

Usporedba metoda mikrouzorkovanja krvi za analizu N-glikanskog profila plazme metodom HILIC-UPLC

Ferić, Marin

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:163:781396>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

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



Marin Ferić

**Usporedba metoda mikrouzorkovanja krvi za
analizu N-glikanskog profila plazme metodom
HILIC-UPLC**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitička biokemija Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Olge Gornik.

Prije svega, zahvaljujem profesorici i mentorici, prof. dr. sc. Olgi Gornik Kljaić, na stručnom usmjeravanju ovog diplomskog rada, iskazanom povjerenju i svom pruženom znanju. Asistentica Ana Cvetko, mag. med. biochem., vodila me je kroz izradu eksperimentalnog i pisanog dijela rada, bila je izrazito strpljiva i pristupačna te je stvorila vrlo ugodnu radnu atmosferu. Na svemu tome veliko joj hvala.

Hvala svim mojim prijateljima na nezaboravnim druženjima i (mentalnoj) potpori tijekom studiranja. Uvijek smo navijali jedni za druge i to ćemo činiti i dalje.

Posebno hvala Maji s kojom sam dijelio veliki dio studentskih „muka“ koje smo uspješno svladali.

Mojoj djevojci Josipi ne mogu dovoljno zahvaliti na svemu što mi je značila tijekom studiranja, na njenoj bezrezervnoj podršci, ljubavi i svim trenutcima koje smo proživjeli zajedno.

Za kraj, najveće hvala iskazujem svojoj obitelji koja je najviše doprinijela da budem tu gdje jesam. Znam da ste ponosni.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 GLIKOPROTEINI I GLIKANI	1
1.1.1 GLIKOPROTEINI I NJIHOVE FUNKCIJE	1
1.1.2 N-GLIKOZILACIJA PROTEINA	4
1.1.3 VARIJABILNOST GLIKANSKOG PROFILA	6
1.2 TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA	8
1.2.1 TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA ULTRAVISOKE DJELOTVORNOSTI, UPLC	10
1.2.2 TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA TEMELJENA NA HIDROFILNIM INTERAKCIJAMA, HILIC ...	11
1.3 METODE MIKROUZORKOVANJA KRVI ZA ANALIZU GLIKANA	13
1.3.1 METODA SUHE KAPI KRVI NA FILTER PAPIRU (DBS)	13
1.3.2 METODA VOLUMETRIJSKOG APSORPCIJSKOG MIKROUZORKOVANJA (VAMS)	15
1.3.3 METODA SUHE MRLJE PLAZME (DPS)	16
1.4 PERSONALIZIRANA MEDICINA	17
2. OBRAZLOŽENJE TEME	19
3. MATERIJALI I METODE	20
3.1 MATERIJALI	20
3.1.1 ANORGANSKE KEMIKALIJE	20
3.1.2 ORGANSKE KEMIKALIJE	20
3.1.3 BIOLOŠKI MATERIJALI	21
3.1.4 OTOPINE I PUFERI	21
3.1.5 LABORATORIJSKA OPREMA I PRIBOR	22
3.2 UZORCI	23
3.3 PROTOKOL PRIPREME UZORAKA ZA KROMATOGRAFSKU ANALIZU	24
3.3.1 PRIKUPLJANJE PRIMARNIH UZORAKA	24
3.3.2 RANDOMIZACIJA UZORAKA	24
3.3.3 OBRADA PRIMARNIH UZORAKA	25
3.3.4 IZOLACIJA N-GLIKANA S PLAZMATSKIH GLIKOPROTEINA	25
3.3.5 OBILJEŽAVANJE, PROČIŠĆAVANJE I ISPIRANJE N-GLIKANA PLAZME	26
3.3.6 ANALIZA IZOLIRANIH N-GLIKANA	27
3.3.7 STATISTIČKA OBRADA	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1 KROMATOGRAMI IZOLIRANIH N-GLIKANA	30
4.2 REZULTATI PRVE FAZE - USPOREDIVOST	36
4.3 REZULTATI DRUGE FAZE - PONOVLJIVOST	40
5. ZAKLJUČAK	44

6. LITERATURA	46
7. SAŽETAK/SUMMARY	48
7.1 SAŽETAK	48
7.2 SUMMARY	50
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	
BASIC DOCUMENTATION CARD	

POPIS KORIŠTENIH POKRATA

ACN	acetonitril
Asn	asparagin
BEH	engl. <i>bridged ethylene hybrid</i>
DBS	suha krvna mrlja (engl. <i>dried blood spot</i>)
DPS	suha mrlja plazme (engl. <i>dried plasma spot</i>)
ER	endoplazmatski retikulum
ERAD	ER-vezana degradacija (engl. <i>ER-associated degradation</i>)
EU	emisijska jedinica (engl. <i>emission unit</i>)
FLR	fluorescentni detekcijski sustav
Fuc	fukoza
GA	Golgijev aparat
Gal	galaktoza
GalNAc	N-acetilgalaktozamin
Glc	glukoza
GlcA	glukuronska kiselina
GlcNAc	N-acetilglukozamin
GP	glikanski pik
Hct	hematokrit
HETP	visina teorijskog tavana (engl. <i>Hight Equivalent to a Theoretical Plate</i>)
HILIC	tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (engl. <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i>)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
ID	unutarnji promjer (engl. <i>internal diameter</i>)
IdoA	iduronska kiselina
IgG	imunoglobulin G
Man	manoza
M	medijan
OST	oligosaharil transferaza
PDIA3	protein disulfid izomeraza A3 (engl. <i>protein disulfide isomerase A3</i>)
Ser	serin
Sia	sijalinska kiselina
TDM	terapijsko praćenje lijekova (engl. <i>therapeutic drug monitoring</i>)
Thr	treonin
UGGT1	UDP-Glc:glikoprotein glukotransferaza 1
UPLC	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. <i>ultra performance liquid chromatography</i>)
VAMS	metoda volumetrijskog apsorpcijskog mikrouzorkovanja (engl. <i>volumetric absorptive microsampling</i>)
Xyl	ksiloza

1. UVOD

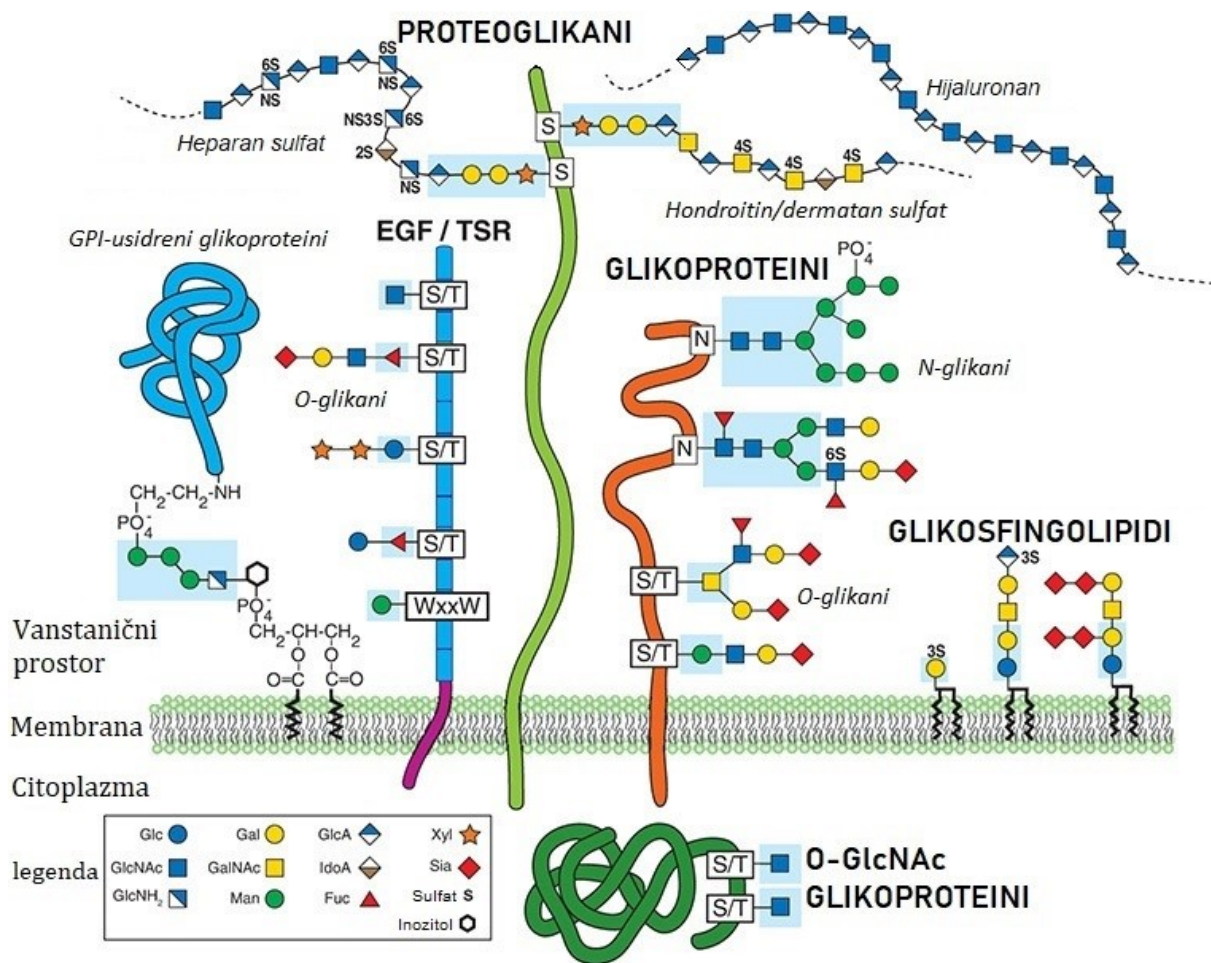
1.1 GLIKOPROTEINI I GLIKANI

1.1.1 GLIKOPROTEINI I NJIHOVE FUNKCIJE

Glikoproteini, glikolipidi i proteoglikani skupina su složenih biomolekula koje se nazivaju glikokonjugati. Glikokonjugat je kompleksna biomolekula koja se sastoji od jedne ili više ugljikohidratnih jedinica kovalentnom vezom vezanih na druge molekule, poglavito peptide, proteine i lipide. Ugljikohidratna skupina na tim glikokonjugatima naziva se glikan. Dugo je glikanski dio strukture glikokonjugata bio zanemarivan, ali posljednjih godina velik broj istraživanja u svoj fokus stavlja upravo glikane jer je postalo jasno da je glikan nerijetko presudan za funkciju biomolekule na koju je vezan, a da glikanski profil plazme ima velik dijagnostički i prognostički potencijal u medicini. U ovom radu pozornost je posvećena glikoproteinima, a posebice N-vezanim glikanima.

Glikoproteini su proteini koji na sebe imaju kovalentno vezan jedan ili više oligosaharidnih (glikanskih) struktura, a glikozilacija je najraznovrsnija posttranslacijska modifikacija proteina. (Gornik i Lauc, 2008) Važno je naglasiti da su gotovo svi membranski i izvanstanični proteini, kao i mnogi unutarstanični, glikozilirani te da su više od polovine svih proteina zapravo glikoproteini. (Lauc i sur., 2016)

Postoji cijeli spektar proteinskih glikokonjugata koji se razlikuju po vrsti i udjelu glikanskih jedinica. Na jednoj strani tog spektra nalaze se proteini poput kolagena na koje je vezan mali broj mono- ili disaharidnih struktura. Druga skupina glikoproteina su unutarstanični glikoproteini za koje je karakteristično da sadrže klastere monosaharida N-acetilglukozamina (GlcNAc) vezanih na polipeptidni lanac proteina. Mucini su glikoproteini koji sadrže mnogo kratkolančanih ogranaka O-vezanih glikana koji završavaju sijalinskom kiselinom. Za mucine je svojstveno da većinski udio njihove molekulske mase otpada upravo na glikane. Važna vrsta glikoproteina su N-vezani glikoproteini koji uglavnom imaju manji broj dužih i razgranatih saharidnih lanaca koji imaju zajedničku sržnu strukturu, a ta vrlo raznolika skupina glikoproteina najbolje je istražena. Na drugom kraju spektra proteinskih glikokonjugata nalaze se proteoglikani koji mogu sadržavati preko stotinu velikih polisaharidnih postranih lanaca glikozaminoglikana, ali i N-vezanih i mucinskih saharida, vezanih na dugačku polipeptidnu srž (Slika 1.). (Hart, 2003)



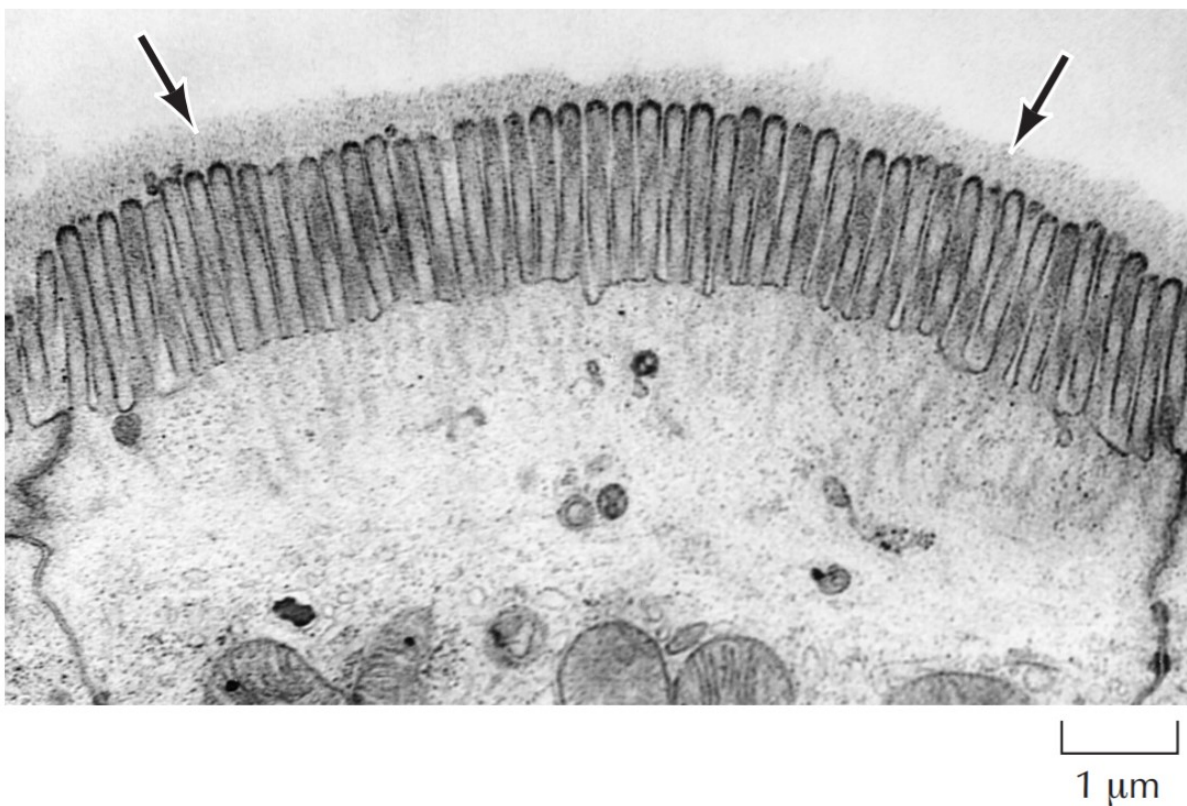
Slika 1. Prikaz važnih proteinskih glikokonjugata na koje su vezane odgovarajuće glikanske strukture. (preuzeto i prilagođeno iz Varki i sur., 2017)

Glikani doprinose funkciji proteina na 3 načina: (1) predstavljaju integralni dio proteina, stoga su važni za definiranje njihovih fizikalno-kemijskih svojstava kao što su smatanje, topivost i stabilnost, (2) služe za fino uštímanje proteinske strukture, a samim time i za moduliranje funkcije proteina alternativnim glikozilacijama i (3) služe kao neovisna mjesta vezanja za lektine¹. (Lauc i sur., 2016)

Glikani vezani na proteine često su nužni za sekreciju proteina jer utječu na njihovo pravilno smatanje. Glikoproteini na površini stanične membrane služe kao ligandi za staničnu adheziju, sudjeluju u signalnim putevima, endocitozi i vezanju na lektine. Stoga glikani pridonose pravilnom imunom odgovoru organizma, sudjeluju u upalnim reakcijama i reguliranju funkcije antitijela. Nadalje, glikani u glikoproteinima imaju važnu ulogu u hormonskoj regulaciji, modulaciji aktivnosti receptora, metastaziranju tumora i interakciji

¹ Lektini su proteini koji specifično vežu glikanske strukture

patogenih i komenzalnih² mikroorganizama sa stanicom domaćina. (Moremen, 2012; Lauc i sur., 2016) Fascinantna je činjenica da ugljikohidratni dijelovi glikolipida i glikoproteina na staničnoj membrani čine čak 5-10 % ukupne mase membrane (Cooper, 2010), a elektronskom mikroskopijom jasno se može vidjeti da su stanice prekrivene gustim slojem glikana, glikokaliksom, koji je 10 do 1000 puta deblji od samog lipidnog dvosloja što se može vidjeti na slici 2. (Lauc i sur., 2016) Glikokaliks se sastoji od oligosaharida vezanih na proteine i lipide ugrađene u staničnu membranu i nalazi se isključivo na vanjskoj strani stanice. Čak i najjednostavnije eukariotske stanice, poput eritrocita, imaju vrlo razvijen glikokaliks. (Hart, 2003)



Slika 2. Elektronsko mikroskopska snimka epitela crijeva koja prikazuje glikokaliks (strelice). (preuzeto i prilagođeno iz Cooper, 2010)

Iako se dugo smatralo da je glikozilacija unutarstaničnih proteina više iznimka nego pravilo, danas je općepoznato da je velik broj unutarstaničnih proteina glikoziliran N-acetilglukozaminom (GlcNAc) vezanim za serinski (Ser) ili treoninski (Thr) ostatak proteina. (Hart, 2003)

² Komenzalizam je udruživanje dvaju organizama, pri čemu jedan ima koristi od drugoga, a pritom ga ne oštećuje. (www.enciklopedija.hr)

1.1.2 N-GLIKOZILACIJA PROTEINA

Glikozilacija proteina izuzetno je kompleksan proces modifikacije proteina jer se sastoji od mnogo koraka koji se odvijaju u različitim staničnim organelama. Glikani se oblikuju kompleksnim i dinamičnim interakcijama između oko 700 proteina, uključujući transkripcijske faktore, enzime, ionske kanale i ostale proteine. (Moremen, 2012; Lauc i sur., 2016) Za razliku od glikozilacije, glikacija, tj. kovalentno vezanje reducirajućih saharida na protein, nije enzimima regulirana reakcija. (Boušová i sur., 2005) Oko 200 tih proteina su glikoziltransferaze, enzimi koji produljuju glikanske strukture glikoproteina koristeći aktivirane ugljikohidrate vezane na nukleotide ili lipide. (Moremen, 2012) Unatoč velikom broju enzima koji sudjeluju u procesu glikozilacije, broj monosaharida koji kod sisavaca grade glikokonjugate vrlo je ograničen i broji samo deset vrsta: fukozu (Fuc), galaktozu (Gal), glukozu (Glc), N-acetilgalaktozamin (GalNAc), N-acetilglukozamin (GlcNAc), glukuronsku kiselinu (GlcA), iduronsku kiselinu (IdoA), manozu (Man), sijalinsku kiselinu (Sia) i ksilozu (Xyl). (Moremen, 2012) Unatoč malom broju gradivnih jedinica, raznolikost glikanskih struktura izuzetno je velika.

