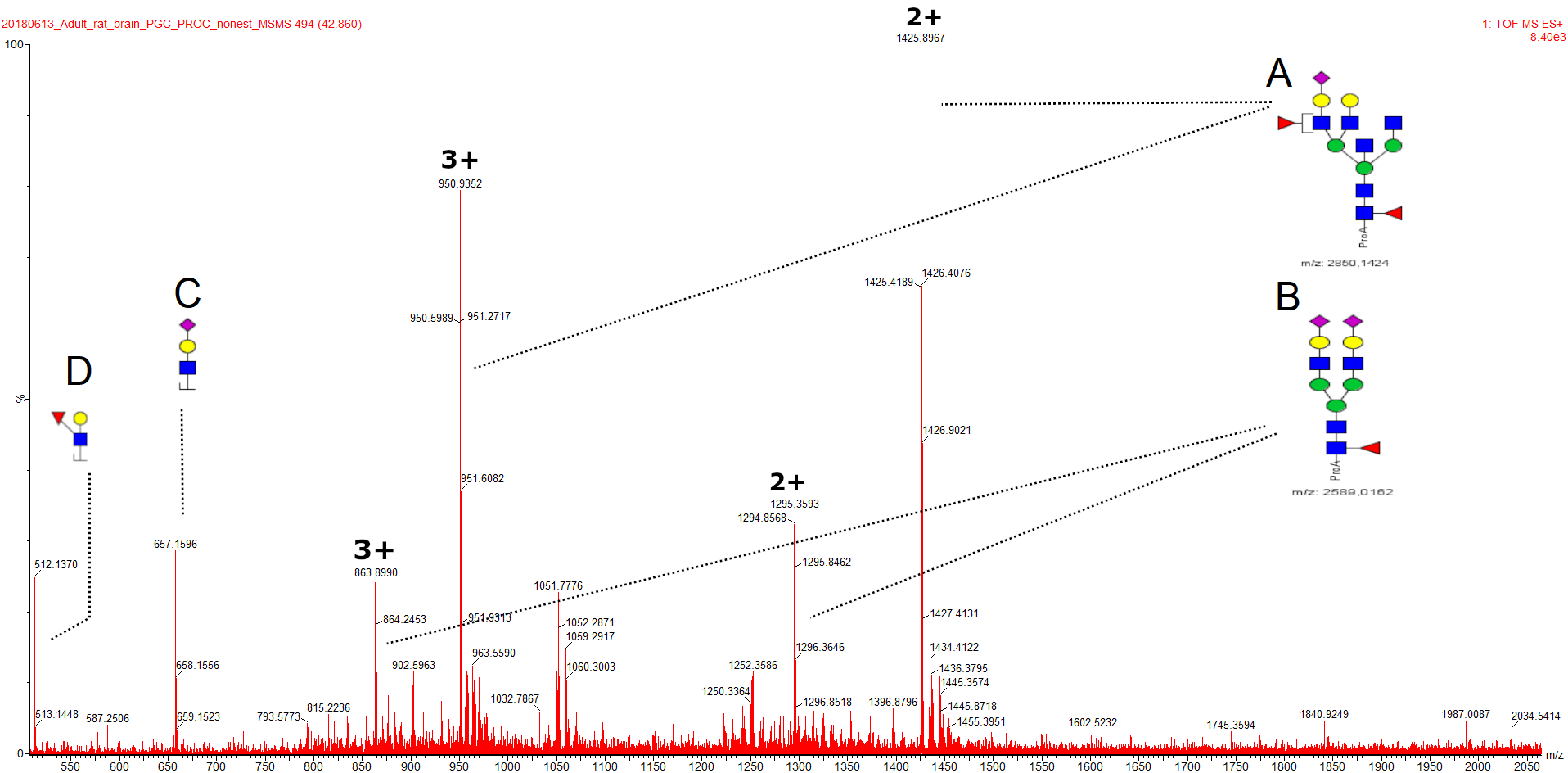
**4. Rezultati i rasprava**

**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.

Prilikom analize masenih spektara (MS1) ustanovljeno je da se molekule N-glikana pojavljuju kao jednostruko, dvostruko, trostruko i u rijetkim slučajevima kao četverostruko nabijene specije (*M(Da) >* 3500) što se odražava na pripadnu vrijednost *m/z*. U nekim slučajevima, osobito ukoliko se radi o kompozicijama koje sadržavaju NeuAc uočena je fragmentacija unutar izvora iona masenog spektrometra (engl. *In-source fragmentation)*. **Slika 4.1** daje reprezentativan primjer masenog spektra razine MS1.

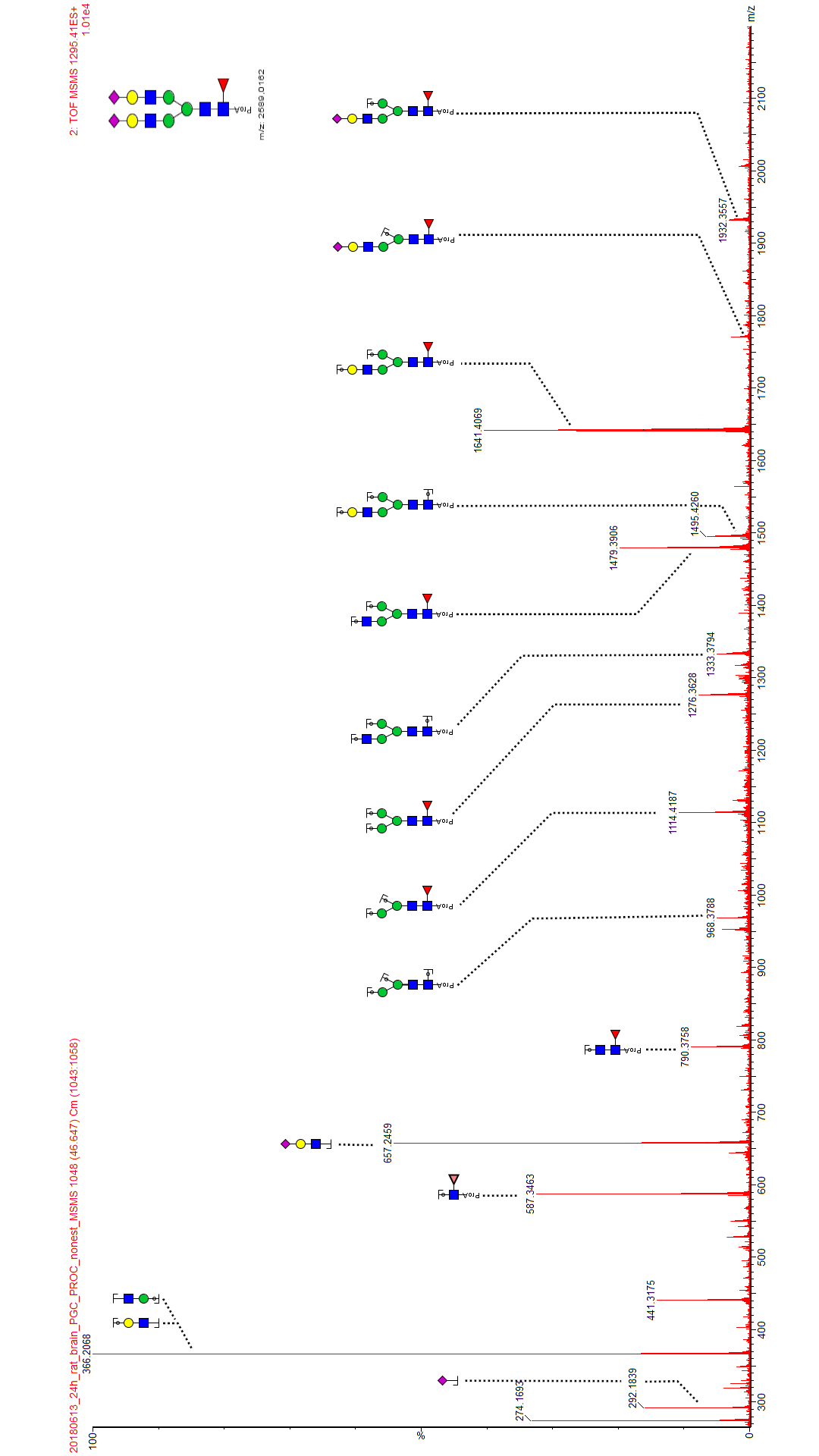
**Slika 4.1** Primjer masenog spektra razine MS1*.* **A:** *kompozicija H5N6F2S1 ([MProaH]+= 2850.14) – linije pokazuju na 2+ i 3+ nabijene ionske specije dane kompozicije.* **B:** *kompozicija H5N4F1S2 ([MProAH]+= 2589.0162) – linije pokazuju na 2+ i 3+ nabijene specije dane kompozicije.* **C:** *fragment m/z = 657.1596 (H1N1S1).* **D:** *fragment m/z = 512.13770. Fragmenti pod C i D upućuju na „in-source“ fragmentaciju kompozicija pod A i/ili B*

**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 4.2** daje primjer anotacije fragmentacijskog spektra dobivenog u ESI(+) načinu rada. U gornjem desnom kutu prikazana je moguća struktura navedene kompozicije 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.

