

Dadansoddiad Rhywogaethau Ghrelin gan Sbectrometreg Màs, Biofarcwyr Newydd ar gyfer Gwneud Diagnosis o Dementia?

Alanna Thomas

Goruchwylwyr:

Dr Jeffrey Davies, Dr Alwena Morgan a Dr Roberto
Angelini.

Cyflwynwyd i Brifysgol Abertawe i gyflawni gofynion y
Radd Doethur mewn Athroniaeth



PRIF YSGOL ABERTAWE 2025

Hawlfraint: Yr awdur, Alanna Thomas, 2025

Wedi'i ddosbarthu o dan delerau Trwydded 'Creative Commons Attribution Non Commercial 4.0' (CC BY-NC 4.0).

Tabl cynnwys

Tabl cynnwys.....	2
Diolchiadau.....	9
Datganiad.....	10
Rhestr o Ffigurau	11
Rhestr o Dablau.....	17
Rhestr o Fyrfoddau	18
1. Rhagymadrodd.....	21
1.1 Cyflwyniad i Biofarcwyr o fewn Ymchwil Biofeddygol.....	22
1.1.1 Diffiniad a Dosbarthiad	22
1.1.2 Pwysigrwydd Cyd-destun Biocemegol: Strwythur Protein, Swyddogaeth, ac Addasiadau Ôl-Trawsfudol	22
1.1.3 Rôl Biofarcwyr mewn Meddygaeth Fanwl ac Ymchwil i Glefydau Niwrodirywiol.....	23
1.1.4 Gofynion ar gyfer Biofarcwyr Hyfyw.....	24
1.2 Tirwedd Clefydau Niwrodirywiol	25
1.3 Ffactorau Systemig sydd yn Dylanwadu ar Niwroddirwyd.....	27
1.3.1 Echelin y Coluddyn-Ymennydd mewn Niwrodirywiol.....	28
1.3.2 Ghrelin wrth Groestoriad Echelin y Coluddyn a yr Ymennydd ac Ymchwil Biofarcwyr	29
1.4 Bioleg Ghrelin ac Amrywiaeth Strwythurol	30
1.4.1 Cefndir o Ghrelin	30
1.4.2 Ffurfiad Ghrelin.....	32
1.4.3 Ffactorau sydd yn effeithio ar lefelau ghrelin	36
1.4.3.1 Effaith proteinau ar fynegiant ghrelin.....	36
1.4.3.2 Clirio Ghrelin a Hanner Oes	37
1.4.3.3 Modelau Anifeiliaid o Newidiadau Ghrelin sydd yn Gysylltiedig ag Oedran	38
1.4.3.4 Astudiaethau Dynol o Newidiadau Ghrelin sydd yn Gysylltiedig ag Oedran	39
1.4.3.5 Diraddiad Ghrelin	40
1.4.3.6 Goblygiadau ar gyfer Datblygu Biofarcwyr Dementia.....	41
1.4.4 Derbynyddion Ghrelin a Lleoleiddiad yr Ymennydd.....	42
1.4.5 Dadasyl ac Asyl Ghrelin a yr BBB	43
1.4.6 Rhwymo Asyl Ghrelin i GHS-R1a.....	49

1.4.7	Rôl o Dadasyl Ghrelin.....	50
1.4.8	Perthnasoedd Ffisegol o Asyl Ghrelin ac Dadasyl ghrelin	52
1.5	Amrywiaeth Lipidau a Perthnasedd i Glefyd	53
1.6	Signalau Ghrelin mewn PD: Perthnasedd Pathoffisiolegol.....	56
1.7	Addasrwydd Ghrelin a Biofarcwyr	57
1.7.1	Cydweddu â Meini Prawf Biofarcwyr	57
1.7.2	Heriau Casglu a Chadwraeth Samplau	58
1.7.3	Sensitifrwydd a Phenodolrwydd.....	59
1.7.4	Haeniad Cleifion a Chyfnod y Clefyd	59
1.7.5	Perthnasedd Biolegol a Pathoffisiolegol	59
1.7.6	Cymhareb AG:UAG ac Adlewyrchiad o Gyflwr y Clefyd	59
1.7.7	Mesuriadau Canolog yn erbyn Perifferol ac Ystyriaethau BBB	60
1.7.8	Dehongladwyedd Clinigol a Photensial Cyfieithu.....	60
1.7.9	Cymhariaeth â Biofarcwyr Gwaed Sefydledig.....	60
1.7.10	Crynodeb.....	61
1.8	Technegau Canfod ar gyfer Isoformau Ghrelin	61
1.8.1	Gofynion Dadansoddol ar gyfer Mesur Cymhareb AG:UAG.....	61
1.8.2	Imiwnopofion: Defnyddioldeb a Chyfyngiadau Cyfredol	61
1.8.3	Technegau sydd yn Seiliedig ar MS: MALDI-TOF ac LC-MS/MS.....	62
1.8.4	Offer sydd yn Dod i yr Amlwg: BAMS ac MS Imiwnedd-Affinedd	63
1.8.5	Pwysigrwydd Strategaethau Cadw a Dal Rhannau Lipid.....	64
1.8.6	Gwersi o Profion Biofarcwyr Niwrodirywiol	64
1.9	Paratoi Sampl ac Ystyriaethau Dadansoddol.....	66
1.9.1	Heriau Hylifau Biolegol Cymhleth	66
1.9.2	Clirio a Symleiddio: Angen am Ddaliad Penodol a Sensitif i Lipidau	68
1.9.3	Gwrthgyrff Presennol a Chyfyngiadau Epitop ar gyfer Asyl Ghrelin.....	68
1.9.4	Clirio Cromatograffig neu Gyfoethogi Dethol: Pwyntiau Penderfynu Technegol	69
1.9.5	Datblygu Biofarcwyr o yr Gwaelod i Fyny: O Fodelau 'In Vitro' i Garfanau Dynol	69
1.10	Hyfywedd Economaidd ac Ymarferol	70
1.10.1	Cymhariaeth Costau: ELISA yn erbyn Dulliau sydd yn Seiliedig ar Sbectrometreg Màs.....	70
1.10.2	Goblygiadau Economeg Iechyd mewn Diagnosteg ar Raddfa Fawr .	71
1.10.3	Potensial Cyfieithu Clinigol a Chydbwysedd Cost-Budd.....	71
1.11	Sbectrometreg Màs.....	72

1.11.1	Trosolwg.....	72
1.11.2	Technegau ïoneiddio.....	73
1.11.3	Dadansoddwyr Mäs.....	73
1.11.4	Tandem MS (MS/MS).....	73
1.11.5	Tabl Crynodeb o yr llwyfannau Sbectrometreg Mäs a ddefnyddiwyd	74
1.12	Rhagdybiaethau ac Amcanion	74
1.13	Amcanion Ymchwil.....	75
1.14	Cyd-destun y Traethawd Hir o fewn Prosiectau Ymchwil Ehangach	75
2.	Deunyddiau a Dulliau.....	76
2.1	Deunyddiau.....	77
2.1.1	Offer.....	77
2.1.2	Adweithyddion a Thoddyddion.....	78
2.1.3	Safonau Ghrelin.....	79
2.2	Casglu Gwaed a Phlasma.....	81
2.3	Echdynnu Ghrelin.....	82
2.4	Dadansoddiad Ghrelin gan MALDI-TOF	82
2.4.1	Sbectromedr Mäs	82
2.4.2	Dull Glanhau yr Targed MALDI-TOF	83
2.4.3	Data a Chaffael.....	84
2.4.4	Dadansoddiad ystadegol	84
2.5	Dadansoddiad Ghrelin gan ESI-MS/MS	84
2.5.1	Gosodiadau Chwistrellu Nano Ïon Positif.....	85
2.6	Dadansoddiad Ghrelin gan LC-MS/MS	85
2.6.1	Ffynhonnell ESI gydag Amodau Orbitrap	86
2.6.2	Data a Chaffael.....	86
2.7	BAMS.....	86
2.7.1	Optimeiddio BAMS ar gyfer Pecyn Cyfeirio	86
2.7.1.1	Gleiniau Sengl Dal-imiwnedd BAMS ar gyfer Pecyn Cyfeirio.....	86
2.7.1.2	Gleiniau Sengl Dal-Imiwnedd BAMS ar gyfer Ghrelin	87
2.7.1.3	Gleiniau Adwaith yr Arae	87
2.7.1.4	Echludo Dadansoddyddion o Araeau Glain trwy Chwistrellwr Matrics MALDI	88
2.7.1.5	Mesur Micro-Araeau o Ddadansoddyddion wedi Echludo gan Gleiniau	88
3.	Datblygiad o ddull arferol ar gyfer dadansoddi ghrelin gan MALDI-TOF ...	89
3.1	Cyflwyniad.....	90

3.1.1	Dethol Matrics MALDI.....	90
3.1.2	Cymhwysiad Matrics MALDI.....	91
3.1.3	Echdynnu Ghrelin o Samplau Biolegol	92
3.1.3.1	Sefydlogi Ghrelin wrth Gasglu Gwaed	92
3.1.3.2	Safon Fewnol	94
3.1.3.3	Dyddodiad Protein.....	94
3.1.3.4	SPE.....	95
3.1.4	Nodau	97
3.2	Deunyddiau a Dulliau	97
3.2.1	Dyddodiad Protein	97
3.2.2	Paratoi Arwynebau Matrics.....	98
3.2.3	Echdynnu Gwedd Solid	98
3.2.3.1	SPE Plât Echludiad Micro	98
3.2.4	Dyfais Hidlo Allgyrchol (' <i>Centrifugal Filter</i> ').....	99
3.2.5	Siptipiau C18	100
3.2.6	Paratoi Sampl ar gyfer Dadansoddiad MS.....	100
3.3	Canlyniadau	102
3.3.1	Effaith y Grisial Hedyn ar Wyneb y Matrics.....	102
3.3.2	Dewis Matrics a Hirhoedledd	105
3.3.3	Meintoli yn ôl MALDI-TOF.....	107
3.3.4	Optimeiddio Echdyniad Ghrelin o Blasma	112
3.3.4.1	Dyddodiad Protein.....	112
3.3.4.2	Dyddodiad Protein a defnydd o Siptipiau C18.....	115
3.3.5	Cynnwys SPE yn y Protocol Echdynnu Ghrelin	117
3.3.5.1	Rhwymiad Amhenodol Ghrelin	127
3.3.5.1.1	Ymchwilio i yr Defnydd o Albwmn Serwm Buchol i Atal Rhwymiad Amhenodol	127
3.3.5.1.2	Ymchwilio i yr Posibilrwydd o Ghrelin yn Rwymo i yr Plât Targed MALDI	130
3.3.6	Crynodi Ghrelin mewn Samplau	133
3.3.6.1	Sychu Samplau	133
3.3.6.2	Plât Micro Echludiad	134
3.3.6.3	Profi yr Defnydd o Amoniw Hydrocsid	137
3.3.7	Halogiad	138
3.3.8	Trafodaeth	144
3.3.8	Casgliadau.....	147

4. Datblygu Protocol i Ddadansoddi Ghrelin gan Ddefnyddio LC-MS/MS ...	148
4.1 Cyflwyniad.....	149
4.1.1 Nodau	153
4.2 Defnyddiau a Dulliau	154
4.2.1 Paratoi Safonau Dynol a Llygoden Fawr Ghrelin ar gyfer Dadansoddiad LC-MS/MS	154
4.2.2 ESI LC-MS/MS	154
4.2.3 LC-MS/MS	154
4.3 Canlyniadau	157
4.3.1 Dull datblygu cychwynnol.....	157
4.3.2 Archwilio Gwanedydd Priodol ar gyfer Peptid Ghrelin	163
4.3.3 Newid Cyfrol Sampl Cychwynnol.....	165
4.3.4 Optimeiddio Cyflwr Gwefr yn dilyn Cynnwys Gwahanol Ychwanegion yn y Cyfnod Symudol yn ystod Dadansoddiad LC-MS/MS	167
4.3.4.1 Archwilio yr Defnydd o Asidau neu Halen o fewn y Cyfnod Symudol	168
4.3.4.2 Archwilio i Gynnwys DMSO yn y Cyfnod Symudol.....	174
4.3.5 Treuliad Tryptig Ghrelin Cyn Dadansoddiad MS	185
4.4 Trafodaeth.....	199
4.5 Casgliad.....	204
5. Datblygu Prawf BAMS i Ddadansoddi Ghrelin	205
5.1 Cyflwyniad.....	206
5.1.1 Nodau	208
5.2 Defnyddiau a Dulliau	209
5.2 Paratoi sampl.....	209
5.2.1 Paratoi yr Gleiniau BAMS a eu Hychwanegiad at Samplau.....	209
5.2.2 Golchi Gleiniau Rhwymo Ghrelin.....	209
5.2.3 Cydosodiad Arae BAMS	210
5.2.4 Echludo Ghrelin o Gleiniau Adweithydd BAMS	210
5.2.5 Casglu Data BAMS Ghrelin	211
5.2.6 Dadansoddi Data BAMS MS	212
5.2.7 Casglu Samplau Plasma	212
5.2.8 ELISA	212
5.3 Canlyniadau	212
5.3.1 Optimeiddio Chwistrellwr HDX.....	212
5.3.2 Cymharu a Dethol Pecynnau Gwrthgyrff	216

5.3.2.1	Defnyddio Ghrelin Llygoden Fawr fel ISTD i Feintioli Ghrelin Dynol 216	
5.3.3	Terfyn Canfod y Prawf BAMS	220
5.3.4	Profion Perfformiad Gwrthgyrff BAMS	222
5.3.4.1	Dadansoddiad Plasma wedi ei Spigo	222
5.3.4.2	Canlyniadau Plasma Digymysg	230
5.3.5	Cymhariaeth rhwng BAMS Ghrelin ac ELISA	237
5.3.5.1	Atgynrychioldeb ELISA	237
5.3.5.2	Cymhariaeth o Atgynrychioldeb ELISA a BAMS gan Ddefnyddio Plasma gan yr Un Rhoddwyr	241
5.3.6	Lleihau Cyfaint Plasma	244
5.4	Trafodaeth a Chasgliad	245
6.	Trafodaeth Gyffredinol	253
6.1	Casgliadau a Thrafodaeth	254
6.2	Cyfyngiadau Biofarcwyr sydd yn seiliedig ar Hylifau yr Corff	260
6.3	Cyfyngiadau y Gwaith	264
6.4	Cyfeiriadau yn y Dyfodol	267
6.5	Cyfieithu Canfod Ghrelin i Gymhwysiad Clinigol: Rhagolygon y Dyfodol ar gyfer Sgrinio Biofarcwyr	269
	Atodiad A: Ffigur a Thablau Atodol.	273
	Cyfeirnodau	286

Crynodeb

Mae tua 50 miliwn o bobl ledled y byd yn dioddef o ddementia, a nodweddir gan gollu cof a dirywiad yn y gallu i gyflawni gweithgareddau bob dydd. Ar hyn o bryd, mae biofarcwyr sydd yn seiliedig ar waed ar gyfer gwneud diagnosis o anhwylderau niwrodirywiol yn gyfyngedig. Mae yr 'hormon newyn' (*'the hunger hormone'*) ghrelin wedi ei gysylltu yn flaenorol â chyfyngu effeithiau buddiol cyfyngiad calorïau ar amddiffyn celloedd nerfol mewn modelau dementia. Mae ghrelin yn bodoli mewn sawl ffurf, gan gynnwys asyl ghrelin (AG) ac dadasyl ghrelin (UAG). Dangoswyd bod asyl ghrelin yn ysgogi niwrogenesis, tra bod dadasyl ghrelin yn atal y broses. Rydym wedi dangos yn flaenorol bod cymhareb plasma gwaed AG:UAG yn cael ei leihau mewn clefyd Parkinson gyda dementia (PDD) ac felly gall fod yn fiofarcwyr dementia posib. Her fawr yw mesur y peptidau ghrelin yn gydamserol ac yn gywir ac mewn un prawf. Prif amcan y traethawd ymchwil hwn yw datblygu techneg sbectrometreg màs (MS) sydd â sensitifrwydd uchel ynghyd â yr gallu i ganfod gwahanol rywogaethau o ghrelin mewndarddol ar yr un pryd mewn un sampl plasma. Datblygwyd dull dadsugniad/ïoneiddiad laser gyda chymorth matrices-amser hedfan (MALDI-TOF) yn gyntaf ar samplau rheolydd ghrelin dynol alldarddol, gan ddefnyddio ghrelin o lygod mawr fel safon fewnol (ISTD). Sefydlwyd cromliniau graddnodi ar gyfer ghrelin alldarddol oedd gyda chyfernod cydberthyniad (R^2) o 0.99 yn cwmpasu ystod 0.08-80 ng/mL o ghrelin, gyda ghrelin mewndarddol fel arfer yn bresennol ar 0.32 ng/mL. Datblygwyd dull cromatograffaeth hylifol-sbectrometreg màs (LC-MS) hefyd; fodd bynnag, adnabyddwyd terfyn canfod isaf (LOD) o 0.4 ng/mL. Echdynnwyd ghrelin mewndarddol o blasma dynol i yw feintioli gan ddefnyddio MALDI-TOF. Defnyddiwyd amrywiaeth o dechnegau echdynnu protein traddodiadol megis dyddodiad protein ac yna echdynnu cyfnod solet (SPE), ynghyd â dull newydd a elwir yn sbectrometreg màs gyda chymorth gleiniau (BAMS). Dangosodd canlyniadau cychwynnol BAMS ei fod yn ddull mwy llwyddiannus o ddal ghrelin o ei gymharu â dulliau SPE traddodiadol o echdynnu ghrelin. Hefyd, o ei gymharu â yr prawf sorbent imiwn sydd yn gysylltiedig ag ensymau (ELISA), roedd atgynrychioldeb prawf BAMS yn debyg, os nad gwell nag atgynrychioldeb yr ELISA. Mae gallu ychwanegol BAMS i ddadansoddi proteinau lluosol mewn un sampl plasma yn agor maes newydd nid yn unig ar gyfer dadansoddi ghrelin ond hefyd ar gyfer biofarcwyr clefyd ychwanegol yn y gwaed.

Diolchiadau

Hoffwn ddiolch o galon i fy ngoruchwylwyr Dr. Jeff Davies, Dr. Alwena Morgan a Dr. Rob Angelini a phawb ar y trydydd llawr a yr ail lawr am eu cefnogaeth dros y blynyddoedd diwethaf.

Ed Dudley, Dr Nick Jones a Dr. James Cronin am eu cefnogaeth dros y chwe blynedd diwethaf o radd israddedig hyd yn hyn. Fe wnaethoch chi i gyd helpu i annog fy ngyrfa wyddonol a rhoi hyder i mi barhau.

Diolch o galon i Dr. Ann Hunter; mae wedi bod yn ffrind gweithio ochr yn ochr â chi. Mae eich mentoriaeth wedi bod yn amhrisiadwy, gan gyflwyno gwybodaeth a doethineb sydd wedi fy ffurfio i fel y gwyddonydd ydw i heddiw. Rydw i yn hynod ddiolchgar am y chwerthin, y cyfeillgarwch a yr anogaeth, yn enwedig pan nad oedd Mr LC yn rhoi yr canlyniadau yr oeddwn eu heisiau.

Rydw i yn hynod ddiolchgar i Kat am gychwyn ar y daith hynod ond cythryblus hon gyda ein gilydd. Mae eich cwmniâeth a yr profiadau a rennir wedi rhoi cysur mawr ei angen. Bydd atgofion ein coffi ac ein egwylliau croissant gydag Ann yn cael eu trysori am byth.

I Mam, mae dy gred ddiwyro ynof ers plentyndod wedi bod yn angor i mi. Diolch i chi am feithrin fy chwilfrydedd mewn gwyddoniaeth, o ddyrannu calonau moch i archwilio gwaed o dan ficrosgop. I fy chwaer, diolch am y sesiynau a y gweithgareddau pobi i leddfu straen a helpodd fi i ymlacio. Diolch o galon i fy mrawd a Shelby am y lifftiau ac y eiliadau di-ri o lefarwydd yng nghanol yr heriau.

Diolch i George am lynu wrth fy ochr yn ystod ras emosiynol y PhD ac am helpu mewn unrhyw ffordd bosibl. Rydych chi yn bendant wedi gwneud y profiad yn fwy pleserus gyda chymaint o atgofion hapus yn ystod cyfnod mor straen.

Estynnaf fy niolch i ym holl deulu a ffrindiau agos sydd wedi sefyll gyda mi gydag amynedd a dealltwriaeth wrth i mi dreiddio yn ddyfnach i'm PhD. Mae eich cefnogaeth ddiwyro a eich cred ynof wedi bod yn ffynhonnell gyson o gymhelliant.

Datganiad

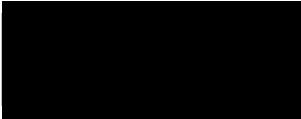
Nid yw sylwedd y gwaith hwn wedi ei dderbyn yn flaenorol ar gyfer unrhyw radd ac nid yw yn cael ei gyflwyno ar yr un pryd mewn ymgeisyddiaeth am unrhyw radd.

Llofnodwyd: 

Dyddiad: 26/09/2025

DATGANIAD 1

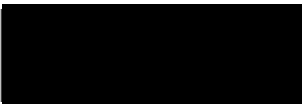
Mae yr traethawd ymchwil hwn yn ganlyniad fy ymchwiliadau fy hun, ac eithrio lle nodir yn wahanol. Mae ffynonellau eraill yn cael eu cydnabod gan droednodiadau sydd yn rhoi cyfeiriadau amlwg. Atodir llyfryddiaeth.

Llofnodwyd: 

Dyddiad: 26/09/2025

DATAGANIAD 2

Rhoddaf ganiatâd drwy hyn i ym thesis, os caiff ei dderbyn, fod ar gael i yw lungopïo ac i yw fenthyg rhwng llyfrgelloedd, ac i yr teitl a yr crynodeb fod ar gael i sefydliadau allanol.

Llofnodwyd: 

Dyddiad: 26/09/2025

Rhestr o Ffigurau

Ffigur 1.1 Ffurfiad ghrelin aeddfed.	32
Ffigur 1.2 Celloedd sydd yn cynhyrchu ghrelin yn y stumog ddynol.	34
Ffigur 1.3 Peptidau ghrelin yn croesi yr rhwystr ymennydd-gwaed.	44
Ffigur 1.4 Heriau mesur biofarcwyr gwaed ar gyfer anhwylderau CNS.	67
Ffigur 2.1 Cymhariaeth o safonau ghrelin gan ddau gyflenwr - Phoenix a Tocris. ...	80
Ffigur 2.2 Cymhariaeth o hUAG a ddarparwyd gan Bachem AG a Tocris. Paratowyd 15 ng/mL ghrelin safonol mewn 0.1% TFA ac ychwanegwyd ar darged dur gwrthstaen mewn cymhareb o 1 rhan.	81
Ffigur 2.3 Cydosod sleid siambr ar gyfer gosod gleiniau.	87
Ffigur 3.1 Camau SPE.	96
Ffigur 3.2 Dyfais hidlo allgyrchol ar gyfer 3kDa (A) a 10kDa (B).	100
Ffigur 3.3 Effaith dull dyddodiad ar nodweddion wyneb y matrices.	103
Ffigur 3.4 Sbectra MALDI-TOF a gafwyd o yr pedair rhywogaeth ghrelin yn y modd ïon positif y 'reflectron' ac yn yr ystod m/z 1000-5000.	104
Ffigur 3.5 Cymharu arddwysedd hUAG ac hAG ar ôl eu paratoi mewn canrannau gwahanol o asetonitril.	106
Ffigur 3.6 Hirhoedledd y matrices CHCA.	107
Ffigur 3.7 Cromliniau graddnodi gyfer ghrelin llygod mawr wedi eu dadansoddi gan MALDI-TOF yn yr ystod o 0.08–80 ng/mL, gan ddefnyddio crynodiad safon fewnol (ISTD) o 51 ng/mL.	108
Ffigur 3.8 Cromlin raddnodi gan ddefnyddio rUAG fel ISTD ar 51 ng/mL a rAG yn amrywio o 0.08-80 ng/mL wedi eu dadansoddi gan ddefnyddio modd llinol ar y MALDI- TOF.	109
Ffigur 3.9 Cromliniau graddnodi ar gyfer meintioli rhywogaethau ghrelin llygoden fawr yn yr ystod o 0.08-2 ng/mL gydag ISTD naill ai ar 1.3 ng/mL (A ac C) neu 0.65 ng/mL (B ac Ch).	110
Ffigur 3.10 Cromlin graddnodi safonol ghrelin dynol, crynodiad hAG yn amrywio rhwng 0.08-2 ng/mL gyda hUAG wedi ei osod fel ISTD (0.65 ng/mL).	111
Ffigur 3.11 Cymhariaeth y dulliau dyddodiad protein a ddefnyddir ar gyfer paratoi sampl cyn dadansoddiad gan MALDI-TOF.	114

Ffigur 3.12 Cymhariaeth o effaith defnyddio siptipiau C18 ar ganfod ghrelin yn dilyn echdyniad gan ddefnyddio naill ai yr dull Eslami et al., Rauh et al. neu Sidibe et al.	116
Ffigur 3.13 Canfod ghrelin yn dilyn dyddodiad protein, SPE a defnyddio siptipiau C18.	119
Ffigur 3.14 Cymhariaeth o ddefnyddio hidlwyr allgyrchol 3kDa neu 10kDa yn dilyn naill ai dulliau dyddodiad protein Eslami et al. neu Sidibe et al. ac SPE o gymharu â heb ddefnyddio hidlyddion allgyrchol.	121
Ffigur 3.15 Cymhariaeth o golofnau C18 yn erbyn colofnau HLB yn dilyn dyddodiad protein (dull Sidibe et al.) wrth echdynnu rAG a rUAG alldarddol wedi rhoi i mewn i blasma dynol.	122
Ffigur 3.16 Effaith siptipiau C18 ar dargadw ghrelin yn dilyn dyddodiad protein gan ddefnyddio dull Sidibe a cholofnau HLB.	123
Ffigur 3.17 Cymhariaeth o ganfod ghrelin yn dilyn SPE HLB a yr defnydd o hidlwyr 10kDa.	123
Ffigur 3.18 Cymharu effaith sychu yr sampl i yw grynodi.	124
Ffigur 3.19 Daliad ghrelin o yr ddyfais hidlo allgyrchol 10kDa a yr llif drwy.	125
Ffigur 3.20 Cynrychiolaeth o golled ghrelin yn ystod protocol siptipiau C18.	127
Ffigur 3.21 Cromlin graddnodi ghrelin llygoden fawr heb (A) a gyda (B) presenoldeb 0.1% BSA. rUAG fel ISTD ar 51 ng/mL a rAG yn amrywio o 0.08-2 ng/mL.	128
Ffigur 3.22 Asesu effaith BSA ar adferiad ghrelin ar ôl ei echdynnu.	129
Ffigur 3.23 Adfer ghrelin ar ôl ei echdynnu ym mhresenoldeb neu absenoldeb BSA yn ystod y camau SPE a SV.	130
Ffigur 3.24 Presenoldeb halogiad ghrelin.	131
Ffigur 3.25 Asesiad o ffynonellau posibl halogiad ghrelin.	132
Ffigur 3.26 Effaith sychu o dan SV gyda chyfeintiau cychwynnol gwahanol ac ail-hyddodi mewn hydoddiannau sydd yn cynnwys canran wahanol o asetonitril.	134
Ffigur 3.27 Dadansoddiad o lefelau ghrelin ar ôl echludiad parhaus ac yna cam golchi gan ddefnyddio naill ai colofnau MAX (A) neu WCX (B).	136
Ffigur 3.28 Dadansoddiad o lefelau ghrelin wedi cam 1 o yr echludiad gan ddefnyddio colofnau MAX neu WCX (ar blât μ Echludiad), gydag a heb ychwanegu siptipiau ar ei ôl.	137

Ffigur 3.29 Effaith 5% amoniwm hydrocsid (NH ₄ OH) ar echdynnu rhywogaethau ghrelin.	138
Ffigur 3.30 Sbectra MALDI-TOF cynrychioliadol o ffynonellau halogiad posibl, ystod m/z 1000-5000 Th.	141
Ffigur 3.31 Profi presenoldeb halogiad PEG ar ôl glanhau y targed MALDI yn ddwfn.	142
Ffigur 3.32 Presenoldeb halogiad PEG o fewn cymysgedd hafal o ghrelin llygod mawr.	143
Ffigur 4.1 Sgematig sbectrometreg màs tandem (MS/MS).	150
Ffigur 4.2 Treuliad tryptig o peptid ghrelin yn arwain at gynhyrchu dau gynnyrch, mae darnau 1-11 yn cadw yr motiff asyl os yw yr swbstrad gwreiddiol yn AG. A. hUAG. B. hAG.	153
Ffigur 4.3 Graddiant echludiad ar gyfer gwahanu rhywogaethau ghrelin gan ddefnyddio HPLC.	155
Ffigur 4.4 Graddiant HPLC ar gyfer gwahanu rhywogaethau ghrelin yn ystod rhediad o 30 munud.	156
Ffigur 4.5 NanoESI gyda FTMS o yr cyflwr gwefr ghrelin a ddewiswyd ac yna MS/MS yn y modd ITMS i adnabod ïonau cynnyrch. A. hUAG. B. hAG. C. rUAG. Ch. rAG. Cymerwyd a chyfunwyd 10 digwyddiad sgan.	158
Ffigur 4.6 Cromatogramau LC ar gyfer y rhediad 40 munud.	159
Ffigur 4.7 Cromlin graddnodi ar gyfer hUAG a hAG yn amrywio o 0.4-40 ng/mL... ..	160
Ffigur 4.8 Cromlin graddnodi ar gyfer hUAG a hAG yn amrywio o 0.8-8 ng/mL.....	161
Ffigur 4.9 Sbectra o ghrelin mewn rhediad 14 munud yn erbyn rhediad 40 munud a ddadansoddwyd gan LC-MS/MS.....	162
Ffigur 4.10 Cymhariaeth o ddefnyddio dŵr a chanrannau gwahanol o asetonitril wrth baratoi sampl ar ardal brig rhywogaethau ghrelin.	164
Ffigur 4.11 Cromlin graddnodi hUAG, hAG, rUAG, a rAG yn amrywio o 0.08-80 ng/mL, wedi ei wanhau gan ddefnyddio asetonitril 20%.....	165
Ffigur 4.12 Cymhariaeth o newid cyfaint y pigiad o 1µL i 2.5µL ar arwynebedd brig rhywogaethau ghrelin yn dilyn dadansoddiad LC-MS/MS.	166
Ffigur 4.13 Cromlin graddnodi rhywogaethau ghrelin gan ddefnyddio cyfaint pigiad o 2.5µL.	167
Ffigur 4.14 40 munud (A a B) yn erbyn 30 munud (C a Ch) rhediad LC-MS/MS....	168

Ffigur 4.15 Cymhariaeth o asid asetig neu asid fformig ar arwynebedd brig rhywogaethau ghrelin $[M+5H]^{5+}$ (20 ng/mL) yn dilyn dadansoddiad LC-MS/MS. ...	169
Ffigur 4.16 Dosbarthiad ïonau cyflwr gwefredig gwahanol ïonau ghrelin ar ôl cynnwys naill ai FA neu AA yn y cyfnod symudol.	170
Ffigur 4.17 Dosbarthiad ïonau cyflyrau gwefredig gwahanol o ghrelin pan gaiff ei ddadansoddi gan LC-MS gan ddefnyddio naill ai FA neu AA yn y cyfnod symudol.	172
Ffigur 4.18 Cymharu gwahanol gyfuniadau o asidau a/neu halwynau yn y cyfnod symudol ar ardaloedd brig y rhywogaeth ghrelin $[M+5H]^{5+}$ (20ng/mL) yn dilyn dadansoddiad LC-MS/MS.	173
Ffigur 4.19 Dosbarthiad gwahanol gyflyrau gwefredig ïonau ghrelin pan gaiff ei ddadansoddi gan LC-MS, yn dilyn defnyddio cyfnod symudol gyda neu heb gynnwys DMSO.	175
Ffigur 4.20 Cymhariaeth o gynnwys DMSO o fewn y cyfnod symudol ar ardaloedd brig y rhywogaeth ghrelin $[M+5H]^{5+}$ (20 a 80ng/mL) yn dilyn dadansoddiad LC-MS/MS.	176
Ffigur 4.21 Enghraifft o halogiad PEG yn ystod dadansoddiad LC-MS/MS o ghrelin (20ng/mL).	176
Ffigur 4.22 Presenoldeb PEG yn ystod dadansoddiad LC-MS/MS o ghrelin (20ng/mL).	177
Ffigur 4.23 Sbectra MS ac MS/MS o yr ïon cyflwr â gwefr $[M+6H]^{6+}$ a $[M+5H]^{5+}$	178
Ffigur 4.24 Cymharu ardaloedd brig ghrelin ar ôl dadansoddi gan ddefnyddio paramedrau LC-MS/MS gan fonitro cyflyrau gwefr ghrelin $[M+6H]^{6+}$ a $[M+5H]^{5+}$ (wedi eu dadansoddi ar 20 ng/mL) (dim cynnwys DMSO).	181
Ffigur 4.25 Dosbarthiad gwahanol gyflyrau gwefr ïonau ghrelin pan gaiff ei ddadansoddi gan LC-MS, yn dilyn defnyddio cyfnod symudol gyda neu heb gynnwys DMSO.	182
Ffigur 4.26 Asesu effaith DMSO ar ardal brig ghrelin (dadansoddwyd ar 20 ng/mL).	182
Ffigur 4.27 Cromlin graddnodi hUAG, hAG, rUAG, a rAG yn amrywio o 0.4-40 ng/mL.	184
Ffigur 4.28 Sbectra MS ac MS/MS o yr cynnyrch dreuliad tryptig ghrelin.	186
Ffigur 4.29 Cymhariaeth o 1:20 neu 1:100 (w/w) o drypsin i ghrelin ar ardaloedd brig ghrelin (cyflwr gwefr $[M+2H]^{2+}$) yn dilyn dadansoddiad LC-MS/MS.	188

Ffigur 4.30 MS cromatogramau a sbectra o samplau asyl ghrelin yn dilyn treuliad gyda trypsin yn awgrymu presenoldeb dadasyl ghrelin yn 8.6 neu 8.7 munud.	189
Ffigur 4.31 Cymhariaeth o peptidau ghrelin wedi eu treulio â trypsin (1:20) wedi ei ddadansoddi ar unwaith neu ar ôl storio am 24 awr ar 4°C.	190
Ffigur 4.32 Cromatogramau MS a sbectra o ghrelin cyfan ar ôl cael eu storio am 24 awr ar 4°C.	191
Ffigur 4.33 Cymhariaeth o yr ardaloedd brig o ghrelin cyfan wedi ei ddadansoddi ar ôl paratoi ar unwaith (amser 0) ac ar ôl 24 awr o storio ar 4°C.	192
Ffigur 4.34 Cromatogramau LC-MS ar gyfer ghrelin dynol a llygoden fawr ar ôl cael eu storio am 24 awr ar 4°C - gyda threuliad trypsin a hebddo.	193
Ffigur 4.35 Dadansoddwyd presenoldeb UAG o fewn samplau AG a gafodd eu trin â thrypsin a hebddynt ar 0 a 24 awr ar ôl storio ar 4°C.	194
Ffigur 4.36 Cymharu yr protocol treuliad trypsin am yn ail; newidiwyd y dull gwreiddiol i gynnwys naill ai cam magu trypsin 1 awr neu ddefnyddio rhewi i ddiffodd yr adwaith.	195
Ffigur 4.37 Cymhariaeth o wahanol gyfeintiau dolen ar yr ardaloedd brig o dadasyl ghrelin tryptig, chwistrellwyd 20ng o ghrelin ar y golofn HPLC yn naill ai 1µL, 10µL, 20 µL (rhannol), neu 20 µL (llawn) cyfaint pigiad cychwynnol.	196
Ffigur 4.38 Cromlin raddnodi hUAG, hAG, rUAG, a rAG yn amrywio o 0.4-40 ng/mL ôl-driniaeth gyda trypsin am 1 awr.	197
Ffigur 4.39 Cromlin graddnodi AG ac UAG dynol, gan ddefnyddio llygoden fawr AG ac UAG fel safonau mewnol, yn dilyn treuliad gyda trypsin.	198
Ffigur 5.1 Sleid arae ffynnon micro BAMS sydd yn cynnwys sleid microsgop wedi ei gorchuddio ag aur ynghlwm wrth gasgedi silicon.	207
Ffigur 5.2 Optimeiddio amodau chwistrellu HDX.	214
Ffigur 5.3 Delweddu yr arae BAMS yn ystod dadansoddiad MALDI-TOF.	215
Ffigur 5.4 Sbectra BAMS o yr cyfeirnod protein.	215
Ffigur 5.5 Canfod ghrelin dynol a llygoden fawr gan ddefnyddio gwrthgorff BAMS 86.	218
Ffigur 5.6 Dadansoddiad MALDI-TOF o gymysgedd hafalaidd o rywogaethau alldarddol ghrelin dynol a llygoden fawr.	219
Ffigur 5.7 Canfod dadasyl ac asyl ghrelin gan ddefnyddio gwrthgorff BAMS 88.	220
Ffigur 5.8 Cromlin safonol o 0.02-10 ng/mL i sefydlu terfynau ar gyfer canfod dadasyl ac asyl ghrelin ddynol gan ddefnyddio naill ai gwrthgorff 86 neu wrthgorff 88.	221

Ffigur 5.9 Asesu terfyn canfod trwy gromlin safonol gyda hUAG yn amrywio o 0.02-10 ng/mL a hAG fel ISTD ar 2.5 ng/mL.	222
Ffigur 5.10 Cymhariaeth o wrthgorff 86 yn erbyn gwrthgorff 88 gan bum rhoddwr gwahanol â phlasma wedi ei 'spigo'.	223
Ffigur 5.11 Sgematig yn dangos tri gleiniau wedi eu gorchuddio â gwrthgyrff ghrelin ar ôl deori mewn plasma rhoddwr yn destun dadansoddiad MADLI-TOF, gan gynhyrchu cymhareb arddwysedd o AG:UAG ar gyfer pob glain.....	224
Ffigur 5.12 Amrywioldeb o fewn profion yn dangos yr atgynrychioldeb rhwng gleiniau wedi eu gorchuddio â gwrthgyrff a ddefnyddir i feintio li felau ghrelin yn yr un sampl plasma wedi ei 'spigo' gan roddwr..	225
Ffigur 5.13 Amrywioldeb o rhwng prawf. Atgynrychioldeb rhwng samplau o yr un plasma rhoddwr wedi ei 'spigo'.....	227
Ffigur 5.14 Cymhariaeth yr %CV cymedrig mewn prawf a yr %CV rhyng prawf ar gyfer pob rhoddwr..	229
Ffigur 5.15 Cymhariaeth o wrthgorff 86 yn erbyn gwrthgorff 86 ar gyfer dadansoddi arddwysedd AG:UAG dynol mewn samplau plasma 'digymysg' gan dri rhoddwr gwahanol.....	230
Ffigur 5.16 Amrywioldeb o fewn profion. Defnyddiwyd atgynhyrchadwyedd rhwng tri glain i fesur li felau ghrelin yn yr un sampl plasma 'digymysg' rhoddwr.....	232
Ffigur 5.17 Amrywioldeb rhwng prawf..	234
Ffigur 5.18 Cymhariaeth o yr %CV cymedrig mewn prawf a yr CV% rhyng prawf ar gyfer pob rhoddwr.	236
Ffigur 5.19 Cymhariaeth amrywioldeb mewn prawf ar draws dulliau ELISA a BAMS	239
Ffigur 5.20 Cymhariaeth amrywioldeb rhyng prawf ar draws dulliau ELISA a BAMS..	240
Ffigur 5.21 Cymhariaeth o %CV mewn prawf ar draws gwahanol lwyfannau canfod (ELISA, BAMS gan ddefnyddio Gwrthgorff 86 a Gwrthgorff 88 ar plasma 'wedi ei spigo') ar gyfer pum rhoddwr unigol.	242
Ffigur 5.22 Cymhariaeth o ganfod ghrelin gan ddefnyddio cyfeintiau plasma cychwynnol gwahanol.	244

Rhestr o Dablau

Tabl 1.1 Dilyniant asid amino ghrelin o fewn gwahanol fertebratau.	30
Tabl 1.2 Tabl Crynodeb: Llwyfannau Sbectrometreg Màs a Ddefnyddiwyd	74
Tabl 2.1 Codau offer a chynnyrch.	77
Tabl 2.2 Adweithyddion a thoddyddion ochr yn ochr â chodau cynnyrch.	78
Tabl 2.3 Cyflenwyr ar gyfer safonau ghrelin	79
Tabl 4.1 Gwerthoedd M/Z ionau cyflwr gwefr ghrelin yn ystod protoneiddiad.	151
Tabl 4.2 Dilyniant peptid a pharamedrau sbectromedr màs sylfaenol.	159
Tabl 4.3 Trawsnewidiadau MRM 8 MS/MS newydd i fonitro rhywogaethau ghrelin llygoden fawr a dynol naill ai gan ganolbwyntio ar ïon cyflwr $[M+5H]^{5+}$ neu $[M+6H]^{6+}$	179
Tabl 4.4 Trawsnewidiadau MRM 4 LC-MS/MS newydd i fonitro rhywogaethau dynol a llygoden fawr ghrelin gan ganolbwyntio ar gyflwr cyhuddedig $[M+2H]^{2+}$ yn dilyn treuliad gan ddefnyddio trypsin.	187
Tabl 6.1 Crynodeb cymharol o yr llwyfannau canfod ghrelin a werthuswyd yn y traethawd ymchwil hwn.	257

Rhestr o Fyrfoddau

A β - beta amyloid.

AEBSF - (4-2-aminoethyl) bensensulfonyl hydroclorid sulfonyl.

AD- clefyd alzheimer's.

AG – asyl ghrelin.

AHN – niwrogenesis hipocampws oedolion.

AMPK - protein cinas actifedig adenosin monoffosffad.

AUC – ardal o dan y gromlin.

BAMS – sbectrometreg màs gyda chymorth gleiniau.

BBB – rhwystr gwaed-ymennydd.

CHCA - asid ciano-4-cinnamighydroxy.

Cl – ïoneiddiad cemegol.

CID - daduniad a achosir gan wrthdrawiad.

CNS – prif system nerfol.

GPCR - derbynnydd cyplydd G-protein..

CR- cyfyngu calorïau.

CSF – hylif cerebrospinol.

Da – daltons.

DC – cerrynt union.

DG – gyrus danheddog.

DI – dŵr wedi ei anioneiddio.

DMSO – deumethyl swlffocsid.

EDTA - asid aprotinin tetra diamin ethylen.

ELISA – prawf immunosorbant sydd yn gysylltiedig ag ensymau.

ER – reticwlwm enodplasmig.

ESI – chwistrell electro wedi eu ioneiddio.

FT – fourier trawsnewid.

GH – hormon twf.

GHS-R1a - derbynydd hormon twf secretagog.

GHRL - rhag cyn peptode ghrelin a obestatin.

GOAT - asyldrosglwyddas Ghrelin '*Ghrelin-O-acyltransferase*'.

HCL – asid hydroclorig.

HLB - cydbwysedd lipoffilig-hydroffilig.

hAG – asyl ghrelin dynol.

hUAG – dadasyl ghrelin dynol.

IP-MS – sbectrometreg mas imiwnedd.

ISTD – safon fewnol.

ITMS – trap ion llinol.

LC-MS - sbectometreg màs cromatograffaeth hylif.

MALDI – dadsugniad/ioneiddiad laser gyda chymorth matrices.

MCI – nam gwybyddol ysgafn.

MS – sbectrometreg mas.

MS/MS – sbectrometreg mas tandem.

M/Z – cymhareb màs i wefr.

NfL - cadwyn golau niwroffilament.

NMR – cyseiniant magnetig niwclear.

PBS - hydoddiant byffer ffosffad halwynog.

PET – tomograffeg allyrru positronau.

PD- clefyd parkinson.

PDD- clefyd dementia parkinson.

pTau – tau ffosfforylaidd.

ROC - nodwedd gweithredu derbynnydd.

rAG – asyl ghrelin llygoden fawr.

RF – amledd radio.

rUAG – dadasyl ghrelin llygoden fawr..

SPE – echdynnu cyfnod solid.

TFA - asid trifluoroacetig.

TOF – amser hedfan.

tTau – cyfanswm tau.

UAG – dadasyl ghrelin.

WT – math gwyllt.

SGZ – ardal is-gronynnol.

88 – gwrthgorff 88.

86 – gwrthgorff 86.

Pennod

1. Rhagymadrodd

1.1 Cyflwyniad i Biofarcwyr o fewn Ymchwil Biofeddygol

1.1.1 Diffiniad a Dosbarthiad

Mae biofarcwyr yn ddangosyddion mesuradwy o gyflyrau neu brosesau biolegol, ac maent yn chwarae rhan ganolog mewn lleoliadau clinigol ac ymchwil. Fe eu defnyddir i ganfod, nodweddu a monitro clefydau, yn ogystal ag arwain a gwerthuso ymyriadau therapiwtig. Gall biofarcwyr fod yn foleciwlaidd, histoleg, radiograffeg, neu ffisiolegol yn eu natur, er bod biofarcwyr moleciwlaidd, yn enwedig proteinau a pheptidau, ymhlith y rhai a astudir fwyaf oherwydd eu hygyrchedd ac eu gwybodaeth benodol i glefyd (Strimbu a Tavel, 2010). Caiff biofarcwyr eu dosbarthu yn fras yn seiliedig ar eu defnyddioldeb clinigol. Mae biofarcwyr diagnostig yn nodi presenoldeb clefyd, gan hwyluso canfod cynnar a chywir. Mae biofarcwyr prognostig yn darparu gwybodaeth am lwybr tebygol y clefyd yn annibynnol ar driniaeth. Mae biofarcwyr rhagfynegol yn rhagweld effeithiolrwydd therapïau penodol, gan gefnogi dewis triniaeth bersonol. Defnyddir biofarcwyr monitro i olrhain cwrs clefyd neu effeithiau therapi dros amser. Mae biofarcwyr ffarmacodynamig yn cynnig cipolwg ar yr ymateb biolegol i asiant therapiwtig. Mae biofarcwyr dirprwyol yn gweithredu fel amnewidion ar gyfer pwyntiau terfyn clinigol, yn enwedig mewn ymchwil a threialon clinigol, lle gall mesurau uniongyrchol o fudd i gleifion, fod yn anymarferol neu yn cymryd llawer o amser (Grŵp Gweithio Biofarcwyr FDA-NIH, 2016).

1.1.2 Pwysigrwydd Cyd-destun Biocemegol: Strwythur Protein, Swyddogaeth, ac Addasiadau Ôl-Trawsfudol

Mae cyd-destun biocemegol yn ddimensiwn hollbwysig wrth ddatblygu biofarcwyr, yn enwedig pan fo proteinau a peptidau yn ffocws. Mae strwythur protein, gan gynnwys ei ddilyniant asid amino cynradd, dynameg plygu, a pharthau rhyngweithio, yn llywodraethu ei rôl fiolegol ac ei botensial fel biofarcwyr. Y tu hwnt i strwythur a helaethrwydd, mae proteinau addasiadau ôl-trawsfudol (PTMau), fel ffosfforyleiddiad, glycosyleiddiad, wbicwtineiddiad (*'ubiquitination'*), a lipideiddiad, yn cyflwyno cymhlethdod a phenodolrwydd biolegol pellach (Mann a Jensen, 2003).

Mae yr addasiadau hyn yn aml yn ddeinamig ac yn benodol i feinwe, gan adlewyrchu cyflwr ffisiolegol neu fiogemegol amser go iawn celloedd ac eu microamgylcheddau. Gall PTMau fodiweiddio sefydlogrwydd, gweithgaredd, lleoliad a rhyngweithiadau protein, gan eu gwneud yn arbennig o berthnasol mewn cyd-destunau clefydau lle

mae llwybrau signalau a phrosesau metabolaidd wedi eu cam reoleiddio (Walsh et al., 2005). Gall lipideiddio peptidau, er enghraifft, effeithio ar rwymo derbynyddion, bio-argaeledd a chlirio metabolaidd. Oedd asyleiddiad ghrelin gan asid octanoig yn yr arddangosiad cyntaf y gallai lipideiddio reoleiddio swyddogaeth hormonau peptid, gan ei wneud yn enghraifft gryf o sut y gall PTMau newid bioweithgarwch a pherthnasedd biofarcwyr (Kojima et al., 1999).

Mae yr maes hwn yn parhau i fod heb ei archwilio yn ddigonol, yn enwedig mewn perthynas â chlefydau dirywiad niwrodirywiol, lle gall newidiadau mewn patrymau PTM gynrychioli dangosyddion cynnar o ffeithiau afiechyd a datblygiad clefydau.

1.1.3 Rôl Biofarcwyr mewn Meddygaeth Fanwl ac Ymchwil i Glefydau Niwrodirywiol

Yn ystod y blynyddoedd diwethaf, mae biofarcwyr wedi dod yn anhepgor i ddatblygiad meddygaeth fanwl, sydd yn anelu at deilwra gofal iechyd yn seiliedig ar broffiliau biolegol unigol. Mae clefydau niwrodirywiol, gan gynnwys clefyd Alzheimer (AD), clefyd Parkinson (PD), a dementia frontotemporal (FTLD), yn arbennig o gymhleth a heterogenaidd, gydag achosegion (*'aetiologies'*) a phatrymau dilyniant amrywiol (De Strooper a Karran, 2016). Fel ganlyniad, mae dulliau diagnostig traddodiadol yn aml yn annigonol, ac mae na angen sylweddol o hyd am fiofarcwyr a all haenu is deipiau clefydau, nodi newidiadau patholegol cynnar, ac arwain strategaethau triniaeth wedi eu personoli. O ystyried pa mor gyffredin yw cyflyrau fel AD a PD a pha mor gymhleth yw yr diagnostig, mae galw cynyddol am fiofarcwyr a all haenu is deipiau, galluogi canfod cynnar, ac eu defnyddio mewn sgrinio ar raddfa fawr gyda lleiafswm o ymledolrwydd (*'invasiveness'*) (Hampel et al., 2018). Byddai biofarcwyr prognostig dementia yn seiliedig ar waed, er enghraifft, yn gwella effeithlonrwydd treialon clinigol a thargedu therapiwtig yn sylweddol trwy gynnig dewis arall, sydd dim yn ymledol, cost-effeithiol, a phosibilrwydd o gynyddu graddfa yn lle niwroddelweddu neu ddadansoddi hylif cerebrospinol (CSF). Mae biofarcwyr hefyd yn rhoi cipolwg ar ffactorau systemig sydd yn dylanwadu ar iechyd yr ymennydd, gan gynnwys cam reoleiddio metabolig, signalau hormonaidd, ac ymatebion llidiol. Yn y cyd-destun hwn, mae hormonau peptid â phriodweddau niwroactif, fel ghrelin, wedi dod i yr amlwg fel ymgeiswyr addawol ar gyfer datblygu biofarcwyr, yn enwedig o ystyried eu rolau deuel mewn swyddogaeth y system nerfol ganolog a metaboledd perifferol.

1.1.4 Gofynion ar gyfer Biofarcwyr Hyfyw

Er mwyn i fiofarcwyr gael ei ystyried yn ddefnyddiol yn glinigol, rhaid iddo fodloni sawl maen prawf llym. Mae penodolrwydd yn hanfodol, gan sicrhau bod y biofarcwyr yn gwahaniaethu yn ddibynadwy rhwng iechyd a chlefyd, neu rhwng gwahanol gyflyrau clefyd. Mae sensitifrwydd yr un mor bwysig, gan ganiatáu canfod newidiadau patholegol cynnil neu gynnar nad ydynt efallai yn amlwg yn glinigol eto. Mae yr nodweddion hyn yn arbennig o hanfodol mewn clefydau niwrodirywiol, lle gall ymyrraeth gynnar newid llwybrau clefydau (Frank a Hargreaves, 2003). Yn ogystal â pherfformiad diagnostig, rhaid i fiofarcwyr hyfyw ddangos perthnasedd biolegol, sydd yn golygu y dylai fod wedi ei gysylltu yn swyddogaethol neu yn fecanyddol â phroses y clefyd. Mae yr perthnasedd hwn nid yn unig yn gwella ei ddilysrwydd ond hefyd yn cynyddu yr tebygolrwydd o ymddygiad cyson ar draws carfanau cleifion. Yn olaf, mae hyfywedd technegol yn hollbwysig. Dylai yr biofarcwyr fod yn hygyrch mewn samplau y gellir eu cael yn glinigol, fel gwaed neu CSF, a dylai fod yn fesuradwy trwy dechnegau dadansoddol dibynadwy, posibilrwydd o gynyddu graddfa, a chost-effeithiol (Mayeux, 2004).

Mae datblygu biofarcwyr yn cael ei gymhlethu ymhellach gan gymhlethdod ffiseogemegol gwaed, sydd yn cynnwys proteinau, lipidau, ac gwrthgyrff ymyrrol a all ddiraddio neu guddio dadansoddydd targed, yn enwedig pan fyddant yn bresennol mewn nifer isel. Er enghraifft, gall gwrthgyrff heteroffilig mewn gwaed gynhyrchu canlyniadau camarweiniol, a gall diraddio proteolytig biofarcwyr nifer isel amharu ar feintioli (Hampel et al., 2018). Mae yr ffactorau hyn yn golygu bod angen defnyddio llwyfannau dadansoddol uwch, fel sbectrometreg màs, a all wella penodolrwydd, lleihau ymyrraeth, a gwella canfod peptidau wedi eu haddasu ar ôl cyfieithu (Domon ac Aebersold, 2006).

Mae yr egwyddorion sylfaenol hyn yn darparu fframwaith ar gyfer gwerthuso biofarcwyr posibl. Yn yr adrannau canlynol, bydd y drafodaeth yn canolbwyntio ar y peptid niwroendocrin ghrelin, ei amrywiaeth strwythurol, lipideiddio ôl-trawsfudol, a yr heriau sydd yn gysylltiedig â datblygu isoformau ghrelin yn fiofarcwyr sydd yn ddefnyddiol yn glinigol ar gyfer clefyd niwrodirywiol.

1.2 Tirwedd Clefydau Niwrodirywiol

Mae clefydau niwrodirywiol yn grŵp amrywiol o gyflyrau blaengar a llethol a nodweddir gan ddirywiad graddol strwythur a swyddogaeth niwronau. Ymhlith y rhai mwyaf cyffredin mae AD, PD, FTLD, a sglerosis ochrol amyotroffig (ALS). Yr anhwylderau hyn yw prif achosion dementia yn fyd-eang, gydag AD yn unig yn cyfrif am oddeutu 60 i 70 y cant o achosion (Sefydliad Iechyd y Byd [WHO], 2021).

Er gwaethaf y gwahaniaethau yn eu cyflwyniad clinigol, mae gan celfyddydau niwrodirywiol mwyaf, nifer o nodweddion patholegol, gan gynnwys colled synaptig, camblygu a chydgrynhoi proteinau, camweithrediad mitocondriaidd, a niwro-llid cronig. Er enghraifft, nodweddir AD gan blaciau amyloid-beta ($A\beta$) allgellog a thangliadau niwroffibrilaidd mewngellol sydd yn cynnwys tau hyperffosfforyleiddiedig. Nodweddir PD gan ddirywiad niwronau dopaminergig yn y '*substantia nigra*' a phresenoldeb cyrff Lewy, sydd yn cynnwys ' α -synuclein' yn bennaf. Mae yr proteinau agregedig hyn yn tarfu ar homeostasis cellog, tra bod celloedd glial wedi eu actifadu yn parhau â rhaeadr llidiol sydd yn gwaethygu difrod niwronaidd (Heneka, Golenbock, a Latz, 2015).

Yn yr ymennydd iach, cynhelir cynnal niwronau trwy gydbwysedd deinamig rhwng niwrogenesis a niwrodirywiol. Mae yr cydbwysedd hwn yn cefnogi plastigrwydd synaptig a swyddogaeth wybyddol, yn enwedig mewn rhanbarthau o yr ymennydd fel yr hipocampws a yr cortecs, sydd ymhlith y rhai yr effeithir arnynt gyntaf mewn AD a dementia eraill. Mae methiant o fewn cydbwysedd hwn yn gysylltiedig â straen ocsideiddiol, proteostasis amhariad, cefnogaeth niwrotroffig lai, a chamweithrediad mitocondriaidd (Mattson ac Arumugam, 2018). Mae sawl llwybr moleciwlaidd yn sail i gwytnwch niwronau, gan gynnwys signalau niwrotroffig, rheoli ansawdd mitocondriaidd, a systemau diraddio protein fel y llwybrau wibicwtin-proteasom ac awtoffagiaeth-lysosom.

Yn ddiweddar, mae mwy o sylw wedi ei roi i rôl bioleg lipidau ac asyleiddiad protein wrth gynnal homeostasis niwral. Mae yr ymennydd yn organ sydd yn llawn lipidau, gyda dros 50 y cant o ei bwysau sych yn cynnwys lipidau fel glyseroffosfolipidau, sffingolipidau, a cholesterol. Mae yr moleciwlau hyn yn hanfodol i gyfanrwydd pilenni cellog ac maent hefyd yn rheoleiddwyr allweddol metaboledd ynni, trosglwyddiad synaptig, a signalau mewngellol. Mae aflonyddwch mewn metaboledd lipidau, yn enwedig o fewn catabolaeth lysosomaidd sffingolipidau a glycosffingolipidau, wedi ei

gysylltu â datblygiad clefydau niwrodirywiol (Wei, Wong, a Boland, 2024). Er enghraifft, mewn FTD a PD, mae diffygion mewn ensymau fel glwcoserebrosidase yn arwain at gronni canolradd lipidau fel glwcosylsffingosin (GlcSph) a gangliosidau (Boer, van Smeden, Bouwstra, ac Aerts, 2020). Mae yr croniadau lipid hyn yn cyfrannu at gamweithrediad lysosomaidd, actifadu llidiol, a cholli niwronau cynyddol. Ochr yn ochr â hyn, mae asyleiddiad protein wedi dod i yr amlwg fel addasiad ôl-trawsfudol hollbwysig gydag effeithiau eang yn y system nerfol. Mae asyleiddiad yn cynnwys atodiad cofalent cadwyni asid brasterog, gan gynnwys grwpiau mwristoyl, palmitoyl, neu octanoyl, i broteinau. Mae yr broses hon yn rheoleiddio lleoleiddiad protein, cludo, cysylltiad â philen, a sefydlogrwydd. Un enghraifft nodedig yw asyleiddiad ghrelin, hormon peptid y mae yn rhaid ei octanoyleiddio i rwymo i yw dderbynnnydd ac arfer swyddogaethau niwroamddiffynnol. Mae yr rhain yn cynnwys effeithiau gwrthlidiol, gwrth-apoptotig, a metabolaidd (Young & Jialal, 2023). Mae bioweithgarwch proteinau wedi ei asyleiddio fel ghrelin yn tanlinellu yr rhyngweithiad cymhleth rhwng metaboledd lipid a signalau protein yn yr ymennydd. Mae aflonyddwch mewn asyleiddiad protein wedi cael ei gysylltu fwy â mecanweithiau niwrodirywiol. Er enghraifft, gall nam ar balmityleiddio proteinau synaptig effeithio ar eu cludo ac eu sefydlogrwydd, gan gyfrannu at y diffygion synaptig a welir yn gyffredin mewn modelau AD (Peng, Liang, a Zhang, 2024). Ar ben hynny, mae asyleiddiad yn dylanwadu ar ryngweithiadau â rafftiaid lipid, sef parthau pilen arbenigol sydd yn ymwneud â thrawsgludo signalau (Yurtsever a Lorent, 2020). Felly, gall camreoleiddio lipidau effeithio yn anuniongyrchol ar swyddogaeth protein trwy newid cyfansoddiad a dynameg y bilen.

Gyda ei gilydd, mae metaboledd lipid ac asyleiddiad protein yn hanfodol i reoleiddio yr cydbwysedd rhwng niwrogenesis a niwroddirywiad. Gall aflonyddwch lipid arwain at ansefydlogrwydd a llid y bilen, tra gall patrymau asyleiddio wedi eu newid amharu ar signalau cellog a throsiant protein. Mae deall y groesffordd rhwng y prosesau hyn yn hanfodol ar gyfer datblygu ein dealltwriaeth o fecanweithiau clefydau niwrodirywiol. O safbwynt clinigol, mae diagnosio clefydau niwrodirywiol yn parhau i fod yn heriol oherwydd diffyg biofarcwyr cynnar a phenodol. Yn aml, mae symptomau yn amhenodol ac yn gorgyffwrdd, a gall colled niwronau sylweddol ddigwydd cyn cyflwyniad clinigol. Er enghraifft, mae tua 25 y cant o oedolion 75 oed a hŷn yn profi AD a dementia fasgwlaidd ar yr un pryd (Ossenkoppele et al., 2015). Mae hyn wedi

arwain at ddiddordeb cynyddol mewn darganfod biofarcwyr ar draws CSF, niwroddelweddu, a phroffilio moleciwlaidd. Mae biofarcwyr sydd yn seiliedig ar waed, yn benodol, wedi derbyn sylw sylweddol oherwydd eu natur leiaf ymledol, eu cost isel, ac eu hyfywedd ar gyfer sgrinio ar raddfa fawr. Yn wahanol i samplu CSF, mae casglu gwaed yn fwy ymarferol mewn lleoliadau ymchwil a chlinigol ac yn cynnig potensial mwy ar gyfer monitro hydredol ar draws poblogaethau amrywiol (Hampel et al., 2018). I grynhoi, mae clefydau niwrodirywiol yn deillio o aflonyddwch aml-ffactor mewn homeostasis cellog a moleciwlaidd. Mae cydgyfeirio metaboledd lipid, addasu protein, a phrosesau niwro-llidiol yn adlewyrchu patholeg gymhleth yr anhwylderau hyn. Gall ymchwilio i rolau proteinau â asyl moiety a rhyngweithiadau lipid-protein, yn enwedig yng nghyd-destun hormonau peptid fel ghrelin, gynhyrchu mewnwleidiadau newydd a chynnig llwybrau newydd ar gyfer diagnosis cynnar ac ymyrraeth therapiwtig.

1.3 Ffactorau Systemig sydd yn Dylanwadu ar Niwroddirywiad

Mae ffactorau ffisiolegol systemig, yn enwedig y rhai sydd yn gysylltiedig â metaboledd, cydbwysedd ynni, a signalau endocrin, yn modiwlleiddio yn gryf ba mor agored yw yr ymennydd i glefydau niwrodirywiol. Mae patrymau dietegol, cymeriant calorïau, ac iechyd metabolig yn dylanwadu ar blastigrwydd niwronau, swyddogaeth mitochondriaidd, a niwro-llid, sydd i gyd yn cyfrannu at ddatblygiad clefydau (Gomez-Pinilla, 2008). Mae hormonau perifferol fel inswlin, leptin, estrogenau, a glwcocorticoidau yn rheoleiddio niwrogenesis, gweithgaredd synaptig, a gwybyddiaeth; mae aflonyddwch yn eu signalau (er enghraifft, mewn gordewdra neu straen cronig) yn amharu ar blastigrwydd hipocampwl ac yn cynyddu yr risg niwrodirywiol (Arnold et al., 2018).

Mae maes sydd yn tyfu yn gyflym yn tynnu sylw at hormonau sydd yn deillio o yr coludd, yn enwedig ghrelin, fel cyfryngwyr allweddol cyfathrebiad rhwng y coludd a yr ymennydd. Mae ghrelin, a syntheseiddir yn bennaf gan gelloedd P/D1 yr stumog ddynol a chan eu cymheiriaid swyddogaethol, celloedd tebyg i X/A, mewn cnofilod, yn ysgogi archwaeth trwy yr derbynnydd hormon twf secretagog-1a (GHS-R1a) ac mae hefyd yn modiwlleiddio niwrogenesis, plastigrwydd synaptig, a goroesiad niwronau (Andrews et al., 2009; Bayliss et al., 2016). Mae yr gweithgaredd hwn yn dibynnu ar octanoyleiddiad penodol yn serin-3 gan ghrelin O-asylltransferas (GOAT), sydd yn hanfodol ar gyfer rhwymo derbynyddion (Kojima et al., 1999; Yang et al., 2008). Mewn PDD, mae AG:UAG is yn cydberthyn â niwrogenesis hipocampwl oedolion amhariad

a dirywiad gwybyddol (Hornsby et al., 2020; Song et al., 2017). O ystyried cludiant dwyffordd ghrelin ar draws y rhwystr gwaed-ymennydd a yr potensial ar gyfer ail asyleiddiad lleol (Banks et al., 2002; Murtuza ac Isokawa, 2018), mae yn enghraifft o sut y gall signalau metabolaidd systemig ddylanwadu ar wydwnch y system nerfol ganolog (CNS).

Gyda ei gilydd, mae yr canfyddiadau hyn yn tanlinellu effaith ffactorau metabolaidd a hormonaidd systemig ar niwroddirywiad ac yn darparu rhesymeg dros ymchwilio i peptidau â asyl moiety fel ghrelin fel biofarcwyr mecanistig, sydd yn seiliedig ar y gwaed.

1.3.1 Echelin y Coluddyn-Ymennydd mewn Niwroddirywiad

Mae echelin y coluddyn-ymennydd yn cynnwys rhwydwaith cyfathrebu aml haenog rhwng y llwybr gastroberfeddol (GI) a yr CNS, gan integreiddio signalau niwral, endocrin, imiwnedd, a microbaidd (Carabotti et al., 2015). Mae ffibrau afferol y nerf fagws yn trosglwyddo gwybodaeth am gynnwys luminal y coluddyn, cyfanrwydd y rhwystr, a statws llidiol yn uniongyrchol i niwclysau coesyn yr ymennydd (*'brainstem'*), tra bod allbwn fagws efferol yn modiweiddio symudedd y coluddyn a swyddogaeth imiwnedd. Mae celloedd enteroendocrin yn yr epitheliwm yn secretu hormonau (er enghraifft, *'colecystokinin'*, GLP-1) sydd yn hysbysu yr CNS am argaeledd maetholion (Gribble a Reimann, 2019).

Mae metabolion microbaidd, yn enwedig asidau brasterog cadwyn fer (SCFA), yn dylanwadu ar actifadu microglial ac uniondeb y rhwystr gwaed-ymennydd (BBB). Mae dysbiosis a threiddiant berfeddol cynyddol (*'gudd yn gollwng'* / *'leaky gut'*) yn caniatáu trawsleoliad lipopolysacarid (LPS), gan ysgogi llid systemig sydd yn gwaethygu niwro-llid (Sampson et al., 2016; Rieder et al., 2017). Yn PD, gall camblygu *'α-synuclein'* o fewn niwronau enterig ledaenu yn ôl-raddol trwy lwybrau fagws i yr niwclews modur dorsal, gan awgrymu y gall patholeg sydd yn tarddu o yr perfedd gychwyn neu fwyhau dirywiad canolog (Braak et al., 2003; Klingelhoefer a Reichmann, 2017). Felly, mae cynnal swyddogaeth rhwystr y perfedd, homeostasis microbaidd, a signalau imiwnedd rheoledig yn ffactorau systemig hanfodol sydd yn llunio llwybrau niwroddirywiol.

1.3.2 Ghrelin wrth Groestoriad Echelin y Coluddyn a yr Ymennydd ac Ymchwil Biofarcwyr

Mae ghrelin yn cynrychioli echelin y coluddyn-ymennydd, gan gael ei ryddhau o gelloedd tebyg i X/A gastrig mewn ymateb i ymprydio ac yn gweithredu trwy lwybrau endocrin a niwral. Ar ôl secretiad, mae asyl ghrelin yn rhwymo i GHS-R1a ar afferol fagws, gan drosglwyddo newyn a statws metabolig i yr niwclews anghyfannedd tractws (*'nucleus tractus solitarius'*) a yr hypothalmws (Date et al., 2002). Mae asyl ghrelin sydd yn cylchredeg hefyd yn croesi yr BBB trwy gludwr dirlawn (Banks et al., 2002), gan alluogi effeithiau canolog uniongyrchol ar niwronau hipocampwl a nigral. O fewn y CNS, mae asyl ghrelin yn ymgysylltu â GHS-R1a i actifadu rhaeadrau mewngellol, ffosfolipas C (PLC), protein cinas C (PKC), a protein cinas wedi ei actifadu gan cinas protein actifedig adenosin monoffosffad (*'AMP-activated protein kinase'* (AMPK)), sydd yn hyrwyddo biogenesis mitocondriaidd, awtoffagi, a signalau gwrthlidiol (Andrews et al., 2009; Bayliss et al., 2016). Mae yr mecanweithiau hyn yn gwrthweithio straen ocsideiddiol ac yn cefnogi plastigrwydd synaptig, a thrwy hynny yn cryfhau gwydnwch gwybyddol. Gall dadasyl ghrelin, sydd yn methu ag ymgysylltu â GHS-R1a, fodiweiddio yr llwybrau hyn yn anuniongyrchol, efallai trwy rwyddo derbynnydd sydd heb ei adnabod eto neu drwy ymyrraeth gystadleuol ar lefel y bilen (Inhoff et al., 2008; Fernandez et al., 2016).

Mewn PDD, mae camweithrediad gastroberfeddol yn aml yn rhagflaenu dirywiad gwybyddol, ac mae gostyngiadau yn AG:UAG yn cydberthyn â niwrogenesis hipocampwl oedolion amhariad a diffygion cof (Hornsby et al., 2020; Song et al., 2017). Gan fod ghrelin yn integreiddio signalau hormonaidd sydd yn deillio o yr perfedd â llwybrau niwroamddiffynnol canolog, gall ei lefelau isoform plasma adlewyrchu iechyd y perfedd a chyfanrwydd y system nerfol ganolog yn unigryw. O ganlyniad, mae rôl ddeuol ghrelin yn echelin y perfedd-ymennydd yn ategu ei addewid fel biofarcwyr systemig ar gyfer canfod a monitro clefydau niwrodirywiol yn gynnar.

1.4 Bioleg Ghrelin ac Amrywiaeth Strwythurol

1.4.1 Cefndir o Ghrelin

Darganfyddwyf ghrelin yn gyntaf yn 1999, fel y ligand mewndarddol ar gyfer GHS-R1a (Kojima et al., 1999). Ar yr un pryd, datgelwyd mecanwaith moleciwlaidd gweithredol ghrelin. Roedd gweithgaredd ghrelin yn dibynnu ar gam ôl-drosiadol pwysig, lle mae ghrelin yn cael ei asyleiddio (sef ei gysylltu ag asid brasterog) ar ei drydydd asid amino, sef serin, gan gynhyrchu asyl ghrelin. Mae yr cam asyleiddio hwn yn hanfodol ar gyfer gweithgaredd rhyddhau hormon twf (GH), sydd yn deillio o rwymiad asyl ghrelin i yw dderbynnnydd cytras (*'cognate receptor'*), GHS-R1a (Kojima et al., 1999). Mae pwysigrwydd addasiad ôl-drosiadol ghrelin yn cael ei ddangos gan bresenoldeb parhaus serin 3 trwy gydol esblygiad mewn fertebratau (Tabl 1.1). (Kojima a Kangawa, 2005).

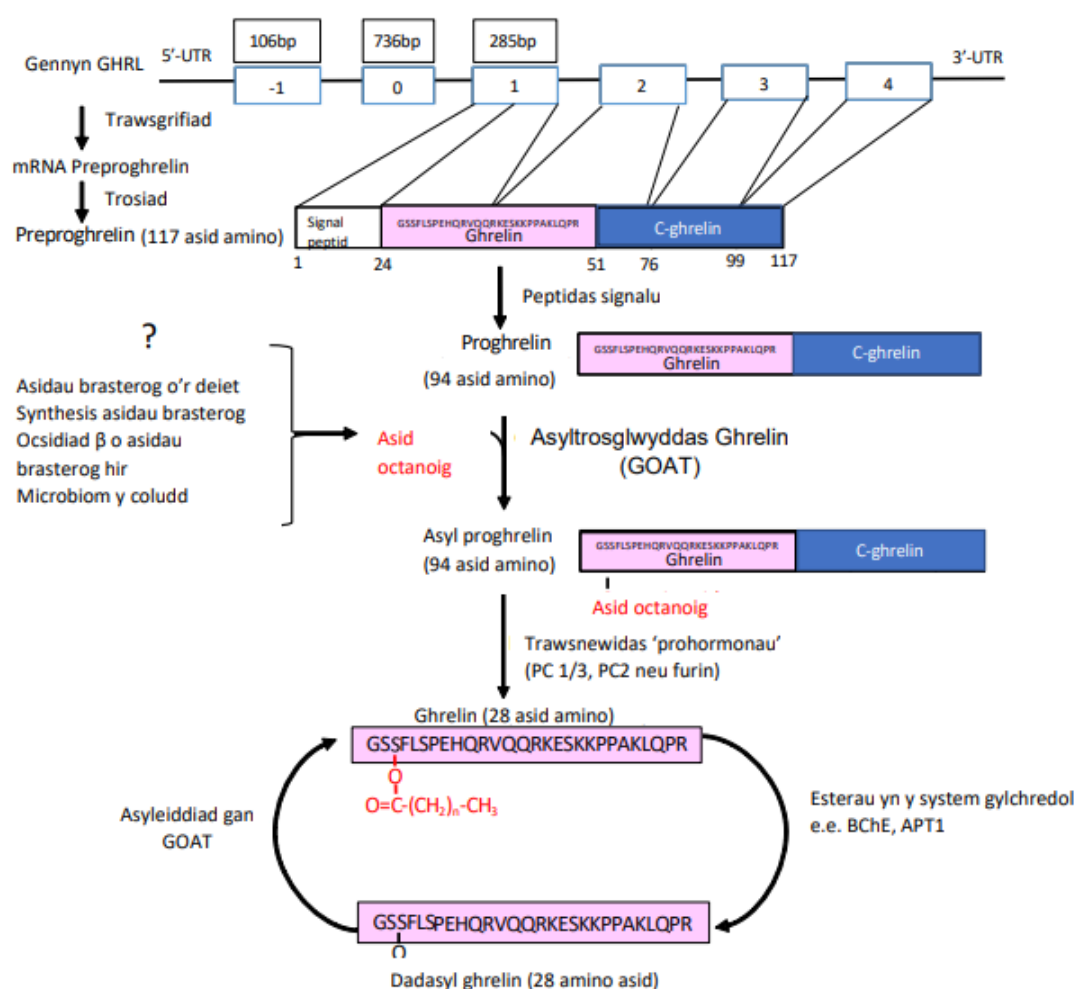
Mamolaidd	1 *	10	20	28
Dynol	GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR			
Llygoden/ llygoden mawr	GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR			
Cŵn	GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR			
Mwnci rhesws	GSSFLSPEHQRAQQRKESKKPPAKLQPR			
Buchol	GSSFLSPEHQKLQ - RKEAKKPSGRLKPR			
Defaid	GSSFLSPEHQKLQ - RKEPKKPSGRLKPR			
Adarol	1 *	10	20	26
Cyw iâr	GSSFLSPTYKNIQQQKDTRKPTARLH			
Twrci	GSSFLSPAYKNIQQQKDTRKPTARLHPR			
Gŵydd	GSSFLSPEFKKIQQQNDPAKATAKIH			
Pysgod	1 *	10	20	23
Brithyll enfys	GSSFLSPSQKPQVROGKGK-PPRV-amide			
Pysgoden aur	GTSFLSPAQKPQ—GRRPPRM-amide			
Pysgoden rhesog	GTSFLSPTQKPQ—GRRPPRV-amide			

Tabl 1.1 Dilyniant asid amino ghrelin o fewn gwahanol fertebratau.

Mae mwntaniad serin³ yn atal asyleiddiad ghrelin gan asyldrosglwyddas ghrelin ('*Ghrelin-O-acyltransferase*', GOAT) (Yang et al., 2008), oni bai bod yr amnewidiad ar gyfer threonin (Darling et al., 2015). Mae hyn yn gyson â yr ffaith bod threonin yn bresennol yn y safle hon o ghrelin mewn rywogaeth amgen, sef y marchlyffant ('*Bullfrog*') (Kaiya et al., 2001). Mae strwythur threonin yn wahanol i serin oherwydd bod ganddo grŵp methyl yn lle hydrogen ar y carbon β . Mae cyfnewid rhwng threonin a serin wedi ei adrodd ers tro, gyda Wan a Millner-White (1999), yn adrodd y gall dau fotiff bond hydrogen ymgorffori naill ai threonin neu weddillion serin yn y derfynell N alffa-heligol. Ar ben hynny, adroddwyd nad yw disodli serin am threonin mewn proteasomau archeaidd, *asidoffylum plasmathermo* (mwntan T1S), yn newid cyfradd hydrolysis y proteasom (Seemiller, Lupas, Stock, Lowe, Huber a Baumesiter 1995). Roedd asyleiddiad ghrelin gan asid brasterog, (yr asid octanoig gan amlaf), yr enghraifft gyntaf o swyddogaeth peptid yn newid wedi yr math hwn o addasiad ôl-drosiadol. Fodd bynnag, nid yw ghrelin bellach yn unigryw o ran cael ei addasu yn y modd hwn. Er enghraifft, mae proteinau Wnt (Willert et al., 2003; Takada et al., 2006; Coombs et al., 2010; Herr a Basler 2011; Janda et al., 2012; Nile a Hannoush 2016), proteinau draenog (Chamoun et al., 2001; Chen et al., 2004) ac antigenau histogydnawsedd (Schultz et al., 2018) hefyd yn gallu cael eu hasyleiddio gan asidau brasterog gwahanol, ac adroddir bod yr addasiad yn newid eu galluoedd signalau. Fodd bynnag, mae ghrelin yn unigryw o ran y mathau ac ystod yr asidau brasterog a all rhwymo iddo (Hosoda et al., 2003; Gutierrez et al., 2008). Gyda ei gilydd, mae yr astudiaethau hyn yn awgrymu bod yna maes ymchwil cyffrous sydd heb ei archwilio yn ddigonol o ran effaith addasiad ôl-drosiadol asyl ar swyddogaeth protein neu beptid.

1.4.2 Ffurfiad Ghrelin

Mae yr gennyn ghrelin (GHRL) wedi ei leoli ar gromosom dynol 3p25–26 ac mae yn cynnwys pum ecson (Khatib, 2014). Mae ei RNA negesydd (mRNA) yn amgodio peptid preproghrelin 117-amino-asid, sydd yn cael ei hollti yn proteolytig i gynhyrchu canolradd proghrelin 94-amino-asid. Caiff hyn ei brosesu ymhellach, yn bennaf gan y trawsnewidas prohormonau 1/3, i gynhyrchu yr peptid ghrelin aeddfed 28 amino asid (Gahete et al., 2010; Villarreal et al., 2022) (Ffigur 1.1).



Ffigur 1.1 Ffurfiad ghrelin aeddfed.

Mae yr peptid preproghrelin (117 asid amino) yn cael ei ffurfio gan gyfres o gamau trawsgrifio a trosi, ac yna holltiad proteolytig, gan arwain at cynhyrchiad y peptid proghrelin (94 asid amino). Gall proghrelin a ghrelin aeddfed gael eu hasyleiddio gan asyldrosoglwyddas ghrelin (GOAT) a gall cael gael ei dadasyleiddio gan ystod o esterau cylchredol (Ffigur a gymerwyd gyda chaniatâd Thomas, A.S et al., 2022).

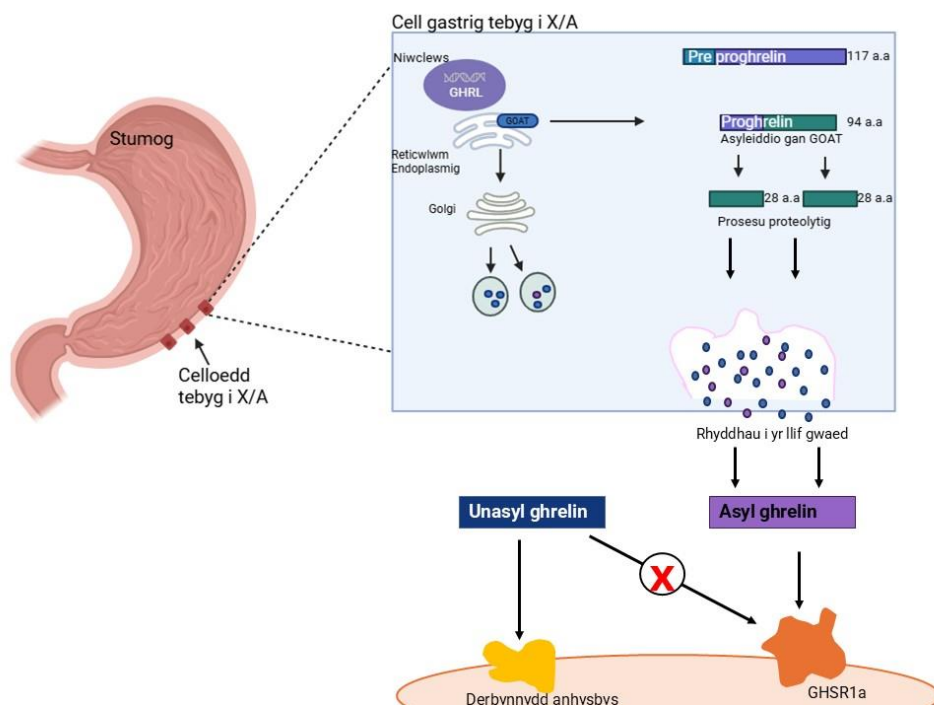
Yn y prosesu hwn, cyflwynir addasiad ôl-trawsfudol unigryw: mae ester asid brasterog octanoyl (C8:0) ynghlwm wrth y serin yn safle 3 o ghrelin (Khatib, 2014; Thomas et

al., 2022). Mae yr cam asyleiddio hwn, wedi ei gatalyddu gan ghrelin GOAT, yn hanfodol ar gyfer gallu yr peptid i rwymo ac actifadu GHS-R1a.

Mae GOAT, wedi ei amgodio gan y gennyn MBOAT4 ac wedi ei adnabod yn 2008, yn ensym sydd yn rhwymo i bilen gydag 11 parth trawsbilen a dau weddillion catalytig allweddol (Asn307 a His338) (Gahete et al., 2010). Mae wedi ei fynegi yn fawr yn y mwcosa gastrig, gan adlewyrchu dosbarthiad celloedd sydd yn mynegi ghrelin, ond mae hefyd yn ganfyddadwy yn yr hypothalmws, y chwarren bitwidol, a yr hipocampws (Villarreal et al., 2022). Mae GOAT yn asyleiddio Ser3 o ghrelin yn ddetholus ac yn defnyddio asidau brasterog cadwyn ganolig yn ddelfrydol, yn enwedig octanoyl-CoA (Gahete et al., 2010; Nishi et al., 2011). Mae cymeriant dietegol o driglyseridau cadwyn ganolig (MCT), yn enwedig y rhai sydd yn cynnwys C8:0, yn cynyddu lefelau octanoyl-ghrelin sydd yn cylchredeg yn sylweddol.

Fodd bynnag, nid yw cynhyrchu asyl ghrelin yn dibynnu yn llwyr ar lipidau dietegol. Hyd yn oed yn absenoldeb brasterau dietegol, mae celloedd sydd yn cynhyrchu ghrelin yn cynnal synthesis asyl ghrelin trwy β -ocsidiad mitocondriaidd asidau brasterog cadwyn hir (Sakata et al., 2018). Mae atal y broses hon gydag '*etomoxir*' yn lleihau cynhyrchiad asyl ghrelin, diffygiad sydd yn cael ei wrthdroi gan atchwanegiadau octanoad alldarddol. Mewn cyferbyniad, nid yw asidau brasterog cadwyn fer o ficrobiota yr perfedd, fel asedad neu butyrad, yn cyfrannu at asyleiddio ghrelin, ac nid yw modelau di-germau yn dangos unrhyw newid yn lefelau asyl ghrelin (Sakata et al., 2018).

Mae ghrelin yn cael ei syntheseiddio yn bennaf gan gelloedd endocrin ym mwcosa ocsyntig y stumog, yn benodol gan gelloedd P/D1 mewn bodau dynol a chelloedd tebyg i X/A mewn cnofilod, wedi ei lleoli yn bennaf yn y ffwndws gastrig (Ffigur 1.2) (Khatib, 2014; Thomas et al., 2022). Mae yr celloedd math caeedig hyn yn rhyddhau ghrelin i yr llif gwaed, gan hwyluso signalau endocrin systemig. Er bod ghrelin hefyd yn cael ei gynhyrchu yn y pancreas, y coluddyn, y galon a yr ymennydd, y stumog yw prif ffynhonnell ghrelin sydd yn cylchredeg (Khatib, 2014; Villarreal et al., 2022). Mae mwyafrif y ghrelin plasma yn bodoli yn ei ffurf dadasyl ghrelin, tra bod asyl ghrelin yn cylchredeg ar grynodiadau is.



Ffigur 1.2 Celloedd sydd yn cynhyrchu ghrelin yn y stomog ddynol.

Mae ghrelin yn cael ei syntheseiddio yn bennaf gan gelloedd endocrin P/D1 sydd wedi eu lleoli ym mwcasa ocsyntig y ffwndws gastrig. Mae yr celloedd math caeedig hyn yn rhyddhau ghrelin i yr cylchrediad, gan alluogi signalau endocrin systemig. Er bod ghrelin hefyd yn cael ei fynegi yn y pancreas, y coluddyn, y galon a yr ymennydd, y stomog yw prif ffynhonnell ghrelin sydd yn cylchredeg. Mewn plasma, dadasyl ghrelin yw yr prif isoform, gydag asyl ghrelin yn bresennol mewn crynodiadau is (Khatib, 2014; Thomas et al., 2022; Villarreal et al., 2022).

Yn yr ymennydd, mae ghrelin yn gweithredu trwy GHS-R1a, derbynnydd sydd yn gysylltiedig â phrotein-G a fynegir yn bennaf yn yr hypothalmws (er enghraifft, niwclews bwaog), hipocampws, a rhanbarthau eraill sydd yn gysylltiedig â metaboedd a gwybyddiaeth (Chen et al., 2016; Khatib, 2014). Dim ond y ffurf asyl sydd yn rhwymo â affinedd uchel ac yn actifadu yr derbynnydd hwn. Er ei fod yn fwy niferus ac yn gallu croesi yr BBB yn haws, nid yw dadasyl ghrelin yn rhwymo GHS-R1a (Rhea et al., 2018). Serch hynny, gall dadasyl ghrelin gael effeithiau annibynnol ar GHS-R1a ar yr ymennydd.

Mae cludo ghrelin ar draws y BBB yn digwydd trwy fecanweithiau a gyfryngir gan gludwyr ac nid oes angen GHS-R1a arno (Rhea et al., 2018). Mae asyl ghrelin yn cael ei amsugno i ranbarthau penodol, fel y bylbiau arogleuol, yr hypothalmws, a yr hipocampws. Ardaloedd sydd yn gysylltiedig ag archwaeth, dysgu, a ymddygiadau

gwobrwyo. Mae hyn yn tynnu sylw at bwysigrwydd asyleiddiad ghrelin wrth hwyluso signalau yr system nerfol ganolog.

Ar ôl ei secretu, mae asyl ghrelin yn cael ei dadasyleiddio yn gyflym yn y cylchrediad, gan addasu ei fioweithgarwch. Mae bwtylcolinesteras (BChE) yn hydrolysu yr grŵp octanoyl, gan wneud ghrelin yn anactif (Chen et al., 2016). Mae gor-fynegiant BChE yn gostwng lefelau asyl ghrelin sydd yn cylchredeg yn sylweddol. Mae thioesterase protein-asil 1 (APT1), a ysgarthir gan gelloedd imiwnedd yn ystod llid, hefyd yn cyfrannu at ddadasyleiddio ghrelin ac yn egluro ymhellach pam mae dadasyl ghrelin yn goruchaf yn y cylchrediad (Satou et al., 2010).

Mae gweithgaredd GOAT ac asyleiddiad ghrelin yn cael eu rheoleiddio yn dynn gan arwyddion metabolaidd, maethol a hormonaidd. Mae ymptydio yn cynyddu mynegiant ghrelin plasma a GOAT, tra bod bwydo yn gwrthdroi yr effaith hon (Gahete et al., 2010). Mae hormonau fel inswlin a somatostatin yn lleihau GOAT, tra bod leptin a ghrelin eu hunain yn gwella ei fynegiant. Mewn gordewdra, mae lefelau ghrelin fel arfer yn cael eu lleihau, er y gall mynegiant GOAT aros yn uchel, o bosibl fel mecanwaith iawndal (Gahete et al., 2010). Mae GOAT hefyd yn sensitif i gyfansoddiad braster dietegol, gyda chymeriant MCT yn cynyddu ei fynegiant ac amddifadedd MCFA yn ei leihau (Nishi et al., 2011). Mae ysgogiadau llidiol fel lipopolysacarid (LPS) hefyd yn modiwlleiddio GOAT yn anuniongyrchol trwy ysgogi mynegiant APT1 (Satou et al., 2010).

Yn olaf, mae yr rhagflaenydd proghrelin hefyd yn arwain at obestatin, peptid 23-amino asid sydd yn deillio o ei ranbarth C-derfynol (Cowan et al., 2016). Mae angen amidiad ('amidation') C-derfynol ar obestatin ac fe ei cynigiwyd yn wreiddiol i wrthweithio effeithiau orecsigenig ghrelin, er bod ei berthnasedd ffisiolegol yn parhau i fod yn ddadleuol. Mae ei gynhyrchiad yn cynrychioli llwybr ôl-trawsfudol cyfochrog sydd yn lleihau argaeledd proghrelin ar gyfer synthesis ghrelin, gan addasu yr cydbwysedd hormonaidd cyffredinol o bosibl.

1.4.3 Ffactorau sydd yn effeithio ar lefelau ghrelin

1.4.3.1 Effaith proteinau ar fynegiant ghrelin

Mae statws maethol yn rheoleiddio secretiad ghrelin yn bennaf, gyda lefelau cylchrediad yn codi yn ystod ymptydio ac yn gostwng ar ôl pryd bwyd o ganlyniad i chwydd gastrig (Cummings et al., 2001). Mae cyfansoddiad macroniwtrient bwyd a fwyteir hefyd yn dylanwadu yn wahanol ar ryddhau ghrelin; dangoswyd bod carbohydradau a phroteinau yn atal lefelau ghrelin plasma yn fwy effeithiol na brasterau dietegol (Lomenick et al., 2009). Mae tystiolaeth arbrofol o fodelau llygoden yn egluro ymhellach fodiwleiddio niwroendocrin ghrelin. Er enghraifft, mae rhoi ‘*kisspeptin*’ mewnwythiennol, peptid hypothalamig y gwyddys, ei fod yn ysgogi yr echelin hypothalamig-bitwidol-gonadal (*‘hypothalamic-pituitary-gonadal axis’*), yn lleihau crynodiadau ghrelin plasma a mynegiant genynnau yn sylweddol, tra bod morffin, alcaloid ag effeithiau ataliol ar swyddogaeth atgenhedlu, yn codi lefelau mRNA ghrelin plasma a hypothalamig yn sylweddol o ei gymharu â rheolyddion halwynog (Khazail a Mahmoud, 2022). Yn arbennig, mesurodd yr astudiaethau hyn gyfanswm ghrelin, sydd yn cyfateb i yr ffurf asyl (actif), heb wahaniaethu rhwng y cyfrannau cymharol o asyl ac dadasyl ghrelin, a thrwy hynny gyfyngu ar fewnwelediadau ddeinameg penodol i isoffurfiau.

Ar y lefel gellog, mae derbynyddion niwclear REV-ERB α a REV-ERB β yn gweithredu fel atalyddion trawsgrifio mynegiant ghrelin a GOAT. Mae gor-fynegiant y derbynyddion hyn mewn celloedd SG-2 (llinell gell sydd yn secretu ghrelin sydd yn deillio o yr stumog) yn arwain at ostyngiad sylweddol mewn mRNA ghrelin a GOAT, tra bad ‘knockdown’ gyfryngir gan siRNA mewn celloedd SG-1 yn achosi eu huwchreoleiddio, gan awgrymu bod REV-ERBs yn rhan o reoleiddio circadaidd biosynthesis ghrelin (Iijima et al., 2021).

Mae rheoleiddio mynegiant GHRL yn cynnwys rhyngweithiadau cymhleth o fecanweithiau trawsgrifio ac epigenetig. Mae sawl ffactor trawsgrifio yn rhwymo yn uniongyrchol i hyrwyddwr GHRL i addasu ei weithgaredd. Mae Nkx2.2, ffactor trawsgrifio homeodomain sydd yn hanfodol ar gyfer datblygiad pancreatig, yn actifadu yr hyrwyddwr ghrelin yn benodol mewn celloedd ynysoddd pancreatig, gan wella mynegiant ghrelin yn uniongyrchol (Hill et al., 2010). I yr gwrthwyneb, mae NF- κ B, yn enwedig yr is-uned RelA/p65, yn gweithredu fel atalydd trawsgrifio GHRL, fel y

dangosir gan atal gweithgaredd hyrwyddwr ghrelin mewn celloedd TT dynol (Shiimura et al., 2015). Yn ogystal, mae BSX (*'Brain-Specific Homeobox'*) wedi ei nodi fel rheolydd hanfodol o homeostasis ynni ac ymddygiad bwydo. Mae BSX yn dylanwadu ar fynegiant hypothalamig niwropeptidau orecsigenig fel AgRP ac NPY, sydd yn dargedau i lawr yr afon o signalau ghrelin (Sakkou et al., 2007).

Mae rheoleiddiad epigenetig hefyd yn chwarae rhan yn fynegiant ghrelin. Er enghraifft, mae ffactor tebyg i Krüppel 13 (KLF13) wedi ei gysylltu â modiwlleiddio ymatebion niwral a hormonaidd sydd yn gysylltiedig â bwydo. Nododd Wiemerslage et al. (2017) safle methylu DNA o fewn y gennyn KLF13 sydd yn gysylltiedig ag adweithedd niwral wedi ei newid i giwiau bwyd a lefelau ghrelin sydd yn cylchredeg, gan awgrymu bod KLF13 yn ymwneud â llwybrau signalau orecsigenig a gyfryngir yn epigenetig.

Gyda ei gilydd, mae yr canfyddiadau hyn yn tanlinellu yr rheoleiddiad amlochrog o secretiad ghrelin a fynegiant genynnau, a lywodraethir gan giwiau maethol, ffactorau niwroendocrin, rheoleiddwyr trawsgrifio, a mecanweithiau epigenetig, sydd i gyd yn cyfrannu at fodiwlleiddio manwl gywir yr hormon metabolaidd allweddol hwn.

1.4.3.2 Clirio Ghrelin a Hanner Oes

Mae ghrelin yn cylchredi mewn dau brif ffurf: asyl ghrelin, y peptid gweithredol, wedi ei octanoyleiddio, ac dadasyl ghrelin, nad yw yn orecsigenig. Mae asyl ghrelin yn cael ei glirio yn gyflym iawn *'in vivo'*.

Mae astudiaethau bolws mewnwythiennol mewn bodau dynol wedi dangos hanner oes o tua 9–13 munud ar gyfer asyl ghrelin, o ei gymharu â 27–31 munud ar gyfer ghrelin cyfan (dadasyl ghrelin yn bennaf), yn gyson â model dwy adran o ddosbarthu a dileu (Akamizu et al., 2004, Vestergaard et al., 2007) a gefnogodd y cineteg deuffasig hyn, gan adrodd hanner oes cychwynnol o ~24 munud a hanner oes terfynol o ~146 munud ar gyfer ghrelin cyfan o dan drwyth parhaus. Mae yn debyg bod gwahaniaethau methodolegol, fel bolws yn erbyn trwyth parhaus, yn egluro rhywfaint o amrywioldeb mewn mesuriadau hanner oes.

Mewn amodau *'ex vivo'*, mae ghrelin yn dangos mwy o sefydlogrwydd. Darganfydded Blatnik a Soderstrom (2011) fod asyl ghrelin yn dadasyleiddio gyda hanner oes o tua 45 munud mewn plasma dynol ar dymheredd ystafell, gyda thua hanner yn trosi i dadasyl ghrelin o fewn awr. Mae yn debyg bod y diraddio arafach hwn yn adlewyrchu

absenoldeb clirio arennol a dosbarthiad meinwe. Pwysleisiodd yr awduron bwysigrwydd defnyddio atalyddion esteras yn ystod casglu samplau i gadw asyl ghrelin mewndarddol a sicrhau meintioli cywir.

O ran heneiddio, mae data uniongyrchol ar glirio ghrelin mewn bodau dynol yn gyfyngedig. Sylwodd Hollis et al. (2013) ar lefelau asyl ghrelin cyflwr cyson is mewn oedolion hŷn ond ni wnaethant asesiadau cineteg dileu yn uniongyrchol. Mewn cnofilod, fodd bynnag, dangoswyd gwahaniaethau sydd yn gysylltiedig ag oedran mewn diraddio. Dangosodd Ni et al. (2010) fod plasma llygod mawr ffetws (*'foetal'*) a newydd-anedigol (*'neonatal'*) yn diraddio asyl ghrelin yn gyflymach na plasma oedolion, er bod esterasau gwaed fel BChE a carbocsylesteras yn cynyddu gydag oedran. Gostyngodd ddiraddiad asyl ghrelin mewn plasma llygod mawr oedolion wrth defnyddio atalyddion proteas serin, gan awgrymu y gallai clirio bywyd cynnar gynnwys systemau proteolytig gwahanol neu fwy gweithredol.

At ei gilydd, nid oes tystiolaeth gref bod cyfradd clirio gynhenid ghrelin yn newid yn sylweddol wrth heneiddio mewn bodau dynol. Yn hytrach, mae yn ymddangos bod y dirywiad sydd yn gysylltiedig ag oedran mewn asyl ghrelin sydd yn cylchredeg yn deillio yn bennaf o secretiad gwaelodol is yn hytrach na dileu wedi ei newid (Hollis et al., 2013).

1.4.3.3 Modelau Anifeiliaid o Newidiadau Ghrelin sydd yn Gysylltiedig ag Oedran

O ran mynegiant datblygiadol, mae astudiaethau mewn llygod wedi dangos bod mRNA ghrelin gastrig yn codi yn sydyn ar ôl genedigaeth, yn cyrraedd uchafbwynt tua diwrnod ôl-enedigol 21, ac wedi hynny yn gostwng i tua 67% o ei lefel uchafbwynt erbyn 6 mis oed ac i tua 5% erbyn 19 mis (Liu et al., 2002). Yn ddiddorol, er gwaethaf y gostyngiad amlwg hwn mewn trawsgrifio, mae crynodiadau ghrelin sydd yn cylchredeg yn parhau yn gymharol sefydlog, rhwng 0.1 a 0.6 ng/mL, ar draws yr oedrannau hyn, gyda phigyn dros dro yn fwy na 15 ng/mL yn cael ei arsylwi ar ddiwrnod ôl-enedigol 60 mewn gwrywod. Mae hyn yn awgrymu y gallai mecanweithiau ôl-drawsgrifio ac ôl-ysgarthu chwarae rhan wrth reoleiddio lefelau ghrelin y tu hwnt i fynegiant genynnau yn unig.

O ran dosbarthiad meinwe, mae ffynonellau ghrelin all-gastrig hefyd yn lleihau gydag oedran. Mewn bodau dynol, adroddodd Carraro et al. (2006) gydb berthynas negyddol

gref rhwng mynegiant mRNA ghrelin uwcharenol ac oedran cronolegol (yn amrywio o 33 i 82 oed), sydd yn dynodi gostyngiad cyffredinol mewn trawsgrifiad ghrelin perifferol fel rhan o yr broses heneiddio.

O ran ymatebolrwydd swyddogaethol, nid yn unig y mae cnofilod oedrannus yn cynhyrchu llai o ghrelin ond maent hefyd yn ymateb yn wahanol i yw effeithiau biolegol. Dangosodd Warzecha et al. (2006) fod llygod mawr 7 wythnos oed yn arddangos ymateb GH a ffactor twf tebyg i inswlin-1 (IGF-1) sylweddol gryfach i weinyddu ghrelin o ei gymharu â llygod mawr newydd-anedigol neu oedolion. Yn yr un modd, darganfydded Nesic et al. (2013) fod gweinyddu asyl ghrelin yn fewngyhyrol yn arwain at fwy o fwyd a mwy o bwysau mewn llygod mawr ifanc o ei gymharu ag anifeiliaid canol oed, tra bod llygod mawr hŷn yn dangos cronni braster gwell a chodiadau mewn lipidau cylchredeg fel triglyseridau a lipoprotein dwysedd isel (LDL) yn dilyn triniaeth ghrelin.

Gyda ei gilydd, mae yr canfyddiadau hyn yn awgrymu bod biosynthesis ghrelin ac ei effeithiau ffisiolegol a gyfryngir gan dderbynyddion yn cael eu lleihau yn raddol wrth heneiddio mewn modelau cnofilod. Mae gan y dirywiad hwn oblygiadau pwysig wrth geisio allosod data cyn-glinigol i gyd-destunau heneiddio a chlefydau dynol.

1.4.3.4 Astudiaethau Dynol o Newidiadau Ghrelin sydd yn Gysylltiedig ag Oedran

Dangoswyd bod lefelau ghrelin cyfanswm mewn plasma wrth ymptydio yn gostwng gydag oedran. Darganfydded Rigamonti et al. (2002) fod gan unigolion 65 oed a hŷn lefelau ghrelin yn y cylchrediad sydd yn debyg i yr rhai a welwyd mewn pynciau gordew, ac yn sylweddol is na yr lefelau a geir mewn rheolyddion iach gydag oedran cymedrig o 30. Gan gefnogi yr duedd hon, adroddodd Schutte et al. (2007) fod crynodiadau ghrelin wrth ymptydio yn is mewn menywod main rhwng 30 a 56 oed o ei gymharu â yr rhai rhwng 19 a 29 oed. Yn ogystal, datgelodd data o yr garfan POWIRS fod heneiddio wedi lleihau yr gydberthynas rhwng ghrelin a marcwyr metabolaidd eraill, fel leptin a ffactorau ceulo, gan awgrymu aflonyddwch yn rôl ghrelin o fewn y rhwydwaith rheoleiddio metabolaidd ehangach.

Wrth fesur asyl ghrelin yn benodol gan ddefnyddio prawf ELISA, nododd Nass et al. (2014) fod crynodiad cymedrig asyl ghrelin dros 24 awr mewn oedolion hŷn tua 14.7 pg/mL, bron hanner y lefel a welir mewn oedolion iau, gyda gwerth cymedrig tua 27.8

pg/mL. Ar ben hynny, roedd y cyplu rhwng pylsau asyl ghrelin a secretiad GH wedi ei wanhau yn sylweddol yn y grŵp hŷn. Mae yr gostyngiad anghymesur hwn yn y ffurf fiolegol weithredol o ghrelin, o ei gymharu â chyfanswm ghrelin, yn tynnu sylw at bwysigrwydd asesu asyl ghrelin yn benodol wrth werthuso swyddogaeth endocrin mewn poblogaethau sydd yn heneiddio.

O ran rheoleiddio trawsgrifio, adroddodd Carraro et al. (2006) am ostyngiadau sydd yn gysylltiedig ag oedran mewn mynegiant mRNA ghrelin uwcharenol mewn bodau dynol, yn gyson â chanfyddiadau o fodelau cnofilod. Yn arbennig, gwelwyd y dirywiad hwn waeth er gwaethaf yr rhyw, gan ddarparu tystiolaeth bellach bod mynegiant genynnau ghrelin perifferol yn lleihau fel rhan o yr broses heneiddio.

1.4.3.5 Diraddiad Ghrelin

Mae diraddiad ghrelin yn cael ei yrru gan ei gydrannau peptid a lipid. Nodweddir y ffurf weithredol, asyl ghrelin, gan addasiad n-octanoyl ar ei drydydd gweddill serin, lipidiad sydd yn hanfodol ar gyfer ei rwymo derbynyddion ac ei weithgaredd biolegol (Kojima et al., 1999). Mae yr rhan lipid hon yn agored i hydrolysis gan esterasau sydd yn cylchredeg, yn enwedig BChE ac esterasau sydd dim yn benodol i eraill mewn plasma, gan arwain at drawsnewid cyflym asyl ghrelin i dadasyl ghrelin (Sato et al., 2012).

Er bod gan dadasyl ghrelin weithgaredd biolegol ynddo ei hun, nid yw yn rhwymo yr GHS-R1a ac yn aml fe ei hystyrir yn foleciwl signalau ar wahân. Ar ben hynny, mae yr dadansoddiad ensymatig o asgwrn cefn y peptid ghrelin ei hun yn cael ei gyfryngu gan broteasau fel '*neprilysin*' ac ensym sydd yn diraddio inswlin (IDE), y gwyddys bod y ddau yn cynyddu mewn gweithgareddau gydag oedran (Iwata et al., 2001). Gall y cynnydd hwn sydd yn gysylltiedig ag oedran mewn gweithgaredd proteolytig gyfrannu at y dirywiad a welwyd mewn lefelau ghrelin gweithredol mewn unigolion hŷn, gan o bosibl waethygu diffygion mewn signalau ghrelin.

Ar ôl ei secretu, caiff ghrelin ei ddadactifadu trwy ddadasyleiddio ensymatig a phroteolysis. Mae esterasau plasma yn tynnu yr grŵp asyl (n-octanoyl) o asyl ghrelin, gan ei drawsnewid yn ghrelin anactif, dadasyl ghrelin. Dangosodd De Vriese et al. (2004) y gall serwm dynol ddadasyleiddiad ghrelin a nodi BChE fel ensym allweddol. Dangosodd eu hastudiaethau bod atalyddion BChE yn lleihau ddadasyleiddio mewn serwm dynol. I yr gwrthwyneb, mae serwm llygod mawr yn dibynnu yn bennaf ar garbocsylesterasau.

I gefnogi hyn, dangosodd Schopfer, Lockridge, a Brimijoin (2015) fod BChE dynol wedi ei buro yn hydrolysu asyl ghrelin yn araf i dadasyl ghrelin. Mae eu canfyddiadau yn awgrymu bod BChE yn berthnasol yn ffisiolegol wrth glirio ghrelin sydd yn cylchredeg. Mae diraddio proteolytig asgwrn cefn y peptid hefyd yn cyfrannu. Nododd De Vriese et al. (2004) safleoedd hollti o fewn y peptid ghrelin (er enghraifft, Ser2-Ser3, Phe4-Leu5), sydd yn cynhyrchu darnau sydd yn anactif wrth y derbynnydd.

Yn bwysig, mae gweithgaredd ensymatig yn targedu yr rhan lipid yn uniongyrchol. Mae BChE a charbocsylesterasau yn hydrolysu yr bond ester yn Ser3, gan gael gwared ar y grŵp octanoyl a thrwy hynny ddileu gweithgaredd biolegol (De Vriese et al., 2004; Schopfer et al., 2015). Felly, mae yr broses hon yn fecanwaith anactifadu allweddol. Gan fod dadasyleiddio yn cael gwared ar weithgaredd y derbynnydd ghrelin, a gall proteasau ddiraddio yr peptid sydd yn deillio o hyn ymhellach, mae diraddio a gyfryngir gan ensymau yn chwarae rhan ganolog wrth reoleiddio signalau ghrelin.

1.4.3.6 Goblygiadau ar gyfer Datblygu Biofarcwyr Dementia

Mae rolau amrywiol ghrelin, gan gynnwys ei swyddogaethau orecsigenig, niwroamddiffynnol, a gwrthlidiol, yn ei wneud yn ymgeisydd addawol fel biofarcwyr yn y gwaed ar gyfer dementia. Fodd bynnag, oherwydd bod heneiddio normadol yn newid secretiad a gweithgaredd ghrelin yn sylweddol, rhaid i unrhyw fodel biofarcwr sydd yn canolbwyntio ar ddementia ystyried y newidiadau ffisiolegol hyn yn ofalus. Yn gyntaf, rhaid i ddadansoddiadau ystadegol addasu ar gyfer oedran, gan fod cyfanswm lefelau ghrelin ac asyl ghrelin yn gostwng wrth i flynyddoedd fynd yn eu blaen, a pheidio â gwneud hynny mae risg o gymysgu gostyngiadau sydd yn gysylltiedig ag oedran â newidiadau penodol i glefyd. Ar ben hynny, oherwydd y gostyngiad anghymesur mwy sydyn mewn asyl ghrelin, sef y ffurf fiolegol weithredol, mae yn hanfodol defnyddio asesiadau sydd yn mesur asyl ghrelin yn gywir. Mae hyn yn gofyn am brotocolau prosesu samplau cyflym sydd yn cynnwys atalyddion esterases i atal diraddio ar ôl casglu, fel y dangoswyd gan Blatnik a Soderstrom (2011).

Rhaid ystyried gwahaniaethau rhyw hefyd, gan fod modelau anifeiliaid a rhai astudiaethau dynol yn awgrymu y gall rheoleiddio ghrelin amrywio yn ôl rhyw. Gall ymgorffori rhyw fel newidyn haenu neu gyd-newidyn wella manylder a dehongladwyedd biofarcwyr sydd yn seiliedig ar ghrelin (Liu et al., 2002; Schutte et

al., 2007). Yn ogystal, nid yw tystiolaeth gyfredol yn cefnogi newid sylweddol yng nghyfraddau clirio ghrelin gydag heneiddio mewn bodau dynol, gan awgrymu bod y gostyngiadau a welwyd mewn lefelau sydd yn cylchredeg yn fwy tebygol o fod oherwydd newidiadau mewn secretiad a mynegiant genynnau yn hytrach na sifftiau mewn dileu metabolig (Hollis et al., 2013; Ni et al., 2010).

I grynhoi, er bod ghrelin, yn enwedig asyl ghrelin, yn lleihau gydag oedran, efallai nad yn unig y mae yr duedd hon yn adlewyrchu heneiddio niwroendocrin arferol ond gallai hefyd nodi unigolion sydd mewn perygl uwch o gael llai o niwroamddiffyniad. O ganlyniad, bydd astudiaethau wedi eu cynllunio yn drylwyr sydd yn rheoli oedran, rhyw, methodoleg arbrawf, a newidynnau metabolaidd yn hanfodol ar gyfer sefydlu dibynadwyedd a dilysrwydd ghrelin fel biofarcwyr ar gyfer dementia.

1.4.4 Derbynyddion Ghrelin a Lleoleiddiad yr Ymennydd

Mae ffurf weithredol ghrelin, asyl ghrelin, yn rhwymo i GHS-R1a, sydd yn cael ei fynegi yn eang yn y system nerfol ganolog, gan gynnwys rhanbarthau allweddol fel yr hipocampws, yr hypothalmws, y '*substantia nigra*', a yr ardal tegmental fentrol (Zigman et al., 2006). Mae yr ardaloedd ymennydd hyn yn ymwneud yn hanfodol â chof, prosesu gwobrau, a rheoleiddio homeostatig, parthau sydd yn aml yn cael eu hamharu mewn dementia. Y tu hwnt i yr system nerfol ganolog, mae GHS-R1a hefyd yn cael ei fynegi mewn meinweoedd perifferol, gan gynnwys y chwarren bitwidol a yr afferol fagws, gan danlinellu rôl y derbynydd wrth gydlyn effeithiau canolog ac ghrelin perifferol (Kojima a Kangawa, 2005).

O fewn yr ymennydd, mae rhwymo asyl ghrelin i GHS-R1a yn actifadu sawl llwybr signalau mewngellol, yn bennaf trwy broteinau Gq/11. Mae yr actifadu hwn yn ysgogi ffosfolipas C (PLC), yn cynyddu lefelau calsiwm mewngellol, ac yn sbarduno rhaeadrau protein cinas wedi ei actifadu gan mitogen/cinas allgellog a reoleiddir gan signalau (MAPK/ERK). Mae yr digwyddiadau signalau hyn yn modiweiddio cyffroad niwronau a phlastigydd synaptig, a thrwy hynny yn cyfrannu at effeithiau niwroamddiffynol a gwella gwybyddol ghrelin (Müller et al., 2015). Yn bwysig, mae GHS-R1a yn bodoli ochr yn ochr ag amrywiad sbleisio, GHS-R1b, sydd heb y gallu i rwymo ghrelin ond gall heterodimeri gyda GHS-R1a, gan fodiweiddio signalau a masnachu derbynyddion (Holst et al., 2003).

Mae astudiaethau ar anifeiliaid wedi dangos bod ghrelin a weinyddir yn ganolog yn gwella pennaeth hirdymor yr hipocampwl (LTP), cydberthynas gellog dysgu a chof (Diano et al., 2006). Yn ogystal, mae ghrelin yn hyrwyddo niwrogenesis hipocampwl mewn oedolion, yn amddiffyn niwronau rhag straen ocsideiddiol, ac yn atal llwybrau niwro-llidiol, mae yr mecanweithiau hyn yn arbennig o berthnasol o ystyried bod crebachiad yr hipocampwl a llid cronig yn nodweddion nodedig o AD (Moon et al., 2009).

Gall dwysedd derbynyddion a lefelau mynegiant amrywio yn ôl oedran a chyflwr y clefyd, gan ddylanwadu ar effeithiolrwydd signalau ghrelin. Mae rhai astudiaethau yn awgrymu bod mynegiant GHS-R1a yn yr hypothalmws a yr hipocampws yn lleihau wrth heneiddio ac mewn modelau niwroddirwyd, gan gyfrannu o bosibl at ymatebolrwydd ghrelin is mewn poblogaethau oedrannus (Malendowicz et al., 2010). Fodd bynnag, mae angen ymchwil bellach i egluro yr newidiadau hyn mewn bodau dynol ac eu perthnasedd i ddatblygiad dementia.

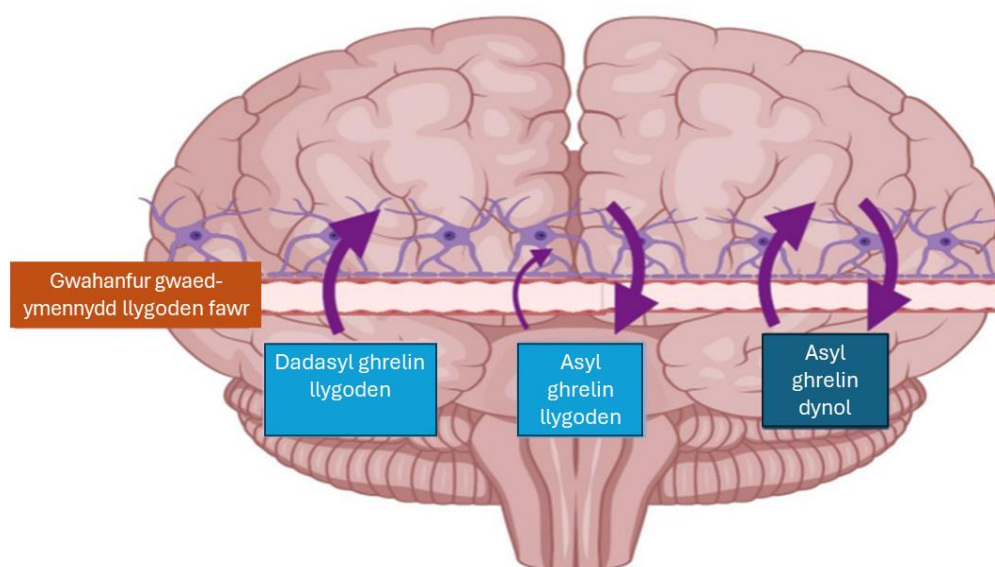
Er bod GHS-R1a yn cyfryngu yr rhan fwyaf o effeithiau hysbys asyl ghrelin, gall rhai swyddogaethau a briodolir i dadasyl ghrelin neu ghrelin yn fwy cyffredinol gynnwys derbynyddion neu safleoedd rhwymo eraill, sydd heb eu hadnabod eto. Er enghraifft, mae rhyngweithiadau rhwymo ghrelin amgen wedi eu cynnig mewn derbynyddion fel CD36 neu broteinau pilen eraill, er bod y mecanweithiau hyn yn parhau i fod wedi ei nodweddu yn wael (Delhanty et al., 2012). Mae yr cymhlethdod hwn yn tynnu sylw at yr angen am ymchwil barhaus i fioleg derbynyddion ghrelin, yn enwedig yng nghydestun heneiddio a chlefydau niwrodirwyol.

1.4.5 Dadasyl ac Asyl Ghrelin a yr BBB

Mae celloedd yn yr ymennydd wedi cael eu cwestiynu ynghylch a ydynt yn mynegi ghrelin. Ym 1999, dangosodd Kojima et al. bresenoldeb mRNA ghrelin yn stumog ac ymennydd llygod mawr. Wedi hynny, dangosodd Cowley et al. (2003) nad oedd unrhyw mRNA wedi ei ganfod yn yr hypothalmws mewn llygod â yr genynnau a anwyd yn y llygod gwyllt (Cowley et al., 2003). I yr gwrthwyneb, mae astudiaethau eraill yn nodi nad oes unrhyw gelloedd yn yr ymennydd yn mynegi yr gen ghrelin (Sakata et al., 2009; Furness et al., 2011). Er gwaethaf hyn, gan fod GOAT yn cael ei fynegi yn yr hipocampws (Murtuza ac Isokawa 2018; Hornsby et al., 2020), gellir syntheseiddio

asyl ghrelin yn lleol yn yr ymennydd ar ôl mewnfario dadasyl ghrelin sydd yn deillio yn perifferol.

Mae yr ymennydd wedi ei amddiffyn gan y BBB, pilen athraidd ddetholus sydd yn rheoleiddio pasio moleciwlau o yr cylchrediad i feinwe niwral. Gall asyl ac dadasyl ghrelin groesi yr BBB o yr cyrion. Mewn llygod, mae statws asyleiddio a tharddiad rhywogaeth yn dylanwadu ar gyfeiriadedd cludiant, mae asyl ghrelin llygodol yn croesi yn ffafriol o yr ymennydd i yr gwaed, tra bod dadasyl ghrelin llygodol yn croesi o yr gwaed i yr ymennydd. Gall asyl ghrelin dynol, sydd yn wahanol i yr ffurf llygoden gan ddau asid amino yn unig, groesi i yr ddau gyfeiriad trwy system gludo dirlawn. Gall y gwahaniaethau asid amino hyn fod yn hanfodol ar gyfer adnabyddiaeth gan y cludwr mewnlifiad, tra bod mecanwaith dirlawn ar wahân yn debygol o gyfryngu all-lif yn y ddwy rywogaeth (Banks et al., 2002) (Ffigur 1.3).



Ffigur 1.3 Peptidau ghrelin yn croesi yr rhwystr ymennydd-gwaed.

Mae yn well gan asyl ghrelin o llygod mawr groesi yr gwahanfur gwaed-ymennydd yn y cyfeiriad ymennydd-i-waed (fel dangoswyd gan y saeth) , tra bod yn well gan dadasyl ghrelin o lygod mawr deithio yn y cyfeiriad gwaed-i-ymennydd. Mae asyl ghrelin dynol, sydd ond yn wahanol i ghrelin llygoden mewn dau safle asid amino (gweler Tabl 1.1), yn gallu croesi i yr ddau gyfeiriad ar draws gwahanfur gwaed-ymennydd y llygoden. (Cymerwyd y ffigur gyda chaniatâd Thomas A.S, et al., 2022).

Asesodd yr astudiaeth gan Banks et al. y gymhareb ymennydd: serwm a chroniad parencymal uniongyrchol i wahaniaethu rhwng ghrelin wedi ei ddal mewn fasgwlariaeth ymennydd a yr hyn a gymerwyd gan feinwe yr ymennydd. Cadarnhaodd

y dull cynhwysfawr hwn nad oedd cludiant wedi ei gyfyngu i gadw capilari ond ei fod yn adlewyrchu treiddiad gwirioneddol i barencyma yr ymennydd. Yn ogystal, dangosodd Banks et al. fod dadasyl ghrelin, mewn cyferbyniad, yn croesi yr BBB trwy fecanwaith annirlawn, trylediad syml yn ôl pob tebyg, sydd yn dangos y gallai fod ganddo fynediad heb ei reoleiddio i yr ymennydd. Mae gan y gwahaniaeth hwn oblygiadau swyddogaethol, mae yn awgrymu y gallai dadasyl ghrelin fod ar gael yn fwy cyson yn y system nerfol ganolog er gwaethaf yr lefelau cylchrediad, gan ganiatáu o bosibl, asyleiddiad lleol gan GOAT a fynegir yn yr ymennydd.

Mae yr canfyddiadau hyn yn dangos cymhlethdod rheoleiddio canolog ghrelin ac yn codi yr posibilrwydd bod gwahaniaethau dilyniant penodol i rywogaethau yn dylanwadu ar rolau niwroendocrin ghrelin. Ar ben hynny, maent yn cefnogi yr ddamcaniaeth y gall gweithredoedd ghrelin canolog ddibynnu nid yn unig ar lefelau perifferol ond hefyd ar fecanweithiau cludo BBB dethol.

Cefnogwyd y canfyddiadau cychwynnol hyn ar allu ghrelin i groesi yr BBB yn ddiweddarach gan astudiaethau ghrelin wedi eu labelu â radiotherapi a awgrymodd hefyd y gall asyl ghrelin dynol groesi yr BBB trwy endocytosis (Diano et al., 2006; Pan, Tu, a Kastin 2006). Dangosodd astudiaeth fwy diweddar fod pigiadau perifferol o F-ghrelin (analog fflwroleuol o asyl ghrelin) wedi eu mewnosod gan gelloedd ependymal y plecsws coroid a chan is-set benodol o tanycytau, celloedd ependymal arbenigol iawn sydd yn ffurfio rhwystr rhwng CSF (rhwystr rhwng y gwaed sydd yn cylchredeg a yr gofod CSF) (Uriarte et al., 2019). Ymddengys bod hygyrchedd asyl ghrelin i yr ymennydd yn digwydd mewn modd sydd yn ddibynnol ar y dos. Roedd dos isel o yr analog asyl ghrelin fflwroleuol a chwistrellwyd yn perifferol yn bresennol ar lefelau isel yn y CSF ac yn dangos mwy o ddewis i yr hypothalmws, tra bod gweinyddiaeth systemig o ghrelin trwy asyl ghrelin a chwistrellwyd yn ganolog (neu ddosau uchel a rhoddir yn perifferol) wedi ei chanfod ar lefelau uchel yn y CSF a rhanbarthau eraill o yr ymennydd (Cabral, Fernandez, a Perello 2013; Uriarte et al., 2019). Gyda ei gilydd, mae yr astudiaethau hyn yn awgrymu y gallai asyl ghrelin a syntheseiddir yn lleol o fewn yr ymennydd neu a ddeilliwyd o yr perifferi, yn effeithio ar swyddogaeth yr ymennydd a dylanwadu ar anhwylderau niwrodirywiol.

Gall ghrelin gael effeithiau ar y system nerfol ganolog drwy groesi yr BBB. Mae astudiaethau olrhain wedi eu labelu yn radiotherapi yn dangos bod asyl ghrelin yn cael

ei gludo ar draws y BBB drwy fecanwaith dirlawn (Banks et al., 2002), ac mae lefelau canfyddadwy o ghrelin sydd yn cylchredeg yn mynd i mewn i ranbarthau yr ymennydd fel yr hipocampws (Diano et al., 2006). Yn wir, mewn astudiaethau anifeiliaid mae ghrelin mewngyhyrol yn cynyddu gweithgaredd niwronau hypothalamig a niwrogenesis, gan awgrymu mynediad canolog sydd yn berthnasol yn ffisiolegol. Yn nodedig, mae PD yn gysylltiedig ag amhariad ar y BBB (Lau et al., 2024), a allai newid bioargaeledd canolog ghrelin yn ddamcaniaethol. Cofnododd Lau et al. (2024) newidiadau eang mewn cyffyrdd tynn a gollyngiadau fasgwlaidd mewn PD, gan awgrymu y gallai hormonau perifferol fel ghrelin gyrraedd rhanbarthau bregus yr ymennydd yn haws. Felly, gall ghrelin sydd yn cylchredeg gyrraedd ei dderbynyddion CNS (GHS-R1a) o dan amodau arferol ac amodau wedi eu newid gan PD, gan ganiatáu iddo fodiwleiddio cylchedau bwydo, niwro-llid, a niwroplastigedd (Banks et al., 2002; Diano et al., 2006; Lau et al., 2024). Mae cynhyrchu a secretiad ghrelin yn dibynnu ar swyddogaeth gastrig, sydd yn aml yn cael ei amharu mewn PD. Mae ansymudedd ('*dysmotility*') gastroberfeddol yn symptom cyffredin di-fodur nad yw yn echddygol o PD, gan gynnwys oedi wrth wagio yr stumog (gastroparesis) a rhwymedd. Gall y newidiadau hyn ddifetha cylchoedd maetholion-hormon arferol. Yn gyson â hyn, mae cleifion PD yn tueddu i arddangos ghrelin sydd yn cylchredeg yn is. Er enghraifft, mesurodd Song et al. (2017) ghrelin plasma ymprydio mewn 291 o gleifion PD cyfnod cynnar a 303 o reolyddion, a chanfod bod lefelau cyfanswm ac asyl ghrelin wedi eu gostwng yn sylweddol mewn PD, er gwaethaf cam y clefyd. Newidiwyd deinameg ôl-bwyd hefyd, dangosodd cleifion PD ataliad ghrelin a achosir gan brydau bwyd gwanedig a chodiadau cyn-bwyd llai (Song et al., 2017). Adroddodd Unger et al. (2011) yn yr un modd fod gan bobl â PD a anhwylder ymddygiad cwsg REM prodromal alldeithiau ghrelin ôl-bwyd amhariad o ei gymharu â yr rheolyddion. Mae yr canfyddiadau hyn yn awgrymu bod camweithrediad gastrig neu golli pwysau sydd yn gysylltiedig â chlefyd mewn PD yn gwanhau yr ymateb ghrelin arferol. Yn wir, nododd un adolygiad clinigol mai dim ond un astudiaeth oedd wedi asesu ghrelin mewn PD a chanfod ghrelin serwm is mewn PD o ei gymharu â yr rheolyddion (Mey et al., a ddyfynnwyd yn adolygiad Gastroparesis). Ar ben hynny, gall cyffuriau gwrth-Parkinsonaidd (er enghraifft, gwrthgolinergigau, '*levodopa*') oedi gwagio gastrig ymhellach ac o bosibl roi adborth ar allbwn ghrelin (Mey et al., 2021). I grynhoi, mae abnormaleddau gastroberfeddol sydd yn gysylltiedig â PD yn tueddu i atal cynhyrchu neu ryddhau ghrelin perifferol, a allai leihau argaeledd yr hormon hwn i yr ymennydd.

Yn y CNS, mae ghrelin yn gweithredu trwy ei dderbynnnydd GHS-R1a, a fynegir mewn niwronau dopaminergig a niwronau eraill. Mae tystiolaeth yn dangos bod signalau GHS-R1a yn cael eu haflonyddu mewn PD.

Dangosodd Suda et al. (2018) fod mynegiant GHS-R1a wedi ei ostwng yn sylweddol mewn niwronau dopaminergig sydd yn deillio o gelloedd bonyn amlbotensial '*pluripotent*' a ysgogwyd gan gleifion â mwtaniadau PARK2. Mewn llygod, cynhyrchodd blocâd ffarmacolegol GHS-R1a yn y *substantia nigra* gatalepsi a diffygion echddygol, sydd yn awgrymu y gall colli swyddogaeth GHS-R1a achosi symptomau Parkinsonaidd (Suda et al., 2018). Felly, gall PD gynnwys colli swyddogaeth gweithgaredd derbynnnydd ghrelin. Mae GHS-R1a hefyd yn heterodimeri gyda derbynnnyddion dopamin, gan addasu signalau dopaminergig. Darganfydded Kern et al. (2014) fod GHS-R1a heb ei feddiannu (apo-GHS-R1a) yn ffurfio heteromerau gyda derbynnnyddion dopamin D2 (DRD2) mewn niwronau hypothalamig, mae yr cymhlethau ('*complexes*') GHS-R1a/DRD2 hyn yn rheoleiddio signalau D2 yn allosterig ('*allosterically*'). Yn yr hipocampws, mae derbynnnyddion GHS-R1a a dopamin D1 (DRD1) yn ffurfio cymhlethau heteromerig sydd yn hanfodol ar gyfer plastigrwydd synaptig sydd yn ddibynnol ar D1. Dangosodd Kern et al. (2015) dim ond pan fydd GHS-R1a yn bresennol y mae tynhawyr ('*agonists*') DRD1 yn ennyn signalau $G\alpha_q$ /PLC anghanonaidd ('*noncanonical*'). Yn yr un modd, nododd Navarro et al. (2022) oligomerau GHS-R1a/GHSR1b/D1R mewn niwronau dopamin ardal tegmental fentrol sydd yn cyfryngu effeithiau ghrelin ar gymhellant. Mae yr rhyngweithiadau hyn yn golygu y gall gweithgaredd derbynnnyddion ghrelin ymhelaethu ar niwrodrosoglwyddiad dopamin gweddilliol. Mewn PD, lle mae diffyg dopamin, gallai GHS-R1a cyfan fod yn arbennig o bwysig ar gyfer modiwlleiddio plastigrwydd synaptig a gwybyddiaeth trwy lwybrau D1 (Hernandez et al., 2015). I yr gwrthwyneb, mae gostwng GHS-R1a mewn niwronau dopaminergig PD yn debygol o waethygu diffygion dopaminergig a gallai gyfrannu at nam gwybyddol (Suda et al., 2018; Kern et al., 2015). Mae ghrelin hefyd yn cefnogi prosesau cellog sydd yn gwrthweithio patholeg PD. Mae yn actifadu AMPK a llwybrau metabolaid cysylltiedig i wella swyddogaeth mitocondriaidd ac awtoffagi. Mae Bayliss ac Andrews (2013) yn adolygu bod ghrelin yn hyrwyddo mynegiant datgysylltu protein 2 (UCP2), gan leihau straen ocsideiddiol, ac yn sbarduno mitoffagiaeth a biogenesis mitocondriaidd a gyfryngir gan AMPK. Yn benodol, mae ghrelin yn atal signalau mTOR (trwy ffosfforyleiddiad AMPK ac ULK1),

gan ysgogi awtoffagi a chlirio organynnau sydd wedi eu difrodi (Bayliss ac Andrews, 2013). Yn arbrofol, mae gweinyddu ghrelin yn cynyddu marcwyr awtoffagi (er enghraifft LC3-II, Beclin-1) ac yn lleihau cronni p62 mewn llygod sydd wedi eu hanafu gan MPTP, gan amddiffyn niwronau nigral rhag cronni ' *α -synuclein*' a straen reticwlwm endoplasmig (ER) (Wang et al., 2020). I yr gwrthwyneb, mae colli signalau ghrelin yn amharu ar y mecanweithiau homeostatig hyn. Mewn model PD MPTP, dangosodd Xiao et al. (2024) fod llygod curo allan GHS-R1a yn arddangos gorfynegiant o DEPTOR (rheolydd positif awtoffagi cynnar) ond yn baradocsiaidd datblygasant gamweithrediad lysosomaidd. Roedd y bloc hwn yn fflwcs awtoffagi yn atal clirio mitochondria a oedd wedi ei ddifrodi mewn niwronau dopaminergig, gan waethygu niwroddirwyad. I grynhoi, mae ghrelin/GHS-R1a yn cefnogi rheoli ansawdd mitochondriaidd trwy awtoffagi/mitoffaggi, prosesau y gwyddys eu bod yn cael eu tarfu mewn PD (er enghraifft llwybrau PINK1/Parkin).

