

Razvoj metode uzastopne analize N-glikoma imunoglobulina A i G iz istog početnog uzorka humane krvne plazme

Maligec, Cristina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:904169>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Cristina Maligec

**RAZVOJ METODE UZASTOPNE ANALIZE N-
GLIKOMA IMUNOGLOBULINA A I G IZ ISTOG
POČETNOG UZORKA HUMANE KRVNE
PLAZME**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra kemije

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za glikobiologiju tvrke Genos d.o.o. pod mentorstvom prof. dr. sc. Gordana Lauca i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Maje Pučić Baković te Filipa Klička, *mag.chem.* Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je izv. prof. dr. sc. Aleksandra Maršavelski.

Zahvale

Želim izraziti svoju iskrenu zahvalnost mentoru prof. dr. sc. Gordanu Laucu, na pruženoj prilici te mogućnosti stjecanja znanja i iskustva u Laboratoriju za glikobiologiju tvrtke Genos. Vaša podrška i resursi značajno su doprinijeli razvoju ovog rada i mog istraživačkog usmjerenja.

Želim iskreno zahvaliti izv. prof. dr. sc. Aleksandri Maršavelski na nesebičnoj podršci, stručnim savjetima i predanom vođenju tijekom izrade ovog diplomskog rada, kao i tijekom cijelog diplomskog studija.

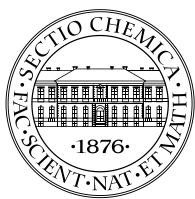
Posebno se zahvaljujem i svojim neposrednim voditeljima, dr. sc. Maji Pučić Baković i Filipu Kličeku, mag. chem., na kontinuiranoj pomoći i korisnim uputama tijekom eksperimentalnog rada, kao i prilikom izradbe diplomskog rada.

Također, veliku zahvalnost dugujem svojim najbližima, koji su mi pružali podršku i motivaciju tijekom cijelog studiranja. Njihova pomoć i razumijevanje omogućili su mi da ostvarim ovaj uspjeh.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	4
2.1. Glikomika.....	4
2.2. Glikozilacija.....	5
2.2.1. N-glikozilacija.....	6
2.3. Imunoglobulin A.....	8
2.4. Imunoglobulin G.....	12
2.5. Korištene tehnologije u istraživanju N-glikoma.....	15
2.5.1. Tekućinska kromatografija.....	16
2.5.2. Priprema uzorka.....	21
2.5.3. Obrada i mjerenje podataka.....	22
2.5.4. Identifikacija glikana.....	23
2.6. Upotreba HT-glikomike u istraživanjima.....	24
2.6.1. HT-glikomika u istraživanjima epidemiologije.....	24
2.6.2. HT-glikomika u istraživanjima genetike.....	24
2.6.3. HT-glikomika u kliničkim istraživanjima.....	25
3. MATERIJALI I METODE.....	26
1.1. Materijali.....	26
1.1.1. Materijali u radu.....	26
1.1.2. Enzimi i kemikalije.....	26
1.1.3. Instrumenti i dodatni pribor.....	27
1.1.4. Priprema pufera i otopina.....	27
1.1.5. Ispitanici i uzrokovanje.....	29
1.2. Metode.....	29
1.2.1. Izolacija IgG iz krvne plazme pomoću protein G pločice.....	29
1.2.2. Deglikozilacija u otopini.....	31
1.2.3. Obilježavanje slobodnih N-glikana u otopini.....	31
1.2.4. IgA izolacija iz krvne plazme pomoću afinitetnih zrnaca.....	33
1.2.5. Separacije i kromatografska analiza slobodnih IgG i IgA proA glikana.....	34
1.2.6. Analiza i obrada dobivenih podataka.....	35
2. REZULTATI.....	36
2.1. GP vrijednosti za IgG iz krvne plazme.....	37
2.2. GP vrijednosti za IgG iz krvne plazme prikazane pomoću statističkih podataka.....	38
2.3. Vrijednosti gliko pikova IgG-a dobivenih iz flow-through-a nakon izolacije IgA.....	39

2.4.	Vrijednosti gliko pikova IgG dobivenih iz flow-through-a nakon izolacije IgA prikazane pomoću statističkih podataka	40
2.5.	Usporedba dobivenih vrijednosti između IgG plazme i IgG relativne površine u flow-through uzorcima standarda	43
2.6.	GP vrijednosti IgA iz krvne plazme	46
2.7.	GP vrijednosti IgA iz krvne plazme prikazane pomoću statističkih podataka.....	46
2.8.	Vrijednosti GP-a IgA iz flow-through-a nakon izolacije IgG-a.....	47
2.9.	Vrijednosti GP IgA iz flow-through-a nakon izolacije IgG-a prikazane pomoću statističkih podataka.....	48
2.10.	Usporedba dobivenih vrijednosti između IgA plazme i IgA relativne površine u flow-through uzorcima standarda	49
3.	RASPRAVA	52
4.	ZAKLJUČAK	56
5.	POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	58
6.	LITERATURNI IZVORI.....	61
7.	DODATAK.....	64
8.	ŽIVOTOPIS	71



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

RAZVOJ METODE UZASTOPNE ANALIZE *N*-GLIKOMA IMUNOGLOBULINA A I G IZ ISTOG POČETNOG UZORKA HUMANE KRVNE PLAZME

Cristina Maligec

Razvijena je metoda za analizu *N*-glikana imunoglobulina A (IgA) i G (IgG) iz istog uzoraka humane krvne plazme. Cilj istraživanja bio je optimizirati izolaciju oba imunoglobulina korištenjem afinitetne kromatografije i ispitati njihove glikozilacijske profile. IgA i IgG izolirani su primjenom protein G pločice za IgG i CaptureSelect™ IgA afinitetnih zrnaca za IgA. Nakon izolacije, *N*-glikani su obilježeni fluorescentnom oznakom prokainamida i analizirani pomoću tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti s fluorescencijskom detekcijom (HILIC-UHPLC-FLR), što je omogućilo visoko osjetljivo praćenje glikozilacijskih obrazaca. Rezultati su pokazali različite obrasce glikozilacije između IgA i IgG, pri čemu IgA ima složenije i raznovrsnije glikanske strukture. Razvijena metoda omogućuje istovremenu analizu oba imunoglobulina iz istog uzorka plazme, smanjujući potrebu za većim količinama biološkog materijala i povećavajući preciznost analize.

(82 stranica, 9 slika, 20 tablica, 58 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: afinitetna kromatografija, HILIC-UHPLC-FLR, imunoglobulin A, imunoglobulin G, *N*-glikani, *N*-glikozilacija, plazma

Mentor: prof. dr. sc. Gordan Lauc

Neposredni voditelj: dr. sc. Maja Pučić Baković i Filip Kliček, *mag. chem.*

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): izv. prof. dr. sc. Aleksandra Maršavelski
Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Aleksandra Maršavelski
2. izv. prof. dr. sc. Ivica Đilović
3. doc. dr. sc. Ivan Nemet

Zamjena: prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Datum diplomskog ispita: 24. rujna 2024.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

METHOD DEVELOPMENT FOR CONSECUTIVE ANALYSIS OF N-GLYCOMES OF IMMUNOGLOBULINS A AND G FROM THE SAME INITIAL SAMPLE OF HUMAN BLOOD PLASMA

Cristina Maligec

A method was developed for the analysis of *N*-glycans from immunoglobulin A (IgA) and G (IgG) from the same human plasma sample. The aim of the study was to optimize the isolation of both immunoglobulins using affinity chromatography and to examine their glycosylation profiles. IgA and IgG were isolated using protein G plate for IgG and CaptureSelect™ IgA affinity beads for IgA. After isolation, the *N*-glycans were labeled with a fluorescent tag (procainamide) and analyzed by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with ultra-high-performance liquid chromatography and fluorescence detection (HILIC-UHPLC-FLR), which enabled highly sensitive tracking of glycosylation patterns. The results showed distinct glycosylation patterns between IgA and IgG, with IgA exhibiting more complex and diverse glycan structures. This method allows for the simultaneous analysis of both immunoglobulins from the same sample, reducing the need for larger quantities of biological material and increasing the precision of the analysis.

(82 pages, 9 figures, 20 tables, 58 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: affinity chromatography, HILIC-UHPLC-FLR, immunoglobulin A, immunoglobulin G, *N*-glycans, *N*-glycosylation, plasma

Mentor: Dr. Gordan Lauc, Prof.

Assistant mentor: Dr. Maja Pučić Baković and Filip Kliček, Res. Assoc.

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Aleksandra Maršavelski, Prof.

Reviewers:

1. Dr. Aleksandra Maršavelski, Prof.
 2. Dr. Ivica Đilović, Prof.
 3. Dr. Ivan Nemet, Asisst. Prof.
- Substitute: Dr. Iva Juranović Cindrić, Prof.

Date of exam: 24th September 2024

1. UVOD

Glikozilacija je jedna od najčešćih posttranslacijskih modifikacija proteina koja može uvelike utjecati na njihovu strukturu i funkciju te ima važnu ulogu u nizu bioloških procesa, uključujući efektorske funkcije, međustanične interakcije, prijenos signala i staničnu imunogenost. Enzimski procesi glikozilacije proteina normalno se odvijaju u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu, ali se također mogu dogoditi u citoplazmi i jezgri. Glikanske strukture su kovalentno povezane s proteinskom okosnicom preko atoma dušika asparagina ili atoma kisika bočnih lanaca serina/treonina, tvoreći *N*-vezane glikane (*N*-glikani) odnosno *O*-vezane glikane (*O*-glikani). Jezgra *N*-glikana sastoji se od dva uzastopna *N*-acetilglukozamina i tri manoze, koje se mogu dalje modificirati djelovanjem raznih glikoziltransferaza i glikozidaza kako bi se formirali oligomanozni, kompleksni ili hibridni *N*-glikani. *N*-glikozilacija je uobičajena modifikacija membranskih i sekretornih proteina, uključujući imunoglobuline kao što su imunoglobulin G (IgG) te imunoglobulin A (IgA).¹

Imunoglobulini ili protutijela su proteinske molekule koje stvara imunološki sustav kao reakciju na ulazak neke strane supstance u organizam (antigena). Najvažnija i najzastupljenija protutijela u krvnoj plazmi su IgG, molarne mase oko 150,000 g mol⁻¹. IgA druga su najzastupljenija protutijela u krvi i najzastupljenija protutijela u sluznicama gdje pružaju početnu imunološku obranu protiv patogena. Obje klase protutijela su građene od dvaju lakih (λ or κ) i dvaju teških polipeptidnih lanaca (α kod IgA, γ kod IgG), međusobno povezanih disulfidnim mostovima.^{2,3} Osnovna monomerna jedinica, zajednička svim protutijelima, sastoji se od dva identična antigen-vezujuća fragmenta Fab (engl. *Fragment Antigen Binding*) koji vežu antigen i povezani su preko zglobne regije na kristalizirajući fragment Fc (engl. *Fragment Crystallizable*), koji posreduje u efektorskim mehanizmima poput stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (engl. *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*, ADCC) ili citotoksičnosti ovisne o komplementu (engl. *Complement Dependent Cytotoxicity*, CDC). Za razliku od IgG protutijela koja imaju samo jedno konzervirano *N*-glikozilacijsko mjesto u Fc regiji (N297), IgA protutijela imaju pet konzerviranih *N*-glikozilacijskih mjesta (N47, N92, N144/N131, N205 i N340/N327) te još devet potencijalnih *O*-glikozilacijskih

mjesta u zglobnoj regiji IgA1 potklase. Efektorske funkcije ovise o podklasi protutijela i sastavu pridruženih *N*-glikana.⁴

Glikozilacija IgG-a je visoko regulirana, kako tijekom homeostaze tako i u slučajevima njezina poremećaja. Uočene su promjene u sastavu i strukturi *N*-glikana tijekom starenja i kod raznih oboljenja. Poznato je da alternativna glikozilacija modulira efektorske funkcije IgG-a te je povezana s razvojem i napredovanjem bolesti.⁵ Zbog svojih karakteristika *N*-glikani IgG-a posjeduju biomarkerski potencijal.⁶ IgA je visoko glikoziliran s *O*- i *N*-glikanima. Pokazalo se da sastav i struktura ovih glikana variraju među različitim pojedincima i tkivima, a također se mijenjaju ovisno o patološkim i fiziološkim stanjima. Glikozilacija IgA ključna je za njegovu biološku funkciju, uključujući vezanje bakterija, uklanjanje patogena i imunoregulaciju. *N*-glikani neophodni su za normalnu funkciju imunološkog sustava.⁷

S obzirom da se oba imunoglobulina nalaze u istom mediju (ljudska krvna plazma), cilj izradbe ovog diplomskog rada je bio uspostaviti metodu za sekvencijalnu izolaciju IgA i IgG iz istog uzorka ljudske krvne plazme kako bismo sačuvali vrijedne biološke uzorke. Pritom smo testirali učinkovitost sekvencijalne izolacije s obzirom na redoslijed izolacija pojedinih proteina (IgG pa IgA, ili obratno IgA pa IgG). Istovremena izolacija oba proteina nije moguća budući da će se naknadno analizirati ukupni oslobođeni *N*-glikani pri čemu se gubi informacija o veznom mjestu oslobođenih *N*-glikana. Za izolaciju oba proteina iz krvne plazme, koristila se metoda afinitetne kromatografije. Izolacija IgG-a provodila se pomoću proteina G vezanog na monolitnu pločicu s 96 jažica, dok su se za izolaciju IgA koristila CaptureSelect™ IgA afinitetna zrnca. Vezani *N*-glikani su se potom enzimski odvojili od izoliranih proteina. Oslobođeni *N*-glikani fluorescentno su se obilježili pomoću 4-amino-*N*-[2-(dimetilamino)etil]benzamida (prokainamid). U posljednjem koraku pripreme uzoraka, fluorescentno obilježeni *N*-glikani su se pročistili ekstrakcijom na čvrstoj fazi temeljenoj na hidrofilnim interakcijama. Obilježeni i pročišćeni *N*-glikani IgG i IgA su se analizirali pomoću tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti temeljene na hidrofilnim interakcijama s fluorescencijskom detekcijom (eng. *hydrophilic interaction ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detection*, HILIC-UHPLC-FLR).

HILIC-UHPLC-FLR analiza *N*-glikana jedna je od najčešće korištenih metoda za analizu glikana pri čemu stehiometrijsko pričvršćivanje jedne oznake po glikanu omogućuje relativnu

kvantifikaciju različitih vrsta glikana na temelju fluorescencije, a izravna usporedba uzoraka sa glikanskim standardima dovodi do preliminarne identifikacije glavnih vrsta glikana.^{8,9}

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Glikomika

Glikomika je područje proučavanja koje se fokusira na prepoznavanje i razumijevanje strukture i funkcije glikoma, što se odnosi na kompletan skup oligosaharida ili šećera (glikana) proizvedenih u određenoj stanici ili organizmu. Pojam "*glycomics*" sadrži riječ „*omics*“ što znači sveobuhvatna analiza biološkog sustava, koja je uspostavljena da kategorizira različita polja proučavanja u biologiji na temelju njihovog fokusa na specifične biološke molekule. U ovom slučaju, "*glyco-*" je izvedeno iz grčke riječi "*glykys*", što znači slatko ili šećer.^{10,11}

Područje funkcionalne glikomike nastoji odgovoriti na tri sveobuhvatna pitanja: (1) kako glikani djeluju u staničnoj komunikaciji; (2) što uzrokuje specifičnost koja postoji između proteina i glikana; i (3) kako raznolikost i mikroheterogenost glikana rezultiraju kao funkcija biologije u razvoju i bolesti. Vrlo ograničen broj monosaharida može izgraditi izuzetno složene strukture jer, za razliku od DNA, RNA i proteina, ugljikohidrati stvaraju granate strukture. Štoviše, proizvodnja glikana je sofisticiran proces koji uključuje više od 200 enzima raspoređenih u preciznoj neuniformnoj distribuciji u ravnotežnom stanju u Golgijevom aparatu. Glikom igra ključnu ulogu u raznim biološkim procesima, a razumijevanje njegovog sastava i funkcije ključno je za razotkrivanje složenosti stanične i organske biologije. Primarni cilj glikomike je identificirati gene i druge čimbenike koji upravljaju glikozilacijom, procesom kroz koji se glikani dodaju proteinima, lipidima ili drugim molekulama.¹⁰

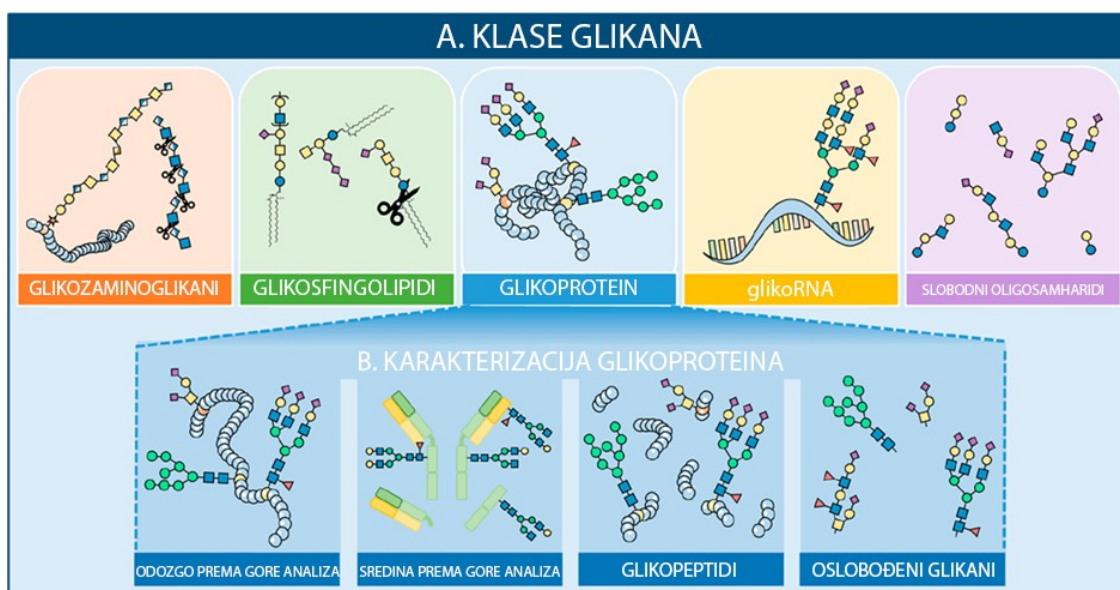
Jedan od glavnih izazova u glikomici je potreba za robusnim, osjetljivim i visokoprotočnim (engl. *High-Throughput*, HT) analitičkim tehnologijama. Glikomika visoke protočnosti uključuje analizu stotina ili tisuća glikoma u što kraćem vremenu, što zahtijeva napredne i potencijalno automatizirane tehnike. Najsuvremenije tehnologije za visokoprotočnu glikomiku uključuju različite analitičke metode kao što su spektrometrija masa, tekućinska kromatografija i kapilarna elektroforeza. Ove tehnologije omogućuju istraživačima karakterizaciju glikoma na različitim razinama i pružaju vrijedne informacije o raznolikosti i složenosti glikanskih struktura te promjenama u glikozilaciji se primjenjuju u zdravim i bolesnim stanjima. Razumijevanje promjena u obrascima glikozilacije može imati

implikacije za dijagnozu bolesti, prognozu i liječenje. Istraživači koriste glikomiku visokeprotočnosti za identifikaciju glikanskih biomarkera povezanih s određenim bolestima i za dobivanje uvida u temeljne mehanizme patologija povezanih s glikozilacijom. Sve u svemu, glikomika, a posebno glikomika visokeprotočnosti, ima ključnu ulogu u unapređenju razumijevanja glikoma i njegovih implikacija na zdravlje i bolest. Integracija najsuvremenijih tehnologija i metodologija u ovom području nastavlja doprinosti značajnim otkrićima i napretku u biomedicinskim istraživanjima.¹⁰

2.2. Glikozilacija

Glikozilacija je najraširenija i najsloženija kotranslacijska i post-ranslacijska modifikacija u kojoj enzimi glikoziltransferaze kataliziraju kovalentno vezanje ugljikohidrata na polinukleotide, polipeptide i lipide. U procesu glikozilacije kao donori šećernih nukleotida primarno služe heksoza i njezini derivati, uključujući *D*-glukozu, *D*-manozu, *D*-galaktozu, fukozu, *N*-acetil-glukozamin i galaktozamin, te dodatno ksilozu ili sijalinsku kiselinu. Ovaj cijeli proces značajno utječe na savijanje proteina, ciljani transport, staničnu lokalizaciju i aktivnost.¹²

Glikozilacija se odvija na velikom broju biomolekula, proizvodeći razne glikokonjugate poput glikosfingolipida (eng. *Glycosphingolipid*, GSL), glikoproteina (engl. *Glycoprotein*), proteoglikana, slobodnih oligosaharida (engl. *Free Oligosaccharides*), glikozaminoglikana (engl. *Glycosaminoglycan*, GAG) ili glikozilirane RNA (engl. *GlycoRNA*) (Slika 1A). Posljednjih godina došlo je do značajnog napretka u analitičkim metodama za njihovo ispitivanje. Ipak visokoprotočne metode analize glikana trenutno se primjenjuju samo na glikoproteinima. Glikoproteini se mogu analizirati u netaknutom obliku primjenom metode "odozgo prema dolje" (engl. *Top-down analysis*) ili "sredina prema gore" (engl. *Middle-up analysis*), koja se koristi za ispitivanje podjedinica (monoklonskih) protutijela. Dodatne tehnike uključuju razgradnju enzimom, koja može razgraditi protein u (gliko)peptide ili odvojiti glikan od njegovog konjugata (proces poznat kao analiza oslobođenih glikana) (Slika 1B).¹⁰



Slika 1. (A) Klase glikana, (B) Karakterizacija glikoproteina. (preuzeto i prilagođeno iz ref. 10)

Glikoproteini imaju ulogu u mnogim biološkim procesima unutar organizma, uključujući imunološki odgovor, prepoznavanje stanica, diferencijaciju, razvoj i prijenos signala. Glikoprotein može imati mnogo mjesta glikozilacije (makroheterogenost) i različite vrste glikana na jednom mjestu (mikroheterogenost). Sekvenca i konformacija proteina, dostupnost prekursora šećera, vremenska i prostorna dostupnost, kao i aktivnost glikoziltransferaza i glikozidaza, utječu na to je li glikozilacijsko mjesto proteina nezauzeto, djelomično ili potpuno zauzeto. Podtipovi glikoproteina klasificirani su kao *N*-vezani ili *O*-vezani na temelju atoma aminokiseline koji povezuje lanac ugljikohidrata.¹³ Glavni tipovi glikozilacije kod ljudi su *N*- i *O*-glikozilacija.

2.2.1. *N*-glikozilacija

N-glikozilacija je proces koji se odvija u endoplazmatskom retikulumu u kojem se *N*-glikani pomoću *N*-glikozidne veze kovalentno vežu na ostatak asparagina (Asn) polipeptida pri čemu se asparagin nalazi u slijedu aminokiselina Asn-X-Ser (serin)/Thr (treonin) gdje X može biti bilo koja aminokiselina osim prolina. *N*-glikani imaju zajedničku sržnu strukturu, $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNac}\beta 1-4\text{GlcNac}\beta 1$, a mogu se klasificirati na sljedeći način: 1) oligomanozni, na čiju se sržnu strukturu dodaju samo ostaci manoze, 2) kompleksni, u kojima se na srž nastavljaju antene koje počinju vezanjem *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i dalje drugih monosaharida poput galaktoze i sijalinske kiseline; te (3) hibridni, u kojima su

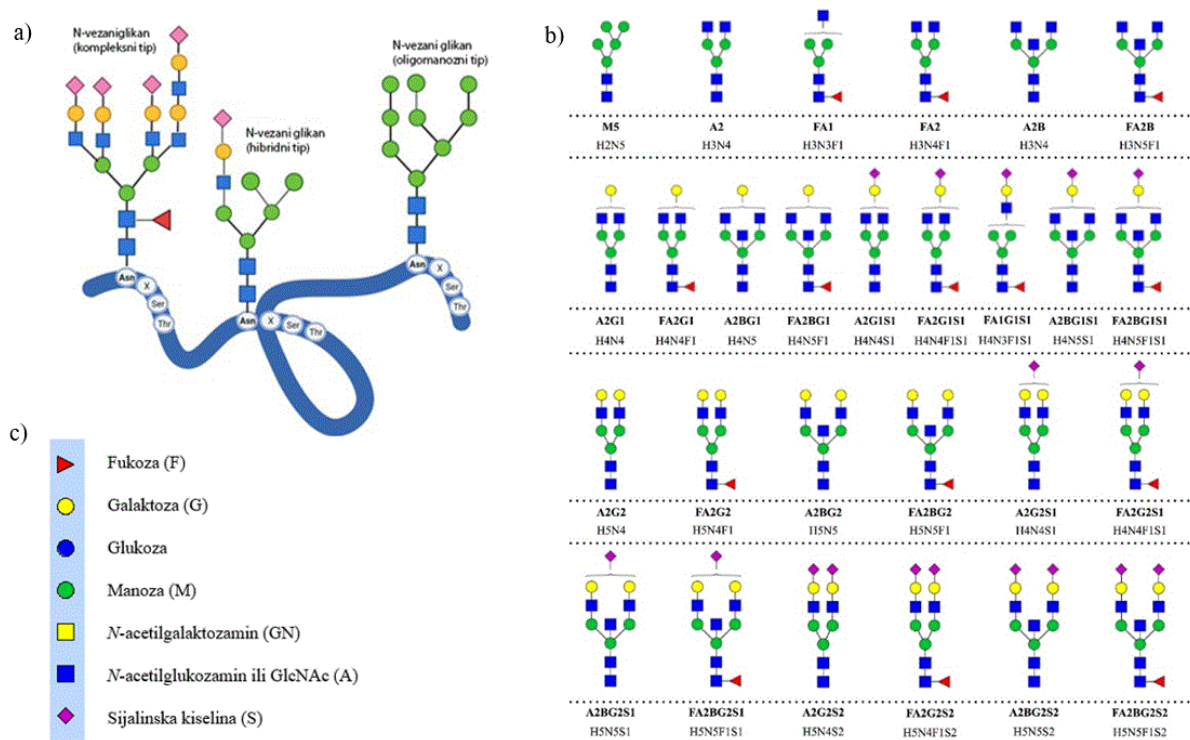
jedan ili dva GlcNAc-a dodana Man α 1-3 ruci srži, dok se na Man α 1-6 ruku sržne strukture vežu samo manoze (Slika 2a).¹⁴

Glikani su složeni oligosaharidi koji se sastoje od petnaest ili više molekula monosaharida. Konzervirana pentasaharidna jezgra onih vezanih na IgG sastoji se od tri ostatka manoze i dva *N*-acetilglukozamina. Kako bi se dodatno proširila struktura jezgre mogu se dodati GlcNAc, sržna fukoza (sržna fukozilacija), račvajući GlcNAc (bisekcija), galaktoza (galaktozilacija) i sijalinska kiselina (sijalinizacija) (Slika 2b).¹⁵

Glycan Oxford nomenklatura je sustav za označavanje oligosaharida i glikana koji pruža jednostavan i jasan način za prikazivanje njihovih struktura koristeći simbole i boje.¹⁵ Ovaj sustav je razvijen kako bi se olakšalo razumijevanje i vizualizacija složenih struktura glikana, osobito u poljima kao što su glikobiologija i biokemija.

Ključne značajke *Glycan Oxford* nomenklature (Slika 2c):¹⁵

1. Simboli i boje: Svaki monosaharid ima specifičan simbol i boju, npr. fukoza (F) prikazuje se crvenim trokutom, galaktoza (G) žutim krugom, glukoza plavim krugom, manoz (M) zelenim krugom, *N*-acetil galaktozamin (GN) žutim kvadratom, *N*-acetil glukozamin (GlcNAc ili A) plavim kvadratom i sijalinska kiselina (S) ljubičastim romбом. Ovi simboli se koriste za predstavljanje monosaharida u lancu oligosaharida, čime se omogućuje brza vizualna identifikacija pojedinih jedinica.
2. Orijehtacija veza: Glikozidne veze (veze između monosaharida) prikazane su linijama koje povezuju simbole. Kut i duljina linija mogu ukazivati na specifične konfiguracije i vrste veza (npr. alfa ili beta veze).
3. Kombinacija simbola: Kompleksni glikani predstavljeni su kombinacijom različitih simbola, koji pokazuju kako su pojedine monosaharidne jedinice međusobno povezane.



