



**ZBORNÍK PRÍSPEVKOV**  
**3. KONFERENCIE**  
**CENTRA EXCELENTNOSTI**

Aplikácia OMICS nástrojov v štúdiu vzniku chorôb a ich  
prevencie



Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, Bratislava

30. november 2022

**Recenzent**

RNDr. Jana Bellová, PhD.

[chemjbel@savba.sk](mailto:chemjbel@savba.sk)

**Editor**

Mgr. Mária Šedivá, PhD.

[chemsedm@savba.sk](mailto:chemsedm@savba.sk)

Ing. Mária Kopáčová

[chemmari@savba.sk](mailto:chemmari@savba.sk)

**ISBN 978 – 80 – 971665 – 4 - 0**

# Monitoring zmien hladín glykobiomarkerov alfa-manozidózy pomocou HPLC-FLD

Maroš Krchňák<sup>1</sup>, Rebeka Kodríková<sup>1</sup>, Marek Nemčovič<sup>1</sup>, Jaroslav Katrlík<sup>1</sup>, Ján Mucha<sup>1</sup>, Zuzana Pakanová<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Centrum glykomiky, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika; [chemkrma@savba.sk](mailto:chemkrma@savba.sk)

## Úvod

Alfa-manozidóza (AM) je ultravzácne lyzozómové ochorenie s autozómovo recesívnou dedičnosťou. Odhadovaná prevalencia je 1:500000 až 1:1000000. Príčinou ochorenia je znížená enzýmová aktivita lyzozómovej  $\alpha$ -manozidázy (EC 3.2.1.24) v dôsledku heterogénnych mutácií v *MAN2B1* géne.  $\alpha$ -manozidáza v lyzozómoch katalyzuje hydrolyzu manozidových väzieb v degradačnej dráhe N-viazaných oligosacharidov glykoproteínov. Medzi klinické príznaky patria poruchy sluchu, mentálna zaostalosť, imunodeficiencia a znížené motorické funkcie [1, 2]. Nedegradované vysokomanozové oligosacharidy (Man2-GlcNAc – Man9-GlcNAc) sa akumulujú vo všetkých tkanivách a sú detegovateľné v moči alebo krvnom sére, napr. tenkovrstvovou chromatografiou (TLC), vysokoučinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) alebo hmotnostnou spektrometriou (MS) [1, 3, 4].

Cieľom práce bola kvantifikácia špecifických oligosacharidových biomarkerov alfa-manozidózy v moči štyroch pacientov a určenie zmeny ich hladín medzi jednotlivými odbermi.