Gall unrhyw berygl o signalau ghrelin waethygu yr straen bioegniol a phroteostatig mewn niwronau PD (Xiao et al., 2024; Wang et al., 2020). Mae tystiolaeth glinigol ac arbrofol yn cysylltu newidiadau ghrelin â PD a PDD. Mae astudiaethau poblogaeth yn adrodd am ghrelin is mewn PD: er enghraifft, darganfydded Song et al. (2017) gyfanswm ymprydio ac asyl ghrelin is mewn cleifion PD o ei gymharu â rheolyddion. Yn yr un modd, sylwodd Unger et al. (2011) nad yw cleifion PD a chleifion prodromal yn llwyddo i atal ghrelin fel arfer ar ôl prydau bwyd. Yn bwysig, mae astudiaethau diweddar yn cysylltu ghrelin â chanlyniadau gwybyddol mewn PD. Dadansoddwyd plasma o gleifion PD gyda a heb ddementia a chanfuwyd dim ond mewn achosion o PDD y gostyngwyd AG:UAG yn sylweddol (Sassi et al., 2022).

Yn yr un modd, dangosodd Hornsby et al. (2020) fod cynyddu UAG (neu ostwng AG:UAG) mewn llygod yn amharu ar niwrogenesis a chof hipocampwl, gan gyfateb i yr ffenoteip PDD dynol. Mae yr astudiaethau hyn yn awgrymu y gallai dadasyl ghrelin uwch (a chymhareb AG:UAG is) wasanaethu fel biofarcwyr cylchredol ar gyfer PDD. Mae modelau arbrofol yn atgyfnerthu rôl amddiffynnol ghrelin, mewn llygod, mae gweinyddu ghrelin allarddol yn lleihau actifadu microglial a achosir gan MPTP a cytocinau llidiol (IL-1 β , TNF- α) yn y '*substantia nigra*', gan gadw niwronau dopaminergig (Moon et al., 2009; Bayliss & Andrews, 2013). I yr gwrthwyneb, mae dileu neu wrthwynebiad GHS-R1a yn cyflymu colli dopaminergig a diffygion modur tebyg i PD (Suda et al., 2018; Xiao et al., 2024). Gyda ei gilydd, mae data epidemioleg

ar ghrelin yn y gwaed, cydberthnasau clinigol â cholli pwysau a gwybyddiaeth, ac astudiaethau anifeiliaid o fodiweiddio ghrelin i gyd yn awgrymu bod ghrelin yn gysylltiedig â datblygiad PD a risg dementia. Mae yr canfyddiadau hyn yn tanlinellu rôl amlochrog ghrelin mewn PD ac yn tynnu sylw at fesurau ghrelin sydd yn cylchredeg (yn enwedig y gymhareb AG:UAG) fel biofarcwyr addawol ar gyfer nodi cleifion PD sydd mewn perygl o ddirywiad gwybyddol (Sassi et al., 2022; Song et al., 2017).

I grynhoi, mae ghrelin yn chwarae rhan amlochrog yn yr ymennydd, gan ddylanwadu ar gof, niwroamddiffyniad, llid, a metaboledd, sydd i gyd yn elfennau allweddol ym patholeg dementia. Gall gostyngiadau sydd yn gysylltiedig ag oedran mewn lefelau ghrelin gyfrannu at ddirywiad gwybyddol a niwroddirwyiad, ac mae data sydd yn dod i yr amlwg yn cefnogi ei botensial fel biofarcwyr yn y gwaed. Mae angen astudiaethau pellach i ddilysu ghrelin fel offeryn diagnostig neu ragfynegol ac i egluro yr llwybrau mecanyddol sydd yn ei gysylltu â datblygiad dementia.

1.4.6 Rhwymo Asyl Ghrelin i GHS-R1a

Mae rhwymo asyl ghrelin i GHS-R1a yn hanfodol ar gyfer actifadu derbynyddion a signalau i lawr yr afon. Yn wahanol i dadasyl ghrelin, mae asyl ghrelin yn treiddio yn ddwfn i yr bilen lipid trwy ei grŵp octanoyl, gan gynyddu crynodiad lleol o amgylch y derbynydd tua 120 gwaith, a thrwy hynny wella ymgysylltiad y derbynydd (Staes et al., 2010). Mae asidau amino hydroffobig yn y derfynfa N, yn enwedig o amgylch serin-3 lle mae yr rhan octanoyl ynghlwm, yn chwarae rhan hanfodol mewn cysylltiad â yr bilen a rhwymo yr derbynydd (Vortmeier et al., 2015).

Mae astudiaethau strwythurol gan ddefnyddio efelychiadau cyseiniant magnetig niwclear (NMR) a deinameg foleciwlaidd wedi dangos bod asyl ghrelin yn mabwysiadu cyfluniad troellog anhyblyg, gyda yr grŵp octanoyl yn ffurfio craidd hydroffobig sydd yn sefydlogi yr cymhlyg hormon derbynydd (Bender et al., 2019; Ferré et al., 2019). Mae strwythurau microsgopeg grisial a chryoelectron GHS-R1a yn datgelu poced rhwymo wedi ei rhannu yn nodedig sydd yn cynnwys pont halen a chraffa hydroffobig. Mae gweddillion ffenylalanin o fewn y derbynydd yn cyfrannu yn hollbwysig at adnabod ligand ac actifadu derbynyddion, ac mae mwntaniadau yn y gweddillion hyn yn amharu ar swyddogaeth y derbynydd (Shiimura et al., 2020; Wang et al., 2021).

Ar ôl rhwymo, mae asyl ghrelin yn actifadu llwybrau a gyfryngir gan brotein Gq/11 sydd yn ysgogi ffosfolipas C (PLC), gan arwain at gynydd mewn calsiwm mewngellol ac

actifadu rhaeadrau signalau protein cinas C (PKC) a MAPK/ERK. Mae yr llwybrau hyn yn dylanwadu ar brosesau niwronaidd lluosog, gan gynnwys secretiad hormonau, plastigrwydd synaptig, a thrawsgrifio genynnau (Müller et al., 2015; Holst et al., 2004). Mewn cyferbyniad, mae dadasyl ghrelin yn dangos affinedd sylweddol is ar gyfer GHS-R1a ac nid yw yn actifadu yr rhaeadrau signalau canonaidd hyn, gan danlinellu rôl hanfodol asyleiddio mewn ymgysylltiad derbynyddion (Kaiya et al., 2001).

Mae tystiolaeth sydd yn dod i yr amlwg hefyd yn cefnogi yr cysyniad o agonistiaeth ('*agonism*') rhagfarnllyd yn GHS-R1a, lle mae gwahanol ligandau yn ysgogi cyfluniadau derbynyddion gwahanol sydd yn actifadu llwybrau mewngellol penodol yn ddetholus. Mae yr ffenomen hon yn cynnig potensial ar gyfer dylunio therapïau sydd yn targedu signalau ghrelin yn fwy manwl gywir gyda llai o sgîl-ffeithiau (Smith et al., 2020). Ar ben hynny, mae GHS-R1a yn cael ei fewnoli ac ei ddadsensiteiddio yn rheoledig trwy endocytosis a gyfryngir gan clathrin yn dilyn rhwymo ligand, mecanweithiau sydd yn addasu hyd a arddwysedd signalau derbynyddion yn fanwl (Roh et al., 2016).

Gyda ei gilydd, mae yr mewnwleidiadau moleciwlaidd hyn i rwymo ac actifadu GHS-R1a gan asyl ghrelin yn sail i effeithiau ffisiolegol amrywiol yr hormon, yn enwedig yn rhanbarthau yr ymennydd sydd yn gysylltiedig â gwybyddiaeth, metaboledd, a niwroamddiffyniad.

1.4.7 Rôl o Dadasyl Ghrelin

Er bod dadasyl ghrelin wedi cael ei ystyried yn 'anactif' yn draddodiadol, mae tystiolaeth gynyddol yn awgrymu y gall gael effeithiau ffisiolegol penodol sydd yn annibynnol ar, neu hyd yn oed yn wrthwynebus i, asyl ghrelin. Er enghraifft, mae rhai astudiaethau yn cynnig y gallai dadasyl ghrelin weithredu fel gwrthwynebydd i asyl ghrelin (Broglia et al., 2004; Gauna et al., 2005; Inhoff et al., 2008). I gefnogi hyn, dangosodd Gauna ac ei gydweithwyr, er bod asyl ghrelin yn ysgogi rhyddhau glwcos o hepatocytâu moch cynradd, bod dadasyl ghrelin yn atal yr effaith hon.

Yn ogystal â gwrthwynebiad posibl, mae dadasyl ghrelin yn cael ei gydnabod fwy a fwy fel un sydd â ei weithgaredd biolegol ei hun, o bosibl yn ymyrryd â rhwymo ghrelin asyl i yr GHS-R neu yn addasu ei effeithiau i lawr yr afon yn anuniongyrchol. Un ddamcaniaeth yw bod dadasyl ghrelin yn rhwymo i dderbynnydd sydd heb ei adnabod

ar hyn o bryd, gan sbarduno llwybrau signalau mewngellol sydd yn modiwliddio neu yn gwrthweithio effeithiau ghrelin asyl.

I brofi hyn, gellid defnyddio strategaethau arbrofol fel dad-orfaneiddio derbynyddion (cyfuno asesiadau rhwymo ligand â sgrinio trwybwn uchel o dderbynyddion cysylltiedig â phrotein G (GPCRs) ymgeisydd neu broteinau eraill sydd yn rhwymo i bilen). Ar ben hynny, gall proffilio trawsgrifiadau a phroteomig celloedd sydd wedi eu trin â dadasyl ghrelin yn erbyn asyl ghrelin helpu i nodi rhaeadrau signalau a thargedau moleciwlaidd gwahanol. Mae llwybrau signalau hysbys sydd yn cael eu actifadu gan asyl ghrelin yn cynnwys actifadu PLC a gyfryngir gan GHS-R1a, calsiwm mewngellol cynyddol, actifadu PKC, ac llwybrau AMPK, sydd yn rheoleiddio homeostasis ynni a niwroamddiffyniad. Byddai nodi pa rai o'r llwybrau hyn sydd yn cael eu modiwliddio neu eu hatal yn ddetholus gan ghrelin heb ei asyleiddio yn egluro ei rôl ffisiolegol ac ei ryngweithiadau derbynyddion.

Mae yn hysbys bod asyl ghrelin yn gweithredu trwy GHS-R1a, gan actifadu llwybrau signalau fel PLC, PKC, a AMPK, sydd yn ymwneud â rheoleiddio homeostasis ynni, archwaeth, a niwroamddiffyniad. Byddai pennu a yw dadasyl ghrelin yn modiwliddio neu yn atal y llwybrau hyn yn ddetholus yn rhoi cipolwg allweddol ar ei rôl ffisiolegol a mecanweithiau derbynnydd posibl.

I gefnogi ei weithgaredd annibynnol, dangosodd Fernandez et al. (2016) fod dadasyl ghrelin yn rhwymo i ac yn gweithredu ar is-set benodol o gelloedd cnewyllyn bwaog ('*arcuate nucleus cells*', niwronau wedi eu lleoli yn yr hypothalmws sydd yn chwarae rhan ganolog wrth reoleiddio archwaeth, cydbwysedd ynni, a secretiad hormonau) yn annibynnol ar GHSR. Gan ddefnyddio traciwr fflwroleuol, dangoson nhw nad oedd dadasyl ghrelin yn effeithio ar fwydo cyfnod tywyll (y cyfnod y mae anifeiliaid nosol fel llygod yn naturiol fwyaf egnïol ac yn bwyta yr rhan fwyaf o eu bwyd). Fodd bynnag, fe wnaeth wanhau effeithiau orecsigenig asyl ghrelin a rhoddir yn perifferol (hynny yw, ghrelin a ddanfonir i yr corff y tu allan i yr system nerfol ganolog, fel trwy bigiad isgroenol neu fewn beritoneol, yn hytrach nag yn uniongyrchol i yr ymennydd).

Mae yr canfyddiadau hyn yn cefnogi yr syniad y gall dadasyl ghrelin wrthweithio effeithiau asyl ghrelin trwy dargedu niwronau hypothalamig sydd yn ymwneud â rheoleiddio archwaeth yn uniongyrchol, gan herio ymhellach y syniad o ei anactifedd.

1.4.8 Perthnasoedd Ffisegol o Asyl Ghrelin ac Dadasyl ghrelin

I ddechrau, cafodd asyl ghrelin ei gydnabod yn fwy eang am ei effeithiau ar ysgogi archwaeth a rhyddhau GH (Nakazato et al., 2001). Y tu hwnt i hwn, mae asyl ghrelin hefyd wedi dangos ystod eang o effeithiau ar swyddogaeth gardiofasgwlaidd (Nagaya et al. 2001), cyhyr ysgerbydol (Ranjit, Remmen a Ahn 2022), ffurfio esgyrn ac amlhau osteoblastau (Fukushima et al. 2005), cwsgr (Szentirmai et al. 2007), thymopoiesis (Dixit et al. 2007), heneiddio (Rigamonti et al. 2002) a swyddogaeth yr ymennydd (Andrews et al. 2009; Fukushima et al. 2005; Li et al. 2013). Yn ogystal, canfuwyd bod gan asyl ghrelin effeithiau niwro-amddiffynnol o fewn y CNS (Andrews Z.B et al. 2009; Bayliss et al. 2016). At hynny, mae ghrelin yn chwarae rhan mewn rheoleiddio hwyliau (Lutter et al. 2008), a hyrwyddo plastigrwydd niwral trwy AHN (Hornsby et al., 2016; Kent et al., 2015). Yn fwy penodol o ran ei effeithiau niwro-amddiffynnol, adroddwyd ei fod yn hyrwyddo niwrogenesis a gwybyddiaeth (Chung et al. 2013, Chung et al. 2018, Hornsby et al. 2016). Mae asyl ghrelin hefyd yn cael ei ystyried yn bwysig ar gyfer rheoleiddio homeostasis egni (Tschöp et al., 2000). Yn gyson â hyn, mewn model llygodol (*'murine model'*) o PD, nodweddir anhwylder niwrodirywiol gan golled celloedd dopaminergig yn yr ymennydd (Bertram a Tanzi 2005). Mae effaith niwro-amddiffynnol asyl ghrelin yn cynnwys anwytho resbiradaeth mitocondriaidd a biogenesis yn niwronau dopaminergig y *substantia nigra*, a oedd yn dibynnu ar y rheoleiddir metabolig, AMPK (Bayliss et al., 2016). Yn gyffredinol, mae nifer o astudiaethau wedi dangos bod gan asyl ghrelin effeithiau buddiol ar amryw o systemau biolegol, adolygir effeithiau penodol asyl ghrelin ar AHN gan Buntwal et al. yn 2019.

Nod astudiaeth ddiweddar gan ein grŵp oedd pennu rôl dadasyl ghrelin mewn modiweiddio AHN a chof sydd yn ddibynnol ar y hipocampws (Hornsby et al., 2020). Yn yr astudiaeth hon, cafodd llygod math gwyllt (WT) a llygod GOAT wedi ei ddileu (*'knock out'* (KO)) (GOAT^{-/-}), sydd heb yr ensym sydd ei angen i asyleiddio ghrelin ac felly sydd â lefelau uchel o dadasyl ghrelin ond dim asyl ghrelin, eu trin â dadasyl ghrelin alldarddol. Roedd y dull hwn yn caniatáu asesu effeithiau uniongyrchol dadasyl ghrelin ar niwrogenesis ar draws genoteipiau a helpu i reoli gwahaniaethau posibl mewn lefelau isoform ghrelin mewndarddol. Yn dilyn y driniaeth, dangosodd llygod WT a GOAT^{-/-} ostyngiad sylweddol mewn celloedd lluosogi Ki67+ a niwronau Dcx+ anaeddfed (niwronau newydd eu cynhyrchu a nodir gan fynegiant doublecortin, protein sydd yn ymwneud â mudo niwronau a dangosydd a ddefnyddir yn helaeth o niwrogenesis) yn yr ardal is-gronynnol (*Subgranular zone* (SGZ)) y gyrws danheddog

(*Dentate gyrus* (DG)). Yn ogystal, bu gostyngiad sylweddol yng ngoroesiad celloedd an-niuronol newydd aned oedolion (*adult-born non-neuronal cells*) (BrdU+ / Dcx+) mewn llygod WT a gafodd eu trin â dadasyl ghrelin ac mewn llygod GOAT^{-/-} wedi eu trin â chludydd ('*vehicle*'). Mae yr gostyngiadau yn awgrymu, bod dadasyl ghrelin yn arwain at lai o niwrogenesis a phlastigrwydd yr hipocampws mewn llygod. Ymhellach, dangosodd llygod GOAT^{-/-} ddiffygion mewn cof gofodol sydd yn ddibynol ar hipocampws wrth iddynt cael eu profi gyda yr dasg drysle-Y; a cafodd y canlyniadau eu gwrthdroi gan driniaeth gydag asyl ghrelin. Gyda ei gilydd, mae yr data yn awgrymu y gall y diffygion mewn AHN a chof gofodol o ganlyniad i yr cyfuniad o lefelau dadasyl ghrelin uwch a yr lefelau is o asyl ghrelin (Hornsby et al., 2020). Gan fod canlyniadau blaenorol ein grŵp a yr llenyddiaeth yn awgrymu y gallai yr gymhareb AG:UAG yn y cylchrediad fod yn arwyddocaol o effaith ghrelin, ymchwiliodd Hornsby et al. (2020) os oedd y gymhareb AG:UAG yn plasma gwaed yn gysylltiedig â swyddogaeth wybyddol. Cafodd y gymhareb AG:UAG ei meintoli mewn plasma gwaed (gan ddefnyddio ELISA) o bobl â PD neu PDD ac ei gymharu â rheolyddion iach. O fewn y grŵp â PDD, gwelwyd gostyngiad yn y gymhareb AG:UAG ond ni welwyd newid yn yr AG:UAG mewn grwpiau PD oedd yn gwybyddol cyflawn na yr pobl iach. Mae yr canlyniadau yn awgrymu y gall yr gymhareb AG:UAG yn y cylchrediad fod yn fiofarcwyr diagnostig o PDD ac o bosibl y gellid ei ddefnyddio i fonitro dirywiad gwybyddol mewn bodau dynol. Byddai biofarcwyr prognostig o ddementia sydd yn seiliedig ar waed yn cyflymu treialon clinigol manwl sydd yn seiliedig ar feddyginiaeth a datblygiad therapiwtig.

1.5 Amrywiaeth Lipidau a Pherthnasedd i Glefyd

Mae lipideiddio, sef ymlyniad cofalent rhannau lipid i beptidau neu broteinau, yn addasiad ôl-trosiadol allweddol sydd yn modiweiddio cyfluniad moleciwlaidd, sefydlogrwydd, lleoliad, a rhyngweithio derbynyddion (Resh, 2013). Yng nghyd-destun ghrelin, mae lipideiddio yn cyfeirio yn benodol at asyleiddiad serin-3 gan grŵp n-octanoyl, wedi ei gatalyddu gan GOAT, sydd yn hanfodol ar gyfer ei weithgaredd biolegol trwy yr derbynnydd GHS-R1a. Mae yr asyleiddiad hwn yn gwahaniaethu asyl ghrelin bioactif oddi wrth ei ffurf heb ei asyleiddio, sydd heb affinedd i yr derbynnydd canonaidd ond a all gael effeithiau annibynnol trwy fecanweithiau eraill, llai diffiniedig (Hosoda et al., 2000; Delhanty et al., 2012).

O safbwynt biolegol, mae asyl ghrelin yn ansefydlog yn ei hanfod ac yn agored iawn i ddadasyleiddio gan esterasau sydd yn cylchredeg, fel BChE a phroteinau asyl thioesterau (Satou a Sugimoto, 2012; Mani a Zigman, 2017). Mae yr trawsnewidiad cyflym hwn o AG i UAG yn creu cydbwysedd deinamig sydd yn sensitif i ddylanwadau ffisiolegol a phatholegol. O ganlyniad, mae yr gymhareb AG:UAG yn cael ei chydabod fwy a fwy fel dangosydd a allai fod yn sensitif o newidiadau mewn metaboledd ynni, rheoleiddio endocrin, a niwroddirwyad, gan gynnwys mewn clefydau fel AD a PD (Müller et al., 2015; Stoyanova, 2014).

Mewn PD, mae ghrelin wedi ei gysylltu â llwybrau niwroamddiffynol, gan gynnwys cadwraeth mitochondriaidd, signalau gwrthlidiol, a goroesiad niwronau dopaminergig (Andrews et al., 2009). Gall amhariad asyleiddiad ghrelin mewn PD adlewyrchu neu gyfrannu at namau metabolaidd sydd yn rhagflaenu symptomau modur. Yn nodedig, mae astudiaethau wedi dangos y gall lefelau AG neu gymhareb AG:UAG fod yn llai mewn cleifion â PD, gan awgrymu cysylltiad rhwng prosesau lipideiddio wedi eu newid a patholeg niwrodirwyol (Stoyanova, 2014). Fodd bynnag, mae nodweddu yr newidiadau hyn yn fanwl gywir yn ddibynnol ar argaeledd methodolegol dadansoddol cadarn sydd yn gallu gwahaniaethu rhwng isoffurfiau ghrelin.

Yn dechnegol, mae canfod ghrelin lipidedig yn llawn heriau. Defnyddir imiwnoproffion fel ELISA ac '*electrocemiluminescence*' (ECLIA) yn helaeth at ddibenion clinigol ac ymchwil ond yn aml nid oes ganddynt y manylder sydd ei angen i wahaniaethu rhwng asyl ac dadasyl ghrelin gyda chywirdeb uchel. Mae croes-adweithedd gwrthgyrff, effeithiau matrices, a thueddiad i ddiraddio samplau yn cymhlethu dehongli, yn enwedig mewn plasma neu serwm (Blatnik a Soderstrom, 2011; Delhanty et al., 2012). Mewn cyferbyniad, mae technegau sydd yn seiliedig ar sbectrometreg màs (MS) yn cynnig datrysiad a manylder moleciwlaidd uwch. Mae LC-MS, gan gynnwys llwyfannau LC-MS/MS, yn caniatáu meintoli asyl ac dadasyl ghrelin yn uniongyrchol trwy fonitro cymarebau màs-i-wefr penodol ac amseroedd cadw. Mae astudiaethau wedi dangos cymhwysiad llwyddiannus LC-MS i ganfod ghrelin, yn enwedig pan gaiff ei gyplysu â phrotocolau sefydlogi asyl gan ddefnyddio atalyddion esteras a phrosesu cyflym (Thomas et al., 2022). Mae imiwno-ddyfodiad-MS (IP-MS) yn darparu lefel ychwanegol o ddetholiad trwy alluogi cyfoethogi wedi ei dargedu o isoformau ghrelin cyn dadansoddi MS, a thrwy hynny wella sensitifrwydd a lleihau ymyrraeth matrices. Yn yr un modd, mae MS MALDI-TOF wedi ei archwilio ar gyfer proffilio peptid trwybwn

uchel, er bod ei ddefnyddioldeb mewn astudiaethau lipideiddio ghrelin yn parhau i fod yn gyfyngedig oherwydd amrywioldeb ÷oneiddio a chyfyngiadau sensitifrwydd (Yin et al., 2015).

Nid yw cymhlethdod canfod asyl ghrelin yn unigryw. Gwelir heriau cymharol wrth astudio lipidiad mewn awtoffagi, yn enwedig o ran protein 1 cadwyn ysgafn 3 (LC3) sydd yn gysylltiedig â microdiwbyn. Yn y cyd-destun hwn, mae LC3 lipidedig (LC3-II) wedi ei rwymo yn gofalent i ffosffatidylethanolamin ac yn cysylltu â phlenni awtoffagosom, tra bod ei ffurf heb ei lipideiddio (LC3-I) yn parhau i fod yn cytosolig (Mizushima et al., 2010). Yn bwysig, rhaid i profion wahaniaethu rhwng y cyflyrau lipidiad hyn i fesur fflwcs awtoffagi yn gywir. Yn ymarferol, asesir y gymhareb LC3-II:LC3-I fel arfer gan ddefnyddio blotio Gorllewinol, sydd yn manteisio ar wahaniaethau mewn symudedd electrofforetig rhwng y ffurfiau lipidedig a yr rhai heb eu lipideiddio. Er y gall sbectrometreg màs ganfod peptidau LC3 sydd wedi eu cysylltu â PE a chadarnhau presenoldeb safleoedd lipideiddio, nid yw eto yn cael ei ddefnyddio yn rheolaidd i fesur cymhareb LC3-II:LC3-I oherwydd heriau wrth adfer peptidau hydroffobig, aneffeithlonrwydd ÷oneiddio, a diffyg safonau mewnol priodol (Wilkinson et al., 2015). Felly, blot gorllewinol yw yr safon aur o hyd ar gyfer mesur cymhareb LC3, tra bod MS yn cynnig mewnwelediadau strwythurol cydraniad uchel heb ddisodli dulliau traddodiadol eto. Mae yr cyfyngiad hwn yn cyfateb i yr anawsterau wrth ganfod ghrelin, lle mae gwahaniaethu asyl ghrelin oddi wrth dadasyl ghrelin gan MS neu imiwnoprofion yn wynebu rhwystrau biocemegol a dadansoddol cyfatebol. Mae yr ddau system yn tanlinellu pwysigrwydd hanfodol dylunio profion manwl gywir wrth fesur ffurfiau lipidedig yn erbyn ffurfiau heb eu lipideiddio mewn ymchwil biofarcwyr.

Yn y pen draw, mae gan fesuriad cywir o amrywiadau ghrelin, yn enwedig y gymhareb AG:UAG, botensial sylweddol fel biofarcwyr ar gyfer clefydau metabolaidd a niwrodirywiol. Fodd bynnag, dim ond trwy fireinio strategaethau canfod a dealltwriaeth ddyfnach o sut mae lipideiddio ghrelin yn amrywio ar draws cyflyrau clefyd y bydd y potensial hwn yn cael ei wireddu. Mae safoni protocolau cyn-ddadansoddol, gwella penodolrwydd gwrthgyrff, a manteisio ar arloeseddiadau sbectrometreg màs yn gamau hanfodol tuag at y nod hwn.

1.6 Signalau Ghrelin mewn PD: Perthnasedd Pathoffisiolegol

Y tu hwnt i yw swyddogaethau metabolaidd perifferol, mae asyl ghrelin yn gweithredu effeithiau niwroamddiffynnol canolog sydd yn arbennig o berthnasol i PD. Mae GHS-R1a, y derbynnydd ghrelin, yn cael ei fynegi mewn niwronau dopaminergig o fewn y '*substantia nigra pars compacta*', un o yr prif ranbarthau yr effeithir arnynt gan niwroddirwyd sydd yn gysylltiedig â PD (Andrews et al., 2009). Mae actifadu GHS-R1a yn hyrwyddo biogenesis a swyddogaeth mitochondriaidd trwy signalau AMPK a PGC-1 α , yn gwella clirio awtoffagi, ac yn lleihau straen ocsideiddiol, sydd i gyd yn llwybrau hanfodol sydd yn gysylltiedig â phatholeg PD (Bayliss & Andrews, 2013; Stoyanova, 2014).

Yn arbennig, mae GHS-R1a yn gallu ffurfio heterodimerau gyda derbynnyddion dopamin D1 a D2, gan fodiwleiddio niwrodrosglwyddiad dopaminergig, mecanwaith sydd yn arbennig o berthnasol yn y striatwm a chanol yr ymennydd, lle mae signalau dopaminergig yn cael eu tarfu mewn PD (Schellekens et al., 2013). Mae yr groes-siarad derbynnydd hwn yn awgrymu y gallai lefelau ghrelin neu swyddogaeth derbynnydd newidiol effeithio yn uniongyrchol ar symptomau modur ac an-fodur sydd yn gysylltiedig â PD. Ar ben hynny, mae astudiaethau cyn-glinigol wedi dangos bod gweinyddu ghrelin yn amddiffyn niwronau dopaminergig rhag sarhadau niwrotocsig ('*neurotoxic*') (er enghraifft, MPTP) a gall hyd yn oed wella swyddogaeth modur mewn modelau anifeiliaid PD (Andrews et al., 2009).

Mae tystiolaeth hefyd yn dod i yr amlwg o newidiadau systemig yn dymameg ghrelin mewn cleifion PD. Mae sawl astudiaeth yn adrodd am lefelau asyl ghrelin sydd yn cylchredeg a chymarebau AG:UAG is mewn unigolion â PD, a allai adlewyrchu asyleiddiad ghrelin amhariad neu ddadasyleiddiad cynyddol o dan amodau clefyd (Stoyanova, 2014). O ystyried bod ghrelin yn cael ei gynhyrchu yn bennaf yn y stumog, efallai na fydd y newidiadau hyn yn deillio yn uniongyrchol o niwroddirwyd canolog. Fodd bynnag, gallai effeithiau canolog godi o hyd oherwydd signalau GHS-R1a wedi eu newid, dosbarthiad derbynnyddion, neu athreiddedd rhwystyr gwaed-ymennydd. Yn ogystal, gall prosesau niwrodirwyol effeithio yn anuniongyrchol ar signalau ghrelin trwy lid, camweithrediad awtonomig, neu weithgaredd echel y perfedd-ymennydd wedi'i newid, sydd i gyd yn nodweddion cyffredin mewn PD.

Gyda ei gilydd, mae yr rhyngweithio rhwng bioleg ghrelin a phatholeg PD, trwy reoleiddio mitocondriaidd, deumereu derbynyddion, modiweiddio dopaminergig, ac awtoffagiaeth, yn cefnogi yr ddamcaniaeth y gallai lipideiddio a signalau ghrelin chwarae rhan weithredol yn natblygiad clefydau. Mae hyn yn atgyfnerthu cyfleustodau posibl cymhareb AG:UAG fel biofarcwyr sydd yn wybodus yn fecanyddol nid yn unig ar gyfer diagnosis PD ond hefyd ar gyfer olrhain sifftiau metabolaidd neu niwrogemegol sydd yn gysylltiedig â chlefydau. Gall ymgorffori mewnwelediadau mecanyddol o yr fath mewn strategaethau datblygu biofarcwyr wella penodolrwydd, darparu gwerth diagnostig cynnar, ac yn y pen draw gefnogi dulliau triniaeth mwy personol ar gyfer PD ac anhwylderau niwrodirywiol cysylltiedig.

1.7 Addasrwydd Ghrelin a Biofarcwyr

1.7.1 Cydweddu â Meini Prawf Biofarcwyr

Fel y trafodwyd yn Adran 1.1, rhaid i fiofarcwyr hyfyw cwrdd â sawl meini prawf critigol i gael ei ystyried yn addas ar gyfer cymwysiadau clinigol neu ymchwil. Mae yr rhain yn cynnwys manylder a sensitifrwydd uchel, perthnasedd biolegol a chlinigol, sefydlogrwydd, atgynhyrchadwyedd, hygyrchedd, a yr gallu i adlewyrchu patholeg ganolog pan gaiff ei ddefnyddio mewn samplau perifferol (Pepe et al., 2001; Strimbu & Tavel, 2010; Blennow & Zetterberg, 2018; Mullane & Williams, 2019).

Mae penodolrwydd yn cyfeirio at allu yr biofarcwyr i wahaniaethu yn gywir rhwng unigolion sydd â yr clefyd a yr rhai heb y clefyd, a thrwy hynny leihau canlyniadau positif ffug a sicrhau cywirdeb diagnostig. I ategu hyn, sensitifrwydd yw yr gallu i adnabod y rhai yr effeithir arnynt gan y clefyd yn gywir, gan gynnwys newidiadau patholegol cynnar neu gynnil, gan leihau canlyniadau negatif ffug (Pepe et al., 2001). Mae yr cyfuniad o benodolrwydd a sensitifrwydd yn sail i ddefnyddioldeb clinigol biofarcwyr. Mae atgynhyrchadwyedd a chywirdeb hefyd yn hanfodol, gan fod yn rhaid i fiofarcwyr ddarparu mesuriadau cyson a dibynadwy o fewn ac ar draws labordai, poblogaethau, a thros amser (Mullane a Williams, 2019). Yr un mor bwysig yw perthnasedd biolegol a chlinigol; dylai biofarcwyr adlewyrchu mecanweithiau clefyd sylfaenol neu gydberthyn yn gryf â datblygiad neu ddifrifoldeb clefydau, gan ddarparu mewnwelediadau ystyrlon i batholeg (Blennow a Zetterberg, 2018).

Mae ghrelin, yn enwedig ei isoformau asyl ac dadasyl ghrelin, yn enghraifft o lawer o yr priodoleddau hyn. Mae ei bresenoldeb mesuradwy mewn gwaed perifferol, ei

gyfranogiad mewn llwybrau niwrobiologol a metabolaidd canolog, a thystiolaeth sydd yn dod i yr amlwg o gysylltiad â chyflyrau patholegol amrywiol yn tanlinellu ei botensial fel biofarcwyr ar gyfer clefydau niwrodirywiol a chlefydau eraill. Er enghraifft, nododd Grönberg et al. (2017) ghrelin fel marcwyr prognostig mewn canser y fron, gan amlygu ei berthnasedd clinigol ehangach. Yn yr un modd, dangosodd Alnasser et al. (2020) addewid diagnostig ghrelin mewn cyflyrau llidiol, gan atgyfnerthu ei rôl fel dangosydd o gyflyrau patholegol systemig.

Mae hygyrchedd yn ystyriaeth hollbwysig arall, dylai biofarcwyr fod yn fesuradwy trwy ddulliau lleiaf ymledol neu dim yn ymledol fel samplu gwaed neu boer i hwyluso monitro hydredol (Strimbu a Tavel, 2010). Ar ben hynny, mae sefydlogrwydd yn ystod casglu, prosesu a storio samplau yn hanfodol i gadw cyfanrwydd biofarcwyr a sicrhau meintoli cywir (Delhanty et al., 2012).

Yn olaf, yng nghyd-destun anhwylderau yr system nerfol ganolog fel clefydau niwrodirywiol, mae yn hanfodol bod lefelau biofarcwyr perifferol yn cyfateb yn ystyrlon i batholeg ganolog. Yn aml, caiff y berthynas hon ei modiweiddio gan gyfanrwydd y BBB, sydd yn rheoleiddio cyfnewid sylweddau rhwng yr ymennydd a chylchrediad systemig. Mae biofarcwyr sydd yn croesi yr BBB yn rhwydd neu y mae eu lefelau perifferol yn adlewyrchu newidiadau i yr ymennydd wedi gwella eu defnyddioldeb ar gyfer monitro clefydau (Blennow a Zetterberg, 2018; Mullane a Williams, 2019).

Gyda ei gilydd, mae yr meini prawf hyn, sef penodolrwydd, sensitifrwydd, atgynhyrchadwyedd, perthnasedd biolegol, hygyrchedd, sefydlogrwydd, a yr berthynas ganolog-perifferol, yn ffurfio fframwaith cadarn ar gyfer gwerthuso addasrwydd ghrelin ac ymgeiswyr eraill fel biofarcwyr.

1.7.2 Heriau Casglu a Chadwraeth Samplau

Mae her sylweddol wrth ddefnyddio ghrelin fel biofarcwyr yn deillio o ei ansefydlogrwydd biocemegol. Mae asyl ghrelin yn cael ei dadasyleiddio yn gyflym gan esterasau sydd yn cylchredeg fel BChE (Hosoda et al., 2004; Blatnik a Soderstrom, 2011). Mae meintoli cywir yn gofyn am brotocolau cyn-ddadansoddol llym, gan gynnwys defnyddio atalyddion esterases, oeri ar unwaith, asideiddio samplau gwaed, a phrosesu cyflym (Delhanty et al., 2012). Mae amrywioldeb wrth drin samplau yn cyfrannu at anghysondebau rhwng labordai, gan rwystro safoni a chyfieithu clinigol.

1.7.3 Sensitifrwydd a Phenodolrwydd

Mae astudiaethau clinigol rhagarweiniol yn dangos y gallai lefelau asyl ghrelin plasma a yr gymhareb AG:UAG wahaniaethu PDD oddi wrth PD heb ddementia a rheolyddion sydd yn iach yn wybyddol (Song et al., 2017; Sassi et al., 2022). Fodd bynnag, nid yw yr canfyddiadau hyn yn cael eu hailadrodd yn gyson, yn ôl pob tebyg oherwydd ffactorau dryslyd fel cyd-morbidrwydd metabolaidd (gordewdra, diabetes), sydd yn dylanwadu ar ghrelin sydd yn cylchredeg (Bayliss & Andrews, 2013). Mae angen astudiaethau haenedig ar raddfa fawr sydd yn ystyried y ffactorau hyn i sefydlu sensitifrwydd a manylder ghrelin yn gadarn ar draws is deipiau niwrodirywiol.

1.7.4 Haeniad Cleifion a Chyfnod y Clefyd

Mae clefydau niwrodirywiol yn arddangos amrywioldeb o ran cyflwyniad clinigol a phatholeg, gyda lefelau biofarcwyr yn amrywio o bosibl yn ôl cam neu is deip y clefyd (Postuma et al., 2015; Jack et al., 2018). Gall haenu cleifion yn ôl ffenoteip clinigol a dilyniant y clefyd wella cywirdeb biofarcwyr a pherthnasedd clinigol. Ar gyfer PD, mae deall sut mae lefelau ghrelin yn newid o ei gymharu â dechrau symptomau echddygol a gwybyddol yn hanfodol. Mae samplu hydredol, cyn symptomatig yn parhau i fod yn heriol ond mae yn angenrheidiol i werthuso potensial ghrelin ar gyfer diagnosis cynnar (Frisoni et al., 2017; Postuma et al., 2017).

1.7.5 Perthnasedd Biolegol a Pathoffisiolegol

Mae effeithiau niwroamddiffynnol ghrelin, gan gynnwys gwella plastigrwydd synaptig, cefnogaeth mitocondriaidd, a phriodweddau gwrthlidiol, yn cefnogi ei berthnasedd pathoffisiolegol mewn niwroddirwyd (Moon et al., 2009; Xiao et al., 2024). Mae asyl ghrelin yn actifadu GHS-R1a, sydd yn rhyngweithio â niwronau dopaminergig, sydd yn ganolog i batholeg PD. Mae lefelau ghrelin ac argaeledd derbynyddion is wedi eu harsylwi mewn cleifion AD ac maent yn cydberthyn â dirywiad gwybyddol (Akimoto et al., 2013; Spitznagel et al., 2010; Kordonowy et al., 2012).

1.7.6 Cymhareb AG:UAG ac Adlewyrchiad o Gyflwr y Clefyd

Mae yr gymhareb o asyl ghrelin i dadasyl ghrelin o bosibl yn cynnig dangosydd mwy sensitif o aflonyddwch metabolaidd penodol i glefyd na chrynodiadau absoliwt yn unig. Mae yr gymhareb hon yn adlewyrchu cydbwysedd gweithgareddau ensymatig (GOAT, ensymau dadasyleiddio) a chyflwr ffisiolegol. Gall cymhareb AG:UAG wedi ei newid mewn PDD ac AD ddangos camweithrediad niwroendocrin neu fetaboledd ynni, o

bosibl yn gysylltiedig â newidiadau i echelin yr ymennydd-berfedd neu gyfranogiad hypothalamig. Fodd bynnag, mae astudiaethau hydredol sydd yn asesu yr gymhareb hon yn uniongyrchol mewn carfanau dementia yn brin ac yn ffurfio maes hanfodol ar gyfer ymchwiliad yn y dyfodol.

1.7.7 Mesuriadau Canolog yn erbyn Perifferol ac Ystyriaethau BBB

Er bod ghrelin yn cael ei syntheseiddio yn bennaf yn perifferol, mae ei effeithiau canolog yn dibynnu ar gludiant ar draws y BBB trwy fecanweithiau dirlawn (Diano et al., 2006). Yn aml, mae cyfanrwydd y BBB yn cael ei beryglu mewn PD ac AD datblygedig (Lau et al., 2024), gan amharu o bosibl ar y gydberthynas rhwng lefelau ghrelin perifferol a gweithgaredd y system nerfol ganolog. Mae hyn yn cymhlethu dehongli ac yn awgrymu bod angen asesu statws y BBB a chydberthyn ghrelin plasma â marcwyr neu ganfyddiadau delweddu penodol i yr CNS.

1.7.8 Dehongladwydd Clinigol a Photensial Cyfieithu

Er gwaethaf y cymhlethdodau hyn, mae gan ghrelin addewid cyfieithu. Mae yn fesuradwy trwy samplu gwaed lleiaf ymledol, mae ganddo weithredoedd CNS sydd wedi eu nodweddu yn dda, a gellir addasu ei lefelau trwy ymyriadau ffarmacolegol neu dietegol. Gall dehongli clinigol wella pan gaiff mesur ghrelin ei integreiddio i baneli aml-fiofarcwyr, gan gyfuno cadwyn ysgafn niwroffilament (NfL, protein cytosgerbydol sydd yn cael ei ryddhau ar ôl anaf i acsonau), tau, a marcwyr llidiol, gan wella cywirdeb diagnostig mewn cyflwyniadau dementia cymhleth neu gymysg (Janelidze et al., 2020; Thijssen et al., 2020).

1.7.9 Cymhariaeth â Biofarcwyr Gwaed Sefydledig

Mewn cyferbyniad â biofarcwyr clasurol fel A β , tau, ac NfL, sydd yn olrhain niwroddirwyd strwythurol yn agos, mae ghrelin yn adlewyrchu newidiadau niwroendocrin-metabolaidd systemig. Er y gall hyn leihau penodolrwydd clefydau, mae yn cynnig cyfle i ganfod newidiadau systemig cynnar sydd yn cyn niwroddirwyd amlwg. Ar ben hynny, yn wahanol i asesiadau tau wedi ei ffosfforyleiddio (pTau) neu A β sydd yn gofyn am lwyfannau hynod sensitif fel SIMOA (*'Single Molecular Array'*) neu sbectrometreg màs, gellir mesur isoformau ghrelin gan ddefnyddio imiwnopofion mwy hygyrch, er bod penodolrwydd a sefydlogrwydd isoform yn parhau i fod yn rhwystrau.

1.7.10 Crynodeb

Mae ghrelin yn cwrdd â nifer o feini prawf biofarcwyr craidd, yn enwedig perthnasedd biolegol a hygyrchedd, ond mae yn wynebu heriau sydd yn gysylltiedig â sefydlogrwydd, atgynhyrchadwyedd, dehongladwyedd a safoni. Gall y gymhareb AG:UAG wasanaethu fel paramedr mwy ystyrlon yn ffisiolegol na chrynodiadau absoliwt o ghrelin. Er ei bod yn annhebygol y bydd yn disodli biofarcwyr AD neu PD sefydledig, gallai ghrelin ychwanegu at ganfod cynnar a diagnosis gwahaniaethol o fewn strategaethau aml-farcwyr. Mae cynnydd yn y dyfodol yn dibynnu ar ddilysu trylwyr, cysoni protocolau mesur, ac ymgorffori mewn astudiaethau clinigol hydredol.

1.8 Technegau Canfod ar gyfer Isoformau Ghrelin

1.8.1 Gofynion Dadansoddol ar gyfer Mesur Cymhareb AG:UAG

Mae meintioli cywir y gymhareb AG:UAG yn hanfodol ar gyfer gwerthuso potensial biofarcwyr rhywogaethau ghrelin mewn clefydau niwrodirywiol. Mae dulliau traddodiadol o fesur asyl ac dadasyl ghrelin, fel ELISA, prawf radioimiwno (RIA), a blotio gorllewinol, yn gyfyngedig o ran sensitifrwydd a detholedd. Fel arfer, mae yr technegau hyn yn methu gwahaniaethu rhwng asyl ac dadasyl ghrelin o fewn yr un sampl ac ni allant wahaniaethu rhwng rhywogaethau wedi eu asyleiddio â hydaau cadwyn asid brasterog amrywiol. Mae yr cyfyngiad hwn yn rhannol oherwydd targedu imiwnogenig terfynellau peptid (terfynellau N neu C fel arfer) tra bod yr addasiad asyl ar Ser3 yn imiwnogenig yn wael ac yn anodd ei ganfod gan ddefnyddio dulliau safonol sydd yn seiliedig ar wrthgyrff.

O ystyried y gall gwahanol isoformau ghrelin gael effeithiau biolegol gwahanol, mae angen platfform dadansoddol mwy datblygedig a sensitif i feintioli yr gymhareb AG:UAG yn ddibynadwy ac i nodweddu yr rhan asid brasterog sydd yn rhwymo i asyl ghrelin. Dim ond trwy ddefnyddio dulliau sydd yn seiliedig ar MS y gellir cyflawni manylder a datrysiad o yr fath, ac maen nhw wedi bod yn allweddol wrth adnabod a nodweddu isoformau ghrelin yn y lle cyntaf (Nishi et al., 2005; Gutierrez et al., 2008).

1.8.2 Imiwnoproffion: Defnyddioldeb a Chyfyngiadau Cyfredol

Mae llwyfannau sydd yn seiliedig ar imiwnoproffion, gan gynnwys ELISA ac RIA, yn parhau i gael eu defnyddio yn helaeth ar gyfer meintioli ghrelin oherwydd eu cost gymharol isel, eu trwybwn uchel, ac eu gweithrediad syml. Fodd bynnag, fel yr

amlinellir yn Adran 7.1, mae eu dibyniaeth ar wrthgyrff sydd yn adnabod rhanbarthau terfynol y peptid yn darparu gwybodaeth fach iawn am y gadwyn asyl sydd ynghlwm wrth asyl ghrelin. Mae ELISA masnachol fel arfer yn sengl-blecs, gan ofyn am adweithiau ar wahân ar gyfer ffurfiau asyl ac dadasyl ghrelin, ac nid ydynt yn dal yr amrywiaeth lawn o isoffurfiau sydd yn cylchredeg.

Er bod imiwnopofion llif ochrol yn cynnig potensial ar gyfer cymwysiadau cyflym, pwynt gofal, maent yn rhannu cyfyngiadau penodolrwydd tebyg ac yn aml mae ganddynt sensitifrwydd llai o ei gymharu ag asesiadau labordy. O ganlyniad, er bod imiwnopofion yn werthfawr ar gyfer sgrinio ar raddfa fawr a llifau gwaith clinigol, maent yn gyfyngedig yn eu gallu i ddatrys y nodweddion strwythurol a chyfansoddiadol manwl sydd yn angenrheidiol ar gyfer meintioli AG:UAG manwl gywir wrth ddarganfod biofarcwyr.

1.8.3 Technegau sydd yn Seiliedig ar MS: MALDI-TOF ac LC-MS/MS

Mae MS yn cynnig mwy o bŵer dadansoddol ar gyfer canfod niwropeptidau fel ghrelin. Mae MALDI-TOF ac LC-MS/MS yn gallu darparu manylder uchel, sensitifrwydd, a yr gallu i ddatrys gwahaniaethau strwythurol bach. Mae MALDI-TOF yn ddeniadol am ei allbwn cyflym ac ei hwylustod paratoi samplau; fodd bynnag, mae yn dioddef o effeithiau matrices, datrysiad is, ac atgynhyrchadwyedd signal gwael, yn enwedig mewn matricesau biolegol cymhleth fel plasma. Er y gall MALDI ganfod asyl ac dadasyl ghrelin ar yr un pryd, mae ei allu i ddatrys newidiadau màs sydd yn gysylltiedig â gwahanol gadwyni asid brasterog yn parhau i fod yn gyfyngedig.

Mae LC-MS/MS yn galluogi meintioli manwl gywir trwy fonitro adweithiau lluosog (MRM), dull caffael wedi ei dargedu lle mae ïonau rhagflaenol penodol (sydd yn cynrychioli yr peptid o ddiddordeb) yn cael eu dewis ac eu darnio, a dim ond ïonau darn wedi eu diffinio ymlaen llaw sydd yn cael eu monitro. Mae yr lefel ddwbl hon o ddetholiad, yn gyntaf ar gyfer y moleciwl cyfan, yna ar gyfer darn nodweddiadol, yn gwella manylder a sensitifrwydd yn fawr. Mae MRM yn arbennig o ddefnyddiol ar gyfer canfod biofarcwyr nifer isel mewn matricesau cymhleth fel plasma, gan ei fod yn lleihau sŵn cefndir ac yn gwella atgynhyrchadwyedd. Mae sawl astudiaeth wedi defnyddio LC-MS i feintioli asyl ac dadasyl ghrelin mewn plasma dynol (Rauh et al., 2007; Sidibe et al., 2014), ond nid yw protocol sydd yn caniatáu monitro pob isoform ghrelin ar yr un pryd gan ddefnyddio MRM wedi ei sefydlu eto. Un cymhlethdod sylweddol mewn

llifau gwaith sydd yn seiliedig ar MS yw yr gofyniad i ddadproteineiddio plasma, gan fod proteinau nifer uchel yn ymyrryd ag ansawdd y signal. Mae hyn yn golygu bod angen paratoi samplau cymhleth ac amseroedd hir, a all arwain at golli ac amrywioldeb dadansoddi.

1.8.4 Offer sydd yn Dod i yr Amlwg: BAMS ac MS Imiwnedd-Affinedd

Mae BAMS yn techneg sydd yn dod i yr amlwg a gynlluniwyd i oresgyn rhai o gyfyngiadau llif gwaith MS traddodiadol. Mae BAMS yn caniatáu dadansoddi plasma yn uniongyrchol heb yr angen i dynnu protein yn helaeth. Yn y dull hwn, mae gleiniau magnetig neu bolymerig yn cael eu swyddogaeth â ligandau affinedd i ddal peptidau targed yn ddetholus o fatricsau cymhleth. Ar ôl golchi ac echludo, gellir dadansoddi peptidau a ddaliwyd yn uniongyrchol gan MALDI neu LC-MS. Mae BAMS yn gwella trwybwn ac atgynhyrchadwyedd wrth leihau colli samplau, gan ei wneud yn llwyfan addawol ar gyfer canfod isoformau ghrelin yn sensitif.

Dull addawol arall yw MS imiwnedd-affinedd (IP-MS), sydd yn cyfuno cyfoethogi sydd yn seiliedig ar wrthgyrff â chanfod MS. Mae yr dull hwn wedi dangos llwyddiant sylweddol wrth fesur proteinau nifer isel mewn plasma, fel isoformau A β a thau. Mewn ymchwil i AD, mae IP-MS wedi cyflawni cywirdeb diagnostig o hyd at 90% ar gyfer cymhareb A β 42/A β 40 (Ovod et al., 2017; Janelidze et al., 2021). Y fantais allweddol o IP-MS yw ei allu i gyfuno detholiad cyfoethogi imiwnedd-affinedd â datrysiad strwythurol MS, gan alluogi asesiad ansoddol a meintiol. Mewn cyferbyniad, mae gostyngiad imiwnomagnetig (IMR), sydd yn canfod rhwymo antigen-gwrthgorff trwy newidiadau mewn signalau magnetig heb gyfoethogi peptid ymlaen llaw, wedi dangos gallu cyfyngedig i ganfod gwahaniaethau mewn lefelau A β 42 plasma rhwng cleifion Alzheimer a rheolyddion (Teunissen et al., 2018). Mae yn debyg bod yr anghysondeb hwn yn deillio o benodolrwydd a sensitifrwydd is IMR o ei gymharu ag IP-MS, gan y gall ymyrraeth matrices ac agregu peptid guddio newidiadau cynnil mewn biofarcwyr. Mae canfyddiadau o yr fath yn dangos ansicrwydd ehangach mewn ymchwil biofarcwyr protein, gall hyd yn oed targedau sydd yn berthnasol yn fiolegol fynd heb eu canfod os nad oes gan y dull dadansoddol ddigon o gywirdeb, sensitifrwydd neu gadernid mewn matricesau biolegol cymhleth fel plasma. Gallai cymhwyso IP-MS i ganfod ghrelin ganiatáu cyfoethogi asyl ghrelin wedi ei dargedu wrth gadw ei ran lipid ansefydlog, rhywbeth na all imiwnoproffion traddodiadol ei gyflawni. Hyd yn hyn, mae

yr dull hwn yn parhau i fod heb ei archwilio yn ddigonol ar gyfer ghrelin ond mae yn cynnig addewid sylweddol, yn enwedig pan gaiff ei gyfuno â llif gwaith MRM amblecs.

1.8.5 Pwysigrwydd Strategaethau Cadw a Dal Rhannau Lipid

Ystyriaeth hollbwysig wrth fesur asyl ghrelin yw cadw yr addasiad asyl wedi ei labelu, sef grŵp octanoyl sydd fel arfer wedi ei rwymo i weddillion Ser3 y peptid. Mae yr rhan lipid hon yn agored iawn i hydrolysis ensymatig gan esterasau sydd i yw cael mewn plasma, gan arwain at drosi asyl yn gyflym i dadasyl ghrelin 'ex vivo'. Felly, rhaid i strategaethau cyn-ddadansoddol gynnwys asideiddio sampl ar unwaith, oeri, ac ychwanegu atalyddion esteras (er enghraifft, AEBSF neu PMSF) i atal diraddio. Gall methu â sefydlogi asyl ghrelin yn ystod samplu a storio arwain at danamcangyfrif sylweddol o ei lefelau ffisiolegol.

Mae strategaethau dal sydd yn amddiffyn ac yn cadw yr rhan lipid yn ystod echdynnu, yr un mor hanfodol. Er enghraifft, gall cyfoethogi affinedd gan ddefnyddio gwrthgyrff penodol i lipid neu ddeunyddiau rhyngweithio hydroffobig i gadw yr ffurf asyl yn ffafriol. Yn ogystal, gall technegau SPE gan ddefnyddio colofnau C18 o dan amodau asidig gynnig cydbwysedd rhwng adferiad a chadwraeth grŵp asyl. Gall y strategaethau hyn fod yn hanfodol ar gyfer mesur cymhareb AG:UAG cywir ac ystyrlon yn fiolegol, yn enwedig pan fwriedir y metrigau hyn at ddefnydd clinigol neu ddiagnostig.

1.8.6 Gwersi o Profion Biofarcwyr Niwrodirywiol

Mae datblygu biofarcwyr yn y gwaed ar gyfer clefydau niwrodirywiol, yn enwedig AD, yn darparu fframwaith gwerthfawr ar gyfer gwerthuso yr gofynion dadansoddol a thrawsfudol sydd eu hangen i ddatblygu canfod isoform ghrelin. Mae technegau fel IP-MS wedi bod yn allweddol wrth ganfod y gymhareb plasma A β 42/A β 40 gyda chywirdeb diagnostig uchel. Er enghraifft, cyflawnodd yr prawf a ddatblygwyd gan Ovod et al. (2017), a ddefnyddiodd dreuliad proteolytig peptidau A β sydd yn deillio o plasma cyn dadansoddiad MS, arwynebedd o dan y gromlin (AUC) o 0.89, gan ddangos cydymffurfiaeth gref â mesuriadau yn seiliedig ar CSF. Fodd bynnag, mae yr prawf hyn wedi eu cyfyngu gan fynegiant A β perifferol a dylanwad cyflyrau cydredol fel clefyd cardiofasgwlaidd, a all ddrysus yr gymhareb plasma A β 42/A β 40 (Lewczuk et al., 2010; Pannee et al., 2014; Roeben et al., 2016).

Yn yr un modd, mae mesur isoformau pTau gan ddefnyddio llwyfannau MS a SIMOA wedi rhoi canlyniadau addawol. Ymhlith yr isoformau pTau, pTau217 sydd wedi

dangos y perfformiad gorau, gyda gwerth R^2 o 0.89 rhwng plasma a CSF, o ei gymharu â 0.76 ar gyfer pTau181 a 0.30 ar gyfer pTau231 (Janelidze et al., 2022). Mae yr canfyddiadau hyn wedi eu hailadrodd gan ddefnyddio llwyfannau imiwnoprofion, gyda chyfernodau cydberthynas '*Spearman*' yn amrywio o gymedrol (<0.65) i gryf (>0.86), yn dibynnu ar yr isoform a yr garfan (Bayoumy et al., 2021).

Yn bwysig, mae datblygiadau diweddar wedi gweld y profion ymchwil hyn yn cael eu cyfieithu i ddiagnosteg wedi ei dilysu yn glinigol. Ym mis Mai 2025, rhoddodd Gweinyddiaeth Bwyd a Chyffuriau yr Unol Daleithiau (FDA) awdurdodiad marchnata ar gyfer y prawf cymhareb amyloid (1-42/1-40) Lumipulse® G β -G ac prawf pTau217 Lumipulse® G i yw defnyddio mewn oedolion 55 oed a hŷn sydd yn cyflwyno â nam gwybyddol (FDA, 2025). Dyma yr prawf biofarcwyr gwaed cyntaf a gymeradwywyd gan yr FDA ar gyfer patholeg AD, gan ddangos cyfradd gydymffurfiaeth o 91.7% â statws biofarcwyr PET neu CSF, a gwerth rhagfynegol negyddol o 97.3% pan gaiff ei ddefnyddio mewn unigolion symptomatig (Quanterix, 2025). Mae yr datblygiadau hyn yn cadarnhau y gall biofarcwyr gwaed gyflawni cywirdeb diagnostig perthnasol yn glinigol trwy integreiddio cyfoethogi imiwnoaffinedd a chanfod cydraniad uchel, boed trwy MS neu systemau imiwnoprofion uwch.

Ar ben hynny, mae mesur NfL, wedi dangos ei fod yn ddefnyddiol fel marcwyr cyffredinol o niwroddirwyd. Mae asesiadau sydd yn seiliedig ar SIMOA wedi dangos cydberthynas uchel rhwng crynodiadau CSF a plasma o NfL ($R^2 = 0.89$), a lefelau uwch mewn unigolion â nam gwybyddol ysgafn (MCI) a dementia AD (Gisslen et al., 2016; Preische et al., 2019). Fodd bynnag, mae diffinio gwerthoedd torbwynt diagnostig a dderbynnir yn gyffredinol yn parhau i fod yn heriol oherwydd amrywioldeb rhyng-garfan. Er enghraifft, adroddodd Palmqvist et al. (2020) dorbwyntiau NfL plasma gwahanol iawn ar draws dau garfan: yn astudiaeth BioFINDER-1 Sweden (oedran cymedrig ~72 oed; 57% benywaidd), y torbwynt gorau posibl oedd 41.9 pg/mL (sensitifrwydd 82%, penodolrwydd 32%), tra yn y garfan BioFINDER-2 annibynnol (oedran cymedrig ~70 oed; 53% benywaidd), y torbwynt gorau posibl oedd 26.5 pg/mL (sensitifrwydd 67%, penodolrwydd 38%). Nid oedd data llwyfannu BRAAK ar gael yn unffurf, ond roedd y garfan yn cynnwys unigolion yn rhychwantu camau cyn-glinigol i ddementia AD, gan gynnwys cyfranogwyr positif amyloid heb nam gwybyddol.

Mae yr gwahaniaethau hyn yn tynnu sylw at yr anhawster o bennu pwyntiau torbwynt sydd yn ddilys yn gyffredinol ar gyfer NfL, lle gall trothwy uwch arwain at ddiagnosis o achosion cyfnod cynnar, a gall trothwy is gynyddu canlyniadau positif ffug. Ar ben hynny, er bod NfL yn farciwr sensitif o ddifrod asconiaid, nid yw yn benodol i yr clefyd a gall fod yn fwy gwerthfawr pan gaiff ei ddehongli ar y cyd â biofarcwyr eraill sydd yn berthnasol yn bathoffisiolegol, fel A β neu tau, i wella cywirdeb diagnostig a gwahaniaethu penodol i gam mewn cyd-destunau clefydau niwrodirywiol.

Gyda ei gilydd, mae yr datblygiadau hyn yn darparu gwersi allweddol ar gyfer dilysu dadansoddol isoformau ghrelin. Yn gyntaf, gellir cyflawni gwerth diagnostig uchel trwy strategaethau cyfoethogi wedi eu targedu ynghyd â llwyfannau canfod sensitif a phenodol. Yn ail, mae datrysiad lefel isoform, fel y dangoswyd gyda peptidau pTau217 ac A β , yn hanfodol i ddal amrywiad ystyrion yn fiolegol. Yn olaf, mae derbyniad rheoleiddiol o fiofarcwyr sydd yn seiliedig ar waed yn gofyn am ddilysu cadarn ar draws poblogaethau amrywiol a rheolaeth ofalus o elfen ddryslyd cyn-ddadansoddol a chlinigol. Bydd y mewnwleidiadau hyn yn llywio yr dull a gymerir yn y traethawd ymchwil hwn i ddatblygu technegau sydd yn seiliedig ar sbectrometreg màs ar gyfer meintioli cymhareb AG:UAG a nodweddu amrywiadau asyl ghrelin mewn plasma.

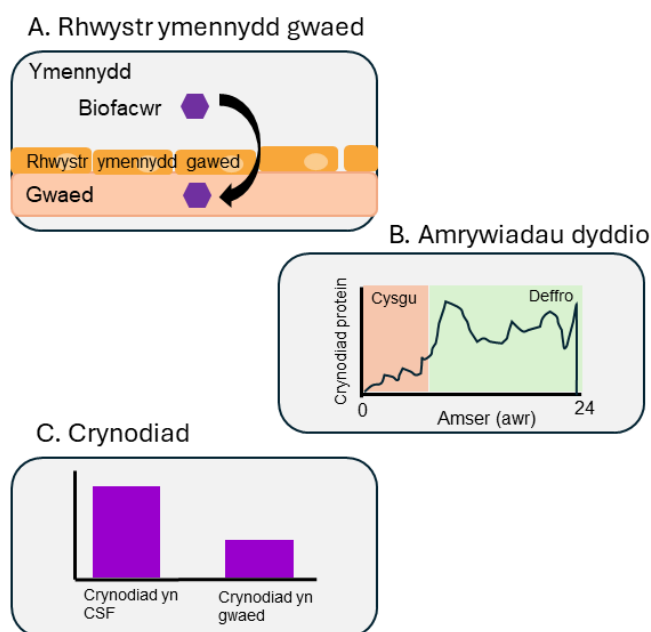
Drwy ddefnyddio yr fframweithiau methodolegol hyn, gall asesiadau isoform ghrelin yn y dyfodol elwa o strategaethau aml-foddol tebyg, yn enwedig y rhai sydd yn cyfuno cyfoethogi imiwnedd â llifau gwaith sefydlogi lipidau a chanfod sglerosis ymledol cydraniad uchel. Bydd datblygu llwyfannau dadansoddol mor gadarn yn hanfodol wrth ddilysu potensial ghrelin fel biofarcwyr yn y gwaed ar gyfer clefyd niwrodirywiol.

1.9 Paratoi Sampl ac Ystyriaethau Dadansoddol

1.9.1 Heriau Hylifau Biolegol Cymhleth

Mae nodi biofarcwyr seiliedig ar waed ar gyfer clefydau yr ymennydd yn peri sawl her (Ffigur 1.4). Er enghraifft, gan fod y CNS yn amgylchedd cyfyngedig, rhaid i fiofarcwyr posibl croesi yr BBB, ac felly, gallent fod yn bresennol mewn crynodiadau is yn y gwaed. Hefyd, gall crynodiad y biofarcwr o ddiddordeb amrywio yn ddyddiol (Hempel et al., 2018). Hefyd, efallai na fydd rhai biofarcwyr yn croesi yr BBB i yr gwaed o wbl (Hempel et al., 2018; Snyder et al., 2014; Zetterberg a Burnham, 2019). Ar ben hynny, mae gwaed coch cyfan yn sylwedd cymhleth, gan ei fod yn cynnwys amrywiaeth eang o gyfansoddion fel proteinau, lipidau, ac asidau niwclëig, a all arwain at amrywioldeb

mewn canlyniadau dadansoddol (Hampel et al., 2018; Lista, Faltraco, Prvulovic a Hampel, 2013).



Ffigur 1.4 Heriau mesur biofarcwyr gwaed ar gyfer anhwylderau CNS.

A: Rhaid i yr biofarcwyr allu croesi yr Gwahanfur gwaed-ymennydd i gael ei ganfod. **B:** Amrywiadau dyddiol mewn lefelau protein. Mae yr gwaed a yr CSF yn dangos amrywiadau mewn lefelau protein yn ystod y dydd. Gan fod lefelau biofarcwyr yn gallu cyrraedd eu lefelau uchaf ar adegau amrywiol o yr dydd yn y CSF a yr gwaed, mae angen asesu yr biofarcwyr pryd fyddai ar ei uchaf neu mae angen i yr prawf i fod yn ddigon sensitif i ganfod lefelau isel. **C:** Amrywiad o yr cryniad. Gall lefelau yr biofarcwyr amrywio rhwng y gwaed a yr CSF, mae lefelau yr plasma yn aml yn is (Addaswyd o Hampel et al., 2018).

Yn y gwaed, gall fod gwrthgyrff heteroffilig (sef gwrthgyrff mewndarddol sydd yn adweithio â gwrthgyrff prawf imiwnocemegol i fesur y biofarcwyr) a allai o bosibl arwain at ganlyniadau anghywir. Mae yr gwrthgyrff hyn yn peri llai o broblem mewn samplau CSF, gan fod lefelau gwrthgyrff yn llawer is (Zetterberg a Burnham, 2019). Ar ben hynny, gall biofarcwyr gwaed hefyd gael eu diraddio yn yr afu neu yn uniongyrchol yn y plasma gan wahanol broteasau, gan effeithio eto ar eu canfod a eu meintoli (Hampel et al., 2018). Problem arall yw cyd-bresenoldeb clefydau niwrodirywiol ag anhwylderau anadlol, rhiwmatig a chardiofasgwlaidd eraill. Gallai hyn effeithio faint o brotein a ganfyddir mewn plasma o ei gymharu â chlaf sydd yn dioddef ag un anhwylder yn unig (Henriksen et al., 2014).

1.9.2 Clirio a Symleiddio: Angen am Ddaliad Penodol a Sensitif i Lipidau

Ystyriaeth ddadansoddol hollbwysig ar gyfer canfod asyl ghrelin yw ansefydlogrwydd biocemegol y moleciwl. Mae asyl ghrelin, a nodweddir gan addasiad lipid n-octanoyl hanfodol ar serin-3, yn agored iawn i ddadasyleiddiad ensymatig gan esterasau sydd yn cylchredeg fel BChE (Chen et al., 2015; Kojima et al., 1999). Mae yr diraddiad cyflym hwn yn golygu bod angen defnyddio dulliau casglu samplau arbenigol, gan gynnwys asideiddio ac atal esteras, i gadw yr ffurf weithredol ar gyfer dadansoddi (De Vriese et al., 2004). Felly mae dal asyl ghrelin yn effeithiol yn gofyn am dechnegau dadansoddol sydd yn sensitif i lipidau neu wrthgyrff sydd yn gallu gwahaniaethu rhwng yr isoffurf asyleiddiad.

Yng nghyd-destun cymhlethdod samplau gwaed, mae symleiddio yr matrices trwy glirio cromatograffig neu gyfoethogi dethol cyn dadansoddi yn hanfodol. Defnyddir technegau fel cyfoethogi imiwnoaffinedd neu LC yn aml i leihau sŵn cefndir a gwella sensitifrwydd (Blatnik a Soderstrom, 2011). Mae yr penderfyniad i ddefnyddio clirio cromatograffig yn hytrach nag imiwnopofion uniongyrchol yn dibynnu ar nodau yr prawf, trwybwn, ac offeryniaeth sydd ar gael, gan gynrychioli pwynt penderfyniad technegol allweddol wrth ddatblygu prawf.

1.9.3 Gwrthgyrff Presennol a Chyfngiadau Epitop ar gyfer Asyl Ghrelin

Ffactor sydd yn cyfyngu ar ddatblygiad biofarcwyr asyl ghrelin yw argaeledd a penodolrwydd gwrthgyrff. Mae yr rhan fwyaf o wrthgyrff masnachol yn targedu epitopau peptid nad ydynt yn gwahaniaethu rhwng ffurfiau asyl ac dadasyl ghrelin, a all ddrysu mesuriadau yr isoform biolegol weithredol (Pemberton a Richards, 2008). Mae gwrthgyrff sydd yn adnabod yr addasiad lipid yn llai cyffredin ac yn dechnegol heriol i yw cynhyrchu oherwydd natur fach ac ansefydlog y grŵp asyl.

O ganlyniad, rhaid dilysu asesiadau yn ofalus i sicrhau penodolrwydd ar gyfer asyl ghrelin, gan ddibynnu yn aml ar ddulliau cyflenwol fel MS i gadarnhau hunaniaeth isoform (Cao et al., 2018; Hornsby et al., 2022). Mae yr cyfyngiad epitop hwn yn dangos yr angen am ddulliau dadansoddol aml-foddol sydd yn cyfuno technegau imiwnocemegol a chromatograffig.

1.9.4 Clirio Cromatograffig neu Gyfoethogi Dethol: Pwyntiau Penderfynu Technegol

Rhaid i yr llif gwaith dadansoddol ar gyfer canfod isoform ghrelin gydbwysu sensitifrwydd, manylder ac ymarferoldeb. Gall dulliau o yr gwaelod i fyny sydd yn defnyddio ffracsiynau samplau trwy LC cyn MS gyfoethogi peptidau targed, lleihau effeithiau matrices, a gwella cywirdeb meintiol (Blatnik a Soderstrom, 2011). Fodd bynnag, mae yr dulliau hyn yn cynyddu cymhlethdod yr prawf a yr amser prosesu. Fel arall, mae imiwnoproffion yn cynnig trwybwn uchel ond gallent ddioddef o groes-adweithedd a diffyg manylder isoform heb wahanu cromatograffig ymlaen llaw (Blatnik a Soderstrom, 2011; Pemberton a Richards, 2008). Mae dulliau hybrid sydd yn dod i yr amlwg fel IP-MS yn ceisio cyfuno manteision dal yn seiliedig ar wrthgyrff â datrysiad moleciwlaidd MS (Hornsby et al., 2022).

Mae yr dewis o ddull yn dibynnu ar y cymhwysiad arfaethedig: gall astudiaethau cyfnod darganfod flaenoriaethu sensitifrwydd a gwahaniaethu isofformau, tra gall sgrinio clinigol bwysleisio trwybwn ac atgynhyrchadwyedd.

1.9.5 Datblygu Biofarcwyr o yr Gwaelod i Fyny: O Fodelau ‘*In Vitro*’ i Garfannau Dynol

Mae piblinell biofarcwyr cadarn yn aml yn dechrau gyda modelau mecanistig ‘*in vitro*’ i nodweddu bioleg biofarcwyr, biocemeg isoform, a llwybrau diraddio o dan amodau rheoledig (Chen et al., 2015). Mae yr ddealltwriaeth sylfaenol hon yn llywio dylunio prawf a phrotocolau trin samplau. Wedi hynny, mae prawf yn cael eu optimeiddio mewn matricesau biolegol cymhleth, gan gynnwys plasma a CSF, gyda sylw gofalus i newidynnau cyn-ddadansoddol fel dewis gwrthgeulydd, amser prosesu, ac amodau storio (De Vriese et al., 2004; Blatnik & Soderstrom, 2011). Yn olaf, mae prawf dilys yn cael eu cymhwyso i garfannau dynol sydd wedi eu nodweddu yn dda, gan gynnwys astudiaethau hydredol, i werthuso perfformiad biofarcwyr mewn lleoliadau clinigol (Song et al., 2017; Sassi et al., 2022). Mae yr dull graddol hwn, o nodweddu moleciwlaidd i ddilysu clinigol, yn cyd-fynd â fframweithiau datblygu biofarcwyr sefydledig ac yn cynyddu yr tebygolrwydd o gyfieithu llwyddiannus (Pepe et al., 2001).

I grynhoi, mae cymhlethdodau matricesau biolegol ac ansefydlogrwydd biocemegol isoformau ghrelin yn golygu bod angen llifau gwaith dadansoddol wedi eu optimeiddio yn ofalus gan gydbwysu sensitifrwydd a manylder. Rhaid ystyried yr heriau technegol

hyn ochr yn ochr â ffactorau economaidd ac ymarferol, a fydd yn cael eu harchwilio yn yr adran ganlynol, gan fynd i'r afael â'r gymhariaeth gost rhwng dulliau ELISA a MS, goblygiadau economaidd iechyd, a dichonoldeb cyfieithu clinigol mewn diagnosteg ar raddfa fawr.

1.10 Hyfywedd Economaidd ac Ymarferol

1.10.1 Cymhariaeth Costau: ELISA yn erbyn Dulliau sydd yn Seiliedig ar Sbectrometreg Màs

Mae mabwysiadu biofarcwyr sydd yn seiliedig ar ghrelin yn glinigol yn ddibynnol nid yn unig ar eu cadernid dadansoddol ond hefyd ar ystyriaethau economaidd ac ymarferol. Mae yr adran hon yn gwerthuso costau cymharol llwyfannau prawf cyffredin, goblygiadau economeg iechyd ehangach defnyddio yr biofarcwyr hyn ar raddfa fawr, a yr cydbwysedd hollbwysig rhwng cyfleustodau clinigol a chost-effeithiolrwydd wrth eu cyfieithu i arfer arferol.

Yn y DU, defnyddir asesiadau ELISA yn gyffredin mewn lleoliadau clinigol ac ymchwil oherwydd eu hygyrchedd ac eu rhwyddineb defnydd. Ar gyfer meintioli ghrelin, mae angen citiau ELISA arbenigol ar gyfer mesuriadau asyl ac dadasyl ghrelin. Fel arfer, mae yr citiau hyn yn cael eu cyflenwi gan *Fischer Scientific* ac eu cynhyrchu gan *Bertin Bioreagent*. Mae pob cit 96-ffynnon yn costio tua £574 (Fischer Scientific UK, 2024), a chan fod yr asesiadau asyl ac dadasyl ghrelin yn angenrheidiol i nodweddu rhywogaethau ghrelin yn llawn, mae cost yr adweithydd yn dyblu yn effeithiol i tua £1,148 fesul 96 sampl. Mae yr gost adweithydd hon yn cyfateb i tua £12 y sampl ar gyfer nwyddau traul yn unig, ac eithrio llafur, dibrisiant offer, a chostau cyffredinol. Er bod llwyfannau ELISA angen seilwaith labordy cymharol gymedrol, sydd ar gael yn gyffredin ar draws labordai yr GIG ac academiaidd, gall cost gronnus adweithyddion ar gyfer astudiaethau carfan fawr neu sgrinio clinigol arferol fod yn sylweddol.

Mewn cyferbyniad, mae dulliau sydd yn seiliedig ar MS yn gofyn am fuddsoddiad cychwynnol sylweddol, gydag offerynnau cydraniad uchel yn costio rhwng £250,000 a £450,000 (Cyngor Ymchwil Feddygol, 2020). Fodd bynnag, mae asesiadau MS yn cynnig galluoedd amblecsio, gan ganiatáu meintioli biofarcwyr lluosog ar yr un pryd, a all leihau yr gost fesul sampl pan gaiff ei raddio yn briodol. Mae amcangyfrifon cyfredol yn gosod costau dadansoddi MS rhwng £80 a £250 y sampl yn dibynnu ar gymhlethdod yr asesiad, paratoi yr sampl, a yr allbwn (Baker a Thompson, 2021). Er

gwaethaf costau ymlaen llaw uwch a chymhlethdod technegol, mae dulliau MS yn darparu manylder a sensitifrwydd uwch, gan gyfiawnhau yr buddsoddiad o bosibl mewn lleoliadau lle mae angen paneli biofarcwyr cynhwysfawr.

1.10.2 Goblygiadau Economeg Iechyd mewn Diagnosteg ar Raddfa Fawr

Mae gweithredu asesiadau biofarcwyr ar raddfa fawr yn gofyn am ystyriaeth ofalus o effeithiau economaidd iechyd, gan ymestyn y tu hwnt i gostau asesiadau i gynnwys effeithiau ar ganlyniadau cleifion a dyrannu adnoddau gofal iechyd. Gall canfod clefydau niwrodirywiol yn gynnar ac yn gywir trwy fiofarcwyr sydd yn seiliedig ar ghrelin alluogi ymyriadau therapiwtig amserol ac oedi dilyniant clefydau a thrwy hynny leihau gwariant gofal hirdymor cyffredinol a gwella blynyddoedd bywyd wedi eu haddasu yn ôl ansawdd o bosibl (Pepe et al., 2001; Hampel et al., 2018). Dylai modelau economaidd iechyd integreiddio sensitifrwydd a phenodolrwydd asesiadau, nifer yr achosion o glefydau, ac arbedion cost i lawr yr afon o ddiagnosis cynnar. Er bod technegau sydd yn seiliedig ar MS ar hyn o bryd yn arwain at gostau cychwynnol a gweithredol uwch, gall eu cywirdeb diagnostig gwell gyfiawnhau eu defnyddio mewn poblogaethau arbenigol neu risg uchel. Mewn cyferbyniad, efallai y bydd dulliau sydd yn seiliedig ar ELISA yn fwy addas ar gyfer sgrinio poblogaethau eang oherwydd cost is a symlrwydd gweithredol, er gyda chyfaddawdau posibl o ran manylder dadansoddol a datrys isoform biofarcwyr (Blatnik a Soderstrom, 2011; Pemberton a Richards, 2008).

1.10.3 Potensial Cyfieithu Clinigol a Chydbwysedd Cost-Budd

Mae cyfieithu clinigol llwyddiannus yn dibynnu ar ddewis y platfform cywir ar gyfer y cam cywir o yr llwybr diagnostig. Er bod MS yn cynnig manylder lefel foleciwlaidd a gall wahaniaethu yn ddiamwys rhwng isoformau ghrelin ac addasiadau ôl-gyfieithu, mae llwyfannau imiwnopofion amblecs amgen, fel SIMOA a *Luminex*, yn cael eu defnyddio fwy a fwy mewn labordai ymchwil a diagnostig yn y DU. Mae SIMOA yn galluogi canfod proteinau isel eu niferoedd yn hynod sensitif, tra bod *Luminex* yn hwyluso dadansoddiad ar yr un pryd o nifer o ddadansoddynnau trwy imiwnopofion sydd yn seiliedig ar gleiniau. Yn gyffredinol, mae angen buddsoddiad cyfalaf is ar y ddau nag MS a gallent ddarparu canlyniadau trwybwn uchel o fewn amseroedd prawf byrrach (Sefydliad Cenedlaethol dros Ragoriaeth mewn Iechyd a Gofal [NICE], 2023).

Fodd bynnag, mae yr llwyfannau hyn sydd yn seiliedig ar imiwnoprofion yn rhannu yr un ddibyniaeth ar adnabod gwrthgyrff â ELISA, sydd yn golygu y gall manylder dadansoddol ar gyfer peptidau wedi eu haddasu gan lipidau fel asyl ghrelin fod yn gyfyngedig. O ystyried y cyfaddawdau hyn, gallai dull diagnostig haenog fod yn optimaidd yn economaidd ac yn glinigol: sgrinio cyflym, ar raddfa fawr gan ddefnyddio ELISA neu imiwnoprofion amblecs, ac yna dadansoddiad MS cadarnhaol ar gyfer achosion sydd angen datrysiad isoform manwl (Hornsby et al., 2022). Gallai yr dull hwn gyd-fynd â blaenoriaethau yr GIG ar gyfer gofal cost-efeithiol, sydd yn seiliedig ar dystiolaeth wrth wneud y mwyaf o gywirdeb diagnostig. Er mwyn sicrhau mabwysiadu, rhaid i profion gael eu dilysu yn drylwyr, sicrhau llwybrau ad-dalu, a dangos cyfleustodau clinigol o fewn fframweithiau economaidd iechyd cadarn.

1.11 Sbectrometreg Màs

1.11.1 Trosolwg

Mae MS yn dechneg ddadansoddol hynod sensitif sydd yn pennu yr gymhareb màs-i-wefr (m/z) o foleciwlau wedi eu ïoneiddio. Mewn llif gwaith MS nodweddiadol, caiff dadansoddydd ei (1) drawsnewid o doddiant neu gyfnod solet i ïonau cyfnod nwy gan ffynhonnell ïoneiddio, (2) ei wahanu yn ôl m/z gan ddadansoddwr màs, a (3) ei ganfod i gynhyrchu sbectrwm màs. Mae yr sbectrwm yn arddangos arddwysedd signal yn erbyn m/z ac yn gwasanaethu fel olion bysedd y gellir eu defnyddio ar gyfer adnabod (trwy batrymau màs a darnio union) a meintioli (trwy darddwysedd signal neu gromatogramau ïon wedi eu tynnu).

Defnyddir MS yn helaeth mewn proteomeg a lipidomeg, gan gynnig detholiad uchel, defnydd isel o samplau, a yr gallu i fesur nifer o ddadansoddyddion ar yr un pryd, gan gynnwys isoformau ghrelin. Yn y traethawd ymchwil hwn, cymhwyswyd MS gan ddefnyddio tair platfform: MALDI-TOF, LTQ-Orbitrap, ac ïoneiddiad electrochwistrellu (ESI) trwy '*Nanomate*'.

Paramedrau perfformiad allweddol yw:

- Cywirdeb màs: agosrwydd m/z mesuredig i m/z gwirioneddol (pwysig ar gyfer cyfansoddiad elfennol ac aseiniad hyderus).
- Pŵer datrys: gallu gwahaniaethu rhwng ïonau bron yn isobarig (hanfodol ar gyfer cymysgeddau peptid cymhleth a gwahaniaethu PTM).

- Sensitifrwydd: y swm isaf y gellir ei ganfod gyda signal-i-sŵn derbyniol.
- Ystod ddeinamig a llinoledd: yr ystod y mae yr signal yn gymesur â chrynodiad y dadansoddydd (yn effeithio ar fesur).

1.11.2 Technegau ïoneiddio

Mae ïoneiddiad yn hanfodol gan dim ond moleciwlau â gwefr y mae MS yn eu canfod. Dau ffynhonnell ïon gyffredin a ddefnyddir yn y traethawd ymchwil hwn yw:

- **ESI:** Yn cynhyrchu ïonau â gwefr lluosog trwy chwistrell foltedd uchel, sydd yn ddelfrydol ar gyfer cyplu ag LC ac yn addas ar gyfer peptidau <10 kDa. Mae yn gweithredu mewn modd positif ar gyfer canfod ghrelin.
- **MALDI:** Yn cynhyrchu ïonau â gwefr sengl yn bennaf trwy abladiad laser o grisial matrices-dadansoddydd. Mae MALDI yn ddefnyddiol ar gyfer dadansoddi peptidau cyfan, gan gynnwys ghrelin.

1.11.3 Dadansoddwyr Mäs

Mae offerynnau MS yn gwahanu ïonau yn ôl eu cymhareb m/z gan ddefnyddio ddadansoddwyr amrywiol. Defnyddiodd y traethawd ymchwil hwn:

- Amser Hedfan (TOF): Yn gwahanu ïonau yn seiliedig ar eu hamser hedfan. Wedi ei ddefnyddio gyda MALDI, mae TOF yn darparu sensitifrwydd uchel ac mae yn addas ar gyfer canfod peptid cyfan.
- Trap Ionau Pedrypol a Llinol (LTQ): Wedi ei ddefnyddio ar gyfer hidlo a darnio ïonau.
- Orbitrap: Yn cynnig mesuriadau mäs cywir a chydrianiad uchel trwy osgiliad ïonau mewn maes trydanol, yn ddelfrydol ar gyfer cymysgeddau peptid cymhleth.

1.11.4 Tandem MS (MS/MS)

Mae tandem MS yn darparu gwybodaeth strwythurol trwy ddarnio ïon rhagflaenydd a chofnodi ei sbectrwm ïon darniog. Mae technegau darnio a ddefnyddir yn gyffredin ar gyfer peptidau yn cynnwys daduniad a achosir gan wrthdrawiad (CID) mewn trapiau ïon/pedrypol, daduniad gwrthdrawiadol ynni uwch (HCD) mewn systemau orbitrap, a daduniad trosglwyddo electronau (ETD) ar gyfer PTMau ansefydlog neu gadw

addasiadau ansefydlog. Mae MS/MS yn hanfodol ar gyfer adnabod peptidau, lleoli PTMau a gwahaniaethu amrywiadau asyleiddio o ghrelin.

1.11.5 Tabl Crynodeb o yr llwyfannau Sbectrometreg Mâs a ddefnyddiwyd

Offeryn	Dull ïoneiddio	Dadansoddwyr mâs	Nodweddion Allweddol	Cymhwysiad yn y Traethawd Hir
MALDI-TOF	MALDI (ïoneiddiad meddal)	TOF	Ionau â gwefr sengl, dadansoddiad cyflym, sensitifrwydd uchel, â chymorth matrices	Canfod peptidau AG ac UAG cyfan
LITQ-Orbitrap	ESI (trwy ïoneiddiad pwysedd atmosfferig, API)	Trap ïon llinellol + orbitrap	Mâs cywir, cydraniad uchel, MS/MS trwy CID a tandem-mewn-amser	Dadansoddiad strwythurol a meintïoli trwy LC-MS
Nanomate (ESI)	ESI sydd yn seiliedig ar sglodion (NanoESI)	Cyplu gyda orbitrap	Cyfaint sampl isel, ïoneiddiad ysgafn, yn ddelfrydol ar gyfer dadansoddydd nifer isel	Trwyth uniongyrchol o isoformau ghrelin ar gyfer dadansoddi MS

Tabl 1.2 Tabl Crynodeb: Llwyfannau Sbectrometreg Mâs a Ddefnyddiwyd

1.12 Rhagdybiaethau ac Amcanion

Rhagdybiaeth Gynradd: Mae technegau sydd yn seiliedig ar MS, yn enwedig pan gânt eu cyfuno â strategaethau cyfoethogi fel BAMS a LC-MS, yn darparu llwyfan dadansoddol cadarn ar gyfer canfod amrywiadau ghrelin mewn matricesau clinigol.

1.13 Amcanion Ymchwil

1. Datblygu dull MALDI-TOF a all nodi asyl ac dadasyl ghrelin o fewn yr un sampl.
2. Datblygu dull LC-MS a all ganfod y ddau rywogaeth ghrelin ar yr un pryd.
3. Optimeiddio echdyniad ghrelin o plasma.
4. Datblygu dull MS â chymorth gleiniau a all ganfod ghrelin.
5. Cymharu yr dull sbectrometreg màs â chymorth gleiniau â yr defnydd o ELISA traddodiadol.

1.14 Cyd-destun y Traethawd Hir o fewn Prosiectau Ymchwil Ehangach

Cyfrannodd rhannau o yr gwaith a gyflwynir yn y bennod hon at ymdrechion ymchwil ehangach o fewn ein grŵp a chydweithrediadau cysylltiedig, gan gyfuno ymchwil academiaidd ac astudiaethau cyfieithu. Mae yr bennod hon yn canolbwyntio ar optimeiddio llifau gwaith sbectrometreg màs i alluogi canfod a meintioli rhywogaethau ghrelin, gyda yr nod o hyrwyddo darganfod ghrelin fel biofarcwyr posibl.

Mae allbynnau perthnasol o yr PhD hwn yn cynnwys:

- Erthygl adolygu ar fioleg ghrelin ac ei rolau mewn iechyd yr ymennydd a metabolig, a gyhoeddwyd yn Cells (PMC9280358):

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9280358/>

- Cyfraniad at astudiaeth sydd yn ymchwilio i effaith y diet 5:2 ar niwrogenesis a biofarcwyr systemig (Neurobiology of Aging, PMID: 37987211):

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37987211/>

- Cymryd rhan mewn treial clinigol sydd yn archwilio rolau niwroamddiffynol hormonau sydd yn cylchredeg, gan gynnwys ghrelin, ac eu rhyngweithiadau â chelloedd T sydd yn treiddio i yr ymennydd (ar y gynnydd).

Pennod

2. Deunyddiau a Dulliau

2.1 Deunyddiau

2.1.1 Offer

Cynnyrch	Cyflenwr	Rhif cynnyrch
Pecyn cychwynnol 'QuickPick' gyda theclynnau a tipiau	Catlag + medsystems	QRE-24001SP
Pecyn Tipiau 'Quickpick' 500	Catlag + medsystems	QRE-24500
Dadansoddwr Sbectrometreg Mass Bruker MALDI AutoFlex	Bruker	
Eppendorf ThermoMixer C	Eppendorf	
Pecyn cychwyn BAMS	Adeptrix	C0008
ELISA Dadasyl Ghrelin (bodau dynol)	Bertin	501190
ELISA Asyl Ghrelin (bodau dynol)	Bertin	501160
Plât datblygu dull echludiad micro (' μ Elution') Oasis PST	Oaiss	186004713
Plât Targed MALDI-TOF dur gwrthstaen	Bruker	8280784
Siptipiau ('Ziptips')	Millipore	ZTC185096
Tipiau LoBind (rhwymiad isel) 1-200 μ l	Sorenson	10470T
Tipiau pibed 0.1-10 μ l	Sorenson	23580T
Ffiolau ('vial') cap sgrif Polypropylen Waters 12x32 mm 300 μ l	Waters	186009186
Tipiau LoBind 0.5mL	Eppendorf	022431064
Tiwbiau LoBind 1.5mL	Eppendorf	022431081
Colofn gwahanu 3 μ m Fortis c18(150x2.1mm)		F18-020385190
Tiwbiau VACUETTE® 6 mL K3E K3EDTA	Greiner Bio-one	456038
Colofn Oasis HLB 6 cc Vac, 200 mg o Sorbent ym mhob Colofn, 30 μ m,	Waters	WAT106202
Hidlau Allgyrchol ('Centrifugal Filters') Amicon® Ultra 0.5 mL – 3kDa	Millipore	UFC5003
Hidlau Allgyrchol Amicon® Ultra 0.5 mL – 10kDa	Millipore	UFC5010

Tabl 2.1 Codau offer a chynnyrch.

2.1.2 Adweithyddion a Thoddyddion

Eitem	Cyflenwr	Rhif cynnyrch
Asid 5-sylffosalisylig dihydrad >99%	Sigma Aldrich	5965-83-3
Asid triffliwoasetig, ACS, 99% lleiafswm	Alfa Aesar	76-03-9
Ethanol absoliwt ≥99.8%	VWR Chemicals	64-17-5
Dŵr, HPLC ar gyfer Dadansoddi Graddiant	Fisher Scientific	7732-18-5
Methanol, am HPLC	Fisher Scientific	67-56-1
Asetonitril, gradd HPLC >99.8	Fisher Scientific	75-05-8
Aseton, gradd adweithydd dadansoddol	Fisher Scientific	67-64-1
Asid α-ciano-4-hydrocsicinamig (CHCA)	Sigma Aldrich	28166-41-8
n-dodecyl-β-D-maltosid, gradd UTROL	Merk milipore	324355-1GM
Heli ffosffad byfferog (PBS) 10x PBS	MP biomedical	1960454
Asid hydroclorig 1.18 gradd dadansoddol	Fisher scientific	H/1200/PB15
Amoniwm sitrad deufasig	Sigma Aldrich	09633-100G
Amoniwm bicarbonad	Sigma Aldrich	A6141-5OOG
Byffer ailhydoddi Trypsin	Progema	V542A
Trypsin	Progema	V5118
(4-2-aminoethyl) bensensylffonyl hydroclorid flworid ('4-(2- <i>aminoethyl</i>)benzenesulfonyl fluoride <i>hydrochloride</i> ' AEBSF)	Sigma Aldrich	A8456
Potasiwm clorid	Sigma Aldrich	P9541
DMSO, 99.8% (y DMSO gwreiddiol)	Thermo scientific	67-68-5
DMSO, gradd LC-MS (a ddefnyddir ar gyfer y rhan fwyaf o yr astudiaeth)	Thermo scientific	85190

Tabl 2.2 Adweithyddion a thoddyddion ochr yn ochr â chodau cynnyrch.

2.1.3 Safonau Ghrelin

Pan nodwyd, defnyddiwyd safonau ghrelin ar gyfer meintioli. Isod mae tabl o yr safonau ghrelin a ddefnyddiwyd, gan gynnwys eu strwythurau (Tabl 2.3).

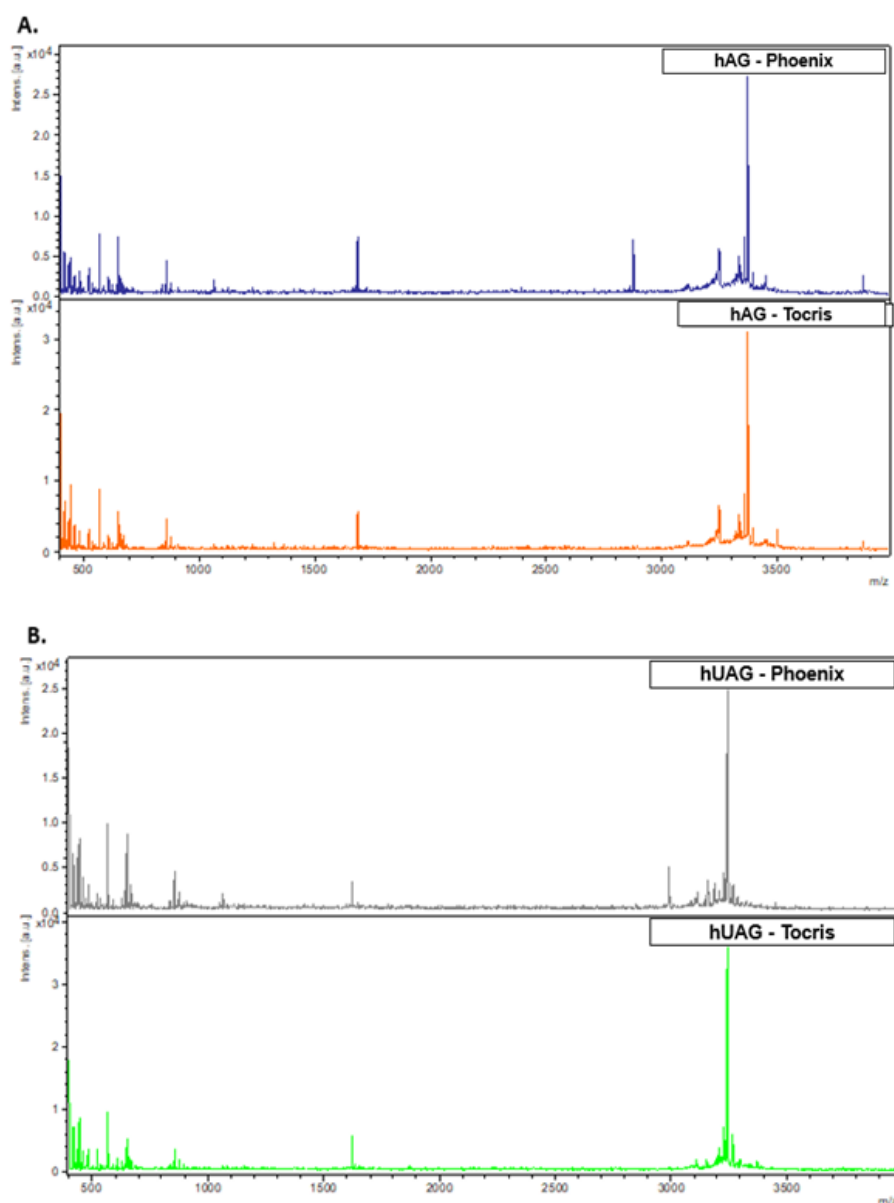
Enw cyffredin	Strwythur	Gwrth-lon	Puredd Peptid	Cyflenwr	Rhif cynnyrch
Ghrelin (bodau dynol)	$\text{Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg}$	TFA	$\geq 95\%$	Tocris	1463
			$\geq 96\%$	Phoenix	031-30
Dadasyl ghrelin (bodau dynol)	$\text{Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg}$	TFA	$\geq 95\%$	Tocris	2260
			$\geq 95\%$	Phoenix	031-32
			$>95\%$	Bachem AG (gyflenwyr gan Cambridge bioscience)	4042605 .1000
Ghrelin (llygoden fawr)	$\text{Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-Ala-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg}$	TFA	$>95\%$	Tocris	1465
			$\geq 97\%$	Phoenix	031-31
Dadasyl ghrelin (llygoden fawr)	$\text{Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-Ala-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg}$	TFA	$>95\%$	Tocris	2951
			$\geq 95\%$	Phoenix	031-33

Tabl 2.3 Cyflenwyr ar gyfer safonau ghrelin

Cafodd peptidau ghrelin eu cyrchu yn wreiddiol drwy fferyllol Phoenix (Unol Daleithiau, UDA), sydd yn adnabyddus am beptidau o ansawdd uchel. Yn ystod y PhD, arweiniodd costau cludo rhyngwladol cynyddol at drawsnewid i Tocris *Bioscience* fel cyflenwr amgen. Er mwyn sicrhau cysondeb a chymhariaeth rhwng y ffynonellau hyn, perfformiwyd dadansoddiad MALDI-TOF ar beptidau Phoenix a Tocris (Ffigur 2.1).

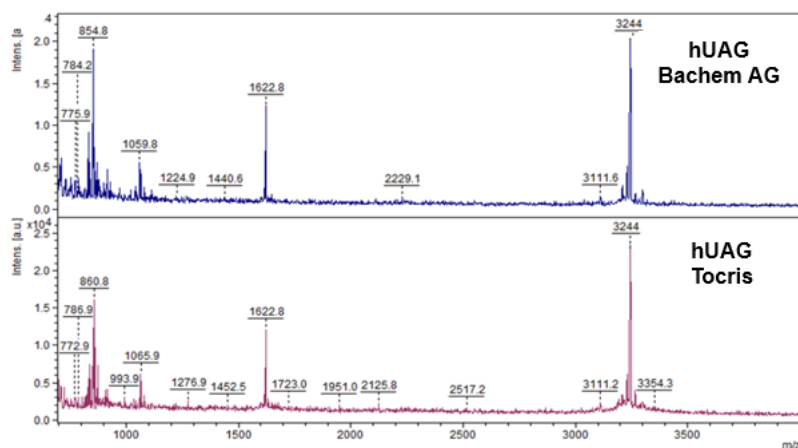
Yn nodedig, mae asyl ghrelin sydd ar gael yn fasnachol wedi ei octanoyleiddio yn bennaf (C8), sydd yn cyfateb i m/z monoisotopig o 3370 ar gyfer asyl ghrelin dynol. Mae yr hyd cadwyn hwn yn cael ei ychwanegu yn ensymatig yn Ser3 ac mae yn hanfodol ar gyfer gweithgaredd biolegol ghrelin. Er bod hydau cadwyn asyl amgen (er enghraifft, C6 neu C10) yn bosibl yn fiolegol ac wedi eu canfod mewn samplau biolegol, nid yw amrywiadau o yr fath fel arfer wedi eu cynnwys mewn safonau sydd ar gael yn fasnachol.

O ystyried bod hyd cadwyn asyl yn effeithio yn uniongyrchol ar bwysau moleciwlaidd ghrelin, mae MALDI-TOF yn arbennig o addas i ganfod gwahaniaethau o yr fath. Mae symudiad o ± 14 Da fesul grŵp CH_2 yn caniatáu datrys rhywogaethau asyl amgen. Yn ein dadansoddiadau, dangosodd paratodau asyl ghrelin Phoenix a Tocris brig yn gyson ar m/z 3370, gan gadarnhau presenoldeb yr addasiad octanoyl disgwyledig a chefnogi cywerthedd y safonau ar draws cyflenwyr.



Ffigur 2.1 Cymhariaeth o safonau ghrelin gan ddau gyflenwr - Phoenix a Tocris. Paratowyd 15ng/mL ghrelin safonol mewn 0.1% TFA ac ychwanegwyd ar darged dur gwrthstaen mewn cymhareb o 1 rhan peptid i 3 rhan matrices CHCA (5 mg/mL, wedi ei hydoddi mewn 40% asetonitril a 0.1% TFA) mewn cyfaint o 1.5 μL . A. hAG. B. hUAG. Darparodd y ddau gwmni safonau o burdeb uchel.

Fodd bynnag, ym mis Tachwedd 2022, terfynodd Tocris cynhyrchiad y peptid dadasyl ghrelin dynol ac felly, roedd angen ffynhonnell arall o yr peptid. Prynwyd peptid dadasyl ghrelin dynol gan gwmni o yr enw Bachem AG a gafodd ei brofi hefyd gan ddefnyddio yr MALDI-TOF i gymharu ei burdeb â safon dadasyl Ghrelin o Tocris (Ffigur 2.2). Yn yr un modd, gyda yr newid o Phoenix i Tocris, ni welwyd unrhyw wahaniaethau arwyddocaol o fewn y safonau dadasyl ghrelin dynol o Bachem AG o gymharu â Tocris.



Ffigur 2.2 Cymhariaeth o hUAG a ddarparwyd gan Bachem AG a Tocris. Paratowyd 15 ng/mL ghrelin safonol mewn 0.1% TFA ac ychwanegwyd ar darged dur gwrthstaen mewn cymhareb o 1 rhan peptid i 3 rhan matrices CHCA (5 ng/mL, wedi ei hydoddi mewn 40% asetonitril a 0.1% TFA) mewn cyfaint o 1.5 µL.

2.2 Casglu Gwaed a Phlasma

Casglwyd gwaed rhoddwr dynol (Pwyllgor Moeseg Ymchwil Ysgol Feddygol Prifysgol Abertawe (SUSM) (RESC), cyfeirnod prosiect 2022-0029) i mewn i diwbiau plasma asid ethylendeuamintetraasetig (*'Ethylenediaminetetraacetic acid'*, EDTA) a eu troi yn ysgafn i sicrhau bod y gwrthgeulydd a yr gwaed wedi eu cymysgu yn drylwyr. Mae EDTA yn gweithredu trwy celadu (*'chelate'*) ïonau calsiwm, a thrwy hynny atal ceulad a chadw cydrannau plasma, sydd yn hanfodol ar gyfer dadansoddi peptidau i lawr yr afon (Lippi, Salvagno, Montagnana, a Guidi, 2006). Ychwanegwyd AEBSF (2 mg/mL) ac ei gymysgu yn ysgafn i sicrhau ataliad o weithgaredd proteinas. Mae AEBSF yn atalydd proteas sydd yn atal proteasau serin, sydd yn angenrheidiol i osgoi dadasyleiddio asyl ghrelin (Blatnik a Soderstorm 2011). O fewn 3 awr o gasglu yr gwaed, cafodd y gwaed ei allgyrchu ar 2,000xg am 15 munud ar $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Ar ôl allgyrchu mae tair haen yn cael eu ffurfio, gyda yr haen uchaf yn blasma (melyn), yr

ail haen yn cynnwys lewcocytâu a phlatennau (gwyn), a yr haen goch isaf yn cynnwys celloedd gwaed coch. Trosglwyddwyd plasma i diwbiau Eppendorf (1.5 mL) a labelwyd pob sampl ac ei storio ar -80°C nes bod angen.

2.3 Echdynnu Ghrelin

Echdynnwyd ghrelin trwy ddyddodiad protein ac yna echdyniad SPE. Disgrifir optimeiddiad dyddodiad protein ac SPE yn 3.2.3 a 3.2.4 ond yn fyr, aeth samplau plasma (1 mL) drwy ddyddodi protein yn gyntaf ar ôl ychwanegu asid sylffosalisylig (500 μL). Yna rhoddwyd samplau ar rew am 30 munud ac yna eu allgyrchu am 40 munud ar 17,500xg. Ar ôl dyddodiad protein, cynhaliwyd SPE gan ddefnyddio colofn cydbwysedd hydroffilig-lipoffilig (HLB) gyda yr protocol canlynol: cafodd y colofnau eu golchi ac eu cyflyru trwy ychwanegu 1 mL 60% asetonnitril mewn 0.1% TFA wedi ei ailadrodd tair gwaith, ac yna 1 mL o hydoddiant halwynog dair gwaith, ac yna llwytho yr samplau. Ar ôl i yr samplau gael eu llwytho ac eu golchi ag 1 mL 5% asetonnitril mewn 0.1% TFA ac yna 1 mL 10% asetonnitril mewn 0.1% TFA, cafodd y samplau eu echludo gyda 500 μL asetonnitril 60% mewn 0.1% TFA.

2.4 Dadansoddiad Ghrelin gan MALDI-TOF

2.4.1 Sbectromedr Màs

Defnyddiwyd y MALDI-TOF Bruker UltrafleXtreme ar gyfer dadansoddi modd adlewyrchydd ïon positif (*'positive ion reflector mode'*) (ceisiwyd astudiaethau mewn modd llinol ac eu nodi lle yn berthnasol). Y laser a ddefnyddiwyd oedd pelydr smart2, fersiwn 2. Cyfeiriwch at Bennod 3.2 am optimeiddiad MALDI-TOF ar gyfer dadansoddiad ghrelin. Paratowyd hydoddiannau a gwanediadau ghrelin safonol mewn 0.1% TFA ac ychwanegwyd ar darged dur gwrthstaen mewn cymhareb o 1 rhan peptid i 3 rhan matrices CHCA (5 ng/mL, wedi ei hydoddi mewn 40% asetonnitril a 0.1% TFA) mewn cyfaint o 1.5 μL . Ychwanegwyd pob sampl tair gwaith ar y targed, gyda dau gaffaeliad (*'acquisition'*) MS yn cael eu cynnal fesul smotyn. Arweiniodd hyn at chwe sbectrwm ar gyfer un sampl. Defnyddiwyd *'Flex analysis'* 3.3. i ddadansoddi yr data, a gafodd ei brosesu yn gyntaf gan ddefnyddio yr swyddogaethau llyfnu a thynnu o yr waelodlin cyn nodi yr brigau. Allforiwyd y brigau cymharol i *'Excel'*, ac yna defnyddiwyd GraffPad Prism i ddadansoddi yr data.

2.4.2 Dull Glanhau yr Targed MALDI-TOF

Ar ôl pob arbrawf, glanhawyd targed y MALDI-TOF. Cafodd y dull lanhau ei hoptimeiddio drwy gydol y gwaith ac nodir drwy yr bennod.

Trefn Glanhau 1:

1. Glanhawyd y mannau sampl / matrices ar wyneb plât targed y MALDI gyda hances bapur gwlyb wedi ei drochi mewn ethanol 70%.
2. Gwlychwyd hances bapur â dŵr ac ei ddefnyddio i lanhau wyneb targed y MALDI.
3. Sychwyd y targed yn llwyr am o leiaf 15 munud ar dymheredd yr ystafell.

Trefn Glanhau 2:

1. Glanhawyd y mannau sampl / matrices ar wyneb plât targed y MALDI gyda hances bapur gwlyb wedi ei drochi mewn ethanol 70%.
2. Gorchuddiwyd y targed gyda haen o TFA 80% wedi ei wanhau mewn dŵr gradd HPLC (100 µL)
3. Golchwyd y targed gyda dŵr wedi ei ddadïoneiddio, yna ei sychu yn sych.
4. Gadawyd i yr targed sychu yn llwyr am o leiaf 15 munud ar dymheredd yr ystafell.

Trefn Glanhau 3:

1. Glanhawyd y mannau sampl / matrices ar wyneb plât targed MALDI gyda hances bapur gwlyb wedi ei drochi mewn ethanol 70%.
2. Trosglwyddwyd plât targed y MALDI i ddysgl grisialu (8x4cm) a gorchuddio wyneb y targed â 70% ethanol. Rhoddwyd yn y bath uwchsain (*'ultrasonic'*) a sonigeiddio am 5 munud.
3. Gorchuddiwyd y targed gyda haen o TFA 80% wedi ei wanhau mewn dŵr gradd HPLC (100 µL).
4. Golchwyd y targed gyda dŵr wedi ei ddadïoneiddio ac ei sychu yn sych.
5. Gadawyd i yr targed sychu yn llwyr am o leiaf 15 munud ar dymheredd yr ystafell.

2.4.3 Data a Chaffael

Defnyddiwyd '*Flex Analysis*' 3.3 ar gyfer dadansoddi data. Roedd prosesu yr sbectrwm màs yn cynnwys llyfnu a thynnu yr llinell sylfaen o yr sbectrwm màs a defnyddio y togol darganfod i adnabod y màsau. Cofnodwyd yr allbwn mewn dogfen '*Excel*' / '*GraphPad Prism*', lle cynhaliwyd dadansoddiad data.

2.4.4 Dadansoddiad ystadegol

Cynhaliwyd yr holl ddadansoddiadau ystadegol gan ddefnyddio '*GraphPad Prism*' (fersiwn 8.0.1). Drwy gydol yr astudiaeth, defnyddiwyd dadansoddiad amrywiant dwyffordd (ANOVA) i asesu effeithiau amodau arbrol ar arddwysedd signal ghrelin. Cymhwyswyd y dull hwn i gymharu dylanwad dau ffactor annibynnol, megis crynodiad asetonitril, cyfansoddiad matrices, neu bamedrau ïoneiddio, a ffurf ghrelin (asyl yn erbyn dadasyl), ar arddwysedd signal MALDI-MS. Galluogodd ANOVA dwyffordd asesu yr prif effeithiau a yr rhyngweithiadau rhwng newidynnau. Lle gwelwyd effeithiau arwyddocaol, defnyddiwyd prawf cymariaethau lluosog Tukey ar gyfer dadansoddiad ôl-hoc i nodi gwahaniaethau grŵp penodol wrth reoli yr gyfradd gwall teuluol. Aseswyd rhagdybiaethau o normalrwydd a homogenedd amrywiant gan ddefnyddio diagnosteg adeiledig Prism, a diffiniwyd arwyddocâd ystadegol fel $p < 0.05$.

Ar gyfer pob arbrawf MALDI-MS, caffaelwyd dau ergyd laser fesul smotyn, ar draws tri smotyn sampl, gan gynhyrchu chwe sbectrwm fesul rhediad. Ailadroddwyd pob rhediad yn annibynnol ar dri diwrnod ar wahân i ystyried amrywioldeb o fewn ac rhwng rhediadau. Oni nodir yn wahanol, cyfartaleddwyd y chwe sbectrwm o bob rhediad i gynhyrchu un gwerth cymedrig fesul sampl y dydd. Yna cymharwyd y cyfartaleddau dyddiol hyn ar draws amodau arbrol. Cyflwynir yr holl ddata graffigol fel cymedr $\pm$ gwall safonol y cymedr (SEM), gan adlewyrchu cywirdeb amcangyfrifon cymedr y grŵp. Ar gyfer tryloywder, pan fydd $N = 3$, mae hyn yn cyfeirio at dri rhediad arbrol annibynnol, sydd yn adlewyrchu amrywioldeb rhwng rhediadau. Mewn achosion lle dim ond amrywioldeb o fewn rhediadau a ddangosir, adroddir N fel 1.

2.5 Dadansoddiad Ghrelin gan ESI-MS/MS

Er mwyn helpu optimeiddio yr amodau ar gyfer LC-MS, fe wnaethom werthuso yr safonau ghrelin yn gyntaf gan ddefnyddio yr Triversa Nanomate (Advion) ynghyd â yr LTQ Orbitrap XL. Gwanhawyd yr holl safonau yng nghyfnod symudol B 20% ar gyfer LC-MS ac eu hychwanegu at blât 96-ffynnon sydd yn cytûn â yr Nanomate a gadwir

ar 10°C. Yn gyntaf roedd angen caffaeliad yn FTMS lle cafodd ynni yr CID ei newid (gan amrywio o 20-23) hyd nes y cafwyd signal sefydlog o yr peptid ghrelin, gan ganiatáu adnabod ïonau yr cynhyrchion MS2 yn ITMS.

2.5.1 Gosodiadau Chwistrellu Nano Ïon Positif

Cyfaint sampl wedi ei chwistrellu: 8 µL.

Cyfaint yr aer i yw allsugno ar ôl y sampl: 1.5 µL.

Pwysedd nwy: 0.4 psi.

Foltedd i yw weithredu: 1.53 kv.

2.6 Dadansoddiad Ghrelin gan LC-MS/MS

Rhywogaethau cyflawn ghrelin: cafodd samplau ghrelin ei gwanhau mewn plasma 0.1% (gan ddefnyddio asetonitril 20% a dŵr) i grynodiad yn yr ystod o 0.08-80 ng/mL (yn dibynnu ar yr arbrawf).

Treuliad trypsin o ghrelin: ar gyfer treuliad gan proteas, ychwanegwyd trypsin (Progema, V5117) at gymhareb proteas:protein ghrelin terfynol o naill ai 1:100 neu 1:20 (w/w). Ar gyfer yr 1:20, ychwanegwyd cymysgedd o 4 ng/mL o drypsin (Progema, V5117), 80 ng/mL o ghrelin a 50 mM amoniwm bicarbonad ac ei roi ar siglwr dros nos ar 37°C ar 500rpm. Ar gyfer yr 1:100, ychwanegwyd cymysgedd o 0.80 ng/mL o drypsin, 80 ng/mL o ghrelin, a bicarbonad amoniwm 50 mM ac ei roi ar siglwr dros nos ar 37°C ar 500rpm. Ar ôl magu dros nos am 16 awr, ychwanegwyd 2% o asid asetig at y cymysgeddau ac eu hallgyrchu am 20 munud ar 9000xg, 37°C.

Ar gyfer datblygiad y ddull, cyfeiriwch at Bennod 4.2.3. Gosodwyd samplau ghrelin (naill ai peptidau cyfan neu wedi eu trypsineiddio) mewn hambwrdd oeri wedi ei osod i 4 °C mewn awtosampler HPLC (Ultimate 3000). Chwistrellwyd y sampl trwy nodwydd ar naill ai cyfaint o 1 µL neu 20 µL ac ei lwytho i yr ddolen sampl, i yw chwistrellu i yr cyfnod symudol o fewn y system HPLC. Os na nodir yn wahanol, roedd y cyfnod symudol A yn cynnwys dŵr, 2% asetonitril, 0.2% asid asetig, a 1% deumethyl swlffocsid (DMSO), tra bod cyfnod symudol B yn cynnwys asetonitril gyda 0.2% asid asetig ac 1% DMSO. Gwahanwyd y peptid ghrelin ar golofn Fertis C18 (3 µM, 150x2.1 mm, F18-020703) ar gyfradd llif o 200 µL/min. Hyd y rhediad oedd 20 munud gyda cham ecwilibreiddio 10 munud cyn cychwyn y rhediad nesaf. Defnyddiwyd

meddalwedd Thermo Xcalibur i nodi yr brigau cywir gyda help sbectra MS2 y rhywogaeth a dargedwyd i gadarnhau adnabyddiaeth ghrelin yn y sampl. Allforiwyd rhestrau yr brig ac eu arddwysedd i Excel, i wneud dadansoddiad ystadegol gan ddefnyddio Graphpad Prism.

2.6.1 Ffynhonnell ESI gydag Amodau Orbitrap

Cyfradd llif y Nwy Gwain: 0 μ L/min.

Foltedd chwistrellu: 0 kv.

Tymheredd capilari: 200 °C.

Foltedd capilari: 39 kv.

2.6.2 Data a Chaffael

Cadarnhawyd y rhywogaeth ghrelin trwy ddadansoddi sbectra MS2 y rhywogaeth darged â llaw gan ddefnyddio meddalwedd Thermo Xcalibur. Allforiodd y data i Excel ar gyfer ei drefnu a chynhyrchu cromliniau graddnodi. Cynhaliwyd dadansoddiad ystadegol gan ddefnyddio Graphpad Prism, gan ganolbwyntio ar ANOVA dwy ffordd gyda dadansoddiad post hoc Tukey, a $P < 0.05$ yn cael eu hystyried yn ystadegol arwyddocaol.

2.7 BAMS

2.7.1 Optimeiddio BAMS ar gyfer Pecyn Cyfeirio

2.7.1.1 Gleiniau Sengl Dal-imiwnedd BAMS ar gyfer Pecyn Cyfeirio

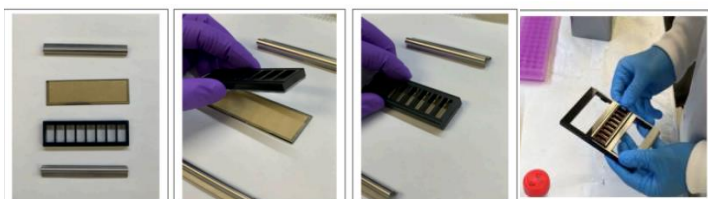
Darparwyd gleiniau cyfeirio BAMS (# 21070002, Adeptrix) o becyn cyfeirio dal-imiwnedd peptid BAMS (SKU C0124, Adeptrix). Ychwanegwyd 15 o leiniau cyfeirio at Eppendorf 1.5mL a eu magu dros nos ar y ThermoMixer ar 4°C a 1,200 rpm gyda yr protein cyfeirio lyoffilig (#21070002, Adeptrix) a gafodd ei ail-hydoddi mewn 100 μ L o ddŵr gradd HPLC. Ar ôl magu dros nos, golchwyd y gleiniau â byffer A (100 mM KCl, 100 mM TrisHCl, pH 8.0) am 10 munud, ac yna ei golchi gyda byffer B (byffer amoniwm bicarbonad 10 mM, pH 8.0) ddwywaith am ddau funud ac yn olaf eu golchi am ddau funud gyda byffer C (dŵr wedi ei ddadiïoneiddio). Cyflawnwyd y camau magu ar y ThermoMixer Eppendorf at 1,200 rpm ar 4°C gyda phob cyfaint golchi yn cynnwys 700 μ L.

2.7.1.2 Gleiniau Sengl Dal-lmiwnedd BAMS ar gyfer Ghrelin

Defnyddiwyd pecynnau gwrthgyrff BAMS ADX086 ac ADX088. Roedd pob pecyn gwrthgyrff unigol yn cynnwys plât 96-ffynnon gyda phob ffynnon yn cynnwys tri glain . Ychwanegwyd sampl i ffynnon (gyda yr tri glain) (ar ôl cael ei golchi mewn 1x PBS am 1 munud) ac ei magu dros nos yn y ThermoMixer Eppendorf ar 4°C a 1100 rpm. Ar ôl magu dros nos, golchwyd y gleiniau mewn cyfaint o 750µL ar 500xg, tymheredd ystafell (RT). Cam cyntaf y golchiad oedd golchi yn byffer A (1 M Potasiwm Clorid, 0.2% n-Dodecyl-D-maltosid, 10% asetnitril mewn 1x PBS pH 7.4) am 10 munud,. Cafodd hyn ei ddilyn gan golchiad yn byffer B (1X PBS, 100 mM potasiwm clorid, 0.2% n-Dodecyl-D-maltosid, pH 7.4) am 10 munud. Am y trydydd golchiad defnyddiwyd byffer C (50mM amoniwm bicarbonad) am 10 munud. Pedwerydd golchiad yn byffer D (10mM amoniwm bicarbonad) am 5 munud. Yn olaf, golchwyd dwy waith gyda dŵr dadïoneiddiad am dau funud. Ar ôl pob cam golchi, trosglwyddwyd y gleiniau yn ofalus i diwb Eppendorf ffres i osgoi cario drosodd a chroes halogi.

2.7.1.3 Gleiniau Adwaith yr Arae

Cafodd sleidiau microffynnon eu cydosod gan ddefnyddio sleid microsgop wedi ei gorchuddio ag aur a gasged silicon i greu arae diffiniedig o ffynhonnau 88 × 26. Er mwyn sicrhau eu bod yn eistedd yn iawn, ychwanegwyd 100µL o ddŵr wedi ei ddadïoneiddio at bob siambr, a chydbwyswyd y sleid wedi ei chydodod â gwrthbwys ac ei allgyrchu ar 355×g am 5 munud. Yn dilyn y allgyrchu, ychwanegwyd tri gleiniau cyfeirio at o leiaf bedair siambr ar wahân. Cyflawnwyd lleoliad y gleiniau trwy osod magnet o dan y sleid, troi yr arae wyneb i waered, ac ei dapio yn ysgafn yn erbyn arwyneb amsugol i ganiatáu i yr gleiniau setlo i mewn i ffynhonnau unigol. Cadwodd atyniad magnetig y gleiniau o fewn y ffynhonnau. Yna tynnwyd y magnet, y clipiau dur di-staen, a yr gasged silicon i gwblhau yr broses o eu trefnu. Dangosir y llif gwaith yn Ffigur 2.3.



Ffigur 2.3 Cydosod sleid siambr ar gyfer gosod gleiniau.

Dewisir ffrâm aml-siambr addas ac ei gosod ar ben yr arae micro-fynnon. Sicreir ei leoliad trwy fewnosod clipiau dur di-staen i mewn i ffrâm y siambr. Mae yr sleid siambr yn cael ei fewnosod yn yr hambwrdd sleidiau yn barod i yw allgyrchu [Addaswyd gyda chaniatâd protocol cit BAMS].

2.7.1.4 Echludo Dadansoddyddion o Araeau Glain trwy Chwistrellwr Matrics MALDI

Cymhwyswyd y matrics i yr arae microffynnon gan ddefnyddio chwistrellwr awtomataidd a gynhyrchodd niwl mân o doddiant asid CHCA. Disodlodd y matrics asidig ddŵr wedi ei ddad-ïoneiddio yn raddol yn y ffynhonnau, gan hwyluso echludo y dadansoddydd o yr gleiniau affinedd. Wrth i yr toddydd anweddu, mae yr dadansoddydd a yr matrics yn cyd-grisialu a ffurfio smotiau arwahanol wedi eu lleoli ar waelod pob ffynnon. Roedd yr hydoddiant matrics yn cynnwys 5 mg/mL CHCA, 50% (v/v) asetonitril, 0.4% (v/v) asid triffllworoasetig (TFA), a 10 mM diammoniwm sitrad. Cynhaliwyd y chwistrelliad ar 30°C, a gosododd y matrics yn syth ar ôl gosod y arae yn y siambr. Ar ôl ei ddyddodi, sychwyd y arae ar dymheredd ystafell am ~30 munud, ac yn ystod y cyfnod hwnnw crebachodd y gleiniau a chrisialu yr matrics. Yna tynnwyd y gleiniau gan ddefnyddio llif nwy nitrogen, ac yna tynnwyd y gasged silicon. Cafodd y arae ei ffotograffio gan ddefnyddio ffôn clyfar gyda fflach i nodi smotiau sydd yn cynnwys dadansoddydd, a oedd yn ymddangos fel cilgant gyda gwagle matrics canolog. Mewn cyferbyniad, roedd smotiau matrics yn unig yn dangos gorchudd unffurf.

2.7.1.5 Mesur Micro-Araeau o Ddadansoddyddion wedi Echludo gan Gleiniau

Mae yr protocol canlynol wedi ei gynllunio ar gyfer meddalwedd caffael data Bruker Ultraflex a Bruker Flex. Mae yr sleid micro-ffynnon yn cael ei fewnosod i addasydd sleidiau plât uchaf ll symudol trwy osod yr addasydd sleidiau ar wyneb glân, fel papur gwyn glân. Ar ôl ei fewnosod yn yr addasydd sleidiau, caiff yr addasydd sleidiau sydd yn cynnwys y micro-ffynnon ei lwytho i yr sbectromedr màs, a chaniateir i wactod sefydlogi.

Pennod

3. Datblygiad o ddull arferol ar gyfer dadansoddi ghrelin gan MALDI-TOF

3.1 Cyflwyniad

Bydd y bennod hon yn datblygu ac yn optimeiddio protocol ar gyfer dadansoddi ghrelin gan MALDI-TOF. Fel yr amlinellwyd ym Mhennod 1, mae gan MALDI-TOF nifer o fanteision o ei gymharu ag ELISA, megis ei sensitifrwydd, cyflymder, a yr defnydd o gyfaint sampl isel. Mae gallu MALDI-TOF i ganfod dadansoddydd gan ddefnyddio cyfeintiau sampl isel yn gwneud y dull hwn yn ddelfrydol ar gyfer canfod ghrelin o samplau plasma, ble mae yn bosib dim ond cyfeintiau bach sydd ar gael. At hynny, mae MALDI-TOF wedi cael ei ddefnyddio yn rheolaidd yn y GIG ers 2010, gan ganolbwyntio yn bennaf ar reoli heintiau microbaidd (Elbehiri et al., 2022), gan gynnwys gwerthuso bacteria gram-bositif a gram-negyddol. O ganlyniad, mae integreiddio MALDI-TOF i arferion clinigol wedi ei sefydlu yn gadarn, gan ei wneud yn arf delfrydol ar gyfer canfod ghrelin fel biofarcwyr yn y gwaed. Yn y bennod hon, cynhelir dadansoddiad MALDI-TOF gan ddefnyddio offeryn Bruker ultrafleXtreme MALDI-TOF. Mewn cyferbyniad, defnyddiodd Guterrez et al. ddadansoddwr Applied Biosystems Proteomics ar gyfer canfod ghrelin trwy MALDI-TOF, tra defnyddiodd Satou et al. (2010) Voyager DE Biospectrometry (Life Technologies, Carlsbad, CA) DE, sydd yn offeryn y fainc. Yn nodedig, mae yr offeryn MALDI-TOF ar y fainc yn cynnig datrasiad o llai na 10,000 o ei gymharu â yr ddyfais Applied Biosystems, sydd yn darparu datrasiad o 5000, tra bod yr offeryn ultrafleXtreme â pŵer datrasiad sydd yn fwy na 40,000.

Mae angen sawl ystyriaeth ofalus wrth optimeiddio dull MALDI-TOF gan gynnwys dewis matrices, cymhwyso matrices wrth paratoi sampl, y gymhareb matrices-i-ddadansoddydd, arddwysedd y laser a maint y smotyn. Bydd y bennod hon yn ymchwilio i yr gwahanol ffactorau hyn i ddatblygu protocol dull arferol ar gyfer dadansoddi ghrelin gan ddefnyddio MALDI-TOF.

3.1.1 Dethol Matrics MALDI

Mae dethol matrices MALDI priodol yn bwysig ar gyfer y broses ddadansoddol. Mae yr matrices yn cynnwys moleciwlau crisialu sydd yn gweithredu fel byffer rhwng y sampl a yr laser. Gall y matrices hefyd helpu i ïoneiddio yr sampl, gan hwyluso ei symudiad ar hyd y tiwb hedfan fel y gellir ei ganfod wedyn. Mae nifer fach o nodweddion dymunol matrices a dderbynnir yn gyffredinol. Un nodwedd o yr fath yw i matrices gael pwysau

moleciwlaidd sydd mor isel â phosib ond dal i fod yn ddigon mawr i fod yn sefydlog o dan wactod ac i anweddu yn hawdd. Yn ail, er mwyn sicrhau amsugnedd cyflym ac effeithlon o yr laser yn ystod arbelydru, mae angen i fatrics gael amsugniad optegol cryf, fel arfer yn yr ystod uwchfioled neu isgoch. At hynny, er mwyn i fatrics gael ei ddefnyddio mewn hydoddiannau dyfrllyd, rhaid iddo hefyd gynnwys grŵp polar. Yn olaf, yn y rhan fwyaf o achosion, mae yr matrices yn cynnwys cymorth gweledol gan ddefnyddio cromoffor. Mae matricesau yn amrywio yn fawr ac o ganlyniad mae ganddynt ystod o wahanol ddefnyddiau, gyda rhai matricesau yn profi yn well ar gyfer lipidau, tra bod eraill yn well ar gyfer proteinau neu beptidau. Matrics a ddefnyddiwyd yn gyffredin gyda peptidau yw CHCA; mae yr matrices hwn yn gweithio yn dda mewn peptidau sydd yn llai na 5000Da (Beavis 1992; Cohen a Chait 1996) ac felly yn addas ar gyfer peptid fel ghrelin. Roedd cyhoeddiadau blaenorol sydd yn canfod ghrelin drwy MALDI-MS yn llwyddiannus wrth ddefnyddio CHCA fel matrices (Gutierrez 2005; Satou et al., 2010). Felly, ar gyfer fy ngwaith, byddaf yn defnyddio CHCA fel matrices ar gyfer dadansoddiad gan MALDI-MS.

3.1.2 Cymhwysiad Matrics MALDI

Yn y llenyddiaeth, mae technegau amrywiol wedi eu harchwilio ar gyfer paratoi samplau ar gyfer dadansoddiad MALDI, a yr dull defnyn sych (*'dried droplet'*) a ddefnyddir amlaf (Gutierrez 2005; Vorm 1994). Mae yr dull hwn yn cynnwys cymysgu hydoddiant matrices dirlawn â chyfaint llai o hydoddiant dadansoddydd. Yna mae defnyn o yr cymysgedd hwn, sydd yn nodweddiadol rhwng 0.3 i 2 μ L mewn cyfaint, yn cael ei ychwanegu ar y plât MALDI, sydd fel arfer yn blât metel gyda safleoedd penodol i gymhwyso sampl. Ar ôl i yr defnyn sychu ar dymheredd yr ystafell, gan arwain at anweddiad llwyr o yr hylif a ffurfio crisialau, mae yr plât MALDI, sydd yn cynnwys y sampl, yn cael ei lwytho i mewn i yr dadansoddwr màs i ddadansoddi ymhellach. Gellir defnyddio dwy dechneg ddilynol benodol ar gyfer cymhwyso matrices: y dulliau haen denau (*'thin-layer method'*) a frechdan (*'sandwich method'*). Yn y dull haen denau, mae defnyn o yr hydoddiant matrices yn cael ei sychu o dan lif ysgafn o aer, ac wedi hynny, mae yr sampl o ddiddordeb yn cael ei roi ar ben y grisial matrices, ac yna sychu eto o dan lif ysgafn o aer. I yr gwrthwyneb, mae yr dull brechdan yn cynnwys cam ychwanegol lle mae defnyn o yr hydoddiant matrices yn cael ei roi ar ben y paratoad haen denau sych, gan arwain at ffurfio 'brechdan' sampl matrices. Anfantais sydd yn gyffredin i yr ddwy dechneg MALDI yw atgynrychioldeb isel rhwng ergydion y laser a

yr dibyniaeth gref ar y dull paratoi sampl. At hynny, gellir cael amrywiadau sbectrol oherwydd y man ergyd sydd ar wyneb y sampl. Yn ogystal, gwelir amrywiad rhwng yr ergydion wrth i yr laser arbelydru smotyn ar y sampl ac felly yn abladau haenau ohono. O ganlyniad, mae homogenedd y matrices-i-sampl ar y targed yn bwysig, ac mae gwelliannau mewn homogenedd yn arwain at fwy o atgynrychioldeb y signal a ganfyddir.

Anhawster arall mewn gwaith meintiol ar gyfer MALDI yw ïoneiddiad cystadleuol (*'competitive ionisation'*) / atal ïon (*'ion suppression'*). Mewn unrhyw gymysgedd, gall fod dadansoddyddion yn bresennol sydd â mwy o affinedd o ran gwefr nag eraill ac sydd felly yn fwy llwyddiannus wrth gystadlu am brotonau sydd ar gael (Duncan, Order a Hunsucker, 2008). O ganlyniad, wrth ddadansoddi nifer o samplau, mae yn bwysig cadw cyfansoddiad y sampl/matrics sampl yn gyson. Pwysigrwydd paratoi sampl yw paratoi y sampl i yr ffurf fwyaf priodol i ddadansoddi, a all leihau cymhlethdod y sampl a thrwy hynny leihau y sŵn yn y cefndir a lleihau y brigau ymyrryd posibl. Rhaid i yr dulliau hyn fod yn atgynrychioldeb iawn gan leihau halogyddion posibl a all achosi mwy o amrywiaeth rhwng samplau ac ataliad ïon. Gall technegau fel LC-MS hefyd gynnwys 'gwahaniad ar-lein' cyn dadansoddi MS; fodd bynnag, anaml mae yn cael ei ddefnyddio yn ystod MALDI-MS, gan fod angen offeryniaeth ychwanegol sydd yn ychwanegu at y cymhlethdod. O ganlyniad, yn ystod MALDI-MS mae dadansoddiadau lluosog yn bresennol ar y targed ar yr un pryd ac felly yn cystadlu am y wefr sydd ar gael yn ystod bob dadsugniad/digwyddiad ïoneiddio (hynny yw saethiad laser). Fel rhan o yr ymchwiliadau yn y bennod hon, byddaf yn ymchwilio i wahanol ddulliau o baratoi yr defnyn sampl ar gyfer dadansoddiad MALDI-MS.