Slika 2. a) Shematski prikaz N-glikana. N-glikani dolaze u tri varijante: oligomanozni, hibridni i kompleksni. Svi eukariotski N-glikani dijele sržnu strukturu, Man α 1-6(Man α 1-3) Man β 1-4GlcNac β 1-4GlcNac β 1-Asn-X-Ser/Thr (preuzeto i prilagođeno iz ref.14), b) Najzastupljenije strukture N-glikana na ljudskom IgG-u, c) Simboli prema *Glycan Oxford* nomenklaturi. (preuzeto iz ref. 15)

2.3. Imunoglobulin A

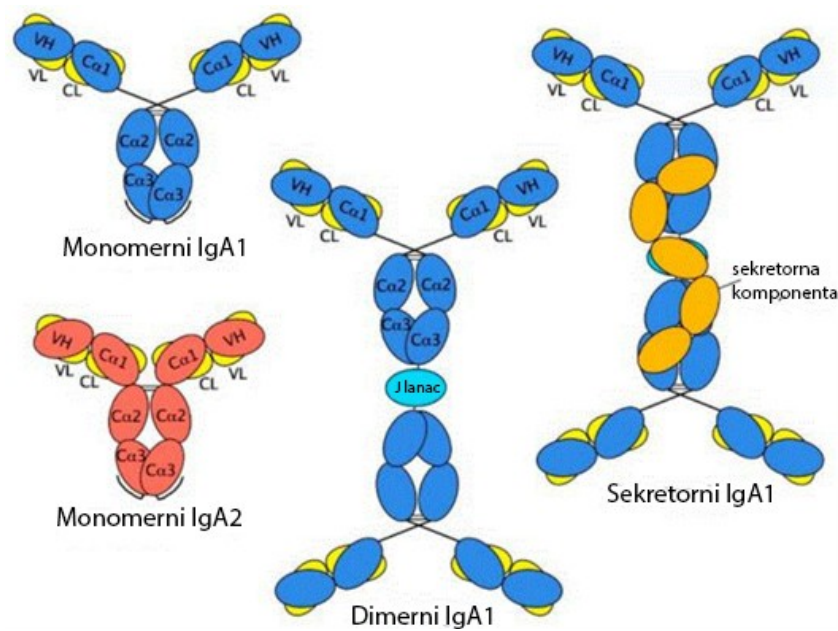
Jedan od pet glavnih imunoglobulina (Ig), imunoglobulin A (IgA), dominantno je protutijelo imuniteta i ključno je za održavanje homeostaze sluznice u gastrointestinalnom, respiratornom i genitourinarnom traktu.¹⁶ Budući da je drugi najrašireniji oblik imunoglobulina u tijelu, igra vitalnu funkciju u obrani od antigena.¹⁷

IgA1 i IgA2, dvije su podklase IgA koje imaju različite funkcije u tijelu. Svaka podklasa imunoglobulina sastoji se od dva identična teška lanca (engl. *Heavy Chain*, HC) i dva identična laka lanca (engl. *Light Chain*, LC), koji čine temeljnu molekularnu jedinicu imunoglobulina. Na svakom teškom lancu zglobne regije IgA1 postoje dva N-glikozilacijska mjesta i nekoliko O-vezanih glikana. IgA2 nema O-vezane glikane i sadrži kraću zglobnu regiju s četiri N-glikozilacijska mjesta po teškom lancu. Dok se IgA2 uglavnom nalazi u debelom crijevu, IgA1 čini oko 80 % ukupnog IgA i prisutan je na površinama sluznice. IgA

je prisutan u krvi/plazmi u manjim količinama u usporedbi s IgG, čineći oko 10-15 % ukupnih serumskih imunoglobulina. Asialoglikoproteinski receptor odgovoran je za uklanjanje IgA iz krvotoka.^{18,19}

HC i LC IgA su savijeni u mnoge varijabilne (V) i konstantne (C) domene, od kojih je svaka kodirana različitim egzonom, slično drugim imunoglobulinima. Postoje četiri domene u HC (VH, C α 1, C α 2 i C α 3, počevši od *N*-terminusa) i dvije u LC (VL i CL, od *N*-terminusa). Svaka domena se savija u usporedivu globularnu sekundarnu strukturu koja se naziva imunoglobulinski nabor. Svaka domena, koja se sastoji od dvije β -plohe sastavljene od antiparalelnih β -lanaca, obično se proteže oko 110 aminokiselina i smještena je oko stabilizirajuće disulfidne veze. Fleksibilna zglobna regija, koja je duža u ljudskom IgA2, ali raširenija u ljudskom IgA1, nalazi se između domena C α 1 i C α 2 svakog HC. Odsutnost međulančanih disulfidnih mostova u zglobnoj regiji IgA, za razliku od IgG, vjerojatno dopušta zglobnim sekvencama, posebno dužima IgA1, da se savijaju neovisno jedna o drugoj. Međutim, to ih također može učiniti osjetljivijima na proteolizu. Zglobna regija IgA1, koja je bogata prolinom, serinom i treoninom, sadrži specifičnu sekvencu koja je odsutna u IgA2. Ova se sekvenca sastoji od dva ponavljanja od po osam aminokiselina, naglašavajući strukturnu razliku između IgA1 i IgA2. Za razliku od IgG, koji ima zglob kodiran posebnim egzonom ili egzonima, ljudski IgA ima zglob kodiran sekvencom smještenom na 5' kraju egzona koji kodira C α 2 domenu. Slično drugim Ig-ima, zglob cijeloj molekuli IgA daje fleksibilnost, što je bitno za djelovanje. Rep od 18 aminokiselina je produžetak koji se nalazi na C-kraju IgA HC.¹⁹

Slika 3 prikazuje kako su dva HC i dva LC raspoređena u dvije Fab regije, od kojih svaka ima VH, C α 1, VL i CL domene. Ove Fab regije vežu se na antigen i povezane su s jednom Fc regijom, koja ima dvije C α 2 i dvije C α 3 domene, preko zglobne regije. Disulfidne veze između HC i LC u Fab regiji i između dva HC na C α 2 domenama, kao i blisko uparivanje suprotnih domena, VH s VL, C α 1 s CL i jedna C α 3 domena s drugom, stabiliziraju interakciju među lancima. Razne nekovalentne interakcije, uključujući vodikove veze i van der Waalsove sile, neophodne su da bi došlo do takvog uparivanja između sudjelujućih domena.¹⁹



Slika 3. Monomerni, dimerni i sekretorni oblici IgA. Domene lakog lanca prikazane su žutom bojom u IgA1 i IgA2, dok su domene teškog lanca prikazane plavom bojom (IgA1) i crvenom bojom (IgA2). U monomernim verzijama IgA Ca3 domena, repovi su prikazani kao produžeci C-krajeva. Svijetlo plava boja predstavlja J lanac, koji se nalazi u sekretornom i dimernom IgA1. Domene sekretorne komponente, prisutne su u sekretornom IgA, prikazane su narančastom bojom. (preuzeto i prilagođeno iz ref. 19)

Sekretorni IgA (engl. *Secretory Immunoglobulin A*, SIgA) je primarna obrana od infekcije, izlučuje se u lumen kako bi se spriječio ulazak antigena u cirkulaciju i submukozu.¹⁹ SIgA se veže na različite receptore, uključujući galektin-1, receptor za transferin, i FcαRI, glavni receptor za imunitet sluznice.²⁰ FcαRI, eksprimiran u mijeloidnim stanicama kao što su neutrofili, makrofagi, eozinofili i Kupfferove stanice, veže monomerni IgA s visokom avidnošću. Ovo vezanje pokreće fiziološke reakcije poput fagocitoze, stanične citotoksičnosti ovisne o antitijelima, oslobađanja citokina i prezentacije antigena. Neutrofili u interakciji s FcαRI oslobađaju leukotrien B4, potičući migraciju stanica. SIgA ne samo da pruža imunološku zaštitu, već također smanjuje upalu, posredovanu receptorima kao što su FcαRI, DC-SIGN (engl. *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*; Dendritička Stanica-Specifični Receptor za Hvatanje Molekule Adhezije Međuceljske 3 koji nije Integrinski Povezan) i SIGNR1 (engl. *Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin-Related 1*; Specifični Receptor za Hvatanje Molekule Adhezije Međuceljske 3 Neintegrinski Povezan 1). SIgA stupa u interakciju sa SIGNR1 na dendritskim stanicama kako bi inducirao imunološku toleranciju putem regulatornih T

stanica. Interakcija monomernog IgA s Fc α RI regrutira enzim fosfatazu koja sadrži Src homološku domenu 2, tip 1 (engl. *Src Homology Region 2 Domain-Containing Phosphatase-1*, SHP-1), što dovodi do inhibicije rasta stanica. Inhibitori Fc α RI testiraju se na mišjim modelima za potencijalnu terapiju za alergije i poremećaje imunološkog kompleksa, naglašavajući važnost Fc α RI i IgA u upalama i imunitetu.¹⁶

Mehanizam se odvija na način da plazma stanice otpuštaju IgA u unutarnje tjelesne tekućine kao i vanjske izlučevine. U unutarnjim tekućinama poput plazme i cerebrospinalne tekućine, ostaje u monomernom stanju. Kada je riječ o vanjskim izlučevinama, gdje djeluje u imunitetu sluznice, uglavnom se izlučuje kao dimer koji se drži spojnim (engl. *Joining Chain*, J) lancem. Monomerni IgA izlučuju plazma stanice u mukoznom subepitelu, a zatim stvara dimerni IgA kovalentnim vezanjem s J lancima. Kako bi ušao u stanicu transcitozom, ovaj dimerni IgA stupa u interakciju s polimernim imunoglobulinskim receptorom (engl. *Polymeric Immunoglobulin Receptor*, pIgR) na bazolateralnoj površini intestinalnih epitelnih stanica. Polimerni Ig receptor koji je još uvijek vezan za IgA mijesha se kroz stanicu prije nego što se razbije na apeksnoj površini kako bi se stvorila sekretorna komponenta. Stoga se sekretorni IgA, koji se sastoji od dimernog IgA, J lanca i sekretorne komponente izvedene iz pIgR, oslobađa u lumen sluznice pomoću pIgR.¹⁶ Ova sekretorna komponenta pomaže IgA antitijelima da se učinkovitije uključe u patogene štiteći ih od proteolitičke destrukcije i sprječavajući ih da prijanjaju na površinu epitela lumena. Ovaj SIgA je uključen u neutralizaciju virusa, opsoniziranje antigena i sprječavanje prijanjanja i prodiranja antigena.¹⁹

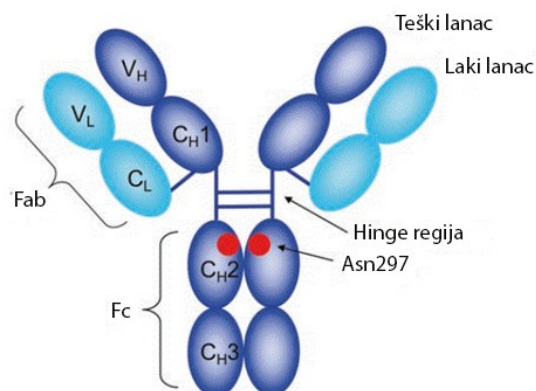
Glikozilacija IgA, posebno N-glikozilacija, bitna je za njegovu funkciju i stabilnost u fiziološkim i patofiziološkim uvjetima. U fiziološkim stanjima, glikozilacija IgA igra ključnu ulogu u održavanju njegove strukturne cjelovitosti, topljivosti i otpornosti na proteolizu. Kritičan je za pravilan rad SIgA, koji je glavni imunoglobulin u mukoznim sekretima kao što su slina, suze i crijevne tekućine. Glikozilacija pomaže SIgA u neutralizaciji patogena i sprječavanju njihovog prijanjanja na površine sluznice, čime igra ključnu ulogu u imunitetu sluznice. U patofiziološkim uvjetima, promjene u obrascima glikozilacije IgA mogu utjecati na progresiju bolesti i imunološke odgovore. Na primjer, kod IgA nefropatije (Bergerova bolest), nenormalna glikozilacija IgA1, posebno smanjena galaktozilacija zglobne regije O-glikana, dovodi do stvaranja imunoloških kompleksa koji se talože u bubrezima, uzrokujući upalu i oštećenje. Slično, promijenjena glikozilacija IgA uočena je u kroničnim infekcijama i upalnim bolestima, utječući na njegove zaštitne funkcije i doprinoseći patologiji bolesti. Sve u

svemu, glikozilacija IgA ključna je za njegovu normalnu funkciju u imunološkoj obrani, a promjene u tom procesu mogu imati značajne implikacije na razvoj i napredovanje bolesti.¹⁹

2.4. Imunoglobulin G

Urođeni i stečeni imunološki sustav dva su primarna dijela ljudskog imunološkog sustava. Kao odgovor na invaziju patogena, urođeni imunitet nudi brzu, nespecifičnu zaštitu i pokreće adaptivni imunitet, sofisticiraniji obrambeni mehanizam. Bitna komponenta adaptivnog imunološkog sustava koji se razvio za obranu ljudi od infekcija je imunoglobulin G ili IgG. S obzirom da je IgG protutijelo uključeno u brojne procese povezane s imunološkim sustavom, može se pretpostaviti da je IgG uključen u širok raspon patologija, uključujući autoimune, upalne, karcinomske, kardiometaboličke i neurodegenerativne bolesti. Također, jedan je od najzastupljenijih proteina u ljudskom serumu koji čini između 10 % i 20 % proteina plazme.⁵

Glikozilacija je primarni faktor koji utječe na funkciju, stabilnost, poluživot, strukturu i aktivnost IgG. IgG glikani igraju ključnu ulogu u modulaciji imunološkog odgovora djelujući kao prekidač između proupalnih i protuupalnih stanja molekule IgG. Ovaj mehanizam pomaže regulirati odgovor imunološkog sustava na različite patogene i održavati ravnotežu između upale i imunološke tolerancije. Imunoglobulin G je građen na sljedeći način. IgG antitijela su molekule u obliku slova Y sastavljene od dvije glavne regije: Fab regije i Fc regije. Dva identična teška lanca i dva identična laka lanca, svaki s dvije jedinstvene domene (varijabilna (V) i konstantna (C) domena), kombiniraju se da bi formirali strukturu IgG u obliku slova „Y“ (Slika 4). Postoje dvije domene u lakom lancu: konkretno, VL i CL, dok četiri domene čine teški lanac, VH, CH1, CH2 i CH3.^{21,22}



Slika 4. Osnovna struktura IgG: dva teška lanca (plavo), dva laka lanca (cijan) i mjesto N-glikozilacije (crveni krugovi). (preuzeto i prilagođeno iz ref. 22)

Fab regija sastoji se od:²²

1. Varijabilno lagane (engl. *Variable Light*, VL) i varijabilno teške (engl. *Variable Heavy*, VH) domene:
 - VL domena: dio lakog lanca.
 - VH domena: dio teškog lanca.
 - Ove varijabilne domene nalaze se na vrhovima strukture u obliku slova Y i ključne su za vezanje antigena.
 - VL i VH domene zajedno tvore mjesto vezanja antigena, koje je vrlo varijabilno kako bi se omogućilo antitijelu da se specifično veže na širok raspon antigena.
2. Konstantno lake (engl. *Constant Light*, CL) i konstantno teške 1 (engl. *Constant Heavy 1*, CH1) domene:
 - CL domena: dio lakog lanca, uz VL domenu.
 - CH1 domena: dio teškog lanca, uz VH domenu.
 - Ove konstantne domene pružaju strukturnu potporu varijabilnim domenama i pomažu stabilizirati mjesta vezanja antigena.

Fc regija:²²

1. CH2 i CH3 domene:
 - Fc regija obuhvaća konstantne regije teških lanaca, posebno CH2 i CH3 domene.
 - CH2 domena: nalazi se odmah ispod zglobne regije (fleksibilni dio koji povezuje Fab i Fc regije). CH2 domena je uključena u vezanje na proteine komplementa.
 - CH3 domena: nalazi se na dnu strukture u obliku slova Y i igra ključnu ulogu u vezanju na Fc receptore na imunološkim stanicama.

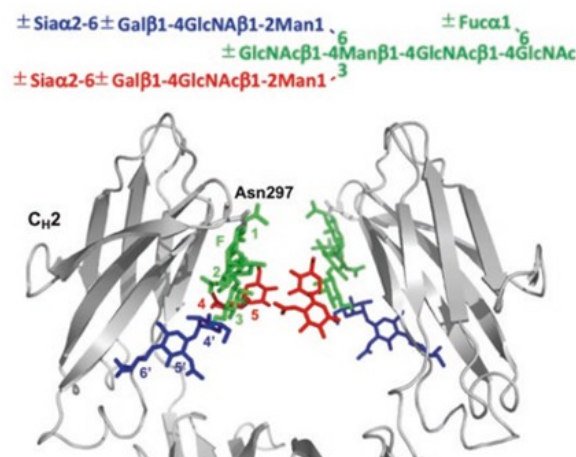
Funkcionalne uloge:²²

1. Fab regija (VL i VH domene):
 - Prepoznavanje antigena: VL i VH domene tvore paratope, specifični dio antitijela koji se veže na epitop antigena.
 - Specifičnost i raznolikost: Sekvence aminokiselina u domenama VL i VH uvelike variraju među različitim antitijelima, što omogućuje raznolik raspon prepoznavanja antigena.
2. Fc regija (CH2 i CH3 domene):

- Efektorske funkcije: CH2 i CH3 domene posreduju u interakcijama s različitim komponentama imunološkog sustava, kao što su Fc receptori na imunološkim stanicama i proteini komplementa.
- Aktivacija imunološkog odgovora: Vežanje za Fc receptore na stanicama poput makrofaga, neutrofila i stanica prirodnih ubojica (engl. *Natural Killer Cells*, NK) može potaknuti fagocitozu, ADCC i druge imunološke odgovore.
- Aktivacija komplementa: CH2 domena se posebno može vezati na C1q, prvu komponentu klasičnog puta komplementa, što dovodi do aktivacije komplementa i daljnjih imunoloških odgovora.

Ove strukturne značajke omogućuju IgG antitijelima da učinkovito identificiraju i pomognu u eliminaciji patogena, dok također uključuju i koordiniraju različite komponente imunološkog odgovora.

IgG je podijeljen u mnoge potklase (IgG1-4 kod ljudi); usprkos tome, Fc fragmenti svih podklasa imaju jedno očuvano mjesto *N*-glikozilacije (Asn297) u svakoj CH2 domeni. Dva *N*-glikana smještena su između dvije CH2 domene, pokazujući mikroheterogenost (Slika 5) zbog varijacija u prisutnosti ili odsutnosti nereducirajuće terminalne fukoze, galaktoze i/ili sijalinske kiseline.²²



Slika 5. Kristalna struktura ljudskog IgG1-Fc fragmenta. Šareni oligosaharidi koji su povezani s Asn297 u crvenoj (Manα1-3 antena), plavoj (Manα1-6 antena) i zelenoj (dio sržne strukture *N*-glikana) boji. Oznake i značenja: *N*-acetilglukozamin (GlcNAc); galaktoza (Gal); manoza (Man); fukoza (Fuc); i sijalinska kiselina (Sia). (preuzeto iz ref. 22)

N-glikozilacija IgG utječe na njegove Fc-posredovane efektorske funkcije utječući na afinitet za C1q i FcγRs. Deglikozilirani IgG-Fc ima smanjeni afinitet vezanja, što je povezano s konformacijskim promjenama u CH2 domenama, što je dokazano simulacijama molekularne dinamike, kristalnim strukturama i drugim biofizičkim tehnikama. Te promjene rezultiraju otvorenijom strukturom, smanjujući stabilnost i sposobnost vezanja Fc regije. Slično, *N*-glikani na Asn 394 IgE-Fc ključni su za održavanje strukturnog integriteta potrebnog za interakcije receptora visokog afiniteta.²²

Glikozilacija IgG na Asn 297 kritična je za njegove efektorske funkcije, utječući na imunološke odgovore i pod fiziološkim i patofiziološkim uvjetima. U normalnim fiziološkim stanjima, *N*-glikozilacija na ovom mjestu osigurava pravilno savijanje i strukturnu stabilnost molekule IgG. Povećava afinitet vezanja IgG za Fcγ receptore na imunološkim stanicama i C1q, pokrećući procese poput ADCC i aktivacije komplementa, koji su vitalni za imunološku obranu od patogena. U patofiziološkim uvjetima, promjene u uzorcima glikozilacije IgG mogu značajno utjecati na njegovu funkciju. Kod autoimunih bolesti kao što su reumatoidni artritis i sistemski eritematozni lupus često dolazi do porasta agalaktoziliranog IgG (bez ostataka galaktoze). Ovaj oblik IgG je proupalni jer se lakše veže na lektin koji veže manozu, aktivirajući sustav komplementa i doprinoseći kroničnoj upali i oštećenju tkiva. Nasuprot tome, određene infekcije i karcinomi mogu dovesti do proizvodnje hipoglikoziliranog IgG, koji može imati smanjene efektorske funkcije, ugrožavajući imunološki odgovor. Dodatno, u kroničnim upalnim stanjima, promijenjena glikozilacija može modulirati imunološku regulaciju, potencijalno utječući na napredovanje i ozbiljnost bolesti.²² Sveukupno, status glikozilacije IgG ključna je odrednica njegove funkcije, utječući i na zaštitne imunološke odgovore i na patološke procese. Razumijevanje ovih promjena glikozilacije može pružiti uvid u mehanizme bolesti i potencijalne terapijske ciljeve.

2.5. Korištene tehnologije u istraživanju *N*-glikoma

HT glikomika se oslanja na brojne metode koje se primjenjuju za profiliranje glikana, obično na razini oslobođenih glikana ili glikopeptida. Tehnologije, kao što su tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti s fluorescencijskom detekcijom (engl. *Ultra high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*, UHPLC-FLD) i tekućinska kromatografija–masena spektrometrija (engl. *Liquid chromatography–mass spectrometry*, LC-MS), nude različite prednosti i daju komplementarne informacije. Dok pripreme uzoraka

općenito slijede slične principe, svaka od ovih tehnologija treba određene jedinstvene analitičke postavke i faze obrade podataka kako bi se pružili robusni i pouzdani rezultati.¹⁰

2.5.1. Tekućinska kromatografija

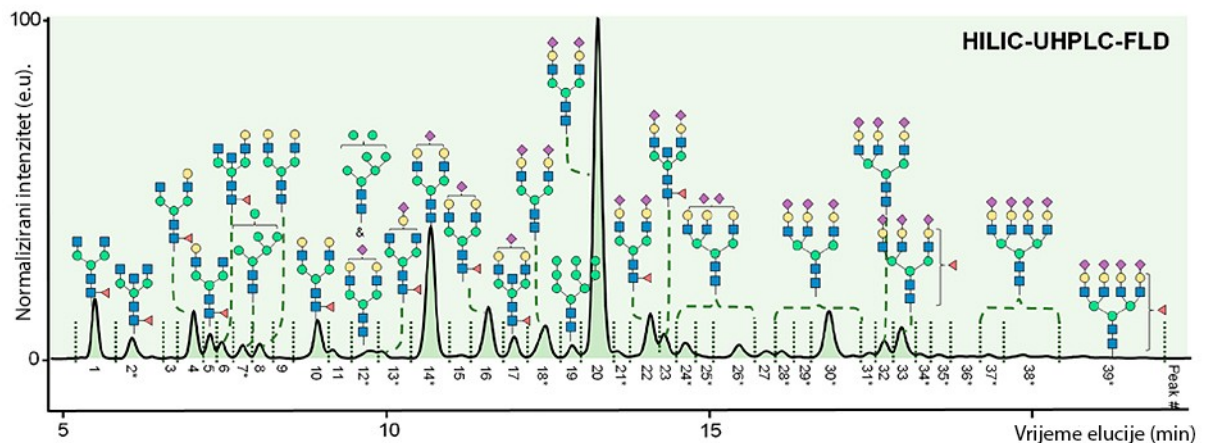
Tekućinska kromatografija (engl. *Liquid chromatography*, LC) je analitička tehnika koja se intenzivno koristi u raznim znanstvenim područjima, uključujući kemiju, biokemiju, farmaciju, znanost o okolišu itd. To je svestrana metoda odvajanja koja omogućuje analizu i pročišćavanje složenih smjesa s visokom preciznošću i osjetljivošću. Ona uključuje odvajanje komponenti unutar uzorka na temelju njihove interakcije sa stacionarnom i mobilnom fazom. Stacionarna faza, obično pakirana u kolonu, može se sastojati od različitih materijala kao što su silicij, polimeri ili vezane faze prilagođene specifičnim primjenama. Mobilna faza, tekuće otapalo ili smjesa, nosi uzorak kroz kolonu. Jedna od ključnih značajki tekućinske kromatografije je njezina sposobnost odvajanja komponenti na temelju njihovog različitog afiniteta za stacionarnu i mobilnu fazu. Ovo odvajanje se postiže ravnotežom interakcijom uključujući adsorpciju, raspodjelu, ionsku izmjenu, isključenje veličine i interakcije afiniteta, ovisno o korištenom kromatografskom načinu. Tekućinska kromatografija nudi širok raspon načina odvajanja za prilagođavanje različitim analitima i primjenama. To uključuje:¹⁰

1. Kromatografija reverzne faze (engl. *Reverse Phase Chromatography*, RPC): Kod RPC stacionarna faza je nepolarna, dok je mobilna faza polarna. Ovaj način se široko koristi za odvajanje hidrofobnih spojeva kao što su lijekovi, lipidi i peptidi.
2. Kromatografija normalne faze (engl. *Normal Phase Chromatography*, NPC): NPC koristi polarnu stacionarnu fazu i nepolarnu mobilnu fazu. Obično se koristi za odvajanje polarnih spojeva kao što su ugljikohidrati, aminokiseline i prirodni proizvodi.
3. Kromatografija ionske izmjene (engl. *Ion-Exchange Chromatography*, IEC): IEC odvaja analite na temelju njihovih interakcija naboja sa stacionarnom fazom, koja sadrži nabijene funkcionalne skupine. Vrijedan je za odvajanje iona, proteina i nukleinskih kiselina.
4. Kromatografija isključenja veličine (engl. *Size Exclusion Chromatography*, SEC): SEC odvaja analite na temelju njihove veličine i molekularne težine. Veće molekule eluiraju brže jer su isključene iz ulaska u pore stacionarne faze, dok se manje molekule zadržavaju duže.

5. Afinitetna kromatografija: Ovaj način rada koristi specifične interakcije između liganda imobiliziranog na stacionarnoj fazi i ciljanog analita. Afinitetna kromatografija naširoko se koristi za pročišćavanje proteina i izolaciju biomolekula.

