

**Marko Tijardović**

**Spolne razlike N-glikozilacije plazmatskih proteina  
kod pacijenata dječje dobi oboljelih od šećerne  
bolesti tipa 1**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitička biokemija Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Olge Gornik.

Zahvaljujem se dragoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Olgi Gornik na ukazanom povjerenju, uloženom trudu kao i pruženim savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Tomi Keseru i Najdi Selak, mag. pharm., na pomoći prilikom izrade praktičnog dijela rada, kao i na vrlo ugodnoj radnoj atmosferi.

Posebno hvala mojoj obitelji i prijateljima na pruženoj podršci i poticanju tijekom napredovanja kroz studij.

## SADRŽAJ:

1.	UVOD .....	1
1.1.	Glikozilacija.....	1
1.2.	Glikani .....	1
1.2.1.	N-glikani.....	1
1.2.2.	O-glikani.....	3
1.2.3.	Biološka uloga i važnost glikana.....	3
1.3.	Šećerna bolest.....	5
1.3.1.	Tip 1 šećerne bolesti.....	6
1.4.	Analiza glikanske strukture .....	7
1.4.1.	HILIC-UPLC.....	7
2.	OBRAZLOŽENJE TEME .....	9
3.	MATERIJALI I METODE .....	10
3.1.	Uzorci .....	10
3.2.	Materijali .....	10
3.3.	Oprema .....	12
3.4.	Priprema uzoraka.....	12
3.4.1.	Randomizacija uzoraka .....	12
3.4.2.	Izolacija N-glikana s plazmatskih glikoproteina.....	12
3.4.3.	Obilježavanje, pročišćavanje i ispiranje N-glikana plazme .....	13
3.5.	Analiza uzoraka .....	14
3.5.1.	Analiza izoliranih N-glikana HILIC-UPLC metodom.....	14
3.5.2.	Statistička obrada .....	15
4.	REZULTATI.....	16
4.1.	Primjer kromatograma plazmatskih N-glikana.....	16
4.2.	Usporedba izoliranih plazmatskih N-glikana između spolova.....	18
4.2.1.	Usporedba kod svih ispitanika .....	19
4.2.2.	Usporedba kod ispitanika mlađih od 10 godina.....	21
4.2.3.	Usporedba kod ispitanika starijih od 11 odnosno 12 godina .....	23
4.2.4.	Usporedba zastupljenosti karakteristika glikana u glikanskom profilu .....	24
5.	RASPRAVA.....	26
6.	ZAKLJUČAK .....	28
7.	LITERATURA.....	29
8.	SAŽETAK / SUMMARY .....	31
8.1.	Sažetak.....	31
8.2.	Summary.....	32

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

## POPIS KORIŠTENIH KRATICA:

ACN	Acetonitril
Asn	Asparagin
DMSO	Dimetil sulfoksid
ER	Endoplazmatski retikul
GAG	Glikozaminoglikan
GBP	Protein koji veže glikane
GP	Glikanski vršak / Glikanska skupina
HILIC	Tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama
IDF	Međunarodna dijabetička federacija
IgG	Imunoglobulin G
PBS	Puferirana otopina fosfatnih soli
SDS	Natrijev dodecil-sulfat
Ser	Serin
Thr	Treonin
UPLC	Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija

## 1. UVOD

### 1.1. Glikozilacija

Glikozilacija je složen i visoko reguliran enzimski posredovan proces kotranslacijskog ili posttranslacijskog vezanja šećernih struktura (glikana) na proteine i lipide. Glikokonjugat čini jedna ili više monosaharidnih ili oligosaharidnih jedinica (glikon) kovalentno vezanih na neugljikohidratnu molekulu (aglikon). Ukoliko su glikani vezani na protein, radi se o glikoproteinima i oni su univerzalni za sve poznate organizme u kojima ujedno igraju i ključnu ulogu uz nukleinske kiseline, proteine i lipide (Varki i sur., 2009).

U glikokonjugatima udio molekule koji zauzima glikan može varirati u velikoj mjeri, od vrlo malog do gotovo potpunog udjela. Razlikujemo dvije grube skupine glikokonjugata, glikoproteine i proteoglikane. Kod glikoproteina, proteinski dio na sebe ima vezan jedan ili više ugljikohidratni lanac N ili O vezom, koji su uglavnom kratki i razgranati. Proteoglikani imaju na sržni protein vezan jedan ili više dugih glikozaminoglikanskih lanaca i većinom imaju veći glikanski udio od glikoproteina (Varki i sur., 2009). Monosaharidne podjedinice koje se najčešće pojavljuju u glikanima su: fukoza (Fuc), galaktoza (Gal), glukoza (Glu), manosa (Man), N-acetilgalaktozamin (GalNAc), N-acetilglukozamin (GlcNAc), sijalinska kiselina (Sia) i ksiloza (Xyl) (Lauc i sur., 2014a).

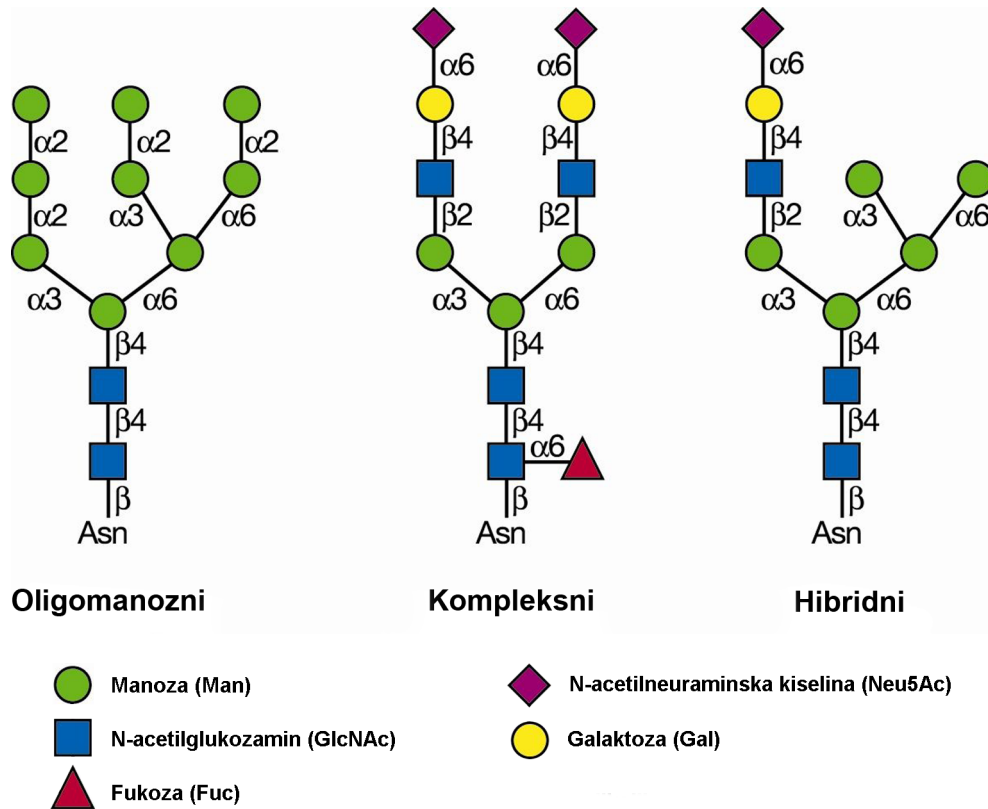
Važno je naglasiti da za razliku od nukleotida i aminokiselina kod kojih tri različita monomera mogu tvoriti 6 različitih trimera, tri različite heksoze mogu (ovisno o formama koje se uzimaju u obzir) tvoriti između 1056 i 27648 jedinstvenih trisaharida. Razlika u kompleksnosti postaje još očitija kako broj monomera raste. Ova spoznaja ukazuje na iznimnu raznolikost glikanskih struktura koje se mogu naći vezane na makromolekule, odnosno posljedičnu raznolikost utjecaja na ponašanje i funkciju određene makromolekule na koju su vezani (Varki i sur., 2009).

### 1.2. Glikani

#### 1.2.1. N-glikani

N-glikani su kovalentno vezani na proteine preko asparaginskih ostataka pomoću N-glikozidne veze. Najčešća od njih je veza N-acetilglukozamina na asparagin (GlcNAc $\beta$ 1-Asn). Svi N-glikani imaju zajedničku jezgru na koju mogu biti vezani različiti ogranci. Ona se sastoji od dva N-acetilglukozamina i tri manoze. Prema glikanskim ostacima koji mogu biti vezani na jezgru, N-glikane dijelimo na tri osnovna tipa: oligomanozni, kompleksni i hibridni. Oligomanozni glikani sadrže samo manji broj manoznih jedinica vezanih na jezgru.

Kompleksni glikani sadrže dvije ili više grana s po barem jednom N-acetilglukozaminskom i jednom galaktoznom jedinicom koje su vezane na jezgru. Hibridni tip predstavlja kombinaciju prethodna dva jer sadrži jednu složenu granu i jedan ili više oligomanoznih ogranaka (Varki i sur., 2009).



Slika 1. Osnovni tipovi N-glikana (preuzeto i modificirano iz Varki i sur., 2009)

Iako je asparagin najčešće mjesto vezanja N-glikana na proteine, oni ne mogu biti vezani za svaki asparaginski ostatak. Minimalni slijed aminokiselina koji mora biti zadovoljen za vezanje N-glikana započinje s asparaginom, nakon njega se može nalaziti bilo koja aminokiselina osim prolina, a treća aminokiselina u slijedu mora biti serin ili treonin. Prema tome, slijedovi Asn-X-Ser/Thr unutar proteina predstavljaju kandidate za vezanje N-glikana. Također, prijenos glikana se ne događa na svakom Asn-X-Ser/Thr slijedu zbog konformacijskih ili drugih ograničenja u smatanju glikoproteina, konkretne aminokiseline na „X“ poziciji i drugih faktora koji mogu utjecati na vezanje. Ipak, procjenjuje se da barem dvije trećine slijedova na sebi sadrži vezane N-glikane. Transfer N-glikana na Asn-X-Ser/Thr odvija se na luminalnoj strani membrane endoplazmatskog retikula (ER) za vrijeme sinteze i prolaska proteina kroz translokon na membrani ER (Varki i sur., 2009).

