostici zbog heterogenosti simptoma i raznih oblika patofiziološke manifestacije. Rano postavljanje dijagnoze povećava mogućnosti početka liječenja i oporavka, a to je moguće samo ako postoje brzi i pouzdani testovi. Nakon postavljanja kliničke sumnje, laboratorijska dijagnostika mukopolisaharidoza započinje određivanjem koncentracije glikozaminoglikana u mokraći.

Inspiracija za ovaj diplomski rad dobivena je iz studije koja opisuje rezultate dvogodišnjeg FIND projekta u Španjolskoj. Jedinica za dijagnozu i liječenje kongenitalnih metaboličkih bolesti je u suradnji s MPS asocijacijom Španjolske za rijetke bolesti pokrenula FIND projekt kojim bi se rano dijagnosticirale MPS kod djece sa simptomima bolesti te podigla svijest o ovim bolestima među pedijatrima. Unutar ovog projekta razvijena je *in house* metoda za određivanje GAG-ova iz suhe kapi mokraće prikupljene na filter papiru. Svi postupci pripreme uzorka, reagensa i kalibracijskih točaka u ovom diplomskom radu napravljeni su po uzoru i preporuci Laboratorija za metaboličke bolesti Kliničke bolnice Santiago de Compostela, Španjolska.

Cilj rada je bio ispitati *in house* metodu za probir mukopolisaharidoza kako bi se pojednostavio postupak slanja uzoraka u laboratorij i ubrzala dijagnostika.

Dobiveni rezultati *in house* metodom iz uzoraka suhe kapi mokraće nisu se pokazali pouzdanima, jer se GAG-ovi neravnomjerno ekstrahiraju iz suhe kapi mokraće na filter papiru. Osim toga metoda je vremenski zahtjevnija nego što se očekivalo. Stoga ova *in house* metoda nije pogodna za probir na mukopolisaharidoze.

Njena eventualna primjena je moguća samo iz tekućih uzorka mokraće ako laboratoriju nije dostupna druga metoda. Određivanje GAG-ova kolorimetrijskom metodom s Blyscan reagensom je pouzdana metoda probira na mukopolisaharidoze koja se koristi u većini metaboličkih laboratorija.

Mucopolysaccharidosis is a subset of lysosomal storage diseases. These diseases present a challenge to modern clinical and laboratory diagnostics due to the heterogeneity of symptoms and various forms of pathophysiological manifestation. Early diagnosis increases the chances of starting treatment and recovery, and this is only possible if there are fast and reliable tests. After setting the clinical suspicion, laboratory diagnosis of mucopolysaccharidosis begins with determining the concentration of glycosaminoglycans in the urine.

The inspiration for this thesis was obtained from a study describing the results of a two-year FIND project in Spain. The Congenital Metabolic Diseases Diagnosis and Treatment Unit, in collaboration with the Spanish MPS Association for Rare Diseases, launched the FIND project to diagnose MPS early in children with symptoms and raise awareness of these diseases among pediatricians. Within this project, an in-house method was developed to determine GAG from dry spots of urine collected on filter paper. All procedures in this thesis are made according to the model and recommendation of the Laboratory for Metabolic Diseases of the Clinical Hospital Santiago de Compostela, Spain.

The aim of the study was to examine the *in house* method for mucopolysaccharidosis screening in order to simplify the procedure of sending samples to the laboratory and speed up the diagnosis.

The results obtained with *in house* method for samples from dry urine spots did not prove to be reliable, because GAGs are unevenly extracted from dry urine spots on filter paper. In addition, the method is more time consuming than expected. Therefore this *in house* method is not suitable for screening for mucopolysaccharidosis.

Its possible application is possible only from liquid urine samples if no other method is available to the laboratory. Determination of GAGs by colorimetric method with Blyscan reagent is a reliable method for screening for mucopolysaccharidosis and is used in most metabolic laboratories.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## PROBIR NA MUKOPOLISAHARIDOZE IZ UZORKA SUHE KAPI MOKRAĆE

**Rebeka Svatić**

### SAŽETAK

Mukopolisaharidoze su podgrupa lizosomskih bolesti nakupljanja. Ove bolesti predstavljaju izazov suvremenoj kliničkoj i laboratorijskoj dijagnostici zbog heterogenosti simptoma i raznih oblika patofiziološke manifestacije. Rano postavljanje dijagnoze povećava mogućnosti početka liječenja i oporavka, a to je moguće samo ako postoje brzi i pouzdani testovi. Nakon postavljanja kliničke sumnje, laboratorijska dijagnostika mukopolisaharidoza započinje određivanjem koncentracije glikozaminoglikana u mokraći.

