**4. Rezultati i rasprava**

**4.1 Rezultati kromatografske analize i masene spektrometrije**

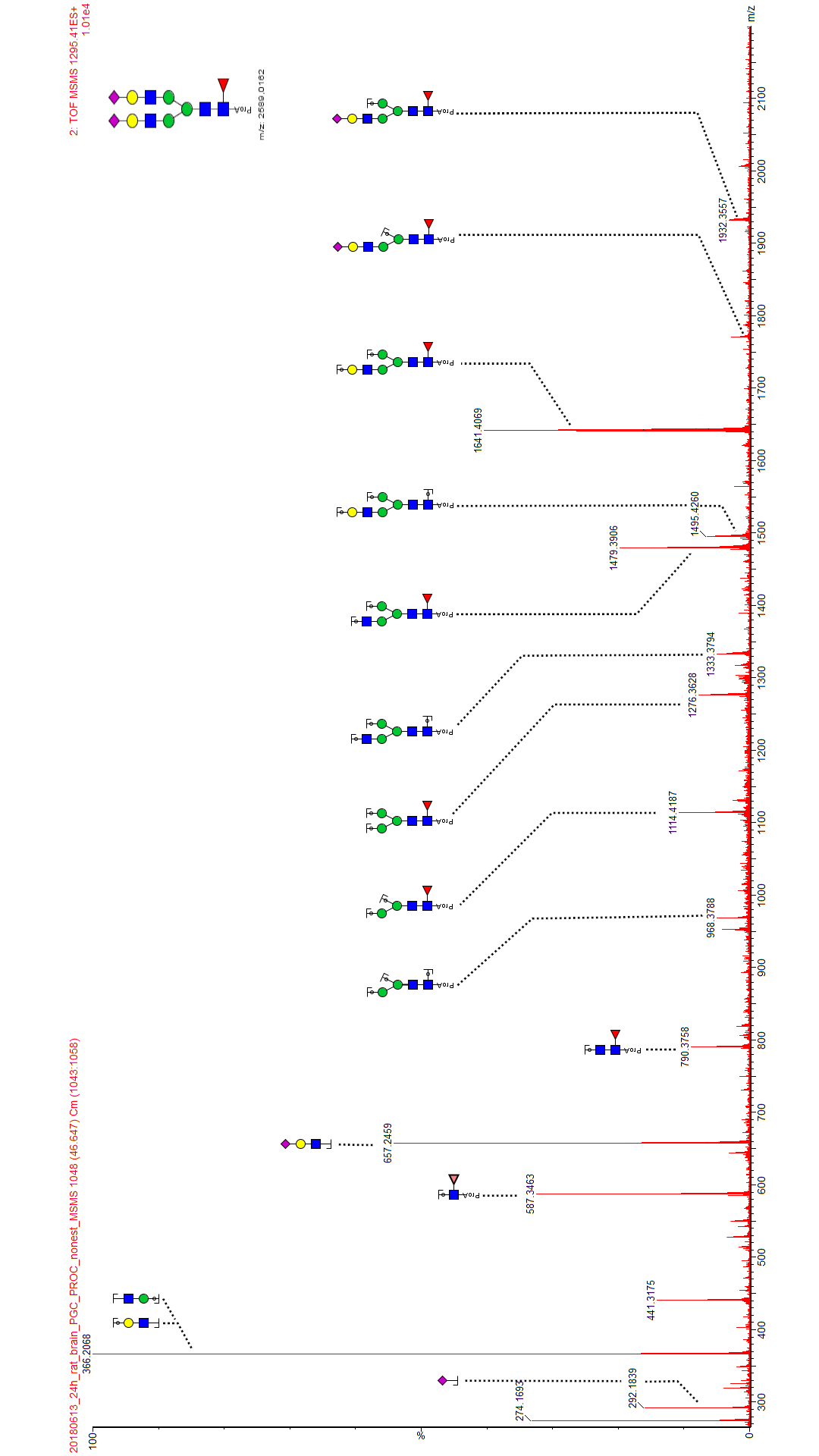
Nakon HILIC-UPLC-ESI-MS/MS analize uzoraka svakog uzorka svake pojedine skupine uzoraka (tkivo korteksa odraslih štakora, „odrasla skupina“, *n = 5*; tkivo mozga štakora starih 24 sata, „skupina 24h“, *n = 4*; tkivo mozga štakora starih 48 sata, „skupina 48h“, *n = 3***)** rezultati analize (u daljnjem tekstu kao *kromatogrami*) podijeljeni su u 46 distinktnih frakcija. Informacija o kvalitativnom sastavu N-glikana u svakoj pojedinoj frakciji dobivena je tumačenjem i anotacijom masenih spektara. Kvalitativna informacija odnosi se na različitost kompozicija identificiranih u svakoj pojedinoj frakciji. Analiza fragmentacijskih spektara (MS/MS) bila je moguća za one kompozicije čiji je intenzitet signala zadovoljio prag pri odabiru molekule za fragmentaciju definiran u postavkama analize masenim spektrometrom.

**4.1.1 Određivanje *N-glikoprofila***

Strukturna informacija o pojedinim kompozicijama upotpunjena je analizom fragmentacijskih (ESI-MS/MS) spektara u pozitivnom načinu rada. Važno je imati na umu da ESI(+)-MSMS spektri ne sadrže informaciju o prostornoj orijentaciji pojedinih veza unutar analiziranog N-glikana uslijed male vjerojatnosti fragmentacije monosaharida unutar šesteročlanog prstena. Također, prilikom anotacije važno je voditi računa o specifičnosti puteva enzimske sinteze N-glikana, čime je moguće eliminirati biološki nemoguće strukture i bitno pojednostaviti analizu. Opis i biološku pozadinu mogućih obrazaca grananja N-glikana daje kratki pregled sastavljen od strane (Taniguchi i sur, 2014). **Slika 4.1** daje primjer anotacije fragmentacijskog spektra dobivenog u ESI(+) načinu rada. U gornjem desnom kutu prikazana je moguća struktura navedene kompozicija određene vrijednosti *m/z* (dalje u tekstu *predložena struktura*), a svakom pojedinom vršku pripisan je mogući fragment odgovarajuće vrijednosti *m/z*. Svi fragmenti prikazani su kao vrijednost *m/z* s vrijednošću naboja (*z*) jednakoj +1 – odstupanja, ukoliko ih ima, posebno su naznačena. Dodatni primjeri anotiranih fragmentacijskih spektara nalaze se u dodatku.

U *odrasloj skupini* frakcijama je bilo moguće pripisano ukupno 95 kompozicija, u *skupini 24h* frakcijama je bilo moguće pripisati 102 kompozicije, dok je frakcijama u *skupini 48h* bilo moguće raščlaniti 105 kompozicija (uz moguća ponavljanja pojedinih kompozicija u različitim frakcijama unutar pojedinog uzorka). Ukupno su identificirane 83 jedinstvene kompozicije. Fragmentacijski spektar nije bio dostupan za frakcije: 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 uslijed niskog intenziteta signala. **Tablice 4.1, 4.2 i 4.3** prikazuju *pretpostavljene stukture* dominantnih kompozicija u pojedinim frakcijama za svaku skupinu uzoraka. Ukoliko je u pojedinoj frakciji prisutno više kompozicija koje se odnose u približno jednakim omjerima kompozicije su označene brojkom i slovom. **Slike 4.2, 4.3, 4.4** prikazuju anotirane kromatograme (*N-glikoprofile*) svake skupine uzoraka – pojedinačnim frakcijama u kromatogramu dodijeljena je *pretpostavljena struktura* dominantne kompozicije.

Iscrpna lista pronađenih kompozicija u pojedinim frakcijama uz dodatne dodatne informacije nalazi se u dodatku.



**Slika 4.1** Primjer anotiranog fragmentacijskog spektra za kompoziciju **H5N4F1S2** s *m/z([MProAH]+) = 2589.0162*.U prikazu crtkane linije spajaju fragment i pojedini vršak u masenom spektru, *m/z* fragmenta napisan je iznad vrška. Praćenjem spektra zdesna ulijevo (strelice) uviđa se postupni gubitak heksoza, heksozamina i sialinskih kiselina uslijed fragmentacije izazvane sudarima (CID). Dijagnostički fragmenti (fragmenti koji daju najviše informacija) zaokruženi su zelenom bojom.