Ovako nastali glikani ograničene raznolikosti dodatno se modificiraju dodavanjem šećernih podjedinica na trans strani Golgijeveg aparata, tvoreći tako široku paletu raznolikih i kompleksnih N-glikana. Ovaj proces možemo podijeliti u tri koraka: vezanje glikanskih jedinica na jezgru, elongacija granajućih N-acetilglukozaminskih ostataka i završno vezanje podjedinica „capping“ na već gotove ogranke (Varki i sur., 2009).

### 1.2.2. O-glikani

Drugu glavnu skupinu glikana predstavljaju O-glikani koji su vezani na polipeptidni lanac preko hidroksilne skupine bočnog ogranka serina ili treonina, dok se šećerna jedinica kojom su vezani može razlikovati i prema njoj ih možemo svrstati u skupine. Česta skupina O-glikana su oni vezani pomoću N-acetilgalaktozamina (GalNAc). Ova skupina glikana često se sastoji od dugih lanaca vezanih na polipeptidne jedinice bogate serinom i treoninom (mjestima vezanja O glikana), zbog čega je glikanski udio u konačnoj strukturi velik. Ovakvi glikokonjugati se uglavnom mogu naći u mukoznim sekretima, zbog čega ih često nazivamo mucinima, kao i u ulozi transmembranskih glikoproteina s glikanskim dijelom molekule izloženim na vanjskoj strani stanice. Osim spomenutih O-GalNAc glikana postoje brojni drugi O-vezani glikani poput  $\alpha$ -vezanih O-fukoznih,  $\beta$ -vezanih O-ksiloznih,  $\alpha$ -vezanih O-manoznih,  $\beta$ -vezanih O-GlcNAc i drugih (Varki i sur., 2009).

### 1.2.3. Biološka uloga i važnost glikana

Glikane je moguće promatrati kao višu razinu gradivnih elemenata živih organizama, poput nukleinskih kiselina, proteina i lipida, samo kompleksniju i uz brži stupanj evolucije. U skladu s tim, glikozilacija proteina predstavlja najčešću epiproteomsku modifikaciju čime je uključena u brojne fiziološke, ali i patofiziološke procese. N-glikozilacija je ključna za sve višestanične oblike života i njezina kompletna odsutnost je embrionalno letalna (Marek i sur., 1999). Osim vezanja i modulacije pojedinih slobodnih proteina u organizmima, sve eukariotske stanice su prekrivene debelim slojem složenih glikana vezanih za proteine i lipide staničnih membrana kojeg nazivamo glikokaliks. On je ključan posrednik u bilo kakvoj interakciji stanice s okolinom i bez njega stanica ne može preživjeti (Gagneux i Varki, 1999). Kao i kod ostalih oblika makromolekula, biološke uloge glikana čine širok raspon od onih jedva zamjetnih, do ključnih uloga u rastu, razvoju, funkcioniranju i preživljavanju organizama u kojima se sintetiziraju (Varki i sur., 2009). Najvažnija evolucijska prednost koju glikani nude višim eukariotima je mogućnost stvaranja novih struktura bez uvođenja većih promjena u genskom nasljedstvu (Lauc i sur., 2014b; Lauc i Zoldoš, 2010). Sve postranslacijske modifikacije to čine

do neke mjere, iako većina funkcionira poput jednostavnih molekularnih prekidača, dok glikani predstavljaju velik strukturni doprinos molekuli i time omogućuju finiju regulaciju njezine funkcije (Lauc i sur., 2014a). Općenito, glikani mogu doprinosti funkciji proteina na tri načina: (1) predstavljajući sastavni dio proteina i time biti ključni za njegovu osnovnu strukturu i funkciju, u vidu pravilnog smatanja, topljivosti i stabilnosti. (2) Precizno modulirajući strukturu proteina pomoću varijacija u glikanima koji su vezani na polipeptidni lanac i na taj način prilagođavajući njegovu funkciju specifičnim fiziološkim zahtjevima. (3) Stvarajući nezavisna vezna mjesta za receptore koji specifično vežu glikane GBP (glycan-binding proteins) (Lauc i sur., 2015). GBP se također mogu podijeliti na intrinzične i ekstrinzične - one koji prepoznaju vlastite glikane odnosno one koji prepoznaju glikane drugih organizama, bilo da se radi o patogenima ili simbiotima (Varki i sur., 2009). Uloga pojedinog glikana može se razlikovati ovisno o tkivu u kojem se nalazi, stupnju razvoja organizma, okolišnim čimbenicima i drugim faktorima. Imajući na umu rasprostranjenost glikana unutar organizma, odnosno njihove raznolike utjecaje, jasno je da su biološke posljedice bilo kakvih izmjena u glikozilaciji vrlo varijabilne i nepredvidive, što otvara mogućnost za razvoj različitih bolesti i patoloških stanja (Varki i sur., 2009). S druge strane, obzirom da je za razliku od proteina koji su definirani jednim genom, struktura glikana posljedica međuodnosa stotina gena, i ona sama je osjetljiva na svaku promjenu fiziologije stanice. Posljedično, mnoga su patološka stanja u organizmu povezana sa specifičnim promjenama u glikanskim strukturama i upravo te promjene predstavljaju vrijedne kandidate za temelje novim dijagnostičkim i prognostičkim postupcima (Labrilla i An, 2009; Freeze, 2006).



### 1.3. Šećerna bolest

Regulacija koncentracije glukoze u krvi složen je proces u kojemu sudjeluje više hormona. Glavni među njima su inzulin, glukagon i hormon rasta, dok je inzulin jedini hormon koji snižava koncentraciju glukoze u krvi (Štraus i Petlevski, 2009).

Šećerna bolest generalni je naziv za heterogene poremećaje u metabolizmu od kojih je glavni kronična hiperglikemija. Uzroci mogu biti ili oslabljeno lučenje inzulina ili rezistencija na inzulin što oboje kao posljedicu ima nedostatak njegove funkcije. Šećerna bolest dijeli se na dva najčešća tipa, tip 1 i tip 2 (Kerner i sur., 2014).

Uzrok šećerne bolesti tipa 1 je uništavanje  $\beta$  – stanica Langerhansovih otočića, najčešće kroz autoimune mehanizme, koje dovodi do apsolutnog nedostatka inzulina. Šećerna bolest tipa 2 može varirati od predominantne inzulinske rezistencije koja kao posljedicu ima relativni nedostatak inzulina, do pretežitog poremećaja lučenja inzulina uz inzulinsku rezistenciju. Ovaj tip šećerne bolesti je često povezan s drugim poremećajima iz tzv. metaboličkog sindroma (Kerner i sur., 2014).

Tablica 1. Obilježja i dijagnostički kriteriji za šećernu bolest tipa 1 i 2. (preuzeto i modificirano iz Kerner i sur., 2014)

	Šećerna bolest tipa 1	Šećerna bolest tipa 2
Dob	Uglavnom djeca, i mlađe osobe	Uglavnom srednja i starija dob
Dinamika pojave	Akutno do subakutno	Najčešće postupno
Simptomi	Poliurija, polidipsija, gubitak mase, iscrpljenost	Često bez simptoma
Tjelesna masa	Većinom normalna	Većinom prekomjerna
Lučenje inzulina	Smanjeno ili izostanak	Smanjeno do visoko
Inzulinska rezistencija	Nije prisutna (ili vrlo mala)	Često izražena
Učestalost u obitelji	Uglavnom negativna	Uglavnom pozitivna
Nasljeđivanje	Multifaktorsko	Multifaktorsko
Prisutnost antitijela	Približno 90-95% na početku	Negativna
Metabolizam	Nestabilan	Stabilan

Na svjetskoj razini registrirano je oko 190 milijuna osoba sa šećernom bolešću, dok WHO (*World Health Organization*) i IDF (*International Diabetes Federation*) procjenjuju da će taj broj do 2025. godine biti 300 milijuna. U Hrvatskoj, broj osoba sa šećernom bolešću viši je od 170 000, a pretpostavlja se da postoji još trećina tog broja neotkrivenih slučajeva (Štraus i Petlevski, 2009).

### 1.3.1. Tip 1 šećerne bolesti

Od ukupnog broja osoba sa šećernom bolešću, tip 1 predstavlja 5-10%. Ovaj tip bolesti javlja se najčešće u djetinjstvu i karakterizira ga apsolutni manjak inzulina koji se javlja kao posljedica lučenja autoantitijela na komponente  $\beta$ -stanica ili na samu molekulu inzulina. Autoantitijela je moguće detektirati u cirkulaciji oko 80-90% oboljelih, a često se javljaju nekoliko mjeseci pa i godina prije pojave jasnih simptoma bolesti. U takvim slučajevima govorimo o autoimunom tipu 1 šećerne bolesti, dok se slučajevi kod kojih nije moguće dokazati autoantitijela u krvi svrstavaju u idiopatski tip 1 šećerne bolesti (Štraus i Petlevski, 2009).