3.1.3 Echdynnu Ghrelin o Samplau Biolegol

3.1.3.1 Sefydlogi Ghrelin wrth Gasglu Gwaed

Yn 2004, sefydlodd Hosoda a Kangawa dull safonol ar gyfer mesur ghrelin a nododd bwysigrwydd paratoi sampl yn briodol oherwydd ansefydlogrwydd asyl ghrelin. O fewn yr astudiaeth hon, aseswyd dibynadwyedd mesuriadau ghrelin mewn plasma, effaith pH ar sefydlogrwydd ghrelin mewn plasma, sefydlogrwydd ghrelin yn ystod rhewiadadmer, a hanner oes ghrelin o yr lygoden fawr. Awgrymodd eu hastudiaeth fod presenoldeb bondiau ester o fewn asyl ghrelin yn achosi ansefydlogrwydd o fewn y peptid, gyda diraddiad posibl yn digwydd naill ai yn gemegol neu yn ensymatig. Mae

diraddiad enzymatig yn debygol o fod oherwydd gweithgaredd esterau mewn samplau sydd yn trosi asyl ghrelin yn ôl i dadasyl ghrelin (Gutierrez et al., 2008). Felly, mae paratoi sampl yn briodol yn hanfodol i sicrhau amcangyfrif cywir o yr gymhareb AG:UAG (Blatnik et al., 2012). Yn yr astudiaeth gan Hosoda a Kangawa, roedd y casgliad gwaed gorau posibl yn cynnwys casglu samplau gwaed mewn tiwbiau EDTA ac allgyrchu yr samplau am 30 munud ar 4°C. Mewn plasma heb ei drin, gostyngodd asyl ghrelin 40% erbyn 6 awr ar ôl ei storio ar 37°C. Yn ystod yr un cyfnod, cynhaliwyd lefelau ghrelin mewn samplau a storiwyd ar 4°C neu ar ôl asideiddio plasma i pH 3-4. Ar gyfer samplau a gafodd bedwar cylchred rhewi-dadmer, ni welwyd unrhyw newidiadau mewn lefelau asyl ghrelin mewn plasma asidiedig tra bod plasma heb ei drin yn dangos gostyngiad mewn lefelau asyl ghrelin o yr ail gylchred rhewi-dadmer ymlaen. Yn olaf, adroddwyd bod hanner oes asyl ghrelin dynol synthetig yn 8 munud ar ôl ei roi yn mewnwythiennol i lygod mawr dan anesthetig (Hosoda a Kawanga et al., 2004).

Ers hynny, cyhoeddodd Blatnik a Soderstrom (2010) ganllaw i sefydlogi asyl ghrelin mewn plasma. Nododd yr astudiaeth fod hanner oes asyl ghrelin mewn plasma tua 45 munud, gyda 50% o asyl ghrelin wedi ei ddiraddio i dadasyl ghrelin erbyn 60 munud. Ers gwaith Hosoda a Kangawa, bu ymchwiliadau i yr defnydd o yr atalydd proteas AEBSF. Darganfydded Blatnik a Soderstorm, os nad oedd AEBSF yn cael ei ychwanegu at waed yna gall arwain at golled ganfyddadwy o asyl ghrelin ac nid oedd ychwanegu asid hydroclorig at AEBSF yn dangos unrhyw welliant yn sefydlogrwydd asyl ghrelin. Daethant hefyd i yr casgliad taw defnyddio samplau o bobl sydd wedi ymprydio ac yna eu trin ag AEBSF oedd yn arwain at y lefelau uchaf o ghrelin. Yn 2016, cynhaliwyd ymchwiliadau pellach i sefydlu yr atalydd esteras mwyaf effeithiol i atal dadasyleiddio (McGovner-Gooch et al., 2016). Yma, fe wnaethon nhw gymharu lefelau asyl ghrelin mewn gwaed a gafodd ei drin ag AEBSF neu fflworoffosffonad methocsi arachidonyl (*Methoxy arachidonyl fluorophosphate*, (MAFP)). Yn gyffredinol, llwyddodd MAFP i gynhyrchu cynnydd deublyg mewn asyl ghrelin o ei gymharu ag AEBSF. Mae yr gwahaniaeth hwn yn codi oherwydd bod AEBSF yn atal proteasau serin sydd yn hollti bondiau peptid yn ddetholus, ond nid yw yn targedu esterasau sydd yn gyfrifol am gael gwared ar addasiadau lipid fel grŵp octanoyl ghrelin. Mewn cyferbyniad, mae MAFP yn atalydd sbectrwm eang o hydrolasau serin, gan gynnwys esterasau ac ensymau sydd yn addasu lipidau fel ffosfolipasau a

hydrolas amid asid brasterog (FAAH), gan ganiatáu iddo atal dadasyleiddio asyl ghrelin yn effeithiol yn ystod paratoi samplau. Fodd bynnag, pan brofwyd hyn gan ein grŵp labordy, arweiniodd ychwanegu MAFP (cyrhaeddodd y stoc mewn methyl asetat ac ei wanhau i mewn i DMSO cyn ei ddefnyddio, ychwanegwyd crynodiad terfynol o 5µM at y waed) at samplau gwaed at haemolysis a fyddai yn effeithio ar ein gwaith yn defnyddio citiau ELISA. Felly rydym yn defnyddio AEBSF yn rheolaidd i sefydlogi ein samplau gwaed, gan gynnwys yr holl samplau plasma a ddisgrifir yn y bennod hon.

3.1.3.2 Safon Fewnol

Offeryn pwysig i wella cywirdeb dadansoddiad meintiol yw ychwanegu ISTD cyn dyddodiad protein. Mae ISTD yn safon o swm hysbys sydd yn cael ei ychwanegu at bob sampl sydd yn cael ei ddadansoddi. Dylai fod gan yr ISTD a ddewiswyd priodweddau cemegol a ffisegol tebyg i rai o yr dadansoddydd o ddiddordeb ac, o ran sbectrometreg màs, dylai fod ag ymateb ìoneiddiad tebyg. O ganlyniad, y safon fwyaf priodol fyddai ffurf sefydlog wedi ei labelu gan isotop o yr dadansoddydd o ddiddordeb (Yang et al., 2019). Mae enghreifftiau yn cynnwys ghrelin wedi ei ddewteradu (*'deuterated'*)([¹³C6] Leu5)-G) wedi ei ychwanegu at blasma mewn hydoddiant 0.1-ppm (Thomas et al., 2021). Er gwaethaf y llwyddiant a ddangoswyd yn y defnydd o ghrelin sefydlog wedi ei labelu gan isotop, mae hyn yn aml yn gostus o ei gymharu â safonau eraill ac yn aml nid yw ar gael yn hawdd. Dull arall yw defnyddio ghrelin o wahanol rywogaethau sydd yn debyg ond nid yn union yr un fath fel ISTD. Er enghraifft, dim ond dau asidau amino sydd yn wahanol rhwng ghrelin o lygod mawr a ghrelin dynol, ac felly, mae yn arddangos nodweddion tebyg ac yn cynnig dewis cost-effeithiol yn lle safon wedi ei labelu gan isotop. I gefnogi hyn, mae nifer o astudiaethau seiliedig ar sbectrometreg màs wedi llwyddo i ddefnyddio ghrelin o lygoden mawr fel ISTD i feintioli ghrelin dynol (Rauh et al., 2007 a Sidibe et al., 2014). Felly, ar gyfer yr arbrofion a ddisgrifir yma, y bwriad yw defnyddio ghrelin o lygod mawr fel ITSD i alluogi meintioli ghrelin dynol.

3.1.3.3 Dyddodiad Protein

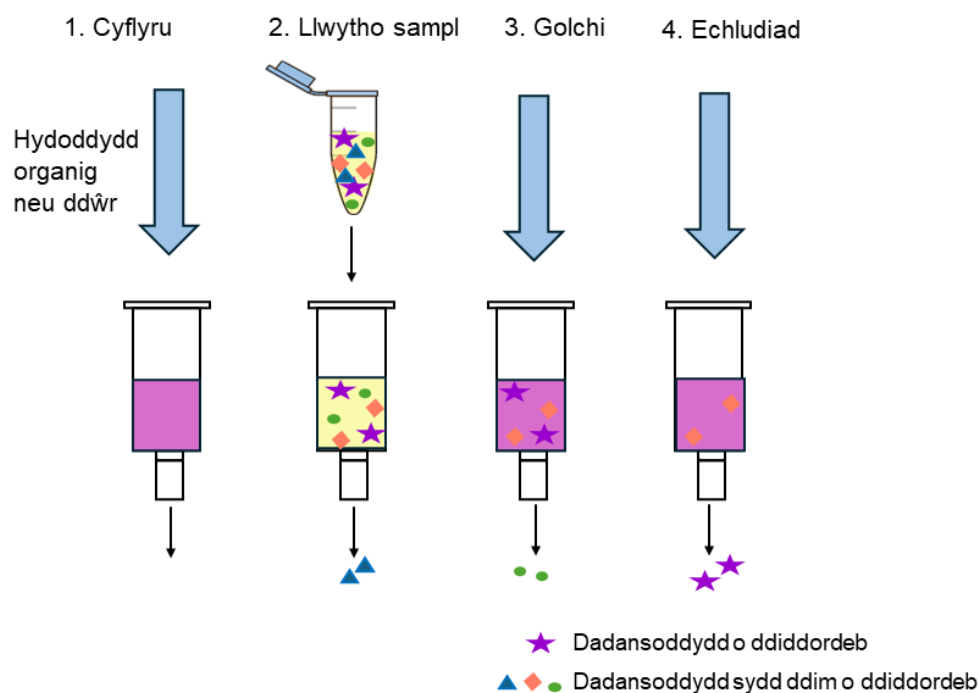
Mae dyddodiad protein yn dechneg gyffredin a ddefnyddir i baratoi samplau biolegol ar gyfer dadansoddi sbectrometreg màs. Mae yr broses yn cynnwys tynnu proteinau mwy o faint a halogyddion eraill o yr samplau, gan arwain at fatrics mwy pur ar gyfer y protein o ddiddordeb. Yn y traethawd ymchwil hwn, archwiliwyd tri dull o dyddodiad protein oedd yn seiliedig ar ymchwil flaenorol gwnaeth ddefnyddio sbectrometreg màs

i feintioli ghrelin. Roedd y dull cyntaf a gyhoeddwyd gan Rauh et al. (2007) yn dangos daliad da o ghrelin, oedd yn cynnwys ychwanegu 50 μ L asetonitril a 50 μ L asid salisylic sylffo (100 mg/mL) fesul 200 μ L o blasma mewn Eppendorf protein rhwymiad isel. Cymysgwyd y sampl a ei allgyrchu ar 4°C ar 36,000xg am 10 munud (Rauh et al., 2007). Cynhaliwyd yr ail ddull dyddodiad protein gan ychwanegu 250 μ L o asid salisylic sylffo (100 mg/mL) i 500 μ L plasma. Cafodd y gymysgedd ei homogoneiddio ar gymysgydd MixMate am 1 munud ar 1500rpm, ac yna ei allgyrchu am 30 munud ar 16,000xg (Sidibe et al., 2014). Yn olaf, yn y trydydd dull gan Eslami et al. (2016) cynhaliwyd dyddodiad protein ac yna dadansoddiad ghrelin gan MS ar ôl ychwanegu hydoddiant asid salisylic sylffo:asetonitril:plasma mewn cymhareb 1:1:4 (v/v/v), ac yna ei gymysgu ac allgyrchu ar 24104xg am 10 munud ar 4°C (Eslami et al., 2016). Llwyddodd y tri dull a ddisgrifir uchod i ddal a chanfod ghrelin yn llwyddiannus. Roedd tueddiad cyffredinol ym mhob un o yr tri dull i gynnwys asid salisylic sylffo yn ystod y cam dyddodiad protein. Yn 2021, cyhoeddwyd papur arall ar ddadansoddiad ghrelin, lle ychwanegwyd 5 μ L o hydoddiant amoniwm hydrocsid 5% at y samplau i atal rhwymiad amhenodol o ghrelin i albwmen neu broteinau mwy o faint eraill yn y plasma. Dilynwyd hyn gan ddyddodiad protein, lle ychwanegwyd 75 μ L o hydoddiant asid salisylic sylffo (100 mg/mL) at 250 μ L o blasma, ac yna ei allgyrchu ar 17,000xg am 10 munud (Thomas et al., 2021). Yn y bennod hon, byddaf yn ymchwilio i yr defnydd o yr dulliau hyn wrth ddatblygu protocol effeithiol ar gyfer echdynnu ghrelin o blasma.

3.1.3.4 SPE

Mae SPE yn dechneg sydd yn galluogi arwahanu proteinau yn seiliedig ar eu priodweddau cemegol a ffisegol. Defnyddir y dechneg yn eang wrth baratoi samplau ar gyfer dadansoddiad gan MS, yn aml i lanhau yr sampl, lleihau cymhlethdod y sampl, a chrynnodi yr dadansoddydd o ddiddordeb (Bladergroen a Van der Burgt, 2015). Bydd priodweddau cemegol a ffisegol cyfansoddyn yn pennu os byddai yn aros yn y cyfnod solet llonydd neu yn y cyfnod hylif symudol yn ystod y broses lanhau. Mae yr gwedd llonydd yn aml yn cael ei becynnu mewn colofn solet ar ffurf colofn, neu golofn fach o fewn plât ffynnon SPE. Mae yr gwedd llonydd ei hun fel arfer yn cynnwys sorbent silica neu bolymer ac mae yn mabwysiadu un o dri dull arsugniad: gwedd gwrthdro/ambegynol, cam arferol/pegynol, neu gromatograffig cyfnewid ïon. Wrth redeg samplau trwy yr golofn, mae yn debygol bydd y dadansoddydd o ddiddordeb yn aros yn y gwedd llonydd os oes ganddo fwy o affinedd ag ef yn hytrach na yr matrices

sampl, a bydd unrhyw gyfansoddion sydd ag affinedd isel i yr gwedd llonydd yn aros yn y gwedd hylif symudol ac yna eu hechludo o yr golofn. Yn achos proteinau a pheptidau, y dull SPE a ddefnyddir fwyaf yw yr wedd wrthwynebol ('reverse phase'). Gellir gweld y broses gyffredinol o SPE yn Ffigur 3.1.



Ffigur 3.1 Camau SPE.

1. Cyflyru yr golofn. 2. Llwytho yr sampl 3. Golchi yr golofn i gael gwared o yr halogyddion. 4. Echludiad y dadansoddydd o ddiddordeb.

Mae SPE yn cynnwys pedwar cam; mae yr cam cyntaf yn cynnwys cyflyru neu ecwilibreiddio yr toddydd i wlychu yr sorbent. Yr ail gam yw llwytho yr sampl ar y golofn, er enghraifft, y plasma, gyda yr dadansoddydd o ddiddordeb. Yn ystod y cam hwn, os oes gan y dadansoddydd o ddiddordeb affinedd uchel â yr gwedd solet, yna bydd yn rhwymo iddo, yn ogystal â nifer o gyfansoddion amgen nad ydynt o ddiddordeb. Mae yr trydydd cam yn cynnwys golchi i gael gwared ar rai o yr amhureddau hyn, ac yna casglu yr dadansoddydd o ddiddordeb yn ystod y cam echludiad terfynol. Mae ymchwil sydd yn defnyddio technegau SPE wrth echdynnu ghrelin yn dyddio i yr 2000au, pan ddefnyddiwyd colofn Sep-Pak C18 mewn sawl astudiaeth (Hosoda 2003; Kojima et al., 2000; Nishi et al., 2005). Mae yr defnydd o golofnau C18 wedi parhau yn gyffredin o fewn ymchwil ghrelin, gyda phapurau yn dal i adrodd eu defnydd tan 2012 (Akamizu et al., 2012). Mae yr ddulliau hyd yma wedi defnyddio colofnau tebyg gyda gwahanol

fathau o weddau symudol ac echludo. Ar gyfer y gwedd symudol mae rhai wedi geisio hydoddiannau ychydig yn wahanol ond ar y cyfan mae yna consensws o ddefnyddio hydoddiant halwynog â 0.1% TFA sydd yn cadw ghrelin i yr gwedd sefydlog. Dilynr hyn yn gyffredinol gan ddefnyddio asetonitril gyda 0.1% TFA fel y toddydd ar gyfer y cam echludiad. Yn 2021, defnyddiwyd colofnau HLB polymerig wedd wrthwynebol ar gyfer gwahanu ghrelin gyda chymysgedd o asetonitril a dŵr fel echludydd (Thomas et al., 2021). Yn y bennod hon byddaf yn ymchwilio i yr defnydd o yr gwahanol ddulliau hyn i echdynnu ghrelin o sampl plasma cyn dadansoddiad gan MALDI-MS.

I gloi, mae MALDI yn arf ardderchog ar gyfer proteomeg, ond mae angen ystyriaeth ofalus ar gyfer dadansoddiad meintiol, gan gynnwys optimeiddio yr paramedrau arbrofol. Fel yr amlygwyd, mae paratoi sampl yn allweddol bwysig ac mae angen optimeiddio er mwyn gwneud y broses hon yn fwy atgynhyrchadwy

3.1.4 Nodau

Nodau cyffredinol y bennod hon yw datblygu ac optimeiddio:

1. Protocol paratoi sampl ar gyfer echdynnu ghrelin o blasma
2. Protocol MALDI-TOF i ganfod a meintoli ghrelin dadasyl ac asyl sydd yn bresennol mewn plasma.

3.2 Deunyddiau a Dulliau

3.2.1 Dyddodiad Protein

Cyn optimeiddio dyddodiad protein gan ddefnyddio pedwar dull gwahanol, ychwanegwyd 10,000 pg/mL o dadasyl neu asyl ghrelin llygoden fawr at 1000 µL o blasma dynol. Roedd y dull cyntaf a nodwyd gan Eslami et al. (2016) yn cynnwys dyddodiad protein ar ôl ychwanegu 250 µL o asid salisylic sylffo a 250 µL asetonitril i blasma. Yn yr un modd, yn dull Rauh et al. (2007) ychwanegwyd 250 µL o asid salisylic sylffo a 250 µL o gymysgedd 50:50 o ddŵr: asetonitril i yr plasma. Yn y trydydd dull gan Sidibe et al. (2014), ychwanegwyd 500 µL asid salisylic sylffo i blasma. Yn olaf, yn y pedwerydd dull ychwanegwyd 10% asid trichloroasetig (TCA) at blasma, a ddefnyddiwyd yn flaenorol mewn prosiect arall yn seiliedig ar lipidomig/MS. Ar ôl ychwanegu i yr toddyddion fel y nodir uchod, rhoddwyd yr holl samplau o bob dull ar rew am 30 munud ac yna eu hallgyrchu am 40 munud ar 17,500xg. Tynnwyd yr uwchwaddod, yna ei baratoi i rhoi ar darged dur gwrthstaen MALDI fel y disgrifir yn

Adran 3.2.2. Fel arall, cafodd yr uwchwaddod ei lanhau ymhellach gan ddefnyddio SPE, hidlwyr allgyrchol, sychu lawr dan wactod (drwy ddefnyddio 'Speedvac'), neu siptipiau C18. Offer echdynnu cyfnod solet sydd yn seiliedig ar flaen piped yw siptipau C18, sydd yn cynnwys gwely bach o resin cyfnod gwrthdro C18, sydd yn rhwymo peptidau a phroteinau hydroffobig yn ddetholus. Fe eu defnyddir yn gyffredin ar gyfer cymryd i ffwrdd halen a chrynodi samplau cyn sbectrometreg màs neu dechnegau dadansoddol eraill, gan ganiatáu tynnu halwynau a halogyddion eraill yn effeithlon wrth gadw peptidau fel ghrelin.

3.2.2 Paratoi Arwynebau Matrics

Golchwyd y platiau targed MALDI-TOF dur di-staen yn y drefn ganlynol: 1. Sgwrio yn ysgafn gyda methanol 100%, 2. Rhoi dŵr wedi ei ddadioneiddio drosto 3. Sgwrio ag ethanol 100%. Gadawyd y platiau i sychu ar dymheredd ystafell. Paratowyd wyneb y matrics gan ddefnyddio yr dull crisial hedyn ('seed crystal') gyda CHCA (5 mg/mL) wedi ei hydoddi mewn aseton (ac eithrio yn ystod astudiaethau ble mae arwyneb y matrics yn cael eu cymharu, lle cymharwyd y dull grisial hedyn â yr dull defnyn sych). Mae tua 1 µL o hydoddiant matrics yn cael ei smotio ar darged dur di-staen MALDI-TOF, mae yr aseton yn achosi yr matrics anweddu yn gyflym ac felly mae rhaid cwblhau y trosglwyddiad yn gyflym. Caniatawyd i yr matrics dirlawn sychu ar dymheredd yr ystafell cyn i yr plât gael ei fewnosod yn y MALDI-TOF i yw dadansoddi.

3.2.3 Echdynnu Gwedd Solid

Yn draddodiadol, defnyddiwyd colofnau C18 fel dull o buro samplau ac ei 'glanhau'. Ar gyfer y protocol hwn, defnyddiwyd y colofnau C18 neu HLB gyda yr protocol canlynol: Golchwyd pob colofn dair gwaith yn gyntaf gyda 60% asetonitril mewn 0.1% TFA, ac yna eu ecwilibreiddio trwy ychwanegu 3 mL o hydoddiant halwynog dair gwaith. Yna llwythwyd yr uwchwaddod o gam 3.2.1 (500 µL) ar y golofn ac ei olchi ag 1 mL 5% asetonitril mewn 0.1% TFA ac yna 1 mL 10% asetonitril mewn 0.1% TFA, ac yn olaf cafodd y samplau eu echludo gyda 500 µL o 600 µL asetonitril mewn 0.1% TFA.

3.2.3.1 SPE Plât Echludiad Micro

Dull amgen o brofi SPE yn lle colofnau C18 neu HLB traddodiadol oedd defnyddio plât datblygu dull echludiad micro. Mae gan y plât echludiad micro 96-ffynnon fanteision megis siapiau ffynnon hir / teneuach, gan ganiatáu ar gyfer uchder gwely sorbet uwch

gydag arwynebedd mawr. O ganlyniad, mae yr dechneg hon yn ddelfrydol ar gyfer cyfeintiau plasma bach ac mae yn osgoi y cam sychu, oherwydd gall echludo yr sampl i 25 µL gyda chyfaint cychwynnol o 750 µL. Roedd y protocol plât echludiad micro yn cynnwys plasma cymysg 1:1 gyda 4% asid ffosfforig (H_3PO_4) mewn cyfaint terfynol o 750 µL cyn eu llwytho ar y colofnau. Golchwyd y colofnau â chyfaint o 750 µL gyda 5% amoniwm hydrocsid (NH_4OH) ac yna asetnitril 20%, ac yn olaf eu echludo gyda 25 µL 1% TFA mewn 75:25 Asetonitril/ H_2O . Yna dadansoddwyd y sampl gan MALDI MS.

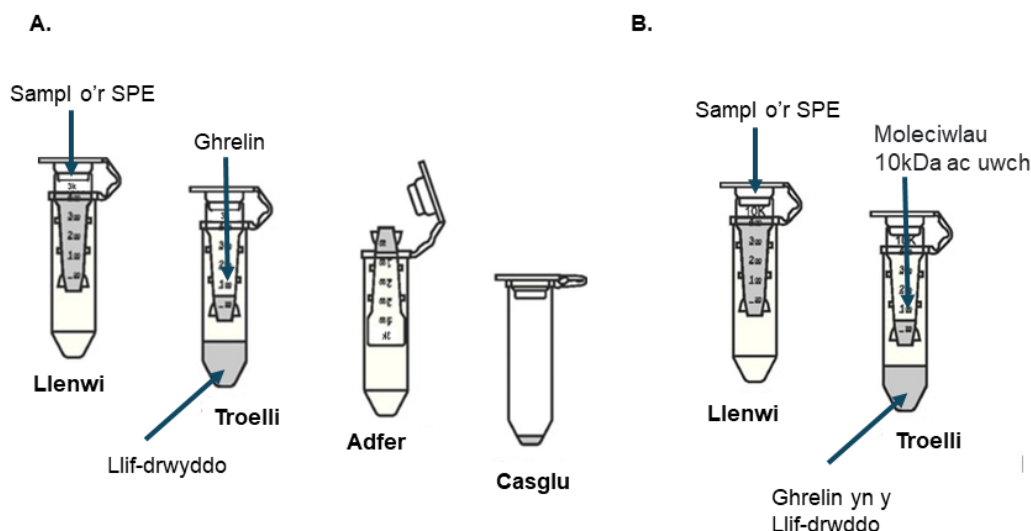
3.2.4 Dyfais Hidlo Allgyrchol ('Centrifugal Filter')

Yn dilyn SPE, ymchwiliwyd i yr defnydd o hidlwyr allgyrchol, sef dyfais a ddefnyddir i grynodi a dihalwyno samplau trwy gymhwyso grym allgyrchol. Roedd y dyfeisiau hidlo yn cynnwys naill ai hidlydd 10kDa neu 3kDa (a oedd yn caniatáu i foleciwlau sydd yn llai na 10kDa neu 3kDa, yn y drefn honno, basio trwyddo) (Ffigur 3.2). Mae egwyddor weithredol hidlydd allgyrchol yn cynnwys y camau canlynol:

Llwytho yr Sampl: Mae 500 µL o uwchwaddod yn cael ei llwytho ar ôl dyddodiad protein ac SPE (adrannau 3.2.1 a 3.2.3) i yr ddyfais hidlo allgyrchol. Fel arfer gosodir y sampl mewn uned hidlo sydd yn cynnwys pilen hidlo sydd yn hongian rhwng dwy siambr.

Allgyrchu: Gosodir yr uned hidlo wedi ei llwytho mewn allgyrchydd am 30 munud ar 14,000xg. Pan fydd yr allgyrchydd yn troelli ar gyflymder uchel, cynhyrchir grym allgyrchol, gan achosi i gydran hylif y sampl symud allan trwy yr bilen hidlo wrth gadw yr gronynnau neu yr moleciwlau dymunol o fâs penodol o fewn yr uned hidlo.

Echludiad: Unwaith y bydd y broses allgyrchu wedi ei chwblhau, gellir echludo yr sampl crynodedig, sydd bellach yn cynnwys y moleciwlau o ddiddordeb sydd wedi eu cynodi. Cyflawnir hyn trwy osod y ddyfais hidlo wyneb i waered mewn tiwb glân a ei allgyrchu am 2 funud ar 1000xg. Yna cymhwyswyd y samplau i darged MALDI a eu dadansoddi.



Ffigur 3.2 Dyfais hidlo allgyrchol ar gyfer 3kDa (A) a 10kDa (B).

3.2.5 Siptipiau C18

Mae samplau ar ôl dyddodiad protein (adran 3.2.1) neu SPE (adran 3.2.3) yn cael eu trosglwyddo i Eppendorf ffres yn barod ar gyfer y protocol siptipiau C18. I ddechrau cafodd y siptip ei cyn-wlychu trwy dynnu yr toddiant gwlychu (sydd yn cynnwys 50% asetonitril mewn 0.1% TFA) trwy yr tip ac yna ei ryddhau i yr gwastraff. Mae yr broses hon yn cael ei hailadrodd tair gwaith er mwyn actifadu yr resin C18 yn llawn. Yn ail, mae yr siptip yn cael ei ecwilibreiddio gyda yr hydoddiant ecwilibreiddio (0.1% TFA) dair gwaith er mwyn paratoi yr resin ar gyfer rhwymiad peptid. Yn trydydd, mae yr peptid yn cael ei rhwymo i yr sorbent gan wasgu plymiwr y bibed i yr 'stop llawn' ac yna caiff y sampl ei sugno ac ei wasgaru deg gwaith, er mwyn sicrhau bod y peptidau wedi ei rhwymo yn ddigonol. Yna, mae yr tip yn cael ei olchi yn yr hydoddiant golchi TFA 0.1% dair gwaith i gael gwared ar halogyddion a halwynau heb eu rhwymo. Yn ddilyn hyn, mae yr sampl yn cael ei echludo mewn 5 µl o fatrics CHCA wedi ei hydoddi mewn 40% asetonitril. Yn olaf, cymhwyswyd y samplau i darged MALDI a eu dadansoddi.

3.2.6 Paratoi Sampl ar gyfer Dadansoddiad MS

Yn ogystal â samplau ghrelin sydd yn deillio o yr cam dyddodiad protein (3.2.1), paratowyd safonau ghrelin a gwanhau y samplau mewn 0.1% plasma wedi ei gwanedu gyda 0.1% TFA ar darged dur di-staen MALDI-TOF. Cyn eu 'sbotio', cymysgwyd y samplau neu yr safonau ghrelin mewn cymysgedd peptid 1-rhan gyda

3 rhan o yr matrices (sef CHCA (5 mg/mL) mewn 40% asetonitril a 0.05% TFA). Cafodd 1.5 µL o yr cymysgedd hwn ei sbotio ar y targed yn uniongyrchol tair gwaith. Ar gyfer pob sbot casglwyd dau sbectrwm, gan arwain at gyfanswm o chwe sbectrwm a gasglwyd fesul sampl gan ddefnyddio sbectromedr màs MALDI-TOF.

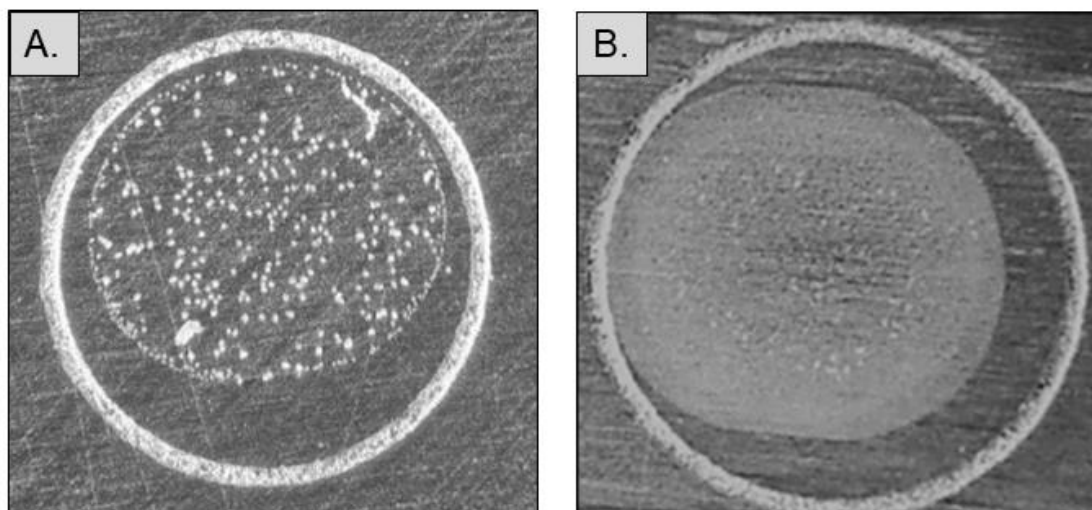
I bennu amrywioldeb gwahanol arwynebau matrices ac ystod yr profion, perfformiwyd astudiaeth gymharu crisial hadau a chromlin calibradu yn cyntaf. Roedd yr astudiaeth cymharu grisial hedyn yn cynnwys gorchuddio rhan o yr targed â grisial hedyn ac adran arall o yr targed gan ddefnyddio dull defnyn sych. Ar gyfer y grisial hedyn, ychwanegwyd CHCA (5 mg/mL) wedi ei hydoddi mewn aseton yn gyntaf i orchuddio yr plât, ac ar ôl ei sychu rhoddwyd cymysgedd peptid:matrics 1:3 yn uniongyrchol ar ei ben. Mae yr dull defnyn sych yn cynnwys 'sbotio' yr cymysgedd peptid:matrics 1:3 yn uniongyrchol ar y targed (heb ychwanegu aseton ymlaen llaw).

Ar gyfer y gromlin raddnodi, ychwanegwyd ghrelin dynol ar 0.08-80 ng/mL, gyda ITSD ghrelin llygoden fawr yn amrywio yn dibynnu ar yr arbrawf penodol ac fe ei nodir yn adran. Defnyddiwyd ystod eang oherwydd y lefelau eang o ghrelin a adroddwyd yn y llenyddiaeth. O fewn unigolion iachus, mae lefelau plasma ymprydio o asyl ghrelin fel arfer yn amrywio o dua 30-80 pg/mL (0.03-0.08 ng/mL), gyda chrynodiadau cyfanswm ghrelin ar gyfartaledd o dua 1 ng/mL (Cummings et al., 2001). Mae dadasyl ghrelin yw yr ffurf sydd yn cylchredeg yn bennaf, sydd yn cynnwys tua 90% o gyfanswm ghrelin mewn plasma (Gahete et al., 2013). Fodd bynnag gall y lefelau hyn amrywio yn dibynnu ar statws maethol a chyflwr y clefyd. Er enghraifft, mae cleifion ag anorecsia nerfosa yn arddangos lefelau cyfanswm ghrelin uchel iawn, gyda chofnodion mor uchel â 13 ng/mL (Shiia et al., 2002), tra bod gordewdra yn gysylltiedig â chrynodiadau ghrelin sydd yn sylweddol is (Pulkkinen et al., 2010). Felly, roedd angen ystod calibradu eang i ystyried amrywiadau ffisiolegol a patholegol mewn lefelau ghrelin.

3.3 Canlyniadau

3.3.1 Effaith y Grisial Hedyn ar Wyneb y Matrics

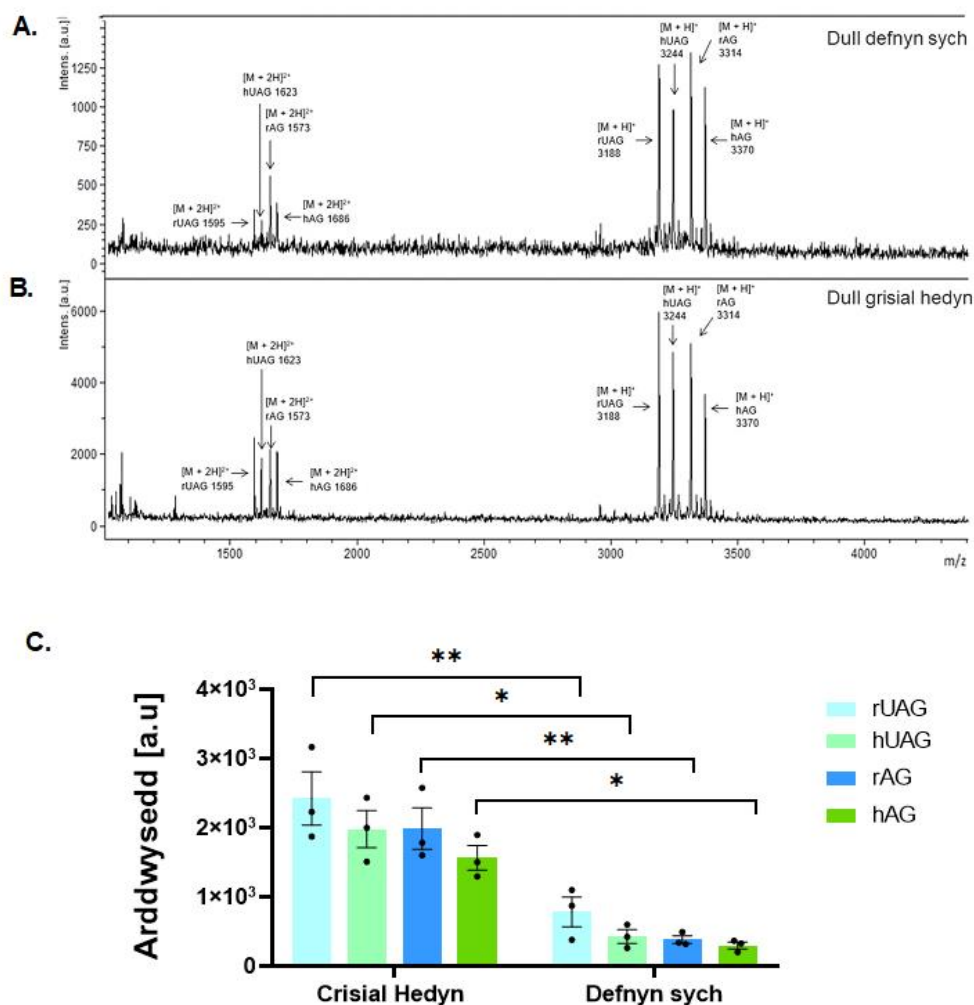
Mae gorchuddio yr matrices grisial hedyn yn gyfartal ar y targed cyn dyddodi y peptid: cymysgedd matrices yn ddull cyffredin a ddefnyddir wrth baratoi sampl MALDI-TOF i gyflawni yr canlyniadau gorau posibl. Mae yr dull hwn yn helpu i sicrhau bod y matrices a yr dadansoddydd wedi eu dosbarthu yn gyfartal yn y man targed, gan hwyluso dadsugniad ac ïoneiddiad effeithlon yn ystod dadansoddiad MALDI-TOF. Fodd bynnag, mae rhai astudiaethau yn adrodd ddefnyddio dull defnyn sych (Gutierrez 2005; Vorm 1994). Mae yr dull hwn yn cynnwys rhoi defnyn sydd yn cynnwys y peptid a yr matrices ar y targed a chaniatáu iddo sychu. Felly, cymharwyd y dulliau crisial hedyn a dull defnyn sych i gadarnhau pa un oedd fwyaf priodol yng nghyd-destun dadansoddiad ghrelin. Mae Ffigur 3.3A yn dangos canlyniadau gweledol y dull defnyn sych. Yn yr achos hwn, gwelwyd clystyrau anwastad o grisialau a smotiau gwasgaredig, sydd yn awgrymu nad oedd dosbarthiad y matrices a yr dadansoddydd yn unffurf. Arweiniodd sychu anghymesur neu ddosbarthiad anwastad y matrices a yr dadansoddydd at ffurfio crynodiadau lleol o yr matrices a yr dadansoddydd, gan arwain at grisialu afreolaidd, a all arwain at amrywiad smotyn-i-smotyn yn y sbectra canlyniadol. Mae Ffigur 3.3B yn dangos cynrychiolaeth weledol o yr haenen gyfartal a gyflawnwyd gan ddefnyddio y dull crisial hedyn. Mae yr ddelwedd yn dangos man wedi ei ddiffinio yn dda gyda dosbarthiad unffurf o yr matrices ar ei wyneb. Roedd wyneb gwastad a siâp cyson y crisialau yn dangos bod y matrices a yr dadansoddydd wedi ei crisialu yn unffurf.



Ffigur 3.3 Effaith dull dyddodiad ar nodweddion wyneb y matrices.

A. Dull defnyn sych, ffurfiwyd crisialau gan greu amgylchedd nad yw yn homogenaidd. B. Dull grisial hedyn, haen lyfn.

Mae yr dadansoddiad gweledol o Ffigur 3.3 yn awgrymu bod y dull hedyn grisial yn arwain at haen fwy homogenaidd. Er mwyn rhoi mewnwelediad pellach i sefydlogrwydd y dadansoddydd a baratowyd gan ddefnyddio yr ddau ddull, paratowyd cymysgedd hafal o rywogaethau o dadasyl ac asyl, llygod mawr a dynol ghrelin ar grynodiad o 15 ng/mL. Ychwanegwyd y cymysgedd ar y targed MALDI gan ddefnyddio naill ai yr grisial hedyn neu yr dull defnyn sych. Dangosodd y dadansoddiad fod y dull defnyn sych wedi arwain at signalau 'swnllyd' ac arddwysedd is o ei gymharu â yr dull grisial hedyn (Ffigur 3.4A). Mae hyn yn debygol o ganlyniad i ffurfiant y grisial fel y gwelir yn Ffigur 3.3A. Mae yr dull crisial hedyn, fel y dangosir yn Ffigur 3.4B, yn dangos sbectra cliriach ar arddwysedd uwch ~4000-6000 unedau mympwyol (a.u.), sydd yn nodi ansawdd signal uwch o ei gymharu â yr dull defnyn sych a gynhyrchodd signal o ~1000-1200 a.u. (Ffigur 3.4A). Cadarnhaodd dadansoddiad ANOVA fod pob rhywogaeth o ghrelin yn arddangos arddwysedd cymedrig sylweddol uwch gyda yr dull crisial hadau o ei gymharu â yr dull defnyn sych (Ffigur 3.4C). Yn benodol, dangosodd asyl a dadasyl ghrelin llygod mawr gynnydd sylweddol ($P < 0.01$), tra bod asyl a dadasyl ghrelin dynol hefyd yn dangos gwelliannau sylweddol ($P < 0.05$).



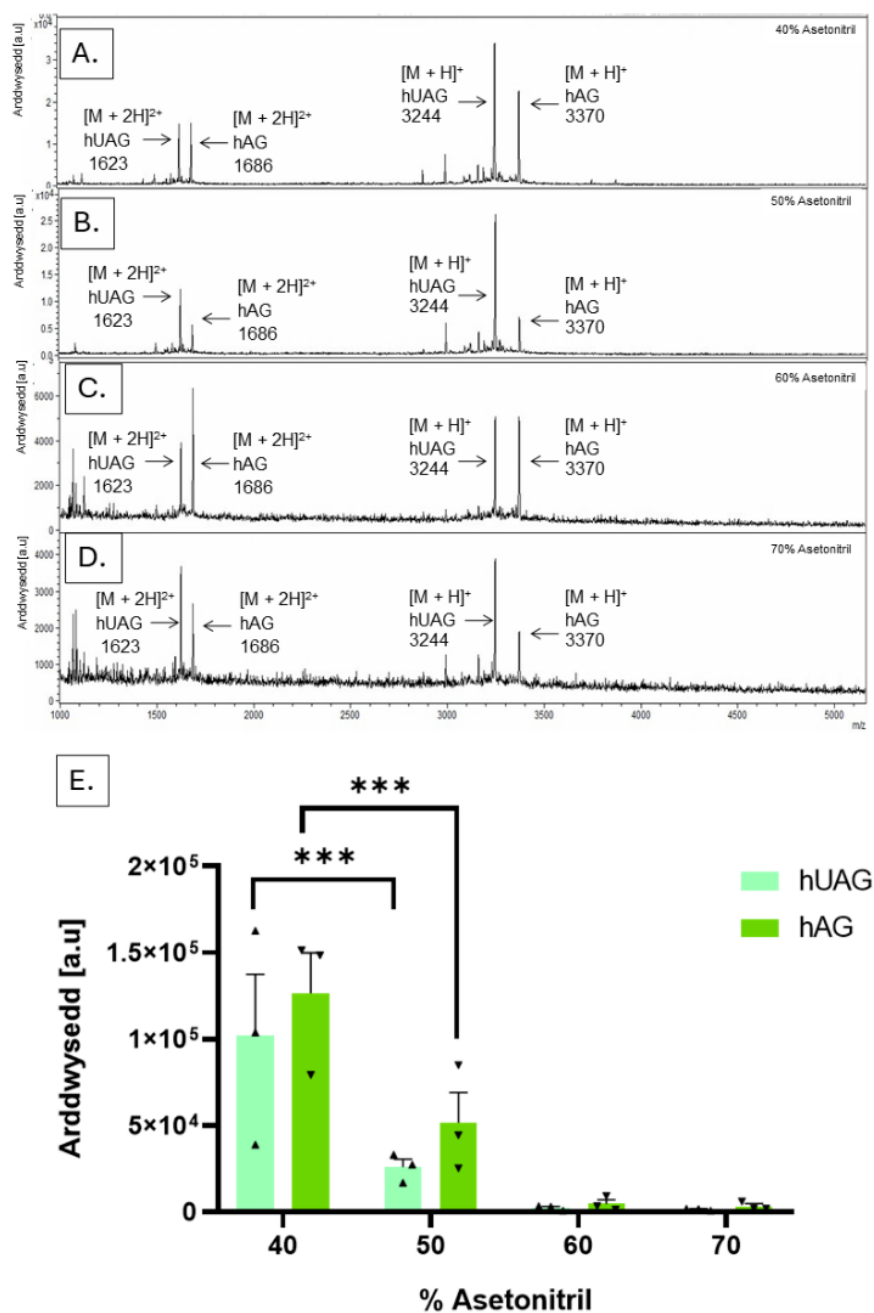
Ffigur 3.4 Sbectra MALDI-TOF a gafwyd o yr pedair rhywogaeth ghrelin yn y modd ïon positif y 'reflectron' ac yn yr ystod m/z 1000-5000.

Mae yr echelin-x yn cynrychioli yr gymhareb màs-i-wefr (m/z), tra bod yr echelin-y yn dangos arddwysedd y signal mewn unedau mympwyol (a.u.), sydd yn cyfateb i uchder brig pob ïon a ganfyddir. Mae yr brig wedi eu labelu fel $[M+H]^+$ yn cynrychioli yr ïonau moleciwlaidd wedi eu protoneiddio yn unigol (rhywogaethau monoisotopig) o bob peptid, tra bod y brig $[M+2H]^{2+}$ yn dynodi yr un peptidau sydd yn cario dau broton, gan arwain at rywogaeth â gwefr ddwbl. Mae yr brig wedi eu labelu yn cyfateb i yr rhywogaethau ghrelin canlynol: dadasyl ghrelin llygod mawr: $[M+H]^+$ ar m/z 3188 a $[M+2H]^{2+}$ ar m/z 1595. Dadasyl ghrelin dynol: $[M+H]^+$ ar m/z 3244 a $[M+2H]^{2+}$ ar m/z 1623. Asyl ghrelin llygod mawr: $[M+H]^+$ ar m/z 3314 a $[M+2H]^{2+}$ ar m/z 1657. Asyl ghrelin dynol: $[M+H]^+$ ar m/z 3370 a $[M+2H]^{2+}$ ar m/z 1686. A. Sbectrwm a gafwyd gan ddefnyddio yr dull diferion sych. B. Sbectrwm a gafwyd gan ddefnyddio yr dull grisial hadau. A a B. Sbectrwm enghreifftiol o yr 6 sbectrwm a gafwyd. C. Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Roedd pob rhediad yn cynnwys tri smotyn fesul sampl, gyda dau sbectrwm wedi eu caffael fesul smotyn (chwe sbectrwm fesul rhediad). Cyfartaleddwyd y chwe sbectrwm o bob rhediad i gynhyrchu un gwerth cymedrig, ac mae yr data a gyflwynir yn cynrychioli yr cymedr $\pm$ SEM a gyfrifwyd ar draws y tri rhediad annibynnol. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. ** $P < 0.01$.

3.3.2 Dewis Matrics a Hirhoedledd

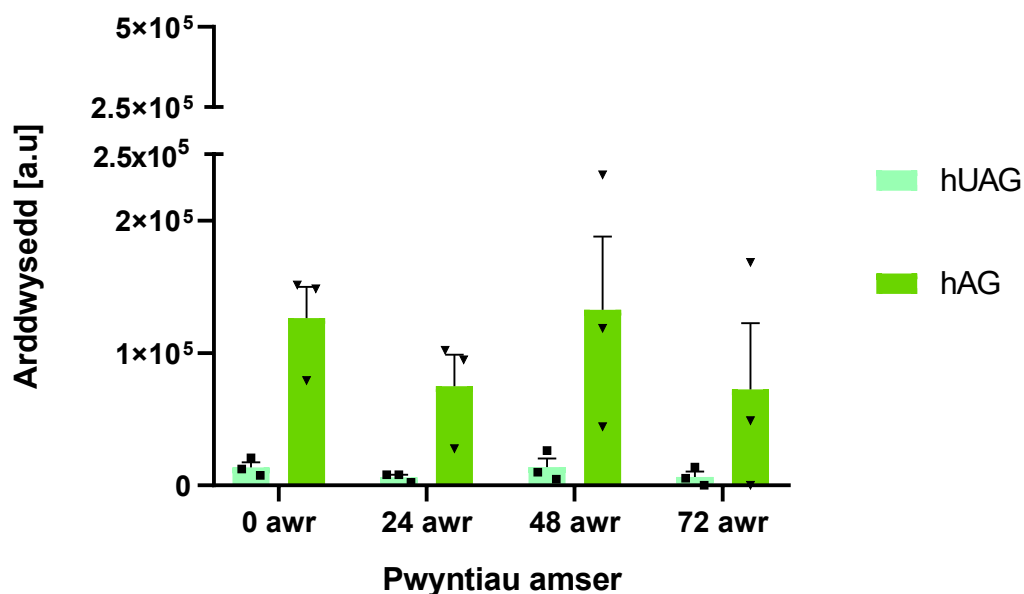
Er mwyn gwneud y gorau o ddadansoddiad MALDI-TOF o yr peptid ghrelin, mae detholiad matrics priodol yn hanfodol oherwydd gall anwytho yr broses ïoneiddio yn sylweddol. Yn seiliedig ar astudiaethau blaenorol gan Zhao et al. (2021) a Gutierrez et al. (2005), mae CHCA wedi ei adrodd fel matrics sydd yn gweithio yn effeithiol gyda pheptidau a phroteinau, gan gynnwys ghrelin. O ganlyniad, dewiswyd CHCA fel matrics y sampl. Mae yr hydoddydd a ddewiswyd i hydoddi CHCA hefyd yn bwysig. Un hydoddydd a ddefnyddir yn gyffredin ar gyfer CHCA mewn dadansoddiad MALDI-TOF yw asetonitril oherwydd ei gydnawsedd â pheptidau a phroteinau, anweddolrwydd cymedrol, a yr gallu i anwytho ffurfio crisial (Bradnt et al., 2010, Tsai et al., 2017). I ddewis y canran orau o asetonitril yn y matrics ar gyfer ein hastudiaeth, paratowyd crynodiad cyfartal o dadasyl ac asyl ghrelin dynol ar 15 ng/mL, wedi eu hydoddi mewn asetonitril oedd yn amrywio rhwng 40-70%. Mae yr sbectra a gafwyd o yr samplau a ddadansoddiwyd yn dangos y gall presenoldeb asetonitril yn y matrics ddylanwadu yn sylweddol ar ïoneiddiad a chanfod dadasyl neu asyl ghrelin yn ystod dadansoddiad MALDI-TOF (Ffigur 3.5). Yn y sbectra yn Ffigur 3.5, a yr dadansoddiad ystadegol, sylwyd bod dadasyl ac asyl ghrelin dynol yn cynhyrchu sbectra a oedd yn arwyddocaol gwell ($P < 0.001$) pan oedd wedi ei hydoddi mewn asetonitril 40%, o ei gymharu â chanrannau eraill o asetonitril (Ffigur 3.5). Mae yr canfyddiadau hyn yn dangos bod canran yr asetonitril yn y matrics yn dylanwadu yn sylweddol ar ïoneiddiad a chanfod rhywogaethau ghrelin dynol yn ystod dadansoddiad MALDI-TOF.

Ymchwiliwyd hefyd i hirhoedledd y matrics ar ôl ei baratoi. Yn fwy penodol, aseswyd sefydlogrwydd a pherfformiad y matrics dros amser. Paratowyd safonau ffres dadasyl ac asyl dynol ghrelin ar wahanol adegau ar ôl ffurfio un hydoddiant o CHCA, amser 0 (yn syth ar ôl paratoi yr matrics), 24 awr, 48 awr a 72 awr ar ôl ei baratoi. Datgelodd y canlyniadau nad oedd unrhyw newidiadau arwyddocaol y yn y rhywogaethau ghrelin rhwng y gwahanol bwyntiau amser (Ffigur 3.6). Mae hyn yn awgrymu bod y matrics wedi aros yn sefydlog ac wedi cynnal ei berfformiad dros y cyfnod amser disgwylledig. Fodd bynnag, er bod y canlyniadau yn awgrymu bod hirhoedledd y matrics yn gyson hyd at 72 awr, fel arfer da, paratowyd matrics ffres bob 48 awr.



Ffigur 3.5 Cymharu arddwysedd hUAG ac hAG ar ôl eu paratoi mewn canrannau gwahanol o asetonitril.

Paratowyd crynodiad hafal o hUAG ac hAG mewn canrannau gwahanol o asetonitril wedi ei ddilyn gan ddadansoddiad MALDI-TOF. A- D: Yn cyflwyno yr sbectra MALDI-TOF yn y modd y 'reflectron' ÷on positif ac yn yr ystod m/z 1000-5000 au. A. 40% asetonitril. B. 50% asetonitril. C. 60% asetonitril. D. 70% asetonitril. E. Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Roedd pob rhediad yn cynnwys tri smotyn fesul sampl, gyda dau sbectrwm wedi eu caffael fesul smotyn (chwe sbectrwm fesul rhediad). Cyfartaleddwyd y chwe sbectrwm o bob rhediad i gynhyrchu un gwerth cymedrig, ac mae yr data a gyflwynir yn cynrychioli yr cymedr $\pm$ SEM a gyfrifwyd ar draws y tri rhediad annibynnol. Ystyriir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. *** $P < 0.001$.

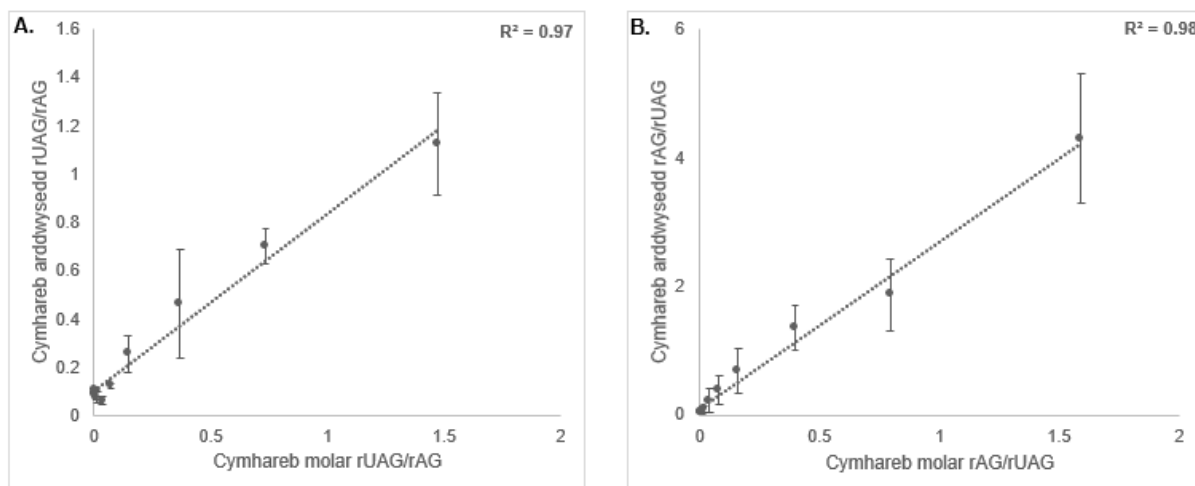


Ffigur 3.6 Hirhoedledd y matrices CHCA.

Paratowyd safonau hUAG a hAG gyda CHCA a eu gadael am bwyntiau amser gwahanol. Amser 0 awr (yn syth ar ôl paratoi yr matrices), 24 awr, 48 awr a 72 awr ar ôl paratoi yr matrices. Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. Mae yr data a ddangosir yn cynrychioli $\pm$ SEM cymedrig ar draw tri rhediad annibynnol ($N=3$).

3.3.3 Meintioli yn ôl MALDI-TOF

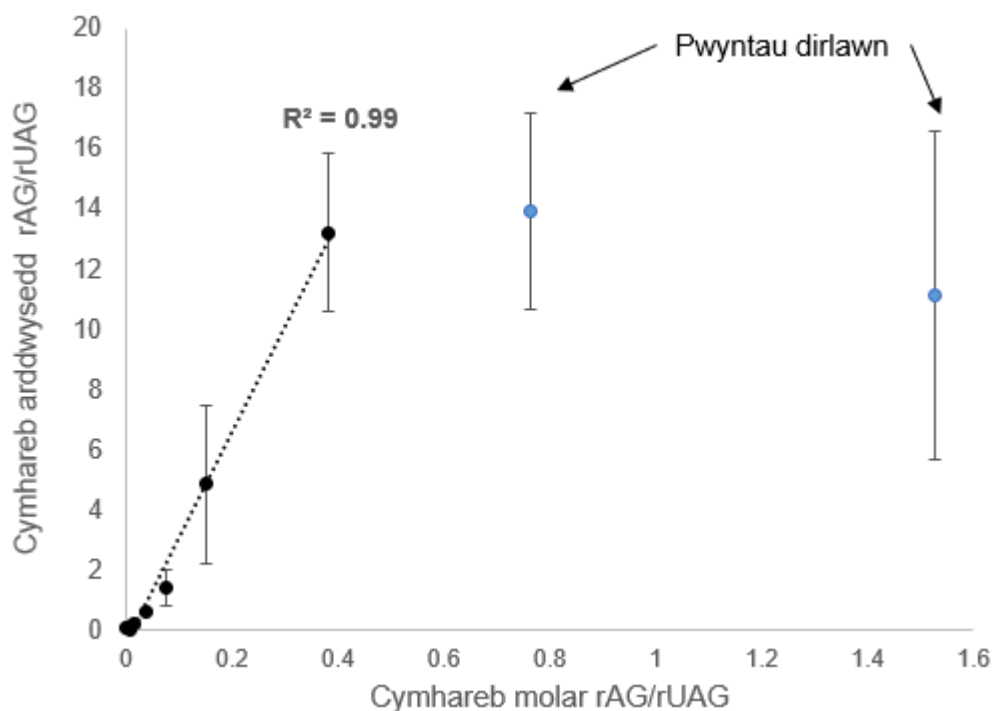
Er mwyn galluogi meintioli ghrelin mewn plasma dynol, cynhyrchwyd cromliniau graddnodi ar gyfer safonau ghrelin alldarddol. Roedd cam cyntaf yr optimeiddiad yn cynnwys cynhyrchu cromliniau graddnodi gan ddefnyddio ghrelin llygoden fawr fel ISTD. Lluniwyd y gromlin raddnodi gan ddefnyddio dull graddnodi deg pwynt, gan gwmpasu ystod crynodiad o 0.08-80 ng/mL (Ffigur 3.7). Roedd yr ISTD yn 51 ng/mL. Perfformiwyd dwy set o gromliniau graddnodi; yn gyntaf defnyddiwyd asyl ghrelin llygoden fawr fel y ISTD gyda chrynodiad amrywiol o dadasyl ghrelin llygoden fawr. Yna, yn ail defnyddiwyd dadasyl ghrelin llygoden fawr fel y ISTD gyda chrynodiad amrywiol o asyl ghrelin llygoden fawr. Gwnaethpwyd hyn i sicrhau cynrychiolaeth gywir o ataliad y signal ar yr darlleniadau arddwysedd cyffredinol, oherwydd gall affinedd dadasyl ac asyl ghrelin fod yn ychydig yn wahanol yn ystod dadansoddiad MALDI. Cafwyd R^2 yn fwy na 0.9 ar y ddau cromlin graddnodi, sydd yn dangos perthynas linol gryf rhwng crynodiad rhywogaethau ghrelin a yr arddwysedd signal cyfatebol (Ffigur 3.7).



Ffigur 3.7 Cromliniau graddnodi gyfer ghrelin llygod mawr wedi eu dadansoddi gan MALDI-TOF yn yr ystod o 0.08–80 ng/mL, gan ddefnyddio crynodiad ISTD o 51 ng/mL.

A. Calibradu gyda rAG fel yr ISTD a yr amrywiol rUAG (wedi ei fynegi fel cymhareb molar). B. Calibradu gyda rUAG fel yr ISTD ac yr amrywiol rAG (wedi ei fynegi fel cymhareb molar). Mae pob pwynt calibradu yn cynrychioli arddwysedd cyfartalog y signal a gyfrifwyd o dair rhediad annibynnol ($N = 3$). Ar gyfer pob rhediad, caffaelwyd chwe sbectrwm fesul pwynt calibradu (dau sbectrwm o bob un o yr tri smotyng), a chyfartaledd y chwe sbectrwm hyn i gynhyrchu un gwerth cymedrig ar gyfer y rhediad hwnnw. Y pwynt plotio terfynol yw cymedr y tair cymedr rhediad hyn, ac mae bariau gwall yn cynrychioli yr gwyriad safonol ar draws rhediadau, gan adlewyrchu amrywioldeb rhwng rhediadau. Mae llinellau tuedd yn cynrychioli ffitiadau atchweliad llinol, ac adroddir gwerthoedd R^2 i nodi daioni yr ffit. Mae bariau gwall yn dangos y gwyriad safonol, gan adlewyrchu amrywioldeb mewn arddwyseddau signal a fesurwyd.

Mae modd adlewyrchol y dechneg MALDI-TOF yn cynnig manteision sylweddol dros y modd llinol, gan gynnwys cywirdeb mäs a datrysiad gwell. Dyma oedd y rhesymeg gychwynnol dros ddewis y modd adlewyrchol ar gyfer y dadansoddiad. Fodd bynnag, pan fydd sefydlogrwydd dadansoddydd yn ystod eu taith drwy yr adlewyrchol yn bryder, yn enwedig ar gyfer moleciwlau ansefydlog neu sydd yn hawdd eu darnio, gall y modd llinol fod yn fwy priodol oherwydd ei drin ïonau yn ysgafnach. Er bod ghrelin yn peptid cymharol fach, a fyddai yn addas yn gyffredinol ar gyfer modd adlewyrchol, roedd ei ansefydlogrwydd posibl ac ei duedd i ddarnio yn ystod y dadansoddiad yn cyfiawnhau ymchwiliad pellach i benderfynu ar y modd mwyaf priodol ar gyfer ei ganfod. Ar ôl eithrio yr pwyntiau data dirlawn ar y ddau grynodiad uchaf, dangosodd y modd llinol llinoledd da, gyda chyfernod cydberthynas o $R^2 = 0.99$ (Ffigur 3.8), yn gymharol â modd y 'reflectron' ($R^2 = 0.99$; Ffigurau 3.7). Fodd bynnag, oherwydd y dirlawnder amlwg yn y modd llinol ar grynodiadau uwch a manteision modd adlewyrchol, megis cywirdeb mäs a datrysiad uwch, dewiswyd y modd adlewyrchol ar gyfer pob dadansoddiad dilynol.

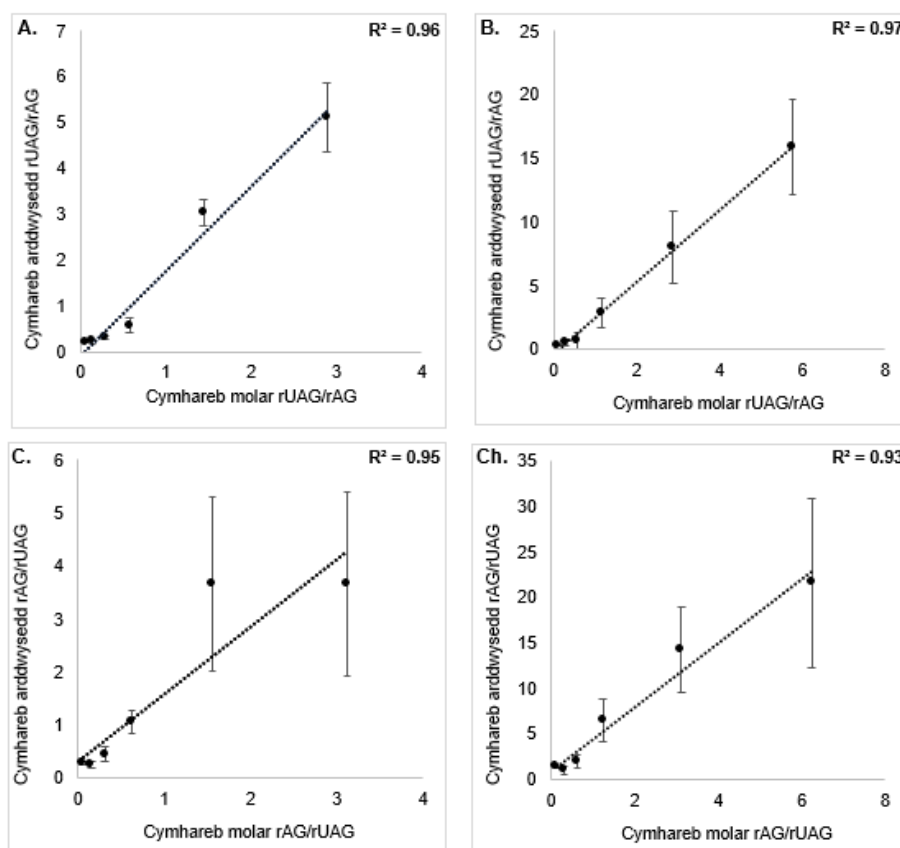


Ffigur 3.8 Cromlin raddnodi gan ddefnyddio rUAG fel ISTD ar 51 ng/mL a rAG yn amrywio o 0.08-80 ng/mL wedi eu dadansoddi gan ddefnyddio modd llinol ar y MALDI-TOF.

Mae pob pwynt calibradu yn cynrychioli arddwysedd cyfartalog y signal a gyfrifwyd o dair rhediad annibynnol ($n = 3$). Ar gyfer pob rhediad, caffael chwe sbectrwm fesul pwynt calibradu (dau sbectrwm o bob un o yr tri smoty), a chyfartaledd y chwe sbectrwm hyn i gynhyrchu un gwerth cymedrig ar gyfer y rhediad hwnnw. Y pwynt plotio terfynol yw cymedr y tair cymedr rhediad hyn, ac mae bariau gwall yn cynrychioli yr gwyriad safonol ar draws rhediadau, gan adlewyrchu amrywioldeb rhwng rhediadau. Mae llinellau tuedd yn cynrychioli ffitiadau atchweliad llinol, ac adroddir gwerthoedd R^2 i nodi daioni yr ffit. Mae bariau gwall yn dangos y gwyriad safonol, gan adlewyrchu amrywioldeb mewn arddwysedd signal a fesurwyd.

Y nod nesaf oedd asesu a allai addasu crynodiad y ISTD yn wella perfformiad y gromlin calibradu. Fel arfer, gosodir yr ISTD yn canolbwynt yr ystod calibradu i sicrhau meintoli cyson a lleihau y risgiau o atal signal neu gystadleuaeth. Fodd bynnag, mewn rhai achosion, gellir ei osod yn fwriadol mewn man arall, er enghraifft i leihau cystadleuaeth ïoneiddio mewn asesiadau sydd yn seiliedig ar sbectrometreg màs, lle gall crynodiadau uchel o ddadansoddon neu fatrics ymyrryd ag effeithlonrwydd ìoneiddio. Gall addasu crynodiad yr ISTD mewn achosion o y fath helpu i sefydlogi signal a gwella cywirdeb mewn rhannau penodol o yr gromlin. I fynd i yr afael â hyn, ail-werthuswyd y gromlin calibradu gan ddefnyddio ystod crynodiad llai o 0.08–2ng/mL, gyda dau grynodiad o ISTD gwahanol wedi eu profi: 0.65ng/mL ac 1.3ng/mL (Ffigur 3.9). Dangosodd asyl ghrelin llygoden fawr llinoledd da fel ISTD ar 1.3ng/mL a

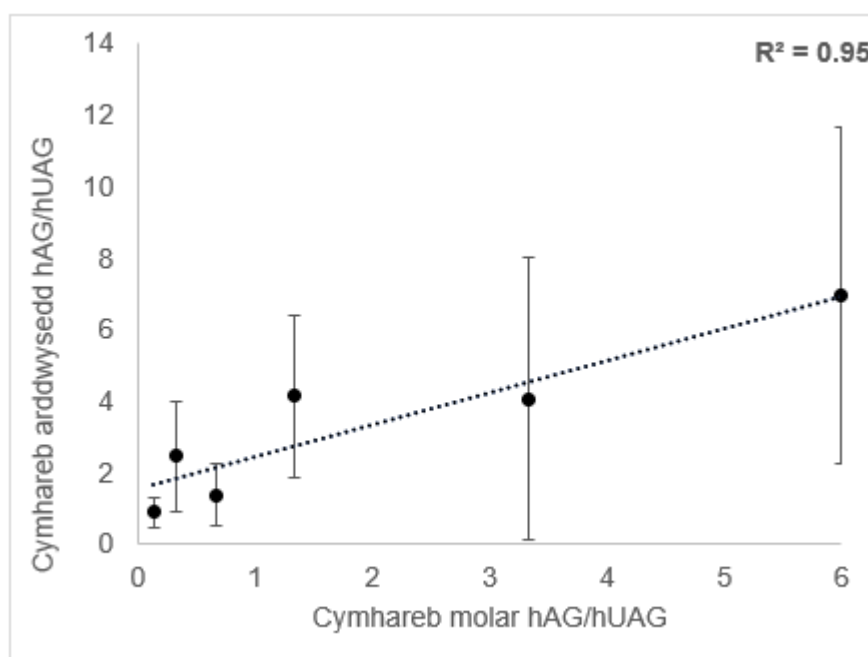
0.65ng/mL, gyda gwerthoedd R^2 o 0.96 a 0.97, yn y drefn honno (Ffigurau 3.9A a 3.9B). Yn yr un modd, pan ddefnyddiwyd dadasyl ghrelin llygod mawr fel yr ISTD, gwelwyd llinoledd cryf gyda gwerthoedd R^2 o 0.95 ar 1.3ng/mL a 0.93 ar 0.65ng/mL (Ffigurau 3.9C a 3.9D). Er y nodwyd gwahaniaethau bach yng ngwerthoedd R^2 , dangosodd pob cromlin calibradu gydberthnasau llinol cryf rhwng crynodiad ghrelin ac arddwysedd signal. At ei gilydd, roedd amrywio crynodiad ISTD yn cael effaith fach iawn ar linoleddeu y cromliniau calibradu. O ganlyniad, dewiswyd 0.65 pg/mL sydd yn agosach at ganol y cromlin fel y crynodiad yr ISTD.



Ffigur 3.9 Cromliniau graddnodi ar gyfer meintioli rhywogaethau ghrelin llygoden fawr yn ystod o 0.08-2 ng/mL gydag ISTD naill ai ar 1.3 ng/mL (A ac C) neu 0.65 ng/mL (B ac Ch).

Mae pob pwynt calibradu yn cynrychioli arddwysedd cyfartalog y signal a gyfrifwyd o dair rhediad annibynnol ($n = 3$). Ar gyfer pob rhediad, caffaelwyd chwe sbectrwm fesul pwynt calibradu (dau sbectrwm o bob un o yr tri smotyn), a chyfartaledd y chwe sbectrwm hyn i gynhyrchu un gwerth cymedrig ar gyfer y rhediad hwnnw. Y pwynt plotio terfynol yw cymedr y tair cymedr rhediad hyn, ac mae bariau gwall yn cynrychioli yr gwriad safonol ar draws rhediadau, gan adlewyrchu amrywioldeb rhwng rhediadau. Mae llinellau tuedd yn cynrychioli ffitiadau atchweliad llinol, ac adroddir gwerthoedd R^2 i nodi daioni yr ffit.

Ar ôl optimeiddio cromlin calibradu llwyddiannus gyda safonau ghrelin llygoden fawr, cynhaliwyd cromlin graddnodi o yr safonau dynol. Ar gyfer y cromlin raddnodi hon, gosodwyd asyl ghrelin dynol fel y newidyn, yn amrywio rhwng 0.08-2 ng/mL a defnyddiwyd y dadasyl ghrelin dynol fel yr ISTD ar 0.65 ng/mL. Cafodd y graff ei blotio fel cymhareb folar asyl ghrelin dynol/ dadasyl ghrelin dynol yn erbyn cymhareb arddwysedd asyl ghrelin dynol/dadasyl ghrelin dynol (Ffigur 3.10). Roedd gan y cromlin graddnodi a gynhyrchwyd ar gyfer y safonau ghrelin dynol gydberthynas llinol gref, a ddangosir gan y gwerth R^2 yn 0.95.



Ffigur 3.10 Cromlin graddnodi safonol ghrelin dynol, crynodiad hAG yn amrywio rhwng 0.08-2 ng/mL gyda hUAG wedi ei osod fel ISTD (0.65 ng/mL).

Mae pob pwynt calibradu yn cynrychioli arddwysedd cyfartalog y signal a gyfrifwyd o dair rhediad annibynnol ($n = 3$). Ar gyfer pob rhediad, caffaelwyd chwe sbectrwm fesul pwynt calibradu (dau sbectrwm o bob un o yr tri smotyn), a chyfartaledd y chwe sbectrwm hyn i gynhyrchu un gwerth cymedrig ar gyfer y rhediad hwnnw. Y pwynt plotio terfynol yw cymedr y tair cymedr rhediad hyn, ac mae bariau gwall yn cynrychioli yr gwyriad safonol ar draws rhediadau, gan adlewyrchu amrywioldeb rhwng rhediadau. Mae llinellau tuedd yn cynrychioli ffitiadau atchweliad llinol, ac adroddir gwerthoedd R^2 i nodi daioni yr ffit. Mae bariau gwall yn dangos y gwyriad safonol, gan adlewyrchu amrywioldeb mewn arddwysedd signal a fesurwyd.

I gloi, cafodd cromliniau graddnodi eu hoptimeiddio yn llwyddiannus ar gyfer ghrelin llygoden fawr a dynol, gan ganiatáu parhad i echdynnu ghrelin o blasma.

3.3.4 Optimeiddio Echdyniad Ghrelin o Blasma

3.3.4.1 Dyddodiad Protein

Mae echdynnu ghrelin, peptid bach â phwysau moleciwlaidd o tua 3000 Da, yn gofyn am ddyddodiad protein fel cam cychwynnol wrth ei echdynnu o blasma i ddileu proteinau mawr a phuro yr sampl. Ar ôl ymchwiliad cynhwysfawr o yr llenyddiaeth ar ghrelin a dadansoddiad MS, dewiswyd tri dull o ddyddodiad protein i yw ymchwilio ymhellach: Rauh et al. 2007, Sidibe et al. 2014 ac Eslami et al. 2016. Hefyd, profwyd dull oedd yn defnyddio TCA a ddefnyddiwyd yn ein labordy yn y gorffennol (disgrifir y dulliau hyn yn fanwl yn Adran 3.2.2, Dyddodiad Protein). Dewiswyd yr ddulliau hyn i yw ymchwilio ymhellach i weld pa un oedd y mwyaf effeithiol yn ein labordy gan ddefnyddio plasma sydd hefyd yn cynnwys ghrelin llygoden fawr alldarddol (*'spiked'*). Ar ôl y dyddodiad protein cychwynnol, dadansoddwyd yr uwchwaddod trwy MALDI-TOF.

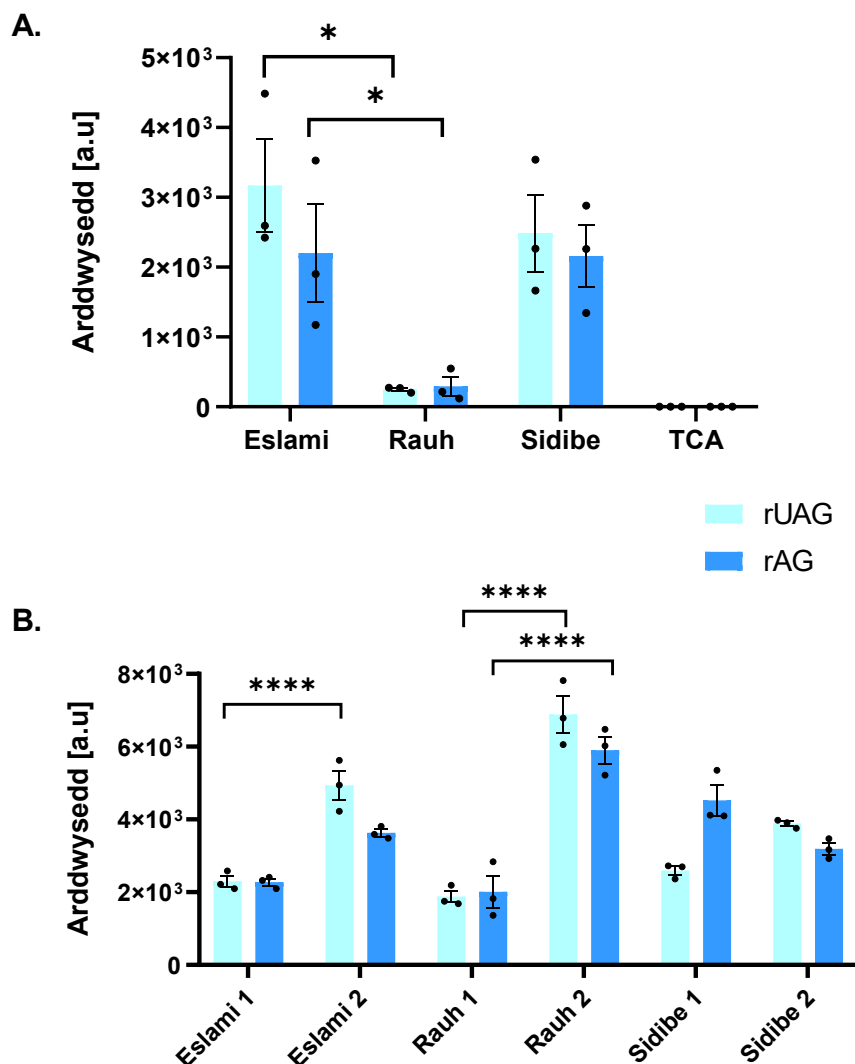
Ni lwyddodd unrhyw un o yr dulliau i ddal ghrelin dynol felly o ganlyniad, dim ond ghrelin llygoden fawr sydd i yw weld ar y graffiau drwy yr bennod hon. Roedd y fethodoleg a brofais gan Eslami et al. yn dangos lefelau sylweddol uwch o dadasyl ac asyl ghrelin llygoden fawr i yw gymharu â methodoleg Rauh et al. (Ffigur 3.11A) ($P < 0.05$). Ni chynhyrchodd y dull TCA ddata canfyddadwy, gan nodi ei aneffeithiolrwydd wrth arunigo ghrelin ac felly eithriwyd fel dull dyddodiad protein hyfyw. Yn nodedig, er nad oedd y fethodoleg gan Rauh et al. mor effeithlon ar gyfer dal ghrelin o gymharu â methodoleg Eslami et al. a Sidibe et al., roedd yn ymddangos yn dda ar gyfer echdynnu dadasyl ac asyl ghrelin ar gymhareb debyg.

Ar y cyfan, gwelwyd lefelau is o ghrelin na ddisgwyliwyd gan y methodoleg dyddodiad protein gan Eslami et al., Sidibe et al. a Rauh et al., gyda arddwysedd y signal uchaf ar ôl dyddodiad protein oedd 10^3 , o ei gymharu ag arddwysedd y sampl ble cafodd ghrelin ei roi (*'spiked'*) (heb echdyniad) sef arddwysedd 10^5 . Ar ôl allosod y crynodiad a ragwelir ar y cromliniau graddnodi a gynhyrchir, dangosodd dull Sidibe et al. colled gyffredinol o 53% o dadasyl ghrelin llygoden fawr a cholled o 72% ar gyfer asyl ghrelin llygoden fawr, tra dangosodd dull Eslami et al. colled o 40% ar gyfer dadasyl ghrelin llygoden fawr a cholled o 65% am asyl ghrelin llygoden fawr. Pan profwyd dull Rauh et al. gostyngodd lefelau ghrelin islaw yr gromlin graddnodi. O ganlyniad, cynhaliwyd

ymchwiliadau pellach i yr tri dull i gael dealltwriaeth fwy cynhwysfawr a phenderfynu pa un yw yr dull mwyaf addas ar gyfer echdynnu ghrelin o blasma.

Er mwyn archwilio a allai addasu yr protocol dyddodiad protein wella adferiad, cymhwyswyd addasiad ychwanegol i bob dull. Ar ôl ychwanegu toddydd yn unol â yr protocolau gwreiddiol, gosodwyd samplau ar rew am 30 munud, ac yna eu allgyrchu am amser estynedig ar $17,500 \times g$ am 40 munud (Ffigur 3.11B). Cymharwyd y protocolau wedi eu haddasu hyn yn uniongyrchol â eu fersiynau gwreiddiol.

Dangosodd y dull Eslami wedi ei addasu welliant sylweddol mewn canfod dadasyl ghrelin llygod mawr ($P < 0.0001$), tra na welwyd unrhyw newid sylweddol ar gyfer asyl ghrelin llygod mawr. Mewn cyferbyniad, dangosodd y dull Rauh wedi ei addasu gynnydd sylweddol mewn canfod asyl ac dadasyl ghrelin llygod mawr ($P < 0.0001$ ar gyfer y ddau). Ni ddangosodd y dull Sidibe unrhyw welliant gyda yr protocol wedi ei addasu. Mae yr canlyniadau hyn yn awgrymu y gallai cyflwyno cam oeri ac allyriad hirach wella adferiad peptid, yn enwedig ar gyfer dadasyl ghrelin llygod mawr o fewn protocolau sydd yn cynnwys asetonitril.



Ffigur 3.11 Cymhariaeth y dulliau dyddodiad protein a ddefnyddir ar gyfer paratoi sampl cyn dadansoddiad gan MALDI-TOF.

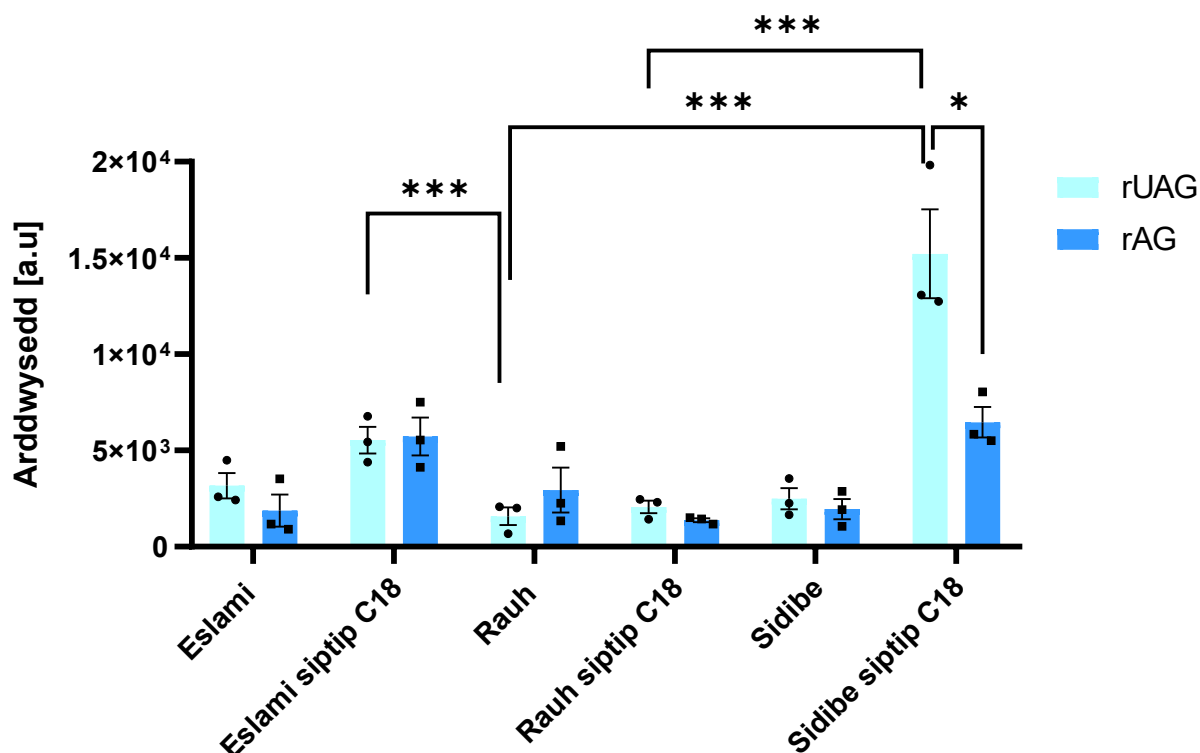
A. Cymhariaeth o bedwar dull gwaddodiad protein (Eslami, Sidibe, Rauh, a TCA) ar gyfer echdynnu asyl ac dadasyl ghrelin llygodyn fawr o plasma cyn dadansoddiad MALDI-TOF. B. Gwerthusiad o fersiynau wedi eu haddasu o brotocolau Eslami, Rauh, a Sidibe. Addaswyd pob dull i gynnwys magu 30 munud ar rew ac yna allgyrchu ar $17,500 \times g$ am 40 munud. Mae labeli bar "1" a "2" yn dynodi yr fersiynau gwreiddiol ("1") a yr fersiynau wedi eu haddasu ("2") o bob dull, yn y drefn honno. Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. * $P < 0.05$. Mae yr data a gyflwynir yn y ffigur yn cynrychioli yr gwerthoedd cymedrig ynghyd â chyfeiliornad safonol y cymedr (SEM) ar draw tri rhediad annibynnol ($N=3$).

3.3.4.2 Dyddodiad Protein a defnydd o Siptipiau C18

Nesaf, gwnaethom ymchwilio i yr defnydd o siptipiau C18 fel dull o lanhau samplau ymhellach yn dilyn y dulliau dyddodiad protein (a ddisgrifiwyd gan Rauh et al. Sidibe et al. neu Eslami et al.). Gall defnyddio siptipiau C18 gynnig manteision o ran dihalwyno samplau a chrynodi dadansoddydd o ddiddordeb a all hwyluso ei ganfod gan MS.

Ni ddangosodd y canlyniadau wahaniaethau sylweddol ($P < 0.05$) rhwng y dulliau dyddodiad protein eu hunain o ei gymharu â defnyddio â siptipiau C18 (Ffigur 3.12). Fodd bynnag, arsylwyd gwahaniaeth ystadegol arwyddocaol mewn dadasyl ghrelin llygoden fawr wrth gymharu yr dull Eslami et al. gyda siptipiau C18, yn erbyn y dull Rauh gyda siptipiau C18 ($P < 0.001$). Roedd cynnydd sylweddol hefyd mewn dadasyl ghrelin llygoden fawr wrth gymharu yr dull Sidibe et al. gyda siptipiau C18 o gymharu ag y dull Rauh et al. gyda siptipiau C18 ($P < 0.001$). Mae yr canlyniadau yn awgrymu, yn achos dadasyl ghrelin llygoden fawr, mae yr ddau ddull Eslami et al. a Sidibe et al. yn perfformio yn well na yr dull Rauh et al. ar ôl defnyddio siptipiau C18 o fewn y protocol. Yn ogystal, ar gyfer y dull Sidibe et al., canfuwyd dadasyl ghrelin llygoden fawr ar arddwysedd uwch na asyl ghrelin llygoden fawr ($P < 0.01$), sydd yn awgrymu bod y dull yn gweithio yn well ar gyfer dadasyl ghrelin llygoden fawr.

Dangosodd y canlyniadau a gafwyd gan ddefnyddio dulliau Eslami et al. a Sidibe et al. leihad mewn colledion ghrelin alldarddol drwy ddefnyddio siptipiau C18. Yn benodol, wrth ddefnyddio tipiau arferol, dangosodd dull Eslami et al. golled ghrelin o 41% ar gyfer dadasyl ghrelin llygoden fawr a 65% ar gyfer asyl ghrelin llygoden fawr, tra gyda siptipiau C18, roedd y colledion hyn ond yn 4% a 7%, yn y drefn honno. Yn yr un modd, roedd y canlyniadau a gafwyd gan ddefnyddio methodoleg Sidibe et al. yn nodi colled ghrelin o 53% ar gyfer dadasyl ghrelin llygoden fawr a 63% ar gyfer asyl ghrelin llygoden fawr wrth ddefnyddio y tip arferol, tra bod y siptipiau C18 yn dangos colledion o 28% a 7%, yn y drefn honno. I yr gwrthwyneb, dangosodd y canlyniadau gan ddefnyddio yr fethodoleg Rauh et al. ostyngiad o 70% a 45% mewn colled dadasyl ac asyl ghrelin llygoden fawr gyda thipiau arferol, tra bod defnydd o siptipiau C18 wedi arwain at golledion o 61% a 75% ar gyfer dadasyl ac asyl ghrelin llygoden fawr, yn y drefn honno. Mae yr canlyniadau hyn yn awgrymu budd posibl o ddefnyddio siptipiau C18 i leihau colled ghrelin. O ganlyniad, parhawyd i archwilio yr defnydd o siptipiau C18 ar ôl defnyddio yr tri dull dyddodiad protein ar y cyd ag SPE.



Ffigur 3.12 Cymhariaeth o effaith defnyddio siptipiau C18 ar ganfod ghrelin yn dilyn echdyniad gan ddefnyddio naill ai yr dull Eslami et al., Rauh et al. neu Sidibe et al.

Ychwanegwyd rUAG neu rAG alldarddol at blasma ac ei echdynnu gan ddefnyddio dulliau dyddodiad protein fel y disgrifiwyd gan Eslami et al, Rauh et al. neu Sidibe et al., ac yna glanhau samplau trwy ddefnyddio siptipiau C18 ac yna dadansoddiad gan MALDI-TOF. Mae yr data a gyflwynir yn y ffigur yn cynrychioli yr gwerthoedd cymedrig ynghyd â chyfeiliornad safonol y cymedr (SEM). Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod * $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. *** $P < 0.001$. Cynhaliwyd hyn gyda maint sampl o $N=3$ ar draws tair rhediad annibynnol.

3.3.5 Cynnwys SPE yn y Protocol Echdynnu Ghrelin

Perfformiwyd cymhariaeth ANOVA i werthuso effeithiolrwydd protocolau dyddodiad protein ac SPE ar gyfer adfer peptid ar draws y tair llif gwaith cyhoeddedig (Sidibe, Eslami, Rauh) fel y dangosir yn Ffigur 3.13A. Y prif ffocws oedd cymharu yr un rhywogaethau ghrelin (asyl ghrelin llygoden fawr yn erbyn asyl ghrelin llygoden fawr, dadasyl ghrelin llygoden fawr yn erbyn dadasyl ghrelin llygoden fawr) o fewn ac ar draws dulliau i asesu a oedd SPE yn gwella adferiad peptid o ei gymharu â gwaddodiad protein.

Ni welwyd unrhyw wahaniaethau arwyddocaol rhwng dyddodiad protein a SPE o fewn yr un grŵp ghrelin ar draws unrhyw ddull. O fewn protocol Eslami, roedd lefelau dadasyl ghrelin llygoden fawr yn arwyddocaol uwch na asyl ghrelin llygoden fawr gan ddefnyddio dulliau dyddodiad protein ac SPE ($P < 0.01$). Gwelwyd tuedd debyg o fewn dull Sidibe, lle yr oedd dadasyl ghrelin llygoden fawr yn sylweddol uwch o ei gymharu â asyl ghrelin llygoden fawr wrth ddefnyddio dyddodiad protein, er bod y lefel arwyddocaol yn is ($P < 0.05$).

Wrth gymharu perfformiad ar draws dulliau echdynnu, cynhyrchodd dull SPE Eslami ar gyfer dadasyl ghrelin llygod mawr werthoedd sylweddol uwch na dull dyddodiad protein Rauh ($**P < 0.0001$). Perfformiodd dull dyddodiad protein Eslami ar gyfer dadasyl ghrelin llygod mawr hefyd yn sylweddol well na phrotocol SPE Rauh ($**P < 0.0001$). Ar ben hynny, perfformiodd Eslami SPE ar gyfer dadasyl ghrelin llygod mawr yn sylweddol well na dull SPE Sidibe ($*P < 0.001$), a chynhyrchodd dull dyddodiad protein Eslami ar gyfer dadasyl ghrelin llygod mawr ganlyniadau gwell hefyd o ei gymharu â dull SPE Sidibe. Yn ogystal, dangosodd dull dyddodiad protein Sidibe ar gyfer dadasyl ghrelin mewn llygod mawr gynnydd sylweddol ($P < 0.01$) o ei gymharu â dull SPE Rauh.

At ei gilydd, mae yr data hyn yn dangos bod protocol dyddodiad protein Sidibe yn gyffredinol yn darparu adferiad peptid gwell o ei gymharu ag SPE o fewn yr un dull, tra bod dull SPE Eslami yn dangos perfformiad gwell o ei gymharu ag SPE Sidibe ond nid â dyddodiad protein Sidibe. Mae yn ymddangos bod protocol Rauh yn llai sensitif i yr dewis o ddull echdynnu ond mae dyddodiad protein Sidibe yn perfformio yn well.

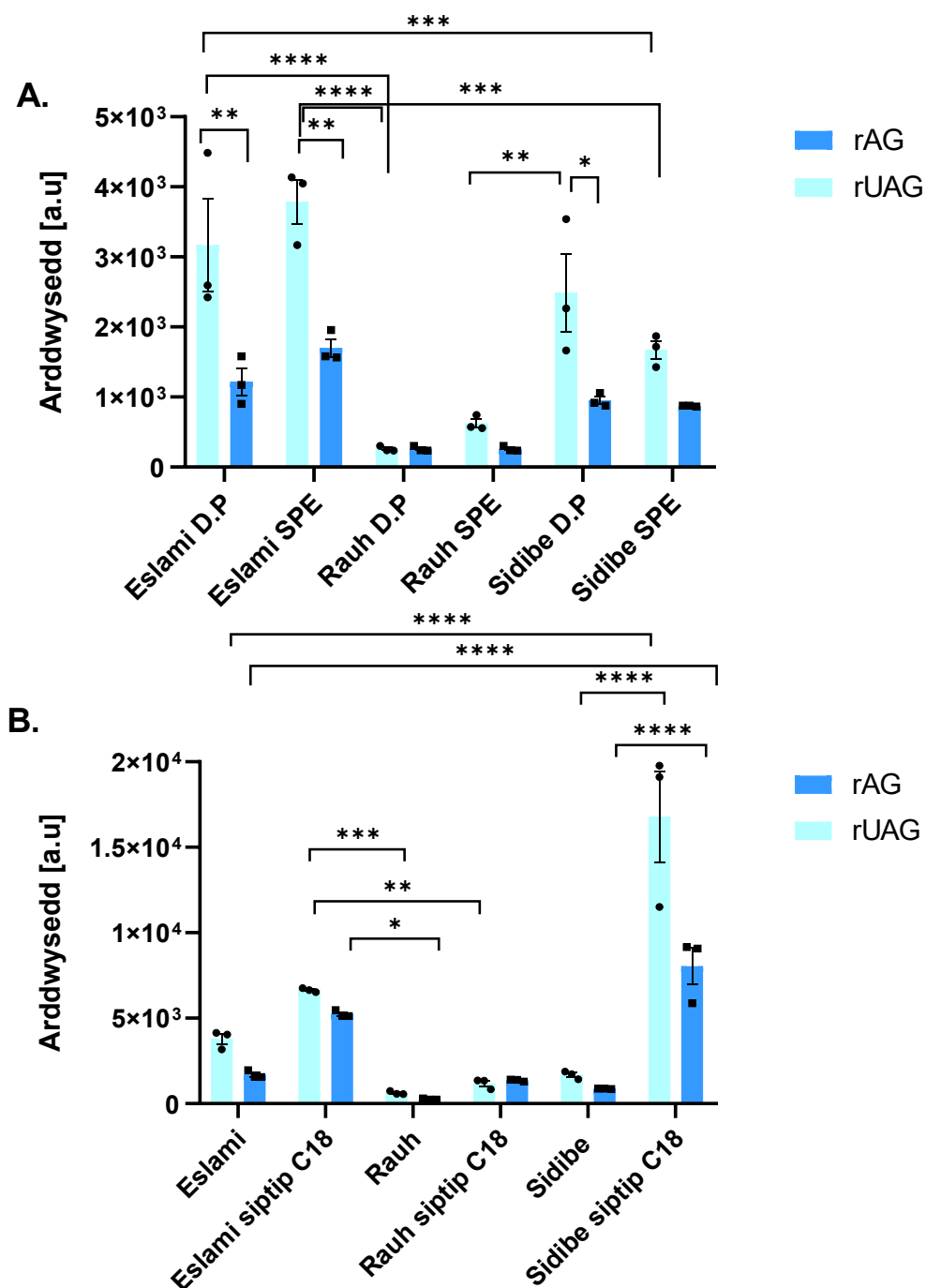
Mae Ffigur 3.13B yn cyflwyno dadansoddiad cymharol o adferiad peptid ar draws protocolau echdynnu Eslami, Rauh, a Sidibe, gyda a heb buro siptip C18, ar gyfer asyl ac dadasyl ghrelin llygoden fawr. O fewn dull Eslami, ni welwyd unrhyw wahaniaethau arwyddocaol rhwng gyda a heb siptipiau C18.

Dangosodd y dull Sidibe gyda siptipiau C18 adferiad sylweddol uwch ar gyfer dadasyl ghrelin llygod mawr ($P < 0.0001$) ac asyl ghrelin llygod mawr ($P < 0.001$) o ei gymharu â samplau Eslami heb C18. Fodd bynnag, roedd gan Eslami gyda siptipiau C18 adferiad sylweddol uwch na Rauh ar gyfer dadasyl ghrelin llygod mawr heb C18 ($P < 0.01$) a gyda C18 ($P < 0.01$). Dangoswyd hefyd fod gan asyl ghrelin llygod mawr o fewn Eslami C18 adferiad sylweddol well na Rauh heb C18 ($P < 0.05$).

O fewn samplau siptip C18 Sidibe, adferwyd dadasyl ghrelin llygoden fawr yn sylweddol well na asyl ghrelin llygoden fawr ($P < 0.0001$).

Hefyd, perfformiodd samplau Sidibe â siptipiau C18 yn well na Rauh ym mhob cymhariaeth ar gyfer y ddau peptid ($P < 0.0001$). Ar draws y dull Rauh, ni ddangoswyd unrhyw wahaniaethau arwyddocaol rhwng asyl ac dadasyl ghrelin llygoden fawr, ac ni chafwyd unrhyw fudd clir o buro C18.

I grynhoi, dangosodd samplau siptipiau C18 Sidibe yr adferiad uchaf yn gyson ymhlith yr holl grwpiau.

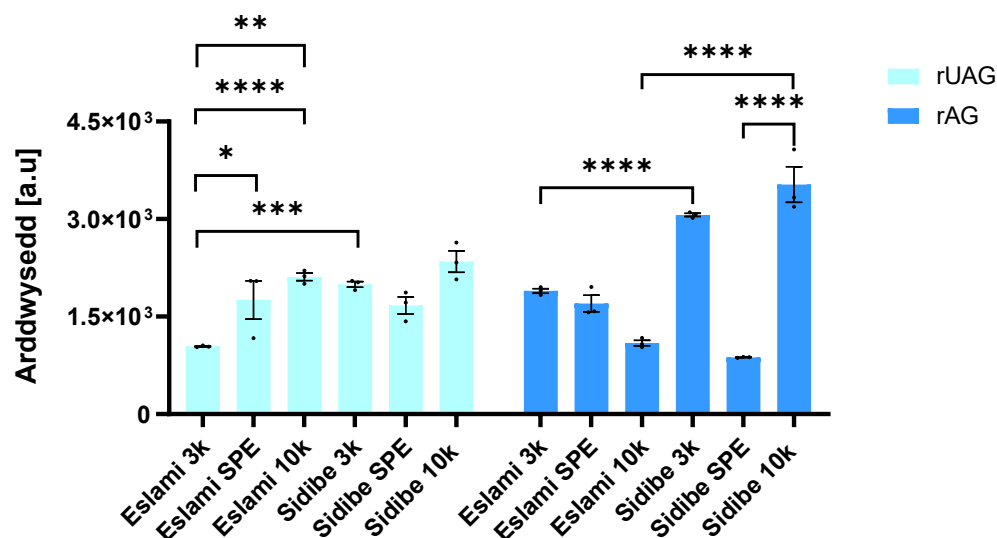


Ffigur 3.13 Canfod ghrelin yn dilyn dyddodiad protein, SPE a defnyddio siptipiau C18.

Mae yr ffigur hwn yn dangos canlyniadau SPE yn dilyn dyddodiad protein (D.P ar y graff). A. Ghrelin wedi ei echdynnu ar ôl dyddodiad protein yn erbyn dyddodiad protein ac SPE. B. Ghrelin wedi ei echdynnu gan ddefnyddio dyddodiad protein ac SPE ond gan ddefnyddio tipiau arferol yn erbyn siptipiau C18 cyn dadansoddiad MALDI-TOF. Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. **** < 0.001 , *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. Mae yr data a ddangosir yn cynrychioli $\pm$ SEM cymedrig. $N = 3$.

O ganlyniad i yr arddwysedd isel o ghrelin a welwyd ar ôl SPE, archwiliwyd opsiynau amgen i grynodi ghrelin mewn samplau ar ôl SPE. Un o yr opsiynau a archwiliwyd oedd defnyddio dyfeisiau hidlau allgyrchol sydd yn adnabyddus am eu gallu i buro a chrynodi samplau yn effeithiol (Yang a Sumbria 2021). Yn yr astudiaeth hon, ymchwiliwyd i yr defnydd o hidlwyr allgyrchol gyda torbwynt moleciwlaidd (*'molecular weight cut-off filters'*) o 10kDa neu 3kDa, ar ôl perfformio SPE am eu potensial i grynodi ghrelin mewn samplau (Ffigur 3.14).

O fewn set ddata Eslami, roedd SPE dadasyl ghrelin llygoden fawr yn sylweddol uwch na yr hidlydd allgyrchol 3 kDa ($P < 0.05$), tra bod yr hidlydd allgyrchol 10 kDa o dadasyl ghrelin mewn llygoden fawr yn sylweddol uwch na yr hidlydd allgyrchol 3 kDa ($P < 0.0001$). Mewn cyferbyniad, ar gyfer ghrelin asyl llygoden fawr, roedd yr hidlydd allgyrchol 3 kDa yn sylweddol uwch na'r hidlydd allgyrchol 10 kDa ($P < 0.001$). Wrth gymharu ar draws setiau data, roedd yr hidlydd allgyrchol 3 kDa Sidibe o dadasyl ghrelin llygoden fawr yn sylweddol uwch na yr hidlydd allgyrchol 3 kDa Eslami ($P < 0.001$), ac roedd yr hidlydd allgyrchol 3 kDa Sidibe o asyl ghrelin llygoden fawr hefyd yn sylweddol uwch na yr hidlydd allgyrchol 3 kDa Eslami ($P < 0.0001$). Ar ben hynny, roedd hidlydd allgyrchol 10 kDa Sidibe o asyl ghrelin llygoden fawr yn sylweddol uwch na hidlydd allgyrchol 10 kDa Eslami ($P < 0.0001$) a hefyd yn sylweddol uwch na SPE Sidibe o asyl ghrelin llygoden fawr ($P < 0.0001$). Gyda ei gilydd, mae yr canfyddiadau hyn yn dangos bod y dewis o hidlydd allgyrchol yn dylanwadu ar adferiad cymharol dadasyl ac asyl ghrein llygoden fawr, gyda yr hidlydd 10 kDa yn ffafrio dadasyl ghrelin llygoden fawr, tra bod yr hidlydd 3 kDa yn cadw asyl ghrelin llygoden fawr yn well. Yn ogystal, mae yr gwahaniaethau cyson rhwng setiau data Eslami a Sidibe yn tynnu sylw at effaith amrywiad methodolegol neu baratoi samplau ar adferiad ghrelin, gan danlinellu pwysigrwydd strategaeth echdynnu wrth bennu cynnyrch ac atgynhyrchadwyedd biofarcwyr.

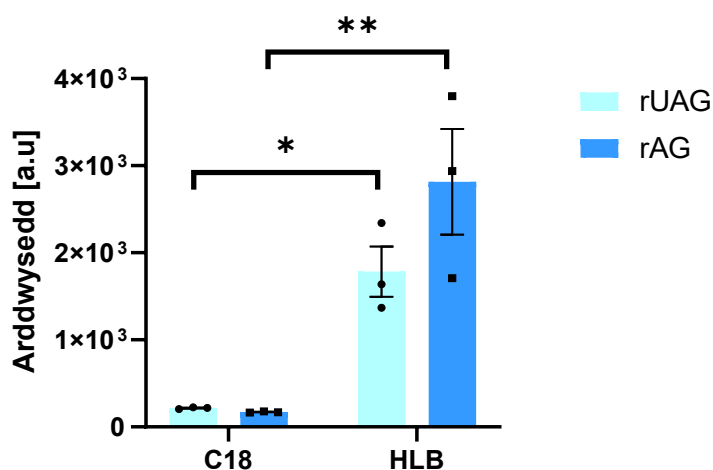


Ffigur 3.14 Cymhariaeth o ddefnyddio hidlwyr allgyrchol 3kDa neu 10kDa yn dilyn naill ai dulliau dyddodiad protein Eslami et al. neu Sidibe et al. ac SPE o gymharu â heb ddefnyddio hidlyddion allgyrchol.

Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$. Mae yr data a ddangosir yn cynrychioli $\pm$ SEM cymedrig. $N=3$. Dim ond ar gyfer cymariaethau dethol (Eslami SPE, 3k a 10k, a Sidibe SPE, 3k a 10k) y dangosir arwyddocâd ystadegol er mwyn eglurder. Disgrifir cymariaethau ystadegol arwyddocaol ychwanegol, gan gynnwys rhwng protocolau Eslami a Sidibe, yn nhestun y canlyniadau ac fe eu crynhoir yn Ffigur Atodol S1.

Er mwyn mynd i yr afael â arddwysedd isel parhaus ghrelin ar ôl echdynnu, archwiliwyd colofnau SPE amgen. Nodwyd colofnau HLB C18 fel dewis amgen posibl ac profwyd. Mae colofnau HLB yn wahanol i golofnau C18 yn eu cyfansoddiad; tra bod C18 yn cynnwys pecyn llawn fandylllog wedi ei seilio ar silica, mae colofnau HLB yn defnyddio pecyn bolymereg llawn fandylllog. Mae ghrelin yn arddangos nodweddion polar ac amholar oherwydd presenoldeb gweddillion lysin ac arginin, yn ogystal ag ychwanegiad y grŵp octanoyl. Mae astudiaethau blaenorol wedi adrodd ar natur ddeuol ghrelin (Eslami et al., 2016). Yn nodweddiadol, mae yn hysbys bod sorbyddion ('*sorbents*') mwy traddodiadol sydd yn seiliedig ar silica, fel colofnau C18, yn fwy effeithiol gyda dadansoddyddion amholar (Waters Corp). Fodd bynnag, mae gan golofnau HLB y fantais o allu echdynnu dadansoddyddion polar ac amholar. Mae yr nodwedd hon yn arbennig o berthnasol yn achos ghrelin, lle gall ffurfiau dadasyl ac asyl ghrelin arddangos priodweddau ychydig yn wahanol. O ganlyniad, allwn

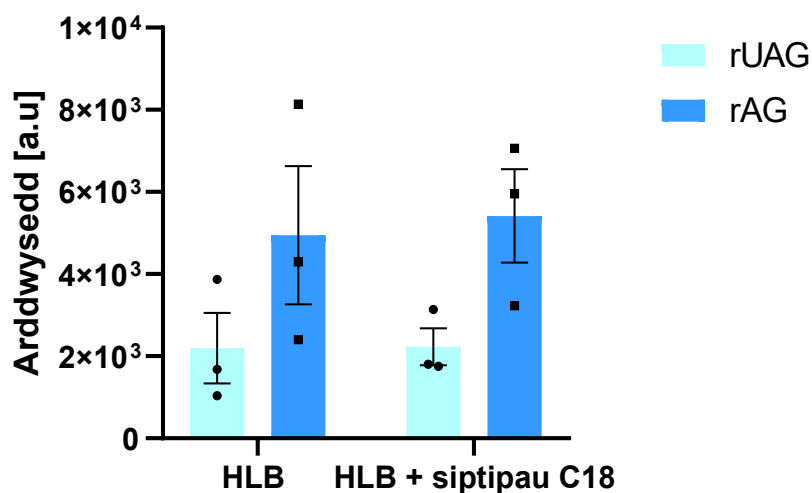
rhagwelwyd bod colofnau HLB yn briodol ar gyfer yr ystod eang o rywogaethau dadasyl ac asyl ghrelin. Dangosodd y colofnau HLB arddwysedd ghrelin sylweddol well ar gyfer dadasyl ghrelin ($P < 0.05$) ac asyl ghrelin ($P < 0.01$) llygoden fawr o ei gymharu â yr colofnau C18 traddodiadol (Ffigur 3.15). Ar sail y canlyniadau hyn, dewiswyd colofnau HLB i gynnal SPE o yr pwynt hwn ymlaen



Ffigur 3.15 Cymhariaeth o golofnau C18 yn erbyn colofnau HLB yn dilyn dyddodiad protein (dull Sidibe et al.) wrth echdynnu rAG a rUAG alldarddol wedi rhoi i mewn i blasma dynol.

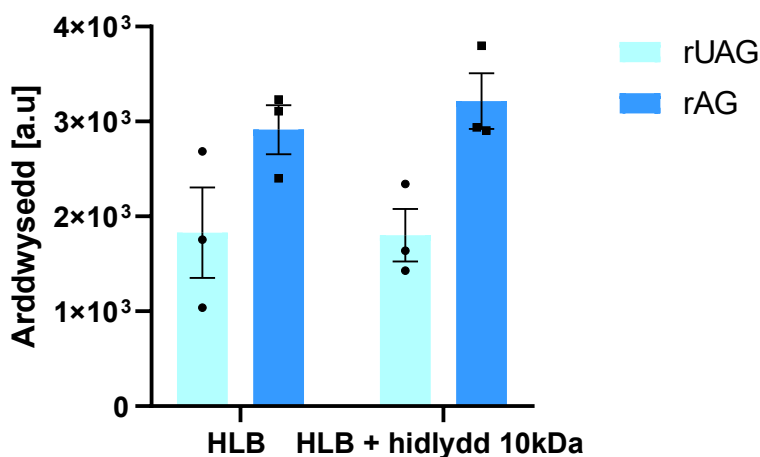
ANOVA dwy ffordd wedi eu perfformio gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. Mae yr data a ddangosir yn cynrychioli $\pm$ SEM cyfmedrig. $N=3$.

O ystyried perfformiad gwell colofnau HLB wrth ddargadw ghrelin, fe wnaethom archwilio ymhellach y posibilrwydd o wella dargadw ghrelin trwy eu cyfuno â siptipiau C18 ar ôl defnyddio yr colofnau HLB. Mae yr canlyniadau yn awgrymu nad oedd ychwanegu siptipiau C18 yn gwella dargadw ghrelin yn sylweddol o ei gymharu â defnyddio colofnau HLB yn unig (Ffigur 3.16). Mae hyn yn debyg i yr canlyniadau yn Ffigur 3.12 lle methodd siptipiau C18 i wella dargadw ghrelin ar ôl defnyddio colofnau C18. Oherwydd y ganlyniadau hyn cafodd y defnydd o siptipiau C18 ei eithrio o yr protocol. Dewis arall yw ystyried defnyddio hidlwyr allgyrchol ar ôl y colofnau HLB. Yn flaenorol, dangosodd defnydd o hidlwyr 10kDa llwyddiant o fewn cynyddu lefelau asyl ghrelin llygoden fawr (Ffigur 3.14). O ganlyniad, archwiliwyd y defnydd o hidlwyr 10kDa ymhellach ar ôl dyddodiad protein ac SPE nawr bod y colofnau HLB yn cael eu defnyddio. Ar y cyfan, ni welwyd unrhyw welliant sylweddol yn y lefelau ar gyfer dadasyl ac asyl ghrelin llygoden fawr alldarddol wedi ei roi mewn i blasma (Ffigur 3.17).



Ffigur 3.16 Effaith siptipau C18 ar dargadw ghrelin yn dilyn dyddodiad protein gan ddefnyddio dull Sidibe a cholofnau HLB.

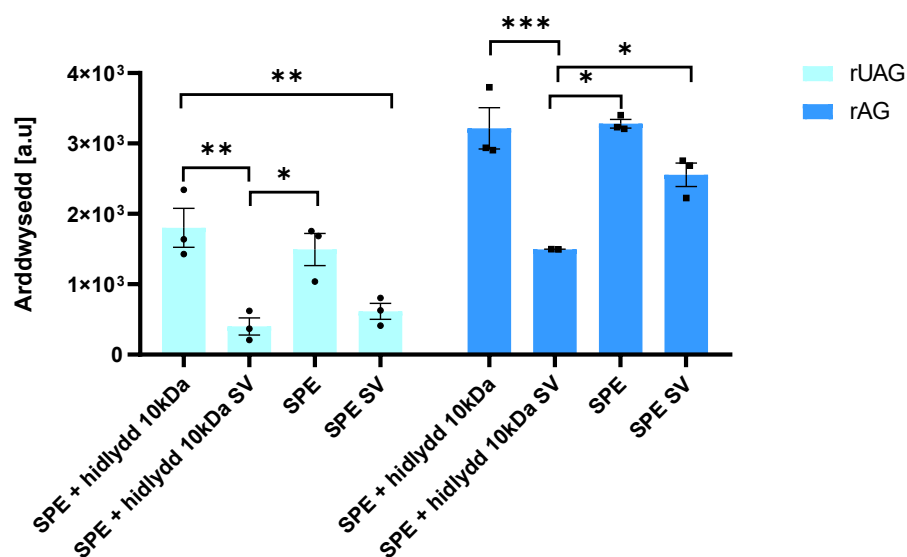
Wedi ei ddadansoddi gan MALDI-TOF. Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. Mae yr data a ddangosir yn cynrychioli $\pm$ SEM cymedrig. $N=3$.



Ffigur 3.17 Cymhariaeth o ganfod ghrelin yn dilyn SPE HLB a yr defnydd o hidlwyr 10kDa.

Aeth plasma gyda 10 ng/mL ghrelin llygodyn fawr alldarddol wedi ei roi i mewn iddo drwy dyddodiad protein (dull Sidibe et al.) cyn cael ei ddadansoddi gan MALDI-MS, perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. Mae yr data a ddangosir yn cynrychioli $\pm$ SEM cymedrig. $N=3$.

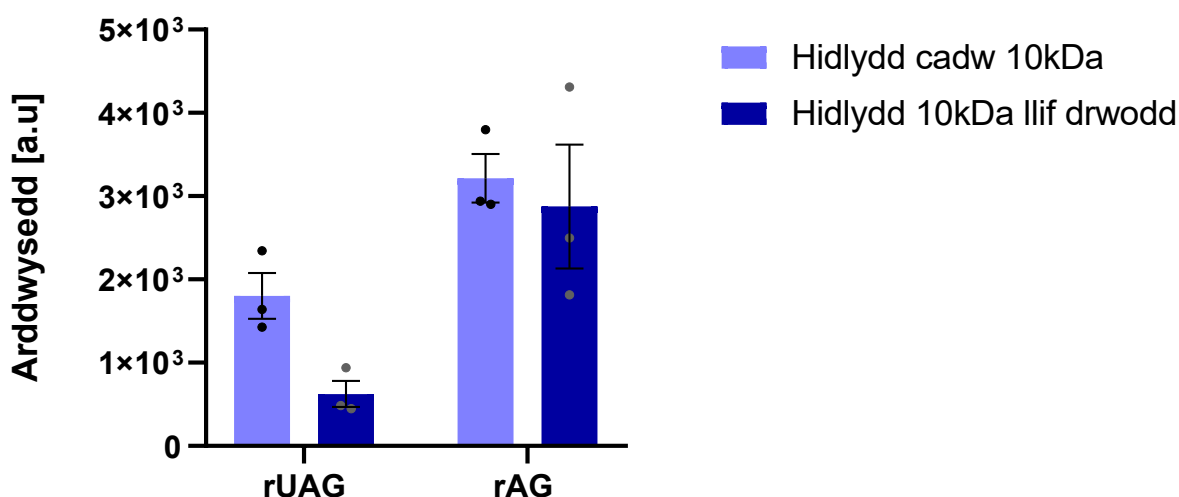
Ni wnaeth y defnydd o golofnau HLB a hidlydd allgyrchol arwain at welliannau sylweddol o ran darganfod ghrelin, felly defnyddiwyd dulliau amgen i wella dargadw ac echdynnu ghrelin o samplau. Aseswyd effaith sychu ar adferiad ghrelin gan ddefnyddio samplau plasma a gafodd dyddodiad protein (dull Sidibe et al.) ac yna SPE gyda cholofnau HLB. Sychwyd y samplau wedyn o dan wactod ('*vaccum speedvac*') naill ai yn syth ar ôl SPE neu ar ôl allgyrchu gan ddefnyddio hidlwyr 10kDa. Yn y ddau achos, canfuwyd lefelau is o ghrelin pryd cafodd y sychu ei berfformio ar ôl SPE neu ar ôl y hidlo 10kDa, (Ffigur 3.18). Ar gyfer asyl ghrelin llygoden fawr, gwelwyd cadw llawer mwy sylweddol pan broseswyd samplau gydag SPE yn unig neu gydag SPE ac yna hidlo 10kDa, heb sychu ($P < 0.05$). Ar ben hynny, roedd adferiad asyl ghrelin gydag SPE ac yna hidlo 10kDa yn sylweddol uwch nag yn y cam sych ar ôl cam hidlo 10kDa ($P < 0.001$). O ran dadasyl ghrelin llygod mawr, dangosodd samplau a gafodd hidlo 10kDa a sychu mewn gwactod lefelau ghrelin llawer is o ei gymharu ag SPE yn unig ($*P < 0.05$). Yn ogystal, arweiniodd SPE ynghyd â hidlo 10kDa (heb sychu) at adferiad llawer uwch na naill ai SPE gyda sychu gwactod ($**P < 0.01$) neu yr cyfuniad o hidlo 10kDa a sychu gwactod ($**P < 0.01$).



Ffigur 3.18 Cymharu effaith sychu yr sampl i yw grynodi.

Aeth samplau plasma â ghrelin llygoden fawr 10 ng/mL drwy dyddodiad protein (dull Sidibe et al.) wedi ei ddilyn gan SPE (colofnau HLB) ac yna naill ai cafodd eu sychu dan wactod gan ddefnyddio '*Speed Vac*' (SV) yn syth neu ar ôl cael eu allgyrchu gan ddefnyddio hidlwyr 10kDa. Yna dadansoddwyd samplau gan MALDI-MS. Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Mae yr data a ddangosir yn cynrychioli $\pm$ SEM cymedrig. N=3.

O ystyried y lefelau isel o ghrelin, ymchwiliwyd i yr posibilrwydd o golled ghrelin. Felly, yr amcan nesaf oedd nodi yr camau neu yr ffactorau yn y broses baratoi samplau a allai fod yn gyfrifol am y lefelau ghrelin isel a welwyd. Er mwyn asesu yr golled bosibl o ghrelin yn dilyn defnyddio hidlwyr 10kDa, aseswyd y llif drwodd a yr hidlydd 10kDa. O ystyried pwysau moleciwlaidd ghrelin (~3 kDa), disgwyliid iddo basio trwy yr hidlydd 10 kDa a chael ei adfer yn y ffracsiwn llif drwodd. Fodd bynnag, dangosodd y canlyniadau ddarlun mwy cymhleth (Ffigur 3.19). Ar gyfer dadasyl ghrelin llygod mawr, er bod cyfran nodedig o yr dadansoddydd wedi ei ganfod yn y ffracsiwn llif drwodd, arhosodd swm sylweddol yn yr hidlydd 10kDa. Ar draws yr atgynhyrchiadau, roedd lefelau dadasyl ghrelin llygod mawr yn yr hidlydd yn gyson uwch nag yn y ffracsiwn llif drwodd. Yn yr un modd, dangosodd asyl ghrelin llygoden fawr bresenoldeb sylweddol yn yr hidlydd a yr llif drwodd, gyda symiau hyd yn oed yn uwch wedi eu canfod mewn rhai achosion yn yr hidlydd nag yn y llif drwodd. Mae yr canfyddiad hwn yn awgrymu bod y ddau fath o ghrelin wedi eu cadw yn rhannol gan yr hidlydd, yn groes i yr disgwyliad o basio cyflawn y peptidau hyn trwy bilen MWCO 10kDa.



Ffigur 3.19 Daliad ghrelin o yr ddyfais hidlo allgyrchol 10kDa a yr llif drwy.

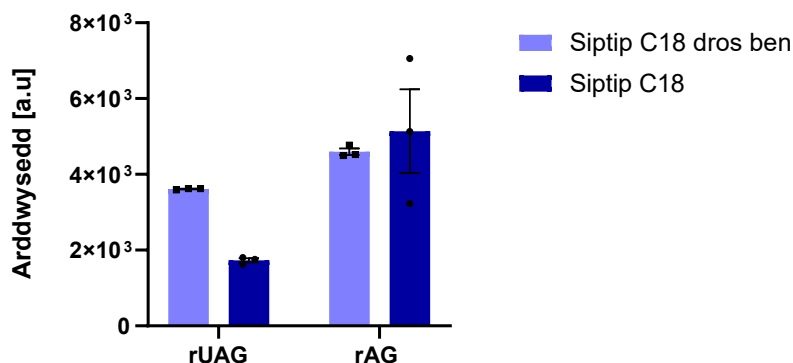
Aeth plasma â 10 ng/mL ghrelin llygoden drwy dyddodiad protein (dull Sidibe et al.), SPE (HLB) ac yna drwy hidlwyr 10kDa, dadansodwyd y ffracsiynau cadw a yr llif drwodd gan MALD-TOF. Mae yr data a ddangosir yn cynrychioli +/- SEM cymedrig. N=3.

Gan fod colled ghrelin yn ystod y cam hidlo allgyrchol mor amlwg, arweiniodd hyn at edrych ar camau eraill lle all colled ghrelin bod yn posibilrwydd. Un posibilrwydd yw defnyddio siptipiau C18. Mae cysyniad y siptipiau C18 yn debyg i yr golofn SPE, mae yr tip siptip yn cael ei breimio yn gyntaf, ac yna mae yr hydoddiant gyda yr peptid ghrelin yn cael ei sugno i mewn ac ei wasgaru ychydig o weithiau gyda yr syniad y byddai yr ghrelin yn rhwymo i wely yr siptipiau C18 ac ni fydda yr hylif a arhosai yn yr Eppendorf bellach yn cynnwys ghrelin. Mae cynnwys y siptipiau C18 yn cael ei ychwanegu ar unwaith i darged MALDI-TOF. I brofi yr ddamcaniaeth hon, cafodd sampl o safonau asyl a dadasyl ghrelin llygoden fawr (10 ng/mL) ei wanhau mewn dŵr gyda 0.01% TFA ac eu mesur ar yr MALDI-TOF ar ôl defnyddio yr siptipiau C18. Mesurwyd hefyd yr hylif dros ben o yr protocol siptipiau (lle na ddylai ghrelin fod yn bresennol).

Fel y dangosir yn Ffigur 3.20, arhosodd cyfran sylweddol o dadasyl ghrelin llygoden fawr yn y toddiant dros ben yn dilyn y weithdrefn siptip, gyda lefelau cyson uwch yn cael eu canfod yn y ffracsiwn dros ben o ei gymharu ag echludiad siptip ar draws yr holl atgynhyrchiadau. Mae hyn yn dynodi cadw gwael neu echludiad aneffeithlon o dadasyl ghrelin llygoden fawr, gan awgrymu nad yw yr peptid o bosibl yn rhwymo yn effeithiol i yr matrices C18 neu nad yw yn cael ei adfer yn ddigonol yn ystod yr echludiad.

Yn yr un modd, er bod asyl ghrelin llygoden fawr yn gyffredinol wedi ei adfer mewn symiau mwy yn echludiad siptip, roedd symiau sylweddol yn dal i fod yn bresennol yn y ffracsiwn dros ben. Mewn rhai achosion, roedd lefelau yr peptid yn y toddiant dros ben yn gymharol â, neu hyd yn oed yn uwch na yr rhai yn yr echludiad, gan amlygu anghysondebau ymhellach wrth adfer peptid.

Mae yr canfyddiadau hyn yn datgelu cyfyngiadau nodedig y protocol C18 siptip cyfredol, yn enwedig ar gyfer dadasyl ghrelin llygoden fawr, ac yn awgrymu y gall ffactorau fel rhwymo peptid is-optimaid, cryfder echludiad annigonol, neu golledion gweithdrefnol gyfrannu at yr aneffeithlonrwydd hyn.



Ffigur 3.20 Cynrychiolaeth o golled ghrelin yn ystod protocol siptipiau C18.

Aeth plasma â ghrelin llygodyn fawr 10 ng/mL drwy dyddodiad protein (dull Sidibe et al.) ac SPE (colofnau HLB) ac yna trwy brotocol siptipiau C18 cyn eu dadansoddi gan MALDI-MS. Mae yr data a ddangosir yn cynrychioli +/- SEM cymedrig. N=3.

Agwedd arall yr ymchwiliwyd iddi mewn perthynas â cholled ghrelin oedd rhwymiad amhenodol moleciwlau ghrelin i wahanol arwynebau y daethpwyd ar eu traws yn ystod y broses o baratoi sampl. Rhagdybiwyd y gall ghrelin aros yn rhwym i yr tiwbiau Eppendorf gwreiddiol neu gydrannau eraill, gan arwain at lefelau is o ghrelin yn cael eu mesur yn y samplau terfynol. Gallai yr ffenomen hon gyfrannu at arddwysedd isel y signalau ghrelin a welwyd.

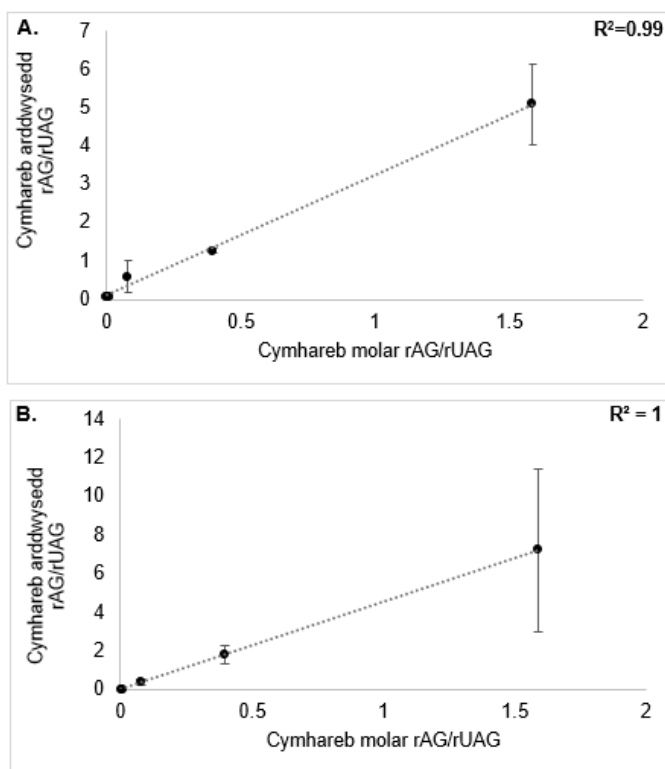
3.3.5.1 Rhwymiad Amhenodol Ghrelin

3.3.5.1.1 Ymchwilio i yr Defnydd o Albwmn Serwm Buchol i Atal Rhwymiad Amhenodol

Er mwyn mynd i yr afael a yr mater o rwymiad amhenodol yn ystod echdynnu protein, archwiliwyd y defnydd o albwmn serwm buchol ('*Bovine Serum Albumin*', BSA). Mae BSA yn adnabyddus am ei allu i leihau rhwymiad amhenodol a gwella sefydlogrwydd protein. Y cysyniad sylfaenol yw y byddai moleciwlau BSA yn rhwymo i safleoedd posibl lle gallai rhwymiad amhenodol ddigwydd, a thrwy hynny atal y protein o ddiddordeb rhag glynu i yr arwynebau hyn.

Er mwyn gwerthuso effeithiolrwydd BSA wrth leihau rhwymiad amhenodol, ailadroddwyd y gromlin raddnodi a ddisgrifir ym Mhennod 3.3.3, Ffigur 3.9, heb ychwanegu BSA (Ffigur 3.21A) a gydag ychwanegu 0.1% BSA yn yr hydoddiant a ddefnyddiwyd i wanhau yr samplau safon (Ffigur 3.21B). Defnyddiwyd dadasyl ghrelin llygodyn fawr fel ISTD ar 0.65 ng/mL gydag asyl ghrelin llygodyn fawr yn amrywio o

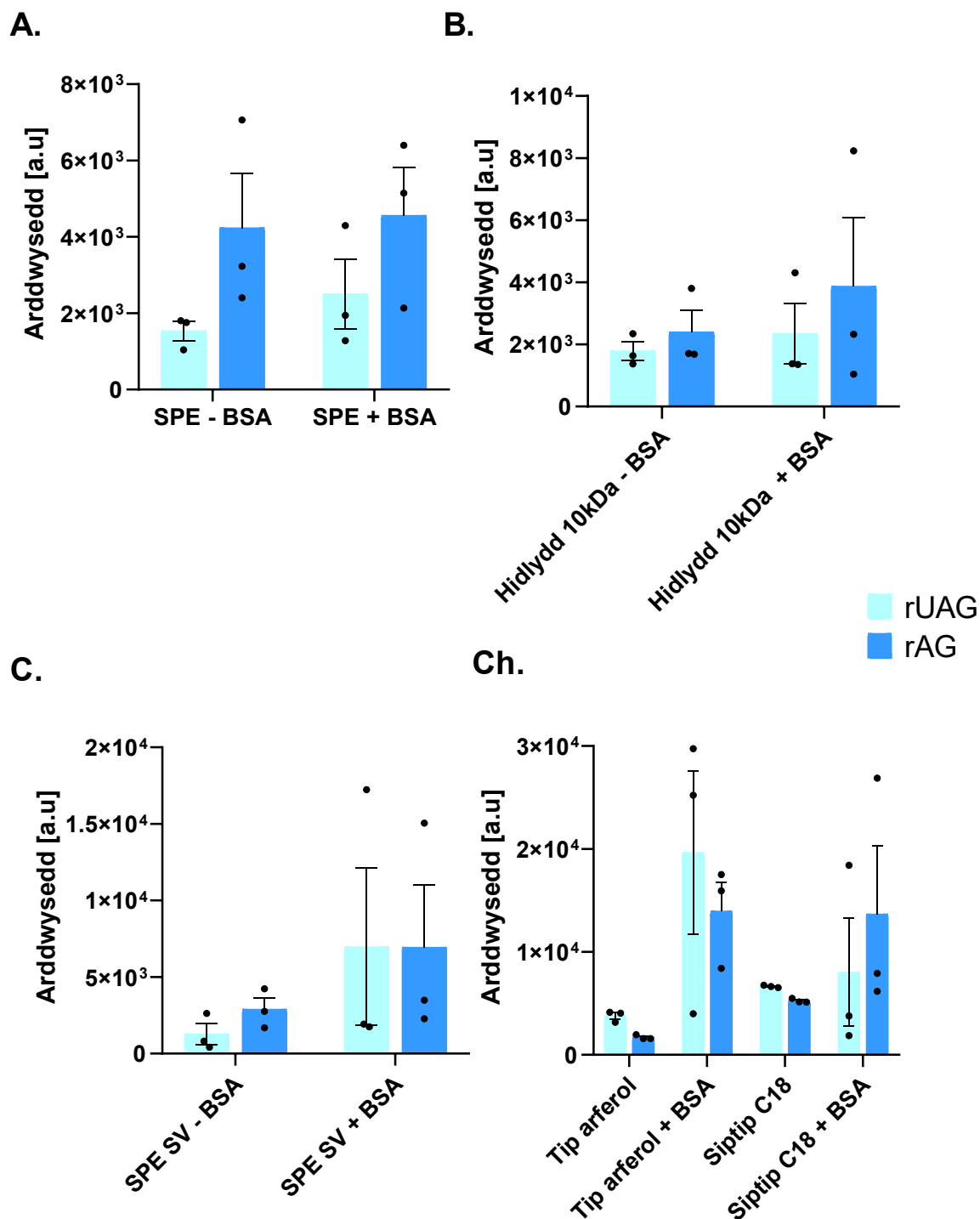
0.08-2 ng/mL. Yn ogystal, cafodd y tipiau a yr tiwbiau Eppendorf a ddefnyddiwyd yn yr arbrawf eu gorchuddio â 0.1% BSA i leihau yr siawns bod ghrelin yn rhwymo i yr arwynebau hyn. Er bod ychwanegu BSA yn dangos rhywfaint o welliant yn y gromlin raddnodi (R^2 o 1 o gymharu â R^2 o 0.99 heb BSA), roedd y gromlin raddnodi heb BSA eisoes wedi ei mesur yn dda ac felly nid oedd lle i wella yn arwyddocaol.