Inspiracija za ovaj diplomski rad dobivena je iz studije koja opisuje rezultate dvogodišnjeg FIND projekta u Španjolskoj. Jedinica za dijagnozu i liječenje kongenitalnih metaboličkih bolesti je u suradnji s MPS asocijacijom Španjolske za rijetke bolesti pokrenula FIND projekt kojim bi se rano dijagnosticirale MPS kod djece sa simptomima bolesti te podigla svijest o ovim bolestima među pedijatrima. Unutar ovog projekta razvijena je *in house* metoda za određivanje GAG-ova iz suhe kapi mokraće prikupljene na filter papiru. Svi postupci pripreme uzorka, reagensa i kalibracijskih točaka u ovom diplomskom radu napravljeni su po uzoru i preporuci Laboratorija za metaboličke bolesti Kliničke bolnice Santiago de Compostela, Španjolska.

Cilj rada je bio ispitati *in house* metodu za probir mukopolisaharidoza kako bi se pojednostavio postupak slanja uzoraka u laboratorij i ubrzala dijagnostika.

Dobiveni rezultati *in house* metodom iz uzoraka suhe kapi mokraće nisu se pokazali pouzdanima, jer se GAG-ovi neravnomjerno ekstrahiraju iz suhe kapi mokraće na filter papiru. Osim toga metoda je vremenski zahtjevnija nego što se očekivalo. Stoga ova *in house* metoda nije pogodna za probir na mukopolisaharidoze.

Njena eventualna primjena je moguća samo iz tekućih uzorka mokraće ako laboratoriju nije dostupna druga metoda.

Određivanje GAG-ova kolorimetrijskom metodom s Blyscan reagensom je pouzdana metoda probira na mukopolisaharidoze koja se koristi u većini metaboličkih laboratorija.

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

Rad sadrži: 69 stranica, 10 grafičkih prikaza, 43 tablica i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Mukopolisaharidoze, glikozaminoglikani, Blyscan test, *in house* metoda

Mentor: **Dr. sc. Ksenija Fumić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ksenija Fumić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Olga Gornik Kljaić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta..*

**Dr. sc. Toma Keser**, *asistent-znanstveni novak Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2020.

## SCREENING FOR MUCOPOLYSACCHARIDOSIS FROM A SAMPLE OF DRY URINE SPOTS

Rebeka Svatić

### SUMMARY

Mucopolysaccharidosis is a subset of lysosomal storage diseases. These diseases present a challenge to modern clinical and laboratory diagnostics due to the heterogeneity of symptoms and various forms of pathophysiological manifestation. Early diagnosis increases the chances of starting treatment and recovery, and this is only possible if there are fast and reliable tests. After setting the clinical suspicion, laboratory diagnosis of mucopolysaccharidosis begins with determining the concentration of glycosaminoglycans in the urine.

The inspiration for this thesis was obtained from a study describing the results of a two-year FIND project in Spain. The Congenital Metabolic Diseases Diagnosis and Treatment Unit, in collaboration with the Spanish MPS Association for Rare Diseases, launched the FIND project to diagnose MPS early in children with symptoms and raise awareness of these diseases among pediatricians. Within this project, an in-house method was developed to determine GAG from dry spots of urine collected on filter paper. All procedures in this thesis are made according to the model and recommendation of the Laboratory for Metabolic Diseases of the Clinical Hospital Santiago de Compostela, Spain. The aim of the study was to examine the *in house* method for mucopolysaccharidosis screening in order to simplify the procedure of sending samples to the laboratory and speed up the diagnosis.

The results obtained with *in house* method for samples from dry urine spots did not prove to be reliable, because GAGs are unevenly extracted from dry urine spots on filter paper. In addition, the method is more time consuming than expected. Therefore this *in house* method is not suitable for screening for mucopolysaccharidosis.

Its possible application is possible only from liquid urine samples if no other method is available to the laboratory. Determination of GAGs by colorimetric method with Blyscan reagent is a reliable method for screening for mucopolysaccharidosis and is used in most metabolic laboratories.

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

Thesis includes: 69 pages, 10 figures, 43 tables and 29 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Mucopolysaccharidoses, glycosaminoglycans, Blyscan assay, *in house* method

Mentor: **Ksenija Fumić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ksenija Fumić, 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  
**Toma Keser, Ph.D.** Assistant – research associate, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2020.