Ukupno je identificirano 87 kompozicija (jedna kompozicija može se pojaviti u više prostornih struktura, odnosno u više frakcija), od čega: 9 oligomanoznih (Man3-9GlcNAc2), 6 fosoforiliranih, 2 sulfatirane, 67 fukoziliranih (antenarno i/ili sržno), 1 kompozicija s heksuronskom kiselinom te 41 kompozicija sa jednom ili više sijalinskih kiselina. Fragmentacijski spektri nisu bili dostupni 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 kompozicijama su uz broj dodijeljena slova abecednim redom (npr. 16a ili 27.1a ukoliko frakcija sadrži više vršaka s više različitih kompozicija. **Slike 4.3, 4.4, 4.5** 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 kompozicije **H5N4F1S2** *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** | **1614.44832** | **1395.37323** | **H5N2Phos2** |  | **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** |  | **36** | **985.27200** | **3** | **2953.80146** | **2734.98033** | **H6N5F1S2** |  |
| **27.1** | **969.75940** | **2** | **1938.51152** | **1719.47883** | **H7N2Phos2** |  | **37** | **936.92490** | **3** | **2808.76016** | **2589.94283** | **H6N5F2S1** |  |
| **27.2** | **1250.84570** | **2** | **2500.68413** | **2281.83213** | **H5N5F1S1** |  | **38** | **1057.61650** | **3** | **3170.83496** | **2952.03893** | **H5N4F1S4** |  |
| **28** | **1222.33500** | **2** | **2443.66273** | **2224.81063** | **H5N4F2S1** |  | **39** | **1053.29250** | **3** | **3157.86296** | **2939.08013** | **H6N6F3S1** |  |
| **29** | **1149.84450** | **2** | **2298.68173** | **2079.77313** | **H5N4F3** |  | **40** | **1033.93700** | **3** | **3099.79646** | **2881.03823** | **H6N5F2S2** |  |
| **30** | **1251.35510** | **2** | **2501.70293** | **2282.85253** | **H5N5F3** |  | **41** | **937.25890** | **3** | **2809.76216** | **2590.96323** | **H6N5F4** |  |
| **31** | **1051.79200** | **2** | **2102.57673** | **1883.65183** | **H9N2** |  | **42** | **1149.96290** | **3** | **3447.87416** | **3229.15513** | **H6N6F1S3** |  |
| **32** | **1425.41900** | **2** | **2849.83073** | **2630.96943** | **H5N6F2S1** |  | **43** | **1203.98930** | **3** | **3609.95336** | **3391.20793** | **H7N6F1S3** |  |
| **33** | **882.90830** | **3** | **2646.71036** | **2427.89003** | **H5N5F2S1** |  | **44** | **1155.97880** | **3** | **3465.92186** | **3247.19083** | **H7N6F4S1** |  |
| **34a** | **912.25800** | **3** | **2734.75946** | **2515.90603** | **H5N4F2S2** |  | **45** | **1252.65220** | **3** | **3755.94206** | **3537.26583** | **H7N6F2S3** |  |
| **34b** | **960.59500** | **3** | **2879.77046** | **2660.94353** | **H5N4F1S3** |  | **46** | **1301.00370** | **3** | **3900.99656** | **3682.30333** | **H7N6F1S4** |  |
| **34c** | **1294.85680** | **2** | **2588.70633** | **2369.84813** | **H5N4F1S2** |  |  | | |  |  |  |  |
| **34d** | **902.26860** | **3** | **2704.79126** | **2485.93193** | **H5N6F3** |  |
| **35** | **931.27000** | **3** | **2791.79546** | **2572.92753** | **H5N5F1S2** |  |

**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 | 807.7650 | 2 | 1614.54623 | 1395.37323 | H5N2Phos2 |  | 27.1 | 969.7594 | 2 | 1938.51152 | 1719.47883 | H7N2Phos2 |  |

**Tablica 4.2** *(Nastavak)*

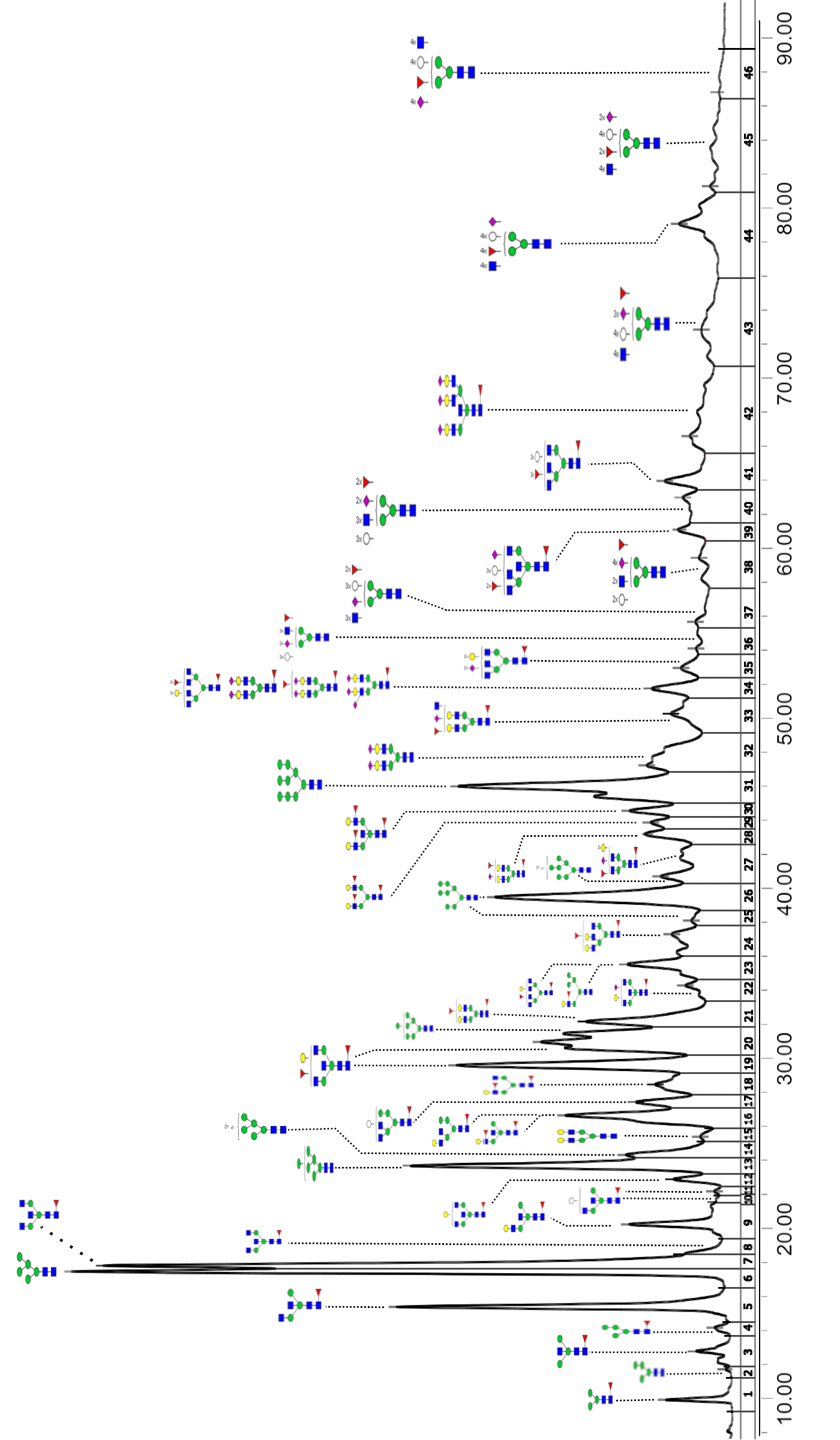
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Frakcija | Mjereni m/z | Naboj | Izračunati  [MProAH]+ (Da) | Teorijski  [MH]+ (Da) | Skraćena kompozicija | Predložena struktura | Frakcija | Mjereni m/z | Naboj | Izračunati  [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

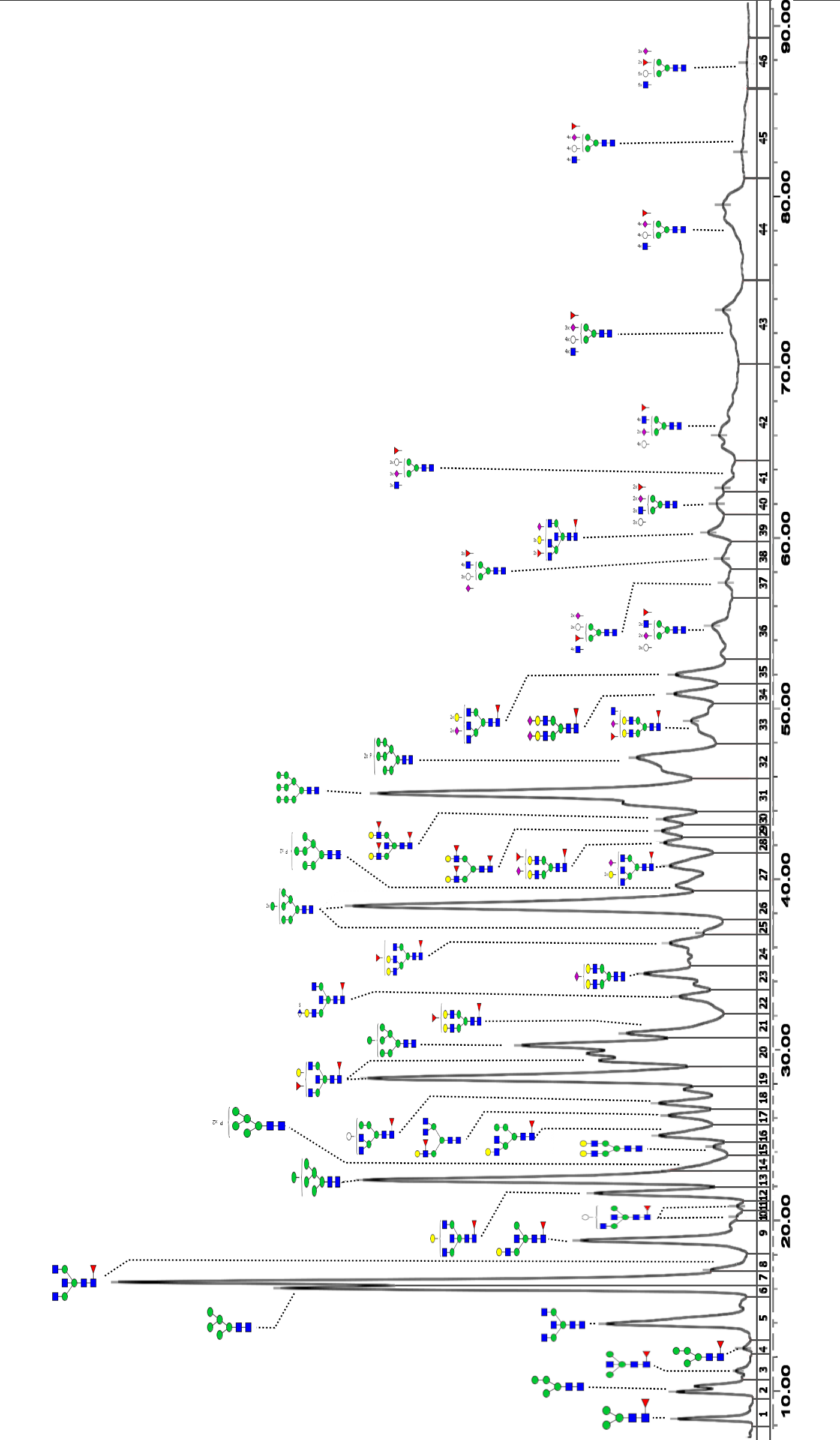
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Frakcija | Mjereni m/z | Naboj | Izračunati  [MProAH]+ (Da) | Teorijski  [MH]+ (Da) | Skraćena kompozicija | Predložena struktura | Frakcija | Mjereni m/z | Naboj | Izračunati  [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 | 807.7402 | 2 | 1614.47312 | 1395.37323 | H5N2Phos2 |  | 27.1 | 969.7720 | 2 | 1938.53672 | 1719.47883 | H7N2Phos2 |  |