Ffigur 3.21 Cromlin graddnodi ghrelin llygoden fawr heb (A) a gyda (B) presenoldeb 0.1% BSA. rUAG fel ISTD ar 51 ng/mL a rAG yn amrywio o 0.08-2 ng/mL.

Wedi ei ddadansoddi gan MALDI-TOF $N=3$. Mae pob pwynt calibradu yn cynrychioli arddwysedd cyfartalog y signal a gyfrifwyd o dair rhediad annibynnol ($N = 3$). Mae llinellau tuedd yn cynrychioli ffitiadau atchweliad llinol, ac adroddir gwerthoedd R^2 i nodi daioni yr ffit. Mae bariau gwall yn dangos y gwyrriad safonol.

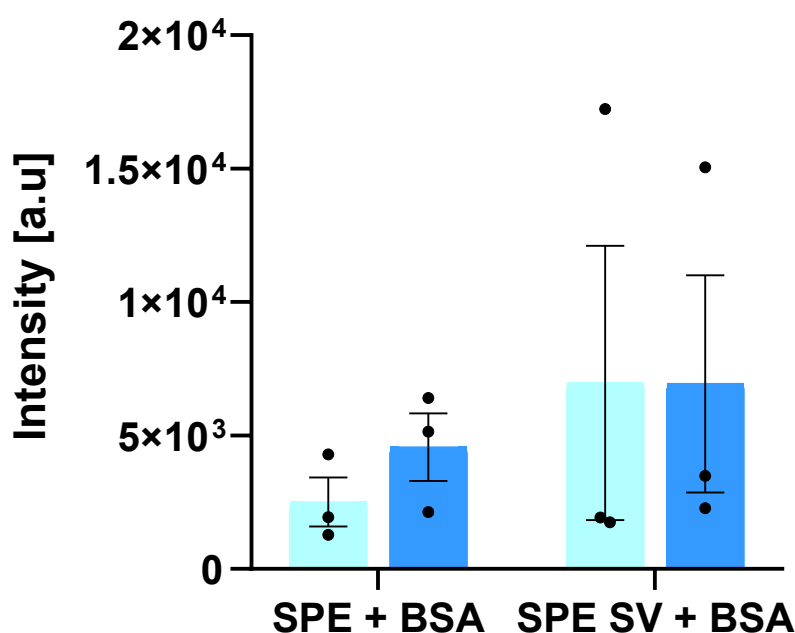
Ar ôl cynnal y gromlin raddnodi yn llwyddiannus ym mhresenoldeb 0.1% BSA, cynhaliwyd arbrofion pellach i asesu effaith cynnwys BSA wrth baratoi yr samplau. Roedd yr arbrofion hyn yn cynnwys gorchuddio hidlwyr allgyrchu 10kDa, colofnau HLB, y tiwbiau Eppendorf (a ddefnyddir yn ystod y cyfnod sychu), tipiau arferol, a yr siptipiau C18 gyda 0.1% BSA cyn eu defnyddio (Ffigur 3.22). Ar y cyfan, ni wnaeth y defnydd o BSA wrth baratoi samplau wella dargadwad ghrelin yn sylweddol o ei gymharu â lefelau ghrelin heb defnyddio BSA.



Ffigur 3.22 Asesu effaith BSA ar adferiad ghrelin ar ôl ei echdynnu.

Aeth plasma â ghrelin llygoden fawr (10 ng/mL) drwy dyddodiad protein (dull Sidibe et al.) ac SPE (colofnau HLB) gydag a heb 0.1% BSA (A), ac yna naill ai glanhau gan ddefnyddio hidlwyr 10kDa gydag a heb 0.1% BSA (B) neu grynodiad trwy sychu o dan wactod (SV) gan ddefnyddio tiwbiau gydag a heb 0.1% BSA (C) neu gan ddefnyddio C18 siptipiau gydag a heb 0.1% BSA (Ch). Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. Mae yr data a ddangosir yn cynrychioli $\pm$ SEM cymedrig. $N=3$.

Archwiliwyd cymhariaeth ochr yn ochr o effaith defnyddio BSA yn ystod SPE a yr camau sychu i benderfynu a allai BSA gynorthwyo gyda cynyddu lefelau ghrelin yn ystod sychu dan wactod, o ei gymharu â SPE yn unig. Unwaith eto, ni welwyd unrhyw wahaniaethau arwyddocaol, sydd yn awgrymu nad oedd sychu yr sampl neu gyflyru â BSA yn cynyddu adferiad ghrelin yn sylweddol (Ffigur 3.23).

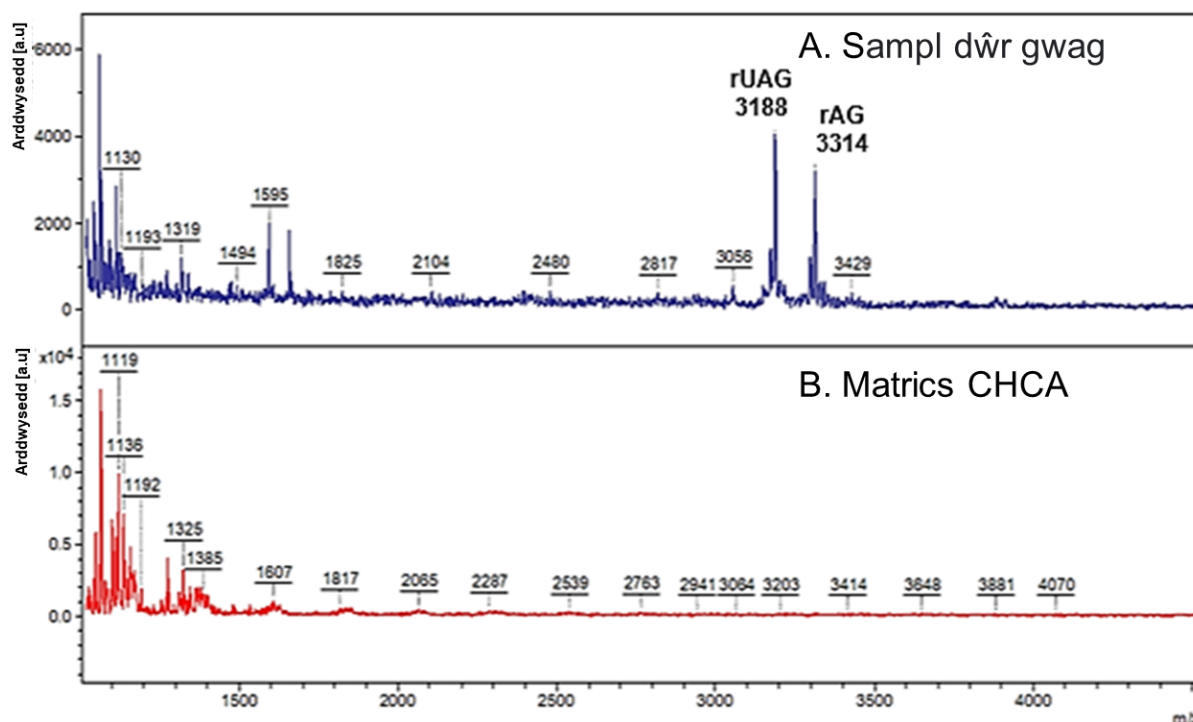


Ffigur 3.23 Adfer ghrelin ar ôl ei echdynnu ym mhresenoldeb neu absenoldeb BSA yn ystod y camau SPE a SV.

Aeth plasma â ghrelin 10 ng/mL drwy dyddodiad protein (dull Sidibe et al) a SPE (colofnau HLB) a eu sychu i lawr o dan wactod (SV) yn dilyn cyflyru gyda 0.1% BSA. Samplau wedi eu dadansoddi gan MALDI-TOF. Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. Mae yr data a ddangosir yn cynrychioli $\pm$ SEM cymedrig. $N=3$.

3.3.5.1.2 Ymchwilio i yr Posibilrwydd o Ghrelin yn Rwymo i yr Plât Targed MALDI

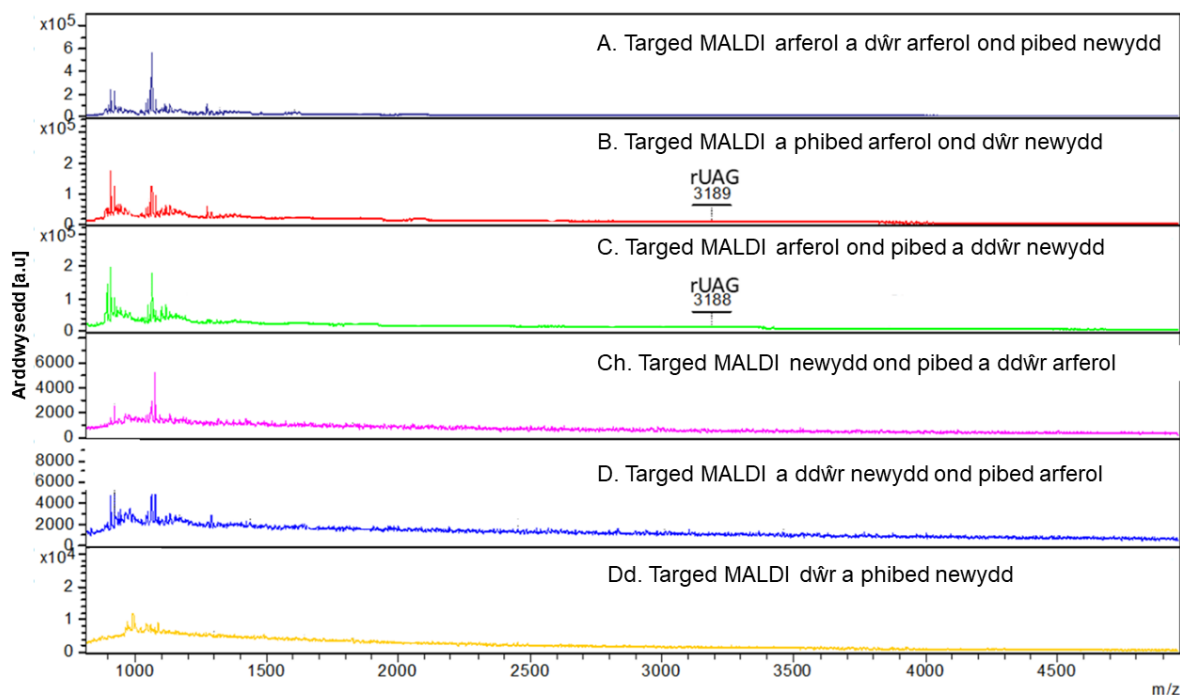
Yn ystod ymchwiliad manwl i yr ffynonellau posibl o colled ghrelin wrth paratoi yr samplau, sylwyd bod ghrelin yn bresennol yn ystod dadansoddiad MALDI-TOF o 'samplau gwag' (Ffigur 3.24A). Er mwyn nodi ffynhonnell yr halogiad, archwiliwyd y matrices yn unig i weld a oedd yn cynnwys olion ghrelin. Ni chanfuwyd unrhyw signalau ghrelin yn y matrices yn unig (Ffigur 3.24B), sydd yn awgrymu nad yw yr matrices yn ffynhonnell halogiad ghrelin.



Ffigur 3.24 Presenoldeb halogiad ghrelin.

Presenoldeb ghrelin llygodyn fawr mewn sampl dŵr gwag yn ystod dadansoddiad MALDI-TOF (A), ond ei absenoldeb pan dadansoddwyd y matrics yn unig (B). Enghraifft o un sbectrwm MALDI-TOF allan o 12.

Cynhaliwyd profion ychwanegol gan ddefnyddio targed MALDI, ffynhonnell ddŵr, a phibed gwahanol (Ffigur 3.25) i nodi ffactorau a allai gyfrannu at bresenoldeb ghrelin yn sbectra MALDI. Yn gyntaf, archwiliwyd y targed MALDI arferol a ddefnyddiwyd o dan amodau gwahanol. Hyd yn oed ar ôl newid yr ffynhonnell ddŵr, a yr bibed a ddefnyddiwyd, gwelwyd rhywogaethau ghrelin yn gyson yn y sbectra ar ôl defnyddio yr targed MALDI arferol (Ffigur 3.25 A-C). Roedd hyn yn awgrymu bod ghrelin yn cronni ar arwyneb y targed dros amser er gwaethaf glanhau rhwng arbrofion (gweler Adran 2.4, Gweithdrefn Glanhau 1), gan arwain at halogiad. Felly, profwyd plât targed MALDI newydd (Ffigur 3.25 D-F). O dan yr un amodau arbrofol, ni chanfuwyd unrhyw rywogaethau ghrelin yn y sbectra o yr targed newydd. Cadarnhaodd hyn fod yr halogiad yn benodol i yr targed MALDI arferol a ddefnyddir.



Ffigur 3.25 Asesiad o ffynonellau posibl halogiad ghrelin.

Cynhaliwyd dadansoddiad MALDI ar A. Targed MALDI a dŵr arferol ond pibed newydd. B. Targed MALDI a phibed arferol ond dŵr newydd. C. Targed MALDI arferol ond pibed a dŵr newydd. Ch. Targed MALDI newydd ond pibed a dŵr arferol. D. Targed MALDI a dŵr newydd ond pibed arferol. Dd. Targed MALDI, dŵr, a phibed newydd. Enghraifft o un sbectwm MALDI-TOF allan o 12.

Ar sail yr arsylwadau hyn, daethpwyd i yr casgliad y gall ghrelin adeiladu ar y targed MALDI dros amser, gan arwain at halogi samplau dilynol. I liniaru yr mater hwn, gweithredwyd protocol glanhau mwy trwyadl ar gyfer y targed MALDI i gael gwared ar y ghrelin gweddilliol yn effeithiol ac atal croes halogi rhwng samplau. Yn fwy penodol, er mwyn atal croes halogi, glanhawyd y targed gan ddefnyddio 80% TFA (a amlinellir yn Adran 2.4, Gweithdrefn Glanhau 2) cyn pob dadansoddiad dilynol. Yn dilyn y protocol glanhau helaeth newydd, profwyd yr targed MALDI eto a ni welwyd unrhyw bresenoldeb ghrelin.

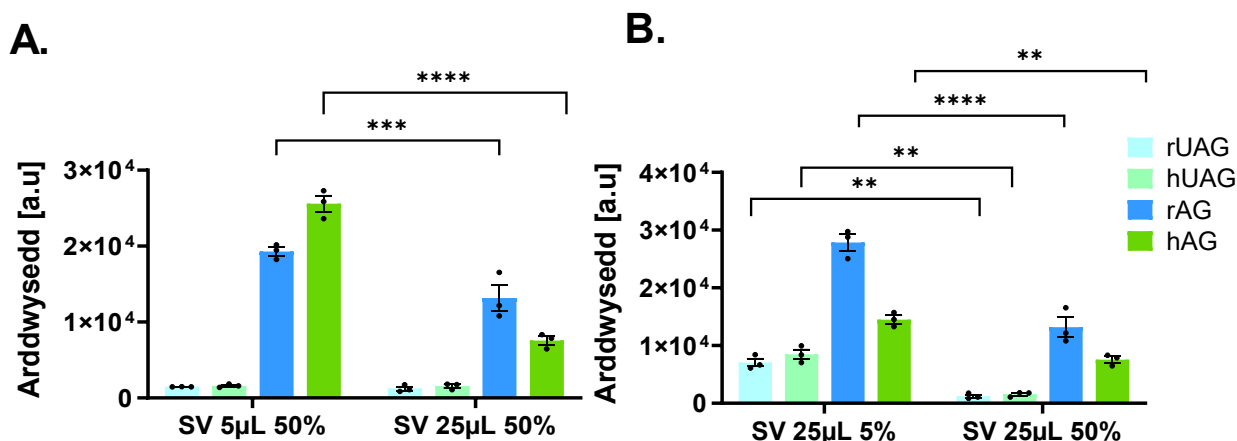
3.3.6 Crynodi Ghrelin mewn Samplau

3.3.6.1 Sychu Samplau

Er mwyn mynd i yr afael â yr mater o grynodiadau ghrelin isel ar ôl SPE, cynhaliwyd astudiaethau pellach i archwilio effeithiolrwydd crynodi samplau ghrelin trwy sychu safonau ghrelin o dan wactod (heb unrhyw ddyddodiad protein neu SPE blaenorol). Felly, roedd y canlyniadau yn wahanol i yr arbrofion blaenorol, ble ddadansoddodd sychu lawr dan wactod ar ôl dyddodiad protein neu yr defnydd o SPE neu hidlwyr 10kDa.

I ddechrau, aseswyd effaith y gyfaint sychu drwy gymharu samplau a sychwyd o gyfeintiau cychwynnol o 5µL neu 25µL ac ail hydoddi mewn cyfaint sefydlog o 5µL o 50% asetonitril, sef y toddydd hydoddi safonol a ddefnyddiwyd mewn arbrofion blaenorol (Ffigur 3.26A). Nod yr arbrawf hwn oedd pennu a allai cyfaint cychwynnol llai, sydd yn lleihau yr amser sychu, wella adferiad, gan y gallai amseroedd sychu estynedig gyda chyfeintiau mwy arwain at golli ghrelin. Yn ddiddorol, er gwaethaf y crynodiad damcaniaethol uwch a ddisgwyliar o sychu 25µL, dangosodd asyl ghrelin llygoden fawr a dynol arddwysedd sylweddol uwch pan gafodd ei sychu o yr gyfaint llai o 5µL (asyl ghrelin llygoden fawr, $P < 0.001$; asyl ghrelin dynol, $P < 0.0001$). Awgrymodd hyn y gallai colled ghrelin yn ystod sychu hirfaith fod yn fwy effeithiol nag effaith crynodiad y gyfaint mwy.

Ar yr un adeg, perfformiwyd ail set o arbrofion i archwilio a oedd canran yr asetonitril yn y toddydd ail hydoddi yn dylanwadu ar adferiad peptid ar ôl sychu. Sychwyd samplau o gyfaint o 25µL ac yna eu hydoddi mewn 5µL o naill ai asetonitril 5% neu 50% (Ffigur 3.26B). Ysgogwyd hyn gan y posibilrwydd y gallai defnyddio crynodiadau uchel o asetonitril, yn ystod yr ail hydoddi ac yn y toddiant matrices ei hun, leihau hydoddedd peptid neu achosi colli sampl yn ystod y broses o sbotio. Ar draws yr holl rywogaethau ghrelin a brofwyd, gwellodd arddwysedd y signal yn sylweddol mewn asetonitril 5% o ei gymharu â asetonitril 50% (dadasyl ghrelin llygoden fawr, $P < 0.01$; dadasyl ghrelin dynol, $P < 0.01$; asyl ghrelin llygoden fawr, $P < 0.0001$; asyl ghrelin dynol, $P < 0.01$). Er na chafodd ei brofi yn y set hon o arbrofion, dull arall sydd yn werth ei archwilio mewn gwaith yn y dyfodol fyddai ail hydoddi y peptid sych yn uniongyrchol i yr toddiant matrices MALDI, a allai symleiddio paratoi samplau ymhellach ac o bosibl gwella adferiad.



Ffigur 3.26 Effaith sychu o dan SV gyda chyfeintiau cychwynnol gwahanol ac ail-hydoddi mewn hydoddiannau sydd yn cynnwys canran wahanol o asetonitril.

Mewn panel A, paratowyd 40ng o hUAG, hAG, rUAG a rAG mewn cyfaint o 5µL neu 25µL, ei sychu o dan gwactod ac ei ail hydoddi mewn 5µL o 50% asetonitril. Mewn panel B, cafodd samplau ei sychu lawr o cyfaint cychwynnol o 25µL (fel panel A) ond cafodd ei ail hydoddi naill ai mewn 5% neu 50% asetonitril er mwyn asesu effaith o grynodiad asetonitril ar arddwysedd. Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. Mae yr data a ddangosir yn cynrychioli SEM cymedrig. **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$. +/- SEM. N=3.

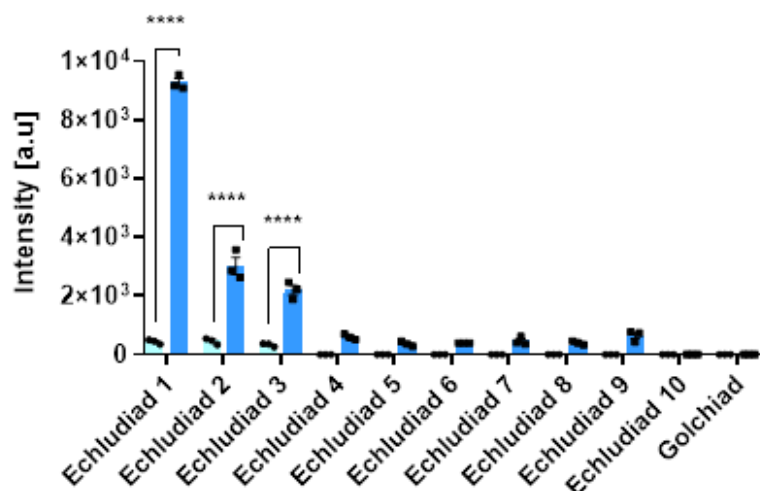
3.3.6.2 Plât Micro Echludiad

Er mwyn mynd i yr afael â yr problemau crynodiad a gafwyd yn flaenorol, arbrofwyd dull gwahanol o SPE gan ddefnyddio plât micro echludiad (μ Echludiad, ' *μ Elution*'). Rhannwyd y plât μ Echludiad yn ddwy adran, gydag un hanner yn cynnwys pecynnu Oasis MAX, sydd wedi ei gynllunio ar gyfer cyfansoddion asidig, a yr hanner arall yn cynnwys pecynnu WCX, sydd wedi ei gynllunio am fasau cryf. Cynlluniwyd y dull hwn i optimeiddio dargadwad ac adfer rhywogaethau ghrelin yn ystod y broses echdynnu. Yn ôl argymhelliad protocol Waters ar gyfer peptidau, ychwanegwyd ISTD ghrelin llygoden fawr at blasma a chymysgwyd 1:1 gyda 4% asid ffosfforig (H_3PO_4) mewn cyfaint o 750 µL. Ni ddefnyddiwyd dulliau dyddodiad protein cyn defnyddio yr plât μ Echludiad gan fod ychwanegu H_3PO_4 yn torri rhwymiad y peptid i yr protein ac yn gwanhau yr sampl ac o ganlyniad yn lleihau gludedd y sylwedd a chynyddu yr amser cyswllt â yr sorbent. Gellid cwblhau yr echludiad terfynol mewn 25 µL o 1% TFA yn 75/25 asetonitril/ H_2O . O ganlyniad, wrth llwytho gyda 750 µL ac echludiad mewn 25 µL, gellir crynodi yr sampl hyd at ffactor o x30. Er mwyn profi a oedd un echludiad o

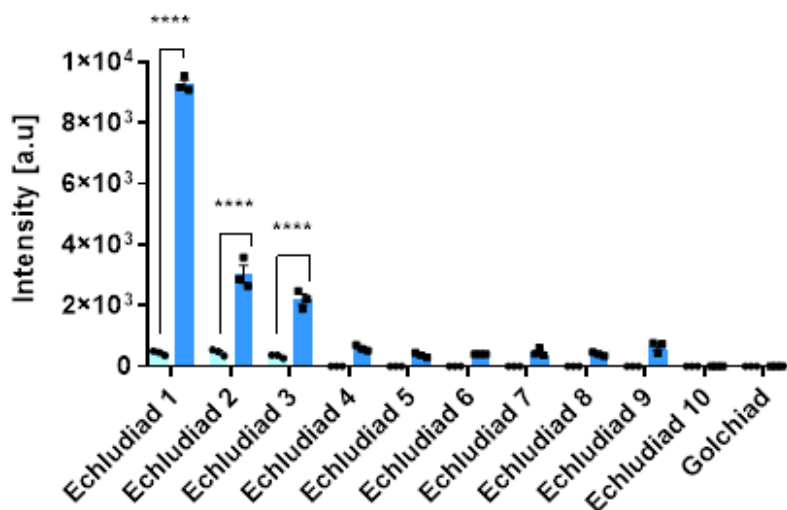
25 μL yn ddigon i echludo ghrelin o yr plât, ailadroddwyd y cam echludiad ddeg gwaith o yr un ffynnon a chadwyd pob echludiad ar wahân ac eu dadansoddi yn unigol am bresenoldeb ghrelin. Yn dilyn yr echludiad terfynol (degfed), perfformiwyd cam golchi, a phrofwyd hwnnw hefyd am bresenoldeb ghrelin (Ffigur 3.27). Yn ystod y dadansoddiad hwn, profwyd y colofnau MAX a yr WCX a amlygir yn Ffigur 3.26 A a B, yn y drefn honno. Ni chanfuwyd ghrelin dynol mewndarddol gan ddefnyddio yr protocol hwn ac felly dim ond yr ISTD, ghrelin llygoden fawr, a welir yn y ffigur. Gwelir tebygrwydd rhwng colofnau MAX a WCX yn y dadansoddiad. Gellir gweld gyda yr ddwy fath o golofn, bod arddwysedd ISTD asyl ghrelin llygoden fawr i yw weld yn echludiadau 1-3 ar gyfer y MAX ($P < 0.001$) ac 1-2 ar gyfer WCX (echludiad 1, $P < 0.001$ ac echludiad 2 $P < 0.001$), sydd yn sylweddol uwch na arddwysedd y dadasyl ghrelin llygoden fawr. Yn ogystal, ar ôl mynd trwy yr colofnau MAX a WCX, gwelwyd ISTD ghrelin llygoden fawr ym mhob un o yr deg cam echludiad ac yn ystod y cam golchi. Gwnaeth arddwysedd y ghrelin llygoden fawr leihau yn ystod echludiadau. Yn achos y golofn MAX (Ffigur 3.27A), mae yr rhan fwyaf o yr ghrelin yn cael ei ddal yn ystod echludiad 4, sydd yn awgrymu bod angen o leiaf 100 μL ar gyfer y cam echludiad. Ar gyfer colofn WCX (Ffigur 3.26B), mae ghrelin yn cael ei ddal yn bennaf yn ystod echludiad 3, sydd yn golygu bydd angen cyfaint o leiaf o 75 μL i ddal ghrelin. Mae cynyddu yr cyfaint echludiad o 25 μL fel mae yr protocol yn awgrymu, yn dileu manteision defnyddio yr plât $\mu\text{Echludiad}$ wrth i yr ffactor crynodiad leihau. Ar gyfer y golofn MAX, cafodd dadasyl ghrelin llygoden fawr golled o 92%, tra ddim ond colled o 20% a gafodd asyl ghrelin llygoden fawr. Mewn cymhariaeth, ar gyfer y WCX, arweiniodd dadasyl ghrelin llygoden fawr at golled o 99%, tra ddim ond colled o 1% a gafodd y asyl ghrelin llygoden fawr. Ar ôl rhannu ein canlyniadau â chynhyrchwyr y plât $\mu\text{Echludiad}$, cynghorodd ein harbenigwyr i barhau ag echludiad o 25 μL ac i ddefnyddio siptipiau C18 i grynodi yr samplau ymhellach. Felly, defnyddiwyd yr echludiad cyntaf (echludiad 1) y plât $\mu\text{Echludiad}$ i werthuso effaith siptipiau C18. Dangosodd y canlyniadau ostyngiad sylweddol yn lefelau asyl ghrelin llygoden fawr ($p < 0.001$ ar gyfer y MAX a $p < 0.0001$ ar gyfer y WCX) ar ôl defnyddio siptipiau C18, tra bod lefelau dadasyl ghrelin llygoden fawr wedi aros yn gymharol heb newid (Ffigur 3.28). Mae yr canfyddiadau hyn yn awgrymu fel darganfydded yn gynharach efallai na fydd defnyddio siptipiau C18 yn crynodi yr sampl ghrelin yn effeithiol yn ôl y disgwyl. Yn lle hynny, mae yn ymddangos y gall defnyddio siptipiau C18 arwain at arddwysedd is o ghrelin. Ymhellach, ymddangosodd asyl ghrelin llygoden fawr arddwysedd

sylweddol uwch na dadasyl ghrelin llygoden fawr ar gyfer y colofnau MAX a yr WCX ($P < 0.0001$). O ran asyl ghrelin llygoden fawr, perfformiwyd y golofn WCX gryn dipyn yn well ($P < 0.0001$) ar gyfer arddwysedd ghrelin o ei gymharu â yr MAX, tra ni welwyd gwahaniaeth arwyddocaol mewn dadasyl ghrelin llygoden fawr rhwng y ddau. Felly, mae yn awgrymu bod y plât yn fwy addas ar gyfer echdynnu asyl ghrelin o ei gymharu â dadasyl ghrelin.

A.

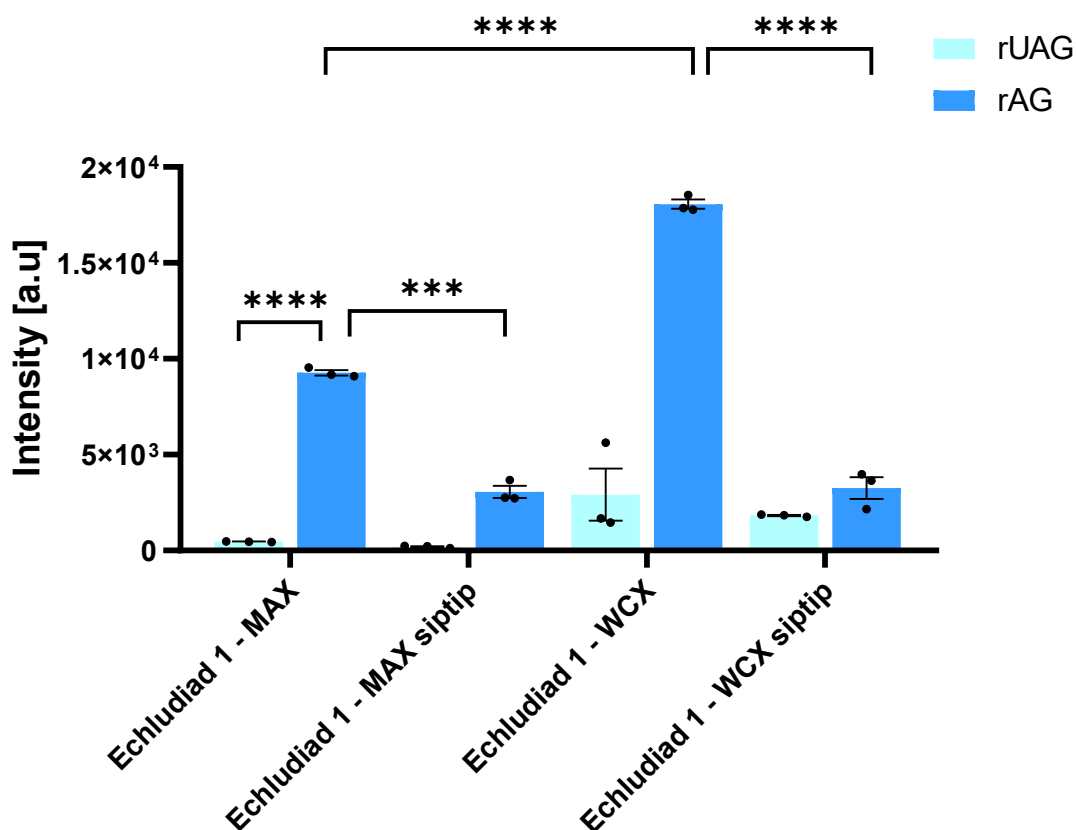


B.



Ffigur 3.27 Dadansoddiad o lefelau ghrelin ar ôl echludiad parhaus ac yna cam golchi gan ddefnyddio naill ai colofnau MAX (A) neu WCX (B).

Cafodd plasma gyda ghrelin llygoden fawr alldarddol (10 ng/mL), ei drin â H_3PO_4 ac yna ei ddilyn gan SPE gan ddefnyddio plât μ Echludiad (colofnau MAX neu WCX). Cynhaliwyd echludiadau o samplau lluosog. Dadansoddiwyd y samplau gan MALDI-TOF. Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. *** $P < 0.01$, **** $P < 0.001$. Mae yr data a ddangosir yn cynrychioli $\pm$ SEM cymedrig. $N=3$.



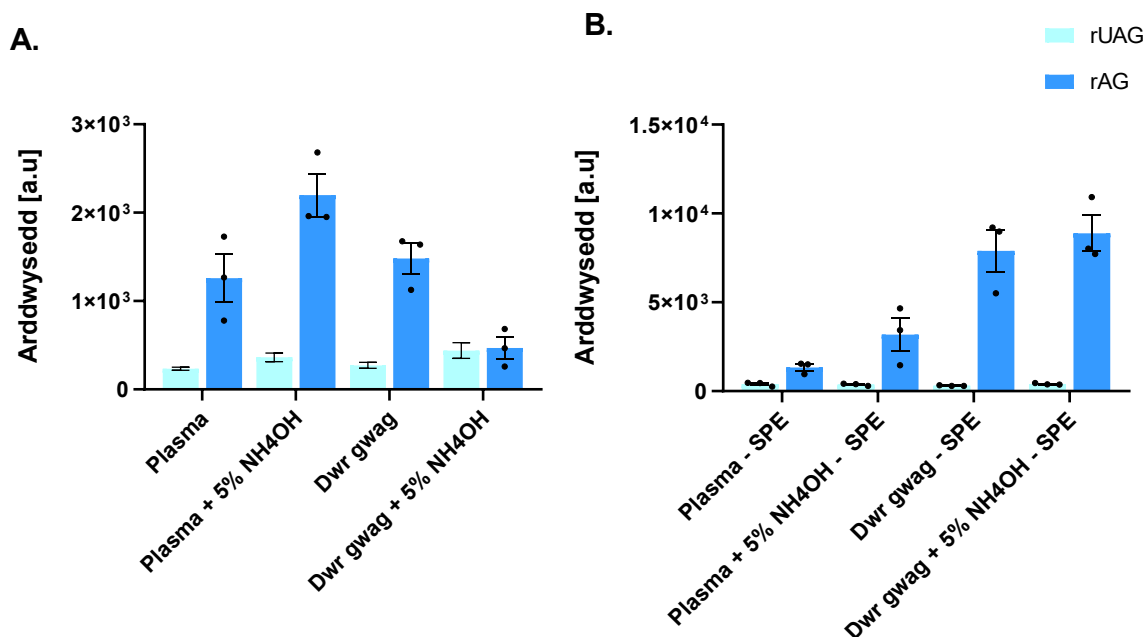
Ffigur 3.28 Dadansoddiad o lefelau ghrelin wedi cam 1 o yr echludiad gan ddefnyddio colofnau MAX neu WCX (ar blât μ Echludiad), gydag a heb ychwanegu siptipiau ar ei ôl.

Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Mae yr data a ddangosir yn cynrychioli $\pm$ SEM cymedrig. $N=3$.

3.3.6.3 Profi yr Defnydd o Amoniw Hydrocsid

Gan fod ghrelin yn beptid bach, mae ganddo debygolrwydd cynyddol o rwymo i albwmen a phroteinau mwy eraill. Er mwyn atal rhwymiad amhenodol ghrelin i broteinau a thrwy hynny gynyddu lefelau ghrelin, ychwanegwyd amoniwm hydrocsid, a ddefnyddiwyd yn flaenorol ar gyfer dadansoddiad ghrelin (Thomas et al., 2021), at blasma ochr yn ochr ag ISTD. Yn yr arbrawf hwn, cyflwynwyd 5% amoniwm hydrocsid (NH_4OH) i samplau plasma oedd hefyd yn cynnwys ISTD ghrelin llygoden fawr (10 ng/mL) ac yna ei gadw ar fortects am ddau funud. Ar ôl ychwanegu amoniwm hydrocsid, perfformiwyd dyddodiad protein (dull Sidibe et al.) gyda phrosesu dilynol gan SPE (colofnau HLB). Cynhaliwyd dau gam dadansoddol i werthuso effeithiau ychwanegu amoniwm hydrocsid: (1) dadansoddiad ar ôl dyddodiad protein a (2) dadansoddiad ar ôl dyddodiad protein ac SPE. Yn y rhediad hwn ($N=1$),

ymddangosodd ychwanegiad o 5% NH_4OH at samplau plasma yn dilyn dyddodiad protein at cynyddiad o fewn lefelau asyl ghrelin llygod mawr, o bosibl trwy amharu ar rwymo ghrelin i broteinau mwy; fodd bynnag, oherwydd halogiad mewn arbrofion dilynol, dim ond amrywiad o fewn y rhediad oedd ar gael, ac mae angen ailadroddiadau pellach i gadarnhau yr arsylwadau rhagarweiniol hyn (Ffigur 3.29A–B).



Ffigur 3.29 Effaith 5% amoniwm hydrocsid (NH_4OH) ar echdynnu rhywogaethau ghrelin.

Cafodd plasma neu ddŵr oedd yn cynnwys ghrelin llygoden fawr (10 ng/mL) ei drin â 5% NH_4OH , ac yna dyddodiad protein (dull Sidibe et al.) cyn cael eu dadansoddi gan MALDI TOF (A) neu yn cael eu gwahanu gan SPE (Colofn HLB) cyn dadansoddiad MALDI-TOF. Mae bariau yn cynrychioli yr cymedr $\pm$ SEM o dri dyblygiad technegol fesul cyflwr o fewn un rhediad arbrofol (N=1). Mae bariau gwall yn adlewyrchu amrywiad technegol yn unig ac nid ydynt yn dynodi amrywioldeb biolegol.

3.3.7 Halogiad

Yn dilyn y profion NH_4OH , fel y disgrifir uchod, daeth problem halogi i yr amlwg wrth ddefnyddio yr MALDI-TOF, gwnaeth hyn atal unrhyw ddadansoddiad MALDI-TOF pellach. Un cyfyngiad sylweddol sydd yn gysylltiedig â dadansoddiad sbectrometreg mäs yw yr potensial ar gyfer halogiad, yn enwedig gan bolymerau glycolau polyethylen (PEG). Mae PEG yn halogydd cyffredin iawn ac mae yn bresennol mewn glanedyddion, cadachau cemegol, a phlastigau, gan ei gwneud hi yn anodd nodi ffynhonnell PEG. Oherwydd yr helaethrwydd o PEG mewn amlygiad dyddiol mewn labordy, mae yn debygol bod PEG yn bresennol mewn samplau yn gyson ond ar lefel

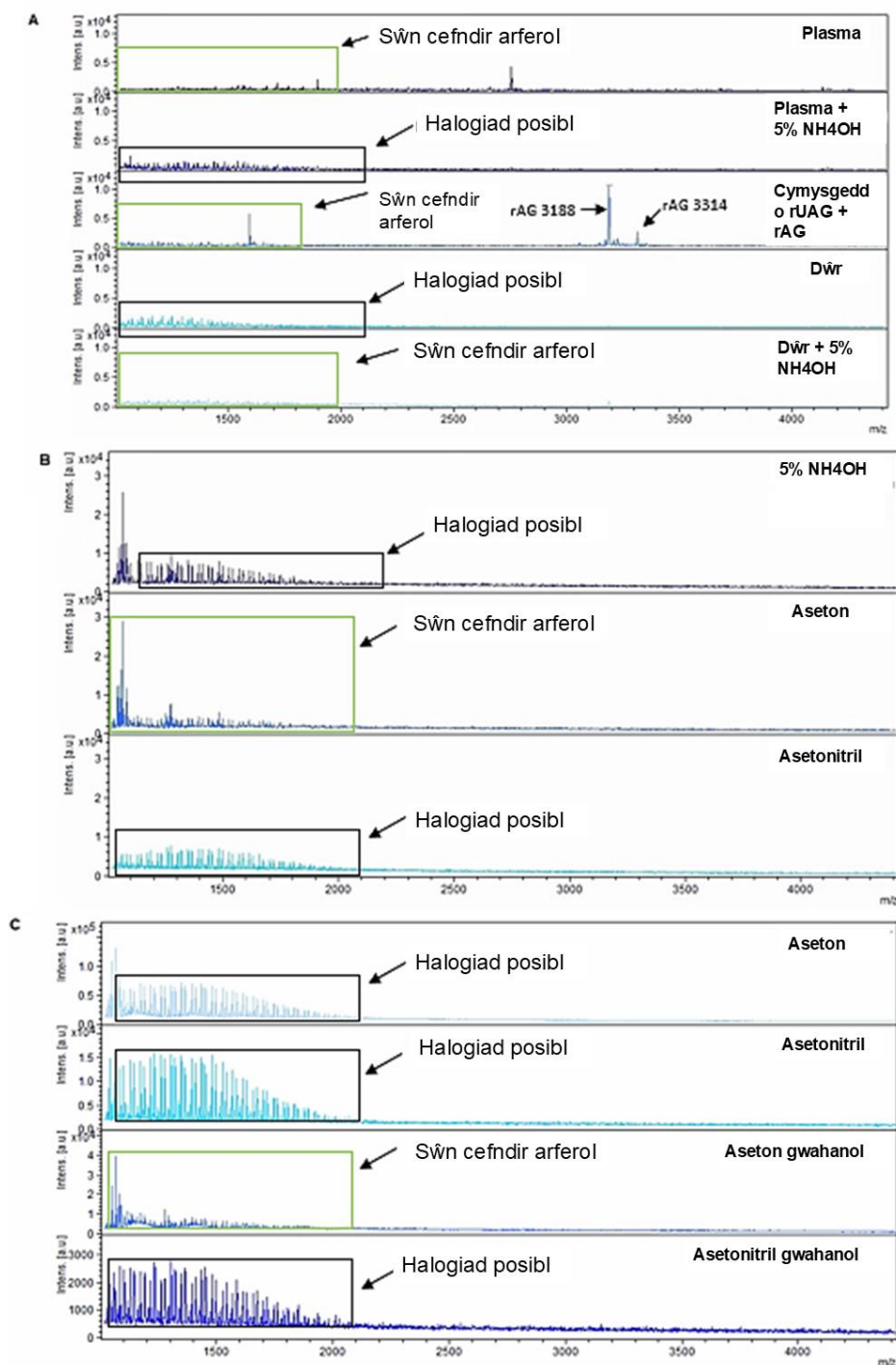
is o gymharu ag y dadansoddyddion o ddiddordeb ac felly yn cael eu hatal yn ystod yr ïoneiddiad/dadansoddiad. Fodd bynnag, gall PEG ddod yn broblematig pan fo yr dadansoddydd o ddiddordeb yn bresennol ar lefelau isel, fel sydd yn wir am ghrelin. Yn y sefyllfa hon, gan fod PEG ei hun yn hawdd ei ïoneiddio, gall PEG atal y dadansoddydd o ddiddordeb ac, mewn rhai achosion, gallai halogiad olygu na ellir canfod lefelau ghrelin.

Yn ystod dadansoddiad arferol MALDI-TOF o samplau, megis ar gyfer Ffigur 3.29, dangosodd rhai o yr sbectra arwyddion o halogiad PEG na welwyd o yr blaen ar gyfer unrhyw un o yr canlyniadau cynharach a ddisgrifiwyd uchod. Felly, i nodi ffynhonnell yr halogiad a welwyd yn y sbectra, cynhaliwyd ymchwiliad trylwyr. Mae Ffigur 3.30 (A) yn dangos sbectra MS o yr arbrawf lle gwelwyd yr halogiad yn wreiddiol. Roedd y samplau a ddadansoddwyd yn cynnwys plasma wedi ei drin â 5% NH_4OH , cymysgedd cyfartal o ghrelin llygoden fawr mewn dŵr, a dŵr wedi ei drin â 5% NH_4OH . Mae sbectra nodweddiadol ar gyfer halogiad PEG i yw gweld yn y sampl plasma a gafodd ei drin â 5% NH_4OH , yn y sampl dŵr, ac yn y sampl cymysgedd cyfartal o ghrelin llygoden fawr

Er mwyn ymchwilio yr halogiad yn ymhellach, casglwyd sbectra MS o yr samplau a yr toddyddion gradd HPLC a ddefnyddiwyd fwyaf yn ystod y protocol arbrofol (Ffigur 30). Yn ddiddorol, dangosodd 5% NH_4OH ac asetonitril dystiolaeth o halogiad. Mae yn werth nodi bod gan ddadansoddiad MALDI-TOF yn aml 'sŵn cefndir' ar ryw lefel sydd yn ymwneud â thoddyddion a matrices penodol. Mae hyn yn cael ei leihau wrth ddadansoddi samplau, gan y bydd y dadansoddydd o ddiddordeb yn atal y sŵn cefndir hwn. Mae yr sŵn cefndir arferol hwn i yw gweld yn aseton Ffigwr 3.29B ac fe ei nodir drwy yr ffigwr. Gellir adnabod hyn wrth edrych ar y sbectra yn agosach a yr unedau 'sŵn' ailadroddus a welir. Mae PEG yn aml yn ailadrodd ei hun o fewn patrwm o 44kDa, sydd yn caniatáu iddo gael ei wahaniaethu oddi wrth sŵn cefndir arferol. Mae yr halogiad yn bresennol o fewn yr asetonitril a NH_4OH , gan awgrymu efallai nad yw yr halogiad yn benodol i doddydd ond yn hytrach yn fater mwy cyffredinol. Gall yr halogiad godi o ffynhonnell heblaw y toddyddion eu hunain, megis yr offer neu yr adweithyddion a ddefnyddir yn y broses o baratoi yr sampl.

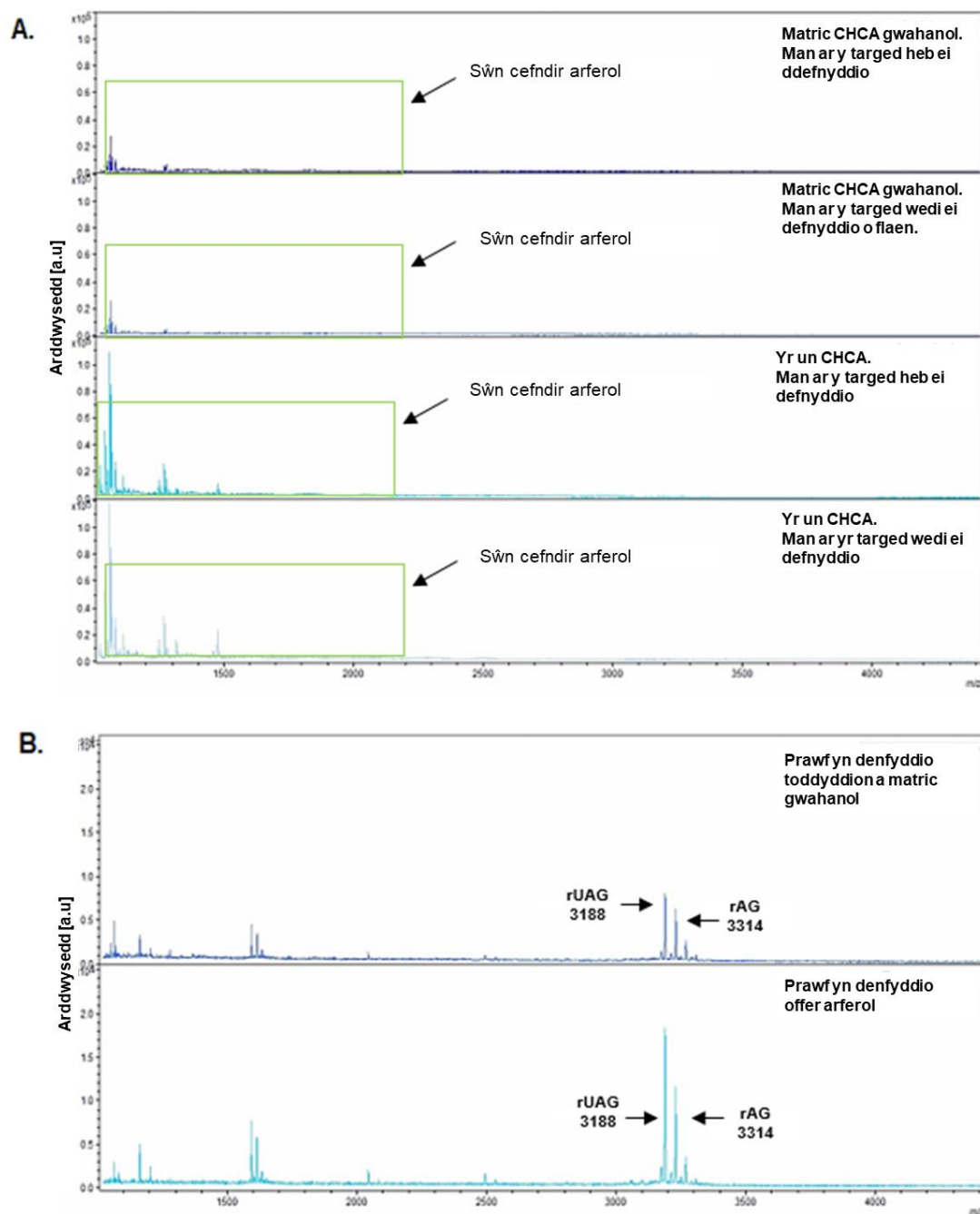
Yn yr ymchwiliad dilynol, cafodd y toddyddion cyffredin, aseton ac asetonitril eu hail-ddadansoddi ac eu cymharu â thoddyddion ffres nad oeddent wedi eu defnyddio o yr

blaen (Ffigur 3.30 C). Nid oedd halogiad yn bresennol o fewn swp gwahanol o aseton, gan awgrymu posibilrwydd o yr halogiad fod yn gysylltiedig â yr aseton penodol. Serch hynny, roedd yr halogiad a welwyd mewn asetonitril yn gyson, hyd yn oed wrth ddefnyddio swp newydd. Mewn ymdrech i gael gwared ar ffynhonnell yr halogiad, perfformiwyd glanhau yn ddwfn o yr targed MALDI gan ddilyn protocol newydd, yn yr adeilad sbectrometreg màs lle mae PEG o lanedyddion yn llai tebygol o fod yn bresennol (gweler adran 3.2, protocol glanhau 3). Roedd protocol newydd glanhau targed y MALDI-TOF yn wahanol i yr hen protocol, gan gynnwys cam golchi ychwanegol mewn 70% ethanol tra mewn bath ultrasonig cyn golchi â 80% TFA. Yn dilyn glanhau yr targed MALDI yn drylwyr, cynhaliwyd prawf ehangach i sicrhau nad oedd halogiad. Roedd y prawf hwn yn cynnwys asesu yr matrices a ddefnyddiwyd, gan gynnwys y matrices a ddefnyddiwyd yn rheolaidd yn ogystal ag matrices o swp newydd, a dadansoddi gwahanol fannau ar y targed. Dangosodd y canlyniadau, nad oedd unrhyw tystiolaeth o PEG o fewn y matrices a ddefnyddir yn rheolaidd na yr swp newydd (Ffigur 3.31A). Ymhellach, ni ddangosodd dadansoddiad o wahanol fannau ar y targed unrhyw presenoldeb PEG. Mae hyn yn awgrymu bod yr halogiad a welwyd yn flaenorol wedi ei diddymu yn llwyddiannus trwy lanhau yr targed yn drylwyr. Profwyd cymysgedd hafal o dadasyl ac asyl ghrelin llygoden fawr gan ddefnyddio offer arferol fel toddyddion, tipiau a thiwbiau Eppendorf yn erbyn swp gwahanol. Ni chanfuwyd unrhyw halogiad, ar ffurf PEG yn y toddyddion, y tipiau, na yr thiwbiau Eppendorf. Ar y cyfan, mae yr profion cynhwysfawr hyn yn cefnogi yr casgliad bod y protocol glanhau ddwfn wedi diddymu ffynhonnell yr halogiad.



Ffigur 3.30 Sbectra MALDI-TOF cynrychioliadol o ffynonellau halogiad posibl, ystod m/z 1000-5000 Th.

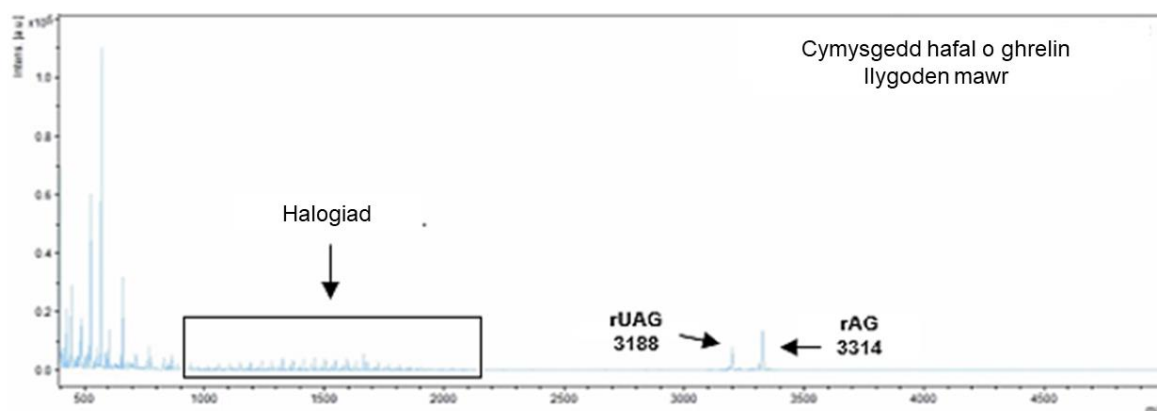
A. Samplau o blasma sydd yn cynnwys amoniwm hydrocsid 5%, plasma gyda chymysgedd ghrelin llygoden fawr, dŵr, a dŵr gyda 5% amoniwm hydrocsid. B. Cynhaliwyd dadansoddiad o wahanol doddysdion a ddefnyddiwyd yn rheolaidd i nodi ffynhonnell bosibl y ffynonellau halogi (5% sodiwm hydrocsid, 100% aseton a 100% asetonitril) C. Aseswyd effaith newid toddysdion ar bresenoldeb PEG (aseton gwreiddiol, asetonitril gwreiddiol, aseton ffres, asetonitril ffres. Enghraifft o un sbectrwm MALDI-TOF allan o 12.



Ffigur 3.31 Profi presenoldeb halogiad PEG ar ôl glanhau y targed MALDI yn ddwfn.

A. Mae yr matrices a ddefnyddir yn cael ei werthuso, gan gynnwys y matrices rheolaidd a swp newydd. Yn ogystal, mae gwahanol fannau ar y targed yn cael eu dadansoddi. B. Cymysgedd cyfartal o ghrelin llygoden fawr gan ddefnyddio offer rheolaidd yn erbyn offer newydd. Enghraifft o un sbectwm MALDI-TOF allan o 12.

Er gwaethaf ymdrechion glanhau ac ymchwilio helaeth, gwnaeth PEG ailymddangosodd yn ystod dadansoddiad sampl. Yn ffigur 3.32, profwyd cymysgedd hafal o ghrelin llygoden fawr a welwyd halogiad gan PEG eto.



Ffigur 3.32 Presenoldeb halogiad PEG o fewn cymysgedd hafal o ghrelin llygod mawr.

Enghraifft o un sbectra MALDI-TOF allan o 12.

Ymddengys bod tarddiad halogiad PEG yn allanol i yr toddyddion, tipiau, tiwbiau Eppendorf, a yr targed MALDI. Gweithredwyd glanhau ffynhonnell y MALDI-TOF (*'the source'*) yn ddwfn sawl gwaith hefyd, ond ni wnaeth ddatrys y mater yn y tymor hir.

3.3.8 Trafodaeth

Mae dadansoddiad MALDI-TOF yn dechneg bwerus ar gyfer adnabod a meintoli peptidau a phroteinau, ond nid yw heb ei gyfyngiadau. Nod y drafodaeth wyddonol hon yw mynd i yr afael â nifer o yr ystyriaethau methodolegol a phrofwyd yn ystod y dadansoddiad o ghrelin gan ddefnyddio MALDI-TOF.

Gan gytûn â yr llenyddiaeth, profwyd effeithlonrwydd y dull crisial hedyn ar gyfer ychwanegu samplau ar darged MALDI-TOF ar gyfer dadansoddi ghrelin (Vorm 1994; Yun et al., 2022). Dewiswyd CHCA fel y matrices yn seiliedig ar ei effeithiolrwydd gyda pheptidau a phroteinau. Mae astudiaethau amrywiol wedi nodi hydoddi CHCA mewn ystod o 40-70% o asetonitril (Sun et al., 2008; Singor et al., 2013, Friedemann, Tougu, a Paulmaa 2020; Leszyk 2010) gyda hydoddi o fewn 50% o asetonitril wedi ei adrodd fwyaf ar gyfer dadansoddiad ghrelin (Gutierrez et al., 2008; Schopfer et al., 2015). Yma, darganfuwyd taw 40% asetonitril oedd y mwyaf effeithlon ar gyfer y dadansoddiad ghrelin. Drwy gydol y broses o baratoi yr sampl, gwelwyd gwahaniaethau rhwng dadasyl ac asyl ghrelin o ran eu hechdynnu. Gellir esbonio hyn gan nodweddion deuol ghrelin. Mae presenoldeb nifer o weddillion lysin ac arginin yn rhoi priodweddau polar ghrelin, tra bod ychwanegu grŵp octanoyl, sydd yn amholar, yn rhoi priodweddau polar ac amholar i asyl ghrelin (Kojima et al., 2001; Bednarek et al., 2000). Yn flaenorol, adroddwyd y defnydd o golofnau C18 SPE ar gyfer echdynnu ghrelin (Kojima et al., 2000; Hosoda, 2003; Nishi et al., 2005) a ddefnyddir ar gyfer cymysgeddau aml-gyfansawdd. Fodd bynnag, dangosodd canlyniadau y bennod hon lefelau isel o ghrelin yn dilyn SPE, y golofn WCX o fewn y plât μ Echludiad ddangosodd y perfformiad gorau ar gyfer echdynnu asyl ghrelin. Ar gyfer gwaith yn y dyfodol, bydd archwilio protocol dau gam ar gyfer SPE yn helpu dargadw ghrelin, megis defnyddio WCX ar gyfer dal asyl ghrelin a chasglu yr llif-drwodd (lle dylai dadasyl ghrelin fod) ac archwilio yr defnydd o golofn WAX ar gyfer echludo dadasyl ghrelin, a ddylai gadw cyfansoddion polar yn well, ond hefyd arwain at brotocol mwy helaeth. Llwybr arall yw archwilio dull echdynnu toddyddion trwy-dro ('*stir-based solvent extraction*', SBSE), sef techneg ddadansoddol a ddefnyddir i echdynnu a chrynodi samplau. Defnyddiwyd hwn yn llwyddiannus yn flaenorol ar gyfer canfod ghrelin gan Eslami et al. 2016, gan ganiatáu canfod ghrelin i lawr i 0.02 ng/mL. Fodd bynnag, mae yn protocol sydd yn cymryd llawer o amser, sydd yn gofyn am gyflyru y bariau am 24 awr cyn SBSE a 45-munud ar gyfer y protocol SBSE, ac yna dadsugniad trwy driniaeth ultrasonig am 30

munud arall. Mae hefyd angen ail-gyflyru yr bariau troi rhwng echdynnu, sydd yn cymryd 30 munud.

Yn y bennod hon, darganfuwyd bod crynodi yr samplau ghrelin trwy sychu wedi arwain at ganlyniadau lefelau ghrelin is o ei gymharu â pheidio â sychu. Mae esboniad am hyn yn gael ei adrodd o fewn llenyddiaeth, sydd yn nodi bod colli peptidau wrth sychu yn ganlyniad i ddyddodiad peptid ac arsugniad ar arwyneb cynwysyddion fel tiwbiau Eppendorf (Pezeshki et al., 2009; Berka a Luklova et al., 2017). Gall yr arsugniad arwyneb gael ei wneud yn iawn drwy ddefnyddio ychwanegion fel PEG, ond mae rhain yn anffafriol ar gyfer dadansoddiad MALDI-TOF ac maent yn cyflwyno problem newydd (Midwoud et al., 2007). Dewis arall sydd wedi ei adrodd oedd defnyddio 0.1% BSA (Kovalchuk, Anikanov, Ivanova, Ziganshin a Govorun 2015) ond o fewn fy arbrofion, ni welwyd unrhyw welliant. Nodwyd colled ghrelin hefyd ar ôl defnyddio hidlyddion allgyrchol a siptipiau C18, gan gymhlethu yr camau paratoi sampl ymhellach. Yn yr un modd, adroddodd Cunningham et al. colled sylweddol o beptidau wedi yr defnydd o hidlwyr allgyrchol (Cunningham et al., 2013). Mae Cunnighnam et al. yn awgrymu defnyddio hydoddiant mwy dyfrllyd i echludo samplau, er yn achos asyl ghrelin, sydd â phriodweddau amholar, gall cynyddu polaredd yr hydoddiant echludo leihau echludiad asyl ghrelin. Gallai colli sampl yn ystod y protocol siptipiau ac SPE yn gyffredinol fod yn ganlyniad i sawl mater a amlygwyd mewn papur gan Bugyi et al., 2023. Yn ystod y protocol siptipiau, gwelwyd ghrelin y llif-drwodd o yr camau golchi, cafodd hyn ei ddisgrifio fel problem sydd yn gyffredin o ganlyniad i pH anghywir ar gyfer y toddydd golchi. Serch hyn, amlygwyd o fewn y papur, yr heriau sydd yn dod gyda ddewis pH cywir sydd yn gweithio ar gyfer gwahanol peptidau. Mae hyn yn fwy wir gyda peptid fel ghrelin sydd yn dangos nodweddion polar ac amholar. Yn ychwanegol, gall colled ghrelin hefyd gael ei esbonio gan ei rwymiad posibl i broteinau mwy, fel albwmen dynol, sydd yn cael ei dynnu yn ystod dyddodiad protein. Nid oedd astudiaethau gwreiddiol yn ymchwilio i ghrelin trwy sbectrometreg màs yn cyfrif am rwymo ghrelin i albwmen (Rauh et al., 2007, Gutierrez et al., 2008, Eslami et al., 2016). Fodd bynnag, mae astudiaethau wedi dangos bod ghrelin yn rhwymo i albwmen dynol trwy yr safleoedd rhwymo asid brasterog albwmen a yr moiety asyl ghrelin (Heppner et al., 2012; Lufrano et al., 2016). Dangoswyd hefyd bod y gadwyn ochr asid brasterog ar gyfer asyleiddio ghrelin, sydd yn bennaf yn C8, yn gallu amrywio. Awgrymodd Heppner et al. (2012), fod C16 asyl ghrelin yn fwy effeithiol na

C8 asyl ghrelin, gyda yr C16 yn ddangos mwy o sefydlogrwydd i ei grŵp asyl ac yn ei wneud yn angor mwy effeithlon ar gyfer rhwymo i yr cellbilen, o ei gymharu â C8 asyl ghrelin. Gan ei bod yn hysbys bod albwmen yn gallu rhwymo i asidau brasterog cadwyn hir, mae yn bosibl gall C16 asyl ghrelin yn rhwymo i albwmen ac aros mewn cylchrediad yn hirach. Felly, o ganlyniad, mae cael asyl ghrelin gyda chadwyni ochr asid brasterog amrywiol yn creu cymysgedd o beptidau ghrelin yn rhydd o fewn plasma a rhai yn gallu rhwymo i broteinau mwy o faint. Adroddodd Thomas et al. (2021), ei fod wedi defnyddio 5% NH_4OH i wahanu rhwymiad ghrelin a phroteinau plasma eraill fel albwmen. Archwiliwyd y defnydd o 5% NH_4OH yn y bennod hon i archwilio a allai hyn gynyddu dargadwad ghrelin, serch hyn, oherwydd halogiad amlwg, dim ond un arbrawf a gynhaliwyd ac felly mae angen arbrofion ychwanegol i archwilio a yw NH_4OH yn gallu cynyddu dal ghrelin.

Yn ystod dadansoddiad MALDI-TOF, gwelwyd amrywiadau yn arddwysedd cymharol asyl a dadasyl ghrelin ar draws rhai arbrofion, gyda gwrthdroadau achlysurol mewn goruchafiaeth signal rhwng y ddwy rywogaeth hyn. Mae yn debyg bod yr amrywiadau hyn wedi eu dylanwadu gan sawl ffactor gan gynnwys gwahaniaethau mewn adferiad echdynnu, effeithiau crisialu matrices, a ffenomenau atal ïonau posibl sydd yn gynhenid i ddadansoddiad MALDI. Yn ogystal, gall effeithlonrwydd ïoneiddio gwahanol rhwng y ffurfiau asyleiddio o ghrelin gyfrannu at amrywioldeb o yr fath.

Er nad oedd y newidiadau hyn mewn arddwysedd yn effeithio yn gyson ar y cymarebau a gyfrifwyd y tu hwnt i yr cyfernodau amrywiad a welwyd, maent yn tynnu sylw at bwysigrwydd dehongli cymarebau sydd yn seiliedig ar arddwysedd yn ofalus mewn arbrofion MALDI-TOF. Gall gwaith yn y dyfodol elwa o ddefnyddio safonau mewnol wedi eu labelu yn isotopig i gywiro yn fwy cywir am amrywiadau o yr fath a gwella dibynadwyedd cymhareb.

Ar ddiwedd y bennod hon, nodwyd halogiad o fewn y MALDI-TOF gydag ymdrechion i gael gwared ar yr halogiad, a fydd yn anodd. Mae halogiad gan bolymerau fel PEG yn parhau i fod yn anodd, gan fod eu presenoldeb yn arwain at ataliad signal ïon ar y MALDI-TOF (Zhao a O'Connor, 2007). Awgrymwyd y gallai defnyddio titaniwm deuocsid mewn samplau protein ddileu PEG (Zhao a O'Connor 2007), er ei fod yn ychwanegu at y paratodau sampl proteomeg sydd eisoes yn helaeth.

Oherwydd y gwahaniaethau cemegol rhwng asyl ghrelin ac dadasyl ghrelin, yn bennaf y grŵp lipid sydd yn bresennol ar gyfer asyl ghrelin, mae yn bosibl y bydd angen camau paratoi samplau ar wahân i drin pob ffurf yn iawn. Yn yr astudiaeth hon, proseswyd y ddwy ffurf o dan yr un amodau. Fodd bynnag, yn aml roedd asyl ghrelin yn dangos adferiad is a arddwysedd signal gwannach. Mae hyn yn awgrymu y gallai fod angen dull ychydig yn wahanol ar gyfer y ddau grŵp i wella ei ganfod, yn enwedig pe bai yr dull hwn i yw ddefnyddio mewn lleoliad clinigol lle mae mesur cywir yn bwysig. Un o yr prif faterion a nodwyd oedd yr angen am echludiad dau gam, sydd yn ychwanegu amser a chymhlethdod at y broses a gallai wneud y dull yn anoddach i yw gymhwyso mewn gwaith clinigol trwybwn uchel neu arferol. Dylai gwaith yn y dyfodol edrych ar ffyrdd o symleiddio hyn, megis defnyddio echludiad un cam neu ddod o hyd i ddulliau echdynnu sydd yn gweithio yn dda ar gyfer y ddau fath o ghrelin ar yr un pryd. Er bod y bennod hon wedi canolbwyntio yn bennaf ar ddatblygu dulliau, mae yr canfyddiadau hyn yn unol ag astudiaethau eraill sydd yn defnyddio MALDI-TOF i fesur ghrelin (Gutierrez et al., 2008; Eslami et al., 2016) a gallent fod yn ddefnyddiol ar gyfer datblygu protocolau mwy effeithlon sydd yn fwy addas ar gyfer astudiaethau clinigol neu astudiaethau sydd yn seiliedig ar fiofarcwyr.

3.3.8 Casgliadau

Mae yr canlyniadau a ddangosir uchod yn amlygu yr heriau sydd yn gysylltiedig â dadansoddiad MALDI-TOF o ghrelin. Cyn dadansoddiad MALDI-TOF, mae yn bwysig nid yn unig echdynnu ghrelin, ond hefyd dihalwyno a chrynodi yr sampl i gael y canlyniadau gorau posibl. Yma, mae colled ghrelin yn helaeth, gyda rhywogaethau ghrelin yn cael eu colli yn ystod y camau golchi a sychu. At hynny, mae priodweddau hydroffobig ghrelin yn golygu y gall waddodi neu gadw at wyneb cynwysyddion. O ganlyniad, buom yn archwilio techneg newydd amgen o sbectrometreg màs gyda chymorth gleiniau er mwyn osgoi problemau echdynnu o yr fath (Pennod 5).

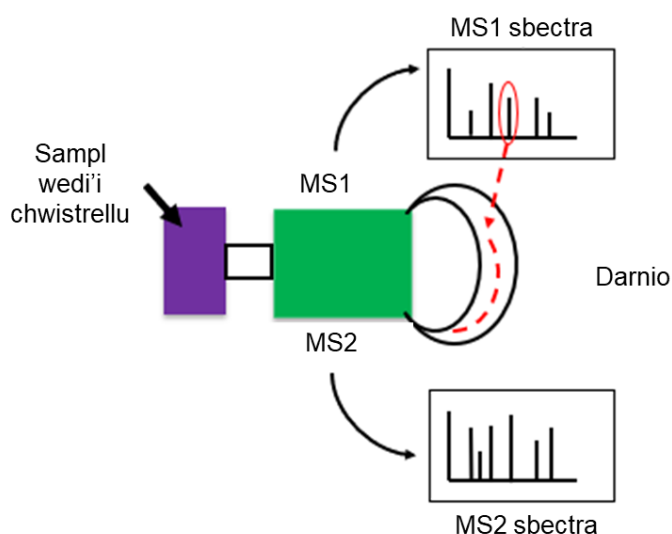
Pennod

4. Datblygu Protocol i Ddadansoddi Ghrelin gan Ddefnyddio LC-MS/MS

4.1 Cyflwyniad

Mae ESI a MALDI yn ddulliau ïoneiddiad a ddefnyddir yn gyffredin ar gyfer dadansoddi ghrelin a dadansoddiad proteomig ar sail MS yn gyffredinol. Fel yr amlygwyd yn y bennod flaenorol, mae MALDI yn dechneg ïoneiddiad meddal sydd yn defnyddio matrices i amsugno yr egni laser a chynhyrchu ïonau heb fawr o ddarniad. Mae ESI hefyd yn defnyddio ïoneiddiad meddal ac mae yr ddau gam ïoneiddiad ar gyfer MALDI ac ESI yn digwydd trwy adio (neu dynnu) protonau i gynhyrchu ïonau moleciwlaidd $[\text{peptid} + n\text{H}]^{n+}$, sydd yn bodoli o fewn y modd ïoneiddiad positif. Mae ESI yn cynnig mantais dros MALDI-TOF gan y gallier cynhyrchu ïonau protonedig sengl a lluosog y gellir eu defnyddio i gadarnhau hunaniaeth peptid.

Cam sengl ESI-MS yw yr mwyaf tebyg i MALDI-MS, gyda yr ddau yn ddefnyddiol ar gyfer pennu pwysau moleciwlaidd protein trwy ganfod m/z o ïonau cysylltiedig. Mae sbectrometreg màs tandem (MS/MS) yn cynnwys dau ddadansoddwr màs wedi eu cysylltu trwy gell wrthdrawiad. Gall Tandem MS arunigo m/z penodol (ïon rhagflaenydd/rhiant) sydd yn wedyn fynd o dan CID. Yn dilyn y rownd gyntaf o ganfod MS, caniateir yr ïon(au) rhagflaenol (yr ïon(au) o ddiddordeb) i mewn i yr hidlydd pedrypol yn seiliedig ar eu m/z (naill ai ystod o m/z neu un m/z penodol) ac yn cael eu darnio gan ddaduniad. Yn ystod CID mae yr ïonau yn gwrthdaro â llif o nwy anadweithiol sydd yn achosi iddynt ddarnio a gwahanu yn seiliedig ar eu cymarebau m/z sydd wedyn yn cael eu canfod mewn ail ddadansoddwr màs (Ffigur 4.1). Mae CID yn arwain at gynhyrchu ïonau darn neu gynnyrch, sef 'olion bysedd' penodol ar gyfer peptid, gan gynnig mwy o wybodaeth am strwythur moleciwlaidd y dadansoddwr ac offeryn adnabod pellach. Pan sefydlir yr MS i fonitro sawl ïonau rhagflaenydd/rhieni i ïonau cynnyrch/merch (a elwir hefyd yn 'drawsnewidiadau') ar yr un pryd, gelwir hyn yn monitro adwaith lluosog (MRM) a ddefnyddir yn gyffredin yn ystod LC-MS/MS.



Ffigur 4.1 Sgematig sbectrometreg màs tandem (MS/MS).

Ar ôl pigiad sampl, mae yr dadansoddydd yn mynd i mewn i yr sbectromedr màs lle caiff ei ïoneiddio, ei gyflymu ac ei ddadansoddi gan sbectrometreg màs sydd yn arwain at sbectra MS1. Mae ïonau o MS1 yn dameidiog ac eu dadansoddi eto yn ôl sbectrometreg màs yn MS2. Sylwch, mae rhai offerynnau yn defnyddio un dadansoddwr màs ar gyfer y ddwy rownd o MS tra bod gan eraill ddadansoddwr màs lluosog.

I gael dadansoddiad manylach, gellir cyplysu ESI ac MS tandem sydd â gwahaniad HPLC, a elwir yn LC-MS/MS. Mae cyfuno amser yr echludiad yn dilyn gwahaniad HPLC a sbectra MS/MS moleciwl yn darparu cryfder adnabod ychwanegol ar gyfer y moleciwl sydd yn cael ei ddadansoddi, efallai y cewch rai moleciwlau â màs tebyg (neu yr un) neu broffil MS/MS (er enghraifft, ocsisterolau gwahanol), mae cyfuno ag amser yn rhoi mwy o sicrwydd eich bod yn edrych ar yr un moleciwl/moleciwl cywir bob tro. Anfantaes ESI-MS yw y gall peptid gynhyrchu sawl ïon â chyflwr gwefru gwahanol. Anfantaes bosibl hyn yw bod mwy o ïonau cyflwr wedi eu gwefru yn cael eu cynhyrchu, yn arwain at ostyngiad yn arddwysedd cyffredinol yr ïonau a ganfyddir, felly at ddibenion canfod a meintioli mae yn fwy buddiol cynhyrchu llai o ïonau gwefru.

Mae ghrelin cyflawn yn beptid sydd yn cynnwys mwy nag un safle sylfaenol y gellir ei brotoneiddio, ac felly, gall ffurfio mwy nag un cyflwr â gwefr bositif. O ganlyniad, gall ghrelin fodoli fel $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M+3H]^{3+}$, $[M+4H]^{4+}$, $[M+5H]^{5+}$, $[M+6H]^{6+}$, $[M+7H]^{7+}$, $[M+8H]^{8+}$ yn ystod dadansoddiad ESI MS (m/z wedi ei amlygu yn nhabl 4.1).

Cyflwr gwefru	rAG	rUAG	hAG	hUAG
[M+H] ⁺	3313.8491	3187.7449	3369.8864	3243.7822
[M+2H] ²⁺	1657.4291	1544.3778	1685.4469	1622.3947
[M+3H] ³⁺	1105.2890	1063.2562	1123.9671	1081.9322
[M+4H] ⁴⁺	829.2183	797.6922	843.2271	811.7010
[M+5H] ⁵⁺	663.5762	638.3553	674.7831	649.5622
[M+6H] ⁶⁺	553.1481	532.1307	562.4872	541.4698
[M+7H] ⁷⁺	474.2704	456.2555	482.2758	464.2609
[M+8H] ⁸⁺	415.1125	399.3495	422.1172	406.3542

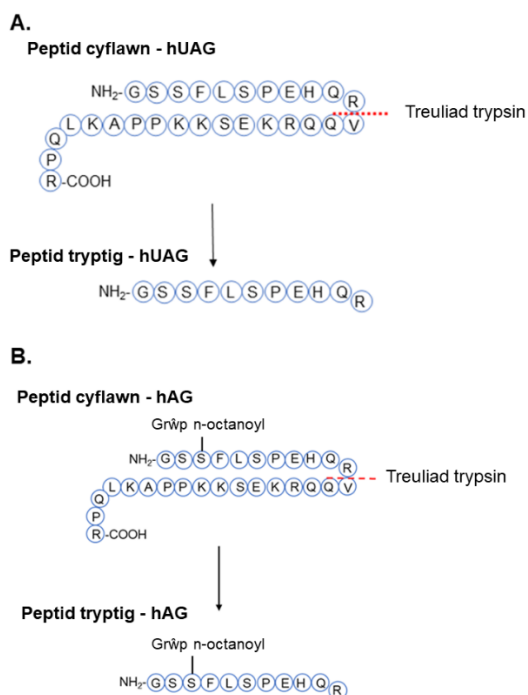
Tabl 4.1 Gwerthoedd M/Z ionau cyflwr gwefr ghrelin yn ystod protoneiddiad.

rAG: asyl ghrelin llygoden fawr. rUAG: dadasyl ghrelin llygoden fawr. hAG: asyl ghrelin dynol. hUAG: dadasyl ghrelin dynol.

Defnyddir Rauh et al. (2007), ESI ynghyd â sbectromedr màs pedrypol ar gyfer canfod a meintoli rhywogaethau dadasyl ac asyl ghrelin o fewn plasma. Yma, yr ionau ghrelin â gwefr driphlyg [M+3H]³⁺ a phedwarplyg [M+4H]⁴⁺ oedd y rhai mwyaf dwys yn ystod dadansoddiad MS. Defnyddiodd eu dadansoddiad gyfnod symudol a oedd â pH o gwmpas 5. I nodi, gall y signal mwyaf dwys ar gyfer y pigyn amrywio yn dibynnu ar pH cyffredinol y cyfnod symudol, fel y cyfryw, gall sawl cyflwr gwefr wahanol o unrhyw beptid ymddangos o dan wahanol pH. Er enghraifft, arsylwyd Sidibe et al. (2014), yr ion 7-plyg [M+7H]⁷⁺ o ghrelin fel y mwyaf dwys wrth ddefnyddio pH cyffredinol o 2 yn y cyfnod symudol.

Pwrpas y bennod hon yw optimeiddio dull LC-MS/MS i ddadansoddi ghrelin, gan ganolbwyntio ar cynyddiadau o fewn sensitifrwydd ac atgynrychioldeb. Mae sensitifrwydd mewn LC-MS/MS yn cyfateb i effeithlonrwydd ìoneiddiad moleciwlau dadansoddydd mewn hydoddiant. Gall y byfferau cyfnod symudol ddylanwadu ar yr ìoneiddiad yn ESI ac felly, mae dewis y byffer priodol yn hynod bwysig ar gyfer sensitifrwydd dull LC-MS/MS. Mae ychwanegyn sydd yn cael ei gynnwys yn gyffredin yng nghyfnod symudol LC-MS/MS yn cynnwys asid asetig, asid fformig, a/neu eu halwynau amoniwm (Lupo et al., 2017). Mae addasydd asid ar gyfer ESI yn aml yn cael ei gynnwys gan ei fod yn gallu rhoi/dileu protonau ac fel y cyfryw, helpu i ìoneiddio

yr dadansoddydd. Fel arall, gall halwynau clustogi (fel amoniwm fformat neu amoniwm asetad) helpu trwy gynyddu effeithlonrwydd ïoneiddiad cyfansoddion niwtral polar fel ghrelin (Lupo et al, 2017). Gwelir llwyddiant defnyddio asid asedig, asid fformig (FA), ac eu halwynau amoniwm ar gyfer dadansoddiad ghrelin yn Rauh et al. (2007), lle oedd cam symudol A ar gyfer yr LC-MS/MS yn cynnwys amoniwm asetad, methanol a 0.1% o asid asedig tra bod cam symudol B yn cynnwys amoniwm asetad a methanol yn cynnwys 0.1% o asid fformig. Yma, nodwyd meintioli ghrelin dynol yn llwyddiannus ar ôl echdynnu o 1 mL o blasma dynol, o fewn yr ystod o 0.07-72 ng/mL. Yn 2014, archwiliwyd Sidibe et al. defnydd o fonitro adwaith yn giwbig a oedd yn cynnwys gwahanu LC ar system SIL-HTC HPLC gan ddefnyddio cam symudol A yn cynnwys 0.2% asid fformig, 0.01% TFA mewn dŵr a cham symudol B yn cynnwys 0.2% asid fformig, 0.01% TFA mewn asetonitril. Adroddwyd bod meintioliad llwyddiannus o dadasyl ac asyl ghrelin dynol o fewn ystod llinol rhwng 0.02-80 ng/mL. Adroddodd Zemenova et al. (2016) y defnydd o 0.1% o asid fformig mewn dŵr ar gyfer eu cyfnod symudol A LC-MS/MS a 0.1% o asid fformig mewn asetonitril ar gyfer cam symudol B. Yma, defnyddiwyd yr ïonau â gwefr chwe-phlyg $[M+6H]^{6+}$ fel rhagsylweddion ghrelin ar gyfer MRM ac canfod dadasyl ac asyl ghrelin o fewn ystodau o 1-250 µg/mL gyda chywirdeb o 80-100%. Mae technegau eraill a drafodir yn y bennod hon yn cynnwys trwyth uniongyrchol, sydd yn cynnwys pwmpio yr sampl yn uniongyrchol i yr sbectromedr màs trwy chwistrell a phwmp chwistrell sydd yn darparu llif rheolaidd o hylif. Gellir defnyddio trwyth uniongyrchol i wneud y orau o amodau yr ffynhonnell ESI, megis foltedd chwistrellu a llif nwy gwain. Dylid gwneud hyn cyn cychwyn ar y rhediadau LC-MS/MS hirach sydd fel arfer yn cymryd rhwng 30-40 munud. Mae yr dulliau uchod yn ddulliau proteomig o yr brig i lawr lle mae peptid ghrelin cyfan yn cael ei fesur, ac felly, oherwydd presenoldeb asidau amino sylfaenol lluosog yn ghrelin, cynhyrchir cyflyrau gwefr lluosog. O ganlyniad, bydd angen canolbwyntio ar gynyddu sensitifrwydd trwy gynyddu arddwysedd un o yr cyflyrau gwefredig a/neu leihau lledaeniad/nifer y cyflyrau gwefredig. Ffordd arall o gynyddu sensitifrwydd yw defnyddio dull 'o yr gwaelod i fyny' lle mae yr protein yn cael ei dreulio naill ai yn ensymatig neu yn gemegol cyn ei ddadansoddi. O ran dadansoddiad ghrelin, mae hyn wedi ei archwilio yn ddiweddar gan Thomas et al yn 2021. Yma, cafodd rhywogaethau ghrelin eu treuliad tryptig, gan gynhyrchu darn 11 asid amino (t1-11), gydag un gweddillion arginin yn y terfynfa C a yr addasiad asyl yn safle serin 3 (Ffigur 4.2).



Ffigur 4.2 Treuliad tryptig o peptid ghrelin yn arwain at gynhyrchu dau gynnyrch, mae darnau 1-11 yn cadw yr motiff asyl os yw yr swbstrad gwreiddiol yn AG. A. hUAG. B. hAG.

Adroddwyd mae yr prif ïonau cyflwr gwefredig yn dilyn y treuliad oedd yr ïonau $[M+2H]^{2+}$ ar m/z 622 a 685 ar gyfer dadasyl ac asyl ghrelin dynol, yn y drefn honno. Er bod dadansoddiad o ghrelin cyflawn wedi canolbwyntio ar yr ïonau $[M+5H]^{5+}$ ar m/z 650 a 675 ar gyfer dadasyl ac asyl ghrelin dynol, yn y drefn honno. Yn gyffredinol, dangosodd y papur fod y peptidau trypsin a ddadansoddiwyd wedi gwahanu yn well yn ystod HPLC gyda arddwysedd uwch nag a welwyd ar gyfer ghrelin cyflawn, gan arwain at ddadansoddiad LC-MS/MS gwell.

4.1.1 Nodau

Nod y bennod hon yw optimeiddio dull LC-MS/MS sydd nid yn unig yn gallu adnabod dadasyl ac asyl ghrelin ar yr un pryd ond hefyd ceisio gwahaniaethu (a meintioli) gwahanol fathau o asyl ghrelin.

Amcanion y bennod:

1. Optimeiddio dull LC-MS/MS sydd yn gallu canfod a meintioli dadasyl ac asyl ghrelin dynol mewndarddol gan ddefnyddio ghrelin llygoden fawr fel ISTD.
2. Asesu lefelau ghrelin mewn samplau plasma dynol.
3. Datblygu dull o ddadansoddi y gwahanol rywogaethau o asyl ghrelin.

4.2 Defnyddiau a Dulliau

4.2.1 Paratoi Safonau Dynol a Llygoden Fawr Ghrelin ar gyfer Dadansoddiad LC-MS/MS

Ar gyfer ESI, cafodd safonau ghrelin LC-MS/MS eu gwanhau i 2 ng/mL mewn 20% o gam symudol B (asetonitril gyda naill ai 0.1% asid asetig neu asid fformig a gyda neu heb DMSO, yn dibynnu ar y dull a ddefnyddiwyd). Ar gyfer LC-MS/MS roedd safonau ghrelin wedi eu gwanhau i ystod o 0.08-80 ng/mL mewn dŵr gradd HPLC neu 20% asetonitril.

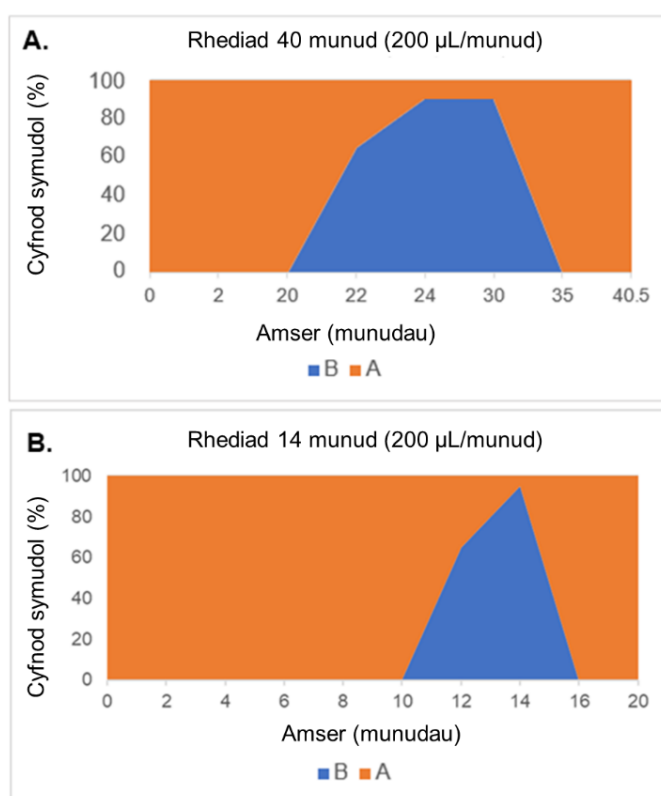
4.2.2 ESI LC-MS/MS

Cyn dadansoddiad LC-MS/MS, dadansoddwyd safonau ghrelin ar y Triversa NanoMate (Advion) ynghyd â Thermo Fisher Scientific LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific). Cafodd y NanoMate ei diwnio ac ei raddnodi gyntaf yn y modd positif cyn dadansoddi samplau. Gwanhawyd yr holl safonau yng nghyfnod symudol 20% B (sef lle mae ghrelin yn cael ei echludo ar yr LC-MS/MS). Ychwanegwyd 40µL o yr sampl (2 ng/mL ghrelin) trwy drwythiad uniongyrchol i yr MS, lle cyflawnwyd y caffaeliad yn gyntaf yn FTMS nes bod signal sefydlog wedi ei gyflawni ac yna nodi ïonau cynnyrch MS2 yn ITMS. Profwyd ystod o egni CID (20-23) ar bob peptid i bennu yr CID mwyaf addas ar gyfer dadansoddiad LC-MS/MS.

4.2.3 LC-MS/MS

Cafodd samplau eu gwahanu ac eu dadansoddi gan ddefnyddio system Agilent 1100 HPLC (adran 4.3.1) neu Ultimate 3000 HPLC (adran 4.3.2 ac ymlaen) ynghyd â Thermo Orbitrap LTQ XL. Ar ôl paratoi sampl (a ddisgrifir yn 4.2.1), gosodwyd y samplau o fewn y sampler awto y system HPLC. Chwistrellwyd naill ai 1µL, 2.5µL neu 20µL o yr sampl drwy yr nodwydd samplu ac ei lwytho i ddolen sampl yn barod i yw chwistrellu i yr cyfnod symudol o fewn y system HPLC, sydd yn rhedeg drwy yr golofn ar 25°C. Yn ystod dull datblygiad, cafodd y cyfnod symudol ac yr hyd rhedeg eu optimeiddio fel yr ganlyn: Dull 1: Roedd cam symudol A yn cynnwys dŵr gradd HPLC, 2% asetonitril a 0.1% asid asetig tra bod cam symudol B yn cynnwys asetonitril gyda 0.1% asid asetig. Perfformiwyd gwahanu yr peptidau ghrelin gan ddefnyddio colofn Fertis C18 (3µM, 150x2.1mm, F18-020703) ar gyfradd llif o 200 µL y funud. Profwyd dau hyd rhediad HPLC, un yn 30 munud gyda chydbwysedd 10 munud (Ffigur 4.3 A), a yr llall yn rediad o 9 munud gyda chydbwysedd 5 munud (Ffigur 4.3 B). Gosodwyd

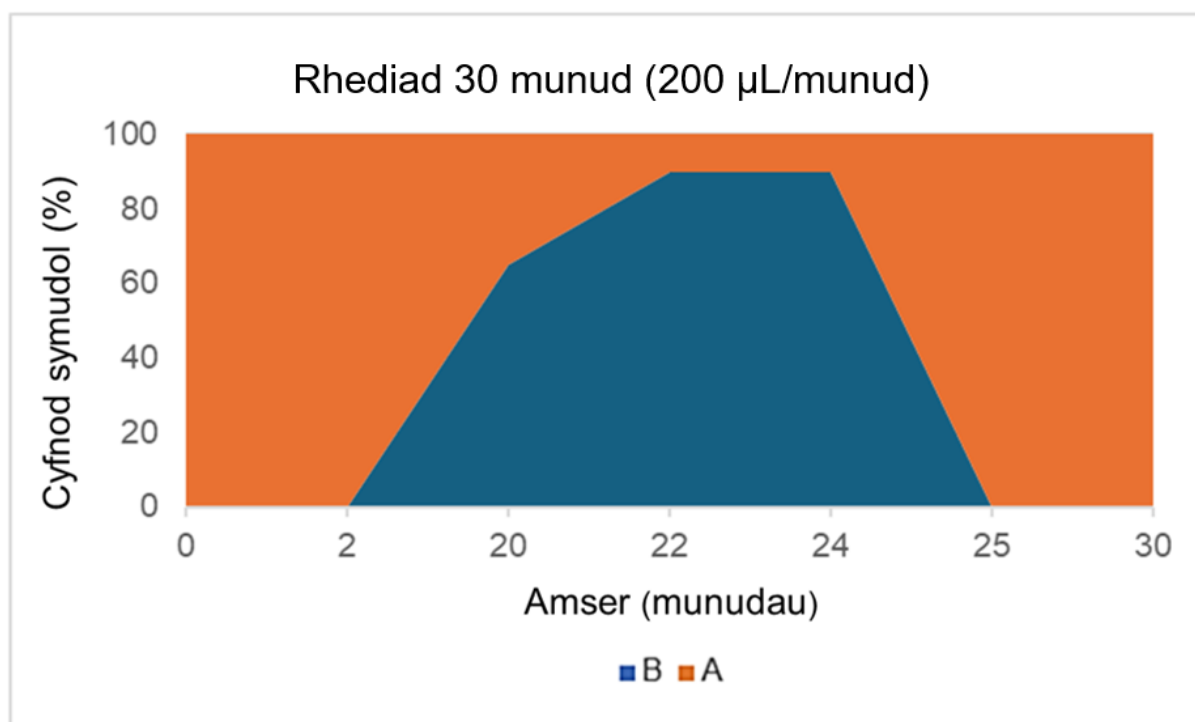
foltedd y nodwydd yn ystod ïoneiddiad electro chwistrellu positif i 3.5 kv a thymheredd y capilari trosglwyddo a yr nwy oedd 325°C, a chyfradd llif y nwy gwain oedd 10. Sgan MS llawn mewn ystod o 400-1700 m/z gyda chydrianiad 30000 yn cael ei ddefnyddio yn ogystal ag MS2 wedi ei dargedu yn ITMS gan ddefnyddio yr trawsnewidiadau MRM MS/MS canlynol 1. Màs rhiant gyda m/z o 638 gydag ïon cynnyrch o ddiddordeb ar m/z 762 ac felly wedi ei sganio rhwng 761-763 ar gyfer dadasyl ghrelin llygoden fawr $[M+5H]^{5+}$. 2. Màs rhiant gyda m/z o 663 gydag ïon cynnyrch o ddiddordeb ar m/z 793 ac felly wedi ei sganio rhwng 792-794 am asyl ghrelin llygoden fawr $[M+5H]^{5+}$. 3. Màs rhiant gyda m/z o 650 gydag ïon cynnyrch o ddiddordeb ar m/z 776 ac felly wedi ei sganio rhwng 775-777 ar gyfer dadasyl ghrelin dynol $[M+5H]^{5+}$. Ac yn olaf, 4. Màs rhiant gyda m/z o 674 gydag ïon cynnyrch o ddiddordeb ar m/z 807 ac fel y cyfryw wedi ei sganio rhwng 806-809 am asyl ghrelin dynol $[M+5H]^{5+}$. Sylwch, gan fod gan ghrelin gyflyrau gwefr lluosog, yn aml ni welwyd y wefr sengl M^+ ar m/z 3000, felly cyfyngwyd yr MS i fonitro o fewn ystod m/z 400 i 1700 i gynnal sensitifrwydd offeryn.



Ffigur 4.3 Graddiant echludiad ar gyfer gwahanu rhywogaethau ghrelin gan ddefnyddio HPLC.

Y graddiant a ddefnyddiwyd ar gyfer datblygu yr dull cychwynnol, sef rhediad 40 munud (A), ochr yn ochr â yr ymgais fyrrach ar 14 munud (B). Oni nodir yn wahanol, mae cam symudol A yn cynnwys dŵr gradd HPLC gyda 2% asetonitril a 0.1% asid asetig. Mae cam symudol B yn cynnwys asetonitril gyda 0.1% asid asetig. Y gyfradd llif oedd 200 µL/munud.

Dull 2: Ar ôl paratoi yr safonau ghrelin, gosodwyd y samplau yn hambwrdd oeri yr sampler awto HPLC, wedi ei osod ar 4°C. Chwistrellwyd y sampl trwy yr nodwydd samplu gan nodi yr cyfaint penodol a ddefnyddiwyd yn yr adran canlyniadau. Llwythwyd y sampl i yr ddolen sampl i yw chwistrellu i yr cyfnod symudol o fewn y system HPLC ar 25°C. Ar gyfer rhai arbrofion, (a nodir lle bo angen yn y canlyniadau), roedd cam symudol A yn cynnwys dŵr, 2% asetonitril, 0.1% asid asetig, ac 1% DMSO tra bod cam symudol B yn cynnwys asetonitril gyda 0.1% asid asetig ac 1% DMSO. Fel y dywedwyd uchod, gwahanwyd y peptid ghrelin gan ddefnyddio colofn Fertis C18 ar gyfradd llif o 200µL y funud. Ar gyfer rhai arbrofion (a nodir lle bo angen yn y canlyniadau), hyd y rhediad oedd 25 munud gyda cham gydbwysedd 5 munud (Ffigur 4.4). Gosodwyd foltedd y nodwydd yn ystod ïoneiddiad electro chwistrellu positif i 3.5 kv, tymheredd y capilari trosglwyddo a yr nwy oedd 325°C a chyfradd llif y nwy gwain oedd 15. Perfformiwyd sgan FTMS yn yr ystod m/z o 400-1700 gyda datrysiaid o 30000, ochr yn ochr ag MS/MS wedi ei dargedu a gyflawnir yn y modd ITMS (Tabl 4.3).



Ffigur 4.4 Graddiant HPLC ar gyfer gwahanu rhywogaethau ghrelin yn ystod rhediad o 30 munud.

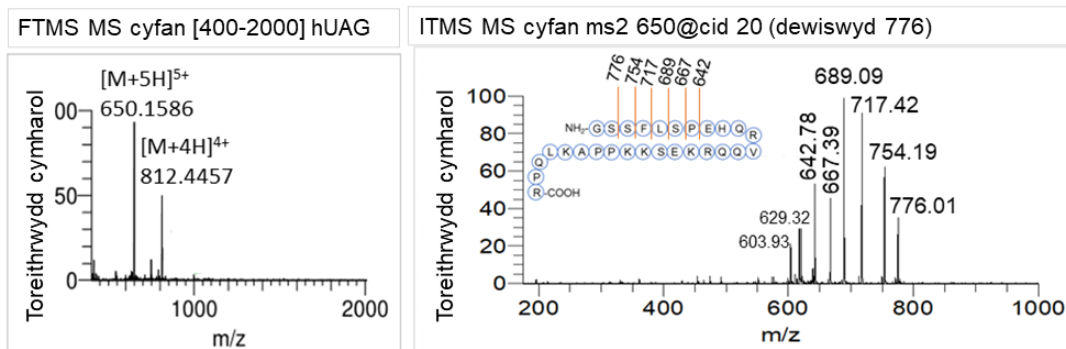
Cam symudol A yn cynnwys dŵr gradd HPLC, 2% asetonitril, 0.02% asid asetig, ac 1% DMSO tra bod cam symudol B yn cynnwys asetonitril gyda 0.02% asid asetig ac 1% DMSO.

4.3 Canlyniadau

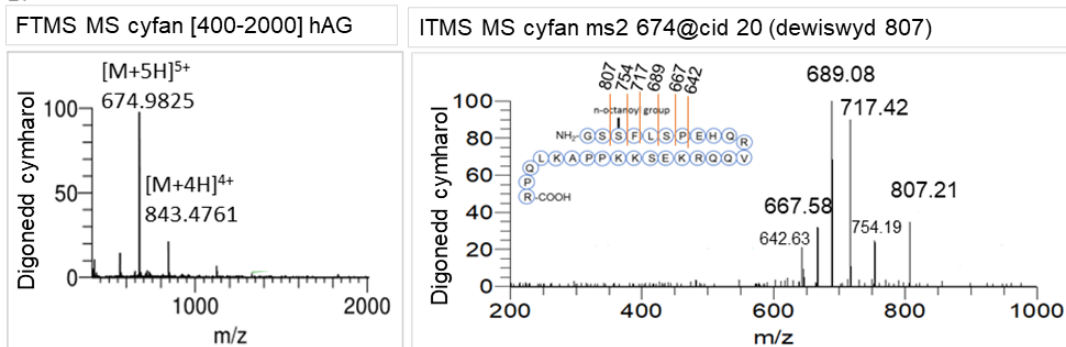
4.3.1 Dull datblygu cychwynnol

I ddechrau, dadansoddwyd safonau ghrelin trwy ESI LC-MS/MS gan ddefnyddio yr NanoMate i optimeiddio yr amodau ar gyfer yr ESI fel foltedd chwistrellu, llif nwy sychu, tymheredd a lens tiwb ar gyfer dadansoddiad LC-MS/MS. Ar ben hynny, perfformiwyd y cam gyntaf hwn cyn LC-MS/MS i gadarnhau màs cywir ghrelin a phennu yr trawsnewidiadau MS/MS mwyaf priodol i yw cynnwys yn ystod MRM a yr egni gwrthdrawiadau mwyaf effeithlon sydd eu hangen ar gyfer dadansoddiad MS/MS. Yn ystod modd FTMS, yr ïon rhagflaenol $[M+5H]^{5+}$ oedd y mwyaf dwys ac felly dewiswyd gwefr hon yn y modd ITMS. Ar ôl profi gwahanol egni gwrthdrawiadau, rhoddodd CID o 20 y cydbwysedd mwyaf priodol o ddarnio digon o yr ïon rhagflaenol heb ei or-darnio. Roedd yr ïon cynnyrch (neu ïon ferch) a welwyd yn MS2 a ddewiswyd ar gyfer yr MRM MS/MS yn seiliedig ar ei allu i wahaniaethu rhwng dadasyl ac asyl ghrelin yn hytrach na yr ïon mwyaf dwys, er mwyn sicrhau penodolrwydd (Ffigur 4.5). Yn ystod y broses hon sefydlir yr MS i gynnal cylchdro parhaus (o fewn mili eiliadau) o un digwyddiad sgan yn FTMS, gan sganio amrediad màs o 400-1700, ac yna pedwar sgan yn ITMS, un ar gyfer pob un o yr trawsnewidiadau MRM sydd yn cael eu monitro ar gyfer pob rhywogaeth ghrelin, fel y crynhoir yn y tabl isod (Tabl 4.2). Defnyddiwyd y paramedrau MRM hyn ar y cyd â rhediad HPLC 40 munud (fel y disgrifir yn adran dull 4.2.3). Enghraifft o yr olion LC-MS/MS a gafwyd yn ystod monitro MRM o bob un o yr pedwar dadasyl ac asyl ghrelin, dynol a llygoden fawr i yw weld yn Ffigur 4.6.

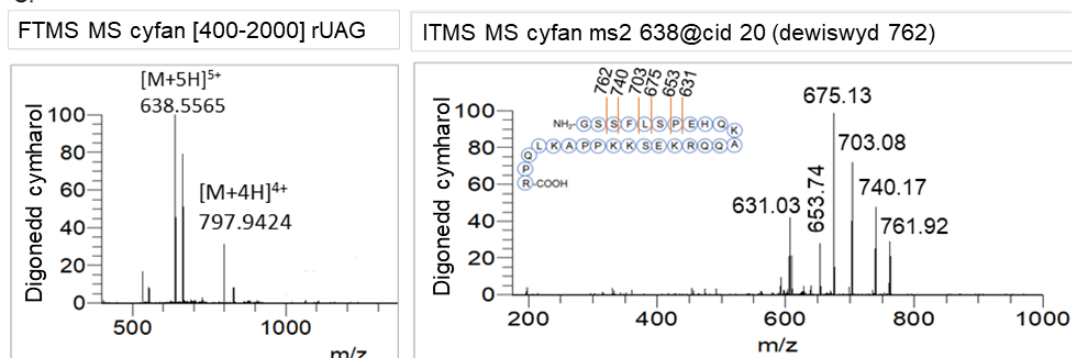
A.



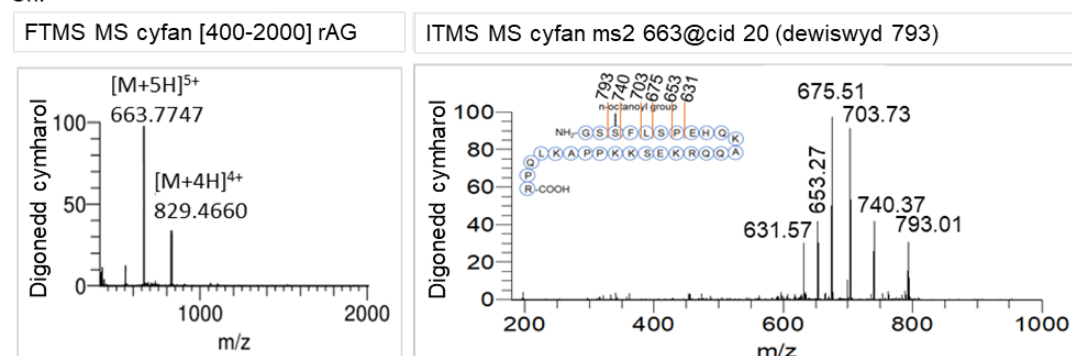
B.



C.



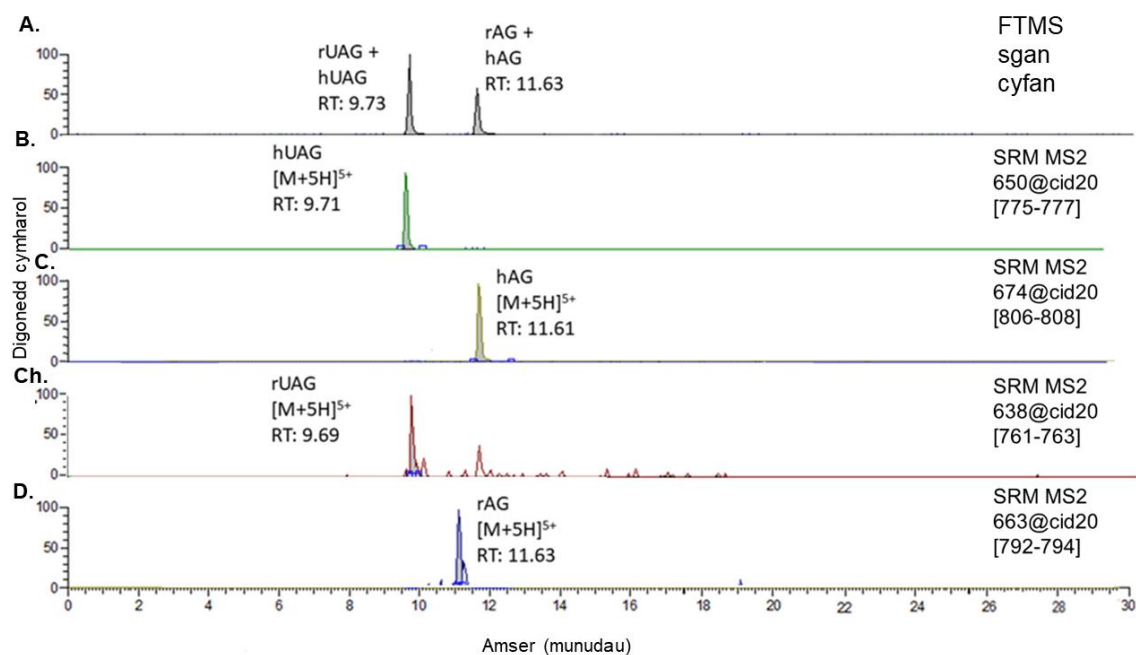
Ch.



Ffigur 4.5 NanoESI gyda FTMS o yr cyflwr gwefr ghrelin a ddewiswyd ac yna MS/MS yn y modd ITMS i adnabod ïonau cynnyrch. A. hUAG. B. hAG. C. rUAG. Ch. rAG. Cymerwyd a chyfunwyd 10 digwyddiad sgan.

Rhywogaethau Ghrelin	Dilyniant asid amino	Ynni gwrthdrawiad	ïon rhagflaenydd neu y rhiant' (m/z)	ïon cynnyrch neu 'merch' o ddiddordeb (m/z)	MS/MS wedi 159 eu cynnwys yn yr MRM
UAG Dynol	GSSFLSPEHQRVQQRKESKK PPAKLQPR	20	650 ([M+5H] ⁵⁺)	776.25	650 / 775-777
AG Dynol	GSS(n- octanoyl)FLSPEHQRVQQRKE SKKPPAKLQPR	20	674 ([M+5H] ⁵⁺)	807.21	674 / 806-808
UAG Llygoden fawr	GSSFLSPEHQKAQQRKESKK PPAKLQPR	20	638 ([M+5H] ⁵⁺)	762.00	638 / 761-763
AG Llygoden fawr	GSS(n- octanoyl)FLSPEHQKAQQRKE SKKPPAKLQPR	20	663 ([M+5H] ⁵⁺)	793.58	663 / 792-794

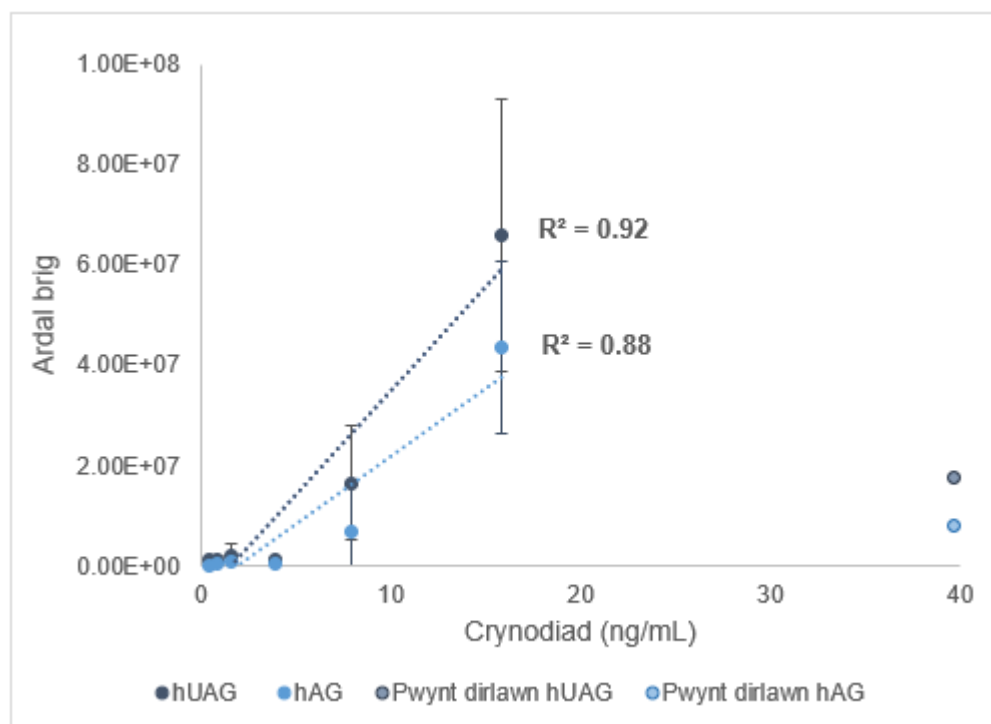
Tabl 4.2 Dilyniant peptid a pharmedrau sbectromedr màs sylfaenol.



Ffigur 4.6 Cromatogramau LC ar gyfer y rhediad 40 munud.

A. Sgan MS cyfan 400-1700 m/z, yn dangos olrhain FTMS LC cyffredinol ar gyfer hUAG a rUAG yn RT: 9.73 a hAG a rAG yn RT: 11.63 yn y drefn honno. B. Digwyddiad sgan SRM MS2 ar gyfer hUAG [M+5H]⁵⁺ (RT:9.71). C. Digwyddiad sgan SRM MS2 ar gyfer hAG [M+5H]⁵⁺ (RT:11.61). Ch. Digwyddiad sgan SRM MS2 ar gyfer rUAG [M+5H]⁵⁺ (RT:9.69). D. Digwyddiad sgan SRM MS2 ar gyfer rAG [M+5H]⁵⁺ (RT:11.63). Defnyddio trawsnewidiadau MS/MS fel y disgrifir yn nhabl 4.2 RT: Amser cadw.

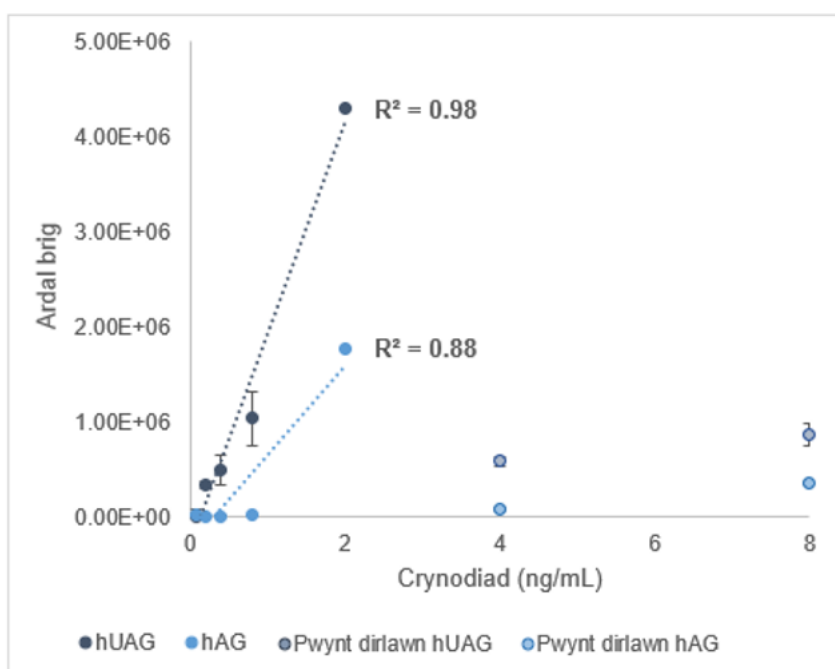
Er mwyn asesu perfformiad a sensitifrwydd y dull LC-MS/MS, cynhyrchwyd cromliniau calibradu ar gyfer asyl ac dadasyl ghrelin dynol gan ddefnyddio safonau synthetig wedi eu gwanhau mewn plasma 0.01% mewn dŵr gradd HPLC. Paratowyd cromlin calibradu gychwynnol dros ystod crynodiad eang (0.4–40 ng/mL), gan adlewyrchu yr ystod ddeinamig a ddefnyddiwyd mewn dadansoddiad MALDI-TOF blaenorol. Plotiwyd arwynebedd y brig yn erbyn crynodiad ghrelin, ac i wella llinoledd y cromliniau calibradu, eithriwyd un pwynt crynodiad uchel. Gwellodd yr addasiad hwn y gydberthynas yn sylweddol, gyda gwerthoedd R^2 terfynol o 0.92 ar gyfer dadasyl ghrelin dynol a 0.88 ar gyfer asyl ghrelin dynol (Ffigur 4.7). Roedd y pwynt eithriedig yn cyfateb i yr crynodiad uchaf a all awgrymu dirlawnder synhwyrdd rhannol neu ataliad signal, o bosibl oherwydd gorlwytho colofn neu ffynhonnell ar lefelau dadansoddol uchel.



Ffigur 4.7 Cromlin graddnodi ar gyfer hUAG a hAG yn amrywio o 0.4-40 ng/mL.

Wedi ei ddadansoddi gan LC-MS/MS. N=3, cymedr cyfartalog wedi ei blotio gyda SEM. Un pwynt crynodiad uchel wedi ei eithrio i wella llinoledd. Y pwynt plotio terfynol yw cymedr y tair cymedr rhediad hyn, ac mae bariau gwall yn cynrychioli yr gwyrriad safonol ar draws rhediadau, gan adlewyrchu amrywioldeb rhwng rhediadau. Mae llinellau tuedd yn cynrychioli ffitiadau atchweliad llinol, ac adroddir gwerthoedd R^2 i nodi daioni yr ffit. Mae bariau gwall yn dangos y gwyrriad safonol.

I gwella perfformiad yr dull ymhellach, cynhyrchwyd ail gromlin calibradu o fewn ystod crynodiad is (0.08–8 ng/mL), sydd yn adlewyrchu lefelau ffisiolegol yn fwy. Yn yr achos hwn, eithriwyd dau bwynt data i gyflawni llinoledd derbyniol, gan arwain at werthoedd R^2 o 0.98 ar gyfer dadasyl ghrelin dynol a 0.88 ar gyfer asyl ghrelin dynol (Ffigur 4.8). Er bod gorlwytho system yn llai tebygol yn y crynodiadau hyn, mae yr angen i eithrio pwyntiau ychwanegol yn codi yr posibilrwydd o ansefydlogrwydd dadansoddi yn ystod rhediadau dadansoddol hirach. Gall hyn adlewyrchu dirywiad graddol ghrelin yn yr awtosampler neu effeithiau cario drosodd, a bydd yn cael ei drafod ymhellach yn y bennod hon. Fel arall, gall yr amrywioldeb a welwyd adlewyrchu yn syml nad oedd yr amodau LC-MS/MS wedi eu optimeiddio yn llawn eto ar adeg y dadansoddiad. Bydd y posibilrwydd hwn yn cael ei ystyried yn fanylach yn yr adran ganlynol.

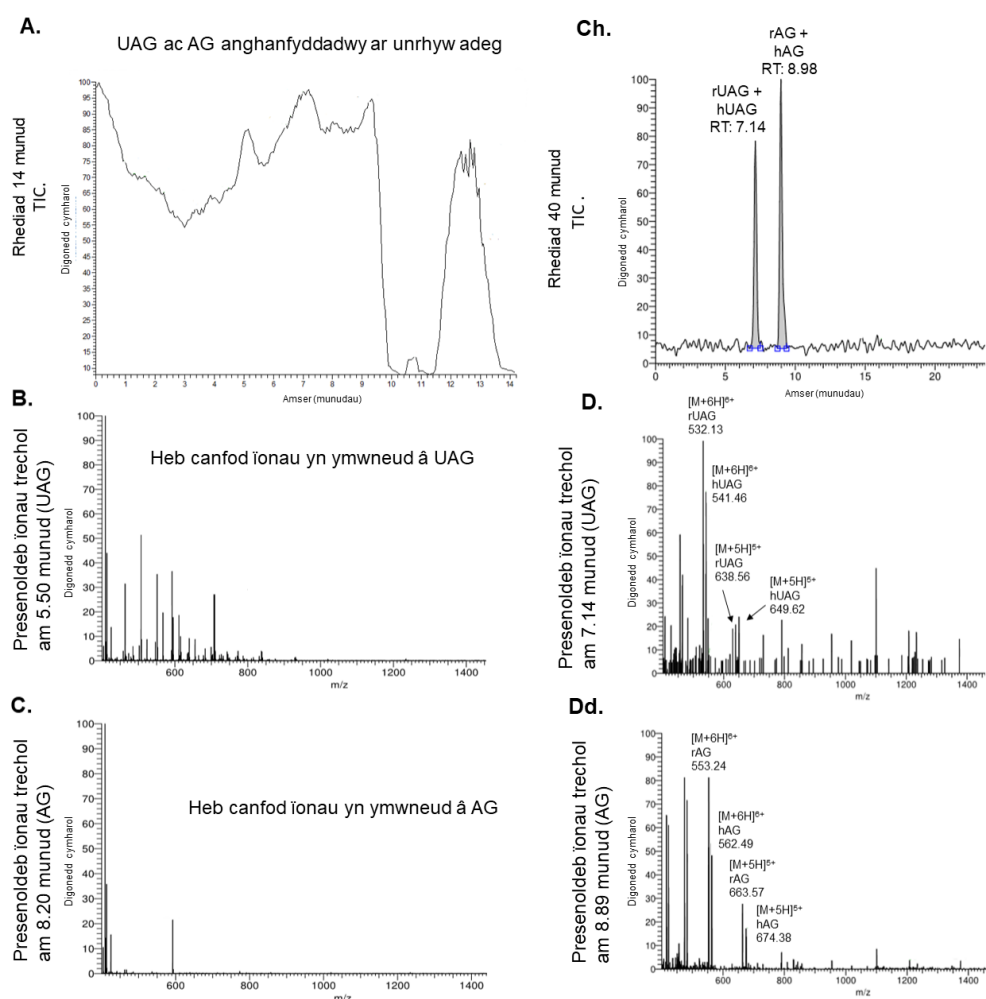


Ffigur 4.8 Cromlin graddnodi ar gyfer hUAG a hAG yn amrywio o 0.8-8 ng/mL.

Wedi ei ddadansoddi gan LC-MS/MS. N=3, cymedr cyfartalog wedi ei blotio gyda SEM. Dau pwynt crynodiad uchel wedi ei eithrio i wella llinoledd. Y pwynt plotio terfynol yw cymedr y tair cymedr rhediad hyn, ac mae bariau gwall yn cynrychioli yr gwriad safonol ar draws rhediadau, gan adlewyrchu amrywioldeb rhwng rhediadau. Mae llinellau tuedd yn cynrychioli ffitiadau atchweliad llinol, ac adroddir gwerthoedd R^2 i nodi daioni yr ffit. Mae bariau gwall yn dangos y gwriad safonol.

Gan fod y dull presennol yn defnyddio amser rhediad o 40 munud, gwerthuswyd lleihau yr amser rhedeg, a fyddai yn cynyddu trwybwn sampl ac yn caniatáu i gamau optimeiddio gael eu perfformio yn gyflymach. Ailadroddwyd y gromlin raddnodi gan

ddefnyddio amser rhediad byrrach newydd o 14 munud gyda chymysgedd hafal o dadasyl ac asyl ghrelin, ddynol a llygoden fawr, yn amrywio o 0.08-8 ng/mL. Arolygwyd holl bwyntiau amser y rhediad 14 munud yn weledol am bresenoldeb dadasyl ac asyl ghrelin, yn enwedig ar bwyntiau amser cadw 5.50 a 8.20 munud, sef yr amseroedd y mae canran y cyfnod symudol B (20%) yn ar y pwynt lle byddai ghrelin fel arfer yn echludo yn ystod y rhediad 40 munud. Fodd bynnag, ni welwyd ghrelin (Ffigur 4.9). Felly, parhawyd â yr holl waith dadansoddi a datblygu dulliau pellach gan ddefnyddio yr rhediad 40 munud.



Ffigur 4.9 Sbectra o ghrelin mewn rhediad 14 munud yn erbyn rhediad 40 munud a ddadansoddwyd gan LC-MS/MS.

Paratowyd a dadansoddwyd safonau dadasyl ac asyl ghrelin dynol a llygoden fawr yn amrywio o 0.08-8 ng/mL gan ddefnyddio naill ai amser rhedeg o 14 munud (A) neu 40 munud (Ch). B. Ionau yn bresennol ar 5.50 munud (20% o gam symudol B). C. Ionau yn bresennol ar 8.20 munud (20% o gam symudol B). D. Ionau yn bresennol ar 7.34 munud (20% o gam symudol B), hUAG a rUAG yn bresennol. Dd. Ionau yn bresennol ar 8.98 munud (20% o gam symudol B), hAG a rAG yn bresennol.

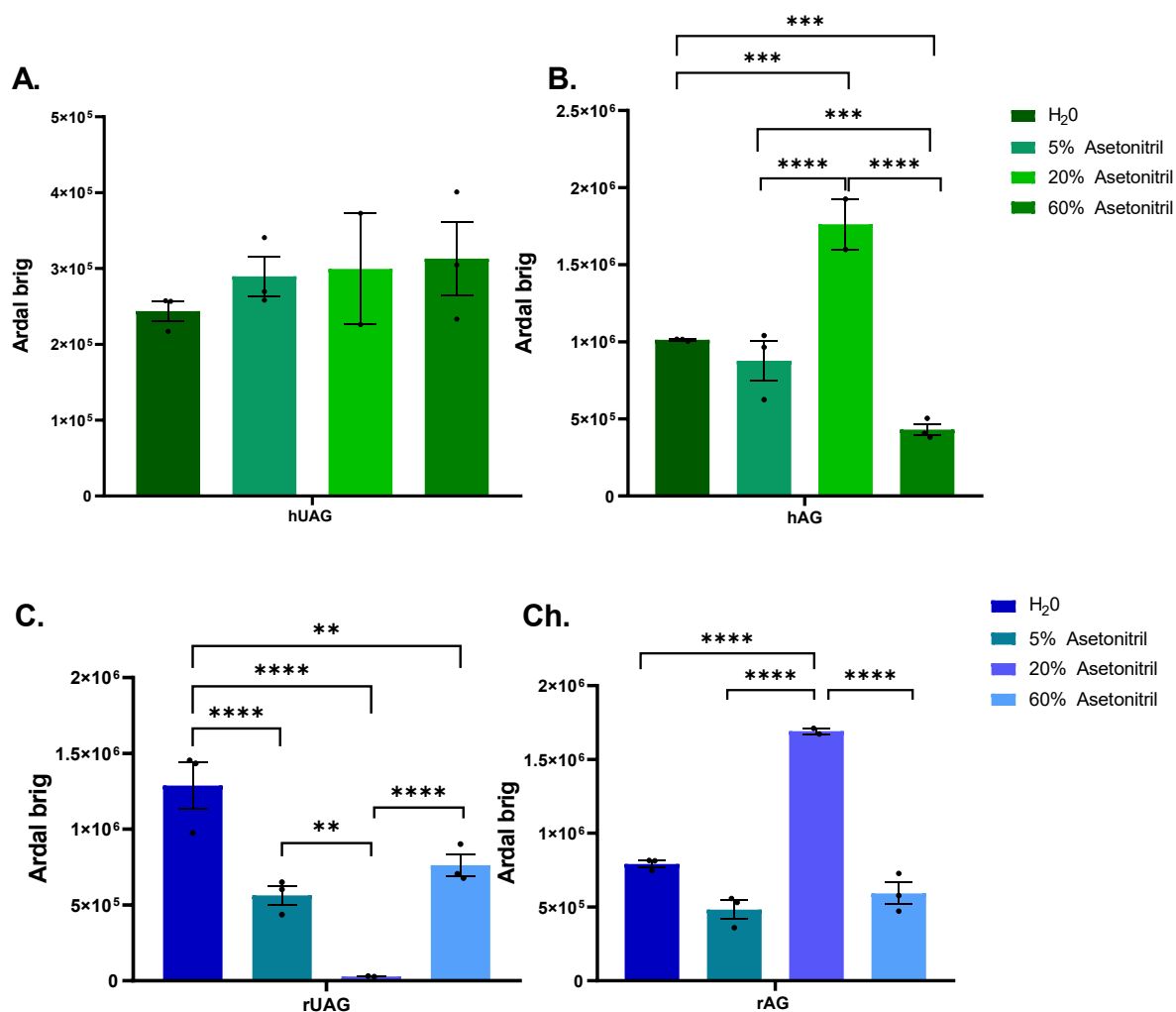
4.3.2 Archwilio Gwanedydd Priodol ar gyfer Peptid Ghrelin

Er mwyn sefydlogi yr signal ghrelin drwy yr ystod o grynodiadau a ddadansoddwyd, yn enwedig ar grynodiadau is, archwiliwyd y dewis o doddydd(ion) sydd fwyaf addas ar gyfer gwanhau samplau cyn dadansoddiad LC-MS/MS o ghrelin. Yn fwy penodol, ymchwiliwyd i effaith gwanedu plasma i 0.01% gan ddefnyddio dŵr gradd HPLC neu ganrannau gwahanol o asetonitril ar ganfod rhywogaethau dadasyl ac asyl ghrelin dynol a llygoden fawr ar grynodiad terfynol o 20 ng/mL.

Ni ddangosodd dadasyl ghrelin dynol unrhyw wahaniaethau arwyddocaol yn yr ardal frig ar ôl gwanhau mewn gwahanol doddyddion (Ffigur 4.10A). Fodd bynnag, roedd gan asyl ghrelin dynol ardal brig sylweddol uwch wrth wanhau mewn 20% asetonitril o gymharu ag unrhyw doddyddion eraill (Ffigur 4.10B). Ar gyfer dadasyl ghrelin llygoden fawr, arweiniodd gwanhau mewn dŵr at ardal brig sylweddol uwch nag unrhyw un o yr tododyddion eraill (Ffigur 4.10C). Yn olaf, ar gyfer asyl ghrelin llygoden fawr, arweiniodd gwanhau mewn 20% asetonitril at ardal brig sylweddol uwch nag unrhyw un o yr tododyddion eraill (Ffigur 4.10D).

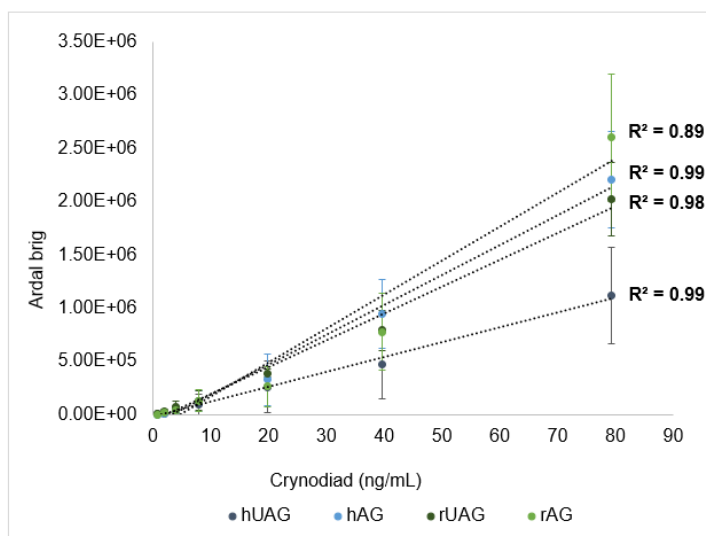
Ar y cyfan, ar wahân i dadasyl ghrelin llygoden fawr lle roedd yn ymddangos mae dŵr oedd y tododydd gorau, roddodd 20% asetonitril y canlyniadau gorau yn gyffredinol. Felly, yn seiliedig ar y canlyniadau hyn, defnyddiwyd 20% asetonitril i wanhau ghrelin wrth baratoi yr safonau ar gyfer y gromlin raddnodi. Ail-redwyd y gromlin graddnodi, paratowyd dadasyl ac asyl ghrelin, dynol a llygoden fawr ar 0.08-80 ng/mL (Ffigur 4.11). Cafodd y cromliniau graddnodi ar gyfer dadasyl ac asyl ghrelin llygoden fawr werth R^2 o 0.98 a 0.89, yn y drefn honno, tra bod yr dadasyl ac asyl ghrelin ddynol R^2 o 0.99.

Er bod y gwerthoedd R^2 wedi ei gwella yn fawr iawn (wrth gymharu â Ffigur 4.8) ar gyfer yr dadasyl ac asyl ghrelin dynol, gwelwyd gwall safonol mawr yn dangos angen am welliant o ran sefydlogrwydd. Yn ogystal, roedd samplau ar ystod crynodiad is y gromlin, < 1 ng/mL, naill ai yn anghanfyddadwy neu â mannau brig bach iawn. Mae absenoldeb canfod ar ystodau crynodiad is yn peri problem bosibl gan fod lefelau ghrelin mewndarddol fel arfer yn dod o fewn yr ystod o 0.03-2 ng/mL. Felly, mae yn hanfodol sicrhau bod ghrelin yn cael ei ganfod mewn ffordd llinol ddibynadwy ar draws y rhanbarthau hyn o yr gromlin raddnodi.



Ffigur 4.10 Cymhariaeth o ddefnyddio dŵr a chanrannau gwahanol o asetonitril wrth baratoi sampl ar ardal brig rhywogaethau ghrelin.

Samplau wedi eu dadansoddi gan LC-MS/MS. A. hUAG. B. hAG. C. rUAG Ch. rAG. Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$. $N = 3$, cymedr cyfartalog wedi ei blotio gyda SEM.



