

TALLINNA REAALKOOL

KADRI MUUGA

11. KLASS

AMINOHAPPE LÜSIINI GLÜKATSIOONIPRODUKTI CROSSLINE'I SÜNTEES JA KATSED PUHASTAMISMETOODIKA VÄLJATÖÖTAMISEKS

JUHENDAJAD RISTO TANNER, MARTIN SAAR

SISSEJUHATUS

Inimorganismis toimub pidevalt glükatsioon, reaktsioon suhkrute ja valkude, aminohapete või lipiidide aminorühmade vahel. Seda mitte-ensümaatilist reaktsiooni kirjeldas esimesena prantsuse teadlane Louis Camille Maillard 1912. aastal.

Reaktsiooni tulemusena tekivad glükatsiooni lõpp-produktid ehk AGE-d (ingl *Advanced Glycation End Products*), mis on organismile kahjulikud ühendid. AGE-d mõjutavad kehas valkude või rakkude struktuuri ja toimimist ning on seotud mitmete raskete haiguste, näiteks ateroskleroosi, kroonilise neeruhaiguse, diabeedi, neurodegeneratiivsete haiguste, reumatoidartriidi ja krooniliste kopsuhaiguste arenguga (Aronson, 2002, Nicholl *et al.*, 1998, Mallipattu *et al.*, 2012, lk 529).

Dialüüsi vajavate patsientide jaoks on AGE-d tõsine probleem, sest dialüüs ei asenda täielikult neeru funktsioone ning ei eralda kõiki mürgiseid jääkaineid, sealhulgas suuremaid AGE-modifitseeritud valke. Hemodialüüs on protseduur, mille käigus eemaldatakse organismist ureemilised jääkained ja liigne vedelik spetsiaalse aparaadi abil. AGE-de eraldumise jälgimiseks ja parandamiseks on TalTechi teadlased loonud fluorestsentsil põhineva optilise monitori.

Loodud monitoriga kõrgemal lainepikkusel fluorestseeruvate AGE-de mõõtmiseks vajatakse markerühendit, milleks võib sobida AGE-de hulka kuuluv *crossline*. *Crossline* on kahe lüsiinijäägiga ristseotud molekul, mille süstemaatiline nimetus on 7-(5-amino-5-karboksüülpentüül)-1-(5-amino-5-karboksüülpentüül)-5-butüül-1,2,3,4-tetrool-1,2,3,4-tetrahydro-1,7-naftüridiin-7-ium ning keemiline valem $C_{24}H_{41}N_4O_{10}$. Uurimistöö kirjutamise hetkel ei ole *crossline* kommertsiaalselt saadaval ning ainet vajavatel teadlastel tuleb *crossline* ise sünteesida või AGE-de poolt modifitseeritud valkudest eraldada.

Uurimistöö eesmärk on leida meetod, mille järgi puhastada optilise monitori kalibreerimiseks vajalik markerühend ehk *crossline*. Uurimistöö koosneb kahest osast. Kirjanduse ülevaates

kirjeldatakse glükatsiooni lõpp-produkte, nende olulisust dialüüsipatsientidele ja töös kasutatavaid meetodikaid. Töö eksperimentaalne osa koosneb *crossline*'i sünteesist ning puhastamisest tahkefaasilise ekstraheerimise ja kromatograafia abil. Töö on protsess – kui midagi töötab, minnakse sellega edasi. *Crossline*'i saagist hinnatakse fluorestsentsi ja massispektromeetriaga.

Töö kirjutamisel ja meetodikate väljatöötamisel on tuginetud teemakohastele teadusartiklitele. Sünteesiskeemi loomisel on võetud aluseks Nemet *et al.* 2011. aastal kirjutatud teadustöö, milles võrreldakse kahe AGE, glükoos-lüsiin dimeeri GLUCOLDi ja *crossline*'i analoogi tekkimist Maillardi reaktsiooni järgi erinevatel tingimustel.

Autor tänab juhendaja Risto Tannerit põhjalike seletuste ja sooja suhtumise eest, samuti võimaluse eest end uurimistöö kavandamisel pidevalt proovile panna. Tänuõnad kuuluvad ka Riin Rebasele ja TÜ Katsekoja juhataja dotsent Koit Herodesele, kelle vastutulelikkus võimaldas teha töö kõige olulisemad mõõtmised.

SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	1
KASUTATUD LÜHENDID	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. Glükatsiooni lõpp-produktid	6
1.1.1. Maillardi reaktsioon	6
1.1.2. Valk-valk ristsidemed	8
1.1.3. AGE retseptorid ehk RAGE-d.....	9
1.1.4. <i>Crossline</i>	9
1.2. Neeruravi.....	10
1.2.1. Dialüüs.....	10
1.2.2. Ureemiline sündroom	11
1.2.3. AGE-de eraldumine dialüüsil.....	11
1.2.4. Muud võimalused AGE-de vähendamiseks	12
1.2.5. Markerühendi olulisus	12
2. METOODIKA, APARATUURI JA REAGENTIDE KIRJELDUS	15
2.1. Fluorestsents.....	15
2.2. HPLC ehk kõrgsurvevedelikkromatograafia.....	16
2.3. Kromatograafia kolonnid.....	16
2.4. Massispektromeetria	17
2.5. SPE ehk tahke faasi ekstraktsioon	18
3. METOODIKA JA TULEMUSED	19
3.1. Inkubeerimine.....	19
3.2. Katsed tahke faasi ekstraktsiooniga	19
3.2.1. Pöördfaas-SPE	20
3.2.2. Ioonvahetus-SPE	20
3.2.3. Fraktsioonide fluorestsents	21
3.2.4. MS analüüs.....	22
3.3. Teine inkubeerimine	24
3.3.1. Ioonvahetus-SPE II	24

3.3.2. Hypercarb-SPE	25
3.4. Kromatograafiline analüüs	26
3.4.1. Kromatograafia C18 kolonnil	27
3.4.2. Kromatograafia TSKgel Amide kolonnil	28
3.4.3. Oasis-SPE	28
3.4.4. Kromatograafiline analüüs II.....	29
3.5. Järeldused ja arutelu	30
KOKKUVÕTE	32
RESÜMEE	33
ABSTRACT.....	34
KASUTATUD KIRJANDUS	35
LISA 1. <i>Crossline</i> tekkemehhanism Maillardi reaktsiooni käigus	40
LISA 2. Strata XL ja Strata XC fraktsioonide fluorestsentspektid	41
LISA 3. MS fraktsioonide fluorestsentspektid	42
LISA 4. Massispektromeetria graafik mõõtnas iooni 545.4000-> 500.4000	43
LISA 5. Strata XL-1 (fraktsioon 2) ja XL-2 (fraktsioon 3) massispektid	44
LISA 6. Strata XC-2 (fraktsioon 4) ja Strata XC-3 (fraktsioon 5) massispektid.....	45
LISA 7. Carb fraktsioonide fluorestsentspektid	46
LISA 8. C18 kromatogrammide võrdlus.....	47
LISA 9. Metoodika fragmendid Nemet <i>et al.</i> artiklist	48

KASUTATUD LÜHENDID

AcN – atseetonitriil – (*acetonitrile*)

AGE – glükatsiooni lõpp-produkt (*advanced glycation end product*)

Boc – tert-butüüloksükarbonüülrühm (*tert-butyloxycarbonyl protecting group*)

β2M – beeta-2-mikroglobuliin (*β2-microglobulin*)

CKD – krooniline neeruhaigus (*chronic kidney disease*)

DAD – UV-spektreid registreeriv detektor (*diod array detector*) kromatograafidel

DCM – diklorometaan (*dichloromethane*)

Em – emissioon (*emission*)

Ex – ergastus (*excitation*)

HPLC – kõrgsurvevedelikkromatograafia (*high performance liquid chromatography, high pressure liquid chromatography*)

MeOH – metanool (*methanol*)

MS – massispektromeetria (*mass spectrometry*)

m/z – massi-laengu suhe (*mass to charge ratio*)

RAGE – AGE retseptor (*receptor for AGE*)

sRAGE – veres ringlev RAGE (*soluble RAGE*)

SPE – tahke faasi ekstraktsioon (*solid phase extraction*)

TFA – trifluoroäädikhape, (*trifluoroacetic acid*)

NH₄ form – ammooniumformiaat (*ammonium formiate*)

UV – ultraviolett (*ultraviolet*)

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Glükatsiooni lõpp-produktid

Glükatsiooni lõpp-produktid (ingl *advanced glycation end products*, AGE) on heterogeenne aineühendite rühm, mis tekib valkude, lipiidide või aminohapete glükatsiooni tulemusel (Oleniuc *et al.*, 2011, lk 299). Glükatsioon on suhkru molekuli mitte-ensümaatiline seostumine lipiidi, aminohappe või valgu molekuliga.

AGE-d on organismile kahjulikud ühendid. Need on reaktiivsed ja nii rakusisesed kui ka rakuvälised valgud võivad nende toimel kehas glükeeruda ja/või oksüdeeruda. Sellistel valgutasandil toimuvatel kahjustustel on organismile oluline mõju. AGE-d on seotud mitmete raskete haigustega, näiteks ateroskleroos, krooniline neeruhaigus, diabeet, neurodegeneratiivsed haigused, reumatoidartriit, kroonilised kopsuhaigused (Mallipattu *et al.*, 2012, lk 529, Aronson, 2002, Nicholl *et al.*, 1998). Ka tervetel inimestel mõjutavad need keha loomuliku vananemise käigus (Ulrich, Cerami, 2001, lk 2).

Olulisemad mehhanismid, millega AGE-d haigestumistele ning haiguste tüsistuste tekkimisele kaasa aitavad, on:

1. rakumembraani põhiliste molekulide vahel ristühenduste moodustamine ehk molekulide omavahel kokkusidumine, mis mõjutab püsivalt koe struktuuri;
2. AGE-de interaktsioon spetsiifiliste rakureseptoritega rakupindadel, mis mõjutab rakkudevahelist ainevahetuse regulatsiooni. (Goldin *et al.*, 2006, lk 601)

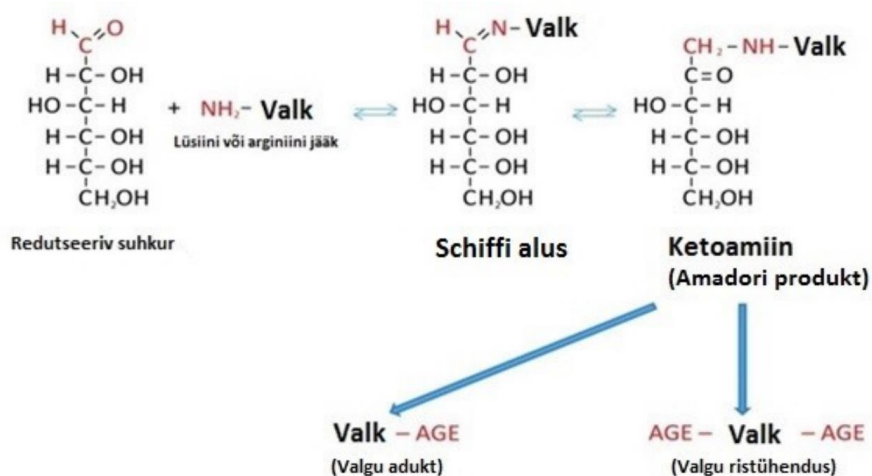
AGE-sid pole bioloogilistest materjalidest nagu veri kliinilises praktikas lihtne mõõta. Õnneks on väikesel osal AGE-dest omadus fluorestseeruda, mis lihtsustab nende tuvastamist kehavedelikes. AGE-de sisaldust kehas hinnatakse fluorestseeruvate markerühendite, näiteks pentosidiini järgi. (Adler, 2017, lk 8–9)

1.1.1. Maillardi reaktsioon

Mitte-ensümaatiline glükatsioon ehk Maillardi reaktsioon on reaktsioon redutseerivate suhkrute ja vaba aminorühmaga ühendite – lipiidide, aminohapete või valkude vahel (Goldin *et al.*, 2006). Prantsuse teadlane Louis-Camille Maillard oli esimene, kes mitte-ensümaatilist glükatsiooni 1900. aastate alguses teaduslikult uuris.

AGE-de teke on keeruline molekulaarne protsess, mis sisaldab endas lihtsaid ja keerukamaid reaktsioone, mis toimuvad nädalate või kuude jooksul (Singh *et al.*, 2001, lk 130). Redutseerivad suhkrud (nt glükoos, fruktoos, galaktoos, mannoos, riboos) on oma olemuselt nukleofiilide suunas reaktiivsed. Nende reaktiivsus lämmastikaluste suhtes ongi Maillardi reaktsiooni alus (Ulrich, Cerami, 2001, lk 3). Maillardi reaktsiooni algatab reaktsioon suhkru aldehüüdrühma ja aminorühma, näiteks lüsiini kõrvalahela ϵ -aminogruppide, vahel. Selle

tulemusena moodustub reageerinud suhkrust ja valgust koosnev ühend, Schiffi alus, ning eraldub vesi. Schiffi alus moodustab sidemete ümberpaigutamisega Amadori produkti, mis laguneb edasi stabiilsemateks AGE-deks (vt joonis 1). (Nemet *et al.*, 2011, lk 1)



Joonis 1. Maillardi reaktsiooni skeem (Adler, 2017, kohandatud Gkogolou ja Böhm 2012 põhjal)

Reaktsiooni teine etapp ehk vahefaas hõlmab dehüdratatsiooni, oksüdatsiooni, fragmenteerumist ja teisi Schiffi aluste, Amadori ühendite, samuti algsete suhkrute, amiinide, lipiidide ja teiste biomolekulide reaktsioone. Toodetakse reaktiivseid vaheühendeid nagu küllastumata karbonüülid, dikarbonüülid, furaanid, reaktiivsed hapnikuühendid (ROS) ja lihtsamad amiinid. AGE-de teke on nii oksüdatiivse keskkonna kiirendatud kui ka selle looja (Mossine, Mawhinney, 2010).

Maillardi reaktsiooni viimane etapp hõlmab vahesaaduste muutmist stabiilsemateks ühenditeks. Mitmekordsete rekombinatsiooni, lagunemise ja kondenseerumisreaktsioonide tulemusena tekivad väga erinevad, sageli ristseotud või värvilised ühendid. (*Ibid.*)

Maillardi reaktsiooni kiirendavad kõrge lähteainete ehk suhkrute ja valkude kontsentratsioon ja oksüdeeriv keskkond (Goldin *et al.*, 2006, lk 597). Kõrge suhkrusisaldus suurendab reaktiivsete aldehüdide ja läbi Le Chatelier' printsiibi ka tekkivate AGE-de hulka. Oksüdeeriv keskkond aitab kaasa pika aja vältel toimuvatele fragmenteerumis- ja oksüdeerimisreaktsioonidele. Seetõttu on diabeeti põdevatel inimestel, aga ka näiteks suitsetajatel AGE-de ning nende tekitatud kahjustuste tase kehas kõrgem (Ulrich, Cerami, 2011, lk 12, Nicholl *et al.*, 1998, lk 598). Ka fosfaatioonid võivad reaktsiooni kiirendada, katalüüsides glükoosist ja lüsiinist moodustunud Schiffi aluse sidemete ümberpaigutumist Amadori produktiks (Nemet *et al.*, 2011, lk 8).

Maillardi reaktsioonil on oluline osa ka toidukeemias. Leiva röstimisel või liha kuumutamisel tekkiv pruunikas kiht on reaktsiooni otsene tulemus. Just tänu Maillardi reaktsioonile on pruunistatud toidul omane aroom ja maitse. Kuigi kuumutamisel tekkivad ühendid, AGE-d, on kehale kahjulikud, maitsevad inimestele pruunistatud toidud ning põhjus arvatakse olevat evolutsiooniline: kuumutatud toit sisaldab väiksema tõenäosusega kahjulikke baktereid ja on ohutum (Hartings, 2011).

1.1.2. Valk- Valk ristsidemed

Üks peamisi mitte-ensümaatilise glükatsiooni tagajärgi on valgu ristühenduste moodustumine (Nemet *et al.*, 2011, lk 2). See tähendab, et suhkrujääk seostub valgu struktuuris lähedikkude aminohappejääkidega, sidudes need omavahel kokku. Ristsidumine muudab valgu struktuuri jäigemaks, mistõttu ei saa valk (näiteks ensüüm) täita oma funktsiooni. Valk-Valgu ristsidemete tekkega pikaajalistel valkudel seostatakse suurt osa diabeedi ja vananemisega seotud komplikatsioonidest. (Ulrich, Cerami, 2001, lk 4,11).

Üks AGE-dele vastuvõtlikest pikaajalistest valkudest on kollageen. Kollageeni loomuliku moodustamise käigus on ristsidemete moodustumine tegelikult normaalne nähtus. Ristsidemed tagavad kollageeni optimaalse tugevuse-painduvuse tasakaalu. Kollageeni tekkel algatab ristühendusteni viiva reaktsiooni ensüüm, mille jaoks ei ole nn täiskasvanud kollageeni reaktsioonitsentrid enam steriilselt kättesaadavad. Väiksemate AGE-de jaoks ei ole aga steriilne piirang takistuseks ning need võivad kollageenil ristsidemete moodustamist jätkata. Liigne ristsidumine sidekoes vähendab viimase elastsust ja paindlikkust ja muudab koe rabedaks. AGE-de mõju veresoontes paiknevale kollageenile võib kaasa tuua ateroskleroosi, koronaarhaiguse (veresoonte sulgumine pärgarterites), kehva perifeerse vereringe ja neerukahjustuse. (*Ibid.*, lk 11–12)

Ka silmaläätsede valgud on pika elueaga ja AGE-dele vastuvõtlikud. Nende reageerimise mõju võib viia vanemate inimeste seas levinud katarakti ehk hallkae tekkeni. (*Ibid.*, lk 11–12)

Kollageeniga toimuvad muutused toetavad AGE-de rolli vananemise kiirendajatena. Nii loomadel kui ka inimestel on leitud märkimisväärne korrelatsioon vananemise, struktuurilise kollageeni jäigenemise, pruunikaskollase värvuse ning fluorestsentsi tekkimise ja AGE-de sisalduse vahel – muutused, mis on diabeedi korral kiirenenud. (*Ibid.*, lk 12). Kuna inimestel pole AGE-de eemaldamiseks ensüüme, sobib glükatsiooniprotsess hästi teooriaga, et ainevahetusjääkide kogunemine kehas viib vananemiseni (Kim *et al.*, 2017, lk 55).