Tekućinska kromatografija može se spojiti s različitim tehnikama detekcije za analizu odvojenih komponenti, uključujući ultraljubičasto-vidljivu (engl. *Ultraviolet-Visible*, UV-Vis) spektroskopiju, fluorescencijsku detekciju, masenu spektrometriju (engl. *Mass spectrometry*, MS) i detekciju indeksa loma, između ostalog. Ove metode detekcije povećavaju osjetljivost i selektivnost, omogućujući identifikaciju i kvantifikaciju analita s velikom točnošću. Uz svoje analitičke mogućnosti, tekućinska kromatografija igra ključnu ulogu u preparativnoj kromatografiji, gdje se koristi za pročišćavanje i izolaciju spojeva u velikim količinama za daljnje primjene.¹⁰

Postoji nekoliko različitih HT metoda za analizu *N*-glikana, a najčešće se koristi HILIC-UHPLC-FLR) (Slika 6). Dok su radni tijekovi pripreme glikana u 1970-ima i 1980-ima obično zahtijevali velike količine početnog materijala, dugotrajno vrijeme za pripremu uzorka i dugotrajne analize, tekuća kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) je postala jedna od najpouzdanijih HT tehnologija korištenih za analizu glikana zahvaljujući napretku u primjenjenoj kemiji, minijaturizaciji reakcijskih volumena i tehnologiji kolonskih čestica. UHPLC je preferirana tehnika za proučavanje glikozilacije proteina s prethodno identificiranim glikanskim strukturama. UHPLC se može koristiti s drugim tehnikama, poput spektrometrije masa, za karakterizaciju jedinstvene strukture glikana i dobivanje daljnjih strukturnih informacija.²³

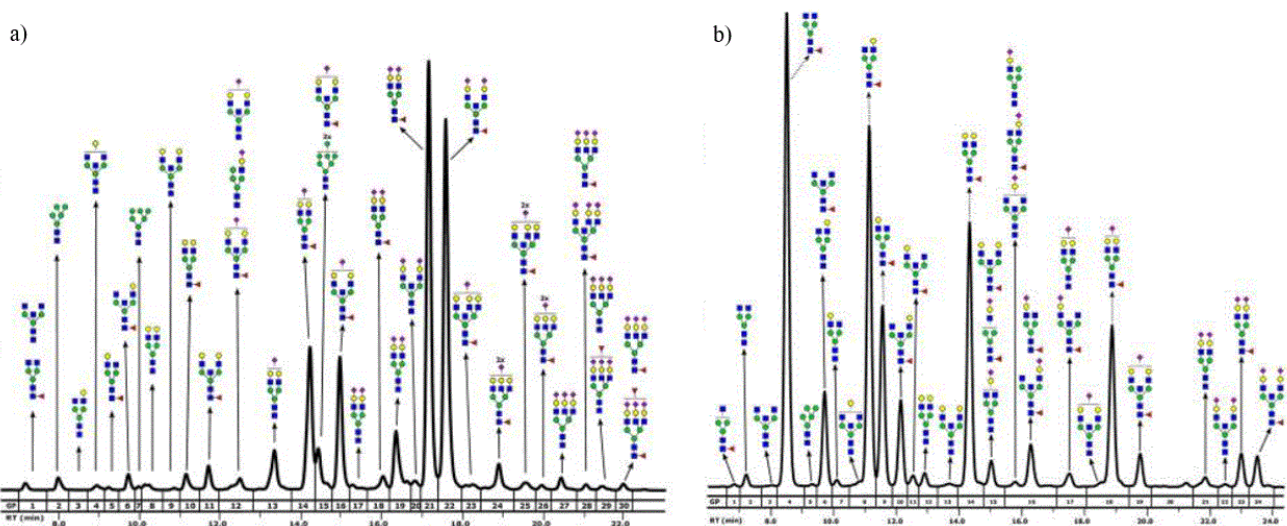


Slika 6. Prikazan je kromatogram fluorescentno (2-aminobenzamid, 2-AB) obilježenih *N*-glikana ukupnih serumskih proteina dobiven HILIC-UHPLC-FLR analizom. *Nekoliko kromatografskih pikova sadrži više različitih *N*-glikana; prikazana je najzastupljenija struktura.¹⁰ (preuzeto iz ref.10)

Na slici 7 su prikazani kromatogrami koji pokazuju raspodjelu *N*-glikana na imunoglobulinima G (IgG) i A (IgA). Svaki pik na kromatogramima predstavlja specifične glikanske strukture, koje su vizualno predstavljene iznad odgovarajućih pikova. U IgG kromatogramu najistaknutiji su pikovi koji odgovaraju kompleksnim biantennarnim glikanima s ili bez fukoze, dok su u IgA kromatogramu dodatno prisutni povišeni pikovi koji odgovaraju strukturama s više sijalinske kiseline. Ova analiza pomaže u razumijevanju različitih obrazaca glikozilacije između IgG i IgA.²⁴

HILIC-UPLC-FLR kromatogrami prikazuju raspodjelu *N*-glikana na imunoglobulinima G (IgG) i A (IgA), ističući specifične glikanske strukture koje su prisutne na ovim važnim komponentama imunološkog sistema. U kromatogramu IgG-a, primjećuju se pikovi koji predstavljaju osnovne glikanske strukture, poput G0F, koji označava agalaktosilirani glikan bez galaktoze, ali s prisutnom fukozom. Ova struktura je često povezana s proinformativnim aktivnostima i može ukazivati na određene bolesti, poput autoimunih poremećaja. Drugi pikovi, kao što su G1F i G2F, prikazuju glikane sa jednim ili dva ostatka galaktoze i fukoze. Ovi glikani igraju ključne uloge u moduliranju imunoloških odgovora, pri čemu povećana galaktozacija često ima antiinformativne efekte, pomažući u neutralizaciji upalnih procesa. Prisutnost sijaliliziranih glikana, poput G1FS i G2FS, ukazuje na dodatnu modifikaciju koja može produžiti poluživot IgG u cirkulaciji i poboljšati njegove antiinformativne osobine.^{24,25}

S druge strane, kromatogrami IgA prikazuju veću raznolikost glikanskih struktura, uključujući monofosforilirane, bisialilirane i trisialilirane glikane, koji sadrže jednu, dvije ili tri molekule sijalinske kiseline. Ovi pikovi su ključni za specifične funkcije IgA, posebno u kontekstu mukoznog imuniteta. Na primjer, višesijalilizirani glikani, kao što su oni predstavljeni pikom A5, povećavaju hidrofilitnost i stabilnost IgA, čime se poboljšava njegova sposobnost vezivanja za receptore na mukoznim površinama i neutralizacija patogena. Fukozilirani glikani u IgA, prikazani pikovima kao što su A1F i A2F, omogućavaju specifične interakcije s receptorima na imunološkim stanicama, što dodatno modulira imunološki odgovor na mukoznim barijerama.^{24,25}



Slika 9. Reprezentativni HILIC-UPLC-FLR kromatogrami *N*-glikana a) imunoglobulina A i b) imunoglobulina G, s grafičkim prikazom najzastupljenije glikanske strukture koja odgovara svakom glikanskom pik (GP).²⁴

Uporedna analiza kromatograma imunoglobulina G (IgG) i A (IgA) otkriva značajne razlike u njihovim glikanskim strukturama, što odražava njihove specifične biološke uloge.²⁵

1. Raznolikost glikozilacije: IgA pokazuje veću raznolikost u glikozilaciji u odnosu na IgG, s izraženom prisutnošću sialilizacije i fosforilacije. Ova raznolikost omogućava IgA-u da efikasno funkcioniše na mukoznim membranama, gde je ključan za zaštitu sluzokože. Visoka sialilizacija i fosforilacija u strukturama IgA omogućavaju mu prilagođavanje specifičnim potrebama na mukoznim površinama, štiteći organizam od patogena na ovim ključnim mestima. IgG, s druge strane, karakteriše manja raznolikost glikanskih

struktura, s dominacijom biantennarnih, fukoziliranih glikana. Ove strukture su uglavnom odgovorne za modulaciju sistemskog imunološkog odgovora, posebno u upalnim procesima. Iako je IgG manje raznolik u glikozilaciji, njegove glikanske strukture optimizovane su za cirkulaciju i odbranu od patogena u krvi.

2. Sialilizacija: IgA sadrži više sialiliziranih glikana, što mu daje snažna antiupalna svojstva i povećava stabilnost u različitim telesnim tečnostima, kao što su sluz i sekretne tečnosti na mukoznim površinama. Visoka sialilizacija je ključna za zaštitnu funkciju IgA jer omogućava bolju interakciju s patogenima i receptorima na stanicama imunološkog sistema, čime se doprinosi efikasnosti u zaštiti mukoznih barijera. Nasuprot tome, IgG ima niži nivo sialilizacije, što se odražava na njegove uloge u prozapalnim i antiupalnim procesima. Sialilizacija kod IgG-a ima manji uticaj na stabilnost molekula u krvi, ali ipak može igrati ulogu u modulaciji imunoloških odgovora, posebno kod upalnih bolesti.
3. Fukozilizacija: izraženija je kod IgA, što omogućava specifične interakcije s receptorima na ćelijama imunološkog sistema, posebno u mukoznim površinama gde je IgA aktivan. Fukozilirani glikani u IgA ključni su za vezivanje na mukozne receptore i regulaciju lokalnog imunološkog odgovora. Kod IgG-a, fukozilizacija je prisutna, ali u nižim nivoima u poređenju s IgA. Iako nije toliko izražena, fukozilizacija u IgG-u je važna za funkcije u sistemskom imunološkom odgovoru, uključujući modulaciju upalnih reakcija.
4. Fosforilacija: igra važnu ulogu u glikozilaciji IgA-a, što je ključno za njegovu funkciju, posebno u regulaciji imunoloških odgovora na mukoznim membranama. Ova modifikacija doprinosi stabilnosti i funkcionalnosti IgA, omogućavajući efikasnije obavljanje uloga u zaštiti sluzokože. Nasuprot tome, IgG nije značajno fosforiliran, što znači da fosforilacija ne igra ključnu ulogu u njegovim funkcijama. Glikozilacija IgG-a više se fokusira na sialilizaciju i fukozilizaciju, koje su ključne za njegove sistemske funkcije u krvotoku i imunološkom odgovoru.

Sve u svemu, IgA i IgG posjeduju različite glikanske profile koji su precizno prilagođeni njihovim specifičnim ulogama u organizmu. IgA je optimiziran za mukoznu imunost kroz raznoliku i sialiliziranu glikozilaciju, dok IgG, s manje raznolikom glikozilacijom, igra ključnu ulogu u sistemskoj cirkulaciji i odgovoru na upalne procese.²⁵

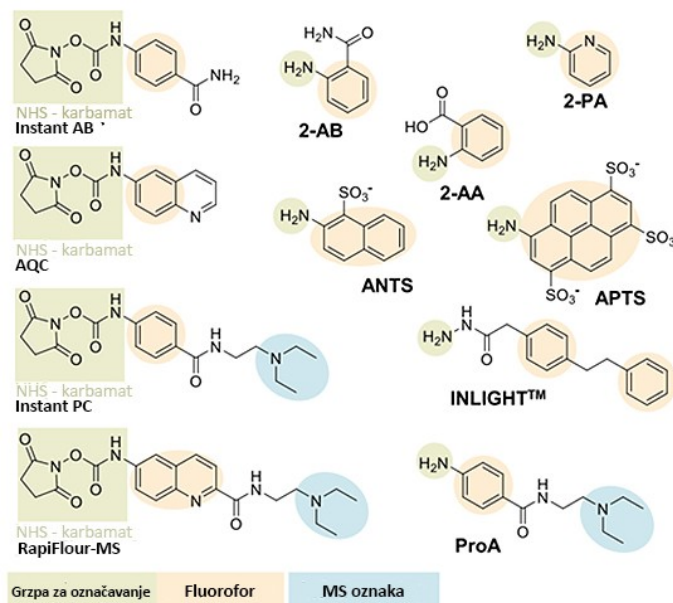
2.5.2. Priprema uzorka

Budući da se UHPLC često koristi za analizu oslobođenih glikana, glikani se prvo moraju osloboditi od svog proteinskog nosača kako bi se mogli odvojiti i detektirati. Enzim koji se najčešće koristi u HT ispitivanjima je endoglikozidaza peptidna-*N*-glikozidaza F (eng. *Peptide-N-glycosidase F*, PNGaza F). Obično se koristi za izvođenje enzimske deglikozilacije uzoraka. Fluorescentno označavanje otpuštenih glikana, proces čišćenja i kromatografska analiza također se često koriste u pripremi uzoraka. Treba napomenuti da, iako se PNGaza F često koristi u analizi oslobođenih *N*-glikana, čini se da je manje učinkovita u oslobađanju vrlo skraćених *N*-glikana koji su, na primjer, uglavnom sastavljeni od kitobioze ili jednog *N*-acetilglukozamina. Povremeno, korak čišćenja dodaje se nakon deglikozilacije kako bi se povećala učinkovitost reakcije fluorescentnog obilježavanja.²⁶

Od najranijih HT istraživanja provedenih na razini od tisuću uzoraka, 2-aminobenzamid (engl. *2-aminobenzamide*, 2-AB) je bio fluorescentni marker koji se najčešće koristio. Nije ga lako ionizirati, što otežava upotrebu za MS karakterizaciju obilježenih *N*-glikana čak i ako proizvodi jake fluorescentne signale. Prokainomid A ili 4-amino-*N*-[2-(dietilamino)etil]benzamid (engl. *Prokainamide A*, ProA), 6-aminokinolil-*N*-hidroksisukcinimidil karbamat (AQC) i RapiFluor-MS reagens za oznaku glikana (engl. *RapiFluor-MS Glycan Labeling Reagent*, RapiFluo*r-MS) (Slika 8) su među ostalim oznakama koje se u zadnje vrijeme sve češće koriste.²⁷⁻³⁰ Ove oznake pokazuju ekvivalentnu ili pojačanu fluorescenciju u usporedbi s 2-AB, kao i ionizaciju u slučaju ProA i RapiFluor-MS zbog uvođenja nabijene oznake tercijarnog amina.^{31,32}

Upotreba kemikalija za brzo označavanje kao što su AQC, instant antitijelo (engl. *Instant Antibody*, InstantAB), instant peptidno hvatanje (engl. *Instant Peptide Capture*, InstantPC) i RapiFluor-MS (Slika 8) značajno je poboljšala učinkovitost opisane tehnike. Ove su kemikalije drastično smanjile vrijeme reakcije na samo 5 minuta, što dovodi do brzih procesa analize. Međutim, važno je napomenuti da tehnike brzog označavanja mogu imati ograničenja u pogledu početnih volumena uzorka koji se mogu obraditi, budući da je često potreban veliki višak reagensa za označavanje kako bi se osiguralo da su sve aminske skupine u uzorku učinkovito obilježene (uključujući *N*-glikozilamini, proteinski amini i drugi slobodni amini). Kako bi se riješio ovaj problem, različite hidrofilne stacionarne faze, kao što su hidrofilni filtri u obliku pločica s 96 jažica i ulošci ili ploče na bazi hidrofilnih kuglica^{31,33}, obično se koriste u procesu čišćenja pomoću tekućinske kromatografije s hidrofilnim interakcijama -

ekstrakcija na čvrstoj fazi (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography - Solid Phase Extraction*, HILIC-SPE). Ove stacionarne faze pokazale su uspjeh u uklanjanju viška reagensa i proteina iz ranijih faza pripreme uzorka, čime se poboljšava ukupna kvaliteta i učinkovitost analize. Osim toga, magnetske nanočestice potencijalno se mogu koristiti kao strategija čišćenja.^{32,33}



Slika 8. Strukturni prikaz često korištenih oznaka koje se mogu pričvrstiti na reducirajući kraj glikana. Oznake su slijedeće: 2-aminobenzoijska kiselina (2-AA), 2-aminobenzamid (2-AB) i 2-piridin-aldehid (2-PA), 8-aminopirensko-1,3,6-trisulfonska kiselina (APTS), 8-aminonaftalenski-1,3,6-trisulfonska kiselina (ANTS). (preuzeto iz ref.10)

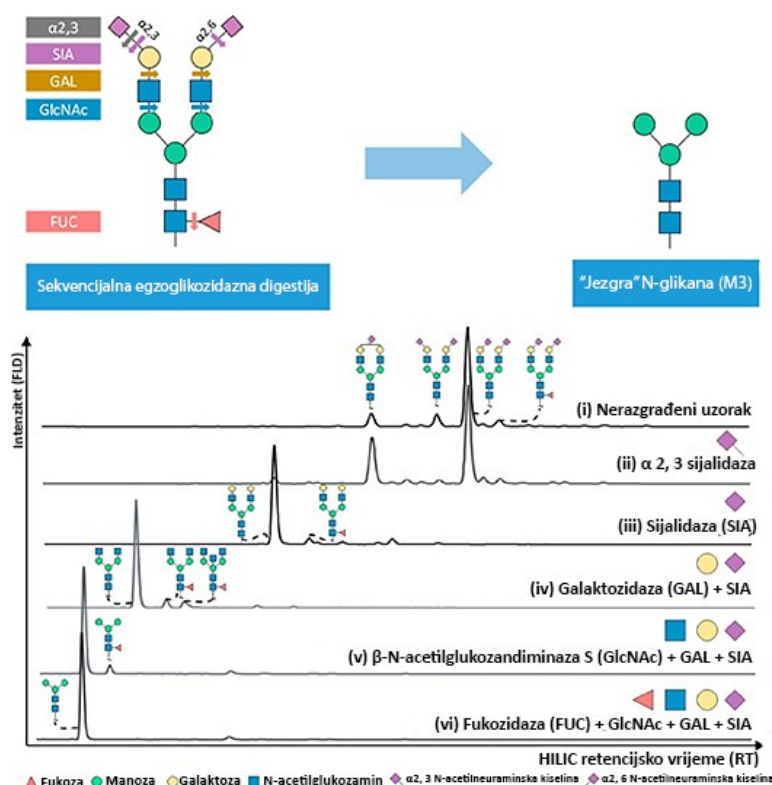
2.5.3. Obrada i mjerenje podataka

Fluorescentno obilježeni glikani često se ispituju u HT modu pomoću LC-a temeljenog na HILIC-u zbog njegovih iznimnih mogućnosti odvajanja polarnih i hidrofilnih analita u vodeno-organskoj mobilnoj fazi. Ovisno o naboju, veličini i vezama vrste *N*-glikana, linearni gradijent s rastućim udjelom od 50 ili 100 mmol dm⁻³ amonijevog formijata u acetonitrilu omogućuje učinkovito odvajanje. Čestice veličine 1,7–1,8 μm u modificiranim ostacima na bazi amida služe kao temelj za kemiju kolone. Napredak u pripremi površine kućišta kolone doveo je do smanjenja interakcija između glikana i metalne površine kolone. Ovo je poboljšalo oblik i ponovljivost pikova, posebno za vrste koje su sialinizirane. Nakon ručne ili automatizirane integracije, količine glikana obično se ekstrahiraju kao relativne postotne

površine pomoću normalizacije ukupne površine. Na kraju se odvija statistička analiza i ispravak serije.¹⁰

2.5.4. Identifikacija glikana

Pojedinačnim glikanskim strukturama razdvojenim pomoću HILIC-UHPLC-FLR dodjeljuju se vrijednosti glukoznim jedinicama (engl. *Glucose Units*, GU) na temelju fluorescentno označene ljestvice dekstrana kao vanjskog standarda, koji se koristi za preliminarnu identifikaciju glikanskih struktura. Vrijednosti GU obično se koriste kao referentne vrijednosti u bazama podataka jer su stabilnije od vremena zadržavanja pojedinačnih glikana na koloni, koje je podložno promjenama uslijed korištenja različitih UHPLC instrumenata i kromatografskih uvjeta tijekom analize. Danas postoji velik broj baza podataka UHPLC glikana s GU vrijednostima koji također sadrže i podatke iz 2-AB obilježenih glikana. Sekvenciranje egzoglikozidazama (podrezivanje glikana korištenjem enzima specifičnih za različite vrste završnih monomera šećera) prethodno je korišteno kao dopunska strategija za obilježavanje specifičnih strukturnih elemenata opaženih na glikanima koji se eluiraju u pojedinačnim kromatografskim pikovima (Slika 9).^{34,35}



Slika 9. Prikaz egzoglikozidazne digestije 2-AB obilježenih *N*-glikana oslobođenih s ljudskog transferina (Tf). (i) Nerazgrađeni uzorak. (ii) Neuraminidaza S (*Streptococcus pneumoniae* α 2–3). (iii) SIA (neuraminidaza A) *Arthrobacter ureafaciens* α 2-3,6,8,9. (iv) *Streptococcus*

pneumoniae β 1-4 galaktozidaza S (GAL) + SIA. (v) *Streptococcus pneumoniae* β -N-acetilglukozaminidaza S (GlcNAc) + GAL + SIA. (vi) GlcNAc + Gal + SIA + fukozidaza O (FUC) iz bakterije *Omnitrophica bacterium* α 1-2,4,6.¹⁰

Važno je zapamtiti da sekvenciranje egzoglikozidazama zahtijeva MS karakterizaciju, koja se može obaviti online spajanjem UHPLC stroja na MS detektor, ili *off-line* nakon prikupljanja kromatografskih pikova. Treba napomenuti da će postavke sekvenciranja egzoglikozidazama možda trebati prilagoditi kako bi se dobili dosljedni rezultati, ovisno o fluorescentnoj oznaci koja se koristi za derivatizaciju oslobođenog glikana. Ovaj je pristup vrlo poželjan za strukturnu karakterizaciju glikana jer, za razliku od spajanja kabilarne elektroforeze (engl. *Capillary Electrophoresis*, CE) na MS, puferi koji se koriste za odvajanje hidrofilne interakcijske tekućinske kromatografije (engl. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC) kompatibilni su s tehnikama ionizacije MS, a nedavno korištene fluorescentne oznake imaju funkcionalne skupine dizajnirane za olakšavanje ionizacije i analize ultra-visokoučinkovite tekućinske kromatografije s masenom spektrometrijom (engl. *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, UHPLC-MS).¹⁰

2.6. Upotreba HT-glikomike u istraživanjima

2.6.1. HT-glikomika u istraživanjima epidemiologije

Pučić i sur. (2011) proveli su prvu opsežnu populacijsku analizu IgG *N*-glikoma koristeći tehniku visoke propusnosti (HT). Odvojili su IgG iz 2298 uzoraka plazme²⁶ i upotrijebili PNGazu F za uklanjanje *N*-glikana povezanih s IgG, nakon čega je uslijedilo označavanje 2-AB. Njihovi su nalazi otkrili da je gotovo 96 % neutralnih IgG glikana fukozilirano u jezgri. IgG *N*-glikani pokazali su manju sijalilaciju u usporedbi s drugim glavnim glikoproteinima plazme, s približno 3 % glikanskih struktura koje su disijalirane (*A2G2S2*). Dodatno, 20 % neutralnih IgG glikana bilo je digalaktozilirano, dok su monogalaktozilirane i α -galaktozilirane strukture činile po 40 %. U prosjeku, 18 % neutralnih glikana sadržavalo je *N*-acetilglukozamin, podijeljen u dva dijela.²⁷

2.6.2. HT-glikomika u istraživanjima genetike

Lauc i sur. (2010) proveli su prvu studiju asocijacije na cijelom genomu (engl. *Genome-wide association study*, GWAS) o *N*-glikomima, otkrivajući poveznice između uobičajenih genetskih varijanti i glikozilacije vezane na protein *N*. Njihovo istraživanje na 2705 osoba iz Škotske i Hrvatske istaknulo je utjecaj varijacija gena *FUT6*, *FUT8* i *HNF1A* na razine *N*-

glikana u plazmi. Naknadna istraživanja potvrdila su ulogu *HNFlA* kao ključnog regulatora fukozilacije proteina plazme.²⁹

Godine 2013. Lauc i sur. proširili su svoj GWAS kako bi istražili genetske lokuse povezane s IgG *N*-glikozilacijom u istim populacijama, identificirajući devet značajnih lokusa za cijeli genom, uključujući gene koji kodiraju glikoziltransferaze i druge povezane s autoimunim i upalnim stanjima.³⁶

Najveću GWAS analizu *N*-glikozilacije IgG do sada objavili su 2020. Klarić i sur. Analizirajući 8.090 uzoraka, identificirali su 27 značajnih lokusa za cijeli genom i šest sugestivnih lokusa, udvostručivši broj u usporedbi s prethodnim studijama. Ova studija otkrila je prethodno neprepoznate lokuse koji utječu na glikozilaciju IgG, naglašavajući složenost mreže glikozilacije.^{37,38}

2.6.3. HT-glikomika u kliničkim istraživanjima

Gudelj i sur. koristili su HILIC-UHPLC-FLD za procjenu karakteristika IgG *N*-glikana kod 179 osoba kojima je dijagnosticiran reumatoidni artritis (engl. *Rheumatoid arthritis*, RA) unutar jednog desetljeća. Suprotno prethodnim nalazima, ova studija nije uspostavila korelaciju između smanjene sijalilacije i galaktozilacije u bolesnika s RA, što sugerira da bi smanjena galaktozilacija mogla biti faktor rizika koji pridonosi razvoju bolesti.³⁹

Trbojević-Akmačić i sur. pokazali su značajne razlike u sastavu IgG *N*-glikoma između bolesnika s Crohnovom bolešću (engl. *Crohn's disease*, CD) i ulceroznim kolitisom (engl. *Ulcerative colitis*, UC) u usporedbi s kontrolama. Koristeći HILIC-UHPLC-FLD, analizirali su IgG *N*-glikom u 320 kontrola, 287 bolesnika s CD-om i 507 pacijenata s UC-om. Dok je sijalizacija IgG bila značajno smanjena u bolesnika s CD-om, i bolesnici s UC i CD-om pokazali su značajno smanjenje galaktozilacije IgG.⁴⁰

3. MATERIJALI I METODE

1.1. Materijali

1.1.1. Materijali u radu

Tablica 1. Prikaz popisa upotrijebljenog materijala u radu.

Materijali	Proizvođači
1 mL AcroPrep wwPTFE 0,2 µm filter pločice	Pall Corporation, SAD
1 mL AcroPrep wwPTFE 0,45 µm filter pločice	Pall Corporation, SAD
Armadillo PCR Plate, 96-well, PCR pločice	Thermo Scientific, SAD
Pločica monolita s proteinom G (CIM® r-Protein G LLD 0.2 mL Monolithic 96-well Plate, 2 µm channels)	BIA Separations (dio Sartoriusa, SAD), Slovenija
Pločice za sakupljanje, zapremina 1 i 2 mL (engl. <i>96-well collection plates</i>)	Waters, SAD
CaptureSelect™ IgA afinitetna zrnca	Thermo Scientific, SAD
Filteri za pufere (Nalgene™ Rapid-Flow™, 0,2 µm)	Thermo Scientific, SAD
LTS tipsevi za pipete (Rainin Instrument)	Mettler Toledo, SAD
Aluminijska termalna ljepljiva folija	Porvair Sciences, SAD
Samoljepljiva folija	LLG Labwane, Njemačka
Mikrotubice (1,5-5 mL)	LLG Labwane, Njemačka
Tube za centrifugiranje (15-50 mL)	LLG Labwane, Njemačka
Kromatografska kolona Acquity UPLC BEH Glycan 1.7µm 2.1x150mm	Waters, SAD

1.1.2. Enzimi i kemikalije

Tablica 2. Prikaz popisa korištenih enzima i kemikalija u radu.

Enzim	Proizvođač
PNGaza F (10 U µL ⁻¹)	Promega, SAD
Kemikalije	Proizvođač
Natrijev klorid	Alkaloid, Sjeverna Makedonija
Kalijev klorid	Sigma, SAD

Acetonitril (ACN), HPLC razina čistoće	CARLO ERBA Reagents, Italija
Dimetilsulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich, SAD
Klorovodična kiselina (37%)	Honeywell Fluka, Švicarska
2-pikolin boran	Aldrich, SAD
Propan-2-ol	CARLO ERBA Reagents, Italija
Igepal® CA 360	Sigma-Aldrich, SAD
Amonijev bikarbonat	Sigma-Aldrich, SAD
Ledena octena kiselina	Lab Expert, UK
Natrijev hidroksid	Merck, Njemačka
SDS (natrijev dodecil sulfat)	Carl Roth GmbH + Co., Njemačka
Formična kiselina	Merck, Njemačka
TRIS pufer	AppliChem GmbH, Njemačka
MilliQ voda R = 18.2 Ω	Merck, Njemačka
Etanol 99,8 %	CARLO ERBA Reagents, Italija
Prokainamid	Acros Organics B.V.B.A., SAD

1.1.3. Instrumenti i dodatni pribor

Tablica 3. Prikaz popisa upotrijebljenih instrumenata i dodatnog pribora u radu.

Instrument i dodatni pribor	Proizvođač
Analitička vaga (Explorer®)	OHAUS, SAD
Tehnička vaga	Mettler Toledo, SAD
Magnetska miješalica	IKA RTC basic, Njemačka
pH metar Seven Compact, Five Easy	Mettler Toledo, SAD
Vodikova elektroda	Mettler Toledo, SAD
Milli-Q® Type 1 Ultrapure Water Systems (uređaj za ultra-čistu vodu)	Merck, Njemačka
Pipete-Lite XLS (automatske mikropipete, jednokanalne i multikanalne)	Rainin (Mettler Toledo), SAD
SpeedVac Concentrator SC210A (vakuumski koncentrator)	Thermo Scientific, SAD
Vacuum manifold (vakuusko odsisavanje pločica)	Pall Corporation, SAD
Vakumska pumpa	Pall Corporation, SAD
Centrifuga	Eppendorf, SAD
Inkubator (DNI-50, 37° C)	MRC, Izrael
Pećnica (DNO-50, 65° C)	MRC, Izrael
Tresilica	GFL, Njemačka
Termo siler	Micro ^{TS} , UK
NanoDrop 8000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, SAD
ACQUITY Premier System UPLC H-Class Plus (tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti)	Waters, SAD

1.1.4. Priprema pufera i otopina

Tablica 4. Priprema otopina i pufera za daljnju upotrebu u analizi IgG i IgA.

Otopine	Priprema
---------	----------

10x fosfatno-puferirana fiziološka otopina (PBS), pH=6,6, neutralizacijski pufer	Naziv soli	c (mmolL⁻¹)	γ (g L⁻¹)
	KCl	2,65	1,976
	KH ₂ HO ₄	2,18	2,964
	NA ₂ HO ₄	9,74	13,832
	NaCl	137,94	80,028
	Priprema 1 L pufera: Soli se otope u 800 mL ultračiste vode. Mjeri se pH otopine i s pomoću 1 mol dm ⁻³ NaOH prilagodi do 6,6. Otopinu se nadopuni s ultračistom vodom do 1 L i zatim profiltrira kroz Buchnerov lijevak. Otopina se pohranjuje na sobnu temperaturu.		
10x PBS, pH=7,4, vezujući pufer			
1x PBS 0,25 mol dm ⁻³ NaCl, pH=7,4, pufer za ispiranje	Priprema 1 L pufera: Otopina 10x PBS razrijedi se u omjeru u 1:10 (v/v). U 100 mL 10x PBS potrebno je dodati ultračistu vodu do 0,9 L. Zatim prilagoditi pH do 7,4 s 1 mol dm ⁻³ NaOH. Otopina se pohranjuje na 4 °C.		
0,1 mol dm ⁻³ formična kiselina, pH=2,5, elucijski pufer	Priprema 500 mL pufera: Dodati 1,89 mL pufera u 400 mL ultračiste vode. Zatim izmjeriti pH otopine i nadopuniti s ultračistom vodom do finalnog volumena od 500 mL. Otopina se pohranjuje na 4 °C.		
1 mol dm ⁻³ amonijev bikarbonat, neutralizacija eluata	Priprema 250 mL pufera: Dodati 19,77 g pufera u 250 mL ultračiste vode. Otopinu nije potrebno filtrirati niti izmjeriti pH vrijednost. Otopina se pohranjuje na 4 °C.		
20 % EtOH u 20 mmol dm ⁻³ 2-amino-2-(hidroksimetil)propan-1,3-diol (TRIS) (Mr = 121, 14 g mol ⁻¹) + 0,1 mol dm ⁻³ NaCl, pH=7,4, pufer za skladištenje	Naziv soli i baze	c (mmol L⁻¹)	γ (g L⁻¹)
	NaCl	137,94	80,028
	TRIS	0,02	2,42
	Priprema 1 L pufera: Potrebno je otopiti soli u 200 mL etanola. Dodati ultračistu vodu do 700 mL i prilagoditi pH od □ 10 do 7,4 pomoću 1 mol dm ⁻³ HCl. Nadopuniti ultračistom vodom do finalnog volumna od 1 L. Otopina se zatim profiltrira i pohranjuje na 4 °C.		
0,1 mol dm ⁻³ NaOH	Priprema 500 mL otopine: Potrebno je otopiti 2 g NaOH u 500 mL ultračiste vode. Otopina se zatim profiltrira i pohranjuje na sobnu temperaturu.		
30 % (v/v) propan-2-ol	Priprema 500 mL otopine: Pomiješati 150 mL 2-propanola i 350 mL ultračiste vode. Otopina se zatim profiltrira i pohranjuje na 4 °C.		
1,33 % natrijev dodekan-1-sulfonat (SDS)	Priprema 100 mL otopine: Otopiti 1,33 g SDS-a u 100 mL ultračiste vode. Potrebno je pohraniti otopinu na 4 °C.		
4 % 2-[2-[4-(2,4-dimetilheptan-3-il)fenoksi]etoksi]etanol (Igepal)	Priprema 50 mL otopine: Dodati 2 mL Igepala u 48 mL ultračiste vode. Otopinu dobro promiješati i pohraniti na 4 °C.		
5x PBS	Priprema 500 mL pufera: Otopina 10x PBS razrijedi se u omjeru u 1:2 (v/v). U 250 mL 10x		

	PBS potrebno je dodati ultračistu vodu do 500 mL. Zatim prilagoditi pH do 7,4 s 1 NaOH mol dm ⁻³ . Potrebno je pohraniti otopinu na 4 °C.
70 % etanol	Priprema 50 mL otopine: Pomiješati 35 mL etanola i 15 mL ultračiste vode. Uvijek je potrebno pripremiti svježu otopinu.