**Tablica 4.1** *Odrasla skupina – pretpostavljene strukture* dominantnih kompozicija po frakcijama

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Frakcija** | **Mjereni m/z** | **Naboj** | **Izračunati**  **[MProAH]+ (Da)** | **Teorijski**  **[MH]+ (Da)** | **Skraćena kompozicija** | **Predložena struktura** | **Frakcija** | **Mjereni m/z** | **Naboj** | **Izračunati**  **[MProAH]+ (Da)** | **Teorijski**  **[MH]+ (Da)** | **Skraćena kompozicija** | **Predložena struktura** |
| **1** | **1276.41000** | **1** | **1276.41000** | **1057.39293** | **H3N2F1** |  | **15** | **930.77730** | **2** | **1860.54733** | **1641.59943** | **H5N4** |  |
| **2** | **1292.40200** | **1** | **1292.40200** | **1073.38783** | **H4N2** |  | **16a** | **995.80610** | **2** | **1990.60493** | **1771.66243** | **H4N4F2** |  |
| **3** | **1479.46700** | **1** | **1479.46700** | **1260.47233** | **H3N3F1** |  | **16b** | **1003.79520** | **2** | **2006.58313** | **1787.65733** | **H5N4F1** |  |
| **4** | **719.72800** | **2** | **1438.44873** | **1219.44573** | **H4N2F1** |  | **17** | **1003.77500** | **2** | **2006.54273** | **1787.65733** | **H5N4F1** |  |
| **5** | **841.76300** | **2** | **1682.51873** | **1463.55173** | **H3N4F1** |  | **18** | **995.80600** | **2** | **1990.60473** | **1771.66243** | **H4N4F2** |  |
| **6** | **1454.44700** | **1** | **1454.44700** | **1235.44063** | **H5N2** |  | **19** | **1097.33600** | **2** | **2193.66473** | **1974.74183** | **H4N5F2** |  |
| **7** | **943.29400** | **2** | **1885.58073** | **1666.63113** | **H3N5F1** |  | **20.1** | **1097.32100** | **2** | **2193.63473** | **1974.74183** | **H4N5F2** |  |
| **8** | **943.29400** | **2** | **1885.58073** | **1666.63113** | **H3N5F1** |  | **20.2** | **889.75500** | **2** | **1778.50273** | **1559.54623** | **H7N2** |  |
| **9** | **922.78000** | **2** | **1844.55273** | **1625.60453** | **H4N4F1** |  | **21** | **1076.81900** | **2** | **2152.63073** | **1933.71523** | **H5N4F2** |  |
| **10** | **922.78000** | **2** | **1844.55273** | **1625.60453** | **H4N4F1** |  | **22** | **1169.83300** | **2** | **2338.65873** | **2119.77933** | **H4N5F1S1** |  |
| **11** | **922.78000** | **2** | **1844.55273** | **1625.60453** | **H4N4F1** |  | **23.1** | **983.28700** | **2** | **1965.56673** | **1746.63073** | **H6N3F1** |  |
| **12** | **1024.30600** | **2** | **2047.60473** | **1828.68393** | **H4N5F1** |  | **23.2** | **1198.84660** | **2** | **2396.68593** | **2177.82123** | **H4N6F2** |  |
| **13** | **808.74500** | **2** | **1616.48273** | **1397.49343** | **H6N2** |  | **24** | **1178.34000** | **2** | **2355.67273** | **2136.79463** | **H5N5F2** |  |
| **14** | **808.74500** | **2** | **1616.48273** | **1397.49343** | **H6N2** |  | **25** | **970.77900** | **2** | **1940.55073** | **1721.59903** | **H8N2** |  |

**Tablica 4.1** *(Nastavak)*

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Frakcija** | **Mjereni m/z** | **Naboj** | **Izračunati**  **[MProAH]+ (Da)** | **Teorijski**  **[MH]+ (Da)** | **Skraćena kompozicija** | **Predložena struktura** | **Frakcija** | **Mjereni m/z** | **Naboj** | **Izračunati**  **[MProAH]+ (Da)** | **Teorijski**  **[MH]+ (Da)** | **Skraćena kompozicija** | **Predložena struktura** |
| **26** | **970.76530** | **2** | **1940.52333** | **1721.59903** | **H8N2** |  | **39** | **1053.29250** | **3** | **3157.86296** | **2939.08013** | **H6N6F3S1** |  |
| **27.1** | **1157.81900** | **2** | **2314.63073** | **2095.76803** | **H6N4F2** |  | **40** | **1033.93700** | **3** | **3099.79646** | **2881.03823** | **H6N5F2S2** |  |
| **27.2** | **1222.33500** | **2** | **2443.66273** | **2224.81063** | **H5N4F2S1** |  | **41** | **937.25890** | **3** | **2809.76216** | **2590.96323** | **H6N5F4** |  |
| **28** | **1222.33500** | **2** | **2443.66273** | **2224.81063** | **H5N4F2S1** |  | **42** | **1149.96290** | **3** | **3447.87416** | **3229.15513** | **H6N6F1S3** |  |
| **29** | **1149.84450** | **2** | **2298.68173** | **2079.77313** | **H5N4F3** |  | **43** | **1203.98930** | **3** | **3609.95336** | **3391.20793** | **H7N6F1S3** |  |
| **30** | **1251.35510** | **2** | **2501.70293** | **2282.85253** | **H5N5F3** |  | **44** | **1155.97880** | **3** | **3465.92186** | **3247.19083** | **H7N6F4S1** |  |
| **31** | **1051.79200** | **2** | **2102.57673** | **1883.65183** | **H9N2** |  | **45** | **1252.65220** | **3** | **3755.94206** | **3537.26583** | **H7N6F2S3** |  |
| **32** | **1425.41900** | **2** | **2849.83073** | **2630.96943** | **H5N6F2S1** |  | **46** | **1301.00370** | **3** | **3900.99656** | **3682.30333** | **H7N6F1S4** |  |
| **33** | **882.90830** | **3** | **2646.71036** | **2427.89003** | **H5N5F2S1** |  |  | | |  |  |  |  |
| **34** | **960.59500** | **3** | **2879.77046** | **2660.94353** | **H5N4F1S3** |  |
| **35** | **931.27000** | **3** | **2791.79546** | **2572.92753** | **H5N5F1S2** |  |
| **36** | **985.27200** | **3** | **2953.80146** | **2734.98033** | **H6N5F1S2** |  |
| **37** | **936.92490** | **3** | **2808.76016** | **2589.94283** | **H6N5F2S1** |  |
| **38** | **1057.61650** | **3** | **3170.83496** | **2952.03893** | **H5N4F1S4** |  |

**Tablica 4.2** *Skupina 24h – pretpostavljene strukture* dominantnih kompozicija po frakcijama

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Frakcija | Mjereni m/z | Naboj | Izračunati  [MProAH]+ (Da) | Teorijski  [MH]+ (Da) | Skraćena kompozicija | Predložena struktura | Frakcija | Mjereni m/z | Naboj | Izračunati  [MProAH]+ (Da) | Teorijski  [MH]+ (Da) | Skraćena kompozicija | Predložena struktura |
| 1 | 1276.4719 | 1 | 1276.47190 | 1057.39293 | H3N2F1 |  | 15 | 930.8039 | 2 | 1860.60053 | 1641.59943 | H5N4 |  |
| 2 | 1292.4553 | 1 | 1292.45530 | 1073.38783 | H4N2 |  | 16 | 1003.7952 | 2 | 2006.58313 | 1787.65733 | H5N4F1 |  |
| 3 | 740.2668 | 2 | 1479.52633 | 1260.47233 | H3N3F1 |  | 17 | 1024.3475 | 2 | 2047.68773 | 1828.68393 | H4N5F1 |  |
| 4 | 719.7519 | 2 | 1438.49653 | 1219.44573 | H4N2F1 |  | 18 | 1003.8367 | 2 | 2006.66613 | 1787.65733 | H5N4F1 |  |
| 5 | 870.3112 | 2 | 1739.61513 | 1520.57323 | H3N5 |  | 19 | 1097.3789 | 2 | 2193.75053 | 1974.74183 | H4N5F2 |  |
| 6 | 1454.4965 | 1 | 1454.49650 | 1235.44063 | H5N2 |  | 20.1 | 1097.3789 | 2 | 2193.75053 | 1974.74183 | H4N5F2 |  |
| 7 | 943.3339 | 2 | 1885.66053 | 1666.63113 | H3N5F1 |  | 20.2 | 889.7939 | 2 | 1778.58053 | 1559.54623 | H7N2 |  |
| 8 | 943.2940 | 2 | 1885.58073 | 1666.63113 | H3N5F1 |  | 21 | 1076.8618 | 2 | 2152.71633 | 1933.71523 | H5N4F2 |  |
| 9 | 922.8196 | 2 | 1844.63193 | 1625.60453 | H4N4F1 |  | 22 | 1152.3318 | 2 | 2303.65633 | 2084.67282 | H4N5F1Sulph1 HexA1 |  |
| 10 | 922.8196 | 2 | 1844.63193 | 1625.60453 | H4N4F1 |  | 23 | 1076.3463 | 2 | 2151.68533 | 1932.69483 | H5N4S1 |  |
| 11 | 922.8196 | 2 | 1844.63193 | 1625.60453 | H4N4F1 |  | 24 | 1178.3860 | 2 | 2355.76473 | 2136.79463 | H5N5F2 |  |
| 12 | 1024.3475 | 2 | 2047.68773 | 1828.68393 | H4N5F1 |  | 25 | 970.8061 | 2 | 1940.60493 | 1721.59903 | H8N2 |  |
| 13 | 808.7699 | 2 | 1616.53253 | 1397.49343 | H6N2 |  | 26 | 970.8061 | 2 | 1940.60493 | 1721.59903 | H8N2 |  |
| 14 | 808.7699 | 2 | 1616.53253 | 1397.49343 | H6N2 |  | 27.1 | 970.8061 | 2 | 1940.60493 | 1721.59903 | H8N2 |  |