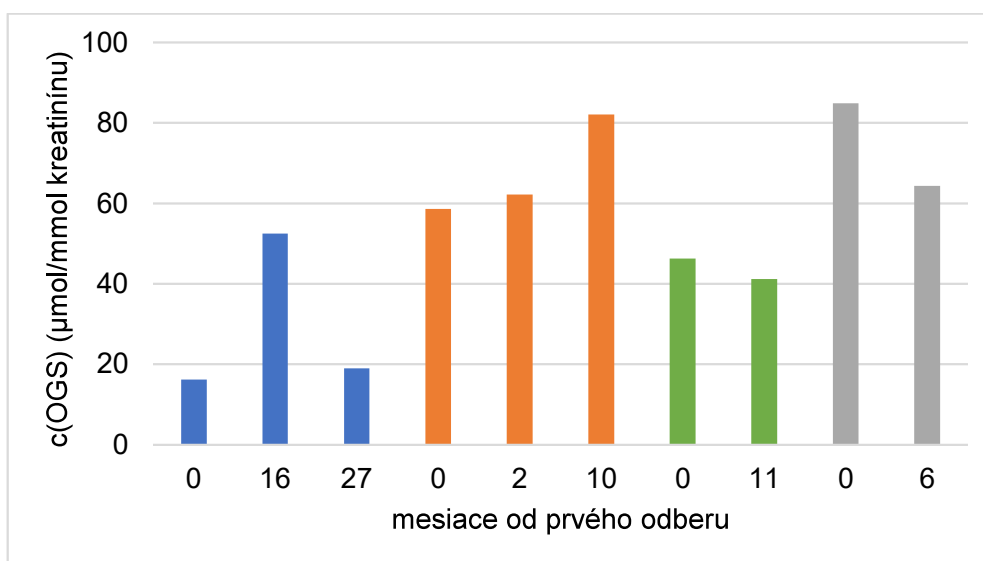
## Materiál a metódy

Ekvivalent moču obsahujúci 10  $\mu\text{g}$  kreatinínu bol zriedený ultračistou vodou na 1 ml. Vzorky boli následne prečistené pomocou kolón pre extrakciu na pevnej fáze (SPE) Supelclean LC-18 a následne Supelclean ENVI-Carb PGC. Eluát z kolón bol vysušený vo vákuovom centrifugačnom koncentrátore. Oligosacharidy boli fluorescenčne označené 2-aminobenzamidom (2-AB) 5  $\mu\text{l}$  zmesi 5 mg 2-AB, 30  $\mu\text{l}$  ľadovej kyseliny octovej, 70  $\mu\text{l}$  dimetylsulfoxidu (DMSO) a 6 mg kyanobórohydridu sodného. Po trojhodinovej inkubácii pri 65°C boli vzorky zbavené nadbytočnej značky pomocou HILIC SPE platne Strata NH<sub>2</sub> (55  $\mu\text{m}$ , 70 Å, 50 mg). Eluát bol vysušený vo vákuovom centrifugačnom koncentrátore a rozpustený v 100  $\mu\text{l}$  ultračistej vody.

Oligosacharidy boli kvantifikované použitím HPLC (Thermo Accela; Thermo Fisher Scientific, USA) s fluorescenčnou detekciou (Dionex UltiMate 3100; Thermo Fisher Scientific, USA) podľa Hanič et al. [5] pri teplote 60°C, excitačnej vlnovej dĺžke 250 nm a emisnej vlnovej dĺžke 430 nm. Použitá bola gradientová elúcia dvoch mobilných fáz: MF A: acetonitril, MF B: 100  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  mravčan amónny (pH 4,0). Oligosacharidy boli kvantifikované podľa plôch príslušných píkov na základe kalibračných kriviek 2-AB značenej maltotetraózy a maltohexózy v rozsahu 5-250  $\text{nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  pomocou softvéru Chromeleon 7.2.10 (Thermo Fisher Scientific, USA).

## Výsledky a diskusia

Vo všetkých vzorkách boli pomocou HPLC-FLD detegované a kvantifikované charakteristické oligosacharidy Man2GlcNAc-Man9GlcNAc a vyjadrené ako súčet ich koncentrácií v  $\mu\text{mol}$  oligosacharidov/ $\text{mmol}$  kreatinínu (Obr. 1). Profil oligosacharidov, ako aj ich hladiny sú v súlade s publikovanou literatúrou [6, 7, 8]. Vo vzorkách všetkých pacientov boli detegované zmeny v čase. U dvoch pacientov klesla hladina celkových oligosacharidov, u jedného pacienta hladina postupne rástla a jednému pacientovi prudko vzrástla a následne poklesla koncentrácia oligosacharidov. Použitá metóda môže byť aplikovaná pri monitoringu priebehu alfa-manozidózy, nakoľko hladiny oligosacharidov reflektujú klinický stav pacienta a závažnosť ochorenia [9].



**Obr.1:** Zmeny v hladinách celkových vysokomanózových oligosacharidov v moči pacientov. Vzorky pacientov sú odlišené farebne.

## Pod'akovanie

Táto publikácia bola podporená Ministerstvom zdravotníctva SR v rámci projektu s registračným číslom 2019/7-CHÚSAV-4 a grantom VEGA 2/0060/21. Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt ITMS 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

## Literatúra

- [1] Ceccarini M.R., Codini M., Conte C., et al. (2018) *Int. J. Mol. Sci.* 19(5), p. 1500
- [2] Malm D., Nilssen Ø. (2008) *Orphanet J. Rare Dis.* 3(1):21
- [3] Semeraro M., Sacchetti E., Deodato F., et al. (2021) *Orphanet J. Rare Dis.* 16(1), p. 24
- [4] Casado M., Ferrer-López I., Ruiz-Sala P., et al. (2017) *Rev. Anal. Chem.* 36(3), p. 20160019
- [5] Hanič M., Lauc G., Trbojević-Akmačić I. (2019) *Curr. Protoc. Protein Sci.* 97(1), e95
- [6] Xia B., Asif G., Arthur L., et al. (2013) *Clin. Chem.* 59(9), p. 1357
- [7] Borgwardt L., Dali C.I. et al. (2013) *J. Inherit. Metab. Dis.* 36(6):1015-1024.
- [8] Bruggink, C., Poorthuis, B.J.H.M. et al. (2012) *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 1671–1683.
- [9] Beck, M., Olsen, K.J. et al. (2013) *Orphanet J. Rare Dis.* 8(1), p. 88.