Tip 1 šećerne bolesti obično nastaje iznenadno i dramatično uz simptome poput učestalog mokrenja, izražene žeđi, suhoće usta, umora, gladi i naglog gubitka tjelesne mase. Od trenutka dijagnoze, osobe s tipom 1 šećerne bolesti su na terapiji inzulinom, dok novije strategije podrazumijevaju imunosupresivnu terapiju, transplantaciju  $\beta$ -stanica, gensku terapiju i terapiju matičnim stanicama (Štraus i Petlevski, 2009).

Komplikacije nastale uslijed šećerne bolesti dijele se na akutne koje se javljaju brzo i zahtijevaju hitnu intervenciju i one kronične, koje su sporijeg tijeka, ali trajno oštećuju pojedine organe (Štraus i Petlevski, 2009).

Akutne komplikacije su hipoglikemija, dijabetička ketoacidoza, laktatna acidoza i hiperosmolalna koma. Kronične komplikacije s druge strane nastaju kao posljedica dugotrajne hiperglikemije uslijed slabe metaboličke kontrole bolesti. One se dijele na mikroangiopatije (retinopatije, nefropatije, neuropatije) i makroangiopatije u koje se ubrajaju moždani udar, ishemijske srčane bolesti i periferne vaskularne bolesti. Mehanizmi kojima hiperglikemija oštećuje tkiva uglavnom se svode na neenzimsko vezanje glukoze na proteine (glikaciju) i oksidativni stres. Glikacija dovodi do promjene tercijarne strukture proteina odnosno njegove normalne funkcije, a prisutnija je kod dugoživućih proteina (kolagen, mijelin, tubulin) zbog sporog odvijanja. Oksidativni stres nastaje uslijed procesa autooksidacije glukoze pri čemu dolazi do stvaranja kisikovih radikala koji kao posljedicu imaju oštećenje tkiva (Štraus i Petlevski, 2009).

#### 1.4. Analiza glikanske strukture

Poput genomike i proteomike, glikomika predstavlja sustavnu analizu i razjašnjavanje glikoma (ukupnosti glikanske strukture) neke vrste stanica ili organizma. S obzirom na daleko veću kompleksnost prisutnu u glikomu u odnosu na genom i proteom, i sam zadatak je kompleksniji (Varki i sur., 2009). Za razliku od oligonukleotida i proteina, glikani uglavnom nisu linearne, nerazgranate strukture, a i u slučajevima kad jesu (npr. GAG), često sadrže brojne supstituente. Prema tome, kompletna analiza sekvence pojedinog glikana je praktično neizvediva upotrebom samo jedne metode zbog čega se koristi niz različitih fizikalnih, kemijskih i enzimatskih pristupa (Varki i sur., 2009).

Analiza glikanske strukture donedavno je predstavljala gotovo nemoguću misiju, s obzirom na strukturnu raznolikost i nedostatak prikladnih analitičkih metoda. U posljednjih nekoliko godina, na ovom području učinjeni su veliki pomaci (Huffman i sur., 2014).

Novе metode analize promijenile su pristup u analizi glikanskih struktura pa ona sada često podrazumijeva prvo probir svih serumskih glikana, nakon čega slijedi identifikacija proteina na kojima se nalaze promijenjeni glikani, odnosno njihova analiza. Za ovakvu vrstu analize uglavnom se koriste metode poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i spektrometrija masa (Gornik i Lauc, 2008). U ovom radu učinjen je samo probir serumskih glikana koji može biti temelj daljnjoj analizi i istraživanju.

##### 1.4.1. HILIC-UPLC

Tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (HILIC) je separacijska tehnika koja je po nekim karakteristikama slična kromatografiji normalnih faza. Kromatografija ugljikohidrata provedena na HILC stacionarnim fazama podrazumijeva mehanizam razdvajanja za razliku od klasične adsorpcijske kromatografije normalnih faza. HILIC omogućava analitima interakciju s visoko polarnim (hidrofilnim) stacionarnim fazama poput čistih silika čestica ili onih modificiranih s amino, hidroksi ili amidnim skupinama uz primjenu polarne mobilne faze s visokim udjelom organskog otapala. Za primjenu u HILIC-u često se koristi binarni gradijent mobilne faze koji se sastoji od vodenog dijela i manje polarnog organskog otapala, uglavnom acetonitrila, s rastućim vodenim udjelom koji potiče eluciju hidrofilnih molekula. Preporučeni puferi su acetatne i formijatne amonijeve soli zbog njihove hlapljivosti i dobre topljivosti u organskim otapalima. Uobičajeno vodena frakcija mobilne faze se postupno povećava do 50% udjela kako bi se eluirale glikanske jedinice iz HILIC kolone (Zauner i sur., 2011).

Općenito, retencijsko vrijeme glikana ili glikopeptida na HILIC materijalima ovisi o hidrofilnom potencijalu analita, koji je uvjetovan strukturalnim osobinama poput veličine, naboja, sastava, veza i razgranatosti oligosaharida. Unatoč tome razdvajanje glikanskih jedinica uglavnom se temelji na broju polarnih skupina što kao posljedicu ima nastajanje obrazaca razdvajanja koji su prilično predvidljivi i jednostavni za interpretaciju (Zauner i sur., 2011).

Pomoću HILIC-UPLC moguće je razdvajanje visoko polarnih hidrofilnih analita koje bi bilo teško razdvojiti pomoću kromatografije obrnutih faza. Osim toga moguće je razdvajanje strukturnih izomera isto kao i primjena različitih modifikacija poput fluorescentnih proba koje pomažu u vizualizaciji, što ovu metodu čini vrijednim alatom u strukturnoj analizi oligosaharida (Zauner i sur., 2011).

Napreci u razvijanju tehnika separacije složenih smjesa glikana ili glikopeptida ključni su za naknadna detaljnija istraživanja pojedinih glikanskih struktura pomoću spektrometrije masa (Zauner i sur., 2011).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kako je u proces glikozilacije uključen iznimno velik broj gena i staničnih faktora koji utječu na konačni produkt, očekivano je da će različita stanja u organizmu, pa tako i bolesti, imati svoj utjecaj na ukupni glikanski profil prisutan u plazmi. Također, uzevši u obzir važnost glikozilacije u brojnim aspektima cjelokupnog funkcioniranja organizma, eventualni poremećaji u glikozilaciji i genima odgovornim za njezino provođenje isto tako mogu sami po sebi biti uzrok određenih bolesti (Freeze, 2006). Ovakva opažanja opisana su u literaturi i prema tome mnogi specifični glikanski oblici i profili već su povezani s određenim bolestima, zbog čega služe kao biomarkeri, kao i potencijalni ciljevi za terapijsko djelovanje (Taniguchi i Kizuka, 2015; Dube i Bertozzi, 2005; Fuster i Esko, 2005).

Šećerna bolest tipa 1 autoimune je prirode i javlja se uglavnom kod djece i mladih. S obzirom na njezinu nerazjašnjenu i složenu etiopatologiju, pretpostavlja se da bi glikozilacija mogla igrati važnu ulogu u njezinom nastanku. Također, s obzirom na već utvrđenu vezu glikozilacije s autoimunim bolestima (Connelly i sur., 2016), istraživanje glikana u kontekstu dijabetesa tipa 1 moglo bi pružiti ključne informacije u daljnjem razjašnjenju ove bolesti. Kao jedan od koraka u opširnom procesu analize kakvu ova vrsta istraživanja zahtijeva, potrebno je usporediti plazmatske profile glikana s obzirom na spol pacijenata. Kako se uglavnom radi o osobama dječje i adolescentne životne dobi, ovakva usporedba bit će korisna i izvan konteksta istraživane bolesti jer su dosadašnje usporedbe među spolovima uglavnom provedene u odrasloj populaciji.

Nedavni napreci u tehnologiji i metodama dostupnima za analizu glikana omogućuju njezino brže i temeljitije izvođenje, što uspješnost ovakvih istraživanja i konačno dobivanje vrijednih informacija u razjašnjavanju bolesti, čini izglednijim.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Uzorci

Uzorci korišteni u ovom istraživanju uzeti su od 153 pacijenta s dijagnozom šećerne bolesti tipa 1. Sudjelovao je 81 muški i 72 ženska ispitanika s rasponom dobi od 2 do 19 godina. Svim ispitanicima uzet je uzorak plazme unutar 3 mjeseca od postavljanja dijagnoze dijabetesa tipa 1. Uzorci su dobiveni iz registra uzoraka dječjeg dijabetesa u Danskoj (The Danish Society for Childhood Diabetes Registry – DanDiabKids.)