**Tablica 4.2** *(Nastavak)*

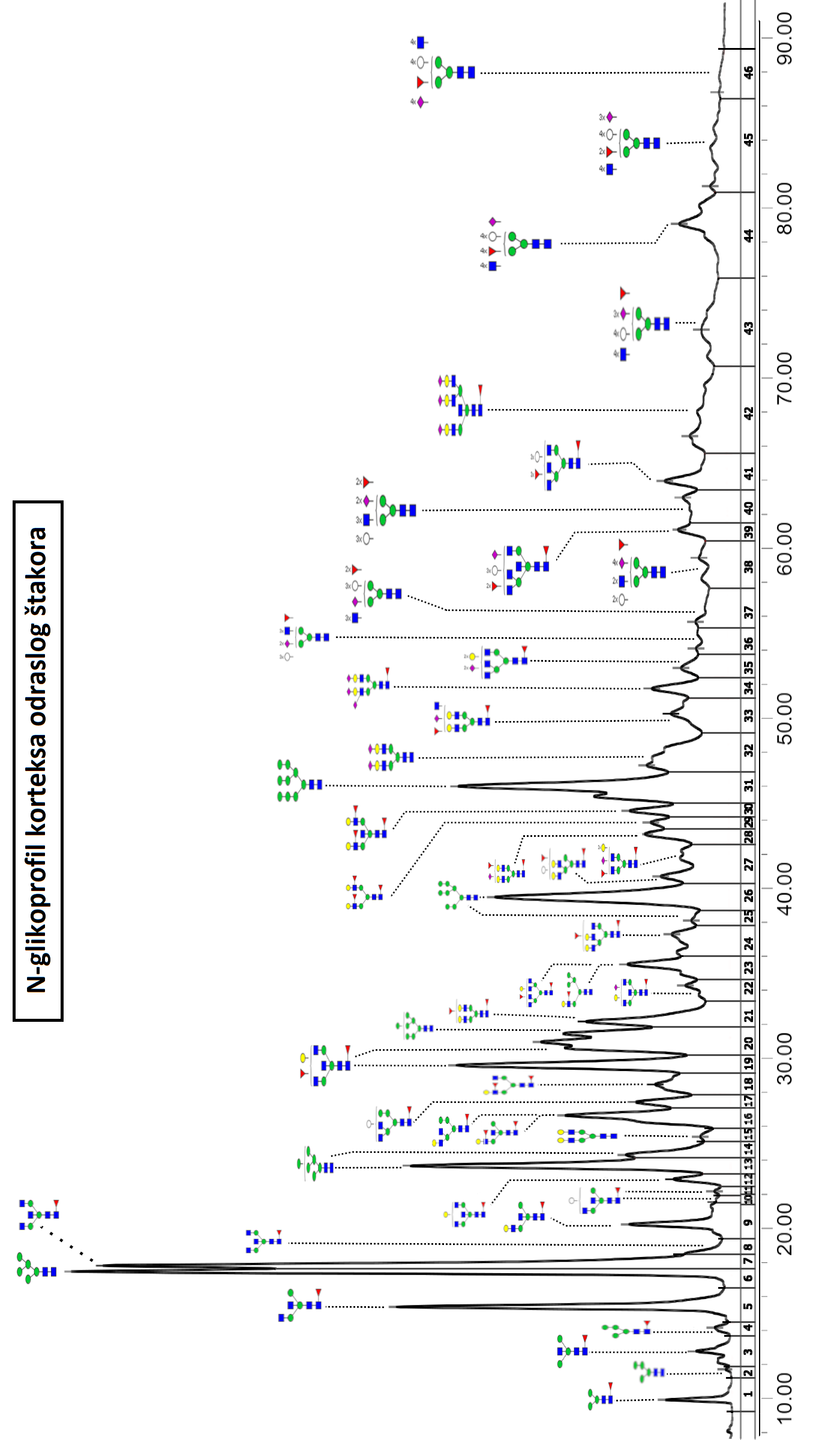
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Frakcija | Mjereni m/z | Naboj | Izračunati  [MProAH]+ (Da) | Teorijski  [MH]+ (Da) | Skraćena kompozicija | Predložena struktura | Frakcija | Mjereni m/z | Naboj | Izračunati  [MProAH]+ (Da) | Teorijski  [MH]+ (Da) | Skraćena kompozicija | Predložena struktura |
| 27.2 | 1250.8920 | 2 | 2500.77673 | 2281.83213 | H5N5F1S1 |  | 41 | 1082.3246 | 3 | 3244.95926 | 3026.07573 | H6N5F1S3 |  |
| 28 | 1222.3804 | 2 | 2443.75353 | 2224.81063 | H5N4F2S1 |  | 42 | 1107.0131 | 3 | 3319.02476 | 3100.11253 | H7N6F1S2 |  |
| 29 | 1149.8445 | 2 | 2298.68173 | 2079.77313 | H5N4F3 |  | 43 | 1204.0195 | 3 | 3610.04396 | 3391.20793 | H7N6F1S3 |  |
| 30 | 1251.4014 | 2 | 2501.79553 | 2282.85253 | H5N5F3 |  | 44 | 1301.0353 | 3 | 3901.09136 | 3682.30333 | H7N6F1S4 |  |
| 31 | 1051.7920 | 2 | 2102.57673 | 1883.65183 | H9N2 |  | 45 | 1301.0353 | 3 | 3901.09136 | 3682.30333 | H7N6F1S4 |  |
| 32 | 1050.7731 | 2 | 2100.53893 | 1881.53163 | H8N2Phos2 |  | 46 | 1374.3984 | 3 | 4121.18066 | 3902.39803 | H8N7F2S3 |  |
| 33 | 882.9471 | 3 | 2646.82676 | 2427.89003 | H5N5F2S1 |  |  | | |  |  |  |  |
| 34 | 1294.9038 | 2 | 2588.80033 | 2369.84813 | H5N4F1S2 |  |
| 35 | 931.2833 | 3 | 2791.83536 | 2572.92753 | H5N5F1S2 |  |
| 36 | 985.2994 | 3 | 2953.88366 | 2734.98033 | H6N5F1S2 |  |
| 37 | 1052.9950 | 3 | 3156.97046 | 2938.05973 | H6N6F1S2 |  |
| 38 | 1053.3208 | 3 | 3157.94786 | 2939.08013 | H6N6F3S1 |  |
| 39 | 1053.3208 | 3 | 3157.94786 | 2939.08013 | H6N6F3S1 |  |
| 40 | 1033.9791 | 3 | 3099.92276 | 2881.03823 | H6N5F2S2 |  |