1.1.5. Ispitanici i uzrokovanje

U ovom istraživanju korišteni su uzorci ljudske krvne plazme skalupljeni u ožujku 2020. u Genosu. Za provođenje istraživanje dobivena je etička dopusnica EP-1/2020 Etičkog povjerenstva Genos d.o.o. Svi ispitanici su bili upoznati s istraživanjem te su potpisali informirani pristanak.

U istraživanju je sudjelovalo 3 muškarca prosječne starosti 36,67 godina u rasponu od 25 do 47 godina te 5 žena prosječne starosti 31,80 godina u rasponu od 25 do 47 godina. Ispitanici su izjavili da u trenutku uzorkovanja nisu bili akutno bolesni.

1.2. Metode

1.2.1. Izolacija IgG iz krvne plazme pomoću protein G pločice

1.2.1.1. Priprema uzoraka plazme i plazme standarda

Protein G pločica i otopine pufera stave se na sobnu temperaturu pola sata. Uzorke plazme potrebno je staviti da se odmrznu te zatim vorteksiraju i centrifugiraju kako bi došlo do odvajanja lipida i to na 3 minute na 12045g pomoću Eppendorf MiniSpin Centrifuge, rotor F-45-12-11 (13 400 okretaja/min). Randomizacija uzoraka provodi se nasumičnim odabirom jažica u koje se dodaju standardni uzorci plazme i slijepa proba, čime se minimizira utjecaj sistematskih varijacija i osigurava nepristrana distribucija uzoraka za daljnju analizu. U nasumično odabrane jažice pločice za sakupljanje nanosi se 25 µL standardnog uzorka plazme i 25 µL 1x PBS koji služi kao slijepa proba. Zatim se razrijede dodavanjem 175 µL 1x PBS u omjeru 1:7 (v/v), nakon čega se pažljivo prenose na 1 mL AcroPrep wwPTFE 0,45 µm filter pločicu. Plazma se zatim filtrira i sakuplja u čisti 1 mL pločicu za sakupljanje koristeći uređaj za filtraciju pomoću vakuuma. Pločica za sakupljanje ostavlja se na tresilici sve dok uzorci ne budu spremni za nanošenje razrijeđene i filtrirane plazme na pločicu s monolitom obloženim proteinom G.

1.2.1.2. Pre-kondicioniranje Protein G pločice

Protein G pločica se upotrebljava u nekoliko navrata, a kada se ne upotrebljava pohranjuje se u hladnjak na 4 °C. Čuva se u puferu za skladištenje (20 % (v/v) etanol u 20

mmol dm⁻³ TRIS i 1 mol dm⁻³ NaCl). Prije samog korištenja monolitne pločice, potrebno ju je pre-kondicionirati na način da se ukloni pufer za skladištenje i isperu jažice pomoću 0,5 mL ultračiste vode i 0,5 mL 1x PBS. Zatim se jažice ispiru s 0,25 mL 0,1 mol dm⁻³ formičnom kiselinom kako bi se eluirali zaostali proteini od prošle izolacije. Pločica se neutralizira s 0,5 mL 10x PBS puferom. Tijekom postupka pre-kondicioniranja Protein G pločice vakuum ne smije prijeći 10 inHg. Na kraju se monolitna pločica ekvilibrira s 1 mL 1x PBS pufera nakon čega je opet spremna za upotrebu.

1.2.1.3. Vežanje IgG na protein G i ispiranje

Filtrirana plazma s tresilice se pomoću mikropipete prenese na Protein G pločicu kako bi došlo do vezanja IgG-a na protein G. Tijekom nanošenja uzoraka, vakuum ne smije prijeći 5 inHg. Odsisanu plazmu smo sakupili u 2 mL pločice za sakupljanje. Zatim je na kraju potrebno isprati jažice po tri puta s 0,5 mL 1x PBS pufera pri čemu vakuum nesmije prijeći 10 inHg.

1.2.1.4. Elucija IgG

Prije eluiranja, u svaku jažicu pločice za skladištenje volumena 1 mL dodaje se 42,5 mL neutralizacijskog pufera (1 mol dm⁻³ amonijev bikarbonat) kako bi se onemogućila desijalinizacija IgG glikana u kiselom mediju. Zatim se ispod pločice za skladištenje stavlja Protein G pločica te se eluira IgG s 0,25 mL 0,1 mol dm⁻³ formične kiseline. Tijekom elucije, vakuum ne smije prijeći 5 inHg. Nakon elucije, potrebno je resuspendirati uzorke IgG eluata s mikropipetom i pritom pazeći da se promijene tipsevi za svaki uzorak kako bi se spriječila križna kontaminacija. Zatim se pločica pokriva aluminijskom folijom i ostavi se na tresilici (oprezno se treba miješati kako ne bi došlo do kontaminacije uzoraka) sve dok ne bude spremno za mjerenje koncentracije IgG. Konačni prosječni volumen IgG eluata od izolacije IgG-a iznosi 292,5 µL.

1.2.1.5. Regeneracija i skladištenje Protein G pločice

Regeneracija Protein G pločice odvija se na način da se u svaku pojedinu jažicu doda 0,5 mL 0,1 mol dm⁻³ formične kiseline. Tijekom postupka ispiranja, vakuum ne smije prijeći 10 inHg. Zatim se pločica ispire s 0,5 mL 10x PBS pufera te vakuumski sustav odvodi tekućinu prema spremniku za otpad. Nadalje, pločica se još ispire s 1 mL 1x PBS pufera. Zatim se jažice Protein G pločice ispiru s 0,25 mL pufera za skladištenje te se nakon toga doda 0,7 mL

istog pufera. Pufer se zatim posprema na skladištenje u hladnjak na 4° C do sljedećeg korištenja.

1.2.1.6. Mjerenje IgG koncentracije i njegovo skladištenje

Kako bi se izmjerila koncentracija IgG u eluatu (3 µL) koristi se NanoDrop 8000 spektrofotometr. Alikvot IgG eluata koji se sakupio u 1 mL pločicu za skladištenje, osuši se u speedvacu i pohrani u zamrzivač do sljedeće uporabe, tj. do postupka deglikozilacije.

1.2.2. Deglikozilacija u otopini

1.2.2.1. Priprema uzoraka i otopina

Prethodno su pripravljene otopine 1,33 % SDS, 4 % Igepal i 5x PBS (opisano u poglavlju 3.1.4.) te se ostave na sobnoj temperaturi. Iz zamrzivača se izvadi 1 mL pločica za skladištenje s osušenim IgG eluatom i stavi na sobnu temperaturu. Prosječna količina u posušenom IgG eluatu iznosi 140 µg.

1.2.2.2. Denaturacija

U svaki uzorak dodaje se 30 µL 1,33 % SDS i pritom resuspendira pipetirajući. Zatim slijedi postupak inkubacije. Pločica se pokriva Porvair termalnom ljepljivom folijom i inkubira se na 65 °C 10 min. Nakon inkubacije pločica se ostavlja na sobnoj temperaturi 30 min kako bi se ohladila. Zatim se dodaje 10 µL 4% Igepala u svaki uzorak i resuspendira pipetiranjem. Pločica se ostavi na tresilici na 15 min dok ne bude spreman za dodavanje enzima.

1.2.2.3. Deglikozilacija

Za pripremu smjese enzima, dodaje se 8,40 µL PNGaze F u 700 µL 5x PBS kako bi se pripremila dovoljna količina za 70 uzoraka. Zatim se dodaje 10 µL smjese enzima u svaki uzorak IgG-a i plazme. Da bi se smanjila mogućnost pogreške pri pipetiranju, potrebno je dobro pomiješajti smjesu pipetiranjem nakon dodavanja enzima. Pločica se pokriva Porvair termalnom ljepljivom folijom i stavlja u inkubator na temperaturu od 37 °C na 18 h kako bi došlo do oslobodjenja *N*-glikana.

1.2.3. Obilježavanje slobodnih *N*-glikana u otopini

Potrebno je pripremiti svježu otopinu fluorescentnog biljega prokainamida, IUPAC naziva 2-(dietilamino)etil 4-aminobenzoat, (koja po uzorku sadrži 4,32 mg prokainamida, 4,48 mg 2-

pikolin-borana i 25 μL od 30 % octene kiseline u dimetil sulfoksidu (DMSO). Prvo se priprema otopina prokainamida (ProA) s 30% octenom kiselinom (HAc) u DMSO te se otopina miješa vorteksiranjem. Zatim se, prethodno izvagani 2-pikolin-boran, otapa s drugom pripremljenom otopinom HAc/DMSO te vorteksira. Dodaje se 25 μL otopine fluorescentnog biljega prokainamida u svaki uzorak i standard te resuspendira pipetiranjem. Pločica se pokriva aluminijskom folijom i stavlja na tresilicu. Nakon 10 min, pločica se pokriva ljepljivom trakom te stavlja u pećnicu na 65 °C na 1 h. Na kraju inkubacije, dodaje se 25 μL otopine redukcijskog sredstva u svaki uzorak i resuspendira. Pločica se pokriva lijepljivom trakom i stavlja na tresilicu na 10 min. Pločica se stavlja u pećnicu na 65 °C na 1,5 h. Nakon završetka inkubacije, pločica se izvadi iz pećnice i ostavi da se ohladni na sobnoj temperaturi na 30 min dok ne bude spremna za nanošenje na 1 mL AcroPrep wwPTFE 0,2 μm filter pločice (ekstrakcija na čvrstoj fazi). Pročišćavanje glikana odvija se na wwPTFE pločici uz uključeni uređaj za filtraciju pomoću vakuuma.

1.2.3.1. Prekondicioniranje wwPTFE pločice

Otopina 96 % (v/v) ACN u ultračistoj vodi treba biti svježe pripremljena i ohlađena do 4 °C. Također, otopina etanola volumnog udjela od 70 % (v/v) treba biti svježe pripremljena. Uređaj za filtraciju pomoću vakuuma ne smije prijeći 2 inHg. Potrebno je odpipetirati 200 μL 70 % EtOH u svaku jažicu wwPTFE pločice. Zatim se odpipetira 200 μL ultra čista voda u svaku jažicu te se na kraju prekondicioniranja doda 200 μL hladnog 96 % ACN.

1.2.3.2. Primjena i pročišćavanje fluorescentno označenih N-glikana

Tijekom pipetiranja uzoraka potrebno je paziti da se promijene tipsevi za svaki uzorak kako ne bi došlo do kontaminacije. Potrebno je dodati 700 μL hladnog 96 % ACN u svaki uzorak (2-AB označeni N-glikani) i resuspendirati koristeći iste tipseve. Zatim pažljivo prenijeti volumen uzorka od otprilike 800 μL (75 μL uzorka + 700 μL ACN) na wwPTFE pločicu. Inkubirati 2 min i uz pomoć vakuuma odsisati u otpad. Postupak pročišćavanja se odvija na sljedeći način. Potrebno je u 4 obroka odpipetirati 200 μL hladnog 96% ACN u svaku jažicu wwPTFE pločice. Pločica se onda premjesti iznad 1 mL pločice za sakupljanje i ponovno odpipetira 200 μL hladnog 96% ACN u svaku jažicu wwPTFE pločice. Na kraju se wwPTFE pločica centrifugira 5 min na 1000 g.

1.2.3.3. Eluiranje 2-AB obilježenih N-glikana

Pločica wwPTFE se stavi iznad nove pločice za sakupljanje uzorka. Doda se 90 μ L ultra-čiste vode u svaki uzorak i ostavi na tresilici da se polagano miješa 15 min. Zatim se centrifugira 5 min na 1000 rpm kako bi se sakupila prva frakcija eluata u PCR pločicu. Navedeni postupak se još jednom ponavlja te se sakuplja druga frakcija od eluata. Na kraju se PCR pločica pokriva Porvair termalnom ljepljivom folijom i stavi se na skladištenje u hladnjak do sljedeće upotrebe. Dobiveni volumen obilježenih i pročišćenih IgG ProA glikana je 180 μ L.

1.2.4. IgA izolacija iz krvne plazme pomoću afinitetnih zrnaca

1.2.4.1. Priprema uzoraka i otopina

Potrebno je sve puferne staviti na sobnu temperaturu na otprilike 30 min. Uzorke otopljene plazme se vorteksiraju i centrifugiraju 3 minute na 12045g pomoću Eppendorf MiniSpin Centrifuge, rotor F-45-12-11 (13 400 okretaja/min). Zatim se odpipetira 40 μ L uzorka plazme u jažice 1 mL pločice za skladištenje koje je određeno randomizacijom prije pripreme uzorka. Uzorke plazme razrijedite s 200 μ L 1x PBS pufera. Razrijeđene uzorke plazme filtriraju se kroz 0,45 μ m wwPTFE filter pločice.

1.2.4.2. Priprema IgA suspenzije zrnaca za jednu pločicu

Potrebno je odpipetirati 50 μ L IgA suspenzije zrnaca po uzorku i centrifugirati (Centrifuga 5804, rotor A-4-44) na 100g na 4 min. Na kraju se odbaci supernatant i doda 3500 μ L 1x PBS u IgA suspenziju zrnaca. Zatim se primjenjuje 50 μ L IgA suspenzija zrnaca u 96 jažica Orochem pločice. Postupak pročišćavanja se odvija u tri ponavljanja na slijedeći način. Doda se 200 μ L ultra-čiste vode uz pomoć uređaj za filtraciju pomoću vakuuma. Zatim se ispire sa 200 μ L 1x PBS i odsisava u otpad. Filterska pločica se stavlja iznad PCR pločice i doda se 30 μ L 1x PBS u svaku jažicu kako bi se priječilo sušenje zrnaca.

1.2.4.3. IgA hvatanje i ispiranje

Potrebno je prebaciti 240 μ L razrijeđenog uzorak plazme u odgovarajuće jažice Orochem filtarske pločice. Pločica se stavlja na tresilicu i inkubacija traje 1 h na sobnoj temperaturi s miješanje na tresilici. IgA filtrat se sakuplja u 1 mL pločicu za skladištenje. Zatim se pločica ispire s 250 μ L 1x PBS koristeći uređaj za filtraciju pomoću vakuuma. Potrebno je pripaziti da vakuum ne prijeđe vrijednost 5 inHg. Navedeni korak je potrebno ponoviti dva puta. Sada

se pločica ispiri s 250 μL ultra-čiste vode i odsisava u otpad uz pomoć uređaj za filtraciju pomoću vakuuma. Također, i ovaj korak se ponavlja 2 puta. Na kraju se centrifugira na 910 g na 1 min (Centrifuga 5804, rotor A-2-DWP).

1.2.4.4. Elucija IgA i sušenje

Pločica se eluira s 100 μL 100 mmol dm^{-3} formične kiseline i inkubira 5 min na tresilici. Zatim se sakuplja IgA eluat poslije IgA izolacije u PCR pločicu (96-jažica) pomoću centrifuge na 1760 g na 2 min. Ovaj postupak se ponavlja još jedanput. Koncentracija se mjeri na Nanodropu ($1 \text{ mg mL}^{-1} \square 1 \text{ Abs}$, 340 nm za normalizaciju). Nakon izmjerene koncentracije IgA eluata, odvaja se u dva jednaka dijela (za deglikozilaciju i tripsinizaciju) i 1 mL pločica za skladištenje se stavlja na sušenje u speedvac na 60 °C na 2,5 h. Opisani postupak se ponavlja i za IgA eluat poslije IgG izolacije, s time da se IgA eluat ne odvaja za trispinizaciju.

1.2.4.5. Deglikozilacija u otopini

Deglikozilacija, označavanje i ispiranje IgA provode se na isti način kao što je opisano za IgG. Nakon izolacije, dobiva se 180 μL IgA proA glikana.

1.2.5. Separacije i kromatografska analiza slobodnih IgG i IgA proA glikana

Analiza uzoraka dobivena je pomoću veznog sustava hidrofilnih interakcija tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (eng. HILIC-UPLC). Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) sastoji se od sljedećih dijelova: FLR detektor, *Sample Manager*-FTN, *Quaternary Solvent Manager* i pećnice. Uloga instrumenta je separacija glikana i njihova detekcija putem fluorescencije. Priprema uzoraka za HILIC-UHPLC odvijala se na slijedeći način. U plastičnim vialama su se pripremili uzorci tako da sadrže 25 % vodene faze i 75 % organske faze (acetonitrila). Konačni volumen iznosio je 60 μL , a na kolonu injektiran je volumen od 50 μL . Tijekom cijelog procesa elucije upotrijebljen je program gradijenta iliti izmjena udjela otapala i brzine protoka u vremenu, uz korištenje dva otapala: otapalo A (100 mmol dm^{-3} vodena otopina amonijeva formijata) i otapalo B (100 % ACN).

Tijekom kromatografije, kolona je bila termostatirana na temperaturu od 25 °C. Uzorci, prije samog injektiranja, nalaze se na temperaturi od 10 °C. Glikani će biti detektirani na

temelju fluorescente boje prokainamida te će ekscitacija biti zabilježena pri 310 nm, a emisija pri 370 nm.

1.2.6. Analiza i obrada dobivenih podataka

Kromatograme je potrebno integrirati i modificirati koristeći softverskog alat koji je u sklopu programskog dijela *EmpowerTM* na *WAT19* kao sistem/administrator, projekt *Browse Projects*. Dobivene vrijednosti omjera retencijskih vremena, signala naprema šumu, relativne i apsolutne kromatografskih pikova su ekstrahirane. Također, za kromatografske pikove je izračunata centralna varijacija i standardna devijacija za sve analizirane uzorke. Standardna devijacija i centralna varijacija su izračunate pomoću računalnog programa *Microsoft Office Excel 2007*.

2. REZULTATI

U ovom poglavlju predstavljena je usporedba izolacije imunoglobulina G (IgG) i imunoglobulina A (IgA) iz krvne plazme za svaki Ig zasebno te IgG iz filtrata nakon izolacije IgA, kao i IgA iz filtrata nakon izolacije IgG. Dakle, sveukupno uspoređujemo dvije grupe, IgG te IgA, u dva tipa uzorka, plazma i flow-through. U ovom istraživanju korištene su napredne metode za izolaciju i kvantifikaciju IgG i IgA, kao i analize standardnih uzoraka, kako bi se osigurali pouzdani i točni rezultati, koji su potom uspoređeni s relevantnim literaturnim vrijednostima. Precizna kvantifikacija IgG i IgA glikanskih profila može pružiti vrijedne informacije o imunološkom statusu pacijenta i učinkovitosti imunoloških odgovora.

U nastavku su detaljno prikazani rezultati mjerenja GP vrijednosti za IgG i IgA u plazmi (uzorci IgG ili IgA izolirani iz plazme) i relativne površine u flow-through uzorcima (uzorci IgG-a iz IgA flow-through faze i uzorci IgA-a iz IgG flow-through faze) dobivene kromatografskom analizom. Vrijednosti za različite gliko pikove (GP) označene su numeričkim oznakama (npr. GP1, GP2, itd.). Svaki GP predstavlja jednu glikansku strukturu kako je prikazano na slici 2. Od statističkih parametara korišteni su prosjek (Average), standardna devijacija (Stdev) i koeficijent varijacije (CV).

Prosječna vrijednost (Average) relativnih površina u uzorcima pokazuje centralnu tendenciju, tj. kolika je prosječna relativna površina pojedine strukture (npr. GP4) u uzorcima IgG-a i/ili IgA. To je srednja vrijednost svih mjerenja relativnih površina. Prosječne vrijednosti su izračunate iz tehničkih triplikata, što osigurava pouzdanost i preciznost rezultata. Tehnički triplikati su dobiveni alikvotiranjem 3 puta iz jednog biološkog uzorka. Standardna devijacija (Stdev) mjeri koliko su rezultati relativnih površina raspršeni oko prosjeka. Ako je standardna devijacija niska, to znači da su rezultati blizu prosječne vrijednosti, dok viša standardna devijacija ukazuje na veću varijabilnost relativnih površina unutar uzoraka. Koeficijent varijacije (CV) izražava standardnu devijaciju kao postotak prosječne vrijednosti, pokazujući relativnu varijabilnost. Visok CV znači da je varijabilnost relativne površine visoka u odnosu na prosječnu vrijednost, dok nizak CV ukazuje na konzistentnije rezultate.

2.1. GP vrijednosti za IgG iz krvne plazme

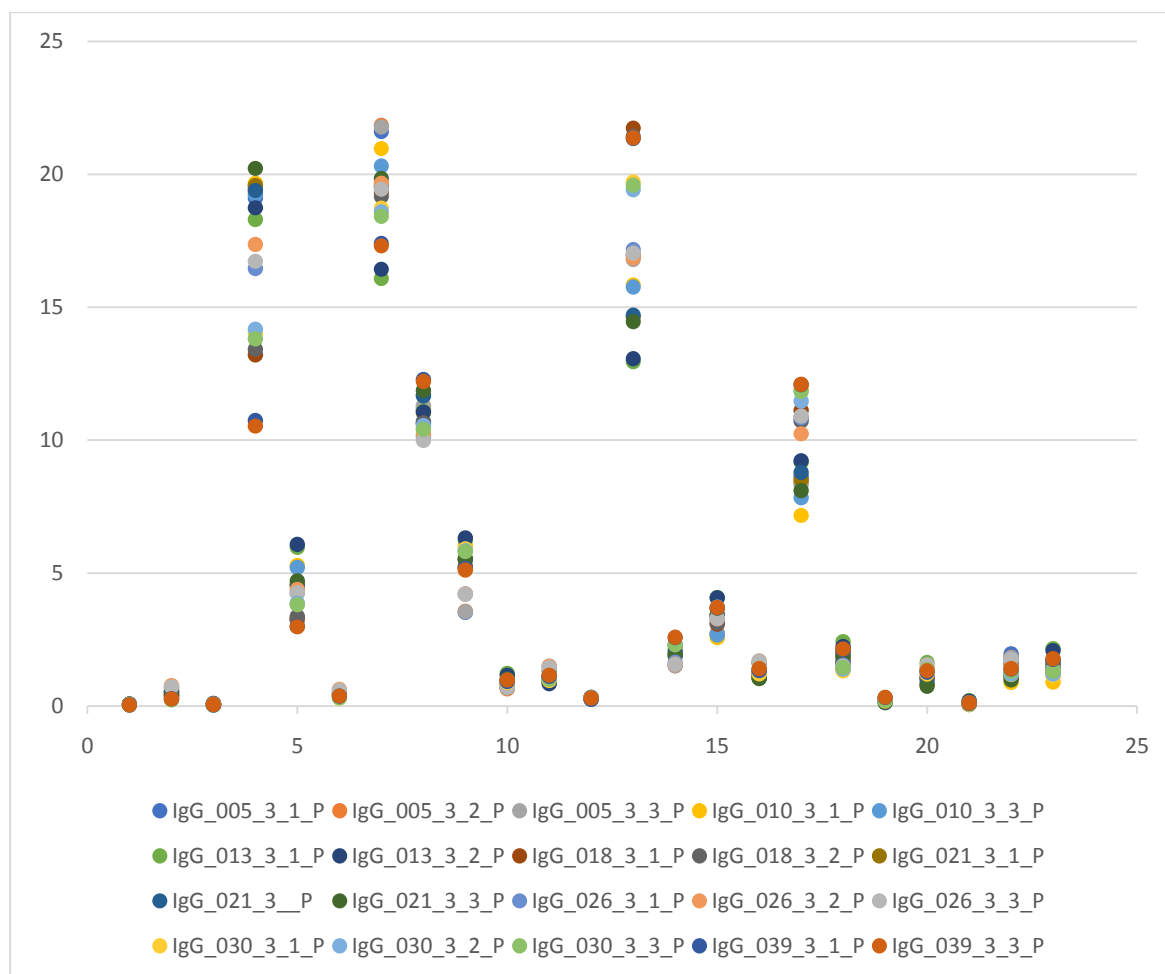
U ovoj studiji analizirani su uzorci IgG-a iz plazme kako bi se kvantificirale relativne površine gliko pikova. Analizirani uzorci plazme pokazali su različite relativne površine GP-a, što se može pripisati biološkim varijacijama među uzorcima. Tablica se nalazi u Dodatku (Tablica D1 a i b).

GP vrijednosti za IgG iz krvne plazme prikazani su na grafu 1. Svi uzorci su mjerili različite glikanske strukture na IgG-u, ali nekoliko uzoraka (IgG_010_3_2_P, IgG_018_3_3_P i IgG_039_3_2_P) su izbačeni zbog odstupanja unutar triplikata. To znači da su ti uzorci imali nekonzistentne ili neobično različite vrijednosti unutar triplikata i odstupaju od ostala dva triplikata, što može ukazivati na moguće pogreške u uzorkovanju ili analizi. Također, odbačeni su zbog loše kvalitete spektara te stoga nisu prošli kontrolu kvalitete.

Graf 1 prikazuje GP vrijednosti za IgG iz uzorka krvne plazme, pri čemu se vrijednosti kreću u širokom rasponu. Na primjer, uzorak IgG_005_3_1_P pokazuje relativne površine od oko 2 % za GP1 do maksimalnih 22 % za GP7, dok IgG_021_3_3_P ima varijacije od oko 2 % za GP1 do približno 20 % za GP4. Pikovi u GP8, GP14 i GP17 pokazuju izrazite skokove u relativnim površinama kod nekoliko uzoraka, što ukazuje na zajedničku karakteristiku jednog glikoproteina IgG. Iako postoji opća varijabilnost, neki uzorci pokazuju dosljednost kroz različite mjerenja, što može ukazivati na stabilnost u stanju plazme ili pouzdanost korištene metode pripreme.

Glikani IgG-a iz plazma uzoraka pokazuju visoke relativne površine, s najvišim vrijednostima GP4, GP8, GP9 i GP13, gdje relativne površine često prelaze 10 %. Primjerice, GP4 ima relativne površine između 18,5 i 19,6 %, što ukazuje na dominaciju IgG u tim glikoproteinskim frakcijama. S druge strane, frakcije kao što su GP1, GP2 i GP5 imaju niže relativne površine, koje se kreću između 2 % i 5 %, ali su i dalje značajne u usporedbi s flow-through uzorcima, gdje se relativne površine obično kreću između 0,05 % i 0,6 %. To dodatno potvrđuje učinkovitost metode izolacije, jer plazma uzorci pokazuju višestruko veće relativne površine IgG u usporedbi s flow-through uzorcima.

Graf 1. GP vrijednosti za IgG iz krvne plazme.