#### 3.2. Materijali

##### Anorganske kemikalije:

Tablica 2. Anorganske kemikalije korištene u istraživanju

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
KCl, kalijev klorid	Calbiochem
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , kalijev dihidrogenfosfat	Sigma-Aldrich
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , dinatrijev hidrogenfosfat	Acros Organics
NaCl, natrijev klorid	Carlo Erba
NH <sub>4</sub> OH, amonijak	Emsure

##### Organske kemikalije:

Tablica 3. Organske kemikalije korištene u istraživanju

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
Dimetil sulfoksid, DMSO	Sigma
Formijatna kiselina, 98-100%	Emsure
ledena octena kiselina, 100%	Emsure
Igepal CA-360	Sigma
SDS, natrijev dodecil sulfat	Sigma
2-AB, 2-aminobenzamid	Sigma-Aldrich
PB, 2-pikolin boran	Sigma-Aldrich
hladni acetonitril (ACN), 96%	Fluka

## Enzimi:

Tablica 4. Enzimi korišteni u istraživanju

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
PNGaza F (peptid N-glikozidaza)	Prozyme

## Otopine i puferi:

Tablica 5. Otopine i puferi korišteni u istraživanju

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
pH Buffer Solution, alkalni standard za pH metar, pH: 9,21 +/- 0,02	Mettler Toledo GmbH
pH Buffer Solution, kiseli standard za pH metar, pH: 4,01 +/- 0,02	Mettler Toledo GmbH
30% octena kiselina u DMSO	Za 3 mL: pomiješati 0,9 mL octene kiseline s 2,1 mL DMSO
Otopina za obilježavanje N-glikana	Za 1 uzorak: u 25 µL 30% octene kiseline u DMSO dodati 0,48 mg 2-aminobenzamida i 1,12 mg 2-pikolin borana
4% Igepal	Za 100 mL: u 80 mL ultra čiste vode dodati 4 mL Igepala, otopiti pri 65°C na mješaču, zatim nadopuniti do 100 mL s ultra čistom vodom
2% SDS	Otopiti 2 g SDS-a u 100 mL vode
10xPBS, phosphate buffer saline	Za 100 mL: dodati 8,0028 g NaCl, 1,3832 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,2964 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,1976 g KCl u 80 mL ultra čiste vode, provjeriti pH i titrirati sa standardnom otopinom da pH bude između 6,6 i 6,8, a zatim pretočiti u menzuru od 100 mL te do 100 mL nadopuniti s ultra čistom vodom
5xPBS, phosphate buffer saline	Za 100 mL: 50 mL 10xPBS prelići u menzuru od 100 mL i do 100 mL nadopuniti s ultra čistom vodom
Pufer amonijev formijat, 2M, pH 4,4	Za 500 mL: uliti 300 mL ultra čiste vode u posudu od 500 mL, dodati 37,75 mL formijatne kiseline, ohladiti otopinu, miješati na magnetskom mješaču, polako dodavati oko 75 mL NH <sub>4</sub> OH do pH 4,2 (početan pH je <2), nakon postizanja sobne temperature otopine dodavati NH <sub>4</sub> OH do pH 4,4

### 3.3. Oprema

Tablica 6. Uređaji i oprema korištena u istraživanju

OPREMA	PROIZVOĐAČ
Pločice za sakupljanje uzoraka, polipropilen, 1 ml zapremine, za 96 uzoraka	Waters
AcroPrep 96 GHP 0.2 µm filter pločica od 1 ml	Pall
ABgene PCR pločica	ThermoFisher
Mikropipete (obične i multikanalne uz nastavke)	Ranin
Vacuum manifold – vakumska pumpa	Pall Corporation
Magnetic Stirrer MSH 300, magnetski mješać	Biosan
Shaker, tresalica	GFL
pH metar Seven Compact	Mettler Toledo
AB54-S, analitička vaga	Mettler Toledo
Highland, analitička vaga	ADAM
Waters Acquity UPLC instrument	Waters, Milford

### 3.4. Priprema uzoraka

#### 3.4.1. Randomizacija uzoraka

Kako bi se minimalizirao utjecaj predanalitičkih i analitičkih čimbenika na rezultate analize N-glikana plazmatskih proteina, uzorci su randomizirani miješanjem svih spremnika sa zamrznutim uzorcima u velikoj posudi, nakon čega su pipetirani na mikrotitarske pločice. Na svaku mikrotitarsku pločicu pipetirano je i po 5 standarda koji su obrađeni na isti način kao i uzorci.

#### 3.4.2. Izolacija N-glikana s plazmatskih glikoproteina

Nakon randomizacije, 10 µL svakog uzorka se stavlja u zasebnu jažicu pločice za sakupljanje uzoraka s 96 jažica (po protokolu otopljeni uzorci plazme se vorteksiraju te centrifugiraju 3 minute na 13400 rpm ili 10 min na 3000 rpm).

#### Denaturacija

2% SDS, 4% Igepal i 5xPBS izvade se iz hladnjaka kako bi postigli sobnu temperaturu. U svaki uzorak se dodaje 20 µL 2% SDS-a i promiješa pipetiranjem. Pločica s uzorcima se zatvori adhezivnom folijom te inkubira 10 minuta na 65°C. Zatim se pločica ostavi 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga se svakom uzorku dodaje 10 µL 4% Igepala s nastavcima za



pipete od 250  $\mu\text{L}$  te se promiješa pipetiranjem. Pločica s uzorcima se zatim stavlja na tresilicu (blago) na 15 minuta.

### Deglikozilacija

Pripremi se otopina enzima miješajući 10  $\mu\text{L}$  5xPBS-a s 0,12  $\mu\text{L}$  PNGaze F po jednom uzorku. U svaki uzorak se potom dodaje po 10  $\mu\text{L}$  otopine enzima s 250  $\mu\text{L}$  nastavcima za pipete te se resuspendira pipetiranjem. Pločica s uzorcima se zatvara adhezivnom folijom pri čemu je potrebno osigurati da su rubovi pločice čvrsto zatvoreni. Pločice se inkubiraju na 37°C tijekom 18 sati.

### 3.4.3. Obilježavanje, pročišćavanje i ispiranje N-glikana plazme

#### Priprema otopine za obilježavanje glikana

Otopina za obilježavanje jednog uzorka priprema se dodavanjem 25  $\mu\text{L}$  30% octene kiseline u DMSO-u u 0,48 mg 2-aminobenzamida te se vorteksira do potpunog otapanja. Potpuno otopljenu otopinu se dodaje u 1,12 mg 2-pikolin borana i ponovo sve vorteksira.

#### Obilježavanje uzorka

Dodaje se 25  $\mu\text{L}$  otopine za obilježavanje, pomoću 250  $\mu\text{L}$  nastavaka za pipete, u svaki uzorak te se promiješa pipetiranjem. Pločica se zatvori adhezivnom folijom i ostavi 10 minuta na tresilici. Nakon toga slijedi inkubacija tijekom 2 sata na 65°C te hlađenje uzoraka tijekom 30 minuta kako bi uzorak bio spreman za nanošenje na 1 mL AcroPrep GHP 0.2  $\mu\text{L}$  filter pločicu.

#### Pretpriprema GHP pločice

Koristeći 300  $\mu\text{L}$  nastavke za pipete pipetira se 200  $\mu\text{L}$  70% etanola u svaku jažicu GHP pločice te se vakuumira u otpad. Zatim se, koristeći iste nastavke, pipetira 200  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode u svaku jažicu pločice te vakuumira u otpad, a nakon toga se koristeći iste nastavke pipetira 200  $\mu\text{L}$  hladnog 96% ACN-a te vakuumira u otpad.

#### Nanošenje obilježenih N-glikana na GHP pločicu te njihovo pročišćavanje

Dodaje se 700  $\mu\text{L}$  hladnog 100% ACN-a u svaki uzorak sa zasebnim nastavkom za pipete za svaki uzorak, promiješa se pipetiranjem te koristeći isti nastavak pažljivo se prenese ukupan volumen uzorka, koji iznosi oko 800  $\mu\text{L}$ , u jažicu GHP pločice. Pločica se inkubira 2 minute, a zatim se vakuumira u otpad (kod korištenja vakuumske pumpe treba paziti da vakuum ne

prijeđe 2 inHg). Zatim se pipetira 200  $\mu$ L hladnog 96% ACN-a u svaku jažicu te vakuumira u otpad. Zadnji korak se ponovi još tri puta nakon čega se GHP pločica stavi na vrh stalka 1mL ili 2 mL pločica i pipetira se 200  $\mu$ L hladnog 96% ACN-a u svaku jažicu te se GHP pločica centrifugira 5 minuta na 1000 rpm.

#### Ispiranje (eluiranje) označenih N-glikana

GHP pločica se stavi na vrh čiste ABgene PCR pločice. U svaki uzorak se dodaje 90  $\mu$ L ultra čiste vode koristeći 300  $\mu$ L nastavke za pipete i stavi se na tresilicu tijekom 15 minuta. Zatim se GHP pločica centrifugira 5 minuta na 1000 rpm kako bi se sakupila prva frakcija eluata u PCR pločicu. Ponovi se postupak dodavanja ultra čiste vode i stavljanja na tresilicu te centrifugiranja, no ovaj put se sakuplja druga frakcija eluata u PCR pločicu. Na kraju se provjerava ukupan volumen eluata (180  $\mu$ L). Konačno, PCR pločica se zatvori PCR poklopcem i pohrani u zamrzivač.

### 3.5. Analiza uzoraka

#### 3.5.1. Analiza izoliranih N-glikana HILIC-UPLC metodom

Nakon izolacije N-glikana iz dobivenih uzoraka plazme, N-glikani se analiziraju metodom HILIC-UPLC na Waters Acquity UPLC instrumentu. Koristi se HILIC kolona za razdvajanje glikana veličine 2,1x150 mm i veličine čestica 1,7  $\mu$ m. Kao mobilna faza koja nosi uzorak kroz kolonu koriste se 100 mM amonijev formijat, pH 4,4, kao otapalo A i ACN kao otapalo B. Pomoću Empower software-a zadaju se željeni uvjeti prikazani u tablici 7.

Tablica 7. Promjena udjela otapala A i B tijekom kromatografske analize

VRIJEME (min)	PROTOK (mL/min)	% A	% B
0	0,561	30,0	70,0
1,47	0,561	30,0	70,0
24,81	0,561	47,0	53,0
25,50	0,250	70,0	30,0
27,00	0,250	70,0	30,0
28,00	0,250	30,0	70,0
31,5	0,561	30,0	70,0

Temperatura kolone postavljena je na 25°C, a temperatura uzoraka na 10°C. Valna duljina ekscitacije fluorescentnog detektora namještena je na 250 nm, a valna duljina detekcije na 428 nm. Nakon završetka analize slijedi obrada podataka u Empower software-u. Nakon provedene

automatske integracije dodatno se ručno integriraju površine pikova dobivenog kromatograma nakon čega slijedi statistička obrada.