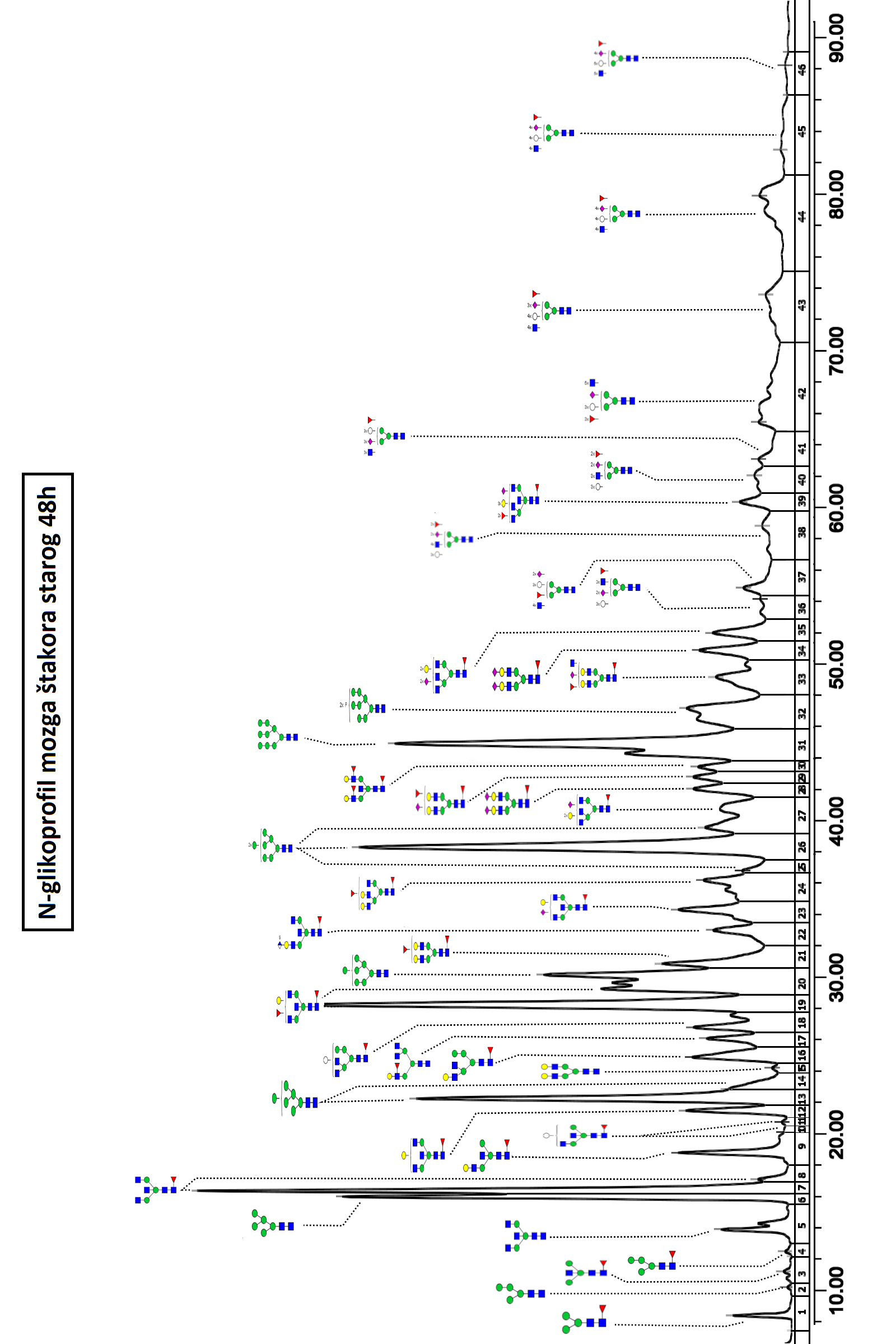
**Tablica 4.3** *Skupina 48h – pretpostavljene strukture* dominantnih kompozicija po frakcijama

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Frakcija | Mjereni m/z | Naboj | Izračunati  [MProAH]+ (Da) | Teorijski  [MH]+ (Da) | Skraćena kompozicija | Predložena struktura | Frakcija | Mjereni m/z | Naboj | Izračunati  [MProAH]+ (Da) | Teorijski  [MH]+ (Da) | Skraćena kompozicija | Predložena struktura |
| 1 | 1276.4719 | 1 | 1276.47190 | 1057.39293 | H3N2F1 |  | 15 | 930.7906 | 2 | 1860.57393 | 1641.59943 | H5N4 |  |
| 2 | 1292.4396 | 1 | 1292.43960 | 1073.38783 | H4N2 |  | 16 | 1003.8090 | 2 | 2006.61073 | 1787.65733 | H5N4F1 |  |
| 3 | 740.2431 | 2 | 1479.47893 | 1260.47233 | H3N3F1 |  | 17 | 1024.3197 | 2 | 2047.63213 | 1828.68393 | H4N5F1 |  |
| 4 | 719.7285 | 2 | 1438.44973 | 1219.44573 | H4N2F1 |  | 18 | 1003.8090 | 2 | 2006.61073 | 1787.65733 | H5N4F1 |  |
| 5 | 870.2854 | 2 | 1739.56353 | 1520.57323 | H3N5 |  | 19 | 1097.3356 | 2 | 2193.66393 | 1974.74183 | H4N5F2 |  |
| 6 | 727.7349 | 2 | 1454.46253 | 1235.44063 | H5N2 |  | 20.1 | 1097.3356 | 2 | 2193.66393 | 1974.74183 | H4N5F2 |  |
| 7 | 943.3071 | 2 | 1885.60693 | 1666.63113 | H3N5F1 |  | 20.2 | 889.7679 | 2 | 1778.52853 | 1559.54623 | H7N2 |  |
| 8 | 943.3071 | 2 | 1885.60693 | 1666.63113 | H3N5F1 |  | 21 | 1076.8330 | 2 | 2152.65873 | 1933.71523 | H5N4F2 |  |
| 9 | 922.7931 | 2 | 1844.57893 | 1625.60453 | H4N4F1 |  | 22 | 1152.3021 | 2 | 2303.59693 | 2084.67282 | H4N5F1Sulph1 HexA1 |  |
| 10 | 922.7931 | 2 | 1844.57893 | 1625.60453 | H4N4F1 |  | 23 | 1169.8479 | 2 | 2338.68853 | 2119.77933 | H4N5F1S1 |  |
| 11 | 922.7931 | 2 | 1844.57893 | 1625.60453 | H4N4F1 |  | 24 | 1178.3561 | 2 | 2355.70493 | 2136.79463 | H5N5F2 |  |
| 12 | 1024.3197 | 2 | 2047.63213 | 1828.68393 | H4N5F1 |  | 25 | 970.7789 | 2 | 1940.55053 | 1721.59903 | H8N2 |  |
| 13 | 808.7451 | 2 | 1616.48293 | 1397.49343 | H6N2 |  | 26 | 970.7789 | 2 | 1940.55053 | 1721.59903 | H8N2 |  |
| 14 | 808.7451 | 2 | 1616.48293 | 1397.49343 | H6N2 |  | 27.1 | 970.7789 | 2 | 1940.55053 | 1721.59903 | H8N2 |  |