N-glikozilacija najčešći je i najbolje proučeni oblik glikozilacije proteina (Moremen, 2012), a N-glikani se nalaze na oko 90 % glikoproteina. (Lauc i sur., 2016) N-glikozilaciju karakterizira *GlcNAc-β-Asn* glikozidna veza koja nastaje između N-acetilglukozaminskog ostatka na glikanskom dijelu molekule i amidne skupine asparaginskog ostatka koji je u primarnoj strukturi proteina najčešće odvojen od serinskog i treoninskog aminokiselinskog ostatka jednom aminokiselinom izuzev prolina (zapisano kao *Asn-X-Ser/Thr*, $X \neq \text{Prolin}$). (Moremen, 2012) Za usporedbu, postoji čak šest vrsta O-glikanskih struktura ovisno o prvoj ugljikohidratnoj jedinici vezanoj za aminokiselinski ostatak. (Moremen, 2012)

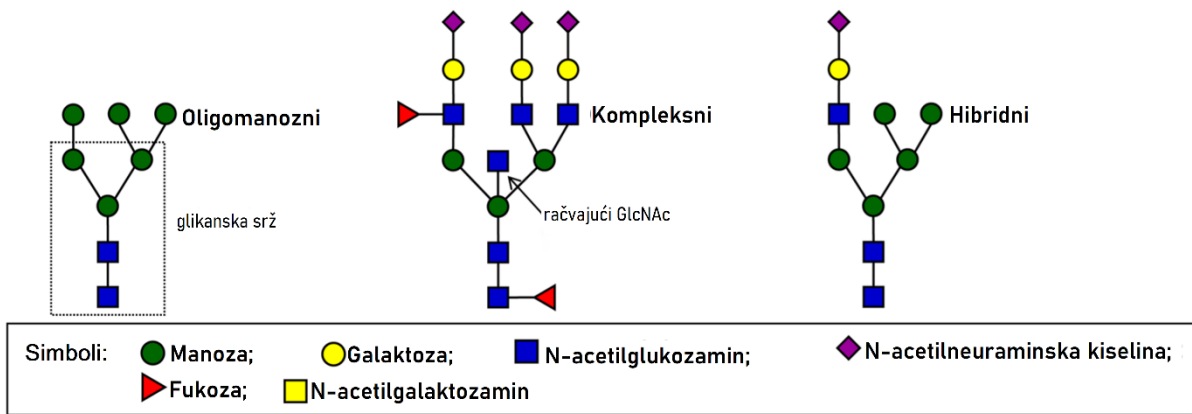
Prva faza sinteze N-vezanih glikana je nastajanje oligosaharida na lipidnom nosaču poliizoprenoidne strukture, dolikolu, koji je sastavni dio membrane endoplazmatskog retikuluma (ER-a). (Moremen, 2012) Taj proces, koji se dijelom odvija u citosolu, a dijelom u lumenu ER-a, vrlo je složen i zahtijeva mnoštvo enzima. Nascentni oligosaharid uvijek ima istu strukturu koja se sastoji od tri glukozna, devet manoznih i dva N-acetilglukozaminska ostatka (*Dolikal-GlcNAc₂-Man₉-Glc₃*) pri čemu su dolikol i GlcNAc vezani fosfodieterskom vezom. (Moremen, 2012; Cooper, 2010)

Sljedeći korak glikozilacije kotranslacijski je prijenos nascentnog oligosaharida s dolikola na nastajući polipeptidni lanac. Taj korak kataliziran je oligosaharil-transferazom (OST),

multimernim enzimom u lumenu ER-a. Akceptorski peptidni slijed je tripeptid *Asn-X-Ser/Thr* ili rjeđe *Asn-X-Cys* te ostali koji se vrlo rijetko nalaze. (Moremen, 2012) Slijedi cijepanje dviju glukočnih jedinica čime nastaje glikan koji je ligand za lektinske šaperone kalneksin, vezan na membranu ER-a, i kalretikulin, toplivi protein u lumenu ER-a. Spomenuti šaperoni također vežu protein-disulfid-izomerazu A3 (engl. *protein disulfide isomerase A3*, PDIA3) te zajedno usmjeravaju pravilno smatanje polipeptidnog lanca u funkcionalni protein tako što sprječavaju hidrofobnu agregaciju i krivo vezanje disulfidnih veza. Tijekom smatanja zbivaju se ciklusi uklanjanja glukočnog ostatka, katalizirani glukočidazom II, i ponovnog vezanja glukoze, katalizirani UDP-Glc:glikoprotein glukočtransferazom 1 (UGGT1). Glikani stoga imaju vrlo važnu ulogu u pravilnom smatanju proteina u endoplazmatskom retikulumu. (Moremen, 2012) Također, glikani pomažu u uklanjanju krivo smotanih glikoproteina iz ER-a jer definiraju vrijeme zadržavanja glikoproteina u ER-u. Naime, glikoproteini sa sporom kinetikom smatanja, koja može biti posljedica mutacije ili krivog spajanja monomernih struktura u multimer, podložni su djelovanju manoza-cijepajućih enzima. Nastali glikanski ostaci prepoznaju multiproteinske strukture na membrani ER-a i vode glikoprotein ka proteasomskoj degradaciji. Taj proces naziva se ER-vezana degradacija (engl. *ER-associated degradation*, ERAD). (Moremen, 2012)

Posljednja faza glikozilacije proteina je sazrijevanje glikanske strukture, a odvija se u Golgijevom aparatu (GA). Iz ER-a u GA pristižu glikoproteini koji imaju samo N-glikane bogate manozom. Rijetko koji glikan bogat manozom stigne do površine stanice, a gotovo se svi skraćuju i produžuju u sukcesivnim koracima sazrijevanja. Sazrijevanje glikana kataliziraju mnogobrojne glikoziltransferaze koje su raspodijeljene duž cijelog GA te više ili manje specifično lokalizirane u pojedinom odjeljku. Smatra se da je ključni mehanizam reguliranja glikanskog profila stanica i izvanstaničnih tekućina upravo lokalizacija glikoziltransferaza u cisternama GA. (Moremen, 2012)

Zreli N-vezani glikani dijele se na tri tipa: (1) oligomanozni, koji ima dvije do šest dodatnih manoza, (2) kompleksni, koji ima dvije ili više grana s bar jednim dodatnim N-acetilglukočaminom i galaktozom te opcionalno sijalinskom kiselinom te (3) hibridni, koji se sastoji od oligomanozne i kompleksne grane. Broj grana vezanih na glikansku srž seže od jedne do četiri (Slika 3.). (Gornik i Lauc, 2008)



Slika 3. Prikaz osnovnih tipova zrelih N-glikanskih struktura. (preuzeto i prilagođeno iz Alley i sur., 2013)

1.1.3 VARIJABILNOST GLIKANSKOG PROFILA

Postoje velike inter-individualne varijacije u glikomu³ ukupnih proteina plazme i imunoglobulina G (IgG). Nasuprot tomu, u uvjetima održane homeostaze ti glikomi su longitudinalno⁴ poprilično stabilni, a znatno se, ali sporo, mijenjaju starenjem te brzo u uvjetima poremećene homeostaze. (Lauc i sur., 2016) Osim toga, otkriveno je da na glikanski profil plazme utječe spol (s razlikama do 10 %) te da postoji nasljedna komponenta koja se značajno razlikuje ovisno o glikanskoj vrsti. (Knežević i sur., 2009) Promjene glikanskog profila plazme, kao i bilo kojeg tkiva, odraz su mnogobrojnih genskih i okolišnih te unutarstaničnih i izvanstaničnih faktora. Rezultat takve varijabilnosti je stvaranje glikoformi proteina, svojevrsnih varijacija glikoproteina koji imaju jednaku primarnu strukturu polipeptidnog lanca, ali različite glikane vezane na isto glikozilacijsko mjesto. Prosječni glikoprotein ima stotine različitih glikoformi. (Lauc i sur., 2016)

Promjene u glikoformama odražavaju fiziološko i biokemijsko stanje organizma u trenutku formiranja glikoproteina, a razlike u glikoformama mogu biti male i fiziološki nevažne ili velike i fiziološki značajne. Primjeri razlika glikanskih struktura pojedinih glikoformi su promjena razgranatosti glikana, gubitak monosaharidne jedinice iz neke grane, nedostatak monosaharida (npr. Fuc, Sia ili GlcNAc) ili promjena tipa glikozidne veze. (Lauc i sur.,

³ Glikom je skup svih glikana jednog organizma, tkiva, stanice ili glikoproteina. Predstavlja čitav glikanski repertoar i promjenjiv je u vremenu. (Lauc i sur., 2016)

⁴ Longitudinalno istraživanje podrazumijeva ponavljano mjerenje na istoj osobi ili populaciji u definiranim vremenskim intervalima.

2016) Takve promjene mogu biti vrlo specifične i stoga vrlo dobar dijagnostički i prognostički marker mnogih bolesti. (Gornik i Lauc, 2008)

Kao što je ranije spomenuto, raznolikost glikanskih struktura unatoč malom broju gradivnih jedinica vrlo je velika. Velika raznolikost glikanskih struktura rezultat je brojnih mogućnosti vezanja monosaharida, grananja i stvaranja anomernih⁵ veza. Glikani imaju puno veću strukturnu raznolikost od linearnih polipeptidnih i nukleotidnih lanaca s obzirom na broj monomernih jedinica. (Hart, 2003) Također, uzrok te raznolikosti je i velik broj biosintetskih puteva i kompeticija enzima za iste glikanske supstrate. (Moremen i sur., 2012) Kompeticija između glikoziltransferaza koje imaju preklapajuću specifičnost za glikan-akceptor, a različitu specifičnost za donorski ugljikohidrat jako utječe na relativnu prisutnost glikanskih struktura u ukupnom glikomu stanice ili tkiva. Dakle, biosintetski potencijal glikana neke stanice ovisi o mnogo faktora uključujući prisutnost pojedinih enzima, ugljikohidratnih donora te promet vezikula u GA. (Moremen i sur., 2012) Golema raznolikost glikanskih struktura i njihovih preklapajućih funkcija čini razotkrivanje uloge pojedinačnih glikana praktički nemogućim jer im se funkcija mijenja ovisno o fiziološkom kontekstu. (Moremen i sur., 2012)

Zbog izrazite strukturne kompleksnosti i metodoloških poteškoća u analizi glikana, spoznaja o ulozi glikana značajno zaostaje za spoznajom o ulogama proteina i nukleinskih kiselina. (Lauc i sur., 2016) Ipak, učinjeni su veliki pomaci u dešifriranju glikanskih profila izvanstaničnih tekućina. Zbog toga što se glikanski profili često mijenjaju kao odgovor na biološke signalne puteve, ulažu se veliki naponi da se razviju analitičke strategije koje identificiraju glikanske „potpise” bolesti. (Moremen, 2012) Otkrivene su brojne varijante glikana koje služe kao marker bolesti, odnosno mogu biti dijagnostičke, ali i terapijske mete. (Lauc i sur., 2016) Zbog homeostatske stabilnosti najviše je proučavana promjena glikanskih profila u kroničnim upalnim bolestima. (Gornik i Lauc, 2008)

⁵ Anomeri su diastereoizomeri nastali kao posljedica povezivanja monosaharida u cikličku strukturu. Ovi izomeri razlikuju se samo po stereokemijskoj konfiguraciji na prvom asimetričnom ugljikovom atomu koji prilikom izgradnje poluacetalna može imati hidroksidnu skupinu iznad ili ispod osnovne ravnine prstena. (www.glossary.periodni.com)

1.2 TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je analitička i preparativna metoda koja se intenzivno primjenjuje za razdvajanje, identifikaciju i kvantificiranje kemijskih spojeva u smjesi. Najmoćnija je i najraznovrsnija separacijska metoda. (Skoog i sur., 2016) Zbog velike raznolikosti metoda i postojanja više sustava i tehnika, kromatografiju je teško precizno definirati. Međutim, ono što je zajedničko svim kromatografskim metodama je postojanje mobilne i stacionarne faze. Komponente smjese tijekom kromatografskog postupka putuju u mobilnoj fazi koja prolazi stacionarnom, a razdvajanje sastojaka smjese temelji se na razlikama u razdiobi između tih dviju faza. U kolonskoj kromatografiji stacionarna faza postavljena je u uskoj cijevi kroz koju prolazi mobilna faza pogonjena tlakom ili gravitacijom. Tekućinska kromatografija razlikuje se prema mehanizmima razdvajanja tvari i može se podijeliti na particijsku (tekućinsko-tekućinsku), adsorpcijsku (tekućinsko-čvrstu), ionsku, afinitetnu i kromatografiju isključenjem na temelju veličine i/ili oblika molekule. (Skoog i sur., 2016)

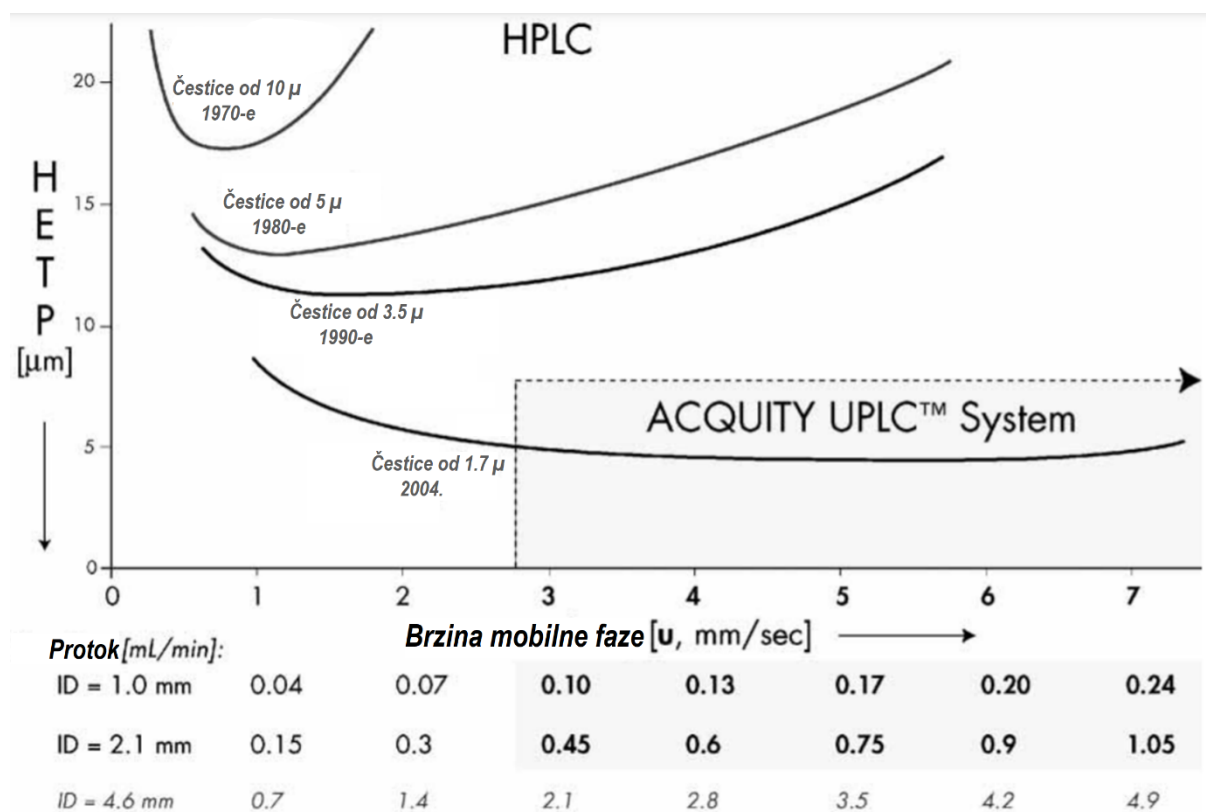
Efikasnost razdvajanja sastojaka smjese postiže se optimiranjem uvjeta koji utječu na (1) razdvajanje pikova i (2) sužavanje pikova na kromatogramu. Na efikasnost razdvajanja utječu brzina protoka mobilne faze, koeficijenti difuzije tvari u mobilnoj i stacionarnoj fazi, retencijski faktor, promjer čestica stacionarne faze i debljina sloja tekućine na stacionarnoj fazi. (Skoog i sur., 2016) Veliki napori uloženi su kako bi se kvantitativno objasnili odnosi spomenutih eksperimentalnih uvjeta koji utječu na efikasnost razdvajanja sastojaka u smjesi kolonskom kromatografijom. Najpoznatiji model koji opisuje efikasnost razdvajanja sastojaka u smjesi opisan je van Deemterovom jednadžbom (1):

$$HETP = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m) \cdot u \quad (1)$$

u kojoj je *HETP* (eng. *Hight Equivalent to a Theoretical Plate*) visina teorijskog tavana i predstavlja mjeru efikasnosti kolone, a *u* je brzina protoka mobilne faze. Član jednadžbe *A* opisuje *eddyjevu* (turbulentnu) difuziju, neovisan je o brzini protoka mobilne faze (*u*) i najmanji kada su čestice stacionarne faze male i uniformne. Eddyjeva difuzija rezultat je neograničenog broja puteva različite duljine kojima se molekule u koloni gibaju pri prolasku kroz čestice stacionarne faze. Član *B/u* opisuje longitudinalnu difuziju analita u koloni i ovisi o difuzijskom koeficijentu tvari, a obrnuto je proporcionalan brzini protoka mobilne faze. Longitudinalna difuzija ima mnogo veći utjecaj na širenje pikova u plinskoj kromatografiji,

dok je utjecaj na širenje pikova u tekućinskoj kromatografiji znatno slabiji jer je brzina difuzije u tekućini mnogo manja nego u plinovitoj fazi. Član $C_s \times u$ opisuje prijenos tvari iz stacionarne u mobilnu fazu. U tekućinskoj kromatografiji, u kojoj je stacionarna faza sloj tekućine na nosaču, veća debljina sloja i manji difuzijski koeficijent tvari u stacionarnoj fazi uzrokuje sporije postizanje dinamičke ravnoteže između stacionarne i mobilne faze što također doprinosi širenju pikova. Varijabla $C_s \times u$ stoga je izraženija u kolonama s brzim protokom mobilne faze, a zanemariva pri sporom protoku mobilne faze. Član $C_m \times u$ opisuje prijenos tvari iz mobilne u stacionarnu fazu i obrnuto je proporcionalan difuzijskom koeficijentu analita u mobilnoj fazi, a proporcionalan brzini protoka mobilne faze. U kolonama punjenim česticama (engl. *packed columns*) C_m je proporcionalan kvadratu promjera čestica. (Skoog i sur., 2016)

Prema van Deemterovom modelu (1) evidentno je da postoji optimalna brzina protoka mobilne faze pri kojem je *HETP* najmanji, a efikasnost razdvajanja kolone najveća što je prikazano na slici 4.



Slika 4. Prikaz ovisnosti visine teorijskog tavana (*HETP*) o brzini protoka mobilne faze (*u*) za različite veličine čestica stacionarne faze i unutarnje promjere kolone (engl. *internal diameter*, ID). (preuzeto i prilagođeno iz Swartz, 2005)

1.2.1 TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA ULTRAVISOKE DJELOTVORNOSTI, UPLC⁶

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti⁷ uvedena 60-ih godina dvadesetog stoljeća, kao i UPLC uveden 2004. godine revolucionirali su bioanalitiku, uključujući i analizu glikana. Obje metode mogu se koristiti u više načina uključujući normalno fazni i obratno fazni te se mogu upariti s brojnim detekcijskim sustavima uključujući spektrometar masa. Princip rada im je identičan, međutim HPLC i UPLC značajno se razlikuju u instrumentaciji i performansama. (Kamal i Sharad, 2018)

Dugo je glavna prepreka u napretku tekućinske kromatografije bila veličina čestica stacionarne faze koje moraju biti porozne zbog veće površine, a istovremeno moraju izdržavati visoke tlakove. Korištenjem čestica promjera manjeg od 2.5 µm dolazi do značajnog povećanja efikasnosti razdvajanja koja se ne smanjuje povećanjem brzine protoka mobilne faze, fenomena uočenog kod stacionarnih faza s većim promjerom čestica (Slika 4.). Uz to, tehnološka unaprjeđenja pumpi, injektora i detektora u UPLC-u bila su potrebna da bi se 2004. godine razvio prvi komercijalni UPLC- ACQUITY UPLCTM System. (Swartz, 2005)

UPLC se temelji na korištenju čestica stacionarne faze promjera manjeg od 2 µm. Manje čestice smanjuju koeficijente eddyjeve i longitudinalne difuzije čime se poboljšava efikasnost razdjeljivanja i ubrzava protok. Duljina UPLC kolone kraća je u odnosu na HPLC, a unutarnji promjer manji (1-2.1 mm). Tlak u UPLC-u prelazi 400 bara, što za posljedicu ima postizanje mnogo veće temperature unutar kolone uslijed trenja. (Kamal i Sharad, 2018) Povišena temperatura ima povoljan učinak na efikasnost razdvajanja jer smanjuje viskoznost mobilne faze i povećava difuzibilnost analita između faza. (Swartz, 2005) Zbog malog volumena uzorka koji iznosi 2-5 µL osjetljivost detektora na UPLC-u mora biti 2 do 3 puta veća od onog na HPLC-u. Prednosti UPLC metode u odnosu na HPLC kraće je trajanje uravnoteživanja kolone kao i kraće ukupno vrijeme analize uz utrošak manjeg volumena otopina. (Kamal i Sharad, 2018) Zbog svega navedenog, UPLC je pogodan za visokoprotočne analize koje zahtijevaju visoku rezoluciju i osjetljivost. (Swartz, 2005)

⁶ engl. *ultra performance liquid chromatography*, UPLC

⁷ engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC

1.2.2 TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA TEMELJENA NA HIDROFILNIM INTERAKCIJAMA, HILIC⁸

HILIC metoda razvojno je povezana s klasičnim sustavima normalnih faza u kojima relativno nepolarna mobilna faza, iako topiva u vodi, razdvaja polarne analite tijekom prolaska kroz kolonu koja je građena od polarnih čestica. Sadržaj vode u kromatografskom sustavu HILIC od presudne je važnosti jer se molekule vode lako vežu na polarne strukture čestica kolone s kojima tvore stacionarnu fazu. (Alley i sur., 2013)

Problem s UPLC-om obratne faze je slabo zadržavanje tvari s malom ili nikakvom raspodjelom u stacionarnoj fazi. Kod tvari koje se slabo zadržavaju na stacionarnoj fazi koristili su se eluenti s vrlo malim količinama organskog otapala, ali takvi eluenti s velikim udjelom vode povezani su s nereproducibilnim retencijskim vremenima. Vrlo polarne tvari, kao što su ugljikohidrati, ne ulaze ni u kakvu interakciju s nepolarnom stacionarnom fazom jer s njom, za razliku od mobilne faze, ne mogu stvarati elektrostatske interakcije. Nedostatak zadržavanja nabijenih tvari lako se rješava Coulombovim interakcijskim mehanizmima u kromatografiji ionske izmjene, koja se koristi za praktički sve nabijene tvari (od malih iona do proteina) ili kromatografijom ionskih parova koja je jeftinija i često efikasnija, a sadrži kolone obratne faze i koristi se kada se ne može iskoristiti ravnoteža kiselinske disocijacije promjenom pH. (Hemström i Irgum, 2006)

Najproblematičnije tvari za kromatografsko razdvajanje su vrlo hidrofilni nenabijeni spojevi jer ne ostvaruju Coulombove interakcije sa stacionarnom fazom, a zbog polarnih skupina imaju prenizak tlak para da bi se razdvojili plinskom kromatografijom. Taj se problem prije rješavao derivatizacijom spojeva, tj. vezanjem hidrofobnih skupina na polarne, čime se istovremeno mogla poboljšati detekcija. Ipak, derivatizacija je pogodna samo kada tvar sadrži jednu, po mogućnosti vrlo reaktivnu, polarnu skupinu čime se osigurava kvantitativni nastanak samo jednog derivatiziranog produkta. Za tvari s više polarnih skupina, kao što su glikani, derivatizacijom redovno nastaju nusprodukti što reakciju čini nekvantitativnom, a kromatogram kompliciranim za interpretaciju. Dodatni problem je što se derivatiziranjem slabo razdvajaju strukturno slični spojevi jer dio molekule koji dominantno doprinosi razdjeljivanju postaje upravo vezana skupina. (Hemström i Irgum, 2006)

⁸ engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography*, HILIC

Rješenje za razdvajanje takvih molekula UPLC-om je HILIC metoda. HILIC se može smatrati posebnom kromatografskom tehnikom u kojoj polarna stacionarna faza privlači polarni sastojak eluenta, tj. vodu i djeluje kao zadržavajući element, dok eluent istovremeno ima svojstvo otapala koje omogućuje brzu i linearnu distribuciju između dviju faza. Dakle, HILIC je varijanta kromatografije normalne faze. Eluent je najčešće smjesa acetonitrila (ACN) i vode u kojoj je udio vode od 5 do 40 %. Dobra karakteristika ACN-a je manja viskoznost od klasičnih organskih eluenata što uzrokuje brže postizanje dinamičke ravnoteže između faza. Razdvajanje analita HILIC-om vrlo je složenog mehanizma jer se ne može objasniti klasičnom tekućinsko-tekućinskom razdiobom zbog toga što se tijekom razdvajanja stvaraju Coulombove interakcije ili vodikove veze između analita i stacionarne faze koju čine polarne mikročestice sa slojem vode na njima. (Hemström i Irgum, 2006) Elucijski redoslijed u HILIC-u je u pravilu obrnut od onog u UPLC-u obratne faze što omogućava njihovo sprezanje. (Hemström i Irgum, 2006)

HILIC je vrlo korisna metoda za razdvajanje i detekciju brojnih molekula jake polarnosti, a posebno je pogodan za bazične spojeve koji se sa stacionarnom fazom sparuju ionskim vezama. HILIC metodom uspješno se razdvajaju brojni farmaceutici, aminokiseline, peptidi, histoni, metaboliti i male polarne molekule. Zbog toga je HILIC važan u farmaceutskoj industriji, toksikologiji, agrokulturi, kemiji prehrane, glikomici, metabolomici, epigenetici i drugim istraživanjima.

Razvoj kvalitetne detekcijske metode je, uz razvoj kolone, bio glavni preduvjet za analizu glikana kromatografskom metodom. Naime, ugljikohidrati ne posjeduju karakterističnu kromofornu skupinu pa su se morali detektirati manje kvalitetnim metodama detekcije (npr. refraktometrijom) koje nisu osiguravale dovoljnu osjetljivost, reproducibilnost niti su dozvoljavale rad s gradijentom eluenta. Od 1980-ih uvedene su metode derivatizacije ugljikohidrata kromoforom, a velik napredak bilo je derivatiziranje s 2-aminopiridinom reduktivnom aminacijom s aromatskim aminom čime se dobio fluorescirajući derivat glikana. Obilježavanje fluoroforama pomaknulo je osjetljivost glikobiologije na pikomolarnu razinu. (Alley i sur., 2013)

1.3 METODE MIKROUZORKOVANJA KRVI ZA ANALIZU GLIKANA

Razvojem osjetljivih i visokoprotočnih metoda analize glikanskog profila plazme javila se potreba za jednostavnijim i praktičnijim metodama uzorkovanja krvi za analizu glikana. Standardni uzorak za analizu glikanskog profila je plazma dobivena klasičnom venepunkcijom. Takav je način uzorkovanja nepraktičan iz više razloga kao što su potreba za centrifugiranjem, relativna invazivnost i mogućnost ozljede koju prati nevoljkost pacijenata/ispitanika za pristupanje uzorkovanju. Nadalje, javljaju se i logistički izazovi kao što su velik volumen uzorka kojeg je nepraktično transportirati te nemogućnost samouzorkovanja. Zbog toga se laboratoriji okreću novim načinima uzorkovanja, prvenstveno metodama mikrouzorkovanja (engl. *microsampling*) kapilarne krvi koje je moguće obaviti samostalno. (Delahaye i sur., 2021)

U procjeni uređaja za mikrouzorkovanje (kapilarne) krvi četiri aspekta trebaju se uzeti u obzir: (1) lakoća samouzorkovanja, (2) cijena uređaja te odnos cijene i kvalitete, (3) rukovanje uzorkom (u transportu ili kliničkom laboratoriju) i (4) tehničke performanse uređaja za mikrouzorkovanje. Stoga treba voditi računa o svrsi u koju se analiza uzorka provodi i realnim analitičkim zahtjevima koji se trebaju ispuniti. (Delahaye i sur., 2021)

Metode mikrouzorkovanja kapilarne krvi mogu se, prema uzorku koji se analizira, podijeliti na one kojima se analizira suha puna krv i one kojima se analizira suha mrlja plazme. Razvijene su brojne metode za mikrouzorkovanje kapilarne krvi, a tri takve opisane su dalje u tekstu. (Delahaye i sur., 2021)

Prednost svih navedenih metoda mikrouzorkovanja kapilarne krvi u odnosu na uzorak plazme dobiven venepunkcijom je lagano uzorkovanje i mogućnost uzorkovanja u vlastitom domu te jednostavan transport i pohrana. Također stabilnost je veća za većinu sastojaka u suhom matriksu uz smanjen rizik od infekcije jer se patogeni koji se mogu nalaziti u krvi sušenjem uništavaju. Volumen uzete krvi mnogo je manji, a uzorkovanje manje invazivno i ugodnije za korisnike u odnosu na venepunkciju. (Delahaye i sur., 2021)

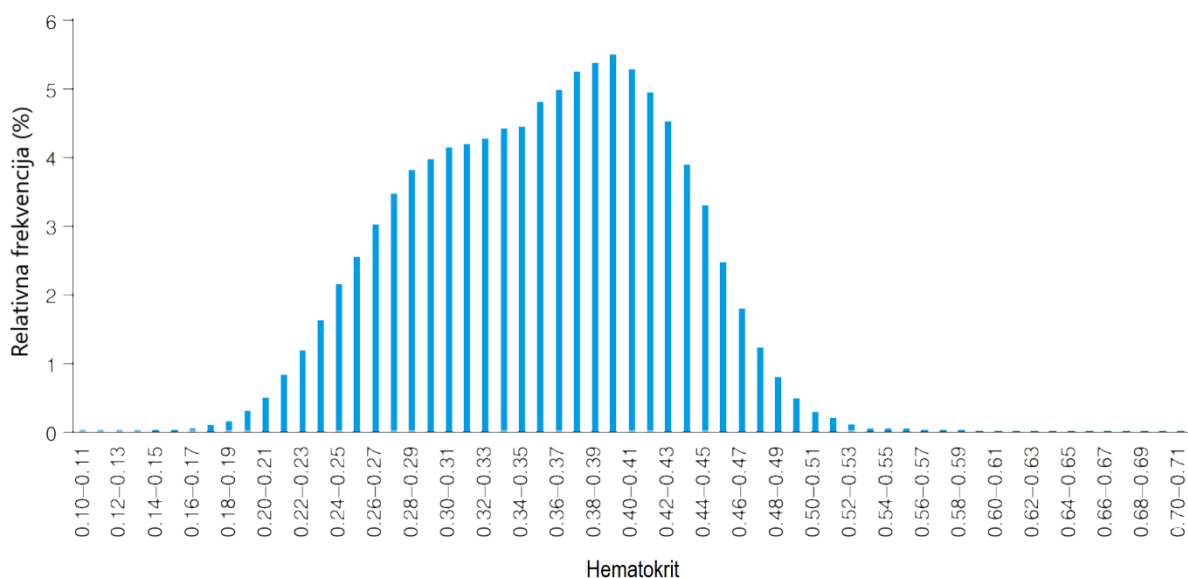
1.3.1 METODA SUHE KAPI KRVI NA FILTER PAPIRU (DBS⁹)

Najpoznatiji i najkorišteniji način mikrouzorkovanja kapilarne krvi je sakupljanje suhih krvnih mrlja na posebnom filter papiru koji može biti u formatu kartice (Slika 6.) DBS

⁹ engl. *dried blood spot*, DBS

metoda vrlo je popularna i uspješna za dobivanje kvantitativnih ili polukvantitativnih rezultata mjerenja analita u krvi koja je zaživjela 1960-ih kada se Guthierov test za fenilketonuriju uveo u novorođenački probir. Uz novorođenački probir, DBS metoda se koristi za serološka testiranja i određivanje glikanskog profila plazme, u toksikologiji, epidemiološkim istraživanjima i dr. Ipak, već je pokušaj uvođenja terapijskog praćenja lijekova (engl. *therapeutic drug monitoring*, TDM), za što su važni vrlo precizni i točni kvantitativni rezultati, naišao na prepreke zbog ograničenja koje ima DBS metoda uzorkovanja kapilarne krvi. (Delahaye i sur., 2021)

Daleko najveći problem kojem se pridavalo najviše pažnje je utjecaj hematokrita (Hct) na analizu DBS-a. Utjecaj hematokrita dvojni je problem zato što je analitičke prirode, tj. utječe na preciznost i točnost analize, ali i fiziološke prirode jer se javlja kod nekih analita zbog njihovog razdjeljivanja između eritrocita i plazme. Hematokrit velikim dijelom određuje viskoznost krvi, a viskoznost utječe na širenje kapi krvi na filter papiru. Krv veće viskoznosti, tj. većeg hematokrita, manje će se raširiti po filter papiru od krvi manje viskoznosti s manjim hematokritom zbog čega nastaju krvne mrlje različitog promjera i debljine. Stoga će uzorak suhe krvne mrlje s visokim hematokritom (Hct) dobiven puncherom fiksne promjera uvijek sadržavati veći volumen krvi od DBS-a s niskim Hct-om. Razlika u volumenu krvi može doseći 35 % u rasponu Hct-a $0.2-0.8 \text{ L}\times\text{L}^{-1}$, te ima velik utjecaj na kvantitativno određivanje analita. (De Kesel i sur., 2013) Na slici 5. prikazana je razdioba hematokrita bolničke populacije na kojoj se vidi velik raspon vrijednosti Hct-a.