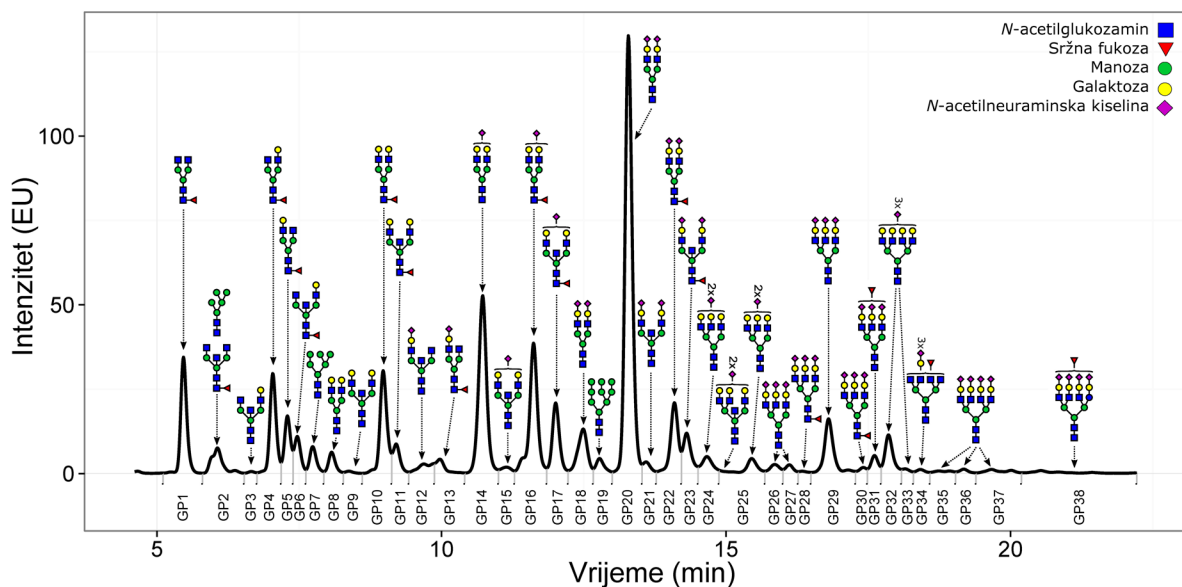
### 3.5.2. Statistička obrada

Integriranjem površina ispod pikova pojedinih glikanskih skupina na kromatogramima, izračunat je relativni udio svakog GP-a u ukupnom sastavu glikana pacijenta. Dobiveni podaci analizirani su pomoću statističkog software-a MedCalc v. 12.5.0.0.. Podaci su podijeljeni prema spolu nakon čega je za svaki GP provjerena normalnost razdiobe pomoću Kolmogorov-Smirnov testa. S obzirom da normalnost raspodjele nije potvrđena kod svih glikanskih skupina, usporedba među spolovima izvedena je uz neparametrijski Mann-Whitney test za nezavisne uzorke. Kako je uspoređeno 38 glikanskih skupina, razina signifikantnosti odnosno kriterij odluke za statistički značajnu P-vrijednost prilagođen je s 0,05 na 0,0013. U drugom dijelu istraživanja gdje su uspoređene glikanske osobine, udjeli onih GP-ova čiji glikani sadrže ispitivanu karakteristiku zbrojeni su za svakog pacijenta i promatrani kao jedan podatak. Uspoređeno je ukupno 5 kategorija prema čemu je razina signifikantnosti postavljena na 0,01. Sve uspoređene skupine kod kojih je Mann-Whitney testom izračunata P-vrijednost manja od pripadajuće razine signifikantnosti mogu se smatrati statistički značajno različitim.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Primjer kromatograma plazmatskih N-glikana

Analizom HILIC-UPLC metodom mjeri se retencijsko vrijeme svih glikana prisutnih u uzorku, koje se grafički prikazuje pomoću kromatograma. Na apscisi je obilježeno retencijsko vrijeme, a ordinata predstavlja intenzitet izmjerene fluorescencije u određenom vremenu. Glikani s manjim brojem šećernih podjedinica manje su hidrofilni i zbog toga ranije izlaze iz kolone. S druge strane, oni s većim brojem podjedinica dulje se zadržavaju na hidrofilnoj stacionarnoj fazi odnosno imaju dulje retencijsko vrijeme. Na slici 2 prikazan je primjer kromatograma plazmatskih N-glikana dobiven HILIC-UPLC analizom. Na njemu su vidljiva 38 GP-a (*glycan peak*), prema kojima analizirane glikane svrstavamo u 38 glikanskih skupina. Površina ispod svakog GP-a predstavlja koncentraciju glikana iz odgovarajuće skupine koji su prisutni u uzorku.



Slika 2. Primjer kromatograma plazmatskih N-glikana dobiven HILIC-UPLC analizom

Svaka od glikanskih skupina sadrži poznatu strukturu glikana koja je u najvećoj mjeri zastupljena u njoj, zbog čega možemo približno podrazumijevati da površina ispod GP-a predstavlja koncentraciju određenog glikana koji tom GP-u pripada.

U tablici 8 prikazani su najzastupljeniji glikani za svaku od 38 glikanskih skupina dobivenih HILIC-UPLC analizom.

Tablica 8. Najzastupljeniji glikani za svaku od 38 glikanskih skupina dobivenih HILIC-UPLC analizom

GLIKANSKA SKUPINA	N-glikan	GLIKANSKA SKUPINA	N-glikan
GP1	FA2	GP20	A2G2S2
GP2	M5 FA2B	GP21	A2BG2S2
		GP22	FA2G2S2
GP3	A2[6]BG1	GP23	FA2BG2S2
GP4	FA2[6]G1	GP24	A3G3S2
GP5	FA2[3]G1	GP25	A3BG3S2
GP6	FA2[6]BG1		A3G3S2
GP7	M6	GP26	A3G3S3
GP8	A2G2	GP27	A3G3S3
GP9	A2BG2	GP28	FA3G3S3
GP10	FA2G2	GP29	A3G3S3
GP11	FA2BG2	GP30	FA3G3S3
GP12	A2[3]BG1S1	GP31	A3G3S3F
GP13	FA2[3]G1S1	GP32	A4G4S3
GP14	A2G2S1	GP33	A4G4S3
GP15	A2BG2S1	GP34	A4G3S3F
GP16	FA2G2S1	GP35	A4G4S4
GP17	FA2BG2S1	GP36	A4G4S4
GP18	A2G2S2	GP37	A4G4S4
GP19	M9	GP38	A4G4S4F
<p><b>A:</b> srž glikana (2 N-acetilglukozamina i 3 manoze) s granom N-acetilglukozamina (A2 označava dvije grane, a A3 označava tri grane)</p> <p><b>B:</b> N-acetilglukozamin na mjestu grananja</p> <p><b>F:</b> sržna fukoza</p> <p><b>G:</b> galaktoza</p> <p><b>M:</b> manaza</p>			

#### 4.2. Usporedba izoliranih plazmatskih N-glikana između spolova

Od početnih 180 uzoraka u kojima su analizirani N-glikani, iz istraživanja je izbačeno ukupno 27 uzoraka od kojih 16 zbog nepotpunih podataka, 10 zbog slabog analitičkog signala i jedan uzorak jer je naknadno ustanovljeno da pacijent nije bolovao od šećerne bolesti tipa 1. Rezultati analize preostalih 153 uzorka prikazani su prema pojedinim glikanskim skupinama i obrađeni s obzirom na spol. Generalni prikaz podataka sva 153 uzorka vidljiv je u tablici 9.

Tablica 9. Opisna statistika pojedinih glikanskih skupina svih ispitanika

Skupina	Min	Max	M	Skupina	Min	Max	M
GP1	1,81	8,97	4,35	GP20	19,45	32,15	23,91
GP2	1,21	3,07	1,88	GP21	0,48	0,82	0,60
GP3	0,02	0,12	0,05	GP22	2,48	6,76	3,54
GP4	1,68	7,79	4,32	GP23	0,39	2,44	1,24
GP5	0,56	3,18	1,69	GP24	1,02	3,90	2,15
GP6	0,45	1,63	0,94	GP25	1,13	3,28	1,80
GP7	0,79	1,49	1,06	GP26	0,46	1,90	0,97
GP8	1,56	3,02	2,33	GP27	0,36	1,17	0,64
GP9	0,06	0,20	0,10	GP28	0,12	0,38	0,21
GP10	2,51	7,91	4,92	GP29	2,20	7,74	3,92
GP11	0,40	1,33	0,78	GP30	0,18	0,72	0,39
GP12	1,26	2,19	1,68	GP31	0,55	2,22	0,99
GP13	0,23	0,79	0,48	GP32	0,96	4,49	2,15
GP14	13,32	19,14	16,00	GP33	0,20	0,61	0,34
GP15	0,30	0,74	0,41	GP34	0,15	0,54	0,29
GP16	4,38	8,08	6,10	GP35	0,35	0,93	0,55
GP17	0,69	2,72	1,50	GP36	0,15	0,98	0,41
GP18	1,90	5,12	3,63	GP37	0,45	1,54	0,80
GP19	0,76	1,40	0,97	GP38	0,25	1,34	0,59
<b>Min:</b> minimum		<b>Max:</b> maksimum		<b>M:</b> medijan			