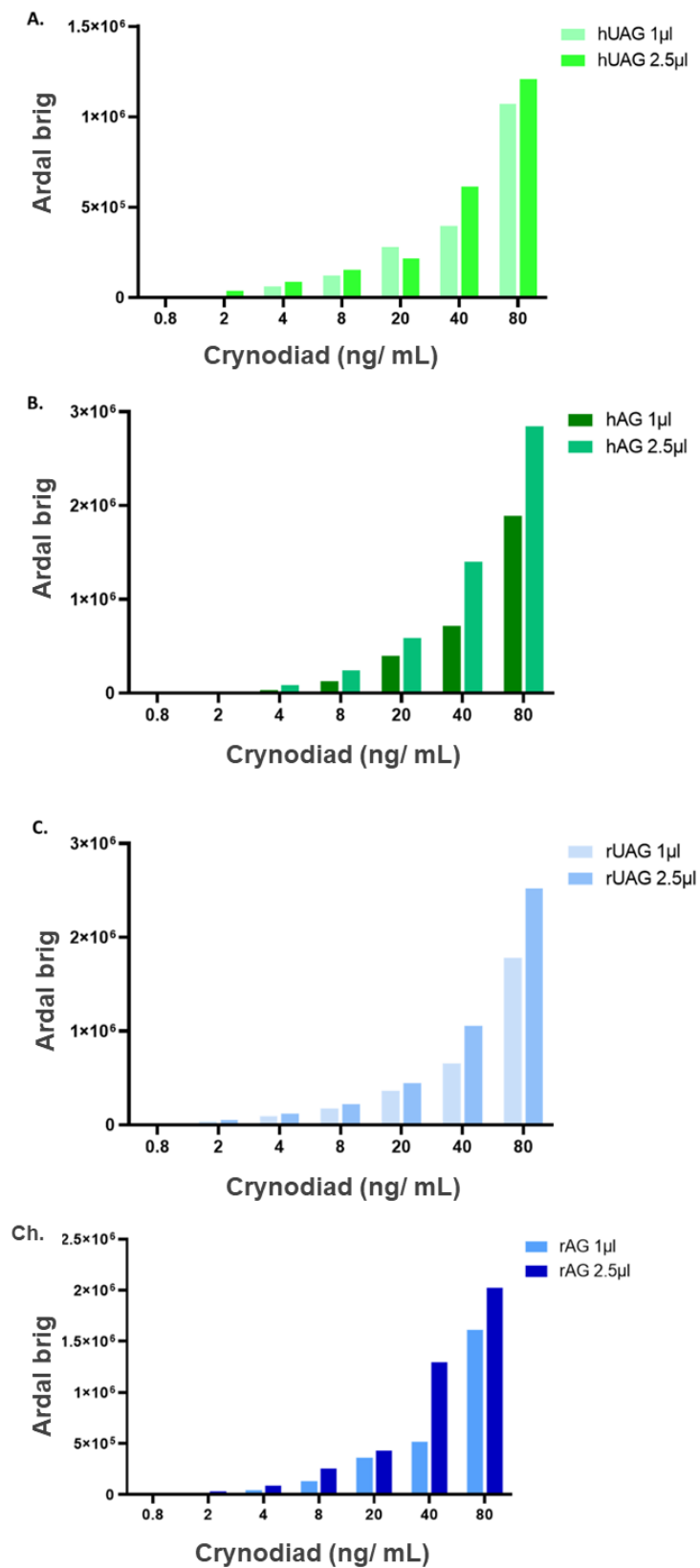
Ffigur 4.11 Cromlin graddnodi hUAG, hAG, rUAG, a rAG yn amrywio o 0.08-80 ng/mL, wedi ei wanhau gan ddefnyddio asetonitril 20%.

Wedi ei ddadansoddi gan LC-MS/MS. N=3, cymedr cyfartalog wedi ei blotio gyda SEM. Y pwynt plotio terfynol yw cymedr y tair cymedr rhediad hyn, ac mae bariau gwall yn cynrychioli yr gwyriad safonol ar draws rhediadau, gan adlewyrchu amrywioldeb rhwng rhediadau. Mae llinellau tuedd yn cynrychioli ffitiadau atchweliad llinol, ac adroddir gwerthoedd R^2 i nodi daioni yr ffit. Mae bariau gwall yn dangos y gwyriad safonol.

4.3.3 Newid Cyfrol Sampl Cychwynnol

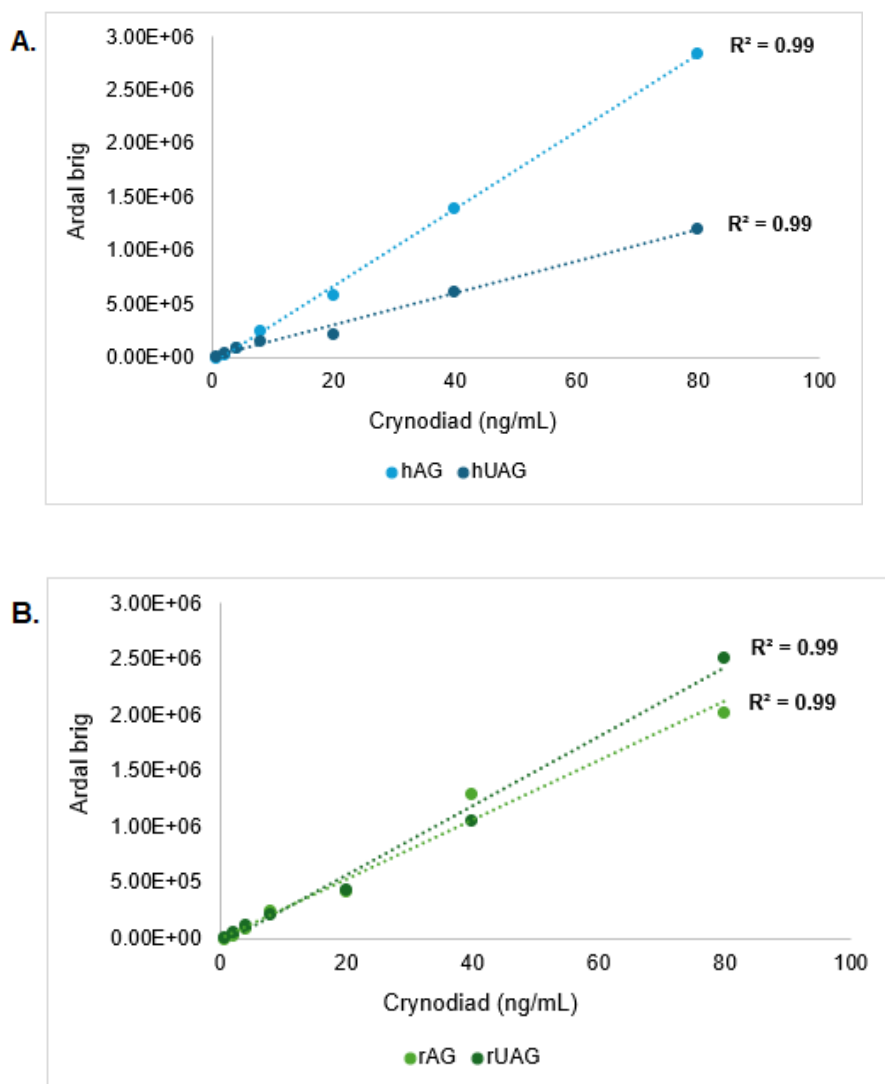
Er mwyn gwella arddwysedd y signal yn yr ystod crynodiad isaf o yr gromlin calibradu, cynyddwyd cyfaint y pigiad o 1 μL i 2.5 μL . Paratowyd y ddwy gromlin gan ddefnyddio ystodau crynodiad union yr un fath (0.8–80 ng/mL), gyda hydoddiannau stoc wedi eu gwanhau i sicrhau bod y crynodiadau chwistrellu terfynol yn aros yn gyson. Er mai dim ond un rhediad ($n=1$) a gynhaliwyd oherwydd argaeledd cyfyngedig yr offeryn a yr amser rhedeg hir fesul sampl (~40 munud), gwelwyd cynnydd gweledol yn arwynebedd y brig yn y pigiadau 2.5 μL o ei gymharu â yr pigiadau 1 μL . Yn seiliedig ar y gwelliant ymddangosiadol hwn, ac yn absenoldeb data gwrthgyferbyniol, mabwysiadwyd cyfaint pigiad o 2.5 μL ar gyfer yr holl arbrofion dilynol (Ffigur 4.12).

Fodd bynnag, nid oedd y cynnydd hwn mewn cyfaint yn ddigonol i gynhyrchu copaon canfyddadwy yn y pwyntiau calibradu isaf (0.8 a 2 ng/mL). Er gwaethaf cyflawni llinoledd cryf ($R^2 = 0.99$) ar draws pob rhywogaeth ghrelin mewn plasma llygod mawr a dynol (Ffigur 4.13), roedd angen optimeiddio yr dull ymhellach i wella sensitifrwydd canfod, yn enwedig ar ben isaf y gromlin.



Ffigur 4.12 Cymhariaeth o newid cyfaint y pigiad o 1μL i 2.5μL ar arwynebedd brig rhywogaethau ghrelin yn dilyn dadansoddiad LC-MS/MS.

A. hUAG. B. hAG. C. rUAG. Ch. rAG. N=1.

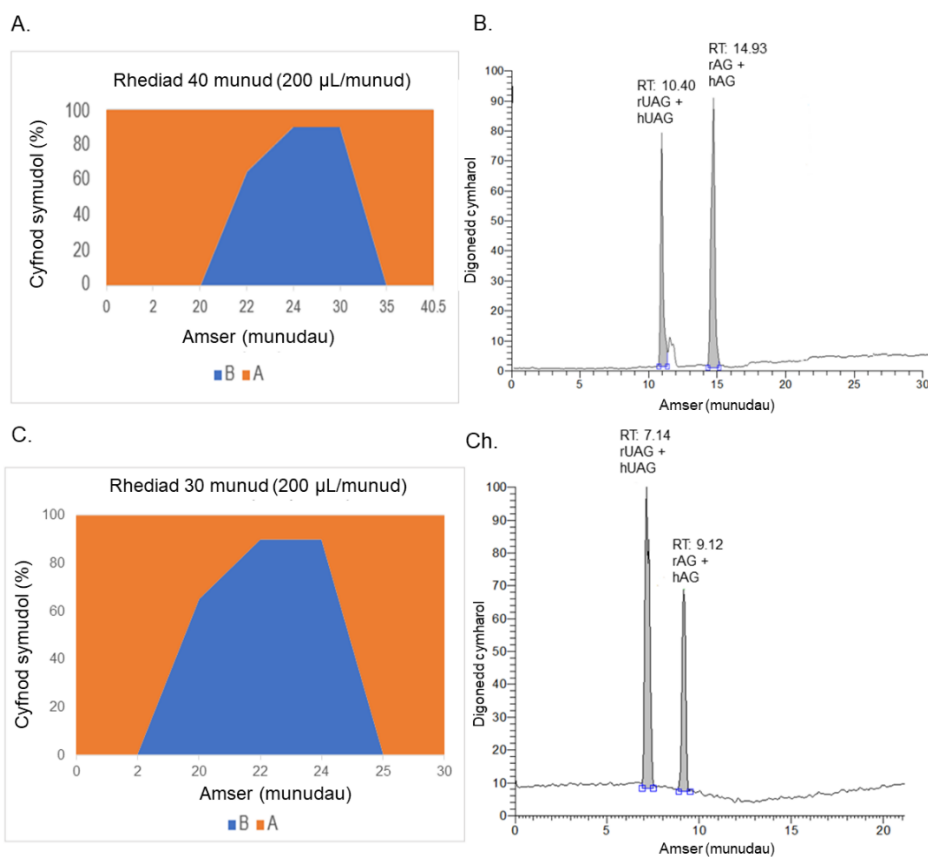


Ffigur 4.13 Cromlin graddnodi rhywogaethau ghrelin gan ddefnyddio cyfaint pigiad o 2.5 μ L.

A. hUAG a hAG. B. rUAG a rAG yn amrywio o 0.8-80 ng/mL. Wedi ei ddadansoddi gan LC-MS/MS. N=1, cymedr cyfartalog wedi ei blotio. Mae llinellau tuedd yn cynrychioli ffitiadau atchweliad llinol, ac adroddir gwerthoedd R^2 i nodi daioni yr ffit.

4.3.4 Optimeiddio Cyflwr Gwefr yn dilyn Cynnwys Gwahanol Ychwanegion yn y Cyfnod Symudol yn ystod Dadansoddiad LC-MS/MS

Ar y pwynt hwn o yr astudiaeth, methodd system Agilent 1100 HPLC ac roedd y tu hwnt i yw hatgyweirio, felly newidiwyd y system HPLC i Dionex Ultimate 3000 ynghyd â yr un Thermo Orbitrap LTQ XL, â ddefnyddiwyd uchod. Yn ystod y newid hwn, datblygwyd dull HPLC-MS/MS newydd gydag amser rhedeg llai o 20 munud gyda chyfnod cydbwysedd 10 munud (Ffigur 4.14C, Ch). Mantais ychwanegol o defnyddio yr Ultimate 3000 yw bod ganddo hambwrdd oeri a all gynnal y ffilau sampl ar 4°C yn ystod y dadansoddiad, gan leihau yr potensial o diraddiad peptidau yn y samplau.



Ffigur 4.14 40 munud (A a B) yn erbyn 30 munud (C a Ch) rhediad LC-MS/MS.

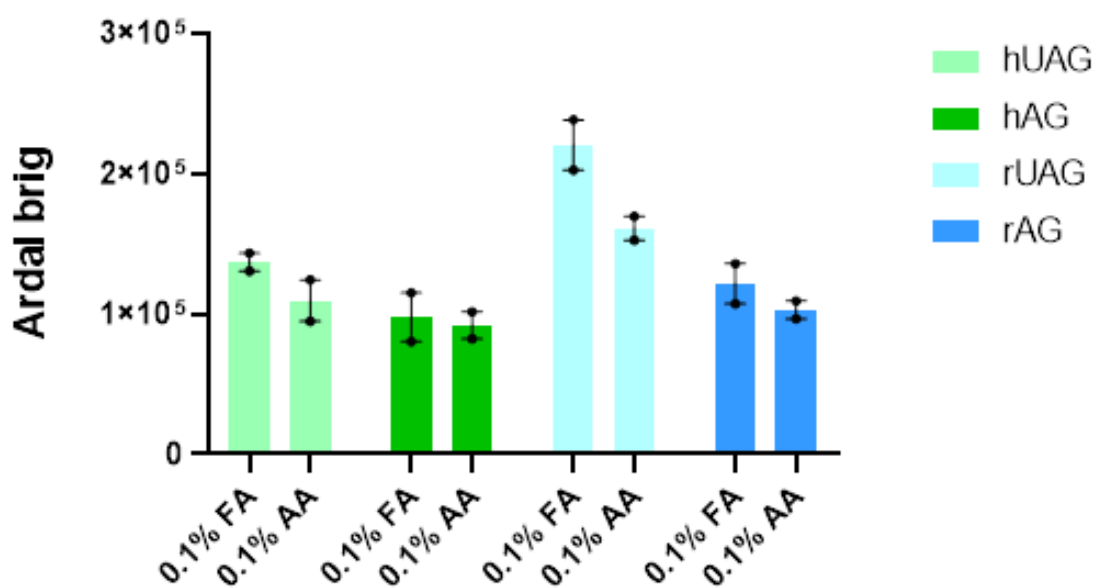
A a C HPLC % olrhain graddiant o gamau symudol A a B o yr rhediadau 40 neu 30 munud yn y drefn honno. Cromatogramau LC B a Ch o hUAG, hAG, rUAG, a rAG yn ystod y ddau rediad LC-MS/MS.

Fel y nodwyd yn y cyflwyniad, mae cynhyrchu ïonau cyflwr â gwefr lluosog yn cael ei adrodd yn gyffredin ar gyfer ghrelin yn ystod dadansoddiad LC-MS/MS. Gan y gall ffurfio nifer gynyddol o gyflyrau gwefredig leihau arddwysedd y brigau, ymchwiliais i weld a allai addasu yr cyfnod symudol leihau yr 'gwasgariad' o ïonau cyflwr gwefredig a gynhyrchir yn ystod y dadansoddiad. Gallai lleihau dosbarthiad cyffredinol cyflyrau gwefredig gynyddu arddwysedd ghrelin ar gyflwr gwefredig penodol a thrwy hynny wella canfod ghrelin yn gyffredinol ond hefyd ar grynodiadau is y gromlin graddnodi.

4.3.4.1 Archwilio yr Defnydd o Asidau neu Halen o fewn y Cyfnod Symudol

Mae asidau yn cael eu cynnwys yn aml yn y cyfnod symudol yn ystod dadansoddiad LC-MS/MS i helpu gwella ïoneiddiad. Yn flaenorol yn y bennod hon, mae asid asetig wedi ei ddefnyddio; fodd bynnag, mae asid fformig hefyd yn cael ei ddefnyddio yn gyffredin mewn cyfnodau symudol ar gyfer dadansoddi MS. Felly, archwiliwyd asid fformig fel dewis arall yn lle asid asetig, i asesu a all leihau nifer yr ïonau cyflwr

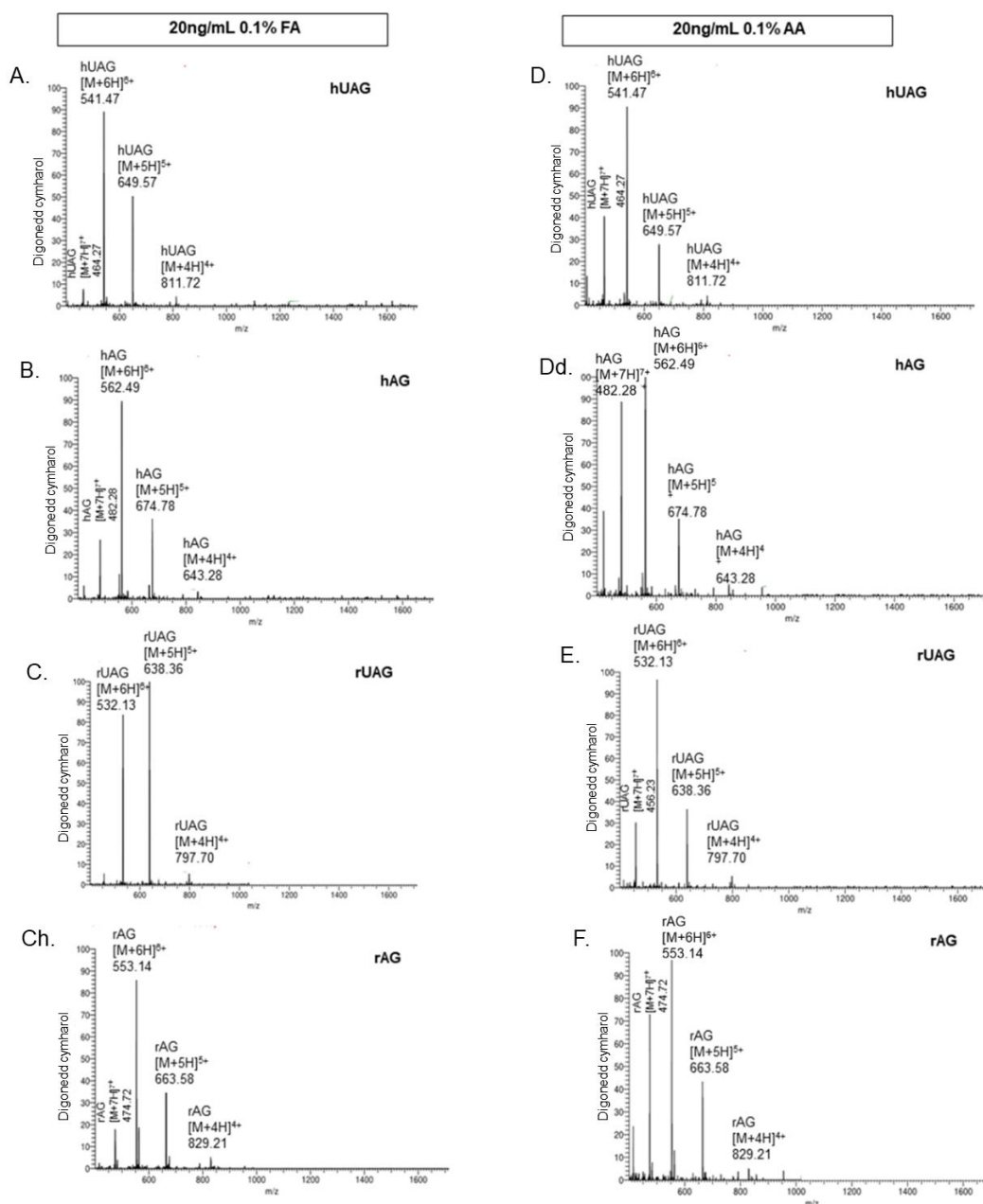
gwefredig ghrelin. Ar gyfer yr arbrawf hwn, paratowyd cam symudol A gan ddefnyddio dŵr gradd HPLC gyda 2% asetonitril a naill ai 0.1% asid asetig neu 0.1% asid fformig, tra bod cam symudol B yn cynnwys asetonitril gyda naill ai 0.1% asid asetig neu 0.1% asid fformig. Dadansoddwyd sampl hafal o yr holl rywogaethau ghrelin (20 ng/mL) gan LC-MS/MS. Ni welwyd unrhyw wahaniaethau arwyddocaol yn yr arwynebedd brig ar gyfer unrhyw un o yr rhywogaethau ghrelin yn dilyn y defnydd o asid asetig neu fformig yn y cyfnodau symudol (Ffigur 4.15).



Ffigur 4.15 Cymhariaeth o asid asetig neu asid fformig ar arwynebedd brig rhywogaethau ghrelin $[M+5H]^{5+}$ (20 ng/mL) yn dilyn dadansoddiad LC-MS/MS.

Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. $N=3$, cymedr cyfartalog wedi ei blotio gyda SEM. Asid Asetig = AA; Asid Fformig (FA).

Nid oedd gwahaniaeth mawr rhwng dosbarthiad ïonau cyflwr gwefredig ar gyfer y rhywogaeth ghrelin wrth ddefnyddio asid fformig neu asid asetig yn y cyfnod symudol (Ffigur 4.16). O ganlyniad, daethpwyd i yr casgliad nad oedd newid y asid asetig i asid fformig yn unig yn lleihau lledaeniad ïonau cyflwr gwefredig nac yn gwella ardaloedd brig ghrelin yn ystod y dadansoddiad o yr ïon rhiant $[M+5H]^{5+}$.



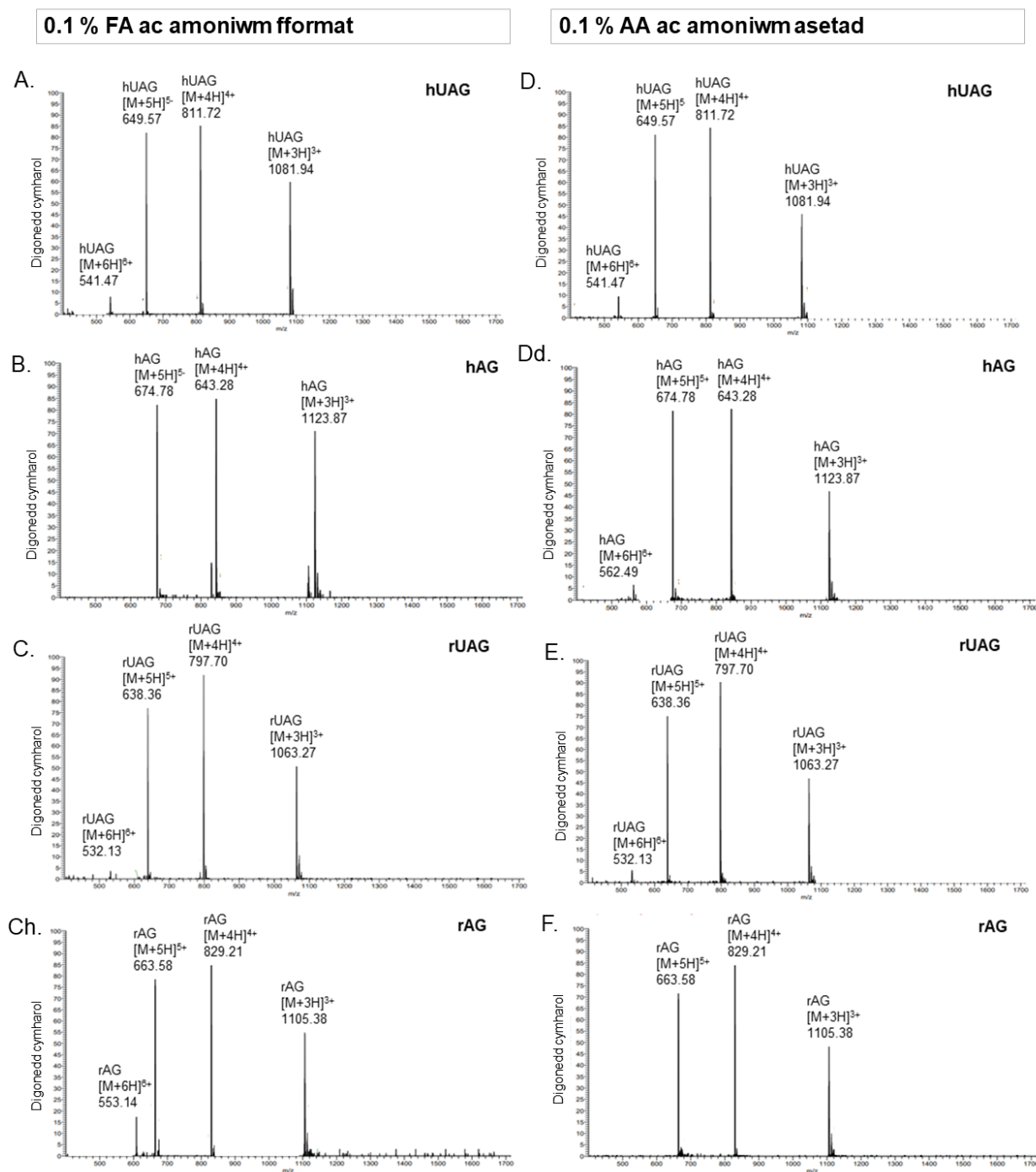
Ffigur 4.16 Dosbarthiad ïonau cyflwr gwefredig gwahanol ïonau ghrelin ar ôl cynnwys naill ai FA neu AA yn y cyfnod symudol.

Sbectra MS o rywogaethau ghrelin (20 ng/mL) wrth ddefnyddio cyfnodau symudol sydd yn cynnwys 0.1% FA (A, B, C, Ch) neu AA (D, Dd, F, E). Asid Asetig = AA; Asid Fformig (FA). Cyfunwyd 10 sgan yn 1.

Dull arall ar gyfer cynyddu ïoneiddiad peptid yw cyflwyno halwynau clustogi i yr cyfnod symudol. Defnyddir halwynau clustogi sydd yn cynnwys amonia fel amoniwm asetad ac amoniwm fformat yn aml i helpu ïoneiddiad cyfansoddion niwtral pegynol ac fe eu defnyddir yn gyffredin gydag LC-MS/MS (Lupo et al., 2017). Felly, ymchwiliais i gynnwys y ddau halwyn yn y cyfnodau symudol ochr yn ochr â chynnwys asid fformig

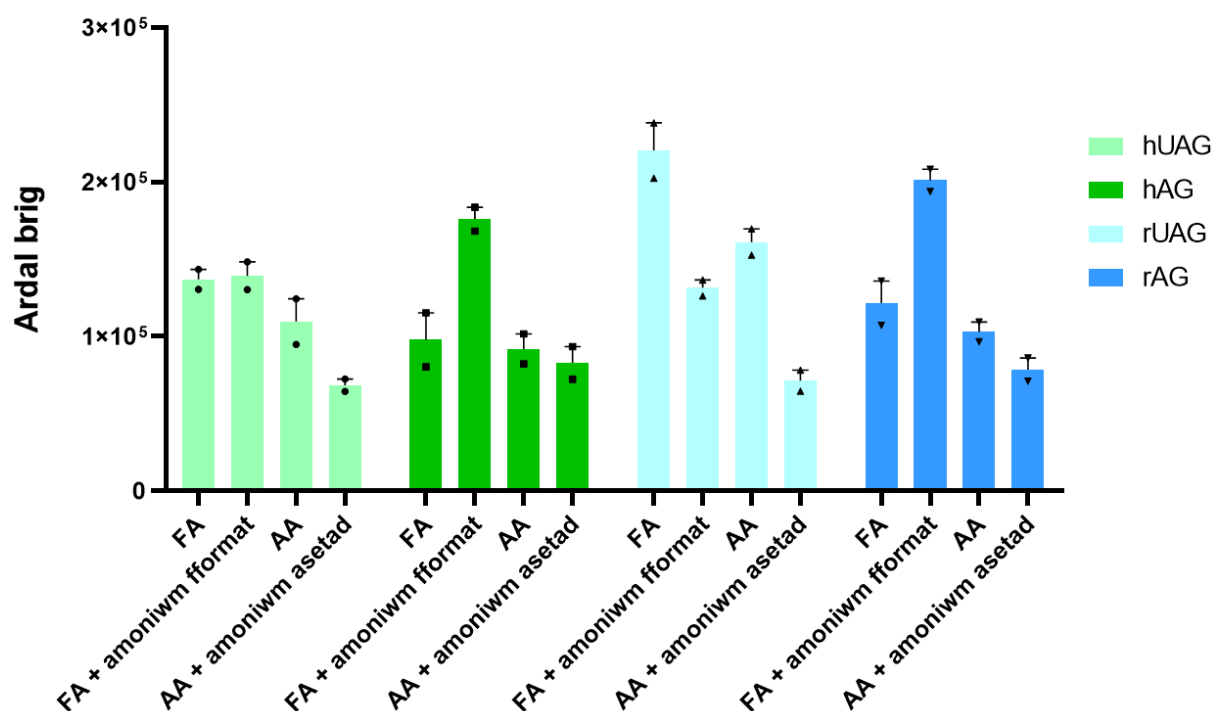
neu asid asetig. Yn gyntaf, cynhwyswyd amoniwm asetat yng nghyfnod symudol A yn cynnwys 2% asetonitril, 0.1% asid asetig, a 50mM amoniwm asetat. Roedd cam symudol B yn cynnwys 90% asetonitril, 10% dŵr, 0.1% asid asetig, a 50mM amoniwm asetat. Yn yr achos hwn, mae angen 10% o ddŵr mewn cam symudol B achos nid yw amonia fel asetat amoniwm yn hydawdd mewn asetonitril yn unig. Mewn arbrawf amgen, ychwanegwyd amoniwm fformat hefyd at gamau symudol sydd yn cynnwys asid fformig. Roedd cam symudol A yn cynnwys 2% asetonitril, 0.1% asid fformig, a fformat amoniwm 50mM, tra bod cam symudol B yn cynnwys 90% asetonitril, 10% H₂O, 0.1% asid fformig, a fformat amoniwm 50mM.

Cafodd ychwanegiad o yr halwynau byffer at y cyfnodau symudol effaith ar ddosbarthiad cyflyrau gwefr lluosog ghrelin (Ffigur 4.17). Achosodd ychwanegu amoniwm asetat neu amoniwm fformat i naill ai asid asetig neu asid fformig, gynnydd o fewn digonedd o ïonau ghrelin $[M+3H]^{3+}$ a $[M+4H]^{4+}$ tra yn achosi gostyngiad nodedig yn y $[M+6H]^{6+}$ ïon. Fodd bynnag, ni arweiniodd cynnwys yr asetat amoniwm neu yr amoniwm fformat yn y cyfnodau symudol at unrhyw newidiadau sylweddol wrth gymharu ardaloedd brig yr ïonau $[M+5H]^{5+}$ ar gyfer ghrelin (Ffigur 4.18). Felly, gallwn ddod i yr casgliad nad oedd ychwanegu halwynau i yr cyfnodau symudol wedi helpu i wella yr broses o ganfod ghrelin, yn debygol oherwydd nad oedd yn lleihau dosbarthiad cyflyrau â gwefr ghrelin ond yn hytrach wedi symud y cyflwr brig dominyddol o $[M+5H]^{5+}$ i $[M+4H]^{4+}$.



Ffigur 4.17 Dosbarthiad ïonau cyflyrau gwefredig gwahanol o ghrelin pan gaiff ei ddadansoddi gan LC-MS gan ddefnyddio naill ai FA neu AA yn y cyfnod symudol.

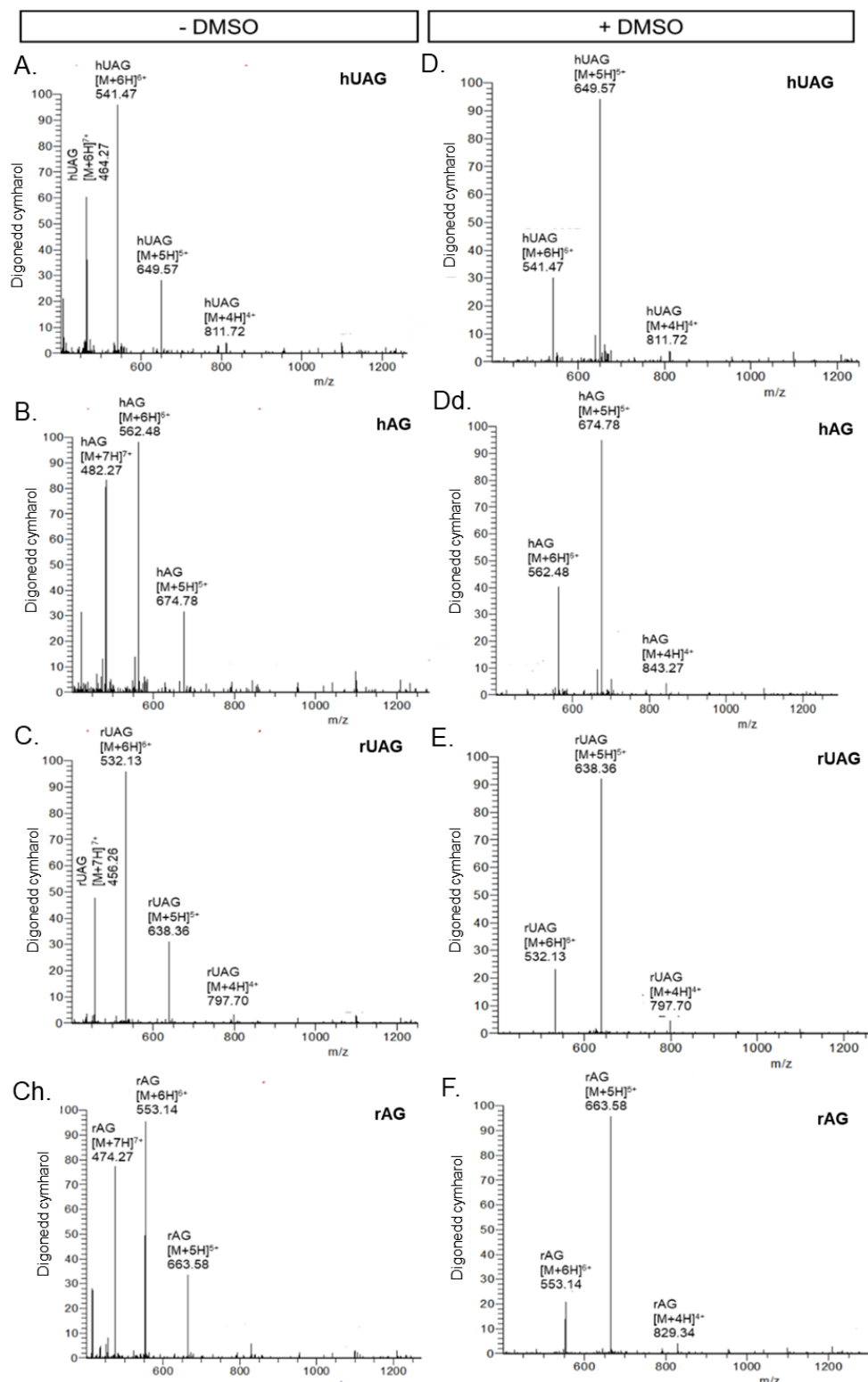
Sbectra MS o rywogaethau ghrelin (20ng/mL) ar ôl cynnwys fformat amoniwm 50nM o fewn y cyfnodau symudol sydd yn cynnwys 0.1% asid fformig (A, B, C, D) neu asetad amoniwm 50nM o fewn y cyfnodau symudol sydd yn cynnwys 0.1% asid asetig (E), F, G, H). Asid Asetig = AA; Asid Fformig (FA).



Ffigur 4.18 Cymharu gwahanol gyfuniadau o asidau a/neu halwynau yn y cyfnod symudol ar ardaloedd brig y rhywogaeth ghrelin $[M+5H]^{5+}$ (20ng/mL) yn dilyn dadansoddiad LC-MS/MS. Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. $N=2$, arwynebedd brig cymedrig cyfartalog wedi ei blotio gyda SEM. Asid Asetig = AA; Asid Fformig (FA).

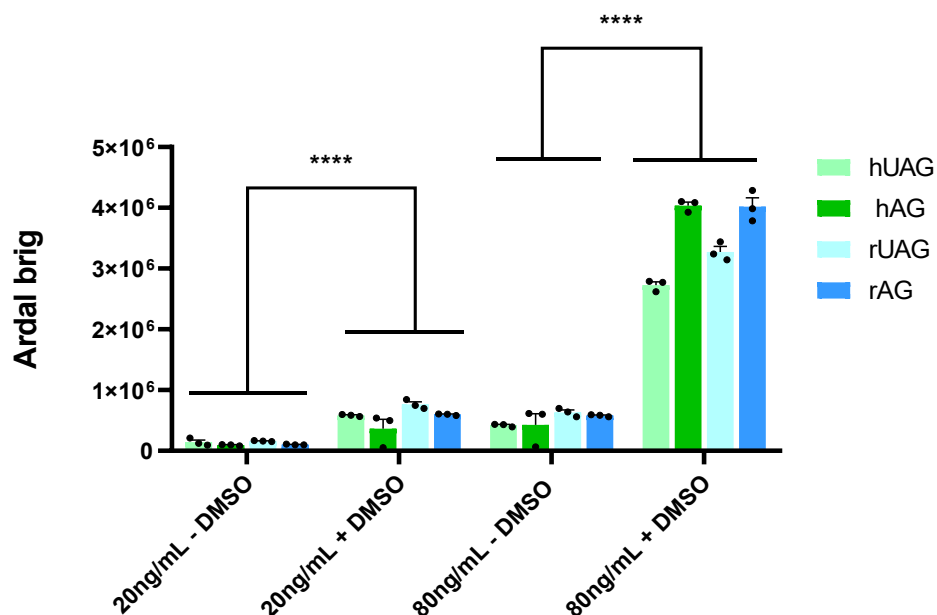
4.3.4.2 Archwilio i Gynnwys DMSO yn y Cyfnod Symudol

Yn ddiweddar, archwiliwyd y defnydd o DMSO o fewn toddyddion LC ar gyfer proteomeg. Mae astudiaethau wedi canfod bod ychwanegu canran isel o DMSO yn cynyddu sensitifrwydd adnabod protein trwy wella ïoneiddiad electrochwistrellu peptidau (Thomas et al., 2021). Felly, archwiliais ychwanegu 1% DMSO yn y ddau gyfnod symudol A (dŵr, 2% asetonitril a 0.1% asid asetig + 1% DMSO) a chyfnod symudol B (asetonitril a 0.1% asid asetig + 1% DMSO) wrth ddadansoddi ghrelin ar grynodiadau o 20ng/mL ac 80ng/mL. Dewiswyd y crynodiadau hyn lle nad oedd terfynau sensitifrwydd neu ganfod yn peri unrhyw bryder. Ar ôl ychwanegu DMSO, symudodd gwasgariad ïonau cyflwr gwefredig. Mewn sbectra MS lle nad oedd unrhyw DMSO wedi ei gynnwys roedd y rhywogaethau $[M+6H]^{6+}$, $[M+7H]^{7+}$, $[M+5H]^{5+}$ a $[M+4H]^{4+}$ yn bresennol (Ffigur 4.19A-Ch), tra ar ôl cynnwys DMSO, symudodd y rhywogaethau amlycaf i yr ïon cyflwr gwefredig $[M+5H]^{5+}$ yn bennaf (Ffigur 4.19D-F). Arweiniodd cynnwys DMSO hefyd at gynnydd sylweddol ($P < 0.0001$) yn ardaloedd brig yr ïonau $[M+5H]^{5+}$ ar gyfer ghrelin (ar 20 ac 80 ng/mL) (Ffigur 4.20). Gan fod cyflwr gwefr ghrelin $[M+6H]^{6+}$ yn edrych i fod yr un mor digonedd na cyflwr gwefr $[M+5H]^{5+}$, y cam nesaf oedd ail-optimeiddio yr paramedrau MS/MS ar gyfer monitro ghrelin a chymharu MRM a osodwyd i ddadansoddi cyflwr gwefr ghrelin $[M+5H]^{5+}$ a $[M+6H]^{6+}$. Fodd bynnag, cyn hyn, canfuwyd cyfres o rywogaethau PEG yng nghyfanswm y sbectra cyfrif ïon (TIC, sgan bras o yr holl ddigwyddiadau sydd yn digwydd yn ystod yr MS1) yn dilyn defnyddio DMSO o fewn y cyfnod symudol (ar gyfer samplau 20 ng/mL ac 80 ng/mL) (Ffigur 4.21). Nid oedd y brigau sydd yn cyfateb i yr rhywogaethau PEG hyn yn bresennol yn y sbectra a arsylwyd wrth ddefnyddio yr cyfnod symudol heb DMSO. Er nad yw yr brigau PEG yn ymyrryd yn uniongyrchol â chanfod rhywogaethau ghrelin (gan fod amser echludiad PEG o yr golofn yn digwydd ar ôl amser y rhywogaeth ghrelin), gallai cronni PEG achosi risg i gyfanrwydd yr offeryniaeth LC ac o bosibl arwain at rwystr colofn dros amser.



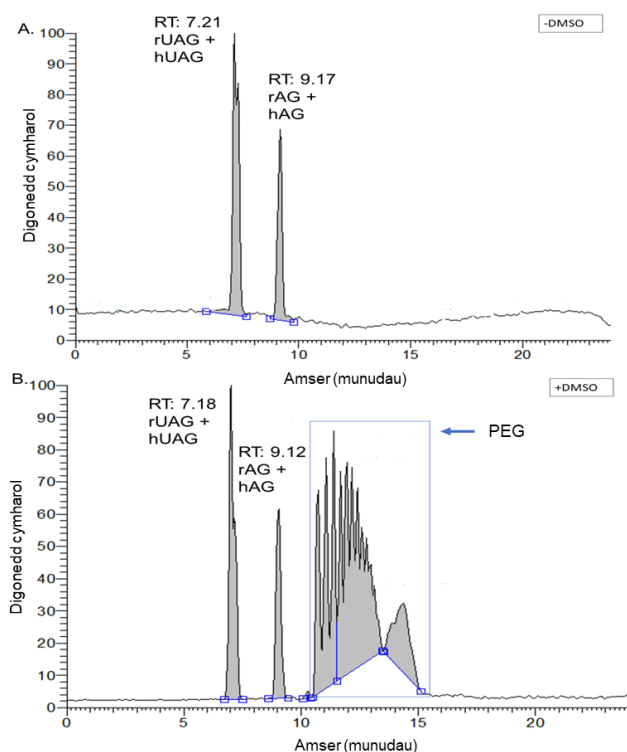
Ffigur 4.19 Dosbarthiad gwahanol gyflyrau gwefredig ïonau ghrelin pan gaiff ei ddadansoddi gan LC-MS, yn dilyn defnyddio cyfnod symudol gyda neu heb gynnwys DMSO.

Sbectra MS o rywogaethau ghrelin (20ng/mL) ar ôl defnyddio cyfnod symudol naill ai gydag (A, B, C, D) neu heb DMSO (E, F, G, H). Cyfunwyd 10 digwyddiad sgan yn 1.



Ffigur 4.20 Cymhariaeth o gynnwys DMSO o fewn y cyfnod symudol ar ardaloedd brig y rhywogaeth ghrelin $[M+5H]^+$ (20 a 80ng/mL) yn dilyn dadansoddiad LC-MS/MS.

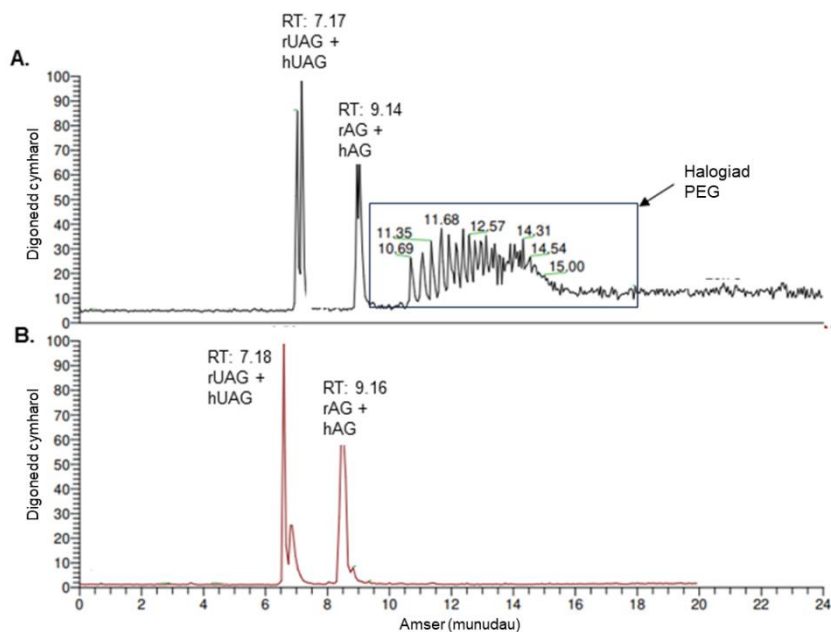
Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. **** $P < 0.0001$. $N=3$, arwynebedd cyfartalog wedi ei blotio gyda SEM.



Ffigur 4.21 Enghraifft o halogiad PEG yn ystod dadansoddiad LC-MS/MS o ghrelin (20ng/mL).

Dangosir yr olion LC-MS/MS ar gyfer Cyfanswm y Cyfrif Ion a fonitryd ar ôl defnyddio yr cyfnod symudol lle yr oedd DMSO yn absennol (A) neu yn bresennol (B).

Gan y gallai yr halogiad hwn fod o ganlyniad i yr DMSO ei hun, ailadroddwyd yr ymchwiliad gan ddefnyddio cam symudol a oedd yn cynnwys DMSO newydd. Fel y dangosir yn ffigur 4.22, roedd yr halogiad PEG yn absennol o yr cromatogramau ar ôl defnyddio DMSO 'newydd', sydd yn awgrymu bod yr halogiad PEG o ganlyniad i yr stoc flaenorol o DMSO.

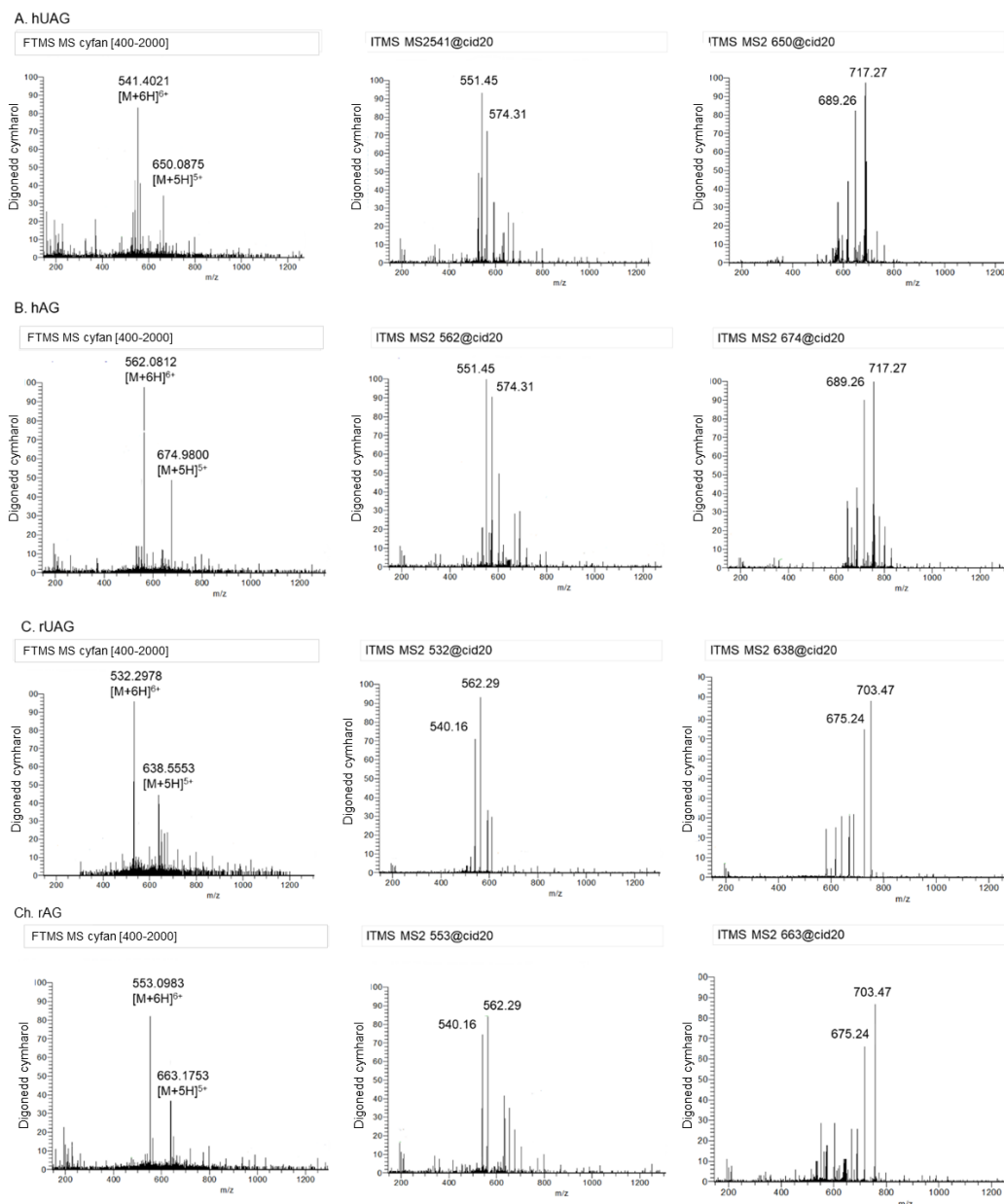


Ffigur 4.22 Presenoldeb PEG yn ystod dadansoddiad LC-MS/MS o ghrelin (20ng/mL).

Dangosir yr olion LC-MS/MS ar gyfer Cyfanswm y Cyfrif Ion a fonitwyd ar ôl defnyddio yr cyfnod symudol a oedd yn cynnwys yr 'hen' DMSO (A) (fel ei defnyddir yn Ffigur 4.20) a DMSO (B) 'newydd'.

Ar ôl datrys yr halogiad PEG, bûm yn parhau i optimeiddio fonitro trawsnewidiadau MRM MS/MS ychwanegol ar gyfer cyflwr gwefr ghrelin $[M+6H]^{6+}$, a welwyd fel yr ïon dominydda mwyaf yn y sbectra pan na chynwysedig DMSO (Tabl 4.3). Yn ogystal, at ddibenion cymharu, datblygwyd dulliau MRM (monitro adweithiau lluosog) newydd i gynnwys yr ïon rhagflaenydd $[M+5H]^{5+}$ ochr yn ochr â yr ïon $[M+6H]^{6+}$ a ddefnyddiwyd yn flaenorol. Dadansoddwyd y ddau gyflwr gwefr trwy ddewis eu gwerthoedd m/z rhiant priodol (hynny yw y cymhareb màs-i-wefr o yr ïonau rhagflaenydd cyfan), ac eu darnio i fonitro yr ddau ïon cynnyrch mwyaf amlwg a welwyd yn ystod dadansoddiad MS/MS. Mae yr dull hwn yn wahanol i ddulliau blaenorol, ble ddefnyddiodd 'ïon diagnostig' penodol ar gyfer meintioli. Yn lle hynny, nod y dull diwygiedig yw gwella sensitifrwydd a chymhariaeth trwy ganolbwyntio ar yr ïonau darnio mwyaf dwys a chyson a welwyd (Ffigur 4.23). Defnyddiwyd yr ïon mwyaf dwys ar ôl ddarnio at ddibenion meintiol, a chafodd yr ail ïon ei gynnwys fel dull eilaidd yn unig o

gadarnhau/cynnal adnabyddiaeth y brig cywir yn perthyn i ghrelin. Dewiswyd yr ïon dwysaf ar ôl darnio fel yr ïon meintioli, a ddefnyddiwyd i bennu yr ymateb dadansoddol tra bod yr ïon arall a ddewiswyd yn cael ei ddewis fel yr ïon cymhwyso, a ddefnyddir i adnabod y dadansoddydd. Crëwyd dau ddull newydd, pob un yn cynnwys 8 trosglwyddiad MRM (Tabl 4.3).



Ffigur 4.23 Sbectra MS ac MS/MS o yr ïon cyflwr â gwefr $[M+6H]^{6+}$ a $[M+5H]^{5+}$.

A. hUAG ar m/z 541 a B. hAG ar m/z 562 gyda yr ïonau cynnyrch mwyaf niferus yn 551 a 574 ar gyfer $[M+6H]^{6+}$ a 689 a 717 ar gyfer y $[M+5H]^{5+}$. C. rUAG ar m/z 532 a Ch. rAG ar m/z 553 gyda yr ïonau cynnyrch mwyaf niferus yn 540 a 562 ar gyfer y $[M+6H]^{6+}$ a 675 a 703 ar gyfer y $[M+5H]^{5+}$. (Dadansoddwyd pob rhywogaeth ghrelin ar 20 ng/mL, (10 digwyddiad sgan).

Rhywogaethau ghrelin	Dilyniant asid amino	Ynni gwrthdrawiad	Ïon rhagflaenydd neu y 'rhiant' (m/z)	Ïon cynnyrch neu 'merch' o ddiddordeb (m/z)	MS/MS wedi eu cynnwys yn yr MRM
UAG Dynol	GSSFLSPEHQ RVQQRKESKK PPAKLQPR	20	650 ([M+5H] ⁵⁺)	Ïon meintiolwr: 717 689	650/ 715-718 650/ 688-690
			541 ([M+6H] ⁶⁺)	Ïon meintiolwr: 551 574	541/ 573-575 541/ 550-552
AG Dynol	GSS(n- octanoyl)FLSPE HQRVQQRKES KKPPAKLQPR	20	675 ([M+5H] ⁵⁺)	Ïon meintiolwr: 717 689	675/ 715-718 675/ 688-690
			562 ([M+6H] ⁶⁺)	Ïon meintiolwr: 551 574	562/ 573-575 562/ 550-552
UAG Llygoden fawr	GSSFLSPEHQ KAQQRKESKK PPAKLQPR	20	638 ([M+5H] ⁵⁺)	Ïon meintiolwr: 703 675	638/ 702-704 638/ 673-675
			532 ([M+6H] ⁶⁺)	Ïon meintiolwr: 562 540	532/ 561-563 532/ 539-541
AG Llygoden fawr	GSS(n- octanoyl)FLSPE HQKAQQRKES KKPPAKLQPR	20	663 ([M+5H] ⁵⁺)	Ïon meintiolwr: 703 675	663/ 702-704 663/ 673-675
			553 ([M+6H] ⁶⁺)	Ïon meintiolwr: 562 675	553/ 561-563 553/ 539-541

Tabl 4.3 Trawsnewidiadau MRM 8 MS/MS newydd i fonitro rhywogaethau ghrelin llygoden fawr a dynol naill ai gan ganolbwyntio ar Ïon cyflwr [M+5H]⁵⁺ neu [M+6H]⁶⁺.

Trawsnewid MS/MS mewn du: a ddefnyddir ar gyfer meintiol ardal oedd brig ghrelin, trawsnewid MS/MS mewn llwyd: a ddefnyddir at ddibenion adnabod i gadarnhau brig cywir ghrelin.

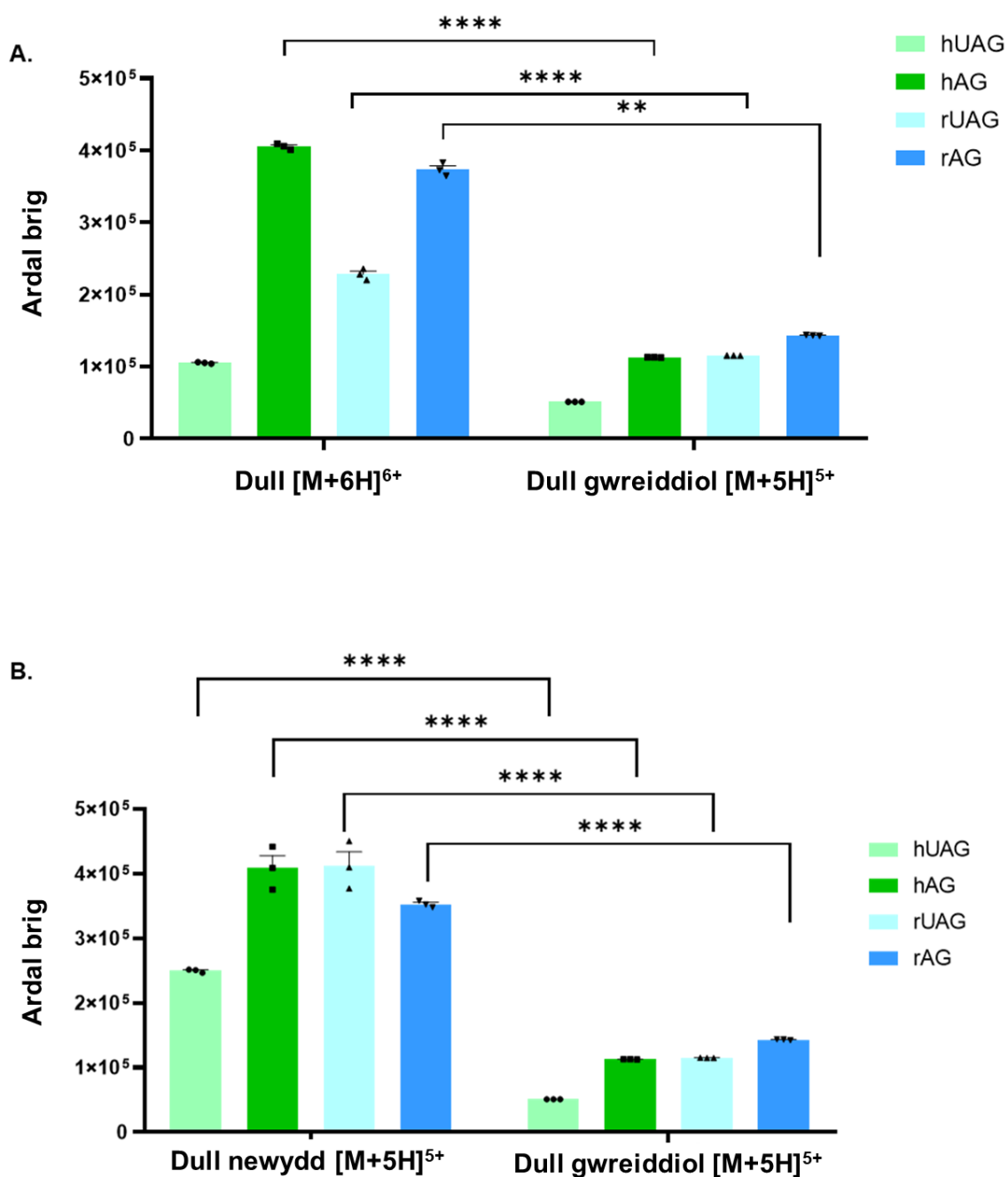
Profwyd y dulliau MRM newydd gan ddefnyddio cymysgedd hafal 20 ng/mL o dadasyl ac asyl ghrelin, dynol a llygoden fawr. Gwnaethpwyd hyn naill ai gyda neu heb gynnwys DMSO yn y cyfnod symudol. Yn gyffredinol, yn absenoldeb DMSO, roedd yr ardaloedd brig a welwyd ar gyfer cyflyrau gwefr [M+6H]⁶⁺ am asyl ghrelin dynol a dadasyl ac asyl ghrelin llygoden fawr, yn sylweddol uwch na yr ardaloedd brig a welwyd gan ddefnyddio yr dull MRM gwreiddiol ar gyfer y cyflwr gwefr [M+5H]⁵⁺ (Ffigur 4.24). Fodd bynnag, nid oedd unrhyw wahaniaeth yn yr ardaloedd brig wrth gymharu

yr dull MRM $[M+6H]^{6+}$ a yr dull gwreiddiol o ddadansoddi cyflwr gwefr $[M+5H]^{5+}$ o dadasyl ghrelin dynol.

Ar gyfer y dull MRM 'newydd' gan ddefnyddio yr cyflwr gwefr $[M+5H]^{5+}$ (cyfeiriwch at dabl 4.3), roedd yr ardaloedd brig ar gyfer yr holl rywogaethau ghrelin yn sylweddol uwch na yr hyn a welwyd gan ddefnyddio yr dull $[M+5H]^{5+}$ gwreiddiol (cyfeiriwch at dabl 4.2) (Ffigur 4.24).

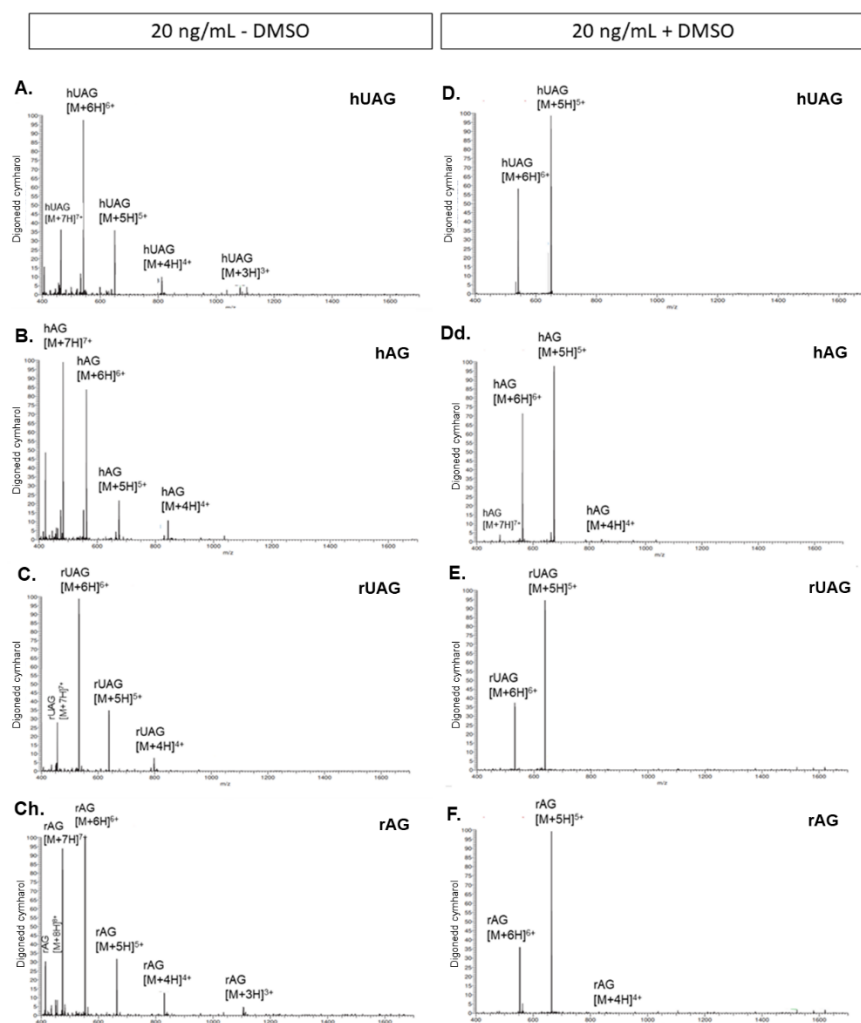
Fel y cyfryw, ar gyfer y cyfnod symudol gan gynnwys DMSO, defnyddiwyd y dulliau MRM yn dilyn yr ïon cyflwr gwefr $[M+5H]^{5+}$ o ghrelin (gan ddefnyddio 717 a 675 fel yr ïonau cynnyrch ar gyfer y rhywogaethau ghrelin dynol a llygoden fawr, yn y drefn honno) i yw dadansoddi ymhellach. Wrth ddefnyddio yr cyfnod symudol heb DMSO, defnyddiwyd y dull MRM newydd yn dilyn yr ïon cyflwr gwefr $[M+6H]^{6+}$ o ghrelin (gan ddefnyddio 551 a 562 fel yr ïonau cynnyrch ar gyfer y rhywogaethau ghrelin dynol a llygoden fawr, yn y drefn honno). Aseswyd effaith DMSO ar gynhyrchu a dosbarthu gwahanol gyflyrau gwefr ghrelin gan ddefnyddio yr dulliau MRM newydd. Yn absenoldeb DMSO, gwelwyd cynnydd mewn cyflyrau gwefr ghrelin, a yr ïon mwyaf dominyddol oedd $[M+6H]^{6+}$. Mewn ychwanegiad, oedd y gwasgariad cyffredinol yn amrywio o $[M+4H]^{4+}$ i $[M+7H]^{7+}$ (Ffigur 4.25). Ym mhresenoldeb DMSO, yr ïon mwyaf dominyddol oedd $[M+5H]^{5+}$, gyda phresenoldeb llai o yr $[M+6H]^{6+}$ a symiau bach o yr $[M+4H]^{4+}$ (Ffigur 4.25). Ar gyfer dadasyl ac asyl ghrelin dynol a llygoden fawr, roedd yr ardal brig gyffredinol yn sylweddol uwch ym mhresenoldeb DMSO (Ffigur 4.26A-B).

O ystyried y canlyniadau o ffigur 4.25 a 4.26, penderfynwyd mae yr dull mwyaf effeithlon o fonitro ghrelin oedd trwy ddefnyddio yr cyflwr 'newydd' $[M+5H]^{5+}$ (fel y disgrifir yn nhabl 4.3), ochr yn ochr â chynnwys DMSO yn y cyfnod symudol.



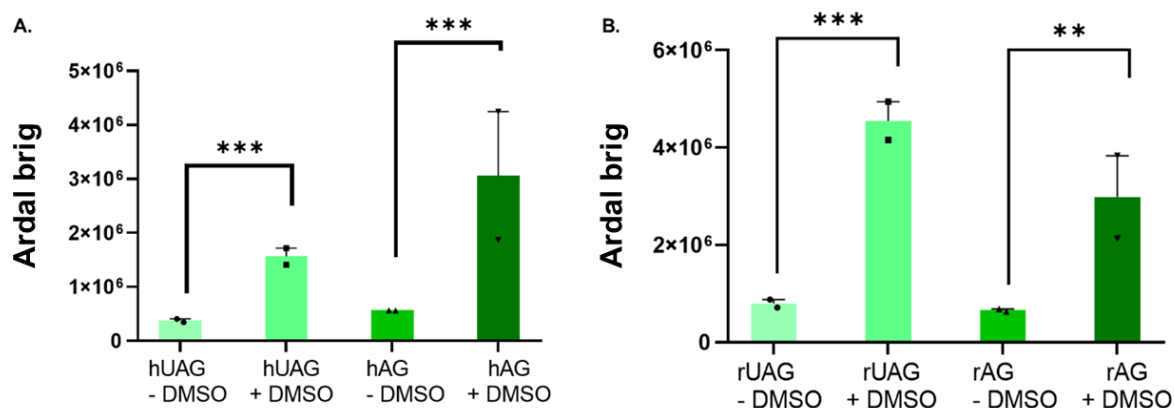
Ffigur 4.24 Cymharu ardaloedd brig ghrelin ar ôl dadansoddi gan ddefnyddio paramedrau LC-MS/MS gan fonitro cyflyrau gwefr ghrelin [M+6H]⁶⁺ a [M+5H]⁵⁺ (wedi eu dadansoddi ar 20 ng/mL) (dim cynnwys DMSO).

A. Cymhariaeth o yr MRM newydd yn monitro yr ïonau rhiant cyflwr gwefr [M+6H]⁶⁺ a yr ïonau cynnyrch dominyddol â yr dull [M+5H]⁵⁺ MRM gwreiddiol. B. Cymharu yr MRM newydd sydd yn monitro yr ïonau rhiant cyflwr gwefr [M+5H]⁵⁺ a yr ïonau cynnyrch dominyddol â yr dull MRM [M+5H]⁵⁺ gwreiddiol. Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. ** $P < 0.01$. **** $P < 0.0001$. $N = 3$, gyda yr cymedr cyfartalog wedi ei blotio a SEM.



Ffigur 4.25 Dosbarthiad gwahanol gyflyrau gwefr ïonau ghrelin pan gaiff ei ddadansoddi gan LC-MS, yn dilyn defnyddio cyfnod symudol gyda neu heb gynnwys DMSO.

Sbectra MS o rywogaethau ghrelin (20 ng/mL) ar ôl defnyddio cyfnod symudol naill ai heb (A, B, C, Ch) neu gyda DMSO (D, Dd, E, F). 10 digwyddiad sgan wedi eu cyfuno.



Ffigur 4.26 Asesu effaith DMSO ar ardal brig ghrelin (dadansoddwyd ar 20 ng/mL).

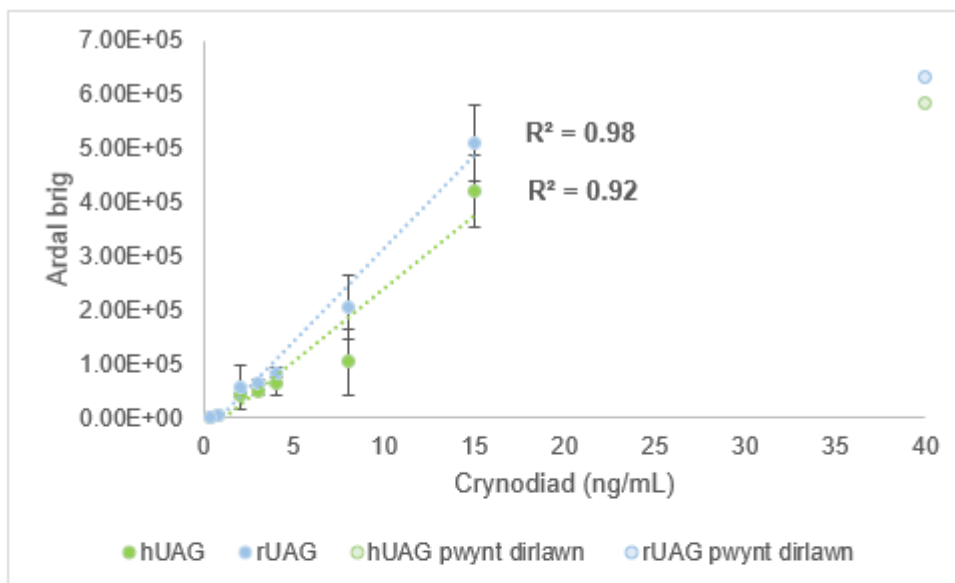
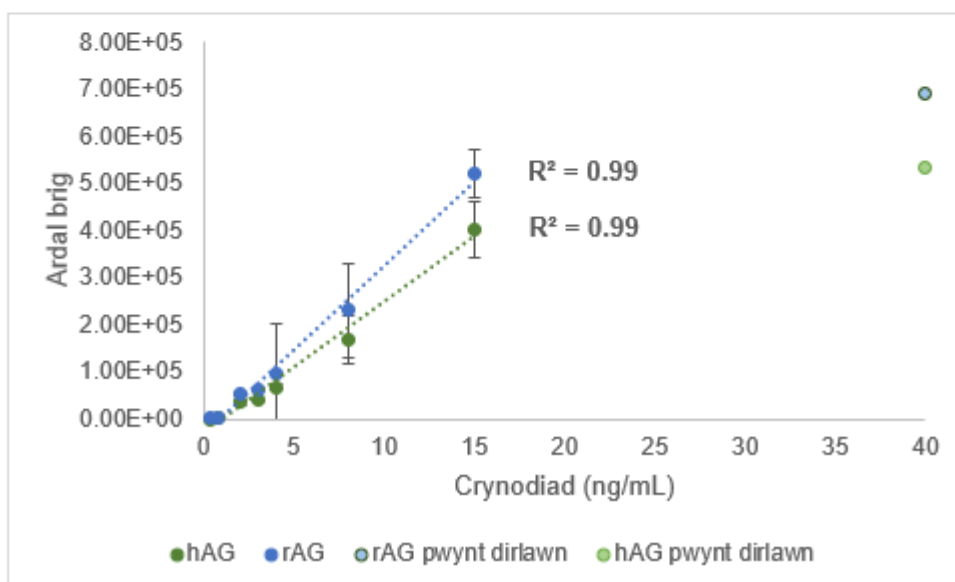
A. hUAG a hAG. B. rUAG a rAG. Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. $N = 3$, gydag arwynebedd brig cymedrig cyfartalog wedi'i blotio a SEM.

Yn dilyn ymlaen o yr canlyniadau addawol hyn o arddwysedd cynyddol ar ôl cynnwys DMSO yn y cyfnod symudol, sefydlwyd cromlin raddnodi newydd i brofi yr terfyn canfod. Roedd y cromlin raddnodi yn cynnwys dadasyl ac asyl ghrelin dynol a llygoden fawr, o fewn cymysgedd hafal yn amrywio o 0.4-40 ng/mL (Ffigur 4.27). Am y tro cyntaf, canfuwyd rhywogaethau ghrelin ar lefelau mor isel â 0.4 ng/mL, gan ddangos dull gwell o sensitifrwydd.

Er mwyn gwella llinoledd a lleihau cymhlethdod gweledol, eithriwyd y pwynt crynodiad uchaf (40 ng/mL) o yr cromlin calibradu. Roedd y penderfyniad hwn yn seiliedig ar wriad cyson o linoledd a welwyd yn y crynodiad hwn, a allai adlewyrchu ataliad signal rhannol, gorlwytho colofnau, neu ddiraddiad ghrelin posibl o dan amodau LC-MS/MS hirfaith. Bydd yr achos sylfaenol yn cael ei archwilio ymhellach yn adrannau diweddarach y bennod hon.

Cyflwynwyd y data canlyniadol ar draws dau banel (Ffigur 4.27A a 4.27B) i gynorthwyo eglurder a dehongliad. Mae Ffigur 4.27A yn dangos y cromliniau calibradu ar gyfer rhywogaethau dadasyl ghrelin, gan ddangos llinoledd cryf gyda gwerthoedd R^2 o 0.98 ar gyfer dadasyl ghrelin dynol a 0.92 ar gyfer dadasyl ghrelin llygoden fawr. Mae Ffigur 4.27B yn cyflwyno yr cromliniau calibradu asyl ghrelin, lle cyflawnodd asyl ghrelin dynol a llygoden fawr linoledd rhagorol, pob un â gwerth R^2 o 0.99.

Er gwaethaf y terfyn canfod isaf newydd addawol a gyflawnwyd, arhosodd gwerthoedd R^2 ar gyfer rhai dadansoddydd islaw yr trothwy delfrydol o 0.95, ac roedd arddwysedd brig ar ben isaf yr ystod crynodiad yn gymharol fach. O ystyried bod y dull o yr brig i lawr wedi ei archwilio yn helaeth, dilynwyd strategaeth o yr gwaelod i fyny nesaf fel dull amgen ar gyfer dadansoddi ghrelin.

A.**B.**

Ffigur 4.27 Cromlin graddnodi hUAG, hAG, rUAG, a rAG yn amrywio o 0.4-40 ng/mL.

Wedi ei ddadansoddi gan LC-MS/MS, trawsnewidiadau MRM fel y disgrifir yn $[M+5H]^{5+}$ dull newydd (Tabl 4.3) gan gynnwys DMSO. N=3, cymedr cyfartalog wedi ei blotio gyda SEM. Mae llinellau tuedd yn cynrychioli ffitiadau atchweliad llinol, ac adroddir gwerthoedd R^2 i nodi daioni yr ffit. Mae bariau gwall yn dangos y gwriad safonol.

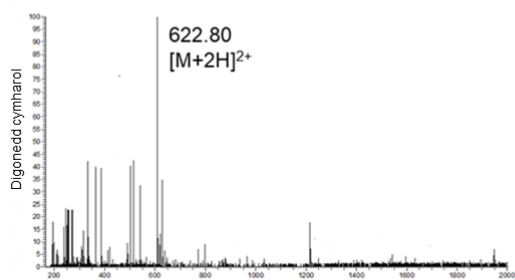
4.3.5 Treuliad Tryptig Ghrelin Cyn Dadansoddiad MS

Yma, archwilir dull o yr gwaelod i fyny, sydd yn golygu treulio protein o ddiddordeb i beptidau yn ensymatig cyn ei ddadansoddi gan LC-MS/MS. Defnyddiodd Thomas et al. (2021), y dull hwn yn llwyddiannus ar gyfer adnabod ghrelin. Mae Trypsin, proteas serin yn cael ei ddefnyddio yn gyffredin ar gyfer treulio proteinau (Laskay et al., 2013). Mae yn gweithredu trwy dorri ar ochr carbocsyl gweddillion lysin ac arginin. Felly, profwyd treuliad tryptig ghrelin. Mae yr treuliad tryptig yn arwain at gynhyrchu darn 11 asid amino o ghrelin ac felly mae yr peptid (1-11) yn dal i gynnwys yr addasiad asyl yn y gweddillion serin 3 (Ffigur 4.2).

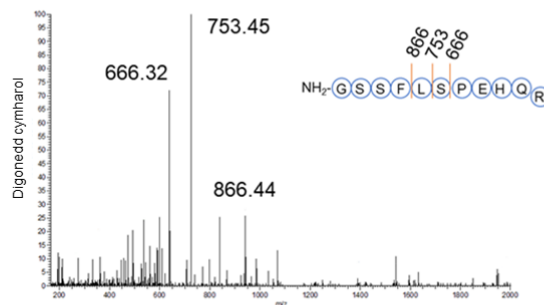
Yn dilyn treuliad tryptig o ghrelin, dadansoddwyd y cynhyrchion gan MS lle cynhaliwyd sganiau ïon cynnyrch o yr rhiant ïonau dominyddol. Roedd yr ïonau rhiant a chynnyrch a welwyd ar gyfer y ghrelin dynol yn dilyn treuliad trypsin yn gyson â yr hyn a adroddwyd yn flaenorol gan Thomas et al (2021), gan ddefnyddio yr un dull o yr gwaelod i fyny. Cafwyd yr ïonau cynnyrch diagnostig o ghrelin dadasyl (1-11) ac asyl ghrelin dynol (1-11) o eu cyflwr gwefr $[M+2H]^{2+}$, ïonau rhiant a welwyd yn m/z 622 a m/z 685 yn y drefn honno (Ffigur 4.28). Ar gyfer dadasyl ac asyl ghrelin llygoden fawr, gellir gweld yr ïonau rhiant cyflwr gwefr $[M+2H]^{2+}$ yn m/z 608 a 671 yn y drefn honno (Ffigur 4.28). Penderfynwyd ar yr egni gwrthdrawiadau a yr paramedrau offer mwyaf priodol ar gyfer pob MS/MS trwy ddadansoddi yr samplau gan ddefnyddio yr NanoMate trwy chwistrelliad uniongyrchol cyn eu dadansoddi gan LC-MS/MS. Ar gyfer y trawsnewidiadau MRM newydd, dewiswyd yr ïonau cynnyrch â yr arddwysedd uchaf i fesur yr ardaloedd brig.

A. hUAG

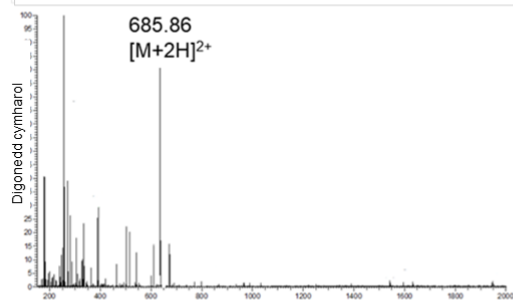
FTMS MS cyfan [400-2000]



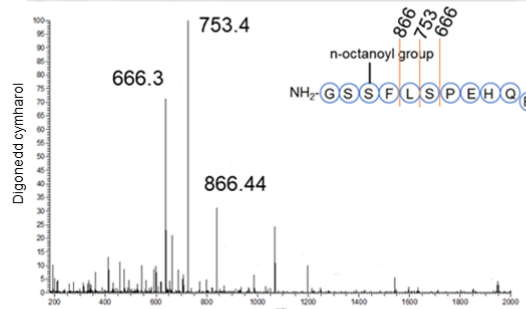
ITMS MS2 622.80@cid23

**B. hAG**

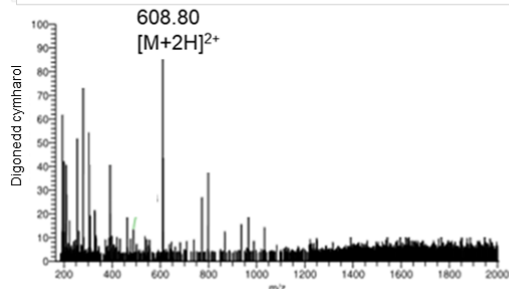
FTMS MS cyfan [400-2000]



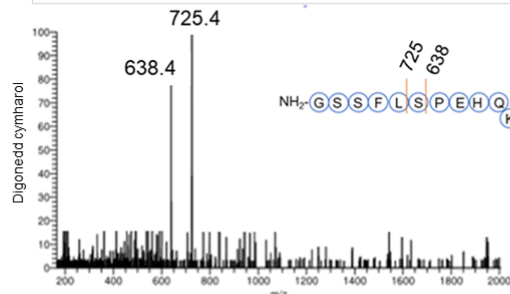
ITMS MS2 685.86@cid23

**C. rUAG**

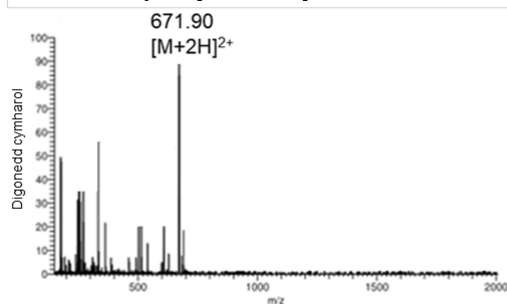
FTMS MS cyfan [400-2000]



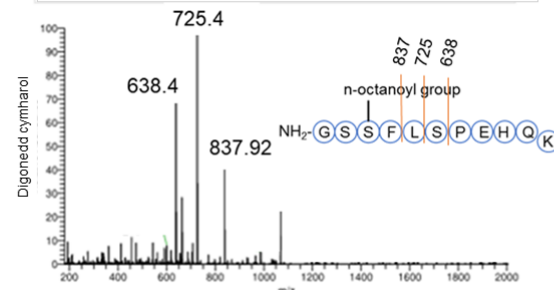
ITMS MS2 608.80@cid23

**Ch. rAG**

FTMS MS cyfan [400-2000]



ITMS MS2 671.90@cid23

**Ffigur 4.28 Sbectra MS ac MS/MS o yr cynnyrch dreuliad tryptig ghrelin.**

A. hUAG (t1-11) ar m/z 622 a B. hAG (t1-11) ar m/z 685 gyda yr ïonau cynnyrch mwyaf helaeth yn 666 a 753. C. rUAG (t1-11) ar m/z 608 a Ch. rAG (t1-11) ar m/z 671 gyda yr ïonau cynnyrch mwyaf helaeth yn 638 a 725.

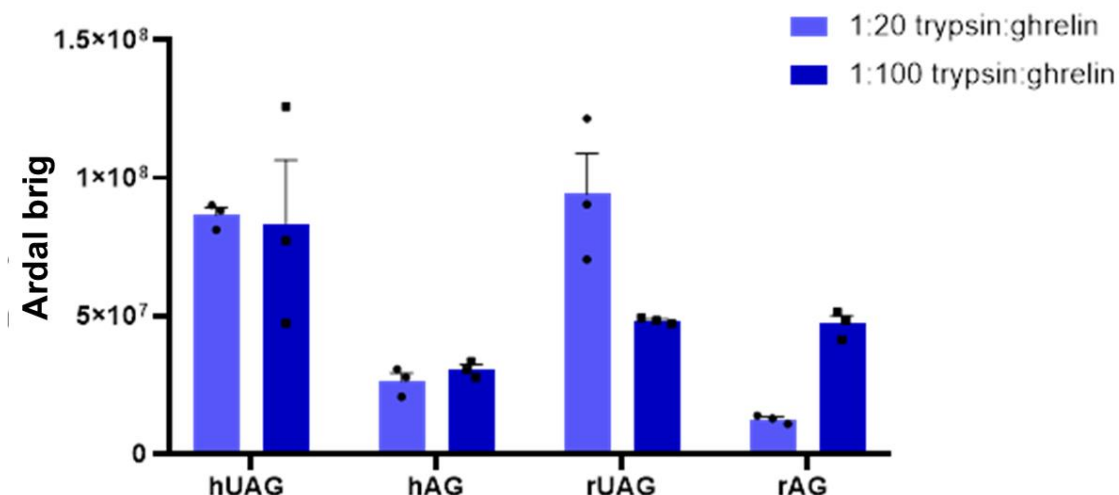
I grynhoi, mae yr paramedrau sbectromedr màs newydd ar gyfer dull gwaelod i fyni yr peptidau ghrelin tryptig wedi eu hamlygu yn Nhabl 4.4 isod.

Rhywogaethau ghrelin	Dilyniant asidau amino	Ynni gwrthdrawiad	ŏon rhagflaenydd neu y rhiant' (m/z)	ŏon cynnyrch neu 'merch' o ddiddordeb (m/z)	MS/MS i yw ddefnyddio mewn MRM
UAG Dynol	GSSFLSPEHQR	23	622.80 ([M+2H] ²⁺)	ŏon meintiolwr:753.4 666.3	622/ 752-754 622/ 665-667
AG Dynol	GSS(n-octanoyl) FLSPEHQR	23	685.86 ([M+2H] ²⁺)	ŏon meintiolwr:753.4 666.3	685/ 752-754 685/ 665-667
UAG Llygoden fawr	GSSFLSPEHQK	23	608.80 ([M+2H] ²⁺)	ŏon meintiolwr:725.4 638.4	608/ 724-726 608/ 637-639
AG Llygoden fawr	GSS(n-octanoyl) FLSPEHQK	23	671.40 ([M+2H] ²⁺)	ŏon meintiolwr:725.4 638.4	671/ 724-726 671/ 637-639

Tabl 4.4 Trawsnewidiadau MRM 4 LC-MS/MS newydd i fonitro rhywogaethau dynol a llygoden fawr ghrelin gan ganolbwyntio ar gyflwr cyhuddedig [M+2H]²⁺ yn dilyn treuliad gan ddefnyddio trypsin.

Trawsnewidiadau MS/MS mewn du: a ddefnyddir ar gyfer meintoli ardaloedd brig ghrelin, trawsnewid MS/MS mewn llwyd: a ddefnyddir at ddibenion adnabod i gadarnhau brig cywir ghrelin.

Yn dilyn nodweddu MS, profwyd y gymhareb trypsin i ghrelin gan ddefnyddio naill ai 1:20 neu 1:100 (w/w) fel yr argymhellir gan gyflenwyr. Cymysgwyd y gymhareb trypsin ghrelin 1:20 neu 1:100 (w/w) ac ei magu dros nos ar 37°C ar set cymysgydd rotor ar 500rpm. Cafodd yr adwaith ei ddiffodd gan ddefnyddio 2% o asid asetig ac yna allgyrchu ar 9000xg am 2 funud. Yn gyffredinol, ni welwyd unrhyw wahaniaethau arwyddocaol ar gyfer yr ardaloedd brig o gyflwr ghrelin [M+2H]²⁺ a godir yn dilyn triniaeth â trypsin ar gymhareb 1:20 neu 1:100 (trypsin i ghrelin) (Ffigur 4.29).

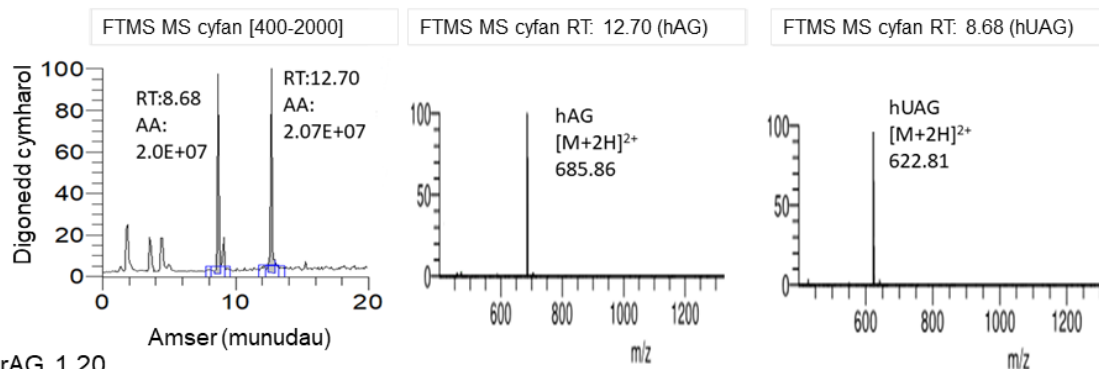


Ffigur 4.29 Cymhariaeth o 1:20 neu 1:100 (w/w) o drypsin i ghrelin ar ardaloedd brig ghrelin (cyflwr gwefr $[M+2H]^{2+}$) yn dilyn dadansoddiad LC-MS/MS.

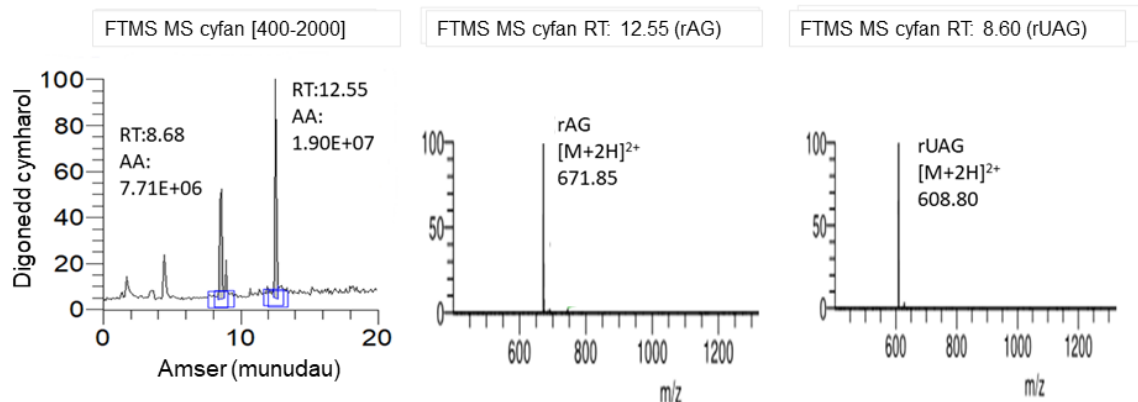
Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. $N=3$, arwynebedd brig cymedrig cyfartalog wedi ei blotio gyda SEM.

Yn ystod dadansoddiad LC-MS/MS o yr samplau asyl ghrelin (dynol a llygoden fawr), gwelwyd presenoldeb parhaus o brig a oedd yn cyfateb i yr un amser cadw â dadasyl ghrelin (RT:8.60 ac RT:8.68 ar gyfer dadasyl ghrelin gan lygoden fawr a dynol, yn y drefn honno) (Ffigur 4.30). Cadarnhawyd presenoldeb dadasyl ghrelin yn y samplau asyl ghrelin treuliad tryptig trwy gynnal sbectra ïon cynnyrch MS/MS o yr brigau hynny ar 8.68 a 8.76 munud a oedd yn cynnwys ïonau cynnyrch diagnostig o dadasyl ghrelin (m/z / 608 a 622 ar dadasyl ghrelin â llygoden fawr a dynol, yn y drefn honno) (Ffigur 4.30). Ni chredwyd bod hyn yn gysylltiedig â chymhareb y driniaeth ghrelin trypsin gan nad oedd unrhyw gydberthynas rhwng faint o drypsin a ddefnyddiwyd ac arwynebedd brig y 'halogiad' dadasyl ghrelin. Ystyriwyd a allai yr dirywiad hwn mewn asyl ghrelin mewn samplau fod o ganlyniad i ddiraddiad/colled 'naturiol' yn y grŵp asyl mewn ymateb i samplau yn cael eu magu dros nos ar 37°C ar gyfer y broses dreulio. Felly, ail-ddadansoddwyd y samplau ar ôl cael eu storio am 24 awr ychwanegol ar 4°C, i weld a oedd presenoldeb dadasyl ghrelin wedi cynyddu ymhellach yn y samplau asyl ghrelin. Fodd bynnag, ni welwyd unrhyw wahaniaethau arwyddocaol rhwng ardaloedd brig y 'halogiad' dadasyl ghrelin pan ddadansoddwyd y samplau naill ai yn syth ar ôl treulio trypsin neu ar ôl cael eu storio am 24 awr ychwanegol ar 4°C (Ffigur 4.31).

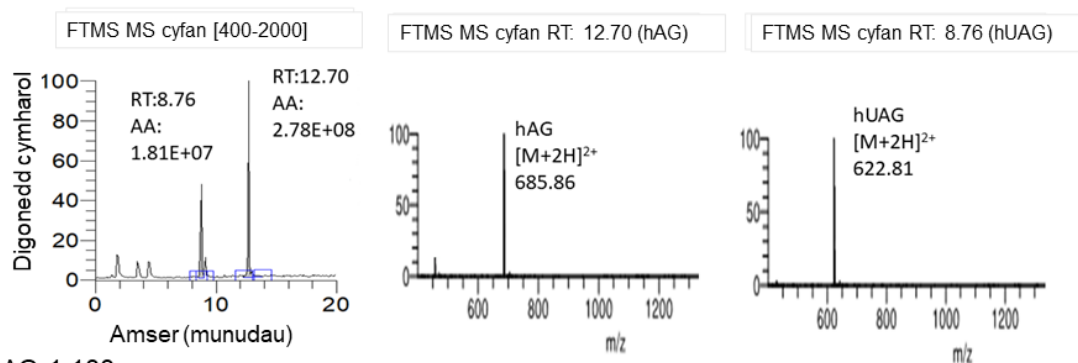
A. hAG 1.20



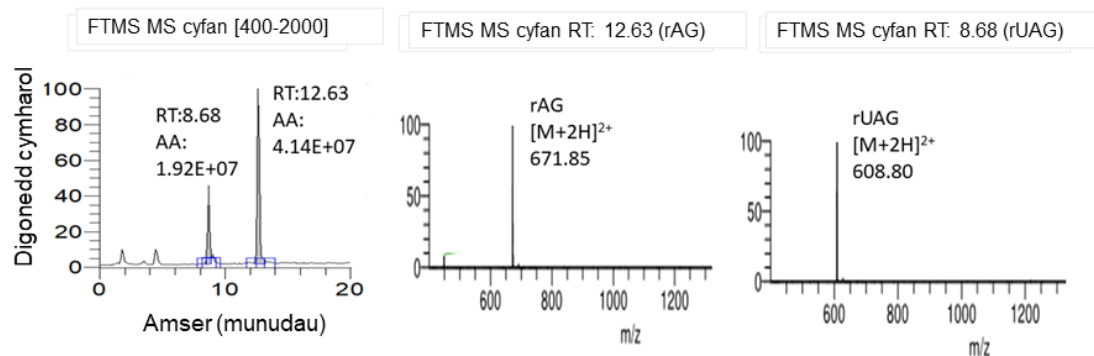
B. rAG 1.20



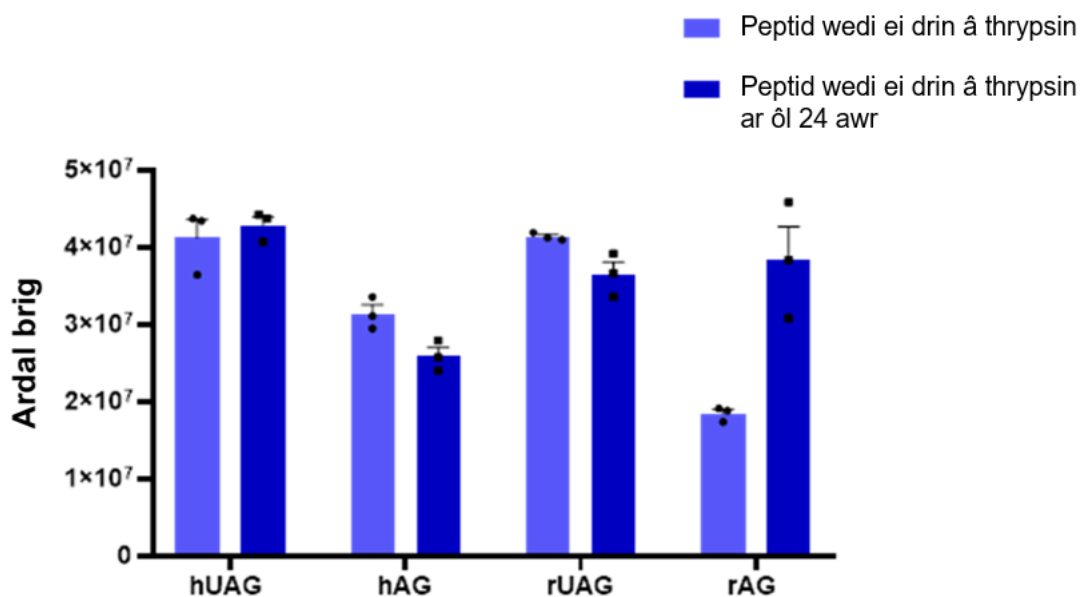
C. hAG 1.100



Ch. rAG 1.100



Ffigur 4.30 MS cromatogramau a sbectra o samplau asyl ghrelin yn dilyn treulid gyda trypsin yn awgrymu presenoldeb dadasyl ghrelin yn 8.6 neu 8.7 munud.

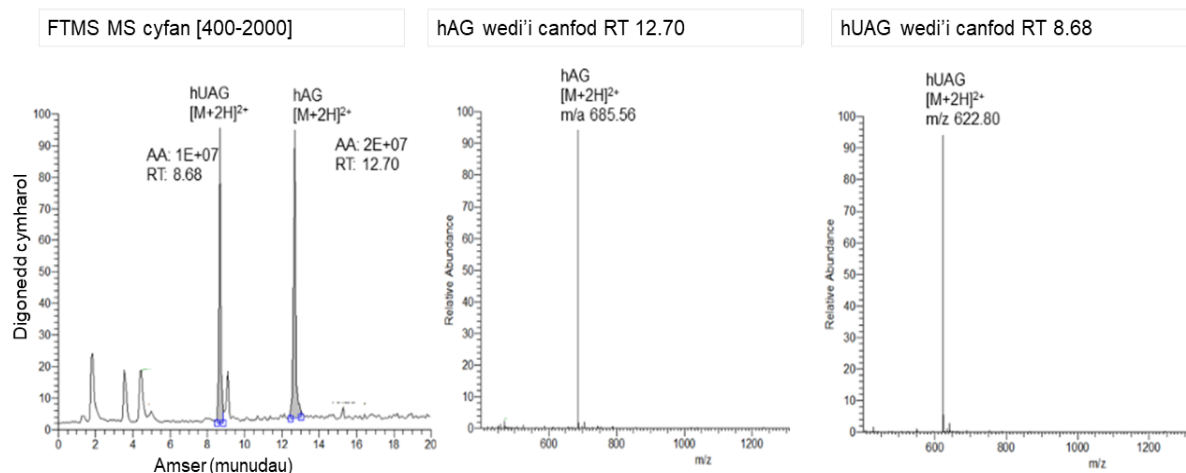


Ffigur 4.31 Cymhariaeth o peptidau ghrelin wedi eu treulio â trypsin (1:20) wedi ei ddadansoddi ar unwaith neu ar ôl storio am 24 awr ar 4°C.

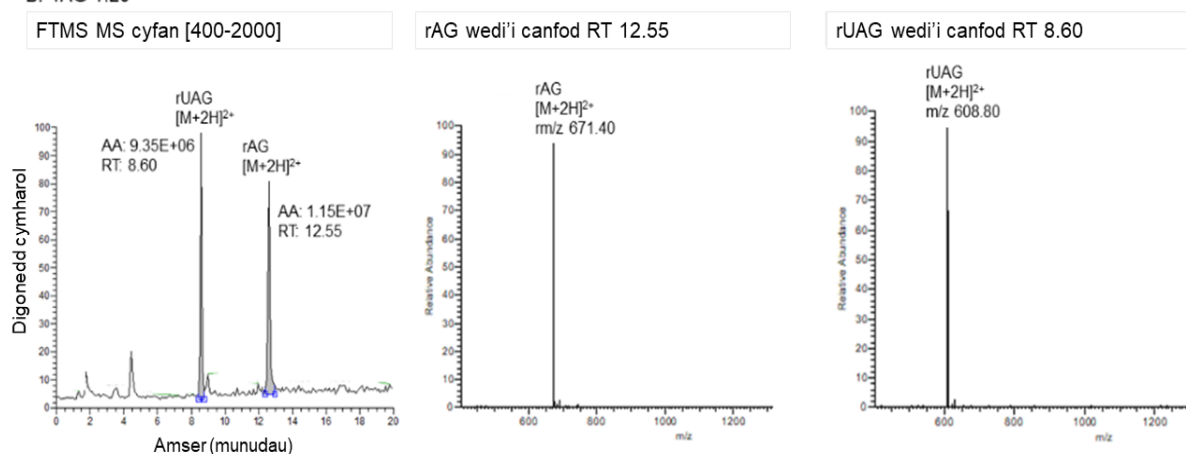
Wedi ei ddadansoddi gan ddadansoddiad LC-MS/MS (Yn dilyn cyflwr gwefr ($[M+2H]^{2+}$)). Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. $N=3$, arwynebedd brig cymedrig cyfartalog wedi ei blotio gyda SEM.

Er mwyn ymchwilio i weld a allai diraddio asyl ghrelin mewn samplau fod o ganlyniad i ddiraddiad/colled 'naturiol' yn y grŵp asyl, dadansoddwyd paratodau unigol o safonau asyl ghrelin llygoden fawr a dynol cyflawn (heb ei dreulio) yn syth ar ôl paratoi (amser 0) gan LC-MS/MS yna ei storio am 24 awr ar 4°C cyn cael ei ail-ddadansoddi gan LC-MS/MS. Cadarnhawyd presenoldeb dadasyl ghrelin yn y samplau asyl ghrelin trwy ddadansoddi yr brigau o fewn sbectra cromatogram ar 8.68 a 8.6 munud (presenoldeb m/z 622 a 608 yn nodi presenoldeb dadasyl ghrelin dynol a llygoden fawr, yn y drefn honno) (Ffigur 4.32).

A. hAG 1:20



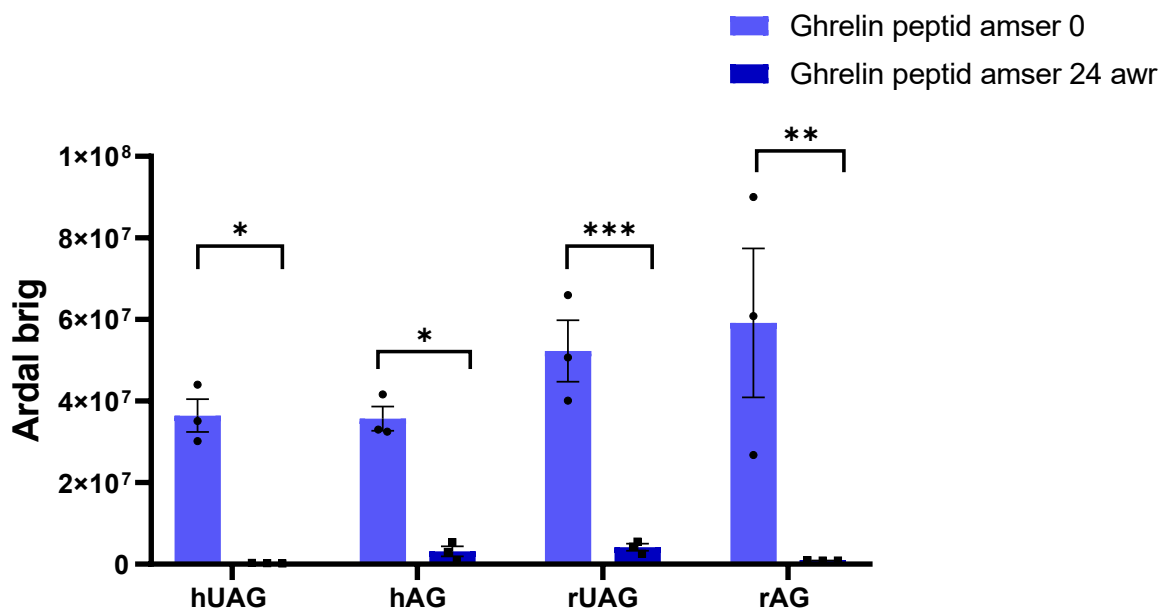
B. rAG 1:20



Ffigur 4.32 Cromatogramau MS a sbectra o ghrelin cyfan ar ôl cael eu storio am 24 awr ar 4°C.

A. Cromatogram LC-MS o hAG (12.70) gyda sbectra o brig ar 8.68 munud yn cefnogi presenoldeb hUAG. B. Cromatogram LC-MS o rAG (12.55) gyda sbectra o brig ar 8.60 munud yn cefnogi presenoldeb rUAG. AA: ardal brig. RT: amser cadw.

Yn gyffredinol, gwelwyd gostyngiad sylweddol yn yr ardaloedd brig ar gyfer yr holl rywogaethau ghrelin ar ôl cael eu storio am 24 awr (Ffigur 4.33). Mae hyn yn awgrymu yr gallu i yr ghrelin ddiraddio mewn samplau ar ôl 24 awr a posibilrwydd o yr peptid fod yn ansefydlog hyd yn oed wrth storio ar 4°C.



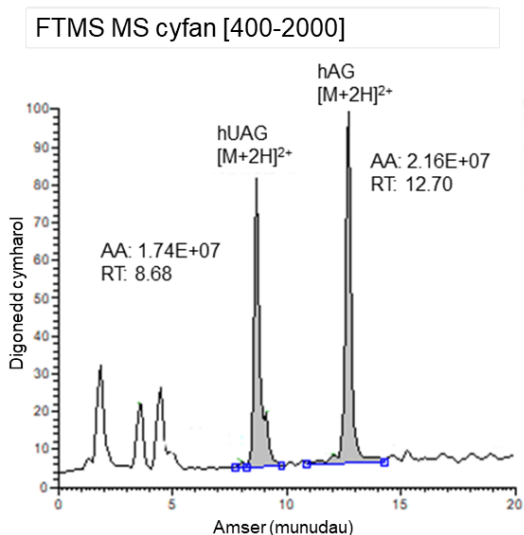
Ffigur 4.33 Cymhariaeth o yr ardaloedd brig o ghrelin cyfan wedi ei ddadansoddi ar ôl paratoi ar unwaith (amser 0) ac ar ôl 24 awr o storio ar 4°C.

Sampl wedi ei ddadansoddi yn ôl dadansoddiad LC-MS/MS (yn dilyn cyflwr gwefr $[M+5H]^{5+}$ fel y disgrifir yn nhabl 4.3). Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. * $P > 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. $N=3$, arwynebedd brig cymedrig cyfartalog wedi ei blotio gyda SEM.

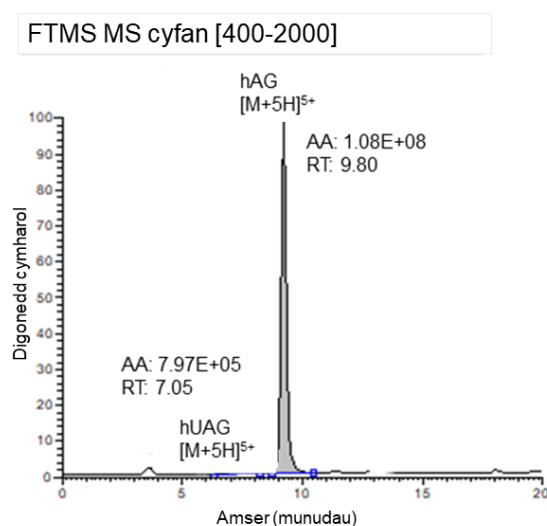
Cymharwyd cromatogramau LC-MS/MS o asyl ghrelin (wedi ei dreulio yn ensymatig ac yn gyfan) ar ôl cael ei storio am 24 awr ar 4°C i gael mewnwelediad pellach i bresenoldeb y 'halogiad' rhywogaeth dadasyl ghrelin yn y samplau asyl ghrelin. Fel o yr blaen, roedd dadasyl ghrelin yn bresennol ym mhob sampl asyl ghrelin (Ffigur 4.34). Ni welwyd unrhyw wahaniaethau arwyddocaol rhwng ardaloedd brig y dadasyl ghrelin a welwyd yn y samplau trypsin asyl ghrelin o eu dadansoddi ar unwaith trwy LC-MS/MS o gymharu â storio yr samplau ar 4°C am 24 awr (Ffigur 4.35A). Fodd bynnag, gwelwyd newidiadau sylweddol yn ardaloedd brig rhywogaethau ghrelin cyfan dros 24 awr (Ffigur 4.35B). Yn benodol, dangosodd dadasyl ghrelin dynol ac asyl ghrelin llygoden fawr ostyngiad sylweddol yn arddwysedd y signal o amser 0 i 24 awr ($P < 0.0001$ a $P < 0.05$, yn y drefn honno), sydd yn dynodi dirywiad neu ansefydlogrwydd posibl o dan yr amodau storio. Yn ddiddorol, gwelwyd cynnydd sylweddol yn ardal brig asyl ghrelin dynol ar ôl 24 awr o storio ar 4°C ($P < 0.05$), sydd yn cyferbynnu â yr patrwm disgwyledig o ddirywiad. Mae yr rheswm dros y cynnydd annisgwyl hwn yn aneglur a gall adlewyrchu effeithlonrwydd ïoneiddio oedi, amrywioldeb sampl, neu

newidiadau arteffactaidd posibl yn ystod storio neu ddadansoddi. Mae yr canfyddiadau hyn yn awgrymu, er bod dirywiad rhai rhywogaethau ghrelin yn amlwg dros amser, bod y deinameg yn gymhleth ac efallai na fyddant yn dilyn patrwm unffurf ar draws rhywogaethau neu isoformau.

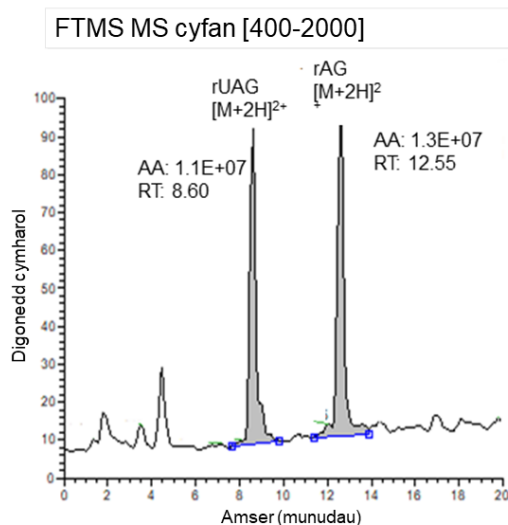
A. hAG 1.20 – dadansoddi ar ôl 24 awr



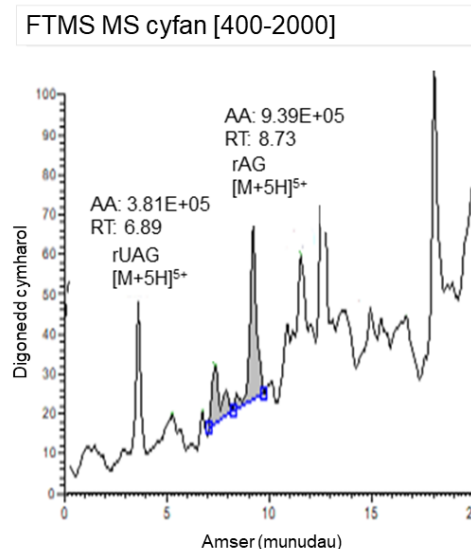
B. hAG cyfan – dadansoddi ar ôl 24 awr



C. rAG 1.20 – dadansoddi ar ôl 24 awr

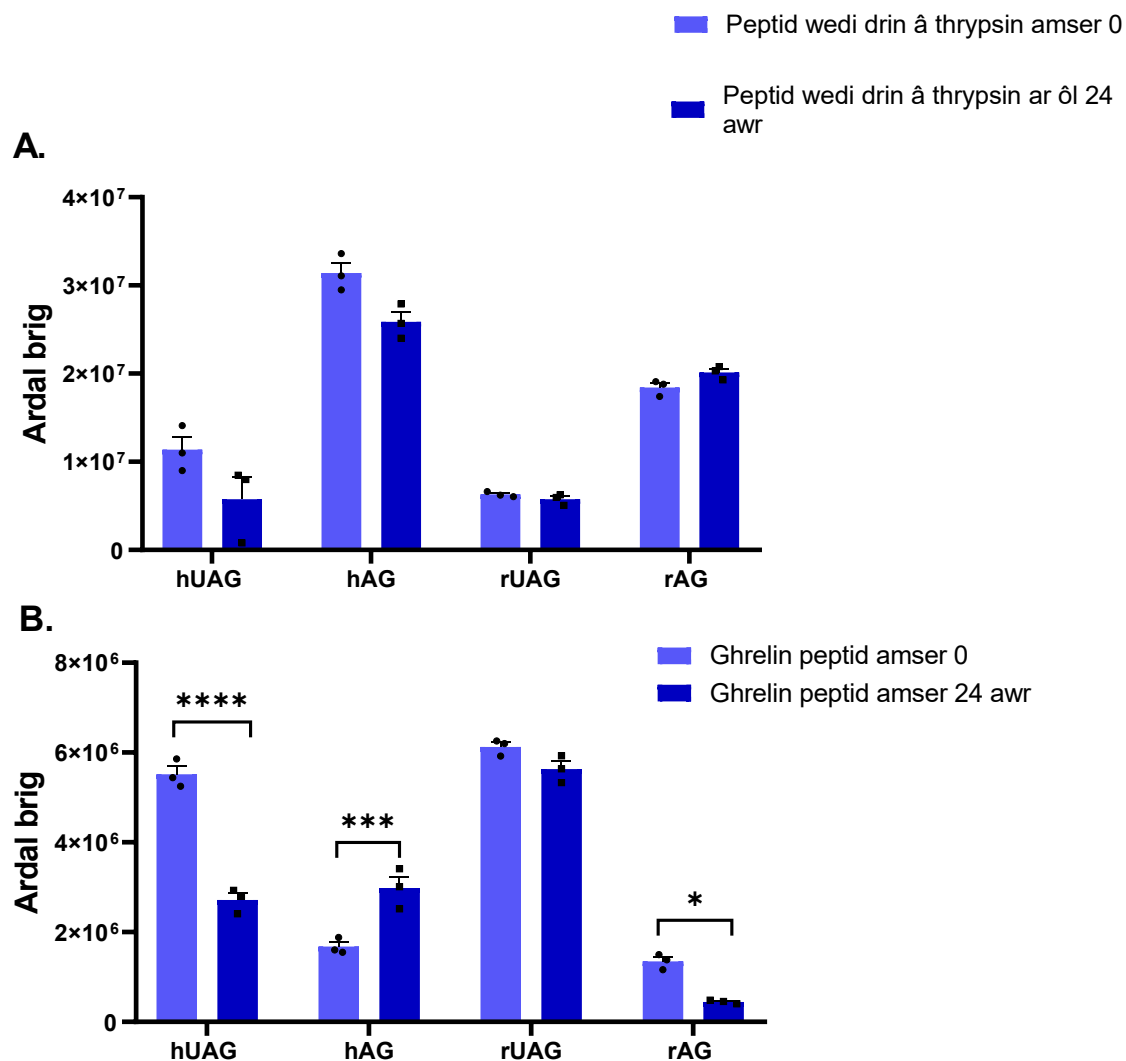


Ch. rAG cyfan – dadansoddi ar ôl 24 awr



Ffigur 4.34 Cromatogramau LC-MS ar gyfer ghrelin dynol a llygoden fawr ar ôl cael eu storio am 24 awr ar 4°C - gyda threuliad trypsin a hebddo.

A. hAG wedi ei drin â trypsin a storio 24 awr (1:20) B. hAG cyfan wedi ei storio am 24 awr. C rAG wedi ei drin â trypsin (1:20) a storio 24 awr. Ch. rAG cyfan wedi ei storio am 24 awr.

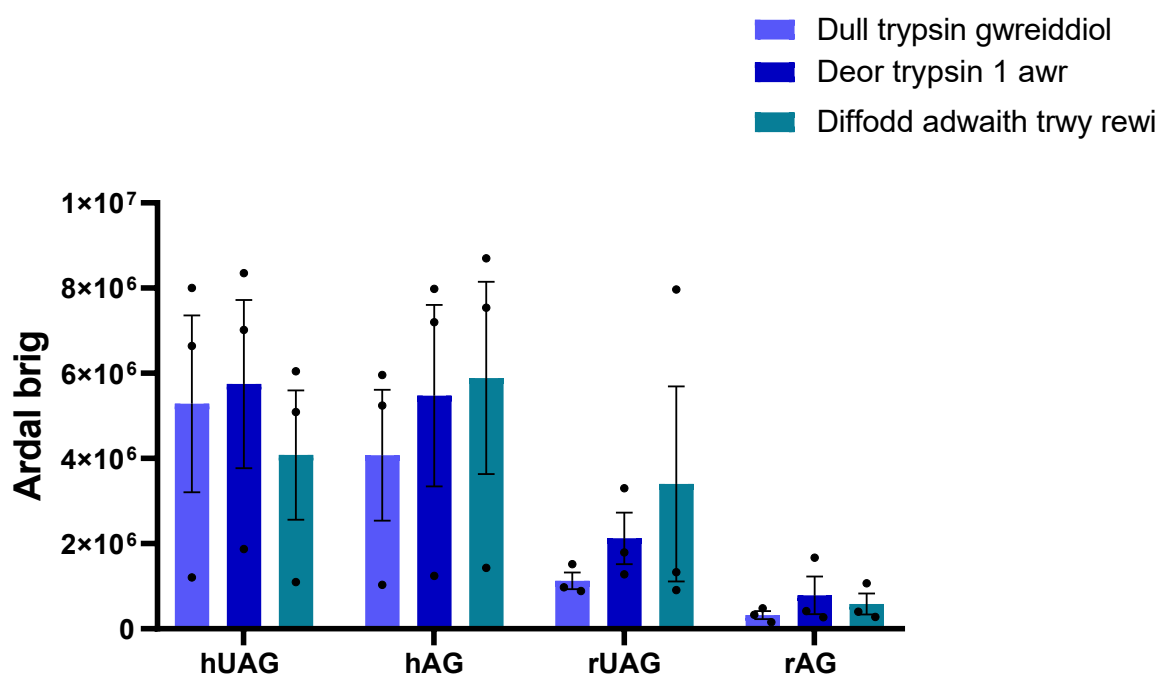


Ffigur 4.35 Dadansoddwyd presenoldeb UAG o fewn samplau AG a gafodd eu trin â thrypsin a hebddynt ar 0 a 24 awr ar ôl storio ar 4°C.

Ardaloedd brig ghrelin wedi eu dadansoddi gan LC-MS/MS. A. ghrelin wedi ei drin â thrypsin ($[M+2H]^{2+}$, cyfeiriwch at dabl 4.4 ar gyfer trawsnewidiadau MS/MS). B. ghrelin cyflawn ($[M+5H]^{5+}$ cyfeiriwch at dabl 4.3 ar gyfer trawsnewidiadau MS/MS). Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. $N=6$, arwynebedd brig cymedrig cyfartalog wedi ei blotio gyda SEM.

Er mwyn lleihau yr tebygolrwydd o ddiraddio ghrelin yn ystod triniaeth â trypsin, archwiliwyd dau addasiad i yr dull A. gweithredu cam magu un awr ar gyfer treuliad trypsin yn lle cael ei wneud dros nos, neu B. yn dilyn magu dros nos gyda trypsin, fel y disgrifiwyd yn y dull gwreiddiol, byddai yr adwaith diffodd yn cael ei wneud trwy rewi yr samplau ar -20°C yn lle defnyddio asid asetig. Ni newidiwyd unrhyw gamau eraill o fewn y protocol. Fodd bynnag, ni welwyd unrhyw newid yn ardaloedd brig y

rhywogaeth ghrelin ar ôl y naill newid na yr llall o gymharu â yr protocol gwreiddiol (Ffigur 4.36).

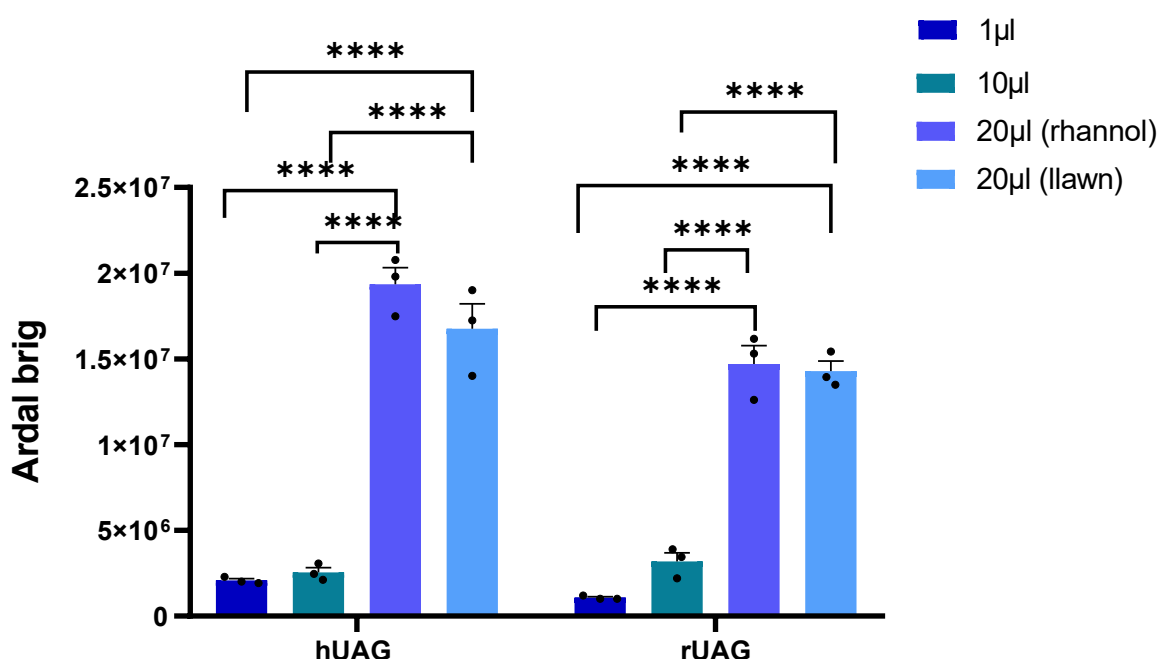


Ffigur 4.36 Cymharu yr protocol treuliat trypsin am yn ail; newidiwyd y dull gwreiddiol i gynnwys naill ai cam magu trypsin 1 awr neu ddefnyddio rhewi i ddiffodd yr adwaith.

Samplau wedi eu dadansoddi yn ôl dadansoddiad LC-MS/MS ($[M+2H]^2+$ wedi ei nodi). Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. $N=6$, arwynebedd brig cymedrig cyfartalog wedi ei blotio gyda SEM.

O ystyried bod y driniaeth awr o ghrelin gyda trypsin wedi rhoi canlyniadau a oedd yn debyg i yr driniaeth dros nos gyda trypsin, gan ganiatáu ar gyfer paratoi sampl yn gyflymach, cafodd y newid hwn yn y dull ei gynnwys fel addasiad parhaol o yr protocol. Roedd optimeiddio pellach y dull MS yn cynnwys ail-brofi cyfaint pigiad cychwynnol HPLC gyda yr gymhariaeth rhwng pigiad dolen rannol wedi ei osod ar 1 μ L, 10 μ L neu 20 μ L yn erbyn pigiad dolen lawn ar 20 μ L. Ar gyfer y system Ultimate 3000 LC, mae yr ddolen lawn yn darparu gwell atgynrychioldeb, fodd bynnag, ar gyfer y pigiad rhannol-dolen, mae angen llai o sampl a allai fod yn well wrth ddadansoddi samplau gwerthfawr gyda chyfeintiau cychwynnol bach. Gan ei bod yn ymddangos mae yr rhywogaeth dadasyl ghrelin yw yr mwyaf sefydlog o ran yr ardaloedd brig a gynhyrchir, cynhaliwyd y profion gan ddefnyddio dadasyl ghrelin dynol a llygoden fawr. Newidiwyd faint o ghrelin fesul mL i sicrhau, beth bynnag fo cyfaint y pigiad cychwynnol, y byddai yr un faint o ghrelin yn cael ei chwistrellu i yr golofn HPLC ei hun (20 ng). Ar gyfer

dadasyl ghrelin dynol a llygoden fawr, arweiniodd y cyfaint 20 μ L (dolen rannol a llawn) at yr ardaloedd brig mwyaf, a oedd yn sylweddol uwch na yr rhai a welwyd ar gyfer y pigladau 1 μ L a 10 μ L (Ffigur 4.37). Ni welwyd unrhyw wahaniaethau arwyddocaol rhwng y pigiad rhannol ar gyfaint 20 μ L na yr pigiad dolen lawn ar 20 μ L. Felly, dewiswyd chwistrelliad dolen rannol 20 μ L fel y dull a ffafrir ar gyfer dadansoddi sampl yn y dyfodol, gan ei fod yn defnyddio cyfaint llai o sampl yn gyffredinol o ei gymharu â yr ddolen lawn.

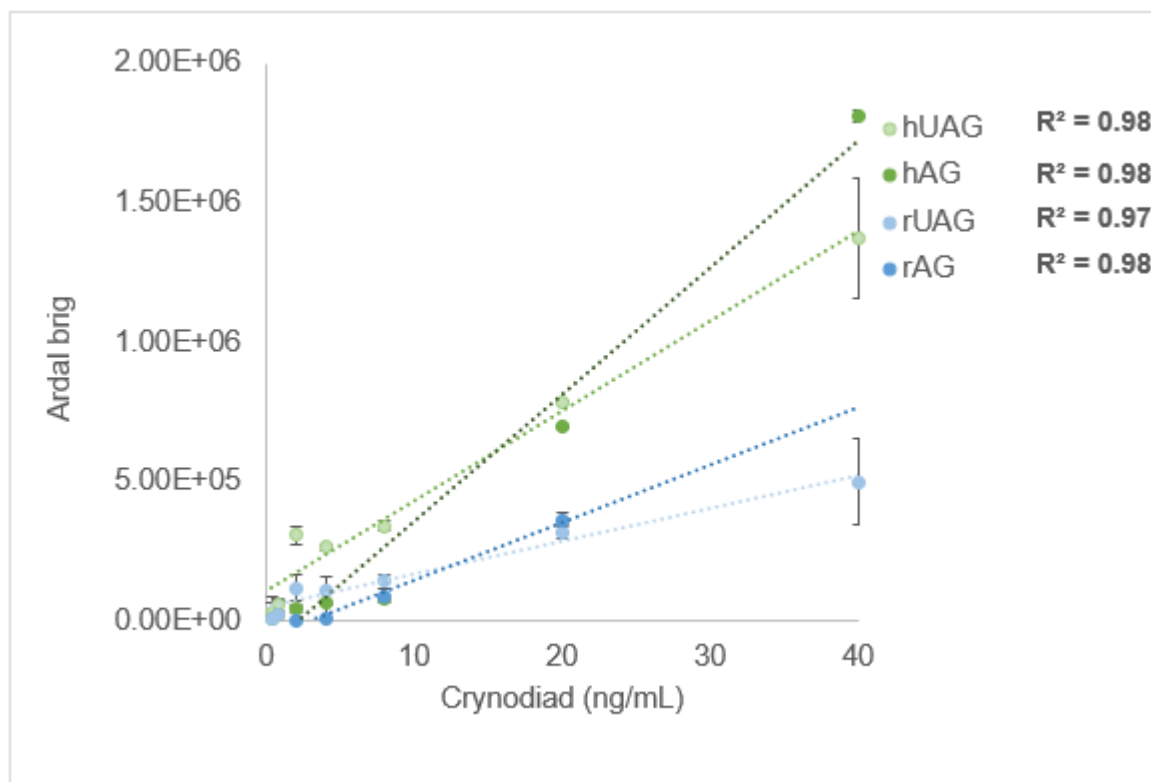


Ffigur 4.37 Cymhariaeth o wahanol gyfeintiau dolen ar yr ardaloedd brig o dadasyl ghrelin tryptig, chwistrellwyd 20ng o ghrelin ar y golofn HPLC yn naill ai 1 μ L, 10 μ L, 20 μ L (rhannol), neu 20 μ L (llawn) cyfaint pigiad cychwynnol.

Dadansoddwyd samplau yn ôl LC-MS/MS (cyflwr gwefr trypsin UAG: $[M+2H]^{2+}$). Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. **** $P < 0.0001$. $N=3$, arwynebedd brig cymedrig cyfartalog wedi ei blotio gyda SEM.