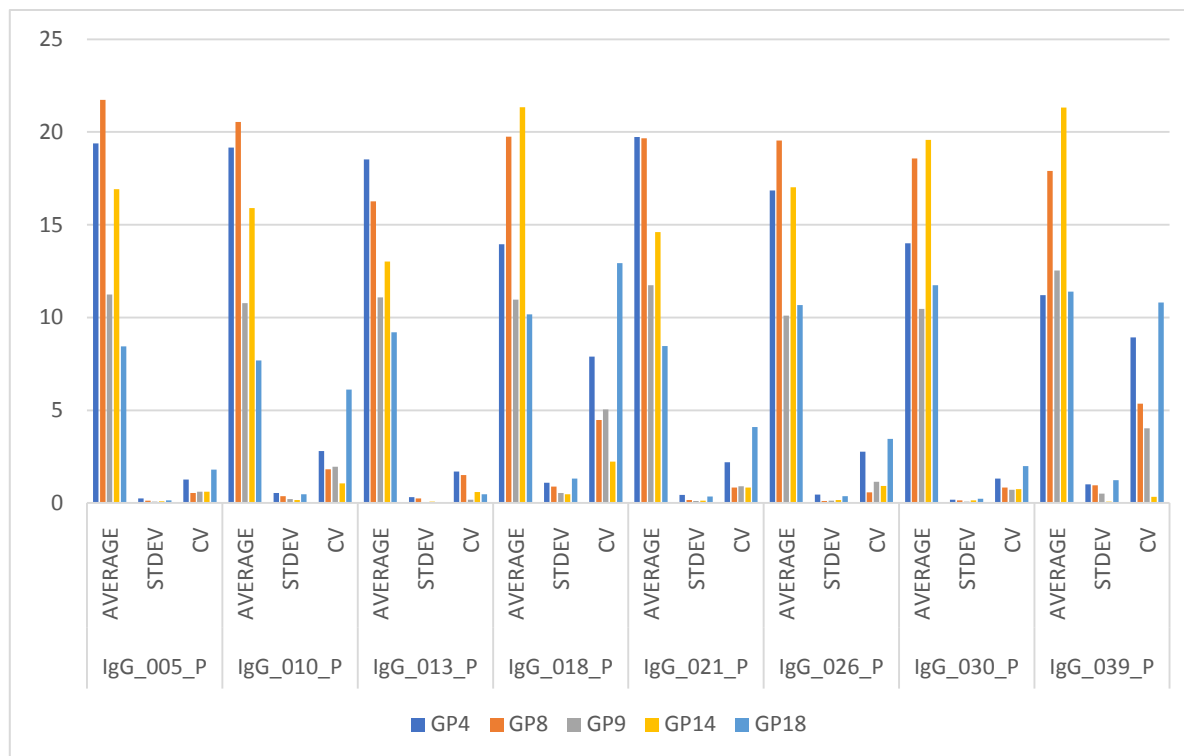
2.2. GP vrijednosti za IgG iz krvne plazme prikazane pomoću statističkih podataka

Prosječne vrijednosti (average) za različite uzorke pokazuju relativno visoku razinu IgG, dok standardne devijacije (stdev) ukazuju na dosljednost mjerenja unutar pojedinih uzoraka. Koeficijent varijacije (CV) koristi se za procjenu relativne varijabilnosti glikanskih struktura u odnosu na prosjek. Podaci iz tablica za IgG plazmu, IgG relativne površine u flow-through uzorcima i standardne uzorke prikazuju relativne površine IgG u različitim frakcijama.

Analiza pokazuje da su prosječne vrijednosti za relativne površine u plazma uzorcima relativno visoke, s niskim standardnim devijacijama, što ukazuje na konzistentna i pouzdana mjerenja. Na primjer, uzorak IgG_005_P pokazuje prosječnu vrijednost od 19,38 % ukupne površine u kromatogramu u GP4, sa standardnom devijacijom od 0,25 % i koeficijentom varijacije od 1,27 %, što ukazuje na visoku preciznost mjerenja. Svi podaci su izračunati iz

tehničkih triplikata, što osigurava pouzdanost rezultata. Na grafu 2 su prikazane prosječne vrijednosti (average), standardne devijacije (Stdev) i koeficijenti varijacije (CV) za nekoliko odabranih frakcija (GP4, GP8, GP9, GP14 i GP18) kroz različite uzorke IgG-a iz plazme.

Graf 2. Vrijednosti prosjeka, standardne devijacije i centralne varijance gliko pikova IgG dobivenih iz plazme.



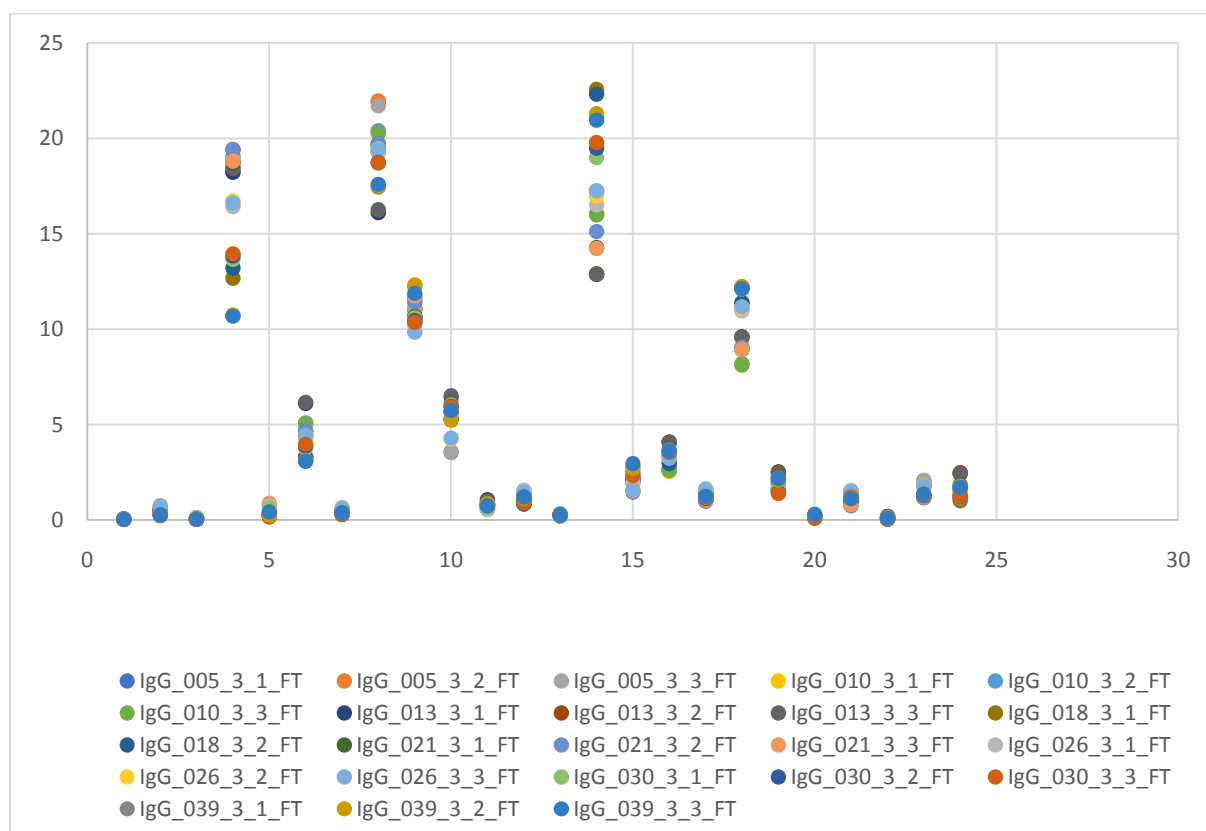
Ovi podaci jasno pokazuju visoku preciznost i pouzdanost u mjerenjima relativnih površina IgG u plazma uzorcima, s niskim koeficijentima varijacije (CV) u većini frakcija, što ukazuje na konzistentnost rezultata kroz triplikate.

2.3. Vrijednosti gliko pikova IgG-a dobivenih iz flow-through-a nakon izolacije IgA

IgG flow-through je dobiven nakon izolacije IgA i odnosi se na filtrat koji sadrži sve preostale proteine plazme, uključujući IgG. Rezultati za ove uzorke pokazuju niže relativne površine IgG u usporedbi s relativnim površinama u plazma uzorcima. Ove niže relativne površine su očekivane s obzirom na prirodu relativne površine u flow-through uzorcima. Standardne devijacije i koeficijent varijacije za ove uzorke pružaju dodatne informacije o konzistenciji i preciznosti mjerenja. Tablica se nalazi u Dodatku (Tablica D3 a i b).

Flow-through uzorci pokazuju znatno niže relativne površine IgG u odnosu na plazma uzorke (Graf 3), što je očekivano jer sadrže IgG koji se nije vezao na afinitetna zrnca. Relativne površine u ovim uzorcima uglavnom se kreću između 0,05 % i 0,6 %, što ukazuje na to da je većina IgG-a bila nespecifično vezana na zrnca. U GP4, GP8 i GP14, koje u plazma uzorcima imaju visoke vrijednosti relativne površine (preko 15 %), flow-through uzorci pokazuju niže vrijednosti, od 10 % do 20 %. To sugerira da su metode izolacije bile vrlo učinkovite, s minimalnim preostalim IgG-om u tekućim uzorcima.

Graf 3. Vrijednosti GP IgG-a dobivenih iz flow-through-a nakon izolacije IgA.



2.4. Vrijednosti gliko pikova IgG dobivenih iz flow-through-a nakon izolacije IgA prikazane pomoću statističkih podataka

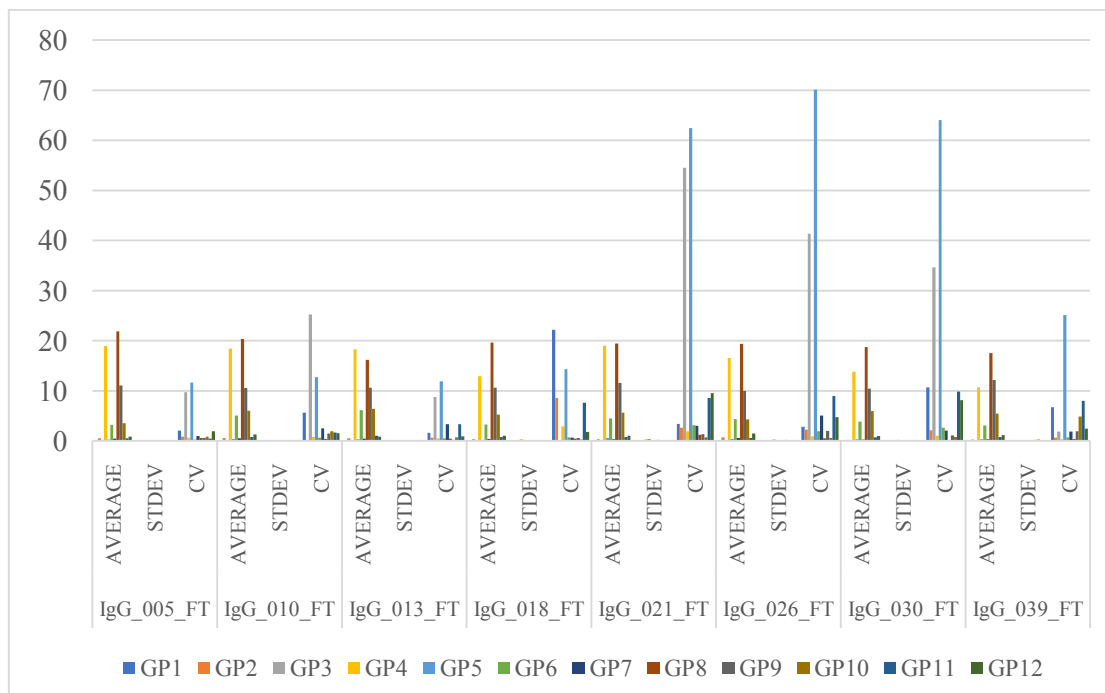
Grafovi prikazuju prosječne vrijednosti (average), standardne devijacije (stdev) i koeficijente varijacije (CV) za svaki uzorak. Prosječne vrijednosti (average) su izračunata iz tehničkih triplikata, osiguravajući pouzdanost i preciznost rezultata. Tablica se nalazi u Dodatku (Tablica D4 a i b).

Na temelju grafa 4a možemo zaključiti sljedeće. Uzorak IgG_005_3_1_FT pokazuje širok raspon relativnih površina, koje se kreću od 6 % ukupne površine u kromatogramu (GP1) do

21,9 % ukupne površine u kromatogramu (GP8). Raspon proizlazi iz zastupljenosti određene glikanske strukture na IgG-u, gdje GP8 dominantna struktura. Na svim uzorcima, prosječne vrijednosti su uglavnom u uskim rasponima, osim u slučaju GP8 gdje je uočen blagi porast. Nizak koeficijent varijacije (CV) u većini uzoraka sugerira da su rezultati ponovljivi, dok viši CV u nekim uzorcima može ukazivati na veće varijacije ili tehničke poteškoće u kvantifikaciji. Standardne devijacije unutar pojedinih uzoraka pokazuju da su mjerenja dosljedna, uz manje varijacije unutar tehničkih ponavljanja, što dodatno podržava pouzdanost rezultata.

Raspon prosječnih relativnih površina u uzorcima IgG_005_FT kreće se od približno 10 % do 60 %, ovisno o specifičnom uzorku i grupi (GP). Primjerice, grupa GP8 pokazuje najvišu prosječnu vrijednost, dok GP1 i GP2 pokazuju najniže prosječne vrijednosti, oko 10 %. Standardna devijacija unutar većine uzoraka je relativno niska, što sugerira da su mjerenja unutar grupe konzistentna. Najveće vrijednosti standardne devijacije zabilježene su za uzorke GP7 i GP8, koji pokazuju vrijednosti do 40 %, što može ukazivati na veću varijabilnost unutar tih uzoraka. Koeficijent varijacije (CV) je relativno nizak za većinu uzoraka, što ukazuje na dosljednost mjerenja unutar grupa. Međutim, primjetno je da su uzorci GP7 i GP8, koji pokazuju visoke prosječne vrijednosti, također imali veći CV, do 20 %, što može sugerirati da su rezultati u tim grupama varijabilniji.

Graf 4. a) Vrijednosti GP IgG-a dobivenih iz flow-through-a nakon izolacije IgA prikazane pomoću statističkih podataka.



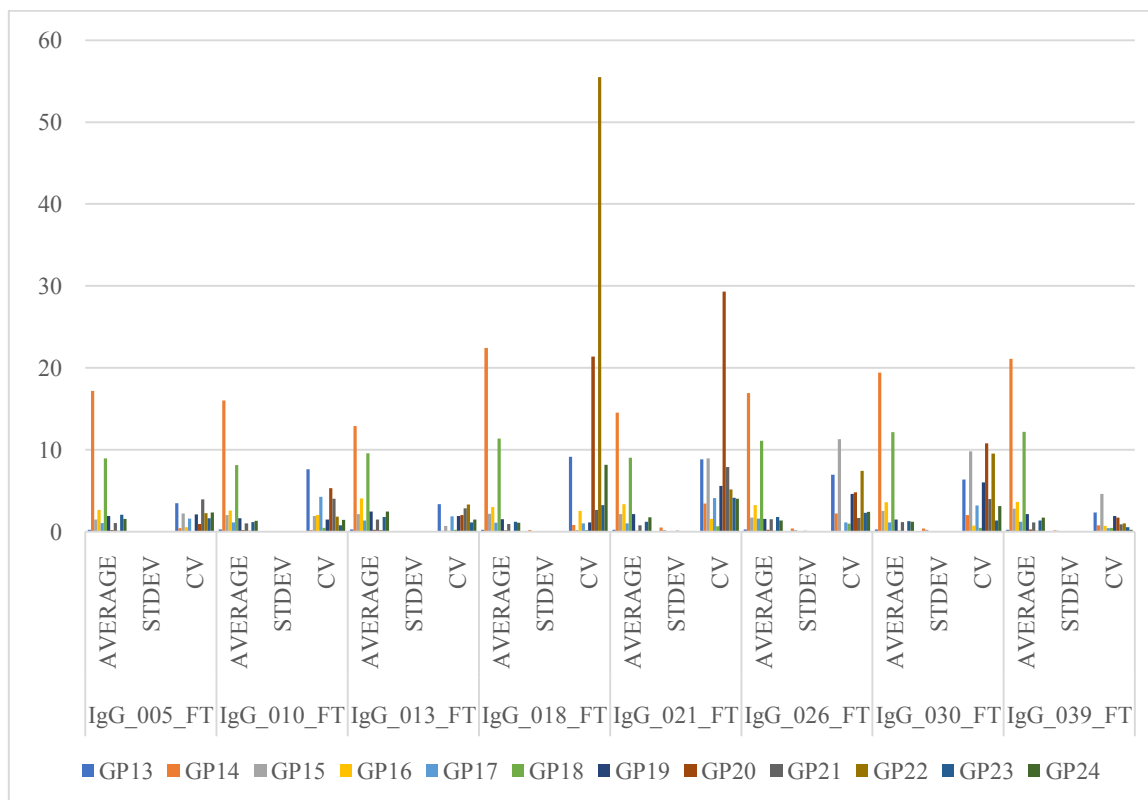
Graf 4a pokazuje da su uzorci GP7 i GP8 najrazličitiji, s visokim prosječnim vrijednostima i većim standardnim devijacijama te koeficijentom varijacije, što može ukazivati na heterogenost ili nespecifičnost u mjerenju ili obradi tih uzoraka. Ostale grupe (GP1, GP2, itd.) pokazuju relativno dosljedne i niže vrijednosti, sugerirajući homogenost unutar grupa.

Gledajući graf 4b možemo zaključiti sljedeće. Raspon prosječnih relativnih površina u uzorcima kreće se od približno 5 % do 55 %, ovisno o specifičnom uzorku i grupi (GP). Najvišu prosječnu vrijednost bilježi grupa GP14, koja dostiže približno 22 %, dok su najniže prosječne vrijednosti primijećene u grupama GP13, GP14, GP15, GP17, GP19, GP21, GP22, GP23, i GP24 s prosjekom od oko 5 % do 10 %. Većina uzoraka ima relativno nisku standardnu devijaciju, što ukazuje na dosljednost mjerenja unutar grupa. Koeficijent varijacije (CV) je uglavnom nizak za većinu uzoraka, što ukazuje na konzistentnost mjerenja. Međutim, grupa GP22 ima vrlo visok CV, do 55 %, što odražava visoku varijabilnost unutar grupe, dok ostale grupe, poput GP13, GP14, GP16, GP20, GP21, imaju relativno niske CV vrijednosti od oko 5 % do 15 %

Graf 4b pokazuje da uzorak GP22 ima izrazito višu prosječnu relativnu površinu u usporedbi s ostalim uzorcima, ali i najveću varijabilnost unutar grupe, što može sugerirati nespecifičnost u mjerenju, tehničke poteškoće, ili različite biološke karakteristike ovog uzorka. Ostale grupe, poput GP13, GP14, GP20, i GP24, pokazuju relativno niske i

konzistentne vrijednosti prosječnih površina, što ukazuje na homogenu distribuciju unutar tih uzoraka.

Graf 4. b) Vrijednosti GP IgG-a dobivenih iz flow-through-a nakon izolacije IgA prikazane pomoću statističkih podataka.



2.5. Usporedba dobivenih vrijednosti između IgG plazme i IgG relativne površine u flow-through uzorcima standarda

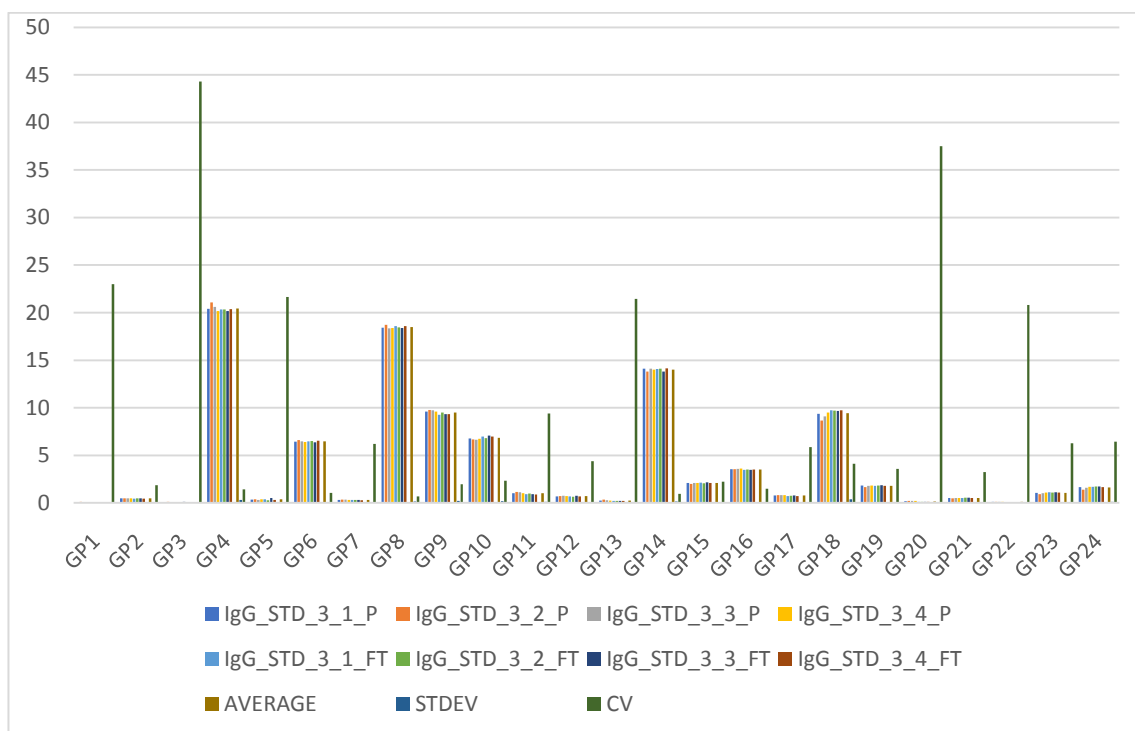
Grafovi za IgG plazmu i relativne površine u flow-through uzorcima standarda omogućava usporedbu različitih tipova uzoraka i njihovih standardnih vrijednosti. Ova usporedba je ključna za ocjenu točnosti i preciznosti metoda kvantifikacije IgG. Rezultati pokazuju da su standardi konzistentni, što potvrđuje validnost korištenih metoda za mjerenje IgG. Tablice su prikazane u Dodatku (Tablica D5 a i b).

Standardni IgG plazma uzorci (IgG_STD_3_1_P do IgG_STD_3_4_P) imaju visoke i konzistentne prosječne vrijednosti u pojedinim frakcijama. Na primjer: GP4 ima prosječnu relativnu površinu od 20,44 % s vrlo niskom varijabilnošću, što ukazuje na konzistentnost mjerenja u ovoj frakciji. GP8 pokazuje relativne površine između 18,34 % i 18,71 % s prosječnom vrijednošću od 18,49 %, što također ukazuje na stabilnost mjerenja. Frakcije kao

što su GP1, GP3 i GP22 imaju vrlo niske prosječne vrijednosti relativne površine od 0,07 % s većom varijabilnošću, što sugerira veću nesigurnost u ovim mjerenjima.

Flow-through uzorci (IgG_STD_3_1_FT do IgG_STD_3_4_FT) pokazuju slične obrasce s nešto manjim prosječnim relativnim površinama u usporedbi s plazma uzorcima GP4 u flow-through uzorcima ima slične vrijednosti relativne površine, krećući se od 20,17% do 20,36% s prosjekom od 20,31%. Varijabilnost je niska (CV = 1,43%). GP8 u flow-through uzorcima ima relativne površine između 18,34% i 18,59% s prosječnom vrijednošću od 18,49%, što je vrlo slično plazma uzorcima (CV = 0,68%). GP13 pokazuje relativne površine između 0,19% i 0,34% s prosjekom od 0,24% i višom varijabilnošću (CV = 21,44%). GP14 ima relativno stabilne površine od 13,81% do 14,13% s prosječnom vrijednošću od 14,02% i niskim CV od 0,95%, što ukazuje na dosljednost mjerenja.

Graf 5. Vrijednosti za IgG relativne površine u plazma i flow-through uzorcima prikazane pomoću statističkih podataka.



Standardni uzorci imaju visoke relativne površine IgG u frakcijama poput GP4 i GP8, ali s manje varijacije. Na primjer, GP4 ima relativne površine između 20,1 i 21,1 %. Standardni uzorci imaju visoke relativne površine IgG u frakcijama kao što su GP4 i GP8, ali s manje varijacija, dok uzorci poput GP1, GP3, GP13, i GP14 pokazuju veću varijabilnost. Niska varijabilnost u većini frakcija, kao što su GP4, GP8, i GP14, ukazuje na stabilnost i

pouzdanost korištenih metoda, dok visoki CV u frakcijama poput GP1, GP3, i GP13 sugerira potrebu za dodatnim provjerama ili optimizacijom metoda mjerenja.

Nadalje, možemo izdvojiti nekoliko ključnih uvida. Relativne površine IgG u plazma uzorcima pokazuju veće vrijednosti, s najvišim u GP4 i GP8 koji su dosljedno iznad 1,0 % u većini uzoraka, dok su u flow-through uzorcima te vrijednosti značajno niže, često blizu nule. IgG relativne površine u flow-through uzorcima pokazuje znatno niže relativne površine IgG u svim frakcijama, često blizu nule ili u niskim decimalama. To pokazuje da je većina IgG-a vezana za relativne površine u plazma uzorcima, dok je samo mali ostatak prisutan u relativnim površinama u frakcijama flow-through uzoraka. Variabilnost među uzorcima u plazmi postoji, ali frakcije GP4 i GP8 ostaju dosljedne. U flow-through uzorcima variabilnost je niska i to s većinom vrijednosti blizu nule, što ukazuje na konzistentnost u učinkovitosti vezanja IgG tijekom procesa. Standardni uzorci pokazuju stabilne koncentracije, a statistički parametri potvrđuju učinkovitost i pouzdanost metoda izolacije i mjerenja IgG.

Analiza pokazuje da su relativne površine IgG-a u plazmi i flow-through uzorcima varijabilne, ali dosljedne unutar pojedinih uzoraka. Ova varijabilnost može biti rezultat bioloških čimbenika, metoda uzorkovanja ili analitičkih tehnika. Usporedba s literaturom potvrđuje da su naši rezultati u skladu s prethodnim istraživanjima, gdje je standardna devijacija ključna za ocjenu varijabilnosti, dok koeficijent varijacije (CV) mjeri relativnu raznolikost. Koeficijent varijacije (CV) u plazma uzorcima je viši u frakcijama s nižim koncentracijama, dok je u flow-through uzorcima CV relativno nizak, što sugerira da je metoda izolacije učinkovita i pouzdana za mjerenje IgG-a. Prosječne vrijednosti dobivene tehničkim triplikatima potvrđuju pouzdanost i preciznost rezultata. U plazma uzorcima, relativne površine IgG-a dosežu značajne vrijednosti, osobito u frakcijama GP4, GP8, GP9 i GP13, s vrijednostima koje često prelaze 10 %. Nasuprot tome, u flow-through uzorcima, relativne površine su znatno niže, što ukazuje na učinkovito vezanje IgG-a u plazmi.

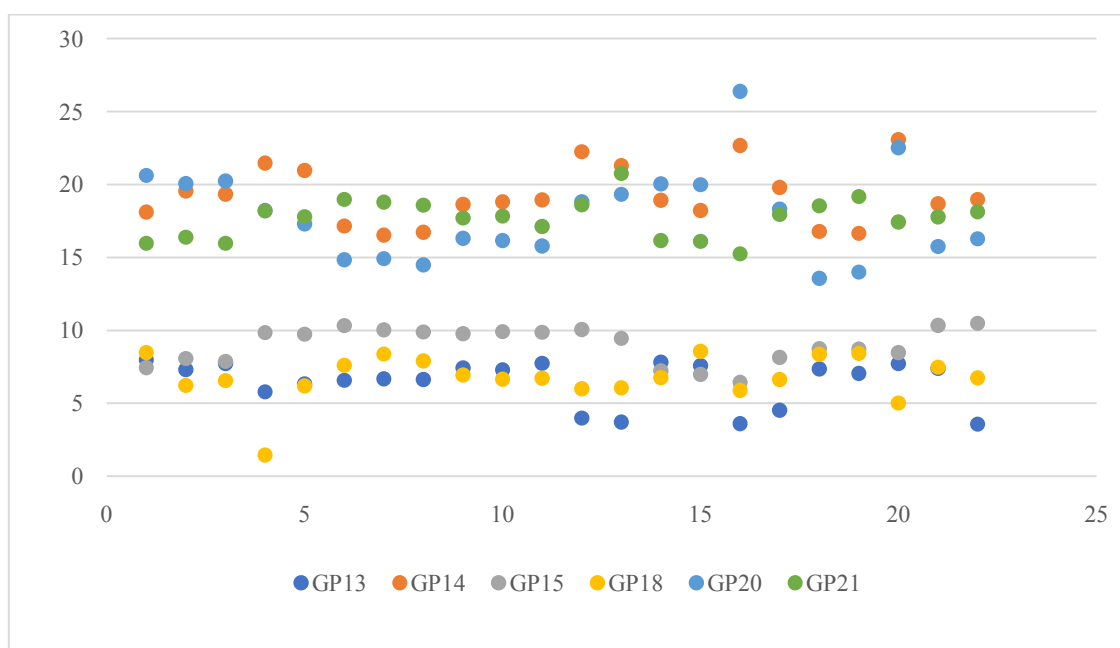
Usporedba između relativnih površina IgG u plazmi i flow-through uzorcima jasno pokazuje učinkovitost izolacije IgG-a. Visoke relativne površine u plazmi, posebno u frakcijama GP4 i GP8, ukazuju na ključne frakcije za analizu. Flow-through uzorci pokazuju znatno niže površine, što potvrđuje uspješno vezanje IgG-a u plazmi. Standardni uzorci pružaju stabilne vrijednosti i nisku varijabilnost, što ih čini pouzdanim za validaciju.