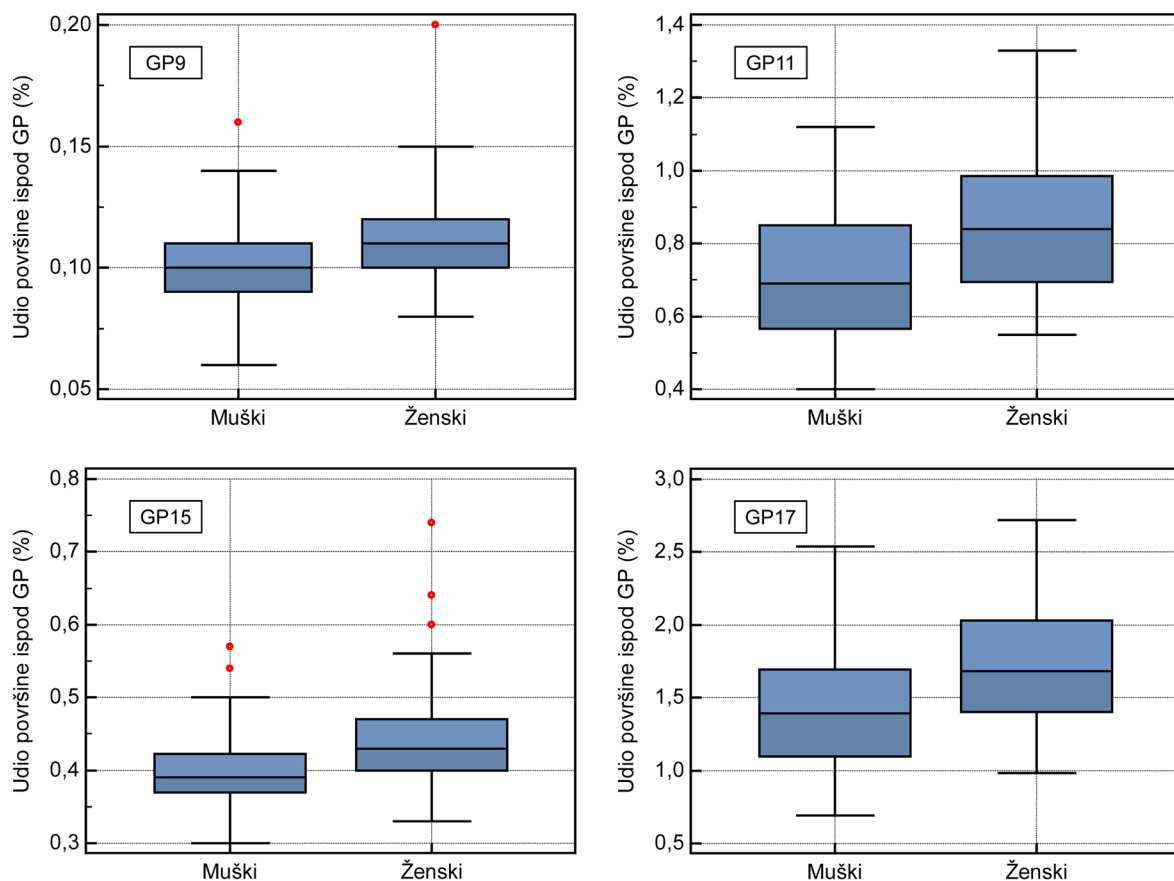
#### 4.2.1. Usporedba kod svih ispitanika

Tablica 10. Rezultati usporedbe glikanskih skupina prema spolu kod svih ispitanika

Skupina	Minimum		Maksimum		Medijan		P vrijednost
	M	F	M	F	M	F	
GP1	1,810	1,810	8,970	7,620	4,510	4,160	0,2572
GP2	1,210	1,220	2,800	3,070	1,880	1,880	0,3035
GP3	0,020	0,030	0,120	0,110	0,050	0,060	0,0206
GP4	1,680	2,070	7,790	6,710	4,390	4,280	0,6622
GP5	0,560	0,810	3,180	2,710	1,760	1,660	0,3345
GP6	0,450	0,570	1,560	1,630	0,880	1,015	0,0071
GP7	0,790	0,840	1,340	1,490	1,020	1,075	0,0049
GP8	1,560	1,690	2,910	3,020	2,360	2,295	0,5403
<b>GP9</b>	<b>0,060</b>	<b>0,080</b>	<b>0,160</b>	<b>0,200</b>	<b>0,100</b>	<b>0,110</b>	<b>0,0001</b>
GP10	2,590	2,510	7,050	7,910	4,880	4,935	0,586
<b>GP11</b>	<b>0,400</b>	<b>0,550</b>	<b>1,120</b>	<b>1,330</b>	<b>0,690</b>	<b>0,840</b>	<b>0,0001</b>
GP12	1,260	1,260	2,180	2,190	1,630	1,735	0,1925
GP13	0,230	0,250	0,790	0,730	0,480	0,485	0,9432
GP14	13,430	13,320	19,140	18,370	16,000	16,010	0,7065
<b>GP15</b>	<b>0,300</b>	<b>0,330</b>	<b>0,570</b>	<b>0,740</b>	<b>0,390</b>	<b>0,430</b>	<b>0,0001</b>
GP16	4,390	4,380	8,080	7,770	5,990	6,135	0,2916
<b>GP17</b>	<b>0,690</b>	<b>0,980</b>	<b>2,540</b>	<b>2,720</b>	<b>1,390</b>	<b>1,680</b>	<b>0,0001</b>
GP18	1,900	2,480	5,120	5,050	3,640	3,620	0,6971
GP19	0,760	0,780	1,400	1,230	0,970	0,980	0,4034
GP20	19,450	20,260	32,150	28,740	23,650	24,100	0,6204
GP21	0,480	0,510	0,820	0,770	0,590	0,620	0,0353
GP22	2,680	2,480	6,760	5,420	3,510	3,570	0,6662
GP23	0,390	0,720	2,320	2,440	1,150	1,290	0,0043
GP24	1,020	1,300	3,900	3,800	2,140	2,175	0,7868
GP25	1,130	1,240	3,280	3,070	1,790	1,815	0,2825
GP26	0,500	0,460	1,900	1,830	0,980	0,970	0,8852
GP27	0,360	0,400	1,160	1,170	0,610	0,640	0,6139
GP28	0,140	0,120	0,380	0,330	0,210	0,200	0,4834
GP29	2,200	2,970	7,740	6,470	3,790	4,110	0,6543
GP30	0,180	0,230	0,710	0,720	0,390	0,390	0,6648
GP31	0,550	0,630	2,220	1,720	0,960	1,010	0,5164
GP32	1,110	0,960	4,490	3,840	2,170	2,125	0,7011
GP33	0,200	0,240	0,610	0,550	0,350	0,340	0,8707
GP34	0,150	0,160	0,540	0,530	0,290	0,295	0,6982
GP35	0,350	0,350	0,930	0,900	0,550	0,545	0,8192
GP36	0,150	0,240	0,980	0,760	0,410	0,410	0,6835
GP37	0,450	0,480	1,540	1,300	0,810	0,790	0,5948
GP38	0,300	0,250	1,340	1,100	0,590	0,585	0,4308
<b>M: muški ispitanici</b>			<b>F: ženski ispitanici</b>			<b>P: Mann-Whitney test</b>	

Rezultati svih ispitanika podijeljeni su u dvije skupine prema spolu nakon čega je za svaku glikansku skupinu neparametrijskim statističkim Mann-Whitney testom napravljena usporedba kako bi se ustanovilo postoje li značajne razlike između spolova za tu glikansku skupinu. Dobiveni podaci za svaki GP vidljivi su u tablici 10. S obzirom na veliki broj testova koji je proveden u ovom istraživanju kao razinu signifikantnosti za Mann-Whitney test odabrana je vrijednost koja odgovara uobičajenoj vrijednosti 0,05 podijeljenoj s brojem testova koji je izveden (38) što daje 0,0013. One skupine glikana u kojima je testom izračunata P vrijednost bila manja od 0,0013 smatraju se statistički značajno različitim između spolova.

Prema podacima u tablici 10 i odabranoj razini signifikantnosti vidljivo je da je ustanovljena značajna razlika između spolova za glikanske skupine GP9, GP11, GP15 i GP17. Grafički prikaz uspoređivanih skupina koje se značajno razlikuju vidljiv je na slici 3.



Slika 3. Prikaz rezultata usporedbe glikanskih skupina svih ispitanika, koje se statistički značajno razlikuju

Na prikazu je vidljivo da su za sve glikanske skupine koje se značajno razlikuju, srednje vrijednosti udjela površine ispod krivulja pojedinih glikanskih skupina veći kod ženskih ispitanika.