Gyda yr dull newydd o magu treuliad trypsin awr o hyd a chwistrelliad dolen rannol 20 μ L, paratowyd cromlin raddnodi ar gyfer rhywogaethau dadasyl ac asyl ghrelin dynol a llygoden fawr, i weld a ellid cael terfyn canfod is o gymharu â yr un cyflawnir gan y dadansoddiad o ghrelin cyfan. Paratowyd cromlin graddnodi yn yr ystod o 0.04 i 40 ng/mL. I grynhoi yr dull, cafodd pob sampl ei dreulio am 1 awr gyda trypsin, diffodd gan ddefnyddio asid asetig yna dadansoddiad gan LC-MS/MS. Cafodd dadasyl ghrelin i yw canfod i lawr i 0.2 ng/mL, tra bod y rhywogaethau asyl ghrelin yn dal i fod yn

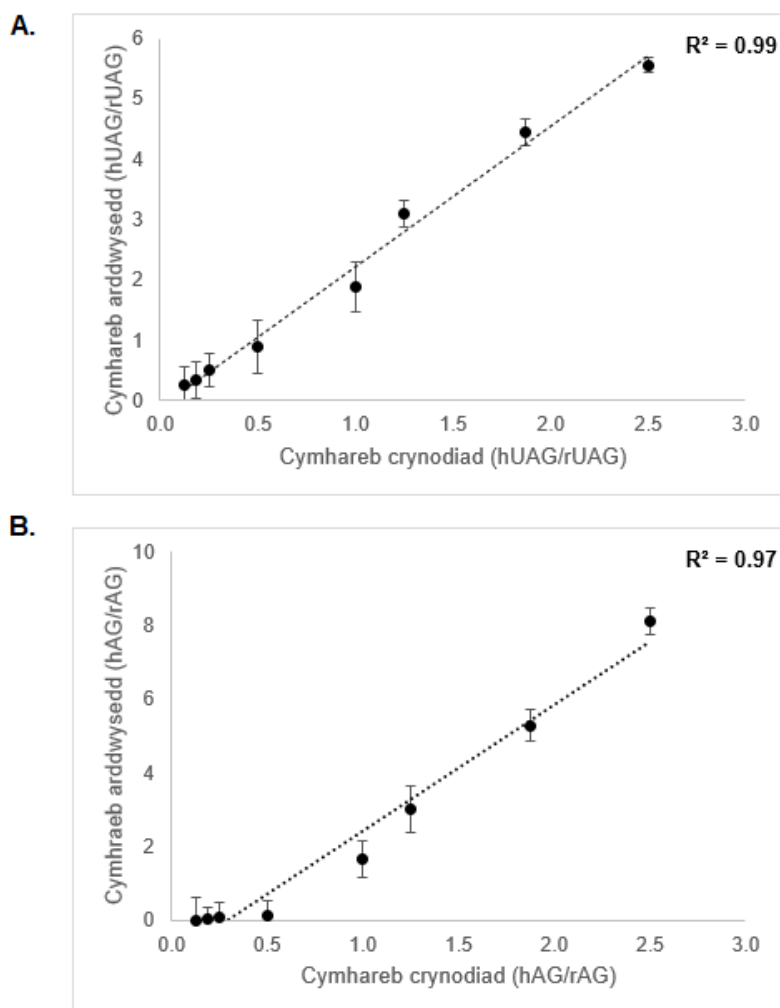
anghanfyddadwy tan 0.4 ng/mL. Yn gyffredinol, gwelwyd gwelliant gan ddefnyddio yr dull gwaelod i fyny gyda gwerthoedd R^2 uwch o gymharu â yr rhai o yr brig i lawr dull dadansoddi ghrelin cyflawn (Ffigur 4.27), er gwaethaf y gwelliannau hyn, mae cyflawni terfyn canfod is yn parhau i fod yn anodd (Ffigur 4.38).



Ffigur 4.38 Cromlin raddnodi hUAG, hAG, rUAG, a rAG yn amrywio o 0.4-40 ng/mL ôl-driniaeth gyda trypsin am 1 awr.

Wedi ei ddadansoddi gan LC-MS/MS (cyflwr gwefr $[M+2H]^{2+}$). N=3, cymedr cyfartalog wedi ei blotio gyda SEM. Mae llinellau tuedd yn cynrychioli ffitiadau atchweliad llinol, ac adroddir gwerthoedd R^2 i nodi daioni yr ffit. Mae bariau gwall yn dangos y gwyrriad safonol.

Er mwyn cynhyrchu cromlin raddnodi lle defnyddir ghrelin llygoden fawr fel ISTD, paratowyd cromlin calibradu gyda chrynodiadau dadasyl ghrelin dynol yn amrywio o 0.2-40 ng/mL a gyda asyl ghrelin llygoden fawr wedi ei osod ar 16 ng/mL (Ffigur 4.39A). Dangosir yr R^2 o yr cromlin yn 0.99, sydd yn awgrymu dull atgynrychioldeb a dibynadwy. Paratowyd cromlin raddnodi tebyg ar gyfer asyl ghrelin dynol yn amrywio o 0.2-40 ng/mL tra bod dadasyl ghrelin llygoden fawr yn sefydlog ar 16 ng/mL (Ffigur 4.39B) a chafwyd R^2 o 0.97.



Ffigur 4.39 Cromlin graddnodi AG ac UAG dynol, gan ddefnyddio llygoden fawr AG ac UAG fel safonau mewnol, yn dilyn treuliad gyda trypsin.

A. hUAG ghrelin yn amrywio crynodiad o 0.2-40 ng/mL a rUAG sefydlog ar 16 ng/mL. B. hAG ghrelin yn amrywio crynodiad o 0.2-40 ng/mL a rAG sefydlog ar 16 ng/mL. Wedi ei ddadansoddi gan LC-MS/MS (cyflwr gwefr $[M+2H]^{2+}$). $N=3$, cymedr cyfartalog wedi ei blotio gyda SEM. Mae llinellau tuedd yn cynrychioli ffitiadau atchweliad llinol, ac adroddir gwerthoedd R^2 i nodi daioni yr ffit. Mae bariau gwall yn dangos y gwyriad safonol.

O hyn, gallwn ddod i yr casgliad bod y dull yn gweithio yn dda ac ei fod wedi ei optimeiddio o fewn yr ystod o 0.4-40ng/mL ar gyfer rhywogaethau asyl ghrelin a 0.2-40 ng/mL ar gyfer dadasyl ghrelin. Fodd bynnag, nid yw yr dull yn gallu cyrraedd y lefelau canfod is sydd eu hangen i arsylwi ghrelin mewndarddol yn llwyddiannus, y disgwyliar iddo fod yn yr ystod o 0.3-1.2 ng/mL. Fel ganlyniad, roedd y dull terfynol wedi ei optimeiddio ar gyfer canfod ghrelin yn cynnwys y dull o yr gwaelod i lawr ar ôl treulio yr ghrelin â trypsin, gan ganfod y rhywogaeth $[M+2H]^{2+}$ gan LC-MS/MS.

4.4 Trafodaeth

Nod y bennod hon oedd datblygu ac optimeiddio protocol LC-MS/MS ar gyfer canfod ghrelin alldarddol ac mewndarddol o fewn yr ystod ffisiolegol a ddisgwylir mewn plasma dynol. Er bod y gwaith hwn yn fethodolegol i raddau helaeth, rhoddodd fewnwelediadau pwysig i alluoedd a chyfyngiadau LC-MS/MS ar gyfer meintïoli ghrelin, yn enwedig wrth baratoi ar gyfer dulliau mwy targedi, fel BAMS, a archwilir mewn penodau dilynol.

Yn ystod y datblygiad a yr optimeiddio, canolbwyntiodd un adran ar bennu yr gwanedydd gorau posibl ar gyfer y rhywogaeth ghrelin ac asesu sut y gallai toddyddion amrywiol effeithio ar ghrelin. Ar ôl prynu ghrelin, mae gweithgynhyrchwyr yn argymhell gwanhau ghrelin mewn dŵr ar gyfer storio a gwaith yn y dyfodol. Er gwaethaf hyn, mae astudiaethau blaenorol wedi nodi bod y peptid ghrelin yn aros yn fwy sefydlog o fewn amodau asidig (Staes et al., 2010). O ganlyniad, profwyd peptidau ghrelin wedi eu gwanhau mewn dŵr gradd HPLC neu 5, 20, a 60% asetonitril. Yn gyffredinol, dangosodd fy nghanlyniadau mae asetonitril 20% oedd yr un mwyaf effeithiol ar gyfer sefydlogrwydd ghrelin, ar wahân i dadasyl ghrelin lygodyn fawr a oedd yn ffafrio dŵr. Adroddwyd canlyniadau tebyg gan Staes et al. (2010), lle profwyd profion sefydlogrwydd ghrelin o dan amodau asidig i sylfaenol. Dywedasant fod dadasyl ghrelin yn parhau yn sefydlog o dan bob cyflwr, tra bod asyl ghrelin ar ei fwyaf sefydlog o dan amodau asidig (~pH4) a daeth yn ansefydlog ar pH7. I gefnogi hyn, nododd Hosoda et al. (2004) hefyd sefydlogrwydd asyl ghrelin uwch ar pH is (~ pH 3-4). Felly, roedd fy nghanlyniadau yn gyson â yr hyn a nodwyd yn y llenyddiaeth.

Un o yr ffactorau allweddol yn ystod y broses o LC-MS/MS yw yr dull cromatograffig. O fewn y traethawd ymchwil hwn, defnyddiwyd HPLC i wahanu yr rhywogaeth ghrelin. Ar gyfer gwahanu HPLC llwyddiannus, mae dewis y cyfnod symudol a llonydd mwyaf priodol yn allweddol. Yn achos ghrelin, mae ei addasiad octanoyl yn rhoi iddo priodweddau hydroffobig. O ganlyniad, mae colofnau cam wrthdroi wedi eu hadrodd yn flaenorol fel y rhai gorau ar gyfer gwahanu ghrelin. Yn 2010, adroddodd Staes et al. am ddull RP-HPLC/UV wedi ei optimeiddio gan ddefnyddio colofn ODS TSK-gel gyda chyfnod symudol A yn cynnwys dŵr a 0.1% TFA a chyfnod symudol B yn cynnwys asetonitril gyda 0.1% TFA. Yn yr achos hwn, cyflawnwyd gwahanu ghrelin; fodd bynnag, penderfynwyd bod y terfyn canfod isaf yn 6236.35 ng/mL. Gan symud y tu hwnt i hyn, ystyriwyd colofnau monolithig fel y C18 (Rauh et al., 2007) oherwydd

cymhwyso cyfnodau symudol asidig i amddiffyn yr addasiad asyl. Trwy gydol y traethawd ymchwil hwn, defnyddiwyd y golofn C18 oherwydd ei cymhwysiad o cyfnodau symudol asidig i amddiffyn yr addasiad asyl, gyda dull wedi ei optimeiddio o amser rhediad o 30 munud gydag amseroedd cadw o 8.70 ar gyfer dadasyl ghrelin a 12.70 ar gyfer asyl ghrelin. Yn yr un modd, adroddodd Date et al. (2000), amser rhedeg o 40 munud gyda dadasyl ac asyl ghrelin yn cael amserau cadw o 11.4 a 21 munud, yn y drefn honno. Mae llwyddiant cyfnod rhedeg byrrach wedi ei adrodd yn flaenorol ar gyfer dadansoddiad ghrelin. Yn fwy diweddar, adroddodd Thomas et al (2021), amser rhedeg o 14 munud ond yma defnyddiwyd cromatograffaeth hylif uwchberfformiad (UHPLC), a nodwyd bod terfyn canfod is yn 30 pg/mL. Byddai lleihau yr amser rhedeg yn fuddiol ar gyfer cynyddu trwybwn sampl. Ceisiais leihau yr amser rhedeg i 14 munud ond yn yr achos hwn, ni chafodd y ghrelin ei ganfod na ei wahanu yn llwyddiannus ar y golofn ac felly, cadwyd yr amser rhedeg o 30 munud. Bydd defnyddio system UHPLC tebyg i yr dull a ddisgrifiwyd gan Thomas et al. (2021) o bosibl yn gyflawni amseroedd rhedeg byrrach a sensitifrwydd parhaus gyda chyfyngiad canfod is. Gall UHPLC gynhyrchu canlyniadau hyd at ddeg gwaith yn gyflymach na HPLC gan ei fod yn gweithio ar bwysau uwch a meintiau gronynnau llai. Ystyriaeth allweddol arall ar gyfer HPLC yw pH y cyfnod symudol gan fod hyn yn effeithio ar sut mae dadansoddydd yn cael ei gadw ar y golofn. Roedd y dull gwreiddiol a ddisgrifir yn y bennod hon yn cynnwys cam symudol A gyda dŵr gradd HPLC, 2% asetonitril, a 0.1% asid asetik tra bod cam symudol B yn cynnwys asetonitril gyda 0.2% asid asetik. Mewn cymhariaeth, defnyddiodd Sidibe et al. 2014, golofn C18 hefyd, gyda 0.2% asid fformig, 0.01% TFA mewn dŵr ar gyfer cam symudol A, a 0.2% FA, 0.01% TFA mewn asetonitril ar gyfer cyfnod symudol B. Yn yr un modd, roedd dull Zemenova et al. (2016), yn cynnwys 0.1% asid fformig mewn dŵr fel cam symudol A gyda 0.1% FA mewn asetonitril ar gyfer cyfnod symudol B. Er gwaethaf yr adroddiadau hyn yn defnyddio asid fformig yn lle asid asetik, mae yr ddau yn gweithio yn yr un modd o leihau pH cyffredinol y cyfnod symudol. Yn ogystal, ni ddangosodd fy nghanlyniadau unrhyw newid sylweddol yn y signal ghrelin rhwng 0.1% AA a 0.1% asid fformig. Ar gyfer asid asetik 0.1% canfuwyd cyflyrau lluosog â gwefr rhwng $[M+4H]^{4+}$ i $[M+8H]^{8+}$, a gwelwyd y arddwysedd signal uchaf ar gyfer yr ïon $[M+6H]^{6+}$. Ar gyfer asid fformig 0.1%, sylwyd ar cyflyrau gwefru rhwng $[M+3H]^{3+}$ i $[M+6H]^{6+}$, a chanfuwyd bod gan $[M+4H]^{4+}$ a $[M+5H]^{5+}$ arddwysedd signal uchaf. Mewn cymhariaeth, gwelodd Sidibe et al. (2014), yr ïon $[M+7H]^{7+}$ fel yr ïon mwyaf dwys, tra

bod Zemenova et al. (2016), yn monitro yr ïon $[M+6H]^{6+}$. Yn gyffredinol, mae fy null a dulliau a nodwyd yn flaenorol yn disgrifio gwasgariad o gyflyrau gwefr ar gyfer y rhywogaeth ghrelin, gyda yr ïon moleciwlaidd mwyaf dwys yn cael ei ddewis i yw ddadansoddi wedyn. Gan fod gwasgariad cyflyrau gwefr hefyd yn arwain at wasgaru arddwysedd y signal ac felly yn debygol o fod yn is yn gyffredinol, gwnaeth gwaith i leihau yr gwasgariad hwn o gyflyrau gwefr a 'gwithio' y ghrelin i nifer llai o gyflyrau gwefr a oedd yn fwy dwys. O ganlyniad, profwyd ychwanegu byfferau amoniwm at y cyfnodau symudol. Yn flaenorol, adroddodd Rauh et al. 2007, ei fod yn defnyddio byffer amoniwm asetat (10 mmol/L): methanol (97:3) yn cynnwys asid asetig 1mL (17M) fel cam symudol A tra bod cam symudol B yn cynnwys amoniwm asetat (2 mmol/ L): methanol (5:95) gyda 0.1 mmol/L asid fformig. Er y gwelwyd llwyddiant o fewn cadw, gwahanu a chanfod ghrelin, pennwyd terfyn isaf y canfod ar 20 ng/L. Ar gyfer fy ymchwiliadau, profwyd amoniwm asetat ac amoniwm fformat a arweiniodd at ostyngiad bach yn nifer y gwasgariad cyflwr gwefredig o gymharu â heb yr halwynau amoniwm. Er gwaethaf hyn, ni welwyd unrhyw gynnydd sylweddol yn nwysedd cyffredinol y signal. Yn 2021, canfodydd Thomas et al. ghrelin i lawr i 50-100 pg/mL, ac yma, defnyddiwyd 1% DMSO o fewn y cyfnod symudol, ac adroddwyd mae yr ïon moleciwlaidd $[M+5H]^{5+}$ oedd y signal mwyaf dwys. Fel y cyfryw, ymchwiliais i ychwanegu 1% DMSO o fewn y cyfnod symudol. Gan ddefnyddio yr dull hwn, gwelais ostyngiad yn nifer yr ïonau cyflwr gwefr a hefyd fod gan $[M+5H]^{5+}$ y signal mwyaf dwys. Yn nodedig, cynyddwyd arddwysedd cyffredinol y signal yn sylweddol ($P<0.001$) ar ôl ychwanegu DMSO. Yn yr un modd, adroddwyd Hahne et al. (2013), fod ychwanegu DMSO wedi arwain at ïoneiddiad electrochwistrellu peptidau yn well, gan arwain at welliant mewn canfod ghrelin hyd at ddeg gwaith. Er bod presenoldeb DMSO wedi cynyddu arddwysedd signal ghrelin yn sylweddol, gwelwyd terfyn canfod is o 0.4 ng/mL ar gyfer pob rhywogaeth ghrelin, sydd yn annigonol i ganfod ghrelin mewndarddol. Mae fy nadansoddiad ar gyfer y ghrelin cyflawn a yr ghrelin sydd yn cael eu treulio gyda trypsin yn awgrymu diraddiad ac ansefydlogrwydd dadasyl ac asyl ghrelin. Yn flaenorol, dangoswyd bod ghrelin yn aros yn sefydlog ar 4°C, ac adroddwyd ansefydlogrwydd ghrelin o unrhyw beth uwchben tymheredd hwn (Hosoda et al., 2004). Gall defnyddio 37°C yn ystod y driniaeth treuliad tryptig fod yn gyfrifol am y diraddiad a welwyd. Mae astudiaethau blaenorol hefyd wedi adrodd am ddiraddiad peptid yn dilyn treuliad trypsin. Yn fwy penodol, adroddodd Shufrod a Grant (2023) fod treuliad trypsin am fwy na 4 awr wedi achosi diraddio peptid. Datblygodd Toth,

Kuklenyik, a Barr (2018), ddull treulio trypsin ar-lein gyda yr nod o leihau diraddiad peptid. Ni ddangosodd fy nghanlyniadau unrhyw ostyngiad sylweddol mewn arddwysedd ghrelin wrth gymharu yr driniaeth trypsin 1 awr a thros nos.

Mae yn bosibl nad oedd ein system LC bresennol yn ddigon sensitif i ganfod lefelau isel o ghrelin ac felly, gall gwaith yn y dyfodol yn ddefnyddio UHPLC ganiatáu canfod llwyddiannus is-lawr. Yn ogystal, gallai archwilio llwybrau fel treuliad trypsin ar-lein ac SPE, ynghyd â defnyddio colofn newydd fel y golofn cromatograffaeth hylif rhyngweithio hydroffilig (HILIC) helpu â ganfod LC-MS/MS yn well. Mae yr golofn HILIC yn cynnwys cyfnod llonydd pegynol gyda rhaniad y dadansoddiadau rhwng haen hydroffilig y cyfnod llonydd a yr cyfnod symudol llai pegynol. Fel y cyfryw, gall yr HILIC fod yn ddewis da o golofn ar gyfer dadansoddiadau mwy pegynol megis y grŵp asyl ghrelin. Yn ogystal, dangoswyd yn flaenorol bod HILIC-MS yn haws i gael gwared ar asetonitril o ei gymharu â chyfnod gwrthdro-HPLC-MS (a ddefnyddir trwy gydol y bennod hon) (Periat et al., 2014). Felly, gall defnyddio UHPLC a ddefnyddio yr golofn HILIC fod yn ddull newydd o ddadansoddi ghrelin trwy LC-MS/MS.

Daeth ystyriaeth ddamcaniaethol bwysig i yr amlwg o ddefnyddio 0.1% o plasma fel gwanedydd yn ystod paratoi yr sampl. Dewiswyd y dull hwn i symbylu matrices mwy ffisiolegol ac i ymgorffori safonau mewnol, gan gyflwyno cefndir cyson ar gyfer asesiadau adferiad mwy realistig. Er na chynhaliwyd unrhyw arbrofion pwrpasol i asesu effeithiau cydrannau plasma, rhagdybir y gallai albwmen o fewn y plasma gyfrannu at adferiad llai o asyl ghrelin oherwydd ei affinedd rhwymo cryf. Mae yr asid brasterog octanoyl (C8) ar asyl ghrelin yn rhoi adran hydroffobig, gan hyrwyddo rhwymo i albwmen serwm - yn arbennig o broblematig mewn matricesau â phroteinau mewndarddol. Gall y rhwymo hwn gyfrannu at gymhareb AG:UAG anghywir a gallai ddod yn fwy amlwg gydag asidau brasterog cadwyn hirach (C10–C16), sydd â phriodweddau rhwymo albwmen hyd yn oed yn gryfach (Heppner et al., 2012). Gan nad oes gan LC-MS gam imiwno-affinedd i ddatgysylltu yr cymhlethau hyn, rhaid i baratoi samplau ddefnyddio naill ai toddyddion organig neu amodau pH isel, sydd yr ddau yn cario yr risg o hyrwyddo diraddio ghrelin.

Mae yr heriau hyn yn tanlinellu sut mae yr gosodiad LC yn dylanwadu ar y darlenniad MS ac yn y pen draw yn effeithio ar berfformiad meintiol. Er gwaethaf gwelliannau a welwyd mewn arddwysedd signal a rheolaeth cyflwr gwefr, roedd y dull LC-MS/MS yn

parhau i fod yn annigonol o sensitif ar gyfer canfod ghrelin mewndarddol o fewn yr ystod ffisiolegol. Arhosodd sensitifrwydd uwchlaw 200 pg/mL, ac roedd ymyrraeth matrices yn dal i fod yn ganfyddadwy, hyd yn oed pan gafodd samplau eu gwanhau mewn plasma 0.1%. Darparodd y cyfyngiadau methodolegol hyn y rhesymeg dros ddilyn BAMS, a drafodir yn y bennod ganlynol. Mae BAMS yn cynnig strategaeth gyfoethogi i fyny yr afon addawol, gan alluogi imiwno-gipio ghrelin (neu GOAT) cyn dadansoddiad MS, a thrwy hynny oresgyn llawer o yr heriau technegol a biolegol a wynebir yma.

Gellid gwneud rhagor o waith ar adnabod ghrelin sydd wedi ei rwymo gan wahanol asidau brasterog. Roedd gwaith yn y bennod hon yn canolbwyntio ar adnabod asyl C8 ghrelin dynol ar m/z o 3371 (y math mwyaf cyffredin o ghrelin). Fodd bynnag, gall ghrelin glymu i ystod o asidau brasterog yn amrywio o C2 i C16 (Heppner et al., 2012). Er bod presenoldeb amrywiadau cadwyn fer fel C2-asil ghrelin '*in vivo*' yn parhau i fod yn ddamcaniaethol ac nad yw wedi ei gadarnhau mewn plasma, mae ffurfiau o yr fath yn bosibl yn ddamcaniaethol. Fodd bynnag, mae eu perthnasedd biolegol yn amheus oherwydd hydroffobigedd cyfyngedig ac affinedd rhwymo gwael tebygol i yr derbynnydd GHS-R1a. Nid yw effaith gwahanol rywogaethau ghrelin ar yr ymennydd yn hysbys ar hyn o bryd ac nid oes unrhyw ddull addas i yw canfod na eu mesur. Mae LC-MS/MS yn addawol iawn ar gyfer y nod hwn. Byddai newid yn y grŵp asid brasterog sydd ynghlwm wrth y serin yn arwain at newid m/z, er enghraifft, byddai asyl ghrelin dynol C6 yn arwain at m/z o 3343. Gellid cynnwys trawsnewidiadau MRM priodol sydd yn cyfrif am y gwahanol m/z hyn yn y dull. Hyd yn hyn, nid oes unrhyw safonau ar gyfer y mathau amgen hyn o ghrelin ar gael yn fasnachol. Felly, dull arall o gadarnhau adnabyddiaeth brig cywir fyddai rhedeg detholiadau sampl a gasglwyd o gelloedd, er enghraifft celloedd RAW (sydd â genynnau ar gyfer ghrelin a GOAT) sydd wedi eu magu ag ystod o wahanol asidau brasterog ac felly wedi eu 'hannog' i gynhyrchu gwahanol rywogaethau o ghrelin. Gall dulliau ychwanegol, megis cydfynegiant synthetas asyl-CoA, atal β -ocsidiad, neu gyflenwi asidau brasterog trwy systemau sydd yn rhwym i albwmen neu liposom, wella ymgorffori cadwyni asyl penodol ymhellach. Gyda darnio MS gan ddefnyddio ESI-MS/MS, gallwn adnabod yr asidau brasterog hyn. Gan ddefnyddio yr paratoad sampl plasma o Bennod 3, mae posibilrwydd i ganfod asidau brasterog gwahanol sydd ynghlwm wrth ghrelin. Gan fod dal digon o ghrelin o blasma wedi bod yn her ym Mhennod 3, cyflwynwyd a phrofwyd

techneg newydd o yr enw BAMS yn y bennod ddilynol. Yn gysylltiedig i ddechrau â chanfod trwy MALDI-TOF, gallai yr cysyniad hwn gael ei addasu ar gyfer gwaith yn y dyfodol, gan alluogi mesur trwy LC-MS/MS yn ogystal â MALDI-TOF.

I grynhoi yr gwahanol baramedrau optimeiddio dull LC-MS/MS a dreialwyd drwy gydol y bennod hon, mae Tabl 4.1 yn cyflwyno crynodeb o yr amodau arbrofol a brofwyd ac eu heffaith ar arddwysedd signal ghrelin, dosbarthiad cyflwr gwefr, a therfyn canfod. Mae yr tabl hwn yn tynnu sylw at y gwelliannau cynyddrannol a yr cyfyngiadau parhaus a wynebwyd wrth ddatblygu protocol canfod cadarn ar gyfer rhywogaethau ghrelin.

Paramedr Optimeiddio	Canlyniad	Effaith ar Ganfod	Nodiadau
Toddydd (Dŵr yn erbyn asetonitril)	Gwelliant o AG sefydlogrwydd gyda 20% asetonitril	Adferiad peptid gwell	UAG yn sefydlog mewn dŵr
Asid (FA yn erbyn AA)	Amrywiad bach	Proffiliau arddwysedd tebyg	Amrywiodd cyflyrau gwefr ychydig
Halenau Amoniwm	Gwasgariad gwefr llai	Dim cynnydd arddwysedd	Effaith gyfyngedig
Ychwanegu DMSO	Arddwysedd signal wedi ei gwella yn sylweddol	Y perfformiad gorau gyda $[M+5H]^{5+}$	Canfod i lawr i 0.4 ng/mL
Treuliad Tryptig	Dim budd i AG, budd i UAG	UAG wedi ei ganfod hyd at 0.2 ng/mL	Dirywiad AG yn debygol
Gwanhau plasma 0.1%	Cefndir ffisiolegol	Rwymo albwmen o AG	Colled AG bosibl

Tabl 4.5 Crynodeb o Strategaethau a Chanlyniadau Optimeiddio LC-MS

4.5 Casgliad

I gloi, er bod gan LC-MS/MS botensial sylweddol ar gyfer dadansoddi isoform ghrelin, roedd y dull a ddatblygwyd yma wedi ei gyfyngu gan ddiraddio samplau, effeithiau rhwymo, ymyrraeth matrices, a throthwyon sensitifrwydd. Mae yr canfyddiadau hyn yn cyfiawnhau yr newid tuag at dechnegau wedi eu cyfoethogi ag imiwnedd fel BAMS, a fydd yn cael eu trafod yn y bennod ganlynol.

Pennod

5. Datblygu Prawf BAMS i Ddadansoddi Ghrelin

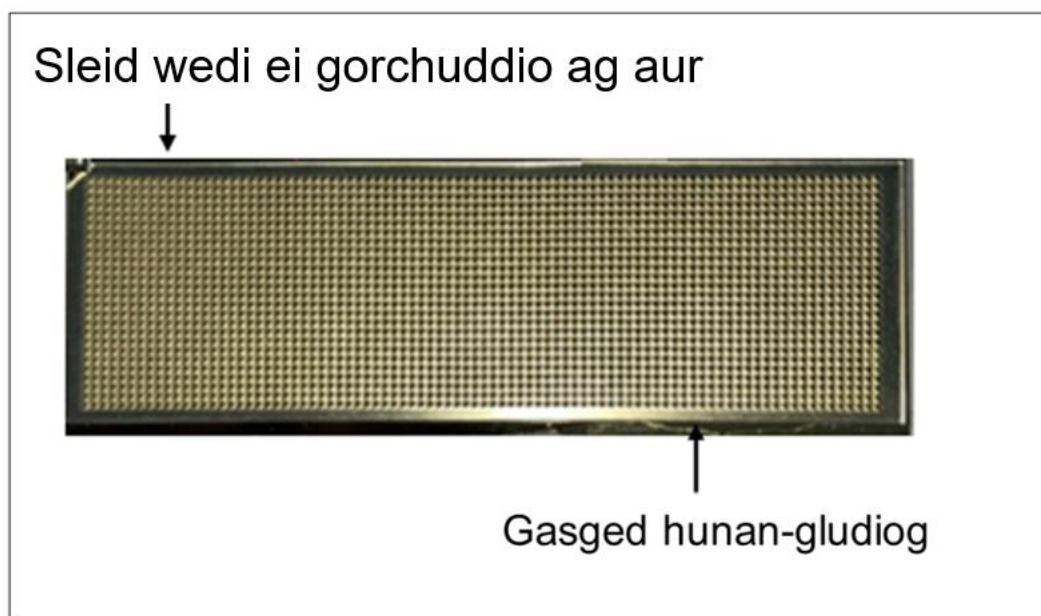
5.1 Cyflwyniad

Dros yr ychydig ddegawdau diwethaf, mae sbectrometreg màs wedi datblygu i fod yn offeryn pwerus ym myd proteomeg, oherwydd y datblygiadau parhaus mewn offeryniaeth, methodolegau darnio, a strategaethau dadansoddol (Han et al., 2008). Mae Penodau 3 a 4 wedi archwilio yr defnydd o MALDI-TOF ac LC-MS i ganfod a (lled-) feintoli rhywogaethau ghrelin. Fodd bynnag, mae yr penodau hyn hefyd wedi datgelu rhai anawsterau gyda yr defnydd unigryw o sbectrometreg màs i ganfod ghrelin mewndarddol mewn samplau biolegol. Mae yr anhawster yn deillio o yr ffaith bod ghrelin yn beptid bach (~3000 kDa), sydd yn gallu rhwymo i broteinau mwy fel albwmen (Thomas et al., 2021). Ymhellach, mae ychwanegu yr gydran asid brasterog i ghrelin yn newid ei briodweddau cemegol, felly mae dadasyl ac asyl ghrelin yn ymddwyn yn wahanol yn ystod y broses echdynnu SPE.

O ystyried y cymhlethdodau hyn, mae yr bennod hon yn archwilio yr defnydd o IP-MS i ganfod a meintoli ghrelin. Mae IP-MS yn cynnig nifer o fanteision o gymharu ag MS confensiynol. Mae yn cynnwys cyfoethogi proteinau targed trwy ddefnyddio gwrthgyrff penodol, a thrwy hynny wella sensitifrwydd ac effeithlonrwydd canfod. Mae yr dechneg hon yn arbennig o fuddiol i rywogaethau â digonedd isel, fel ghrelin, o fewn samplau biolegol cymhleth. Trwy dewis y protein o ddiddordeb yn ddetholus, mae sŵn cefndir yn cael ei leihau, gan arwain at well cywirdeb, atgynrychioldeb a chysondeb (Have et al., 2011). Er gwaethaf manteision IP-MS, mae cafeatau yn cynnwys materion penodolrwydd, ansawdd gwrthgyrff, colled posibl mewn rhyngweithiadau affinedd isel, a mwy o sŵn cefndir oherwydd rhwymiad gwrthgyrff amhriodol neu halogiad sampl (Have et al., 2011). At hynny, efallai y bydd IP-MS yn wynebu cyfyngiadau gyda dim ond ychydig o wrthgyrff ar gael ar gyfer targed penodol a dadnatureiddio protein gyda y grŵp asyl yn disgyn islaw yr terfynau canfod ac efallai y bydd angen offer arbenigol a drud fel gleiniau magnetig. I grynhoi, er bod IP-MS yn addo bod yn arf gwerthfawr mewn proteomeg, mae ei heriau yn cyd-fynd â ei gymhwysiad effeithiol.

Yn flaenorol, defnyddiwyd Guterrez et al. (2005) IP-MS i ganfod ghrelin, a oedd yn cynnwys gleiniau magnetig ond a oedd hefyd yn golygu paratoi sampl llafurddwys. Roedd y protocol yn ymwneud â samplau gwaed ag isotop sefydlog ISTD (wedi ei labelu â ^{13}C a ^{15}N) o dadasyl neu asyl ghrelin, ac yna dyddodiad protein am ddwy awr ac allgyrchu am awr. Yna cafodd y gwaddod peptid ei sychu o dan nwy nitrogen ac ei hydoddi mewn 1mL o glustogfa tris-Hepes. Yn dilyn hyn, ychwanegwyd gleiniau

magnetig gyda 1µg o wrthgorff gwrth-ghrelin at yr ataliad ac eu deor am ddwy awr ar 4°C gyda chylchdroi ysgafn. Roedd y gleiniau sydd bellach wedi eu cyfuno â ghrelin, yn cael eu golchi ar dymheredd yr ystafell, ddwywaith mewn bicarbonad amoniwm 50mM, unwaith mewn 0.1% SDS mewn bicarbonad amoniwm, ac yna golchiad arall mewn bicarbonad amoniwm 50mM, ac yn olaf unwaith mewn dŵr distyll. Cafodd y ghrelin rhwymedig ei echludo o yr gleiniau gwrthgyrff trwy asideiddio gyda 0.1% TFA ac ei grynhoi gan ddefnyddio awgrymiadau siptip C18. Cafodd peptidau ghrelin eu echludo o flaenau siptip C18 ac eu ychwanegu uniongyrchol ar y targed i yw dadansoddi gan ddefnyddio MALDI-TOF MS. Yma, mae yr cysyniad o BAMS yn cael ei archwilio i darganfod dadasyl ac asyl ghrelin a ei wneud mewn cydweithrediad ag Adeptrix (UDA). Mae BAMS yn ymwneud â deori gleiniau magnetig wedi eu cyfuno â gwrthgyrff (a grëwyd gan Adeptrix) mewn sampl biolegol fel plasma, i ddal y dadansoddiadau targed o ddiddordeb, sydd ar gyfer y gwaith hwn yn dadasyl ac asyl ghrelin. Ar ôl deori, mae yr gleiniau yn cael eu golchi i gael gwared ar unrhyw foleciwlau sydd wedi rhwymo yn amhenodol ac eu hychwanegu at sleid arae ffynnon micro BAMS sydd yn gynnwys gasgedi elastomer â grid sgwâr o dyllau trwodd 88x26 (ffynnon micro) ynghlwm wrth sleid microsgop aur (Ffigur 5.1).



Ffigur 5.1 Sleid arae ffynnon micro BAMS sydd yn cynnwys sleid microsgop wedi ei gorchuddio ag aur ynghlwm wrth gasgedi silicon.

Mae yr gleiniau arae yn dod i gysylltiad â matrices sydd yn cynnwys aerosol ar gyfer MALDI-TOF MS. Mae yr dadansoddyddion sydd yn cael eu dal yn cael eu hechludo o

leiniau i ffynhonnau micro unigol. Mae yr gasgedi ochr yn ochr â yr gleiniau yn cael ei gwaredu, gan arwain at amrywiaeth o smotiau sydd yn cynnwys dadansoddydd crynodedig a phuro wedi eu hymgorffori yn y matrices. Mae smotiau unigol yn yr arae yn cael eu mesur gan MALDI-MS. Mae BAMS yn cefnogi profion un-plecs ac amblecs wedi eu hintegreiddio â dadansoddiad MALDI-TOF. Cyflawnir y prawf amblecs trwy gyfuno gwahanol leiniau prawf BAMS, pob un yn cynnwys gwrthgyrff gwahanol. Yn ogystal, gellir cyflawni amblecsio ar-gleiniau gan ddefnyddio gwrthgyrff sydd yn cydnabod dilyniant protein cyffredin ar gyfer targed sydd yn caniatáu canfod amrywiadau protein ar sail MALDI-TOF. Mae potensial i BAMS gwella ar fformatau asesu amgen, megis ELISA, oherwydd ei allu i fesur ar yr un pryd amrywiaeth helaeth o broteinau o fewn un prawf. O ei gymharu â phroffion eraill fel 'Luminex', sydd hefyd yn gallu dadansoddi dadansoddiadau lluosog, mae gan BAMS fantais ychwanegol oherwydd ei allu i ganfod y dadansoddydd trwy gyfrwng MS yn lle defnyddio gwrthgyrff canfod. Gan fod BAMS yn defnyddio MS i ganfod dadansoddydd yn hytrach na gwrthgyrff canfod eilaidd, Mae yn osgoi yr broblem o draws-adweithedd gwrthgyrff fel y gwelir mewn profion megis y Luminex, ELISA, a WB. Wrth ganfod MS, mae yr dadansoddydd yn cael eu gwahanu ar sail mäs ac felly yn caniatáu adnabod gwahanol rywogaethau dadansoddol, er enghraifft, ghrelin wedi ei rwymo gan rywogaethau asid brasterog gwahanol. At hynny, o gymharu ag LC-MS, nid oes angen y gwahaniad cromatograffig mwy llafurddwys a llafurus ar BAMS, gan gynyddu yr potensial o fewnbwn sampl uchel. O gymharu â MALDI-TOF yn unig, mae gan BAMS well penodolrwydd a sensitifrwydd (trwy leihau 'sŵn' cefndir) a yr potensial ar gyfer meintioli dadansoddwyr yn uniongyrchol. Felly, yn y bennod hon, archwiliais y defnydd o BAMS fel dull o ganfod a mesur rhywogaethau ghrelin mewn samplau plasma.

5.1.1 Nodau

Prif amcanion yr ymchwil yw:

- Datblygu dull BAMS arloesol sydd yn gallu canfod rhywogaethau dadasyl ac rhywogaethau asyl ghrelin.
- Cymharu yr dadansoddiad o dadasyl ac asyl ghrelin dull BAMS yn erbyn yr ELISA.

5.2 Defnyddiau a Dulliau

Rhoddir disgrifiad manwl o yr deunydd a yr dulliau ar gyfer yr asesiad BAMS ym Mhennod 2.7.

Yn gwyno, cynhyrchwyd pecyn arae BAMS gyda gleiniau magnetig wedi eu gorchuddio mewn gwrthgyrff ar gyfer dadasyl ac asyl ghrelin gan ein cydweithwyr yn Adeptrix ac ei anfon i ein labordy i ddilysu. Roedd un pecyn gwrthgorff yn cynnwys plât 96-ffynnon, gyda phob ffynnon yn cynnwys tri glain magnetig wedi eu gorchuddio â gwrthgyrff sydd yn rhwymo i ddilyniant sydd yn gyffredin i bob peptid ghrelin. Defnyddiwyd un ffynnon, yn cynnwys tri glain fesul sampl (250µL o blasma). Profwyd dau wrthgorff sydd ar gael yn fasnachol a godwyd yn erbyn ghrelin (ADX086 ac ADX088) ac eu cynnwys yn y broses datblygu prawf. Gan mai ymdrech ar y cyd oedd hwn, gyda Adeptrix yn darparu yr gwrthgyrff, ni ddatgelwyd manylion adnabod antigen.

5.2.1 Paratoi sampl

Ar gyfer samplau 'digymysg', cafodd 250µL o blasma ei ddadmer ac ei phipedi i mewn i diwb Eppendorf. Ar gyfer samplau plasma wedi ei 'spigo', ychwanegwyd ghrelin allddarddol at y plasma ar grynodiad o 2.5ng fesul 250µL o blasma.

5.2.2 Paratoi yr Gleiniau BAMS a eu Hychwanegiad at Samplau

Er mwyn cronni yr gleiniau wedi eu gorchuddio â gwrthgyrff i waelod y ffynnon, cafodd y pecyn prawf BAMS ghrelin 96-ffynnon ei allgyrchu ar 4°C, 500 xg am 3 munud. Ar ôl eu hallgyrchu, trosglwyddwyd y tri glain wedi eu gorchuddio â gwrthgyrff gan ddefnyddio yr 'dewis cyflym' (pibed fagnetig) i 500 µL o doddiant golchi 1X PBS ac eu cymysgu ar gymysgydd ysgydwir am 1 munud ar 1100 RPM. Yn dilyn y cam golchi, ychwanegwyd y gleiniau wedi eu gorchuddio â gwrthgyrff at y sampl plasma a baratowyd ac eu deor dros nos ar 4°C, 1100 RPM mewn cymysgydd Thermo Eppendorf.

5.2.3 Golchi Gleiniau Rhwymo Ghrelin

Ar ôl deori dros nos (adran 5.2.2), roedd gleiniau wedi eu rhwymo â ghrelin yn cael eu golchi i gael gwared â moleciwlau a oedd wedi rhwymo yn amhenodol. Paratowyd y tiwbiau golchi trwy ychwanegu 750 µL o byffer golchi A i mewn i diwb Eppendorf 1.2 mL newydd. Trosglwyddwyd y gleiniau wedi eu rhwymo â ghrelin i yr Eppendorf newydd hwn ac eu hallgyrchu am 10 munud ar 500 xg yn RT. Nesaf, trosglwyddwyd

y gleiniau i mewn i diwbiau sydd yn cynnwys byffer golchi B ac eu hallgyrchu am 10 munud, ac yna eu trosglwyddo i diwbiau sydd yn cynnwys byffer C ac allgyrchu am 10 munud (500 x g). Trosglwyddwyd y gleiniau i mewn i diwbiau sydd yn cynnwys byffer golchi D ac eu hallgyrchu am 5 munud (500 x g). Trosglwyddwyd y gleiniau wedyn i diwbiau sydd yn cynnwys byffer E cyn eu hallgyrchu am 2 funud. Yn olaf, ailadroddwyd y broses hon gyda thiwbiau sydd yn cynnwys byffer F.

5.2.4 Cydosodiad Arae BAMS

Digwyddodd cydosod yr arae BAMS yn ystod un o yr camau golchi yn 5.2.3. Gosodwyd gasgedi silicon ar sleid aur BAMS, gyda yr gasgedi silicon a yr sleid wedi eu halinio yn gywir. Ar ben y gasgedi silicon, gosodwyd ffrâm aml-siabr yn cynnwys 16 siabr, gan greu yr arae BAMS. Roedd yr arae BAMS yn cael ei chadw yn ei lle trwy glipiau dur di-staen ar frig a gwaelod yr aml-siabr. Gosodwyd yr arae BAMS mewn addasydd sleidiau allgyrchol a dosbarthwyd dŵr wedi ei ddadïoneiddio i bob siabr, i orchuddio yr microffynnonau â dyfnder o 0.5 cm o ddŵr (~150 μ L). Nesaf, cafodd yr arae BAMS ei allgyrchu am dri munud ar 500 xg i hydradu yr ffynnon ficro. Yn y cyfamser, roedd y chwistrellwr matrices wedi ei osod ac yn barod ar gyfer adran 5.2.5. Ar ôl eu hallgyrchu, tynnwyd yr addasydd sleidiau a chlipiau dur di-staen. Trosglwyddwyd y gleiniau wedi eu golchi gan ddefnyddio pibed 'dewis cyflym' i yr siabr arae BAMS ddynodedig. Cafodd ochr yr arae BAMS ei thapio yn ysgafn i wasgaru yr tri glain i ffynhonnau micro unigol y tu mewn i yr siabr samplu. Ar ôl ei drosglwyddo, gosodir magnet o dan yr arae BAMS i gasglu yr gleiniau ar waelod y ffynnon. Roedd yr arae BAMS sydd yn cynnwys gleiniau magnetig yn cael ei gwrthdroi ac ei thapio yn ysgafn i gael gwared ar unrhyw ddŵr dros ben. Aeth yr adran nesaf ymlaen ar unwaith i atal gleiniau BAMS rhag sychu, a fyddai yn arwain at ddadansoddi targed yn aneffeithlon.

5.2.5 Echludo Ghrelin o Gleiniau Adweithydd BAMS

Nesaf, cyflawnwyd dadansoddiad ghrelin o yr glain trwy ei ddeor â hydoddiant matrices asidig, a ddisodlodd y dŵr wedi ei ddadïoneiddio yn y ffynnon ficro yn raddol. Er mwyn darparu yr hydoddiant matrices asidig, defnyddiwyd chwistrellwr matrices sydd yn cynhyrchu defnynnau micro sydd yn cynnwys aerosol o yr matrices MALDI dros yr arae ffynnon ficro. Unwaith y bydd y toddydd yn anweddu, mae yr dadansoddydd ghrelin

yn cael ei ymgorffori ym matrices MALDI ac ei leoli mewn mannau amlwg ar waelod y ffynnon ficro. I gyflawni hyn, defnyddiwyd y protocol canlynol.

Gosodwyd y cynulliad arae BAMS o 5.2.4 yn y chwistrellwr matrices (chwistrellwr HDX) a llwythwyd 5 mL o fatrics CHCA. Cafodd y chwistrellwr ei droi ymlaen ac ei osod i raglen gyda yr amodau canlynol:

Tymheredd: 30°C.

Cyflymder: 1350

Bylchiad olrhain (mm): 1

Patrwm: W

Pwysau (psi): 19

Amser sychu: 0

Uchder ffroenell (mm): 65

Nifer y cylchoedd chwistrellu: 10

Cyfradd llif: 145 μ L/munud.

Ar ôl ychwanegu yr matrices, tynnwyd y sleid o yr chwistrellwr HDX, a gadawyd y matrices gweddilliol i anweddu i sychder cyn parhau. Gan ddefnyddio aer cywasgedig, cafodd y gleiniau eu taflu allan o yr ffynnon ficro i mewn i wastraff cemegol priodol. Tynnwyd y gasged silicon, a sicrhawyd bod yr holl leiniau yn cael eu tynnu yn llwyddiannus yn ystod y cam aer cywasgedig. I raddnodi yr offeryn MALDI-TOF, cymysgwyd 1 μ L o ïodid caesiwm ag 1 μ L o fatrics CHCA ac ei osod ar gornel o yr sleid sydd heb smotiau dadansoddi gleiniau. Gadawyd smotiau i sychu yn llwyr cyn eu gosod yn yr offeryn MALDI-TOF.

5.2.6 Casglu Data BAMS Ghrelin

Ar ôl ei sychu, gosodwyd y sleid mewn addasydd a oedd yn addas ar gyfer yr offeryn MALDI a chafwyd delwedd o yr sleid gan ddefnyddio yr llun 'perffeithrwydd Epson V600'. Ar ôl ei gael, cafodd y sleid ei fewnosod yn yr offeryn MALDI-TOF. Defnyddiwyd yr amodau MS canlynol ar y MALDI-TOF: Modd positif llinol, pŵer laser = 60%, 'diamedr terfyn' = 600 μ m, amlder saethu = 1000, nifer yr ergydion laser = 25,000, gosodwyd samplu i rannol, amrediad màs = 700-7000 m/z.

5.2.7 Dadansoddi Data BAMS MS

Cynhaliwyd yr holl ddadansoddi gan ddefnyddio dadansoddiad fflecs. Cynhaliwyd y 'sbectrwm màs llinell sylfaen tynnu' ('*subtract baseline mass spectrum*') a yr 'sbectra màs llyfn' ar bob sbectra. Defnyddiwyd y paramedrau dull canlynol: algorithm canfod brig = centroid, trothwy signal i sŵn = 1.5, trothwy arddwysedd cymharol = 0. trothwy arddwysedd lleiaf = 0, uchafswm nifer y brigau = 2000, lled frig = 1000 m/z, uchder = 10%, tynnu llinell sylfaen = canolrif, gwastadrwydd = 0.1, lefel ganolrif = 0.5. Cynhyrchwyd rhestr offeren trwy yr swyddogaeth 'perfformio rhestr màs darganfod'. Allforiwyd y m/z o ddiddordeb i Excel i yw dadansoddi ymhellach.

5.2.8 Casglu Samplau Plasma

Dewiswyd pum rhoddwr iach, yn amrywio rhwng 20-40 oed gyda dwy fenyw a thri dyn (Ysgol Feddygol Prifysgol Abertawe (SUSM) Pwyllgor Moeseg Ymchwil (RESC)). Cafodd pob rhoddwr ympryd ('*fast*') dros nos, 12 awr cyn rhoi gwaed. Ychwanegwyd AEBSF at waed wrth ei gasglu er mwyn osgoi diraddio yr grŵp asyl, a chafodd y gwaed ei allgyrchu i gasglu plasma. Roedd plasma yn cael ei storio fel alicwot 500 µL ac ei storio ar -80°C nes ei ddefnyddio. Cafodd yr un rhoddwyr eu gwaedu ar dri achlysur gwahanol, gan arwain at dair set ddata.

5.2.9 ELISA

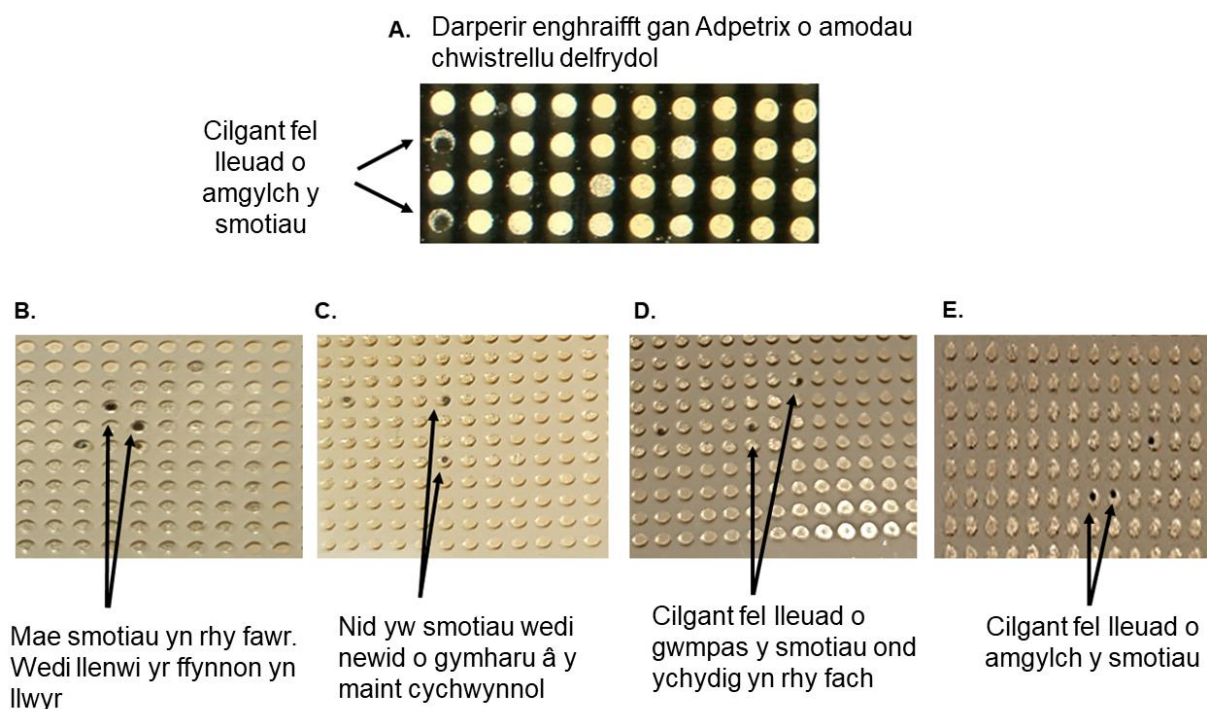
Mesurwyd crynodiadau plasma asyl ac dadasyl ghrelin gan ddefnyddio citiau ELISA cystadleuol masnachol (Bertin Bioreagent, Ffrainc; Rhif Cat. A05106 ar gyfer AG ac A05119 ar gyfer UAG), yn unol â chyfarwyddiadau yr gwneuthurwr. Paratowyd samplau a safonau mewn dyblygiadau, gyda yr holl adweithyddion a samplau wedi eu cydbwysu i dymheredd ystafell cyn yr prawf. Mesurwyd amsugnedd ar 405 nm gan ddefnyddio darllenydd microplat, a chyfrifwyd crynodiadau gan ddefnyddio cromlin safonol logistaidd pedwar paramedr (4-PL). Rhyngosodwyd crynodiadau samplau ac eu mynegi mewn pg/mL. Roedd y cyfernodau amrywiad mewn-prawf ac rhwng-prawf o fewn yr ystod dderbyniol fel yr eu nodir gan y gwneuthurwr.

5.3 Canlyniadau

5.3.1 Optimeiddio Chwistrellwr HDX

Cyn cyflwyno yr weithdrefn BAMS, cafodd y paramedrau chwistrellu HDX eu hoptimeiddio gan ddefnyddio samplau hyfforddi BAMS a ddarparwyd gan Adeptrix. Ar

gyfer optimeiddio yr chwistrellwr, defnyddiwyd gleiniau magnetig heb unrhyw rwymo gwrthgyrff. Roedd optimeiddio yr chwistrellwr yn golygu sicrhau maint y gleiniau ar ôl chwistrellu yr matrices MALDI-TOF oedd y gorau posibl. Darparwyd delwedd o yr maint gleiniau delfrydol gan Adeptrix (Ffigur 5.2A) a sicrhodd cydweithio agos â Dr Tamil Selvan (Adeptrix) er mwyn cyflawni yr nodweddion sbot gorau posibl. Perfformiwyd pedair rownd o optimeiddio cyn dod o hyd i yr gosodiadau mwyaf priodol ar gyfer ein chwistrellwr HDX a greodd y maint gleiniau gorau posibl. Roedd yr amodau optimeiddio cyntaf yn cynnwys 10 cylch chwistrellu, gyda chyfradd llif o 175 $\mu\text{L}/\text{munud}$ a thymheredd o 30°C, wrth gynnal yr amodau a ddisgrifir yn Adran 5.2.5. Roedd yr ymgais gychwynnol yn dangos llifogydd yn y ffynhonnau micro a arweiniodd at faint y gleiniau yn rhy fawr (Ffigur 5.2B). Roedd yr ail optimeiddio yn archwilio newidiadau i lif a chylchoedd gweithredol y chwistrellwr cyflymder. Felly, profwyd dull o 15 cylch chwistrellu, cyfradd llif o 115 $\mu\text{L}/\text{munud}$, a thymheredd o 30°C. Yn yr ail ymgais, arhosodd maint y sbot yn ddigyfnewid o ei gymharu â maint cychwynnol y glain, sydd yn debygol o ganlyniad i gyfradd llif uchel a chylch byrrach sydd ei angen (Ffigur 5.2C). O ganlyniad, oherwydd y gyfradd llif uchel, roedd y trydydd optimeiddio yn cynnwys cyfradd llif is o 110 $\mu\text{L}/\text{munud}$, 10 cylch chwistrellu, a thymheredd uchel o 40°C (Ffigur 5.2D). Er bod y trydydd ymgais yn dangos gwelliant, nodwyd bod y smotiau ychydig yn rhy fach. O ystyried yr arsylwad hwn, roedd y bedwaredd ymgais yn cynnwys cyfradd llif uwch ar 145 $\mu\text{L}/\text{munud}$, 10 cylch chwistrellu, a thymheredd o 30°C. Dangosodd y pedwerydd dull o optimeiddio terfynol ganlyniadau addawol gyda dimensiynau sbot digonol, gan nodi yr amodau chwistrellu gorau posibl (Ffigur 5.2E).



Ffigur 5.2 Optimeiddio amodau chwistrellu HDX.

Enghraifft a ddarparwyd gan Adeptrix o ymddangosiad smotiau yr amodau gorau posibl. B. Amodau chwistrellu: 10 cylch chwistrellu, cyfradd llif o 175 μL /munud a 30°C. C. 15 cylch chwistrellu, cyfradd llif o 115 μL /munud a 30°C. D. 10 cylch chwistrellu, cyfradd llif o 110 μL /munud, a 40°C. E. 10 cylch chwistrellu, cyfradd llif o 145 μL /munud a 30°C.

Ar ôl optimeiddio amodau yr chwistrellwr yn llwyddiannus ar gyfer y chwistrellwr HDX, profwyd y protocol llawn gan ddefnyddio y pecyn protein cyfeirio. Roedd y sampl hyfforddi yn cynnwys gleiniau magnetig gyda gwrthgyrff ar gyfer pedwar peptid synthetig gwahanol mewn BSA wedi ei dreulio, sef:

1. ATK1 (asid amino 2330249).

m/z o 2457, dilyniant asid amino: gTTAIQTVADGLKKQEEEEEmDF.

2. RPS6 (asid 233-249).

m/z o 2070, dilyniant asid amino: gRLssLRASTSKSESSQK.

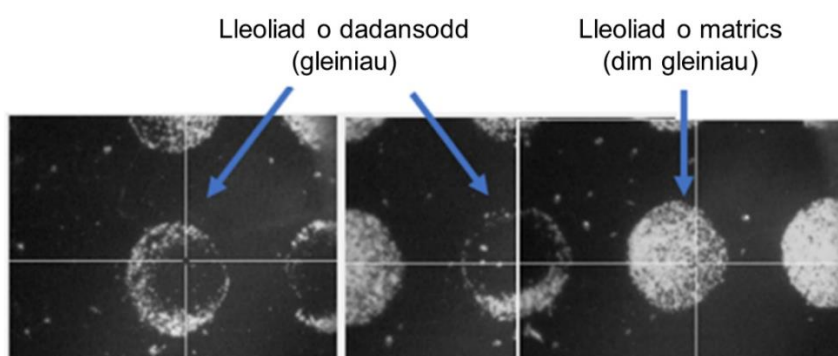
3. ATK1 (asid amino 466-480).

m/z o 1790, dilyniant asid amino: gRPHFPQFsYSASGTA

4. ATK1/2 (asid amino 468-480).

m/z pf 1678, dilyniant asid amino: gTHFPQFsYSASIR.

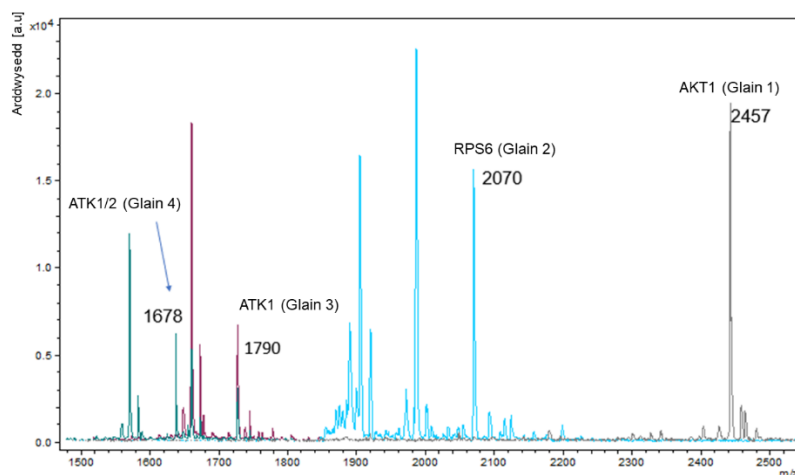
Ychwanegwyd 15 o leiniau gwrthgyrff magnetig (pob glain â gwrthgorff gwahanol ar gyfer y peptidau synthetig) at y cyfeirnod protein ac eu deor dros nos. Dilynwyd protocol BAMS ar gyfer dadansoddiad gosod MALDI-TOF fel y disgrifir yn adran 5.2. Mae delweddu yr arae BAMS gan ddefnyddio yr MALDI-TOF yn rhoi syniad clir o leoliad y dadansoddydd, yn erbyn y smotiau sydd yn cynnwys y matrices yn unig (Ffigur 5.3).



Ffigur 5.3 Delweddu yr arae BAMS yn ystod dadansoddiad MALDI-TOF.

Gellir gweld manau lle mae yr dadansoddiadau o ddiddordeb (y gleiniau) a manau nad oeddent yn cynnwys unrhyw gleiniau.

Ar ôl dadansoddiad MALDI-TOF, llwyddwyd i ddal y gleiniau protein cyfeiriol yn llwyddiannus trwy nodi pob un o yr pedwar peptid (Ffigur 5.4).



Ffigur 5.4 Sbectra BAMS o yr cyfeirnod protein.

Roedd pedwar sbectra yn goryffwrdd, gan ddangos pedwar peptid yn gyffredinol. Mae pigau heb eu labelu yn dangos sŵn cefndir.

Roedd nodi yr brigau peptid cyfeirio cywir a oedd yn gyson â yr hyn y dylid adrodd amdano yn awgrymu bod y dull gweithredu yn gweithio yn effeithlon gyda phrotocol y labordy. Felly, parheais i ddefnyddio pecyn canfod peptid ghrelin BAMS.

5.3.2 Cymharu a Dethol Pecynnau Gwrthgyrff

Drwy gydol yr adran ganlynol, fel y manylir yn Adran 5.3.2, defnyddiwyd dau becyn gwrthgorff gwahanol, a ddynodwyd yn Wrthgorff 86, a Gwrthgorff 88, yn y dadansoddiad cymharol a ganlyn. Defnyddiwyd y ddau becyn gwrthgorff i ddadansoddi plasma rhoddwr gydag a heb gyflwyniad dadasyl ac asyl ghrelin alldarddol. Mae samplau plasma 'digymysg' yn cyfeirio at samplau sydd yn cynnwys ghrelin mewndarddol yn unig, tra bod plasma wedi ei 'spigo' yn cyfeirio at samplau sydd yn cynnwys ghrelin ychwanegol a ychwanegwyd yn alldarddol.

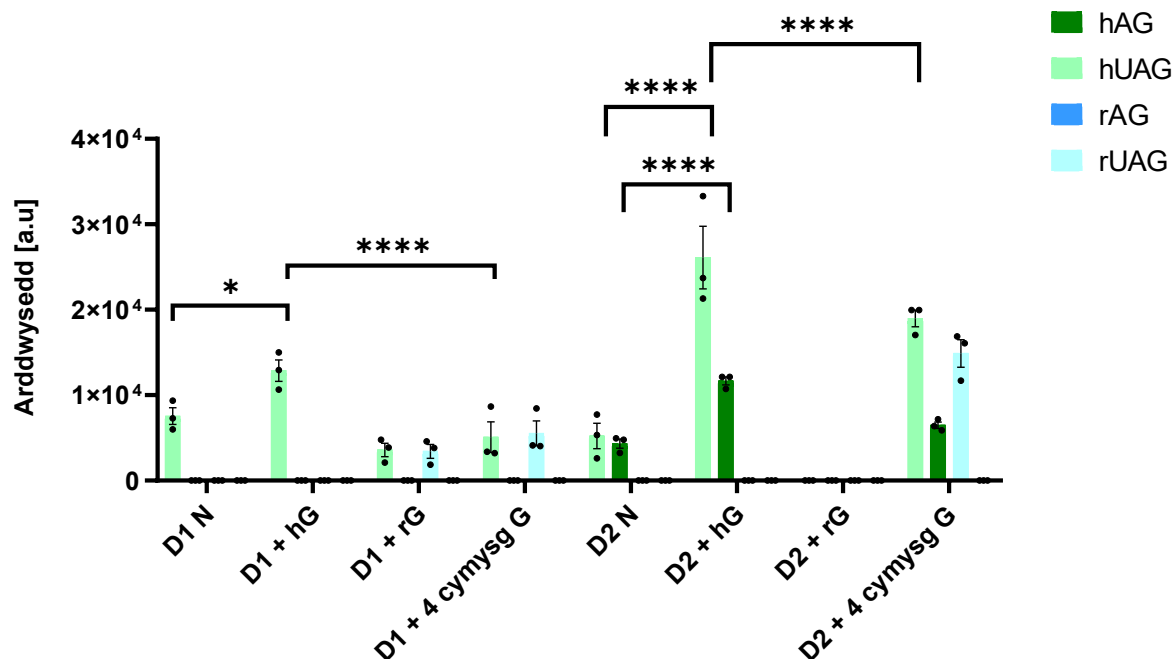
5.3.2.1 Defnyddio Ghrelin Llygoden Fawr fel ISTD i Feintioli Ghrelin Dynol

O fewn sbectrometreg màs, mae yr defnydd o ISTD yn bwysig ar gyfer meintioli cywir. Cyflwynir ISTD o grynodiad hysbys i samplau, blanciau, a chromliniau graddnodi. Ei ddiben yw gwneud iawn am y posibilrwydd o golli dadansoddyddion yn ystod y prosesau paratoi sampl ac ïoneiddiad.

Mewn penodau blaenorol sydd yn ymroddedig i ddadansoddiadau LC-MS/MS a MALDI-TOF, defnyddiwyd rhywogaethau ghrelin llygoden fawr yn aml fel ISTD. Gwnaethpwyd y dewis hwn yn seiliedig ar eu tebygrwydd mewn dilyniant asid amino i ghrelin dynol. Er y byddem yn ddelfrydol yn defnyddio isotop â label ghrelin dynol fel ISTD ar gyfer gwaith MS, nid oedd hyn yn ariannol hyfyw ar y pryd. Felly, mae yr dull o ddefnyddio ghrelin llygoden fawr fel ISTD mewn samplau dynol yn cynnig dewis arall darbodus i yr defnydd o isotop â label ghrelin dynol, os cedwir mewn cof y gall eu heffeithlonrwydd ïoneiddiad ac echdyniad amrywio. Felly, gwnaethom archwilio dichonoldeb defnyddio ghrelin llygoden fawr fel ISTD yn ystod ghrelin BAMS. Oherwydd cyfyngiadau nifer y gleiniau, cynhaliwyd y profion ISTD ar blasma dau roddwr gwahanol, rhoddwr 1 a rhoddwr 2. Roedd y rhesymeg ddethol yn deillio o yr gwahanol lefelau o ghrelin mewndarddol yn y rhoddwyr hyn a nodwyd yn flaenorol gan ddadansoddiad ELISA. Roedd gan roddwr 1, fenyw oed 23, lefelau is o ghrelin mewndarddol (0.1 ng/mL ar gyfer dadasyl ghrelin a 0.01 ng/mL ar gyfer asyl ghrelin) tra bod gan roddwr 2, dyn oed tua 40, lefelau uwch o ghrelin mewndarddol (0.6 ng/mL ar gyfer dadasyl ghrelin a 0.06 ng/mL ar gyfer asyl ghrelin).

Yn gyntaf, ar gyfer y pecyn gwrthgyrff ADX086 (gwrthgorff 86) profwyd yr amodau canlynol gan ddefnyddio cyfaint o 250 µL; plasma digymysg, plasma gan ychwanegu ghrelin dynol alldarddol (dadasyl ac asyl ghrelin) mewn cymysgedd hafal o 1ng/100µL,

plasma gyda ghrelin llygoden fawr alldarddol (dadasyll ac asyll ghrelin) mewn cymysgedd hafal o 1ng/100 μ L, a phlasma yn cynnwys pob un o yr pedair rhywogaeth ghrelin alldarddol (dynol a llygoden fawr, dadasyll ac asyll ghrelin) mewn cymysgedd hafal o 1ng/100 μ L. Ar ôl paratoi gyda yr pecyn BAMS, dadansoddwyd y samplau gan MALDI-TOF. Monitrwyd y dilyniant asid amino 1-28 o ghrelin $[M+H]^+$, gyda m/z 3,244 ar gyfer dadasyll ghrelin dynol, m/z 3188 ar gyfer dadasyll ghrelin llygoden fawr, m/z 3370 ar gyfer yr asyll ghrelin dynol a m/z 3314 am y asyll ghrelin llygoden fawr. Ni chanfuwyd unrhyw asyll ghrelin llygoden fawr alldarddol yn unrhyw un o yr samplau plasma, fodd bynnag, roedd dadasyll ghrelin llygoden fawr i yw canfod (Ffigur 5.5). Yn ogystal, ar gyfer rhoddwr 1, roedd asyll ghrelin dynol hefyd yn anghanfyddadwy. Yn ôl y disgwyl, gwelodd y samplau plasma wedi ei 'spigo' â ghrelin dynol alldarddol gynnydd sylweddol mewn arddwysedd cymedrig ar gyfer dadasyll ghrelin dynol ($P<0.05$) o gymharu â yr plasma 'digymysg'. Fodd bynnag, ar ôl cynnwys ghrelin llygoden fawr alldarddol ochr yn ochr â yr plasma wedi ei 'spigo' dadasyll ac asyll ghrelin dynol, gwelwyd gostyngiad sylweddol yn y dadasyll ghrelin dynol ($P<0.0001$) o ei gymharu â yr 'plasma wedi ei spigo' â ghrelin dynol yn unig (Ffigur 5.5). Mae hyn yn awgrymu y gall ghrelin llygoden fawr gael effaith negyddol ar y rhywogaeth ghrelin dynol. Ar gyfer rhoddwr 2, o ei gymharu â yr samplau plasma 'digymysg', mae dadasyll ac asyll ghrelin dynol yn dangos cynnydd sylweddol ($P<0.0001$) mewn samplau a plasma wedi ei 'spigo' gyda dadasyll ac asyll ghrelin dynol alldarddol. Yn yr un modd, adroddwyd cynnydd sylweddol ($P<0.0001$) mewn arddwysedd ar gyfer dadasyll ac asyll ghrelin o fewn y plasma wedi ei 'spigo' a ghrelin alldarddol pedwar ffordd yn erbyn plasma 'digymysg' (na ddangosir ar y graff). Ar gyfer y samplau plasma wedi ei 'spigo' â dadasyll ac asyll ghrelin llygoden fawr alldarddol, gwelwyd lefelau isel iawn o dadasyll ac asyll ghrelin dynol ochr yn ochr â lefelau isel o dadasyll ghrelin llygoden fawr. Fodd bynnag, mewn samplau plasma wedi ei 'spigo' gyda yr pedwar rhywogaeth ghrelin, canfuwyd y dadasyll ac asyll ghrelin dynol ac dadasyll ghrelin llygoden fawr lefelau uwch (Ffigur 5.3.4). Serch hynny, oedd yr dadasyll ghrelin dynol yn sylweddol yn is ($P<0.0001$) o ei gymharu â yr plasma wedi ei 'spigo' dadasyll ac asyll ghrelin dynol (Ffigur 5.5).

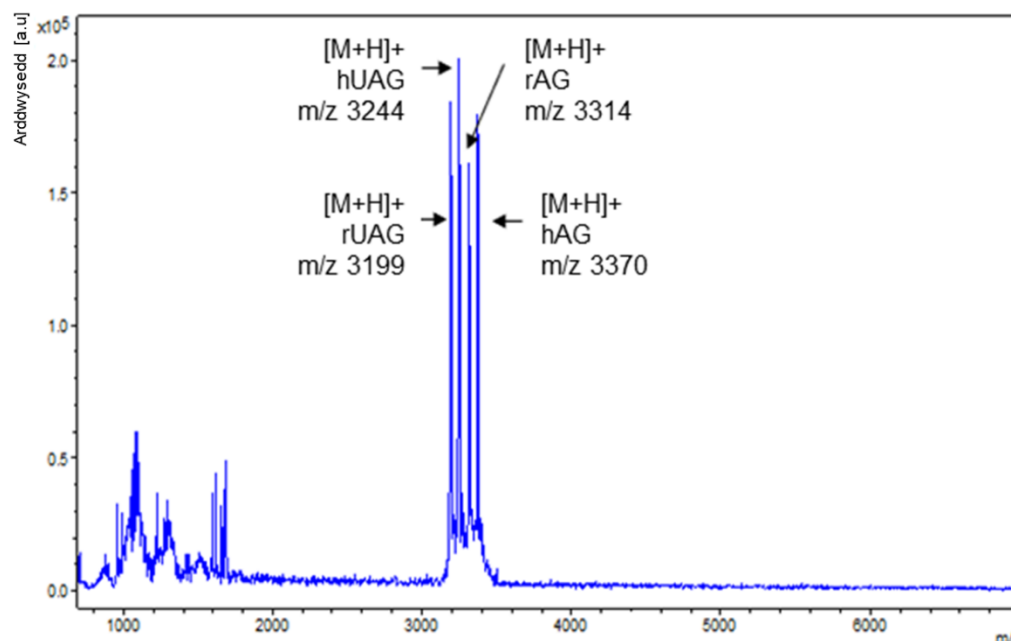


Ffigur 5.5 Canfod ghrelin dynol a llygoden fawr gan ddefnyddio gwrthgorff BAMS 86.

D1 – rhoddwr 1. D2 – rhoddwr 2. N – sampl plasma ‘digymysg’ (dim ghrelin alldarddol). + hG – ychwanegu ghrelin dynol alldarddol (dadasyll ac asyll) i blasma. + rG – ychwanegu ghrelin alldarddol llygoden fawr (dadasyll ac asyll) i blasma. + 4 cymysg G - cymysgedd hafal o ddynol alldarddol a llygoden fawr, dadasyll ac asyll ghrelin i blasma. Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. $N = 3$, cyfartaledd cymedrig wedi ei blotio gyda SEM. **** $P < 0.0001$. * $P < 0.05$.

Er mwyn penderfynu a oedd diffyg canfyddadwy asyll ghrelin llygoden fawr yn broblem gyda yr weithdrefn BAMS neu yn broblem gyda yr cymysgedd peptid, ail ddadansoddwyd y cymysgedd hafal pedair ffordd plasma wedi ei ‘spigo’ (dadasyll ac asyll ghrelin, dynol a llygoden fawr) gan MALDI-TOF yn unig, cyn ailadrodd y weithdrefn BAMS gyda gwrthgorff 88. Fel y cyfryw, gwelwyd bod 1 ng/100 μL o gymysgedd hafal ghrelin dynol a llygoden fawr yn cyrraedd targed MALDI-TOF yn uniongyrchol (fel y disgrifiwyd eisoes ym Mhennod 3, adran 3.2.5). Roedd modd canfod pob un o yr pedair rhywogaeth ghrelin yn y cymysgedd plasma wedi ei ‘spigo’ alldarddol (Ffigur 5.6), sydd yn awgrymu bod y cymysgedd plasma wedi ei ‘spigo’ gwreiddiol a ychwanegwyd at y samplau plasma yn cynnwys y pedair rhywogaeth ghrelin ac y dylai BAMS fod wedi ei ganfod. Gallai colled posibl o asyll ghrelin llygoden fawr gael ei esbonio gan faterion yn ystod y broses dal rhywogaethau ghrelin ar sail gwrthgyrff. Felly, o ystyried yr anallu i ganfod asyll ghrelin llygoden fawr ac oherwydd

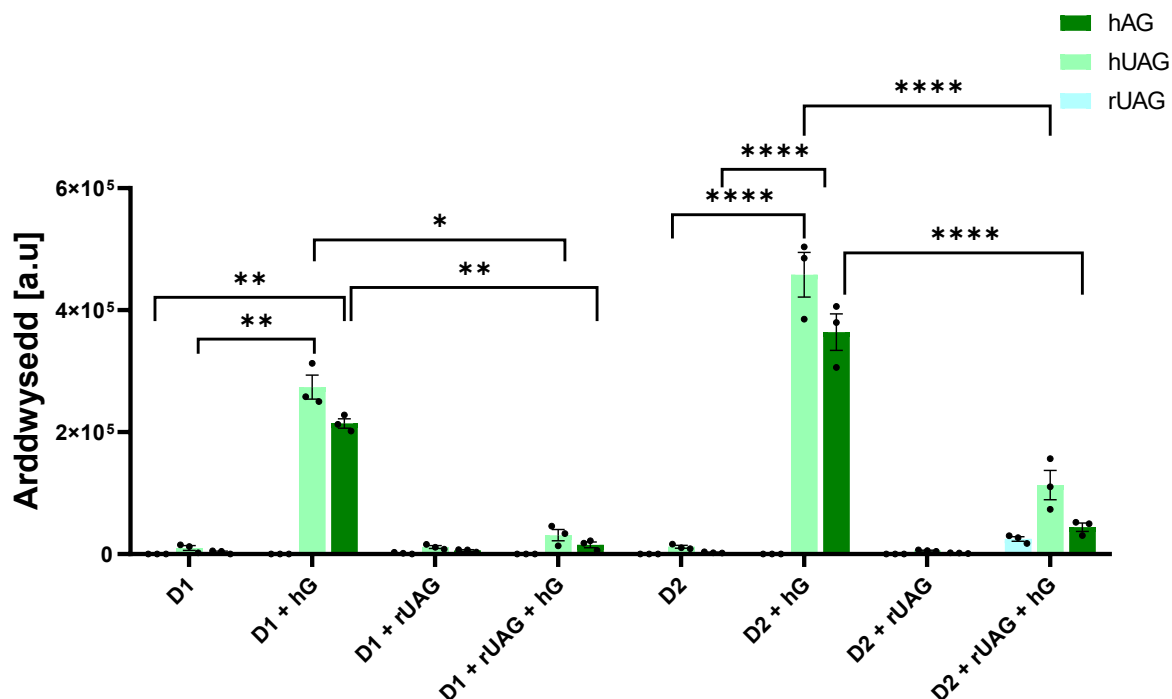
nifer gyfyngedig o leiniau sydd ar gael i gynnal profion pellach, cafodd ei ddiystyru fel ISTD bosibl ar gyfer canfod ghrelin dynol.



Ffigur 5.6 Dadansoddiad MALDI-TOF o gymysgedd hafal o rywogaethau alldarddol ghrelin dynol a llygoden fawr.

Felly, ar gyfer y pecyn ADX088 (gwrthgorff 88), archwiliwyd dadasyl ghrelin llygoden fawr fel ISTD. O ganlyniad, ar gyfer gwrthgorff 88 defnyddiwyd y samplau canlynol: plasma 'digymysg', plasma wedi ei 'spigo' â dadasyl ac asyl ghrelin dynol alldarddol mewn cymysgedd hafal o 1 ng/100 μ L, plasma wedi ei 'spigo' â dadasyl ghrelin llygoden fawr alldarddol ar 1 ng/100 μ L, a plasma wedi ei 'spigo' â dadasyl ac asyl ghrelin dynol alldarddol a dadasyl ghrelin llygoden fawr alldarddol mewn cymysgedd hafal ar 1 ng/100 μ L (Ffigur 5.7). Ar gyfer rhoddwr 1 mewn plasma wedi ei 'spigo' gyda dadasyl ac asyl ghrelin dynol alldarddol, gwelwyd cynnydd sylweddol ($P < 0.01$) mewn dadasyl ac asyl ghrelin dynol o ei gymharu a yr plasma 'digymysg'. Lleihawyd dadasyl ac asyl ghrelin dynol yn sylweddol ($P < 0.05$ a $P < 0.01$, yn y drefn honno) ar ôl cynnwys dadasyl ghrelin llygoden fawr alldarddol ochr yn ochr â dadasyl ac asyl ghrelin alldarddol dynol yn y cymysgedd plasma wedi ei 'spigo' o ei gymharu â phan gafodd plasma wedi ei 'spigo' gyda dim ond dadasyl ac asyl ghrelin dynol alldarddol (Ffigur 5.7). Gwelwyd yr un tueddiadau yn rhoddwr 2, gydag dadasyl ac asyl ghrelin dynol yn dangos cynnydd sylweddol ($P < 0.001$) o fewn plasma wedi ei 'spigo' ag dadasyl ac asyl ghrelin dynol alldarddol o ei gymharu â yr plasma 'digymysg'. Yn ogystal, gostyngwyd dadasyl ac asyl ghrelin dynol yn sylweddol ($P < 0.001$) ar ôl ychwanegu

dadasyl ghrelin llygoden fawr i yr cymysgedd plasma wedi ei 'spigo' alldarddol dynol o ei gymharu â yr plasma wedi ei 'spigo' gydag dadasyl ac asyl ghrelin dynol alldarddol (Ffigur 5.7).



Ffigur 5.7 Canfod dadasyl ac asyl ghrelin gan ddefnyddio gwrthgorff BAMS 88.

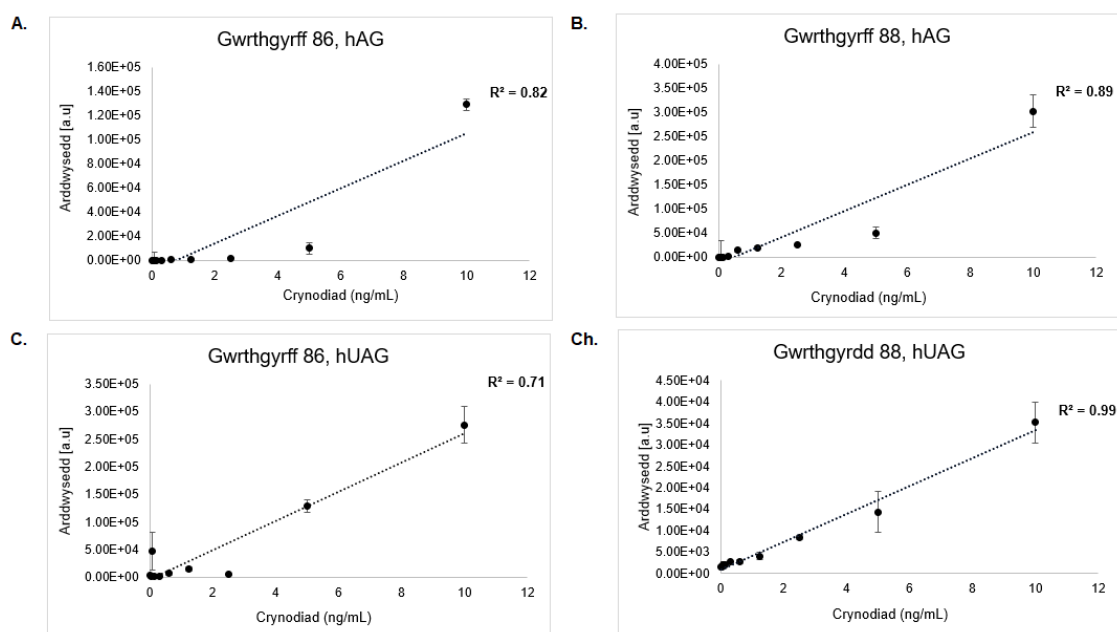
(N) – sampl plasma 'digymysg' (dim ghrelin alldarddol). +hG – ychwanegu ghrelin dynol alldarddol (dadasyl ac asyl ghrelin) i blasma. +rUAG – ychwanegu dadasyl ghrelin llygod alldarddol at blasma. +rUAG + hG – cymysgedd hafal o dadasyl ac asyl ghrelin dynol alldarddol ac dadasyl ghrelin llygoden fawr alldarddol i blasma. Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. $N = 3$, cyfartaledd cymedrig wedi ei blotio gyda SEM. **** $P < 0.0001$, ** $P < 0.01$. * $P < 0.05$.

Mae yr data hon yn dangos gostyngiad mewn lefelau dadasyl ac asyl ghrelin dynol ar ôl ychwanegu ghrelin llygoden fawr alldarddol mewn profion ADX086 ac ADX088. O ganlyniad, mae fy arbrofion yn dangos nad oedd ghrelin llygoden fawr yn ISTD hyfyw ac felly ni defnyddiwyd mwyach mewn arbrofion dilynol. Bu ein cydweithwyr yn Adeptrix yn ymchwilio ymhellach i ymarferoldeb ISTD ar gyfer BAMS wrth i mi gynnal ymchwiliadau pellach yn y cyfamser.

5.3.3 Terfyn Canfod y Prawf BAMS

Oherwydd yr heriau a wynebwyd wrth ddefnyddio ghrelin llygoden fawr alldarddol fel ISTD, lluniwyd cromliniau graddnodi cychwynnol gan ddefnyddio safonau ghrelin

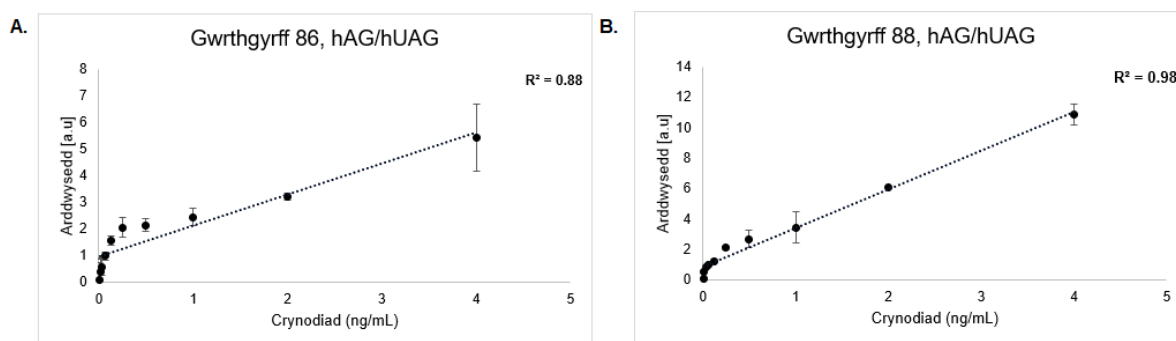
dynol alldarddol yn unig. Nod hyn yn bennaf oedd profi terfynau canfod y pecyn BAMS. Y bwriad oedd ail edrych ar y dull hwn yn dilyn gwelliannau pellach yn ymwneud â ISTD neu ar ôl prynu isotop â label ghrelin dynol. Sefydlwyd cromlin graddnodi i bennu terfyn isaf canfod y safonau ghrelin dynol alldarddol ar gyfer pecyn BAMS gwrthgorff 86 (Ffigur 5.8A, C) ac 88 (Ffigur 5.8B, D). Crynodiad uchaf y gromlin oedd 10 ng/mL ar gyfer dadasyl ac asyl ghrelin dynol. Roedd hwn yn destun gwanhad cyfresol mewn cymhareb 1:2. Parhaodd y broses wanhau hon nes cyrraedd crynodiadau o 0.02 ng/mL, gan greu cromlin wyth pwynt. Ar gyfer gwrthgorff 86, cafwyd gwerth R^2 o 0.82 ar gyfer y gromlin asyl ghrelin dynol (Ffigur 5.8A). Yma, pennwyd terfyn canfod isaf asyl ghrelin dynol ar 0.31 ng/mL. Ar gyfer gwrthgorff 88, sefydlwyd terfyn canfod isaf asyl ghrelin dynol ar 0.04 ng/mL gyda gwerth R^2 o 0.89 a gafwyd ar gyfer y gromlin safonol (Ffigur 5.8B). Sefydlwyd y terfyn isaf ar gyfer canfod dadasyl ghrelin dynol ar 0.02 ng/mL ar gyfer gwrthgorff 86 a gwrthgorff 88. Cafodd gwrthgorff 86 werth R^2 o 0.71 (Ffigur 5.8C), tra cafodd gwrthgorff 88 werth R^2 o 0.99 (Ffigur 5.8 D).



Ffigur 5.8 Cromlin safonol o 0.02-10 ng/mL i sefydlu terfynau ar gyfer canfod dadasyl ac asyl ghrelin ddynol gan ddefnyddio naill ai gwrthgorff 86 neu wrthgorff 88.

Gwrthgorff 86, hAG B. Gwrthgorff 88, hAG. C. Gwrthgorff 86, hUAG. D. Gwrthgorff 88, hUAG. Wedi ei ddadansoddi gan MALDI-TOF. N=3, cymedr cyfartalog wedi ei blotio gyda SEM. Y pwynt plotio terfynol yw cymedr y tair cymedr rhediad hyn, ac mae bariau gwall yn cynrychioli yr gwyriad safonol ar draws rhediadau, gan adlewyrchu amrywioldeb rhwng rhediadau. Mae llinellau tuedd yn cynrychioli ffitiadau atchweliad llinol, ac adroddir gwerthoedd R^2 i nodi daioni yr ffit. Mae bariau gwall yn dangos y gwyriad safonol.

Ar ôl pennu yr terfyn canfod isaf, cynhyrchwyd cromlin raddnodi gan ddefnyddio asyl ghrelin dynol fel ISTD ar 2.5 ng/mL ac dadasyl ghrelin ddynol yn amrywio o 0.02-10 ng/mL (Ffigur 5.9). Cafodd gwrthgorff 86 werth R^2 da o 0.88 (Ffigur 5.9A), tra dangosodd gwrthgorff 88 werth R^2 rhagorol o 0.98 (Ffigur 5.9B). Felly yn awgrymu, yn gyffredinol, bod gwrthgorff 88 yn perfformio yn well na gwrthgorff 86.



Ffigur 5.9 Asesu terfyn canfod trwy gromlin safonol gyda hUAG yn amrywio o 0.02-10 ng/mL a hAG fel ISTD ar 2.5 ng/mL.

A. Cit gwrthgorff 86. B. Cit gwrthgorff 88. Wedi ei ddadansoddi gan MALDI-TOF. N=3, cymedr cyfartalog wedi ei blotio gyda SEM. Mae cymhareb arddwysedd cymedrig a chymhareb crynodiad cymedrig hAG/hUAG wedi ei phlotio. Y pwynt plotio terfynol yw cymedr y tair cymedr rhediad hyn, ac mae bariau gwall yn cynrychioli yr gwriad safonol ar draws rhediadau, gan adlewyrchu amrywioldeb rhwng rhediadau. Mae llinellau tuedd yn cynrychioli ffitiadau atchweliad llinol, ac adroddir gwerthoedd R^2 i nodi daioni yr ffit. Mae bariau gwall yn dangos y gwriad safonol.

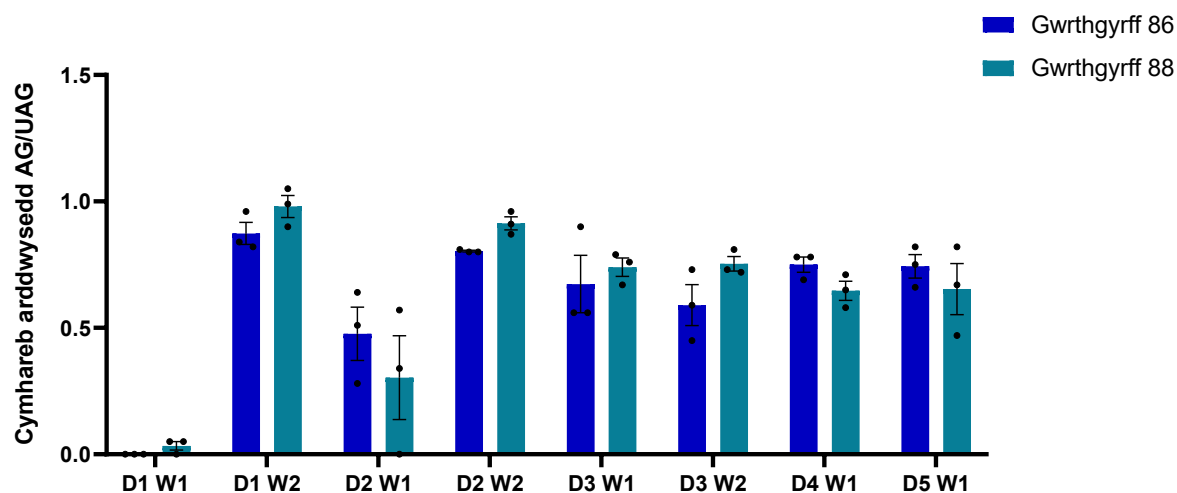
5.3.4 Profion Perfformiad Gwrthgyrff BAMS

Perfformiwyd dau fath o brofion amrywioldeb i brofi atgynrychioldeb a dibynadwyedd y becynnau. Roedd y cyntaf yn gwerthuso y amrywiad rhwng gleiniau gwahanol a gafwyd o yr un sampl. Roedd yr ail yn gwerthuso y amrywiad sydd yn deillio o ddadansoddiadau lluosog o yr un sampl. Defnyddiwyd y ddau becyn gwrthgyrff i ddadansoddi samplau plasma 'digymysg' a plasma wedi ei 'spigo'. Yma, roedd y samplau 'plasma wedi ei spigo' yn cynnwys cymysgedd hafal o dadasyl ac asyl ghrelin dynol, pob un â chrynodiad o 2.5 ng o fewn 250 μ L o blasma.

5.3.4.1 Dadansoddiad Plasma wedi ei Spigo

Mae yr dadansoddiad cyntaf hwn yn asesu amrywioldeb gwrthgorff 86 yn erbyn gwrthgorff 88 mewn plasma wedi ei 'spigo' ymhlith yr holl roddwyr (D1-D5) ac ar draws dau dyniad gwaed gwahanol gan yr un rhoddwr (W1-2). Cafodd y set ddata, sydd yn cynnwys cyfartaleddau gleiniau o dri dadansoddiad o yr un sampl plasma, ei profi gan

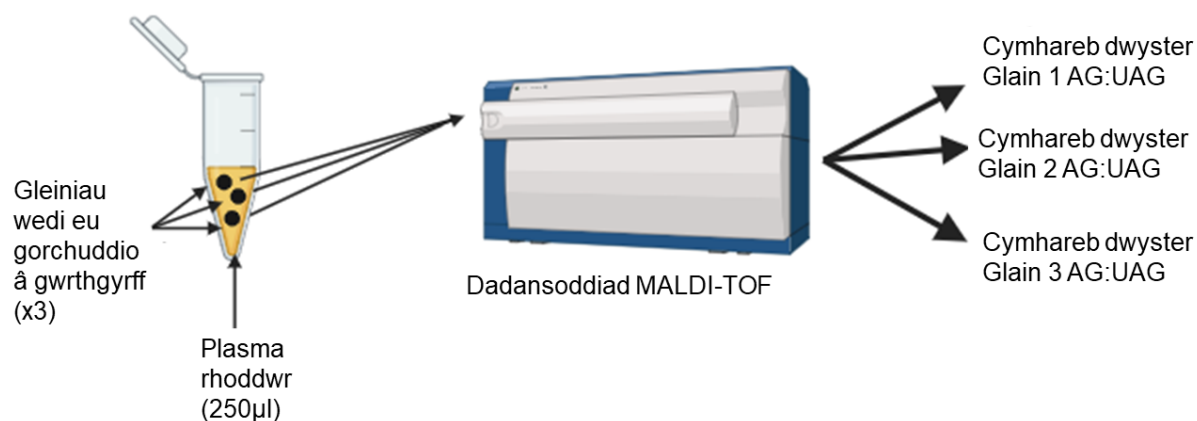
prawf ANOVA. Yma, ni adroddwyd unrhyw wahaniaethau ystadegol arwyddocaol yn y gymhareb arddwysedd AG:UAG wrth gymharu gwerthoedd gwrthgorff 86 a gwrthgorff 88 o yr un dyniad gwaed (Ffigur 5.10). Mae yr data hyn yn awgrymu bod gwrthgorff 86 ac 88 yn perfformio ar lefel debyg.



Ffigur 5.10 Cymhariaeth o wrthgorff 86 yn erbyn gwrthgorff 88 gan bum rhoddwr gwahanol â phlasma wedi ei 'spigo'.

Ychwanegwyd cymysgedd hafal o asyl a dadasyl ghrelin dynol (2.5 ng yr un fesul 250 µL o plasma) o bum rhoddwr gwahanol (D1–D5) gyda dau dyniad gwaed yr un (W1–W2). Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. $N = 3$, cymedr wedi ei blotio â SEM. D1 = rhoddwr 1, D2 = rhoddwr 2, D3 = rhoddwr 3, D4 = rhoddwr 4, D5 = rhoddwr 5. W1 – tyniad gwaed 1, W2 = tyniad gwaed 2.

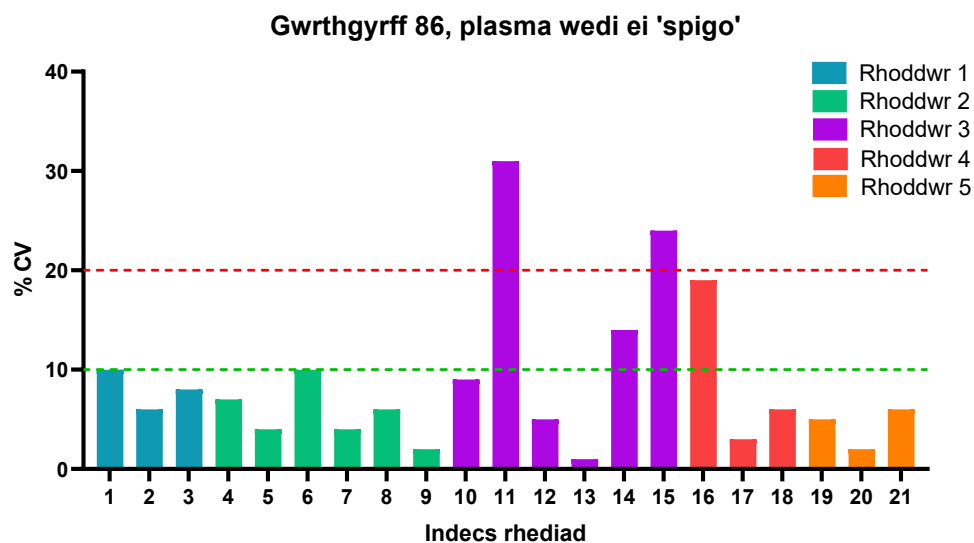
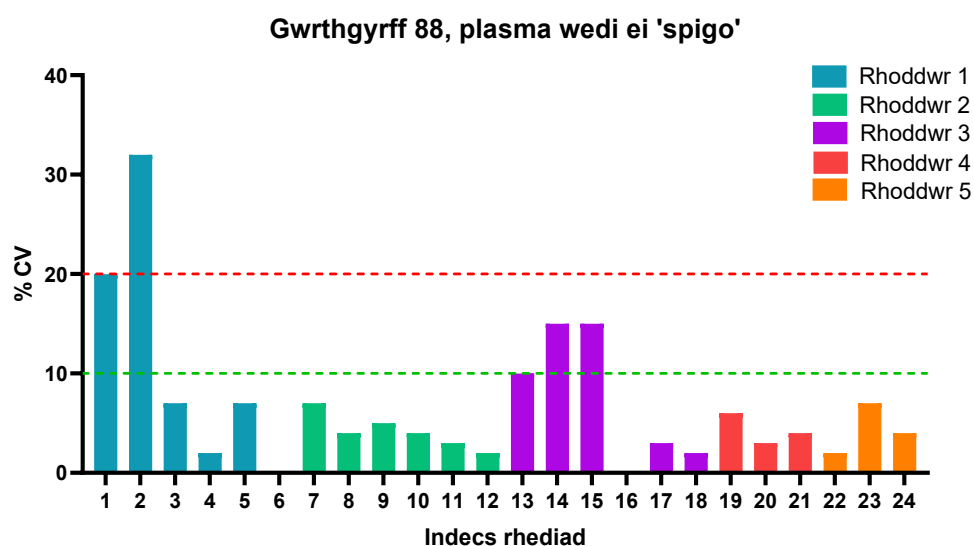
Er mwyn gwerthuso nodweddion perfformiad y gwrthgyrff hyn ymhellach, cynhaliwyd profion amrywioldeb yn defnyddio samplau plasma rhoddwr. Cymysgwyd pob sampl mewn ffynnon yn cynnwys tair glain wedi eu gorchuddio ag gwrthgyrff, ac aseswyd atgynhyrchadwyedd meintioli ghrelin trwy gymharu arddwysedd yr signal ar draws y gleiniau hyn (Glain 1, Glain 2, a Glain 3) o fewn yr un rhediad dadansoddol (Ffigur 5.11). Mynegwyd amrywiad o fewn yr prawf fel %CV ar draws mesuriadau gleiniau triphlyg.



Ffigur 5.11 Sgematig yn dangos tri gleiniau wedi eu gorchuddio â gwrthgyrff ghrelin ar ôl deori mewn plasma rhoddwr yn destun dadansoddiad MADLI-TOF, gan gynhyrchu cymhareb arddwysedd o AG:UAG ar gyfer pob glain.

Gwerthuswyd cywirdeb mewn prawf Gwrthgorff 86 a Gwrthgorff 88 ar draws 21 a 24 rhediad dyblyg, yn y drefn honno, yn dilyn y 'spigo'. Categoriwyd y canlyniadau yn seiliedig ar drothwyon %CV: rhagorol (<10%), derbyniol (11–20%), a gwael (>21%), fel y dangosir yn Ffigur 5.12A–B. Cyflwynir dadansoddiad amrywioldeb mewn profion ychwanegol yn seiliedig ar atchweliad gleiniau i gleiniau yn Ffigur Atodol S2. Dangosodd Gwrthgorff 86 ('wedi ei spigo') atgynhyrchadwyedd mewn prawf cryf, gyda 89.95% o rediadau wedi eu dosbarthu fel rhagorol, 9.5% fel derbyniol, a 9.5% fel gwael. Roedd y dosbarthiad yn gyson â %CV canolrif isel o 6.0%, ac roedd y rhan fwyaf o yr gwerthoedd o fewn terfynau cywirdeb derbyniol. Roedd dau rediad yn uwch na yr trothwy o 15%, gyda yr amrywioldeb mwyaf yn cyrraedd 31%. Dangosodd Gwrthgorff 88 ('wedi ei spigo') berfformiad cymharol, gyda 83.3% o yr rhediadau wedi eu graddio yn rhagorol, 12.5% yn dderbyniol, a dim ond 4.1% yn wael. Roedd y %CV canolrif ychydig yn is ar 4.0%, ac arhosodd yr amrywioldeb cyffredinol wedi ei gyfyngu yn llym, ac eithrio un allanolyn ar 32%.

Mae yr canfyddiadau hyn yn cadarnhau bod y ddau wrthgorff yn darparu cywirdeb mewn prawf uchel pan gânt eu pigo i mewn i plasma, gyda Gwrthgorff 88 yn arddangos amrywioldeb cyffredinol ychydig yn is a llai o rediadau sydd yn perfformio yn wael. Mae hyn yn cefnogi eu haddasrwydd ar gyfer dadansoddiad meintiol sensitif ac atgynhyrchadwyedd o dan amodau pigo rheoledig.

A.**B.**

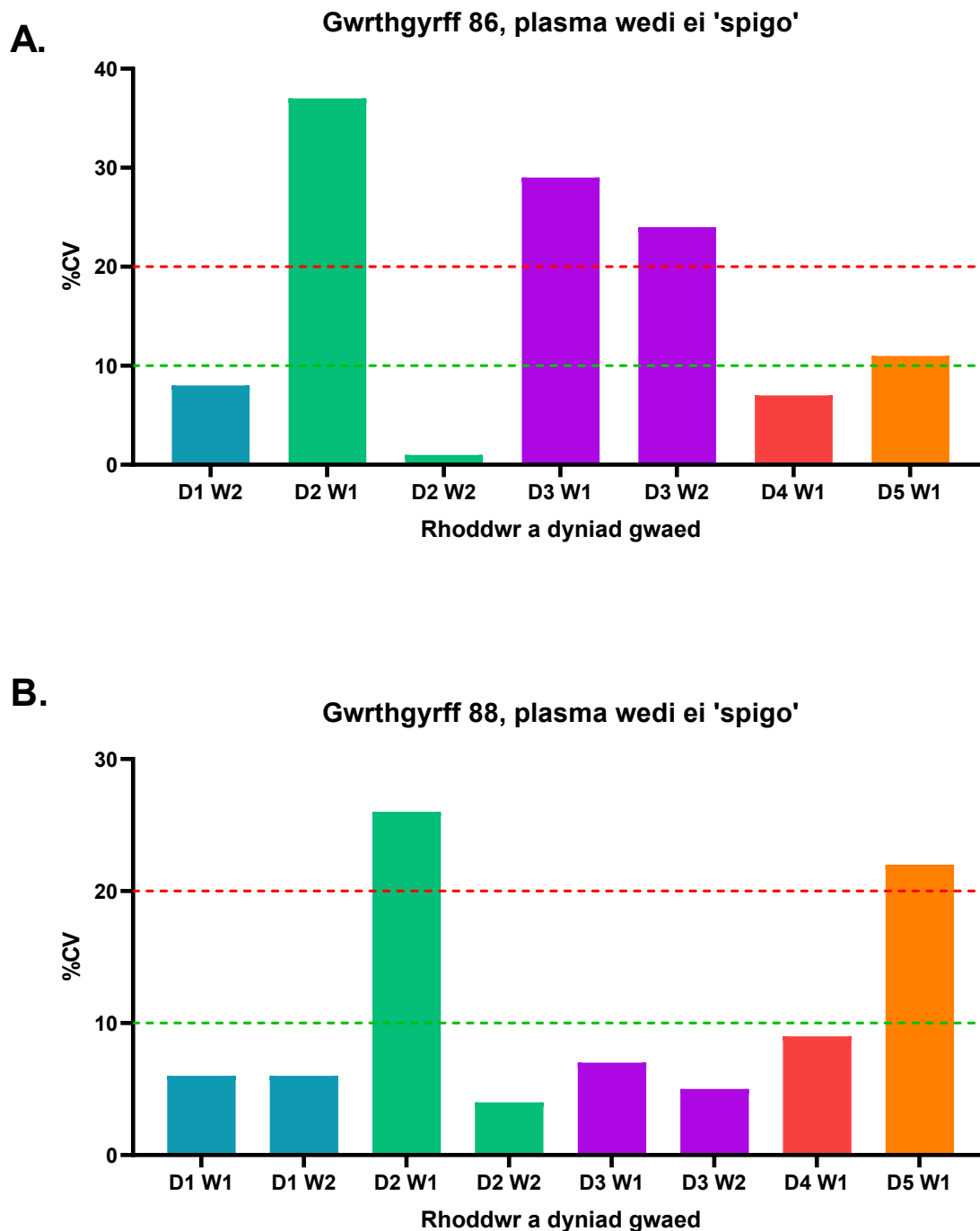
Ffigur 5.12 Amrywioldeb o fewn profion yn dangos yr atgynrychioldeb rhwng gleiniau wedi eu gorchuddio â gwrthgyrff a ddefnyddir i feintioli lefelau ghrelin yn yr un sampl plasma wedi ei 'spigo' gan roddwr. Mae pob rhediad yn cynrychioli mesuriadau triphlyg (Glain 1–3) ar gyfer un tyniad. Mae trothwyon o 10% a 20% wedi eu marcio i ddynodi cywirdeb da a derbyniol, yn y drefn honno. Ystyriwyd bod rhediadau sydd yn fwy na 20% o yr CV yn gallu ailadrodd yn wael. Am atgynrychioldeb mewn prawf ychwanegol yn seiliedig ar ddadansoddiad atchweliad fesul glain, gweler Ffigur Atodol S2. A. Gwrthgyrff 86. B. Gwrthgyrff 88.

Aseswyd amrywioldeb rhyng prawf drwy fesur atgynrychioldeb ar draws rhediadau prawf annibynnol o 'plasma wedi ei spigo' gan yr un rhoddwr, a gasglwyd o un tyniad gwaed. Ar gyfer pob cyfuniad rhoddwr-tyniad gwaed, cyfrifwyd y gymhareb AG:UAG gymedrig o dri mesuriad gleiniau o fewn pob rhediad. Yna defnyddiwyd y %CV ar draws y rhediadau hyn i werthuso cywirdeb rhyng prawf (Ffigur 5.13A–B). Mae Ffigur Atodol S3 yn darparu cymariaethau ychwanegol yn seiliedig ar atchweliad rhwng rhediadau arbrofol i ddangos ymhellach atgynrychioldeb rhyng prawf.

Dangosodd Gwrthgorff 86 (Ffigur 5.13A) berfformiad rhyng prawf cymedrol, gyda 42.9% o yr rhediadau wedi eu dosbarthu fel rhagorol, 14.3% yn dderbyniol, a 42.9% yn wael. Er bod sawl pwynt amser yn dangos CV isel (1–8%), roedd amrywioldeb yn sylweddol uwch mewn rhediadau eraill, gyda CV yn cyrraedd 29%, 37%, a 24%, gan nodi anghysondebau o ddydd i ddydd ym mherfformiad yr prawf.

Mewn cymhariaeth, dangosodd Gwrthgorff 88 (Ffigur 5.13B) well atgynrychioldeb rhyng prawf, gyda 75% o yr rhediadau yn dod o fewn yr ystod ragorol, a 25% wedi eu dosbarthu fel rhai gwael. Ni syrthiodd unrhyw rhediadau o fewn yr ystod dderbyniol ganolradd. Arhosodd y rhan fwyaf o werthoedd CV ymhell islaw 10%, ac eithrio dau bwynt amser uwch (22% a 26%).

Gyda ei gilydd, mae yr canlyniadau hyn yn awgrymu bod Gwrthgorff 88 yn darparu cywirdeb rhyng profion mwy sefydlog o ei gymharu â Gwrthgorff 86 o dan amodau 'plasma wedi ei spigo'. Mae amllder is rhediadau sydd yn perfformio yn wael yn cefnogi ei addasrwydd ar gyfer cymwysiadau hydredol lle mae atgynrychioldeb dros amser yn hanfodol. Mae Tabl Atodol S1 yn manylu ar y gymhareb arddwysedd AG:UAG crai o bob rhediad, gan amlygu anghysondebau penodol rhwng rhediadau, gan gynnwys allanolion posibl a allai gyfrif am CVau uwch. Mae yr gwahaniaethau hyn mewn canfod brig wedi eu dangos ymhellach yn Ffigur Atodol S4, sydd yn dangos sbectrwm MALDI-TOF lle gall amrywioldeb signal asyl ghrelin esbonio gwahaniaethau cywirdeb rhyng-prawf oherwydd effeithiau trothwy signal-i-sŵn.



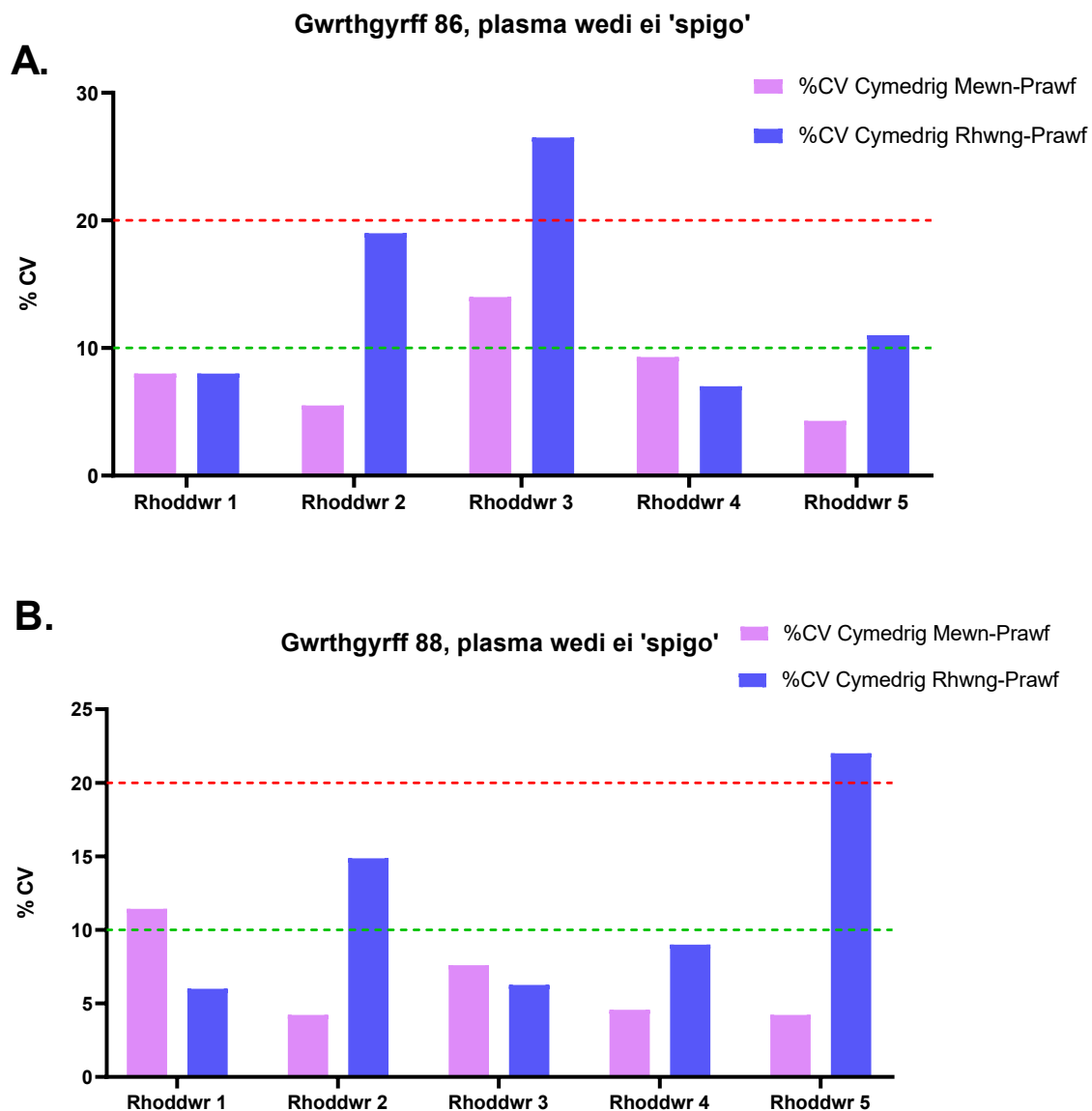
Ffigur 5.13 Amrywioldeb o rhwng prawf. Atgynrychioldeb rhwng samplau o yr un plasma rhoddwr wedi ei 'spigo'. Ar gyfer pob pâr rhoddwr–tynnu'n ôl, cyfrifwyd y gymhareb UAG/AG gymedrig o fesuriadau gleiniau triphlyg fesul rhediad, a defnyddiwyd y %CV ar draws rhediadau i asesu cywirdeb rhwng-prawf. Nodir trothwyon o 10% (cywirdeb da) a 20% (cywirdeb derbyniol) gan linellau toredig. Mae gwerthoedd CV sydd yn fwy na 20% yn dynodi atgynhyrchadwyedd gwael rhwng rhediadau. Am gymariaethau ychwanegol rhwng rhediadau gan ddefnyddio dadansoddiad atchweliad, gweler Ffigur Atodol S3.A. Gwrthgyrff 86, B. Gwrthgyrff 88.

Gwerthuswyd cywirdeb ac atgynhyrchadwyedd gwrthgorff 86 a gwrthgorff 88 plasma wedi ei 'spigo' trwy gymharu %CV cymedrig mewn prawf a rhyng prawf ar draws pum rhoddwr (Ffigur 5.14). Mae %CV mewn prawf yn adlewyrchu cysondeb o fewn un rhediad prawf, tra bod %CV rhyng prawf yn dangos atgynhyrchadwyedd ar draws rhediadau annibynnol lluosog gan ddefnyddio yr un sampl.

Ar gyfer gwrthgorff 86 (Ffigur 5.14A), roedd y %CV mewn prawf yn amrywio o 4.3% i 14%, gyda yr amrywioldeb isaf a welwyd yn Rhoddwr 5 (4.3%) a yr uchaf yn Rhoddwr 3 (14%). Dangosodd amrywioldeb rhyng profion ledadeniad ehangach, yn amrywio o 7% (Rhoddwr 4) i 26.5% (Rhoddwr 3), sydd yn dangos anghysondeb mwy ar draws rhediadau ar gyfer rhai samplau. Mae yr %CV rhyng profion uchel yn Rhoddwr 3 yn awgrymu amrywioldeb gweithdrefnol neu drin samplau posibl sydd angen sylw.

Mewn cyferbyniad, dangosodd gwrthgorff 88 (Ffigur 5.14B) amrywioldeb rhyng profion is ar y cyfan ar draws y rhan fwyaf o roddwyr. Roedd gwerthoedd %CV mewn profion yn amrywio o 4.2% i 11.4%, tra bod %CV rhyng-prawf yn amrywio o 5.9% i 22%. Nodwyd yr amrywioldeb rhyng-prawf uchaf yn Rhoddwr 5 (22%), tra bod yr isaf yn Rhoddwr 1 (5.99%), gan adlewyrchu atgynrychioldeb gwell o ei gymharu ag gwrthgorff 86. Yn arbennig, syrthiodd y rhan fwyaf o roddwyr a ddefnyddiodd wrthgorff 88 o dan y trothwy o 20% ar gyfer %CV rhyng profion, gan ddangos sefydlogrwydd gwell ac addasrwydd posibl ar gyfer cymariaethau samplau hydredol.

Mae yr canfyddiadau hyn yn dangos bod y ddau wrthgorff yn arddangos cywirdeb derbyniol mewn profion; fodd bynnag, mae gwrthgorff 88 yn cynnig atgynrychioldeb rhyng profion cymharol well ar draws y set rhoddwyr, gan gefnogi ei botensial ar gyfer cymhwysiad mwy cyson mewn mesuriadau dro ar ôl tro. Er mwyn delweddu cadernid yr prawf ymhellach, mae Ffigur Atodol S5 yn plotio yr berthynas rhwng amrywioldeb mewn prawf (gleiniau %CV) ac amrywioldeb rhyng prawf (rhediad %CV) ar gyfer pob rhoddwr.

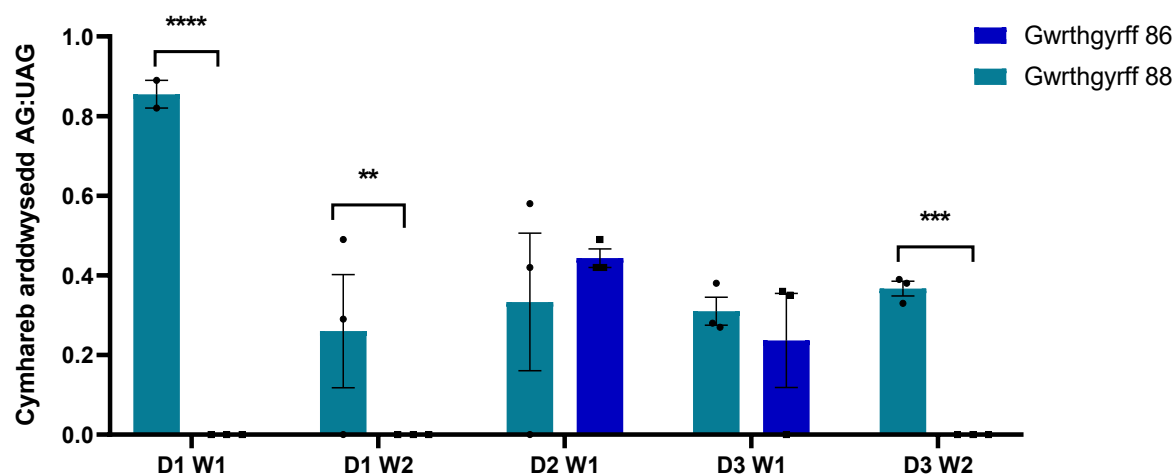


Ffigur 5.14 Cymhariaeth yr %CV cymedrig mewn prawf a yr %CV rhyng prawf ar gyfer pob rhoddwr. Mae amrywioldeb mewn prawf yn adlewyrchu cysondeb o glain i glain o fewn un rhediad, tra bod amrywioldeb rhyng prawf yn adlewyrchu atgynhyrchadwyedd ar draws rhediadau lluosog ar gyfer yr un sampl. Mae rhoddwyr â CVau rhyng prawf uchel (>40%) yn dangos bod angen safoni protocol neu reoli trin a phrosesu samplau yn well. Gweler Ffigur Atodol S5 am gymhariaeth fanwl o CVau mewn prawf yn erbyn rhyng prawf ar draws rhoddwyr unigol. A. Gwrthgyrff 86, B. Gwrthgyrff 88.

5.3.4.2 Canlyniadau Plasma Digymysg

Nesaf, defnyddiwyd gwrthgyrff 86 ac 88 i fesur arddwysedd AG:UAG dynol yn y samplau plasma digymysg gan wahanol roddwyr. Roedd y gwerthusiad o yr plasma digymysg yn gyfyngedig oherwydd argaeledd gleiniau. O ganlyniad, dim ond tri rhoddwr o yr pump a ddadansoddwyd ar gyfer gwrthgyrff 86 ac 88 a dim ond dau dyniad gwaed o bob un a ddadansoddwyd, ar wahân i roddwr 2, a ddadansoddwyd un tyniad gwaed yn unig ar gyfer gwrthgyrff 86.

Ar gyfer rhoddwr 1, roedd gwrthgyrff 86 yn aflwyddiannus wrth fesur asyl ghrelin, ac felly roedd y gymhareb AG:UAG dynol yn 0. O ganlyniad, roedd cymhareb arddwysedd gwrthgyrff 88 AG:UAG dynol yn sylweddol well ar gyfer rhoddwr 1 ($P < 0.001$ ar gyfer rhoddwr 1, tyniad gwaed 1 a $P < 0.01$ ar gyfer rhoddwr 1, tyniad gwaed 2) (Ffigur 5.15). Ar gyfer rhoddwr 2, ni welwyd unrhyw wahaniaethau ystadegol arwyddocaol rhwng gwrthgyrff 86 a gwrthgyrff 88 yn y gymhareb arddwysedd AG:UAG dynol wrth gymharu gwerthoedd o yr un tyniad gwaed. Ar gyfer rhoddwr 3, perfformiwyd gwrthgyrff 88 yn sylweddol well na gwrthgyrff 86 ($P < 0.001$) o ran arddwysedd AG:UAG dynol.



Ffigur 5.15 Cymhariaeth o wrthgyrff 86 yn erbyn gwrthgyrff 88 ar gyfer dadansoddi arddwysedd AG:UAG dynol mewn samplau plasma 'digymysg' gan dri rhoddwr gwahanol.

Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. $N = 3$, cymedr wedi ei blotio â SEM. $P < 0.0001 = ****$, $P < 0.001 = ***$, $P < 0.01 = **$. D1 = rhoddwr 1, D2 = rhoddwr 2, D3 = rhoddwr 3. W1 – tyniad 1, W2 = tyniad 2.

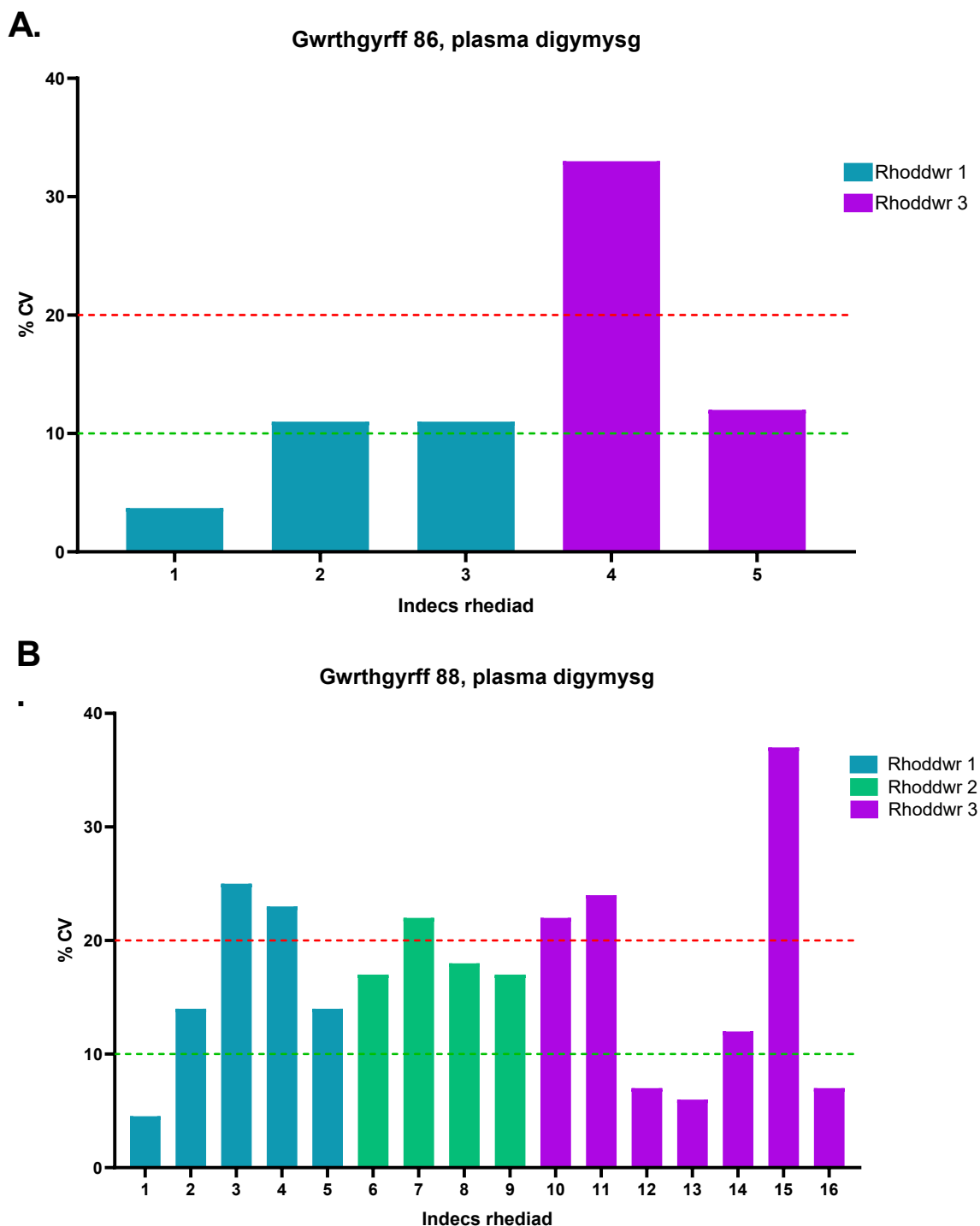
Aseswyd ymhellach gywirdeb mewn prawf Gwrthgyrff 86 a Gwrthgyrff 88 gan ddefnyddio samplau plasma 'digymysg' (heb eu spigo) ar draws 5 a 16 rhediad dyblyg,

yn y drefn honno, fel y dangosir yn Ffigur 5.16A–B. Cyflwynir dadansoddiad amrywioldeb mewn prawf ychwanegol yn seiliedig ar atchweliad gleiniau i gleiniau yn Ffigur Atodol S6.

Dangosodd Gwrthgorff 86 ('digymysg') atgynrychioldeb cymedrol, gyda 20% o yr rhediadau wedi eu graddio fel rhagorol, 60% fel derbyniol, a 20% fel gwael. Roedd y %CV canolrif yn 11.0%, gan awgrymu perfformiad derbyniol cyffredinol; fodd bynnag, dangosodd un rhediad amrywioldeb uchel ar 33%, a allai nodi ansefydlogrwydd neu rwymo anghyson mewn amodau matrices 'digymysg'.

I yr gwrthwyneb, dangosodd Gwrthgorff 88 ('digymysg') ddosbarthiad ehangach o amrywioldeb. Dim ond 18.8% o yr rhediadau a gyrhaeddodd y trothwy rhagorol, tra bod 25.0% yn dderbyniol a yr mwyafrif (56.3%) yn disgyn i yr categori cywirdeb gwael. Roedd y %CV canolrif yn 17.0%, sydd yn adlewyrchu amrywioldeb uwch o dan amodau 'digymysg'. Yn penodol, cyrhaeddodd y %CV uchaf 37%, gan amlygu ymhellach gysondeb llai heb bigo ymlaen llaw.

Mae yr canlyniadau hyn yn dangos bod y ddau wrthgorff yn dangos cywirdeb mewn prawf llai pan gânt eu defnyddio yn uniongyrchol mewn plasma 'digymysg', gyda Gwrthgorff 88 yn dangos amrywioldeb mwy yn gyffredinol. Mae yr canfyddiadau yn tanlinellu effaith cymhlethdod matrices ar berfformiad prawf ac yn atgyfnerthu pwysigrwydd optimeiddio amodau prawf ar gyfer meintioli cyson.

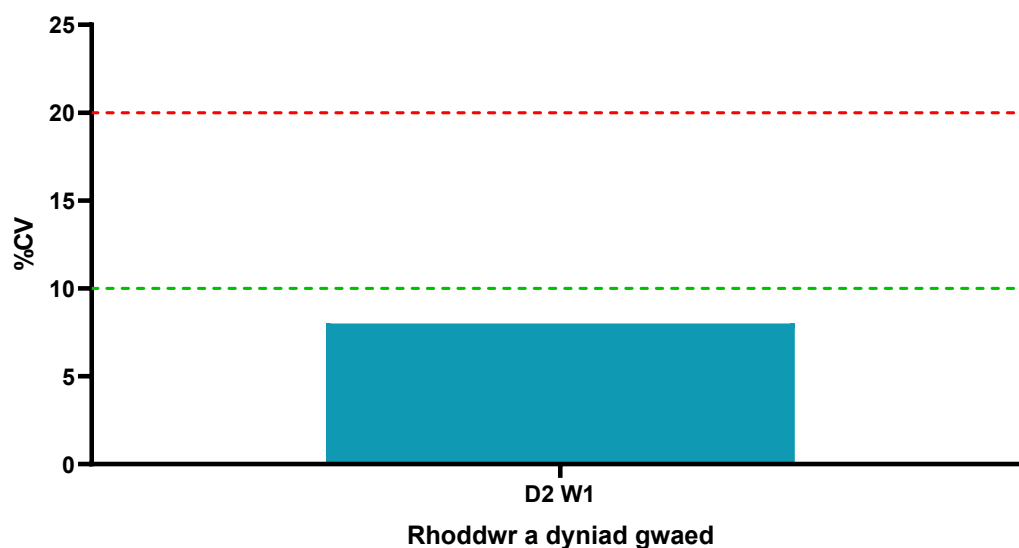
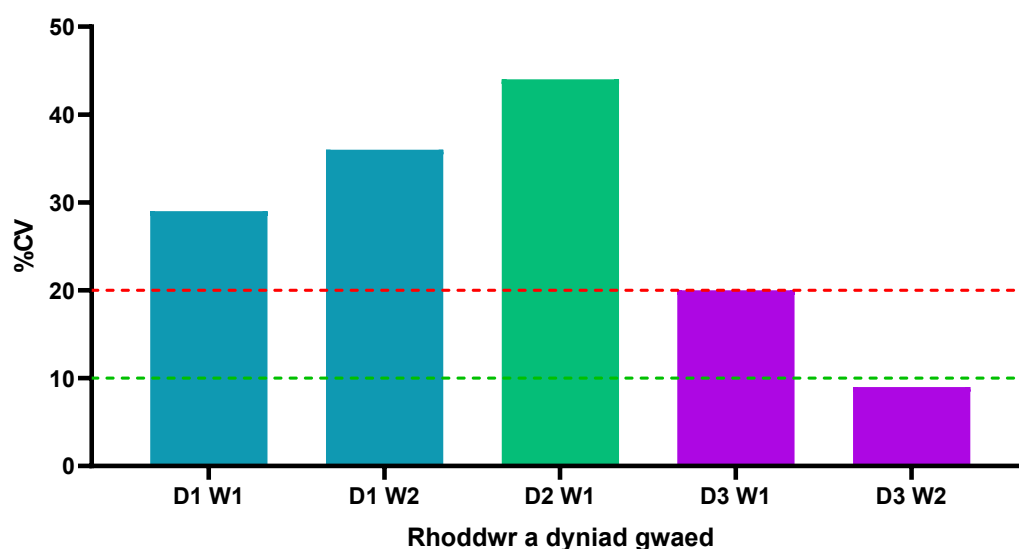


Ffigur 5.16 Amrywioldeb o fewn profion. Defnyddiwyd atgynhyrchadwyedd rhwng tri glain i fesur lefelau ghrelin yn yr un sampl plasma 'digymysg' rhoddwr. Mae pob rhediad yn cynrychioli mesuriadau triphlyg (Glain 1–3) ar gyfer un tyniad. Mae trothwyon o 10% a 20% wedi eu marcio i ddynodi cywirdeb da a derbyniol, yn y drefn honno. Ystyriwyd bod rhediadau sydd yn fwy na 20% o yr CV yn gallu ailadrodd eu hunain yn wael. Am atgynhyrchadwyedd ychwanegol o fewn yr prawf yn seiliedig ar ddadansoddiad atchweliad fesul glain, gweler Ffigur Atodol S6. A. Gwrthgyrff 86. B. Gwrthgyrff 88.

Aseswyd amrywioldeb rhyng prawf drwy werthuso atgynhyrchadwyedd ar draws rhediadau profion annibynnol gan ddefnyddio samplau plasma 'digymysg' o yr un rhoddwr a digwyddiad tyniad gwaed (Ffigur 5.17A–B). Mae Ffigur Atodol S7 yn darparu cymariaethau ychwanegol yn seiliedig ar atchweliad rhwng rhediadau arbrofol i ddangos ymhellach atgynhyrchadwyedd rhyng prawf.