Statistički parametri (average, stdev, CV) pokazuju veću varijabilnost u plazmi, dok su flow-through uzorci stabilniji.

2.6. GP vrijednosti IgA iz krvne plazme

Analiza relativnih površina IgA u različitim uzorcima pokazuje značajne varijacije. Na primjer, u GP13, vrijednosti relativnih površina IgA kreću se od 3,61 % do 7,98 %, dok u GP21 vrijednosti variraju od 15,97 % do 20,75 %. Najviše relativne površine zabilježene su u uzorcima IgA_039_3_1_P i IgA_039_3_3_P, gdje GP14 doseže čak 23,07 %. Primjećuje se da GP18 i GP21 pokazuju konzistentnije vrijednosti među uzorcima, dok GP14 i GP13 imaju najveće oscilacije, što može ukazivati na biološku varijabilnost ili tehničke čimbenike u analizi. Kao i kod IgG, neki uzorci (IgA_010_3_2_P i IgA_021_3_1_P) su izbačeni zbog odstupanja od ostalih vrijednosti, uslijed loše kvalitete spektara nisu prošli kontrolu kvalitete. Tablica je prikazana u Dodatku (Tablica D6).

Graf 6. GP vrijednosti za IgA iz krvne plazme.

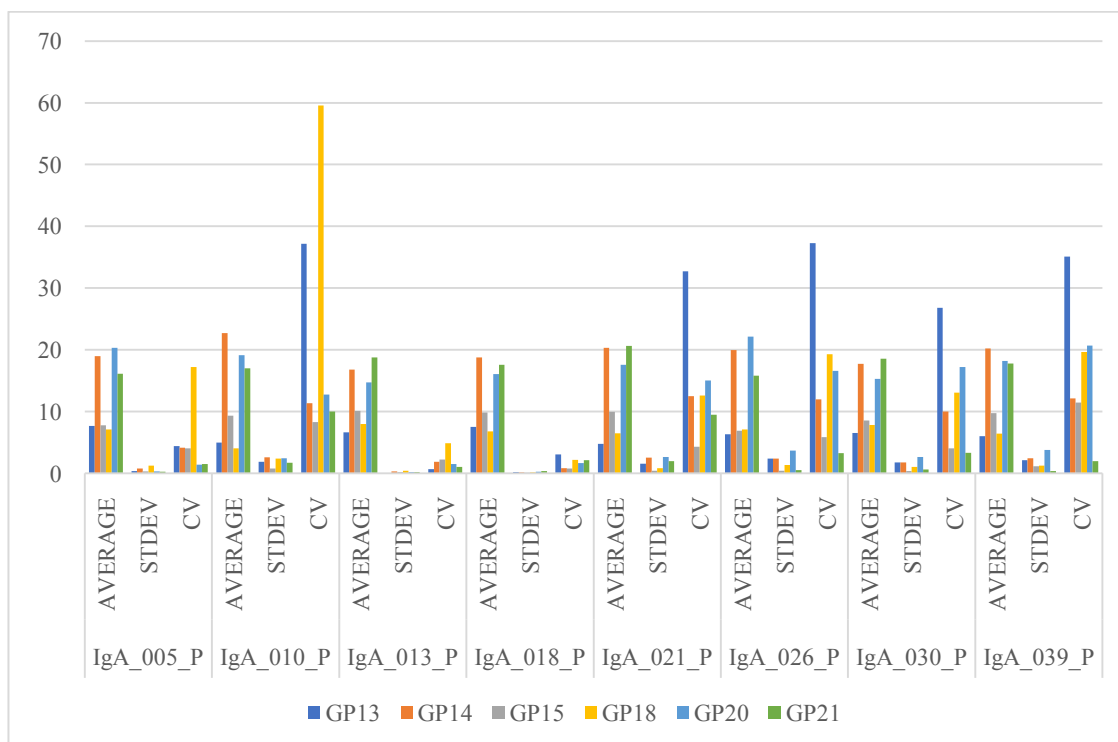


2.7. GP vrijednosti IgA iz krvne plazme prikazane pomoću statističkih podataka

Analiza pokazuje da su prosječne vrijednosti za relativne površine u IgA uzorcima iz plazme relativno visoke, s niskim standardnim devijacijama, što ukazuje na konzistentna mjerenja (Graf 7). Prosječne vrijednosti su izračunate iz tehničkih triplikata, što osigurava pouzdanost i preciznost rezultata. Uzorak GP13 prikazuje konzistentne rezultate unutar

različitih uzoraka. Na primjer, uzorak IgA_005_P za GP13 pokazuje prosječnu relativnu površinu od 7,67 %, dok uzorak IgA_026_P za isti GP13 ima nešto nižu prosječnu vrijednost od 6,34 %. S druge strane, uzorak IgA_021_P za GP13 bilježi najnižu vrijednost s prosječnom relativnom površinom od 4,75 %. Ove varijacije unutar GP13 pokazuju manju raznolikost glikana, ali uz relativno male standardne devijacije, što ukazuje na stabilnost rezultata. Za GP20, varijacije su značajnije. Na primjer, uzorak IgA_005_P za GP20 ima prosječnu relativnu površinu od 20,30 %, dok uzorak IgA_026_P pokazuje veću vrijednost od 22,13 %. Uzorak IgA_021_P za GP20 prikazuje vrijednost od 20,62 %, što je blisko vrijednostima ostalih uzoraka za ovaj GP. Ove vrijednosti za GP20 ukazuju na veću raznolikost glikanskih struktura u odnosu na GP13, ali su i dalje unutar uskog raspona koji potvrđuje stabilnost mjerenja. Usporedbom uzoraka unutar svakog GP-a primjećuje se da su glikanske strukture relativno stabilne, s malim varijacijama u relativnim površinama.

Graf 7. GP vrijednosti za IgA iz krvne plazme uzorcima pomoću statističkih podataka.

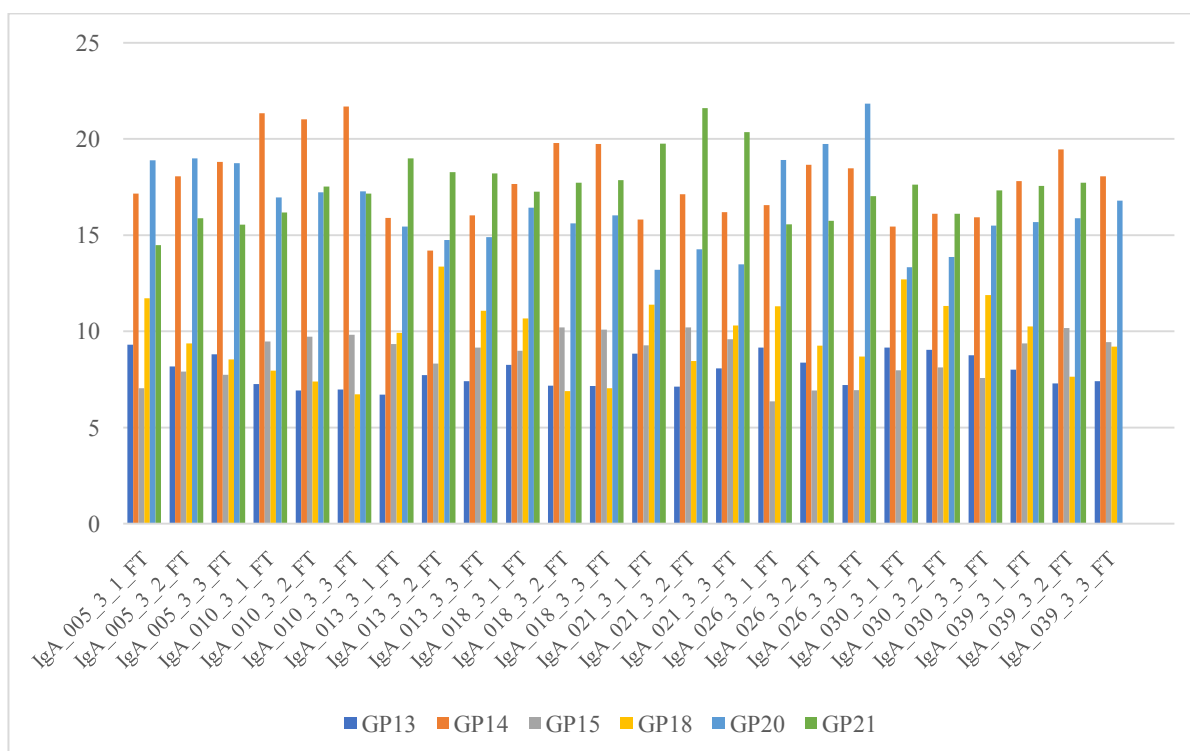


2.8. Vrijednosti GP-a IgA iz flow-through-a nakon izolacije IgG-a

IgA flow-through je dobiven nakon izolacije IgG i prikazuju varijacije u vrijednostima GP IgA-a koje nisu vezane na kolonu tijekom izolacije. Prema dostupnim podacima iz tablice D8, najniže relativne površine IgA primijećene su u GP13, gdje su vrijednosti za različite uzorke

unutar raspona od 6,7 % do 9,3 %. Suprotno tome, najviše vrijednosti IgA zabilježene su u GP21, s relativnim površinama koje dostižu između 15,54 % i 21,60 % ukupne površine kromatograma. Analizom ostalih, poput GP14 i GP20, vidi se da su relativne površine također znatne. U GP14, vrijednosti se kreću od 14,19 % do 21,68 %, dok u GP20 variraju između 13,19 % i 21,83 %. Ove varijacije pokazuju da su relativne površine u flow-through uzorcima niže u usporedbi s uzorcima iz plazme.

Graf 8. Vrijednosti GP IgA iz flow-through-a nakon izolacije IgG-a.



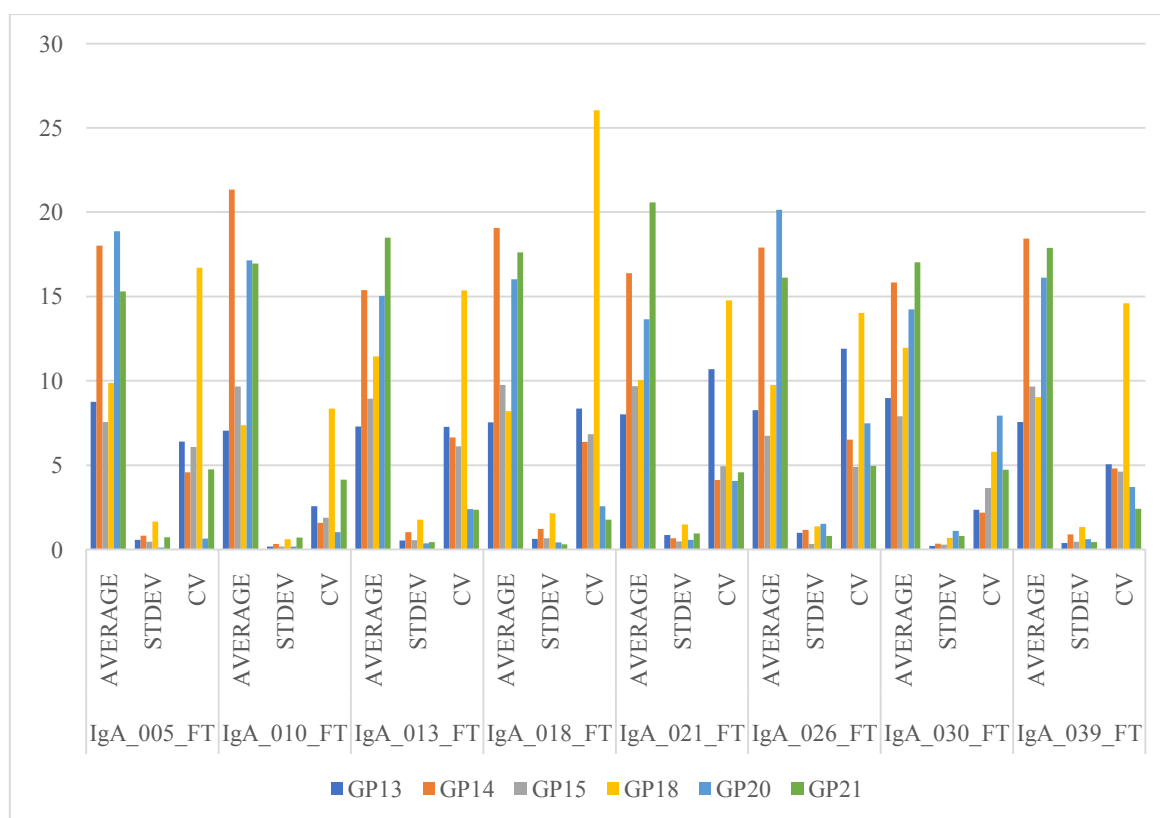
2.9. Vrijednosti GP IgA iz flow-through-a nakon izolacije IgG-a prikazane pomoću statističkih podataka

Uzorki dobiveni iz flow-through pokazuju značajno niže relativne površine u usporedbi s uzorcima iz plazme, što je očekivano zbog potencijalnog nespecifičnog vezanja IgA prilikom izolacije IgG-a na monolitu. Prosječne vrijednosti za različite uzorke variraju, no zadržavaju relativno konzistentne rezultate unutar svakog uzorka, kako je prikazano u grafu 9. Uzorak IgA_0013_FT ima relativne površine koje se kreću od 5 % do 15 % ukupne površine u kromatogramu, što je značajno niže u usporedbi s plazma uzorcima.

GP13 ima prosječnu vrijednost od 7,28 %, dok GP21 ima znatno višu vrijednost od 18,48 %. Primjerice, GP18 varira između 7,36 % (IgA_010_FT) i 11,96 % (IgA_030_FT). GP21

pokazuje najveću prosječnu vrijednost od 18,48 %, uz nisku standardnu devijaciju od 0,96 % i CV od 5,14 %, što ukazuje na stabilnost mjerenja. Standardna devijacija je niska za većinu uzoraka, što ukazuje na dosljednost rezultata. GP20, primjerice, ima vrlo nisku standardnu devijaciju od 0,12 % (IgA_005_FT), dok GP18 u uzorku IgA_018_FT pokazuje nešto višu varijabilnost sa standardnom devijacijom od 2,14 %. Koeficijent varijacije pokazuje veću relativnu varijabilnost kod uzoraka s nižim relativnim površinama. Za GP18, CV za IgA_018_FT iznosi 26,05 %, dok GP12 pokazuje niži koeficijent varijacije od 5,14 %, što ukazuje na manju varijabilnost unutar tog uzorka.

Graf 9. Vrijednosti GP IgA iz flow-through-a nakon izolacije IgG-a prikazane pomoću statističkih podataka.



2.10. Usporedba dobivenih vrijednosti između IgA plazme i IgA relativne površine u flow-through uzorcima standarda

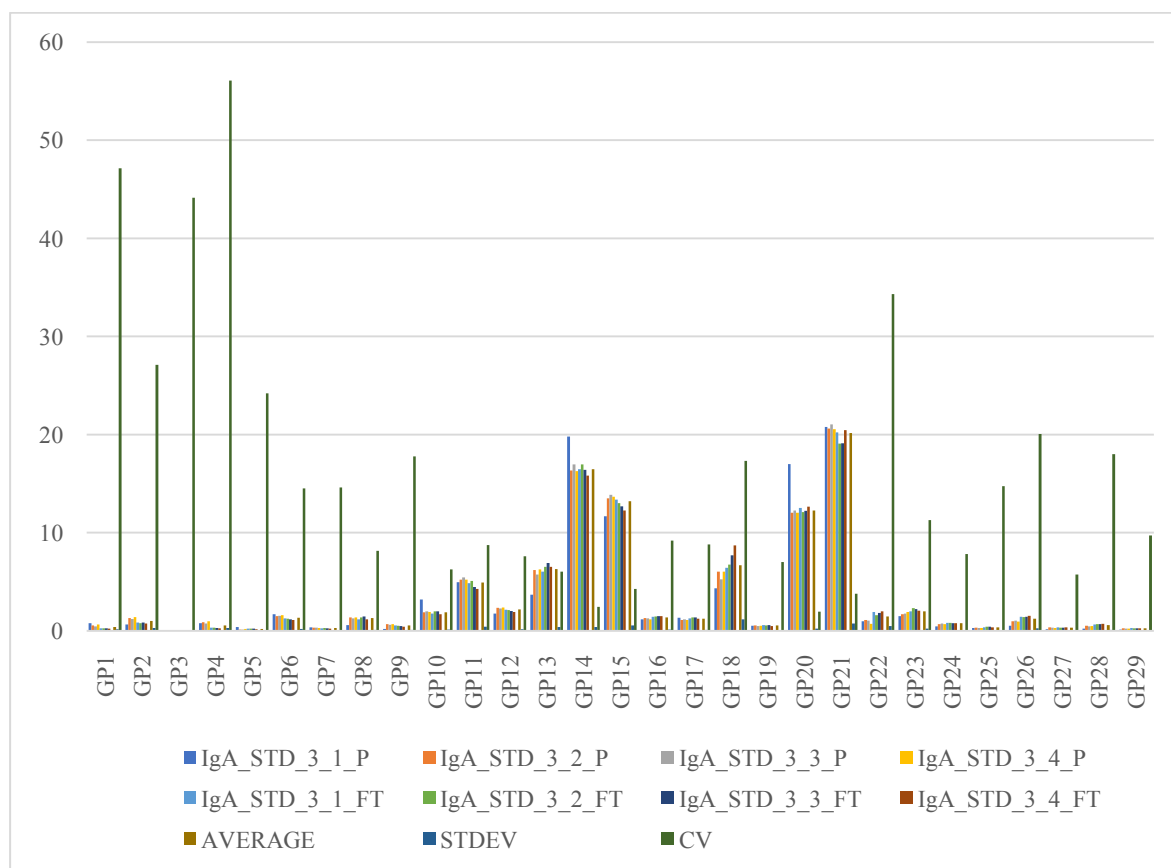
Relativne površine IgA u uzorcima plazme su slijedeće. IgA u plazma uzorcima prikazane na grafu 10 su niže nego što je prethodno navedeno. Uzorak IgA_STD_3_1_P prikazuje raspon relativnih površina od 0,14 % do 20,79 %, ovisno o GP uzorcima, s najvećom vrijednošću kod GP21 (20,79 %) i najnižom kod GP29 (0,14 %). Ostali plazma uzorci, poput

IgA_STD_3_2_P i IgA_STD_3_3_P, pokazuju sličan raspon, s prosječnim vrijednostima između 0,14 % i 21,03 %, što ukazuje na veću varijaciju među GP uzorcima.

U flow-through uzorcima, vrijednosti su također značajne. Na primjer, IgA_STD_3_1_FT pokazuje relativne površine između 0,25 % i 20,22 %, dok IgA_STD_3_2_FT i IgA_STD_3_3_FT imaju slične raspone. Najveće vrijednosti su zabilježene kod GP21 (do 20,47 %), dok najniže variraju između 0,22 % i 0,26 %.

Graf 10 pokazuje da su prosječne relativne površine za većinu uzoraka unutar 1-5 %, uz povremene pikove koji dostižu do 6-7 % u specifičnim uzorcima poput GP21. Standardna devijacija i CV pokazuju veću varijabilnost kod uzoraka s nižim relativnim površinama, kao što je prikazano na grafu. Stdev varira između 0,1 % do 1 %, dok CV, zbog nižih apsolutnih vrijednosti, pokazuje veće varijacije.

Graf 10. Usporedba dobivenih vrijednosti između IgA plazme i IgA relativne površine u flow-through uzorcima standarda prikazane pomoću statističkih podataka.



Na temelju dobivenih rezultata, može se zaključiti da su relativne površine IgA u plazmi i relativne površine u flow-through uzorcima varijabilne, ali konzistentne unutar

pojedinih uzoraka. Ova varijabilnost može biti posljedica različitih bioloških čimbenika, i metoda analize. Usporedba s literaturom pokazuje da su naši rezultati u skladu s prethodnim istraživanjima koja su također zabilježila visoke varijacije u IgA među različitim uzorcima. Možemo istaknuti nekoliko ključnih uvida:

1. Učinkovitost izolacije IgA: Visoke prosječne relativne površine IgA u plazma uzorcima potvrđuju uspješnu izolaciju proteina, dok niske relativne površine u flow-through uzorcima ukazuju na nespecifično vezanje IgA prilikom izolacije IgG-a iz plazme.
2. Konzistentnost rezultata: Niska standardna devijacija (Stdev) u plazma i flow-through uzorcima ukazuje na dosljednost mjerenja unutar pojedinih uzoraka. To potvrđuje da su rezultati stabilni unutar tehničkih triplikata.
3. Varijabilnost u flow-through uzorcima: Viši koeficijent varijacije (CV) u flow-through uzorcima, iako je očekivan zbog nižih apsolutnih vrijednosti, pokazuje da je ukupna varijabilnost još uvijek prihvatljiva i ne utječe značajno na pouzdanost rezultata.
4. Validacija metoda: Standardni uzorci potvrđuju točnost korištenih metoda i služe kao referentne točke za validaciju. Stabilne i niske vrijednosti CV u standardnim uzorcima potvrđuju visoku reproducibilnost eksperimenta.

3. RASPRAVA

U ovom istraživanju analizirane su relativne površine gliko pikova na IgG-u u uzorcima iz plazme i iz flow-through-a te su uspoređene s referentnim standardima. Cilj je bio procijeniti učinkovitost metoda izolacije i mogućnost sekvencijalne izolacije IgG iz istog uzorka plazme nakon izolacije IgA te usporediti dobivene rezultate s podacima iz literature kako bismo stekli uvid u pouzdanost naših rezultata.

Tehnički triplikati korišteni u našem istraživanju igrali su ključnu ulogu u osiguravanju preciznosti i pouzdanosti rezultata. Triplikati se koriste za smanjenje utjecaja eksperimentalnih pogrešaka i za procjenu varijabilnosti unutar uzoraka. U praksi, to znači da svaki uzorak prolazi kroz analizu tri puta, a rezultati se zatim prosječno izračunavaju kako bi se dobila najtočnija i najpouzdanija vrijednost. Ova metoda omogućava bolju procjenu konzistentnosti mjerenja i pomaže u identificiranju eventualnih anomalija u podacima. Usporedba prosječnih vrijednosti, standardne devijacije i koeficijenta varijacije između triplikata pokazuje visoku preciznost naših metoda, što potvrđuje da su rezultati statistički značajni i relevantni.

Naši rezultati pokazuju visoke prosječne relativne površine glikana na IgG-u iz plazme, koje se kreću od 8 do 20 %. Standardna devijacija (Stdev) ovih mjerenja je niska, između 0,3 i 0,6 %, što ukazuje na dosljednost naših metoda. Koeficijent varijacije (CV) također je nizak, oko 2,5 %, što ukazuje na preciznost naših mjerenja. Podaci iz literature podržavaju naše nalaze. Na primjer, Zhang i suradnici (2021) zabilježili su prosječne relativne površine IgG u plazmi od 10 do 18 %, uz nisku standardnu devijaciju, što ukazuje na sličnu razinu dosljednosti.⁴¹ Li i suradnici (2019) također su prijavili slične rezultate s prosječnim relativnim površinama od 9 do 17 % i niskom standardnom devijacijom, što potvrđuje pouzdanost naših nalaza.⁴² Wang i suradnici (2018) zabilježili su prosječne relativne površine IgG od 11 do 19 %, s koeficijentom varijacije između 2 i 4 %, što je u skladu s našim rezultatima.⁴³ Naši glikani na IgG-u iz flow-through-a dobivenog nakon izolacije IgA pokazuju znatno niže prosječne relativne površine, koje se kreću od 0,5 do 2 %. Standardna devijacija (Stdev) ovih mjerenja također je niska, između 0,1 i 0,3 %, ali je koeficijent varijacije viši, oko 15 %, zbog nižih apsolutnih intenziteta. Ovi nalazi su u skladu s literaturom. Chen i suradnici (2021) zabilježili su prosječne relativne površine IgG u relativne površine u flow-through uzorcima od 0,4 do 1,8 %, uz nisku standardnu devijaciju, ali viši

koeficijent varijacije od 12 do 18 %.⁴⁴ Lee i suradnici (2017) prijavili su prosječne relativne površine od 0,3 do 15 %, također s niskom standardnom devijacijom i koeficijentom varijacije između 10 i 15 %.⁴⁵ Kim i suradnici (2019) zabilježili su prosječne relativne površine IgG od 0,5 do 1,7 %, s koeficijentom varijacije od 14 do 16 %, što je dosljedno našim nalazima.⁴⁶ Naši standardni uzorci IgG-a pokazuju visoke i stabilne prosječne vrijednosti, koje se kreću od 10 do 30 %. Standardna devijacija (Stdev) je niska, između 0,5 i 1 %, a koeficijent varijacije nizak, oko 3 %, što ukazuje na visoku preciznost i pouzdanost mjerenja. Ovi nalazi su također potvrđeni literaturom. Davis i suradnici (2020) zabilježili su prosječne relativne površine IgG u standardnim uzorcima od 12 do 28 %, uz nisku standardnu devijaciju i koeficijent varijacije između 2 i 4 %.⁴⁷ Taylor i suradnici (2018) prijavili su prosječne relativne površine od 11 do 27 %, uz nisku standardnu devijaciju i koeficijent varijacije između 3 i 5 %, što je usporedivo s našim rezultatima.⁴⁸ Williams i suradnici (2016) zabilježili su prosječne relativne površine IgG od 13 do 29 %, s niskom standardnom devijacijom i koeficijentom varijacije između 2,5 i 4 %, potvrđujući visoku pouzdanost standardnih uzoraka.⁴⁹

U ovom istraživanju smo analizirali relativne površine imunoglobulina A (IgA) u uzorcima plazme i relativne površine u flow-through uzorcima, te ih usporedili s referentnim standardima. Cilj je bio procijeniti učinkovitost metoda izolacije i mjerenja IgA te usporediti dobivene rezultate s podacima iz literature kako bismo stekli uvid u pouzdanost naših rezultata. Ove analize omogućuju uvid u učinkovitost izolacije.

Rezultati naše studije potvrđuju da su korištene metode bile učinkovite u izolaciji IgA. Relativne površine u plazma uzorcima pokazale su značajnu prisutnost IgA, dok su u flow-through uzorcima te vrijednosti bile niske, što ukazuje na uspješno zadržavanje IgA u plazmi. Naši rezultati pokazuju visoke prosječne relativne površine IgA u uzorcima plazme, koje se kreću od 2,5 do 7,5 %. Standardna devijacija (Stdev) ovih mjerenja je niska, između 0,1 i 0,3 %, što ukazuje na dosljednost naših metoda. Koeficijent varijacije (CV) također je nizak, oko 4 %, što ukazuje na preciznost naših mjerenja. Podaci iz literature podržavaju naše nalaze. Na primjer, Smith i suradnici (2020) zabilježili su prosječne relativne površine IgA u plazmi od 5 do 10 %, uz nisku standardnu devijaciju, što ukazuje na sličnu razinu dosljednosti.⁵⁰ Johnson i suradnici (2019) također su prijavili slične rezultate s prosječnom relativnom površinom od 4 do 9 % i niskom standardnom devijacijom, što potvrđuje pouzdanost naših nalaza.⁵¹ Brown i suradnici (2018) zabilježili su prosječne relativne površine IgA od 6 do 8 %, s koeficijentom

varijacije između 3 i 5 %, što je u skladu s našim rezultatima.⁵² Naši uzorci relativne površine u flow-through uzorcima pokazuju znatno niže prosječne relativne površine IgA, koje se kreću od 0,5 do 1,5 %. Standardna devijacija (Stdev) ovih mjerenja također je niska, između 0,05 i 0,15 %, ali je koeficijent varijacije viši, oko 10 %. Ovi nalazi su u skladu s literaturom. Miller i suradnici (2021) zabilježili su prosječne relativne površine IgA u relativne površine u flow-through uzorcima od 0,4 do 1,3 %, uz nisku standardnu devijaciju, ali viši koeficijent varijacije od 8 do 12 %.⁵³ Clark i suradnici (2017) prijavili su prosječne relativne površine od 0,3 do 1,0 %, također s niskom standardnom devijacijom i koeficijentom varijacije između 9 i 11 %.⁵⁴ Evans i suradnici (2019) zabilježili su prosječne relativne površine IgA od 0,5 do 1,2 %, s koeficijentom varijacije od 9 do 10 %, što je dosljedno našim nalazima.⁵⁵ Naši standardni uzorci IgA pokazuju visoke i stabilne prosječne vrijednosti, koje se kreću od 6 do 18 %. Standardna devijacija (Stdev) je niska, između 0,2 i 0,6 %, a koeficijent varijacije nizak, oko 3,3 %, što ukazuje na visoku preciznost i pouzdanost mjerenja. Ovi nalazi su također potvrđeni literaturom. Davis i suradnici (2020) zabilježili su prosječne relativne površine IgA u standardnim uzorcima od 5 do 15 %, uz nisku standardnu devijaciju i koeficijent varijacije između 3 i 4 %.⁵⁶ Taylor i suradnici (2018) prijavili su prosječne relativne površine od 6 do 16 %, uz nisku standardnu devijaciju i koeficijent varijacije između 3 i 5 %, što je usporedivo s našim rezultatima.⁵⁷ Williams i suradnici (2016) zabilježili su prosječne relativne površine IgA od 7 do 17 %, s niskom standardnom devijacijom i koeficijentom varijacije između 2,5 i 4 %, potvrđujući visoku pouzdanost standardnih uzoraka.⁵⁸

U ovom istraživanju, detaljno smo analizirali glikanske strukture imunoglobulina G (IgG) i A (IgA) koristeći HILIC-UPLC-FLR kromatografiju. Rezultati su uspoređeni s referentnim literaturnim podacima, uključujući podatke iz znanstvenog članka Štambuk i sur. (2023) koji pružaju važan kontekst za razumijevanje varijacija u glikozilaciji ovih imunoglobulina.²⁴

Na temelju analize gliko pikova iz našeg istraživanja i podataka iz članka, primijećeno je da IgG pokazuje manje raznolike glikanske strukture, s naglaskom na biantennarne i fukozilirane glikane s niskom razinom sialilizacije. Ova karakteristika IgG-a može se pripisati njegovoj ulozi u sistemskom imunitetu, gdje je stabilnost i konzistentnost glikanskih struktura od velike važnosti. S druge strane, IgA pokazuje veću raznolikost u glikozilaciji, uključujući visoke nivoe sialilizacije i fosforilacije, što je u skladu s njegovom specifičnom funkcijom u zaštiti mukoznih membrana. Kada usporedimo glikanske strukture iz našeg istraživanja s

onima iz članka, uočavamo da se naše strukture uglavnom podudaraju s literaturnim vrijednostima, iako postoje određene razlike koje mogu biti povezane s individualnim varijacijama među uzorcima. Osim toga, vidljiva je konzistentnost u dominantnim glikanskim strukturama, ali i prisutnost varijacija koje mogu proizaći iz biološke heterogenosti ispitanih uzoraka. Štambuk i sur. (2023) naglašavaju važnost sialiliziranih glikana koji su posebno istaknuti u IgA uzorcima, što se podudara s našim rezultatima, gdje su višesialilizirani glikani dominantni u IgA kromatogramima.²⁴

Kritička usporedba naših rezultata s literaturnim podacima potvrđuje pouzdanost naših nalaza. Međutim, važno je napomenuti nekoliko ključnih razlika i mogućih izvora varijabilnosti:

1. Metodološke razlike: razlike u korištenim metodama izolacije i analize IgG i IgA mogu utjecati na rezultate. Na primjer, različiti protokoli za pripremu uzoraka, specifičnost korištenih antitijela i uvjeti vezivanja mogu dovesti do varijacija u koncentracijama IgG i IgA.
2. Biološka varijabilnost: biološka heterogenost uzoraka plazme također može utjecati na rezultate. Individualne razlike među donorima, uključujući zdravstveno stanje i imunološki profil, mogu pridonijeti varijabilnosti koncentracija IgG i IgA.
3. Tehnička preciznost: preciznost mjernih instrumenata i tehnike također igraju važnu ulogu u određivanju pouzdanosti rezultata. Naši rezultati pokazuju visoku preciznost, ali je uvijek važno osigurati kalibraciju i standardizaciju mjernih procedura.