Diabeet kiirendab vanusega seotud kollageeni ristsidumise suurenemist ja AGE-de kogunemist kehas. See viitab sellele, et glükoosist tingitud ristsidemete moodustumine võib kaasa aidata nii krooniliste diabeetiliste tüsistuste kui ka vananemise füsioloogiliste muutuste tekkele. (Brownlee *et al.*, 1986, lk 1629)

1.1.3. AGE retseptorid ehk RAGE-d

Lisaks ristsidemete tekitamisele mõjutavad kehas ringlevad AGE-d läbi retseptorite rakkude tööd. RAGE-d on retseptorid immunoglobuliini perekonnast, mis on võimelised seonduma Maillardi reaktsiooni käigus tekkivate glükatsiooni lõpp-produktidega (Neeper *et al.*, 1992, lk 14998). AGE-dega seostuvad mitmed retseptorid: mõned neist on spetsiifilised ja aitavad kaasa AGE-de eemaldamisele, samas teised, nagu RAGE-retseptor, on mittespetsiifilised, seotud põletiku ja oksüdatiivse stressiga ning neid peetakse AGE-ga seotud haiguste vahendajateks (Pinkas, Aschner, 2016, lk 707).

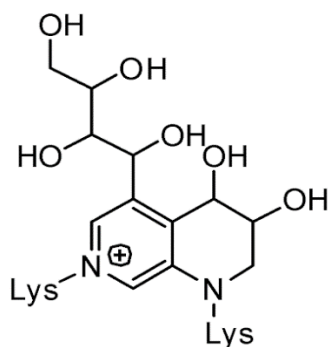
AGE-d aktiveerivad läbi RAGE-de signaalmehhanismi, mis põhjustab rakkudele stressi ning talitlushäireid ning viib põletikulise reaktsioonini. Krooniline põletik aitab aga kaasa krooniliste haiguste arengule ning kiirendab komplikatsioone: immuunsussüsteemi reaktsioon põletikule kahjustab ka terveid rakke, kudesid ja organeid (Santos-Longhurst, 2018). Selle tulemuseks võivad olla organite kahjustused, mis viivad edasiste komplikatsioonideni.

Lisaks AGE-de kogusele kehas sõltub ka RAGE-de kogus elustiilist: 2. tüüpi diabeedihaigetel on seerumi sRAGE-de (ehk veres leiduvate RAGE-de) tase oluliselt kõrgem kui mitte-diabeetikutel ning diabeedi olemasolu on sõltumatu sRAGE-sid määrav tegur. (Nakamura *et al.*, 2006, lk 370)

1.1.4. Crossline

Crossline on üks füsioloogilistes tingimustes moodustuvatest fluorestseeruvatest AGE-dest (Ulrich, Gerami *et al.*, 2001, lk 5; Obayashi *et al.*, 1996). Ta on ristseotud molekul, mis on moodustunud kahe Amadori produkti ühinemisel Maillardi reaktsiooni käigus. *Crossline*'i tekkemehhanism on toodud lisas 1.

Eri autorid käsitlevad *crossline*'iks nimetatavat ainet erinevalt. Naftüridiinil põhinev põhistruktuur on käsitluses ühine, kahe aminorühmaga seotud rühmad mitte. Kirjanduse põhjal on *crossline* enamasti seotud lüsiinijääkidega (Derbré *et al.*, 2013, Ulrich, Cerami, 2011, Kim *et al.*, 2017), kuid *crossline*'iks on nimetatud ka teiste ühenditega (aminohappejääkidega) seotud molekule (Nemet *et al.*, 2011, Obayashi *et al.*, 1996). Siinses töös käsitletakse *crossline*'i kahe lüsiinijäägiga ristseotud molekulina, mille süstemaatiline nimetus on 7-(5-amino-5-karboksüülpentüül)-1-(5-amino-5-karboksüülpentüül)-5-butüül-1,2,3,4-tetrool-1,2,3,4-tetrahydro-1,7-naftüridiin-7-ium ning keemiline valem $C_{24}H_{41}N_4O_{10}$ (vt joonis 2). Tänu mitmetele hüdrofiilsetele hüdroksüül- ja aminorühmadele on *crossline* vees hästi lahustuv.



8 Crossline

(λ_{exc} 379 nm; λ_{em} 463 nm)

Joonis 2. *Crossline*’i keemiline struktuur (Derbré *et al.*, 2013)

1996. aastal tehtud uuringu tulemused näitavad, et suurem osa glükatsiooni lõpp-produkte sisaldavatest valkudest on ristseotud *crossline*’iga sarnanevate struktuuridega. *Crossline*’i laadsete struktuuride mõõtmine kudedes võib olla indeksiks vananemisele ja diabeedi komplikatsioonide tekkele. (Obayashi *et al.*, 1996, lk 37)

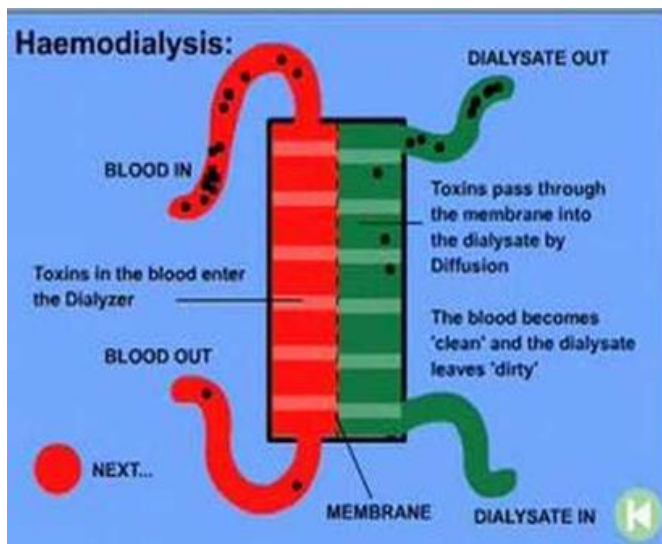
1.2. Neeruravi

1.2.1. Dialüüs

Tervetel inimestel puhastavad verd jääkainetest ning eemaldavad kehast liigset vedelikku neerud. Kui inimese neerud ei toimi piisavalt ja verre on kogunenud ohtlikul hulgal mürgiseid jääkaineid, kasutatakse neeru funktsioonide asendamiseks dialüüsi. Dialüüsini viiva neerukahjustuse peamine põhjus on krooniline neerupuudulikkus (CKD), mida põeb maailmas kergemal või raskemal kujul ligi 14% rahvastikust. CKD puhul ei muutu neerutegevus enam kunagi normaalseks (National Kidney Foundationsi koduleheküljel).

Dialüüsi on võimalik teha kahel viisil: hemodialüüsina ja peritoneaaldialüüsina. Peritoneaaldialüüsil imbuvad kahjulikud ained kõhuõõnde viidud vedelikku, mida saab patsient kodus ise vahetada. Levinumat meetodit ehk hemodialüüsi tehakse spetsiaalse aparatuuri abil dialüüsikeskuses tavaliselt kolm korda nädalas kestusega 4–5 tundi. (Põhja-Eesti Regionaalhaigla, 2016)

Hemodialüüs toimib difusiooni põhimõttel. Veri ja dialüsaat liiguvad membraaniga eraldatud torudes, jääkained liiguvad verest läbi membraani madalama kontsentratsiooniga dialüüsivedelikku (vt joonis 3). Dialüüsil on oluline mitte eemaldada verest olulisi aineid, näiteks punaseid vererakke, lümfotsüüte ja valke. Seetõttu ei ole membraanide avad piisavalt suured, et eraldada osa kahjulikest jääkainetest, näiteks suuremaid AGE-modifitseeritud valke. Parim ravi on siiski uue neeru siirdamine.



Joonis 3. Hemodialüüsi tööpõhimõte (Kidneypatientguide kodulehekülg)

Maailmas suureneb lõppfaasis CKD patsientide arv 5–7% aastas. Selle põhjus on elustiilihaiguste levimine maailmas (dialüüsini viiva neerukahjustuse peamine põhjus on diabeet) ning ka ravi kättesaadavamaks muutumine kolmanda maailma riikides. Doonorneere on vähem kui ravi vajavaid patsiente. (University of California San Francisco kodulehekülg)

1.2.2. Ureemiline sündroom

Erinevalt elavatest neerudest ei anna dialüüsiaparaat kehale olulisi aineid tagasi. Seetõttu ei saa ideaalset dialüüsi olemas olla. Mida efektiivsem on mürkide eemaldamine, seda rohkem viiakse välja ka kehale vajalikke aineid. Parameetrik, mis membraanide poori suurusele piiri seab, on veres leiduv valk albumiin (Kriefer, Canaud, 2003, lk 561).

Ureemiline sündroom on neeruhaigetel tekkiv keeruline mürgistuse seisund. Selle põhjus on pidev ühendite säilitamine kehas, mille tervetel inimestel viivad välja neerud. Neid ühendeid nimetatakse ureemilisteks jääkaineteks või ureemilisteks toksiinideks, kui need mõjutavad negatiivselt bioloogilisi funktsioone. Ureemilise sündroomi tulemuseks on mitmetahulised kliinilised probleemid. (Vanholder *et al.*, 2003, lk 1934–1935)

Ureemiline sündroom, mida püütakse dialüüsiga leevendada, puudutab palju rohkemaid aineid kui kasutatavad peamised markerid urea ja kreatiniin. Selleks, et dialüüsravi efektiivsemaks muuta, peab jälgima ka teiste ureemiliste toksiinide eraldumist. Dialüüs peaks olema disainitud viisil, mis tagab, et mitte ainult standardmolekulid, vaid ka kliiniliselt olulised mürkained saavad efektiivselt eemaldatud. (*Ibid.*, lk 1939–1941)

1.2.3. AGE-de eraldumine dialüüsil

Tervetel inimestel eraldavad kehast glükatsiooni lõpp-produkte neerud. Kui kahjustatud valgud enam ei toimi, siis lagundab need keha ja aminohapetega seotud väiksed AGE-d (ingl *AGE free adducts*) filtreeritakse neerude kaudu kehast välja. Kuna AGE-d erituvad peamiselt

neerude kaudu, suureneb neerufunktsiooni langusega AGE-de tase vereseerumis (Vlassara *et al.*, 1994, lk 54). Dialüüsist on kasu, kuid mitte palju – tavaline hemodialüüsi seanss eemaldab verest tõhusalt vaid väiksema molekulmassiga AGE-sid ja vähendab tavaliselt vere AGE-de taset kuni 20% (Dhondt *et al.*, 2000).

Ometi saab seda efektiivsust suurendada seansside sageduse või kestuse suurendamisega. On ka näiteks meetod, hemofiltratsioon, mille käigus eemaldatakse molekulid kehast vere ultrafiltrimisega hüdrostaatilise rõhu all läbi suuremate pooridega membraani. Suure läbilaskvusega membraanid vähendavad vere AGE-de sisaldust kuni 60% (Gerdemann *et al.*, 2000, lk 276). On leitud, et konvektiivsed teraapiad mitte ainult ei eralda efektiivselt ureemilisi toksine, vaid vähendavad ka põletikuliste markerite taset (Susantitaphong *et al.*, 2013, lk 2871). Seega on praeguste dialüüsimeetoditega võimalik AGE-sid efektiivsemalt kehast välja tuua, kuid sellel on oma takistused, esmajoonel koormus patsiendile, ohutus ja hind.

1.2.4. Muud võimalused AGE-de vähendamiseks

AGE-de hulk organismis on inimese elustiiliga tihedalt seotud ja nende vähendamiseks organismis on mitmeid võimalusi. Üks viis on jälgida kehaväliselt tekkinud AGE-de tarbimist, sest need moodustavad olulise osa kõikidest AGE-dest – Maillardi reaktsioon toimub ka näiteks toiduvalmistamise käigus. Süüa ei soovitata kõrgel temperatuuril kuumutatud toite nagu grillitud liha, mis sisaldavad juba tekkinud AGE-sid. Madalal kuumusel ja niiskes keskkonnas küpsetamine vähendab oluliselt tekkivate AGE-de hulka. (Mallipattu, Urribarri, 2014, lk 548)

Teine viis on aeglustada organismis toimuvat Maillardi reaktsiooni. Oluline on veresuhkru jälgimine ehk glükeemiline kontroll, sest kõrgem suhkru kontsentratsioon veres suurendab läbi Le Chatelier printsíibi reaktiivsete aldehüüdide kontsentratsiooni ja kiirendab AGE-de tekkimist. Ka oksüdeeriv keskkond kiirendab reaktsiooni. Näiteks on suitsetajate kudedes oluliselt kõrgem AGE-de tase (Nicholl *et al.*, 1998, lk 598). Seetõttu on kasulik süüa antioksüdante ja vältida oksüdatiivset stressi tekitavate ainete (näiteks tubaka ja alkoholi) tarbimist. Maillardi reaktsiooni inhibeerimiseks ja AGE-de kehast välja viimiseks on välja töötatud ravimid. (Mallipattu, Urribarri, 2014, lk 548–549)

1.2.5. Markerühendi olulisus

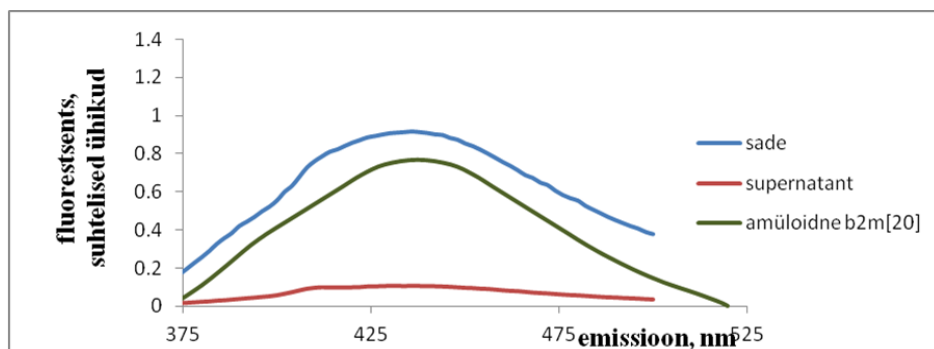
Nii fluorestsents- kui ka massispektromeetria (MS) võimaldavad mõõta aineid täpselt ja tundlikult ka väga väikeses koguses. Ilma võrdlusmaterjalita ei saa aga mõõtmise tulemusi aine päris sisaldustega kokku viia, sest ained fluorestseeruvad või ioniseeruvad erinevalt. Näiteks võib tuua lahused ainetega, millest üks fluorestseerub intensiivselt ja teine väikeses koguses. Vastavaid koefitsiente teadmata ei saa nende koguseid fluorestsentsi järgi võrrelda. Sama kehtib MS-i kohta seaduspära: kuna ained ioniseeruvad erinevalt, võivad ühesuguse kõrgusega piigid tähendada erinevat aine hulka mõõdetavas lahuses. Probleemi

lahendamiseks kasutatakse mõõtmisel võrdluseks standardlahuseid – lahuseid, milles on uuritava aine kontsentratsioon täpselt teada.

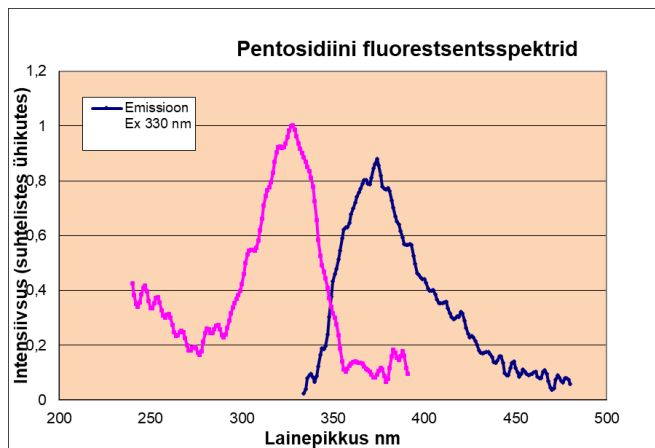
Loodud optilise monitori kalibreerimisel ei ole võimalik kõikidest dialüsaadis leiduvatest ainetest standardeid luua ja nende sisaldust fluorestsentsi järgi hinnata. Proovis leiduvate ureemiliste toksiinide iseloomustamiseks kasutatakse markerühendeid. Nende kogus mõõdetakse dialüsaadis (standardlahusega võrreldes) kromatograafiaga ning seda võrreldakse fluorestsentsiga. Korrelatsiooni kaudu markerühendite sisalduse ja dialüsaadi fluorestsentsi vahel püütakse fluorestsentsmonitori näidu järgi hinnata kogu AGE grupi ainete sisaldust dialüsaadis.

AGE-de eraldumist iseloomustavaks markerühendiks on seni kasutatud pentosidiini. Probleem on aga selles, et pentosidiin ei sobi kõikide AGE-de iseloomustamiseks. AGE-de modifitseeritud valkudes, näiteks beeta-2-mikroglobuliinis ($\beta 2M$), toimub fluorestseerumine pentosidiini lainepikkusest pikemal lainepikkusel, nagu on näha joonistelt 4 ja 5 ($\beta 2M$ emissiooni maksimum on lainepikkusel ~ 450 nm, pentosidiinil ~ 375 nm). Ka need ühendid on kliiniliselt olulised. Valk $\beta 2M$ on oluline ureemiline toksiin – kõrge $\beta 2M$ kontsentratsioon veres on kroonilise neeruhaigusega patsientidel tervise halvenemise indikaator (Cheung *et al.*, 2006, lk 554). Kõrgematel lainepikkustel fluorestseeruvate AGE-de koguse hindamiseks on soovitatav leida ka teine markerühend. Selleks markerühendiks võib fluorestsentsi järgi sobida *crossline* (Derbré *et al.*, 2013). Võrdluseks võib tuua ka Obayashi *et al.* uuringu tulemused, mis näitavad, et suurem osa AGE-sid sisaldavatest valkudest on ristseotud *crossline*´iga sarnanevate struktuuridega (Obayashi *et al.*, 1996, lk 37).

Seega võib uurimistöö õnnestumisel saada lisaks pentosidiinile täiendava markerühendi AGE kahjustatud valkude koosseisus olevate AGE-de dialüüsil eraldumise paremaks hindamiseks.



Joonis 4. Patsiendi dialüsaadi supernatandi ja sademe ning amüloidse b2m (Miyata *et al.*, 1993) fluorestsentsi võrdlus (Kressa, 2013, Miyata *et al.*, 1993 põhjal)



Joonis 5. Pentosidiini fluorestsentspektid. Roosa joon tähistab pentosidiini lahuse ergastuse ja sinine emissiooni intensiivsust (Adler, 2017, avaldamata)

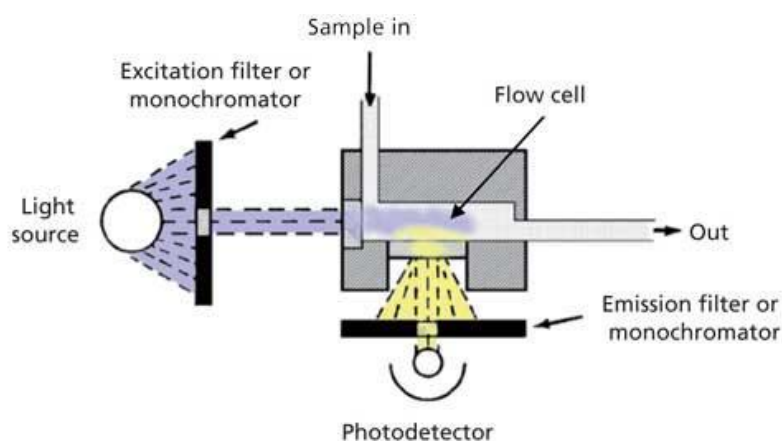
Crossline'i markerainena kasutamiseks on vaja selle kindla kontsentratsiooniga lahust. Kuna kommertsiaalselt ei ole *crossline*'i saadaval, on vaja leida selle puhastamiseks vajalik meetodika. *Crossline*'i kohta ei leitud kirjandusest molaarset neeldumiskoeffitsienti. See tähendab, et enne standardlahuse loomist tuleb *crossline* puhastada, lahusest välja kristalliseerida ja kaaluda.

2. METOODIKA, APARATUURI JA REAGENTIDE KIRJELDUS

2.1. Fluorestsents

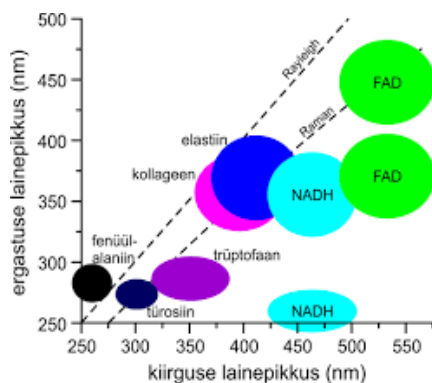
Fluorestsents on valguse kiirgumine aineksest, mida on varem ergastatud suurema energiaga kiirgusega. Elektronid ergastatakse ja need liiguvad kõrgema energiaga orbitaalidele ja tagasi ning naastes orbitaalile võivad kiirata footoni. Fluorestsents on luminesentsi alaliik ning erineb kõige sagedamini esinevast fotoluminesentsist selle poolest, et kiirgumine toimub lühikest aega pärast ergastumist. (Kiisk, 2015, lk 1)

Fluorestsentsi kasutatakse fluorestseerumisvõimeliste ainete tuvastamiseks lahustes ning analüütilises spektroskoopias. Seda mõõtes on võimalik määrata fluorestseeruva aine kontsentratsioon lahuses valguse neeldumisega võrreldes tundlikumalt. Fluorestsentsi mõõdetakse ergastatava valgusega risti (vt joonis 6). (*Ibid.*, lk 1–2)

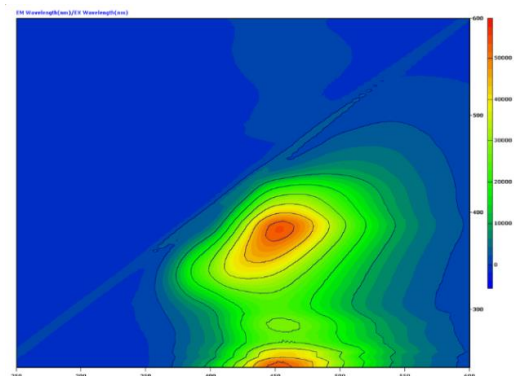


Joonis 6. Kromatograafi fluorestsentsdetektor (Dolan, 2016)

Fotoluminesentsil on kaks nn koordinaati: ergastatava ehk lahuses neelduva kiirguse lainepikkus λ_{em} ja detekteeritava ehk eralduva kiirguse lainepikkus λ_{ex} . Molekulidel on tihti laiad neeldumis- ja kiirgusribad. Need võivad erinevatel ainetel kattuda, mistõttu on ainete eristamine proovis raskendatud. Samas, kui kahel ainel on sarnased kiirgusspektrid, võivad neil olla erinevad neeldumisribad, või kui neeldumisribad kattuvad, võivad selgemalt eristuda kiirgusspektrid. Selle tõttu mõõdetakse fluorestsentsi ergastus-kiirgusmaatriksit ehk totaalspektrit. Totaalspekter kaardistab nii lahuse neeldumis- kui ka kiirgusspektri ning fluorestsentsi tugevuse (vt joonis 7 ja 8). Joonisel 7 on kujutatud tuntud bioloogiliste ainete fluorestseerumise koordinaadid totaalspektril. Joonisel 8 on toodud *crossline*'i sisaldava sünteesisegu totaalspekter pärast inkubeerimist. *Crossline* fluorestseerub maksimaalselt lainepikkusel λ_{ex} 380 / λ_{em} 463 nm (Derbré *et al.*, 2013). (Kiisk, 2015, lk 2)



Joonis 7. Totaalspektri koordinaadid tuntud bioloogilistel ainetel (Kiisk, 2015)



Joonis 8. Sünteesisegu totaalspekter. Värvus näitab fluorestsentsi intensiivsust, y-teljel on ergastamise lainepikkus ja x-teljel ergastatava kiirguse lainepikkus (autor)

2.2. HPLC ehk kõrgsurvevedelikkromatograafia

Kromatograafia on meetod komponentide eraldamiseks ainete segudest. See põhineb molekulidevahelistel vastastiktoimetel: hüdrofiilsetel ja hüdrofoobsetel mõjudel ning elektrostaatilistel jõududel.

Kromatograafia hõlmab statsionaarset ja liikuvat faasi. Liikuv faas ehk eluent voolab läbi statsionaarse faasi ehk kolonnitäite. Molekulid, millel on statsionaarse faasiga tugevam vastastiktoime, liiguvad läbi kolonni aeglasemalt. Kuna erinevad ained läbivad kolonni eri ajaga, saab kromatograafia abil ained segudest eraldada või mõõta nende esinemist ja sisaldust. (TÜ, 2015a, lk 1)

Eristatakse mitut liiki kromatograafiat. Kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC, ingl *high performance liquid chromatography*, ka *high pressure liquid chromatography*) kasutab peeneteralisi adsorbente ja liikuva faasina vedelikke, mille poorselt adsorbendilt läbivoolutamine nõuab suurt rõhku. Rõhu kasutamine aitab reagente ja ruumi kokku hoida: tänu sellele saavutatakse maksimaalne lahutusvõime minimaalse kolonni suuruse ja liikuva faasi hulga.

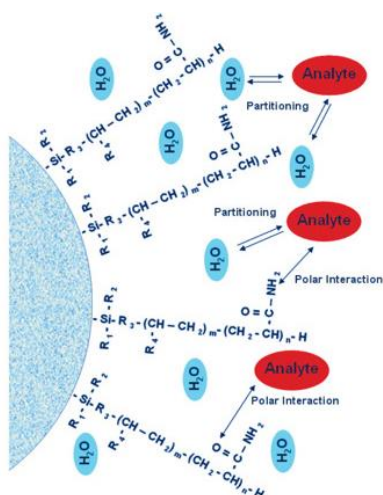
Ainete identifitseerimiseks pärast kromatografeerimisel segu komponentideks lahutamist kasutatakse erinevaid meetodikaid. TalTech Tervisetehnoloogiate Instituudi laboris on kromatograafidel kasutuses UV-detektor, fluorestsentsdetektor ja massispektromeeter. Viimane polnud uurimistöö tegemise hetkel töökorras. Mõõtmisi aitasid teha Keskkonnauuringute Keskuse ja Tartu Ülikooli Katsekoja laboratoorium.

2.3. Kromatograafia kolonnid

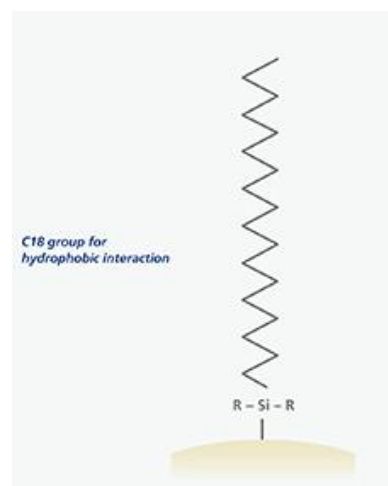
Tänapäeval on saadaval lai valik erinevaid HPLC kolonne, kus ainete püüdmisel mängivad rolli erinevad molekulidevahelised vastasmõjud.

TÜ-s oli võimalik kasutada kolonni Kinetex C18 pikkusega 100 mm siseläbimõõduga 3 mm, tera suurusega $2,6\ \mu\text{m}$, poorsusega $100\ \text{\AA}$ (firma Phenomenex, Torrance, CA, USA), kus poorse silikageeli pinnale on kovalentselt seotud hüdfoobsed oktaadetsüülradikaalid (vt joonis 10). Kolonni pikk süsivesinikahel võimaldab hüdfoobsete ainete sidumist vesilahustes. Arvati, et meetod võib *crossline*-i eraldamiseks sobida, sest molekuli aromaadne tuum seob seda kolonni mittepolaarse pinnaga. Ühtlasi on *crossline* tänu mitmetele hüdroksüülrühmadele suuremast osast AGE-dest polaarsem ning C18 kolonn eraldab potentsiaalselt selle teistest AGE-dest. (Phenomenex kodulehekülg)

Crossline-i püüdmiseks oli TalTechis valida kolonn TSKgel Amide-80, mis seob vähem polaarset orgaanilisest lahusest polaarsemad aineid läbi vesiniksidemete moodustamise. Kuna *crossline*-i molekulis olevaid vesiniksidemeid moodustavad vabad hüdroksüül- ja aminorühmad, sobib kolonn aine püüdmiseks. Kolonni poorse silikageeli pinnale on kovalentselt seotud $-(\text{CH}_2)_n-$ karbamoüülradikaalid, et püüda orgaanilisest lahustist polaarset ühendeid, enamasti suhkruid ja teisi hüdroksüülderivaate (vt joonis 9). (Sigma Aldrich kodulehekülg)



Joonis 9. TSKgel Amide-80 tööpõhimõte (Scantec Nordic LTD)



Joonis 10. C18 kolonni sisu (Advanced Chromatography Technologies)

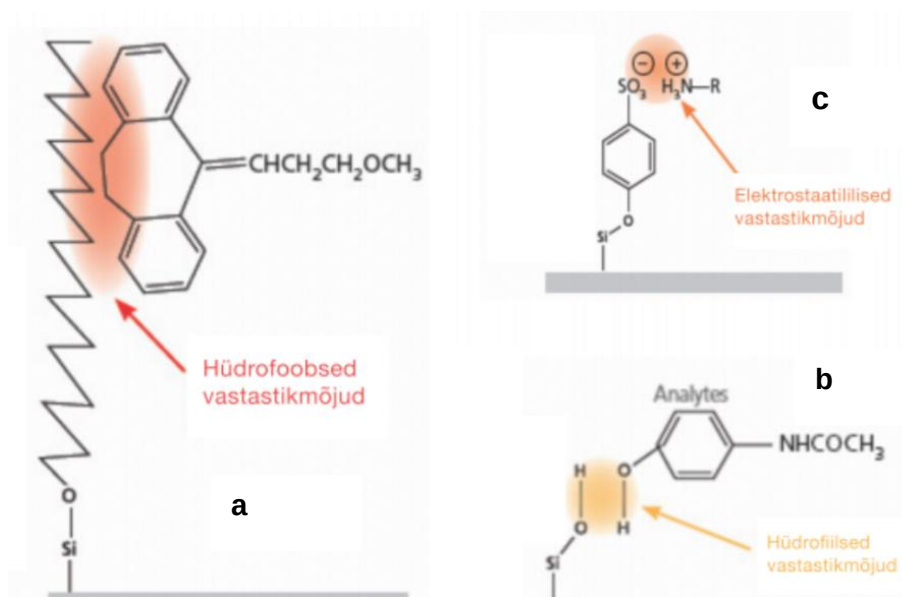
2.4. Massispektromeetria

Massispektromeetria (MS) on analüüsimeetod proovis leiduvate ainete identifitseerimiseks nende massispektrite järgi. Väikesest kogusest analüüdist tekitatakse gaasifaasilised ioonid. Ioonid eraldatakse elektri- ja/või magnetvälja abil nende massi ja laengu suhte (m/z) järgi ning nende tekitatud signaal registreeritakse massispektrina. Massispektromeetrit kasutatakse ka vedelikkromatograafia detektorina ainete identifitseerimiseks piikide järgi. (Kase, 2015, lk 14)

2.5. SPE ehk tahke faasi ekstraktsioon

Ekstraktsioon on füüsikalise-keemilise meetodi aine eraldamiseks segudest või lahustest. Ekstraktsiooni eesmärk võib olla segavate ainete eemaldamine, ainete kontsentreerimine või viimine sobivasse keskkonda, näiteks lahuste vahetamine. Eristatakse tahkefaasilist ja vedelik-vedelik ekstraktsiooni. (TÜ, 2015b, lk 10–11)

Tahke faasi ekstraktsioon on aine vedelikust tahkele faasile kandmise protsess (Royal Society of Chemistry koduleheküljel). Meetod, nagu ka kromatograafia, põhineb uuritava aine ja tahke faasi vahelistel vastastikmõjudel. Kolonni viiakse uuritava aine lahus ning aine kinnitub kolonni pinnale. Segavate ainete eemaldamiseks pestakse kolonni. Aine püüdmiseks kolonnist neutraliseeritakse vastastikmõju või pestakse kolonni statsionaarse faasiga tugevamalt seonduva ainega.



Joonis 11. Pöördfaas –SPE (a), normaalfaas-SPE (b) ja ionvahetus-SPE (c) tööpõhimõtte (Sigma Aldrich)

Pöördfaas-SPE kolonn seob orgaanilisi ühendeid dispersioonijõudude ehk hüdrofoobsete vastastikmõjude kaudu. Polaarsed ained, mis hüdrofoobse kolonni täitega ei seostu, pestakse polaarset lahustiga välja. Meetodit peetakse SPE meetodikatest kõige vähem selektiivseks, sest kolonn ei eralda sarnase struktuuriga molekule. Normaalfaas-SPE põhineb polaarsetel vastastiktoimetel: vesiniksidemetel või dipoolmomentidel. Ionvahetus-SPE toimib tänu erimärgiliste laengute tõmbumisele ja sellega püütakse (sõltuvalt kolonnist) nii positiivsete kui ka negatiivsete laengutega ioone. (Sigma Aldrich koduleheküljel)

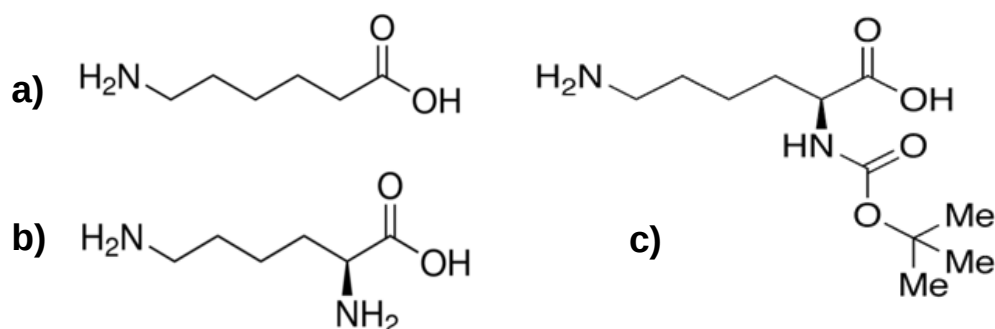
SPE-ks on loodud ka adsorbente, mis kombineerivad nimetatud vastastikmõjusid. Näiteks hypercarb kolonn sisaldab ainult grafiitset süsinikku ning töötab tänu dispersioonijõududele või laengute tekitatud elektrijõududele, sest grafiidi pind on polariseeritav (Thermo Fisher, 2007, lk 4).

3. METOODIKA JA TULEMUSED

3.1. Inkubeerimine

Crossline'i moodustumine Maillardi reaktsiooni käigus on keeruline reaktsioonide jada. Labori võimalusi arvestades võeti sünteesiskeemi loomisel aluseks päriselt organismis toimuva reaktsiooni mudel, mille tingimusi kirjeldab Nemet *et al.* 2011. aastal kirjutatud teadustöö. Nemet *et al.* töö eesmärk oli uurida mittefluorestseeruva glucoldi-nimelise AGE tekkimise tingimusi võrreldes tingimustega, kus suurem osa lüsiini ja glükoosi inkubeerimise produktist on *crossline*.

Nemet *et al.* olid inkubeerimisel kasutanud lüsiini asemel ϵ -amino-kapronhapet, millel on lüsiiniga võrreldes üks aminorühm vähem (vt joonis 12). Glükoosi aldehüüdrühm võib AGE-d moodustades reageerida lüsiini mõlema aminorühmaga. Valkudes on α -aminorühm seotud peptiidsidemes ning reaktsioonis glükoosiga osaleb ainult ϵ -aminorühm. Katses kõrvalreaktsiooni vältimiseks ja saagise suurendamiseks võeti reaktsiooni lähteaineks asendatud aminorühmaga lüsiin (α -Boc-Lys). Kaitseks valiti Boc- ehk tert-butüülkarbonüülgrupiga blokeeritud lüsiin, mis oli kommertsiaalselt saadaval ja mis ise ei fluorestseeru.



Joonis 12. ϵ -amino-kapronhape (a), L-lüsiin (b) ja α -Boc-Lys (c) (Sigma Aldrich, 2019)

Nemet *et al.* töö eeskujul prooviti *crossline*'i sünteesida järgmisel viisil: α -Boc-lüsiini (111 mg) ja glükoosi (89,3 mg) inkubeeriti molaarses suhtes 1 : 1 fosfaatpuhvris (pH 8,3 ml) 0,1 mM DTPA juuresolekul lämmastiku keskkonnas 50 °C juures esimesel korral 11 ja teisel 13 päeva. Inkubeerimise käigus muutus värvitu lahus tumepruuniks.

3.2. Katsed tahke faasi ekstraktsiooniga

Ekstraheerimise eesmärk oli leida meetod *crossline*'i puhastamiseks võimalikult paljudest kõrvalsaadustest. SPE-d ehk tahkefaasilist ekstraheerimist eelistati vedelik-vedelik ekstraktsioonile, sest *crossline* on tänu hüdrofiilsetele rühmadele vees hästi lahustuv, samas seostub tänu aromaatssele tuumale tõenäoliselt ka mittepolaarse lahustiga. Metoodika pandi

kokku adsorbendikolonne tootnud firmade juhendeid kasutades. Kõikide lahuste valmistamiseks kasutati ultrapuhast MilliQ vett.

3.2.1. Pöördfaas-SPE

Pöördfaasi SPE tegemiseks kasutati SPE-kolonne Strata-XL: 100 µm 500 mg/6ml. Sidumise parandamiseks enne ekstraheerimist hüdrofoobseid Boc-rühmi ei eemaldatud.

Peale proovi lisamist koguti kolm fraktsiooni (vt tabel 1), mille fluorestsentspektrid mõõdeti. Proovid XL-2 ja XL-3 kuivatati enne spektrite mõõtmist N₂ voolus ja lahustati 2 ml 0,1 M sipelghappes.

Peale esimest väljapesu atseetonitriiliga jäi kolonni helepruun kiht. Selle püüdmiseks pesti kolonni diklorometaaniga (Strata XL-3), aga värv jäi siiski kolonni. Eeldati, et *crossline* kui suhteliselt polaarne aine oli ekstraheerimisel välja pestud.

Tabel 1. Strata XL meetod

Nr	Etapp	Strata XL	Fraktsioon
1	Kolonni stabiliseerimine	MeOH 12,5 ml H ₂ O 12,5 ml	-
2	Proovi lisamine	alglahus 1 ml	XL-1
3	Kolonni pesu	H ₂ O 5 ml	
4	Väljapesu 1	AcN 5 ml	XL-2
5	Väljapesu 2	DCM 5 ml	XL-3

3.2.2. Ioonvahetus-SPE

Crossline'i sidumiseks vabade aminorühmade kaudu valiti ioonvahetus-SPE. Neutraalses või happelises keskkonnas on lüsiinijääkide aminorühmad protoneeritud ning püstitati hüpotees, et neid võiks püüda kationiit. Hüpoteesi testimiseks kasutati Strata-X-C 33 µm Polymeric Strong Cation, 60 mg / 3 ml kolonne.

Enne ekstraheerimist eemaldati algsegult Boc-kaitserühmad, et vabastada ioniseeruvad aminorühmad. 1 ml inkubeeritud alglahusele lisati 0,265 ml sipelghapet (pH 1,5 saavutamiseni) ja kuumutati 100 °C vees 5 minutit.

Kuna laboris olevad kolonnid olid väikse mahuga, töötati samal ajal kahe kolonniga, mille fraktsioonid koguti ühte anumasse. Tabelis on andmed esitatud ühe kolonni kohta. Koguti kolm

fraktsiooni (vt tabel 2), millel mõõdeti fluorestsentspektreid. Esimese pesu tulemus (metanooliga) oli helepruun, esimene väljapesu tumedam. Teine väljapesu hele, vaid kerge pruunika varjundiga.

Tabel 2. Strata XC meetod

Nr	Etapp	Strata XC	Fraktsioon
1	Kolonne stabiliseerimine	MeOH 2 ml	-
2	Proovi lisamine	Alglahus : HCOOH (10:2,65) 0,5 ml	XC-2
3	Kolonne pesu	MeOH 2 ml	
4	Väljapesu 1	5% NH ₄ OH MeOH-s 2 ml	XC-3
5	Väljapesu 2	5% NH ₄ OH MeOH-s 2 ml	XC-4

3.2.3. Fraktsioonide fluorestsents

Fluorestsentsi mõõtmise eesmärk oli hinnata läbi viidud ekstraheerimise efektiivsust.

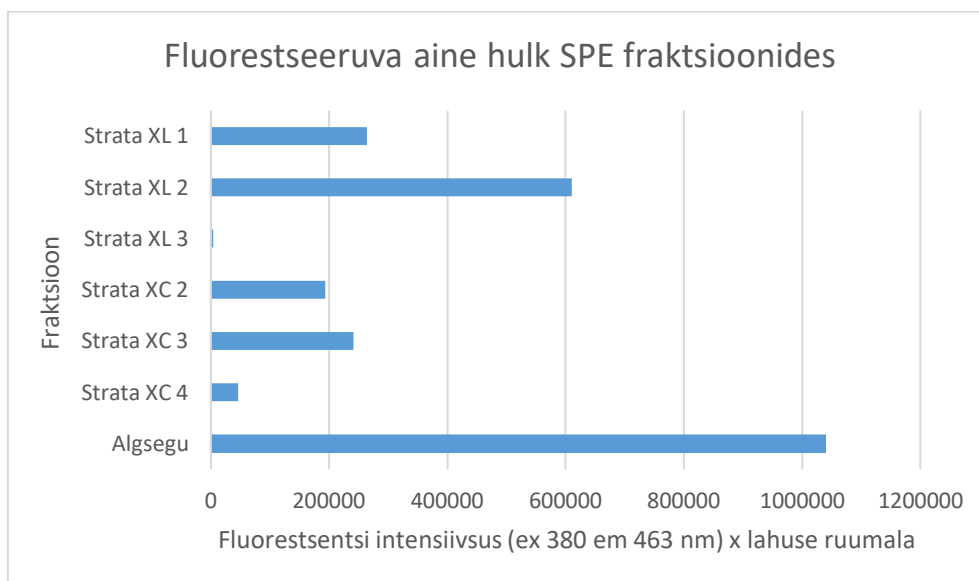
Fluorestsentsi mõõtmiseks kasutati spektrofluoromeetrit RF-6000 (firma Shimadzu, Kyoto, Jaapan), mõõteküveti optiliste teedega ex/em vastavalt 4/4 mm. Fluorestsentsspekter registreeriti ergastamise lainepikkuste vahemikus 200–550 nm intervalliga 5 nm, emissiooni mõõtmisega vahemikus 220–600 nm intervalliga 1 nm, ex/em mõõteriiba laiused vastavalt 5/5 nm. Mõõteriista juhiti ja andmeid töödeldi arvutiprogrammiga Labsolutions RF v. 1.12 (Shimadzu, Kyoto, Jaapan). Mõõdetud spektrid on toodud lisas 2.

SPE hindamiseks fluorestsentsi järgi võrreldi kogutud fraktsioonide fluorestsentsi lainepikkusel ex 380 / em 463 nm, mille juures peaks fluorestseeruma crossline (Derbré *et al.*, 2013). Fluorestsentsi intensiivsus näitab fluorestseeruva aine kontsentratsiooni proovis. Kuna kogutud fraktsioonide ruumalad olid erinevad, korrutati proovis olevate fluorofooride koguste võrdlemiseks fluorestsentsi intensiivsus kogutud lahuse ruumalaga.

$$c = \frac{n}{V} \Rightarrow n = c \times V$$

Kõige tumedamaid lahuseid, Strata XL 2 ja algsegu lahjendati mõõtmiseks vastavalt 10 ja 20 korda. Ainete koguste leidmisel korrutati saadud tulemus lisaks lahjendusega. Lahjenduste

tegumine võis mõõdetud intensiivsust veidi suurendada, sest kangemas lahuses neeldub osa ergastavast kiirgusest.



Joonis 13. Fluorestseeruva aine hulk SPE fraktsioonides

Mõõdetud spektrite (vt lisa 2) ja fluorestsentsi intensiivsuse järgi eeldati, et *crossline* pesti välja kolonnide pesu ja esimese väljapesuga, sest järgmistes väljapesudes oli fluorestsentsi vähem. Fluorestsentsspektrite põhjal järelitati, et *crossline* ei olnud ainuke segus tekkinud fluorestseeruv ühend ning et tulemuste täpsemaks hindamiseks tuleb kasutada massispektromeetriat.

Lainepikkustel ex 380 nm ja em 463 nm intensiivsema fluorestsentsiga proovidest valiti mõlema meetodi pesu, mida analüüsiti edasi MS-iga.

3.2.4. MS analüüs

Massispektromeetria mõõtmisi aitas teha Riin Rebane Eesti Keskkonnauuringute Keskuse laboratooriumis. Proovide kromatografeerimiseks sobivat kolonni laboris kasutada ei olnud.

MS-iga analüüsiti fraktsioone XL-1, XL-2, XC-2 ja XC-3. Enne mõõtmist viidi kõik proovid pH väärtusele 3 ning filtreeriti tahkete osakeste eemaldamiseks 0,2 µm poori läbimõõduga teflonfiltriga (PTFE). Selleks proovid kuivatati ja lahustati 1,5 ml 0,025 M sipelghappes. Erandiks oli XL-2, mis oli juba lahustatud 2 ml-s 0,1 M sipelghappes. Proovile lisati sobiva pH saavutamiseks 0,4 ml ammooniumformiaati. XL-1 ja XL-2 fraktsioonidel eemaldati Boc-rühmad nagu varem kirjeldatud.

Massispektromeetrisse minevasse 0,1 M sipelghappe lahusesse süstiti väike kogus valitud lahuseid. MS detektor seadistati Nemet *et al.* meetoodika järgi MS/MS režiimile otsima emaiooni m/z 545,4 ja tütariooni m/z 500,36, kokkupõrke energiaga 35 eV. (Nemet *et al.*, 2011, lk 4) Sel

viisil saadi nn kromatogramm fragmendist, mis tekkis *crossline*'i täismassiga ionist. *Crossline*'i sisaldust käsitleti proportsionaalsena fragmendi graafikualuse pindalaga.

MS graafikud jõudsid autorini integreerimiseks ebamugavas docx-formaadis. Graafikualuse pindala leidmiseks lõigati graafikud paberist välja ja kaaluti. Võrdluseks kaalutud lehtede põhjal hinnati, et paberi ebaühtlusest tekkiv mõõteviga oli väiksem kui 1%.

Leiti, et kõige rohkem sisaldas *crossline*'i Strata XC-3 ehk kationiidi-SPE väljapesu (vt tabel 3). Ka see ekstraheerimine ei olnud väga efektiivne, sest ligi neljandik *crossline*'ist pesti metanooliga välja. Teadmata põhjusel oli esimeses ja teises Strata XL fraktsioonis kokku *crossline*'i vähem. Selle põhjus vajab edasist uurimist.

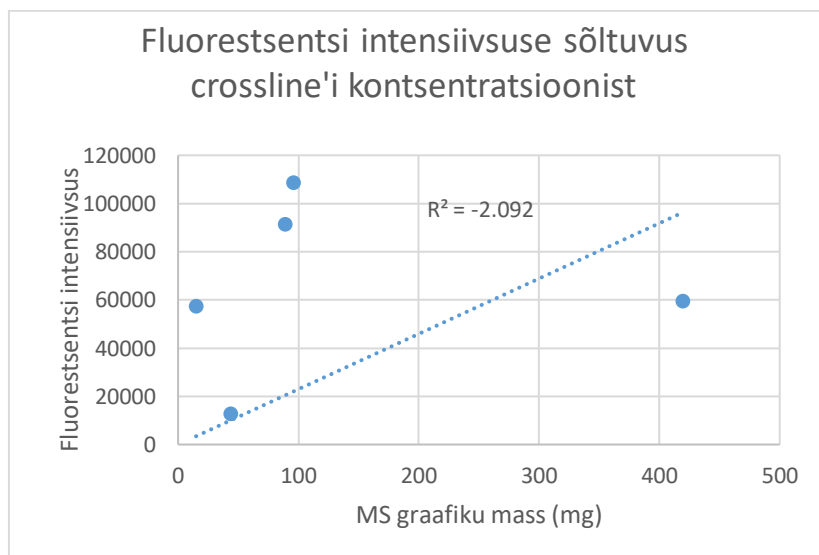
Piikide massispektritelt otsiti ioone, mis viitaksid sellele, et Boc-rühmad pole eemaldatud. Selgelt välja joonistunud piikide seast neid ei leitud ning eeldati, et Boc-rühmade eemaldamine oli olnud efektiivne. Mõõdetud massispektrid on toodud lisades 5–7.

Tabel 3. *Crossline*'i kogus mõõdetud fraktsioonides graafiku massi järgi

Fraktsioon	XC II 2	XL 1	XL 2*	XC 2	XC 3
MS graafiku mass (mg)	43,55 mg	88,87 mg	95,67 mg	149,13 mg	419,5 mg

* Lahuse maht oli 2,4 ml, teiste proovide oma 1,5 ml. Teiste proovidega võrreldav mass (aine sisaldus) oleks $95,67 \times 4/1,5 = 153,0$ mg.

Peale MS analüüsi mõõdeti uuesti proovide fluorestsentsispektrid, et hinnata, kas *crossline*'i sisaldus korreleerub fluorestsentsiga vastaval lainepikkusel. Uus mõõtmine aitas vähendada lahusti erinevusest tingitud mõõteviga, sest erinevate lahustite juures võivad spektrid nihkuda.



Joonis 14. Fluorestsentsi intensiivsuse sõltuvus *crossline*'i kontsentratsioonist

Nagu joonis 14 näitab, ei leitud kolonnide väljapesude *crossline*'i sisalduse ja fluorestsentsi vahel korrelatsiooni. Sellest võib järeldada, et inkubeeritud segu sisaldas lisaks *crossline*'ile ka teisi samal lainepikkusel fluorestseeruvaid fluorofore.

3.3. Teine inkubeerimine

Teise inkubatsiooniseguga jätkati SPE-ga puhastamise katseid. Kuna Strata XC osutus edukamaks, otsustati teha korduskatse teisel inkubeerimisel saadud algseguga.

3.3.1. Ioonvahetus-SPE II

Puhastamine Strata XC kolonniga tehti sama moodi nagu esimese variandiga. Edasiseks analüüsimiseks koguti eelmises katses MS-analüüsi järgi kõige enam *crossline*'i sisaldav fraktsioon (XC-3, vt tabel 3) ja tähistati kui XC-II-3.

Kuna laboris olevad kolonnid olid väikse mahuga, töötati samal ajal kahe kolonniga, mille fraktsioonid koguti ühte anumasse. Tabelis on andmed toodud ühe kolonni kohta.

Tabel 4. Strata XC meetod

Nr	Etapp	Strata XC	Fraktsioon
1	Kolonne stabiliseerimine	1) MeOH 2 ml 2) 0,1 M HCOOH 2 ml 3) MeOH 2 ml	-
2	Proovi lisamine	Alglahus : HCOOH (10 : 2,65) 0,5 ml	Strata XC II-2
3	Kolonne pesu	MeOH 2 ml	
4	Väljapesu 1	5% NH ₄ OH MeOH-s 3 ml	Strata XC II-3

3.3.2. Hypercarb-SPE

Crossline'i analüüsile hypercarb tüüpi HPLC kolonnidel viitavad Nemet *et al.* (Nemet *et al.*, 2011, lk 5). TalTechis oli võimalik kasutada sama tüüpi sisuga SPE kolonne HyperSep Hypercarb 200mg/3ml.

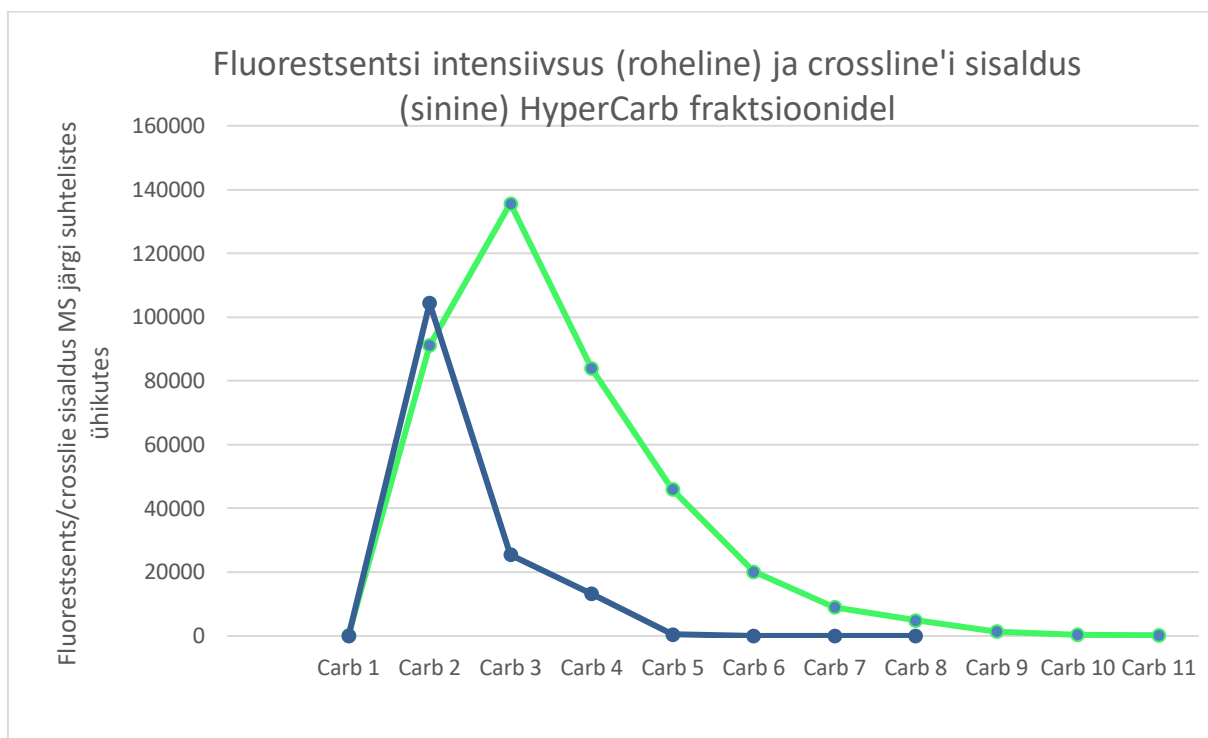
Hypercarb SPE kolonnide kasutamise eesmärk oli testida, kas söel põhinev kolonn eraldab lainepikkustel ex 380 / em 463 nm fluorestseeruvaid fluorofore paremini. Eelmistest katsetest oli selgunud, et sünteesisegu sisaldas lisaks *crossline*'ile teisi fluorestseeruvaid ühendeid. Hypercarb SPE-ga loodeti need üksteisest eraldada. Eluentide valikul lähtuti Nemet *et al.* viidatud kromatografeerimismetoodikast (Thornalley *et al.*, 2003, lk 583). Fluorestseeruvate ühendite väljapesul suurendati järjest AcN kontsentratsiooni puhvris (pH 3,8), mis oli valmistatud 30 mM ammooniumformiaadi ja väikse koguse sipelghappe lahustamisel ultrapuhastas MilliQ vees. Prooviks võeti 0,4 ml teisel inkubeerimisel saadud alglahust, millel oli Boc-kaitserühm eemaldatud eelkirjeldatud viisil.

Tabel 5. Hypercarb meetod

Kolonne stabiliseerimine	1) ACN 2 ml 2) Puhver 2,9 ml (30 mM NH ₄ form vees)	-
Proovi lisamine	Alglahus : HCOOH (10:2,65) 0,4 ml	Carb 1
Kolonne pesu	Puhver 1 ml	
Väljapesu	10% _{vol} AcN puhvris 1 ml	Carb 2
	20% _{vol} AcN puhvris 1 ml	Carb 3
	30% _{vol} AcN puhvris 1 ml	Carb 4
	40% _{vol} AcN puhvris 1 ml	Carb 5
	50% _{vol} AcN puhvris 1 ml	Carb 6
	60% _{vol} AcN puhvris 1 ml	Carb 7
	70% _{vol} AcN puhvris 1 ml	Carb 8
	80% _{vol} AcN puhvris 1 ml	Carb 9
	90% _{vol} AcN puhvris 1 ml	Carb 10
	90% _{vol} AcN puhvris 1 ml	Carb 11

Crossline'i sisalduse hindamiseks analüüsiti fraktsioone fluorestsentsi abil ja kromatograafia-massispektromeetriliselt MS-iga (vt ptk 2.4.) Enne seda proove eraldi ette ei valmistatud, sest AcN ja puhvri segu oli analüüsimiseks sobiv lahusti. Väike kogus proove süstiti ilma kolonnita

kromatograafi ja *crossline*-ile iseloomuliku fragmentiooni (m/z 545 $\rightarrow$ 500) piigid integreeriti. Joonisel 15 on *crossline*-i sisaldus esitatud suhtelistes ühikutes.



Joonis 15. *Crossline* väljumine HyperSep HyperCarb SPE kolonnist fluorestsentsi (ex 380, em 463 nm) ja MS (m/z 545 $\rightarrow$ m/z 500) järgi

Jooniselt 15 on selgelt näha, et *crossline*-i sisalduse maksimum ei lange kokku fluorestsentsi maksimumiga. See tähendab, et inkubatsioonisegu sisaldab ka muid fluorestseeruvaid aineid, nagu näitas ka varasem katse (vt joonis 14). Ühtlasi võib järeldada, et hypercarb kolonn sobib *crossline*-i eraldamiseks suuremast osast fluorestseeruvatest ühenditest lainepikkusel ex 380 / em 463 nm. Samas ei toimu eraldamine tõenäoliselt täiesti puhtalt, sest erinevaid piike ei tekkinud. Mõõdetud fluorestsentspektrid (vt lisa 7) näitavad, et suur osa ka teistel lainepikkustel fluorestseeruvatest ainetest tuleb välja pärast *crossline*-i fraktsioonides 3–10. *Crossline*-i kadu on HyperSep kolonniga Strata XC meetodist natuke suurem, ligi 30%.

3.4. Kromatograafiline analüüs

Varem kasutatud SPE püüdis lahusest aineid nende keemiliste omaduste järgi, näiteks läbi selle, kas nad moodustavad vesiniksidemeid. HPLC erineb sellest selle poolest, et lahuses olevaid aineid ei jagata vaid kahte rühma (näiteks kas moodustab vesiniksidemeid või mitte), vaid neid eristatakse ka mõju tugevuse järgi. Kolonniga nõrgemalt seostuvad ained voolavad kolonnist kiiresti välja, tugevalt seostuvate ainete jaoks võtab see kauem. Seega on kromatograafiaga võimalik aineid üksteisest täpsemalt eraldada.

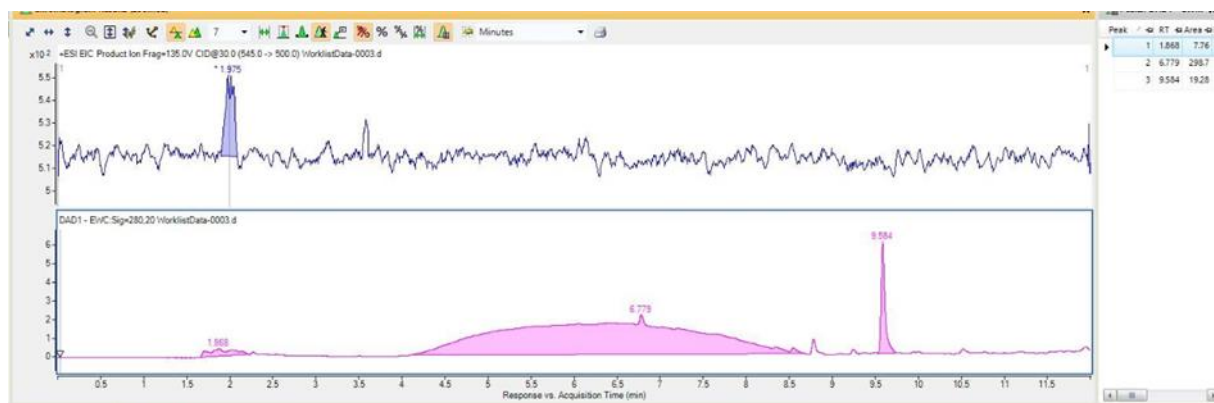
HPLC kromatograafia aitas teha TÜ Katsekoja juhataja dotsent Koit Herodes. Kasutati firma Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) seadmekomplekti, mis koosnes gradientelueerimist võimaldavast kõrgsurvepumbast, autodosaatorist, kolonnitermostaadist, DAD detektorist ja sellega liidetud massispektromeetrist (mudel 6460). Kromatogrammid registreeriti UV lainepikkuste vahemikus 260–370 nm ja massivahemikus m/z 100–550(800) Da, analüüsiks kasutati TÜ kolonni Kinetex C18 pikkusega 100 mm, siseläbimõõduga 3 mm, tera suurusega 2,6 μm , poorsusega 100 Å (firma Phenomenex, Torrance, CA, USA) ja TalTech kolonni TSKgel Amide-80 vastavalt 250 mm ja 4,6 mm (firma Tosoh Bioscience, Tokyo, Jaapan).

3.4.1. Kromatograafia C18 kolonnil

Alguses katsetati TÜ kolonni Kinetex C18. Sama tüüpi sorbendiga pikemat kolonni kasutatakse ka dialüsaatide analüüsimiseks TalTechi kromatograafialaboris. Lahustina kasutati 0,1%_{vol} sipelghapet vees, gradient on toodud joonisel 16. Prooviks võeti fraktsioon Strata XC II-3. Voolu kiirus oli 0,2 ml/min.

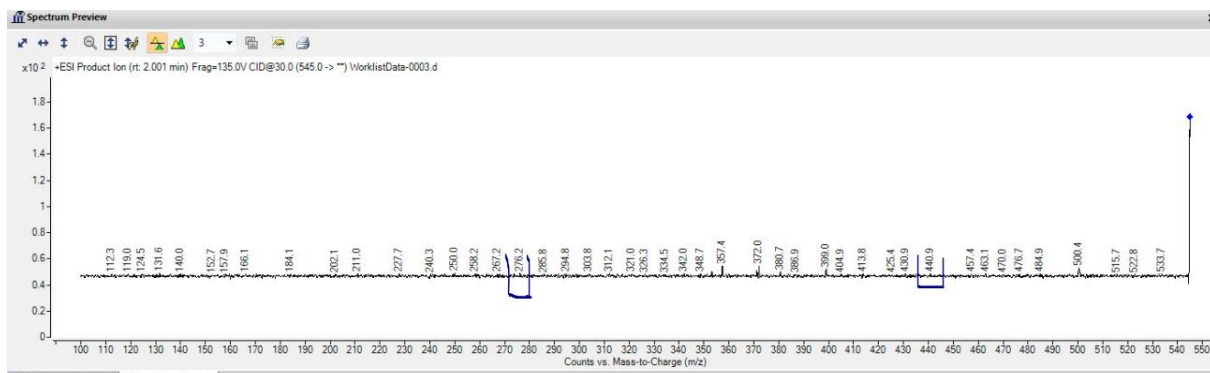
Time [min]	A [%]	B [%]	C [%]	D [%]	Flow [mL/min]	Max. Pressure Limit [bar]
0.00	97.00	3.00	0.00	0.00	0.200	400.00
5.00	0.00	100.00	0.00	0.00	---	---
7.00	0.00	100.00	0.00	0.00	---	---
10.00	0.00	100.00	0.00	0.00	---	---
11.20	97.00	3.00	0.00	0.00	---	---
12.00	97.00	3.00	0.00	0.00	---	---

Joonis 16. C18 kolonniga kasutatud gradient



Joonis 17. C18 kromatogramm MS (m/z 545.0 $\rightarrow$ m/z 500.0) ja UV-neelduvuse järgi lainepikkusel 280 nm

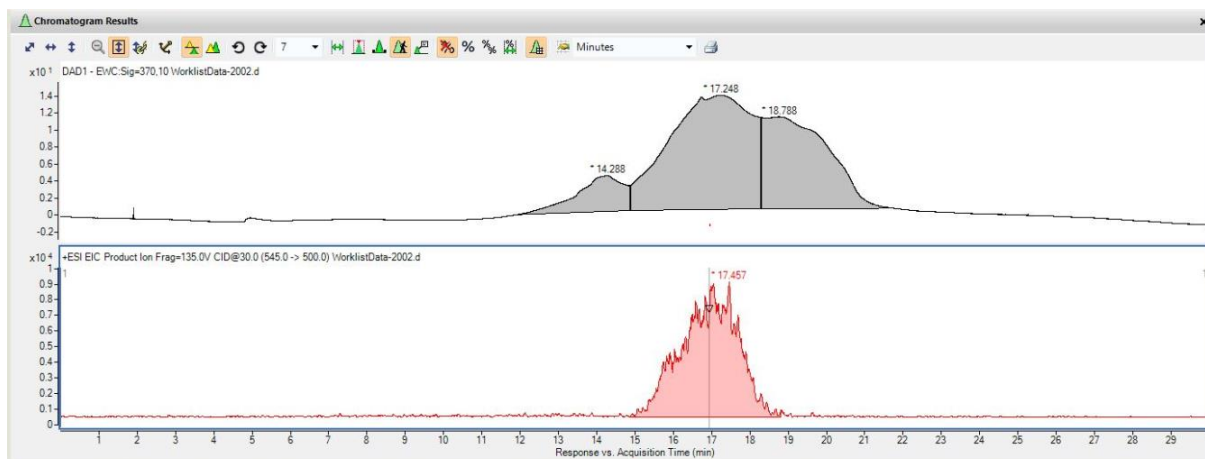
Crossline'i piik tuli C18 kolonnist välja teise minuti lõpul ehk peaaegu frondiga, nagu on näha jooniselt 18. Järelikult ei sidunud hüdrofoobne kolonn *crossline*'i efektiivselt. C18 kromatogrammi UV-neelduvuse graafikute (vt joonis 17, lisa 8) põhjal võis aga hinnata, kui suure osa UV-d neelavast materjalist moodustas *crossline*. Üldises UV-neelduvuses oli koos *crossline*'iga väljuvate ainete osakaal lainepikkustel 260, 280 ja 370 nm vastavalt 5,6; 2,4 ja 1,41%. Ka ekstraheerimisel oli kaduma läinud vähemalt neljandik ainest. Sellest järeldub, et *crossline*'i kogus puhastatud fraktsioonis XC II-3 oli UV-neelduvuse järgi väiksem kui 1%.



Joonis 18. *Crossline*'i piigi massispekter, mis on tekkinud emaiioonist 545,0. Sinisega on tähistatud fragmendid, mis olid ka Nemet *et al.* töös *crossline*'i analoogi massispektril (vt lisa 9). Nemet *et al.* kirjeldavad *crossline*'i analoogi massispektrit, millel α -asendis aminorühmad puuduvad. On aga võimalik, et molekulid fragmenteervad samadest kohtadest. Kaks ühist fragmenti annavad kinnitust, et piik on tõesti *crossline*.

3.4.2. Kromatograafia TSKgel Amide kolonnil

Teiseks fraktsioneerimiskatseks kasutati TalTechi HPLC kolonni TSKgel Amide-80. Lahustina kasutati 1 : 1 segu atseetonitrilist ja 0,1%_{vol} sipelghappes vees, gradienti ei kasutatud. Prooviks võeti SPE fraktsioon XC II-3.



Joonis 19. TSKgel kromatogramm Strata XC II-3 MS (m/z 545.0 $\rightarrow$ m/z 500.0) järgi (punane) ja UV-neelduvuse järgi lainepikkusel 280 nm (hall)

Nagu joonis 19 näitab, sidus kolonn *crossline*'i, aga piik tuli 17. minuti piirkonnas välja koos suure koguse UV-d neelava ainega. See tähendab, et kolonn ei eraldanud *crossline*'i teistest ainetest ja aine puhastamiseks ei sobi.

3.4.3. Oasis-SPE

Katsed kromatograafiaga näitasid, et enamikku lisanditest saab eemaldada polaarsel C18 kolonnil. Lisandite eemaldamist katsetati ka polaarsel SPE kolonnil Oasis HLB 6cc 150 mg. Kolonn stabiliseeriti ja lisati proov. Peale proovi lisamist lasti 5 tilka joosta ja koguti fraktsioon Oasis 1, mida analüüsiti edasi kromatograafiaga.

Oasis SPE efektiivsust ei saanud hinnata, sest polnud võimalust MS-iga mõõta. Fluorestsentsi ei kasutatud, sest oli leitud, et *crossline* polnud ainuke kitsal lainepikkusel fluorestseeruv ühend.

Tabel 6. Oasis HLB meetod

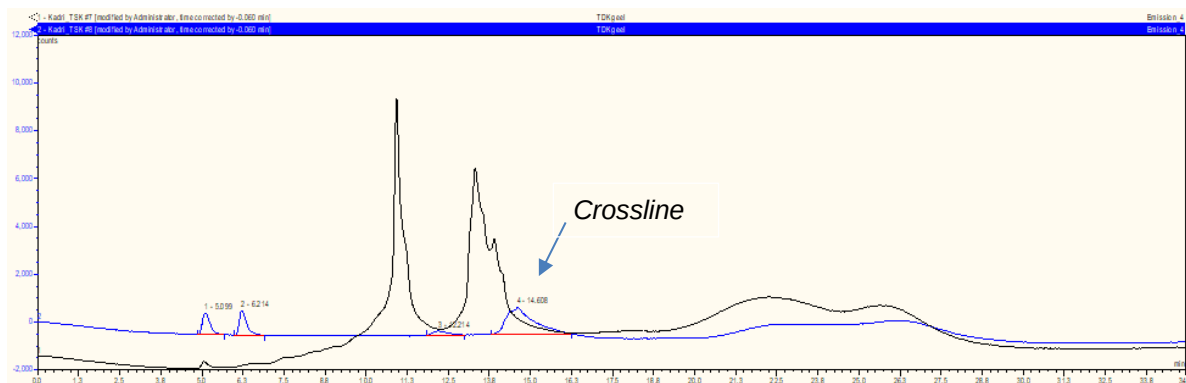
Nr	Etapp	Oasis HLB	Fraktsioon
1	Kolonne stabiliseerimine	1) MeOH 2 ml 2) 5% AcN 1% HCOOH vesilahuses 4 ml	-
2	Proovi lisamine	Strata XC II-3 1,1 ml	Oasis 1 0,9 ml
3	Väljapesu	11% AcN 1% HCOOH vesilahuses 1,1 ml	Oasis 2 1,1 ml

3.4.4. Kromatograafiline analüüs II

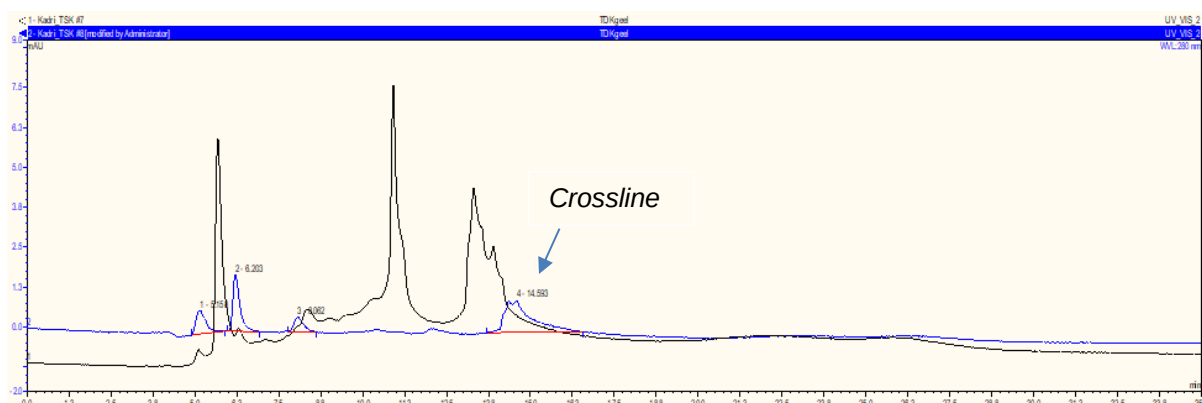
Teine kromatograafia tehti TalTech kromatograafiga UltiMate 3000 (firma Thermo Scientific), kasutades sama kolonne, eluenti ja voolukiirust nagu eelmisel katsel (TSKgel Amide 80, 1 : 1 AcN : 0,1%vol HCOOH vees, 0,5 ml/min). Kromatogrammid registreeriti UV-neelduvuse vahemikus 260-380 nm ja fluorestsentsi lainepikkustel ex 350 / em 340, ex 360 / em 450, ex 370 / em 460, ex 380 / em 470 nm. Proovina kasutati Oasis SPE-ga täiendavalt puhastatud fraktsiooni XC-II (vt tabel 6, Oasis 1) ja võrdluseks täiendava puhastuseta fraktsioon esimeselt ekstraheerimiselt kationiidil XC-3.

Nagu joonistelt 20 ja 21 näha, püüdis Oasis HLB kinni suure osa hüdrofoobsetest kõrge UV-neelduvusega ainetest. Järeldati, et Strata XC-ga kaasa tulnud hüdrofoobseid fluoro- ja kromofore saab eemaldada pöördfaasi SPE-l. *Crossline*'i kindlamaks identifitseerimiseks ja piigi puhtuse kontrollimiseks on vaja teha täiendav MS-analüüs, mis ei olnud tehnilistel põhjustel enam võimalik.

Teisel katsel tuli eeldatavalt *crossline*'i sisaldav piik välja varem ehk neljateistkümnendal minutil. See võis olla tingitud kromatograafide temperatuurierinevusest, sest temperatuuril on mõju HPLC kolonnide sidumisvõimele.



Joonis 20. Emissiooni 470 nm kromatogrammide ergastusega 380 nm. Must joon on fraktsioon XC-3, sinine joon fraktsioon III-3 pärast puhastamist lisanditest Oasis HLB kolonnil.



Joonis 21. Kromatogrammide UV lainepikkusel 280 nm. Must joon on fraktsioon XC-3, sinine joon fraktsioon III-3 pärast puhastamist lisanditest Oasis HLB kolonnil.

Kromatogrammidele sai leida piigi pindalade järgi *crossline*-ile omistatava lainepikkuse. Piikide integreerimisel selgus, et Oasisega täiendavalt puhastatud fraktsioonis oli ergastuslainepikkusel 380 nm ja emissioonilainepikkusel 470 nm *crossline*-ile omistatavat fluorestsentsi 19,6% ehk ligi viiendik. Lainepikkusel Ex 370 nm erines see 0,2% võrra.

3.5. Järeldused ja arutelu

Uurimistöö eesmärk oli sünteesida vajalik markeraine *crossline* ja leida meetod selle puhastamiseks.

Püstitatud eesmärk täideti osaliselt – inkubeerimisel tekkis *crossline* ning SPE ja kromatograafia abil õnnestus see eeldatavalt ka reaktsioonisegust välja puhastada. Samas selgus, et sünteesisegu inkubeerimisel tekkis suur kogus kõrvalprodukte ning *crossline* moodustas väikse osa tekkinud ühenditest. Standardaine loomiseks ei ole väikese saagise tõttu kasutatud meetod mõistlik.

Sellest hoolimata lõi uurimistöö esialgse baasi metoodikale, millega *crossline*-i keerulistest segudest eraldada. Saagise suurendamiseks võib optimeerida inkubeerimise tingimusi või

võtta algaaineks AGE-de modifitseeritud valgu hüdrolüsaat. Huvipakkuv võib olla ka *crossline*'i eraldamine loodud skeemi järgi patsientide dialüüsivedelikust.

Uurimistöö tulemusel selgus, et Strata XL pöördfaasiadsorbent ei sidunud Boc-blokeeritud *crossline*'i efektiivselt. Ligi kolmandik ainet pesti metanooliga välja ja teadmata põhjusel läks osa *crossline*'ist kaduma. Ka kromatograafiakatsed pöördfaasikolonniga Kinetex näitasid, et hüdrofoobne sorbent *crossline*'i ei seo.

Strata XC ehk kationiidi SPE meetod osutus efektiivsemaks. Kationiidi väljapesu sisaldas Strata XL-i väljapesust *crossline*'i pea kolm korda rohkem, aga sidus ka palju muid aroomaatseid UV-d neelavaid ja fluorestseeruvaid aineid. Ka Strata XC-ga pesti metanooliga välja ligi neljandik ainet, kuid see kadu võib olla protsessi optimeerimisega vähendatav.

Crossline'i puhastamiseks fluorofooridest sobib ka hypercarb kolonn. Fluorestsentsspektrite (vt lisa 7) ja *crossline*'i ja fluorestsentsi eraldumise võrdluse (vt joonis 15) järgi sobib see *crossline*'i puhastamiseks suuremast osast fluorestseeruvatest ühenditest. *Crossline*'i kadu teistesse fraktsioonidesse oli tehtud katses Strata XC meetodist natuke suurem, ligi 30%. Hypercarb HPLC kolonni on *crossline*'i analüüsimiseks kasutatud ka varem (Nemet *et al.*, 2011, lk 5).

Peale ekstraheerimist Strata XC-ga vajas *crossline* täiendavat puhastamist. Peale puhastamist Strata XC ja Oasis HLB kolonnidel oli eemaldatud suurem osa fluorestseeruvatest ja UV-kiirgust neelavatest ainetest.

Kuna leiti, et fluorestsentsi intensiivsus *crossline*'i sisaldusega ei korreleeru, on selgete võrdluste saamiseks vaja kasutada massispektromeetriat.

Otstarbekas puhastusoperatsioonide järjekord Tallinna Tehnikaülikooli kromatograafialaboris võiks kokkuvõttes olla järgmine: (1) inkubatsioon, kasutades blokeeritud α -aminorühmaga lüsiini ja glükoosi; (2) deblokaad ehk kaitserühma eemaldamine; (3) *crossline*'i puhastamine hüdrofoobsetest lisanditest pöördfaasi SPE-ga, näiteks kolonnil Oasis HLB; (4) puhastamine teistest fluorestseeruvatest ühenditest aminorühmi siduval kationiidil, peale mida on proov AcN-is lahustatud ja sobib kromatografeerimiseks hüdroksüülrühmi siduval kolonnil; (5) kromatograafia Silica-NH₂ kolonnil. Nii on teoreetiliselt võimalik saada *crossline* kui puhas aine. See omakorda võimaldaks mõõta *crossline*'i kvantitatiivselt dialüsaadis.

KOKKUVÕTE

Inimorganismis toimub pidevalt glükatsioon, reaktsioon suhkrute ja valkude, aminohapete või lipiidide aminorühmade vahel. Reaktsiooni tulemusena tekivad glükatsiooni lõpp-produktid ehk AGE-d, mis on inimesele kahjulikud ühendid.

Dialüüsipatsientide jaoks on organismis kuhjuvad AGE-d tõsine probleem. AGE-d mõjutavad kehas valkude või rakkude struktuuri ning reageerivad rakureseptoritega, mille tulemuseks on molekulide ja rakkude tasandil tekivad kahjustused, põletik ja oksüdatiivse stressi kasv. Kuna dialüüsiaparaat ei suuda erinevalt elavatest neerudest kehale olulisi aineid tagasi anda, on dialüüs laveerimine mürgistatuse vältimise ja kehale oluliste ainete säilitamise vahel. Dialüüsi protsessi optimeerimiseks töötatakse TalTechis välja optilisi monitore, mis jälgiksid dialüüsi käigus eri ainegruppide eemaldamist patsientide verest. Optiliste monitoride kalibreerimiseks vajatakse markeraineid.

Uurimistööga loodeti leida meetod ühe AGE-de mõõtmiseks vajaliku markeraine - *crossline*'i - sünteesiks ja puhastamiseks. Kirjandusest leiti võimalik meetoodika *crossline* sünteesiks Boc-lüsiini ja D-glükoosi koos inkubeerimise teel. Meetoodika järgi loodi *crossline* ja katsetati selle puhastamist pöördfaasi-, ionvahetus- ja normaalfaasi-SPE abil ning kromatograafiaga. *Crossline*'i sisaldust segudes hinnati fluorestsentsi ja massispektromeetria abil.

Segu inkubeerimisel tekkis *crossline* ning SPE ja kromatograafia abil õnnestus see eeldatavalt ka puhastada. Samas tekkis reaktsioonide käigus suur kogus kõrvalprodukte, mistõttu ei ole kasutatud meetod standardlahuse loomisel mõistlik. Saagise suurendamiseks võib optimeerida inkubeerimise tingimusi või valida teine algaine, näiteks AGE-de modifitseeritud valkude hüdrolüsaat.

Leiti, et *crossline*'i puhastamiseks enne eraldamist Silica-NH₂ HPLC kolonnil sobib kombinatsioon tugeva kationiidi ja pöördfaas-SPE-st. Suuremast osast fluorestseeruvatest ühenditest vabanemiseks sobib veel söel põhinev hypercarb kolonn, mida on *crossline*'i püüdmiseks varem kasutatud.

Uurimistööga loodi baas *crossline*'i eraldamiseks keerulistest segudest. Saadud tulemused annavad lootust, et meetoodika viimistlemisega õnnestub puhastada ka vajalik markerühend.

RESÜMEE

Glükatsiooni lõpp-produktid ehk AGE-d on heterogeensed ühendid, mis tekivad Maillardi reaktsiooni käigus.

Dialüüsipatsientide jaoks on organismis kuhjuvad AGE-d tõsine probleem. AGE-d mõjutavad kehas valkude või rakkude struktuuri ning reageerivad rakuretseptoritega, mille tulemuseks on molekulide ja rakkude tasandil tekkivad kahjustused, põletik ning oksüdatiivse stressi kasv.

Kuna dialüüsiaparaat ei suuda erinevalt toimivatest neerudest kehale olulisi aineid tagasi anda, on dialüüs laveerimine mürgistatuse vältimise ja kehale oluliste ainete säilitamise vahel. Dialüüsi protsessi optimeerimiseks töötatakse TalTechis välja optilisi monitore, mis jälgiksid dialüüsi käigus eri ainegruppide eemaldamist patsientide verest. Optiliste monitoride kalibreerimiseks vajatakse markeraineid.

Uurimistööga loodeti leida meetod ühe AGE-de mõõtmiseks vajaliku markeraine - *crossline*'i - sünteesiks ja puhastamiseks. Kirjandusest leiti võimalik meetodika *crossline*'i sünteesiks Boc-lüsiini ja D-glükoosi koos inkubeerimise teel. Meetodika järgi loodi *crossline* ja katsetati selle puhastamist pöördfaasi-, ioonvahetus- ja normaalfaasi-SPE abil ning kromatograafiaga. *Crossline*'i sisaldust segudes hinnati fluorestsentsi ja massispektromeetria abil.

Töö käigus leiti, et segu inkubeerimisel tekkis tõesti *crossline* ning SPE ja kromatograafia abil õnnestus see eeldatavalt ka puhastada. Samas tekkis reaktsioonide käigus suur kogus kõrvalprodukte, mistõttu ei ole kasutatud meetod standardlahuse loomisel mõistlik. Saagise suurendamiseks võib optimeerida inkubeerimise tingimusi või valida teine algaine, näiteks AGE-de poolt modifitseeritud valkude hüdrolüsaat.

Leiti, et *crossline*'i puhastamiseks enne eraldamist Silica-NH₂ HPLC kolonnil sobib kombinatsioon tugeva kationiidi ja pöördfaas-SPE-st. Suuremast osast fluorestseeruvatest ühenditest vabanemiseks sobib veel söel põhinev Hypercarb kolonn, mida on *crossline*'i püüdmiseks varem kasutatud.

Uurimistööga loodi baas *crossline*'i eraldamiseks keerulistest segudest. Saadud tulemused annavad lootust, et meetodika viimistlemisega õnnestub puhastada ka vajalik markerühend.

ABSTRACT

Synthesis and experiments of purification of *crossline*, a glycation product of the amino acid lysine

Advanced glycation end products or AGEs are a group of heterogeneous compounds that are formed during the Maillard reaction - a reaction between sugars and proteins, lipids or amino acids. The accumulation of AGEs in a body is a serious issue for dialysis patients. AGEs react with tissues and interact with cellular receptors, resulting in a damage at molecular and cellular levels, inflammation, and increased oxidative stress.

Since the dialysis device is unable to return important substances to the body compared to the functioning kidney, dialysis is a balance of avoiding poisoning and preserving essential substances for the body. To optimize the dialysis process, TalTech develops optical sensors that monitor the removal of different substance groups from the blood of patients during dialysis. For quantitative assessment of the compounds, marker substances are needed.

The aim of the study was to find a method for synthesis and purification of a potential marker for AGE-s named *crossline*. *Crossline* was synthesised by incubating α -Boc-lysine and glucose. The substance was thereafter extracted from the mixture by using reversed phase, ion exchange and charcoal types of SPE and available chromatographic techniques. The efficiency of used methods was assessed by fluorescence and mass-spectrometry.

After synthesis *crossline* was purified by successive SPE on strong cationite and reversed phase adsorbents, followed by HPLC on silica-amide column with acetonitrile-water as eluent. The purity of the final product could not be assessed due to technical reasons.

The proportion of *crossline* in the incubation mixture, however, was not high. The used method is therefore not reasonable for creating a standard substance. For future work incubation conditions may be optimized to achieve increased yield, or hydrolysate of proteins modified by AGEs may be used.

The experiments created a basis for extracting *crossline* from complex mixtures. The results obtained give hope that the elaboration of the methodology will also allow the necessary marker compound to be purified.

KASUTATUD KIRJANDUS

Advanced Chromatography Technologies LTD kodulehekülg. Kättesaadav: <http://www.ace-hplc.com/products/product.aspx?id=2913>. (10.02.2019).

Adler M. 2017. Pentosidiini analüüsimeetodi juurutamine TTÜ Tervisetehnoloogiate instituudi kromatograafialaboris [magistritöö]. Tallinn.

Aronson D. 2002. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. *Journal of Hypertension*, nr 21 lk 3–12.

Brownlee M., Vlassara H., Kooney A., Ulrich P., Cerami A. 1986. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science*, nr 232, lk 1629–1632.

Cheung A. K., Rocco M. V., Yan G., Leypoldt J. K., Levin N. W., Greene T., *et al.* 2006. Serum beta-2 microglobulin levels predict mortality in dialysis patients: results of the HEMO study. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(2), 546–555.

Derbré S., Séro L., Sanguinet L., Blanchard P., Tai Dang B., Morel S., Richomme P., Séraphin D. 2013. Tuning a 96-Well Microtiter Plate Fluorescence-Based Assay to Identify AGE Inhibitors in Crude Plant Extracts. *Molecules* nr 18(11), lk 14320–14339.

Dhondt A., Vanholder R., Van Biesen W., Lameire N. 2000. The removal of uremic toxins. *Kidney Int Suppl*, nr 76, lk 47–59.

Dolan J. W. 2016. How Does It Work? Part V: Fluorescence Detectors *LCGC North America* nr 34(9), lk 710–719.

Fridolin I., Uhlin F., Jerotskaja J., Tanner R., Arund J. 2011. A method and device for determining content of the middle and protein bound uremic toxins in a biological fluid Kättesaadav:

<https://patents.google.com/patent/EP2585830B1/en?inventor=ivo+fridolin&oq=ivo+fridolin>. (20.01.2018).

Gerdemann A., Lemke H. D., Nothdurft A., Heidland A., Münch G., Bahner U., Schinzel R. 2000. Low-molecular but not high-molecular advanced glycation end products (AGEs) are removed by high-flux dialysis [abstract] *Clin Nephrol*, nr 54, lk 276–283.

Gkogkolou P., Böhm M. 2012. Advanced glycation end products - Key players in skin aging?, *Dermato Endocrinology*, nr 3, lk 259–270.

Goldin A., Beckman J. A., Schmidt A. M., Creager M. A. 2006. Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation*, nr 114(6), lk 597–605.

Hartings M. 2011. Maillard Reaction. Kättesaadav: <https://cen.acs.org/articles/89/i47/Maillard-Reaction.html> (28.10.2018).

Hofmann M. A., Drury S., Fu C., Qu W., Taguchi A., Lu Y., Avila C., Kambham N., Bierhaus A., Nawroth P., Neurath M. F., Slaterry T., Beach D., McClary J., Nagashima M., Morser J., Stern D., Schmidt A. M. 1999. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, nr 97, lk 889–901.

Kase H. 2015. Metoodika arendamine ilma eeltötluseta vereplasma analüüsiks vedelikkromatograafia massispektromeetria meetodil [bakalaureusetöö]. Tartu: Tartu Ülikool.

Kaysen G. A. 1998. Biological basis of hypoalbuminemia in ESRD. *J Am Soc Nephrol*, nr 9, lk 2368–2376

Kidneypatientguide kodulehekülg. Kättesaadav: <http://www.kidneypatientguide.org.uk/HDanim.phmallipattupe> (14.11.2018).

Kressa H. 2013. Hemodialüüsi valitud fluorestseeruvate fraktsioonide isoleerimine ja iseloomustus [magistritöö]. Tallinn, Tallinna Tehnikaülikool.

Kriefer D. H., Canaud B. 2003. High permeability of dialysis membranes: what is the limit of albumin loss? *Nephrol Dial Transplant*, nr 18, lk 651–654.

Mallipattu S. K., Uribarri J. 2014. Advanced glycation end product accumulation: a new enemy to target in chronic kidney disease? *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, nr 23(6), lk 547–554.

Mallipattu S., He J. C., Uribarri J. 2012. Role of advanced glycation endproducts and potential therapeutic interventions in dialysis patients. *Seminars in dialysis*, nr 25(5), lk 529–538.

Miyata T., Osamu O., Inagi R., Lida Y., Araki N., Yamada N., Horiuchi S., Taniguchi N., Maeda K., Kinoshita T. 1993. β 2-Microglobulin Modified with Advanced Glycation End Products Is a Major Component of Hemodialysis-associated Amyloidosis. *J Clin Invest* 92(3), lk 1243–1252.

Mossine V., Mawhinney T. P. 2010. 1-Amino-1-deoxy-D-fructose ("Fructosamine") and Its Derivatives, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* nr 64, lk 291–402.

National Kidney Foundationi kodulehekülg. Kättesaadav: <https://www.kidney.org/atoz/content/preventkiddisease>. (24.01.2019).

Nakamura K., Yamagishi S., Adachi H., Kurita-Nakamura Y., Matsui T., Yoshida T., Sato A., Imaizumi T. 2006. Elevation of soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in diabetic subjects with coronary artery disease. *Diabetes Metab Res Rev*, nr 23, lk 368–371.

Neeper M., Schmidt A. M., Brett J., Yan S. D, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A 1992. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, nr 267 (21) lk 14998–15004.

Nemet I., Strauch C. M., Monnier V. M. 2011. Favored and disfavored pathways of protein crosslinking by glucose: glucose lysine dimer (GLUCOLD) and *crossline* versus glucosepane. *Amino Acids* nr 40(1), lk 167–181.

Nicholl I. D., Stitt A.W., Moore J. E., Ritchie A.J., Archer D.B., Bucala R. 1998. Increased levels of advanced glycation endproducts in the lenses and blood vessels of cigarette smokers. *Mol Med*, nr 4, lk 594–601.

Obayashi H., Nakano K., Shigeta H., Yamaguchi M., Yoshimori K., Fukui M., Fujii M., Kitagawa Y., Nakamura N., Nakamura K., Nakazawa Y., Ienaga K., Ohta M., Nishimura M., Fukui I., Kondo M. 1996. Formation of *crossline* as a fluorescent advanced glycation end product *in vitro* and *in vivo*. [abstract] *Biochem Biophys Res Commun*, nr 226(1), lk 37–41.

Phenomenex kodulehekülg. Kättesaadav: <https://www.phenomenex.com/Kinetex/Selectivities> (10.02.2019).

Pinkas A., Aschner M. 2016. Advanced Glycation End-Products and Their Receptors: Related Pathologies, Recent Therapeutic Strategies, and a Potential Model for Future Neurodegeneration Studies. *Chem Res Toxicol* nr 29(5), lk 707–714.

Põhja-Eesti Regionaalhaigla 2016: Dialüüsravi. Kättesaadav: https://www.regionaalhaigla.ee/sites/default/files/Dialuusravi_2016.pdf. (13.01.2019).

Royal Society of Chemistry kodulehekülg. Kättesaadav: <http://www.rsc.org/publishing/journals/prospect/ontology.asp?id=CMO:0001585&MSID=c0ay00545b>. (15.01.2019).

Santos-Longhurst A. 2018. Understanding and Managing Chronic Inflammation. Kättesaadav: <https://www.healthline.com/health/chronic-inflammation>. (03.02.2018)

Scandec Nordic kodulehekülg. Kättesaadav: https://www.scantecnordic.se/2015/06/08/sv-SE/amide-80-hilic-nu-%C3%A4ven-i-2%C2%B5m-partikelstorlek_-27250914. (11.02.2019).

Sigma Aldrich: Guide to Solid Phase Extraction. Kättesaadav: <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>. (15.01.2019)

Sigma Aldrich kodulehekülg. Ioovahetus-SPE. Kättesaadav: <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/ionexchange-methodology.html> (9.01.2019).

Sigma Aldrich kodulehekülg. Normaalfaas-SPE. Kättesaadav: <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/normalphase-methodology.html>. (9.01.2019).

Sigma Aldrich kodulehekülg. Pöördfaas-SPE. Kättesaadav:
<https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/reversedphase-methodology.html>. (9.01.2019).

Sigma Aldrich kodulehekülg. TSKgel® Amide-80 HPLC kolonn. Kättesaadav:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/813071?lang=en®ion=EE>.
(12.02.2019)

Sigma Aldrich kodulehekülg. Boc-Lys-OH. Kättesaadav:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/359688?lang=en®ion=EE>.
(9.10.2018)

Sigma Aldrich kodulehekülg. L-Lüsiin- Kättesaadav:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/llysine146195687111?lang=en®ion=EE>.
(9.01.2018).

Sigma Aldrich kodulehekülg. ε-amino-kapronhape. Kättesaadav:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a2504?lang=en®ion=EE>.
(9.10.2018).

Singh R., Barden A., Mori T., Beilin L. 2001. Advanced glycation end-products: a review.
Diabetologia nr 44, lk 129–146.

Susantitaphong P., Siribamrungwong M., Jaber B. L. 2013. Convective therapies versus low-flux hemodialysis for chronic kidney failure: A meta-analysis of randomized controlled trials.
Nephrol Dial Transplant 28: 2859–2874.

Thermo Fisher 2007. Method Development Guide for Hypercarb Columns.
Kättesaadav: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Specification-Sheets/TG-20394-Method-Development-Guide-Hypercarb-Columns-TG20394-EN.pdf>. (9.08.2019).

Thornalley P. J., Battah S., Ahmed N., Karachalias N., Agalou S., Babaei-Jadidi R., Dawnay A. 2003. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem J* nr 375, lk 581–592,

TÜ 2015a. Kromatograafia. Kättesaadav: <http://tera.chem.ut.ee/~koit/arstpr/krom.pdf>.
(14.11.2018).

TÜ 2015b. Proovide ettevalmistus. Kättesaadav:
http://tera.chem.ut.ee/~ivo/Chrom/Prooviettevalmistus_2015.pdf. (11.11.2018).

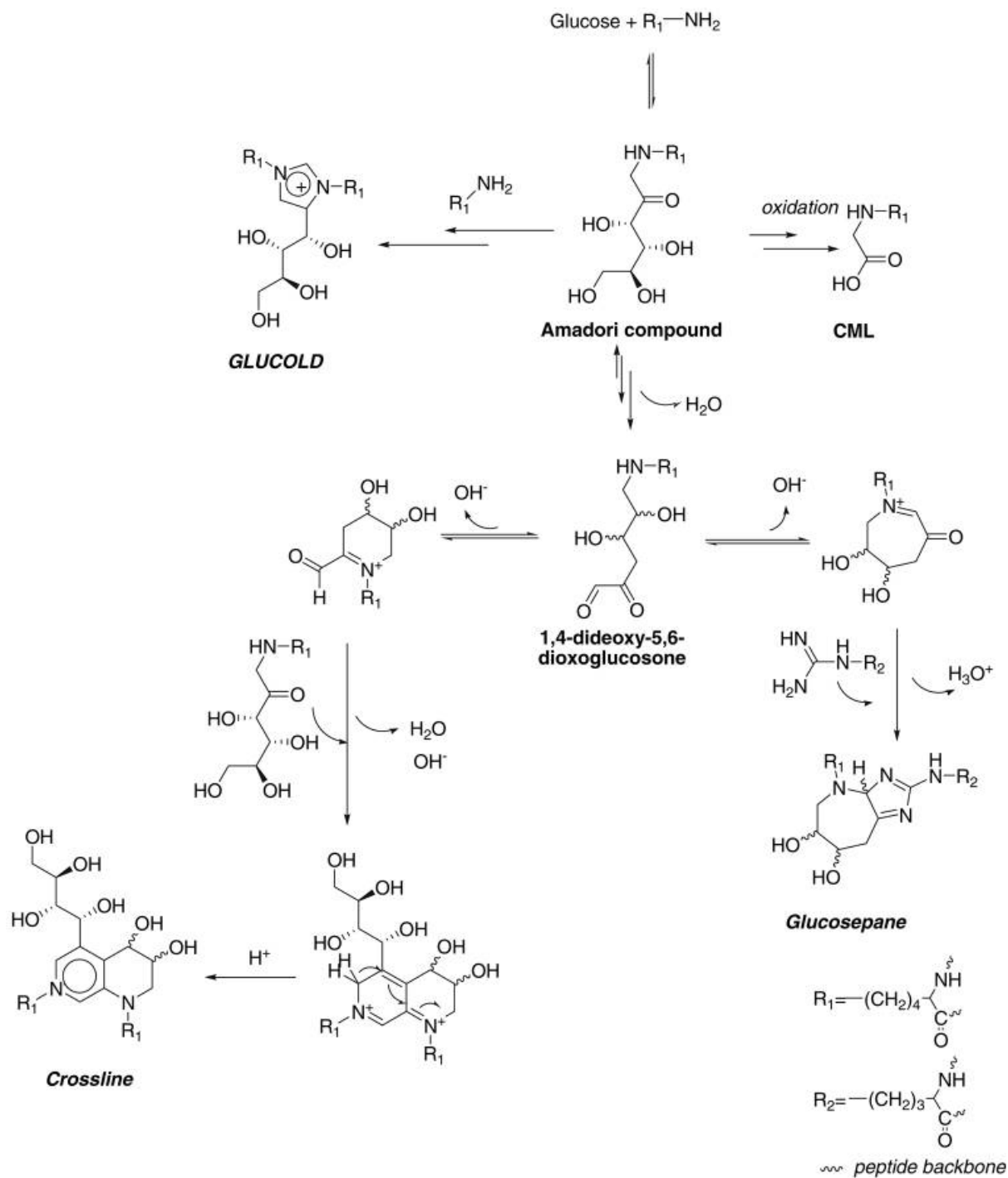
Ulrich P., Cerami A. 2001. Protein Glycation, Diabetes, and Aging. Kättesaadav:
https://www.endocrine.org/~media/endosociety/files/ep/rphr/56/rphr_vol_56_ch_01_protein_glycation.pdf. (28.10.2018).

University of San Francisco kodulehekül. Kättesaadav:
<https://pharm.ucsf.edu/kidney/need/statistics>. (15.01.2019).

Vanholder R., De Smet R., Glorieux G., Argiles A., Baurmeister U., Brunet P., Clark W., Cohen G., De Deyn P. 2003. Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney International*, nr 63, lk 1934–1943.

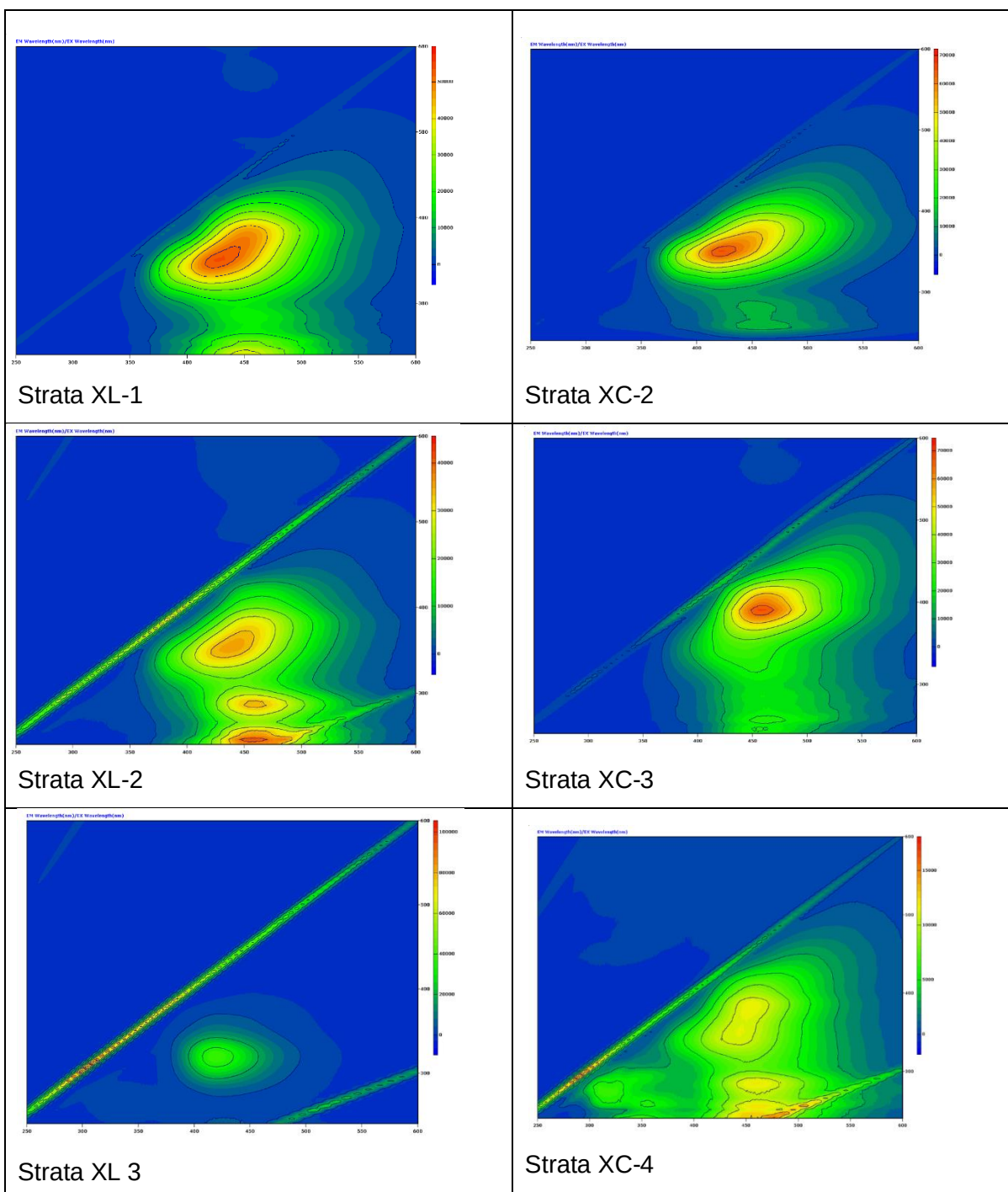
Vlassara H. 1994. Serum advanced glycosylation end products: A new class of uremic toxins? [abstract] *Blood Purif*, nr 12, lk 54–59.

LISA 1. Crossline tekkemehhanism Maillardi reaktsiooni käigus

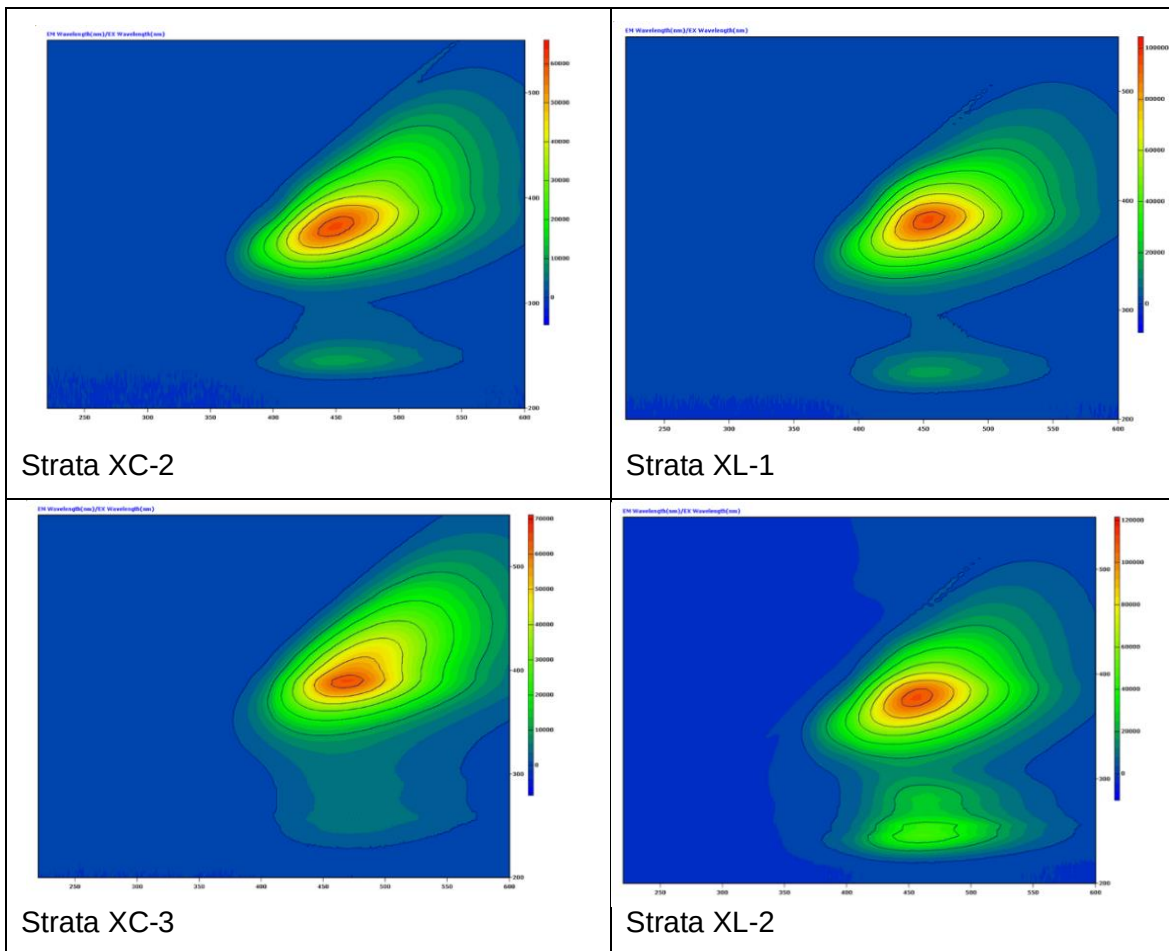


(Nemet et al., 2011)

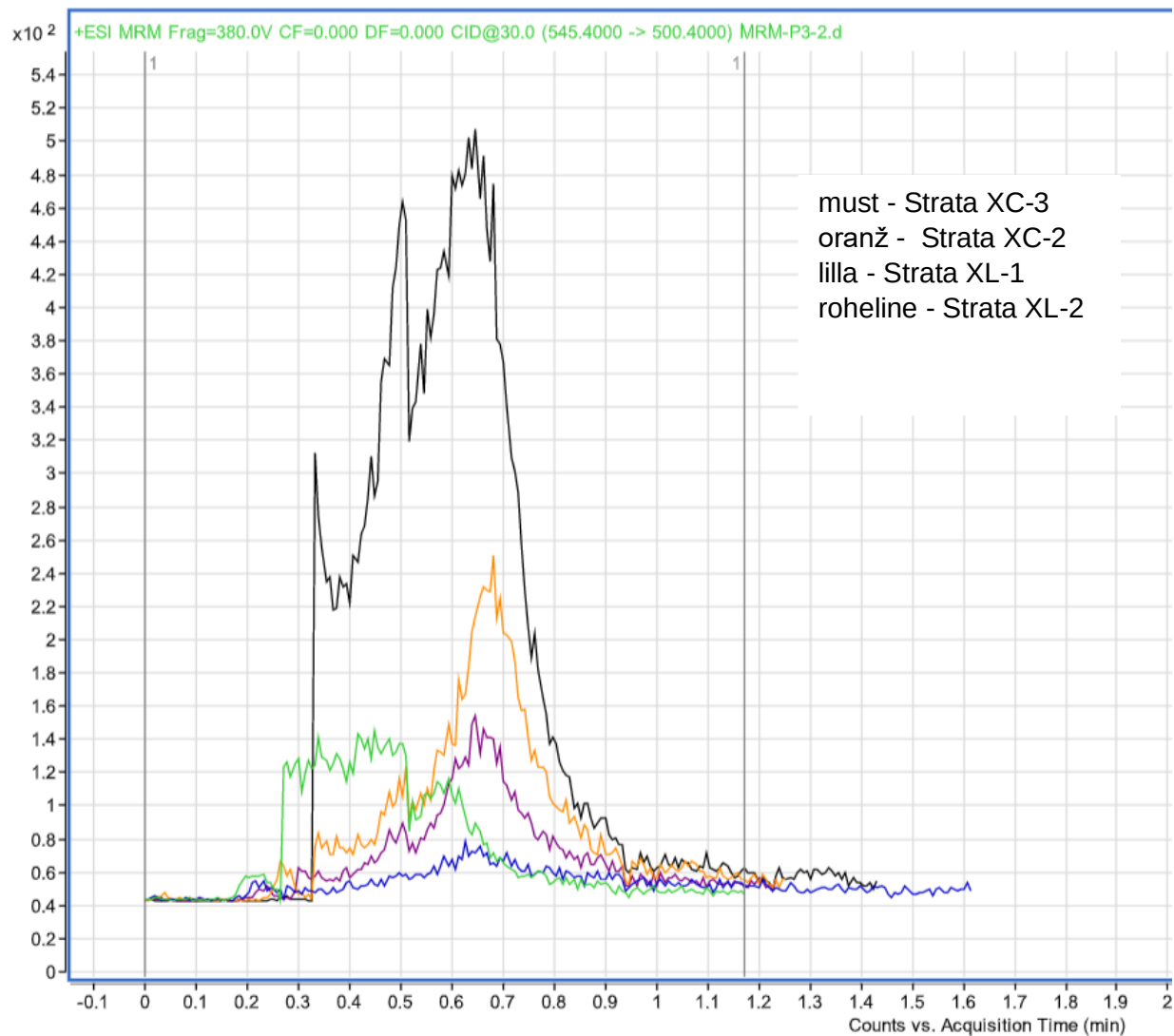
LISA 2. Strata XL ja Strata XC fraktsioonide fluorestsentspektrid



LISA 3. MS fraktsioonide fluorestsentspektrid



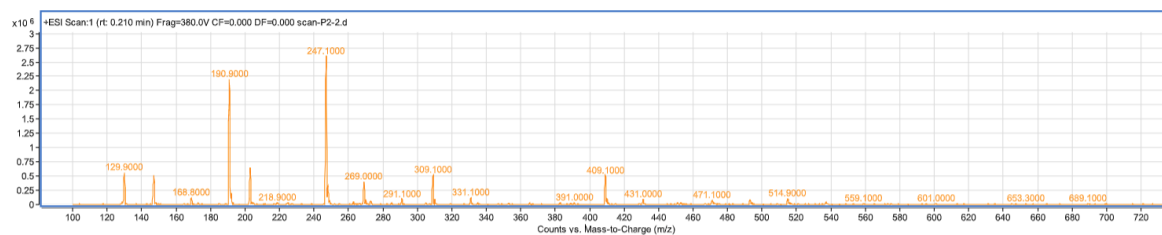
LISA 4. Massispektromeetria graafik mõõtmis iooni 545.4000-> 500.4000



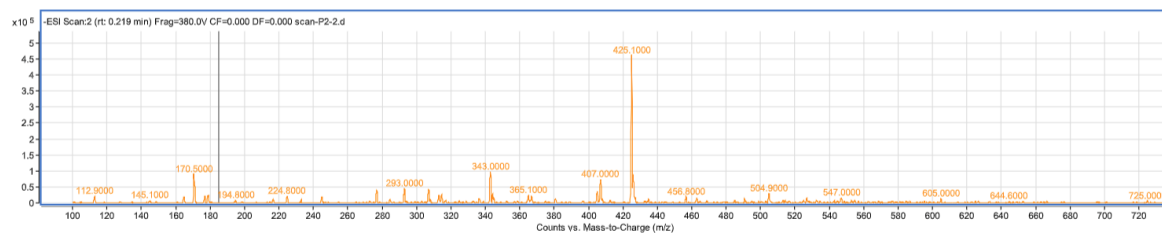
LISA 5. Strata XL-1 (fraktsioon 2) ja XL-2 (fraktsioon 3) massispektrid

Fraktsioon 2

Scan positiivne

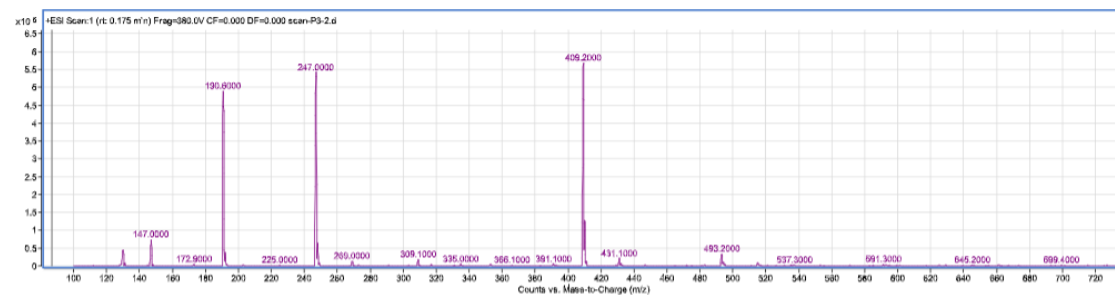


scan negatiivne

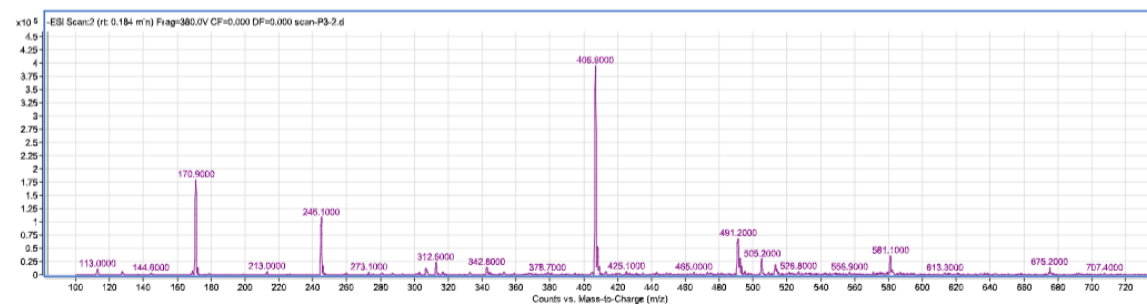


Fraktsioon 3

scan positiivne



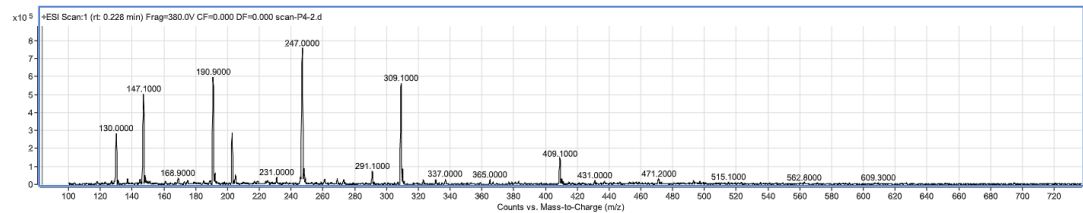
scan negatiivne



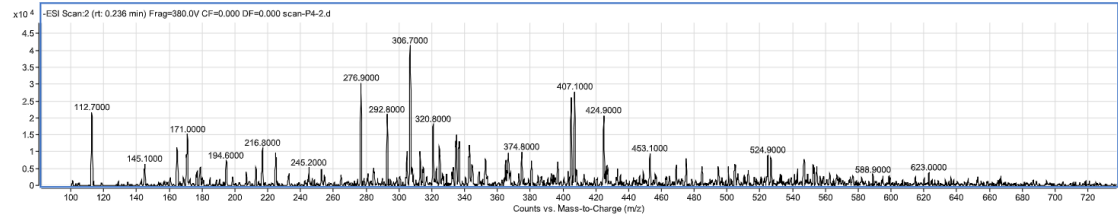
LISA 6. Strata XC-2 (fraktsioon 4) ja Strata XC-3 (fraktsioon 5) massispektrid

Fraktsioon 4

scan positiivne

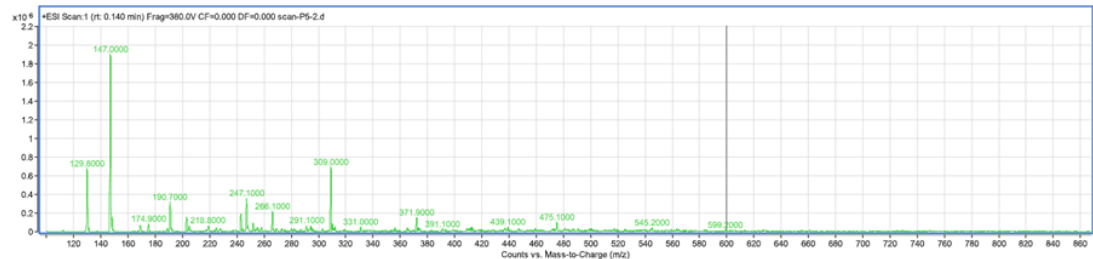


scan negatiivne

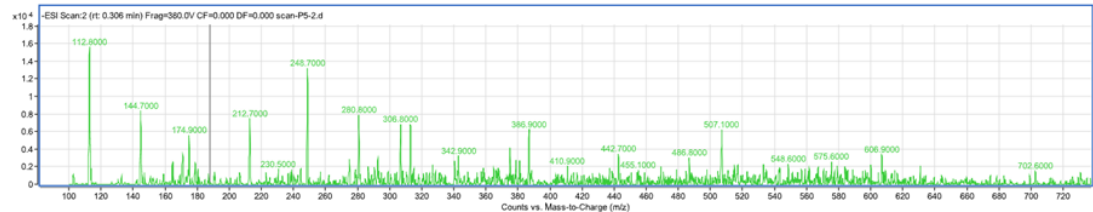


Fraktsioon 5

scan positiivne



fraktsioon 5 scan negatiivne

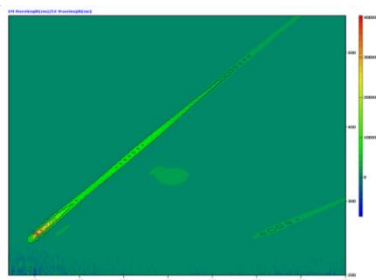


fraktsioon 5 MRM

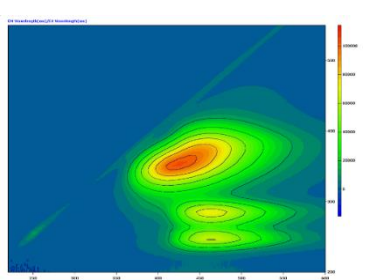
545 -> 500

LISA 7. Carb fraktsioonide fluorestsents-spektrid

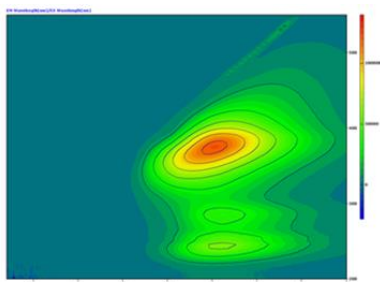
Carb 1



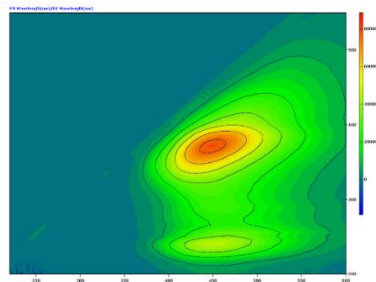
Carb 2



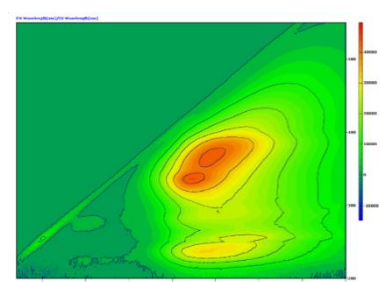
Carb 3



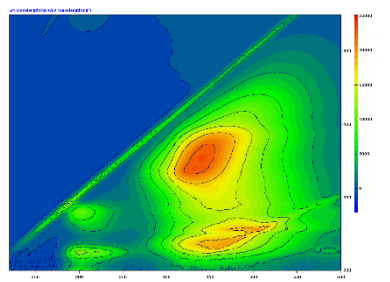
Carb 4



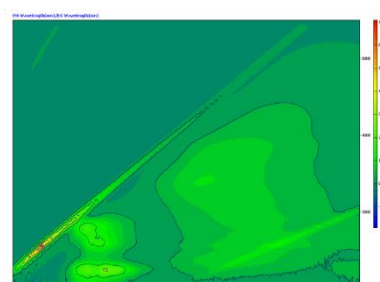
Carb 5



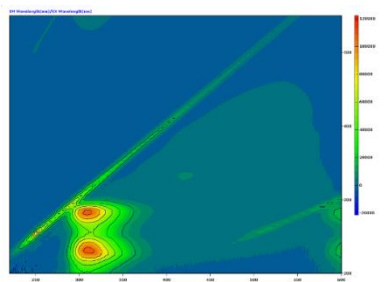
Carb 6



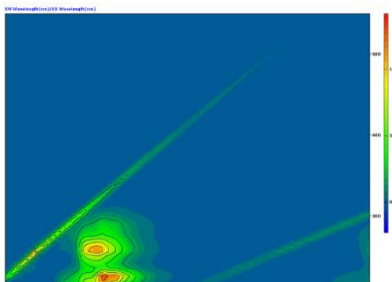
Carb 7



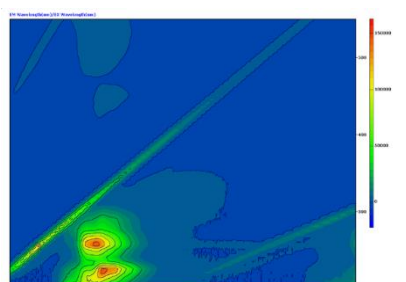
Carb 8



Carb 9

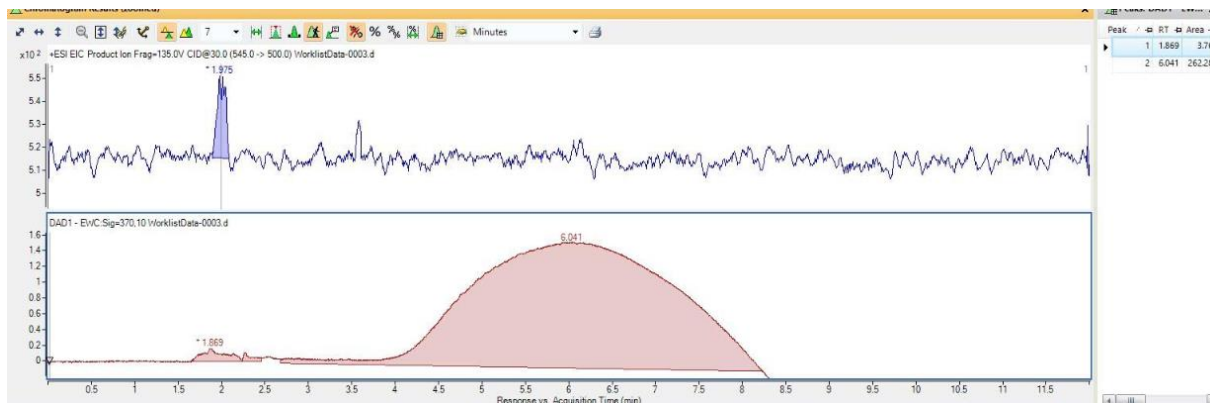
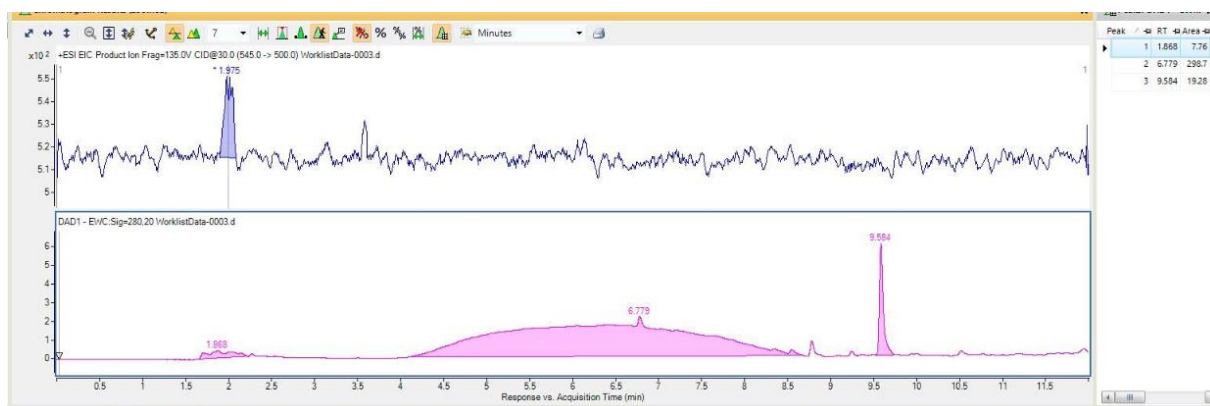
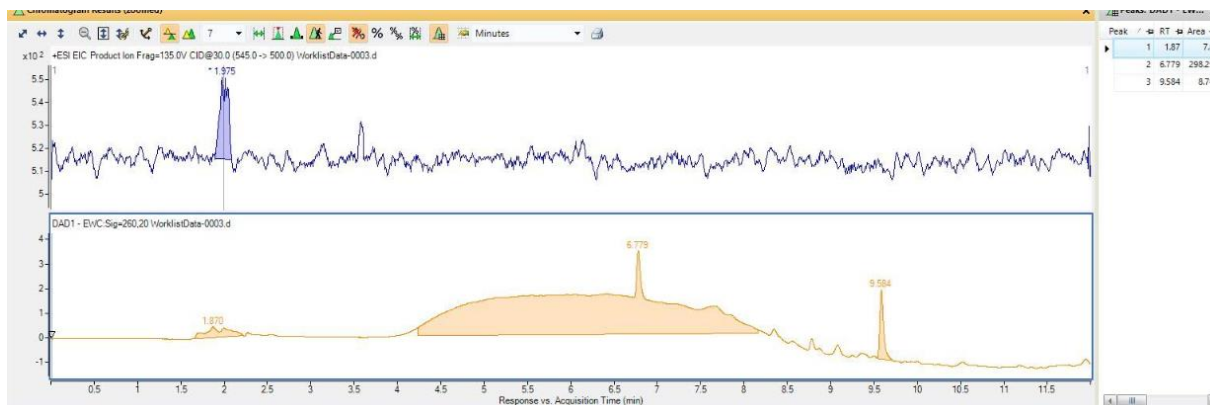


Carb 10



LISA 8. C18 kromatogrammide võrdlus

Ülemisel joonisel on kromatogramm *crossline* täismassiga ionist (545.4) tekkinud fragmentidest, alumisel UV-neelduvus lainepikkustel 260 nm, 280 nm ja 370 nm



LISA 9. Metoodika fragmendid Nemet *et al.* artiklist

Crossline analog isolation

ϵ -Amino caproic acid (500 mg) and glucose (687 mg) were incubated in phosphate buffer (100 mM, pH 8, 5 mL) in the presence of 0.1 mM DTPA, under nitrogen at 50°C for 15 days. The reaction mixture was diluted five times in 1% TFA and applied to the preparative HPLC.

Mass spectrum: m/z 514.99, fragments m/z : 468.36; 404.99; 388.95; 377.12; 360.89; 276.96; 274.76; 236.13; 160.64.

/.../ **crossline standards** were prepared from /.../ **Boc-lysine and glucose** /.../ under the same conditions as their analogs following the same purification procedures. **The protective Boc-groups were cleaved with TFA:water (9:1, 1 mL) at room temperature.**

As previously shown by Watkins *et al.* phosphate ions accelerated the Amadori product formation by catalyzing glucose-lysine Schiff base rearrangement ([Watkins *et al.* 1987](#))/.../ The catalytic effect of phosphate ions was observed for all three crosslinks.

"LC-MS measurements showed molecular ion at m/z 447 for GLUCOLD **and m/z 545 for crossline**. The LC-MS/MS analysis 1 conditions were as previously published (Thornalley *et al.* 2003) whereby conditions for GLUCOLD and crossline were as follows: **crossline: parent ion m/z 545.45; daughter ion m/z 500.36; collision energy 35 eV**; retention time 24.7 min."

for crossline (parent ion m/z 515.20) collision energy for **both fragments (m/z 377.13 and 388.95)** was 50 eV.

Alternatiivne info Nemet *et al.* poolt viidatud allikast (Thornalley PJ, Battah S, Ahmed N, Karachalias N, Agalou S, Babaei-Jadidi R, Dawnay A. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem J* 2003;375:581–592) **crossline HPLC** kohta (originaal crossline'i ei käsitle):

Two 5- μ m **Hypersil TM columns** (Thermo Hypersil, Runcorn, Cheshire, U.K.) in series were used: 2.1 mm $\times$ 50 mm (column 1) and 2.1 mm $\times$ 250 mm (column 2). **The mobile phase was 26 mM ammonium formate, pH 3.8, with a two-step gradient of acetonitrile** (17–25 min, 0–31% acetonitrile; 25–30 min, 31% acetonitrile; 30–35 min, 31–50% acetonitrile). The flow rate was 0.2 ml/min.

|

(Nemet *et al.*, 2011, lk 3–4, Thornalley *et al.*, 2003, lk 583)