Slika 5. Prikaz razdiobe hematokrita u bolničkoj populaciji (preuzeto i prilagođeno iz De Kesel i sur., 2013)

DBS se koristi kako za analizu malih molekula i mikroelemenata, tako i za analizu velikih biomolekula kao što su peptidi, proteini i glikani koji se nalaze većinom u plazmi. Diskovi DBS-a fiksnog promjera s visokim Hct-om imat će manje plazme od diskova DBS-a s niskim Hct-om, što je efekt obrnut od gore opisanog utjecaja hematokrita na volumen krvi. (De Kesel i sur., 2013)

Hct također utječe na ekstrakciju analita iz DBS-a jer DBS s visokim Hct-om sušenjem stvara barijeru za ekstrakciju, a usprkos tomu što se DBS uzorkovanje doima vrlo jednostavnim, postoji niz uputa koje je potrebno pratiti kako bi se uzorak pravilno prikupio. (De Kesel i sur., 2013) Također, opisan je i kromatografski utjecaj filter papira na položaj pojedinog analita u krvnoj mrlji što dodatno doprinosi nepouzdanosti analize.

Zbog rastuće potrebe za samouzorkovanjem veliki se napori ulažu da se takvi problemi riješe, uključujući edukaciju pacijenata. S druge strane, javljaju se nove unaprijeđene metode koje kombiniraju sakupljanje visokokvalitetnih volumetrijskih uzoraka suhe kapi krvi pogodne za uzorkovanje u nebolničkom okruženju. (De Kesel i sur., 2013)

1.3.2 METODA VOLUMETRIJSKOG APSORPCIJSKOG MIKROUZORKOVANJA (VAMS¹⁰)

VAMS je tehnika mikrouzorkovanja kapilarne krvi pomoću Mitra štapića razvijena 2014. godine (Neoteryx, Torrance, CA) i najbolje je istražena alternativna metoda za sakupljanje kapilarne krvi. Mitra štapić se sastoji od porozne apsorbirajuće bijele kapice pričvršćene na plastičnu dršku (Slika 6.). Kapica je načinjena od hidrofilnog polimera koji omogućuje prikupljanje definiranog volumena krvi u iznosu od 10, 20 ili 30 μL ovisno o veličini kapice. Krv se prikuplja kapilarnim silama do popunjenja kapice, suši na sobnim uvjetima i čuva u specijaliziranim kutijicama sa isušivačem, a analit se potom ekstrahira iz popunjene kapice. Za visokoprotočna istraživanja VAMS uzorci se mogu staviti na prilagođeni stalak (Mitra 96-Autorack) što omogućuje (polu)automatiziranu analizu. VAMS metoda rješava problem hematokrita zato što se prikuplja fiksni volumen krvi, a jedini način na koji hematokrit može utjecati na kvalitetu analize jest na učinkovitost ekstrakcije analita što zahtijeva optimizaciju samog procesa ekstrakcije. Mogući uzrok pogreške je uzorkovanje manje krvi nego li je potrebno. (Delahaye i sur., 2021)

¹⁰ engl. *volumetric absorptive microsampling*, VAMS

Provedena su brojna istraživanja u kojima se anketnim ispitivanjem ustanovila mnogo veća sklonost pacijenata za VAMS samouzorkovanje u vlastitom domu (81 %) nego za venepunkciju u bolnici. Također, vrlo je važno da je broj ispravno prikupljenih uzoraka dobivenih VAMS metodom značajno veći nego prikupljen DBS metodom. (Delahaye i sur., 2021)

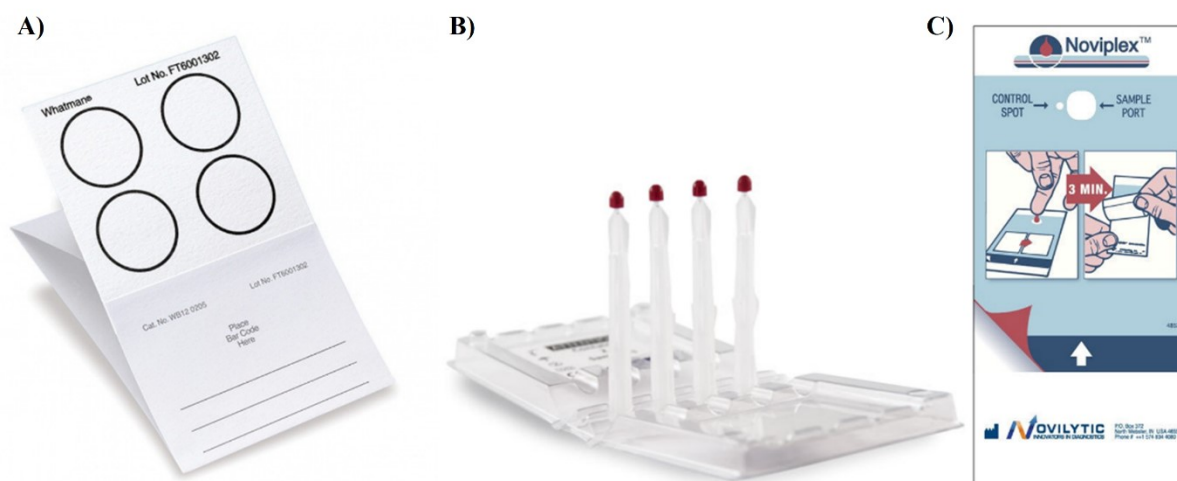
1.3.3 METODA SUHE MRLJE PLAZME (DPS¹¹)

Noviplex Plasma Prep Card (Novilytic, West Lafayette, IN) jedini je uređaj pomoću koje se može analizirati mikrouzorak suhe mrlje plazme (Slika 6.). DPS metoda omogućuje prikupljanje suhe plazme membranskom filtracijom. Kap kapilarne krvi stavi se na gornji sloj kartice zadužen za ravnomjerno širenje kapi krvi fiksnog volumena. Nakon prikupljanja dovoljno uzorka indikatorsko polje promijeni boju. Ispod gornjeg sloja nalazi se membrana za razdvajanje koja zadržava eritrocite filtracijom, a plazma prolazi do diska za sakupljanje plazme. Nakon tri minute gornji sloj se odlijepi i baci, a DPS se potom suši 15 minuta. Prije analize donji se sloj pincetom odlijepi od DPS-a.

Trenutno postoji samo jedno istraživanje u kojem je *Noviplex Plasma Prep Card* korišten za prikupljanje DPS-a iz kapilarne krvi. Potvrđeno je da je volumen prikupljanja plazme vrlo stabilan i varira manje od 2 % u širokom rasponu Hct-a, a dodatna istraživanja trebaju potvrditi slaganje s analizom iz venske plazme za što danas postoje vrlo ograničeni podatci. (Delahaye i sur., 2021)

Mnogi novi sustavi za mikrouzorkovanje krvi trenutačno su u razvoju. Hoće li njihova uporaba u kliničkom i istraživačkom okruženju zaživjeti ovisi o mnogo faktora, prvenstveno o lakoći uzorkovanja, mogućnosti automatizacije, cijeni i tehničkim performansama. Za većinu takvih sustava intenzivno se proučavaju analitičke performanse da bi se utvrdila pouzdanost metode, a važno je i istražiti stupanj uspješnog samouzorkovanja kao i provođenje edukacije i motivacije pacijenata. (Delahaye i sur., 2021)

¹¹ engl. *dried plasma spot*, DPS



Slika 6. Prikaz odabranih metoda mikrouzorkovanja kapilarne krvi: **A)** Whatman FTA card (filter papir) za sakupljanje DBS uzorka (www.scientificfilters.com), **B)** Neoteryx uređaj za sakupljanje VAMS uzorka (*Neoteryx Mitra stick*) (www.neoteryx.com), **C)** *NoviplexTM Plasma Prep Cards* za sakupljanje DPS uzorka (www.novilytic.com).

1.4 PERSONALIZIRANA MEDICINA

Korištenje novih metoda visoke protočnosti, tj. biomedicinskih testova koji generiraju veliku količinu informacija (engl. *data-intensive biomedical assays*) otkrilo je veliku interindividualnu varijaciju s obzirom na mehanizme i faktore koji utječu na patofiziološke procese kao i posljedice koje ti patofiziološki procesi imaju na pojedinca. Zbog toga se postavlja pitanje koliko bi interindividualne varijacije mogle utjecati na odluku o optimalnom načinu liječenja, praćenja i prevencije te rano otkrivanje bolesti kod individualnog pacijenta. Danas je općeprihvaćeno da se, zbog velike heterogenosti patoloških stanja, terapija i prevencija trebaju personalizirati, tj. krojiti po pacijentovu jedinstvenom biokemijskom, fiziološkom, okolišnom i bihevioralnom profilu.

Najsvjetliji primjer primjene personalizirane medicine danas krojenje je terapije i doziranje lijekova analizom gena koji sudjeluju u metabolizmu lijekova i time utječu na njihovu farmakokinetiku. Identificiranjem genskih profila mogu se također definirati terapijske mete i samim time proizvesti lijekovi specifični za neke podvrste bolesti.

Personalizirana medicina također podrazumijeva uvođenje osobnih graničnih vrijednosti (npr. osobnih referentnih intervala), a ne korištenje populacijskih graničnih vrijednosti dobivenih epidemiološkim studijama. (Goetz i Schork, 2018)

Personalizirana medicina jedna je od četiri principa na kojima se temelji P4 medicina koja postaje sve dominantnija paradigma u pristupu pacijentu, a čine ju još prediktivna, preventivna i participativna medicina. Prediktivna medicina podrazumijeva detekciju patofiziološkog procesa prije nego li je on uopće započeo ili je u vrlo ranoj fazi, a omogućena je poznavanjem genetskih, biokemijskih i ostalih markera kojima se može predvidjeti nastanak bolesti. Preventivna medicina fokusirana je na održavanju zdravstvenog blagostanja (engl. *wellness*) promicanjem zdravog životnog stila, edukacijom zajednice i primjenom preventivnih metoda liječenja kao što je cijepljenje protiv zaraznih bolesti. Konačno, participativna medicina od samih pacijenata i korisnika medicinskih usluga zahtijeva aktivan angažman, kako za preuzimanje odgovornosti za vlastito zdravlje, tako i za doprinos razvoju medicine dijeljenjem digitalnih podataka nastalih praćenjem biometrijskih parametara pacijenta. (<https://promise.bit.ai>)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Novi medicinski trendovi u zamahu, a koji su obuhvaćeni pod akronimom P4 medicine, omogućeni su, između ostalog, razvojem visokoprotočnih, osjetljivih i pristupačnih analitičkih metoda i digitalnom revolucijom. Analiza glikanskog profila plazme, tj. glikomika, odličan je primjer P4 medicine na djelu zbog preventivnog i prediktivnog potencijala te visokog stupnja personalizacije. Aktivno sudjelovanje korisnika i njihov angažman u preventivnoj brizi za vlastito zdravlje vjerojatno će biti glavna prepreka u implementaciji P4 koncepta kao nove paradigme u medicini. Jedan od načina na koji se prepreka participacije korisnika može nadići je povećanje dostupnosti svih blagodati moderne medicine i znanosti pacijentima i korisnicima, kao i smanjenje nelagode prilikom uzorkovanja krvi za analizu. Razvojem analitičkih metoda koje su postajale sve osjetljivije i pouzdanije rasla je potreba za uzorkovanjem manjih volumena krvne tekućine manje invazivnim metodama. Venepunkcija, iako minimalno invazivna, nepraktična je metoda jer ju pacijent ne može obaviti sam iz udobnosti vlastitog doma. Uz to, venepunkcija je neugodan zahvat koji može rezultirati ozljedama što smanjuje motivaciju pacijenata za pristupanje uzorkovanju. Također, uzorak je nepotrebno velik, stabilnost na sobnoj temperaturi mu je mala i zahtjeva predobradu centrifugiranjem što ovu metodu čini nepraktičnom, pogotovo ako postoji potreba za transportom uzorka. Zbog toga su se razvile, i trenutno su u procesu razvoja, brojne metode za mikrouzorkovanje kapilarne krvi koje pacijent može obaviti sam i poslati poštom u laboratorij. Prije rutinske uporabe takvih metoda potrebno je detaljno ispitati njihove mogućnosti i ograničenja. Analitičke procedure razvijene su za brojne analite, ali istraživanja koja uspoređuju metode mikrouzorkovanja kapilarne krvi međusobno i s uzorkom dobivenim venepunkcijom vrlo je ograničen.

Ovim radom uspoređuju se metode za mikrouzorkovanje kapilarne krvi sa standardnim uzorkovanjem plazme venepunkcijom u analizi glikanskog profila plazme. Također, istražuje se ponovljivost metoda za mikrouzorkovanje krvi ne bi li se utvrdila odstupanja rezultata mjerenih u seriji čime bi se dodatno opisala (ne)pouzdanost određene metode uzorkovanja.

Za određivanje N-glikanskog profila u uzorcima krvi korištena je HILIC-UPLC-FLR metoda, odnosno tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama s fluorescentnim detekcijskim sustavom. Dobiveni kromatogrami obrađeni su računalno integriranjem glikanskih pikova nakon čega su rezultati interpretirani metodama deskriptivne statistike.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

3.1.1 ANORGANSKE KEMIKALIJE

Tablica 1. Anorganske kemikalije

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
KCl, kalijev klorid	Calbiochem
KH ₂ PO ₄ , kalijev dihidrogenfosfat	Sigma-Aldrich
Na ₂ HPO ₄ , natrijev hidrogenfosfat	Acros Organics
NaCl, natrijev klorid	Carlo Erba
NH ₄ OH, amonijev hidroksid	Emsure

3.1.2 ORGANSKE KEMIKALIJE

Tablica 2. Organske kemikalije

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
Dimetilsulfoksid (DMSO)	Sigma
Ledena octena kiselina, 100%-tna	Emsure
Igepal CA-360	Sigma
Natrijev dodecil-sulfat (SDS)	Sigma
2-aminobenzamid (2-AB)	Sigma-Aldrich
2-pikolin boran	Sigma-Aldrich
Acetonitril (ACN), LC-MS razina čistoće	Fluka
Metanska kiselina, 98-100%-tna	Emsure
Etanol, 100%-tni	Merck
Acetonitril (ACN), HPLC razina čistoće	PanReac AppliChem

3.1.3 BIOLOŠKI MATERIJALI

Tablica 3. Biološki materijali

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
PNGaza F (peptid N-glikozidaza)	Prozyme

3.1.4 OTOPINE I PUFERI

Tablica 4. Otopine i puferi

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ / POSTUPAK IZRADE
pH Buffer Solution, alkalni standard za pH metar, pH: $9,21 \pm 0,02$	Mettler Toledo GmbH
pH Buffer Solution, kiseli standard za pH metar, pH: $4,01 \pm 0,02$	Mettler Toledo GmbH
30%-tna octena kiselina (AcH) u DMSO	Za 1500 μL : pomiješati 450 μL octene kiseline s 1050 μL DMSO.
Otopina za obilježavanje N-glikana	Za 1 uzorak: u 25 μL 30%-tne octene kiseline u DMSO dodati 0,48 mg 2-aminobenzamida i 1,12 mg 2-pikolin borana uz vorteksiranje.
Igepal, 4%-tni	Za 100 mL: u 80 mL ultračiste vode dodati 4 mL Igepala, staviti na 65 °C i na magnetsku mješalicu da se rastopi; zatim nadopuniti do 100 mL s ultračistom vodom
2%-tni SDS	Za 100 mL: dodati 2 g SDS-a u 100 mL vode.
10xPBS, puferirana otopina fosfatnih soli	Za 100 mL: dodati 8,0028 g NaCl, 1,3832 g Na_2HPO_4 , 0,2964 g KH_2PO_4 , 0,1976 g KCl u 80 mL ultračiste vode, provjeriti pH i titrirati sa standardnom otopinom da pH bude između 6,6 i 6,8, a zatim pretočiti u menzuru od 100 mL te do 100 mL nadopuniti s ultračistom vodom.

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ / POSTUPAK IZRADE
5xPBS, puferirana otopina fosfatnih soli	Za 100 mL: 50 mL 10xPBS prelići u menzuru od 100 mL i do 100 mL nadopuniti s ultračistom vodom.
Pufer amonijev formijat, 2 mol·L ⁻¹ , pH 4,4	Za 500 mL: uliti 300 mL ultračiste vode u posudu od 500 mL, dodati 37,75 mL metanske kiseline, ohladiti otopinu, miješati na magnetskom mješaču, polako dodavati oko 75 mL NH ₄ OH do pH 4,2 (početan pH je <2), nakon postizanja sobne temperature otopine dodavati NH ₄ OH do pH 4,4.
Etanol, 70%-tni	Za pripremu 1000 mL dodati 700 mL etanola u menzuru te nadopuniti do 1000 mL ultračistom vodom. Spremiti na 4 °C.
Acetonitril, 96%-tni	Za pripremu 1000 mL dodati 960 mL acetonitrila u menzuru te nadopuniti do 1000 mL ultračistom vodom. Spremiti na 4 °C.

