

Glikirani albumin u suzama - neinvazivno praćenje šećerne bolesti

Jakoplić, Željka

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:163:861661>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-10**



Repository / Repozitorij:

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



Željka Jakoplić

**Glikirani albumin u suzama – neinvazivno
praćenje šećerne bolesti**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Opća klinička biokemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Roberte Petlevski.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Roberti Petlevski na stručnom vodstvu, pristupačnosti te prijateljskom pristupu pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se roditeljima Željku i Nevenki, bratu Mariju te obitelji na financijskoj i moralnoj podršci tokom cijelog studija. Najviše hvala mojoj majci koja nije posumnjala u mene i moje sposobnosti ni kada je bilo najteže.

Hvala mojim kolegicama, prijateljicama i bližnjima na svakoj podršci, riječi ohrabrenja i predivnim zajedničkim trenucima.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Šećerna bolest	1
1.2. Hemoglobin A1c (HbA1c)	4
1.3. Fruktozamin i glikirani albumin	6
1.3.1. Fruktozamin	6
1.3.2. Glikirani albumin	7
1.4. Usporedba HbA1c i glikiranog albumina	8
1.5. Suze kao klinički uzorak	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Materijali	14
3.2. Metode mjerenja glikiranog albumina	14
3.2.1. Metode mjerenja glikiranog albumina u uzorku krvi	14
3.2.2. Metode mjerenja glikiranog albumina u suzama	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. Neinvazivne metode praćenja šećerne bolesti	18
4.2. Glikirani albumin u suzama	22
4.3. Metode sakupljanja uzorka suza	24
4.4. Potencijalni biomarkeri u suzama kod odabranih sistemskih bolesti i bolesti oka	27
5. ZAKLJUČCI	32
6. LITERATURA	34
7. SAŽETAK	38
8. SUMMARY	39
9. PRILOZI	40
9.1. Popis kratica	40

1. UVOD

1.1. Šećerna bolest

Šećerna bolest je kronična metabolička bolest karakterizirana perzistentnom hiperglikemijom te poremećajima u metabolizmu ugljikohidrata, masti i proteina. Zbog velikog rasta incidencije i prevalencije bolesti, riječ je o značajnom javno-zdravstvenom problemu te jednom od deset vodećih uzroka smrtnosti u svijetu (Batičić i sur., 2019).

Šećerna bolest nastaje zbog apsolutnog i/ili relativnog manjka inzulina, a taj manjak uzrokuje niz patoloških promjena. Glukoza ne može ući u stanice, pojačana je glikogenoliza, a inhibirana glikogeneza. Inhibiran je metabolizam glukoza-6-fosfata putem pentoznog ciklusa i smanjena je glikoliza, a sve to dovodi do povećanja koncentracije glukoze u krvi. Također je inhibirana lipogeneza, a pojačana lipoliza. Zbog lipolize se stvara više acetil-CoA, inhibiran je ciklus limunske kiseline i sinteza proteina. Te metaboličke promjene imaju kao posljedicu stvaranje ketonskih spojeva, povećanje koncentracije slobodnih masnih kiselina, triglicerida i kolesterola u krvi (Čvorišćec i Čepelak, 2009).

Šećerna bolest se naziva globalnom epidemijom jer broj oboljelih osoba u svijetu raste na razine koje su bile nezamislive prije samo nekoliko desetljeća. Postoji više razloga za ovu pojavu, a najznačajniji je promjena načina života koju obilježava veći unos visokokalorične hrane i smanjena tjelesna aktivnost. Svjetske procjene govore da 463 milijuna osoba u dobi od 20 do 79 godina živi sa šećernom bolešću. Čak polovica oboljelih osoba nema postavljenu dijagnozu bolesti. Među nešto više od 4 milijuna osoba koje godišnje umru zbog šećerne bolesti, svaka druga osoba mlađa je od 60 godina. Na svjetskoj razini, troškovi zdravstvene zaštite vezani uz šećernu bolest iznose 759 milijardi dolara (podaci Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo iz 2021. godine). U Europi od šećerne bolesti boluje 59 milijuna osoba u dobi od 20 do 79 godina, a troškovi liječenja i skrbi za oboljele od šećerne bolesti iznose 161 milijardu američkih dolara godišnje.

Prema podacima CroDiab Registra osoba sa šećernom bolešću, u Hrvatskoj je u 2020.-toj godini bilo 310 212 osoba sa šećernom bolesti, a broj oboljelih povećava se iz godine u godinu. Ranija istraživanja pokazuju da u Hrvatskoj tek 60% oboljelih osoba ima postavljenu dijagnozu pa se procjenjuje da je ukupan broj oboljelih blizu 500 000. Šećerna bolest je treći vodeći uzrok smrtnosti sa udjelom od 7.8% u 2019. godini (Hrvatski zavod za javno zdravstvo- Nacionalni registar osoba sa šećernom bolešću CroDiab, Izvješće za 2020.).

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, etiološka klasifikacija šećerne bolesti podrazumijeva: tip 1 (o inzulinu ovisnu) šećernu bolest, tip 2 (o inzulinu neovisnu) šećernu bolest, trudničku šećernu bolest te ostale specifične tipove kao što su nasljedni poremećaj beta stanica, nasljedni poremećaj djelovanja inzulina, bolesti pankreasa, endokrinopatije, neuobičajeni oblici imunomodulirane bolesti, drugi genetski sindromi (Čepelak i sur., 2004). Šećerna bolest tipa 1 karakterizirana je autoimunim oštećenjem beta stanica Langerhansovih otočića gušterače, što dovodi do apsolutnog manjka inzulina. Pacijenti koji imaju genetsku predispoziciju za nastanak šećerne bolesti tipa 1 u trenutku rođenja imaju očuvane beta stanice gušterače, ali slijedom autoimunskih zbivanja, koja su najčešće potaknuta okolišnim čimbenicima, dolazi do njihovog razaranja. Smanjenjem broja beta stanica, posljedično se znatno smanjuje lučenje inzulina. Šećerna bolest tipa 2 karakterizirana je smanjenim lučenjem inzulina, povećanom perifernom inzulinskom rezistencijom te povećanom glukoneogenezom u jetri. Hiperglikemija, kao jedan od osnovnih pokazatelja ove bolesti, može djelovati na beta stanice gušterače tako da pogoršava inzulinsku rezistenciju, vodeći u začaran krug hiperglikemije te pogoršavajući metabolički status pacijenta. Šećerna bolest tipa 2 najčešće je udružena sa komorbiditetima kao što su hipertenzija, visoke vrijednosti koncentracije LDL kolesterola te niske vrijednosti HDL kolesterola. Inzulinska rezistencija i smanjeno izlučivanje inzulina najvažnija su obilježja šećerne bolesti tipa 2 uz hiperglikemiju (Batičić i sur., 2019).

Neregulirana koncentracija glukoze u krvi može dovesti do pojave akutnih i kroničnih komplikacija šećerne bolesti. Akutne komplikacije nastaju brzo, dramatičnog su tijeka i zahtijevaju hitnu intervenciju. Akutne komplikacije šećerne bolesti su hipoglikemija, dijabetička ketoacidoza, laktatna acidoza i hiperosmolarna koma. Kronične komplikacije nastaju polagano, a mnoge su godinama bez simptoma, no one trajno oštećuju pojedine organe. Posljedica su slabe metaboličke kontrole bolesti, tj. dugotrajne hiperglikemije.

Kronične komplikacije šećerne bolesti dijele se na mikroangiopatije u koje se ubrajaju retinopatije, nefropatije, neuropatije te na makroangiopatije u koje se ubrajaju moždani udar, ishemijske srčane bolesti i periferne vaskularne bolesti (Čvorišćec i Čepelak, 2009).

Dijagnostika šećerne bolesti vrlo je jednostavna ako pacijent opisuje specifične simptome, a to su poliurija, polidipsija, polifagija, gubitak tjelesne težine te koncentracija glukoze $>7,0$ mmol/L mjerena natašte u venskoj plazmi. Ako je pacijent asimptomatski, dijagnoza se vrši sukladno određenim kriterijima (Batičić i sur., 2019).

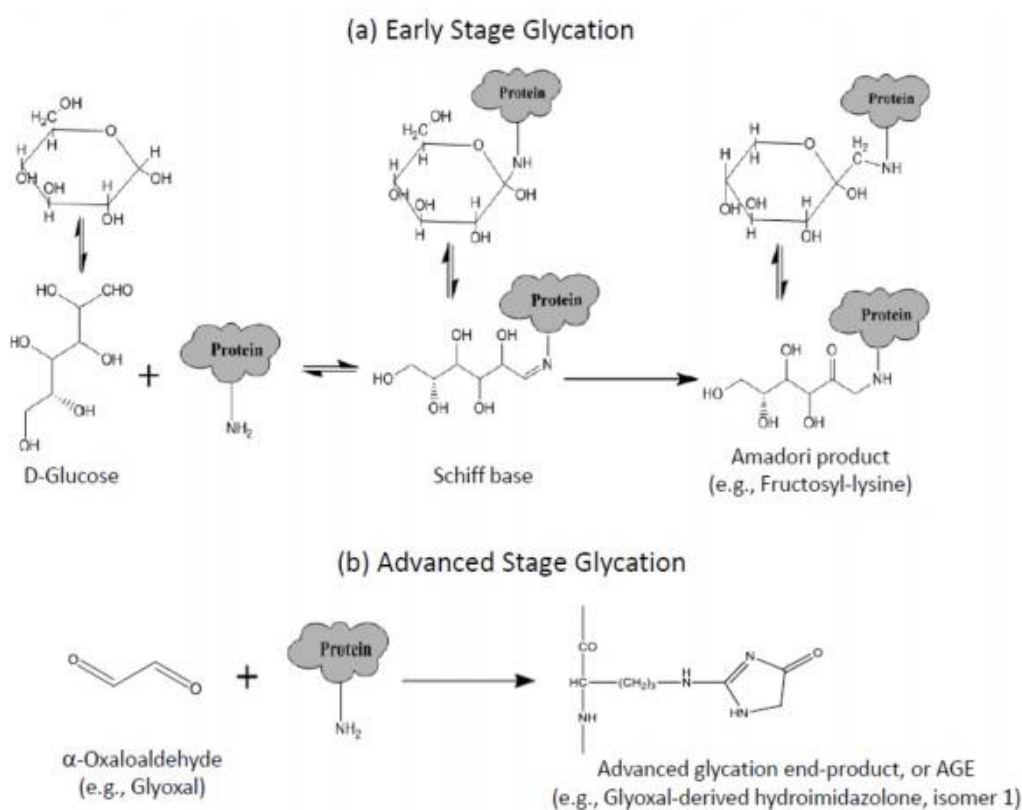
Kriteriji za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti su:

- a) Vrijednost koncentracije glukoze natašte koja iznosi više od $7,0$ mmol/L, a mjerena je u uzorku venske plazme.
- b) U oralnom testu tolerancije glukoze (oGTT-test, engl. Oral glucose tolerance test) vrijednost koncentracije glukoze veća ili jednaka $11,1$ mmol/L dva sata nakon opterećenja sa 75 g glukoze, a mjerenje se izvodi u uzorku venske plazme.
- c) Vrijednost HbA1c (glikirani hemoglobin) veća ili jednaka $6,5\%$.
- d) Nalaz glukoze u slučajnom uzorku venske plazme veći ili jednak $11,1$ mmol/L u osoba koje imaju simptome šećerne bolesti ili onih sa hiperglikemijskom krizom.

Za potvrdu dijagnoze šećerne bolesti potrebna su najmanje dva uzastopna mjerenja koncentracije glukoze natašte u uzorku venske plazme sa rezultatom $>7,0$ mmol/L (Topić i sur., 2018).

1.2. Hemoglobin A1c (HbA1c)

Glikacija je ireverzibilno neenzimsko kovalentno vezanje reducirajućih šećera na primarnu ili sekundarnu amino skupinu proteina. Rana faza glikacije uključuje nukleofilni napad reducirajućeg šećera (D-glukoze) na primarnu amino skupinu proteina pri čemu nastaje nestabilna Schiffova baza (Slika 1.a). Ovaj intermedijarni produkt podliježe sporoj pregradnji i stvara se stabilniji Amadorijev produkt ili ketoamin. Daljnja oksidacija, dehidracija i unakrsno povezivanje dovode do stvaranja reaktivnih dikarbonilnih spojeva. Ti spojevi se mogu vezati za argininske i lizinske ostatke proteina (Slika 1.b) što dovodi do nastanka produkata uznapredovale faze glikacije (AGE). Postoji sve veći interes za istraživanja vezana uz glikaciju humanog serumskog albumina, a od iznimnog je značaja glikacija proteina hemoglobina pri čemu nastaje hemoglobin A1c koji je „zlatni standard“ za kliničko praćenje šećerne bolesti (Anguizola i sur., 2013; Čvorišćec i Čepelak, 2009).



Slika 1. Prikaz procesa glikacije. a) Tijek reakcije rane faze glikacije, b) Uznapredovala faza glikacije (Preuzeto: Anguizola i sur., 2013).

Procesu glikacije podložni su svi proteini, a razlikuje se od glikozilacije koja čini enzimsku fazu u sintezi membranskih i drugih glikoproteina. Neenzimskim kovalentnim vezanjem glukoze na slobodne aminoskupine globinskih lanaca odnosno procesom glikacije nastaje hemoglobin A1c. Tako promijenjen hemoglobin podložniji je razgradnji i ima promijenjen površinski naboj. Količina nastalog HbA1c izravno je razmjerna koncentraciji glukoze. Eritrociti zdravog čovjeka sadržavaju 90% HbA, a ostatak čine produkti alternativne sinteze globina (HbA2, HbF), te posttranslacijskih modifikacija HbA. Kromatografijom s kationskim izmjenjivačem odvojene su tri manje hemoglobinske komponente s jačim negativnim nabojem od HbA. Prema redoslijedu ispiranja s kolone kationskog izmjenjivača, komponente su nazvane HbA1a, HbA1b i HbA1c. HbA1c je izravni produkt posttranslacijskog vezanja glukoze na molekule hemoglobina i postoji povezanost između HbA1c i prosječne koncentracije glukoze u krvi tijekom prethodnih 5-10 tjedana, koliki je životni vijek eritrocita. HbA1c je „zlatni standard“ za kliničko praćenje šećerne bolesti. Ako je vrijednost HbA1c manja ili jednaka 7%, to znači da je terapija uspješna, odnosno da je rizik za razvoj komplikacija šećerne bolesti minimalan (Čvorišćec i Čepelak, 2009).

1.3. Fruktozamin i glikirani albumin

1.3.1. Fruktozamin

Albumin je najzastupljeniji serumski protein i čini 60-70% ukupnih serumskih proteina. Molekularna masa mu je 66,7kDa i sastavljen je od jednog polipeptidnog lanca sa 585 aminokiselina i 17 disulfidnih mostova. N-terminalni kraj i 59 lizinskih ostataka mogu biti potencijalna mjesta za formiranje produkata rane faze glikacije na tom proteinu. Serumski albumin ima i 24 arginina koji zajedno sa lizinom i N-terminalnim krajem, mogu biti potencijalno uključeni u formiranje produkata uznapredovale faze glikacije. Humani serumski albumin je uključen u brojne fiziološke procese kao što su održavanje osmotskog tlaka i pH krvi. Posreduje u metabolizmu lipida, veže slobodne radikale (antioksidans), djeluje kao transportni protein za brojne tvari kao što su niskomolekularni hormoni, masne kiseline i neki lijekovi (Danese i sur., 2015; Anguizola i sur., 2013).

Naziv fruktozamin odnosi se na ketoamin koji nastaje interakcijom glukoze s aminoskupinom lizina u albuminskoj molekuli, a ujedno predstavlja ukupne glikirane serumske proteine. Kako je vrijeme zadržavanja albumina u cirkulaciji 14-20 dana, fruktozamin odražava stanje glikemije u znatno kraćem razdoblju (1-4 tjedna) u odnosu na HbA1c. Zbog toga mjerenje fruktozamina može biti korisno u praćenju trudnica sa trudničkom šećernom bolesti i pri promjeni terapije šećerne bolesti. Albumin je podložniji promjenama koncentracije u brojnim patološkim stanjima kao što su razne upale, gubitci putem bubrega i probavnog trakta, no u slučajevima kad mjerenje HbA1c ne daje pouzdane rezultate (hemolitička anemija, hemoglobinopatije), određivanje fruktozamina može imati kliničku vrijednost (Čvorišćec i Čepelak, 2009).

Koncentracija fruktozamina ovisi o koncentraciji glukoze, ali i o koncentraciji serumskog albumina pa njegove koncentracije značajno variraju u pacijenata sa dijabetesom i kroničnom bolesti bubrega (Gan i sur., 2018). Na koncentraciju fruktozamina ne utječu anemije ili varijante hemoglobina. Određivanje glikiranog albumina je razvijeno kako bi se zaobišle slabe točke koje postoje kod mjerenja fruktozamina (Koga i sur., 2010).

Koncentracija fruktozamina se ne korigira u odnosu na albumin ili ukupnu koncentraciju proteina dok se glikirani albumin izražava kao omjer glikiranog albumina u odnosu na ukupni albumin pa se mjerenje glikiranog albumina preferira u odnosu na fruktozamin u kliničkim stanjima koja rezultiraju gubitkom proteina kao što su nefrotski sindrom i bolesti jetre (Dorcely i sur., 2017).

1.3.2. Glikirani albumin

Glikirani albumin je ketoamin koji nastaje neenzimskim oksidacijskim vezanjem glukoze i albumina. Poluvrijeme života serumskog albumina je kraće od poluvremena života eritrocita, pa se koncentracija glikiranog albumina brže mijenja u odnosu na HbA1c što je pogodno za praćenje glikemijskog statusa u slučajevima kada koncentracija glukoze u krvi varira tokom određenog perioda (Koga i sur., 2010). Glikirani albumin pogodan je stoga za praćenje glikemijskog statusa unatrag 2-3 tjedna, dok HbA1c odražava status glikemijske kontrole unatrag 2-3 mjeseca. Iako glikirani albumin trenutno nije u preporukama za probir ili postavljanje dijagnoze šećerne bolesti, nekoliko studija govori u prilog tome da bi se mjerenje glikiranog albumina moglo koristiti kao probirni test kod nedijagnosticirane šećerne bolesti ili kao dodatan marker već postojećim za dijagnosticiranje šećerne bolesti (Chume i sur., 2019).

1.4. Usporedba HbA1c i glikiranog albumina

Glikirani albumin se može određivati u uzorku plazme ili seruma odnosno analizirati istovremeno sa uobičajenim markerima kao što su glukoza, kolesterol, trigliceridi, kreatinin bez da je potrebno uzorkovanje krvi u još jednu zasebnu epruvetu. Suprotno tome HbA1c se može mjeriti samo u uzorku pune krvi (Chume i sur., 2019).

Nalaz HbA1c u praćenju glikemije bazira se na pretpostavci da je životni vijek eritrocita u svih pacijenata jednak (120 dana) pa je stoga i vrijeme dostupno za glikaciju hemoglobina jednako, a količina HbA1c je tad proporcionalna koncentraciji glukoze. Nekoliko studija je pokazalo da smanjen životni vijek eritrocita u pacijenata s dijabetesom na hemodijalizi može dovesti do nižih koncentracija HbA1c koji onda nepravilno odražavaju stvarnu koncentraciju glukoze u krvi kod takvih pacijenata (Bomholt i sur., 2021). Stoga bi se praćenje glikemijskog statusa pacijenata na hemodijalizi trebalo provoditi mjerenjem glikiranog albumina umjesto HbA1c (Koga i sur., 2010).

U pacijenata sa dijabetesom i kroničnom bolesti bubrega, vrijednosti HbA1c mogu pogrešno odražavati stanje glikemije zbog prisutne anemije, smanjenog životnog vijeka eritrocita i/ili nedostatka željeza. Glikirani albumin u serumu pokazao se kao osjetljiviji i pouzdaniji pokazatelj glikemije u pacijenata sa dijabetesom i kroničnom bolesti bubrega jer anemija ne utječe na njegovu koncentraciju s obzirom da se njegova koncentracija računa kao omjer u odnosu na ukupni serumski albumin (Gan i sur., 2018). Anemija nedostatka željeza (sideropenična anemija) je najčešće opažena anemija. Približno jedna polovica žena u predmenopauzi ima nedostatak željeza, pa stoga veliki broj takvih žena ima visoke vrijednosti HbA1c u odnosu na stvarnu koncentraciju glukoze u plazmi. Kod pacijenata s anemijom na terapiji suplementima željeza, HbA1c se prolazno smanji jer se životni vijek eritrocita skraćuje. Ovakvi slučajevi ne utječu na koncentraciju glikiranog albumina, pa se on preferira kao marker glikemije u žena u predmenopauzi koje su često pogođene anemijom nedostatka željeza (Koga i sur., 2010).

Hemoglobin S ili C varijante hemoglobina, povišene vrijednosti fetalnog hemoglobina zajedno sa kemijski modificiranim derivatima hemoglobina (npr. karbamilirani hemoglobin u pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega) umanjuju prikladnost mjerenja HbA1c za praćenje glikemijskog statusa (Danese i sur., 2015). Stoga vrijednosti HbA1c nisu pouzdane za praćenje dijabetesa kod pojedinaca koji žive u zemljama gdje je prevalencija anemije srpastih stanica vrlo visoka. Afroamerikanci imaju povećan rizik od nošenja gena za srpasti hemoglobin (HbS) i talasemiju koji su povezani sa smanjenim preživljavanjem eritrocita. Na životni vijek eritrocita osim nacionalnosti također može utjecati dob, spol i primjena nekih lijekova (Gan i sur., 2018).

U trudnica koje boluju od dijabetes mellitusa ili gestacijskog dijabetesa, vrlo je važna intenzivna glikemijska kontrola kako bi se smanjio rizik smrti fetusa, poremećaji rasta fetusa i komplikacija kod same majke. HbA1c tijekom trudnoće pokazuje bifazične promjene koncentracije. Koncentracija HbA1c je najniža u 24.-tom gestacijskom tjednu. Jedan od razloga zašto se HbA1c smanjuje od prvog tromjesječja do drugog tromjesječja je smanjenje koncentracije glukoze u plazmi, a nepoznato je zašto mu koncentracija ponovno raste od drugog tromjesječja do trećeg tromjesječja. Glikirani albumin se u periodu od drugog do trećeg tromjesječja ne mijenja u tolikom značaju. Iz tih razloga glikirani albumin je prikladniji marker glikemijske kontrole tijekom trudnoće. Također njegova koncentracija nije pogođena nedostatkom željeza i reflektira glikemijski status u kraćem vremenskom periodu što je tijekom trudnoće od izuzetne važnosti (Koga i sur., 2010).

Smanjeno ili produljeno poluvrijeme života serumskog albumina utječe na koncentraciju glikiranog albumina, a posljedično i na njegovu korelaciju sa koncentracijom glukoze u krvi tijekom prijašnja 3 tjedna (Bomholt i sur., 2021). Jetra je organ zadužen za regulaciju koncentracije glukoze i sintezu albumina pa se poremećaji u metabolizmu glukoze često pojavljuju kod pacijenata sa kroničnim bolestima jetre kao što su kronični hepatitis i ciroza jetre. HbA1c je u takvih pacijenata niži u odnosu na stvarnu glikemiju zbog smanjenog poluvremena života eritrocita. Koncentracije glikiranog albumina i fruktozamina više su u odnosu na stvarnu glikemiju u takvih pacijenata zbog produljenog poluvremena života serumskog albumina izvorno zbog smanjenog kapaciteta sinteze in vivo serumskog albumina (Koga i sur., 2010).

Smanjeno poluvrijeme života albumina opaženo je u pacijenata sa teškom proteinurijom gdje nefrogeni gubitak albumina dovodi posljedično do sniženih razina glikiranog albumina. Proteinurija je česta u pacijenata sa dijabetesom i kroničnom bolesti bubrega (Bomholt i sur., 2021).

Glikirani albumin pokazuje niže vrijednosti u odnosu na stvarni glikemijski status u pacijenata sa nefrotskim sindromom, hipertireoidizmom i onima na terapiji glukokortikoidima jer je u tim stanjima povećan metabolizam albumina. Također snižene vrijednosti glikiranog albumina u odnosu na stvarni glikemijski status, nađene su u pušača, pacijenta sa hiperurikemijom, hipertrigliceridemijom te muškaraca sa nealkoholnom masnom jetrom i povišenom alanin aminotransferazom (Koga i sur., 2010). Glikirani albumin reflektira stanje glukoze u krvi puno brže i ranije od HbA1c pa je pogodniji za praćenje dijabetesa kod pacijenata koji imaju velike varijacije u koncentraciji glukoze u krvi te su samim time u većem riziku od hipoglikemije (Gan i sur., 2018).

Bolesti i stanja kod kojih se preporuča mjerenje glikiranog albumina:

- Brze promjene glikemijskog statusa odnosno velike varijacije koncentracije glukoze u krvi
- Tip 1 šećerne bolesti
- Tip 2 šećerne bolesti na inzulinskoj terapiji
- Pacijenti sa hemolitičkom anemijom, krvarenjem, na transfuziji krvi
- Varijante hemoglobina (hemoglobinopatije)
- Kronično bubrežno zatajenje, osobito kod pacijenta na hemodijalizi
- Ciroza jetre
- Anemija nedostatka željeza, bilo kakav nedostatak željeza
- Faza liječenja anemije nedostatka željeza, primjena suplemenata željeza
- Trudnice, žene u predmenopauzi (Koga i sur., 2010).

1.5. Suze kao klinički uzorak

Suze su kompleksna biološka tekućina i sadržavaju elektrolite, proteine (uključujući enzime), lipide, mucine, glukozu i neke male organske molekule i metabolite. Luče ih suzne žlijezde i goblet stanice u konjuktivi. Suzni film podmazuje površinu oka, održava površinu oka vlažnom i glatkom što je potrebno za dobar vid, štiti oko od patogena te osigurava prehranu epitela rožnice. Normalan volumen suza je oko 6 μ L, a secernira se oko 1,2 μ L po minuti. Suzni film sastoji se od 3 sloja: unutarnji sloj mucina, srednji vodeni sloj koji sadržava elektrolite, proteine i različite metabolite, te vanjski lipidni sloj.

U sadržaju suza mogu se naći ioni natrija, kalija, magnezija, kalcija, klorida, bikarbonata i fosfata. Oni značajno doprinose osmolarnosti suza, što je bitan dijagnostički parametar za dijagnostiku suhog oka, ocjenu stupnja težine kliničke slike i praćenje odgovora na terapiju (Lukaš, 2018). Normalno suze sadrže 6-10mg/mL ukupnih proteina. Najznačajniji proteini su lizozim, laktoferin (laktotransferin), sekretorni imunoglobulin A (sIgA), serumski albumin, lipokalin-1 i lipofilin (Ma i sur., 2021; Zhou i sur., 2006). Koncentracija proteina u suzama u različitim studijama varira između 6 i 11mg/mL ovisno o načinu sakupljanja uzorka suza i metodi određivanja proteina iz uzorka suza (Quah i sur., 2014). Lipokalin je značajan protein u suzama. Veže se za veliki broj lipofilnih molekula čime stabilizira suzni film, regulira viskoznost suza, veže mikrobne siderofore, ima protuupalnu ulogu i upotrebljava se kao biomarker sindroma suhog oka. Lipofilin ima slična svojstva. Na lizozim otpada 20-30% svih proteina u bazalno i refleksno izlučenim suzama. Navedeni protein djeluje antibakterijski na način da katalizira hidrolizu peptidoglikanske stijenke Gram pozitivnih bakterija pri čemu bakterija ne može više održavati svoj osmotski okoliš. Smanjenje koncentracije lizozima i lipokalina u suzama je osjetljivi pokazatelj zahvaćenosti suznog sustava u Sjögrenovom sindromu. Laktoferin ima visoki kapacitet vezanja dvovalentnih kationa te na taj način sprječava bakterijama dostupnost esencijalnih nutrijenata za rast i proizvodnju toksina, a narušava i integritet stanične membrane bakterija.

Albumin u suzama se koristi kao marker očnog infarkta i upale. Sastavom je identičan serumskom albuminu jer u suze prelazi preko krvno-očne barijere, pa je njegova koncentracija povišena kod prisutne upale koja dovodi do povećane vaskularne permeabilnosti. IgA je prevladavajući imunoglobulin u suzama, a prisutne su i sve ostale klase imunoglobulina (IgD, IgE, IgG i IgM). U suzama su prisutni razni enzimi i metaboliti poput glukoze i uree. Prilikom hipoksičnog stresa, npr. tijekom spavanja, razina laktat dehidrogenaze u suzama raste zbog anaerobnog metabolizma površine oka pri zatvorenom oku, te se stoga njezin omjer s malat dehidrogenazom (čija se razina pritom ne mijenja) koristi kao indeks hipoksičnog stresa rožnice (Lukaš, 2018).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U liječenju šećerne bolesti vrlo je važno kontinuirano praćenje koncentracije glukoze u krvi te ostalih markera glikemije kako bi se spriječila pojava akutnih i kroničnih komplikacija bolesti.

Glikirani hemoglobin (HbA1c) je „zlatni standard“ za praćenje glikemije u pacijenata sa šećernom bolesti i odražava prosječnu koncentraciju glukoze tijekom posljednja 2-3 mjeseca.

Glikirani albumin odražava prosječnu koncentraciju glukoze tijekom posljednja 2-3 tjedna te je koristan kao dodatan marker glikemijskog statusa posebice u nekim patološkim stanjima u kojima HbA1c ne daje pouzdane rezultate kao primjerice kod pacijenata sa kroničnom bolesti bubrega, anemijom ili pacijenata na hemodijalizi (Sato i sur., 2018).

HbA1c, glikirani albumin i koncentracija glukoze određuju se iz uzorka krvi, a uzorkovanje krvi smatra se invazivnim postupkom te je za pacijenta sa dijabetesom koji glikemiju mora kontrolirati na dnevnoj bazi to neugodno i bolno iskustvo.

Cilj ovog diplomskog rada je upoznati metode neinvazivnog praćenja koncentracije glukoze te prezentirati mogućnost određivanja glikiranog albumina u uzorku suza. Također će se ukratko obraditi suze kao klinički uzorak u kojem je moguće odrediti brojne analite što uz standardne pretrage može pridonijeti dijagnostici, probiru ili praćenju različitih patoloških stanja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Istraživanje koje je predmet ovog diplomskog rada je teorijskog karaktera i uključuje pregled dostupne znanstvene i stručne literature o predloženoj temi. Literatura je pretražena elektroničkim putem. Korištene su baze podataka PubMed i Hrčak. U pretraživanju baza podataka korištene su ključne riječi „diabetes“, „glycated albumin“, „glucose“, „tears“.

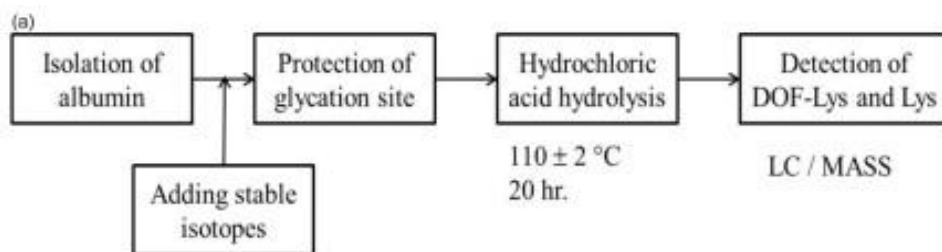
3.2. Metode mjerenja glikiranog albumina

3.2.1. Metode mjerenja glikiranog albumina u uzorku krvi

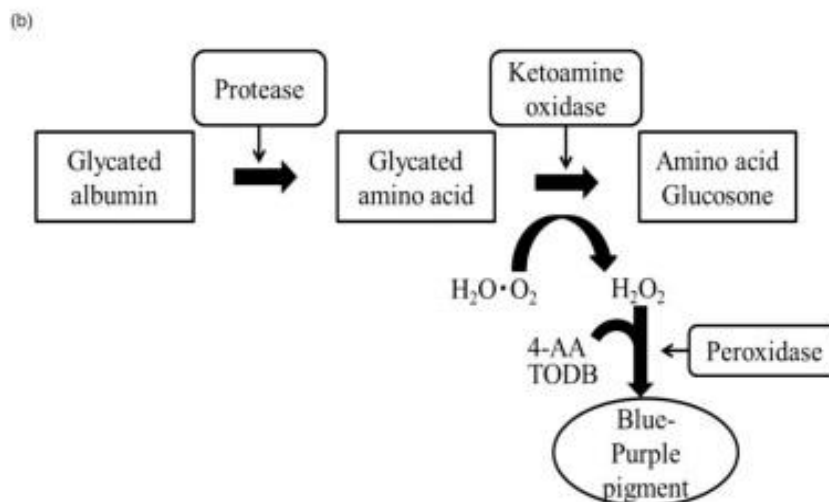
Glikirani albumin u uzorku krvi može se mjeriti visoko afinitetnom tekućinskom kromatografijom, ionsko izmjenjivačkom kromatografijom, enzimskom metodom, imunokemijskom metodom (ELISA ili RIA). Također su razvijene i alternativne metode kao što su Ramanova spektroskopija i kapilarna elektroforeza no njihova korisnost u kliničkoj praksi je ograničena zbog loših analitičkih performansi i potrebnih instrumenata za izvođenje same metode (Sato i sur., 2018; Danese i sur., 2015).

Japansko društvo za kliničku kemiju (JSCC) pri preporuci metode uzima u obzir inicijalnu definiciju glikiranog albumina kao albumina koji sadrži lizinske ostatke ireverzibilno vezane za glukozu. U toj metodi (Slika 2.a) albumin se izdvaja iz seruma, a kao unutarnji standard koriste se stabilni izotopi lizina i glikiranog lizina. Nakon hidrogeniranja, otopina albumina se hidrolizira pomoću klorovodične kiseline do svojih sastavnih aminokiselina. Dobiveni N-(1-deoksi-D-fruktoz-1-il)-L-lizin (DOF-Lys) i lizin kvantificiraju se pomoću spektrometra masa da bi se dobila koncentracija DOF-Lys i albumina u $\mu\text{mol/L}$. Koncentracija DOF-Lys se podijeli sa koncentracijom albumina da bi se dobila vrijednost glikiranog albumina u mmol/mol (Sato i sur., 2018).

Enzimska metoda za mjerenje glikiranog albumina je u širokoj upotrebi. U toj metodi (Slika 2.b) albumin se razgrađuje do aminokiselina ili peptida pomoću albumin specifične proteinaze, a tada se samo glikirane aminokiseline ili peptidi oksidiraju sa ketoamin oksidazom pri čemu nastaje vodikov peroksid. Nastali vodikov peroksid mjeri se kvantitativno kolorimetrijskom metodom da bi se dobila koncentracija glikiranog albumina (g/dL). Koncentracija albumina (g/dL) mjeri se zasebno. Koncentracija glikiranog albumina izražena u g/dL podijeli se sa koncentracijom albumina izraženom također u g/dL da bi se dobila vrijednost glikiranog albumina (%). Formula za pretvaranje jedinica glikiranog albumina između % i mmol/mol je $GA (\%) = 0.05652 \times GA (\text{mmol/mol}) - 0,4217$ (Sato i sur., 2018).



$$GA \text{ value (mmol/mol)} = GA \text{ Concentration } (\mu\text{mol/L}) / ALB \text{ Concentration } (\mu\text{mol/L}) \times 1000$$



Albumin concentration determined by the modified bromocresol purple (BCP) method.

$$GA \text{ value } (\%) = GA \text{ Concentration } (\text{g/dL}) / ALB \text{ Concentration } (\text{g/dL}) \times 100$$

Slika 2. Prikaz principa mjerenja glikiranog albumina a) JSCC preporučenom metodom, b) enzimskom metodom (Preuzeto: Sato i sur., 2018).

Enzimski metoda ima dobru reproducibilnost, točnost, linearnost i ne pokazuje značajne razlike kada se izvodi na različitim analizatorima. Vjeruje se da bi ta metoda mogla biti primjenjiva za rutinsku upotrebu u kliničkim laboratorijima (Sato i sur., 2018).

3.2.2. Metode mjerenja glikiranog albumina u suzama

Prethodno opisane metode za mjerenje glikiranog albumina izvode se u uzorku krvi što predstavlja invazivan način kontrole glikemijskog statusa. U posljednje vrijeme proučava se mjerenje koncentracije glikiranog albumina u suzama kao neinvazivan način praćenja koncentracije glukoze u pacijenata sa dijabetesom.

Metode određivanja proteina u suzama su MALDI-TOF-MS, dvodimenzionalna gel elektroforeza koju slijedi MALDI-TOF-MS, „shotgun“ metoda (uzorak suza razgrađuje se sa tripsinom nakon čega slijedi tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrom masa, LC-MS/MS), SELDI-TOF-MS, analiza čitavih proteina tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrom masa (LC-MS). Metode bazirane na spektrometriji masa daju kvalitativne i kvantitativne podatke o proteinima u suzama (Zhou i sur., 2006).

Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrom masa (LC-MS) je analitička metoda koja kombinira sposobnost tekućinske kromatografije da fizički razdvoji komponente uzorka i sposobnost masene spektrometrije da odredi molekularnu masu komponenti uzorka. Tako spregnuti analitički sustav je popularan u kemijskoj analizi zbog individualnih sposobnosti svake tehnike koje se u ovom slučaju sinergistički nadopunjuju. Tekućinska kromatografija je metoda fizičkog odvajanja u kojoj se komponente tekućeg uzorka raspodijele između stacionarne i mobilne faze koje se ne miješaju. Tekućinska kromatografija može se izvoditi kao adsorpcijska kromatografija, ionsko izmjenjivačka kromatografija i afinitetna kromatografija. Ovisno o raspodijeli između stacionarne i mobilne faze, komponente uzorka istjecati će sa kolone u različitim vremenima. Masena spektrometrija je analitička tehnika koja mjeri omjer mase i naboja (m/z) nabijenih čestica (iona). Glavne komponente masenog spektrometra su izvor iona, analizator masa, detektor i sistem za sakupljanje podataka. Komponente uzorka ioniziraju se pomoću izvora iona do iona u obliku plina koji se dalje šalju na analizator masa. Analizator masa primjenjuje električno i magnetno polje kako bi razvrstao ione po njihovoj masi. Detektor mjeri ione i podatke šalje na računalo.

Maseni spektrometar daje podatke o masi analita i kemijskoj strukturi komponenata uzorka. Maseni analizatori koji se koriste u LC-MS metodi su kvadrupol, time-of-flight (TOF), ionske stupice i hibridni kvadrupol TOF (QTOF). Ova tandemna tehnika može se koristiti za analizu biokemijskih, organskih i anorganskih spojeva iz uzoraka nađenih u okolišu, lijekova ili bioloških uzoraka. LC-MS metodom mogu se mjeriti proteini u suzama, a između ostalog i glikirani albumin u suzama (Preuzeto: https://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry, 24.8.2021).

Proteomika bazirana na tekućinskoj kromatografiji ima dobru reproducibilnost, a za analizu je potreban mali volumen uzorka što omogućava određivanje proteina u stanicama, plazmi i suzama. U zdravih osoba otkriven je 491 protein u suzama. Većina otkrivenih proteina uključena je u modulaciju imunološkog sustava. Novije tehnologije kao što su NanoRP-LC i TripleTOF 5600 MS metode otkrile su 1543 proteina u suzama zdravih osoba. To je značajno veći rezultat od prethodnih studija te stoga treba naglasiti da su se izoforme istog proteina brojale kao zasebni protein, a samo rezultat od 714 proteina je bio ponovljiv i reproducibilan kad je određivan u triplikatu (Ma i sur., 2021).

Rezultati metoda za određivanje glikiranog albumina prikazuju se kao omjer koncentracije glikiranog albumina u odnosu na ukupni serumski albumin pa te metode nisu pod utjecajem promjena koncentracija serumskog albumina. Iz tih razloga glikirani albumin je dobar marker za kontrolu glikemije u pacijenata sa dijabetesom i kroničnom bolesti bubrega kroz period od 1-3 tjedna (Anguizola i sur., 2013). Ne postoji internacionalni konsenzus o referentnim intervalima i referentnoj metodi za glikirani albumin kao što to postoji za HbA1c gdje je HPLC prihvaćena metoda. Trenutno referentni intervali za glikirani albumin ovise o metodi mjerenja. Iako je enzimski metoda najviše obrađena i proučavana u studijama, ne postoji univerzalni prihvaćeni referentni interval ni za tu metodu. Nedostatak internacionalno prihvaćenih referentnih intervala i „cutoff“ vrijednosti za dijabetes, otežava implementaciju glikiranog albumina u kliničku primjenu (Bomholt i sur., 2021).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Neinvazivne metode praćenja šećerne bolesti

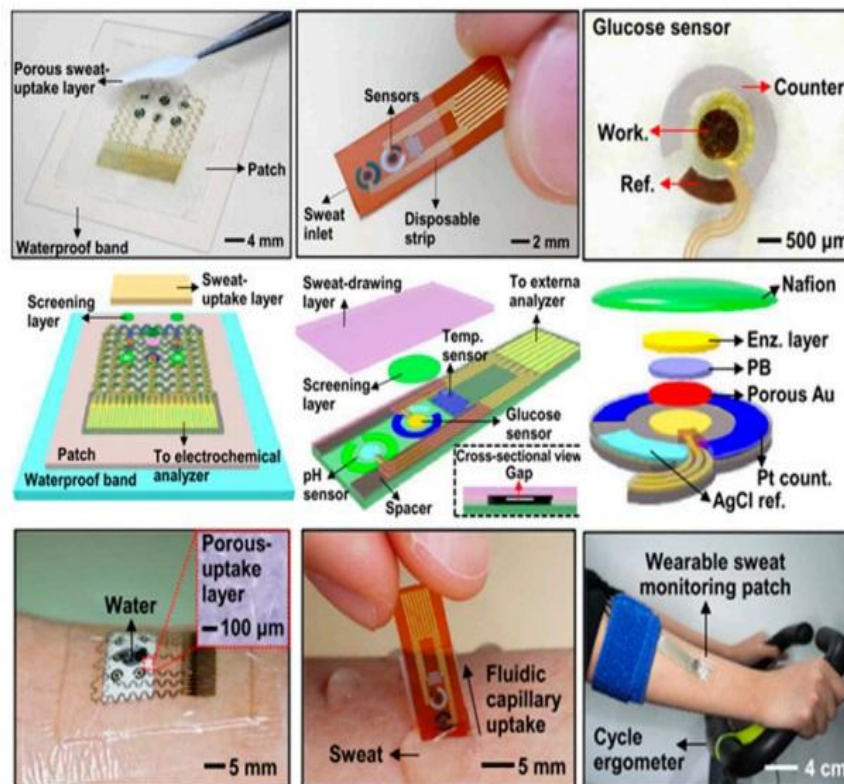
Ovisno o tome uzrokuje li uzimanje uzorka za mjerenje koncentracije glukoze ozljedu na ljudskoj koži, praćenje koncentracije glukoze može se podijeliti na invazivno i neinvazivno. Mjerenje koncentracije glukoze iz uzorka krvi je invazivan postupak, ali najčešće se primjenjuje jer najbolje odražava glikemijski status, a takvo mjerenje se nalazi i u smjernicama i kriterijima za praćenje šećerne bolesti te dijagnozu šećerne bolesti. Koncentracija glukoze može se odrediti glukometrima kod kuće u svrhu samopraćenja terapije šećerne bolesti, te u laboratorijima biokemijskim analizatorima. Za takav uređaj (glukometar), krv se uzorkuje ubodom iglice u prst. S obzirom da samopraćenje koncentracije glukoze glukometrom provodi sam pacijent više puta dnevno, ponekad rane nastale ubodima zbog učestalog kontroliranja, ne stignu zacijeliti. To proširuje rizik pojave infekcije, a pacijentu stvara bol i stres. Neinvazivno praćenje koncentracije glukoze odnosi se na određivanje koncentracije glukoze bez nanošenja štete ljudskom tkivu (Tang i sur., 2020).

Metode za neinvazivno određivanje koncentracije glukoze mogu se podijeliti na optičke, mikrovalne i elektrokemijske metode, a optičke metode uključuju refleksnu spektroskopiju u infracrvenom području, polariziranu optičku rotaciju, Raman spektroskopiju, fluorescenciju, optičku koherentnu tomografiju, itd. (Tang i sur., 2020).

Osim u krvi, glukoza se može naći u različitim tjelesnim tekućinama kao što su intersticijska tekućina, suze, slina, urin i znoj. Idealna metoda za mjerenje glukoze u tim tjelesnim tekućinama trebala bi biti u mogućnosti odrediti koncentraciju glukoze u bilo koje vrijeme i u bilo kojem stanju, a dobivena koncentracija glukoze trebala bi korelirati sa koncentracijom glukoze u krvi (Ciudin i sur., 2012).

Slina je ljepljiva tekućina koju luče žlijezde slinovnice. Sadržava razne biomarkere kao što su glukoza, mliječna kiselina, fosfati, enzimi (amilaza), hormoni (kortizol, steroidi), protutijela itd. Slinu je lako sakupiti i ekstrahirati za razliku od ostalih bioloških tekućina. U kliničkim studijama pokazana je dobra korelacija između koncentracija glukoze u slini i koncentracija glukoze u krvi prije i nakon dva sata od uzimanja glukoze (Tang i sur., 2020).

Znoj je biološka tekućina koju proizvode žlijezde znojnice, a sadrži razne metabolite, elektrolite, elemente u tragovima i biološke makromolekule. Biosenzor za sakupljanje znoja dizajniran u obliku krpice ili trake može se kontinuirano nositi i kombinirati sa modulom koji dostavlja lijek po potrebi. Sadržaj glukoze u znoju detektira se jednim dijelom takvog uređaja, a on šalje informacije u odijeljak za doziranje antidijabetika što dovodi do otpuštanja lijeka transdermalno u slučaju potrebe. Na taj način zaokružuje se proces liječenja i praćenja koncentracije glukoze u takozvanom „liječenju u zatvorenoj petlji“. Ovaj transdermalni sustav sprječava nanošenje boli i stresa pacijentu, a dati antidijabetik zaobilazi gastrointestinalni sustav pa je potrebna i manja doza lijeka. Nedostatci ovakvog senzora baziranog na sakupljanju znoja su poteškoće u sakupljanju znoja, ovisnost o fizičkoj aktivnosti pacijenta te utjecaj temperature okoline na proces znojenja. Ograničenje takvog sustava je i činjenica da znoj može biti detektiran i analiziran samo kada se nađe na površini kože (Tang i sur., 2020).

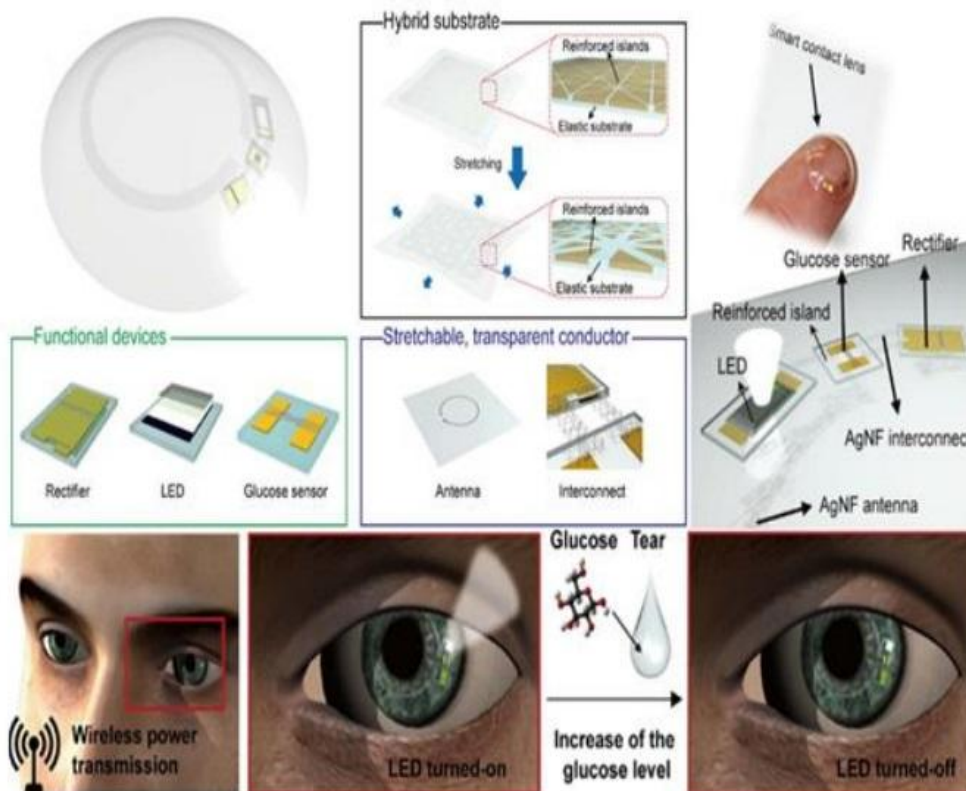


Slika 3. Prikaz uređaja/senzora za praćenje koncentracije glukoze iz uzorka znoja koji je kombiniran sa transdermalnim modulom za doziranje antidijabetika (Preuzeto: Tang i sur., 2020).

Suza su biološka tekućina koja sadržava soli, proteine, enzime, a između ostalog i glukozu (Tang i sur., 2020). Koncentracija glukoze u suzama u pacijenata sa šećernom bolesti proučava se u studijama od 1937. godine. 1980.-te godine, neke studije su opisale korištenje kvantitativne enzimске metode određivanja koncentracije glukoze u suzama te su pokazale korelaciju između koncentracije glukoze u krvi i koncentracije glukoze u suzama. Među različitim studijama, koncentracije glukoze u suzama pokazale su varijacije. Jedan od mogućih razloga varijacija je razlika u primjenjenoj metodi stimulacije toka suza, bila ona kemijska, mehanička ili neinvazivna. Odstupanja u koncentracijama glukoze moguća su također zbog razlika u metodi mjerenja koncentracije glukoze i nestandardiziranih uvjeta za uzorkovanje suza, kao što je vrijeme uzorkovanja u danu i prandijalno stanje pacijenta (Aihara i sur., 2021).

Nekoliko studija govori o postojanju transportera glukoze u suznim žlijezdama. Glukozni transporter 1 (GT1) eksprimiran je na apikalnom epitelu rožnice, a natrij-glukoza kotransporter 1 eksprimiran je na apikalnoj strani bulbarne i palpebralne konjunktive odnosno spojnice. Uloga ovih transportera i izvor glukoze u suzama još nije dovoljno proučen (Aihara i sur., 2021).

Dizajnirani su biosenzori koji funkcioniraju putem različitih metoda detekcije koncentracije glukoze u suzama. Svi se temelje na činjenici da koncentracija glukoze u krvi korelira sa koncentracijom glukoze u suzama. Prvotni senzori dizajnirani su u obliku trakica, ali oni su se teško mogli pričvrstiti za površinu oka. Istraživači su trenutno fokusirani na dizajniranje senzora za praćenje koncentracije glukoze u obliku kontaktnih leća. Takve leće su neinvazivne i mogu bežično prenositi podatke u stvarnom vremenu što je praktično za pacijente i njihove liječnike. Takav tip senzora suočava se sa brojnim nedostacima i još nije dospio na tržište (Tang i sur., 2020).



Slika 4. Prikaz pametnih kontaktnih leća u koje je integriran wireless sklop i senzor koncentracije glukoze (Preuzeto: Tang i sur., 2020).

Iako se istražuju brojni pristupi neinvazivnom praćenju koncentracije glukoze, do danas još nije nađena pogodna metoda i marker koji bi u potpunosti zamijenili mjerenje koncentracije glukoze iz uzorka krvi za praćenje i postavljanje dijagnoze šećerne bolesti (Aihara i sur., 2021).

4.2. Glikirani albumin u suzama

Studije su pokazale da se povišene koncentracije glukoze mogu naći u suzama u pacijenata sa šećernom bolesti. Proteini iz suza, posebice oni iz krvi (serumski albumin) mogu ući u reakciju glikacije, neenzimsku reakciju reducirajućih šećera sa amino skupinom proteina pri čemu nastaju produkti uznapredovale glikacije (AGE). AGE modificirani proteini sudjeluju u brojnim komplikacijama šećerne bolesti uključujući dijabetičku retinopatiju. AGE modificiran hemoglobin (HbA1c) koristi se kao „zlatni standard“ za praćenje šećerne bolesti. AGE modificirani proteini u suzama pacijenata sa šećernom bolesti povišeni su u vidu koncentracije, a razlikuju se u stupnju modifikacije pojedinih proteina. Svi proteini sa slobodnim amino skupinama mogu sudjelovati u procesu glikacije, a visoke koncentracije šećera u suzama pacijenata sa šećernom bolesti rezultiraju povišenom koncentracijom AGE modificiranih proteina u suzama. Malo se zna o sintezi, pohrani i sekreciji suznih proteina pa nedostaje informacija kako dugo proteini iz suza postoje u tijelu prije no što se izluče u suze. Vjerojatno je da se neki proteini glikiraju prije nego što se izluče u suze. AGE produkti su bioaktivni i mogu utjecati direktno na površinu oka, a pronađeni su i specifični receptori za AGE produkte. Procesom glikacije vezanjem glukoze na amino skupinu serumskog albumina nastaje glikirani albumin (Zhao i sur., 2010).

Glikirani albumin odražava prosječnu koncentraciju glukoze u posljednjih 1-3 tjedna i bolji je marker za ranu detekciju promjena koncentracije glukoze u krvi za razliku od glikiranog hemoglobina (HbA1c) koji odražava promjene u koncentraciji glukoze u posljednjih 2-3 mjeseca.

Znanstvenici iz Škole za medicinu na Sveučilištu u Tokiju proučavali su mjerenje glikiranog albumina u suzama kako bi pronašli alternativnu metodu za praćenje šećerne bolesti, a koja bi ujedno bila i neinvazivna. Svoje zaključke prezentirali su posterom na virtualnom godišnjem sastanku Europskog udruženja za dijabetes (European Association for the Study of Diabetes).

Provedeno je istraživanje na 100 pacijenata odrasle dobi (srednja dob 50,87 godina; 71% muškaraca) sa šećernom bolesti kojima je mjerena koncentracija glikiranog albumina u suzama. Dr. Aihara i sur. sakupljali su uzorke suza paralelno sa uzorcima krvi. Glikirani albumin u suzama mjereno je tekućinskom kromatografijom (LC) i spektrometrom masa (MS), a glikirani albumin u krvi enzimskom metodom. Višestruka regresijska analiza pokazala je dobru korelaciju između koncentracije glikiranog albumina u suzama i koncentracije glikiranog albumina u krvi, a u obzir su uzeti dob, spol, stadij nefropatije i pretilost. S obzirom da se glikirani albumin izražava kao omjer, koncentracije glikiranog albumina u suzama nisu bile pod utjecajem razrijeđenih ili koncentriranih suza. Utvrdili su da bi se glikirani albumin u suzama mogao u budućnosti koristiti kao neinvazivni marker šećerne bolesti (Preuzeto: <https://medicaldialogues.in/diabetes-endocrinology/news/tear-samples-may-help-monitor-blood-sugar-in-diabetes-study-70571>, 28.6.2021., <https://www.healio.com/news/endocrinology/20201006/similar-glycated-albumin-levels-in-tears-blood-may-allow-noninvasive-glucose-testing>, 28.6.2021.). Znanstvenici pokušavaju unaprijediti metodu kojom se sakupljaju uzorci suza, a pokušavaju i naći način smanjenja volumena suza potrebnog za analizu. Trenutna metoda uključuje uzorkovanje suza sa kapaljkom, a potrebno je 100µL uzorka suza za analizu. Rade se studije koje proučavaju i testiraju ovu metodu kod pacijenata na različitim vrstama terapije šećerne bolesti (Preuzeto: <https://conferences.medicom-publishers.com/specialisation/endocrinology/easd-2020/non-invasive-monitoring-by-measuring-glycated-albumin-in-tears/>, 29.6.2021.).

4.3. Metode sakupljanja uzorka suza

Suze se mogu sakupljati na nekoliko načina, a različiti načini uzorkovanja utječu na kvalitetu uzorka suza te posljedično na rezultat analize proteina u suzama. Suze se najčešće sakupljaju celuloznim spužvicama, Schirmerovim trakicama i kapilarnim cjevčicama. Te metode sakupljanja su neinvazivne i kod provođenja ne zahtijevaju primjenu lokalne anestezije (Ma i sur., 2021). Sakupljanje uzorka suza ne zahtijeva specijalno educirano zdravstveno osoblje kao što to zahtijeva vađenje uzorka krvi (Quah i sur., 2014).

CELULOZNE SPUŽVICE

Celulozne spužvice koriste se za sakupljanje suza na način da se smjeste u donju konjunktivalnu vrećicu na približno jednu minutu. Taj način je pogodan jer je visokoefektivan u sakupljanju suza čak i kod pacijenata sa malim volumenom suza, ne iritira oko te je generalno dobro prihvaćen među pacijentima. U različitim studijama opisana je primjena više vrsta spužvica i više vrsta pufera za ekstrakciju što otežava direktnu usporedbu njihovih rezultata. Neki citokini, uključujući interleukine i γ -interferon, se čvrsto vežu za spužvicu pa je ekstrakcija takvih proteina otežana (Ma i sur., 2021).



Slika 5. Prikaz sakupljanja suza korištenjem celulozne spužvice (Preuzeto: Resan i sur., 2014).

SCHIRMEROVE TRAKICE

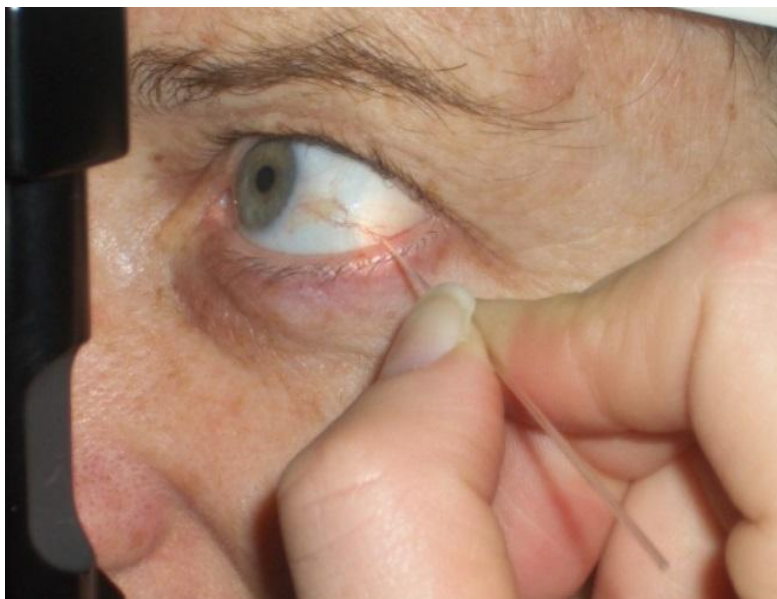
Schirmerove trakice koriste se u Schirmerovom testu za procjenu suhoće oka. Trakica se stavi u donju konjunktivalnu vrećicu te se ostavi dok se ne napuni suzama do oznake na kontrolnoj liniji. Kasnije se trakica inkubira u otopini pufera kako bi se sama trakica navlažila, a proteini ili metaboliti mogli ekstrahirati i koristiti za daljnja testiranja. Ova tehnika sakupljanja suza omogućuje bolju detekciju interleukina od tehnike sakupljanja suza sa celuloznom spužvicom. Schirmerove trakice su jeftina metoda sakupljanja suza, metoda se lako izvodi i interpretira, suze mogu biti istovremeno sakupljane iz oba oka, ali može izazvati iritaciju oka pacijenta. To posljedično može dovesti do pojačanog refleksnog suzenja koje rezultira neželjenim razrijeđenjem suza kao uzorka. Schirmerove trakice i celulozne spužvice koriste apsorptivne materijale koji imaju doticaj sa konjunktivom i potencijalno mogu oštetiti očnu površinu. U studijama je opisano da se kod mehaničkog oštećenja konjunktive može naći porast određenih proteina u suzama. Sakupljanje suza Schirmerovim trakicama može lažno povećati koncentraciju glukoze u mjerenim uzorcima suza (Ma i sur., 2021; Quah i sur., 2014).