Dangosodd Gwrthgorff 86 (Ffigur 5.17A) gywirdeb rhyng prawf rhagorol, gydag un rhediad (D2 W1) yn dangos %CV o 8%, felly wedi ei ddosbarthu fel da. Er mai dim ond un pwynt data oedd ar gael, mae yr canlyniad yn awgrymu atgynhyrchadwyedd uchel o dan amodau 'digymysg' yn yr achos hwn. Mewn cyferbyniad, dangosodd Gwrthgorff 88 (Ffigur 5.17B) amrywioldeb sylweddol rhyng prawf, gyda dim ond 1 o 5 rhediad (D3 W2) yn cyflawni cywirdeb rhagorol (%CV = 9%). Syrthiodd un rhediad (D3 W1, 20%) ar y trothwy ar gyfer perfformiad derbyniol, tra bod y tri rhediad sydd yn weddill (D1 W1, D1 W2, a D2 W1) wedi eu dosbarthu fel rhai gwael, gyda CVau yn amrywio o 29% i 44%.

Mae yr canfyddiadau hyn yn dangos, er bod Gwrthgorff 86 wedi cynnal atgynyrchioldeb rhyng prawf cryf mewn plasma 'digymysg' (er gyda data cyfyngedig), bod Gwrthgorff 88 wedi dangos amrywioldeb sylweddol rhwng rhediadau. Mae hyn yn atgyfnerthu yr angen am optimeiddio pellach wrth ddefnyddio Gwrthgorff 88 mewn dyluniadau mesur hydredol neu ailadroddus sydd yn cynnwys samplau heb eu 'spigo'

A.**Gwrthgyrff 86, plasma digymysg****B.****Gwrthgyrff 88, plasma digymysg**

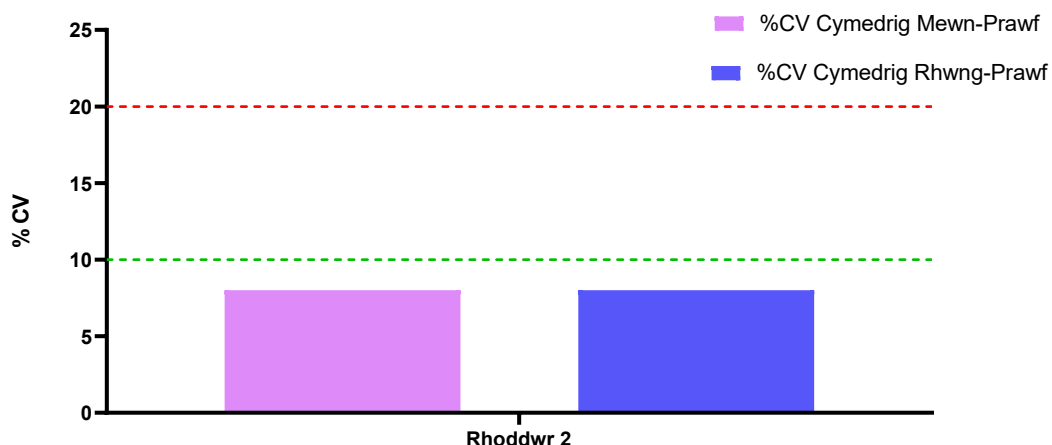
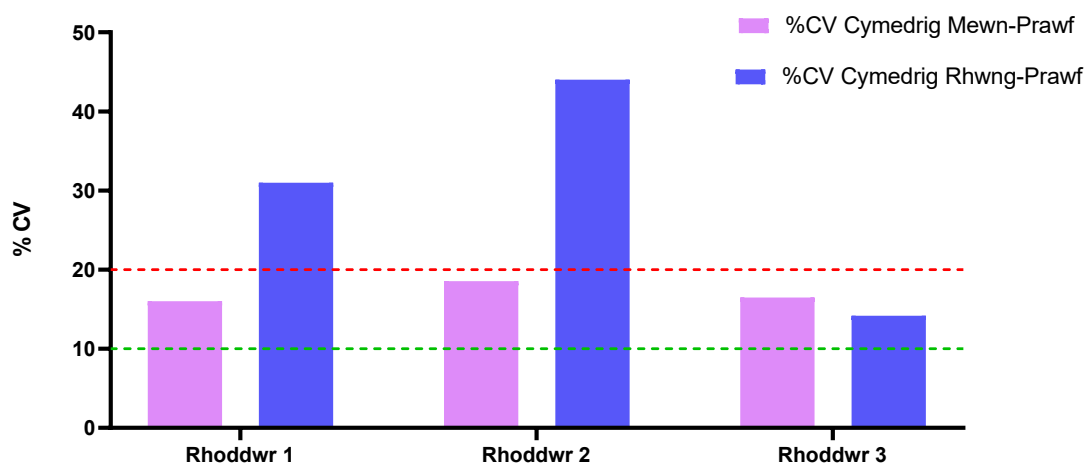
Ffigur 5.17 Amrywioldeb rhwng prawf. Atgynhyrchadwyedd ar draws rhediadau profion annibynnol o yr un rhoddwr â plasma wedi ei ‘spigo’ o tyniad gwaed sengl. Ar gyfer pob pâr rhoddwr-tyniad gwaed, cyfrifwyd y gymhareb AG:UAG gymedrig o fesuriadau gleiniau triphlyg fesul rhediad, a defnyddiwyd y %CV ar draws rhediadau i asesu cywirdeb rhyng prawf. Nodir trothwyon o 10% (cywirdeb da) a 20% (cywirdeb derbyniol) gan linellau toredig. Mae gwerthoedd CV sydd yn fwy na 20% yn dynodi atgynhyrchadwyedd gwael rhwng rhediadau. Am atgynhyrchadwyedd rhwng profion ychwanegol yn seiliedig ar ddadansoddiad atchweliad fesul glain, gweler Ffigur Atodol S7. A. Gwrthgyrff 86, B. Gwrthgyrff 88.

Gwerthuswyd cywirdeb ac atgynhyrchadwyedd asesiadau Gwrthgorff 86 ac Gwrthgorff 88 drwy gymharu %CV cymedrig mewn prawf a rhyng prawf ar draws rhoddwyr, fel y dangosir yn Ffigur 5.18. Mae %CV mewn prawf yn dynodi cysondeb o fewn rhediadau prawf unigol, tra bod %CV rhyng prawf yn adlewyrchu atgynhyrchadwyedd ar draws rhediadau annibynnol o yr un samplau. I ddelweddu cadernid prawf ymhellach, mae Ffigur Atodol S8 yn plotio yr berthynas rhwng amrywioldeb mewn prawf (%CV gleiniau) a rhyng prawf (%CV rhediad) ar gyfer pob rhoddwr.

Ar gyfer Gwrthgorff 86 (Ffigur 5.18A), roedd y %CV mewn prawf a rhyng prawf yn gyson ar gyfer Rhoddwr 2, gyda gwerthoedd cymedrig o 8% yr un. Dylid nodi bod yr arsylwad hwn yn seiliedig ar set ddata un rhoddwr, gan gyfyngu ar gasgliadau ehangach. Serch hynny, mae yr data yn awgrymu perfformiad sefydlog Gwrthgorff 86 o dan amodau 'digymysg' gyda yr amrywioldeb lleiaf o fewn a rhwng rhediadau prawf.

Mewn cyferbyniad, dangosodd Gwrthgorff 88 (Ffigur 5.18B) fwy o amrywioldeb. Roedd y %CV mewn prawf cymedrig yn amrywio o 16% i 18.5% ar draws rhoddwyr, tra bod y %CV rhyng prawf yn dangos lledaeniad ehangach, o 14.2% (Rhoddwr 3) hyd at 44% (Rhoddwr 2). Yn nodedig, dangosodd Rhoddwr 2 amrywioldeb rhyng prawf arbennig o uchel, gan nodi atgynhyrchadwyedd prawf anghyson ar draws rhediadau ar gyfer sampl 'digymysg' y rhoddwr hwn. Fodd bynnag, dangosodd Rhoddwr 3 gywirdeb rhyng prawf cymharol well (14.2%) er gwaethaf CVau mewn prawf yng nghanol eu harddegau.

Mae yr canlyniadau hyn yn dangos bod Gwrthgorff 86 yn darparu perfformiad mwy sefydlog ac atgynhyrchadwy mewn plasma 'digymysg' ar draws amodau mewn prawf a rhyng prawf, er bod y data cyfyngedig sydd ar gael yn gwarantu dehongliad gofalus. Mewn cymhariaeth, mae Gwrthgorff 88 yn dangos amrywioldeb cynyddol, yn enwedig o ran cywirdeb rhyng prawf, a all effeithio ar ei ddibynadwyedd ar gyfer astudiaethau hydredol heb optimeiddio pellach.

A.**Gwrthgyrff 86, plasma digymysg****B.****Gwrthgyrff 88, plasma digymysg**

Ffigur 5.18 Cymhariaeth o yr %CV cymedrig mewn prawf a yr CV% rhyng prawf ar gyfer pob rhoddwr. Mae amrywioldeb mewn prawf yn adlewyrchu cysondeb o glain i glain o fewn un rhediad, tra bod amrywioldeb rhyng prawf yn adlewyrchu atgynhyrchadwyedd ar draws rhediadau lluosog ar gyfer yr un sampl. Mae rhoddwyr â CVau rhyng prawf uchel (>40%) yn dangos bod angen safoni protocol neu reoli trin a phrosesu samplau yn well. Gweler Ffigur Atodol S8 am gymhariaeth fanwl o CVau mewn prawf yn erbyn rhyng prawf ar draws rhoddwyr unigol. A. Gwrthgyrff 86, B. Gwrthgyrff 88.

Dangosodd profion perfformiad yr asesiadau gwrthgyrff BAMS fod gwrthgyrff 86 ac 88 yn arddangos cywirdeb mewn prawf cryf wrth fesur lefelau ghrelin mewn plasma wedi ei 'spigo', gyda gwrthgyrff 88 yn dangos atgynrychioldeb cyffredinol a sefydlogrwydd mewn profion ychydig yn well na gwrthgyrff 86. Fodd bynnag, mewn samplau plasma 'digymysg', dangosodd y ddau wrthgyrff gywirdeb is, gyda gwrthgyrff 86 yn gyffredinol yn perfformio yn well na gwrthgyrff 88 o ran atgynrychioldeb rhyng profion. Mae Ffigur Atodol S9 yn dangos y gwrthgyferbyniad hwn trwy gymhariaeth plot bocs o ddosraniadau %CV rhwng samplau 'wedi ei spigo' a 'digymysg' ar draws y ddau wrthgyrff. Mae yr canlyniadau hyn yn tynnu sylw at bwysigrwydd amodau profion ar berfformiad gwrthgyrff ac yn awgrymu addasrwydd gwrthgyrff 88 ar gyfer samplau rheoledig, wedi ei 'spigo', tra gall gwrthgyrff 86 fod yn fwy dibynadwy ar gyfer plasma 'digymysg'. Oherwydd bod y gleiniau sydd ar gael yn gyfyngedig, ni ellid sefydlu yr nodweddion perfformiad llawn, yn enwedig ar gyfer plasma 'digymysg' fodd bynnag, o ystyried cyfyngiadau amser, cymharwyd y data prawf gwrthgyrff BAMS oedd ar gael â chanlyniadau ELISA i werthuso eu cryfderau cymharol ac eu haddasrwydd ar gyfer meintoli ghrelin.

5.3.5 Cymhariaeth rhwng BAMS Ghrelin ac ELISA

Prif nod fy nhraethawd ymchwil yw datblygu dull newydd ar gyfer adnabod dadasyl ac asyl ghrelin o fewn yr un sampl plasma sydd yn gwella ar y ddibyniaeth bresennol ar ddau becyn ELISA gwahanol, un ar gyfer dadasyl ghrelin ac un ar gyfer asyl ghrelin. I wneud hynny, cymharais atgynrychioldeb a sensitifrwydd y dull newydd o ddefnyddio BAMS â chitiau ELISA sydd wedi eu dilysu ac eu defnyddio yn eang yn ein grŵp ymchwil.

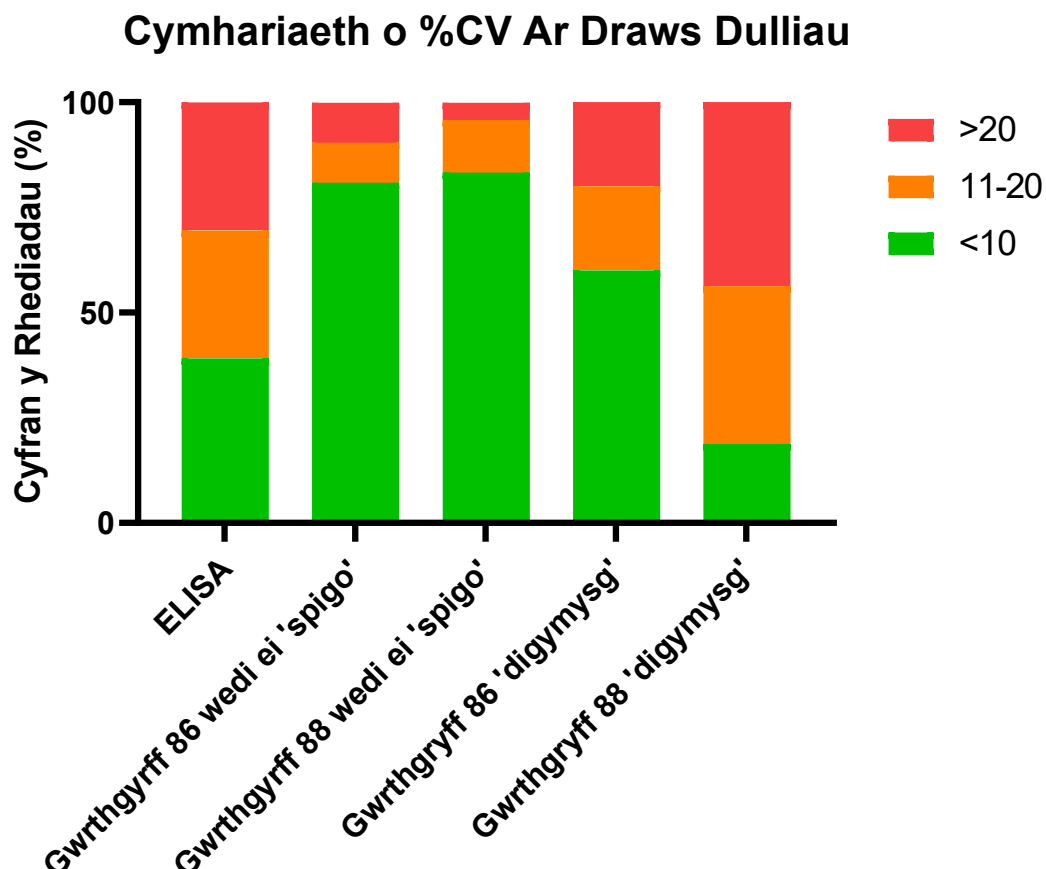
5.3.5.1 Atgynrychioldeb ELISA

Er mwyn asesu atgynrychioldeb y becynnau ELISA dadasyl ac asyl ghrelin (A05106, A05119 yn y drefn honno, Bertin), cynhyrchwyd a dadansoddwyd cromliniau graddnodi ar draws tri rhediad arbrol annibynnol. Roedd hyn yn caniatáu gwerthuso amrywiad o fewn yr prawf (rhwng ffynnon dyblyg o fewn yr un pecyn) ac amrywiad rhyng prawf (rhwng gwahanol citiau ELISA). Cyfrifwyd amrywioldeb o fewn yr prawf gan ddefnyddio mesuriadau ffynnon dyblyg fesul sampl rhoddwr ($n = 23$). Ar gyfer BAMS, aseswyd cywirdeb o fewn yr prawf trwy gymharu arddwysedd signal ar draws tri glain dadansoddol a baratowyd o yr un sampl plasma. Cyfrifwyd CVau ar gyfer pob

cyflwr gan ddefnyddio naill ai Gwrthgorff 86 neu 88 mewn plasma wedi i 'spigo' (n = 21 ac n = 24, yn y drefn honno) neu blasma 'digymysg' (n = 5 ac n = 16, yn y drefn honno). Cyflwynir dadansoddiad amrywioldeb o fewn yr prawf ychwanegol ar gyfer yr ELISA, yn seiliedig ar atchweliad o glain i glain, yn Ffigur Atodol S10. Dangosodd y platfform ELISA atgynrychioldeb cymedrol (Ffigur 5.19), gyda 39.13% o rediadau wedi eu dosbarthu fel rhagorol, a yr gweddill wedi eu rhannu yn gyfartal rhwng derbyniol (30.43%) a gwael (30.43%). Mewn cyferbyniad, dangosodd BAMS gywirdeb sylweddol well, yn enwedig mewn plasma wedi ei 'spigo'. Cyflawnodd Gwrthgorff 86 (wedi ei spigo) 80.95% rhagorol, 9.5% derbyniol, a 9.5% o rediadau gwael. Perfformiodd Gwrthgorff 88 (wedi ei spigo) yn debyg, gyda 83.3% o rediadau yn disgyn i yr categori rhagorol, 12.5% yn dderbyniol, a dim ond 4.1% yn wael.

Mewn plasma 'digymysg', roedd perfformiad BAMS yn amrywio. Cynhaliodd Gwrthgorff 86 atgynrychioldeb da (60% rhagorol, 20% derbyniol, 20% gwael), tra bod Gwrthgorff 88 yn dangos mwy o amrywioldeb, gyda dim ond 18.75% o rediadau wedi eu dosbarthu fel rhagorol, 37.5% yn dderbyniol, a 43.75% yn wael.

At ei gilydd, mae yr canfyddiadau hyn yn dangos bod BAMS yn cynnig atgynhyrchadwyedd o fewn prawf gwell o ei gymharu ag ELISA, pan gaiff ei gymhwyso i samplau wedi ei 'spigo' ond dim o fewn plasma 'digymysg'. Mae yr manylder is a welwyd gyda Gwrthgyrff 88 mewn plasma 'digymysg' yn awgrymu dylanwad effeithiau matrices neu amrywioldeb dadansoddydd mewndarddol ar berfformiad prawf. Gweler Tabl Atodol S2 am gymhariaeth bellach rhwng amrywioldeb ELISA a BAMS.

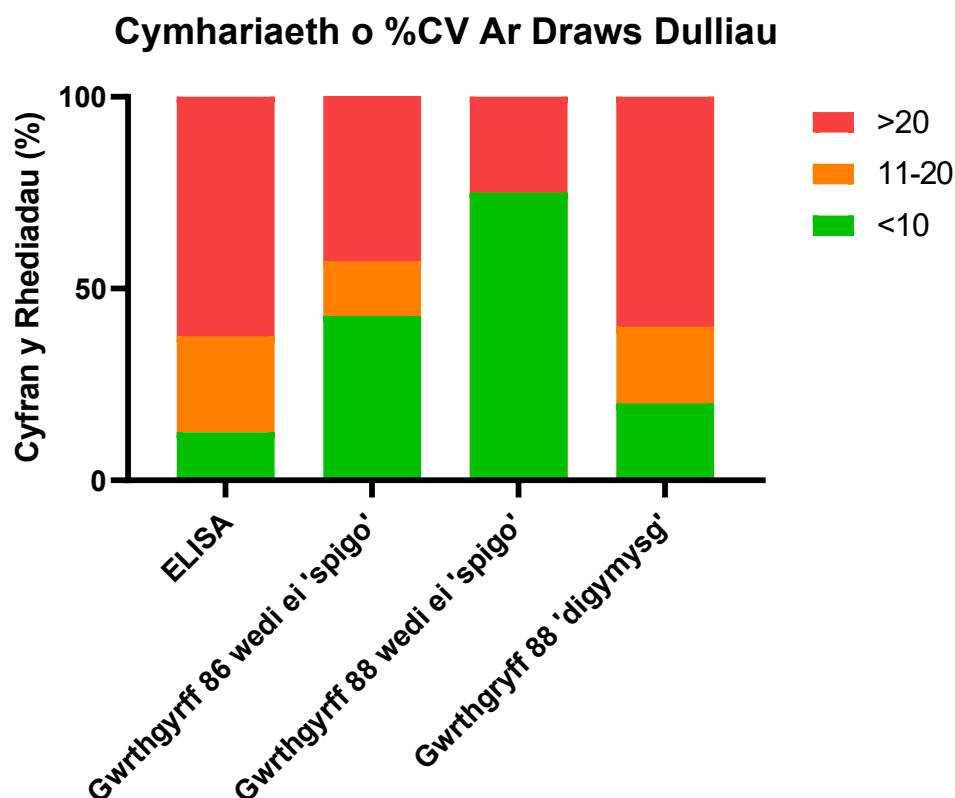


Ffigur 5.19 Cymhariaeth amrywioldeb mewn prawf ar draws dulliau ELISA a BAMS

Catgoreiddiwyd rhediadau dyblyg pob dull yn ôl %CV i dri throthwy ansawdd: $\leq 10\%$ (rhagorol), 11–20% (derbyniol), a $>20\%$ (gwael). Ar gyfer pob categori, cyfrifwyd y ganran trwy rannu nifer y rhediadau oedd o fewn yr ystod %CV honno â chyfanswm nifer y rhediadau mewn prawf ar gyfer y dull hwnnw. Am atgynrychioldeb mewn prawf ychwanegol yn seiliedig ar ddadansoddiad atchweliad fesul glain, gweler Ffigur Atodol S10 a Thabl Atodol S2.

Yn dilyn y gwerthusiad mewn prawf, aseswyd amrywioldeb rhyng prawf i bennu cysondeb pob dull ar draws rhediadau arbrolf lluosog (Ffigur 5.20). Mae Ffigur Atodol S11 yn darparu cymariaethau ychwanegol yn seiliedig ar atchweliad rhwng rhediadau arbrolf i ddangos ymhellach atgynhyrchadwyedd rhyng prawf. Mynegwyd cyfran y CVau o fewn pob categori fel canran o gyfanswm y gwerthoedd rhyng prawf fesul dull. At ei gilydd, cyfrannodd ELISA 8 gwerth CV, roedd gan Wrthgorff 86 (wedi ei 'spigo') 7, roedd gan Wrthgorff 88 (wedi ei 'spigo') 8, ac roedd gan Wrthgorff 88 ('digymysg') 5. Cafodd Gwrthgorff 86 ('digymysg') ei eithrio o yr dadansoddiad hwn oherwydd data annigonol ($n = 1$). Unwaith eto, dangosodd ELISA y radd uchaf o amrywioldeb ar draws rhediadau, gyda dim ond 12.5% o fesuriadau wedi eu dosbarthu fel rhagorol, 25% yn dderbyniol, a 62.5% yn fwy na yr trothwy 20%. I yr gwrthwyneb, dangosodd

dulliau BAMS gywirdeb rhyng prawf gwell. Cyflawnodd Gwrthgorff 86 (wedi ei 'spigo') 42.86% rhagorol, gyda yr canlyniadau sydd yn weddill wedi eu rhannu yn gyfartal rhwng categorïau derbyniol a gwael (14.29% yr un). Dangosodd BAMS gyda Gwrthgorff 88 (wedi ei 'spigo') y perfformiad mwyaf cyson, gyda 75% o werthoedd yn dod o fewn yr ystod ragorol a dim ond 25% yn y categori gwael. I yr gwrthwyneb, dangosodd Gwrthgorff 88 ('digymysg') atgynyrchioddeb is ar draws rhediadau, gyda dim ond 20% rhagorol, 20% derbyniol, a 60% gwael. Mae yr canlyniadau hyn yn atgyfnerthu atgynyrchioddeb uwch BAMS, yn enwedig mewn fformatau wedi ei 'spigo', dros ELISA, tra hefyd yn tynnu sylw at y sefydlogrwydd llai ac yr amrywioldeb cynyddol a welwyd mewn paratodau plasma 'digymysg', yn enwedig gydag Gwrthgorff 88.



Ffigur 5.20 Cymhariaeth amrywioldeb rhyng prawf ar draws dulliau ELISA a BAMS. Cafodd rhediadau pob dull eu categorïddio yn ôl %CV)i dri throthwy ansawdd: $\leq 10\%$ (rhagorol), 11–20% (derbyniol), a $>20\%$ (gwael). Am gymariaethau rhediad-i-rhediad ychwanegol gan ddefnyddio dadansoddiad atchweliad, gweler Ffigur Atodol S11.

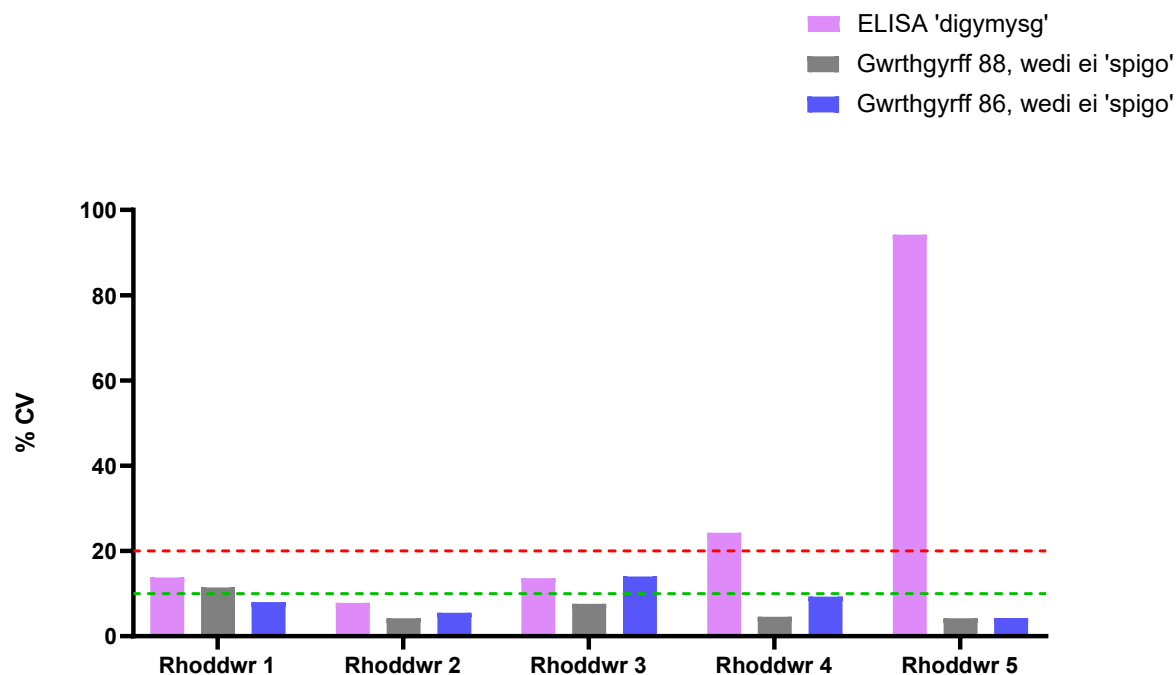
Gyda ei gilydd, mae yr canlyniadau hyn yn dangos bod yr amrywioldeb mewn prawf a rhyng prawf ar ei isaf ar gyfer y dulliau BAMS, yn enwedig wrth ddefnyddio Gwrthgorff 88. Mae yr cysondeb gwell yn awgrymu y gallai BAMS gynnig dull mwy cadarn a

dibynadwy ar gyfer meintioli isoformau ghrelin mewn plasma o ei gymharu ag profion traddodiadol sydd yn seiliedig ar ELISA.

5.3.5.2 Cymhariaeth o Atgynrychioldeb ELISA a BAMS gan Ddefnyddio Plasma gan yr Un Rhoddwyr

Er mwyn cymharu atgynhyrchadwyedd yr prawf yn uniongyrchol o dan amodau biolegol cyfatebol, gwerthuswyd %CVau mewn prawf ar gyfer pum rhoddwr iach ar draws llwyfannau ELISA a BAMS gan ddefnyddio yr un samplau plasma. Darparodd pob rhoddwr plasma tair tyniad gwaed annibynnol. Er bod ELISA wedi ei berfformio ar bob tyniad gwaed, roedd dadansoddiad BAMS wedi ei gyfyngu i yr amodau 'spigo' oherwydd argaeledd gleiniau, gyda data 'digymysg' wedi ei eithrio o yr gymhariaeth hon oherwydd cwmipas rhoddwyr anghyflawn. Perfformiwyd dadansoddiad ELISA dri mis ar ôl dadansoddiad BAMS.

Fel y dangosir yn Ffigur 5.21, dangosodd ELISA amrywioldeb mewn prawf sylweddol fwy ar draws rhoddwyr. Roedd y %Cvau yn amrywio o 7.85% i 94.18%, gyda Rhoddwr 5 yn arddangos yr atgynrychioldeb gwaethaf. Mewn cyferbyniad, cynhyrchodd BAMS gan ddefnyddio Gwrthgorff 86 ganlyniadau mwy cyson (%CVau: 4.3%–14%), a chynhigiodd Gwrthgorff 88 y cywirdeb uchaf ar draws yr holl roddwyr (%CVau: 4.2%–11.4%). Yn nodedig, ar gyfer Rhoddwr 5, yr achos ELISA mwyaf amrywiol, gostyngodd BAMS amrywioldeb mewn prawf fwy nag 20 gwaith. Mae yr gymhariaeth ochr yn ochr hon yn dangos bod BAMS, yn enwedig pan gaiff ei baru ag gwrthgryff 88 mewn samplau wedi ei 'spigo', yn darparu atgynrychioldeb gwell yn sylweddol o ei gymharu ag ELISA wrth ddadansoddi plasma rhoddwr cyfatebol o dan amodau safonol. Cyflwynir dadansoddiad amrywioldeb mewn prawf ychwanegol yn seiliedig ar atchweliad gleiniau-i-gleiniau yn Ffigur Atodol S12.



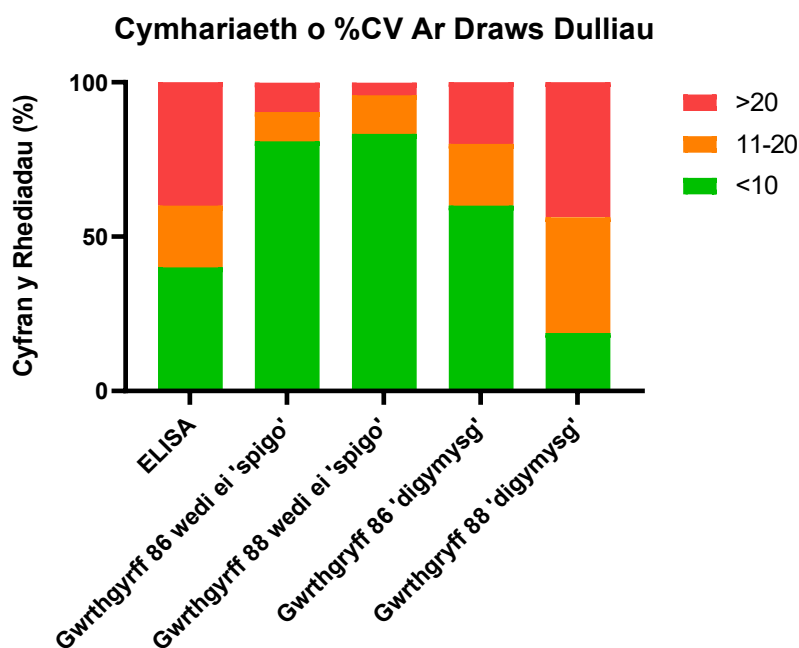
Ffigur 5.21 Cymhariaeth o %CV mewn prawf ar draws gwahanol lwyfannau canfod (ELISA, BAMS gan ddefnyddio Gwrthgorff 86 a Gwrthgorff 88 ar plasma wedi ei 'spigo') ar gyfer pum rhoddwr unigol. Defnyddiwyd %CV canolrif fesul rhoddwr i grynhoi yr amrywioldeb mewn prawf o fewn pob platform. Am atgynrychioldeb mewn prawf ychwanegol yn seiliedig ar ddadansoddiad atchweliad fesul glain, gweler Ffigur Atodol S12.

Er mwyn rhoi persbectif ehangach ar atgynhyrchadwyedd o fewn prawf ar draws yr holl setiau data, gan gynnwys mesuriadau BAMS 'digymysg' rhannol gyflawn, grwpwyd rhediadau dyblyg o bob platform yn dair categori %CV wedi eu diffinio ymlaen llaw: $\leq 10\%$ (rhagorol), 11–20% (derbyniol), a $>20\%$ (gwael). Yna cyfrifwyd cyfran y rhediadau dyblyg o fewn pob categori i hwyluso cymhariaeth uniongyrchol draws-lwyfan o gywirdeb prawf (Ffigur 5.22).

Yn gyson ag arsylwadau cynharach, dangosodd ELISA yr amrywioldeb rhwng prawf uchaf, gyda dim ond 40% o rediadau yn cyflawni cywirdeb rhagorol a chyfran sylweddol (40%) yn disgyn i yr ystod atgynhyrchadwyedd gwael. Mewn cyferbyniad, dangosodd BAMS gysondeb gwell yn sylweddol, yn enwedig yn y fformatau plasma wedi ei 'spigo', lle roedd dros 80% o rediadau yn bodloni i yr trothwy rhagorol ar gyfer Gwrthgorff 86 ac 88. Dangosodd samplau BAMS 'digymysg' fwy o amrywioldeb; tra bod Gwrthgorff 86 yn cynnal atgynhyrchadwyedd da yn gyffredinol, dangosodd rhediadau 'digymysg' Gwrthgorff 88 ddirywiad nodedig mewn cywirdeb, gan

adlewyrchu dylanwadau posibl o gymhlethdod matrices sampl neu ddata dyblyg cyfyngedig.

Mae yr canlyniadau hyn yn atgyfnerthu perfformiad o fewn prawf uwch BAMS o ei gymharu ag ELISA, yn enwedig wrth ddefnyddio protocolau gwrthgyrff wedi ei 'spigo'. Maent hefyd yn tynnu sylw at yr heriau a achosir gan samplau plasma 'digymysg', lle gall effeithiau matrices a lefelau dadansoddydd is leihau cysondeb yr prawf.



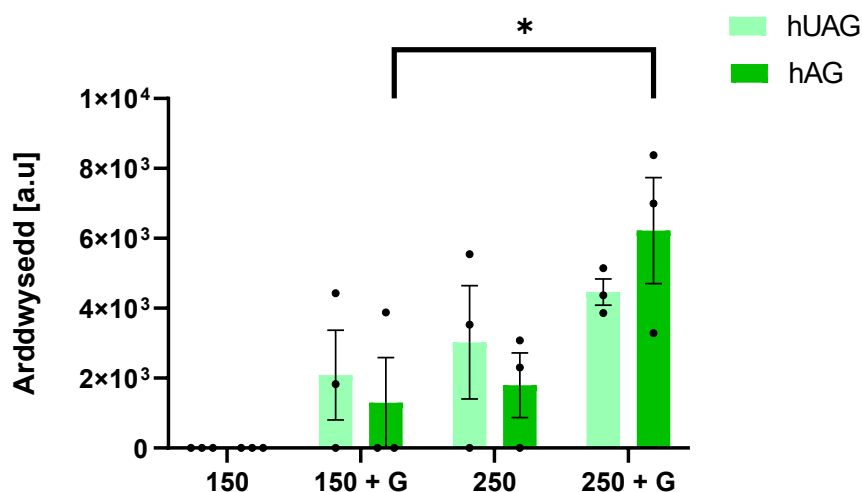
Ffigur 5.22 Cymhariaeth amrywioldeb mewn prawf ar draws dulliau ELISA a BAMS.

Catgoreiddiwyd rhediadau dyblyg pob dull yn ôl %CV i dri throthwy ansawdd: $\leq 10\%$ (rhagorol), 11–20% (derbyniol), a $>20\%$ (gwael). Ar gyfer pob categori, cyfrifwyd y ganran trwy rannu nifer y rhediadau oedd o fewn yr ystod %CV honno â chyfanswm nifer y rhediadau mewn prawf ar gyfer y dull hwnnw.

At ei gilydd, mae yr data yn dangos bod asesiadau BAMS, yn enwedig wrth ddefnyddio samplau plasma wedi ei 'spigo' gydag gwrthgyrff 88, yn cynnig atgynyrchioldeb o fewn prawf gwell o ei gymharu ag ELISA confensiynol. Cynhaliodd BAMS gywirdeb uwch, gan danlinellu ei botensial fel platfform mwy dibynadwy ar gyfer canfod rhywogaethau ghrelin mewn plasma dynol. Fodd bynnag, mae yr cysondeb llai a welwyd mewn asesiadau BAMS plasma 'digymysg' yn tynnu sylw at yr angen i ystyried effeithiau matrices sampl ac amodau prawf wrth ddehongli canlyniadau. Mae yr canfyddiadau hyn yn cefnogi blaenoriaethu BAMS gyda fformatau gwrthgyrff wedi ei 'spigo' ar gyfer meintioli ghrelin cadarn ac atgynhyrchadwy mewn astudiaethau yn y dyfodol.

5.3.6 Lleihau Cyfaint Plasma

Mae yr holl samplau plasma sydd yn deillio o gleifion yr ydym yn eu dadansoddi yn ein labordy yn adnoddau gwerthfawr. Fodd bynnag, hyd yn oed yn fwy gwerthfawr, ac yn anodd eu cael yw samplau a gawn o yr clinigau PD canolog, a thrwy hynny byddai lleihau maint y sampl a ddefnyddir fesul arbrawf yn cael effaith fawr ar y dadansoddiadau y gallwn eu perfformio. Yn y broses o ddilysu yr defnydd o BAMS, dewisom gymharu yr ELISA sydd wedi ei hen sefydlu ac a ddefnyddir yn eang. Ar hyn o bryd, mae yr prawf BAMS yn defnyddio 250 μL fesul sampl i ddadansoddi dadasyl ac asyl ghrelin, tra bod pecyn ELISA yn defnyddio 140 μL yn gyffredinol ar gyfer dadasyl ac asyl ghrelin. Felly, ceisiais ddilysu yr defnydd o BAMS gyda chyfaint plasma cychwynnol is. O ganlyniad, cymharwyd samplau plasma gyda ghrelin alldarddol a hebddo ar gyfaint o 150 μL neu 250 μL . Yn yr un modd ag o yr blaen, ychwanegwyd ghrelin alldarddol ar grynodiad o 1 ng/100 μL . Ni chanfuwyd unrhyw ghrelin mewndarddol o fewn y cyfaint sampl 150 μL , tra bod ghrelin mewndarddol i yw ganfod wrth ddefnyddio cyfaint sampl o 250 μL (Ffigur 5.23). Yn y plasma wedi ei 'spigo' gyda ghrelin dynol alldarddol, bu cynnydd sylweddol ($P < 0.05$) mewn asyl ghrelin dynol yn y 250 μL o ei gymharu â yr gyfaint 150 μL .



Ffigur 5.23 Cymhariaeth o ganfod ghrelin gan ddefnyddio cyfeintiau plasma cychwynnol gwahanol.

Dadansoddwyd cyfeintiau plasma 150 μL neu 250 μL gan BAMS (Gwrthgorff 88) naill ai o fewn plasma 'digymysg' neu 'plasma wedi ei spigo' a oedd yn cynnwys ychwanegu ghrelin dynol (+hG) ar 1 ng/100 μL . Perfformiwyd ANOVA dwy ffordd gyda chywiriadau Tukey. Ystyrir bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. $N = 3$, cyfartaledd cymedrig wedi ei blotio gyda SEM. * $P < 0.05$.

5.4 Trafodaeth a Chasgliad

Nod y bennod hon oedd 1) optimeiddio dull BAMS a all ganfod ghrelin dynol mewndarddol a 2) asesu yr perfformiad rhwng prawf BAMS ag ELISA. Dangosodd canlyniadau yr astudiaeth hon y gallai BAMS ganfod ghrelin dynol mewndarddol yn llwyddiannus gydag atgynhyrchadwy da, er bod terfyn canfod ar hyn o bryd. Ymhellach, o yr canlyniadau, sylwyd bod atgynrychioldeb BAMS ar yr un lefel ac mewn mannau well na pecyn ELISA, er bod sensitifrwydd ELISA yn fwy. Mae yn bwysig nodi, yn unol ag argymhellion y gwneuthurwr a yr arfer safonol, bod mesuriadau ELISA wedi eu cynnal yn ddyblyg (hynny yw ar dau ffynnon fesul sampl). Mewn cyferbyniad, defnyddiodd yr prawf BAMS dri glain fesul sampl ar gyfer dadansoddiad cymharol. Er bod trefniant tair glain yn caniatáu asesiad atgynhyrchadwyedd mwy llym, mae yr fformat dau ffynnon a ddefnyddir yn ELISA yn gadael ychydig mwy o le i amrywioldeb yn ei hanfod. Fodd bynnag, o ystyried bod yr ELISA yn ddull sefydledig, dilys a bod dau ffynnon fesul sampl yn safon a dderbynnir yn eang ac a gyhoeddwyd, defnyddiwyd y fformat hwn i alluogi cymhariaeth deg a chynrychioliadol rhwng yr ELISA sefydledig a yr dull BAMS newydd. Prif gyfyngiad yr astudiaethau hyn oedd argaeledd gleiniau, a oedd yn rhwystro profi meintiau sampl mwy a chmau optimeiddio pellach, a drafodir isod.

Roedd cyflwyno ISTD yn heriol, gyda defnyddio llygoden fawr fel ISTD mewn rhai achosion yn cael effaith negyddol ar prawf BAMS trwy lesteirio signal ghrelin dynol yn ystod dadansoddiad MS. Mewn achosion eraill, nid oedd modd canfod y llygoden fawr ISTD, sydd yn awgrymu diffyg rhwymiad i yr gwrthgorff. Cafodd ghrelin ei ddadansoddi yn flaenorol gan IP-MS ar MALDI-TOF, lle defnyddiwyd peptidau sefydlog dynol â label isotopau a heb eu labelu fel ISTD ar gyfer plasma llygoden fawr (Gutierrez et al., 2005). Mae yr cysyniad hwn yn debyg i yr un a brofir yma, er yn ein hachos ni, roedd yr anawsterau o rwymo llygoden fawr a dynol i yr un gwrthgorff yn anodd. Defnyddiwyd Gutierrez et al. (2005), gwrthgyrff gyda penodolrwydd ar gyfer terfynfa carbocsyl y peptid ghrelin, a oedd yn rhwymo i gleiniau magnetig. Yn anffodus, ni ddatgelwyd fecanwaith rhwymo yr gwrthgyrff a ddewiswyd gan Adeptrix i ni. Bydd dealltwriaeth ddyfnach o yr gwrthgyrff ddewiswyd Adeptrix ar gyfer pecyn BAMS ghrelin yn helpu i wella ein dealltwriaeth o yr diffyg rhwymiad i ghrelin llygoden fawr a sut i fynd i yr afael a / neu fynd ar drywydd gwrthgyrff amgen a allai rwymo i wahanol feysydd o yr peptid. Fodd bynnag, defnyddio ISTD dynol wedi ei labelu â isotop fyddai yr opsiwn gorau ar

gyfer ISTD (Thomas et al., 2021). Gan y byddai yr safon ghrelin dynol wedi ei labeli â isotop yn agosach o ran strwythur i yr ghrelin dynol, Mae yn debygol o gael llai o broblemau o ran rhwymo. Yn ogystal, mae astudiaethau wedi dangos yn flaenorol bod safonau wedi ei labeli â isotop yn lleihau ataliad ïon a chynyddu cywirdeb dulliau ac atgynrychioldeb o ei gymharu â ISTD analog strwythurol (Lanckmans, K., Sarre, S., Smolders, I., a Michotte, Y. 2007; Stokvis, Rosing, a Beijen 2005; Piórkowska, Musijowski, J., Buś-Kwaśnik, K., a Rudzki 2017).

Cynhyrchwyd cromliniau graddnodi gan ddefnyddio un rhywogaeth ddynol yn erbyn y llall fel ISTD, i asesu terfyn canfod ghrelin yn yr prawf BAMS. Gan ddefnyddio yr dull hwn, y terfyn canfod ar gyfer asyl ghrelin dynol oedd 312 pg/mL ar gyfer pecyn gwrthgyrff 86, tra bod terfyn canfod ar gyfer pecyn gwrthgyrff 88 yn 40 pg/mL. Llwyddodd y ddau wrthgyrff 86 ac 88 i ganfod ghrelin dynol dadasyl ghrelin i lawr i lefelau o 20 pg/mL. Mewn cymhariaeth, adroddwyd yn flaenorol o fewn llenyddiaeth bod lefelau gweithio ghrelin IP-MS yn 375 i 3750 pg/mL ar gyfer asyl ghrelin, tra bod dadasyl ghrelin wedi ei adrodd yn 211-2109 pg/mL (Gutierrez et al., 2005). O ganlyniad, llwyddodd fy mhrosiect i ganfod dadasyl ac asyl ghrelin ar lefelau is nag a ddisgrifiwyd yn flaenorol ar gyfer prawf tebyg yn seiliedig ar imiwnedd. Mewn asesiad amgen nad yw yn seiliedig ar imiwnedd a ddefnyddiodd LC-MS/MS, sylwyd bod terfyn y lefel ganfod yn 30 pg/mL ar gyfer dadasyl ac asyl ghrelin gyda chymhareb signal-i-sŵn (S/N) o 3, tra bod lefelau meintioli yn 50 pg/mL gyda S/N o 10 (Thomas et al., 2021). Mewn samplau cleifion dynol iach, mae lefelau asyl ghrelin yn amrywio o 0 i 200 pg/mL, tra bod dadasyl ghrelin yn amrywio o 100 i 1500 pg/mL (Tong J, Dave N, Mugundu GM et al. ac Eslami et al., 2016). O ganlyniad, mae angen optimeiddio yr dull BAMS presennol er mwyn cynyddu sensitifrwydd er mwyn gallu cystadlu â phrofion fel yr ELISA, sydd yn gallu canfod hyd at 2 pg/mL.

Maes arall sydd angen ei optimeiddio ymhellach yw cyfaint y plasma sydd yn cael ei ddefnyddio. Yn fy astudiaethau i, defnyddiwyd 250 µL o plasma, gan ganiatáu adnabod asyl ac dadasyl ghrelin yn llwyddiannus. Er bod angen 180 µL o plasma yn y citiau ELISA Bertin a ddefnyddir yn ein labordy ar gyfer asyl ac dadasyl ghrelin. Felly, er mwyn gwella effeithiolrwydd y cit BAMS, byddai lleihau yr defnydd o plasma i 150 µL yn fanteisiol. Er ei fod wedi ei archwilio yn fyr yn y bennod hon, roedd yr ymchwiliad yn cynnwys asesu lefelau ghrelin gan ddefnyddio cyfaint plasma llai o 150 µL o ei gymharu â 250 µL. Wrth ddadansoddi cyfeintiau plasma o 150 µL wedi ei 'spigo' â

ghrelin dynol alldarddol (crynnodiad 1 ng/100µL), roedd modd canfod y ddau rywogaeth o ghrelin dynol. Fodd bynnag, dangosodd asyl ghrelin dynol ostyngiad sylweddol ($P < 0.05$) yn y gyfaint 150 µL o ei gymharu â yr gyfaint 250 µL o plasma. Gan fod y ddau gyfrol yn cynnwys yr un crynnodiad o ghrelin alldarddol wedi ei 'spigo' (1 ng/100µL), mae yn debyg bod yr anghydraddoldeb a welwyd yn cael ei briodoli i lefelau uwch o ghrelin mewndarddol mewn 250 µL o plasma. Yn dilyn trafodaethau gyda cydweithwyr yn Adeprix, awgrymasant y byddai defnyddio cyfaint plasma mor isel â 100 µL yn ymarferol pe bai nifer y gleiniau a ddefnyddir fesul sampl yn cael ei gynyddu i 6. Mae hyn yn bwysig i yw brofi, fodd bynnag, roedd oedi wrth gyflenwi gleiniau ychwanegol yn golygu nad oedd amser i archwilio hyn ymhellach. Er gwaethaf diffyg ISTD effeithiol, perfformiwyd profion ymchwiliol o becynnau gwrthgyrff.

Pwrpas gweithredu ISTD yw i gywiro am amrywioldeb mewn gwanediadau, gwella dilysu dulliau, ac asesu perfformiad offerynnau. Yn ein hachos ni, achosodd ychwanegiad ISTD (ghrelin llygoden fawr) ataliad i y rhywogaeth ghrelin ddynol neu mewn rhai achosion, oedd yr ISTD yn anghyfiawnadwy, yn ôl pob tebyg oherwydd rhwymo gwrthgyrff gwahaniaethol neu ymyrraeth matrices. Yn yr un modd, dadansoddodd astudiaeth gan Stokvis et al. y defnydd o wahanol ISTDau ar gyfer atalydd tiwbulin (D-24851) a chanfod bod y meintioli heb ISTD wedi arwain at ganlyniadau gwell. Achosodd gweithredu ISTD yn eu hachos nhw broblemau gyda chywirdeb a manylder a achoswyd gan ataliad ïonau (Stokvis et al., 2004). Mae hyn yn tynnu sylw at rôl hanfodol ymdrechion cydweithredol rhwng y byd academiaidd ac yr diwydiant, yn enwedig wrth weithio gydag adweithyddion perchnogol fel gwrthgyrff Adeprix, nad yw eu safleoedd rhwymo yn cael eu datgelu. Mae didreiddedd o yr fath yn cyfyngu ar y gallu i ddylunio ISTDau yn rhesymol neu ddehongli perfformiad prawf annisgwyl. Byddai peptid ghrelin dynol wedi ei ddadwttereiddio yn cynrychioli yr safon aur, gan ganiatáu ar gyfer meintioli a chywiro manwl gywir ar gyfer colli sampl neu effeithiau matrices. Wrth symud ymlaen, rhaid blaenoriaethu datblygu gwrthgyrff a safonau peptid wedi eu mapio gan epitopau wedi eu nodweddu yn llawn os yw BAMS i gael ei fabwysiadu fel prawf biofarcwyr sydd yn hyfyw yn glinigol. Mae hyn hefyd yn tanlinellu gwers dadasyl ghrelin ehangach: er mwyn i ddatblygu pontio rhwng biofarcwyr darganfod a diagnosteg, mae tryloywder prawf llawn a piblinell dilysu ar y cyd yn hanfodol.

Profwyd perfformiad MALDI-TOF bob dydd gyda graddnodi cyn dadansoddi. Hefyd, profwyd swm hysbys o asyl ac dadasyl dynol alldarddol pob tro i wirio perfformiad. Ar gyfer yr prawf BAMS, rhoddodd ein cydweithwyr ddau becyn gwrthgorff posibl inni, gwrthgorff 86 ac gwrthgorff 88. Gwnaethom ddadansoddiad cymharol o yr ddau becyn gwrthgorff i ddewis yr gwrthgorff mwyaf priodol.

At ei gilydd, datgelodd yr asesiad fod y ddau wrthgorff wedi dangos canlyniadau cymharol ar gyfer darlleniadau arddwysedd AG:UAG. Fodd bynnag, dangosodd gwrthgorff 88 atgynrychioldeb a chywirdeb gwell yn gyson. Tynnodd gwerthusiad y samplau plasma wedi ei 'spigo' sylw at gysondeb ac atgynrychioldeb gwrthgorff 88 o ei gymharu ag gwrthgorff 86. Un duedd a ddangoswyd yn yr atgynrychioldeb rhwng echdynnu gwahanol rodwyr ar gyfer gwrthgyrff wedi ei 'spigo' 88 ac 86 (gweler Tabl Atodol S1 a Ffigur S4), oedd gwerth R^2 is ar gyfer rhediad 3. Amlygodd Tabl Atodol S1 fod y gwerth is o R^2 wedi ei gael gan roddwyr 1 a 2, tyniad gwaed 1. Yma, cafodd rhediadau 1 a 2 werthoedd tebyg tra bod rhediad 3 yn wahanol. Amlygodd ymchwiliadau i yr dyddiadau y perfformiwyd y rhediadau hyn fod y ddau rediad cyntaf ar gyfer rhoddwr 1 a 2, tyniad gwaed 1, wedi eu perfformio ym mis Chwefror 2023 tra bod rhediad 3 a gweddill yr arbrefion wedi eu perfformio ddiwedd mis Ebrill-Mehefin 2023. Yn ystod y cyfnod hwn, gwnaed addasiad bach o fewn y protocol oherwydd pryderon ynghylch dadhyradu yr gleiniau. Mae yn gredadwy bod yr addasiad hwn wedi dylanwadu ar y gwerthoedd cymhareb is a welwyd yn rhediadau 1 a 2 o roddwr 1, tyniad gwaed 1. Yn olaf, o ystyried bod hwn yn brotocol newydd, mae yn bosibl y gallai gwelliannau mewn techneg rhwng fframiau amser Chwefror ac Ebrill gyfrif am y perfformiad gleiniau gwell a welwyd yn y rhediadau diweddarach. Gwelwyd hefyd fod asyl ghrelin yn cael ei ganfod o bryd i yw gilydd ar lefelau sydd yn agos at y gymhareb signal-i-sŵn (Ffigur Atodol S4), a newidiodd ddarlleniadau yr gymhareb AG:UAG ac arweiniodd at werthoedd CV is. Penderfynwyd ar y gymhareb signal-i-sŵn gan ddilyn protocol sefydledig y cwmni, gan ddefnyddio trothwy o 1.5. Fodd bynnag, gallai addasu yr trothwy cymhareb signal-i-sŵn i 3 (Thomas et al., 2021) atal achosion o yr fath gan ei fod yn cynyddu ystyrllonder signal.

Fel y nodwyd yn y cyflwyniad i yr bennod hon, mae technegau sydd yn seiliedig ar IP yn aml yn wynebu heriau atgynhyrchadwyedd a penodolrwydd oherwydd amrywioldeb gwrthgyrff. Yn yr astudiaeth hon, fe geisiom fynd i yr afael â hyn trwy werthuso dau

becyn gwrthgyrff gwahanol (gwrthgorff 86 ac 88) am eu perfformiad wrth ddal rhywogaethau ghrelin dynol gan ddefnyddio dull '*in vitro*', strategaeth safonol wrth ddatblygu biofarcwyr. Mae yr asesiadau cymharol hyn yn hanfodol wrth ddilysu sensitifrwydd a penodolrwydd gwrthgyrff cyn cyfieithu clinigol. Mae camau dilysu '*in vitro*' o yr fath yn cyd-fynd â fframweithiau cymhwyster biofarcwyr a ddefnyddir mewn lleoliadau academiaidd a diwydiannol, lle mae yn rhaid asesu penodolrwydd, atgynhyrchadwyedd, a chymhareb signal-i-sŵn yn drylwyr cyn symud ymlaen i astudiaethau carfanau mwy neu dreialon dilysu clinigol. Yma, dangosodd gwrthgorff 88 atgynhyrchadwyedd uwch, gan awgrymu targedu epitop neu affinedd rhwymo gwell, er bod y manylion epitop na datgelwyd yn parhau i fod yn gyfyngiad i fewnwelediad mecanistig llawn.

Ar y cyfan, roedd gan samplau plasma wedi ei 'spigo' a oedd yn dadansoddi yr gymhareb AG:UAG werthoedd CV is o ei gymharu â samplau plasma 'digymysg'. Mae yr samplau plasma wedi ei 'spigo' yn cynnwys newidyn ychwanegol ar gyfer gwall dynol yn ystod y paratoad neu ychwanegiad o yr ghrelin alldarddol i greu yr sampl wedi ei 'spigo'. Er gwaethaf hyn, mae yr gwerthoedd CV is o fewn y samplau plasma wedi ei 'spigo' yn awgrymu gwall dynol lleiaf posibl drwy gydol y protocol. Mae gwerthoedd CV uwch yn y sampl plasma 'digymysg' yn fater o sensitifrwydd pan fydd lefelau ghrelin yn disgyn yn agos at neu islaw yr terfyn canfod, gan arwain at werthoedd CV gwael neu werthoedd na ellir eu darllen.

Dangosodd cymhariaeth rhwng yr prawf BAMS a phecyn ELISA masnachol botensial yr BAMS i berfformio i yr un safon pan nad oedd lefelau peptid yn isel. Dangosodd BAMS atgynrychioldeb cymharol, ac weithiau yn well, wrth ddal ghrelin, yn enwedig mewn samplau wedi ei 'spigo'. Un agwedd nodedig yw y gall y pecyn ELISA ganfod asyl ghrelin yn llwyddiannus ar lefelau isel o 2 pg/mL a gallu canfod lefelau asyl ghrelin ym mhob rhoddwr. Mae hyn yn cyferbynnu ar BAMS, na chyflawnodd yr un lefel o sensitifrwydd. Byddai optimeiddio yr prawf BAMS i gyflawni terfyn canfod is gwell yn galluogi cymhariaeth fwy uniongyrchol o yr ddau dull. Yn ogystal, dylid nodi cafodd ELISA ei gynnal tua thri mis ar ôl yr arbrofion BAMS. Er bod y ddau wedi defnyddio samplau plasma a oedd wedi eu storio o dan amodau union yr un fath, gall yr oedi wrth ddadansoddi gyflwyno amrywioldeb amserol neu sydd yn gysylltiedig â storio. Serch hynny, mae hyn yn adlewyrchu senario realistig mewn llif gwaith ymchwil lle mae prosesu swp ac argaeledd offer yn aml yn gorfodi gwahaniad amserol rhwng

profion. Er gwaethaf hyn, roedd canlyniadau ELISA yn dal i alinio yn dda â yr crynodiadau disgwylidig mewn plasma mewndarddol, gan awgrymu bod cyfanrwydd y sampl wedi ei gynnal i raddau helaeth. Yn bwysig, dylai unrhyw gymhariaeth rhwng y ddau blatfform ystyried y ffactorau amserol hyn, yn enwedig mewn perthynas â diraddio peptid ac atgynhyrchadwyedd prawf dros amser. Er bod ELISA yn parhau i fod y safon aur ar gyfer mesur ghrelin oherwydd ei sensitifrwydd (i lawr i 2 pg/mL), mae yn gyfyngedig o ran gallu amblecsio ac yn aml mae angen cyfrolau plasma mwy. Er ei fod yn llai sensitif ar hyn o bryd, dangosodd BAMS atgynhyrchadwyedd cymharol mewn samplau wedi ei 'spigo' ac mae yn cynnig y potensial ar gyfer dadansoddiad amblecs o un sampl, mantais mewn paneli biofarcwyr. Ar gyfer canfod asyl ghrelin, sydd yn arbennig o ansefydlog, mae yr driniaeth cyn-ddadansoddol lai a yr darlleniad MALDI-MS uniongyrchol yn cynnig risgiau diraddio llai o ei gymharu ag ELISA. Fodd bynnag, nes bod trothwy canfod is BAMS yn agosáu at drothwy ELISA, mae ei ddefnyddioldeb fel offeryn diagnostig annibynnol yn parhau i fod yn gyfyngedig. Er mwyn dod yn ddewis arall hyfyw, rhaid i lifau gwaith BAMS gael gwelliannau sensitifrwydd, o bosibl trwy gynyddu cyfrif gleiniau, integreiddio ISTD deuredig, a gwell dewis gwrthgyrff.

Yn flaenorol, mae yr dechneg BAMS wedi asesu ffosfforyleiddiad safle-benodol ffactor cychwyn ewcariotig 4E-rhwymo 1 a phrotein ribosomal S6 mewn ymateb i driniaethau ysgogol fel effeithiau atalydd cinas. Fe ei defnyddiwyd hefyd i broffilio ffactorau trosglwyddiad a reoleiddir gan cytocin dethol ac addasiadau protein histon H3 (Hamza et al., 2020). Yn wahanol i fy dull o BAMS, sydd yn dal proteinau o plasma, yn yr astudiaethau cyhoeddedig hyn cafodd y proteinau eu dal o lysadau celloedd. Mae yr dull hwn yn dangos llwyddiant wrth ddal ac adnabod yr holl broteinau ond i nodi bod y proteinau a dynnwyd o lysadau celloedd yn 100-200 µg o ei gymharu, ein terfyn canfod isaf yw 0.32 µg ar gyfer asyl neu 0.04 µg ar gyfer dadasyl ghrelin. Mae hyn yn dangos llwyddiant y BAMS ar grynodiad uwch.

Ar wahân i yr dechneg BAMS, mae dulliau dadansoddol i fesur biofarcwyr AD plasma wedi eu datblygu yn ystod y degawdau diwethaf, i gynnig dewisiadau amgen i yr ELISA. Un o yr technolegau cyntaf i gynnig dewis arall oedd defnyddio technolegau proffilio dadansoddi lluosog (xMAP) a allai, yn debyg i yr BAMS, fesur isoformau Aβ40, Aβ42, cyfanswm tau, a pTau ar yr un pryd (Herskovtis, Locascio, Peskind a Hyman 2013). Llwyddodd asesiadau xMAP lled-awtomataidd Luminex i sicrhau sensitifrwydd

uwch na yr ELISA ond adroddwyd am atgynhyrchadwyedd gwael yr asesiad ar draws gwahanol labordai (Song, Poljak, Valenzuela, Mayeux, Smythe a Sachdev 2011). Yn ogystal, datblygwyd prawf imiwno amsugol moleciwl sengl sydd yn gysylltiedig ag ensymau (SIMOA) i ganfod biofarcwyr AD. Gall SIMOA ganfod crynodiadau protein ar grynodiadau femtogram o ei gymharu ag ELISA a all ganfod ar grynodiadau picogram (Wilson et al., 2016; Kuhle et al., 2016). Er gwaethaf ei lwyddiant, mae yr SIMOA yn gostus ac felly nid yw yn opsiwn hyfyw ar hyn o bryd i lawer o grwpiau labordy. O ran defnyddio IP-MS i fesur biofarcwyr plasma, dangoswyd llwyddiant gyda meintoli protein dibynadwy ar gyfer A β a pTau pan gânt eu rhyngwynebu ag LC-MS (Janelidze et al., 2022; Hu et al., 2022). Yn ogystal, mae rhai o yr asesiadau hyn wedi cael eu defnyddio fel Profion a Ddatblygwyd mewn Labordy (LDT) yn yr Unol Daleithiau (Janelidze et al., 2021, Quest Diagnostics). Defnyddiodd Janelidze et al. dull sydd yn seiliedig ar IP-MS a ddatblygwyd ym Mhrifysgol Washington (IP-MS-WashU). Mae yr dull hwn yn cynnwys rhoi 1 ng o tau 2N4R ailgyfunol wedi ei labelu â 15N fel ISTD mewn samplau plasma, ac yna paratoi sampl o waddodi yr protein, SPE, a lyoffilio gan 'SpeedVac'. Ar ôl paratoi yr sampl, cafodd y samplau eu himiwnowaddodi ('immunoprecipitated') ag gwrthgyrff Tau1 a Hj8.5 ac eu treulio â trypsin. Cafodd y treuliadau eu 'spigo' â 50 a 5 fmol o peptid heb ei ffosfforyleiddio ac ei ffosfforyleiddio ac eu puro gan SPE pellach. Cafodd yr echludiad ei lyoffilio ac ei ail-hydoddi mewn 25 μ L o 2% asetonitril a 0.1% asid fformig mewn dŵr gradd MS, cyn dadansoddiad nano-LC-MS (Barthelemy et al., 2020). Er gwaethaf llwyddiant IP-MS wedi ei ryngwynebu ag LC-MS, mae yr dulliau hyn yn dal i fod angen protocol paratoi samplau sydd yn llafurddwys, gan dynnu sylw at yr angen am prawf IP-MS sydd yn lleihau camau beichus, fel BAMS. Roedd y penderfyniad i ddefnyddio yr fformat BAMS-MALDI yn hytrach na llif gwaith BAMS-LC-MS yn seiliedig ar sawl ystyriaeth ymarferol a methodolegol. Yn gyntaf, roedd platfform BAMS-MALDI yn darparu cydnawsedd uniongyrchol â thechnoleg Adeptrix BAMS heb yr angen am optimeiddio LC helaeth na gwanhau samplau, a allai beryglu peptidau nifer isel fel asyl ghrelin. Yn ail, mae MALDI-TOF yn darparu caffael cyflym a chadernid mewn amgylcheddau trwybwn uchel, ystyriaeth hanfodol ar gyfer gweithredu diagnostig posibl. Er bod LC-MS/MS yn cynnig sensitifrwydd ac ystod ddeinamig uwch, mae fel arfer yn gofyn am baratoi samplau mwy cymhleth, amser rhedeg estynedig, ac arbenigedd technegol, sydd yn cyfyngu ar ei raddadwyedd ar gyfer diagnosteg glinigol arferol. O ystyried y cyfaddawd

rhwng symlirwydd a sensitifrwydd, mae BAMS-MALDI yn cyflwyno canolbwynt pragmatig a allai, gydag optimeiddio pellach, bontio llifau gwaith ymchwil a diagnostig.

Gan edrych ymlaen, mae integreiddio IP ag MS yn cyflwyno llwybr addawol ar gyfer datblygu biofarcwyr diagnostig. Er bod dulliau IP-MS traddodiadol yn llafurddwys, mae BAMS yn cynnig platfform symlach, lled-awtomataidd gyda chynhwysedd amblecs a thrin samplau llai. Fodd bynnag, er mwyn iddo wasanaethu fel offeryn diagnostig cyfieithu, rhaid mynd i yr afael â sawl her: penodolrwydd a datgeliad gwrthgyrff, safoni rheolaethau mewnol, ac atgynhyrchadwyedd prawf ar draws labordai. Yng nghydestun clefydau niwrodirywiol, lle mae paneli aml-ddadansoddydd (er enghraifft, ghrelin, A β , tau, NfL) yn gynyddol angenrheidiol, gallai platfform BAMS amblecs gyda sensitifrwydd wedi ei optimeiddio ddarparu datrysiad diagnostig sydd ar y allu i graddio a chadarn. Dylai gwaith yn y dyfodol gynnwys profi BAMS mewn carfannau mwy, asesu ei atgynhyrchadwyedd ar draws gwahanol safleoedd, a mireinio yr llif gwaith i leihau cyfaint plasma a chynyddu trwybwn, gan osod y llwyfan yn y pen draw ar gyfer cymeradwyaeth reoleiddiol a mabwysiadu clinigol.

I grynhoi, mae BAMS yn darparu dull addawol ar gyfer dadansoddi ghrelin mewn samplau plasma sydd â yr potensial i ragori ar ddulliau cyfredol. Yn ogystal, mae gan y dechnoleg BAMS alluoedd amblecsio a fyddai yn caniatáu dadansoddi biofarcwyr ychwanegol (er enghraifft, AB, Tau, NfL) o un sampl plasma. Dylai protocolau BAMS yn y dyfodol ystyried cynnwys y biofarcwyr sefydledig hyn ochr yn ochr â ghrelin i roi gwell dealltwriaeth o yr clefyd.

Pennod

6. Trafodaeth Gyffredinol

6.1 Casgliadau a Thrafodaeth

Drwy gydol fy ngwaith doethuriaeth, fy amcan oedd i optimeiddio dull sbectrometreg màs gyda sensitifrwydd i ganfod peptidau mewndarddol. Roedd optimeiddio yr dull ar gyfer pob techneg MS benodol, MALDI-TOF, LC-MS, a BAMS yn hir; fodd bynnag, datblygwyd dulliau a nododd peptidau alldarddol yn llwyddiannus ond oedd yn brin o ran canfod peptidau ghrelin mewndarddol, naill ai oherwydd cymhlethdodau wrth baratoi sampl neu gyda chyfyngiad ar ganfod a materion sensitifrwydd.

Roedd y bennod LC-MS (pennod 4) yn canolbwyntio yn llwyr ar ddatblygu ac optimeiddio dull sensitif o ganfod ghrelin mewndarddol gan ddefnyddio dulliau o yr gwaelod i fyny ac o yr brig i lawr. Canfu yr dull o yr brig i lawr peptidau ghrelin cyfan. Mae MS o yr brig i lawr wedi datblygu yn gyflym dros y degawd diwethaf ac wedi helpu i ddeall swyddogaethau biolegol a mecanweithiau clefydau, ynghyd â darganfod biofarcwyr newydd (Melby et al., 2021; Tucholski et al., 2020; Ntai et al., 2018; Ansong et al., 2013). Un cymhlethdod gyda yr dull o yr brig i lawr i ganfod ghrelin yw ei fod yn cynnwys cyflyrau gwefr luosog yn ESI, sydd yn lleihau sensitifrwydd prawf. Roedd symud ghrelin i un cyflwr gwefr trwy ychwanegu DMSO yn y cyfnod symudol yn cynyddu sensitifrwydd gan ei fod yn gwella ïoneiddiad peptidau (Thomas et al., 2021; Meyer, JG, Komives EA 2012). Er gwaethaf hyn, nid oeddem yn gallu canfod ghrelin alldarddol ar grynodiadau isel (o dan 0.4 pg/mL). Dywedir bod y dull o yr brig i lawr, 100 gwaith yn llai sensitif na yr dull o yr gwaelod i fyny, sydd yn cynnwys treulio yr proteinau yn ensymatig (Timp a Timp 2020). O ganlyniad, defnyddiwyd trypsin i dreulio peptidau ghrelin cyn LC-MS a arweiniodd at gyflwr gwefr ddominyddol 2+. Fodd bynnag, amlygodd y defnydd o trypsin ar beptidau ghrelin ansefydlogrwydd y peptidau ghrelin cyfan a yr rhai a dreuliwyd yn ensymatig. I gefnogi hyn, adroddwyd yn flaenorol y gall peptidau ghrelin ddod yn ansefydlog yn hawdd, yn dibynnu ar asidedd y toddiant (Hosoda a Kangawa et al., 2004). Fel y trafodwyd ym Mhennod 4, gall treuliad tryptig 'ar-lein' gynnig dull mwy sefydlog a sensitif i yw ystyried yn y dyfodol.

Mae defnyddio LC-MS/MS fel techneg ar gyfer adnabod biofarcwyr seiliedig ar waed wedi bod yn llwyddiant mawr. Er enghraifft, cefnogodd astudiaeth AHEAD 3-45 y defnydd o plasma pTau217/nofel pTau217 (nofel pTau217 yn targedu ffurfiau tau wedi eu ffosfforyleiddio yn threonin-217 yn ogystal â chynnwys yr epitop terfynfa N 6-18) fel prawf sgrinio ar gyfer treulio anaerobig cyn-glinigol gan ddefnyddio dull LC-MS/MS a oedd yn cynnwys UPLC y '*waters Acquity M-class*' ynghyd â '*Thermo Scientific Fusion*

Lumos Tribid MS' (Rissman et al., 2023). Y tu hwnt i hyn, datblygodd Inoue et al. dull LC-MS/MS i nodi 45 proteinau plasma fel biofarcwyr ar gyfer MCI ac AD. Defnyddiwyd dull o yr gwaelod i fyny lle yr oedd plasma yn cael ei dreulio yn dryptig, lle defnyddiwyd cymhareb trypsin:peptid o 1:5, o ei gymharu â yr dull a ddisgrifir yn y traethawd ymchwil hwn lle defnyddiwyd trypsin:peptid o 1:20. Cynhaliwyd dadansoddiad LC-MS/MS gan ddefnyddio system sbectromedr màs triphlyg pedrypol LC-MS-8060 gyda cholofn Aeris PEPTIDE XB-C18, yn debyg i yr dull a ddefnyddir yn yr traethawd hir, lle defnyddiwyd colofn C18 ar gyfer gwahanu ghrelin. Gan ddefnyddio yr dull hwn, fe wnaethant nodi wyth biofarcwyr protein plasma (albwmin, APOC1, cydran gyflenwol 3, cydran gyflenwol 4 cadwyn gama, alffa-2-gwrthplasmin, alffa-2-macroglobulin, hemopexin, alffa-1-B-Glycoprotein) a allai wahaniaethu rhwng MCI ac AD gyda yr potensial clinigol a aseswyd gan ddefnyddio dadansoddiad nodwedd gweithredu derbynnydd (ROC), a roddodd 0.83 ar gyfer dynion a 0.71 ar gyfer menywod (Inoue et al., 2023). Roedd dull LC-MS/MS arall a ddatblygwyd yn dadansoddi metabolion tryptoffan yn troeth cleifion â PD (Chung et al., 2023). Yma, defnyddiwyd system UPLC-MS/MS ynghyd â sbectromedr màs pedrypol triphlyg API 3200, lle chwistrellwyd samplau troeth ar golofn C18 ar ôl dyddodiad protein a chrynodiad nitrogen. Am y tro cyntaf, adroddwyd bod asid indole-3-asetig yn biofarcwyr posibl ar gyfer PD oherwydd ei lefelau troeth afreolaidd uchel mewn PD o ei gymharu â rheolaethau iach. Adroddodd Watson et al., ddull SRM-MS a all fesur biofarcwyr protein CSF, a oedd yn broteinau niwronaidd yn bennaf (VGF, NPTX2, NPTXR ac SCG2) ar draws cyfnodau AD. Yma, dadansoddwyd y peptidau gan ddefnyddio sbectromedr màs pedwarplyg triphlyg ynghyd â system 1290 Infinity II system UHPLC, gyda yr system UHPLC yn meddu ar well datrysiad na yr system HPLC a ddefnyddir yn y traethawd ymchwil hwn. Gall y sbectromedr màs a ddisgrifir drwy gydol y traethawd ymchwil hwn berfformio SRM ac MRM ar ddatrysiad o 0.15-3 lled llawn ar hanner uchafswm (FWHM), tra mai dim ond SRM y gall y sbectromedr màs a ddisgrifir yn y papur ei berfformio ond mae yn dal i fod ar ddatrysiad da o 0.2-2 FWHM. Mae sensitifrwydd yr offeryn MS a ddefnyddir yma yn gymharol, os nad yn well, na rhai o yr offerynnau a ddisgrifir uchod. Felly, ni ddylai yr diffyg sensitifrwydd a LOD a welir yn ystod dadansoddiad ghrelin fod yn ffactor allweddol.

Gan ddefnyddio MALDI-TOF fe wnaethom ganfod ghrelin alldarddol ar lefelau 0.08-80 ng/mL, $R^2 = 0.99$. Fodd bynnag, arweiniodd ataliad signal o ganlyniad i halogiad

PEG at atal canfod ghrelin mewndarddol yn ddibynadwy. Er bod canfod ghrelin gan MALDI-TOF wedi ei ddogfennu yn dda (Satou et al., 2010, Schopfer et al., 2015, Bender et al., 2019), yn gyffredinol, defnyddir MALDI-TOF ochr yn ochr ag IP-MS ar gyfer biofarcwyr yn y gwaed, a drafodir isod. Yn 2020, canfu Abe et al. bedwar biofarcwyr peptid newydd mewn serwm (cadwyn fibrinogen β , α 2-HS-glycoprotein, cadwyn fibrinogen α ac atalydd proteas plasma C1) a all wahaniaethu rhwng cleifion rheoli, MCI, ac AD, gyda sensitifrwydd o 87% a manylder o 65%. Dadansoddwyd y dilyniannau peptid gan ddefnyddio yr ultrafleXtreme TOF/TOF, sef yr un offeryn a ddefnyddir ag a ddisgrifir ym Mhennod 3 o yr traethawd ymchwil hwn. Felly, er gwaethaf y problemau a ddisgrifir yma, gellir defnyddio MALDI-TOF yn effeithiol o hyd i ganfod biofarcwyr sydd yn seiliedig ar serwm.

Fel y disgrifiwyd ym Mhennod 5, gwnaethom optimeiddio yr defnydd o BAMS, sydd yn cael gwared ar gamau lluosog o baratoi sampl, i ddal peptidau ghrelin imiwn. Er bod BAMS ei hun yn nofel heb fawr ddim llenyddiaeth ategol, mae IP-MS yn gyffredinol wedi dod yn fwy poblogaidd gyda sawl dull IP-MS ynghyd â naill ai LC-MS neu MALDI-TOF yn cael eu datblygu i asesu biofarcwyr ar gyfer dementia. Mae IP-MS wedi cael ei ymchwilio yn helaeth ar gyfer arwahanrwydd o beptidau A β o blasma gyda rhai astudiaethau yn canolbwyntio ar IP-MS ynghyd â MALDI-TOF megis Kaneko et al a Nakamura et al. tra bod eraill yn cyplysu IP-MS ag LC-MS/ MS megis Ovod et al. a Keshavan et al. Defnyddiodd un astudiaeth gan Pennee et al. MALDI-TOF yn dilyn LC-MS/MS i gadarnhau adnabyddiaeth y peptidau A β . Mesurodd Nakamura et al. cymarebau amyloid- β protein rhagflaenydd (APP) 669-711 / A β 1-42 ac A β 1-40 / A β 1-42, ac eu cyfansoddion trwy IP-MS LC-MS ac wedi eu dangos AUC uchel (94-96%) ochr yn ochr â chywirdeb o 80% o ei gymharu â PET (Nakamura et al., 2018). I gefnogi IP-MS gan ddefnyddio LC-MS, mesurodd Keshavan et al. plasma amyloid- β 1-42/1-40 gydag AUC o 0.82, ar system LC Dionex UltiMate a Thermo Scientific Q Exactive Quadrupole-Orbitrap, mae yr dau yn perfformio yn debyg o ran sensitifrwydd a datrysiad o ei gymharu â yr offerynnau a ddefnyddir ym Mhennod 4.

Mewn cymhariaeth ben i ben, darparodd y mesuriadau LC-MS-IP-MS o pTau217 a yr cywirdeb uchaf ar gyfer asesu presenoldeb patholeg A β o ei gymharu â phroffion imiwno eraill megis y SIMOA a yr Lumipulse (Janelidze et al., 2022). Ar gyfer MALDI-IP-MS, gwnaeth Hirtz et al. cymharu yr IPMS a ddatblygwyd gan Shimadzu (IMPS_Shim A β 42, A β 40, APP 669-711) yn erbyn prawf Niwroleg Ddynamol 3-PLEX A

SIMOA (Aβ42, Aβ40, tTau). Dwedodd y gall y dull IPMS ganfod y gostyngiad mewn plasma Aβ42 sydd yn benodol i gleifion AD wrth gymharu cymarebau Aβ40/Aβ42 â yr rhai â MCI (AUC 0.78), namau gwybyddol goddrychol (AUC 0.91), clefyd niwrodirywiol arall (AUC 0.89) ac anhwylderau niwrolegol eraill (AUC 0.89). Perfformiwyd y SIMOA yn gymedrol gydag AUC yn amrywio o 0.60-0.84 (Hirtz et al., 2023). Hyd yn hyn, nid oes unrhyw lenyddiaeth ar ddefnyddio BAMS wrth ddadansoddi dadansoddydd mewn samplau cleifion, ac felly mae yn anodd asesu effeithiolrwydd gwirioneddol y dechneg. Mae yr canfyddiadau hyn yn tanlinellu rôl esblygol dulliau sbectrometreg màs a phrawf imiwno ar gyfer canfod biofarcwyr yn y gwaed, pob un â manteision a chyfyngiadau penodol. Er mwyn rhoi trosolwg clir o gryfderau a gwendidau cymharol pob platfform a werthuswyd yn y traethawd ymchwil hwn, mae Tabl 6.1 yn crynhoi nodweddion dadansoddol ac ymarferol allweddol ELISA, BAMS, ac LC-MS/MS ar gyfer canfod ghrelin mewn plasma.

Nodwedd	ELISA	BAMS	LC-MS/MS
Cyfaint Sampl	180 µL	250 µL	Amrywiol
Terfyn Canfod (Asyl Ghrelin)	~2 pg/mL	40 pg/mL	~30 pg/mL
Atgynhyrchadwyedd	Uchel (crynnodiad isel.)	Cymaradwy i ELISA	Uchel
Sensitifrwydd	Yr uchaf	Cymedrol	Uchel
Defnydd ISTD	Amherthnasol	Heriol (problemau ISTD llygod mawr)	Safonau ghrelin llygod mawr yn effeithiol
Gallu Amlblecs	Cyfyngedig	Uchel	Cymedrol
Cymhlethdod Paratoi Sampl	Isel	Cymedrol	Uchel
Cost	Cymedrol	Isel i cymedrol	Uchel

Tabl 6.1 Crynodeb cymharol o yr llwyfannau canfod ghrelin a werthuswyd yn y traethawd ymchwil hwn. Mae yr paramedrau yn cynnwys cyfaint y sampl, sensitifrwydd dadansoddol, atgynhyrchadwyedd, cost, a chyfleustodau cyffredinol ar gyfer meintioli biofarcwyr plasma.

Y tu hwnt i yr technegau sbectrometreg màs a ddisgrifir yn y traethawd ymchwil hwn, bu cynnydd yn natblygiad llwyfannau newydd a phrofion imiwno ar gyfer mesur biofarcwyr yn y gwaed. Un datblygiad o yr fath yw yr ELISA cenhedlaeth nesaf (*‘next Generation ELISA’*), yn benodol ELISA EUROIMMUN sydd yn defnyddio gwrthgyrff

terfyn-C a terfyn-N, tra nad yw yr rhan fwyaf o ELISA blaenorol yn gwneud hynny. Perfformiwyd cymhariaeth pen-i-pen o yr EUROIMMUN ELISA i yr SIMOA ar gyfer cywirdeb mesuriadau A β 40/A β 42 o fewn plasma yn ogystal â yr gymhareb A β 42/tau. Roedd mesuriad cymhareb A β 40/A β 42 yn debyg ac roedd cydberthynas rhwng dulliau i yr un graddau ag amyloid PET a CSF A β 42/tTau (De Maer et al., 2020). Mae yr EUROIMMUN ELISA yn dal yn newydd ac mae angen mwy o brofion pen-i-ben ar gyfer biofarcwyr yn y gwaed. Y tu allan i hyn, astudiwyd ELISA EUROIMMUN ar gyfer cymhareb CSF A β 42 ac A β 40/A β 42 o fewn astudiaethau mawr o garfanau clinigol heterogenaidd. Dangosodd yr astudiaethau hyn fod CSF A β 42 yn rhagweld positifrwydd PET amyloid gyda gradd uwch o gywirdeb gydag AUC o 0.81-0.89, yn ogystal, dangosodd y gymhareb A β 40/A β 42 berfformiad gwelliant gydag AUC o 0.87-0.96 (Janelidze et al., 2016, Janelidze et al., 2016, Janelidze et al., 2017).

Prawf arall yw yr SIMOA sydd yn ELISA digidol. O ran gwaed A β , nododd gyntaf nad oedd unrhyw gydberthynas, neu un gwan, rhwng y biofarcwyr plasma A β (Janelidz et al., 2016, Verberk et al., 2020). Er mwyn gwahaniaethu rhwng pynciau PET A β + ac A β -, adroddodd Janelidze et al. AUC cymedrol o 0.60-0.62 ar gyfer plasma A β , tra adroddodd Verberk et al. 0.66-0.79. Yn fwy diweddar, adroddwyd Thijssen et al. wahaniaethu rhwng pynciau A β + ac A β - ag AUC 0.95 yn erbyn 0.85 ac adroddodd gydberthynas gref rhwng cymhareb plasma A β 40/A β 42 a CSF A β 42 ($r=0.71$ yn erbyn $r=0.53$) (Thijssen et al., 2020). O ran amrywiadau SIMOA ac tau, adroddodd Bayoumy et al. berfformiad dadansoddol a chlinigol uchel ochr yn ochr â chydberthnasau mewn chwe phrawf SIMOA gwahanol ar gyfer tri amrywiad tau gwahanol gan ddefnyddio plasma. Roedd y rhain yn cynnwys tri phrawf ar gyfer pTau181 (Eli Lilly, ADx, Quantrix), un ar gyfer pTau217 (Eli Lilly), a dau ar gyfer pTau231 (ADx, Gothenburg) (Bayoumy et al., 2021). Yn ogystal, adroddwyd Ashton et al. gywirdeb diagnostig plasma pTau217 wrth ddefnyddio SIMOA. Roedd yr astudiaeth yn cynnwys 786 o gyfranogwyr a gwnaethant adrodd am gywirdeb uchel wrth nodi patholeg tau (AUC 0.93-0.97) ochr yn ochr ag A β uchel (AUC 0.92-0.96) gyda yr cywirdebau yn debyg i fiofarcwyr CSF wrth bennu signalau PET annormal (Ashton et al., 2023). Mewn cymhariaeth o SIMOA â dadansoddiad LC-MS, roedd perfformiadau diagnostig pTau217 rhwng y ddau yn gymaradwy iawn, tra bod gan pTau181 a pTau231 berfformiad is yn y dull LC-MS o gymharu â SIMOA (Therriault et al., 2024). Yn gyffredinol, mae gan yr prawf SIMOA rai cyfyngiadau, yn enwedig o ran cost, gan fod

y pecynnau yn ddrytach na phecynnau ELISA traddodiadol. Yn ogystal, mae yr offeryn canfod yn gostus ac yn gyfyngedig i ddadansoddiad SIMOA ac mae angen hyfforddiant arbenigol arno, felly gall fod yn anodd ei gyflwyno i labordy clinigol. Mewn cyferbyniad, er bod sbectrometreg mäs hefyd yn golygu offeryniaeth ddrud, mae yr offerynnau hyn yn aml ar gael mewn sefydliadau ac ysbytai ac nid ydynt wedi eu cyfyngu i un math o prawf.

Math arall o prawf imiwn yw yr 'Meso Scale Discovery' (MSD) sydd yn caniatáu amblecsio. Mae yr plât MSD yn arwyneb electrod sydd yn gweithio lle mae gwrthgyrff dal yn cael eu hansymudol ar smotiau wedi eu diffinio yn dda. Dangosodd Vogelgsang et al. cydberthynas gymedrol rhwng CSF a chymhareb plasma A β 40/A β 42 (Vogelgsang et al., 2018). Cynhaliwyd cymhariaeth pen-i-ben o SIMOA yn erbyn MSD ar pTau217, pTau181, a pTau231 ar 200 o gyfranogwyr gyda 177 heb nam gwybyddol a 23 â MCI. Ymhlith y rhai â nam gwybyddol, perfformiwyd pTau217 a pTau181 MSD (AUC 0.80-0.81) yn well na yr SIMOA (AUC 0.70) (Mielke et al., 2021). Dangosodd Janelidze et al hefyd lwyddiant yr MSD wrth fesur pTau181 plasma. Yn eu hastudiaeth, mesurwyd plasma pTau181 mewn tair carfan gyda chyfanswm o 589 o unigolion gan gynnwys anhwylderau niwrodirywiol heb nam gwybyddol, MCI, AD, ac anhwylderau niwrodirywiol nad ydynt yn AD. Adroddwyd bod plasma pTau181 yn cynyddu mewn AD cyn-glinigol ac wedi cynyddu ymhellach yn y cyfnodau MCI a dementia. Dangosodd hefyd gydberthynas dda â CSF pTau181 gydag AUC o 0.87-0.91 ar gyfer gwahanol ranbarthau ymennydd. Yn ogystal, roedd plasma pTau181 yn gallu gwahaniaethu rhwng dementia AD a chlefyd niwrodirywiol nad yw yn AD gyda chywirdeb fel Tau PET a CSF pTau181 (AUC 0.94-0.98) (Janelidze et al., 2020).

Mae llwyfannau ELISA amblecs yn cael eu defnyddio yn fwy mewn amgylcheddau labordy clinigol, yn enwedig ar gyfer cymwysiadau mewn oncoleg, clefydau heintus, ac anhwylderau awto-imiwn, lle gellir meintoli nifer o ddadansoddyddion ar yr un pryd o gyfaint sampl lleiaf posibl (Ellington et al., 2010; Bjerner et al., 2015). Yng nghydestun diagnosteg clefydau niwrodirywiol, mae llwyfannau fel Luminex xMAP a MSD wedi eu mabwysiadu mewn labordai ymchwil a chyfeirio i fesur paneli o fiofarcwyr, gan gynnwys A β , tau cyfanswm, a tau ffosfforyleiddiedig mewn hylif serebro-sbinol. Er bod yr prawf imiwn amblecs hyn wedi eu marcio â CE (cwrdd â safonau Ewropeaidd) ac wedi dangos eu bod yn ddefnyddiol yn glinigol mewn canolfannau arbenigol, nid ydynt eto wedi eu defnyddio yn eang mewn diagnosteg arferol y GIG ar gyfer

dementia. Fodd bynnag, mae mentrau fel Her Biofarcwyr Gwaed y DU yn treialu yr defnydd o brofion gwaed amblecs ar gyfer canfod dementia yn gynnar, gan awgrymu bod gweithrediad clinigol ehangach ar fin digwydd (Cymdeithas Alzheimer, 2025). Mae yr datblygiadau hyn yn cyd-fynd â newid mewn strategaeth ddiagnostig, gan ffafrio paneli biofarcwyr dros asesiadau dadansoddol sengl i gofnodi natur amblecs cyflyrau niwrodirywiol. Felly, mae ELISA amblecs a llwyfannau cysylltiedig mewn sefyllfa dda i chwarae rhan ganolog mewn sgrinio clinigol yn y dyfodol, ar yr amod bod materion safoni, cymeradwyaeth reoleiddiol ac integreiddio i lif gwaith y GIG yn cael eu mynd i yr afael â nhw.

Yn ddiweddar cyhoeddwyd Cournut et al. techneg newydd i gystadlu ag IP-MS, MALDI gyda chymorth arwyneb ('*surface assisted MALDI*', *SALDI-MS*). Yma, fe wnaethant ymchwilio i weld a all SALDI-MS fonitro yr gymhareb $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ heb unrhyw driniaeth sampl ymlaen llaw. Er bod y technegau IP-MS eraill a ddisgrifiwyd yn flaenorol yn dangos llwyddiant gyda sensitifrwydd ar gyfer canfod y gymhareb $A\beta_{40}/A\beta_{42}$, mae yr anfanteision yn cynnwys gweithdrefnau sydd yn cymryd llawer o amser a yr posibilrwydd o golli biofarcwyr oherwydd y weithdrefn dau gam anuniongyrchol (IP ac yna MS). Mae SALDI-MS yn golygu bod samplau yn cael eu dyddodi ar ddeunydd anadweithiol. Er gwaethaf eu llwyddiant wrth ganfod $A\beta_{40}$ ac $A\beta_{42}$ heb gydgasgled, arhosodd eu terfyn canfod yn rhy uchel ar gyfer penderfyniad ystyrlon o yr gymhareb $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ (Cournut et al., 2024), ond mae yn dod â thechneg newydd arall i yr amlwg ar gyfer adnabod biofarcwyr gyda llif gwaith llai.

Fel y disgrifiwyd, mae datblygiad profion trwybwn uchel uwch sensitif newydd wedi arwain at ddarganfyddiadau a chymwysiadau clinigol posibl ar gyfer biofarcwyr addawol a all wahaniaethu rhwng gwahanol ddementia ac anhwylderau niwrodirywiol. Fodd bynnag, mae angen gwneud cymariaethau mwy uniongyrchol o berfformiad profion, cynnal astudiaethau pellach gyda charfannau mwy o gefndiroedd amrywiol, a gwerthuso yr defnydd o baneli aml-farciwr.

6.2 Cyfyngiadau Biofarcwyr sydd yn seiliedig ar Hylifau yr Corff

Mae nifer o fiofarcwyr hylif y corff ar gyfer niwrodirywiol wedi dod i yr amlwg gyda biofarcwyr plasma yn cael eu hymchwilio yn dda fel biofarcwyr hylif corff ymarferol oherwydd ei fod yn hawdd ei gasglu. Fodd bynnag, nid yw yn dod heb anfanteision fel rhai biofarcwyr yn cyflwyno lefelau isel. Mae hyn wedi sbarduno datblygiad asesiadau

sydd yn gynyddol sensitif a dethol, ond mae heriau yn parhau o ran cydbwysu sensitifrwydd ag atgynhyrchadwyedd a trwybwn asesiadau ar gyfer defnydd clinigol. O hyd, mae na dal angen i dilysu asesiadau sydd yn seiliedig ar waed mewn carfan mawr ac amrywiol cyn y cânt eu hystyried yn ymarferol yn glinigol. Yma rydym yn trafod ac yn cymharu yr ystod o fiofarcwyr sydd yn cael eu datblygu ar hyn o bryd a manteision ac anfanteision defnyddio mesuriadau o fewn CSF, plasma, serwm, a troeth.

Mae gan y gymhareb A β 40/A β 42 gydberthynas dda â dyddodiad A β wedi ei nodi gan sganiau PET (AUC 0.84) a gyda mesuriadau CSF (AUC 0.85) (Li et al., 2021). Fe ei dangoswyd ar draws gwahanol lwyfannau megis profion imiwn ac IP-MS fel y trafodwyd uchod, bod cymhareb plasma A β 40/A β 42 yn is mewn grwpiau A β + na grwpiau A β - negatif, heb ots am statws gwybyddol y garfan, fodd bynnag, mae A β 40 ac A β 42 unigol wedi eu lleihau mewn dementia AD (Janelidze et al., 2016, Oovd et al., 2017., Nakamura et al., 2018). Er gwaethaf hyn, mae cyfyngiad yn codi o amrywiad y gymhareb A β 40/A β 42 ar draws y llwyfannau, er enghraifft, oedd profion IP-MS patholeg A β gydag AUC o 0.84-0.87, tra bod profion imiwn eraill yn brin o berfformiad derbyniol (AUC 0.64-0.69) (Janelidze et al., 2021). Mae yr anghysondeb hwn yn tynnu sylw at gyfyngiad craidd mewn datblygu profion amrywioldeb o blatfform i blatfform. Mae gwahaniaethau mewn manylder gwrthgyrff, protocolau paratoi samplau, sensitifrwydd canfod, a strategaethau calibradu yn effeithio yn sylweddol ar gytundeb rhyng-profion. Fel ganlyniad, mae angen ymdrechion safoni a chysoni ar frys os yw yr profion hyn i gael eu mabwysiadu yn eang mewn diagnosteg arferol.

Mae isoformau pTau gwahanol mewn plasma gan gynnwys pTau181, pTau217, a pTau231 hefyd wedi dangos datgeliadau dibynadwy ar gyfer AD (Mielke et al., 2018, Palmqvist et al., 2020, Ashton et al., 2021). Dangosodd cymariaethau pen-i-ben o yr isoformau pTau bod pTau217 yn canfodydd gwell o batholeg AD a datblygiad AD yn y dyfodol, fodd bynnag, mae yr canlyniadau hyn yn seiliedig ar dair astudiaeth yn unig (Mielke et al., 2021., Janelidze et al., 2022, Ashton et al., 2022). Yn ystod yr astudiaeth, adroddodd Janelidze et al. gydberthynas uchel rhwng plasma a lefelau CSF o pTau217 (Janelidze et al., 2022). Dangosodd pTau217 a pTau181 gydberthynas â phlaciau A β a tanglau tau, gyda pTau217 eto yn dangos cydberthynas gryfach rhwng patholegau (Mattson-Carlgrén et al., 2022). Er ei bod yn ymddangos mae pTau231 yn gysylltiedig â llwyth plac A β , gan ddangos cynnydd ar lefelau plac

A β bach, nid yw yn ymddangos ei fod yn gysylltiedig â lefelau tau fel pTau217 a pTau181 (Therriault et al., 2022). Ar hyn o bryd, nid oes unrhyw fiofarcwyr plasma tau tangl penodol, fodd bynnag, mae biofarcwyr posibl yn CSF ar gyfer mesur rhanbarth tau sydd yn rhwymo microtiwb (Horie et al., 2021). Mae datblygu asesiadau penodol i dangl tau yn parhau i fod yn gymhleth yn dechnegol, yn enwedig mewn plasma, oherwydd nifer isel y cynnyrch a yr angen am adweithyddion hynod ddetholus sydd yn gallu gwahaniaethu rhwng isoformau tebyg yn strwythurol. Mae yr cyfyngiadau hyn yn tanlinellu yr angen i ddatblygu gwrthgyrff ffyddlondeb uchel a gwelliannau mewn dulliau mwyhad signal.

Gan y gall yr arennau glirio A β a Tau, llwybr arall ar gyfer canfod y proteinau hyn yw yn y troeth (Tian et al., 2021), biofarcwyr delfrydol ar gyfer y rhai sydd yn ofni nodwyddau. Er gwaethaf hyn, mae ymchwil ar fiofarcwyr troeth yn gyfyngedig o hyn o bryd. Ar ôl profi monomerau A β yn ELISA ac oligomerau yn blot gorllewinol, darganfuwyd bod crynodiadau oligomer A β mewn plasma a throeth yn cydberthyn yn negyddol â swyddogaeth wybyddol, ac roedd y ddau yn gallu gwahaniaethu rhwng cleifion AD a rheolyddion (Zhou et al., 2012). Mewn astudiaeth arall, profwyd A β 40 ac A β 42 ochr yn ochr â lefelau pTau mewn ecosomau ('*exosome*') wedi eu harunigo o samplau troeth clinigol gan ddefnyddio ELISA. Yma, dangoswyd bod ecosom wedi ei chynyddu yn sylweddol gyda chrynodiad A β 42 a pTau mewn cleifion AD, fodd bynnag, ni phenderfynwyd ar y berthynas rhwng patholeg ecosom ac AD (Sun et al., 2019). Yn fwy diweddar, datblygwyd llwyfan cemogwrtheddol ('*chemoresistive*') yn seiliedig ar fioelectrod polypyrrole, a lwyddodd i ganfod A β 40 ac A β 42 mewn crynodiadau mor isel â 5.71 fg/mL a 9.09 fg/mL, yn y drefn honno, ond dim ond ar samplau synthetig y cafodd ei brofi (Surpaja et al., 2021). Er bod y canlyniadau hyn yn dangos sensitifrwydd dadansoddol addawol, mae yr diffyg dilysu mewn samplau clinigol yn cyfyngu ar berthnasedd cyfieithu. Ar ben hynny, yn aml mae dulliau canfod newydd yn brin o trwybwn, cadernid ac atgynhyrchadwyedd ar draws labordai, rhwystrau allweddol y mae yn rhaid mynd i yr afael â nhw cyn eu defnyddio yn glinigol. O ganlyniad, mae angen profi yr profion hwn ar samplau troeth o hyd ac asesu sut mae yn cymharu â sganiau PET a mesuriadau CSF. O ystyried pa mor hawdd yw cael samplau troeth, mae angen mwy o ymchwil yn y maes hwn.

Gan ddefnyddio SIMOA ac ELISA, profwyd lefelau tTau, pTau, ac A β 42 yn y poer, plasma, a throeth gleifion AD a rheolaethau negyddol. Er bod lefelau tTau a pTau yn

sylweddol uwch mewn cleifion AD o gymharu â rheolyddion, roedd y lefelau mewn troeth (96.76, 118.68, a 16.88 pg/mL ar gyfer A β 42, tTau441, a pTau181, yn y drefn honno) yn llawer is nag mewn plasma (340.07, 669.44, and 493.79 pg/mL ar gyfer A β 42, tTau441, and pTau181, yn y drefn honno) (Chan et al., 2017). O ganlyniad, mae yr biofarcwyr biohylif ar gyfer tau wedi ei chanolbwyntio ar fiofarcwyr sydd yn seiliedig ar waed. Er gwaethaf hyn, mae ymchwil mwy diweddar gan Rutledge et al. yn cymharu 4,877 CSF, plasma gwaed, a samplau troeth ar gyfer biofarcwyr PD. Yma canfuwyd bod cannoedd o broteinau wedi eu huwchreoleiddio (*'upregulated'*) yn y CSF, gwaed, neu droeth PD ac un biofarcwyr addawol ar gyfer PD cynnar yw DOPA decarbocsyl (DCC). Mae DCC yn cataleiddio yr cam olaf synthesis dopamin a gwelwyd yn benodol ei fod wedi ei uwchreoleiddio yn y CSF a throeth gleifion PD, gan ei wneud yn farcwyr diagnostig a phrognostig addawol (Rutledge et al., 2024). Fodd bynnag, mae cyfieithu canfyddiadau proteomig o yr fath i asesiadau cadarn, trwybwn uchel sydd yn addas ar gyfer defnydd clinigol yn cynnwys optimeiddio helaeth, gan gynnwys dewis gwrthgyrff canfod, lleihau ymyrraeth gefndirol, a sefydlu trothwyon sydd yn ystyrlon yn glinigol. Felly, er gwaethaf yr anawsterau wrth ddefnyddio yr biohylifau penodol hyn, mae yna rai llwyddiannau diweddar iawn o hyd trwy eu defnydd.

Mae Plasma NfL hefyd wedi dangos addewid gyda chydberthynas dda â mesuriadau CSF (Gisslen et al., 2016). Er bod lefelau NfL yn gysylltiedig â niwroddirwyd mewn AD, mae yr effaith yn llai ar gyfer plasma nag ar gyfer CSF. Roedd lefelau serwm NfL hefyd yn dangos cysylltiad cryf â lefelau CSF ($P < 0.001$) (Disanto et al., 2017) a lefelau plasma. Fodd bynnag, adroddwyd bod lefelau canolrif NfL yn sylweddol uwch mewn serwm o gymharu â phlasma (Kwon et al., 2023). Mae yr anghysondeb hwn yn tynnu sylw at bwysigrwydd dewis matrices wrth ddatblygu prawf. Mae serwm a plasma yn wahanol o ran cynnwys protein, ffactorau ceulo, a sefydlogrwydd cyn-ddadansoddol, ac mae pob un ohonynt yn dylanwadu ar allbwn prawf. Rhaid i ddatblygwyr ystyried y newidynnau hyn i wneud y gorau o sensitifrwydd, manylder ac atgynhyrchadwyedd.

Mae lefelau plasma protein asidig ffibrilaidd glial (GFAP) hefyd wedi dangos cydberthynas dda â phatholegau A β ochr yn ochr â rhagfynegiad o ddirywiad gwybyddol a throsi i ddementia AD mewn unigolion â nam gwybyddol a chleifion â MCI (Benedet et al., 2021, Verbeck et al., 2021, Cicognola et al., 2021). Mewn cymhariaeth o yr holl fiofarcwyr a drafodwyd, gan ddefnyddio yr SIMOA, ymchwiliodd

Sanchez et al., GFAP, NFL, pTau181, a chymhareb A β 40/A β 42 mewn 44 o reolaethau iach a 480 o gyfranogwyr wedi cael diagnosis o AD/MCI, PD, FTD, neu glefyd serebro-fasgwlaidd (Sanchez et al., 2023). Adroddwyd bod GFAP, NfL, a/neu pTau181 yn uchel ymhlith yr holl afiechydon o eu cymharu â rheolaeth, tra bod pTau181 yn benodol i yr cleifion AD/MCI, a chanfuwyd cysylltiadau gwasgaredig yn y garfan FTD a chlefyd serebro-fasgwlaidd ar gyfer y gymhareb A β 40/A β 42. Yn ogystal, defnyddiodd Mattson-Carlgrén et al. SIMOA i fesur plasma pTau181, pTau231, NfL, GFAP, a terfyn-N tau yn eu hastudiaeth i werthuso biofarcwyr plasma ar gyfer nodi positifrwydd A β a chyfnod cronni tau. Dywedwyd bod pTau217 wedi ei gysylltu gryffaf â phositifrwydd A β (AUC 0.94) (Mattson-Carlgrén et al., 2024). Er gwaethaf y llwyddiant hyn, mae llwyfannau hynod sensitif cyfredol fel SIMOA yn gostus ac mae angen seilwaith arbenigol arnynt. Wrth ddatblygu prawf amiblecs, mae rhaid hefyd ystyried croes-adweithedd rhwng dadansoddydd, ymyrraeth signal bosibl, ac amrywioldeb technegol rhwng sypiau a gweithredwyr. Mae yr ffactorau hyn gyda ei gilydd yn herio atgynhyrchadwydd prawf a mabwysiadu clinigol ehangach.

I gloi, er bod biofarcwyr hylifau yr corff, yn enwedig rhai sydd yn seiliedig ar plasma, yn cynnig llwybrau addawol ar gyfer canfod clefydau niwrodirywiol fel AD, mae heriau fel lefelau isel o ddadansoddydd, amrywioldeb prawf, a chydberthnasau cyfyngedig â mesuriadau safon aur fel sganiau PET a dadansoddiadau CSF yn tanlinellu yr angen am ymchwil a mireinio pellach yn y maes hwn. Dylai ymdrechion yn y dyfodol ganolbwyntio ar gysoni prawf ar draws llwyfannau, ehangu astudiaethau dilysu mewn poblogaethau cyn-glinigol a prodromal, a datblygu technolegol newydd sydd yn galluogi mesuriadau trwybwn uchel, cost isel, ac atgynhyrchadwy mewn lleoliadau clinigol arferol.

6.3 Cyfyngiadau y Gwaith

Un o gyfyngiadau yr traethawd ymchwil oedd yr offeryniaeth a ddefnyddiwyd ar gyfer dadansoddi sbectrometreg màs. Roedd y cyfyngiadau yn cynnwys camweithrediad yr offeryn a greodd oedi yng nghynnydd y prosiect. Fodd bynnag, roedd yn brin i yr holl offeryniaeth fod yn anhygyrch ar yr un pryd, ac felly yn ystod y cyfnodau pan oedd yr LC-MS neu yr MALDI-TOF yn cael eu hymchwilio, gellid gwneud cynnydd o hyd ar yr offeryn nad oedd wedi ei 'dorri'. Cyfyngiad arall yn yr offeryniaeth oedd argaeledd system HPLC yn unig yn hytrach na system UHPLC. Dangoswyd bod y system UHPLC yn cynyddu sensitifrwydd canfod ghrelin, yn cynyddu datrysiaid

cromatograffig, ac yn cael amseroedd rhedeg dadansoddol byrrach, a fyddai nid yn unig yn lleihau cost y dadansoddiad ond hefyd yn caniatáu cynnydd cyflymach o fewn optimeiddio (Behnouch et al., 2015 a Thomas et al., 2021). Yn ogystal, roedd y synwryddion cyfredol yn yr MS yn hen ac yn aros am uwchraddiad, a allai hefyd fod wedi arwain at sensitifrwydd is.

Un o brif gyfyngiadau yr prawf BAMS oedd argaeledd cyfyngedig gleiniau, a achosodd i optimeiddio pellach beidio â digwydd a gadael yr astudiaethau yn anghyflawn. Arweiniodd argaeledd cyfyngedig gleiniau hefyd at fesur ghrelin mewn pwll bach o roddwyr iach yn unig (5 i gyd). Yn ogystal â hyn, ni ddefnyddiwyd ISTD gywir i fesur ghrelin o fewn yr prawf ac felly dylid asesu cynnwys ISTD priodol. Oherwydd y cydweithrediad ag Adeprix, nid oeddem yn ymwybodol chwaith o yr gwrthgorff penodol a ddefnyddiwyd, ac felly, ni allem gael cipolwg ar ba derfynell yr oedd yr gwrthgorff yn rhwymo iddi. Efallai bod gwybodaeth fel y cyfryw wedi cynorthwyo i optimeiddio defnyddio ghrelin llygod mawr fel ISTD yn lle safon ghrelin ddynol gostus wedi ei labelu ag isotop. Cyfyngiad arall o fewn y bennod wrth gymharu yr profion BAMS ac ELISA, achos dim ond unwaith y cynhaliwyd yr ELISA gan ddefnyddio yr un samplau rhoddwyr iach â BAMS oherwydd cyfyngiadau amser ac argaeledd y pecyn ELISA. Roedd hyn yn caniatáu inni wneud cymhariaeth uniongyrchol â sensitifrwydd y pecyn a yr amrywiad o fewn yr prawf ond mae angen ailadroddiadau pellach ar gyfer cymhariaeth fwy cadarn. Er na chafodd ei gynnal dair gwaith i gyd, fel grŵp labordy rydym wedi defnyddio yr citiau ELISA ghrelin yn helaeth ac, felly, er mwyn cael gwybodaeth am yr amrywiad rhyng-prawf, mesurwyd cromliniau safonol y citiau ar draws tri achlysur gwahanol yn lle hynny.

Mae yr archwiliad i wahaniaethu yr asidau brasterog sydd yn gysylltiedig â ghrelin, gan ffurfio asyl ghrelin, yn parhau i fod yn anodd oherwydd absenoldeb amrywiadau ghrelin synthetig sydd ar gael yn fasnachol gydag amrywiaeth o asidau brasterog yn bresennol fel y gadwyn asyl. O ganlyniad, er mwyn dadansoddi yr gwahanol ffurfiau o asyl ghrelin, rhaid syntheseiddio yr amrywiadau hyn yn fewnol i ddechrau. Yn 2005, ymchwiliodd Nishi et al. i weld a oedd asidau brasterog cadwyn ganolig a lyncwyd yn cael eu defnyddio yn uniongyrchol ar gyfer addasu asyl ghrelin. Roedd yr astudiaeth yn cynnwys llygod gwrywaidd C57BL/6J a gafodd fwyd labordy safonol wedi ei ategu ag asidau brasterog cadwyn ganolig C6, C8, a C10. Er mwyn gwerthuso yr peptidau ghrelin a addaswyd gan wahanol grwpiau asyl, echdynnwyd peptidau stumog gan

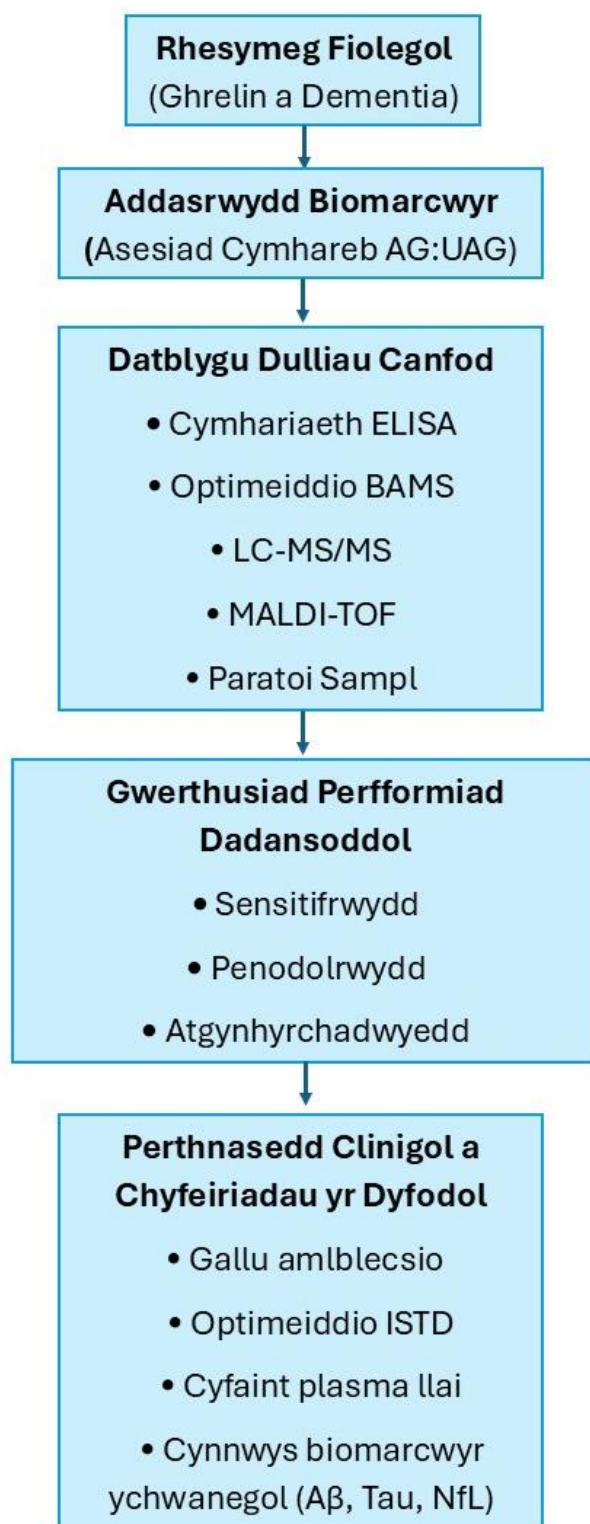
ddefnyddio Sep-Pak Plus C18, ac eu rhoi dan C18 RP-HPLC, a mesurwyd eu cynnwys ghrelin ym mhob ffracsiwn trwy prawf radioimiwn ghrelin C ac N. Drwy addasu yr dull a ddisgrifiwyd, gallem gynhyrchu amrywiadau C4, C6, C8, C10, C12, C14 a C16 o ghrelin i yw dadansoddi drwy sbectrometreg màs gan ddefnyddio Nanomate. Wedi hynny, gellid datblygu dull LC-MS/MS ar gyfer eu hadnabod yn rheolaidd. Yn dilyn hyn, (ac ar ôl optimeiddio echdynnu ghrelin o plasma) gellid ymchwilio i bresenoldeb yr amrywiadau hyn mewn samplau cleifion, yn enwedig gan bobl ag anhwylderau niwrodirywiol. Mae yr dull a sefydlwyd gan Nishi et al. yn gofyn am ddefnyddio llygod, nad yw efallai yn ddull mwyaf cost-effeithiol nac ymarferol. Fodd bynnag, gellid cynnal dull tebyg gan ddefnyddio llinell gell a all gynhyrchu ghrelin a GOAT. Er enghraifft, datblygodd Bando et al. (2016) linell gell gastrig MGN3-1, sydd yn cynnwys GOAT ac yn mynegi symiau mawr o ghrelin. Yn eu hastudiaeth, fe wnaethant gyflwyno asidau brasterog C5, C11, C12, a C16 i gyfryngau diwylliant celloedd MGN3-1. Fe wnaethant lwyddo i fesur lefelau asyl carnitin mewngellol, a ddylai gydberthyn â lefelau asyl-CoA (asid brasterog sydd yn gysylltiedig â CoA), trwy sbectrometreg màs tandem. Fodd bynnag, fe wnaethant wynebu problemau ansefydlogrwydd wrth fesur y gwahanol ddadansoddyddion asyl-CoA gan ddefnyddio LC-ESI-MS/MS, yn ôl pob tebyg oherwydd ansefydlogrwydd asyl-CoA. Felly, mae defnyddio llinell gell yn cyflwyno dull mwy hygyrch ac amgen ar gyfer cynhyrchu gwahanol rywogaethau o asyl ghrelin fel 'safonau' i adeiladu dull ar gyfer eu dadansoddiad trwy sbectrometreg màs. Fodd bynnag, mae angen ymchwil pellach hefyd ar sefydlogrwydd y rhywogaethau asyl ghrelin ar gyfer/yn ystod dadansoddiad trwy sbectrometreg màs.

I grynhoi, er gwaethaf y cyfyngiadau a achosir gan gamweithrediadau offeryniaeth, argaeledd cyfyngedig o gleiniau, a chyfyngiadau ar ailadrodd profion, gwnaed ymdrechion i wneud y mwyaf o gynnydd a thynnu mewnwelediadau o yr data sydd ar gael. Wrth symud ymlaen, bydd mynd i yr afael â yr cyfyngiadau hyn trwy offeryniaeth well, pyllau sampl estynedig a dilysu profion trylwyr yn gwella dibynadwyedd a chadernid astudiaethau yn y dyfodol yn y maes hwn.

6.4 Cyfeiriadau yn y Dyfodol

Mae yr gwaith hwn wedi amlygu pwysigrwydd biofarcwyr yn y gwaed ar gyfer canfod dementia a yr anhawster wrth echdynnu peptidau bach fel ghrelin o blasma. Yn gyffredinol, dangoswyd BAMS fel prawf newydd ac addawol ar gyfer canfod biofarcwyr yn y gwaed. Unwaith y bydd y prawf BAMS wedi ei optimeiddio yn llwyddiannus, dylid ei ddefnyddio i ail-archwilio plasma sydd eisoes wedi ei werthuso gan ELISA. Er enghraifft, yn 2020 cyhoeddodd ein grŵp bapur lle cafodd y gymhareb plasma AG:UAG o PDD, cleifion PD sydd yn wybyddol gyflawn, a rheolaethau eu meintioli gan ddefnyddio citiau ELISA a nododd AG:UAG llai fel biofarcwyr diagnostig cylchol o ddementia mewn pobl â PDD (Hornsby et al., 2020). Mantis arall BAMS yw yr posibilrwydd o amlblecsio ar gyfer biofarcwyr eraill. Er enghraifft, byddai canfod ghrelin, A β , NfL, a tau ar y cyd o un sampl yn caniatáu dadansoddiad cyflym o nifer o fiofarcwyr ar draws grwpiau dementia. Dylai hyn helpu i haenu is-fathau o glefydau ar gyfer cymryd rhan mewn treialon clinigol ac, yn y dyfodol, therapïau. Y tu allan i fyd niwroddirwyd, gellid defnyddio prawf BAMS ghrelin hefyd i helpu i ymchwilio i gyflyrau eraill fel diabetes, anorecsia a gordewdra, anhwylderau llidiol, cwsig, a chlefyd cardiofasgwlaidd (Hörber et al 2020., Tezenas du Montcel et al., 2022, Muñoz-Prieto et al., 2019, Molina et al., 2020, Kennaway et al., 2020, Radha et al., 2021).

I grynhoi trywydd cyfieithu yr gwaith hwn, o yr rhesymeg fiolegol sylfaenol hyd at ddatblygu ac optimeiddio dulliau canfod a chymhwysiad clinigol, mae Ffigur 6.1 yn cyflwyno trosolwg o strwythur y traethawd ymchwil a yr rhagolygon ar gyfer y dyfodol.



Ffigur 6.1. Trosolwg o lif gwaith y traethawd ymchwil, gan amlinellu yr dilyniant o yr rhesymeg fiolegol dros ghrelin fel biofarcwyr dementia i ddatblygu a optimeiddio dulliau, dilysu dadansoddol, a chyfieithu clinigol. Mae cyfeiriadau yr dyfodol yn cynnwys canfod biofarcwyr amlblecs, optimeiddio ISTD, lleihau gofynion cyfaint plasma, a chynnwys biofarcwyr dementia ychwanegol.

6.5 Cyfieithu Canfod Ghrelin i Gymhwysiad Clinigol: Rhagolygon y Dyfodol ar gyfer Sgrinio Biofarcwyr

Mae ghrelin wedi cael ei gysylltu fwy a fwy â chyflyrau niwrodirywiol fel AD a PD. Ar lefel ymchwil, mae llwyfannau sbectrometreg màs fel LC-MS/MS wedi dangos perfformiad dadansoddol uchel ar gyfer canfod isoformau ghrelin, yn enwedig asyl ac dadasyl ghrelin gyda sensitifrwydd is-bicogram a manylder uchel (Rauh et al., 2007; Eslami et al., 2017). Fodd bynnag, mae yr dulliau hyn yn gofyn am amodau cyn-ddadansoddol sydd wedi eu rheoli yn dynn, megis defnyddio tiwbiau EDTA, atalyddion proteas serin, ac asideiddio ar unwaith i atal dadasyleiddio ghrelin (Hosoda et al., 2004, Blatnik et al., 2010). Er eu bod yn effeithiol mewn cyd-destunau arbrofol, nid yw protocolau mor llym yn addas ar gyfer eu gweithredu yn glinigol yn eang. O ganlyniad, mae ymdrechion cyfieithu wedi dechrau canolbwyntio ar dechnolegau sydd yn gallu cydbwysu sensitifrwydd dadansoddol â hyfywedd ymarferol.

Mewn cyferbyniad â MS sydd yn seiliedig ar labordy, mae profion imiwn yn cynnig llwybr mwy hygrych tuag at ddefnyddioldeb clinigol. Defnyddiwyd profion ELISA confensiynol a profion radioimiwn yn helaeth i fesur lefelau ghrelin sydd yn cylchredeg, er y gallent amrywio yn sylweddol o ran eu sensitifrwydd ac eu manylder (Foster-Schubert et al., 2010). Mae profion imiwn digidol mwy newydd, fel SIMOA ac MSD, wedi gwella terfynau canfod i yr ystod femtogram fesul mililitr, gan eu gwneud yn hyfyw ar gyfer biofarcwyr â crynodiad isel mewn plasma (Rissin et al., 2010). Fodd bynnag, gall y llwyfannau hyn wynebu cyfyngiadau o ran manylder o hyd oherwydd croes-adweithedd gwrthgyrff, sydd yn parhau i fod yn ystyriaeth hollbwysig wrth wahaniaethu rhwng asyl ac dadasyl ghrelin.

Byddai angen i brawf clinigol yn y dyfodol ar gyfer ghrelin fynd i yr afael â sawl prawf craidd er mwyn gweithredu yn effeithiol fel offeryn sgrinio o fewn y GIG. Yn gyntaf, rhaid i yr math o sampl fod yn gydnaws ag arfer clinigol safonol. Er bod plasma asidig gydag atalyddion proteas yn ddelfrydol ar gyfer cadw asyl ghrelin, nid yw yn ymarferol mewn diagnosteg arferol. Felly, gellid archwilio naill ai byfferau sefydlogi cyn-ddadansoddol neu fethodolegau smotiau gwaed sych (DBS) i symleiddio trin samplau wrth gadw cyfanrwydd y dadansoddydd (Lim et al., 2010. Huner et al., 2024). Rhaid i yr brawf hefyd fod yn gadarn yn ddadansoddol a chynnal sensitifrwydd uchel o fewn yr ystod ffisiolegol o ghrelin, fel arfer rhwng 50–150 pg/mL mewn plasma ymprydio (Foster-Schubert et al., 2010). Mae llwyfannau fel SIMOA ac MSD yn gallu cyrraedd

y lefel hon o sensitifrwydd ac maent eisoes yn cael eu defnyddio ar gyfer biofarcwyr niwrodirywiol eraill (Li et al., 2019, Pais et al., 2023).

Mae amblecsio yn nodwedd hanfodol arall. Mae strategaethau diagnostig yn symud fwy tuag at baneli biofarcwyr yn hytrach na phroffion dadansoddwr sengl, o ystyried natur aml ffactor clefyd niwrodirywiol. Er enghraifft, mae astudiaethau wedi dangos bod cyfuniadau o p-tau181, p-tau217, NfL, a GFAP yn darparu gwerth rhagfynegol cryf ar gyfer dementia (Zhu et al., 2021, Rabl et al., 2024). Gallai cynnwys peptidau metabolaidd fel ghrelin ychwanegu at y paneli hyn trwy ychwanegu gwybodaeth gyflenwol am lwybrau sydd yn addasu clefydau, yn enwedig o ystyried priodweddau niwro amddiffynnol ghrelin (Beuker et al., 2025, Buntwal et al., 2019).

Gofyniad hollbwysig arall yw amser troi. Yn ddelfrydol, dylai dyfeisiau pwynt gofal (POC) ddarparu canlyniadau o fewn 30 munud i hwyluso penderfyniadau clinigol ar unwaith. Er y gall ELISA confensiynol gymryd sawl awr, mae datblygiadau mewn hylif micro a thechnolegau labordy-ar-sglodion yn cynnig atebion addawol ar gyfer gweithredu profion imiwn yn cyflym. Mae dyfeisiau symlach sydd yn seiliedig ar MS, fel imiwnoaffinedd MALDI-TOF hefyd yn cael eu harchwilio ar gyfer canfod protein cyflym amblecs, gyda pharatoi sampl lleiaf posibl (Montoliu-Gaya et al., 2023). Roedd strategaeth gysylltiedig dadasyl ghrelin a archwiliwyd yn y traethawd ymchwil hwn yn cynnwys BAMS, sydd yn cyfuno cyfoethogi wrthgyrff â chanfod MALDI-TOF uniongyrchol. Galluogodd y dull hwn ganfod asyl ghrelin dynol ar derfyn o 40 pg/mL gan ddefnyddio pecyn gwrthgyrff 88, a dadasyl ghrelin ar 20 pg/mL, sydd yn dod o fewn yr ystod crynodiad ffisiolegol. Er bod y dull yn gofyn am 250 µL o plasma, sydd yn uwch na delfrydol ar gyfer sgrinio ar raddfa fawr, dangosodd yr prawf atgynrychioldeb cryf. Yn arbennig, gwelwyd ymyrraeth gwrthgyrff o yr ISTD, gan dynnu sylw at yr angen am well manylder adweithydd. Serch hynny, mae BAMS yn cynrychioli pont addawol rhwng sbectrometreg màs perfformiad uchel a llifau gwaith addasadwy yn glinigol. Gyda mireinio pellach, gallai fod yn addas i yw ddefnyddio mewn labordai diagnostig neu hyd yn oed mewn amgylcheddau pwynt gofal datganoledig.

Mae dehongli y canlyniadau yn hanfodol i glinigwyr. Mae hyn yn cynnwys cyfyngau cyfeirio clir ac offer haenu risg. Er enghraifft, mewn diagnosteg dementia, mae biofarcwyr sydd yn seiliedig ar waed yn cael eu mabwysiadu fwy fel offer cyn-sgrinio i

nodi cleifion a allai elwa o weithdrefnau mwy pendant ond ymledol neu gostus, fel PET neu CSF (Hansson et al., 2022; Hampel et al., 2018). Enillodd y dull hwn fomentwm pellach gyda chliriad diweddar Gweinyddiaeth Bwyd a Chyffuriau yr Unol Daleithiau (FDA) o yr prawf cyntaf yn seiliedig ar waed ar gyfer AD ym mis Mai 2025, gan nodi carreg filltir reoleiddio bwysig yn y symudiad tuag at ddiagnosteg lleiaf ymledol (Gweinyddiaeth Bwyd a Chyffuriau yr Unol Daleithiau [FDA], 2025). Y bwriad yw y bydd profion biofarcwyr o yr fath yn seiliedig ar waed yn cael eu rhoi ar waith yn fuan mewn clinigau cof y GIG ac o bosibl eu cyflwyno o fewn lleoliadau gofal sylfaenol dros y blynyddoedd nesaf, fel rhan o Her Biofarcwyr Gwaed y DU gyfan. Mae yr fenter hon wedi dechrau recriwtio dros 3,100 o gyfranogwyr ar draws 28 o safleoedd y GIG i werthuso a all panel o brofion ategu llwybrau diagnostig presennol, a gallai arwain at ddefnydd arferol o fewn y GIG o fewn pum mlynedd (Cymdeithas Alzheimer, 2025; Ymddiriedolaeth Sefydledig GIG Iechyd Rhydychen, 2025).

O ran cydymffurfiaeth reoleiddiol, rhaid i unrhyw brawf clinigol llynu wrth safonau UKCA neu CE-IVDR ar gyfer diagnosteg '*in vitro*'. Mae hyn yn gofyn am dystiolaeth o ddilysu dadansoddol a chlinigol, rheoli ansawdd o dan ISO 13485, a goruchwyliaeth gan gorff hysbysedig ar gyfer profion risg gymedrol i uchel. Mae protocolau yr GIG hefyd yn gorchymyn bod dyfeisiau POC yn cael eu hasesu gan wasanaethau patholeg achrededig o dan ganllawiau UKAS (NHS England, 2021).

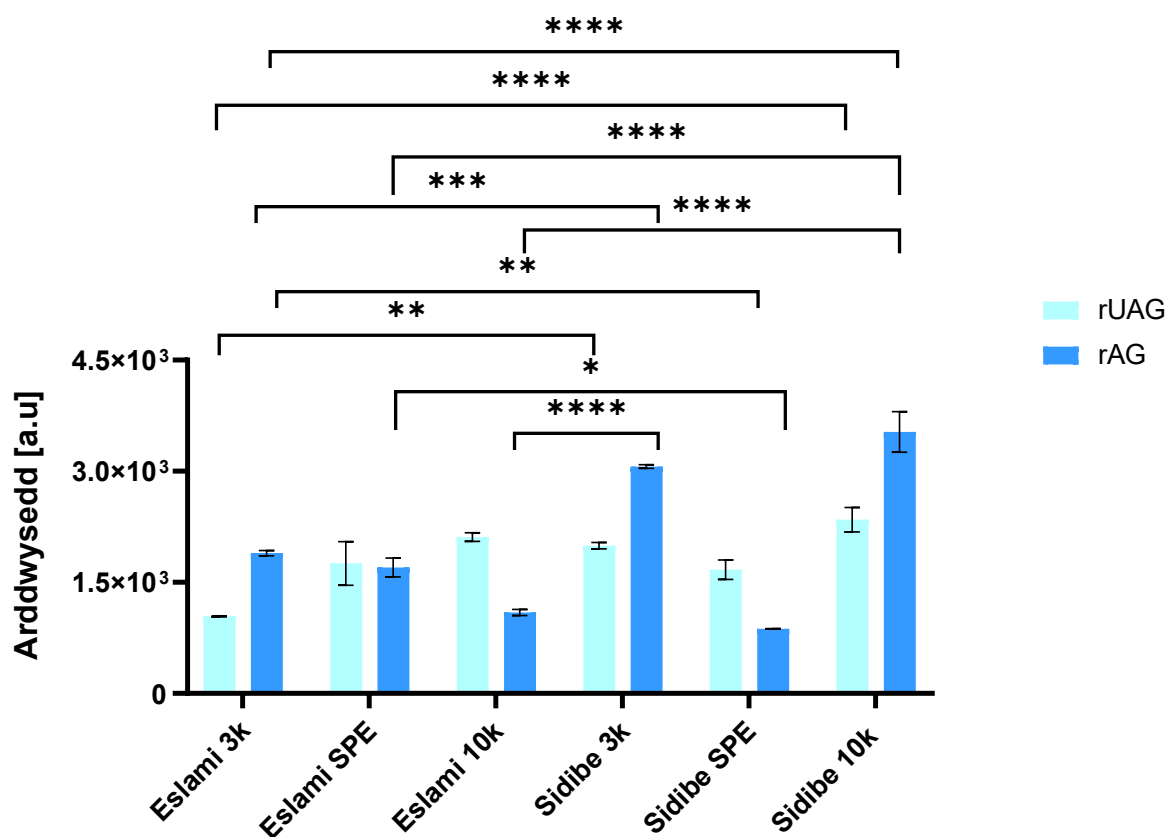
Mae hyfywedd economaidd yn ystyriaeth hollbwysig arall. Er bod MS pen uchel ac profion imiwn digidol yn cario costau ymlaen llaw sylweddol, gellir gwrthbwysu yr rhain gan ostyngiadau yn y defnydd o ofal iechyd i lawr yr afon, megis llai o atgyfeiriadau arbenigol diangen neu weithdrefnau delweddu. Mae adolygiadau systematig yn awgrymu y gall diagnosteg ar bwynt gofal fod yn gost-effeithiol pan gânt eu gweithredu yn strategol (Lingervelder et al., 2021).

Yn olaf, mae cyfieithu brawf sydd yn seiliedig ar ghrelin yn llwyddiannus i lif gwaith y GIG yn dibynnu ar integreiddio diwnïad i lwybrau diagnostig presennol. Ar gyfer sgrinio niwroderywiol, gall hyn olygu defnyddio yr prawf ar lefel meddyg teulu neu mewn clinigau cof fel ategu asesiadau gwybyddol. Mae mentrau parhaus fel yr Her Biofarcwyr Gwaed ac astudiaeth READ-OUT Caergrawnt eisoes yn treialu yr defnydd o brofion gwaed aml-fiofarcwyr mewn lleoliadau yr GIG, gyda chanlyniadau cynnar yn

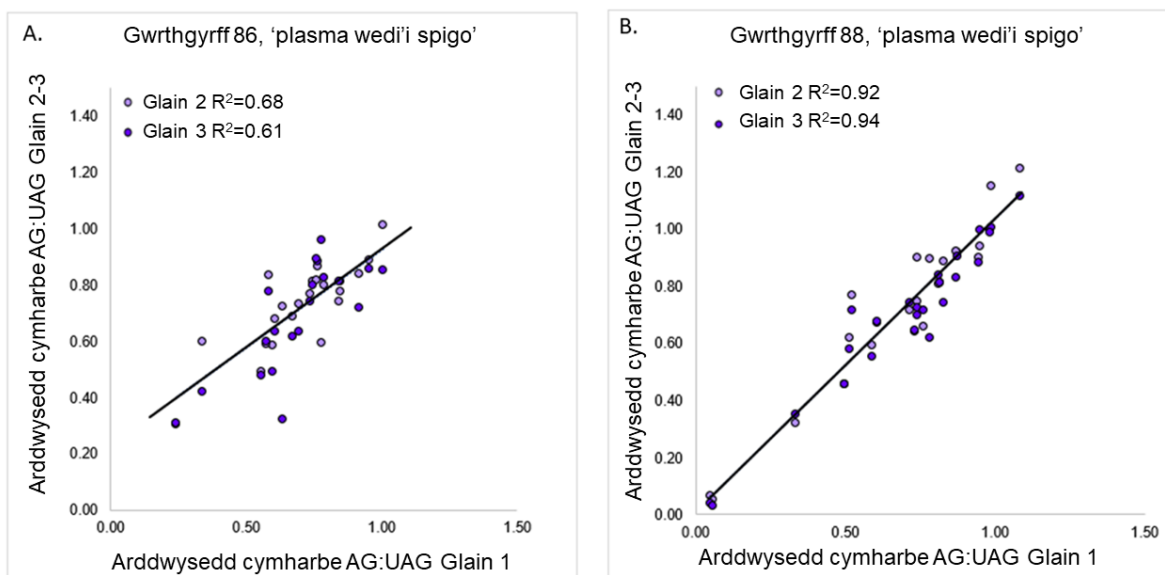
awgrymu potensial i wella canfod cynnar a symleiddio gofal cleifion (Ymddiriedolaeth Sefydledig GIG Swydd Gaergrawnt a Peterborough, 2024).