**Tablica 4.3** *(Nastavak)*

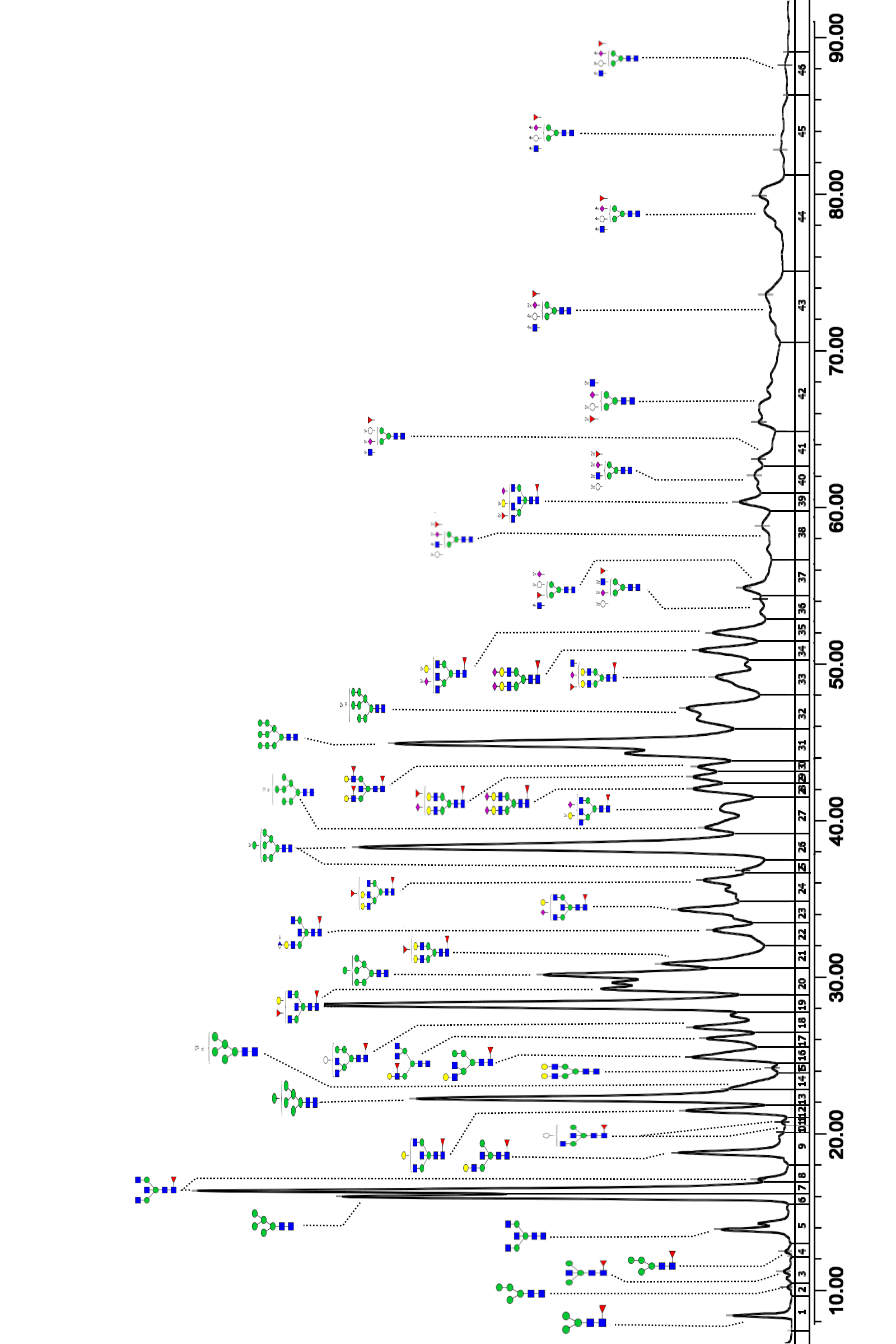
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Frakcija | Mjereni m/z | Naboj | Izračunati  [MProAH]+ (Da) | Teorijski  [MH]+ (Da) | Skraćena kompozicija | Predložena struktura | Frakcija | Mjereni m/z | Naboj | Izračunati  [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*

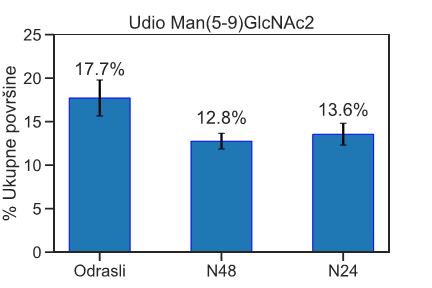
****

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



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

**4.1.2 Udio oligomanoznih struktura**

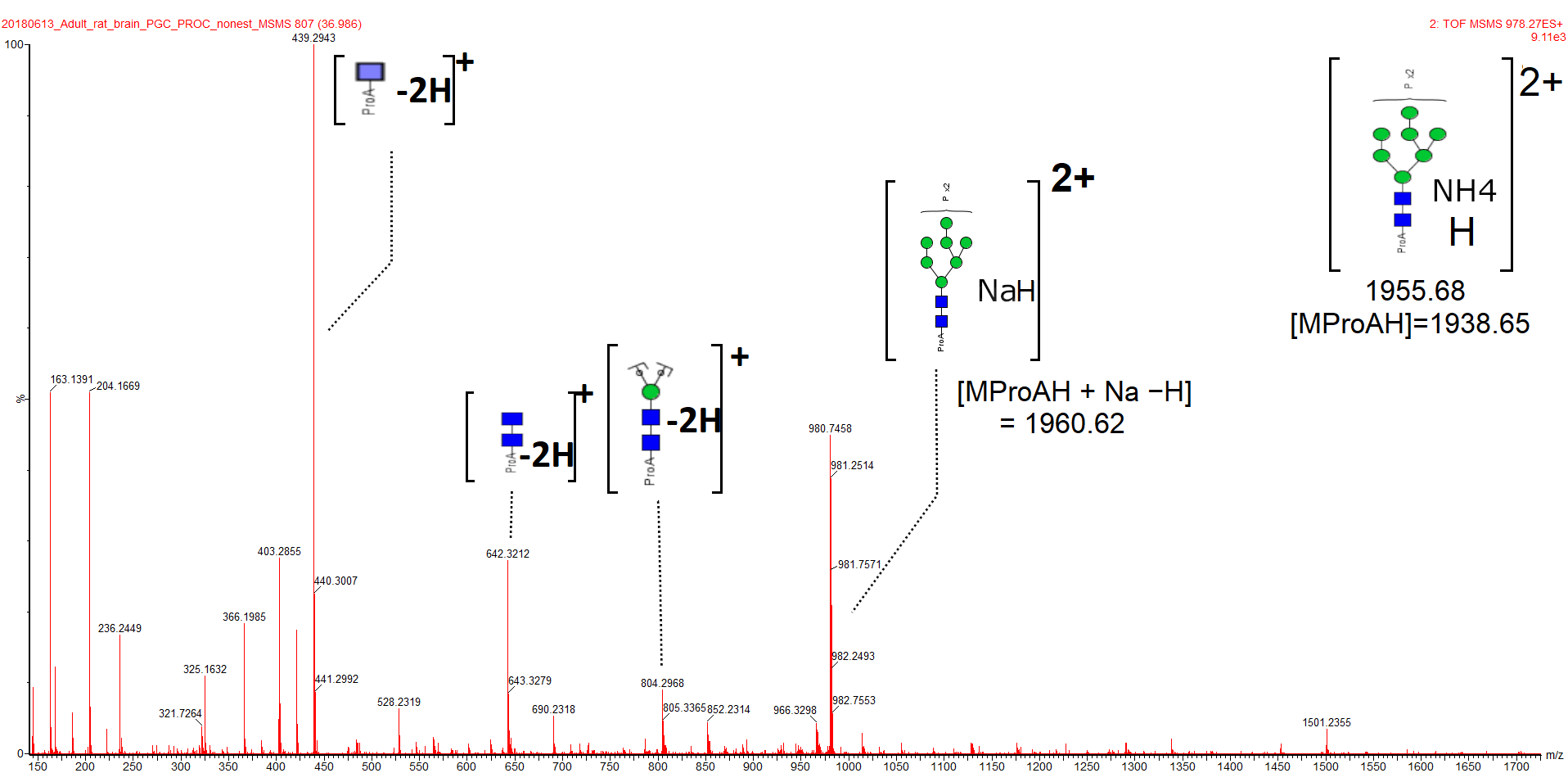
Relativno visok udio oligomanoznih struktura jedna je od glavnih karakteristika N-glikoprofila mozga. Pregledom literature utvrđeno je da se koncentracija oligomanoznih (Man(5-9)GlcNAc2) struktura iznosi oko 15% ukupnih N-glikana mozga (Chen i sur, 1997). Udio oligomanoznih struktura u profilu svake 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

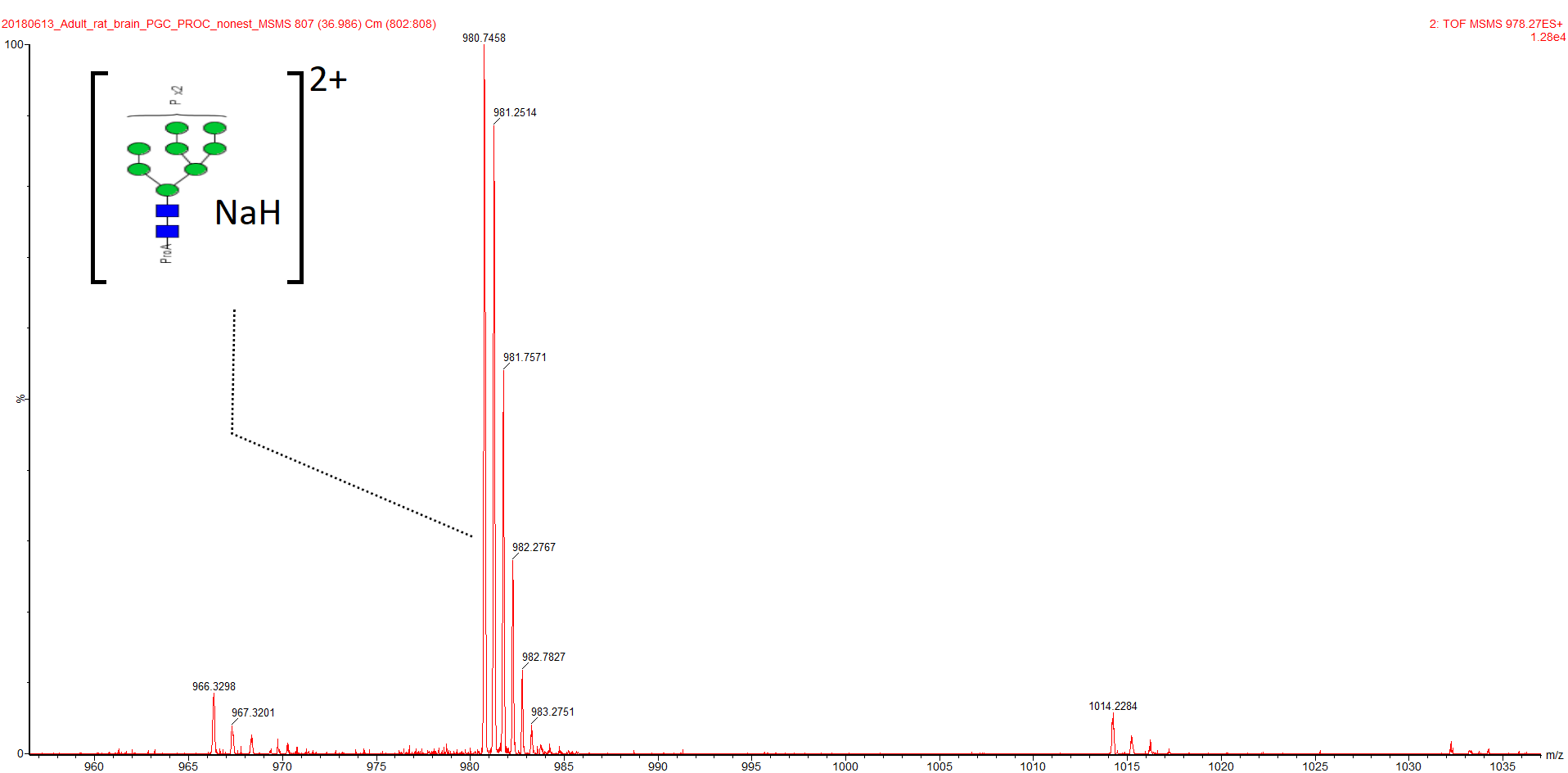
Posebno su zanimljiva činjenica da se udio navedenih struktura u mozgu odraslih jedinki statistički značajno (p < 0.025, korigirano prema *Bonferroniju*) razlikuje od udjela u mlađim jedinkama (***p* = 0.00991 za *skupinu 24h*, *p* = 0.00847 za *skupinu 48h***). Ovaj rezultat može ukazivati na važnost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

**4.1.3 Specifičnosti fosforiliranih N-glikana pri sudarom izazvanoj disocijaciji (CID)**

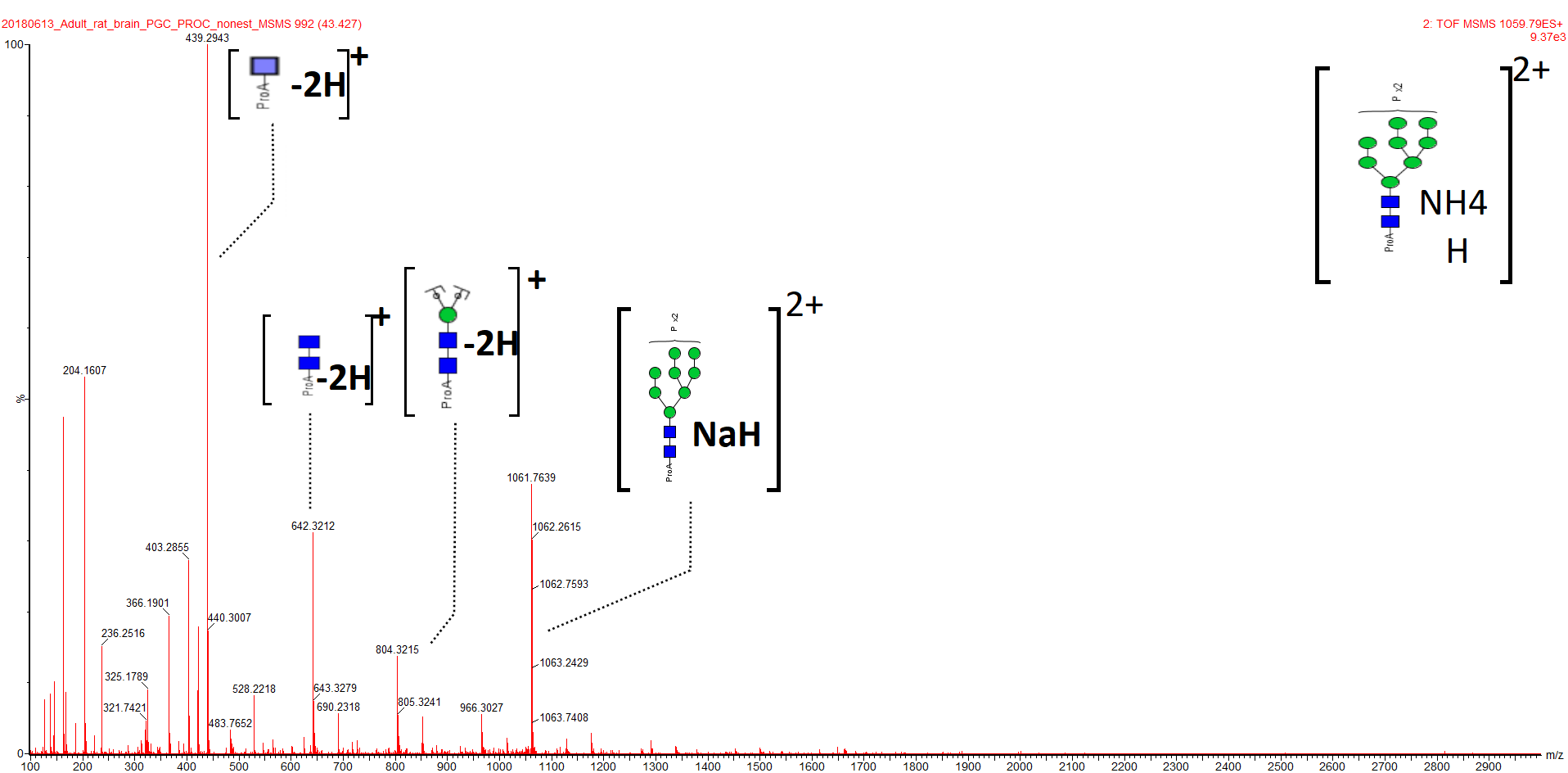
Molekule koje su prema *Glycomod* mrežnom alatu svojim *m/z* vrijednostima odgovarale fosforiliranim N-glikanima pokazivale su određene specifičnosti vidljive u fragmentacijskim spektrima. Naime, kod ovih kompozicija primijećena je *reakcija neutralne izmjene* jednog ili više protona fosfatne skupine jednakim brojem iona natrija ili kalija. Ova reakcija ne mijenja stanje naboja molekule, a opisana je u (Khoo i Yu, 2010). Osim toga, primijećena je sklonost asociranju ovih molekula s NH4+ ionima (mobilna faza sadrži NH4COOH 50mM). Pri proučavanju fragmentacijskih spektara uočeno je nekoliko anomalija koje mogu ometati analizu i dovesti do krivih zaključaka o strukturi (ili čak kompoziciji molekule). **Slike 4.5, 4.6, 4.7** Prikazuju primjer fragmentacijskih spektara kontroverznih molekula. Iz slika je vidljivo da neki od fragmenata koji sadrže vezani fluorofor (prokainamid) pokazuju gubitak mase od 2 Da, što je se može smatrati ekvivalentom dva atoma vodika. Usto, vidljiva je velika količina nefragmentirane molekule u stanju naboja 2+ koja prema izračunima odgovara nefragmentiranoj molekuli koja je vezala dodatni Na. Prema (Harvey, 2000) fragmentacija unutar prstena pri uvjetima ESI(+) mogu se pojaviti uz uporabu prokainamida kao fluorofora, međutim gubitak od 2 Da (ekvivalent 2 H) nije naveden kao jedan od rezultata. Moguće je da se ova pojava javlja uslijed nedovoljno prilagođene razine kolizijske energije za ovaj tip molekula. Također, valjda spomenuti da fosforilirani glikani oligomanoznog tipa pri kromatografskoj analizi obično eluiraju nedugo nakon oligomanoznih glikana njima vrlo bliske mase (Tablice 4.1, 4.2, 4.3 – frakcije 26 i 27.1 kao primjer) gdje je razlika unutar 1-2 Da, stoga nije moguće sa potpunom sigurnošću isključiti fragmentaciju oligomanoznih glikana unutar izvora iona (gubitak ekvivalenta 2 H) zbog nedovoljno prilagođenih uvjeta pri analizi masenim spektrometrom. U svim rezultatima prikazanim u ovom radu, kontroverzne kompozicije koje opisuje ovo poglavlje smatrane su fosforiliranima.



**Slika 4.5** Fragmentacijski spektar fosforilirane strukture. *Fragmenti 439.294, 642.3212, 804.2968 su za 2 Da lakši od očekivanih masa prisutnih u spektrima ostalih molekula. 980.7458 – velika količina nefragmentirane molekule s dodatnim vezanim Na+ (***Slika 4.6** *daje uvećani prikaz).*

****

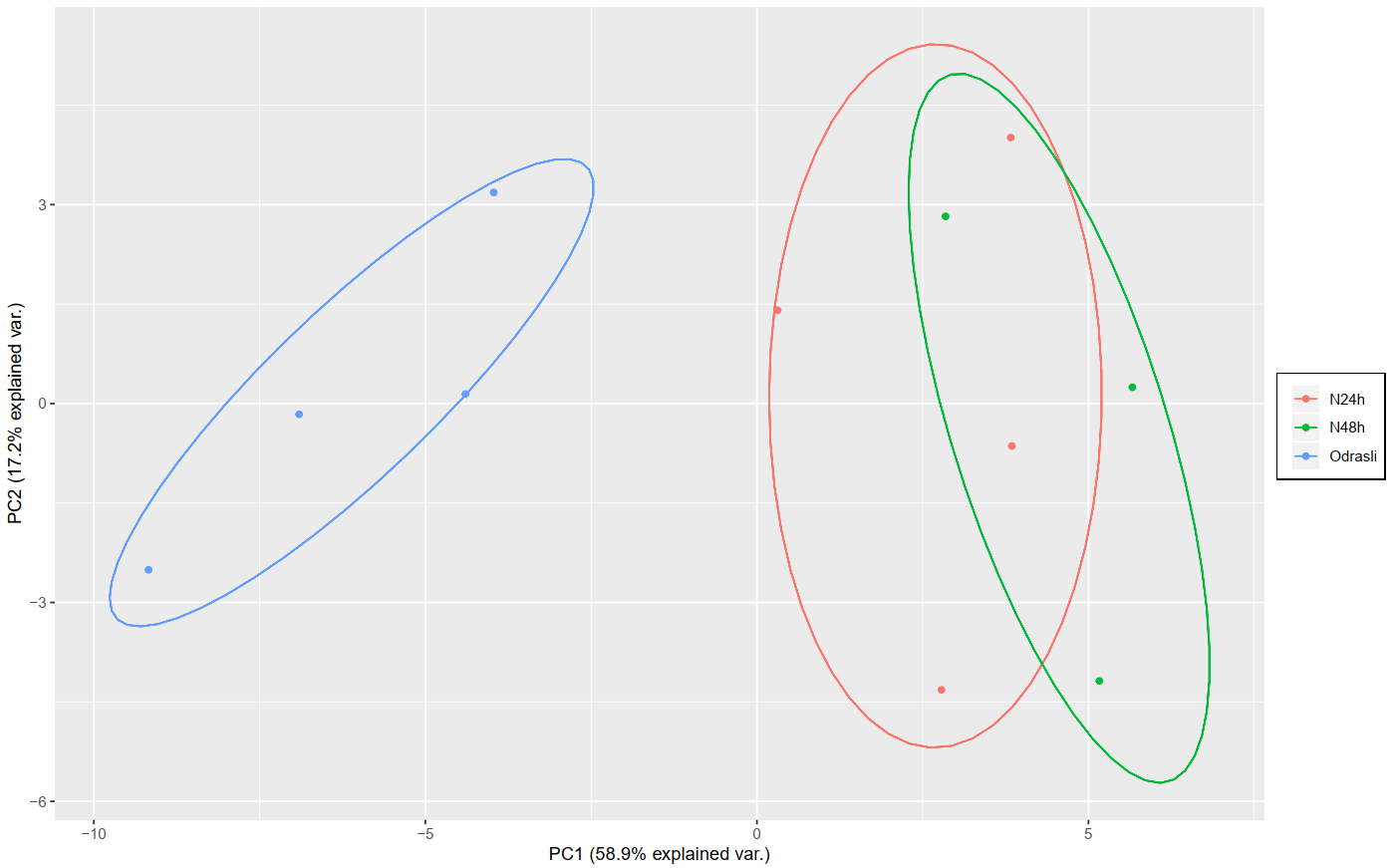
**Slika 4.6** Uvećani prikaz *m/z = 980.7458 ([MProAHNa]2+)*

****

**Slika 4.7** Dodatni primjer kontroverzne strukture. *Problematika je jednaka onoj opisanoj na* **slici 4.5**.

**4.2 Rasprava**

**4.2.1 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 4.8**.

**Slika 4.8** 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 4.8**) 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

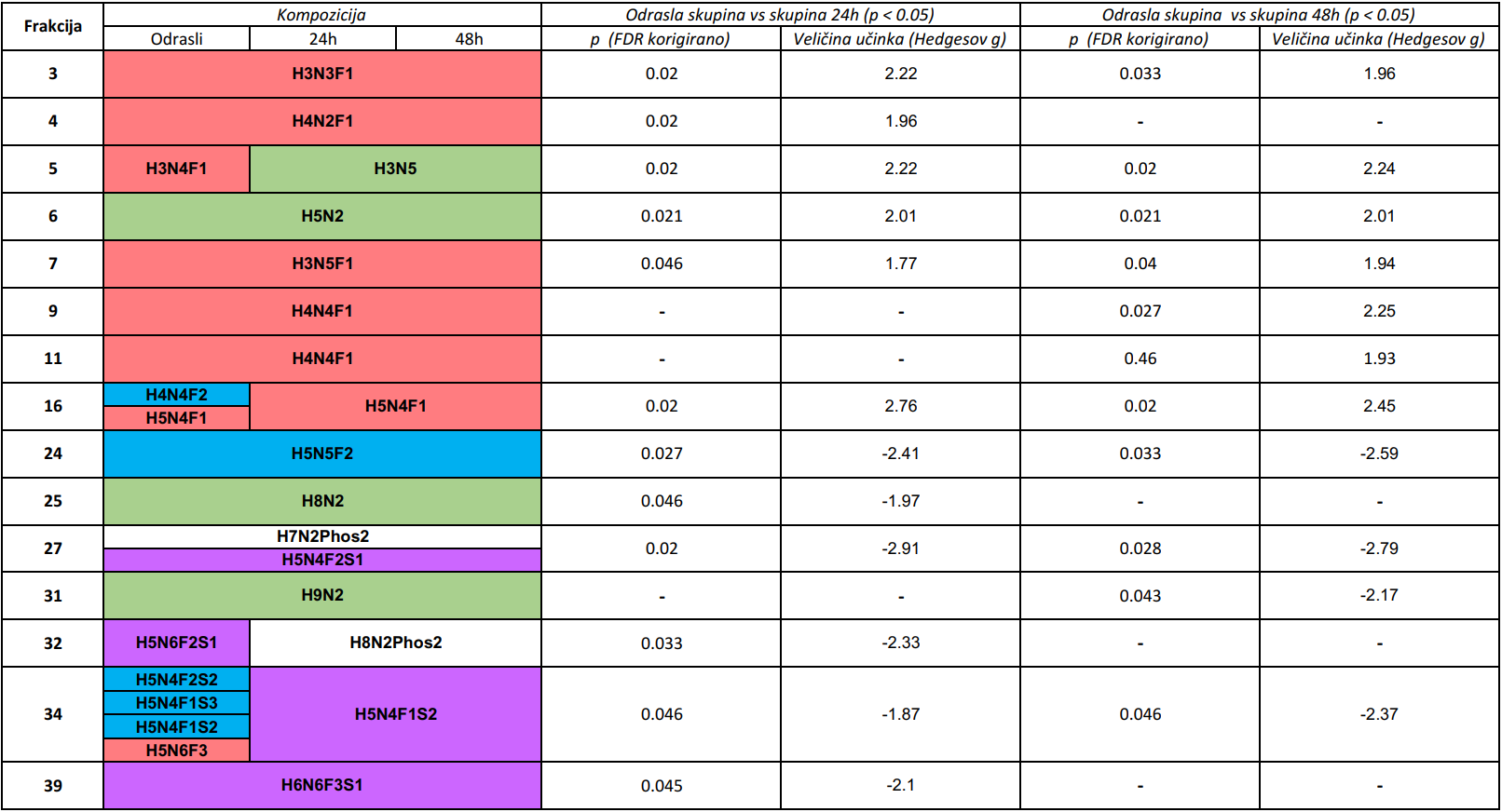
**4.2.2 Statistički značajne razlike između skupina**

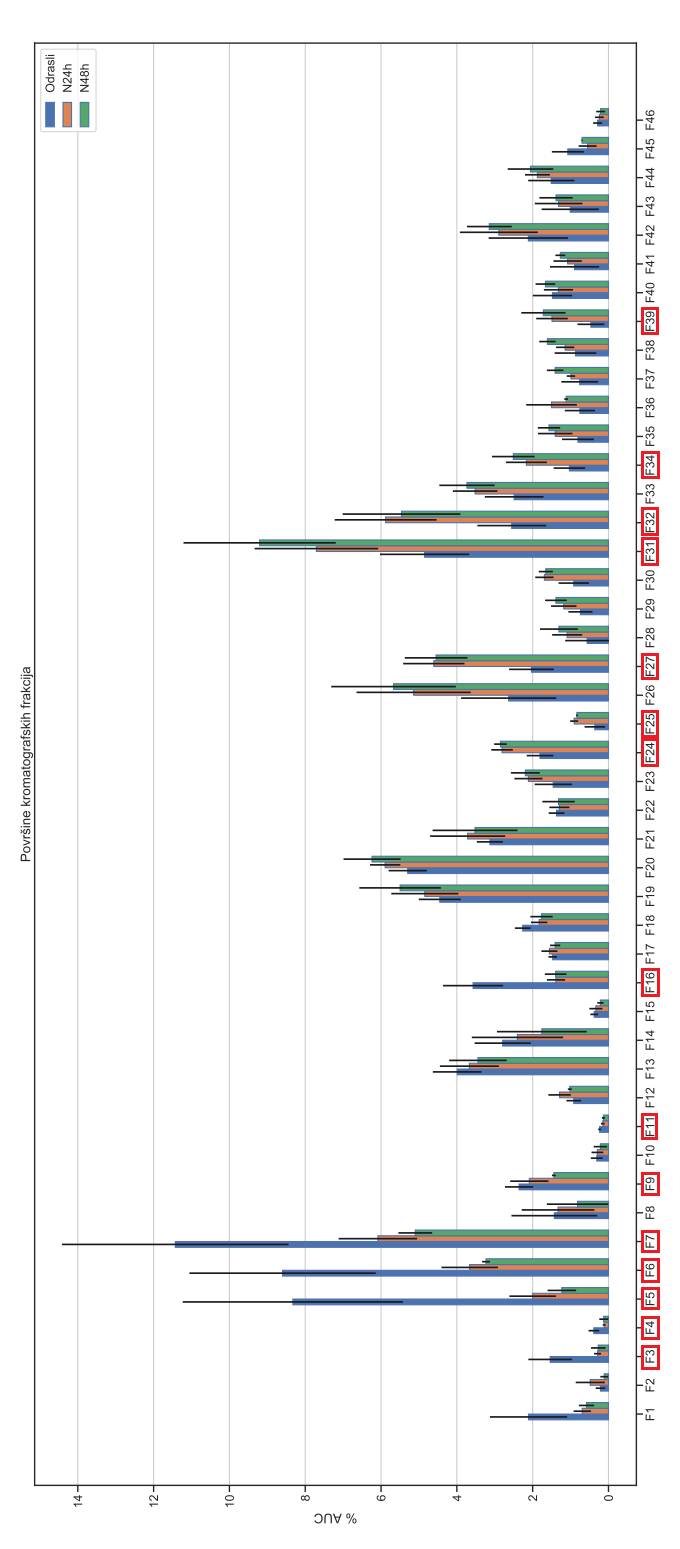
**Slika 4.9** prikazuje stupičaste dijagrame udjela pojedine frakcije u ukupnoj površini ispod krivulje kromatograma za sve tri skupine uzoraka. Ovakav prikaz može pojednostaviti tumačenje razultata. Frakcije za koje je utvrđena statistički značajna razlika uokvirene su crvenom bojom.

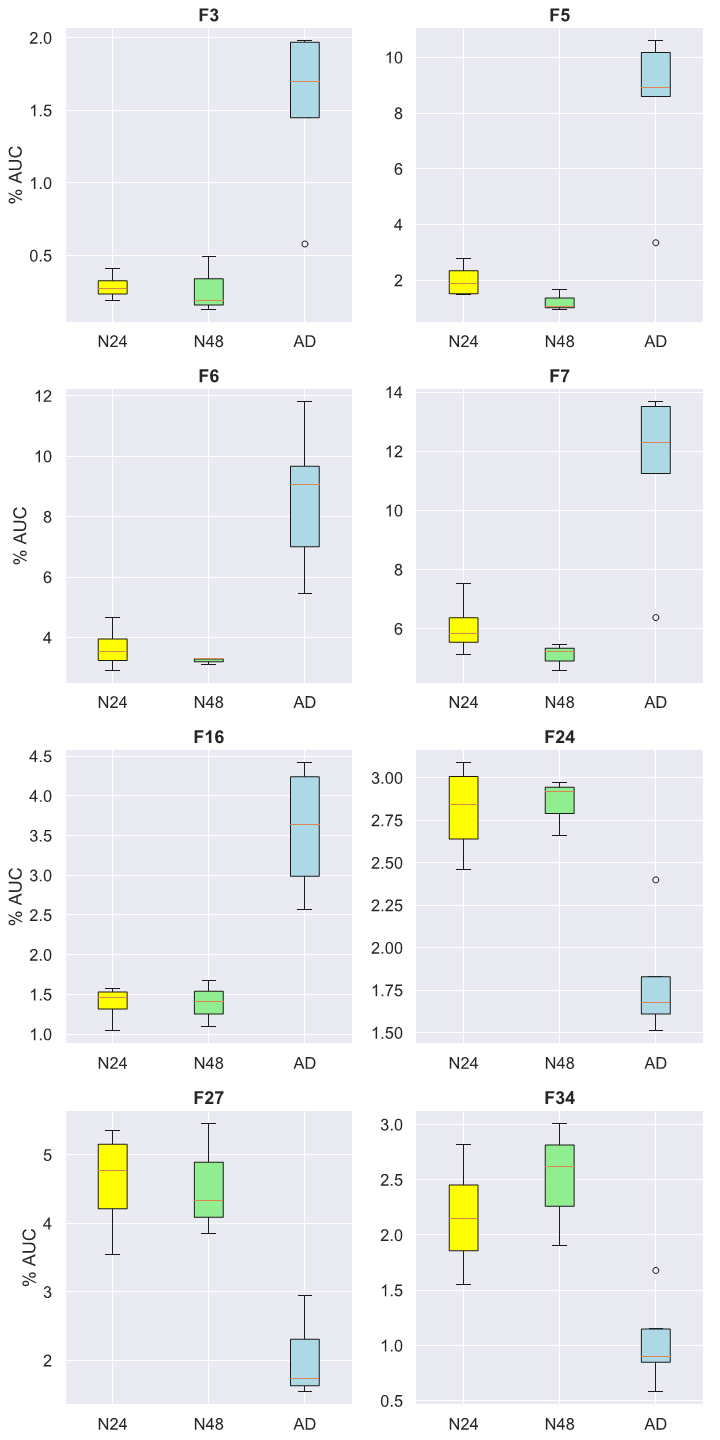
Utvrđivanje statistički značajnih razlika između skupina izvršeno je na *log2-transformiranim* vrijednostima površina dobivenih integracijom HILIC-UPLC-FLR kromatograma pomoću *T-testova* (dvostrani, nezavisni). Uspoređivane su površine svake pojedinačne frakcije (46 frakcija) između *odrasle skupina*  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 4.9** Površine kromatografskih frakcija predstavljene kao stupičasti dijagrami. Statistički značajno različite frakcije označene su uokvirene su crvenom bojom.



**Slika 4.10** 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).

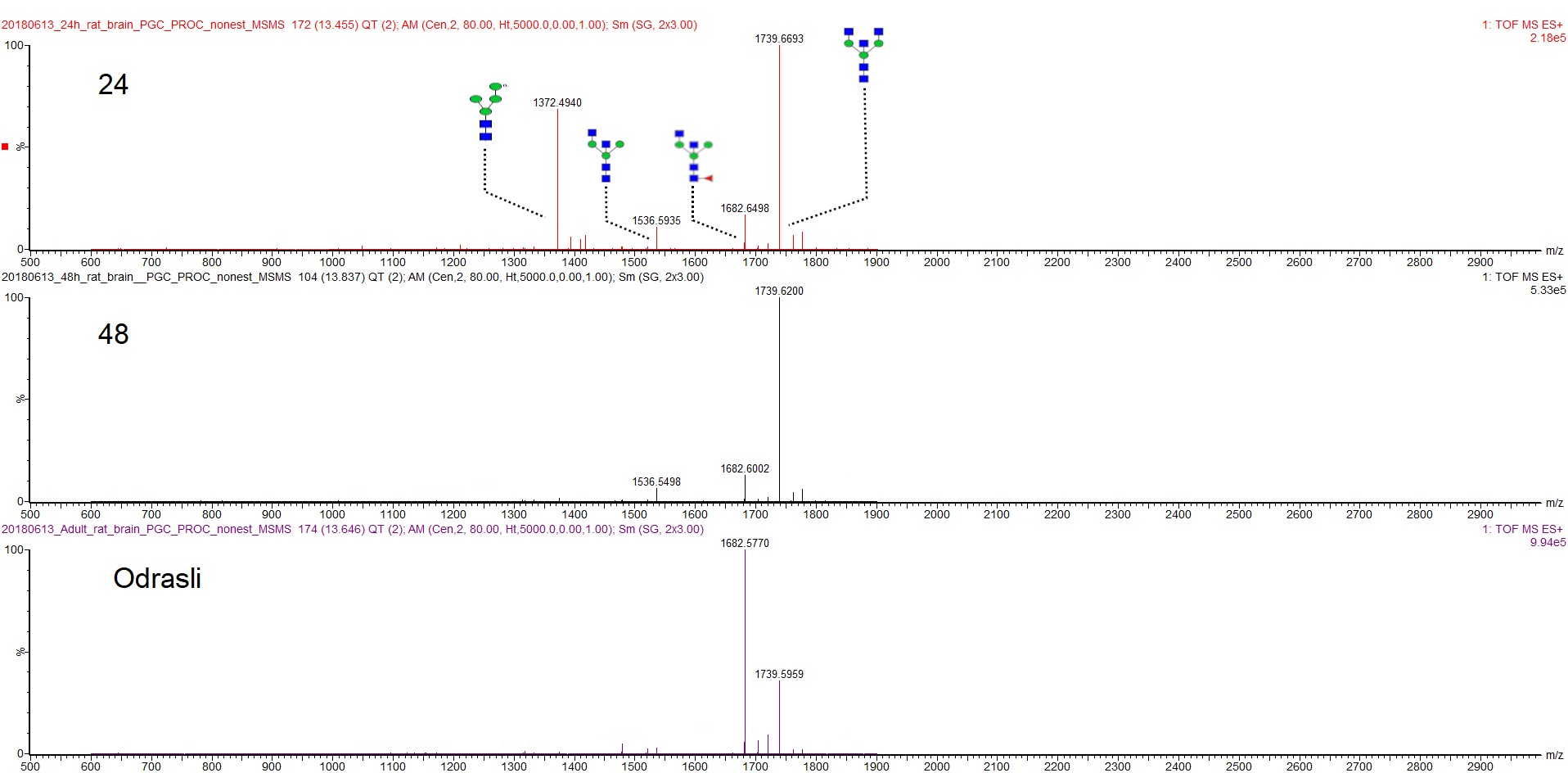
Frakcije koje su se pokazale statistički značajno razlite između *odrasle skupine* i *skupine 24h*  te *odrasle skupine i skupine 48h* pomnije su analizirane. Pregledom rezultata (**Tablica 4.4**) utvrđeno je da u frakcijama 3, 5, 6, 7, 24, 27 dolazi do promjene količine dominantne komponente u frakciji 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 – **Slike 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15**.

Rezultati nalažu da se u frakciji 5 u *odrasloj skupini* kao dominantna struktura nalazi N-glikan kompozicije *H3N4F1* (kompleksni tip, sržno fukoziliran), dok u *skupini 24h* i *skupini 48h* dominira N-glikan kompozicije *H3N5* (kompleksni tip) (**Slika 4.11**). 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)*.*

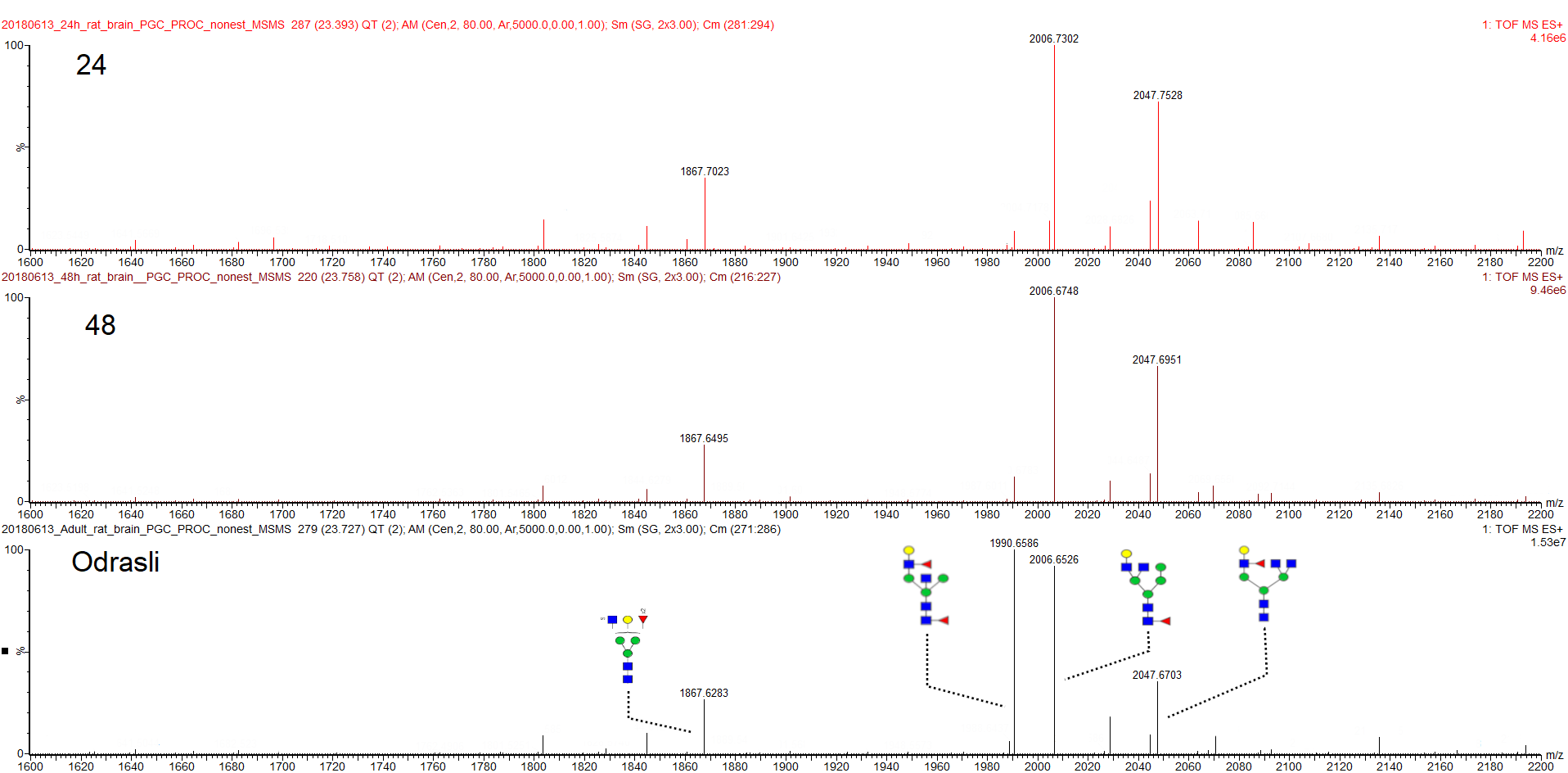
U svim skupinama u frakciji 16 prisutna je kompozicija H3N5F1 (kompleksni tip, antenarna fukozilacija). **Slika 4.12** prikazuje razlike među skupinama u frakciji 16. Potpuni izostanak kompozicije *H4N4F2* u *skupini 24h* i *skupini 48h* može objasniti statistički značajnu statistički značajno smanjenje površine frakcije 16 u *skupini 24h*  i *skupini 48h*.

U frakciji 27.1 u *odrasloj skupini* dominira kompozicija H7N2Phos2, uz značajnu prisutnost H6N4F2 (kompleksni ili hibridni tip, sržna i antenarna fukozilacija) dok u *skupini 24h* i *skupini 48h* dominira kompozicija H7N2Phos2i uz primjetno niži udio H6N4F2 (**Slika 4.11**). U frakciji 27.2 u svim skupinama dominira kompozicija H5N5F1S1 (kompleksni tip, antenarna sijalinizacija, sržna fukozilacija) uz promjenjivi udio H5N4F2S1 (kompleksni tip, antenarna sijalinizacija, sržna i antenarna fukozilacija).

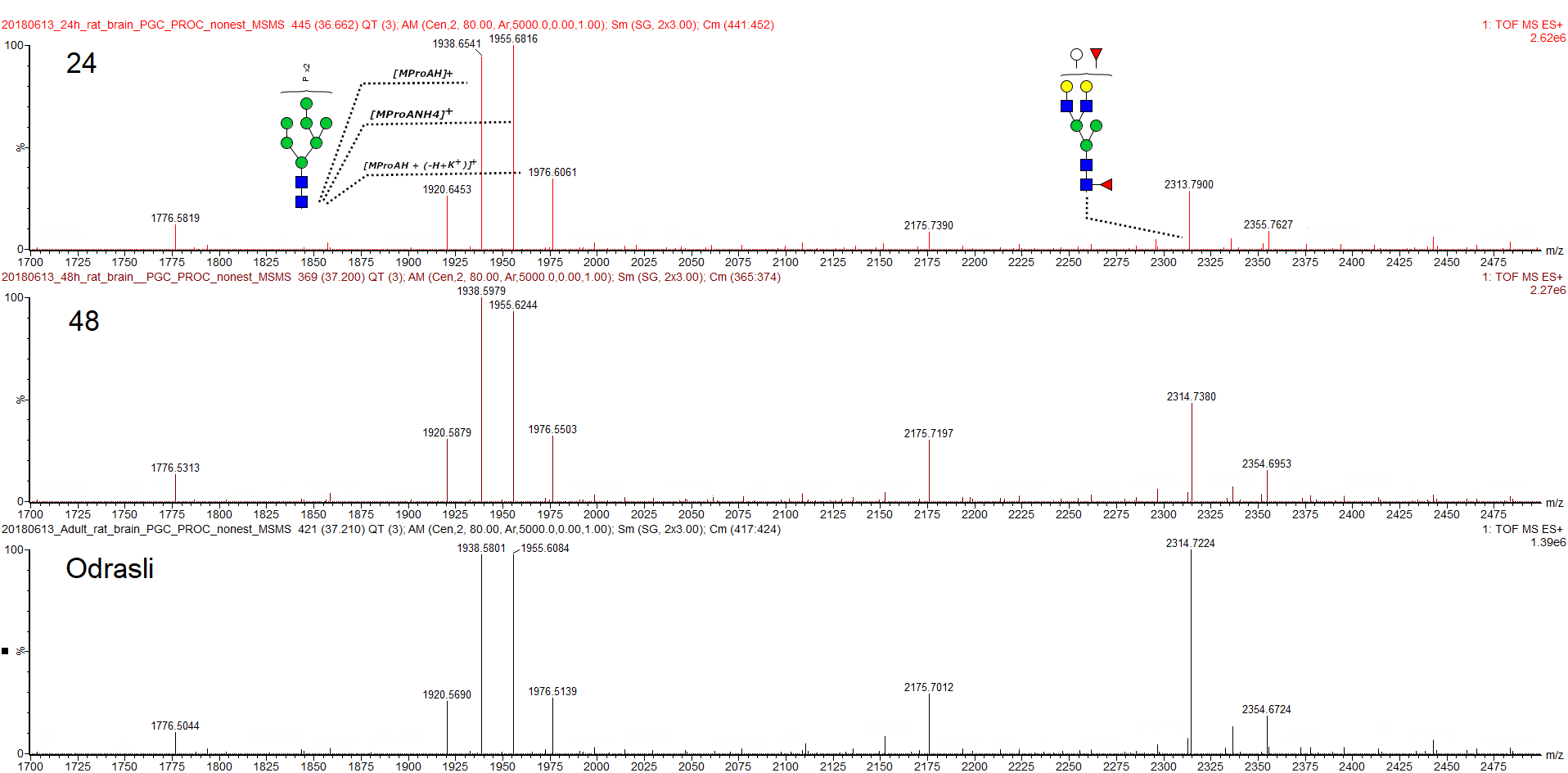
U frakciji 34 u *skupini 24h* i *skupini 48h* dominantna je kompozicija *H5N4F1S2* dok se u odrasloj skupini ističu 4 kompozicije: 1. H5N4F2S2 (kompleksni tip, antenarna sijalinizacija, sržna i antenatna fukozilacija), 2. H5N3F1S3 (kompleksni tip, antenarna sijalinizacija, sržna fukozilacija), 3. H5N4F2S1 (kompleksni tip, antenarna sijalinizacija, sržna i antenarna fukozilacija) i 4. H5N6F3 (kompleksni tip, sržna i antenarna fukozilacija). Površina frakcije 34 u *odrasloj skupini* značajno je niža od površine navedene frakcije u *skupini 24h* i *skupini 48h* (**Slika 4.10**)*.* Razlika u površinama frakcije 34 među skupinama uzoraka može se objasniti smanjenjem količine kompozicije *H5N4F1S2* u korteksu odraslog štakora što rezultira detekcijom 4 različite kompozicije u približno jednakim omjerima prilikom tumačenja masenih spektara (**Slika 4.15**).



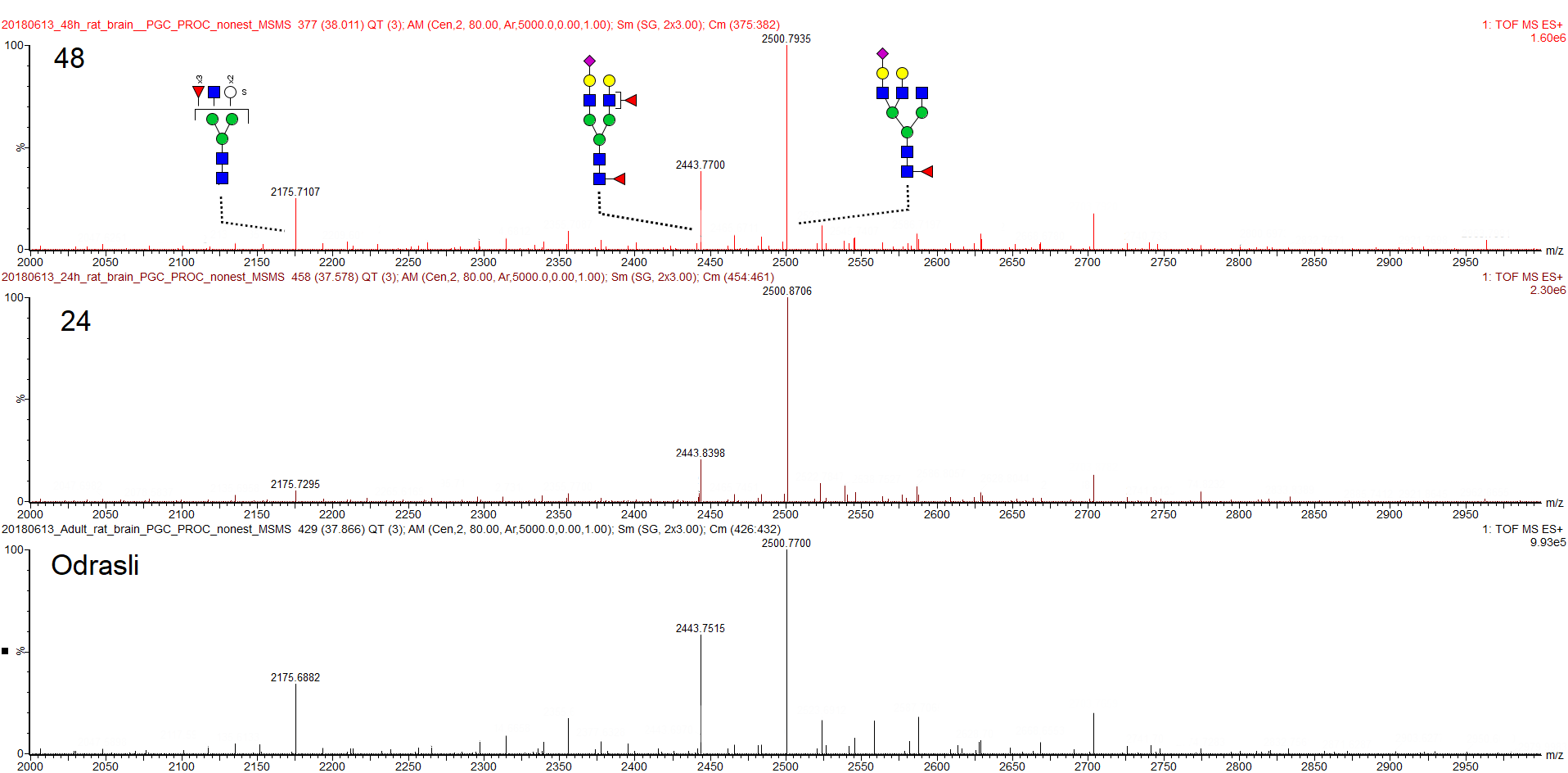
**Slika 4.11** Frakcija 5. *Vidljive razlike doprinosa pojedine kompozicije ukupnom signalu. Brojka u gornjem desnom kutu odnosi se na intenzitet najvišeg vrška u prikazu. Prikazan je spektar dobiven kombiniranjem svih snimaka unutar frakcije nakon čega su izvršene operacije Smooth, Center, TOF Transform u Mass Lynx računalnom paketu.*