Slika 6. Prikaz sakupljanja suza korištenjem Schirmerovih trakica (Preuzeto: <https://www.standardofcare.com/showarticle.php?artid=5982>, 18.8.2021.).

KAPILARNE CJEVČICE

Suze se mogu izvlačiti pod utjecajem kapilarne sile iz donjeg temporalnog suznog meniskusa blizu vanjskog kantusa oka u borosilikatnu staklenu mikrokapilaru za jednokratnu upotrebu. Usporedno sa metodama koje koriste apsorptivne materijale, ova se metoda smatra manje invazivnom. Smanjena je mogućnost refleksnog suzenja oka pa je i manji utjecaj takvog uzorkovanja suza na određivanje proteina u suzama. Metoda zahtijeva precizno rukovanje te nije prikladna za nesuradljive pacijente i djecu, a potreban je određeni vremenski period za sakupljanje samog uzorka pa se to smatra nedostacima ove metode. Kod ove metode volumen uzorka koji se može sakupiti je ograničen volumenom kapilarne cjevčice, pa se za veće studije ponekad radi „pool“ od uzoraka suza sakupljenih od više pacijenata (Ma i sur., 2021).



Slika 7. Prikaz sakupljanja suza korištenjem kapilarnih cjevčica (Preuzeto: https://www.researchgate.net/figure/2-Tear-film-collection-at-a-slit-lamp-with-a-disposable-polycarbonate-capillary-tube_fig4_268296664, 18.8.2021.).

Za svaku specifičnu studiju potrebno je odabrati prikladnu metodu sakupljanja suza. Kada je potrebna velika količina uzorka, poželjnije je koristiti Schirmerove trakice, a kod pacijenata sa suhim očima poželjnije je koristiti celulozne spužvice. Rezultati istraživanja proteina u suzama dobiveni korištenjem različitih metoda sakupljanja suza nisu direktno usporedivi te je vrlo važno uzeti u obzir potencijalni utjecaj metode sakupljanja na koncentraciju i ekspresiju proteina u suzama (Ma i sur., 2021).

4.4. Potencijalni biomarkeri u suzama kod odabranih sistemskih bolesti i bolesti oka

Suze sadržavaju potencijalne biomarkere sistemskih bolesti i bolesti oka. Sadržavaju proteine (mucine, enzime, glikoproteine, imunoglobuline), lipide, elektrolite, vodu i otopljene organske tvari. Iako je uzorak suza koji se uzima za analizu mali (približno 20 μ L), razvoj osjetljivih tehnika omogućuje detekciju 6-12 mg/mL proteina u suzama. Kad je uzorka suza premalo, uzorkovanje se nadopunjuje ispiranjem oka fiziološkom otopinom. Metoda ispiranja provodi se na način da se kap fiziološke otopine aplicira u konjunktivalnu vrećicu, a nakon toga se uzorak suza uzima mikropipetom. Detekcija proteina u suzama važna je za razumijevanje fundamentalnih patoloških procesa, za pravovremeno postavljanje dijagnoze i liječenje različitih bolesti kao što su dijabetička retinopatija, sa starenjem povezana makularna degeneracija, glaukom, cistična fibroza, rak i Parkinsonova bolest (Glinska i sur., 2017). Sakupljanje suza može biti korisno u razumijevanju bolesti kao što su sindrom suhog oka, Sjögrenov sindrom, različite infekcije oka, alergijske bolesti oka i upala očne vjeđe. Sistemske bolesti kod kojih je opažena promjena u sastavu proteina suza su šećerna bolest i Gravesova oftalmopatija. Kronične komplikacije šećerne bolesti mogu dovesti do sljepoće. U pacijenata sa dijabetičkom retinopatijom opažena je promjena u sastavu proteina suza koja uključuje smanjenje za-suze-specifičnog prealbumina, povećanje koncentracije lizozima te značajno povišene koncentracije apolipoproteina A1. U pacijenata sa Gravesovom oftalmopatijom u uzorku suza opažen je povišen omjer IgA u odnosu na lizozim, povećana koncentracija cink-alfa-2-glikoproteina i laktoferina (Quah i sur., 2014).

SINDROM SUHOG OKA

Sindrom suhog oka je upalna bolest koja pogađa površinu oka. S obzirom da je upala glavna komponenta ovog sindroma, u pretraživanju biomarkera u suzama, razne studije se najviše fokusiraju na analizu molekula citokina, faktora rasta, mucina i lipida. Pronađene su visoke koncentracije interleukina 1, 6, 8, 10, 13, 17, 22, interferona i TNF- α koji dalje mogu pojačati upalu aktivacijom T stanica. Idealna i visoko osjetljiva metoda za detekciju različitih citokina u uzorku suza je multipleks Luminex metoda. Određivanje citokina u suzama je potencijalna dopuna ostalim pretragama za dijagnosticiranje subpopulacija sindroma suhog oka. Lizozim nije specifičan biomarker za sindrom suhog oka, ali bi se mogao koristiti kod ove patologije za npr. kontrolu neželjenih učinaka lijekova kao što su blokatori β -adrenergičkih receptora (Zhao i sur., 2018; Glinska i sur., 2017). Mucini su o-glikozilirani proteini visoke molekularne mase i prisutni su u dva oblika: sekretorni oblik u suzama i na-membranu-vezani u glikokaliksu, koji je zaštitna barijera na rožnici i konjuktivi. MUC5AC mucin ima glavnu ulogu u podmazivanju površine oka, a luče ga goblet stanice konjunktive. MUC16 mucin ima ulogu u održavanju funkcije epitelne barijere glikokaliksa. Ta dva mucina mogu se detektirati u suzama sakupljenim različitim metodama uzorkovanja (Ablamowicz i sur., 2017).

SJÖGREN SINDROM

Sjögren sindrom je podskupina sindroma suhog oka kojeg karakterizira nedostatak vodenog sloja u suznom filmu. To je vezano uz autoimuni poremećaj u kojem su pogođene endokrine žlijezde, suzne, žlijezde slinovnice, znojnice i mukozne žlijezde te žlijezde pankreasa. U tom sindromu analize su pokazale povišene vrijednosti citokina IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α i MMP-9. Također su detektirane povećane koncentracije autoantitijela u suzama i to protiv Ro/SSA, Ls/SSB te IgG zajedno sa IgA protiv α -fodrina. U suzama pacijenata sa Sjögren sindromom je pronađena povišena koncentracija proteina AQP5 (Akvaporin 5) za razliku od pacijenata sa sindromom suhog oka što indicira da se taj akvaporin nađe u suzama zbog destrukcije suzne žlijezde od strane limfocita. Tu hipotezu potvrđuje određivanje serumskih protutijela na AQP5, koja su značajno visoka u pacijenata sa Sjögren sindromom. To povećava šansu da bi se AQP5 u suzama mogao u budućnosti koristiti kao biomarker za ovu patologiju (Glinska i sur., 2017).

DIJABETIČKA RETINOPATIJA

Dijabetička retinopatija je najčešća kronična komplikacija šećerne bolesti koja može dovesti do gubitka vida i ostalih ozbiljnih metaboličkih, vaskularnih i neuroloških oštećenja u pacijenata. Može se određivati veliki broj proteina vezan uz ovu patologiju, ali još ne postoji tkivno specifični biomarker za retinu odnosno mrežnicu oka. Ključnu ulogu u patologiji dijabetičke retinopatije ima upala i angiogeneza. Promjene u koncentraciji različitih proupalnih i angiogenetskih medijatora opažene su u serumu i suzama pacijenata sa dijabetičkom retinopatijom. Zbog promijenjene angiogeneze kao markeri se mogu koristiti VEGF i IL-6, IP-10 i MCP-1. Zbog prisutne hiperglikemije mijenjaju se koncentracije IGF-a. Vezano uz dijabetičku retinopatiju također se u suzama mogu detektirati proteini NGF, APOA1, lipokalin 1, laktotransferin, lakritin, lizozim C, lipofilin A, lambda lanci imunoglobulina, Hsp27, β 2-mikroglobulin i enolaza. Šećernu bolest prati restrukturiranje vaskularnih struktura što je povezano sa matriks metaloproteinazama. Pacijenti sa dijabetesom koji su bili podvrgnuti vitrektomiji imaju više vrijednosti MMP-10. Prije operacije koncentracije MMP-2, MMP-9 i MMP-10 u suzama pacijenata oboljelih od dijabetesa nisu se znatno razlikovale od koncentracija u zdravoj kontrolnoj grupi (Kaštelan i sur., 2020; Glinska i sur., 2017).

CISTIČNA FIBROZA

Cistična fibroza je genski poremećaj koji pogađa egzokrine žlijezde koje onda proizvode jako gusti sekret što dovodi do disfunkcije organa za koje je sluz važna za funkciju kao što su pluća, crijeva, gušterača i znojne žlijezde. Vezano uz cističnu fibrozu u suzama se prati koncentracija citokina, IL-8 i IFN- γ koja je u ovom slučaju znatno povišena. Koncentracija ovih citokina značajno korelira sa kliničkom progresijom bolesti no IFN- γ je povišen i kod sindroma suhog oka i Sjögren sindroma te u ostalim upalnim stanjima površine oka. Drugi potencijalni marker je MIP-1 β koji je značajno povišen u suzama pacijenata sa cističnom fibrozom i sindromom suhog oka. Malo se zna o ulozi ovog proteina u progresiji i patogenezi ove bolesti, ali daljnja istraživanja će pokazati njegovu korisnost kao biomarkera ili terapijske mete (Glinska i sur., 2017).

RAK

Veliki problem današnjice je zakašnjela dijagnoza raka pa se intenzivno traže potencijalni biomarkeri raka u svim tjelesnim tekućinama uključujući suze. Lakriglobin je protein kojeg luče suzne žlijezde, mliječne žlijezde i maternica. Pronađen je u povećanim koncentracijama u suzama pacijenata oboljelih od raznih tipova karcinoma. Također je nađen u zdravih pojedinaca koji u obitelji imaju dijagnozu karcinoma. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se otkrila korisnost ovog biomarkera (Glinska i sur., 2017).

MULTIPLA SKLEROZA

Multipla skleroza je autoimuna bolest koju karakterizira demijelinizacija u središnjem živčanom sustavu. Dijagnoza bolesti postavlja se uzimanjem uzorka likvora lumbalnom punkcijom što je invazivna metoda koja pacijentu izaziva izuzetnu neugodu i bol. Standardni biomarker su nalaz oligoklonalnog IgG u likvoru, a on se može odrediti i u suzama. Određivanja IgG u suzama u pacijenata sa multiplom sklerozom još se mora dodatno istražiti da bi se saznao potencijal IgG u suzama kao biomarkera (Glinska i sur., 2017).

HIV/AIDS

HIV-1 virus može prodrijeti u različita tkiva, tjelesne tekućine i sekrete. Istraživanja su pokazala da se HIV-1 može izolirati iz suza pacijenata. HIV-1 RNA visoka je u suzama pacijenata koji su prošli dugotrajnu antiretroviralnu terapiju (HAART), što sugerira da bi sa-suzama-povezana tkiva mogla biti novi rezervoari HIV-1. HIV-1 RNA nema u suzama pacijenata koji su trenutno na antiretroviralnoj terapiji (HAART, u trajanju od 1-146 mjeseci). Iako su oči imunosno privilegirani organ, rezultati studija pokazuju da trenutni antiretroviralni lijekovi mogu penetrirati kroz krvno-očnu barijeru i efektivno suprimirati HIV-1 u sa-suzama-povezanim tkivima. Potrebna su daljnja istraživanja o dinamici virusa HIV-1 u suzama (Qian i sur., 2020).

PARKINSONOVA BOLEST

Parkinsonova bolest je progresivna neurodegenerativna bolest središnjeg živčanog sustava. Kao i u ostalim sistemskim bolestima, istraživanja proteomike suza u potrazi za potencijalnim biomarkerom još su u začetcima. Važna molekula u patogenezi Parkinsonove bolesti je TNF- α koji uzrokuje progresivnu degeneraciju dopaminergičkih neurona. Njegove koncentracije u suzama u pacijenata sa različitim stadijem Parkinsonove bolesti značajno su povišene u odnosu na zdrave pojedince, ali nisu povezane sa trajanjem pojedinog stadija te bolesti. Parkinsonovu bolest karakterizira gubitak dopaminergičkih neurona i nakupljanje Lewijevih tjelešaca u supstanciji nigri. Lewijeva tjelešca formirana su od agregata monomera α -sinukleina koji se prvo povezuje u oligomere, a zatim fibrile. Mutacije i polimorfizmi u genu za protein α -sinuklein povezani su sa povećanim rizikom za Parkinsonovu bolest. Koncentracija α -sinukleina istraživana je u likvoru, plazmi, slini i suzama. Vezano uz Parkinsonovu bolest u suzama je određivan i MMP9 i laktoferin. MMP9 je proteaza čija je koncentracija povišena u pacijenata sa sindromom suhog oka i upalnim stanjima očne površine. Laktoferin je antimikrobni protein kojeg proizvode suzne žlijezde i marker je njihove normalne funkcije. Pronađena je značajna razlika u koncentracijama oligo α -sinukleina i ukupnog α -sinukleina u pacijenata sa Parkinsonovom bolesti u odnosu na skupinu zdravih pacijenata stoga se ti proteini u suzama smatraju potencijalnim biomarkerima Parkinsonove bolesti (Alvarez i sur., 2019; Glinska i sur., 2017).

Dopamin je neurotransmiter povezan sa brojim funkcijama u organizmu. Neregulirane koncentracije dopamina povezane su sa poremećajem pažnje i hiperaktivnosti, Parkinsonovom bolesti, shizofrenijom, epilepsijom, Alzheimerovom bolesti i demencijom. U oku, neregulirane koncentracije dopamina povezane su sa razvojem mijopije, sindroma suhog oka i glaukoma. Koncentracije dopamina mogu se određivati u uzorku plazme, likvora, urina i suza. U suzama se može određivati kemiluminiscentnom ELISA metodom što predstavlja neinvazivnu metodu za kontrolu koncentracije dopamina. Nedostatak je nepostojanje referentnih intervala ili preporučenih vrijednosti za koncentracije dopamina u suzama kako bi se ova mjerenja potencijalno uvela u kliničku praksu za kontrolu koncentracija dopamina (Sharma i sur., 2019).

5. ZAKLJUČCI

1. Često i redovito mjerenje koncentracije glukoze u krvi nužno je u pacijenata sa šećernom bolesti kako bi se spriječio razvoj akutnih i kroničnih komplikacija šećerne bolesti.
2. Glikirani hemoglobin (HbA1c) je „zlatni standard“ za praćenje glikemije u pacijenata sa šećernom bolesti i odražava prosječnu koncentraciju glukoze tijekom posljednja 2-3 mjeseca.
3. Glikirani albumin odražava prosječnu koncentraciju glukoze tijekom posljednja 2-3 tjedna te je koristan kao dodatan marker glikemijskog statusa posebice u nekim patološkim stanjima u kojima HbA1c ne daje pouzdane rezultate kao primjerice kod pacijenata kod kojih se glikemijski status poboljšava ili pogoršava u kratkom periodu, kod pacijenta sa kroničnom bolesti bubrega, anemijom ili pacijenata na hemodijalizi.
4. Upotreba glikiranog albumina kao biomarkera za kontrolu glikemije bazira se na činjenici da je opseg glikacije ovisan o koncentraciji glukoze dostupne za reakciju sa serumskim albuminom.
5. Glikirani albumin je obećavajući marker glikemije koji nadopunjava upotrebu HbA1c no nepostojanje univerzalnog referentnog intervala i „cutoff“ vrijednosti za šećernu bolest ograničava njegovu kliničku upotrebu.
6. Razvoj neinvazivnih metoda za određivanje koncentracija glukoze i drugih biomarkera za praćenje šećerne bolesti pomoglo bi milijunima pacijenta jer bi spriječilo bol i stres koji nastaju učestalim uzorkovanjem krvi. Iako se istražuju brojni pristupi neinvazivnom praćenju koncentracije glukoze, do danas još nije nađena pogodna metoda i marker koji bi u potpunosti zamijenili mjerenje koncentracije glukoze iz uzorka krvi za postavljanje dijagnoze i praćenje šećerne bolesti.
7. Glikirani albumin u serumu i suzama mogao bi se koristiti kao dodatni biomarker uz određivanje koncentracije glukoze u plazmi i HbA1c u svrhu što boljeg praćenja šećerne bolesti, a daljnja istraživanja trebaju potvrditi može li se glikirani albumin u krvi i suzama koristiti kao zasebni i neovisni glikemijski marker ili u kombinaciji sa već postojećim.

8. Zbog neinvazivne prirode sakupljanja uzorka suza i relativno jednostavnog sastava suza u odnosu na serum i plazmu, pojačan je interes za istraživanje biomarkera u suzama koji bi služili postavljanju dijagnoze ili praćenju bolesti oka te sistemskih oboljenja.

6. LITERATURA

Ablamowicz AF, Nichols JJ. Concentrations of MUC16 and MUC5AC using three tear collection methods. *Molecular Vision*, 2017, 23, 529-537.

Aihara M, Kubota N, Minami T, i sur. Association between tear and blood glucose concentrations: Random intercept model adjusted with confounders in tear samples negative for occult blood. *Journal of Diabetes Investigation*, 2021, 12(2), 266-276.

Alvarez SFH, Okamoto CT, Janga SR, i sur. Oligomeric α -synuclein is increased in basal tears of Parkinsons patients. *Biomarkers in Medicine*, 2019, 13(11), 941-952.

Anguizola J, Matsuda R, i sur. Review: Glycation of human serum albumin. *Clinica chimica acta*, 2013, 425, 64-74.

Batičić L, Ivanović L, Grčić A, i sur. Šećerna bolest i inhibitori DPP IV/CD26. *Medicina fluminensis*, 2019, 55(3), 200-214.

Bomholt T, Adrian T, Norgaard K, i sur. The Use of HbA1c, Glycated Albumin and Continuous Glucose Monitoring to Assess Glucose Control in the Chronic Kidney Disease Population Including Dialysis. *Nephron*, 2021, 145, 14-19.

Capillary tubes for tears collection, https://www.researchgate.net/figure/2-Tear-film-collection-at-a-slit-lamp-with-a-disposable-polycarbonate-capillary-tube_fig4_268296664, pristupljeno 18.8.2021.

Chume FC, Kieling MH, i sur. Glycated albumin as a diagnostic tool in diabetes: An alternative or an Additional test?. *PLoS ONE*, 2019, 14(12), 1-13.

Ciudin A, Hernandez C, Simo R. Non-Invasive Methods of Glucose Measurement: Current Status and Future Perspectives. *Current Diabetes Reviews*, 2012, 8, 48-54.

Čepelak I, Štraus B, Dodig S, Labar B. Medicinsko-biokemijske smjernice. Zagreb, Medicinska naklada, 2004, str.118-130.

Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str.113-123.

Danese E, Montagnana M, Nouvenne A, i sur. Advantages and Pitfalls of Fructosamine and Glycated Albumin in the Diagnosis and Treatment of Diabetes. Journal of Diabetes Science and Technology, 2015, 9(2), 169-176.

Dorcely B, Katz K, Jagannathan R, i sur. Novel biomarkers for prediabetes, diabetes, and associated complications. Diabetes Metabolic Syndrome and Obesity, 2017, 10, 345-361.

Gan T, Liu X, Xu G. Glycated Albumin Versus HbA1c in the Evaluation of Glycemic Control in Patients With Diabetes and CKD. Kidney International Reports, 2018, 3, 542-553.

Glinska G, Krajičikova K, Tomečkova V. Diagnostic potential of tears in ophthalmology. Czech and slovak ophthalmology, 2017, 3, 99-106.

Glycated Albumin Levels in Tears, <https://conferences.medicom-publishers.com/specialisation/endocrinology/easd-2020/non-invasive-monitoring-by-measuring-glycated-albumin-in-tears/>, pristupljeno 29.6.2021.

Glycated Albumin Levels in Tears, <https://medicaldialogues.in/diabetes-endocrinology/news/tear-samples-may-help-monitor-blood-sugar-in-diabetes-study-70571>, pristupljeno 28.6.2021.

Glycated Albumin Levels in Tears, <https://www.healio.com/news/endocrinology/20201006/similar-glycated-albumin-levels-in-tears-blood-may-allow-noninvasive-glucose-testing>, pristupljeno 28.6.2021.

Hrvatski zavod za javno zdravstvo-Nacionalni registar osoba sa šećernom bolešću CroDiab, Izvješće za 2020, 2020, <https://www.hzjz.hr/>, pristupljeno: 29.6.2021.

Kaštelan S, Orešković I, Bišćan F, i sur. Inflammatory and angiogenic biomarkers in diabetic retinopathy. *Biochem Med*, 2020, 30(3), 1-15.

Koga M, Kasayama S. Clinical impact of glycated albumin as another glycemic control marker. *Endocrine Journal*, 2010, 57(9), 751-762.

LC-MS,

https://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry, pristupljeno 24.8.2021.

Lukaš M. Dijagnostika suznog filma. Diplomski rad, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2018, 1-54.

Ma JYW, Sze YH, Bian JF, Lam TC. Critical role of mass spectrometry proteomics in tear biomarker discovery for multifactorial ocular diseases (Review). *International journal of molecular medicine*, 2021, 47(83), 1-12.

Qian Y, Wu Z, Chen C, i sur. Detection of HIV-1 viral load in tears of HIV/AIDS patients. *Infection*, 2020, 48, 929-933.

Quah JHM, Tong L, Barbier S. Patient Acceptability of Tear Collection in the Primary Healthcare Setting. *Optometry and Vision Science*, 2014, 9(4), 452-458.

Resan M, Stanojević I, Ćurčin AP, i sur. Levels of interleukin-6 in tears before and after excimer laser. *Vojnosanitetski pregled*, 2014, 1-6.

Sato A, Yada S, Hosoba E, i sur. Establishment of glycated albumin unit conversion equation from the standardized value (mmol/mol) to the routinely used value (%). *Annals of Clinical Biochemistry*, 2019, 56(2), 204-209.

Schirmers strips, <https://www.standardofcare.com/showarticle.php?artid=5982>, pristupljeno 18.8.2021.

Sharma NS, Acharya SK, Nair AP, i sur. Dopamine levels in human tear fluid. *Indian Journal of Ophthalmology*, 2019, 67(1), 38-41.

Tang L, Chang SJ, i sur. Non-Invasive Blood Glucose Monitoring Technology: A Review. *Sensors*, 2020, 20, 1-32.

Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M, i sur. Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. Zagreb, Medicinska naklada, 2018., str. 176-194.

Zhao H, Li Q, Ye M, Yu J. Tear Luminex Analysis in Dry Eye Patients. *Medical science monitor*, 2018, 24, 7595-7602.

Zhao Z, Liu J, Shi B, i sur. Advanced glycation end product (AGE) modified proteins in tears of diabetic patients. *Molecular Vision*, 2010, 16, 1576-1584.

Zhou L, Beuerman RW, Foo Y, i sur. Characterisation of Human Tear Proteins Using High-resolution Mass Spectrometry. *Annals Academy of Medicine*, 2006, 35(6), 401-407.

7. SAŽETAK

Šećerna bolest je kronični metabolički sindrom nastao zbog apsolutnog i/ili relativnog manjka inzulina, a karakteriziran je kroničnom hiperglikemijom koju prate poremećaji u metabolizmu ugljikohidrata, masti i proteina. Koncentracija glukoze mora se održavati unutar određenih granica kako se ne bi razvile akutne i kronične komplikacije šećerne bolesti. Glikacijom odnosno neenzimskim kovalentnim vezanjem glukoze za amino skupinu proteina nastaju hemoglobin A1c i glikirani albumin. HbA1c je „zlatni standard“ za kliničko praćenje šećerne bolesti i odražava stanje glikemijske kontrole unatrag 2-3 mjeseca. Glikirani albumin odražava stanje glikemijske kontrole unatrag 2-3 tjedna te je pogodan za praćenje glikemije u pacijenata kod kojih koncentracija glukoze u krvi varira tokom određenog kratkog perioda. U nekih bolesti i stanja kao što su kronična bolest bubrega, anemija i primjena hemodijalize, glikirani albumin je bolji biomarker kontrole šećerne bolesti od HbA1c koji u tim slučajevima ne daje pouzdane rezultate. HbA1c, glikirani albumin i koncentracija glukoze određuju se iz uzorka krvi, a uzorkovanje krvi je invazivan postupak koji u pacijenata sa šećernom bolesti koji glikemiju moraju kontrolirati na dnevnoj bazi, izaziva bol i neugodu. Razvijaju se i istražuju neinvazivne metode praćenja koncentracije glukoze. Osim u krvi, glukoza se može naći u različitim tjelesnim tekućinama kao što su intersticijska tekućina, suze, slina, urin i znoj. Glikirani albumin osim u krvi može se određivati u suzama kao neinvazivna metoda za praćenje šećerne bolesti. Suze su kompleksna biološka tekućina i sadržavaju elektrolite, proteine, lipide, mucine, glukozu i neke male organske molekule i metabolite. U sadržaju suza mogu se naći ioni natrija, kalija, magnezija, kalcija, klorida, bikarbonata i fosfata. Najznačajniji proteini su lizozim, laktoferin, sekretorni imunoglobulin A, serumski albumin, lipokalin-1 i lipofilin. Suze se mogu sakupljati na nekoliko načina, a različiti načini uzorkovanja utječu na kvalitetu uzorka suza te posljedično na rezultat analize proteina u suzama. U suzama je moguće odrediti brojne analite što uz standardne pretrage i biomarkere može pridonijeti dijagnostici, probiru i praćenju različitih bolesti oka te sistemskih bolesti.

8. SUMMARY

Diabetes mellitus is a chronic metabolic syndrome caused by absolute and /or relative lack of insulin, and is characterized by chronic hyperglycemia accompanied by disorders in metabolism of carbohydrates, fats and proteins. Glucose concentration must be maintained within certain limits to avoid the development of acute and chronic complications of diabetes. Hemoglobin A1c and glycated albumin are formed by glycation or non-enzymatic covalent binding of glucose to the amino group of proteins. HbA1c is the "gold standard" for clinical monitoring of diabetes and reflects the state of glycemic control in the previous 2 to 3 months. Glycated albumin reflects the state of glycemic control in the previous 2 to 3 weeks and is suitable for monitoring glycemia in patients in whom blood glucose levels vary over a period of time. In some diseases and conditions such as chronic kidney disease, anemia and use of hemodialysis, glycated albumin is a better biomarker of diabetes control than HbA1c which, in these cases, does not give reliable results. HbA1c, glycated albumin, and glucose concentration are determined from a blood sample, and blood sampling is an invasive procedure that causes pain and discomfort in diabetic patients who must control glycemia on a daily basis. Non-invasive methods for monitoring glucose concentration are being developed and investigated. In addition to blood, glucose can be found in various body fluids such as interstitial fluid, tears, saliva, urine and sweat. Glycated albumin, other than in blood, can be determined in tears as a non-invasive method of monitoring diabetes. Tears are complex biological fluids and contain electrolytes, proteins, lipids, mucins, glucose, and some small organic molecules and metabolites. Sodium, potassium, magnesium, calcium, chloride, bicarbonate and phosphate ions can be found as the contents of tears. The most important proteins are lysozyme, lactoferrin, secretory immunoglobulin A, serum albumin, lipocalin-1 and lipophilin. Tears can be collected in several ways, and different sampling methods affect the quality of tear sample and consequently the result of protein analysis in the tears. The fact that it is possible to determine a lot of analytes in tears, combined with standard tests and biomarkers, can contribute to diagnosis, screening and monitoring of various eye diseases and systemic diseases.

9. PRILOZI

9.1. Popis kratica

AGEs – Produkti uznapredovale glikacije (engl. Advanced glycation end-products)

APOA1 - Apolipoprotein A1

AQP5 - Akvaporin 5

DOF-Lys - N-(1-deoksi-D-fruktoz-1-il)-L-lizin

ELISA – Enzimski povezani imunosorbent test (engl. Enzyme-linked immunosorbent assay)

GA - Glikirani albumin

GT1 – Glukozni transporter 1

HAART - Vrlo djelotvorna antiretrovirusna terapija (engl. Highly Active Antiretroviral Treatment)

HbA1c – Hemoglobin A1c, glikirani hemoglobin

HIV-1 RNA – Ribonukleinska kiselina virusa humane imunodeficijencije 1

HPLC – Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. High Performance Liquid Chromatography)

Hsp27 – Protein toplinskog šoka 27 (engl. Heat shock protein 27)

IFN- γ – Interferon gama

IGF – Inzulinu sličan faktor rasta (engl. Insulin-like growth factor)

IL - Interleukin

IP-10 – Interferonom potaknuti protein 10 (engl. Interferon induced protein 10)

Itd. – I tako dalje

JSCC – Japansko društvo za kliničku kemiju (engl. Japan Society of Clinical Chemistry)

LC-MS – Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrom masa (engl. Liquid chromatography-Mass spectrometry)

MALDI-TOF-MS - Matriksom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija spregnuta sa spektrometrom masa (engl. Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry)

MCP-1 – Kemoatraktantni monocitni protein 1 (engl. Monocyte chemoattractant protein 1)

MIP-1 β – Upalni protein makrofaga 1 β (engl. Macrophage inflammatory protein 1 β)

MMP – Matriks metaloproteinaza

NanoRP-LC – Kromatografija obrnutih faza u nanoskali (engl. Nanoscale reversed phase-liquid chromatography)

NGF – Faktor rasta živaca (engl. Nerve growth factor)

oGTT-test – Oralni test tolerancije glukoze (engl. Oral glucose tolerance test)

QTOF – Hibridni kvadrupol TOF (engl. Quadrupole-TOF)

RIA – Radioimuno test (engl. Radioimmunoassay)

SELDI-TOF-MS - Sa površinom povezana laserska desorpcija/ionizacija spregnuta sa spektrometrom masa (engl. Surface-enhanced laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry)

TNF- α – Faktor nekroze tumora α (engl. Tumor necrosis factor α)

TOF – Vrijeme preleta (engl. Time-of-flight)

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Opća klinička biokemija
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Glikirani albumin u suzama - neinvazivno praćenje šećerne bolesti

Željka Jakoplić

SAŽETAK

Šećerna bolest je kronični metabolički sindrom nastao zbog apsolutnog i/ili relativnog manjka inzulina, a karakteriziran je kroničnom hiperglikemijom koju prate poremećaji u metabolizmu ugljikohidrata, masti i proteina. Koncentracija glukoze mora se održavati unutar određenih granica kako se ne bi razvile akutne i kronične komplikacije šećerne bolesti. Glikacijom odnosno neenzimskim kovalentnim vezanjem glukoze za amino skupinu proteina nastaju hemoglobin A1c i glikirani albumin. HbA1c je „zlatni standard“ za kliničko praćenje šećerne bolesti i odražava stanje glikemijske kontrole unatrag 2-3 mjeseca. Glikirani albumin odražava stanje glikemijske kontrole unatrag 2-3 tjedna te je pogodan za praćenje glikemije u pacijenata kod kojih koncentracija glukoze u krvi varira tokom određenog kratkog perioda. U nekih bolestima i stanjima kao što su kronična bolest bubrega, anemija i primjena hemodijalize, glikirani albumin je bolji biomarker kontrole šećerne bolesti od HbA1c koji u tim slučajevima ne daje pouzdane rezultate. HbA1c, glikirani albumin i koncentracija glukoze određuju se iz uzorka krvi, a uzorkovanje krvi je invazivan postupak koji u pacijenata sa šećernom bolesti koji glikemiju moraju kontrolirati na dnevnoj bazi, izaziva bol i neugodu. Razvijaju se i istražuju neinvazivne metode praćenja koncentracije glukoze. Osim u krvi, glukoza se može naći u različitim tjelesnim tekućinama kao što su intersticijska tekućina, suze, slina, urin i znoj. Glikirani albumin osim u krvi može se određivati u suzama kao neinvazivna metoda za praćenje šećerne bolesti. Suze su kompleksna biološka tekućina i sadržavaju elektrolite, proteine, lipide, mucine, glukozu i neke male organske molekule i metabolite. U sadržaju suza mogu se naći ioni natrija, kalija, magnezija, kalcija, klorida, bikarbonata i fosfata. Najznačajniji proteini su lizozim, laktoferin, sekretorni imunoglobulin A, serumski albumin, lipokalin-1 i lipofilin. Suze se mogu sakupljati na nekoliko načina, a različiti načini uzorkovanja utječu na kvalitetu uzorka suza te posljedično na rezultat analize proteina u suzama. U suzama je moguće odrediti brojne analite što uz standardne pretrage i biomarkere može pridonijeti dijagnostici, probiru i praćenju različitih bolesti oka te sistemskih bolesti.

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

Rad sadrži: 41 stranica, 7 grafičkih prikaza i 35 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: dijabetes, glikirani albumin, glukoza, suze

Mentor: **Dr. sc. Roberta Petlevski**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Roberta Petlevski**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Lovorka Vujić, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Anita Somborac Bačura, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: Rujan 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Haematology
General clinical biochemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Glycated albumin levels in tears – noninvasive diabetes monitoring

Željka Jakoplić

SUMMARY

Diabetes mellitus is a chronic metabolic syndrome caused by absolute and /or relative lack of insulin, and is characterized by chronic hyperglycemia accompanied by disorders in metabolism of carbohydrates, fats and proteins. Glucose concentration must be maintained within certain limits to avoid the development of acute and chronic complications of diabetes. Hemoglobin A1c and glycated albumin are formed by glycation or non-enzymatic covalent binding of glucose to the amino group of proteins. HbA1c is the "gold standard" for clinical monitoring of diabetes and reflects the state of glycemic control in the previous 2 to 3 months. Glycated albumin reflects the state of glycemic control in the previous 2 to 3 weeks and is suitable for monitoring glycemia in patients in whom blood glucose levels vary over a period of time. In some diseases and conditions such as chronic kidney disease, anemia and use of hemodialysis, glycated albumin is a better biomarker of diabetes control than HbA1c which, in these cases, does not give reliable results. HbA1c, glycated albumin, and glucose concentration are determined from a blood sample, and blood sampling is an invasive procedure that causes pain and discomfort in diabetic patients who must control glycemia on a daily basis. Non-invasive methods for monitoring glucose concentration are being developed and investigated. In addition to blood, glucose can be found in various body fluids such as interstitial fluid, tears, saliva, urine and sweat. Glycated albumin, other than in blood, can be determined in tears as a non-invasive method of monitoring diabetes. Tears are complex biological fluids and contain electrolytes, proteins, lipids, mucins, glucose, and some small organic molecules and metabolites. Sodium, potassium, magnesium, calcium, chloride, bicarbonate and phosphate ions can be found as the contents of tears. The most important proteins are lysozyme, lactoferrin, secretory immunoglobulin A, serum albumin, lipocalin-1 and lipophilin. Tears can be collected in several ways, and different sampling methods affect the quality of tear sample and consequently the result of protein analysis in the tears. The fact that it is possible to determine a lot of analytes in tears, combined with standard tests and biomarkers, can contribute to diagnosis, screening and monitoring of various eye diseases and systemic diseases.

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

Thesis includes: 41 pages, 7 figures and 35 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Diabetes mellitus, glycated albumin, glucose, tears

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

Reviewers: **Roberta Petlevski, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lovorka Vujić, Ph.D., *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Anita Somborac Bačura, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2021.