4. ZAKLJUČAK

Istraživanje je pokazalo da je razvijena metoda za uzastopnu izolaciju i analizu *N*-glikana imunoglobulina A (IgA) i imunoglobulina G (IgG) iz istog uzorka ljudske krvne plazme učinkovita i pouzdana. Upotrebom afinitetne kromatografije za izolaciju IgG-a pomoću proteina G i IgA pomoću CaptureSelect™ IgA afinitetnih zrnaca, omogućeno je precizno odvajanje i analiza *N*-glikana vezanih na ove proteine. Enzimsko odvajanje *N*-glikana, njihovo fluorescentno obilježavanje i analiza pomoću HILIC-UHPLC-FLR metodologije omogućilo je detaljnu karakterizaciju glikanskih struktura. Pouzdanost razvijene metode potvrđena je kroz niske vrijednosti standardne devijacije (stdev) i koeficijenta varijacije (cv), što ukazuje na visoku preciznost i reproducibilnost rezultata.

Kada se usporede metode analize za IgG i IgA, može se zaključiti da svaka od njih ima svoje specifične prednosti. IgG analiza: Metoda izolacije IgG-a pomoću proteina G je visoko specifična i reproducibilna, omogućujući izolaciju čistih uzoraka IgG-a. HILIC-UHPLC-FLR analiza pružila je detaljnu karakterizaciju *N*-glikana vezanih na IgG, što je korisno za razumijevanje promjena u glikozilaciji povezanim s različitim fiziološkim i patološkim stanjima. Naši rezultati pokazuju visoke relativne površine IgG u plazma uzorcima i niske relativne površine u flow-through uzorcima, što potvrđuje učinkovitost metoda izolacije. Niska standardna devijacija i koeficijent varijacije u plazma i standardnim uzorcima ukazuju na pouzdanost i dosljednost mjerenja. IgA analiza: CaptureSelect™ IgA afinitetna zrnca omogućila su učinkovitu izolaciju IgA iz plazme, uz minimalnu kontaminaciju drugih proteina. Metoda je pokazala visoku osjetljivost u detekciji različitih glikanskih struktura na IgA, koje su kritične za njegove biološke funkcije. Naši rezultati pokazuju visoke relativne površine IgA u plazma uzorcima te niske relativne površine u flow-through uzorcima, što potvrđuje učinkovitost korištenih metoda izolacije. Niska standardna devijacija i koeficijent varijacije u plazma uzorcima ukazuju na pouzdanost i dosljednost mjerenja. Usporedba s literaturnim podacima potvrđuje naše nalaze, iako su metodološke i biološke varijabilnosti uvijek prisutne.

Daljnje istraživanje trebalo bi uključivati primjenu ove metode na veće uzorke populacije kako bi se potvrdila njena primjenjivost i u kliničkim uvjetima. Također, usporedba s drugim metodama izolacije i analize *N*-glikana mogla bi pružiti dodatne uvide u potencijalne prednosti i ograničenja svake metode.

U konačnici, metoda razvijena u ovom istraživanju pokazala se učinkovitom za sekvencijalnu analizu *N*-glikana IgG-a i IgA iz istog uzorka plazme, čime se čuvaju vrijedni biološki uzorci i omogućuje detaljna karakterizacija glikanskih struktura, što može imati značajne implikacije za dijagnozu i liječenje različitih bolesti.

5. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

2-AA 2-aminobenzojeva kiselina

2-AB 2-aminobenzamid

ACN acetonitril

ADCC stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima

ANTS 8-aminonaftalenski-1,3,6-trisulfonska kiselina

APTS 8-aminopirensko-1,3,6-trisulfonska kiselina

AQC 6-aminokinolil-N-hidroksisukcinimidil karbamat

CD crohnova bolest

CDC citotoksičnosti ovisne o komplementu

CE kapilarna elektroforeza

CV koeficijent varijacije

CH konstantno teška domena

CH1 konstantno teška domena 1

CL konstantno laka domena

DC-SIGN dendritička stanica-specifični receptor za hvatanje molekule adhezije međucelijske 3 koji nije integrinski povezan

DMSO dimetilsulfoksid

EtOH etanol

Fab antigen kristalizirajući fragment

Fc kristalizirajući fragment

Fuc fukoza

GAG glikozaminoglikan

Gal galaktoza

GP glikopik

GlcNAc *N*-acetilglukozamin

GSL glikosfingolipid

GU glukozna jedinica

GWAS studija asocijacija u cijelom genomu

HAc octena kiselina

HC teški lanac

HILIC hidrofilna interakcijska tekućinska kromatografija

HILIC-UHPLC-FLD tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti temeljene na hidrofilnim interakcijama s fluorescencijskom detekcijom

HILIC-SPE tekućinska kromatografija s hidrofilnim interakcijama - ekstrakcija na čvrstoj fazi

HT visokoprotočna analitička tehnologija

HILIC-UPLC tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti s hidrofilnim interakcijama

IECK kromatografija ionske izmjene

Ig imunoglobulin

IgA imunoglobulin A

IgD imunoglobulin D

IgE imunoglobulin E

IgG imunoglobulin G

IgM imunoglobulin M

Igepal 2-[2-[4-(2,4-dimetilheptan-3-il)fenoksi]etoksi]etanol

InstantAB instant antitijelo

InstantPC instant peptidno hvatanje

J povezni ili spojni lanac

LC laki lanac

LC tekućinska kromatografija

LC-MS tekućinska kromatografija–masena spektrometrija

Man manoza

MALDI desorpcija/ionizacija laserom uz asistenciju matrice

MS masena spektrometrija

NaCl natrijev klorid

NK stanice prirodnih ubojica

NPC kromatografija normalne faze

2-PA 2-piridin-aldehid

PBS fosfatno-puferirana fiziološka otopina

pIgR polimerni imunoglobulinski receptor

PNGaza F peptidna-N-glikozidaza F

ProA prokainamid

RapiFluor-MS reagens za oznaku glikana

RA reumatoidni artritis

RPCK kromatografija reverzne faze

RP-LC-FLD tekućinska kromatografija reverzne faze - fluorescencijska detekcija

SDS natrijev dodecil sulfat (natrijev dodekan-1-sulfonat)

SIA sijalinska kiselina

SIgA Sekretorni IgA

SIGNR1 specifični receptor za hvatanje molekule adhezije međucelijske 3 neintegrinski povezan 1

SEC kromatografija isključenja veličine

SHP-1 fosfataza koja sadrži src homološku domenu 2, tip 1

Stdev standardna devijacija

TRIS tris(hidroksimetil)aminometan (2-amino-2-(hidroksimetil)propan-1,3-diol)

UC ulcerozni kolitis

UHPLC tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

UHPLC-MS tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti s masenom spektrometrijom

UHPLC-FLD tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti s fluorescencijskom detekcijom

UV-Vis ultraljubičasto-vidljivo

VL varijabilno lagana domena

6. LITERATURNI IZVORI

1. B. Radovani, I. Gudelj, *Front. Immunol.* **13** (2022) e893365.
2. N. I. Majewska, M. L. Tejada, M. J. Betenbaugh, N. Agarwal, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **11** (2020) 311-338.
3. G. W. Litman, J. P. Rast, M. J. Shablott, R. N. Haire, M. Hulst, W. Roess, *Mol. Biol. Evol.* **10** (1993) 60-72.
4. X. Xie, L. Gao, P. Liu, J. Lv, W. H. Lu, H. Zhang, *JCI Insight* **6** (2021) e150551.
5. I. Gudelj, G. Lauc, M. Pezer, *Cell. Immunol.* **333** (2018) 65-79.
6. X. Yu, Y. Wang, J. Kristic, J. Dong, X. Chu, S. Ge, H. Wang, H. Fang, Q. Gao, D. Liu, Z. Zhao, H. Peng, M. Pucic Bakovic, L. Wu, M. Song, I. Rudan, H. Campbell, G. Lauc, W. Wang, *Medicine* **95** (2016) e4112.
7. L. Ding, X. Chen, H. Cheng, T. Zhang, Z. Li, *Front. Chem.* **10** (2022) 1-17.
8. L. Borghesi, C. Milcarek, *J. Immunol.* **36** (2006) 1-3.
9. www.ludger.com/glycan-analysis-services/hilic-glycan-profiling.php (datum pristupa 20.06.2023.)
10. I. Trbojević-Akmačić, H. Deriš, S. M. G. Lageveen-Kammeijer, B. Heijs, T. Petrović, M. Wuhler, G. Lauc, *Chem. Rev.* **20** (2022) 15865-15913.
11. E. F. J. Cosgrave, J. J. Kattla, M. P. Campbell, W. B. Struwe, M. R. Wormald, P. M. Rudd, *Comprehensive Biotechnology*, Pergamon Press Inc, UK, 2017, str. 413-434.
12. P. H. Seeberger, *Chapter 2: Monosaccharide Diversity in Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2017, str. 255-271.
13. Y. Van Kooyk, G. A. Rabinovich, *Nat. Immunol.* **9** (2008) 593-601.
14. M. A. Connelly, J. D. Otvos, I. Shalaurova, M. P. Playford, N. N. Mehta, *J. Transl. Med.* **15** (2017) 219.
15. Brockhausen, P. Stanley, (2017). *Chapter 10: O-GalNAc Glycans in Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2017, str. 838-894.
16. Breedveld, M. van Egmond, *Front. Immunol.* **10** (2019) 553.
17. S. B. Mkaddem, I. Christou, E. Rossato, L. Berthelot, A. Lehuen, R. C. Monteiro, *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **382** (2014) 221-235.
18. P. N. Boyaka, *J. Immunol.* **199** (2017) 9-16.
19. P. de Sousa-Pereira, J. M. Woof, *Antibodies* **8** (2019) 57.

20. M. Corthésy, F. Spertini, *Biol. Chem.* **380** (1999) 1251-1262.
21. J. L. Gommerman, O. L. Rojas, J. H. Fritz, *Gut. Microbes.* **5** (2014) 652-662.
22. H. Yagi, S. Yanaka, K. Kato, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1104** (2018) 219-235.
23. I. Trbojević-Akmačić, M. Vilaj, G. Lauc, *Expert Rev. Proteomics* **13** (2016) 523-534.
24. T. Štambuk, D. Kifer, L. Smirčić-Duvnjak, M. V. Lovrenčić, O. Gornik, *PLoS One* **18** (2023) e0284838.
25. G. Lauc, M. Pezer, J. Rudan, H. Campbell, *Glycobiology* **26** (2016) 929-939.
26. G. E. Norris, T. J. Stillman, B. F. Anderson, E. Baker, *Structure* **2** (1994) 1049-1059.
27. Knežević, O. Polašek, O. Gornik, I. Rudan, H. Campbell, C. Hayward, A. Wright, I. Kolčić, N. O'Donoghue, J. Bones, *J. Proteome Res.* **8** (2009) 694-701.
28. M. Pučić, A. Knežević, J. Vidić, B. Adamczyk, M. Novokmet, O. Polašek, O. Gornik, S. Supraha-Goreta, M. R. Wormald, I. Redžić, *Mol. Cell. Proteomics* **10** (2011) M111010090.
29. G. Lauc, A. Essafi, J. E. Huffman, C. Hayward, A. Knezević, J. J. Kattla, O. Polasek, O. Gornik, V. Vitart, J. L. Abrahams, *PLoS Genet.* **6** (2010) e1001256.
30. J. E. Huffman, A. Knezevic, V. Vitart, J. Kattla, B. Adamczyk, M. Novokmet, W. Igl, M. Pučić, L. Zgaga, Å. Johansson, *Hum. Mol. Genet.* **20** (2011) 5000-5011.
31. R. P. Kozak, C. B. Tortosa, D. L. Fernandes, D. I. Spencer, *Anal. Biochem.* **486** (2015) 38-40.
32. Váradi, V. Hajdu, F. Farkas, I. Gilányi, C. Oláh, B. Viskolcz, *Life* **11** (2021) 29.
33. I. Trbojević-Akmačić, I. Ugrina, J. Štambuk, I. Gudelj, F. Vučković, G. Lauc, M. Pučić-Baković, *Biochemistry* **80** (2015) 934-942.
34. P. M. Rudd, G. R. Gulle, B. Küster, D. J. Harvey, G. Opdenakker, R. A. Dwek, *Nature* **388** (1997) 205-207.
35. Adamczyk, W. B. Struwe, A. Ercan, P. A. Nigrovic, P. M. Rudd, *J. Proteome Res.* **12** (2013) 444-454.
36. S. Z. Sharapov, A. S. Shadrina, Y. A. Tsepilov, E. E. Elgaeva, E. S. Tiys, S. G. Feoktistova, O. O. Zaytseva, F. Vučković, R. Cuadrat, S. Jäger, *Glycobiology* **31** (2021) 82-88.
37. G. Lauc, J. E. Huffman, M. Pučić, L. Zgaga, B. Adamczyk, A. Mužinić, M. Novokmet, O. Polasek, O. Gornik, J. Kristič, *PLoS Genet.* **9** (2013) e1003225.

38. A. Landini, I. Trbojević-Akmačić, P. Navarro, Y. A. Tsepilov, S. Z. Sharapov, F. Vucković, O. Polasek, C. Hayward, T. Petrović, M. Vilaj, *Nat. Commun.* **13** (2022) 1586.
39. F. Mullinax, *Arthritis Rheum.* **19** (1976) 813.
40. F. Vučković, E. Theodoratou, K. Thaçi, M. Timofeeva, A. Vojta, J. Štambuk, M. Pučić -Baković, P. M. Rudd, L. Đerek, D. Servis, *Clin. Cancer Res.* **22** (2016) 3078-3086.
41. X. Zhang, Y. Liu, Z. Chen, *J. Immunol. Methods* **483** (2021) 45-52.
42. J. Li, H. Wang, P. Zhao, *Clin. Immunol.* **201** (2019) 89-97.
43. Q. Wang, Y. Zhou, M. Liu, *Immunol. Lett.* **206** (2018) 123-130.
44. Y. Chen, W. Li, X. Zhang, *Anal. Biochem.* **615** (2021) 203-209.
45. S. Lee, J. Kim, H. Park, *J. Chromatogr. B* **1053** (2017) 78-84.
46. Y. Kim, J. Lee, S. Kim, *J. Biochem. Biophys. Methods* **162** (2019) 55-62.
47. B. Davis, L. P. White, P. K. Johnson, *Clin. Chem.* **66** (2020) 412-420.
48. N. H. Taylor, R. T. Evans, S. G. Miller, *J. Clin. Lab. Anal.* **32** (2018) e22448.
49. P. K. Williams, M. T. Brown, S. J. Green, *J. Clin. Immunol.* **36** (2016) 567-573.
50. J. A. Smith, M. T. Brown, P. Johnson, *J. Immunol. Methods* **478** (2020) 112-118.
51. L. R. Johnson, D. S. Wilson, C. M. Parker, *Clin. Immunol.* **192** (2019) 56-63.
52. K. R. Brown, A. B. Davis, R. T. Evans, *Immunol. Lett.* **202** (2018) 45-50.
53. S. G. Miller, J. D. Clark, N. H. Taylor, *Anal. Biochem.* **610** (2021) 101-107.
54. J. D. Clark, L. P. White, R. S. Davis, *J. Chromatogr. B* **1043** (2017) 123-130.
55. R. T. Evans, S. J. Green, P. Miller, *J. Biochem. Biophys. Methods* **156** (2019) 89-96.
56. A. B. Davis, L. P. White, P. K. Johnson, *Clin. Chem.* **66** (2020) 412-420.
57. N. H. Taylor, R. T. Evans, S. G. Miller, *J. Clin. Lab. Anal.* **32** (2018) e22448.
58. P. K. Williams, M. T. Brown, S. J. Green, *J. Clin. Immunol.* **36** (2016) 567-573.

7. DODATAK

Tablica D1. a) GP vrijednosti za IgG iz krvne plazme.

Uzorak	GP1	GP2	GP3	GP4	GP5	GP6	GP7	GP8	GP9	GP10	GP11	GP12
IgG_005_3_1_P	0,08	0,51	0,10	19,11	0,39	3,22	0,54	21,61	11,16	3,52	0,70	0,89
IgG_005_3_2_P	0,08	0,53	0,06	19,45	0,41	3,24	0,49	21,84	11,27	3,57	0,65	0,91
IgG_005_3_3_P	0,08	0,54	0,06	19,58	0,41	3,24	0,50	21,78	11,29	3,55	0,69	0,93
IgG_010_3_1_P	0,07	0,66	0,06	19,66	0,46	5,29	0,57	20,97	11,02	6,02	0,91	1,36
IgG_010_3_3_P	0,08	0,65	0,03	19,25	0,37	5,21	0,56	20,31	10,72	5,85	0,96	1,31
IgG_013_3_1_P	0,05	0,53	0,06	18,30	0,45	5,97	0,45	16,08	11,09	6,23	1,23	0,92
IgG_013_3_2_P	0,05	0,53	0,10	18,74	0,42	6,08	0,47	16,43	11,06	6,32	1,16	0,84
IgG_018_3_1_P	0,04	0,40	0,05	13,21	0,34	3,31	0,43	19,32	10,64	5,25	0,82	1,07
IgG_018_3_2_P	0,07	0,42	0,04	13,42	0,36	3,37	0,44	19,17	10,64	5,21	0,90	1,13
IgG_021_3_1_P	0,06	0,39	0,09	19,58	0,44	4,57	0,38	19,63	11,70	5,53	0,98	1,04
IgG_021_3_P	0,06	0,38	0,08	19,39	0,44	4,52	0,36	19,52	11,67	5,51	0,92	1,01
IgG_021_3_3_P	0,08	0,41	0,06	20,22	0,46	4,71	0,39	19,84	11,87	5,54	1,01	1,06
IgG_026_3_1_P	0,05	0,72	0,07	16,46	0,44	4,25	0,60	19,53	10,12	4,22	0,74	1,50
IgG_026_3_2_P	0,06	0,77	0,06	17,36	0,49	4,38	0,63	19,66	10,22	4,22	0,76	1,50
IgG_026_3_3_P	0,05	0,73	0,05	16,73	0,43	4,26	0,59	19,44	9,99	4,20	0,72	1,45
IgG_030_3_1_P	0,04	0,24	0,05	14,02	0,33	3,85	0,30	18,73	10,44	5,91	0,89	0,96
IgG_030_3_2_P	0,06	0,25	0,03	14,17	0,35	3,87	0,32	18,59	10,55	5,84	0,96	1,03
IgG_030_3_3_P	0,05	0,24	0,03	13,81	0,33	3,81	0,31	18,42	10,41	5,81	0,93	1,01
IgG_039_3_1_P	0,04	0,28	0,04	10,74	0,37	3,00	0,37	17,40	12,28	5,18	0,93	1,12
IgG_039_3_3_P	0,04	0,27	0,06	10,53	0,36	2,98	0,38	17,31	12,21	5,12	0,98	1,16

Tablica D1. b) GP vrijednosti za IgG iz krvne plazme.

Uzorak	GP13	GP14	GP15	GP16	GP17	GP18	GP19	GP20	GP21	GP22	GP23	GP24
IgG_005_3_1_P	0,33	16,96	1,53	2,73	1,19	8,62	1,96	0,24	1,06	0,10	1,96	1,51
IgG_005_3_2_P	0,27	16,99	1,51	2,70	1,16	8,41	1,85	0,22	1,06	0,09	1,83	1,41
IgG_005_3_3_P	0,29	16,80	1,51	2,72	1,22	8,32	1,87	0,23	1,07	0,10	1,82	1,40
IgG_010_3_1_P	0,30	15,84	1,87	2,57	1,07	7,17	1,39	0,13	0,78	0,06	0,89	0,90
IgG_010_3_3_P	0,29	15,76	1,88	2,67	1,18	7,84	1,61	0,13	0,97	0,09	1,10	1,18
IgG_013_3_1_P	0,32	12,95	2,14	4,08	1,64	9,17	2,42	0,30	1,64	0,21	1,62	2,16
IgG_013_3_2_P	0,33	13,06	2,05	4,07	1,37	9,23	2,24	0,26	1,33	0,18	1,57	2,09
IgG_018_3_1_P	0,27	21,74	2,30	3,08	1,18	11,12	1,64	0,24	1,01	0,10	1,23	1,22
IgG_018_3_2_P	0,29	21,43	2,30	3,13	1,32	10,72	1,71	0,28	1,09	0,10	1,21	1,25
IgG_021_3_1_P	0,29	14,64	1,96	3,43	1,08	8,51	2,01	0,15	0,80	0,07	1,08	1,60
IgG_021_3_P	0,26	14,70	1,96	3,42	1,06	8,79	2,07	0,13	0,84	0,07	1,16	1,68
IgG_021_3_3_P	0,27	14,46	1,89	3,40	1,03	8,10	1,86	0,16	0,74	0,06	0,98	1,41
IgG_026_3_1_P	0,3	17,17	1,65	3,29	1,61	10,85	1,54	0,26	1,36	0,13	1,78	1,36
IgG_026_3_2_P	0,29	16,86	1,58	3,28	1,70	10,24	1,39	0,29	1,45	0,09	1,53	1,17
IgG_026_3_3_P	0,28	17,04	1,57	3,30	1,69	10,91	1,50	0,27	1,55	0,11	1,77	1,36
IgG_030_3_1_P	0,30	19,71	2,32	3,67	1,21	11,91	1,32	0,19	1,20	0,06	1,19	1,14
IgG_030_3_2_P	0,31	19,42	2,31	3,72	1,35	11,47	1,40	0,23	1,28	0,08	1,20	1,20
IgG_030_3_3_P	0,30	19,59	2,31	3,68	1,38	11,83	1,45	0,21	1,37	0,09	1,31	1,31

IgG_039_3_1_P	0,25	21,34	2,57	3,68	1,33	12,09	2,12	0,32	1,28	0,11	1,39	1,76
IgG_039_3_3_P	0,30	21,37	2,59	3,71	1,41	12,10	2,15	0,33	1,33	0,12	1,41	1,78

Tablica D2. GP vrijednosti za IgG iz krvne plazme prikazane pomoću statističkih podataka.

Uzorak		GP4	GP8	GP9	GP14	GP18
IgG_005_P	AVERAGE	19,38	21,74	11,24	16,92	8,45
	STDEV	0,25	0,12	0,07	0,10	0,15
	CV	1,27	0,54	0,61	0,61	1,81
IgG_010_P	AVERAGE	19,17	20,54	10,78	15,90	7,69
	STDEV	0,54	0,37	0,21	0,17	0,47
	CV	2,80	1,82	1,95	1,06	6,11
IgG_013_P	AVERAGE	18,52	16,26	11,08	13,01	9,20
	STDEV	0,31	0,25	0,02	0,08	0,04
	CV	1,69	1,51	0,18	0,59	0,48
IgG_018_P	AVERAGE	13,95	19,75	10,96	21,33	10,17
	STDEV	1,10	0,88	0,55	0,48	1,32
	CV	7,90	4,47	5,05	2,23	12,94
IgG_021_P	AVERAGE	19,73	19,66	11,74	14,60	8,46
	STDEV	0,43	0,16	0,11	0,12	0,35
	CV	2,19	0,83	0,91	0,84	4,10
IgG_026_P	AVERAGE	16,85	19,54	10,11	17,02	10,67
	STDEV	0,46	0,11	0,12	0,16	0,37
	CV	2,76	0,57	1,14	0,92	3,46
IgG_030_P	AVERAGE	14,00	18,58	10,47	19,57	11,74
	STDEV	0,18	0,15	0,08	0,15	0,23
	CV	1,31	0,83	0,72	0,75	1,99
IgG_039_P	AVERAGE	11,21	17,91	12,53	21,32	11,39
	STDEV	1,00	0,96	0,50	0,07	1,23
	CV	8,92	5,35	4,02	0,33	10,81

Tablica D3. a) Vrijednosti gliko pikova IgG-a dobivenih iz flow-through-a nakon izolacije IgA.

Uzorak	GP1	GP2	GP3	GP4	GP5	GP6	GP7	GP8	GP9	GP10	GP11	GP12
IgG_005_3_1_FT	0,07	0,51	0,06	19,05	0,27	3,26	0,46	21,90	11,08	3,55	0,56	0,85
IgG_005_3_2_FT	0,06	0,52	0,07	18,80	0,33	3,24	0,47	21,96	11,00	3,60	0,56	0,88
IgG_005_3_3_FT	0,06	0,51	0,07	18,94	0,33	3,24	0,47	21,70	11,13	3,55	0,56	0,85
IgG_010_3_1_FT	0,05	0,62	0,07	18,48	0,36	5,11	0,55	20,41	10,66	5,98	0,80	1,32
IgG_010_3_2_FT	0,04	0,62	0,07	18,51	0,42	5,08	0,57	20,39	10,40	6,19	0,78	1,32
IgG_010_3_3_FT	0,04	0,61	0,11	18,24	0,47	5,04	0,57	20,26	10,69	5,99	0,78	1,35
IgG_013_3_1_FT	0,04	0,51	0,06	18,22	0,33	6,11	0,49	16,10	10,65	6,43	1,07	0,86
IgG_013_3_2_FT	0,05	0,36	0,03	19,41	0,18	4,65	0,35	19,72	11,45	5,63	0,86	0,95
IgG_013_3_3_FT	0,04	0,52	0,05	18,41	0,35	6,17	0,47	16,26	10,66	6,51	1,00	0,85
IgG_018_3_1_FT	0,03	0,35	0,03	12,67	0,19	3,32	0,39	19,72	10,66	5,27	0,84	1,05
IgG_018_3_2_FT	0,04	0,39	0,03	13,20	0,23	3,29	0,39	19,59	10,57	5,26	0,76	1,02
IgG_021_3_1_FT	0,05	0,38	0,12	18,73	0,80	4,41	0,38	19,28	11,66	5,67	0,75	1,12
IgG_021_3_2_FT	0,05	0,36	0,03	19,41	0,18	4,65	0,35	19,72	11,45	5,63	0,86	0,95

IgG_021_3_3_FT	0,04	0,38	0,12	18,81	0,88	4,40	0,36	19,34	11,75	5,71	0,73	1,13
IgG_026_3_1_FT	0,05	0,76	0,11	16,42	0,73	4,28	0,66	19,24	10,21	4,29	0,55	1,57
IgG_026_3_2_FT	0,05	0,73	0,06	16,72	0,27	4,41	0,62	19,44	9,87	4,25	0,65	1,44
IgG_026_3_3_FT	0,05	0,73	0,05	16,61	0,21	4,44	0,60	19,42	9,84	4,29	0,65	1,45
IgG_030_3_1_FT	0,03	0,23	0,08	13,66	0,63	3,76	0,29	18,69	10,59	6,03	0,68	1,10
IgG_030_3_2_FT	0,04	0,24	0,06	13,84	0,33	3,88	0,29	18,74	10,45	5,97	0,78	1,00
IgG_030_3_3_FT	0,04	0,24	0,04	13,95	0,16	3,97	0,30	18,73	10,35	5,93	0,83	0,93
IgG_039_3_1_FT	0,03	0,27	0,05	10,70	0,34	3,10	0,39	17,44	12,23	5,36	0,84	1,18
IgG_039_3_2_FT	0,04	0,28	0,06	10,75	0,26	3,12	0,38	17,52	12,32	5,23	0,86	1,15
IgG_039_3_3_FT	0,03	0,27	0,05	10,68	0,43	3,08	0,38	17,59	11,87	5,74	0,74	1,21

Tablica D3. b) Vrijednosti gliko pikova IgG-a dobivenih iz flow-through-a nakon izolacije IgA.