3.1.5 LABORATORIJSKA OPREMA I PRIBOR

Tablica 5. Laboratorijska oprema i pribor

OPREMA I PRIBOR	PROIZVOĐAČ
Pločice za sakupljanje uzoraka, polipropilen, 1 ml zapremine, za 96 uzoraka	Waters
AcroPrep 96 GHP 0.45 μm filter pločica od 1 ml	Pall Corporation
ABgene PCR pločica	ThermoFisher
Mikropipete (obične i multikanalne uz nastavke)	Rainin
Vacuum manifold – vakumska pumpa	Pall Corporation
Magnetic Stirrer MSH 300 – magnetska mješalica	Biosan
Shaker (tresilica)	GFL
pH metar Seven Compact	Mettler Toledo
AB54-S, analitička vaga	Mettler Toledo

OPREMA I PRIBOR	PROIZVOĐAČ
Highland, analitička vaga	ADAM
Waters Acquity UPLC instrument	Waters, Milford
Mitra štapić	Neoteryx, Torrance, CA
Whatman FTA card (filter papir)	Whatman plc
Noviplex™ Plasma Prep Cards (plazma separator)	Shimadzu
Nastavci za pipete	Rainin

3.2 UZORCI

Uzorci za ovo istraživanje prikupljeni su na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu (FBF) Sveučilišta u Zagrebu, a donori uzoraka punoljetne su zdrave osobe i zaposlenici FBF-a. Uzorci su prikupljeni u dvije faze.

U prvoj fazi sudjelovalo je deset donora od kojih je prikupljen po jedan uzorak plazme dobivene venepunkcijom iz epruvete s EDTA antikoagulansom, suhe mrlje plazme (DPS) dobivene iz kapilarne krvi Noviplex™ plazma separatorom, kapilarne krvi na filter papiru Whatman (DBS) te uzorak kapilarne krvi uzorkovane Mitra štapićima na Neoteryx uređajima za samouzorkovanje (VAMS) što čini ukupno 40 uzoraka. Također, uz uzorke donora analizirana su se četiri uzorka standardne otopine plazme te dvije slijepe probe s vodom. Do analize uzorci su se čuvali u zamrzivaču.

U drugoj fazi sudjelovalo je pet donora od kojih je prikupljeno po šest uzoraka kapilarne krvi na filter papiru Whatman (DBS), kapilarne krvi na Mitra štapićima Neoteryx (VAMS) i suhe mrlje plazme na Noviplex™ plazma separatoru (DPS) što čini ukupno 90 uzoraka. Primarni uzorci čuvani su u zamrzivaču do dana obrade. Također, uz uzorke donora analizirano je pet uzoraka standardne otopine plazme te jedan uzorak slijepe probe s vodom.

3.3 PROTOKOL PRIPREME UZORAKA ZA KROMATOGRAFSKU ANALIZU

3.3.1 PRIKUPLJANJE PRIMARNIH UZORAKA

(I) Prikupljanje uzoraka plazme

Uzorci plazme prikupljeni su venepunkcijom u epruvete s K₂EDTA antikoagulansom. Uzorak krvi je centrifugiran, a plazma iz supernatanta alikvotirana i pohranjena u zamrzivaču do analize.

(II) Prikupljanje DBS uzorka

Uzorci suhe kapi krvi prikupljeni su na filter papirima (Whatman, USA) tako da su dvije kapi krvi prislonjene uz filter papir i, bez dodirivanja prstom, puštene da se rašire kapilarnim silama te osuše na zraku.

(III) Prikupljanje VAMS uzoraka

VAMS uzorci sakupljeni su na Neoteryx Mitra štapićima (Neoteryx, USA) potpunim natapanjem kapica kapilarnom krvlju i ostavljeni da se suše na zraku.

(IV) Prikupljanje DPS uzoraka

DPS uzorci prikupljeni su na Noviplex plazma-separirajućim karticama (Shimadzu, Japan) dodavanjem kapilarne krvi na područje za sakupljanje krvi do promjene boje indikatorskog polja. Filtracija je trajala tri minute nakon čega je gornji sloj kartice odlijepljen, a plazma-disk sušen na zraku 15 minuta.

3.3.2 RANDOMIZACIJA UZORAKA

Randomizacija uzoraka učinjena je kako bi se izbjegla nenamjerna pristranost tijekom analize uzoraka.

3.3.3 OBRADA PRIMARNIH UZORAKA

Primarni uzorci preneseni su na pločice za sakupljanje uzoraka s 96 jažica prema rasporedu dobivenom u prethodno obavljenoj randomizaciji. Svaki primarni uzorak ima zaseban protokol predobrade opisan u tablici 6.

Tablica 6. Protokoli predobrade primarnih uzoraka

PRIMARNI UZORAK	PROTOKOL PREDOBRADE
Plazma (faza 1)	10 μL plazme pipetirano je u jažice.
Plazma-disk (DPS) (faza 1, faza 2)	U jažici su pomiješani Noviplex TM plazma separator koji sadrži oko 2,5 μL plazme s 10 μL ultračiste vode.
Puna krv na filter papiru (DBS) (faza 1, faza 2)	Škarama ili puncherom odrezan je filter papir sa suhom kapi krvi i stavljen u jažicu u koju je potom dodano 10 μL ultračiste vode.
Puna krv na mitri (VAMS) (faza 1, faza 2)	Mitra štapić natopljen krvlju stavljen je u jažice sa 20 μL ultračiste vode i miješan na tresilici 45 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga 10 μL ekstrakta preneseno je u pločice sa ostalim uzorcima.

Uzorci na pločici za skupljanje miješaju se vorteksiranjem.

3.3.4 IZOLACIJA N-GLIKANA S PLAZMATSKIH GLIKOPROTEINA

(I) Denaturacija

U svaki uzorak dodano je po 20 μL 2%-tnog SDS-a sobne temperature i promiješano pipetom. Jažice su potom zatvorene adhezivnom folijom i inkubirane na temperaturi od 65 °C 10 minuta te hlađene 30 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je u svaki uzorak dodano po 10 μL 4%-tne Igepal otopine sobne temperature i promiješano pipetom. Uzorci su zatim inkubirani na tresilici pri blagom programu 15 minuta.

(II) Deglikozilacija

Otopina enzima PNGase F za deglikozilaciju proteina pripravljena je opreznim pipetiranjem 0.12 μL PNGase F u 10 μL 5xPBS-a po uzorku. Potrebno je uzeti u obzir grešku pipetiranja i pripremiti malo više otopine nego li je potrebno. U svaki je uzorak potom dodano po 10 μL pripravljene otopine enzima uz miješanje pipetom. Uzorci se čvrsto zatvoreni adhezivnom folijom inkubiraju na temperaturi od 37 °C tijekom 18 sati.

3.3.5 OBILJEŽAVANJE, PROČIŠĆAVANJE I ISPIRANJE N-GLIKANA PLAZME

(I) Obilježavanje glikana u uzorku

25 μL otopine za obilježavanje glikana dodano je u svaku jažicu s uzorkom, promiješano pipetom i zatvoreno adhezivnom folijom. Uzorci su potom promiješani na tresilici 10 minuta nakon čega su inkubirani 2 sata na temperaturi od 65 °C.

(II) Kondicioniranje GHP pločice

U svaku jažicu GHP pločice pipetirano je po 200 μL 70%-tnog etanola i vakuumirano u otpad. Isto je ponovljeno s ultračistom vodom i 96%-tnim hladnim ACN-om. Treba paziti da tijekom vakuumiranja tlak pumpe ne prijeđe 2 inHg.

(III) Pročišćavanje obilježenih N-glikana iz uzorka

U svaku jažicu s uzorkom dodano je po 700 μL hladnog 100%-tnog ACN-a i promiješano pipetom. Ukupni volumen uzorka, koji je iznosio oko 775 μL (75 μL uzorka i 700 μL ACN-a) prenesen je u odgovarajuću jažicu GHP pločice te inkubiran 2 minute i potom vakuumiran u otpad. Filter pločica pročišćena je pipetiranjem po 200 μL hladnog 96%-tnog ACN-a u svaku jažicu s uzorkom u četiri ciklusa uz vakuumiranje. Nakon toga, u zadnjem koraku pročišćavanja s ACN-om, GHP pločica stavljena je na pločicu s jedno- ili dvomililitarskim jažicama za 96 uzoraka te je pipetirano po 200 μL hladnog 96%-tnog ACN-a u svaku jažicu GHP pločice s uzorkom i sve zajedno centrifugirano 5 minuta na 1000 rpm.

(IV) Eluiranje označenih N-glikana s GHP filtera

GHP pločica postavljena je na vrh ABgene PCR pločice. U svaku GHP jažicu s uzorkom dodano je po 90 μL ultračiste vode i miješano na tresilici 15 minuta i zatim centrifugirano 5 minuta na 1000 rpm čime je sakupljena prva frakcija eluata u PCR pločicu. Postupak je ponovljen da bi se sakupila druga frakcija eluata u istu PCR pločicu. Ukupan volumen eluata treba biti 180 μL . Jažice PCR pločice zatvorene su odgovarajućim čepovima i pohranjene u zamrzivač na temperaturi od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.6 ANALIZA IZOLIRANIH N-GLIKANA

Uzorak pročišćenih glikana obilježenih 2-aminobenzamidom analiziran je metodom tekućinske kromatografije hidrofilnih interakcija (HILIC) na *Waters Acquity* tekućinskom kromatografu ultravisoke djelotvornosti (UPLC) spregnutim s fluorescentnim detektorom (FLR). Glikani su razdvojeni na *Waters Glycan BEH* (engl. *bridged ethylene hybrid*, BEH) kromatografskoj koloni duljine 150 mm i unutarnjeg promjera od 2.1 mm (150 x 2.1 mm) s BEH česticama promjera 1.7 μm . Mobilna faza smjesa je 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ otopine amonijeva formijata, pH 4,4 (otapalo A) i 100%-tnog acetonitrila (otapalo B). Koristeći *Empower 3* program zadani su željeni uvjeti protoka i gradijenta mobilne faze prikazani u tablici 7., temperatura kolone koja se održava na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ i temperatura uzorka koja se održava na $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Valna duljina ekscitacije fluorescentno obilježenog glikana iznosi 250 nm, a valna duljina emisije fluorokroma i detekcije iznosi 428 nm.

Tablica 7. Program elucije

VRIJEME (min)	PROTOK (mL/min)	%A (vol./vol.)	%B (vol./vol.)
0	0,561	30,0	70,0
1,47	0,561	30,0	70,0
24,81	0,561	47,0	53,0
25,50	0,250	70,0	30,0
27,00	0,250	70,0	30,0
28,00	0,250	30,0	70,0
31,5	0,561	30,0	70,0

Nakon završetka analize obrađeni su podaci u *Empower* programu, a potom ručno integrirani pikovi u dobivenim kromatogramima.

3.3.7 STATISTIČKA OBRADA

(I) Prva faza

Rezultati dobiveni integriranjem površina pikova kromatograma obrađeni su u Excel programu koristeći metode deskriptivne statistike.

U prvoj fazi istraživanja proučavana je usporedivost korištenih metoda mikrouzorkovanja krvi sa standardnom metodom uzorkovanja, venepunkcijom, u analizi glikanskog profila plazme. U tu svrhu izračunata je relativna razlika između površina pikova testiranih metoda mikrouzorkovanja i venepunkcije za svaki pik i svakog ispitanika prema formuli (2):

$$RR = \frac{gp_x - GP_x}{GP_x} \quad (2)$$

gdje RR označava relativnu razliku, gp_x relativnu površinu glikanskog pika x u uzorku dobivenom metodom mikrouzorkovanja, a GP_x relativnu površinu glikanskog pika x u uzorku plazme dobivene venepunkcijom.

Iz odgovarajućih relativnih razlika svih deset ispitanika izračunat je medijan i interkvartilni raspon koji je prikazan tablično i grafički linijskim dijagramom.

Uz to, izračunat je medijan površine glikanskih pikova svih deset ispitanika dobivenih iz kromatograma uzorka plazme što je prikazano tablično i grafički stupčastim dijagramom.

(II) Druga faza

U drugoj fazi istraživanja proučavala se ponovljivost¹² rezultata dobivenih metodama mikrouzorkovanja. Izračunati su medijani koeficijenata varijacije (CV) za svaki od 39 pikova iz heksaplikata dobivenih od pet ispitanika. VAMS uzorak jednog ispitanika izbacio se iz statističke obrade zbog neispravnog uzorkovanja.

Izračunati koeficijenti varijacije (%CV) prikazani su grafički stupčastim dijagramom.

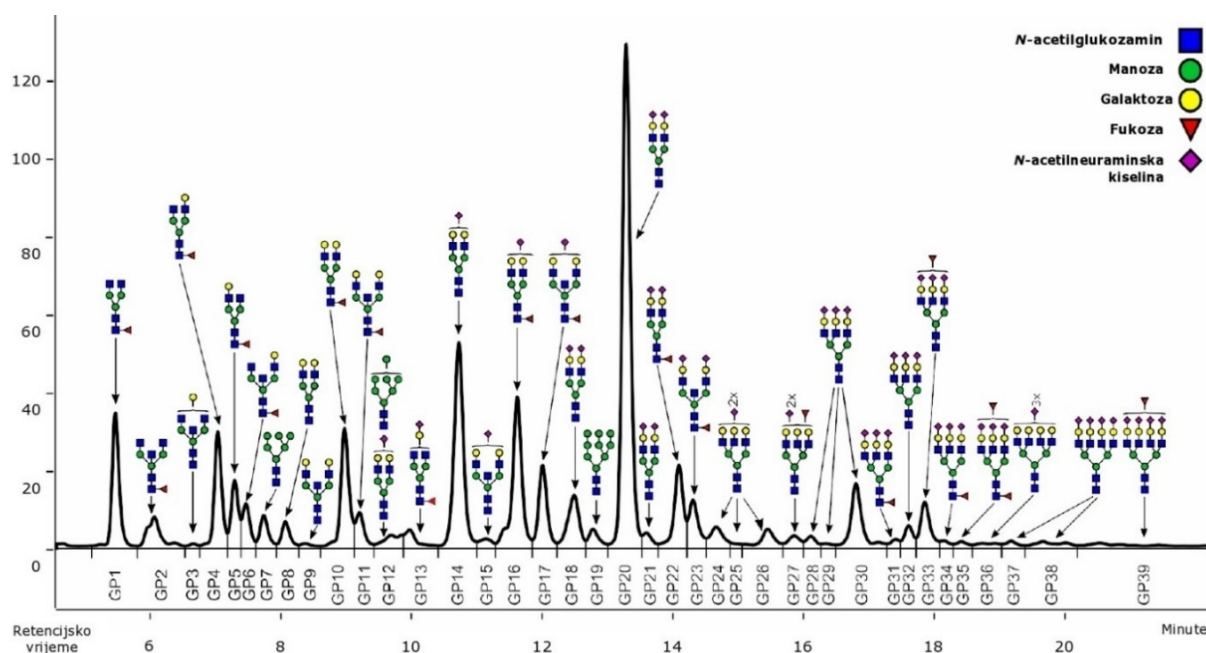
U statističkoj analizi kao mjere centralne tendencije i rasipanja korišteni su medijan i interkvartilni raspon zato što je broj uzoraka manji od 30 te se nije mogla utvrditi normalnost razdiobe.

¹² Ponovljivost je vrsta preciznosti koja se izvodi u uvjetima ponovljivosti, a to su uvjeti u kojima su neovisni rezultati ispitivanja dobiveni istom metodom u istom laboratoriju od istog operatera, uporabom iste opreme unutar kratkog vremenskog intervala i izražava se koeficijentom varijacije. (Čvorišćec i Čepelak, 2009)

4. REZULTATI I RASPRAVA

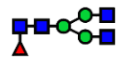
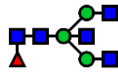
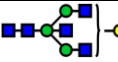
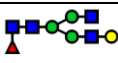

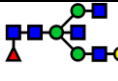
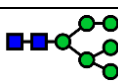


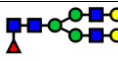

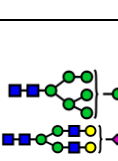
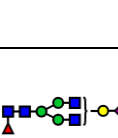
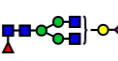


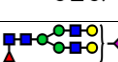
4.1 KROMATOGRAMI IZOLIRANIH N-GLIKANA

N-glikani plazme se zbog razlika u kemijskim i fizikalnim osobinama razdvajaju u 39 glikanskih skupina, tj. glikanskih pikova (GP), koji se sastoje od dominantnih i manje zastupljenih glikana. Na slici 7. prikazana je struktura dominantnih N-glikana eluiranih u određenom retencijskom vremenu, a u tablici 8. navedeni su i manje zastupljeni glikani pojedinog glikanskog pika. Kao što je navedeno u 11, retencijsko vrijeme manje polarnih glikana u HILIC metodi kraće je od retencijskog vremena polarnijih glikana. Najveći doprinos polarnosti glikana daje sijalinska kiselina koja jedina nosi naboj, a kako glikani plazme sadrže nula do četiri sijalinske kiseline može se grubo predvidjeti redosljed elucije glikana ovisno o broju vezanih sijalinskih kiselina. Tako se glikani bez sijalinske kiseline (GP1-GP11) eluiraju prvi, a zatim oni s jednom (GP12-17), dvije (GP18-27), tri (GP 28-36) te konačno oni s četiri (GP37-39) takve skupine.

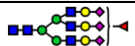



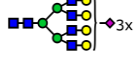




Slika 7. Shematski prikaz kromatograma dobivenog analizom izoliranih N-glikana HILIC-UPLC-FLR metodom. Prikazane su najzastupljenije glikanske strukture za svaki glikanski pik.

Tablica 8. Detaljni strukturni opis svih glikanskih struktura prisutnih u 39 glikanska pika proteina plazme s grafičkim prikazom dominantne strukture za svaki pik.

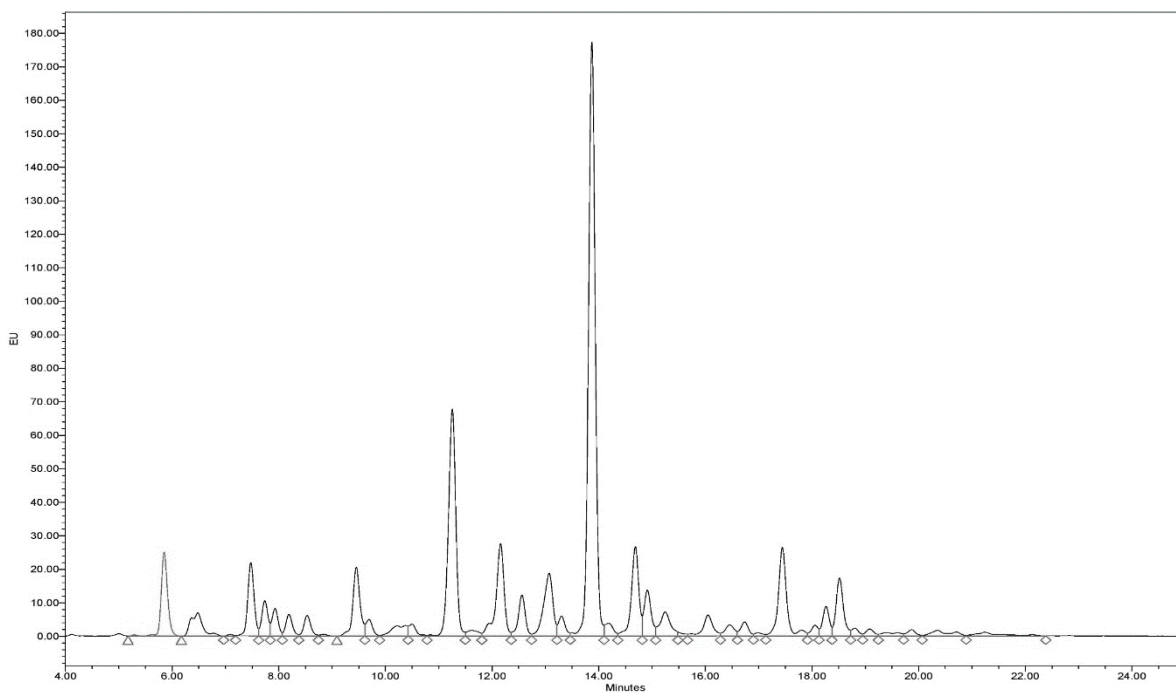
Glikanski pik	Struktura glikana	Opis strukture glikana
GP1		sržno fukoziliran biantenar
GP2		sržno fukoziliran biantenar s račvajućim GlcNAc; oligomanozni
GP3		monogalaktoziliran biantenar s račvajućim GlcNAc
GP4		sržno fukoziliran i monogalaktoziliran biantenar
GP5		sržno fukoziliran i monogalaktoziliran biantenar
GP6		sržno fukoziliran i monogalaktoziliran biantenar s račvajućim GlcNAc
GP7		oligomanozni; sržno fukoziliran i monogalaktoziliran biantenar s račvajućim GlcNAc
GP8		digalaktoziliran biantenar
GP9		digalaktoziliran biantenar s račvajućim GlcNAc
GP10		sržno fukoziliran, digalaktoziliran biantenar
GP11		sržno fukoziliran, digalaktoziliran biantenar s račvajućim GlcNAc
GP12		oligomanozni; digalaktoziliran, monosijaliniziran biantenar; tetramanoziliran, monogalaktoziliran, monosijaliniziran monoantenar; monogalaktoziliran, monosijaliniziran biantenar s račvajućim GlcNAc
GP13		sržno fukoziliran, monogalaktoziliran i monosijaliniziran biantenar; sržno fukoziliran, monogalaktoziliran i monosijaliniziran biantenar s račvajućim GlcNAc
GP14		digalaktoziliran i monosijaliniziran biantenar
GP15		digalaktoziliran i monosijaliniziran biantenar s račvajućim GlcNAc
GP16		sržno fukoziliran, digalaktoziliran i monosijaliniziran biantenar
GP17		sržno fukoziliran, digalaktoziliran i monosijaliniziran biantenar s račvajućim GlcNAc

Glikanski pik	Struktura glikana	Opis strukture glikana
GP18		digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar; sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar
GP19		oligomanozni
GP20		digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar
GP21		digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar; trigalaktoziliran i monosijaliniziran triantenar; sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar; digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar s račvujućim GlcNAc; antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i monosijaliniziran triantenar
GP22		sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar
GP23		sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar s račvujućim GlcNAc
GP24		trigalaktoziliran i disijaliniziran triantenar; antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i monosijaliniziran triantenar
GP25		trigalaktoziliran i disijaliniziran triantenar; sržno fukoziliran, antenarno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar; antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i disijaliniziran triantenar
GP26		trigalaktoziliran i disijaliniziran triantenar; sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i disijaliniziran triantenar
GP27		antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i disijaliniziran triantenar; trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar
GP28		trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar; antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i disijaliniziran triantenar
GP29		trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar; antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i disijaliniziran triantenar
GP30		trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar; antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar
GP31		sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar; trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar
GP32		trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar

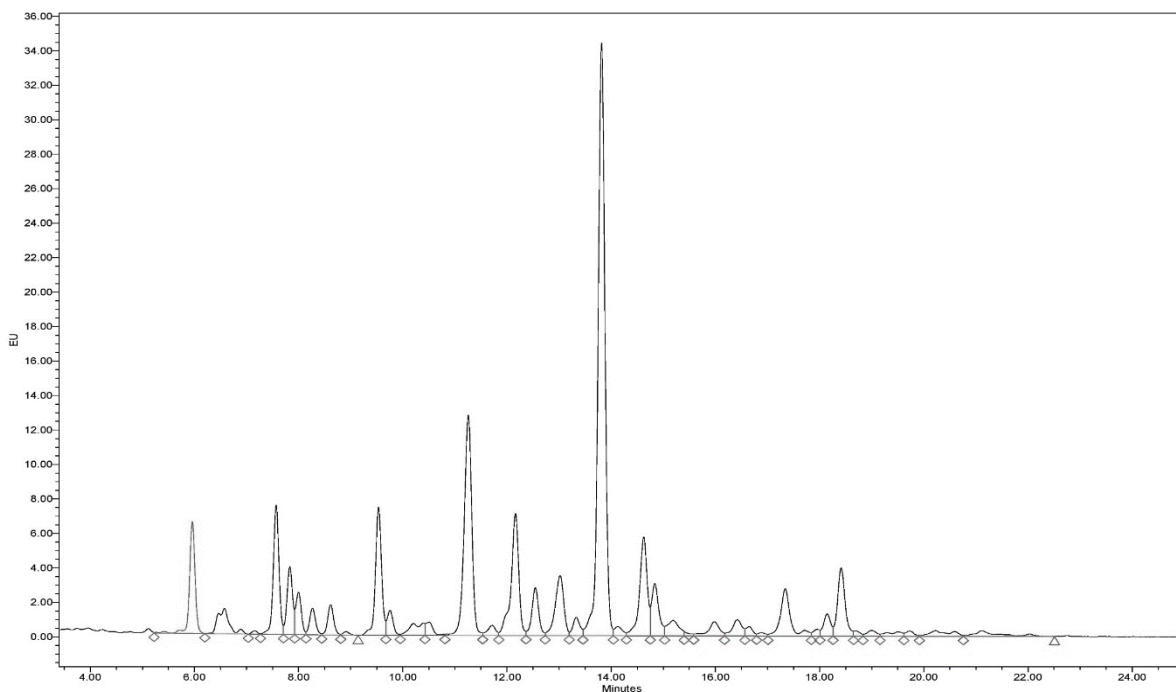
Glikanski pik	Struktura glikana	Opis strukture glikana
GP33		antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar
GP34		sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar; tetragalaktoziliran i trisijaliniziran tetraantenar
GP35		sržno fukoziliran, antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar; antenarno fukoziliran, tetragalaktoziliran i trisijaliniziran tetraantenar
GP36		tetragalaktoziliran i trisijaliniziran tetraantenar; antenarno fukoziliran, tetragalaktoziliran i trisijaliniziran tetraantenar
GP37		tetragalaktoziliran i tetrasijaliniziran tetraantenar; antenarno fukoziliran, tetragalaktoziliran i trisijaliniziran tetraantenar
GP38		tetragalaktoziliran i tetrasijaliniziran tetraantenar; antenarno fukoziliran, tetragalaktoziliran i tetrasijaliniziran tetraantenar; antenarno fukoziliran, tetragalaktoziliran i trisijaliniziran tetraantenar
GP39		antenarno fukoziliran, tetragalaktoziliran i tetrasijaliniziran tetraantenar; antenarno difukoziliran, tetragalaktoziliran i tetrasijaliniziran tetraantenar

Na slikama 8., 9., 10. i 11. prikazani su primjeri kromatograma¹³ dobivenih iz uzorka plazme, DPS-a, VAMS-a i DBS-a. U svim kromatogramima može se detektirati svaki od 39 glikanskih skupina prema slici 7. u odgovarajućim retencijskim vremenima. Međutim, kromatogrami se vidno razlikuju prema intenzitetu pozadinskog šuma te po intenzitetu pojedinih glikanskih pikova manje površine, što je posebno izraženo u DBS kromatogramima, ali i prema ukupnom intenzitetu cijelog kromatograma. Zbog toga je DBS kromatograme zahtjevnije integrirati što dovodi do povećane mogućnosti grešaka tijekom integriranja.

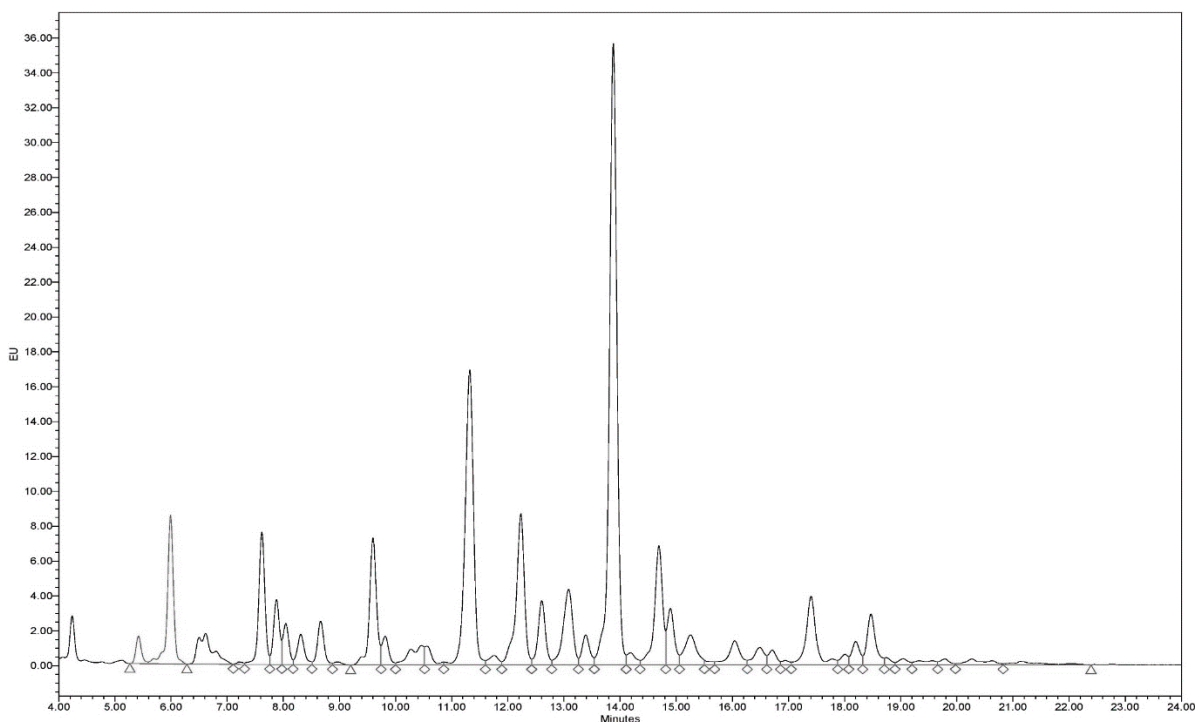
¹³ EU = emisijska jedinica (engl. *emission unit*)



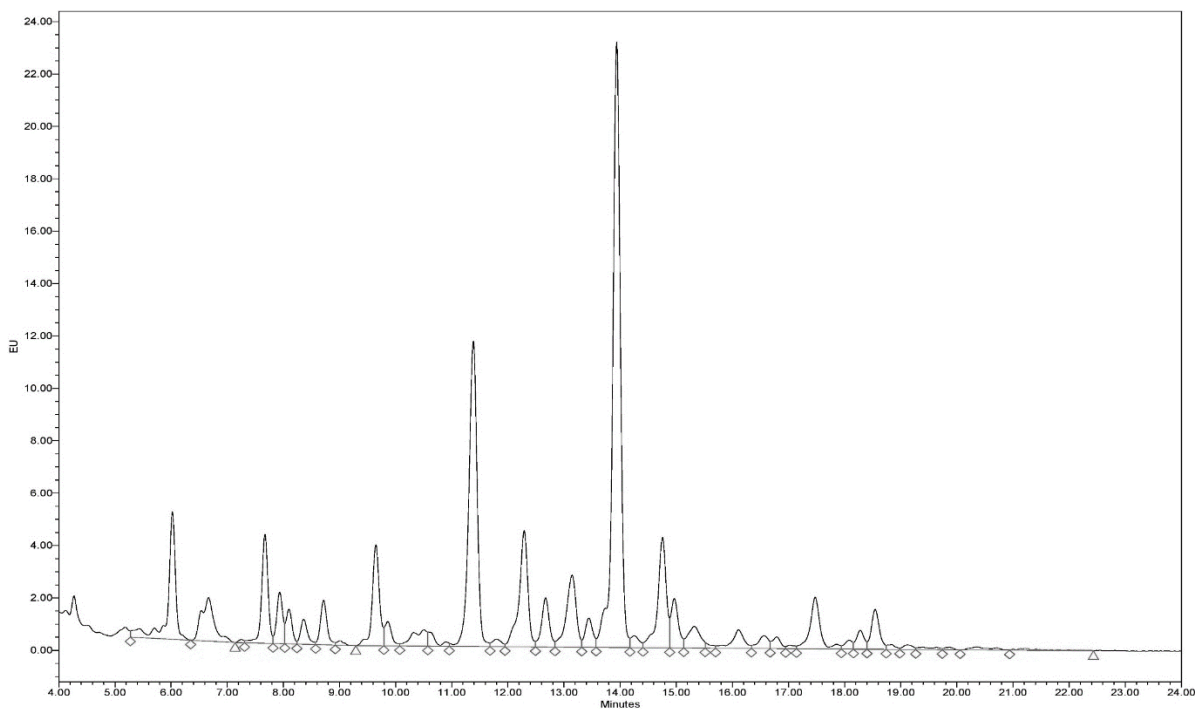
Slika 8. Primjer kromatograma dobivenog analizom izoliranih N-glikana HILIC-UPLC-FLR metodom iz uzorka plazme dobivene klasičnom venepunkcijom.



Slika 9. Primjer kromatograma dobivenog analizom izoliranih N-glikana HILIC-UPLC-FLR metodom iz uzorka suhe mrlje plazme dobivene pomoću Noviplex plazma separatora.



Slika 10. Primjer kromatograma dobivenog analizom izoliranih N-glikana HILIC-UPLC-FLR metodom iz uzorka suhe krvi dobivene VAMS metodom pomoću Neoteryx Mitre.



Slika 11. Primjer kromatograma dobivenog analizom izoliranih N-glikana HILIC-UPLC-FLR metodom iz uzorka suhe kapi krvi (DBS) dobivenog na Whatman filter papiru.

4.2 PRVA FAZA - USPOREDIVOST

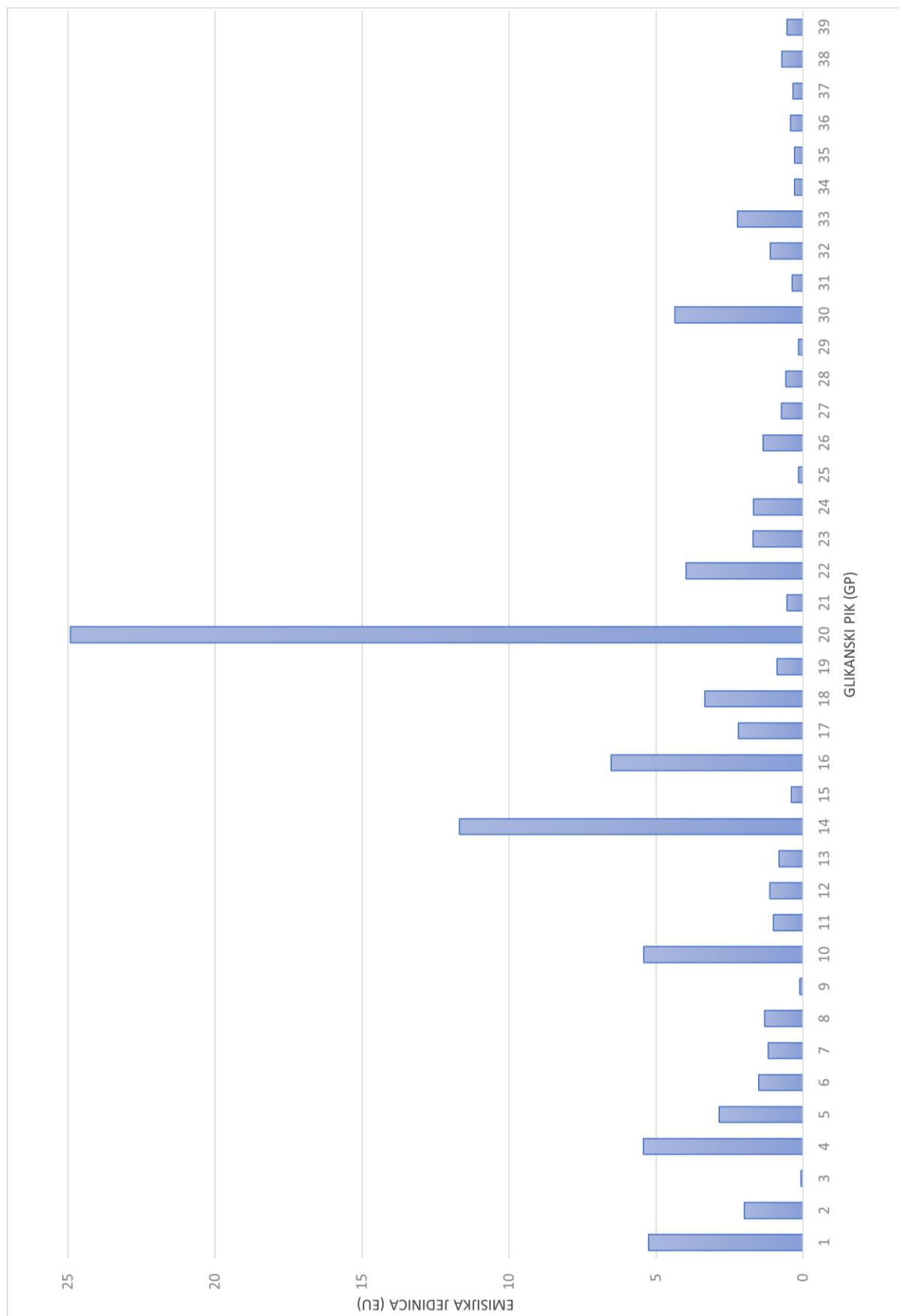
U prvoj fazi istraživala se usporedivost rezultata analize glikana iz uzoraka dobivenih mikrouzorkovanjem DBS, VAMS i DPS metodama sa standardnom metodom, tj. analizom glikana proteina plazme iz uzorka plazme dobivene venepunkcijom. U analizi je sudjelovalo deset ispitanika od kojih su prikupljeni po jedan uzorak plazme, DBS-a i DPS-a i VAMS-a. Tih 50 uzoraka, uz 4 standardna uzorka i 2 slijepe probe ukupno čini 56 uzoraka. Rezultati su prikazani u tablici 9. i tablici 10. numerički te slici 12. i slici 13. grafički.

Tablica 9. Prikaz medijana (M) površine glikanskih pikova dobivenih analizom glikana u uzorku plazme dobivene venepunkcijom

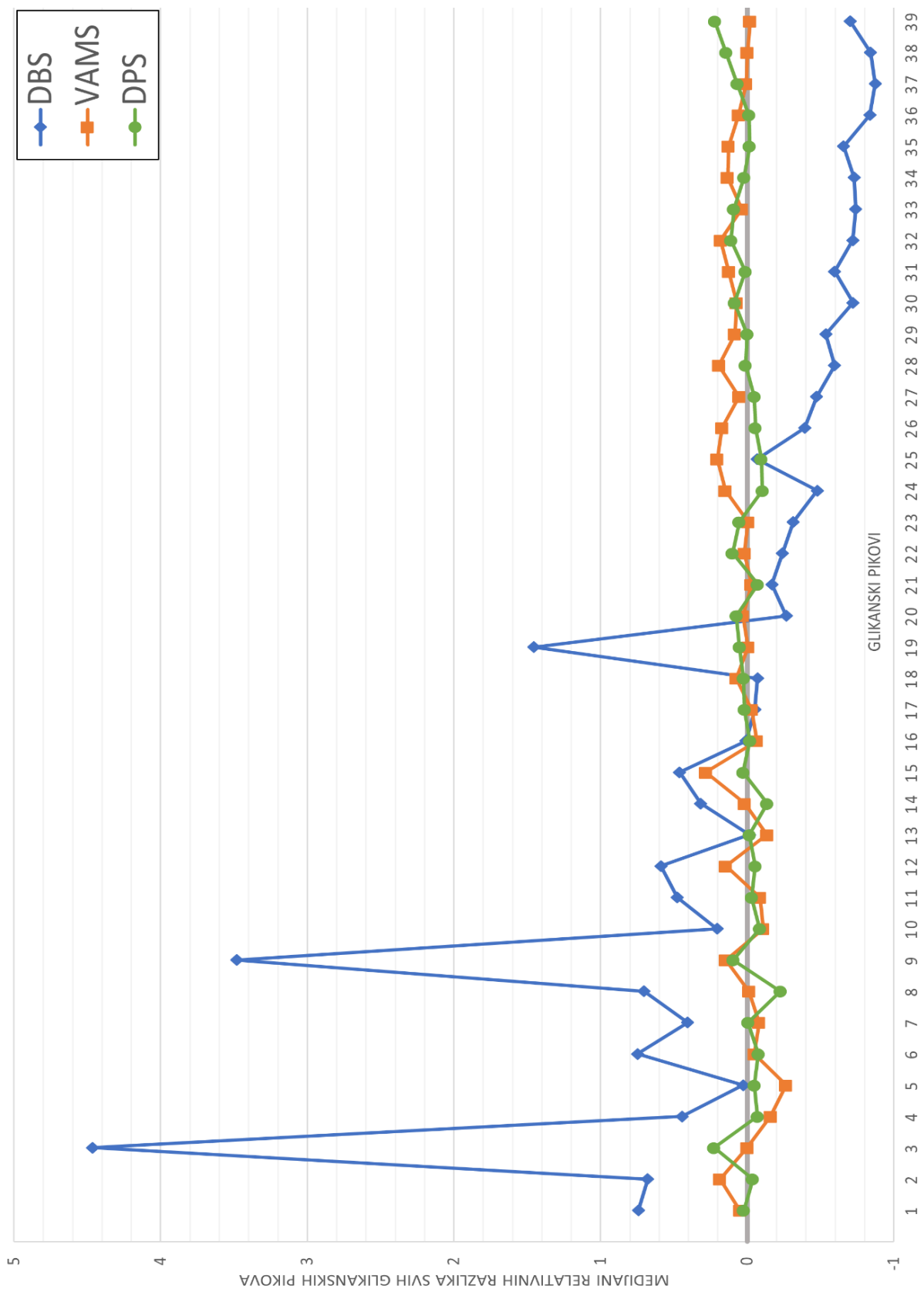
Glikanski pik	M plazma (%)	Glikanski pik	M plazma (%)
GP1	5,26	GP21	0,54
GP2	1,99	GP22	3,98
GP3	0,07	GP23	1,7
GP4	5,43	GP24	1,69
GP5	2,85	GP25	0,14
GP6	1,51	GP26	1,36
GP7	1,18	GP27	0,74
GP8	1,30	GP28	0,58
GP9	0,10	GP29	0,14
GP10	5,42	GP30	4,35
GP11	1,00	GP31	0,36
GP12	1,13	GP32	1,12
GP13	0,81	GP33	2,22
GP14	11,69	GP34	0,28
GP15	0,395	GP35	0,28
GP16	6,53	GP36	0,42
GP17	2,19	GP37	0,34
GP18	3,34	GP38	0,72
GP19	0,88	GP39	0,54
GP20	24,91		

Tablica 10. Prikaz medijana relativnih razlika dobivenih usporedbom pojedine metode mikrouzorkovanja sa standardnom metodom analize glikana iz uzorka plazme dobivene venepunkcijom.

		Medijan relativne razlike					
Glikanski pik	DBS	VAMS	DPS	Glikanski pik	DBS	VAMS	DPS
GP1	0,74	0,05	0,02	GP21	-0,17	-0,03	-0,07
GP2	0,68	0,19	-0,04	GP22	-0,24	0,02	0,10
GP3	4,46	0,00	0,23	GP23	-0,31	-0,01	0,05
GP4	0,44	-0,16	-0,07	GP24	-0,48	0,15	-0,10
GP5	0,03	-0,27	-0,05	GP25	-0,07	0,20	-0,10
GP6	0,75	-0,05	-0,08	GP26	-0,39	0,17	-0,06
GP7	0,41	-0,08	-0,01	GP27	-0,47	0,06	-0,05
GP8	0,70	-0,01	-0,23	GP28	-0,60	0,19	0,01
GP9	3,48	0,15	0,10	GP29	-0,54	0,08	0,00
GP10	0,21	-0,11	-0,09	GP30	-0,72	0,07	0,09
GP11	0,48	-0,09	-0,03	GP31	-0,60	0,13	0,01
GP12	0,59	0,15	-0,06	GP32	-0,72	0,18	0,11
GP13	-0,01	-0,14	-0,02	GP33	-0,74	0,04	0,09
GP14	0,32	0,02	-0,14	GP34	-0,73	0,13	0,02
GP15	0,46	0,28	0,03	GP35	-0,66	0,13	-0,02
GP16	0,01	-0,07	-0,02	GP36	-0,84	0,06	-0,01
GP17	-0,05	-0,03	0,02	GP37	-0,87	0,01	0,07
GP18	-0,07	0,07	0,02	GP38	-0,84	0,00	0,14
GP19	1,45	-0,01	0,05	GP39	-0,70	-0,02	0,22
GP20	-0,27	0,03	0,07				



Slika 12. Medijani površina 39 glikanskih pikova dobivenih analizom glikana iz uzorka plazme prikazanih stupčastim dijagramom.



Slika 13. Usporedba metoda mikrouzorkovanja u analizi glikana proteina plazme sa standardnom metodom za analizu glikana iz uzorka plazme prikazana linijskim dijagramom.

Svaka točka na grafu na slici 13. prikazuje medijan izračunate relativne razlike pojedinog glikanskog pika. Relativna razlika je to manja što linija određene metode bolje prati x-os pa je u tom slučaju metoda mikrouzorkovanja bolje usporediva s analizom glikana iz uzorka plazme. Lako se može uočiti da su VAMS i DPS metode mnogo bolje usporedive s metodom venepunkcije nego DBS metoda. Usporedbom s relativnim udjelom pojedinog pika izračunatog na uzorku plazme (Tablica 9., Slika 12.) može se vidjeti da je relativna razlika to veća što je površina ispod pika manja, tj. što je glikan manje zastupljen u ukupnom kromatogramu. To je posebno uočljivo kod uzorka DBS-a. DPS i VAMS uzorci pokazali su izvrsno poklapanje sa standardnom metodom čak i za glikanske pikove male relativne površine.

Relativno lošem rezultatu DBS-a zasigurno je doprinijelo izrezivanje krvne mrlje škarama umjesto puncherom što je povećalo varijabilnosti rezultata te metode. DBS uzorak bi se trebao izrezivati standardiziranom metodom koristeći puncher, ili uzorkovati nekom od volumetrijskih metoda na filter papiru.

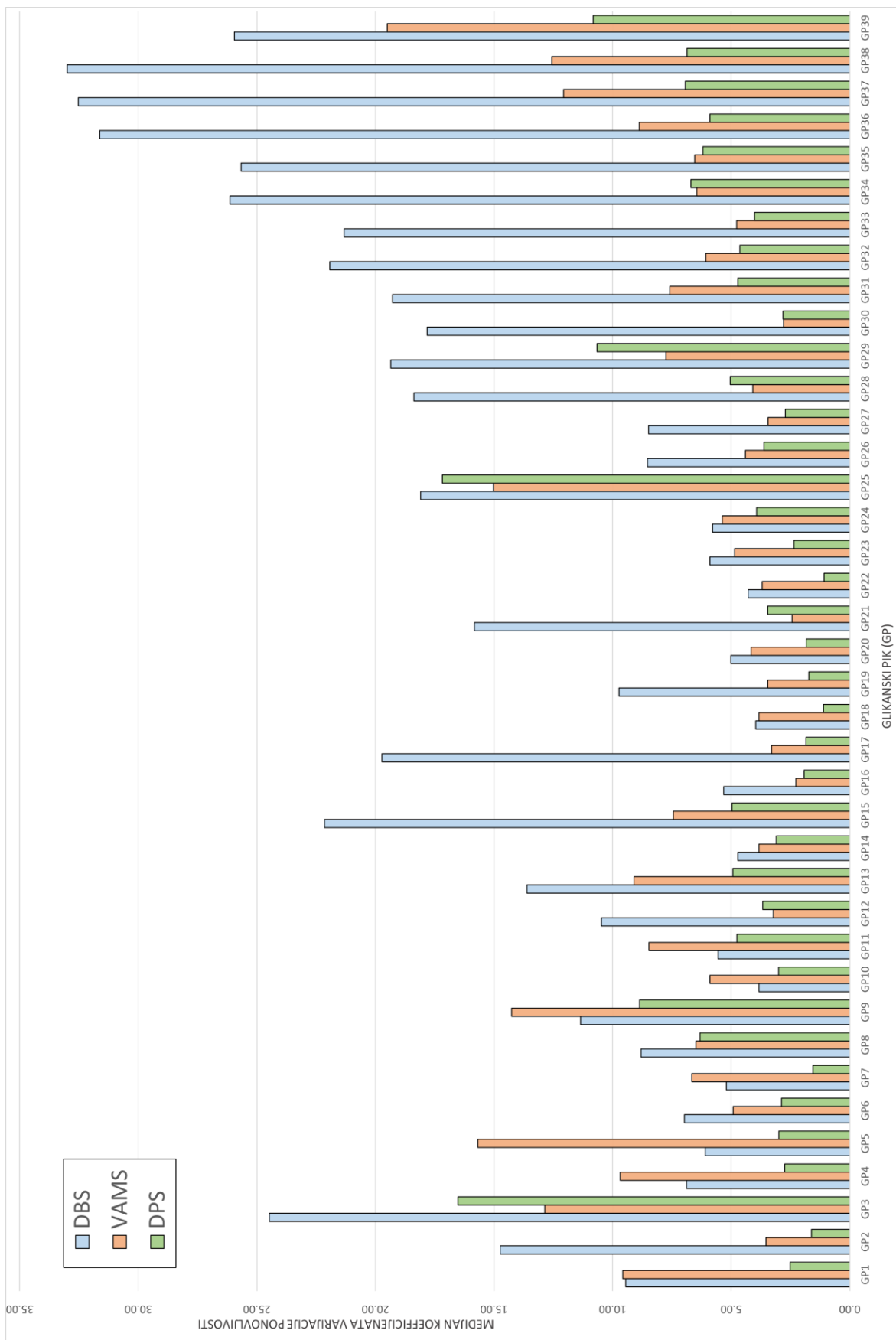
4.3 DRUGA FAZA - PONOVLJIVOST

U drugoj fazi rada istraživala se ponovljivost rezultata dobivenih DBS, VAMS i DPS metodama mikrouzorkovanja. Sudjelovalo je šest ispitanika kojima se uzimao uzorak u heksaplikatu za svaku od metoda. Iz relativnih udjela svakog glikanskog pika dobivenog pojedinom metodom izračunala se aritmetička sredina i standardna devijacija te koeficijent varijacije kod svakog ispitanika pojedinačno. Od dobivenih koeficijenata varijacije glikanskih pikova svakog od pet ispitanika izračunati su medijani za svaki glikanski pik i svaku metodu te izraženi tablično u tablici 11. i grafički na slici 14..

Tablica 11. Prikaz medijana CV-a 39 glikanskih pikova triju ispitanih metoda mikrouzorkovanja, aritmetičke sredine medijana CV-ova za svaku metodu (\bar{x}) te udjela medijana CV-ova glikanskih pikova svake metode s arbitrarno definiranim granicama (<7 % označeno zeleno, 7-15 % označeno žuto, >15 % označeno crveno).

Glikanski pik	DBS (%)	VAMS (%)	DPS (%)
GP1	9,45	9,57	2,52
GP2	14,74	3,53	1,62
GP3	24,47	12,86	16,51
GP4	6,89	9,68	2,74

Glikanski pik	DBS (%)	VAMS (%)	DPS (%)
GP5	6,09	15,68	2,99
GP6	6,98	4,91	2,88
GP7	5,20	6,66	1,55
GP8	8,80	6,49	6,32
GP9	11,35	14,25	8,86
GP10	3,83	5,90	3,00
GP11	5,55	8,46	4,76
GP12	10,48	3,22	3,66
GP13	13,61	9,10	4,93
GP14	4,72	3,83	3,10
GP15	22,14	7,44	4,97
GP16	5,31	2,27	1,93
GP17	19,72	3,29	1,85
GP18	3,97	3,82	1,10
GP19	9,73	3,46	1,72
GP20	5,02	4,16	1,83
GP21	15,83	2,43	3,46
GP22	4,28	3,69	1,08
GP23	5,90	4,86	2,36
GP24	5,78	5,37	3,92
GP25	18,10	15,03	17,17
GP26	8,53	4,40	3,62
GP27	8,48	3,45	2,71
GP28	18,38	4,08	5,04
GP29	19,35	7,75	10,65
GP30	17,82	2,79	2,82
GP31	19,27	7,59	4,72
GP32	21,93	6,06	4,63
GP33	21,32	4,77	4,02
GP34	26,14	6,45	6,69
GP35	25,66	6,54	6,19
GP36	31,62	8,87	5,90
GP37	32,52	12,06	6,93
GP38	33,00	12,56	6,86
GP39	25,94	19,50	10,82
\bar{x}	14,31	7,10	4,83
CV (%) < 7.00	33 %	62 %	87 %
CV (%) = 7.00 – 15	23 %	30 %	8 %
CV (%) > 15	44 %	8 %	5 %



Slika 14. Prikaz medijana koeficijenta varijacije dobivenih testiranjem ponovljivosti metode mikrouzorkovanja pomoću stupčastog dijagrama za 39 glikanska pika.

Pomoću rezultata prikazanih u tablici 11. i slici 14. može se usporediti ponovljivost pojedine metode za svaki od 39 pikova. Evidentno je da je metoda s uvjerljivo najvećom ponovljivošću DPS metoda na Noviplex plazma-separatoru jer je udio glikanskih pikova s CV-om manjim od 7 % najveći od tri ispitivane metode i iznosi 87 %, a udio onih s CV-om većim od 15 % najmanji od tri ispitivane metode i iznosi 5 %. Također aritmetička sredina medijana glikanskih pikova najmanja je za DPS metodu s iznosom 4,83 %, a najveću za DBS metodu s iznosom 14,31 %. DBS metoda imala je najslabiju ponovljivost i nije se pokazala najboljom niti za jedan glikanski pik. VAMS metoda se po ponovljivošću smjestila između DPS i DBS. Također, za VAMS metodu uočena je bolja ponovljivost za glikanske pikove male površine po čemu se razlikuje od ostale dvije metode što može biti rezultat uzorkovanja vrlo kontroliranog volumena kapi krvi.

5. ZAKLJUČAK

Određivanje glikanskog profila plazme ima veliki potencijal da se nametne kao značajna prognostička i dijagnostička metoda kod brojnih bolesti koje imaju upalnu komponentu. Iz tih razloga potreba za analizom glikanskog profila plazme sve je veća i sve se češće provodi pa je razvoj visokoprotočnih i pristupačnih metoda logičan korak u povećanju dostupnosti te vrste analize korisnicima. UPLC kromatografska metoda u tom je smislu bolja od HPLC-a iz niza razloga kao što su potreba za manjim volumenom uzorka i otapala, kraće trajanje analize, brža priprema kolone i veća osjetljivost detektora. Mogućnost analize vrlo malog volumena uzorka UPLC metodom otvorila je vrata metodama mikrouzorkovanja kapilarne krvi koje imaju niz prednosti u odnosu na klasično uzorkovanje krvi venepunkcijom, a to je prvenstveno mogućnost samouzorkovanja bez prisutnosti profesionalnog osoblja, ali i praktičnost u transportu. DBS metoda mikrouzorkovanja za određivanje glikanskog profila plazme već se godinama koristi sa zadovoljavajućim rezultatima. Ipak, u ovom radu pokazano je da postoje metode mikrouzorkovanja koje imaju mnogo bolju usporedivost s rezultatima analize iz uzorka plazme dobivene venepunkcijom te imaju veću preciznost u seriji, odnosno ponovljivost. Uzorci DPS-a na ispitivanom su uzorku imali najbolju usporedivost s uzorkom plazme, kao i najbolju ponovljivost. VAMS metoda imala je manju usporedivost i ponovljivost od DPS metode, ali i dalje mnogo veću nego DBS metoda.

Da bi se u konačnici donijela odluka o metodi izbora za analizu glikanskog profila plazme trebaju se uzeti u obzir, osim analitičkih performansi, i ostali parametri metoda. To su mogućnost primjene u visokoprotočnom sustavu, za što, trenutno, VAMS metoda ima najveći potencijal. Zatim cijena metode koja je daleko najniža za filter papir, a najveća za plazma separator. Također, vrlo je važna lakoća samouzorkovanja i minimaliziranje stupnja loše sakupljenih uzoraka. Najjednostavnija metoda za uzorkovanje je sakupljanje suhe kapi krvi na filter papiru, ali istovremeno ima najveći postotak pogrešno sakupljenih uzoraka kao i najveću podložnost utjecaju hematokrita i mjesta izrezivanja. VAMS metoda također je vrlo jednostavna za uzorkovanje, iako se lako može dogoditi da se ne sakupi dovoljna količina uzorka, dok je u DPS metodi taj problem eliminiran indikatorskim poljem. Nažalost, proces sakupljanja krvi DPS metodom najsloženiji je od ispitivanih metoda. Konačno, važan faktor je i cijena metode. Ispitivani uređaji za sakupljanje DPS i VAMS uzoraka višestruko su skuplji od filter papira za sakupljanje DBS uzorka.

Prema tome, odluka o metodi izbora ovisi o mnogo faktora i neće biti jednaka za svaki laboratorij i vrstu istraživanja već se mora definirati ovisno o postavljenim analitičkim zahtjevima, cijeni, potrebom za transportom i sl. Iako je već sada jasan potencijal, ali i potreba za metodama mikrouzorkovanja, buduća istraživanja na većem broju uzoraka trebaju detaljnije opisati njihove performanse i usporedivost sa standardnim metodama čime će nove metode mikrouzorkovanja zasigurno dobiti važno mjesto u analizi glikanskog profila plazme, ali i šire.

6. LITERATURA

- Alley WR, Mann BF, Novotny MV. High-sensitivity analytical approaches for the structural characterization of glycoproteins, *Chem Rev*, 2013, 113(4), 2668–2732.
- Boušová I i sur. Enzyme activity and AGE formation in a model of AST glycooxidation by D-fructose in vitro. *Acta Pharm*, 2005, 55(1), 107–114.
- Cooper GM, Hausman RE. Stanica - Molekularni pristup. Zagreb, Medicinska naklada, 2004, str. 305-307, 493.
- Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2004, str. 11.
- Delahaye L i sur. Alternative Sampling Devices to Collect Dried Blood Microsamples: State-of-the-Art. *Ther Drug Monit*, 2021, 43(3), 310–321.
- Goetz LH, Schork NJ. Personalized medicine: motivation, challenges, and progress. *Fertil Steril*, 2018, 109(6), 952–963.
- Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers*, 2008, 25(4–5), 267–278.
- Hart GW. Structural and functional diversity of glycoconjugates: a formidable challenge to the glycoanalyst. *Methods Mol Biol*, 2003, 213, 3–24.
- Hemström P, Irgum K. Hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci*, 2006, 29(12), 1784-1821.
- komenzalizam. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021.,
<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=32562>, pristupljeno 27. 8. 2021.
- Introduction to P4 medicine, 2021.,
<https://promise.bit.ai/docs/view/dgPvUL2mLmzpv7vG>, pristupljeno 2. 8. 2021.
- Kamal S, Sharad W. Step-up in liquid chromatography from HPLC to UPLC: A comparative and comprehensive review. *Pharma Innovation*, 2018, 7(8), 342–347.

Generalić, Eni. "Anomer." Englesko-hrvatski kemijski rječnik & glosar, 2018.,
<https://glossary.periodni.com>, pristupljeno 27 8. 2021.

De Kesel PM i sur. Hemato-critical issues in quantitative analysis of dried blood spots: Challenges and solutions. *Bioanalysis*, 2013, 5(16), 2023–2041.

Knežević A i sur. Variability, heritability and environmental determinants of human plasma n-glycome. *J Proteome Res*, 2009, 8(2),. 694–701.

Lauc G i sur. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2016, 1860(8), 1574–1582.

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

Novilytic 2021.,
<https://www.novilytic.com/product-page/noviplex-uno>, pristupljeno 27.8.2021.

Skoog DA, Holler JF, Crouch SR. Principles of Instrumental Analysis, Seventh Edition. Boston, Cengage Learning, 2016, str. 695-719, 746-756.

Swartz ME. UPLCTM: An introduction and review. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2005, 28(7–8), 1253–1263.

Tisch Scientific, 2021.,
<https://scientificfilters.com/nucleic-acid-and-sample-prep-fta-cards-wb120411> pristupljeno 27.8.2021..

Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL, Seeberger PH. General Principles, Structure and Biosynthesis, Structural Analysis of glycans. U: Essentials of Glycobiology [Internet] 3rd edition. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1 SAŽETAK

Glikozilacija proteina najraznovrsnija je posttranslacijska modifikacija proteina, a N-glikozilacija najčešća je i najbolje proučena vrsta glikozilacije. Jasna je korelacija između N-glikanskog profila proteina plazme i brojnih patoloških stanja, naročito onih sa značajnom upalnom komponentom, što je analizu glikanskog profila proteina plazme učinilo vrlo perspektivnom. Poznavanje glikanskog profila plazme pojedinog pacijenta i njegova analiza visokoprotocnim metodama, kao što je HILIC-UPLC, uvelike bi doprinijelo personalizaciji medicinske intervencije. HILIC-UPLC metoda, osim što je visokoprotocna, vrlo je osjetljiva zbog čega je analiza glikanskog profila plazme dobivene venepunkcijom, koja je nepraktična i neugodna, zamijenjena analizom kapilarne krvi na filter papiru. Osim filter papira, u novije vrijeme na tržištu su postale dostupne brojne sofisticiranije metode za analizu kapilarne krvi.

U ovom radu ispitivane su performanse metoda za uzorkovanje kapilarne krvi na filter papiru (Whatman), Mitra štapiću (Neoteryx) i plazma separatoru (Noviplex) u svrhu analize glikanskog profila plazme. U prvoj fazi istraživanja analizirana je usporedivost navedenih metoda s uzorkom plazme dobivene venepunkcijom. U drugoj fazi istraživanja je ponovljivost triju metoda za uzorkovanje kapilarne krvi.

U istraživanju usporedivosti korišteni su uzorci deset zdravih donora od kojih je prikupljen po jedan uzorak kapilarne krvi za tri ispitivane metode te po jedan uzorak venske krvi. Za analizu ponovljivosti korišteni su uzorci pet donora od kojih su prikupljeni uzorci triju metoda uzorkovanja kapilarne krvi u heksaplikatu. HILIC-UPLC metodom analizirani su N-glikanski profili proteina plazme, a dobiveni rezultati prikazani su metodama deskriptivne statistike.

Rezultati usporedivosti metoda za mikrouzorkovanje sa standardnim uzorkom plazme dobivene venepunkcijom pokazuju izvrsno slaganje rezultata uzoraka dobivenih plazma separatorom te vrlo dobro slaganje rezultata uzoraka dobivenih pomoću Mitra štapića. Spomenute metode mikrouzorkovanja pokazale su superiornost u odnosu na uzorak krvi na filter papiru.

Rezultati ponovljivosti triju metoda za mikrouzorkovanje krvi pokazuju najveću ponovljivost metode za uzorke dobivene plazma separatorom, a najslabiju ponovljivost metode na filter papiru.

Proučene performanse metoda za mikrouzorkovanje jasno ukazuju na analitičku superiornost metoda uzorkovanja plazma separatorom i Mitra štapićem u odnosu na filter papir, međutim ostale karakteristike metoda kao što su cijena, lakoća uzorkovanja, udio pravilno skupljenih uzoraka i mogućnost automatizacije također utječu na izbor metode uzorkovanja za analizu N-glikanskog profila plazme.

7.2 SUMMARY

Protein glycosylation is the most diverse posttranslational modification of proteins, with N-glycosylation being the most common one and the most extensively studied. The correlation between the N-glycan profile of plasma proteins and numerous pathological conditions is well known, particularly for those conditions with a significant inflammatory component. This notion made the analysis of the glycan profile of plasma proteins promising. Understanding the patient's glycan profile and the ability to analyse it with high-throughput methods would contribute to the personalization of medical intervention considerably. HILIC-UPLC, besides being high-throughput, is a very sensitive analytical method allowing the replacement of impractical and unpleasant venepuncture sampling with a sampling of capillary blood on a filter paper. Along with the filter paper, numerous sophisticated methods for microsampling of capillary blood have recently been developed.

In this research filter paper (Whatman), Mitra sticks (Neoteryx) and plasma separator (Noviplex) devices for capillary blood microsampling were evaluated for the purpose of the plasma protein glycan profile analysis. The comparability of the mentioned microsampling methods with venepuncture were tested in the first phase of the research, whereas the repeatability of microsampling methods were assessed in the second phase.

In the first phase samples from ten healthy donors were acquired. One sample was collected for each microsampling method and venepuncture. In the second phase, the samples from five donors were collected in sextuplicate for each microsampling method. The analysis of the N-glycan profile of plasma proteins was done by the HILIC-UPLC. The collected data was interpreted by descriptive statistics.

Results of the first phase, i.e., comparability, showed the surpassing equivalence of the samples acquired by the plasma separator and a very good equivalence of the samples acquired by Mitra sticks to the standard venepuncture sampling. These microsampling methods have proved superior to the sampling on filter paper.

Results of the second phase, i.e., repeatability, attested the excellent repeatability of the plasma separator method and the lowest for sampling on the filter paper.

The studied performances of microsampling methods have clearly shown the analytical superiority of the plasma separator and Mitra stick sampling methods compared to the filter

paper. However, other method properties, e.g., price of sampling devices, ease of sampling, degree of correctly sampled blood, and the ability of analysis automatization also take part in the selection of the sampling method for N-glycan profile analysis.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Usporedba metoda mikrouzorkovanja krvi za analizu N-glikanskog profila plazme metodom HILIC-UPLC

Marin Ferić

SAŽETAK

Glikozilacija proteina najraznovrsnija je posttranslacijska modifikacija proteina, a N-glikozilacija najčešća je i najbolje proučena vrsta glikozilacije. Jasna je korelacija između N-glikanskog profila proteina plazme i brojnih patoloških stanja, naročito onih sa značajnom upalnom komponentom, što je analizu glikanskog profila proteina plazme učinilo vrlo perspektivnom. Poznavanje glikanskog profila plazme pojedinog pacijenta i njegova analiza visokoprotocnim metodama, kao što je HILIC-UPLC, uvelike bi doprinijelo personalizaciji medicinske intervencije. HILIC-UPLC metoda, osim što je visokoprotocna, vrlo je osjetljiva zbog čega je analiza glikanskog profila plazme dobivene venepunkcijom, koja je nepraktična i neugodna, zamijenjena analizom kapilarne krvi na filter papiru. Osim filter papira, u novije vrijeme na tržištu su postale dostupne brojne sofisticiranije metode za analizu kapilarne krvi.

U ovom radu ispitivane su performanse metoda za uzorkovanje kapilarne krvi na filter papiru (Whatman), Mitra štapiću (Neoteryx) i plazma separatoru (Noviplex) u svrhu analize glikanskog profila plazme. U prvoj fazi istraživanja analizirana je usporedivost navedenih metoda s uzorkom plazme dobivene venepunkcijom. U drugoj fazi istraživanja je ponovljivost triju metoda za uzorkovanje kapilarne krvi.

U istraživanju usporedivosti korišteni su uzorci deset zdravih donora od kojih je prikupljen po jedan uzorak kapilarne krvi za tri ispitivane metode te po jedan uzorak venske krvi. Za analizu ponovljivosti korišteni su uzorci pet donora od kojih su prikupljeni uzorci triju metoda uzorkovanja kapilarne krvi u heksaplikatu. HILIC-UPLC metodom analizirani su N-glikanski profili proteina plazme, a dobiveni rezultati prikazani su metodama deskriptivne statistike.

Rezultati usporedivosti metoda za mikrouzorkovanje sa standardnim uzorkom plazme dobivene venepunkcijom pokazuju izvrsno slaganje rezultata uzoraka dobivenih plazma separatorom te vrlo dobro slaganje rezultata uzoraka dobivenih pomoću Mitra štapića. Spomenute metode mikrouzorkovanja pokazale su superiornost u odnosu na uzorak krvi na filter papiru.

Rezultati ponovljivosti triju metoda za mikrouzorkovanje krvi pokazuju najveću ponovljivost metode za uzorke dobivene plazma separatorom, a najslabiju ponovljivost metode na filter papiru.

Proučene performanse metoda za mikrouzorkovanje jasno ukazuju na analitičku superiornost metoda uzorkovanja plazma separatorom i Mitra štapićem u odnosu na filter papir, međutim ostale karakteristike metoda kao što su cijena, lakoća uzorkovanja, udio pravilno skupljenih uzoraka i mogućnost automatizacije također utječu na izbor metode uzorkovanja za analizu N-glikanskog profila plazme.

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

Rad sadrži: 51 stranicu, 14 grafičkih prikaza, 11 tablica i 22 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: N-glikani, HILIC, UPLC, mikrouzorkovanje, samouzorkovanje, DPS, VAMS, DBS

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

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

Dr. sc. Toma Keser, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Ana Mornar Turk, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan, 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of Biochemistry and Molecular Biology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Blood microsampling method comparison for the HILIC-UPLC analysis of plasma N-glycan profile

Marin Ferić

SUMMARY

Protein glycosylation is the most diverse posttranslational modification of proteins, with N-glycosylation being the most common one and the most extensively studied. The correlation between the N-glycan profile of plasma proteins and numerous pathological conditions is well known, particularly for those conditions with a significant inflammatory component. This notion made the analysis of the glycan profile of plasma proteins promising. Understanding the patient's glycan profile and the ability to analyse it with high-throughput methods would contribute to the personalization of medical intervention considerably. HILIC-UPLC, besides being high-throughput, is a very sensitive analytical method allowing the replacement of impractical and unpleasant venepuncture sampling with a sampling of capillary blood on a filter paper. Along with the filter paper, numerous sophisticated methods for microsampling of capillary blood have recently been developed.

In this research filter paper (Whatman), Mitra sticks (Neoteryx) and plasma separator (Noviplex) devices for capillary blood microsampling were evaluated for the purpose of the plasma protein glycan profile analysis. The comparability of the mentioned microsampling methods with venepuncture were tested in the first phase of the research, whereas the repeatability of microsampling methods were assessed in the second phase.

In the first phase samples from ten healthy donors were acquired. One sample was collected for each microsampling method and venepuncture. In the second phase, the samples from five donors were collected in sextuplicate for each microsampling method. The analysis of the N-glycan profile of plasma proteins was done by the HILIC-UPLC. The collected data was interpreted by descriptive statistics.

Results of the first phase, i.e., comparability, showed the surpassing equivalence of the samples acquired by the plasma separator and a very good equivalence of the samples acquired by Mitra sticks to the standard venepuncture sampling. These microsampling methods have proved superior to the sampling on filter paper.

Results of the second phase, i.e., repeatability, attested the excellent repeatability of the plasma separator method and the lowest for sampling on the filter paper.

The studied performances of microsampling methods have clearly shown the analytical superiority of the plasma separator and Mitra stick sampling methods compared to the filter paper. However, other method properties, e.g., price of sampling devices, ease of sampling, degree of correctly sampled blood, and the ability of analysis automatization also take part in the selection of the sampling method for N-glycan profile analysis.

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

Thesis includes: 51 pages, 14 figures, 11 tables and 22 references. Original is in Croatian language.

Keywords: N-glycans, HILIC, UPLC, microsampling, self-sampling, DPS, VAMS, DBS

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

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

Toma Keser, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Ana Mornar Turk, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September, 2021.