O safbwynt dadansoddol sylfaenol, mae BAMS yn pontio sensitifrwydd a detholusrwydd sbectrometreg màs â penodolrwydd dal gwrthgyrff, gan gynrychioli dull hybrid sydd yn addas iawn ar gyfer gwahaniaethu ghrelin ar lefel isoform. O ei gymharu ag LC-MS/MS confensiynol, mae BAMS yn cynnig amser rhedeg byrrach, cymhlethdod cromatograffig llai, a photensial ar gyfer trwybwn uwch. Mae yr manteision hyn yn gosod BAMS fel ymgeisydd addawol ar gyfer cymwysiadau cyfieithu lle mae seilwaith labordy neu gyfyngiadau amser yn cyfyngu ar ddefnyddio llifau gwaith MS mwy cymhleth. Wrth edrych ymlaen, disgwylir i lwyfannau sgrinio biofarcwyr yn y dyfodol symud tuag at fformatau cyflym, amlblecs sydd yn gallu canfod paneli o farcwyr niwrodirywiol a metabolaidd mewn un prawf. Yn y cyd-destun hwn, gellid datblygu BAMS yn system fodiwlaid ar gyfer canfod aml-peptid, lle mae isoformau ghrelin yn cael eu dadansoddi ochr yn ochr â biofarcwyr sefydledig fel ptau, NFL, neu GFAP. Byddai yr weledigaeth hon yn gofyn am fireinio technegol pellach, gan gynnwys lleihau mewnbwn samplau, integreiddio â llwyfannau canfod awtomataidd, a dilysu yn erbyn safonau cyfeirio clinigol. Gyda yr datblygiadau hyn, gallai offeryn diagnostig yn y dyfodol sydd yn seiliedig ar BAMS fod ar ffurf dyfais sydd yn seiliedig ar getris, a fyddai yn cael ei weithredu o fewn labordai clinigol neu leoliadau datganoledig fel clinigau cof neu feddygfeydd teulu. Yn ddelfrydol, byddai system o yr fath yn gofyn am amser ymarferol lleiaf posibl, yn dychwelyd canlyniadau o fewn 30 i 60 munud, ac yn integreiddio â chofnodion iechyd electronig ar gyfer dehongli a dosbarthu yn symlach. Er bod cyfyngiadau cyfredol yn parhau, mae canlyniadau yr traethawd ymchwil hwn yn cefnogi datblygiad parhaus BAMS fel cam canolradd ymarferol rhwng sbectrometreg màs gradd ymchwil a phroffion biofarcwyr arferol mewn gofal clinigol.

I grynhoi, bydd angen i brawf biofarcwyr ghrelin sydd yn hyfyw yn glinigol gydbwysu cywirdeb sbectrometreg màs â symlrwydd gweithredol profion imiwn, gan gyd-fynd â thueddiadau sydd yn esblygu mewn diagnosteg niwroddirywiad, gan gynnwys profion panel, cyflwyno POC, ac integreiddio yr GIG. Bydd llwyddiant trawsfudol yn gofyn am gydlyn rhyngddisgyblaethol ar draws gwyddoniaeth ddadansoddol, niwroleg glinigol, a pholisi gofal iechyd.

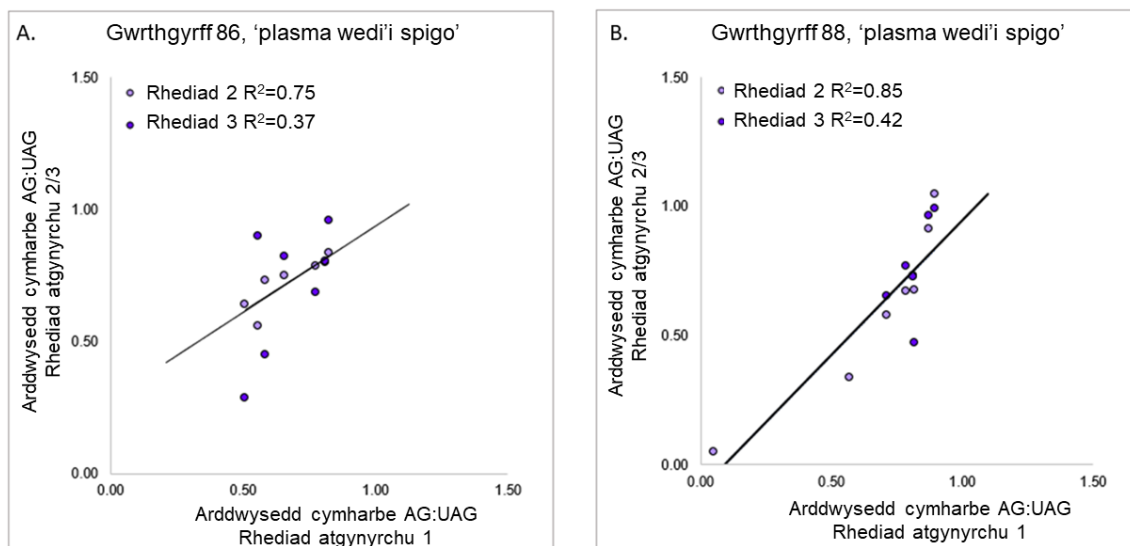
Atodiad A: Ffigur a Thablau Atodol.

Ffigur Atodol S1: Cymariaethau ystadegol estynedig o hidlwyr allgyrchol 3kDa a 10kDa yn dilyn gwaddodiad protein (Eslami et al. a Sidibe et al.) a phrotocolau SPE. Mae yr ffigur hwn yn darparu cymariaethau pâr ychwanegol nad ydynt yn cael eu dangos yn Ffigur 3.14 er mwyn eglurder gweledol, gan gynnwys gwahaniaethau arwyddocaol rhwng protocolau Eslami a Sidibe. Defnyddiwyd ANOVA dwyffordd gyda phrawf ôl-hoc Tukey ar gyfer pob dadansoddiad. Ystyriwyd bod $P < 0.05$ yn ystadegol arwyddocaol. **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. Cyflwynir data fel cymedr $\pm$ SEM (N=3). Gweler yr adran Canlyniadau am ddehongliad ystadegol llawn.



Ffigur Atodol S2: Amrywioldeb mewn-prawf BAMS ar gyfer gwrthgyrff 86 ac 88.

Mae yr ffigur hwn yn dangos atgynhyrchadwyedd gleiniau magnetig wedi eu gorchuddio ag gwrthgyrff a ddefnyddir i fesur lefelau ghrelin yn yr un sampl plasma 'spigo' rhoddwr. Ar gyfer pob gwrthgyrff, cymharwyd arddwysedd hAG:UAG o un glain â yr rhai o yr ddau glain arall, a chafodd y canlyniadau eu ffitio gan ddefnyddio model atchweliad llinol ($y = mx + b$) gyda gwerthoedd R^2 wedi eu cyfrifo yn Microsoft Excel. Mae Panel A yn dangos data ar gyfer gwrthgyrff 86, a gynhyrchodd werth R^2 o ~0.6 ar gyfer y ddau gymhariaeth glain, gan nodi gradd sylweddol o amrywioldeb mewn-prawf. Mewn cyferbyniad, mae panel B yn dangos gwrthgyrff 88, a gynhyrchodd werthoedd R^2 yn fwy na 0.9, gan adlewyrchu atgynhyrchadwyedd uchel a pherfformiad mewn-prawf derbyniol. Mae yr profion amrywioldeb ychwanegol hyn, fel yr adroddwyd gan Nielsen et al. (2020), yn cefnogi ymhellach berfformiad uwch gwrthgyrff 88 o fewn yr un rhediad arbrol.

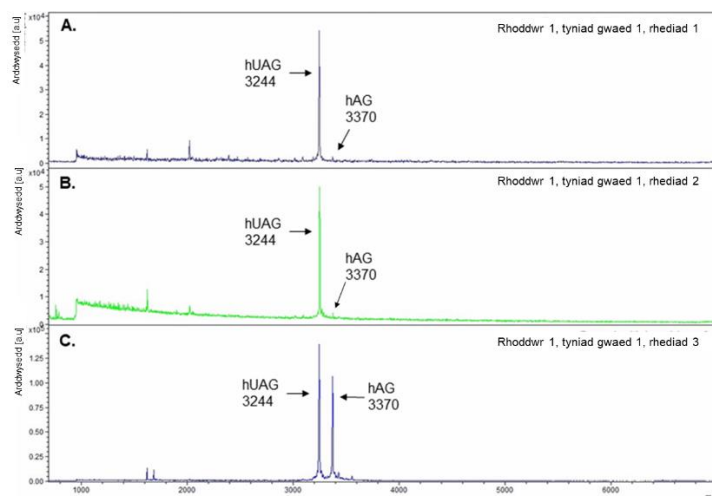


Ffigur Atodol S3 Amrywioldeb rhyng profion yn asesu atgynyrchioldeb rhwng rhediadau arbrofol gan ddefnyddio samplau plasma wedi eu 'spigo' o yr un rhoddwr. I werthuso atgynyrchioldeb ymhellach, perfformiwyd y protocol BAMS ar yr un sampl plasma ar draws tair rhediad arbrofol ar wahân i asesu amrywioldeb rhyng prawf ar gyfer pob gwrthgorff. Mae yr dull dadansoddi yn debyg i yr un a ddefnyddiwyd yn Ffigur Atodol S2, lle cymharwyd y gymhareb arddwysedd cyfartalog o AG i UAG o rediad 1 yn erbyn y rhai o rediadau 2 a 3. Mae Panel (A) yn dangos canlyniadau ar gyfer gwrthgorff 86, a phanel (B) ar gyfer gwrthgorff 88. Cymhwyswyd ffitiadau atchweliad llinol (sgwariau lleiaf cyffredin), a chyfrifwyd gwerthoedd R^2 gan ddefnyddio Microsoft Excel. Dangosodd gwrthgorff 88 atgynyrchioldeb uwch yn gyson dros wrthgorff 86, gyda gwerthoedd R^2 rhediad 2 o 0.85 a 0.75 yn y drefn honno, o ei gymharu â rhediad 1. Dangosodd y ddau wrthgorff atgynyrchioldeb is yn rhediad 3, gyda gwerthoedd R^2 yn gostwng i 0.42 ar gyfer gwrthgorff 88 a 0.37 ar gyfer gwrthgorff 86, a allai adlewyrchu gwallau dynol neu wallau sydd yn gysylltiedig ag offerynnau. Mae yr canfyddiadau hyn yn cyd-fynd â yr amrywioldeb a welwyd yn flaenorol o fewn gleiniau (Ffigur Atodol S2).

Gwrthgyrff 88			Cymhareb AG:UAG					
Sampl	Tyniad	Rhediad	Arddwysedd					
			Glain 1	Glain 2	Glain 3	Cymedr	SD	CV
Rhoddwr 1 (plasma wedi'i spigo)	1	1	0.05	0.07	0.04	0.05	0.01	20
		2	0.06	0.05	0.03	0.05	0.02	32
		3	0.83	0.88	0.74	0.82	0.06	7
Rhoddwr 1 (plasma wedi'i spigo)	2	1	0.88	0.92	0.90	0.90	0.02	2
		2	0.99	1.15	1.00	1.05	0.07	7
		3	0.99	0.99	0.99	0.99	0.00	0
Rhoddwr 2 (plasma wedi'i spigo)	1	1	0.52	0.62	0.58	0.57	0.04	7
		2	0.34	0.32	0.35	0.34	0.01	4
		3	1.09	1.21	1.11	1.14	0.05	5
Rhoddwr 2 (plasma wedi'i spigo)	2	1	0.87	0.92	0.83	0.87	0.04	4
		2	0.95	0.90	0.88	0.91	0.03	3
		3	0.95	0.94	0.99	0.96	0.02	2
Rhoddwr 3 (plasma wedi'i spigo)	1	1	0.74	0.90	0.72	0.79	0.08	10
		2	0.53	0.77	0.71	0.67	0.10	15
		3	0.78	0.90	0.62	0.76	0.12	15
Rhoddwr 3 (plasma wedi'i spigo)	2	1	0.82	0.81	0.81	0.81	0.00	0
		2	0.74	0.74	0.70	0.73	0.02	3
		3	0.72	0.71	0.74	0.72	0.01	2
Rhoddwr 4 (plasma wedi'i spigo)	1	1	0.77	0.66	0.71	0.71	0.04	6
		2	0.59	0.59	0.55	0.58	0.02	3
		3	0.61	0.67	0.67	0.65	0.03	4
Rhoddwr 5 (plasma wedi'i spigo)	1	1	0.81	0.81	0.84	0.82	0.01	2
		2	0.74	0.64	0.65	0.67	0.04	7
		3	0.50	0.46	0.45	0.47	0.02	4

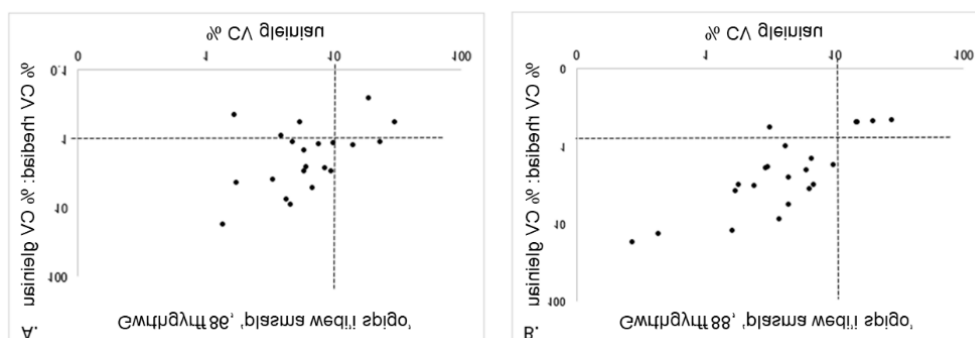
Tabl Atodol S1 Cymarebau arddwysedd AG:UAG Dynol ar gyfer pob rhoddwr a thyniad gwaed ar draws tair rhediad arbrefol gan ddefnyddio gwrthgyrff 88 mewn samplau plasma wedi eu 'spigo'.

Er mwyn ymchwilio i yr dirywiad atgynhyrchadwyedd a welwyd yn rhediad arbrefol 3 (Ffigur Atodol S3), dadansoddwyd gwerthoedd arddwysedd cymedrig unigol ar gyfer rhediadau 1, 2, a 3. Ar gyfer rhoddwr 1, tyniad gwaed 1, dangosodd rhediad 3 gymhareb arddwysedd cymedrig allanol o 0.8, o ei gymharu â rhediadau 1 a 2, a oedd yn gyfartaledd o tua 0.05. Fodd bynnag, dangosodd rhoddwr 1, tyniad gwaed 2 y tri rhediad gyda chymarebau arddwysedd cymedrig rhwng 0.9 ac 1, gan awgrymu bod rhediadau 1 a 2 o fewn tyniad gwaed 1 yn allanolion posibl. Cefnogir y casgliad hwn gan werthoedd CV, lle roedd gan rhediadau 1 a 2 CVau uwch o 20 a 32, yn y drefn honno, o ei gymharu â CV rhediad 3 o 7. Gwelwyd tuedd gymharol ar gyfer rhoddwr 2 tyniad gwaed 1, lle ymddangosodd rhediad 3 i ddechrau fel allanolyn (cymedr 1.14) yn erbyn rhediadau 1 a 2 (cymedrau 0.57 a 0.34). Ac eto, yn nilyniad rhoddwr 2 tyniad gwaed 2, roedd yr holl rhediadau yn amrywio yn rhwng 0.87 a 0.96, gan ddangos bod rhediadau 1 a 2 yn tyniad gwaed 1 yn allanolion. Yn nodedig, roedd rhoddwr 2 tyniad gwaed 1 rhediadau 1 a 2 yn cyddaro â yr un diwrnod y canfuwyd anomaleddau ar gyfer rhoddwr 1, gan awgrymu ffynhonnell a rennir bosibl o amrywiad arbrefol. Mae celloedd wedi eu hamlygu mewn coch yn dynodi gwerthoedd anomalaidd posibl o fewn tyniad gwaed.

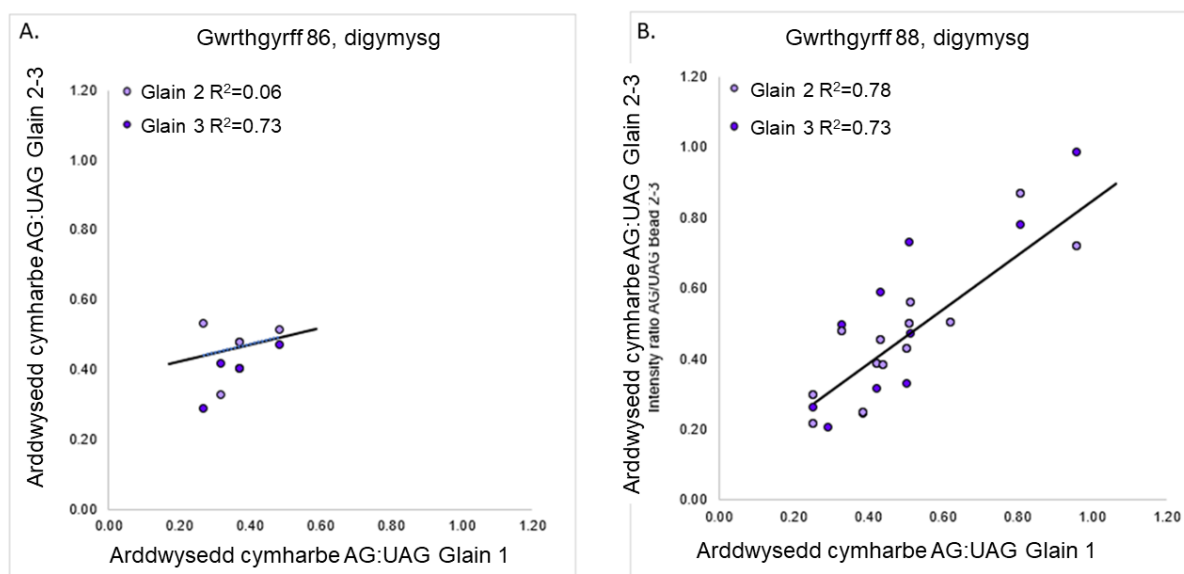


Ffigur Atodol S4 Sbectrwm MALDI-TOF o roddwr 1 ar draws tair rhediad arbrofol, yn dangos amrywioldeb mewn canfyddadwyedd asyl ghrelin.

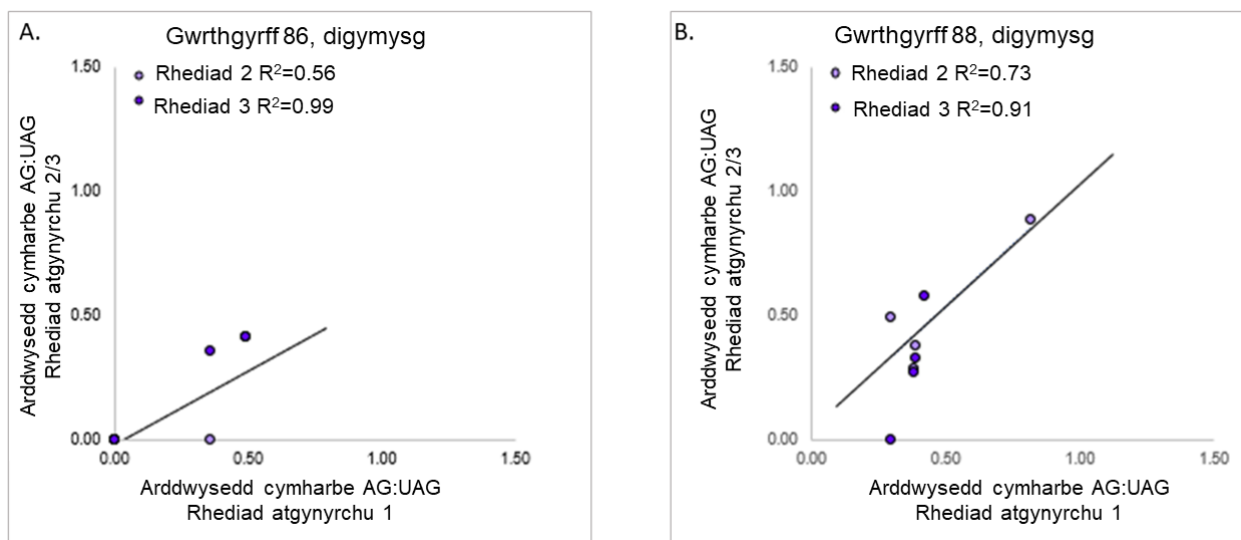
Sylwad ychwanegol drwy gydol y dadansoddiad hwn oedd bod gwerthoedd CV yn aml yn cael eu heffeithio gan y signal asyl ghrelin dynol yn disgyn islaw yr trothwy cymhareb signal-i-sŵn. Mae sbectrwm o rediadau 1 a 2 o roddwr 1, tyniad gwaed 1 yn dangos brig dadasyl ghrelin amlwg, tra bod y brig asyl ghrelin prin yn ganfyddadwy (Paneli A a B). I yr gwrthwyneb, yn rhediad 3 o roddwr 1, tyniad gwaed 1, mae yr brig asyl ghrelin yn weladwy yn glir ac ymhell uwchlaw yr trothwy signal-i-sŵn (Panel C). Mae yr gwahaniaeth hwn mewn canfyddadwyedd asyl ghrelin yn tynnu sylw at sut y gall trothwyon cymhareb signal-i-sŵn ddylanwadu ar gywirdeb mesur a chyfrannu at werthoedd CV uwch.



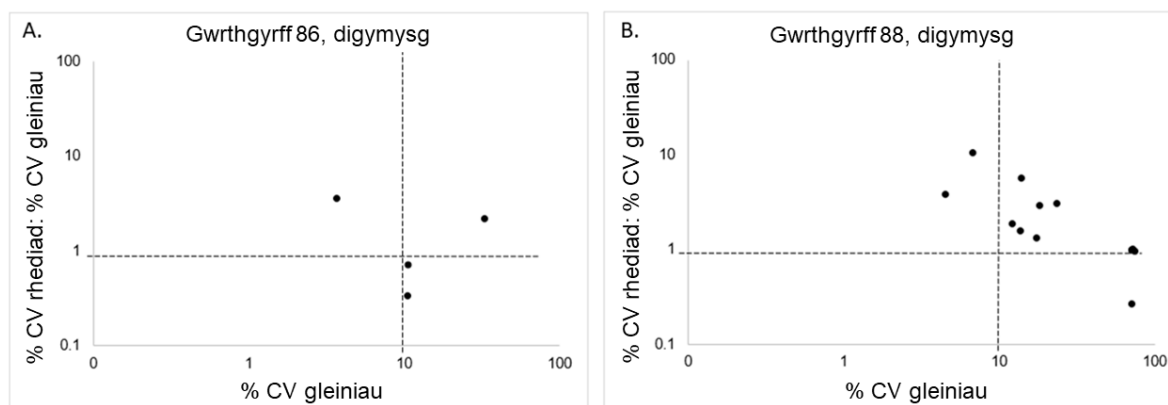
Ffigur Atodol S5. Penderfynwyd ar % CV rhediad : % CV gleiniau ar gyfer plasma wedi ei ‘spigo’ rhoddwyr unigol wedi ei blotio yn erbyn gwerthoedd cyfatebol % CV gleiniau. Gwerthusodd y prawf amrywioldeb terfynol y %CV yn gysylltiedig ag amrywiad rhwng gleiniau o fewn yr un sampl (gleiniau %CV, echelin-x) ac ar draws gwahanol rediadau arbrofol (rhediad %CV, echelin-y). Cynrychiolir y perfformiad dymunol gan werthoedd gleiniau %CV islaw 10% a gwerthoedd rhediad %CV islaw 1%. Mae pwyntiau data sydd wedi eu lleoli islaw yr ddau drothwy hyn yn dynodi cywirdeb ac atgynhyrchadwyedd uchel. Ar gyfer gwrthgorff 86 (Panel A) ac gwrthgorff 88 (Panel B), mae mwyafrif y pwyntiau data yn clwstwr yn y cwadrant chwith uchaf, sydd yn dynodi perfformiad prawf da. Yn benodol, mae gwerthoedd gleiniau %CV yn gyffredinol yn aros o dan 10%, tra bod gwerthoedd rhediad %CV yn tueddu i fod yn fwy nag 1% ond yn aros o fewn yr ystod 1–10%, gan adlewyrchu amrywioldeb derbyniol rhwng rhediadau.



Ffigur Atodol S6 Amrywioldeb o fewn profion yn asesu atgynhyrchadwyedd rhwng tri glain sydd ynn meintioli cymhareb AG:UAG dynol yn yr un sampl plasma 'digymysg' yr un rhoddwr. I werthuso amrywioldeb o fewn profion mewn samplau plasma 'digymysg', plotiwyd y gymhareb arddwysedd o AG i UAG a fesurwyd gan un glain yn erbyn y cymhareb cyfatebol o yr ddau glain arall o yr un rhoddwr. Ar gyfer gwrthgorff 86 (Panel A), dangosodd glain 2 yn erbyn glain 1 werth R^2 isel o 0.06, tra bod glain 3 yn erbyn glain 1 wedi cynhyrchu R^2 uwch o 0.73. Dangosodd gwrthgorff 88 (Panel B) werthoedd R^2 o 0.78 a 0.73 ar gyfer glain 2 yn erbyn glain 1 a glain 3 yn erbyn glain 1, yn y drefn honno. Fodd bynnag, mae yr nifer gyfyngedig o bwyntiau data ar gyfer gwrthgorff 86 yn y samplau 'digymysg' yn cyfyngu ar ddehongliad pendant o yr canlyniadau hyn. Cyfrifwyd ffitiau atchweliad llinol gan ddefnyddio sgwariau lleiaf cyffredin yn Microsoft Excel.

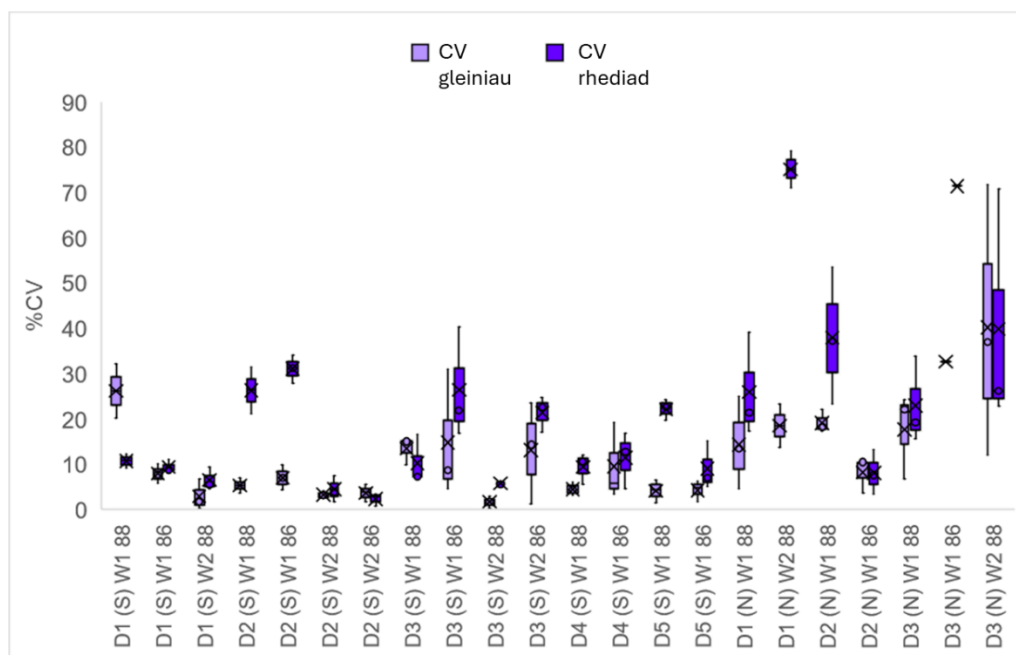


Ffigur Atodol S7 Amrywiaeth rhyng-prawf yn asesu atgynhyrchadwyedd rhwng rhediadau arbrofol gan ddefnyddio samplau plasma 'digymysg' o yr un rhoddwr. Dadansoddwyd yr amrywiad rhwng rhediadau sampl trwy blotio yr gymhareb arddwysedd AG:UAG gyfartalog o rediad 1 yn erbyn y rhai o rediadau 2 a 3. Dangosodd gwrthgorff 86 (Panel A) ac 88 (Panel B) berfformiad tebyg gyda gwerthoedd R^2 uchel o 0.99 a 0.91, yn y drefn honno, wrth gymharu rhediad 1 â rhediad 3. Fodd bynnag, gwelwyd gwerthoedd R^2 is ar gyfer rhediad 1 o ei gymharu â rhediad 2, 0.56 ar gyfer gwrthgorff 86 a 0.73 ar gyfer gwrthgorff 88, sydd yn adlewyrchu rhediad 2 fel allanolyn gyda chymhareb AG:UAG is. O ei gymharu â samplau plasma wedi ei 'spigo' (Ffigur Atodol S3), gostyngwyd atgynhyrchadwyedd mewn samplau 'digymysg', gyda yr olaf yn dangos gwerthoedd R^2 o 0.56 a 0.73 ar gyfer rhediad 1 o ei gymharu â rhediad 2, o ei gymharu â 0.75 a 0.85 mewn samplau 'wedi ei spigo', yn y drefn honno. Ar gyfer rhediad 3, cyflawnodd y ddau wrthgorff werthoedd R^2 derbyniol uwchlaw 0.9 mewn samplau 'digymysg' (y ffigur hwn, Ffigur Atodol S7). Ar y cyfan, nodwyd atgynhyrchadwyedd gwell mewn samplau 'wedi ei spigo', yn ôl pob tebyg oherwydd lefelau uwch o asyl ghrelin yn gwella canfod cymhareb AG:UAG. Cyfrifwyd ffitiau atchweliad llinol gan ddefnyddio sgwariau lleiaf cyffredin yn Microsoft Excel.



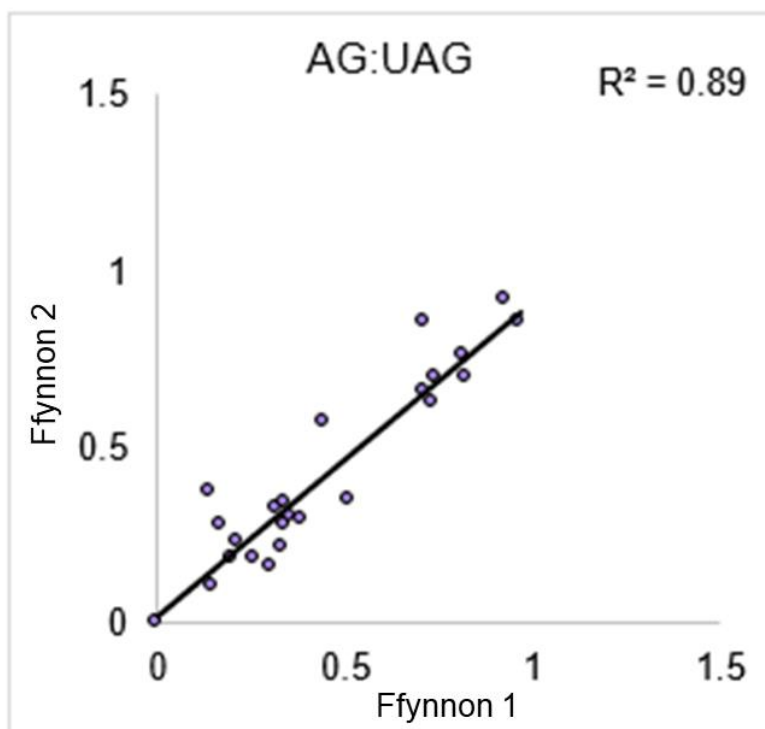
Ffigur Atodol S8 Asesiad amrywioldeb meintioli AG:UAG dynol mewn samplau plasma 'digymysg' gan roddwyr unigol.

Platiwyd y gwerthoedd %CV ar gyfer gleiniau unigol (%CV gleiniau) ac atgynhyrchiadau ar draws rhediadau (rhediad %CV) i werthuso amrywioldeb. Dangosodd gwrthgorff 86 ac 88 dueddiadau tebyg, gyda nifer sylweddol o bwyntiau data yn dangos gleiniau %CV a chymhareb gleiniau %CV rhediad:%CV uchel. Ar gyfer gwrthgorff 86, roedd y gymhareb gleiniau %CV rhediad:%CV gymedrig yn 1.7, gyda gwerthoedd gleiniau %CV yn aml yn fwy na 10%. Dangosodd gwrthgorff 88 gymhareb gleiniau %CV rhediad:%CV gymedrig uwch o 2.1 a gwerthoedd gleiniau %CV yn aml yn fwy na 20%. Mae yr canfyddiadau hyn yn awgrymu amrywioldeb nodedig ar gyfer y ddau wrthgorff, a allai ddeillio o gyfyngiadau sensitifrwydd, yn enwedig pan fo crynodiadau peptid yn isel.



Ffigur Atodol S9 Plot blwch yn dangos dosbarthiad gwerthoedd %CV ar gyfer samplau plasma 'digymysg' a 'wedi ei spigo' gan ddefnyddio gwrthgyrff 86 ac 88.

Mae yr plot blwch yn cynrychioli gwerthoedd %CV a gyfrifwyd o ddata meintoli ar draws gwahanol roddwyr, gan gymharu amrywioldeb o fewn gleiniau (gleiniau %CV) a rhwng rhediadau (rhediad %CV). Yn nodedig, mae gwerthoedd %CV yn gyson uwch mewn samplau 'digymysg' o ei gymharu â samplau 'wedi ei spigo'. Mae yn debyg bod yr amrywioldeb cynyddol hwn mewn samplau 'digymysg' oherwydd cyfyngiadau sensitifrwydd sydd yn gynhenid yn y protocol. Adnabod rhoddwyr: D1 = rhoddwr 1, D2 = rhoddwr 2, D3 = rhoddwr 3, D4 = rhoddwr 4, D5 = rhoddwr 5. Mathau o samplau: S = 'wedi ei spigo', N = 'digymysg'. Tynnu yn ôl: W1 = tynnu yn ôl 1, W2 = tynnu yn ôl 2, W3 = tynnu yn ôl 3.

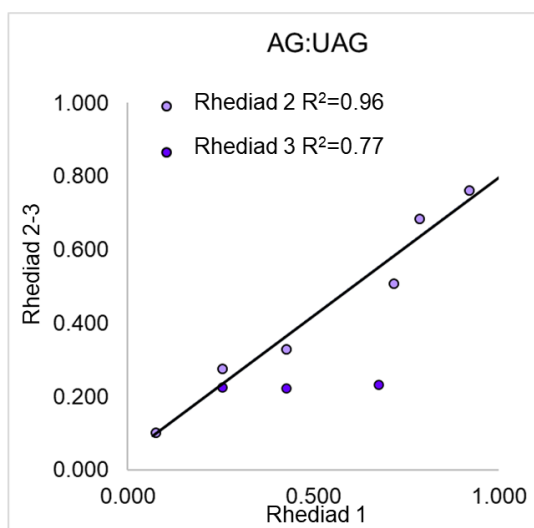


Ffigur Atodol S10 Amrywiad o fewn profion ELISA yn asesu atgynyrchioldeb rhwng ffynhonnau o fewn yr un sampl plasma rhoddwr.

Cynhyrchwyd cromliniau safonol ar draws tair rhediad arbrofol i werthuso amrywiad rhwng profion o fewn citiau ELISA ar gyfer canfod dadasyl (A05106) ac asyl ghrelin (A05119) (Bertin). Mesurwyd amrywiad rhwng profion trwy gymharu cymarebau hAG:UAG rhwng dau ffynnon o yr un cit ELISA. Cymhwyswyd ffit atchweliad llinol, gan gynhyrchu gwerth R^2 o 0.88. I gymharu, gwerthuswyd amrywioldeb rhwng profion BAMS trwy gymariaethau arddwysedd ar draws tair glein o fewn sampl. Dangosodd BAMS werthoedd R^2 uwchlaw 0.9 ar gyfer gwrthgorff 88 mewn plasma 'spigo' (Ffigur Atodol S2B), gan ddangos atgynyrchioldeb cymharol neu uwch nag ELISA. Fodd bynnag, dangosodd gwrthgorff 86 mewn plasma 'wedi ei spigo' atgynyrchioldeb BAMS is ($R^2 = 0.6$, Ffigur Atodol S2A). Mewn samplau 'digymysg', perfformiodd atgynyrchioldeb ELISA yn well na BAMS, gydag ELISA yn dangos gwerthoedd R^2 uwch o ei gymharu ag gwrthgorff 86 ($R^2 = 0.06$ a 0.73) ac gwrthgorff 88 ($R^2 > 0.7$) yn BAMS (Ffigurau Atodol S6A ac S6B). Cyfrifwyd atchweliad llinol gan ddefnyddio sgwariau lleiaf cyffredin yn Microsoft Excel.

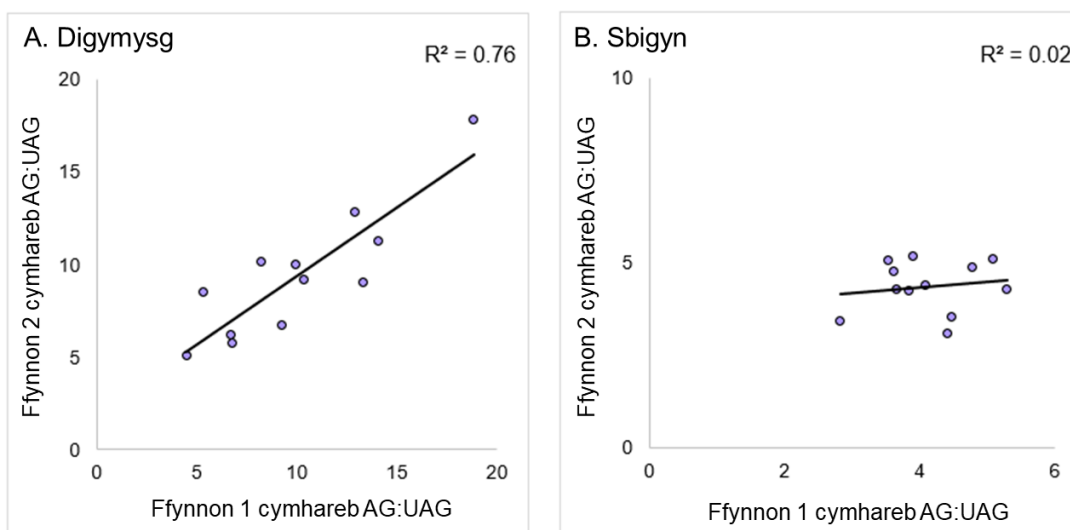
Bertin AG: UAG							Gwrthgyrff 88		Cymhareb AG:UAG						
Crynodiad (ng/mL)	Rhediad	Ffynnon 1	Ffynnon 2	Cymedr	SD	CV	Sampl	Tyniad	Rhediad	Arddwysedd					
										Glain 1	Glain 2	Glain 3	Cymedr	SD	CV
2	1	0.166667	0.28125	0.224	0.081	36	Rhoddwr 1 (sbigin)	1	1	0.05	0.07	0.04	0.05	0.01	20
	2	0.333333	0.217391	0.275	0.082	35			2	0.06	0.05	0.03	0.05	0.02	32
	3	0.139535	0.37037	0.255	0.163	64			3	0.83	0.88	0.74	0.82	0.06	7
3.9	1	0.196262	0.182796	0.190	0.010	5	Rhoddwr 1 (sbigin)	2	1	0.88	0.92	0.90	0.90	0.02	2
	2	0.142857	0.108108	0.125	0.025	20			2	0.99	1.15	1.00	1.05	0.07	7
	3	0.383333	0.298246	0.341	0.060	18			3	0.99	0.99	0.99	0.99	0.00	0
7.8	1	0.211382	0.234848	0.223	0.017	7	Rhoddwr 2 (sbigin)	1	1	0.52	0.62	0.58	0.57	0.04	7
	2	0.354167	0.305085	0.330	0.035	11			2	0.34	0.32	0.35	0.34	0.01	4
	3	0.506667	0.349398	0.428	0.111	25			3	1.09	1.21	1.11	1.14	0.05	5
15.6	1	0.304813	0.15942	0.232	0.103	42	Rhoddwr 2 (sbigin)	2	1	0.87	0.92	0.83	0.87	0.04	4
	2	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			2	0.95	0.90	0.88	0.91	0.03	3
	3	0.731343	0.623932	0.678	0.076	11			3	0.95	0.94	0.99	0.96	0.02	2
31.3	1	0.259819	0.184524	0.222	0.053	24	Rhoddwr 3 (sbigin)	1	1	0.74	0.90	0.72	0.79	0.08	10
	2	0.443925	0.570707	0.507	0.090	18			2	0.53	0.77	0.71	0.67	0.10	15
	3	0.738739	0.693617	0.716	0.032	4			3	0.78	0.90	0.62	0.76	0.12	15
62.5	1	0.339383	0.277477	0.308	0.044	14	Rhoddwr 3 (sbigin)	2	1	0.82	0.81	0.81	0.81	0.00	0
	2	0.710692	0.659459	0.685	0.036	5			2	0.74	0.74	0.70	0.73	0.02	3
	3	0.814815	0.758929	0.787	0.040	5			3	0.72	0.71	0.74	0.72	0.01	2
125	1	0.315043	0.32948	0.322	0.010	3	Rhoddwr 4 (sbigin)	1	1	0.77	0.66	0.71	0.71	0.04	6
	2	0.711429	0.854197	0.783	0.101	13			2	0.59	0.59	0.55	0.58	0.02	3
	3	0.963357	0.853795	0.909	0.077	9			3	0.61	0.67	0.67	0.65	0.03	4
250	1	0.338599	0.342162	0.340	0.003	1	Rhoddwr 5 (sbigin)	1	1	0.81	0.81	0.84	0.82	0.01	2
	2	0.824742	0.699507	0.762	0.089	12			2	0.74	0.64	0.65	0.67	0.04	7
	3	0.923122	0.919204	0.921	0.003	0			3	0.50	0.46	0.45	0.47	0.02	4

Tabl Atodol S2 Cymhariaeth o amrywioldeb o fewn profion rhwng ELISA a BAMS gan ddefnyddio gwrthgyrff 88 mewn samplau plasma wedi ei 'spigo'. Cymharir gwerthoedd CV o 24 sampl a ddadansoddwyd gan ELISA a BAMS i asesu amrywioldeb o fewn profion. Dangosodd BAMS lai o amrywiad, gyda dim ond dau werth CV yn fwy na 20, tra bod gan yr ELISA saith gwerth CV uwchlaw yr trothwy hwn. Yn ôl Reed, Lynn, a Meade (2002), ystyrir bod gwerthoedd CV islaw 20 yn dderbyniol, mae gwerthoedd islaw 10 yn dda, a gwerthoedd islaw 5 yn rhagorol.



Ffigur Atodol S11 Amrywiaeth rhyng profion ELISA yn asesu atgynrychioldeb rhwng samplau o yr un rhoddwr ar draws gwahanol becynnau (N=3).

Gwerthuswyd yr amrywiad rhyng-profion ar gyfer yr ELISA ghrelin dynol trwy gymharu mesuriadau o becynnau lluosog ar draws tair rhediad arbrofol. Mae yr canlyniadau yn dangos perfformiad tebyg i yr amrywioldeb mewn profion gyda yr ELISA yn dangos atgynrychioldeb cyson. Yn nodedig, dangosodd yr ELISA fwy o werthoedd CV y tu allan i yr ystod dderbyniol o ei gymharu â yr prawf BAMS, a oedd â dim ond dau werth CV uwchlaw yr trothwy, gan amlygu cadernid cymharol yr prawf BAMS.



Ffigur Atodol S12 Defnyddir cymhareb AG:UAG i bennu yr amrywiad mewn-prawf o yr pecyn ELISA gan ddefnyddio plasma gan 5 rhoddwr iach. Cafwyd samplau plasma gan yr un rhoddwr a thyniad gwaed â yr rhai a ddadansoddwyd gan yr prawf BAMS. Aseswyd samplau plasma 'digymysg' a 'wedi ei spigo'. Yn wahanol i BAMS, lle cafodd rhai tyniad gwaed eu heithrio oherwydd argaeledd gleiniau, perfformiwyd yr ELISA ar bob sampl. Gwerthuswyd yr amrywiad mewn profion ar wahân ar gyfer plasma 'digymysg' (Panel A) a plasma 'wedi ei spigo' (Panel B). Mae yr data hwn yn tynnu sylw at wahaniaethau yn atgynhyrchadwyedd rhwng ELISA a BAMS ar draws mathau o samplau plasma.

Cyfeirnodau

Alzheimer's Society. (2025, January 30). *Trial for blood tests to diagnose dementia accepts first participants* [Press release]. Retrieved from

<https://www.alzheimers.org.uk/news/2025-01-30/trial-blood-tests-diagnose-dementia-accepts-first-participants>

Andrews, Z. B., Erion, D., Beiler, R., Liu, Z. W., Abizaid, A., Zigman, J., ... & Horvath, T. L. (2009). Ghrelin promotes and protects nigrostriatal dopamine function via a UCP2-dependent mitochondrial mechanism. *Journal of Neuroscience*, 29(45), 14057–14065. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4190-09.2009>

Akamizu, T., Takaya, K., Irako, T., Hosoda, H., Teramukai, S., Matsuyama, A., Tada, H., Miura, K., Shimizu, A., Fukushima, M., Yokode, M., Tanaka, K., and Kangawa, K. (2004). Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects. *European journal of endocrinology*, 150(4), 447–455. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1500447>

Alnasser, S., et al. (2020). Diagnostic value of serum ghrelin levels in inflammatory diseases: A systematic review. *The Journal of International Medical Research*, 48(7), 0300060520920441. <https://doi.org/10.1177/0300060520920441>

Andrews Z. B., Erion D. M., Beiler R., Choi C. S., Shulman G. I., Horvath T. L., et al. (2009). Ghrelin Promotes and Protects Nigrostriatal Dopamine Function via a UCP2-Dependent Mitochondrial Mechanism. *J. Neurosci.* 29 (45), 14057–14065. doi:10.1523/JNEUROSCI.3890-09.2009

Ansong, C.; Wu, S.; Meng, D.; Liu, X.; Brewer, H. M.; Kaiser, B. L. D.; Nakayasu, E. S.; Cort, J. R.; Pevzner, P.; Smith, R. D.; Heffron, F.; Adkins, J. N.; Paša-Tolić, L. Top-down Proteomics Reveals a Unique Protein S-Thiolation Switch in *Salmonella Typhimurium* in Response to Infection-like Conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013, 110 (25), 10153– 10158, DOI: 10.1073/pnas.1221210110

Ashton, N. J., Brum, W. S., Di Molfetta, G., Benedet, A. L., Arslan, B., Jonaitis, E., Langhough, R. E., Cody, K., Wilson, R., Carlsson, C. M., Vanmechelen, E., Montoliu-Gaya, L., Lantero-Rodriguez, J., Rahmouni, N., Tissot, C., Stevenson, J., Servaes, S., Therriault, J., Pascoal, T., Lleó, A., ... Zetterberg, H. (2024). Diagnostic Accuracy of a

Plasma Phosphorylated Tau 217 Immunoprawf for Alzheimer Disease Pathology. *JAMA neurology*, 81(3), 255–263. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2023.5319>

Bando, M., Iwakura, H., Koyama, H., Hosoda, H., Shigematsu, Y., Ariyasu, H., Akamizu, T., Kangawa, K., & Nakao, K. (2016). High incorporation of long-chain fatty acids contributes to the efficient production of acylated ghrelin in ghrelin-producing cells. *FEBS letters*, 590(7), 992–1001. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12132>

Banks, W. A., Tschöp, M., Robinson, S. M., and Heiman, M. L. (2002). Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 302(2), 822–827. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.034827>

Barthélemy, N. R., Horie, K., Sato, C., and Bateman, R. J. (2020). Blood plasma phosphorylated-tau isoforms track CNS change in Alzheimer's disease. *The Journal of experimental medicine*, 217(11), e20200861. <https://doi.org/10.1084/jem.20200861>

Bateman, R. J., Barthélemy, N. R., and Horie, K. (2020, March 1). Another step forward in blood-based diagnostics for Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, Vol. 26, pp. 314–316. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0797-4>

Bayliss, J. A., & Andrews, Z. B. (2013). Ghrelin is neuroprotective in Parkinson's disease: Molecular mechanisms of metabolic neuroprotection. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, 4(1), 25–36. <https://doi.org/10.1177/2042018813479645>

Bayliss, J. A., Lemus, M. B., Ding, C., Rose, C., & Andrews, Z. B. (2016). Central ghrelin-AMPK signaling mediates the neuroprotective effects of ghrelin in Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 11, 30.

Bayliss, J. A., Lemus, M. B., Stark, R., Santos, V. V., Thompson, A., Rees, D. J., Galic, S., Elsworth, J. D., Kemp, B. E., Davies, J. S., and Andrews, Z. B. (2016). Ghrelin-AMPK Signaling Mediates the Neuroprotective Effects of Calorie Restriction in Parkinson's Disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 36(10), 3049–3063. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4373-15.2016>

Bayoumy S, Verberk IMW, den Dulk B, Hussainali Z, Zwan M, van der Flier WM, Ashton NJ, Zetterberg H, Blennow K, Vanbrabant J, Stoops E, Vanmechelen E, Dage JL, Teunissen CE. Clinical and analytical comparison of six Simoa prawfs for plasma P-tau isoforms P-tau181, P-tau217, and P-tau231. *Alzheimers Res Ther*. 2021 Dec 4;13(1):198. doi: 10.1186/s13195-021-00939-9. PMID: 34863295; PMCID: PMC8645090.

Beavis RC, Chaudhary T, Chait BT. α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrixassisted laser desorption mass spectrometry. *Org Mass Spectrom* 1992;27:156–158

Bednarek, M. A., Feighner, S. D., Pong, S. S., McKee, K. K., Hreniuk, D. L., Silva, M. V., Warren, V. A., Howard, A. D., Van Der Ploeg, L. H., and Heck, J. V. (2000). Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *Journal of medicinal chemistry*, 43(23), 4370–4376. <https://doi.org/10.1021/jm0001727>

Behnouch, B., Sheikhezadi, A., Bazmi, E., Fattahi, A., Sheikhezadi, E., and Saberi Anary, S. H. (2015). Comparison of UHPLC and HPLC in benzodiazepines analysis of postmortem samples: a case-control study. *Medicine*, 94(14), e640. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000640>

Benedet, A. L., Milà-Alomà, M., Vrillon, A., Ashton, N. J., Pascoal, T. A., Lussier, F., Karikari, T. K., Hourregue, C., Cognat, E., Dumurgier, J., Stevenson, J., Rahmouni, N., Pallen, V., Poltronetti, N. M., Salvadó, G., Shekari, M., Operto, G., Gispert, J. D., Minguillon, C., Fauria, K., ... Translational Biomarkers in Aging and Dementia (TRIAD) study, Alzheimer's and Families (ALFA) study, and BioCogBank Paris Lariboisière cohort (2021). Differences Between Plasma and Cerebrospinal Fluid Glial Fibrillary Acidic Protein Levels Across the Alzheimer Disease Continuum. *JAMA neurology*, 78(12), 1471–1483. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2021.3671>

Bender, B. J., Vortmeier, G., Ernicke, S., Bosse, M., Kaiser, A., Els-Heindl, S., Krug, U., Beck-Sickinger, A., Meiler, J., and Huster, D. (2019). Structural Model of Ghrelin Bound to its G Protein-Coupled Receptor. *Structure (London, England : 1993)*, 27(3), 537–544.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.12.004>

Bertram, L. and Tanzi, R.E. 2005. The Journal of Clinical Investigation The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *The Journal of Clinical Investigation* 115(6), pp. 1449–1457. Available at: <http://www.jci.org>.

Bjerner, J., Nustad, K., & Norum, L. F. (2015). Analytical performance of multiplex immunoassays: A comparative study of Luminex and other platforms. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 75(5), 397–404. <https://doi.org/10.3109/00365513.2015.1039181>

Beuker, C., Schreiner, U., Strecker, J. K., Altach, E., Rätzel, V., Schmidt-Pogoda, A., Wiendl, H., Minnerup, J., & Diederich, K. (2025). Ghrelin promotes neurologic recovery and neurogenesis in the chronic phase after experimental stroke. *Neurological research and practice*, 7(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s42466-025-00371-6>

Bladergroen, M. R., and van der Burgt, Y. E. (2015). Solid-phase extraction strategies to surmount body fluid sample complexity in high-throughput mass spectrometry-based proteomics. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2015, 250131. <https://doi.org/10.1155/2015/250131>

Blatnik, M. A., & Soderstrom, C. A. (2011). Pre-analytical considerations for ghrelin measurement. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(3), 740–748.

Blatnik M., Soderstrom C.I., Dysinger M., Fraser S.A. Prandial ghrelin attenuation provides evidence that des-acyl ghrelin may be an artifact of sample handling in human plasma. *Bioanalysis*. 2012;4:2447–2455. doi: 10.4155/bio.12.248.

Blatnik, M., and Soderstrom, C. I. (2011). A practical guide for the stabilization of acylghrelin in human blood collections. *Clinical endocrinology*, 74(3), 325–331. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2010.03916.x>

Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., and Zetterberg, H. (2010, March). Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, Vol. 6, pp. 131–144. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.4>

Boer DEC, van Smeden J, Bouwstra JA, Aerts JMFG. Glucocerebrosidase: Functions in and Beyond the Lysosome. *J Clin Med*. 2020 Mar 9;9(3):736. doi: 10.3390/jcm9030736. PMID: 32182893; PMCID: PMC7141376.

Brandt, H., Ehmann, T., and Otto, M. (2010). Solvent selection for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of synthetic polymers employing solubility parameters. *Rapid communications in mass spectrometry* : RCM, 24(16), 2439–2444. <https://doi.org/10.1002/rcm.4668>

Braak, H., de Vos, R. A., Bohl, J., & Del Tredici, K. (2003). Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neuroscience Letters*, 396(1), 67–72.

Breijyeh, Z., and Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(24), 5789. <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>

Broglia F, Gottero C, Prodam F, Gauna C, Muccioli G, Papotti M, Abribat T, Van Der Lely AJ, Ghigo E. Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;89(6):3062-5. doi: 10.1210/jc.2003-031964. PMID: 15181099.

Buntwal, L., Sassi, M., Morgan, A. H., Andrews, Z. B., and Davies, J. S. (2019). Ghrelin-Mediated Hippocampal Neurogenesis: Implications for Health and Disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 30(11), 844–859. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.07.001>

Cabral, A., Fernandez, G., and Perello, M. (2013). Analysis of brain nuclei accessible to ghrelin present in the cerebrospinal fluid. *Neuroscience*, 253, 406–415. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.008>

Cao, X., et al. (2018). Serum acyl-ghrelin as a biomarker for mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, 65, 161–167.

Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M. A., & Severi, C. (2015). The gut–brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Annals of Gastroenterology*, 28(2), 203–209.

Castrillo, J. I., and Oliver, S. G. (2016). Alzheimer's as a Systems-Level Disease Involving the Interplay of Multiple Cellular Networks. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), Vol. 1303, pp. 3–48. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2627-5_1

Cambridgeshire and Peterborough NHS Foundation Trust. (2024). *READ-OUT: A feasibility study for blood biomarker-based dementia screening*. <https://www.cpft.nhs.uk>

Cicognola, C., Janelidze, S., Hertze, J., Zetterberg, H., Blennow, K., Mattsson-Carlgren, N., & Hansson, O. (2021). Plasma glial fibrillary acidic protein detects Alzheimer pathology and predicts future conversion to Alzheimer dementia in patients with mild cognitive impairment. *Alzheimer's research & therapy*, 13(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s13195-021-00804-9>

Chamoun Z., Mann R. K., Nellen D., von Kessler D. P., Bellotto M., Beachy P. A., et al. (2001). Skinny Hedgehog, an Acyltransferase Required for Palmitoylation and Activity of the Hedgehog Signal. *Science* 293 (5537), 2080–2084. doi:10.1126/SCIENCE.1064437

Chan, H. N., Xu, D., Ho, S. L., Wong, M. S., & Li, H. W. (2017). Ultra-sensitive detection of protein biomarkers for diagnosis of Alzheimer's disease. *Chemical science*, 8(5), 4012–4018. <https://doi.org/10.1039/c6sc05615f>

Chen, V. P., Pang, Y.-P., Geng, L., Gao, Y., & Brimijoin, S. (2016). Physiological roles for butyrylcholinesterase: A BChE–ghrelin axis. *Chemico-Biological Interactions*, 259, 271–275.

Chen, B., Sun, Y., Niu, J., Jarugumilli, G. K., & Wu, X. (2022). Protein lipidation in cell signalling and diseases: Function, regulation, and therapeutic opportunities. **Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01245-y>

Chen M.-H., Li Y.-J., Kawakami T., Xu S.-M., Chuang P.-T. (2004). Palmitoylation Is Required for the Production of a Soluble Multimeric Hedgehog Protein Complex and Long-Range Signaling in Vertebrates. *Genes Dev.* 18 (6), 641–659. doi:10.1101/gad.1185804

Christenson, J.L. Powers, L.M. Shaw, O. Hansson, J.D. Doecke, Q.X. Li, C. Teunissen, H. Tumani, K. Blennow. Elecsys® Total-Tau and Phospho-Tau (181P)

CSF prawns: Analytical performance of the novel, fully automated immunoprawfs for quantification of tau proteins in human cerebrospinal fluid

Clin. Biochem., 72 (2019), pp. 30-38, 10.1016/j.clinbiochem.2019.05.005

Chung, H., Li, E., Kim, Y., Kim, S., and Park, S. (2013). Multiple signaling pathways mediate ghrelin-induced proliferation of hippocampal neural stem cells. *The Journal of endocrinology*, 218(1), 49–59. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0045>

Chung, H., Choi, J., and Park, S. (2018). Ghrelin protects adult rat hippocampal neural stem cells from excessive autophagy during oxygen-glucose deprivation. *Endocrine journal*, 65(1), 63–73. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ17-0281>

Chung, S. H., Yoo, D., Ahn, T., Lee, W., & Hong, J. (2023). Profiling Analysis of Tryptophan Metabolites in the Urine of Patients with Parkinson's Disease Using LC–MS/MS. *Pharmaceuticals*, 16(10), 1495. <https://doi.org/10.3390/ph16101495>

Cohen, S. L., and Chait, B. T. (1996). Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins. *Analytical Chemistry*, 68(1), 31–37. <https://doi.org/10.1021/ac9507956>

Coombs G. S., Yu J., Canning C. A., Veltri C. A., Covey T. M., Cheong J. K., et al. (2010). WLS-Dependent Secretion of WNT3A Requires Ser209 Acylation and Vacuolar Acidification. *J. Cell Sci.* 123 (19), 3357–3367. doi:10.1242/JCS.072132

Cournut, A., Moustiez, P., Coffinier, Y., Enjalbal, C., & Bich, C. (2024). Innovative SALDI mass spectrometry analysis for Alzheimer's disease synthetic peptides detection. *Talanta*, 268, 125357. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125357>

Covey, T. R., Thomson, B. A., and Schneider, B. B. (2009). Atmospheric pressure ion sources. *Mass Spectrometry Reviews*, 28(6), 870–897. <https://doi.org/10.1002/mas.20246>

Cowan, E., Burch, K. J., Green, B. D., & Grieve, D. J. (2016). Obestatin as a key regulator of metabolism and cardiovascular function with emerging therapeutic potential for diabetes. *British journal of pharmacology*, 173(14), 2165–2181. <https://doi.org/10.1111/bph.13502>

Cowley, M. A., Smith, R. G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K. L., Strasburger, C. J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M. L., Garcia-Segura, L.

M., Nillni, E. A., Mendez, P., Low, M. J., Sotonyi, P., Friedman, J. M., Liu, H., Pinto, S., Colmers, W. F., Cone, R. D., ... Horvath, T. L. (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*, 37(4), 649–661. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00063-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00063-1)

Darling J. E., Zhao F., Loftus R. J., Patton L. M., Gibbs R. A., Hougland J. L. (2015). Structure-Activity Analysis of Human Ghrelin O-Acyltransferase Reveals Chemical Determinants of Ghrelin Selectivity and Acyl Group Recognition. *Biochemistry* 54 (4), 1100–1110. doi:10.1021/bi5010359

Date, Y., Nakazato, M., Hashiguchi, S., Dezaki, K., Mondal, M. S., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., Arima, T., Matsuo, H., Yada, T., and Matsukura, S. (2002). Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes*, 51(1), 124–129. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.1.124>

De Meyer S ,Schaevebeke JM , Verberk IMW , et al. Comparison of ELISA- and SIMOA-based quantification of plasma A β ratios for early detection of cerebral amyloidosis. *Alzheimers Res Ther* 2020;12:162. doi:10.1186/s13195-020-00728-w pmid:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33278904>

De Strooper, B., & Karran, E. (2016). The cellular phase of Alzheimer's disease. *Cell*, 164(4), 603-615.

Diano, S., Farr, S. A., Benoit, S. C., McNay, E. C., da Silva, I., Horvath, B., Gaskin, F. S., Nonaka, N., Jaeger, L. B., Banks, W. A., Morley, J. E., Pinto, S., Sherwin, R. S., Xu, L., Yamada, K. A., Sleeman, M. W., Tschöp, M. H., and Horvath, T. L. (2006). Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nature neuroscience*, 9(3), 381–388. <https://doi.org/10.1038/nn1656>

Disanto, G., Barro, C., Benkert, P., Naegelin, Y., Schädelin, S., Giardiello, A., Zecca, C., Blennow, K., Zetterberg, H., Leppert, D., Kappos, L., Gobbi, C., Kuhle, J., & Swiss Multiple Sclerosis Cohort Study Group (2017). Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Annals of neurology*, 81(6), 857–870. <https://doi.org/10.1002/ana.24954>

Dixit, V. D., Yang, H., Sun, Y., Weeraratna, A. T., Youm, Y. H., Smith, R. G., and Taub, D. D. (2007). Ghrelin promotes thymopoiesis during aging. *The Journal of clinical investigation*, 117(10), 2778–2790. <https://doi.org/10.1172/JCI30248>

Dole, M., Hines, R. L., Mack, L. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D., and Alice, M. B. (1968). Gas phase macroions. *Macromolecules*, 1(1), 96–97. <https://doi.org/10.1021/ma60001a017>

Domon, B., & Aebersold, R. (2006). Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, 312(5771), 212-217.

Duncan, M. W., Roder, H., and Hunsucker, S. W. (2008). Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Briefings in functional genomics and proteomics*, 7(5), 355–370. <https://doi.org/10.1093/bfpg/eln041>

Elbehiry A, Aldubaib M, Abalkhail A, Marzouk E, ALbeloushi A, Moussa I, Ibrahim M, Albazie H, Alqarni A, Anagreyah S, Alghamdi S, Rawway M. How MALDI-TOF Mass Spectrometry Technology Contributes to Microbial Infection Control in Healthcare Settings. *Vaccines (Basel)*. 2022 Nov 8;10(11):1881. doi: 10.3390/vaccines10111881. PMID: 36366389; PMCID: PMC9699604.

Ellington, A. A., Kullo, I. J., Bailey, K. R., & Klee, G. G. (2010). Antibody-based protein multiplex platforms: Technical and operational challenges. *Clinical Chemistry*, 56(2), 186–193. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.127217>

Eslami, Z., Torabizadeh, M., Talebpour, Z., Talebpour, M., Ghassempour, A., and Aboul-Enein, H. Y. (2016). Simple and Sensitive Quantification of Ghrelin Hormone in Human Plasma Using SBSE-HPLC/DAD-MS. *Journal of chromatographic science*, 54(9), 1652–1660. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw125>

Eslami, M., Yousefi, B., Kokhaei, P., Hemati, M., Nejad, Z. R., & Arabkari, V. (2017). Ghrelin as a regulator of neurodegeneration, neuroinflammation, and neurogenesis: Implications for Alzheimer's disease. *Reviews in the Neurosciences*, 28(8), 769–780. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0005>

Fairchild J.N., Horvath K., Guiochon G. Theoretical advantages and drawbacks of on-line, multidimensional liquid chromatography using multiple columns operated in

parallel. J. Chromatogr. A. 2009;1216:6210–6217. doi: 10.1016/j.chroma.2009.06.085.

FDA-NIH Biomarker Working Group. (2016). BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. National Institutes of Health.

FDA. (2025). FDA grants marketing authorization for first blood test to aid in evaluation of Alzheimer's disease. U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements>

Fenn, J. B. (2003). Electrospray Wings for Molecular Elephants (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie*, 42(33), 3871–3894. <https://doi.org/10.1002/anie.200300605>

Fernandez G, Cabral A, Cornejo MP, De Francesco PN, Garcia-Romero G, Reynaldo M, Perello M. Des-Acyl Ghrelin Directly Targets the Arcuate Nucleus in a Ghrelin-Receptor Independent Manner and Impairs the Orexigenic Effect of Ghrelin. *J Neuroendocrinol*. 2016 Feb;28(2):12349. doi: 10.1111/jne.12349. PMID: 26661382.

Fernandez, G., et al. (2016). Unacylated ghrelin binds to a subset of arcuate nucleus cells independently of GHSR. *Endocrinology*, 157(2), 769–784.

Ferré, G., Louet, M., Saurel, O., Delort, B., Czaplicki, G., M'Kadmi, C., Damian, M., Renault, P., Cantel, S., Gavara, L., Demange, P., Marie, J., Fehrentz, J. A., Floquet, N., Milon, A., and Banères, J. L. (2019). Structure and dynamics of G protein-coupled receptor-bound ghrelin reveal the critical role of the octanoyl chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(35), 17525–17530. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905105116>

Foster-Schubert, K. E., Overduin, J., Prudom, C. E., Liu, J., Callahan, H. S., Gaylinn, B. D., Thorner, M. O., & Cummings, D. E. (2010). Acyl and total ghrelin are suppressed strongly by ingested proteins, weakly by lipids, and biphasically by carbohydrates. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(2), 827–834. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1328>

Frank, R., & Hargreaves, R. (2003). Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(7), 566–580.

Fukumoto, H., Tennis, M., Locascio, J. J., Hyman, B. T., Growdon, J. H., and Irizarry, M. C. (2003). Age but not diagnosis is the main predictor of plasma amyloid β -protein

levels. Archives of Neurology, 60(7), 958–964.
<https://doi.org/10.1001/archneur.60.7.958>

Fukushima, N., Hanada, R., Teranishi, H., Fukue, Y., Tachibana, T., Ishikawa, H., Takeda, S., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Kangawa, K., Nagata, K., and Kojima, M. (2005). Ghrelin directly regulates bone formation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 20(5), 790–798. <https://doi.org/10.1359/JBMR.041237>

Furness, J. B., Hunne, B., Matsuda, N., Yin, L., Russo, D., Kato, I., Fujimiya, M., Patterson, M., McLeod, J., Andrews, Z. B., and Bron, R. (2011). Investigation of the presence of ghrelin in the central nervous system of the rat and mouse. *Neuroscience*, 193, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.07.063>

Gahete, M. D., Córdoba-Chacón, J., Salvatori, R., Castaño, J. P., Kineman, R. D., & Luque, R. M. (2010). Metabolic regulation of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) expression in the mouse hypothalamus, pituitary, and stomach. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 317(1–2), 154–1627

Gahete M. D., Córdoba-Chacón J., Hergueta-Redondo M., Martínez-Fuentes A. J., Kineman R. D., Moreno-Bueno G., et al. (2011). A Novel Human Ghrelin Variant (In1-Ghrelin) and Ghrelin-O-Acyltransferase Are Overexpressed in Breast Cancer: Potential Pathophysiological Relevance. *PLoS ONE* 6 (8), e23302. doi:10.1371/journal.pone.0023302

Gale, S. A., Acar, D., and Daffner, K. R. (2018). Dementia. *The American journal of medicine*, 131(10), 1161–1169. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2018.01.022>

Gao S., Casals N., Keung W., Moran T. H., Lopaschuk G. D. (2013). Differential Effects of central Ghrelin on Fatty Acid Metabolism in Hypothalamic Ventral Medial and Arcuate Nuclei. *Physiol. Behav.* 118, 165–170. 10.1016/j.physbeh.2013.03.030

Gauna C, Meyler FM, Janssen JA, Delhanty PJ, Abribat T, van Koetsveld P, Hofland LJ, Broglio F, Ghigo E, van der Lely AJ. Administration of acylated ghrelin reduces insulin sensitivity, whereas the combination of acylated plus unacylated ghrelin strongly improves insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Oct;89(10):5035-42. doi: 10.1210/jc.2004-0363. PMID: 15472202.

Gisslén M, Price RW, Andreasson U, Norgren N, Nilsson S, Hagberg L, Fuchs D, Spudich S, Blennow K, Zetterberg H. Plasma Concentration of the Neurofilament Light Protein (NFL) is a Biomarker of CNS Injury in HIV Infection: A Cross-Sectional Study. *EBioMedicine*. 2015 Nov 22;3:135-140. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.11.036. Erratum in: *EBioMedicine*. 2016 May;7:287-288. PMID: 26870824; PMCID: PMC4739412.

Glish, G. L., and Vachet, R. W. (2003). The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature reviews. Drug discovery*, 2(2), 140–150. <https://doi.org/10.1038/nrd1011>

Gomez-Pinilla, F. (2008). Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(7), 568–578. <https://doi.org/10.1038/nrn2421>

Grönberg, M., Ahlin, C., Naeser, Y., Tiensuu Janson, E., Holmberg, L., & Fjällskog, M.-L. (2017). Ghrelin is a prognostic marker and a potential therapeutic target in breast cancer. *PLoS ONE*, 12(4), e0176059. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176059>

Gross, J. H. (2017). Mass spectrometry. In Springer eBooks. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54398-7>

Gutierrez, J. A., Dorocke, J. A., Knierman, M. D., Gelfanova, V., Higgs, R. E., Koh, N. L., and Hale, J. E. (2005). Quantitative determination of peptides using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *BioTechniques*, Suppl, 13–17. <https://doi.org/10.2144/05386su02>

Gutierrez J.A., Solenberg P.J., Perkins D.R., Willency J.A., Knierman M.D., Jin Z., Witcher D.R., Luo S., Onyia J.E., Hale J.E. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 2008;105:6320–6325.

Gutierrez, J. A., Willency, J. A., Knierman, M. D., Coskun, T., Solenberg, P. J., Perkins, D. R., Higgs, R. E., and Hale, J. E. (2012). From ghrelin to ghrelin's O-acyl transferase. *Methods in enzymology*, 514, 129–146. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381272-8.00009-X>

Haag, A. M. (2016). Mass analyzers and mass spectrometers. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 157–169). https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5_7

Hampel, H., O'Bryant, S. E., Molinuevo, J. L., Zetterberg, H., Masters, C. L., Lista, S., ... Blennow, K. (2018, November 1). Blood-based biomarkers for Alzheimer disease: mapping the road to the clinic. *Nature Reviews Neurology*, Vol. 14, pp. 639–652. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0079-7>

Hampel H, Hu Y, Cummings J, Mattke S, Iwatsubo T, Nakamura A, Vellas B, O'Bryant S, Shaw LM, Cho M, Batrla R, Vergallo A, Blennow K, Dage J, Schindler SE. Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease: Current state and future use in a transformed global healthcare landscape. *Neuron*. 2023 Sep 20;111(18):2781-2799. doi: 10.1016/j.neuron.2023.05.017. Epub 2023 Jun 8. PMID: 37295421; PMCID: PMC10720399.

Hamza, Ghaith M., Vladislav B. Bergo, Sergey Mamaev, Don M. Wojchowski, Paul Toran, Camilla R. Worsfold, M. Paola Castaldi, and Jeffrey C. Silva. 2020. "Affinity-Bead Assisted Mass Spectrometry (Affi-BAMS): A Multiplexed Microarray Platform for Targeted Proteomics" *International Journal of Molecular Sciences* 21, no. 6: 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms21062016>

Han, X., Aslanian, A., and Yates, J. R., 3rd (2008). Mass spectrometry for proteomics. *Current opinion in chemical biology*, 12(5), 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.024>

Hankin, J. A., Barkley, R. M., and Murphy, R. C. (2007). Sublimation as a method of matrix application for mass spectrometric imaging. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18(9), 1646-1652.

Heneka, M. T., Golenbock, D. T., & Latz, E. (2015). Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nature Immunology*, 16*(3), 229–236. <https://doi.org/10.1038/ni.3102>

Henriksen, K., O'Bryant, S. E., Hampel, H., Trojanowski, J. Q., Montine, T. J., Jeromin, A., ... Weiner, M. W. (2014, January). The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, Vol. 10, pp. 115–131. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.01.013>

Herskovits, A. Z., Locascio, J. J., Peskind, E. R., Li, G., and Hyman, B. T. (2013). A Luminex platform detects amyloid β oligomers in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid. *PloS one*, 8(7), e67898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067898>

Herr P., Basler K. (2012). Porcupine-Mediated Lipidation Is Required for Wnt Recognition by Wls. *Developmental Biol.* 361 (2), 392–402. doi:10.1016/j.ydbio.2011.11.003

Hirtz, C., Busto, G. U., Bennys, K., Kindermans, J., Navucet, S., Tiers, L., Lista, S., Vialaret, J., Gutierrez, A., Dauvilliers, Y., Berr, C., Lehmann, S., & Gabelle, A. (2023). Comparison of ultrasensitive and mass spectrometry quantification of blood-based amyloid biomarkers for Alzheimer's disease diagnosis in a memory clinic cohort. *Alzheimer's Research & Therapy*, 15. <https://doi.org/10.1186/s13195-023-01188-8>

Ho, C. S., Lam, C. W., Chan, M. H., Cheung, R. C., Law, L. K., Lit, L. C., Ng, K. F., Suen, M. W., and Tai, H. L. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical biochemist. Reviews*, 24(1), 3–12.

Hörber, S., Achenbach, P., Schleicher, E., & Peter, A. (2020). Harmonization of immunoprawfs for biomarkers in diabetes mellitus. *Biotechnology advances*, 39, 107359. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.015>

Hofmann K. A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. *Trends Biochem Sci.* 2000 Mar;25(3):111-2. doi: 10.1016/s0968-0004(99)01539-x. PMID: 10694878.

Hornsby A. K. E., Redhead Y. T., Rees D. J., Ratcliff M. S. G., Reichenbach A., Wells T., et al. (2016). Short-Term Calorie Restriction Enhances Adult Hippocampal Neurogenesis and Remote Fear Memory in a Ghrelin-Dependent Manner. *Psychoneuroendocrinology* 63, 198–207. doi:10.1016/j.psyneuen.2015.09.023

Hornsby A. K. E., Buntwal L., Carisi M. C., Santos V. V., Johnston F., Roberts L. D., et al. (2020). Unacylated Unacylated Ghrelin Impairs Hippocampal Neurogenesis and Memory in Mice and Is Altered in Parkinson's Dementia in Humans. *Cell Rep. Med.* 1 (7), 100120. doi:10.1016/j.xcrm.2020.100120

Hornsby, W. E., et al. (2022). Mass spectrometry for ghrelin isoform quantification. *Analytical Chemistry*, 94(2), 897–905.

Hosoda, H., M, Kojima., H. Matsuo, and K. Kangawa. 2000. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 279:909–913.

Hosoda, H., Kojima, M., Mizushima, T., Shimizu, S., and Kangawa, K. (2003). Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *The Journal of biological chemistry*, 278(1), 64–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205366200>

Hosoda, H., Kangawa, K. (2004). Ghrelin Measurement: Present and Perspectives. In: Ghigo, E., Benso, A., Broglio, F. (eds) *Ghrelin. Endocrine Updates*, vol 23. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/1-4020-7971-0_15

Hossain, M. The Mass Spectrometer and Its Components. in *Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry (SRM-MS) in Proteomics* 17–52 (Springer International Publishing, 2020). doi:10.1007/978-3-030-53433-2_2.

Hou, J., Charron, C. L., Fowkes, M. M., and Luyt, L. G. (2016). Bridging computational modeling with amino acid replacements to investigate GHS-R1a-peptidomimetic recognition. *European journal of medicinal chemistry*, 123, 822–833. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.078>

Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Cooks RG. The Orbitrap: A new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry*. 2005;40:430–443

Hu Y, Kirmess KM, Meyer MR, Rabinovici GD, Gatsonis C, Siegel BA, Whitmer RA, Apgar C, Hanna L, Kanekiyo M, Kaplow J, Koyama A, Verbel D, Holubasch MS, Knapik SS, Connor J, Contois JH, Jackson EN, Harpstrite SE, Bateman RJ, Holtzman DM, Verghese PB, Fogelman I, Braunstein JB, Yarasheski KE, West T (2022) Assessment of a plasma amyloid probability score to estimate amyloid positron emission tomography findings among adults with cognitive impairment. *JAMA Netw Open* 5, e228392.

Inhoff T, Mönnikes H, Noetzel S, Stengel A, Goebel M, Dinh QT, Riedl A, Bannert N, Wisser AS, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Kobelt P. Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides*. 2008 Dec;29(12):2159-68. doi: 10.1016/j.peptides.2008.09.014. Epub 2008 Sep 30. PMID: 18938204; PMCID: PMC2586396.

Inoue, M., Suzuki, H., Meno, K., Liu, S., Korenaga, T., & Uchida, K. (2023). Identification of Plasma Proteins as Biomarkers for Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry.

International Journal of Molecular Sciences, 24(17), 13064.
<https://doi.org/10.3390/ijms241713064>

Jack, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., ... Silverberg, N. (2018, April 1). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, Vol. 14, pp. 535–562.
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>

Janda C. Y., Waghray D., Levin A. M., Thomas C., Garcia K. C. (2012). Structural Basis of Wnt Recognition by Frizzled. *Science* 337 (6090), 59–64.
[doi:10.1126/SCIENCE.1222879](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1222879)

Janelidze, S., Stomrud, E., Palmqvist, S., Zetterberg, H., Van Westen, D., Jeromin, A., ... Hansson, O. (2016). Plasma β -amyloid in Alzheimer's disease and vascular disease. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep26801>

Janelidze, S., Mattsson, N., Palmqvist, S., Smith, R., Beach, T. G., Serrano, G. E., Chai, X., Proctor, N. K., Eichenlaub, U., Zetterberg, H., Blennow, K., Reiman, E. M., Stomrud, E., Dage, J. L., & Hansson, O. (2020). Plasma P-tau181 in Alzheimer's disease: relationship to other biomarkers, differential diagnosis, neuropathology and longitudinal progression to Alzheimer's dementia. *Nature medicine*, 26(3), 379–386.
<https://doi.org/10.1038/s41591-020-0755-1>

Janelidze S, Teunissen CE, Zetterberg H, Allué JA, Sarasa L, Eichenlaub U, Bittner T, Ovod V, Verberk IMW, Toba K, Nakamura A, Bateman RJ, Blennow K, Hansson O (2021) Head-to-head comparison of 8 plasma amyloid- β 42/40 rawfs in Alzheimer disease. *JAMA Neurol* 78, 1375–1382.

Janelidze, S. et al. Head-to-head comparison of 10 plasma phospho-tau rawfs in prodromal Alzheimer's disease. *Brain* <https://doi.org/10.1093/brain/awac333> (2022).

Janelidze, S., Mattsson-Carlsson, N., Palmqvist, S., Cullen, N. C., Hansson, O. (2022). Performance of plasma p-tau217 in the prediction of Alzheimer's disease pathology. *Nature Medicine*, 28(6), 1057–1063. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01702-5>

Jennings KR, Dolnikowski GG (1990) Mass analyzers. *Method Enzymol* 193:37–61

Julien, M., Kay, R. G., Delhanty, P. J., Allas, S., Granata, R., Barton, C., Constable, S., Ghigo, E., van der Lely, A. J., and Abribat, T. (2012). In vitro and in vivo stability and pharmacokinetic profile of unacylatedunacylated ghrelin (UAG) analogues. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 47(4), 625–635. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.07.014>

Kaiya H., Kojima M., Hosoda H., Koda A., Yamamoto K., Kitajima Y., et al. (2001). Bullfrog Ghrelin Is Modified by N-Octanoic Acid at its Third Threonine Residue. *J. Biol. Chem.* 276 (44), 40441–40448. doi:10.1074/jbc.M105212200

Kaneko, N., Yamamoto, R., Sato, T. A., & Tanaka, K. (2014). Identification and quantification of amyloid beta-related peptides in human plasma using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 90(3), 104–117. <https://doi.org/10.2183/pjab.90.104>

Karas, M., and Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical chemistry*, 60(20), 2299–2301. <https://doi.org/10.1021/ac00171a028>

Karikari, T. K., Pascoal, T. A., Ashton, N. J., Janelidze, S., Benedet, A. L., Rodriguez, J. L., ... Blennow, K. (2020). Blood phosphorylated tau 181 as a biomarker for Alzheimer's disease: a diagnostic performance and prediction modelling study using data from four prospective cohorts. *The Lancet Neurology*, 19(5), 422–433. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30071-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30071-5)

Kebarle, P., and Verkerk, U. H. (2009). Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass spectrometry reviews*, 28(6), 898–917. <https://doi.org/10.1002/mas.20247>

Keller, B. O., Sui, J., Young, A. B., and Whittall, R. M. (2008). Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 627(1), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.04.043>

Kennaway D. J. (2020). Measuring melatonin by immunoprawf. *Journal of pineal research*, 69(1), e12657. <https://doi.org/10.1111/jpi.12657>

Kent B. A., Beynon A. L., Hornsby A. K. E., Bekinschtein P., Bussey T. J., Davies J. S., et al. (2015). The Orexigenic Hormone Acyl-Ghrelin Increases Adult Hippocampal Neurogenesis and Enhances Pattern Separation. *Psychoneuroendocrinology* 51, 431–439. doi:10.1016/j.psyneuen.2014.10.015

Kern, A., Grande, M. T., & Smith, R. G. (2014). Apo-ghrelin receptor (apo-GHS-R1a) regulates dopamine signaling in the brain. *Frontiers in Neuroscience*, 8, 157. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00157>

Kern, A., Apikian, C., & Smith, R. G. (2015). Hippocampal dopamine/DRD1 signaling is dependent on the ghrelin receptor. *Cell*, 163(6), 1512–1528. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.015>

Keshavan, A., Pannee, J., Karikari, T. K., Rodriguez, J. L., Ashton, N. J., Nicholas, J. M., Cash, D. M., Coath, W., Lane, C. A., Parker, T. D., Lu, K., Buchanan, S. M., Keuss, S. E., James, S. N., Murray-Smith, H., Wong, A., Barnes, A., Dickson, J. C., Heslegrave, A., Portelius, E., ... Schott, J. M. (2021). Population-based blood screening for preclinical Alzheimer's disease in a British birth cohort at age 70. *Brain : a journal of neurology*, 144(2), 434–449. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa403>

Klingelhoefer, L., & Reichmann, H. (2017). Pathogenesis of Parkinson disease—the gut–brain axis and environmental factors. *Nature Reviews Neurology*, 13(11), 653–668.

Khatib, N. (2014). Ghrelin: Ghrelin as a regulatory peptide in growth hormone secretion. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(8), MC13–MC17.

Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., Kangawa, K.; Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach; *Nature*, (1999); 402(6762): 656–660

Kojima, M., Hosoda, H., Matsuo, H., Kangawa, K.; Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor; *Trends in Endocrinology and Metabolism*, (2001); 12(3): 118–122.

Kojima M., Kangawa K. (2005). Ghrelin: Structure and Function. *Physiol. Rev.* 85, 495–522. doi:10.1152/physrev.00012.2004

Kovalchuk, S. I., Anikanov, N. A., Ivanova, O. M., Ziganshin, R. H., and Govorun, V. M. (2015). Bovine serum albumin as a universal suppressor of non-specific peptide binding in vials prior to nano-chromatography coupled mass-spectrometry analysis. *Analytica chimica acta*, 893, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.08.027>

Knochenmuss, R., and Zhigilei, L. V. (2010). Molecular dynamics simulations of MALDI: laser fluence and pulse width dependence of plume characteristics and consequences for matrix and analyte ionization. *Journal of Mass Spectrometry*, n/a. <https://doi.org/10.1002/jms.1732>

Kuhle J, Barro C, Andreasson U, Derfuss T, Lindberg R, Sandelius AA, Liman V, Norgren N, Blennow K, Zetterberg H (2016) Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa. *Clin Chem Lab Med* 54, 1655–1661.

Kwon, H. S., Lee, H., Kim, Y. S., Choi, H., Lee, K. Y., Lee, Y. J., Lee, E. H., Hwang, M., Park, H., & Koh, S. H. (2023). Comparing Neurofilament Light Chain Levels in Serum and Plasma. *Dementia and neurocognitive disorders*, 22(3), 109–111. <https://doi.org/10.12779/dnd.2023.22.3.109>

Lanckmans, K., Sarre, S., Smolders, I., and Michotte, Y. (2007). Use of a structural analogue versus a stable isotope labeled internal standard for the quantification of angiotensin IV in rat brain dialysates using nano-liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 21(7), 1187–1195. <https://doi.org/10.1002/rcm.2950>

Landau, S. M., Lu, M., Joshi, A. D., Pontecorvo, M., Mintun, M. A., Trojanowski, J. Q., ... Jagust, W. J. (2013). Comparing positron emission tomography imaging and cerebrospinal fluid measurements of β -amyloid. *Annals of Neurology*, 74(6), 826–836. <https://doi.org/10.1002/ana.23908>

Lau, K., Kotzur, R., & Richter, F. (2024). Blood–brain barrier alterations and their impact on Parkinson's disease pathogenesis and therapy. *Translational Neurodegeneration*, 13(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s40035-024-00430-z>

Lewczuk, P., Kornhuber, J., Vanmechelen, E., Peters, O., Heuser, I., Maier, W., ... Wiltfang, J. (2010). Amyloid β peptides in plasma in early diagnosis of Alzheimer's

disease: A multicenter study with multiplexing. *Experimental Neurology*, 223(2), 366–370. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.07.024>

Lewczuk, P., Esselmann, H., Otto, M., Maler, J. M., Henkel, A. W., Henkel, M. K., ... & Kornhuber, J. (2010). Neurochemical diagnosis of Alzheimer's dementia by CSF A β 42, A β 42/A β 40 ratio and total tau. *Neurobiology of Aging*, 31(5), 778–788. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.06.013>

Li E., Kim Y., Kim S., Park S. Ghrelin-induced hippocampal neurogenesis and enhancement of cognitive function are mediated independently of GH/IGF-1 axis: lessons from the spontaneous dwarf rats. *Endocr. J.* 2013;60:1065–1075.

Li, E., Chung, H., Kim, Y., Kim, D. H., Ryu, J. H., Sato, T., Kojima, M., and Park, S. (2013). Ghrelin directly stimulates adult hippocampal neurogenesis: implications for learning and memory. *Endocrine journal*, 60(6), 781–789. <https://doi.org/10.1507/endocrj.ej13-0008>

Lista, S., Faltraco, F., Prvulovic, D., and Hampel, H. (2013, February). Blood and plasma-based proteomic biomarker research in Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, Vol. 101–102, pp. 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.06.007>

Lippi, G., Salvagno, G. L., Montagnana, M., & Guidi, G. C. (2006). Stability of blood samples drawn in K3EDTA tubes for routine hematologic testing. *LaboratoriumsMedizin*, 30(1), 33–38.

Lifke, V., Kollmorgen, G., Manuilova, E., Oelschlaegel, T., Hillringhaus, L., Widmann, M., von Arnim, C. A. F., Otto, M., Christenson, R. H., Powers, J. L., Shaw, L. M., Hansson, O., Doecke, J. D., Li, Q. X., Teunissen, C., Tumani, H., and Blennow, K. (2019). Elecsys® Total-Tau and Phospho-Tau (181P) CSF prawns: Analytical performance of the novel, fully automated immunoprawns for quantification of tau proteins in human cerebrospinal fluid. *Clinical biochemistry*, 72, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.05.005>

Lim M. D. (2018). Dried Blood Spots for Global Health Diagnostics and Surveillance: Opportunities and Challenges. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 99(2), 256–265. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0889>

Liu B., Garcia E. A., Korbonits M. (2011). Genetic Studies on the Ghrelin, Growth Hormone Secretagogue Receptor (GHSR) and Ghrelin O-Acyl Transferase (GOAT) Genes. *Peptides* 32 (11), 2191–2207. doi:10.1016/j.peptides.2011.09.006

Loo, R. R., Dales, N., and Andrews, P. C. (1994). Surfactant effects on protein structure examined by electrospray ionization mass spectrometry. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 3(11), 1975–1983. <https://doi.org/10.1002/pro.5560031109>

Lupo, S., and Kahler, T. (2020). New Advice on an Old Topic: Buffers in Reversed-Phase HPLC. *Chromatography Online*. <https://www.chromatographyonline.com/view/new-advice-old-topic-buffers-reversed-phase-hplc>

Leeuwendaal, N. K., Cryan, J. F., and Schellekens, H. (2021). Gut peptides and the microbiome: focus on ghrelin. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 28(2), 243–252. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000616>

Lingervelder, D., van Rijn, M., Ruijter, W., & Moons, K. G. (2021). Cost-effectiveness of point-of-care testing: A systematic review. *BMJ Open*, 11(2), e040725. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-040725>

Lutter, M., Sakata, I., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky, S. A., Anderson, J. G., Jung, S., Birnbaum, S., Yanagisawa, M., Elmquist, J. K., Nestler, E. J., and Zigman, J. M. (2008). The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nature neuroscience*, 11(7), 752–753. <https://doi.org/10.1038/nn.2139>

Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry*. 2000;72:1156–1162.

Mann, M., & Jensen, O. N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology*, 21(3), 255-261.

Mani BK, Zigman JM. Ghrelin as a Survival Hormone. *Trends Endocrinol Metab*. 2017 Dec;28(12):843-854. doi: 10.1016/j.tem.2017.10.001. Epub 2017 Oct 30. PMID: 29097101; PMCID: PMC5777178.

Matsumoto, M., Kitajima, Y., Iwanami, T., Hayashi, Y., Tanaka, S., Minamitake, Y., Hosoda, H., Kojima, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (2001). Structural similarity of

ghrelin derivatives to peptidyl growth hormone secretagogues. *Biochemical and biophysical research communications*, 284(3), 655–659.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5014>

Mattsson N, Andreasson U, Zetterberg H, Blennow K; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Association of Plasma Neurofilament Light With Neurodegeneration in Patients With Alzheimer Disease. *JAMA Neurol*. 2017 May 1;74(5):557-566. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.6117. PMID: 28346578; PMCID: PMC5822204.

Mattson, M. P., & Arumugam, T. V. (2018). Hallmarks of brain ageing: Adaptive and pathological modification by metabolic states. **Cell Metabolism*, 27*(6), 1176–1199.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.011>

Mattsson-Carlsson, N., Collij, L. E., Stomrud, E., Pichet Binette, A., Ossenkoppele, R., Smith, R., Karlsson, L., Lantero-Rodriguez, J., Snellman, A., Strandberg, O., Palmqvist, S., Ashton, N. J., Blennow, K., Janelidze, S., & Hansson, O. (2024). Plasma Biomarker Strategy for Selecting Patients With Alzheimer Disease for Anti-amyloid Immunotherapies. *JAMA neurology*, 81(1), 69–78.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2023.4596>

Masumoto N., Lanyon-Hogg T., Rodgers U. R., Konitsiotis A. D., Magee A. I., Tate E. W. (2015). Membrane Bound O-Acyltransferases and Their Inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.* 43, 246–252. 10.1042/BST2015001

Mayeux, R. (2004). Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx*, 1(2), 182-188.

Mendel, C. M., and Mendel, D. B. (1985). 'non-specific' binding. The problem, and a solution. *The Biochemical journal*, 228(1), 269–272.
<https://doi.org/10.1042/bj2280269>

McGovern-Gooch, K. R., Rodrigues, T., Darling, J. E., Sieburg, M. A., Abizaid, A., and Hougland, J. L. (2016). Ghrelin Octanoylation Is Completely Stabilized in Biological Samples by Alkyl Fluorophosphonates. *Endocrinology*, 157(11), 4330–4338.
<https://doi.org/10.1210/en.2016-1657>

Melby, J. A.; De Lange, W. J.; Zhang, J.; Roberts, D. S.; Mitchell, S. D.; Tucholski, T.; Kim, G.; Kyriavasilis, A.; McIlwain, S. J.; Kamp, T. J.; Ralphe, J. C.; Ge, Y. Functionally Integrated Top-Down Proteomics for Standardized Assessment of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Engineered Cardiac Tissues. *J. Proteome Res.* 2021, 20, 1424–1433, DOI: 10.1021/acs.jproteome.0c00830

Menzies M., Seim I., Josh P., Nagaraj S. H., Lees M., Walpole C., et al. (2014). Cloning and Tissue Distribution of Novel Splice Variants of the Ovine Ghrelin Gene. *BMC Veterinary Research* 10 (1). doi:10.1186/s12917-014-0211-x

Meyer J. G., Komives E. A. (2012) Charge state coalescence during electrospray ionization improves peptide identification by tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 23, 1390–1399

Mielke, M. M., Frank, R. D., Dage, J. L., Jeromin, A., Ashton, N. J., Blennow, K., Karikari, T. K., Vanmechelen, E., Zetterberg, H., Algeciras-Schimmich, A., Knopman, D. S., Lowe, V., Bu, G., Vemuri, P., Graff-Radford, J., Jack, C. R., Jr, & Petersen, R. C. (2021). Comparison of Plasma Phosphorylated Tau Species With Amyloid and Tau Positron Emission Tomography, Neurodegeneration, Vascular Pathology, and Cognitive Outcomes. *JAMA neurology*, 78(9), 1108–1117. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2021.2293>

Molina, R. D., Conzatti, L. P., da Silva, A. P. B., Goi, L. D. S., da Costa, B. K., Machado, D. C., & Sato, D. K. (2020). Detection of autoantibodies in central nervous system inflammatory disorders: Clinical application of cell-based prawns. *Multiple sclerosis and related disorders*, 38, 101858. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.101858>

Molinuevo, J. L., Ayton, S., Batrla, R., Bednar, M. M., Bittner, T., Cummings, J., ... Blennow, K. (2018). Current state of Alzheimer's fluid biomarkers. *Acta Neuropathologica*, 136(6). <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1932-x>

Moon, M., Kim, H. G., Hwang, L., Seo, J.-H., Kim, S., Hwang, S., Kim, K.-T., Lee, K.-T., Chung, H., Oh, M.-S., & Lee, K.-W. (2009). Neuroprotective effect of ghrelin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. *Neurotoxicology Research*, 15(4), 332–347. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9037-x>

Moon M., Cha M.-Y., Mook-Jung I. (2014). Impaired Hippocampal Neurogenesis and its Enhancement with Ghrelin in 5XFAD Mice. *Jad* 41 (1), 233–241. doi:10.3233/JAD-132417

Montagne, A., Barnes, S. R., Sweeney, M. D., Halliday, M. R., Sagare, A. P., Zhao, Z., ... Zlokovic, B. V. (2015). Blood-Brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron*, 85(2), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.032>

Montoliu-Gaya, L., Barthelemy, N. R., Long, K. R., et al. (2023). Quantification of multiple tau isoforms by targeted immunoprecipitation mass spectrometry in plasma. *Alzheimer's & Dementia*, 19(12), 444–452. <https://doi.org/10.1002/alz.13025>

Muñoz-Prieto, A., Martínez-Subiela, S., Cerón, J. J., & Tvarijonaviciute, A. (2019). A new highly sensitive immunoprawf for the detection of adiponectin in serum and saliva of dogs and its application in obesity and canine leishmaniosis. *Research in veterinary science*, 125, 374–381. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.07.019>

Murtuza, M. I., and Isokawa, M. (2018). Endogenous ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) acylates local ghrelin in the hippocampus. *Journal of neurochemistry*, 144(1), 58–67. <https://doi.org/10.1111/jnc.14244>

Nagaya, N., Uematsu, M., Kojima, M., Ikeda, Y., Yoshihara, F., Shimizu, W., Hosoda, H., Hirota, Y., Ishida, H., Mori, H., and Kangawa, K. (2001). Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation*, 104(12), 1430–1435. <https://doi.org/10.1161/hc3601.095575>

Nakamura, A., Kaneko, N., Villemagne, V. L., Kato, T., Doecke, J., Doré, V., ... Yanagisawa, K. (2018). High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*, 554(7691), 249–254. <https://doi.org/10.1038/nature25456>

Nakazato M., Murakami N., Date Y., Kojima M., Matsuo H., Kangawa K., et al. (2001). A Role for Ghrelin in the Central Regulation of Feeding. *Nature* 409 (6817), 194–198. [10.1038/35051587](https://doi.org/10.1038/35051587)

Navarro, G., Rea, W., Quiroz, C., Moreno, E., Gomez, D., Wenthur, C. J., Casadó, V., Leggio, L., Hearing, M. C., & Ferré, S. (2022). Complexes of ghrelin GHS-R1a, GHS-R1b, and dopamine D1 receptors localized in the ventral tegmental area as main

mediators of the dopaminergic effects of ghrelin. *Journal of Neuroscience*, 42(6), 940–956. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1151-21.2021>

Neagu, A. N., Jayathirtha, M., Baxter, E., Donnelly, M., Petre, B. A., and Darie, C. C. (2022). Applications of Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) in Protein Analysis for Biomedical Research. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(8), 2411. <https://doi.org/10.3390/molecules27082411>

NHS England. (2021). *Point of care testing (POCT): Guidance for NHS Trusts and clinical teams*. <https://www.england.nhs.uk/publication/point-of-care-testing-guidance>

Niemeyer, C. M., Adler, M., and Wacker, R. (2005, April). Immuno-PCR: High sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification. *Trends in Biotechnology*, Vol. 23, pp. 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.02.006>

Nile A. H., Hannoush R. N. (2016). Fatty Acylation of Wnt Proteins. *Nat. Chem. Biol.* 12 (2), 60–69. doi:10.1038/nchembio.2005

Nishi, Y., Hiejima, H., Hosoda, H., Kaiya, H., Mori, K., Fukue, Y., Yanase, T., Nawata, H., Kangawa, K., and Kojima, M. (2005). Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. *Endocrinology*, 146(5), 2255–2264. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0695>

Nishi, Y., Yoh, J., Hattori, Y., & Sugimoto, H. (2011). Ghrelin acylation and its biological significance. *Endocrine Journal*, 58(6), 403–410.

Ntai, I.; Fornelli, L.; DeHart, C. J.; Hutton, J. E.; Doubleday, P. F.; LeDuc, R. D.; van Nispen, A. J.; Fellers, R. T.; Whiteley, G.; Boja, E. S.; Rodriguez, H.; Kelleher, N. L. Precise Characterization of KRAS4b Proteoforms in Human Colorectal Cells and Tumors Reveals Mutation/Modification Cross-Talk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2018, 115 (16), 4140– 4145,

O'Bryant, S. E., Edwards, M., Johnson, L., Hall, J., Villarreal, A. E., Britton, G. B., ... Graff-Radford, N. R. (2016). A blood screening test for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring*, 3, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2016.06.004>

O'Bryant, S. E., Mielke, M. M., Rissman, R. A., Lista, S., Vanderstichele, H., Zetterberg, H., ... Hampel, H. (2017, January 1). Blood-based biomarkers in Alzheimer disease: Current state of the science and a novel collaborative paradigm for advancing from discovery to clinic. *Alzheimer's and Dementia*, Vol. 13, pp. 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.09.014>

Ossenkoppele, R., Jansen, W. J., Rabinovici, G. D., Knol, D. L., van der Flier, W. M., van Berckel, B. N., Scheltens, P., Visser, P. J., Amyloid PET Study Group, Verfaillie, S. C., Zwan, M. D., Adriaanse, S. M., Lammertsma, A. A., Barkhof, F., Jagust, W. J., Miller, B. L., Rosen, H. J., Landau, S. M., Villemagne, V. L., Rowe, C. C., ... Brooks, D. J. (2015). Prevalence of amyloid PET positivity in dementia syndromes: a meta-analysis. *JAMA*, 313(19), 1939–1949. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.4669>

Outeiro, T.F., Koss, D.J., Erskine, D. et al. Dementia with Lewy bodies: an update and outlook. *Mol Neurodegeneration* 14, 5 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0306-8>

Ovod, V., Ramsey, K. N., Mawuenyega, K. G., Bollinger, J. G., Hicks, T., Schneider, T., ... Bateman, R. J. (2017). Amyloid β concentrations and stable isotope labeling kinetics of human plasma specific to central nervous system amyloidosis. *Alzheimer's and Dementia*, 13(8), 841–849. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.06.2266>

Oxford Health NHS Foundation Trust. (2025, January). *Trial for blood tests to diagnose dementia accepts first participants at Warneford Hospital* [News release]. Retrieved from <https://www.oxfordhealth.nhs.uk/news/trial-for-blood-tests-to-diagnose-dementia-accepts-first-participants-at-warneford-hospital/>

Pais MV, Forlenza OV, Diniz BS. Plasma Biomarkers of Alzheimer's Disease: A Review of Available Assays, Recent Developments, and Implications for Clinical Practice. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*. 2023;7(1):355-380. doi:10.3233/ADR-230029

Palmqvist, S., Zetterberg, H., Mattsson, N., Johansson, P., Minthon, L., Blennow, K., ... Hansson, O. (2015). Detailed comparison of amyloid PET and CSF biomarkers for identifying early Alzheimer disease. *Neurology*, 85(14), 1240–1249. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001991>

Palmqvist, S., Janelidze, S., Stomrud, E., Zetterberg, H., Karl, J., Zink, K., ... & Hansson, O. (2020). Performance of fully automated plasma assays as screening tests for Alzheimer disease–related β -amyloid status. *JAMA Neurology*, 77(9), 1060–1069. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1123>

Pan, W., Tu, H., and Kastin, A. J. (2006). Differential BBB interactions of three ingestive peptides: obestatin, ghrelin, and adiponectin. *Peptides*, 27(4), 911–916. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.12.014>

Pannee, J., Törnqvist, U., Westerlund, A., Ingelsson, M., Lannfelt, L., Brinkmalm, G., ... Portelius, E. (2014). The amyloid- β degradation pattern in plasma-A possible tool for clinical trials in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 573, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.04.041>

Pannee, J., Portelius, E., Minthon, L., Wallin, A., Blennow, K., & Zetterberg, H. (2014). Reference measurement procedures for Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarkers: Progress and challenges. *Frontiers in Neurology*, 5, 182. <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00182>

Pasch, H., and Schrepp, W. (2003). MALDI-TOF Mass spectrometry of synthetic polymers. In Springer eBooks. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-05046-0>

Pemberton, J., & Richards, P. (2008). Isoforms of circulating ghrelin: biological relevance and measurement. *Endocrine Reviews*, 29(4), 443–462.

Peng, J., Liang, D., & Zhang, Z. (2024). Palmitoylation of synaptic proteins: roles in functional regulation and pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Cellular & Molecular Biology Letters*, 29*(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s11658-024-00625-2>

Pepe, M. S., et al. (2001). Phases of biomarker development for early detection of cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(14), 1054–1061.

Preisiche O, Schultz SA, Apel A, Kuhle J, Kaeser SA, Barro C, Gräber S, Kuder-Bulletta E, LaFougere C, Laske C, Vöglein J, Levin J, Masters CL, Martins R, Schofield PR, Rossor MN, Graff-Radford NR, Salloway S, Ghetti B, Ringman JM, Noble JM, Chhatwal J, Goate AM, Benzinger TLS, Morris JC, Bateman RJ, Wang G, Fagan AM, McDade EM, Gordon BA, Jucker M; Dominantly Inherited Alzheimer Network. Serum neurofilament dynamics predicts neurodegeneration and clinical progression in

presymptomatic Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2019 Feb;25(2):277-283. doi: 10.1038/s41591-018-0304-3. Epub 2019 Jan 21. PMID: 30664784; PMCID: PMC6367005.

Piórkowska, E., Musijowski, J., Buś-Kwaśnik, K., and Rudzki, P. J. (2017). Is a deuterated internal standard appropriate for the reliable determination of olmesartan in human plasma?. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1040, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.11.021>

Quanterix. (2025). Quanterix receives FDA clearance for first blood-based Alzheimer's test. Quanterix Corporation. <https://www.quanterix.com/newsroom>

Quest Diagnostics. [online] Available at: https://testdirectory.questdiagnostics.com/test/test-guides/TS_AD_Detect_BetaRatioPlasma/quest-ad-detect-beta-amyloid-4240-ratio-plasma?p=td.

Rabinovici, G. D., Gatsonis, C., Apgar, C., Chaudhary, K., Gareen, I., Hanna, L., ... Carrillo, M. C. (2019). Association of Amyloid Positron Emission Tomography with Subsequent Change in Clinical Management among Medicare Beneficiaries with Mild Cognitive Impairment or Dementia. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 321(13), 1286–1294. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.2000>

Radha, R., Shahzadi, S. K., & Al-Sayah, M. H. (2021). Fluorescent Immunoprawfs for Detection and Quantification of Cardiac Troponin I: A Short Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(16), 4812. <https://doi.org/10.3390/molecules26164812>

Ranjit R, Van Remmen H, Ahn B. Acylated Ghrelin Receptor Agonist HM01 Decreases Lean Body and Muscle Mass, but Unacylated Ghrelin Protects against Redox-Dependent Sarcopenia. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Nov 28;11(12):2358. doi: 10.3390/antiox11122358. PMID: 36552566; PMCID: PMC9774605.

Rauh, M., Gröschl, M., and Rascher, W. (2007). Simultaneous quantification of ghrelin and desacyl-ghrelin by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in plasma,

serum, and cell supernatants. *Clinical chemistry*, 53(5), 902–910.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.078956>

Rhea, E. M., Salameh, T. S., Gray, S., Niu, J., Banks, W. A., & Tong, J. (2018). Ghrelin transport across the blood–brain barrier can occur independently of the growth hormone secretagogue receptor. *Molecular Metabolism*, 18, 88–96.

Rigamonti, A. E., Pincelli, A. I., Corrà, B., Viarengo, R., Bonomo, S. M., Galimberti, D., Scacchi, M., Scarpini, E., Cavagnini, F., and Müller, E. E. (2002). Plasma ghrelin concentrations in elderly subjects: comparison with anorexic and obese patients. *The Journal of endocrinology*, 175(1), R1–R5. <https://doi.org/10.1677/joe.0.175r001>

Rissin, D. M., Kan, C. W., Campbell, T. G., Howes, S. C., Fournier, D. R., Song, L., ... Walt, D. R. (2010). Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nature Biotechnology*, 28(6), 595–599. <https://doi.org/10.1038/nbt.1641>

Rissman, R. A. et al. Plasma A β 42/A β 40 and phospho-tau217 concentration ratios increase the accuracy of amyloid PET classification in preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. <https://doi.org/10.1002/alz.13542> (2023).

Roeben, B., Maetzler, W., Vanmechelen, E., Schulte, C., Heinzel, S., Stellos, K., ... Berg, D. (2016). Association of Plasma A β 40 Peptides, but Not A β 42, with Coronary Artery Disease and Diabetes Mellitus. *Journal of Alzheimer's Disease*, 52(1), 161–169. <https://doi.org/10.3233/JAD-150575>

Roeben, B., Schliebs, R., Hartig, W., Schramm, M., & Bigl, V. (2016). Amyloid- β (1–42) plasma levels correlate with peripheral cholesterol metabolism in elderly non-demented individuals. *Journal of Alzheimer's Disease*, 54(2), 627–637. <https://doi.org/10.3233/JAD-160314>

Rieder, R., Wisniewski, P. J., & Alderman, B. L. (2017). The gut–brain axis: An emerging role for the gut microbiome in psychiatric and neurodegenerative disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 83, 793–803.

Rogers, J. C., and Bomgarden, R. D. (2016). Sample Preparation for Mass Spectrometry-Based Proteomics; from Proteomes to Peptides. *Advances in experimental medicine and biology*, 919, 43–62. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5_3

Rutledge, J., Lehallier, B., Zarifkar, P., Losada, P. M., Shahid-Besanti, M., Western, D., Gorijala, P., Ryman, S., Yutsis, M., Deutsch, G. K., Mormino, E., Trelle, A., Wagner, A. D., Kerchner, G. A., Tian, L., Cruchaga, C., Henderson, V. W., Montine, T. J., Borghammer, P., Wyss-Coray, T., ... Poston, K. L. (2024). Comprehensive proteomics of CSF, plasma, and urine identify DDC and other biomarkers of early Parkinson's disease. *Acta neuropathologica*, 147(1), 52. <https://doi.org/10.1007/s00401-024-02706-0>

Sakata, I., Nakano, Y., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky, S. A., Lee, C. E., Perello, M., Anderson, J. G., Coppari, R., Xiao, G., Lowell, B. B., Elmquist, J. K., and Zigman, J. M. (2009). Characterization of a novel ghrelin cell reporter mouse. *Regulatory peptides*, 155(1-3), 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2009.04.001>

Sakata, I., Takemi, S., Kaminoda, A., Aizawa, S., Ojima, S., Gong, Z., ... & Sakata, T. (2018). β -Oxidation in ghrelin-producing cells is important for ghrelin acyl-modification. *Scientific Reports*, 8, 9176.

Sampson, T. R., & Mazmanian, S. K. (2016). Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. *Cell Host & Microbe*, 17(5), 565–576.

Sanchez, E., Wilkinson, T., Coughlan, G., Mirza, S., Baril, A. A., Ramirez, J., Binns, M. A., Black, S. E., Borrie, M., Dilliot, A. A., Dixon, R. A., Dowlatsahi, D., Farhan, S., Finger, E., Fischer, C. E., Frank, A., Freedman, M., Goncalves, R. A., Grimes, D. A., Hassan, A., ... Masellis, M. (2024). Association of plasma biomarkers with cognition, cognitive decline, and daily function across and within neurodegenerative diseases: Results from the Ontario Neurodegenerative Disease Research Initiative. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 20(3), 1753–1770. <https://doi.org/10.1002/alz.13560>

Sassi, M., Morgan, A. H., & Davies, J. S. (2022). Ghrelin acylation: A post-translational tuning mechanism regulating adult hippocampal neurogenesis. *Cells*, 11(5), 765. <https://doi.org/10.3390/cells11050765>

Satou M, Sugimoto H. The study of ghrelin deacylation enzymes. *Methods Enzymol*. 2012;514:165-79. doi: 10.1016/B978-0-12-381272-8.00011-8. PMID: 22975053.

Satou, M., Nishi, Y., Yoh, J., Hattori, Y., & Sugimoto, H. (2010). Identification and characterization of acyl-protein thioesterase 1/lysophospholipase I as a ghrelin

deacylation/lysophospholipid hydrolyzing enzyme in fetal bovine serum and conditioned medium. *Endocrinology*, 151(10), 4765–4775.

Schopfer LM, Lockridge O, Brimijoin S. Pure human butyrylcholinesterase hydrolyzes octanoyl ghrelin to desacyl ghrelin. *Gen Comp Endocrinol*. 2015 doi:10.1016/j.ygcen.2015.05.017.

Schultz H. S., Østergaard S., Sidney J., Lamberth K., Sette A. (2018). The Effect of Acylation with Fatty Acids and Other Modifications on HLA Class II:peptide Binding and T Cell Stimulation for Three Model Peptides. *PLOS ONE* 13 (5), e0197407. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0197407

Seemüller, E., Lupas, A., Stock, D., Lowe, J., Huber, R., and Baumeister, W. (1995) *Science* 268, 579–582

Shaw, L. M., Hansson, O., Manuilova, E., Masters, C. L., Doecke, J. D., Li, Q. X., Rutz, S., Widmann, M., Leinenbach, A., and Blennow, K. (2019). Method comparison study of the Elecsys® β -Amyloid (1-42) CSF prawf versus comparator prawfs and LC-MS/MS. *Clinical biochemistry*, 72, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.05.006>

Shiimura, Y., Horita, S., Hamamoto, A., Asada, H., Hirata, K., Tanaka, M., Mori, K., Uemura, T., Kobayashi, T., Iwata, S., and Kojima, M. (2020). Structure of an antagonist-bound ghrelin receptor reveals possible ghrelin recognition mode. *Nature communications*, 11(1), 4160. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17554-1>

Shiia, T., Nakazato, M., Mizuta, M., Date, Y., Mondal, M. S., Tanaka, M., Nozoe, S., Hosoda, H., Kangawa, K., and Matsukura, S. (2002). Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(1), 240–244. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.1.8129>

Sidibé, J., Varesio, E., and Hopfgartner, G. (2014). Quantification of ghrelin and desacyl ghrelin in human plasma by using cubic-selected reaction-monitoring LCMS. *Bioanalysis*, 6(10), 1373–1383. <https://doi.org/10.4155/bio.14.108>

Sinha, A., and Mann, M. (2020). A beginner's guide to mass spectrometry-based proteomics. *The Biochemist*, 42(5), 64–69. <https://doi.org/10.1042/bio20200057>

Smith, R. M. (2004). Understanding Mass Spectra: A Basic Approach. In John Wiley and Sons, Inc. eBooks. <https://doi.org/10.1002/0471479357>

Snyder, H. M., Carrillo, M. C., Grodstein, F., Henriksen, K., Jeromin, A., Lovestone, S., ... Fillit, H. M. (2014). Developing novel blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, 10(1), 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.10.007>

Song F, Poljak A, Valenzuela M, Mayeux R, Smythe GA, Sachdev PS (2011) Meta-analysis of plasma amyloid- β levels in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 26, 365–375.

Song, N., Wang, W., Jia, F., Du, X., Xie, A., He, Q., Shen, X., Xie, J., & Jiang, H. (2017). Assessments of plasma ghrelin levels in the early stages of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 32(10), 1487–1491. <https://doi.org/10.1002/mds.27095>

St-Onge M.-P., Wolfe S., Sy M., Shechter A., Hirsch J. (2014). Sleep Restriction Increases the Neuronal Response to Unhealthy Food in Normal-Weight Individuals. *Int. J. Obes.* 38 (3), 411–416. 10.1038/ijo.2013.114

Staes, E., Rozet, E., Ucakar, B., Hubert, P., and Pr  at, V. (2010). Validation of a method for the quantitation of ghrelin and unacylated ghrelin by HPLC. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51(3), 633–639. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.09.040>

Stokvis, E., Nan-Offeringa, L. G., Ouwehand, M., Tibben, M. M., Rosing, H., Schnaars, Y., Grigat, M., Romeis, P., Schellens, J. H., and Beijnen, J. H. (2004). Quantitative analysis of D-24851, a novel anticancer agent, in human plasma and urine by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 18(13), 1465–1471. <https://doi.org/10.1002/rcm.1493>

Stokvis, E., Rosing, H. and Beijnen, J.H. (2005), Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not?. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19: 401-407. <https://doi.org/10.1002/rcm.1790>

Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463-466.

Suda, Y., Kuzumaki, N., Sone, T., Narita, M., Takei, N., et al. (2018). Down-regulation of ghrelin receptors on dopaminergic neurons in the substantia nigra contributes to Parkinson's disease-like motor dysfunction. *Molecular Brain*, 11(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0349-8>

Sun R., Wang H., Shi Y., Gao D., Sun Z., Chen Z., et al. (2019). A pilot study of urinary exosomes in Alzheimer's disease. *Neurodegener. Dis.* 19 184–191. 10.1159/000505851

Szentirmai, E., Kapás, L., Sun, Y., Smith, R. G., and Krueger, J. M. (2007). Spontaneous sleep and homeostatic sleep regulation in ghrelin knockout mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 293(1), R510–R517. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00155.2007>

Takada R., Satomi Y., Kurata T., Ueno N., Norioka S., Kondoh H., et al. (2006). Monounsaturated Fatty Acid Modification of Wnt Protein: Its Role in Wnt Secretion. *Developmental Cell* 11 (6), 791–801. doi:10.1016/j.devcel.2006.10.003

Taylor M. S., Ruch T. R., Hsiao P.-Y., Hwang Y., Zhang P., Dai L., et al. (2013). Architectural Organization of the Metabolic Regulatory Enzyme Ghrelin O-Acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 288 (45), 32211–32228. 10.1074/jbc.M113.510313

Tian, D. Y., Cheng, Y., Zhuang, Z. Q., He, C. Y., Pan, Q. G., Tang, M. Z., Hu, X. L., Shen, Y. Y., Wang, Y. R., Chen, S. H., Sun, H. L., Sun, P. Y., Yu, Z. Y., Fan, D. Y., Bu, X. L., Tan, C. R., Zeng, G. H., Wang, J., Zhao, H. W., & Wang, Y. J. (2021). Physiological clearance of amyloid-beta by the kidney and its therapeutic potential for Alzheimer's disease. *Molecular psychiatry*, 26(10), 6074–6082. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01073-6>

Ten Have, S., Boulon, S., Ahmad, Y., and Lamond, A. I. (2011). Mass spectrometry-based immuno-precipitation proteomics - the user's guide. *Proteomics*, 11(6), 1153–1159. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000548>

Teunissen, C. E., Chiu, M. J., Yang, C. C., Yang, S. Y., Scheltens, P., Zetterberg, H., & Blennow, K. (2018). Plasma Amyloid- β (A β 42) Correlates with Cerebrospinal Fluid

A β 42 in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease* : JAD, 62(4), 1857–1863. <https://doi.org/10.3233/JAD-170784>

Tezenas du Montcel, C., Duriez, P., Lebrun, N., Grouselle, D., de Grimaudet, B., Dardennes, R., Epelbaum, J., Cuenca, M., Viltart, O., Gorwood, P., and Tolle, V. (2022). Methodological considerations for ghrelin isoforms prawf in clinical evaluation in anorexia nervosa. *Comprehensive psychoneuroendocrinology*, 11, 100140. <https://doi.org/10.1016/j.cpnec.2022.100140>

Therriault, J., Woo, M.S., Salvadó, G. et al. Comparison of immunoprawf- with mass spectrometry-derived p-tau quantification for the detection of Alzheimer's disease pathology. *Mol Neurodegeneration* 19, 2 (2024). <https://doi.org/10.1186/s13024-023-00689-2> Thomas A, Krombholz S, Wolf C, Thevis M. Determination of ghrelin and desacyl ghrelin in human plasma and urine by means of LC-MS/MS for doping controls. *Drug Test Anal.* 2021 Nov;13(11-12):1862-1870. doi: 10.1002/dta.3176. Epub 2021 Oct 26. PMID: 34633773.

Thijssen, E. H., La Joie, R., Wolf, A., Strom, A., Wang, P., Iaccarino, L., Bourakova, V., Cobigo, Y., Heuer, H., Spina, S., VandeVrede, L., Chai, X., Proctor, N. K., Airey, D. C., Shcherbinin, S., Duggan Evans, C., Sims, J. R., Zetterberg, H., Blennow, K., Karydas, A. M., ... Advancing Research and Treatment for Frontotemporal Lobar Degeneration (ARTFL) investigators (2020). Diagnostic value of plasma phosphorylated tau181 in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. *Nature medicine*, 26(3), 387–397. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0762-2>

Thomas, A. S., Sassi, M., Angelini, R., Morgan, A. H., and Davies, J. S. (2022). Acylation, a Conductor of Ghrelin Function in Brain Health and Disease. *Frontiers in physiology*, 13, 831641. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.831641>

Thomson, B. A., and Iribarne, J. V. (1979). Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *Journal of Chemical Physics*, 71(11), 4451–4463. <https://doi.org/10.1063/1.438198>

Tsai FJ, Chen SY, Liu YC, Liao HY, Chen CJ. The comparison of CHCA solvent compositions for improving LC-MALDI performance and its application to study the impact of aflatoxin B1 on the liver proteome of diabetes mellitus type 1 mice. *PLoS*

One. 2017 Jul 24;12(7):e0181423. doi: 10.1371/journal.pone.0181423. PMID: 28738076; PMCID: PMC5524319.

Tschöp, M., Smiley, D. L., and Heiman, M. L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 407(6806), 908–913. <https://doi.org/10.1038/35038090>

Tucholski, T.; Cai, W.; Gregorich, Z. R.; Bayne, E. F.; Mitchell, S. D.; McIlwain, S. J.; de Lange, W. J.; Wrobbel, M.; Karp, H.; Hite, Z.; Vikhorev, P. G.; Marston, S. B.; Lal, S.; Li, A.; Dos Remedios, C.; Kohmoto, T.; Hermesen, J.; Ralphe, J. C.; Kamp, T. J.; Moss, R. L.; Ge, Y. Distinct Hypertrophic Cardiomyopathy Genotypes Result in Convergent Sarcomeric Proteoform Profiles Revealed by Top-down Proteomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020, 117 (40), 24691– 24700,

Unger, M. M., Möller, J. C., Mankel, K., Eggert, K. M., Bohne, K., Bodden, M., Stiasny-Kolster, K., Kann, P. H., Mayer, G., Tebbe, J. J., & Oertel, W. H. (2011). Postprandial ghrelin response is reduced in patients with Parkinson's disease and idiopathic REM sleep behaviour disorder: A peripheral biomarker for early Parkinson's disease? *Journal of Neurology*, 258(6), 982–990. <https://doi.org/10.1007/s00415-010-5864-1>

Uriarte M., De Francesco P. N., Fernandez G., Cabral A., Castrogiovanni D., Lalonde T., et al. (2019). Evidence Supporting a Role for the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Transporting Circulating Ghrelin into the Brain. *Mol. Neurobiol.* 56 (6), 4120–4134. doi:10.1007/s12035-018-1362-8

Van Berkel, G. J., and Kertesz, V. (2007). Using the electrochemistry of the electrospray ion source. *Analytical chemistry*, 79(15), 5510–5520. <https://doi.org/10.1021/ac071944a>

Verberk, I. M. W., Thijssen, E., Koelewijn, J., Mauroo, K., Vanbrabant, J., de Wilde, A., Zwan, M. D., Verfaillie, S. C. J., Ossenkoppele, R., Barkhof, F., van Berckel, B. N. M., Scheltens, P., van der Flier, W. M., Stoops, E., Vanderstichele, H. M., & Teunissen, C. E. (2020). Combination of plasma amyloid beta(1-42/1-40) and glial fibrillary acidic protein strongly associates with cerebral amyloid pathology. *Alzheimer's research & therapy*, 12(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00682-7>

Villarreal, D., Pradhan, G., Zhou, Y., Xue, B., & Sun, Y. (2022). Diverse and complementary effects of ghrelin and obestatin. *Biomolecules*, 12(4), 517.

Vogelgsang, J., Shahpasand-Kroner, H., Vogelgsang, R., Streit, F., Vukovich, R., & Wiltfang, J. (2018). Multiplex immunoprawf measurement of amyloid- β 42 to amyloid- β 40 ratio in plasma discriminates between dementia due to Alzheimer's disease and dementia not due to Alzheimer's disease. *Experimental brain research*, 236(5), 1241–1250. <https://doi.org/10.1007/s00221-018-5210-x>

Vorm, O., Roepstorff, P., and Mann, M. (1994). Improved resolution and very high sensitivity in MALDI TOF of matrix surfaces made by fast evaporation. *Analytical Chemistry*, 66(19), 3281–3287. <https://doi.org/10.1021/ac00091a044>

Vortmeier, G., DeLuca, S. H., Els-Heindl, S., Chollet, C., Scheidt, H. A., Beck-Sickinger, A. G., Meiler, J., and Huster, D. (2015). Integrating solid-state NMR and computational modeling to investigate the structure and dynamics of membrane-associated ghrelin. *PloS one*, 10(3), e0122444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122444>

Vuckovic D., Dagley L.F., Purcell A.W., Emili A. Membrane proteomics by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Analytical approaches and challenges. *Proteomics*. 2013;13:404–423. doi: 10.1002/pmic.201200340.

Walker A. K., Rivera P. D., Wang Q., Chuang J.-C., Tran S., Osborne-Lawrence S., et al. (2015). The P7C3 Class of Neuroprotective Compounds Exerts Antidepressant Efficacy in Mice by Increasing Hippocampal Neurogenesis. *Mol. Psychiatry* 20 (4), 500–508. doi:10.1038/mp.2014.34

Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., & Gatto Jr, G. J. (2005). Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(45), 7342-7372.

Wan, W. Y., and Milner-White, E. J. (1999). A recurring two-hydrogen-bond motif incorporating a serine or threonine residue is found both at alpha-helical N termini and in other situations. *Journal of molecular biology*, 286(5), 1651–1662. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2551>

Wang, H., Dou, S., Zhu, J., Shao, Z., Wang, C., & Cheng, B. (2020). Ghrelin protects dopaminergic neurons against MPTP neurotoxicity through promoting autophagy and

inhibiting endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Brain Research*, 1746, 147023. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147023>

Wang, Y., Guo, S., Zhuang, Y. et al. Molecular recognition of an acyl-peptide hormone and activation of ghrelin receptor. *Nat Commun* 12, 5064 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25364-2>

Wei, J., Wong, L. C., & Boland, S. (2024). Lipids as emerging biomarkers in neurodegenerative diseases. **International Journal of Molecular Sciences*, 25*(1), 131. <https://doi.org/10.3390/ijms25010131>

Wiley, W. C., and McLaren, I. H. (1955). Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Review of Scientific Instruments*, 26(12), 1150–1157. <https://doi.org/10.1063/1.1715212>

Wilson DH, Rissin DM, Kan CW, Fournier DR, Piech T, Campbell TG, Meyer RE, Fishburn MW, Cabrera C, Patel PP, Frew E, Chen Y, Chang L, Ferrell EP, von Einem V, McGuigan W, Reinhardt M, Sayer H, Vielsack C, Duffy DC (2016) The Simoa HD-1 Analyzer: A novel fully automated digital immunoprawf analyzer with single-molecule sensitivity and multiplexing. *J Lab Autom* 21, 533–547.

Willert K., Brown J. D., Danenberg E., Duncan A. W., Weissman I. L., Reya T., et al. (2003). Wnt Proteins Are Lipid-Modified and Can Act as Stem Cell Growth Factors. *Nature* 423 (6938), 448–452. doi:10.1038/nature01611

Winston Timp and Gregory Timp Beyond mass spectrometry, the next step in proteomics. *Sci. Adv.* 6, eaax8978(2020). DOI:10.1126/sciadv.aax8978

World Health Organization. (2021). **Dementia**. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>

Yang, J., Brown, M. S., Liang, G., Grishin, N. V., & Goldstein, J. L. (2008a). Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*, 132(3), 387–396. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.017>

Yang J., Zhao T.-J., Goldstein J. L., Brown M. S. (2008b). Inhibition of Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) by Octanoylated Pentapeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (31), 10750–10755. doi:10.1073/pnas.0805353105

Yang, S., Mu, L., Feng, R., and Kong, X. (2019). Selection of Internal Standards for Quantitative Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Analysis Based on Correlation Coefficients. *ACS omega*, 4(5), 8249–8254. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00566>

Yang, J., and Sumbria, R. K. (2021). The concentration of brain homogenates with the Amicon Ultra Centrifugal filters. *MethodsX*, 8, 101584. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101584>

Young, E. R., & Jialal, I. (2023). Biochemistry, ghrelin. In **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547692/>

Yurtsever, D., & Lorent, J. H. (2020). Structural modifications controlling membrane raft partitioning and curvature in human and viral proteins. **The Journal of Physical Chemistry B*, 124*(35), 7574–7585. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.0c03435>

Xiao, X., Tang, T., Bi, M., Liu, M., Liu, J., Jiao, Q., Chen, X., Yan, C., Du, X., & Jiang, H. (2024). GHSR deficiency exacerbates Parkinson's disease pathology by impairing autophagy. *Redox Biology*, 76, 103322. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2024.103322>

Zarkali, A., McColgan, P., Ryten, M., Reynolds, R. H., Leyland, L. A., Lees, A. J., Rees, G., and Weil, R. S. (2020). Dementia risk in Parkinson's disease is associated with interhemispheric connectivity loss and determined by regional gene expression. *NeuroImage. Clinical*, 28, 102470. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2020.102470>

Zeidman R., Jackson C. S., Magee A. I. (2009). Protein Acyl Thioesterases (Review). *Mol. Membr. Biol.* 26 (1–2), 32–41. doi:10.1080/09687680802629329

Zemenova, J., Sykora, D., Adamkova, H., Maletinska, L., Elbert, T., Marek, A., and Blechova, M. (2017). Novel approach to determine ghrelin analogs by liquid chromatography with mass spectrometry using a monolithic column. *Journal of separation science*, 40(5), 1032–1039. <https://doi.org/10.1002/jssc.201601141>

Zetterberg, H., and Burnham, S. C. (2019, March 28). Blood-based molecular biomarkers for Alzheimer's disease. *Molecular Brain*, Vol. 12, p. 26. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0448-1>

Zhou Q., Yang D., Wu M., Guo Y., Guo W., Zhong L., et al. (2019). Common Activation Mechanism of Class a GPCRs. *ELife* 8, e50279. doi:10.7554/ELIFE.50279

Zhu X., Cao Y., Voodg K., Steiner D. F. (2006). On the Processing of Proghrelin to Ghrelin. *J. Biol. Chem.* 281 (50), 38867–38870. doi:10.1074/jbc.M607955200

Zhu, N., Santos-Santos, M., Illán-Gala, I., Montal, V., Estellés, T., Barroeta, I., Altuna, M., Arranz, J., Muñoz, L., Belbin, O., Sala, I., Sánchez-Saudinós, M. B., Subirana, A., Videla, L., Pegueroles, J., Blesa, R., Clarimón, J., Carmona-Iragui, M., Fortea, J., Lleó, A., ... Alcolea, D. (2021). Plasma glial fibrillary acidic protein and neurofilament light chain for the diagnostic and prognostic evaluation of frontotemporal dementia. *Translational neurodegeneration*, 10(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s40035-021-00275-w>

Zipser, B. D., Johanson, C. E., Gonzalez, L., Berzin, T. M., Tavares, R., Hulette, C. M., ... Stopa, E. G. (2007). Microvascular injury and blood-brain barrier leakage in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 28(7), 977–986. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.01>