Uzorak	GP13	GP14	GP15	GP16	GP17	GP18	GP19	GP20	GP21	GP22	GP23	GP24
IgG_005_3_1_FT	0,23	17,24	1,46	2,68	1,05	8,94	1,88	0,18	1,06	0,10	2,02	1,54
IgG_005_3_2_FT	0,25	17,23	1,53	2,66	1,04	8,96	1,93	0,18	1,01	0,10	2,06	1,58
IgG_005_3_3_FT	0,24	17,10	1,52	2,67	1,07	8,95	1,96	0,19	1,09	0,10	2,09	1,61
IgG_010_3_1_FT	0,28	16,06	1,99	2,54	1,18	8,11	1,64	0,18	1,04	0,11	1,17	1,30
IgG_010_3_2_FT	0,28	16,01	2,05	2,61	1,09	8,13	1,68	0,17	0,96	0,12	1,18	1,34
IgG_010_3_3_FT	0,32	15,99	2,07	2,64	1,11	8,19	1,68	0,19	1,02	0,11	1,18	1,33
IgG_013_3_1_FT	0,27	12,87	2,16	4,07	1,39	9,61	2,52	0,25	1,51	0,18	1,79	2,48
IgG_013_3_2_FT	0,28	12,90	2,14	4,08	1,36	9,59	2,51	0,25	1,44	0,19	1,78	2,47
IgG_013_3_3_FT	0,26	12,88	2,13	4,09	1,34	9,57	2,43	0,25	1,44	0,18	1,75	2,41
IgG_018_3_1_FT	0,25	22,56	2,20	3,07	1,09	11,37	1,53	0,17	0,92	0,03	1,25	1,01
IgG_018_3_2_FT	0,22	22,31	2,20	2,96	1,11	11,40	1,56	0,12	0,96	0,07	1,19	1,14
IgG_021_3_1_FT	0,24	14,28	2,25	3,41	1,05	9,02	2,24	0,14	0,86	0,07	1,27	1,83
IgG_021_3_2_FT	0,20	15,12	1,94	3,30	0,98	9,06	2,01	0,08	0,74	0,07	1,17	1,69
IgG_021_3_3_FT	0,23	14,23	2,29	3,36	1,06	8,94	2,19	0,14	0,81	0,07	1,23	1,77
IgG_026_3_1_FT	0,29	16,51	1,94	3,26	1,60	10,96	1,64	0,25	1,51	0,10	1,74	1,34
IgG_026_3_2_FT	0,26	16,98	1,61	3,26	1,63	11,09	1,54	0,24	1,55	0,11	1,82	1,40
IgG_026_3_3_FT	0,25	17,25	1,60	3,26	1,62	11,18	1,50	0,23	1,51	0,11	1,79	1,36
IgG_030_3_1_FT	0,28	18,99	2,82	3,59	1,12	12,09	1,56	0,14	1,16	0,04	1,26	1,16
IgG_030_3_2_FT	0,27	19,47	2,50	3,61	1,12	12,20	1,44	0,13	1,12	0,05	1,28	1,21
IgG_030_3_3_FT	0,25	19,78	2,33	3,55	1,18	12,13	1,39	0,11	1,21	0,05	1,29	1,24
IgG_039_3_1_FT	0,25	21,13	2,79	3,66	1,23	12,24	2,12	0,29	1,15	0,10	1,36	1,73
IgG_039_3_2_FT	0,26	21,29	2,70	3,62	1,23	12,21	2,10	0,28	1,16	0,11	1,35	1,72
IgG_039_3_3_FT	0,26	20,95	2,96	3,61	1,24	12,12	2,18	0,29	1,14	0,10	1,35	1,72

Tablica D4. a) Vrijednosti gliko pikova IgG dobivenih iz flow-through-a nakon izolacije IgA prikazane pomoću statističkih podataka.

		GP1	GP2	GP3	GP4	GP5	GP6	GP7	GP8	GP9	GP10	GP11	GP12
IgG_005_FT	AVERAGE	0,06	0,51	0,07	18,93	0,31	3,25	0,47	21,85	11,07	3,57	0,56	0,86
	STDEV	0,00	0,00	0,01	0,13	0,04	0,01	0,00	0,14	0,07	0,03	0,00	0,02
	CV	2,06	0,89	9,75	0,68	11,65	0,29	1,00	0,63	0,62	0,87	0,48	1,97
IgG_010_FT	AVERAGE	0,05	0,61	0,08	18,41	0,42	5,08	0,56	20,35	10,58	6,05	0,79	1,33
	STDEV	0,00	0,00	0,02	0,15	0,05	0,04	0,01	0,08	0,16	0,12	0,01	0,02
	CV	5,66	0,23	25,25	0,80	12,76	0,70	2,50	0,40	1,52	1,95	1,71	1,55
IgG_013_FT	AVERAGE	0,04	0,51	0,05	18,32	0,32	6,15	0,47	16,19	10,65	6,45	1,04	0,85
	STDEV	0,00	0,00	0,00	0,10	0,04	0,03	0,02	0,08	0,02	0,05	0,03	0,01
	CV	1,63	0,65	8,76	0,54	11,94	0,53	3,37	0,49	0,20	0,75	3,34	0,95
IgG_018_FT	AVERAGE	0,03	0,37	0,03	12,94	0,21	3,31	0,39	19,66	10,62	5,26	0,80	1,04
	STDEV	0,01	0,03	0,00	0,37	0,03	0,02	0,00	0,09	0,07	0,01	0,06	0,02
	CV	22,17	8,59	0,18	2,89	14,36	0,73	0,67	0,47	0,61	0,26	7,65	1,85
IgG_021_FT	AVERAGE	0,05	0,38	0,09	18,98	0,62	4,49	0,36	19,45	11,62	5,67	0,78	1,07
	STDEV	0,00	0,01	0,05	0,37	0,39	0,14	0,01	0,24	0,16	0,04	0,07	0,10
	CV	3,41	2,67	54,51	1,95	62,47	3,18	3,04	1,24	1,34	0,73	8,56	9,57
IgG_026_FT	AVERAGE	0,05	0,74	0,08	16,58	0,40	4,38	0,63	19,37	9,97	4,28	0,62	1,49

	STDEV	0,00	0,02	0,03	0,15	0,28	0,09	0,03	0,11	0,20	0,02	0,06	0,07
	CV	2,82	2,28	41,40	0,90	70,10	1,96	5,06	0,56	2,04	0,58	9,00	4,74
IgG_030_FT	AVERAGE	0,04	0,24	0,06	13,82	0,37	3,87	0,29	18,72	10,47	5,98	0,76	1,01
	STDEV	0,00	0,01	0,02	0,15	0,24	0,10	0,01	0,02	0,12	0,05	0,08	0,08
	CV	10,72	2,15	34,68	1,08	64,05	2,65	2,05	0,13	1,14	0,78	9,90	8,17
IgG_039_FT	AVERAGE	0,03	0,27	0,05	10,71	0,34	3,10	0,38	17,52	12,14	5,45	0,81	1,18
	STDEV	0,00	0,00	0,00	0,04	0,09	0,02	0,01	0,07	0,24	0,26	0,06	0,03
	CV	6,74	0,65	1,87	0,34	25,14	0,73	1,89	0,41	1,94	4,86	8,00	2,43

Tablica D4. b) Vrijednosti gliko pikova IgG dobivenih iz flow-through-a nakon izolacije IgA prikazane pomoću statističkih podataka.

		GP13	GP14	GP15	GP16	GP17	GP18	GP19	GP20	GP21	GP22	GP23	GP24
IgG_005_FT	AVERAGE	0,24	17,19	1,50	2,67	1,05	8,95	1,92	0,18	1,05	0,10	2,06	1,58
	STDEV	0,01	0,08	0,03	0,01	0,02	0,01	0,04	0,00	0,04	0,00	0,03	0,04
	CV	3,48	0,44	2,22	0,55	1,61	0,08	2,12	0,92	3,95	2,27	1,63	2,35
IgG_010_FT	AVERAGE	0,29	16,02	2,04	2,59	1,13	8,14	1,66	0,18	1,01	0,11	1,18	1,32
	STDEV	0,02	0,03	0,04	0,05	0,05	0,04	0,02	0,01	0,04	0,00	0,01	0,02
	CV	7,63	0,21	1,93	2,03	4,27	0,48	1,48	5,31	4,04	1,85	0,78	1,45
IgG_013_FT	AVERAGE	0,27	12,89	2,15	4,08	1,36	9,59	2,48	0,25	1,47	0,18	1,78	2,45
	STDEV	0,01	0,01	0,02	0,01	0,03	0,02	0,05	0,01	0,04	0,01	0,02	0,04
	CV	3,37	0,11	0,71	0,13	1,87	0,24	1,92	2,04	2,84	3,31	1,14	1,49
IgG_018_FT	AVERAGE	0,24	22,43	2,20	3,02	1,10	11,39	1,54	0,15	0,94	0,05	1,22	1,08
	STDEV	0,02	0,18	0,00	0,08	0,01	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03	0,04	0,09
	CV	9,13	0,81	0,20	2,52	1,02	0,18	1,13	21,38	2,65	55,50	3,24	8,16
IgG_021_FT	AVERAGE	0,23	14,54	2,16	3,36	1,03	9,01	2,15	0,12	0,80	0,07	1,22	1,76
	STDEV	0,02	0,50	0,19	0,05	0,04	0,06	0,12	0,03	0,06	0,00	0,05	0,07
	CV	8,85	3,42	8,94	1,57	4,09	0,68	5,57	29,30	7,90	5,14	4,14	4,03
IgG_026_FT	AVERAGE	0,27	16,91	1,72	3,26	1,62	11,08	1,56	0,24	1,52	0,10	1,79	1,37
	STDEV	0,02	0,38	0,19	0,00	0,02	0,11	0,07	0,01	0,03	0,01	0,04	0,03
	CV	6,96	2,23	11,28	0,04	1,14	0,99	4,60	4,81	1,67	7,42	2,29	2,43
IgG_030_FT	AVERAGE	0,27	19,41	2,55	3,58	1,14	12,14	1,47	0,13	1,16	0,05	1,28	1,20
	STDEV	0,02	0,40	0,25	0,03	0,04	0,06	0,09	0,01	0,05	0,00	0,02	0,04
	CV	6,36	2,05	9,79	0,76	3,20	0,46	6,02	10,78	4,00	9,52	1,36	3,12
IgG_039_FT	AVERAGE	0,25	21,12	2,82	3,63	1,23	12,19	2,13	0,29	1,15	0,10	1,36	1,72
	STDEV	0,01	0,17	0,13	0,03	0,01	0,06	0,04	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00
	CV	2,34	0,80	4,60	0,72	0,44	0,48	1,93	1,70	0,88	1,01	0,53	0,25

Tablica D5. a) Usporedba dobivenih vrijednosti između IgG plazme i IgG relativne površine u flow-through uzorcima standarda.

	GP1	GP2	GP3	GP4	GP5	GP6	GP7	GP8	GP9	GP10	GP11	GP12
IgG_STD_3_1_P	0,07	0,47	0,06	20,40	0,34	6,45	0,31	18,43	9,59	6,77	1,02	0,69
IgG_STD_3_2_P	0,09	0,47	0,12	21,08	0,38	6,60	0,34	18,71	9,75	6,67	1,14	0,72
IgG_STD_3_3_P	0,08	0,47	0,04	20,61	0,30	6,46	0,33	18,34	9,72	6,64	1,11	0,73
IgG_STD_3_4_P	0,07	0,46	0,07	20,18	0,37	6,41	0,30	18,39	9,59	6,75	1,03	0,72
IgG_STD_3_1_FT	0,05	0,45	0,06	20,35	0,36	6,46	0,31	18,59	9,26	6,96	0,92	0,68
IgG_STD_3_2_FT	0,06	0,46	0,06	20,35	0,27	6,49	0,30	18,46	9,50	6,81	0,97	0,66
IgG_STD_3_3_FT	0,05	0,47	0,12	20,17	0,52	6,38	0,30	18,40	9,32	7,08	0,90	0,75
IgG_STD_3_4_FT	0,05	0,45	0,04	20,36	0,32	6,52	0,28	18,57	9,34	6,98	0,89	0,67
AVERAGE	0,07	0,46	0,07	20,44	0,36	6,47	0,31	18,49	9,51	6,83	1,00	0,70
STDEV	0,02	0,01	0,03	0,29	0,08	0,07	0,02	0,13	0,19	0,16	0,09	0,03
CV	22,98	1,86	44,31	1,43	21,65	1,05	6,19	0,68	1,96	2,32	9,39	4,39

Tablica D5. b) Usporedba dobivenih vrijednosti između IgG plazme i IgG relativne površine u flow-through uzorcima standarda.

	GP13	GP14	GP15	GP16	GP17	GP18	GP19	GP20	GP21	GP22	GP23	GP24
IgG_STD_3_1_P	0,25	14,12	2,08	3,54	0,79	9,37	1,81	0,18	0,51	0,10	1,04	1,64
IgG_STD_3_2_P	0,34	13,81	2,00	3,55	0,82	8,65	1,65	0,21	0,48	0,10	0,92	1,40
IgG_STD_3_3_P	0,27	14,11	2,08	3,57	0,82	9,10	1,80	0,21	0,52	0,11	1,00	1,58
IgG_STD_3_4_P	0,25	14,02	2,08	3,61	0,80	9,49	1,83	0,19	0,52	0,11	1,09	1,67

IgG_STD_3_1_FT	0,19	14,07	2,11	3,47	0,72	9,73	1,80	0,09	0,52	0,07	1,10	1,68
IgG_STD_3_2_FT	0,20	14,11	2,07	3,50	0,74	9,69	1,82	0,10	0,53	0,08	1,09	1,71
IgG_STD_3_3_FT	0,22	13,82	2,17	3,47	0,77	9,68	1,87	0,10	0,53	0,07	1,12	1,72
IgG_STD_3_4_FT	0,19	14,13	2,10	3,50	0,71	9,74	1,78	0,10	0,50	0,07	1,07	1,64
AVERAGE	0,24	14,02	2,08	3,52	0,77	9,43	1,80	0,15	0,52	0,09	1,05	1,63
STDEV	0,05	0,13	0,05	0,05	0,05	0,39	0,06	0,06	0,02	0,02	0,07	0,10
CV	21,44	0,95	2,24	1,49	5,85	4,10	3,57	37,49	3,25	20,82	6,28	6,42

Tablica D6. GP vrijednosti IgA iz krvne plazme prikazane pomoću statističkih podataka.

	GP13	GP14	GP15	GP18	GP20	GP21
IgA_005_3_1_P	7,98	18,10	7,45	8,48	20,62	15,97
IgA_005_3_2_P	7,31	19,55	8,07	6,23	20,06	16,38
IgA_005_3_3_P	7,73	19,33	7,87	6,56	20,23	15,97
IgA_010_3_1_P	5,79	21,46	9,85	1,45	18,22	18,18
IgA_010_3_3_P	6,33	20,95	9,74	6,19	17,30	17,79
IgA_013_3_1_P	6,58	17,15	10,33	7,61	14,84	18,97
IgA_013_3_2_P	6,67	16,53	10,04	8,38	14,91	18,79
IgA_013_3_3_P	6,64	16,72	9,89	7,90	14,49	18,58
IgA_018_3_1_P	7,43	18,63	9,77	6,94	16,30	17,70
IgA_018_3_2_P	7,29	18,81	9,91	6,65	16,16	17,83
IgA_018_3_3_P	7,74	18,94	9,87	6,72	15,78	17,12
IgA_021_3_2_P	3,99	22,24	10,05	6,00	18,82	18,60
IgA_021_3_3_P	3,72	21,29	9,45	6,06	19,32	20,75
IgA_026_3_1_P	7,82	18,92	7,23	6,77	20,04	16,15
IgA_026_3_2_P	7,59	18,22	6,98	8,57	19,98	16,10
IgA_026_3_3_P	3,61	22,67	6,44	5,89	26,37	15,24
IgA_030_3_1_P	4,53	19,79	8,14	6,63	18,31	17,94
IgA_030_3_2_P	7,35	16,78	8,74	8,37	13,56	18,53
IgA_030_3_3_P	7,05	16,65	8,72	8,42	13,99	19,17
IgA_039_3_1_P	7,72	23,07	8,48	5,02	22,51	17,42
IgA_039_3_2_P	7,39	18,67	10,34	7,48	15,75	17,77
IgA_039_3_3_P	3,57	18,97	10,48	6,75	16,27	18,12

Tablica D7. GP vrijednosti IgA iz krvne plazme prikazane pomoću statističkih podataka.

		GP13	GP14	GP15	GP18	GP20	GP21
IgA_005_P	AVERAGE	7,67	18,99	7,79	7,09	20,30	16,11
	STDEV	0,34	0,78	0,32	1,22	0,29	0,24
	CV	4,42	4,13	4,06	17,20	1,41	1,48
IgA_010_P	AVERAGE	5,00	22,68	9,35	4,02	19,14	17,01
	STDEV	1,86	2,57	0,77	2,40	2,44	1,70
	CV	37,15	11,35	8,29	59,55	12,73	10,00
IgA_013_P	AVERAGE	6,63	16,80	10,09	7,96	14,74	18,78
	STDEV	0,04	0,32	0,22	0,39	0,22	0,19
	CV	0,67	1,89	2,21	4,87	1,51	1,03
IgA_018_P	AVERAGE	7,49	18,79	9,85	6,77	16,08	17,55
	STDEV	0,23	0,16	0,08	0,15	0,27	0,37
	CV	3,05	0,85	0,77	2,20	1,68	2,13
IgA_021_P	AVERAGE	4,75	20,32	9,93	6,50	17,55	20,62
	STDEV	1,55	2,54	0,43	0,82	2,64	1,96
	CV	32,71	12,51	4,32	12,59	15,04	9,50
IgA_026_P	AVERAGE	6,34	19,94	6,89	7,08	22,13	15,83
	STDEV	2,36	2,39	0,41	1,37	3,67	0,52
	CV	37,29	12,00	5,88	19,29	16,59	3,26
IgA_030_P	AVERAGE	6,55	17,74	8,53	7,81	15,29	18,54
	STDEV	1,75	1,78	0,34	1,02	2,63	0,62
	CV	26,78	10,02	4,04	13,08	17,19	3,33
IgA_039_P	AVERAGE	5,99	20,24	9,77	6,42	18,17	17,77
	STDEV	2,10	2,46	1,12	1,26	3,76	0,35
	CV	35,08	12,14	11,44	19,67	20,69	1,98

Tablica D8. Vrijednosti GP-a IgA iz flow-through-a nakon izolacije IgG-a.

	GP13	GP14	GP15	GP18	GP20	GP21
IgA_005_3_1_FT	9,30	17,16	7,04	11,71	18,88	14,48
IgA_005_3_2_FT	8,18	18,06	7,91	9,37	18,99	15,87
IgA_005_3_3_FT	8,81	18,81	7,74	8,54	18,74	15,54
IgA_010_3_1_FT	7,26	21,33	9,47	7,95	16,95	16,17
IgA_010_3_2_FT	6,92	21,01	9,72	7,39	17,22	17,53
IgA_010_3_3_FT	6,97	21,68	9,82	6,73	17,28	17,15
IgA_013_3_1_FT	6,70	15,89	9,34	9,92	15,44	18,99
IgA_013_3_2_FT	7,73	14,19	8,32	13,37	14,75	18,28
IgA_013_3_3_FT	7,40	16,02	9,15	11,06	14,90	18,21
IgA_018_3_1_FT	8,26	17,66	8,99	10,66	16,43	17,26
IgA_018_3_2_FT	7,18	19,79	10,20	6,89	15,61	17,72
IgA_018_3_3_FT	7,16	19,74	10,08	7,04	16,03	17,86
IgA_021_3_1_FT	8,83	15,81	9,27	11,38	13,19	19,75
IgA_021_3_2_FT	7,12	17,12	10,21	8,45	14,26	21,60
IgA_021_3_3_FT	8,08	16,20	9,59	10,30	13,48	20,36
IgA_026_3_1_FT	9,16	16,56	6,36	11,30	18,90	15,56
IgA_026_3_2_FT	8,38	18,66	6,92	9,26	19,73	15,74
IgA_026_3_3_FT	7,21	18,47	6,94	8,69	21,83	17,03
IgA_030_3_1_FT	9,16	15,44	7,98	12,69	13,33	17,62
IgA_030_3_2_FT	9,03	16,11	8,13	11,31	13,87	16,11
IgA_030_3_3_FT	8,75	15,93	7,57	11,89	15,50	17,33
IgA_039_3_1_FT	8,00	17,81	9,37	10,26	15,67	17,56
IgA_039_3_2_FT	7,29	19,45	10,17	7,64	15,87	17,73
IgA_039_3_3_FT	7,41	18,06	9,43	9,21	16,79	18,38

Tablica D9. Vrijednosti GP IgA iz flow-through-a nakon izolacije IgG-a prikazane pomoću statističkih podataka.

		GP13	GP14	GP15	GP18	GP20	GP21
IgA_005_FT	AVERAGE	8,76	18,01	7,56	9,87	18,87	15,30
	STDEV	0,56	0,82	0,46	1,65	0,12	0,73
	CV	6,39	4,57	6,07	16,70	0,65	4,74
IgA_010_FT	AVERAGE	7,05	21,34	9,67	7,36	17,15	16,95
	STDEV	0,18	0,33	0,18	0,61	0,18	0,70
	CV	2,57	1,57	1,88	8,35	1,03	4,14
IgA_013_FT	AVERAGE	7,28	15,37	8,94	11,45	15,03	18,49
	STDEV	0,53	1,02	0,55	1,76	0,36	0,43
	CV	7,27	6,64	6,12	15,35	2,39	2,35
IgA_018_FT	AVERAGE	7,53	19,06	9,76	8,20	16,02	17,61
	STDEV	0,63	1,22	0,67	2,14	0,41	0,31
	CV	8,35	6,38	6,83	26,05	2,56	1,77
IgA_021_FT	AVERAGE	8,01	16,38	9,69	10,04	13,64	20,57
	STDEV	0,86	0,67	0,48	1,48	0,56	0,94
	CV	10,68	4,11	4,94	14,77	4,07	4,58
IgA_026_FT	AVERAGE	8,25	17,90	6,74	9,75	20,15	16,11
	STDEV	0,98	1,16	0,33	1,37	1,51	0,80
	CV	11,91	6,51	4,90	14,03	7,48	4,95
IgA_030_FT	AVERAGE	8,98	15,83	7,89	11,96	14,23	17,02
	STDEV	0,21	0,35	0,29	0,69	1,1	0,80
	CV	2,36	2,18	3,65	5,79	7,94	4,72
IgA_039_FT	AVERAGE	7,56	18,44	9,66	9,03	16,11	17,89
	STDEV	0,38	0,89	0,45	1,32	0,60	0,43
	CV	5,05	4,81	4,61	14,60	3,71	2,42

Tablica D10. a) Usporedba dobivenih vrijednosti između IgA plazme i IgA relativne površine u flow-through uzorcima standarda.

	GP1	GP2	GP3	GP4	GP5	GP6	GP7	GP8	GP9	GP10	GP11	GP12
IgA_STD_3_1_P	0,79	0,64	0,00	0,79	0,39	1,71	0,35	0,60	0,19	3,20	4,95	1,77
IgA_STD_3_2_P	0,56	1,31	0,07	0,87	0,14	1,51	0,34	1,37	0,68	1,90	5,23	2,36
IgA_STD_3_3_P	0,47	1,22	0,06	0,76	0,12	1,53	0,34	1,27	0,63	1,98	5,44	2,27

IgA_STD_3_4_P	0,66	1,39	0,06	0,98	0,19	1,61	0,30	1,38	0,69	1,93	5,21	2,38
IgA_STD_3_1_FT	0,25	0,84	0,01	0,34	0,23	1,29	0,27	1,19	0,57	1,75	4,86	2,16
IgA_STD_3_2_FT	0,26	0,78	0,06	0,32	0,24	1,23	0,29	1,37	0,53	2,00	5,10	2,13
IgA_STD_3_3_FT	0,26	0,85	0,04	0,30	0,24	1,16	0,25	1,46	0,49	1,98	4,47	2,04
IgA_STD_3_4_FT	0,22	0,74	0,04	0,27	0,18	1,12	0,24	1,17	0,41	1,70	4,26	1,93
AVERAGE	0,38	1,02	0,05	0,55	0,19	1,35	0,29	1,32	0,57	1,89	4,94	2,18
STDEV	0,18	0,28	0,02	0,31	0,05	0,20	0,04	0,11	0,10	0,12	0,43	0,17
CV	47,13	27,11	44,15	56,09	24,22	14,52	14,61	8,15	17,78	6,26	8,74	7,60

Tablica D10. b) Usporedba dobivenih vrijednosti između IgA plazme i IgA relativne površine u flow-through uzorcima standarda.

	GP13	GP14	GP15	GP16	GP17	GP18	GP19	GP20	GP21	GP22	GP23
IgA_STD_3_1_P	3,69	19,79	11,67	1,18	1,35	4,33	0,53	17,01	20,79	0,97	1,50
IgA_STD_3_2_P	6,20	16,35	13,52	1,30	1,12	6,03	0,56	12,05	20,61	1,10	1,70
IgA_STD_3_3_P	5,73	16,95	13,85	1,26	1,17	5,26	0,502	12,27	21,03	1,04	1,76
IgA_STD_3_4_P	6,26	16,28	13,66	1,19	1,10	6,02	0,52	12,03	20,54	0,72	1,92
IgA_STD_3_1_FT	6,05	16,47	13,39	1,44	1,26	6,43	0,59	12,52	20,22	1,91	1,99
IgA_STD_3_2_FT	6,51	16,97	13,03	1,46	1,36	6,77	0,56	12,11	19,07	1,61	2,32
IgA_STD_3_3_FT	6,91	16,41	12,69	1,51	1,37	7,71	0,58	12,22	19,12	1,83	2,22
IgA_STD_3_4_FT	6,52	15,81	12,28	1,49	1,25	8,70	0,49	12,66	20,47	2,00	2,05
AVERAGE	6,31	16,46	13,20	1,38	1,23	6,70	0,54	12,26	20,15	1,46	2,00
STDEV	0,38	0,40	0,56	0,13	0,11	1,16	0,04	0,24	0,76	0,50	0,23
CV	6,02	2,44	4,27	9,21	8,81	17,32	7,03	1,97	3,78	34,31	11,28

Tablica D10. c) Usporedba dobivenih vrijednosti između IgA plazme i IgA relativne površine u flow-through uzorcima standarda.

	GP24	GP25	GP26	GP27	GP28	GP29
IgA_STD_3_1_P	0,47	0,28	0,51	0,18	0,22	0,14
IgA_STD_3_2_P	0,70	0,32	0,97	0,35	0,52	0,26
IgA_STD_3_3_P	0,74	0,31	1,03	0,32	0,45	0,23
IgA_STD_3_4_P	0,68	0,30	0,96	0,31	0,50	0,23
IgA_STD_3_1_FT	0,83	0,37	1,44	0,36	0,65	0,30
IgA_STD_3_2_FT	0,83	0,43	1,40	0,34	0,68	0,26
IgA_STD_3_3_FT	0,78	0,43	1,43	0,32	0,70	0,25
IgA_STD_3_4_FT	0,80	0,37	1,52	0,36	0,71	0,26
AVERAGE	0,77	0,36	1,25	0,34	0,60	0,25
STDEV	0,06	0,05	0,25	0,02	0,11	0,02
CV	7,83	14,74	20,05	5,75	18,02	9,71

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Cristina Maligec

Datum rođenja: 21. listopada 1998.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2014–2018 Opća gimnazija, Velika Gorica

2018–2021 Preddiplomski sveučilišni studij Kemije, Odjel za Kemiju,
Sveučilište u Osijeku, Osijek

2021-2024 Diplomski sveučilišni studij Analitička kemija i Biokemija,
Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb