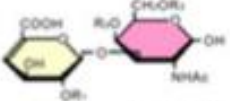
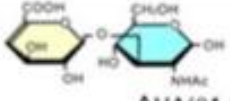
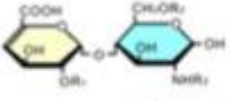
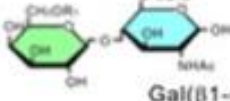


Analiza Glicozaminoglicanilor

Glicozaminoglicanii (GAG) sunt polizaharide liniare încărcate negativ compuse din dizaharide repetate cu niveluri de sulfatare variabile. Se clasifică în cinci grupe majore în funcție de subunitatea care se repetă ca: condroitin sulfat (CS) (acid glucuronic și N-acetilgalactosamină), dermatan sulfat (DS) (acid iduronic sau acid glucuronic și N-acetilgalactosamină), heparan sulfat (HS) (acid iduronic sau acid glucuronic și N-acetilglucozamină), keratan sulfat (KS) (galactoză și N-acetilglucozamină) și hialuronan (HA) (acid glucuronic și N-acetilglucozamină)

Class	Abbreviation	Structure	R ₁	R ₂	R ₃	M.W.
CS/DS	ΔCS-0S	 ΔUA(β1-3)GalNAc	H	H	H	379.3
	ΔCS-2S		SO ₃ H	H	H	459.4
	ΔCS-4S		H	SO ₃ H	H	459.4
	ΔCS-6S		H	H	SO ₃ H	459.4
	ΔCS-2S4S		SO ₃ H	SO ₃ H	H	539.4
	ΔCS-2S6S		SO ₃ H	H	SO ₃ H	539.4
	ΔCS-4S6S		H	SO ₃ H	SO ₃ H	539.4
	ΔCS-1S		SO ₃ H	SO ₃ H	SO ₃ H	619.5
HA	ΔHA	 ΔUA(β1-3)GlcNAc	-	-	-	379.3
HS	ΔHS-0SNH	 ΔUA(α1-4)GlcN	H	H	H	337.3
	ΔHS-0S		H	H	Ac	379.3
	ΔHS-2SNH		SO ₃ H	H	H	417.3
	ΔHS-6SNH		H	SO ₃ H	H	417.3
	ΔHS-NS		H	H	SO ₃ H	417.3
	ΔHS-2S		SO ₃ H	H	Ac	459.4
	ΔHS-6S		H	SO ₃ H	Ac	459.4
	ΔHS-2S6S		SO ₃ H	SO ₃ H	Ac	539.5
	ΔHS-2SNS		SO ₃ H	H	SO ₃ H	497.4
	ΔHS-6SNS		H	SO ₃ H	SO ₃ H	497.4
	ΔHS-2S6SNH		SO ₃ H	SO ₃ H	H	497.4
	ΔHS-1S		SO ₃ H	SO ₃ H	SO ₃ H	577.5
KS	KS-6S	 Gal(β1-4)GlcNAc	H	SO ₃ H	-	463.4
	KS-6S6S		SO ₃ H	SO ₃ H	-	543.4

Metoda colorimetrica cu Albastru de toluidina (TB)

Albastrul de toluidina (TB) este o tiazină care are proprietăți metacromatice acidofile. Acesta a fost descoperit de William H. Perkin în 1856 și este folosit pentru a detecta GAG datorită afinității sale ridicate pentru țesuturile acide.

Colorația TB se bazează pe metacromazie, un principiu în care colorantul reacționează cu grupări electronegative din țesuturi pentru a produce culori de lungimi de undă diferite în funcție

de concentrația GAG, dar nu modifică structura chimică a GAGs. Sulfatii încărcăți negativ în GAG neutralizează încărcarea pozitivă de albastrului de toluidina, ceea ce duce la agregarea de coloranți prin legarea hidrofobă și interacțiunile van der Waals. Metodele de detecție folosind electroforeza cu gel urmată de colorarea cu TB au fost dezvoltate pentru a detecta niveluri scăzute de GAG în extractele de țesut. Colorația TB este utilizată pe scară largă pentru patohistologie pentru a detecta acumularea de GAG în țesuturile secționate cu o grosime de 0,5 μm , oferind cea mai bună rezoluție a materialelor de depozitare; cu toate acestea, metoda TB nu poate fi aplicată la analizele cantitative ale GAG-urilor, deoarece TB reacționează cu alte molecule încărcate negativ fără legătură.

Metoda colorimetrică cu Albastru Alcian

Albastru Alcian (AB) este un colorant cationic tetravalent cu un miez hidrofob care conține un ion de cupru. Colorantul interacționează cu specificitate ridicată la GAG-urile sulfatate prin interacțiuni ionice și a fost utilizat pentru cuantificarea GAG-urilor. De asemenea, este utilizat în combinație cu argintul pentru a colora GAG-urile după separarea prin gel-electroforeza. Cu toate acestea, utilizarea AB este limitată din cauza problemelor cu precipitați și interferențe datorate interacțiunii cu alte molecule încărcate negative.

Metoda AB poate fi limitată de prezența moleculelor încărcate negativ, cum ar fi aminoacizii, care pot interfera cu legarea AB la GAG. Colorația AB este utilizată pentru detectarea GAG-urilor în combinație cu electroforeza, precum și colorarea țesuturilor. Această metodă nu este suficient de sensibilă și specifică pentru a măsura GAG-urile în sânge sau extracte de țesut fără proteza, nuclează sau hialuronidaza anterioară și nu poate distinge GAG-uri specifice de la sine.

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

ELISA este o tehnică bazată pe legarea unui antigen la un anticorp care este legat de o enzimă și detectarea prin hidroliză a unui substrat de enzimele legate. Există diferite tipuri de ELISA: direct , indirect , sandwich, competitiv .

Testele ELISA dezvoltate pentru GAG pot măsura nivelurile mici de KS, HS, C4S, C6S, DS și acid hialuronic. Protocoalele ELISA au fost, de asemenea, dezvoltate pentru a detecta GAG-

uri în celule și pe suprafețele celulare [125–126]. Măsurarea GAGs prin sandwich ELISA este încă frecvent utilizat, în special în medii clinice. Avantajele utilizării sale sunt: fezabilitatea, sensibilitatea, reproductibilitatea și cuantificarea care necesită doar un simplu cititor de plăci ELISA. Dezavantajele sunt costurile, deoarece niciun test actual nu poate detecta mai multe GAG care necesită simultan teste multiple.

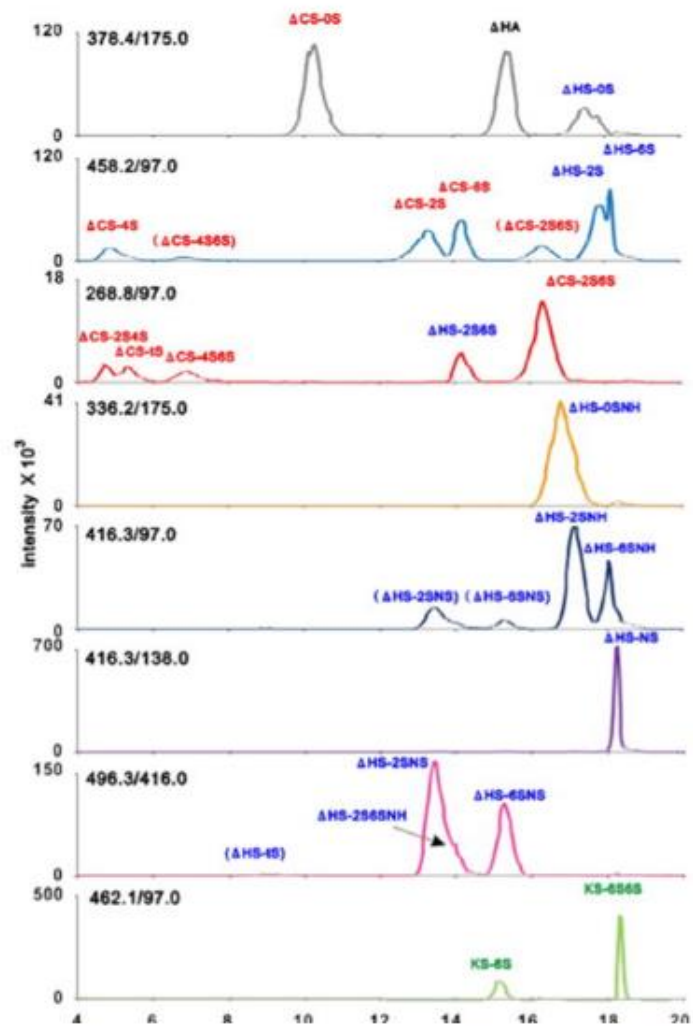
Spectrometrie de masa

Spectrometria de masă (MS) este o tehnică care măsoară compușii pe baza raportului masă-sarcină (m / Q , m / q , m / Z sau m / z). Pot fi utilizate diferite surse de ionizare, de ex. ionizare electrospray (ESI), ionizare chimică sub presiune atmosferică (APCI), bombardare cu atom rapid (FAB), ionizare chimică (CI), desorbție / ionizare laser asistată de matrice (MALDI).

Analizele GAG au fost efectuate în diferite tipuri de analizoare de masă: timp de zbor (TOF), trapa ionică (IT), rezonanță ciclotronă ionică transformată Fourier (FTICR) și triplu quadrupol (QQQ).

Analiza MS poate fi cu spectru complet pentru a detecta toți ionii intacti în amestecuri de compuși necunoscuți, monitorizarea ionilor pentru a măsura nivelurile de ioni intacti cunoscuți sau monitorizarea multiplă a reacțiilor (MRM) pentru a măsura diferite perechi de ion intact / produs care pot distinge compuși care au ioni de raport masă / sarcină identică, dar au fragmente diferite

Metodele de spectrometrie de masă sunt superioare în ceea ce privește precizia, viteza, sensibilitatea și specificitatea altor metode de detectare. Există multe protocoale descrise folosind MS / MS pentru cuantificarea GAG: de ex. GAGs sulfatate în mai multe linii celulare, GAG urinare, mono și dizaharide în extracte de țesut, GAG plasmatice / serice sau urinare, GAG-uri în cartilaj articular și ligament galben și GAG-uri din pete de sânge uscate.



Cromatograma ionica a unor fractiuni glucidice din patru tipuri de GAG