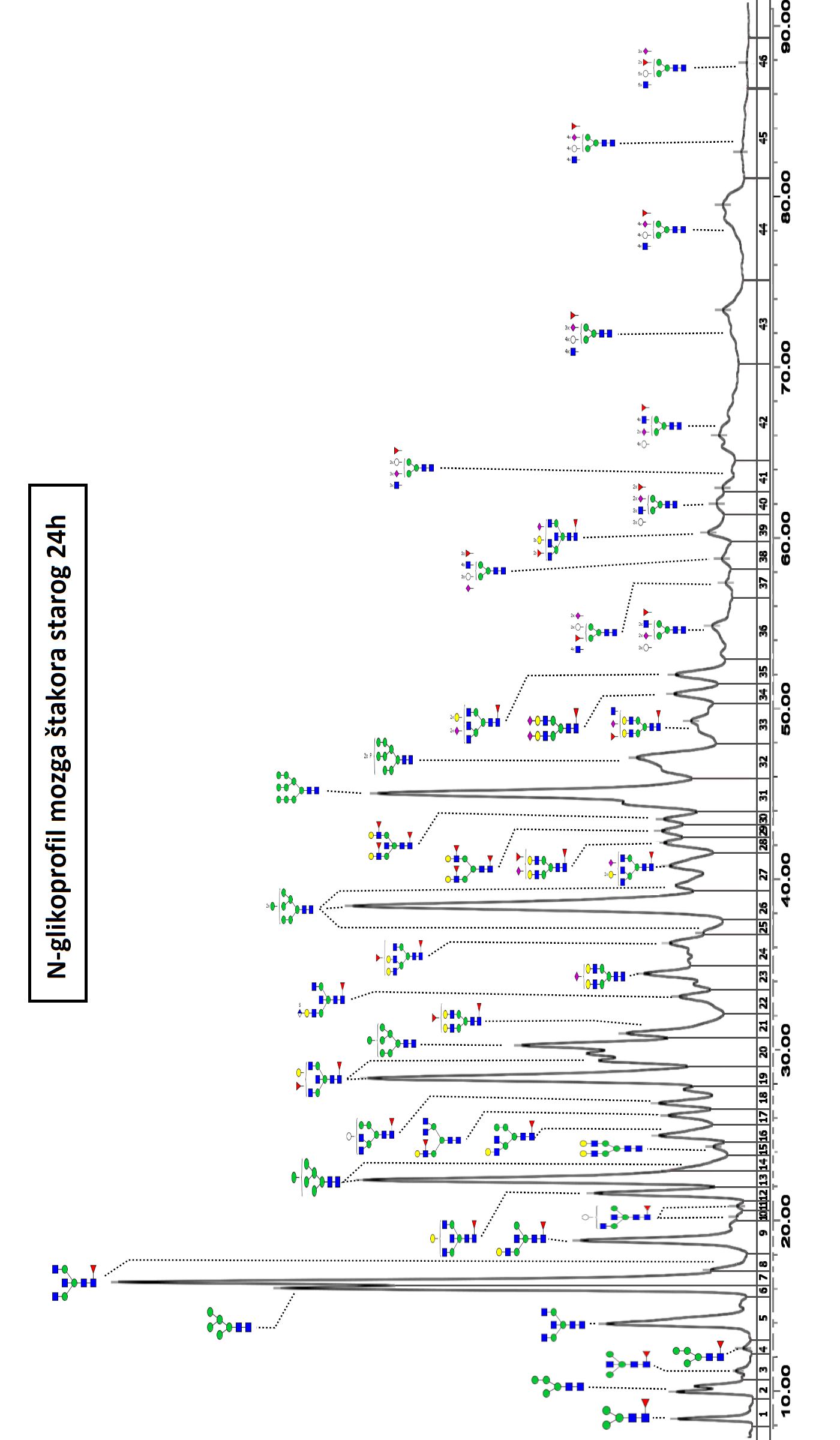
**Tablica 4.3** *(Nastavak)*

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Frakcija | Mjereni m/z | Naboj | Izračunati  [MProAH]+ (Da) | Teorijski  [MH]+ (Da) | Skraćena kompozicija | Predložena struktura | Frakcija | Mjereni m/z | Naboj | Izračunati  [MProAH]+ (Da) | Teorijski  [MH]+ (Da) | Skraćena kompozicija | Predložena struktura |
| 27.2 | 1250.8612 | 2 | 2500.71513 | 2281.83213 | H5N5F1S1 |  | 41 | 1082.2959 | 3 | 3244.87316 | 3026.07573 | H6N5F1S3 |  |
| 28 | 1294.8724 | 2 | 2588.73753 | 2369.84813 | H5N4F1S2 |  | 42 | 1120.9807 | 3 | 3360.92756 | 3142.15953 | H6N7F3S1 |  |
| 29 | 1222.3499 | 2 | 2443.69253 | 2224.81063 | H5N4F2S1 |  | 43 | 1203.9898 | 3 | 3609.95486 | 3391.20793 | H7N6F1S3 |  |
| 30 | 1251.3705 | 2 | 2501.73373 | 2282.85253 | H5N5F3 |  | 44 | 1301.0037 | 3 | 3900.99656 | 3682.30333 | H7N6F1S4 |  |
| 31 | 1051.7917 | 2 | 2102.57613 | 1883.65183 | H9N2 |  | 45 | 1301.0037 | 3 | 3900.99656 | 3682.30333 | H7N6F1S4 |  |
| 32 | 1050.7872 | 2 | 2100.56713 | 1881.53163 | H8N2Phos2 |  | 46 | 1422.6689 | 3 | 4265.99216 | 4047.43553 | H8N7F1S4 |  |
| 33 | 882.9212 | 3 | 2646.74906 | 2427.89003 | H5N5F2S1 |  |  | | |  |  |  |  |
| 34 | 1294.8568 | 2 | 2588.70633 | 2369.84813 | H5N4F1S2 |  |
| 35 | 931.2567 | 3 | 2791.75556 | 2572.92753 | H5N5F1S2 |  |
| 36 | 985.2720 | 3 | 2953.80146 | 2734.98033 | H6N5F1S2 |  |
| 37 | 1052.9667 | 3 | 3156.88556 | 2938.05973 | H6N6F1S2 |  |
| 38 | 1101.6332 | 3 | 3302.88506 | 3084.11763 | H6N6F2S2 |  |
| 39 | 1053.2925 | 3 | 3157.86296 | 2939.08013 | H6N6F3S1 |  |
| 40 | 1033.9510 | 3 | 3099.83846 | 2881.03823 | H6N5F2S2 |  |

**Slika 4.2** Anotirani kromatogram*: HILIC-UPLC N-glikoprofil korteksa odraslog štakora*



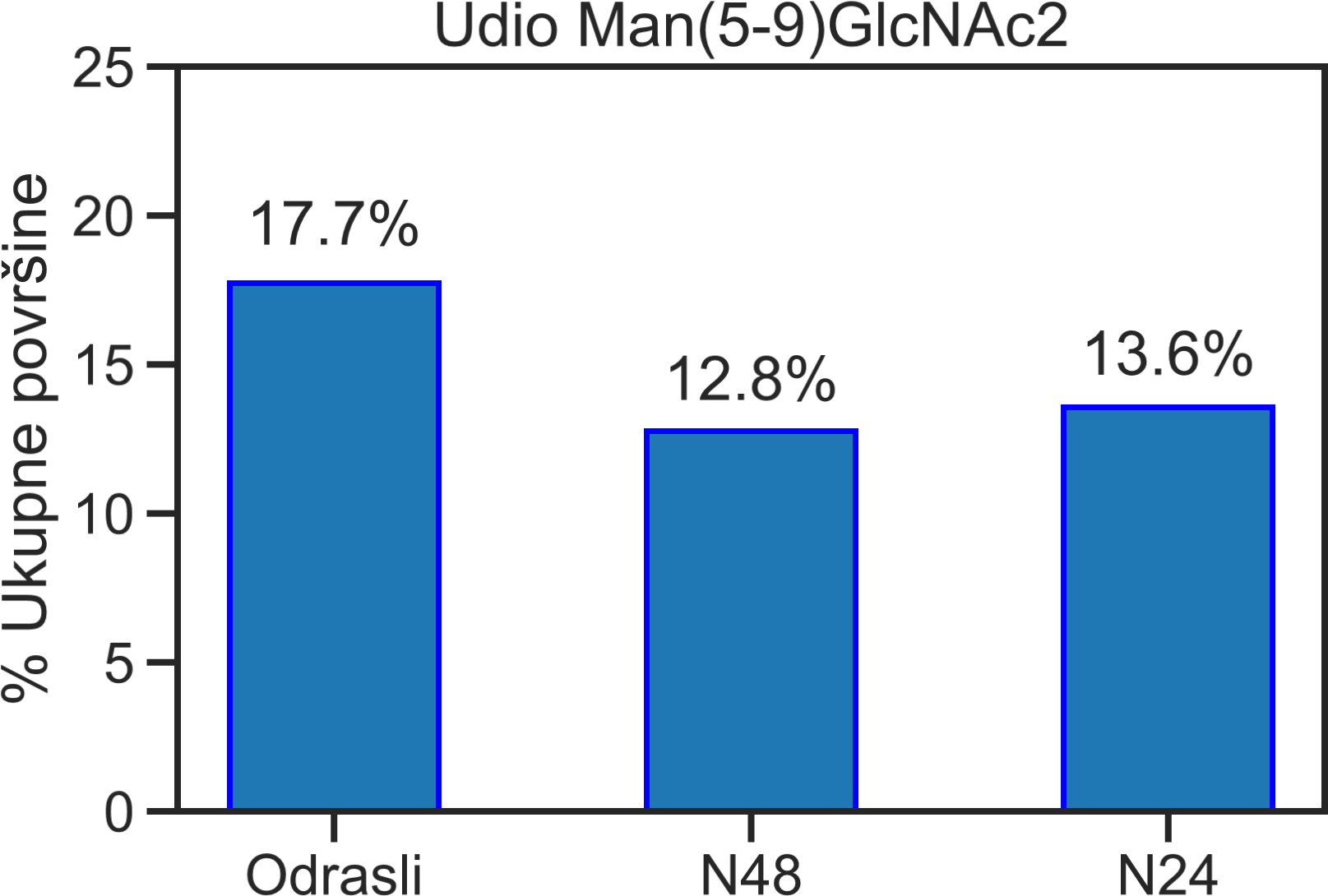
**Slika 4.3** Anotirani kromatogram*: HILIC-UPLC N-glikoprofil mozga štakora starog 48h*