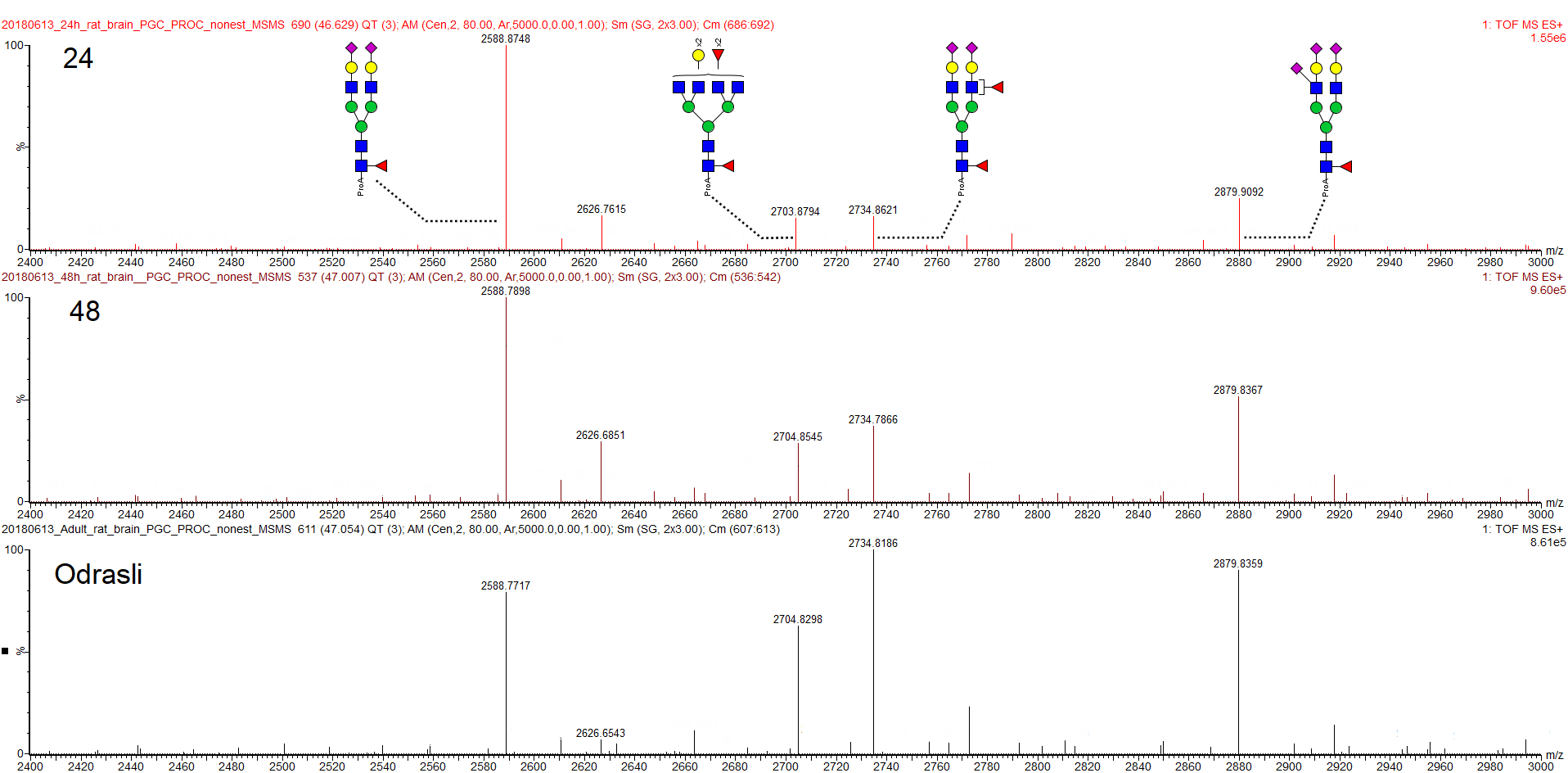
**Slika 4.12** Frakcija 16. *Vidljive razlike doprinosa pojedine kompozicije ukupnom signalu. Brojka u gornjem desnom kutu odnosi se na intenzitet najvišeg vrška u prikazu. Prikazan je spektar dobiven kombiniranjem svih snimaka unutar frakcije nakon čega su izvršene operacije Smooth, Center, TOF Transform u Mass Lynx računalnom paketu.*



**Slika 4.13** Frakcija 27.1. *Vidljive razlike doprinosa pojedine kompozicije ukupnom signalu. Brojka u gornjem desnom kutu odnosi se na intenzitet najvišeg vrška u prikazu. Prikazan je spektar dobiven kombiniranjem svih snimaka unutar frakcije nakon čega su izvršene operacije Smooth, Center, TOF Transform u Mass Lynx računalnom paketu.*



**Slika 4.14** Frakcija 27.2. *Vidljive razlike doprinosa pojedine kompozicije ukupnom signalu. Brojka u gornjem desnom kutu odnosi se na intenzitet najvišeg vrška u prikazu. Prikazan je spektar dobiven kombiniranjem svih snimaka unutar frakcije nakon čega su izvršene operacije Smooth, Center, TOF Transform u Mass Lynx računalnom paketu.*

**

**Slika 4.15** Frakcija 34. *Vidljive razlike doprinosa pojedine kompozicije ukupnom signalu. Brojka u gornjem desnom kutu odnosi se na intenzitet najvišeg vrška u prikazu. Prikazan je spektar dobiven kombiniranjem svih snimaka unutar frakcije nakon čega su izvršene operacije Smooth, Center, TOF Transform u Mass Lynx računalnom paketu.*

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 (posebice izraženo u frakciji 34, s količinom sijaliniziranih stuktura). 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.

**4.2.2 Kvalitativne razlike između skupina**

Pregled kvalitativnih razlika u dominantnim kompozicijama između skupina prikazuje **Tablica 4.5.**

Posebno interesantna razlika pronađena je u frakciji 22 za koju statistički značajna razlika u površinama između skupina nije detektirana. U *odrasloj skupini* dominira N-glikan kompozicije H4N5F1S1, dok u *skupini 24h* i *skupini 48h* dominira kompozicija H4N5F1Sulph1HexA1 – N-glikan koji nosi HNK-1 antigen (CD57, 3-O-sulfo glukuronska kiselina (GlcA) vezana α1-3 vezom na terminalnu Gal). Smatra se da se obrasci ekspresije ovog antigena mijenjaju tijekom razvoja živčanog sustava kralježnjaka. Ovaj antigen identificiran je kao sastavni dio O- ili N-glikana, proteoglikana i glikolipida. Neuroglikoproteini koji za koje je ustanovljena prisutnost HNK-1 antigena uključuju: neuronalnu staničnu adhezijsku molekulu (engl. *Neuronal cell adhesion molecule*, NCAM), kontaktin, mijelin-asocirani glikoprotein (MAG), telenkefalin L1, telenkefalin P0. Također, smatra se da ovaj antigen može služiti kao ligand za laminin, L-selektin, P-selektin te cerebelarni adhezijski protein amfoterin.

**Tablica 4.5** Kvalitativne razlike frakcija između uzoraka.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **ODRASLI** | | **N48** | | **N24** | |
| Skraćena kompozicija | Predložena struktura | Skraćena kompozicija | Predložena struktura | Skraćena kompozicija | Predložena struktura |
| 17 | H5N4F1 |  | H4N5F1 |  |  |  |
| 18 | H4N4F2 |  | H5N4F1 |  |  |  |
| 22 | H4N5F1S1 |  | H4N5F1Sulph1HexA1 |  |  |  |
| 23.1 | H6N3F1 |  | H4N5F1S1 |  | H5N4S1 |  |
| 23.2 | H4N6F2 |  |
| 28 | H5N4F2S1 |  | H5N4F1S2 |  | H5N4F2S1 |  |

**Tablica 4.5** (*Nastavak)*

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **ODRASLI** | | **N48** | | **N24** | |
| Skraćena kompozicija | Predložena struktura | Skraćena kompozicija | Predložena struktura | Skraćena kompozicija | Predložena struktura |
| 29 | H5N4F3 |  | H5N4F2S1 |  | H5N4F3 |  |
| 32 | H5N6F2S1 |  | H8N2Phos2 |  |  |  |
| 37 | H6N5F2S1 |  | H6N6F1S2 |  |  |  |
| 38 | H5N4F1S4 |  | H6N6F2S2 |  | H6N6F3S1 |  |
| 41 | H6N5F4 |  | H6N5F1S3 |  |  |  |
| 42 | H6N6F1S3 |  | H6N7F3S1 |  | H7N6F1S2 |  |
| 44 | H7N6F4S1 |  | H7N6F1S4 |  |  |  |
| 45 | H7N6F2S3 |  | H7N6F1S4 |  |  |  |
| 46 | H7N6F1S4 |  | H8N7F1S4 |  | H8N7F2S3 |  |

**5. Zaključci**

Uzorci u ovom kratkom istraživanju uključivali se korteks mozga odraslih jedinki štakora te cerebrume mladih jedinki postnatalne starosti 24 i 48 sati. Nakon pripreme uzorka, slobodni N-glikani obilježeni prokainamidom analizirani su HILIC-UPLC-ESI-MS/MS metodom opisanom u poglavlju *Materijali i metode*. Rezultati kromatografske analize podijeljeni su u 46 različitih frakcija, a svakoj frakciji upotrebom analizom masenih spektara određen je kvalitativni sastav N-glikana (kompozicija). Identificirano je ukupno 87 različitih kompozicija 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 87 navedenih kompozicija, 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 ili MALDI-MS 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. Osim toga istraživanje se može poboljšati izolacijom isključivo N-glikana stanične površine (u ovom istraživanju koršten je homogenat tkiva čime su obuhvaćani i glikani u različitim dorade obrade u Golgijevom aparatu) i provođenjem reakcije karboksietilacije čime bi se omogućilo razlikovanje α2-6 i α2-3 s vezane sijalinske kiseline. Nedostatak ovog ispitivanja je mali broj 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 je cijeli cerebrum mozga jedinke, dok je u *odrasloj skupini* korišten isključivo korteks mozga.

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 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.