**Slika 4.3** Anotirani kromatogram*: HILIC-UPLC N-glikoprofil mozga štakora starog 24h*

**4.2 Rasprava**

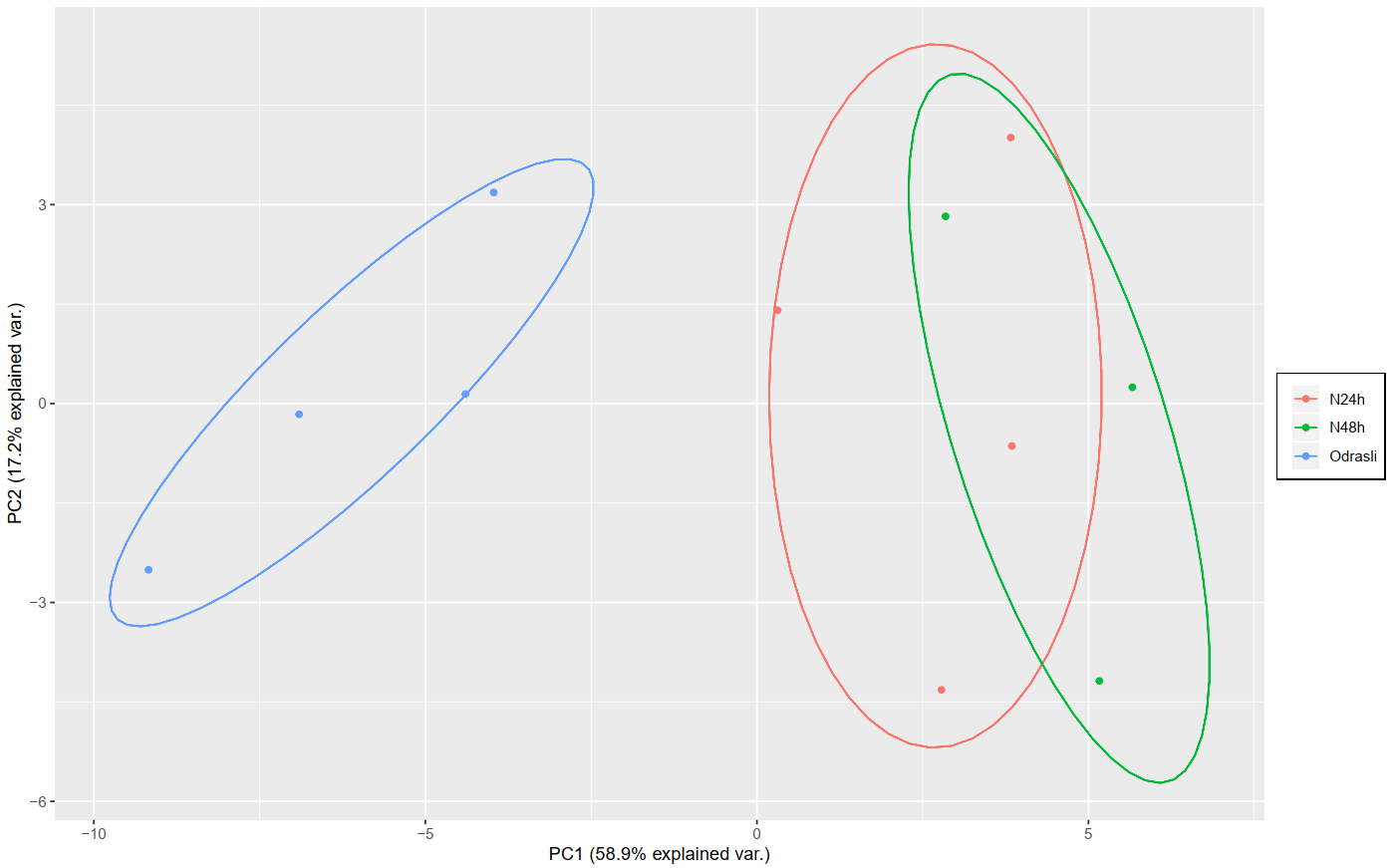
**4.2.1 Udio oligomanoznih struktura**

Relativno visok udio oligomanoznih struktura predstavlja jednu od glavnih karakteristika N-glikoprofila mozga. Pregledom literature utvrđeno je da se koncentracija oligomanoznih (Man(5-9)GlcNAc2) struktura iznosi oko 15% ukupnih N-glikana mozga (Chen i sur, 1997). Udio oligomanoznih struktura u profilu svake skupine uzoraka u ovom istraživanju slaže se s ovom činjenicom. **Slika 4.4** prikazuje stupičasti dijagram ukupnog udjela oligomanoznih struktura u N-glikoprofilu pojedinog uzorka.

**Slika 4.4**  Udio oligomanoznih Man(5-9)GlcNAc2 struktura u pojenim skupinama

Posebno su zanimljiva činjenica da se udio navedenih struktura u mozgu odraslih jedinki statistički značajno (p < 0.025, korigirano prema *Bonferroniju*) razlikuje od udjela u mlađim jedinkama (***p* = 0.00991 za *skupinu 24h*, *p* = 0.00847 za *skupinu 48h***). Ovaj rezultat može ukazivati na važnost oligomanoznih u neurološkihm procesima, no zbog prirode istraživanja (dostupne informacije odnose se isključivo na N-glikane, a ne na N-glikoproteine) nije moguće raspraviljati o specifičnim implikacijama ovog rezultata. Također, u ovom slučaju nije moguće isključiti čimbenik vremena – postoji mogućnost da je potrebno određeno vrijeme nakon rođenja jedinke za uspostavu normalne razine oligomanoznih struktura mozga, posebice u korteksu mozga.

**4.2.2 Rezultati analize glavne komponente**

Postupak analize glavne komponente (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) izvršen je na *log2-transformiranim* vrijednostima površina dobivenih integracijom HILIC-UPLC-FLR kromatograma. PCA je operacija redukcije dimenzionalnosti podataka koja se u širem smislu koristi uklanjanjem dimenzija koje su visoko korelirane. Grafički prikaz rezultata daje **Slika 4.5**.

**Slika 4.5** Grafički prikaz rezultata PCA. Ističe se razdvajanje skupine odraslih uzoraka (plavo) od skupina koje sačinjavaju mlade životinje (24h – zeleno, 48h - narančasto). Pojedini uzorak označen je točkom pripadajuće boje, a skupina je istaknuta elipsom pripadajuće boje.

U ovom slučaju rezultati PCA zbog specifičnosti grupiranja (**Slika 4.5**) mogu upućivati na postojanje razlika među ispitivanim skupinama - čak i pri malom broju dostupnih uzoraka očito je razdvajanje odraslih od mladih jedinki - no iz ovih rezultata nije moguće utvrditi što čini razliku među ispitivanim skupinama. Iz navedenih razloga ovaj rezultat treba, u najboljem slučaju, smatrati tek sugestivnim.

24

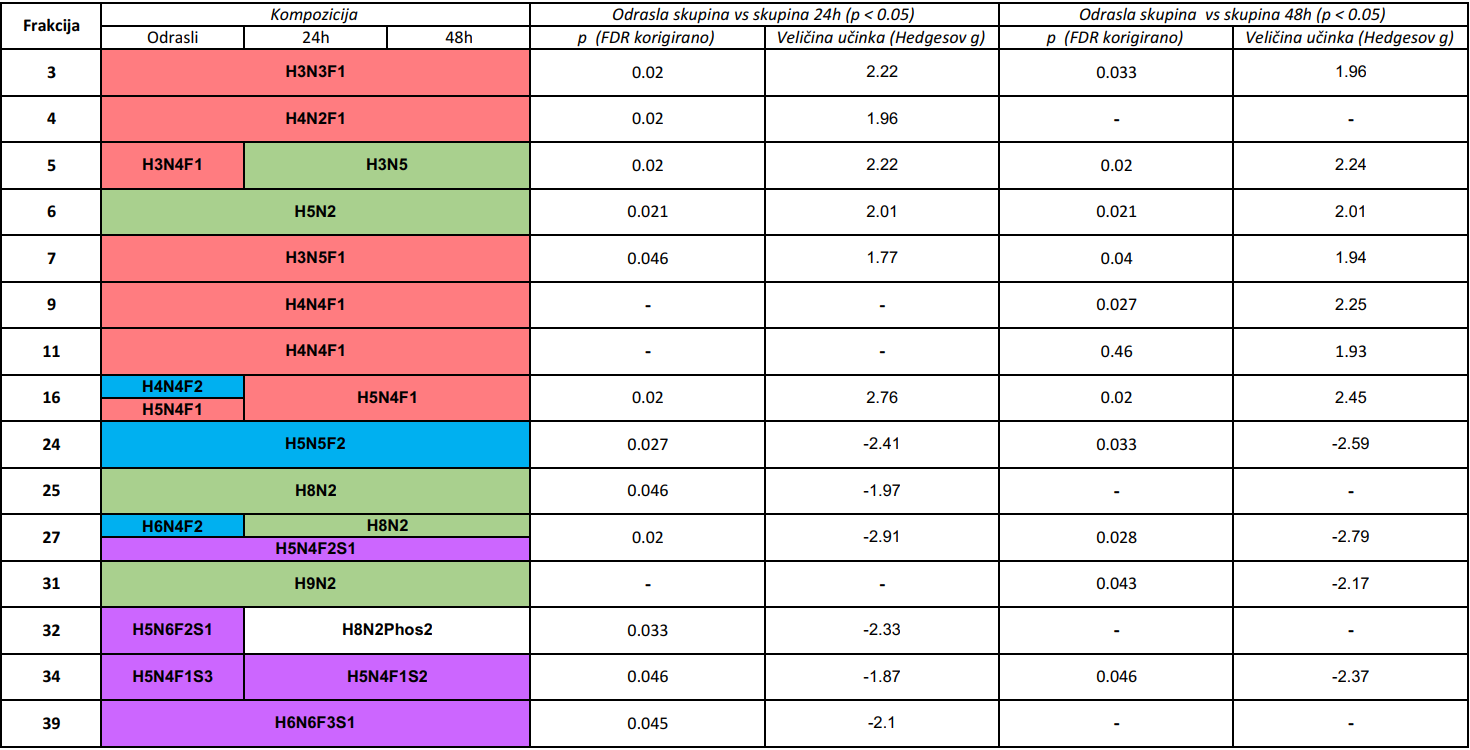
48

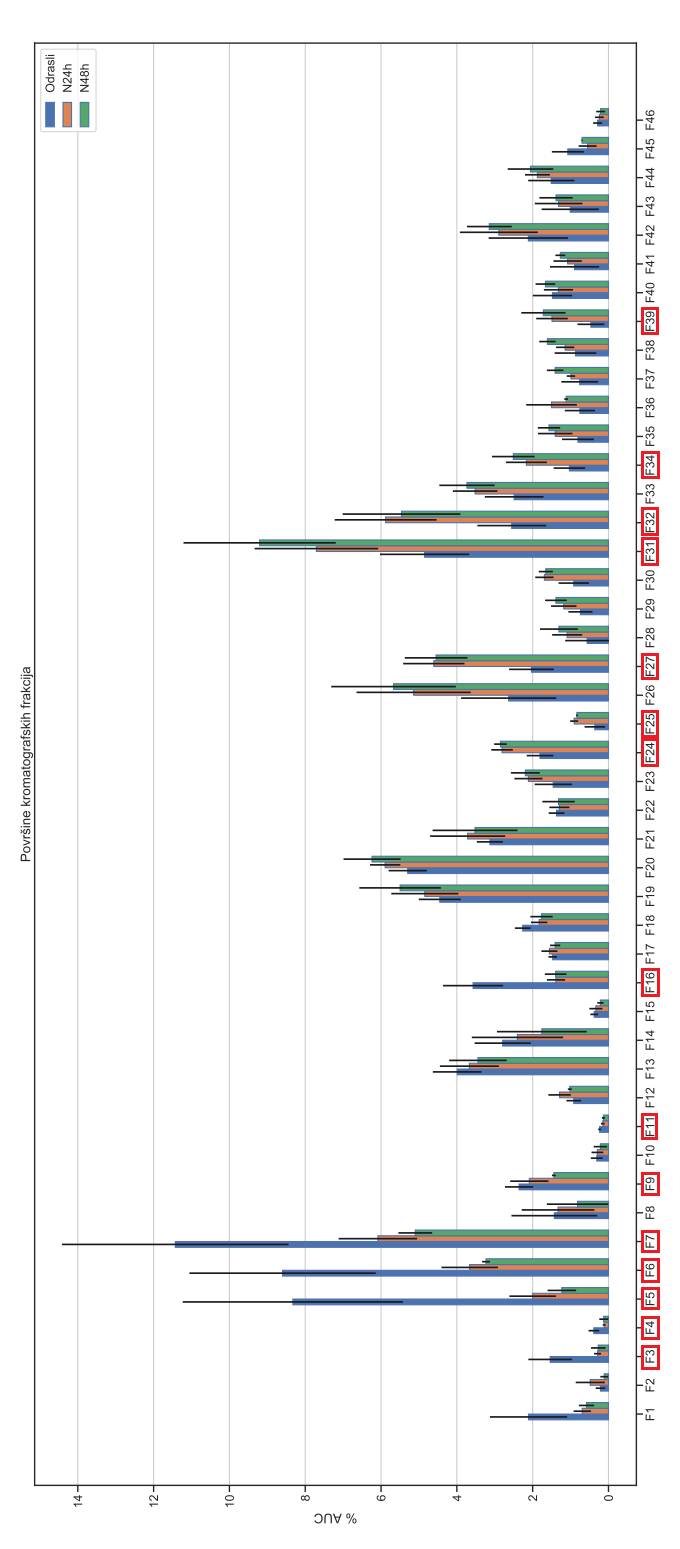
**4.2.3 Statistički značajne razlike između skupina**

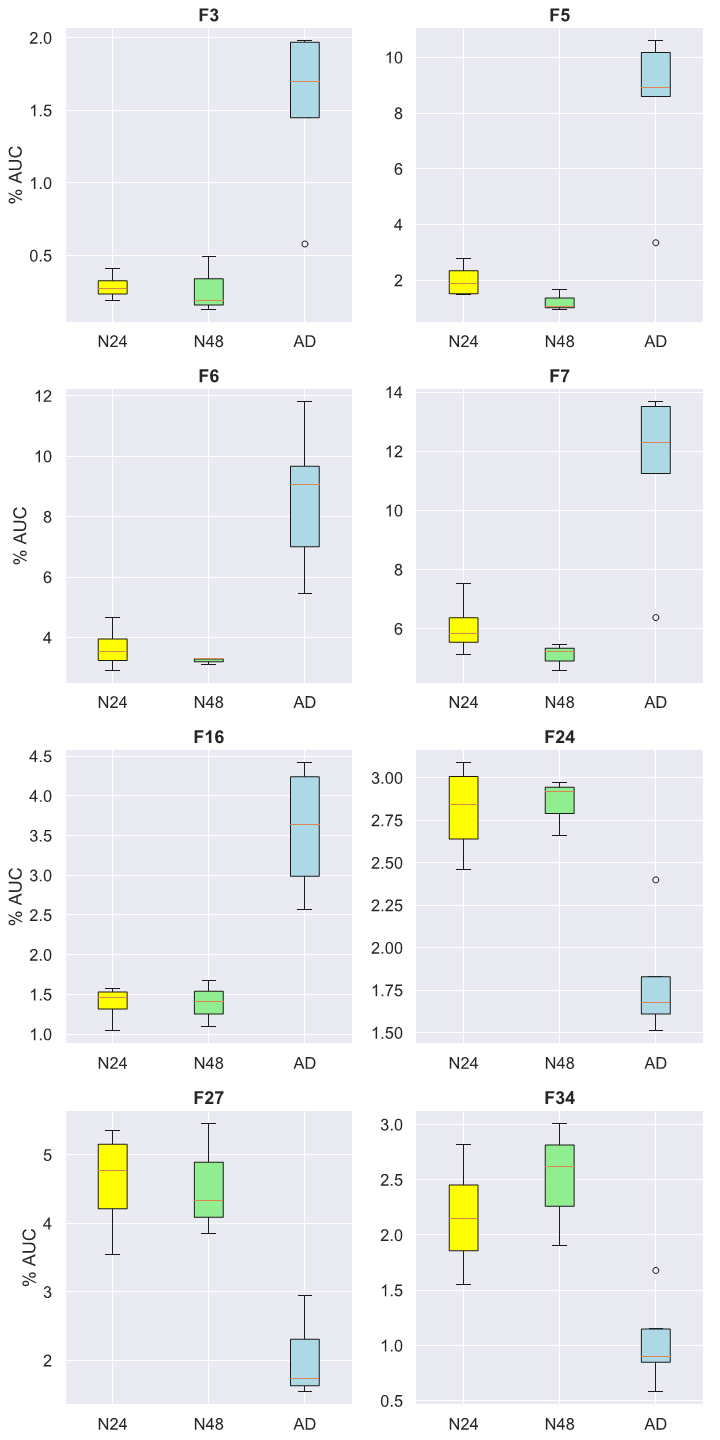
**Slika 4.6** prikazuje stupičaste dijagrame udjela pojedine frakcije u ukupnoj površini ispod krivulje kromatograma za sve tri skupine uzoraka. Ovakav prikaz može pojednostaviti tumačenje razultata. Frakcije za koje je utvrđena statistički značajna razlika uokvirene su crvenom bojom.

Utvrđivanje statistički značajnih razlika između skupina izvršeno je na *log2-transformiranim* vrijednostima površina dobivenih integracijom HILIC-UPLC-FLR kromatograma pomoću *T-testova* (dvostrani, nezavisni). Uspoređivane su površine svake pojedinačne frakcije (46 frakcija) između *odrasle skupina*  i *skupine 24h*  te *odrasle skupine*  i *skupine 48h*. Za korekciju rezultata višestrukih testiranja (engl. *Multiple Testing Correction)* korištena je metoda *lažne stope otkrića* (engl. *False Discovery Rate,* FDR).

Rezultati ukazuju na statistički značajne razlike između *odrasle skupine* i *skupine 24h* u frakcijama: 3, 4, 5, 6, 7, 16, 24, 25, 27, 32, 34 i 39 (ukupno 12); između *odrasle skupine* i *skupine 48h* u frakcijama: 3, 5, 6, 7, 9, 11, 16, 24, 27, 31, 34 (ukupno 11). Frakcije statistički značajno različite za obje skupine ispitivanja su: 3, 5, 6, 7, 16, 24, 27, 34 (ukupno 8). **Tablica 4.4** prikazuje statistički značajno različite frakcije između skupina uzoraka. Zbog malog broja uzoraka važno je *veličinu učinka* razmatrati s rezervom. *Hedgesova g* vrijednost prikazuje omjer razlike srednjih vrijednosti mjerenja i ukupne standardne devijacije mjerenja, korigirano za mali broj uzoraka (korištena formula nalazi se u dodatku).

**Tablica 4.4** Statistički značajno različite frakcije između uzoraka. Negativan predznak *veličine učinka* znači da je srednja vrijednost pojedine frakcije veća u *skupini 24h* i *skupini 48h*, pozitivan predznak označava veće vrijednosti u *odrasloj skupini. Veličina učinka* odnosi se na standardiziranu razliku srednjih vrijednosti frakcija po skupinama. Crvenom bojom označene su kompozicije koje sadržavaju sržnu Fuc, zelenom oligomanozne, plavo strukture s antenarnom i sržnom Fuc, bijelo fosforilirane strukture, ljubičasto strukture s jednom ili više Neu5Ac.

**Slika 4.6** Površine kromatografskih frakcija predstavljene kao stupičasti dijagrami. Statistički značajno različite frakcije označene su uokvirene su crvenom bojom.



**Slika 4.7** Kutijasti dijagrami statistički značajno različitih frakcija između skupina. Frakcije su označene s F uz pripadajući broj frakcije. N24 – *skupina 24h* (žuto), N48 – *skupina 48h* (zeleno), AD – *odrasla skupina* (plavo).

Frakcije koje su se pokazale statistički značajno razlite između *odrasle skupine* i *skupine 24h*  te *odrasle skupine i skupine 48h* pomnije su analizirane. Pregledom rezultata (**Tablica 4.4**) utvrđeno je da u frakcijama 3, 5, 6, 7, 24, 27 dolazi do promjene količine dominantne komponente u frakciji između skupina, dok u frakcijama 5, 16, 27 i 34 osim do promjene količine N-glikana (iskazano površinom ispod krivulje) dolazi i do promjene u relativnom omjeru komponenti u frakciji. Rezultati nalažu da se u frakciji 5 u *odrasloj skupini* kao dominantna struktura nalazi kompozicija N-glikan *H3N4F1* (kompleksni tip sa sržnom fukozom), dok u *skupini 24h* i *skupini 48h* dominira N-glikan kompozicije *H3N5* (kompleksni tip). U frakciji 16 u *odrasloj skupini*  dvije su kompozicije N-glikana prisutne u približno jednakom omjeru: *H4N4F2* (kompleksni tip) *i H5N4F1* (kompleksni tip)*,*  dok u *skupini 24h* i *skupini 48h dominira* kompozicija *H5N4F1* (kompleksni tip)*.* U frakciji 27 postoje dvije dominantne strukture u svakoj od skupina. U *odrasloj skupini* postoji podjednak udio kompozicija *H6N4F2* (kompleksni tip) i *H5N4F2S1* (kompleksni, antenarno sijaliziran), dok u *skupini 24h* i *skupini 48h* dominiraju strukture *H8N2 (oligomanozni tip) i H5N4F2S1* (kompleksni, antenarno sijaliziran). U frakciji 34 u *odrasloj skupini* dominantna je kompozicija *H5N4F1S3* dok je u *skupini 24h* i *skupini 48h* dominantna kompozicija *H5N4F1S2. (SLIKA OMJERA KOPOZICIJA IZ MS)*

Ovi rezultati ukazuju na moguće razvojne ili funkcionalne uloge gorenavedenih kompozicija N-glikana u normalnom razvoju tkiva mozga. Moguće je da, budući da profil glikozilacije ovisi o velikom broju čimbenika – uključujući i dob jedinke, neke od ovih struktura mogu igrati ulogu u normalnom razvoju tkiva mozga štakora te da prilikom sazrijevanja jedinke može doći do promjene relativnih udjela pojedinih kompozicija u ukupnom neuroglikomu. Iz ovdje dostupnih podataka nije moguće pojedinoj kompoziciji pripisati određenu ulogu niti ju je moguće spariti s određenim proteinom ili skupinom proteina. Također, nedostatak ovog ispitivanja je mala količina uzoraka po skupinama što može negativno utjecati na statističke rezultate i dovesti do krivih zaključaka, no na taj čimbenik vrlo je teško utjecati zbog teškoća u nabavi ovog tipa tkiva i načina rukovanja. Osim toga, zbog male količine tkiva (u smislu mase) u *skupini 24h* i *skupini 48h* korišteni su cijeli cerebrum mozga jedinke, dok je u *odrasloj skupini* korišten isključivo korteks mozga.

**5. Zaključci**

Uzorci u ovom kratkom istraživanju uključivali se korteks mozga odraslih jedinki štakora te mozgove (cerebrum) mladih jedinki postnatalne starosti 24 i 48 sati. Nakon pripreme uzorka, slobodni N-glikani obilježeni prokainamidom analizirani su HILIC-UPLC-ESI-MS/MS metoome opisanom u poglavlju *Materijali i metode*. Rezultati kromatografske analize podijeljeni su u 46 različitih frakcija, a svakoj frakciji upotrebom masenih spektara kvalitativno je određen sastav N-glikana (kompozicija) koja je upotpunjena analizom fragmentacijskih spektara, ukoliko je taj podatak bio dostupan. Identificirane su ukupno 83 različite kompozicije kroz 3 skupine uzoraka. Od 46 frakcija, ukupno 15 frakcija (3, 4, 5, 6, 7, 16, 24, 25, 27, 32, 34 i 39 između *odrasle skupine* i *skupine 48h*  - ukupno 12; 3, 5, 6, 7, 9, 11, 16, 24, 27, 31 i 34 između *odrasle skupine* i *skupine 48h* - ukupno 11) pokazalo se različitima na statistički značajan način. Broj prisutnih N-glikanskih struktura u mozgu štakora vjerojatno je značajno veći od 83 navedene kompozicije, no zbog male količine dostupnog tkiva, metode pripreme i malog volumena injekcije pri *on-line* analizi masenom spektrometrijom potpuna informacija o bogatstvu struktura ovog tipa tkiva nažalost nije dobivena. Slikovni prikazi kompozicija predstavljaju samo *predložene strukture*, one strukture koje bi navedena kompozicija mogla zauzeti s određenim stupnjem sigurnosti, sudeći prema poznatim putevima biosinteze N-glikana u endoplazmatskoj mrežici i Golgijevom aparatu. Za potpunu informaciju o strukturi potrebno je koristiti moćnije tehnike kao što je ESI u negativnom načinu rada čime bi se ostvarila značajno veća vjerojatnost fragmentacije unutar prstena monosaharida koji čine određenu kompoziciju, što je moguće iskoristiti za inferenciju konfiguracije pojedinih veza unutar molekule N-glikana.

Zbog prirode *glikomičkih* pokusa dobivene informacije odnose se isključivo na profile slobodnih N-glikana otpuštenih s glikoproteina PNG-azom F i obilježenih fluoroforom. Odvajanjem N-glikana od glikoproteina za koje ranije bili vezani gubi se veliki dio smislene cjeline interakcija pojedinih glikoproteina i njihove uloge u fiziološkom funkcioniranju pojedinog organa – u ovom slučaju mozga. Osim toga, izgubljena je informacija o bogatstvu glikoformi pojedinih proteina. Ovi rezultati prije svega su sugestivne prirode, a mogu služiti kao dobra osnova za buduća kompleksnija i iscrpnija istraživanja koja trebaju uključivati *glikomički* i *glikoproteomički* pristup analizi.