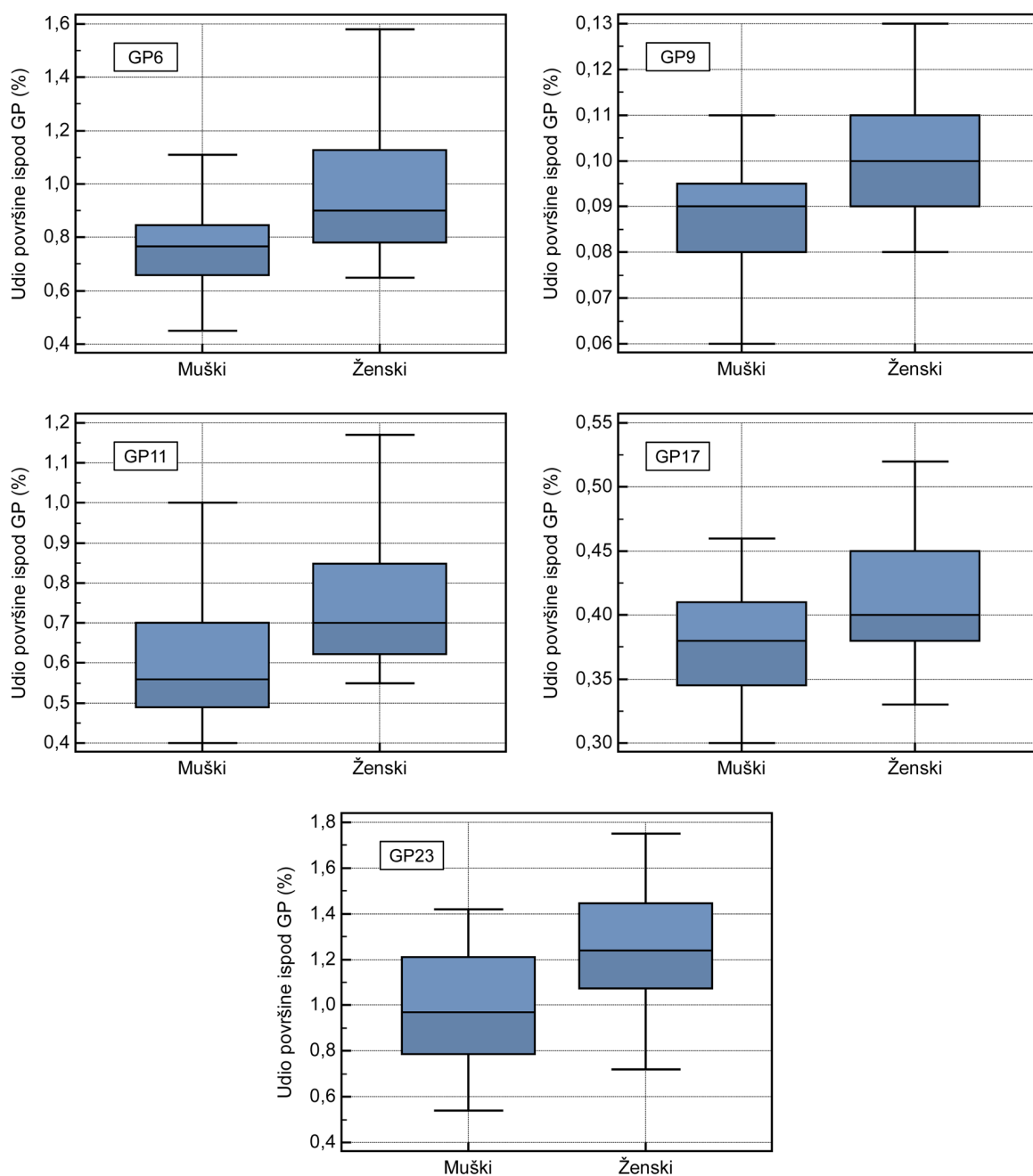


#### 4.2.2. Usporedba kod ispitanika mlađih od 10 godina

Tablica 11. Rezultati usporedbe glikanskih skupina prema spolu kod ispitanika mlađih od 10 godina

Skupina	Minimum		Maksimum		Medijan		P vrijednost
	M	F	M	F	M	F	
GP1	1,810	2,090	8,970	7,620	4,150	4,120	0,7869
GP2	1,210	1,300	2,390	2,610	1,745	1,810	0,0754
GP3	0,020	0,030	0,070	0,070	0,040	0,050	0,1981
GP4	1,680	2,200	6,360	6,710	4,150	4,230	0,8382
GP5	0,560	0,810	2,640	2,710	1,435	1,450	0,9808
<b>GP6</b>	<b>0,450</b>	<b>0,650</b>	<b>1,110</b>	<b>1,580</b>	<b>0,765</b>	<b>0,900</b>	<b>0,0005</b>
GP7	0,800	0,850	1,280	1,440	0,935	1,060	0,0027
GP8	1,560	1,690	2,830	2,760	2,345	2,300	0,6523
<b>GP9</b>	<b>0,060</b>	<b>0,080</b>	<b>0,110</b>	<b>0,130</b>	<b>0,090</b>	<b>0,100</b>	<b>0,0007</b>
GP10	2,590	2,980	6,260	6,660	4,660	4,520	0,9378
<b>GP11</b>	<b>0,400</b>	<b>0,550</b>	<b>1,000</b>	<b>1,170</b>	<b>0,560</b>	<b>0,700</b>	<b>0,0002</b>
GP12	1,350	1,330	2,180	2,130	1,715	1,760	0,4004
GP13	0,230	0,250	0,760	0,650	0,410	0,460	0,3014
GP14	13,750	13,320	19,140	18,370	16,165	16,040	0,9330
GP15	0,300	0,330	0,460	0,520	0,380	0,400	0,0034
GP16	4,390	4,410	7,700	7,770	5,700	6,010	0,4748
<b>GP17</b>	<b>0,750</b>	<b>0,980</b>	<b>2,010</b>	<b>2,590</b>	<b>1,105</b>	<b>1,410</b>	<b>0,0001</b>
GP18	2,960	2,900	5,120	5,050	3,860	3,770	0,9139
GP19	0,830	0,820	1,190	1,230	0,965	0,970	0,5359
GP20	20,780	20,520	32,150	28,740	24,005	24,330	0,9713
GP21	0,510	0,510	0,770	0,720	0,580	0,610	0,0206
GP22	2,680	2,480	5,060	4,900	3,310	3,500	0,9904
<b>GP23</b>	<b>0,540</b>	<b>0,720</b>	<b>1,420</b>	<b>1,750</b>	<b>0,970</b>	<b>1,240</b>	<b>0,0006</b>
GP24	1,760	1,670	3,900	3,800	2,430	2,220	0,0585
GP25	1,460	1,390	3,280	3,070	1,960	1,840	0,2160
GP26	0,560	0,460	1,780	1,800	0,955	1,040	0,3904
GP27	0,480	0,520	1,120	1,170	0,735	0,680	0,1010
GP28	0,160	0,150	0,380	0,310	0,210	0,220	0,5382
GP29	3,040	3,170	7,740	6,470	4,740	4,210	0,0546
GP30	0,260	0,270	0,700	0,720	0,480	0,410	0,0868
GP31	0,750	0,660	2,220	1,490	1,060	1,010	0,4140
GP32	1,350	1,350	4,490	3,820	2,205	2,180	0,7639
GP33	0,260	0,260	0,610	0,550	0,390	0,360	0,1509
GP34	0,200	0,200	0,510	0,470	0,295	0,310	0,7228
GP35	0,430	0,390	0,930	0,900	0,575	0,580	0,6697
GP36	0,290	0,290	0,980	0,760	0,530	0,460	0,2204
GP37	0,590	0,520	1,540	1,300	0,870	0,870	0,4140
GP38	0,380	0,320	1,340	1,100	0,580	0,600	0,7639
<b>M: muški ispitanici</b>		<b>F: ženski ispitanici</b>		<b>P: Mann-Whitney test</b>			

Nakon usporedbe rezultata analize svih ispitanika s obzirom na spol, učinjena je usporedba između spolova samo kod pacijenata mlađih od 10 godina. Cilj ovakve analize bio je ispitivanje prisutnih razlika prije nastupa puberteta u kojem se javljaju značajne hormonske promjene u organizmu. U ovom dijelu istraživanja sudjelovalo je 69 od originalnih 153 pacijenta, 36 muška i 33 ženska pacijenta. Podaci su obrađeni jednako kao u prethodnom dijelu, pomoću Mann-Whitney testa s jednakom razinom signifikantnosti od 0,0013. Iz podataka u tablici 11 moguće je zaključiti da su skupine GP6, GP9, GP11, GP17 i GP23 one kod kojih je ustanovljeno značajno razlikovanje između spolova, a grafički prikazi vidljivi su na slici 4.



Slika 4. Prikaz rezultata usporedbe glikanskih skupina ispitanika mlađih od 10 godina, koje se statistički značajno razlikuju

#### 4.2.3. Usporedba kod ispitanika starijih od 11 odnosno 12 godina

Tablica 12. Rezultati usporedbe glikanskih skupina prema spolu kod ženskih ispitanika starijih od 11 i muških ispitanika starijih od 12 godina

Skupina	Minimum		Maksimum		Medijan		P vrijednost
	M	F	M	F	M	F	
GP1	2,450	1,810	6,820	7,310	4,865	3,950	0,0192
GP2	1,510	1,220	2,470	2,780	1,910	1,880	0,7528
GP3	0,040	0,040	0,120	0,110	0,055	0,060	0,1067
GP4	2,750	2,070	7,790	6,010	4,655	4,440	0,2564
GP5	1,010	1,010	3,180	2,640	1,980	1,960	0,2849
GP6	0,520	0,650	1,560	1,630	1,025	1,060	0,8904
GP7	0,790	0,840	1,340	1,490	1,075	1,120	0,2454
GP8	1,670	1,900	2,900	3,020	2,355	2,330	0,6366
GP9	0,080	0,090	0,140	0,200	0,100	0,110	0,0244
GP10	3,590	2,510	7,050	7,910	5,020	5,040	0,2675
GP11	0,400	0,550	1,120	1,330	0,840	0,950	0,0105
GP12	1,260	1,260	1,940	2,190	1,570	1,660	0,3973
GP13	0,280	0,270	0,790	0,730	0,560	0,520	0,4544
GP14	13,430	14,000	18,770	18,040	15,890	15,900	0,8082
GP15	0,330	0,350	0,570	0,740	0,400	0,440	0,0277
GP16	4,550	4,380	8,010	7,700	6,230	6,400	0,1873
GP17	0,690	1,000	2,540	2,720	1,685	1,870	0,0314
GP18	1,900	2,480	4,600	4,260	3,395	3,370	0,5288
GP19	0,760	0,780	1,400	1,220	0,985	0,980	0,9948
GP20	19,450	20,260	29,390	26,480	23,720	23,910	0,4273
GP21	0,480	0,520	0,820	0,770	0,600	0,630	0,3823
GP22	2,700	2,480	6,760	4,820	3,700	3,730	0,9529
GP23	0,390	0,900	2,320	2,440	1,310	1,370	0,6366
GP24	1,020	1,300	2,660	2,730	1,855	2,050	0,0447
GP25	1,130	1,240	2,180	2,620	1,575	1,780	0,0051
GP26	0,500	0,460	1,900	1,830	1,015	0,970	0,4427
GP27	0,360	0,400	0,770	0,800	0,530	0,590	0,0482
GP28	0,140	0,120	0,280	0,280	0,200	0,190	0,2336
GP29	2,200	2,970	5,150	5,190	3,440	3,670	0,0364
GP30	0,180	0,230	0,530	0,580	0,330	0,370	0,0796
GP31	0,550	0,660	1,750	1,720	0,930	0,990	0,1138
GP32	1,110	0,960	4,050	3,840	2,210	2,110	0,6698
GP33	0,200	0,240	0,500	0,420	0,310	0,330	0,2557
GP34	0,150	0,160	0,490	0,530	0,290	0,270	0,7577
GP35	0,370	0,350	0,900	0,690	0,530	0,530	0,7427
GP36	0,150	0,240	0,640	0,540	0,345	0,350	0,7879
GP37	0,510	0,480	1,340	1,030	0,730	0,750	0,9738
GP38	0,300	0,250	1,160	0,980	0,590	0,570	0,3029

**M:** muški ispitanici      **F:** ženski ispitanici      **P:** Mann-Whitney test

Usporedbom pacijenata mlađih od 10 godina ispitane su razlike u glikozilaciji prije nastupa puberteta odnosno hormonskih promjena koje se u njemu javljaju. Za usporedbu pacijenata kod kojih je vjerojatnije da je pubertet već započeo, izdvojeni su ženski ispitanici stariji od 11 godina (njih 33) i muški ispitanici stariji od 12 godina (32 ispitanika). Promatranjem podataka u tablici 12 vidljivo je da P vrijednost dobivena Mann-Whitney testom niti kod jedne glikanske skupine ne zadovoljava kriterij statistički značajnog razlikovanja od 0,0013.

#### 4.2.4. Usporedba zastupljenosti karakteristika glikana u glikanskom profilu

Glikane je osim prema kromatografskim skupinama moguće podijeliti i prema strukturnim osobinama koje ih obilježavaju. U ovom je istraživanju uspostavljeno 5 skupina glikanskih osobina koje su uspoređene između spolova: sijalinizacija, fukozilacija, agalaktozilacija, mono-, tri- i tetragalaktozilacija i digalaktozilacija kao zasebna skupina. Digalaktozilacija je odvojena od ostalih galaktozilacija jer je najzastupljenija među njima i u nekim istraživanjima je ustanovljeno kako se različito mijenja s dobi kod dječje populacije u odnosu na druge galaktozilacije (Pučić i sur., 2012).

Tablica 13. Usporedba karakteristika glikana kod ispitanika mlađih od 10 godina

Karakteristika glikana	Muški		Ženski		P vrijednost
	M	IQR	M	IQR	
Sijalinizacija	77,76	5,24	76,31	4,97	0,418
Fukozilacija	32,41	7,50	33,96	5,74	0,358
Agalaktozilacija	7,73	1,96	8,18	2,16	0,340
Mono-, tri- i tetragalaktozilacija	27,22	3,10	26,33	2,27	0,156
Digalaktozilacija	64,59	3,20	64,99	2,77	0,261
<b>M:</b> medijan <b>IQR:</b> interkvartilni raspon <b>P:</b> Mann-Whitney test					

Tablica 14. Usporedba karakteristika glikana kod ispitanika starijih od 11 (ženski) odnosno 12 (muški) godina

Karakteristika glikana	Muški		Ženski		P vrijednost
	M	IQR	M	IQR	
Sijalinizacija	74,84	5,04	75,59	4,24	0,471
Fukozilacija	37,44	7,42	37,47	5,07	0,646
Agalaktozilacija	8,89	1,09	7,99	2,21	<b>0,025</b>
Mono-, tri- i tetragalaktozilacija	25,01	2,74	25,84	2,21	0,689
Digalaktozilacija	66,03	2,44	66,01	2,90	0,479
<b>M:</b> medijan <b>IQR:</b> interkvartilni raspon <b>P:</b> Mann-Whitney test					

Za usporedbu karakteristika korišten je neparametrijski Mann-Whitney test nakon zbrajanja vrijednosti GP-ova u kojima je prisutna karakteristika glikana koja se ispituje. Za sijalinizaciju promatrani su GP12-GP18 i GP20-GP38; za fukozilaciju GP1, GP2, GP4-GP6, GP10, GP11, GP13, GP16, GP17, GP22, GP23, GP28, GP30, GP31, GP34 i GP38; za agalaktozilaciju GP1, GP2, GP7 i GP19; za mono-, tri- i tetragalaktozilaciju GP3-GP6, GP12, GP13, GP24-GP38, dok su za digalaktozilaciju promatrani GP8-GP11, GP14-GP18, GP20-GP23. Za razinu signifikantnosti odabrana je vrijednost od 0,01 (0,05 / broj ispitivanih karakteristika). U tablicama 13 i 14 prikazane su usporedbe strukturnih karakteristika glikana između spolova za mlađu, predpubertetsku skupinu ispitanika kao i za stariju skupinu. Dobiveni podaci ne ukazuju na statistički značajnu razliku između spolova niti za jednu glikansku karakteristiku. Najniža P vrijednost koja se ujedno i znatnije razlikuje od ostalih P vrijednosti dobivena je pri usporedbi agalaktoziliranih glikana između ispitanika starijih od 11 odnosno 12 godina.

## 5. RASPRAVA

Različito u glikanskim profilima između spolova već je ranije utvrđena (Ercan i sur., 2017; Krištić i sur., 2014; Pučić i sur., 2012; Ding i sur., 2011; Knežević i sur., 2009), a usporedbom svih pacijenata i u ovom istraživanju različito između spolova je potvrđeno. Spolne razlike u glikozilaciji znatno manje su izražene u dječjoj nego u odrasloj populaciji, što objašnjava relativno mali broj GP-ova kod kojih je ustanovljena razlika (Pučić i sur., 2012). Različito između glikanskih profila među spolovima uglavnom se pripisuju hormonskim utjecajima, na što upućuju značajne promjene u glikanskim profilima koje se javljaju oko puberteta kao i menopauze i trudnoće kod ženske populacije, kada su i hormonske promjene u organizmu izraženije (Ercan i sur., 2017; Pučić i sur., 2012). Kako su pacijenti kod kojih se javlja šećerna bolest tipa 1 uglavnom dječje i mladenačke dobi, u ovom istraživanju učinjena je i usporedba glikozilacije između spolova kod predpubertetske populacije, odnosno kod populacije kod koje bi pubertet već mogao nastupiti. Dobiveni podaci upućuju na veće razlike kod predpubertetske populacije, dok kod starije populacije statistički značajna razlika nije utvrđena. Ova je spoznaja interesantna jer je u suprotnosti s opažanjima zabilježenim u drugim istraživanjima, gdje se dječje populacije slabo razlikuju po spolu sve dok pubertet ne nastupi (Pučić i sur., 2012). S obzirom da se u ovom istraživanju radi isključivo o ispitanicima kod kojih je prisutna šećerna bolest tipa 1, moguće je da baš ona ima određenu ulogu u drugačijoj dinamici razlika između spolova, u odnosu na onu zabilježenu u drugim istraživanjima gdje su korišteni zdravi ispitanici.

Pojedine zajedničke strukturne osobine različitih glikana poput sijalinizacije, fukozilacije, grananja i slično, posljedica su djelovanja istih enzima odnosno skupina enzima koji sudjeluju u procesu glikozilacije, pa prema tome i zastupljenost određenih karakteristika u glikanskom profilu posljedica je razine eksprimiranosti tih enzima. Usporedbom općenitih karakteristika glikanskih struktura prisutnih u plazmatskim profilima ispitanika predpubertetske dobi, nije ustanovljena statistički značajna razlika između muških i ženskih ispitanika, što je u skladu s prethodnim istraživanjima (Pučić i sur., 2012). Prilikom usporedbe strukturnih obilježja glikana kod ispitanika starijih od 11 odnosno 12 godina, također nije ustanovljena statistički značajna razlika niti u jednoj karakteristici. Promatranjem dobivenih P vrijednosti u tablici 14 vidljivo je da, iako ne statistički značajna, P vrijednost za agalaktozilaciju znatno je niža od dobivenih vrijednosti za ostale glikanske osobine. Ovakvo opažanje također je u skladu s prethodnim istraživanjem na dječjoj populaciji (Pučić i sur.,

2012), gdje je kod ispitanika između 11 i 14 godina ustanovljena statistički značajna razlika između spolova samo u agalaktozilaciji.

Prilikom određivanja glikanskih profila treba uzeti u obzir da dobiveni rezultati ne reflektiraju isključivo „intenzitet“ glikozilacije u nekom organizmu nego isto tako ovise i o razini eksprimiranosti pojedinih proteina na koje su glikani vezani. Naknadna istraživanja uz proteinske profile plazme odnosno istraživanja glikozilacije na konkretnim proteinima, poput onih koja se provode na molekulama IgG-a, mogu dati detaljniji uvid u pojedinosti glikozilacije u ispitivanim stanjima.

Iako pretraživanje cjelokupnih glikanskih profila plazme još uvijek nije primjenjivo za dijagnostičke svrhe u kliničkim laboratorijima, vidljivo je da istraživanja napreduju prema trenutku kada će obilje informacija, još uvijek skriveno u glikoproteinima i njihovim glikanima, doprinijeti ostvarenju personaliziranije i kvalitetnije brige za pacijenta (Connelly i sur., 2016).

## 6. ZAKLJUČAK

Analiziranjem ukupnih glikanskih profila plazme kod pacijenata sa šećernom bolešću tipa 1, ustanovljeno je postojanje razlike u glikozilaciji među spolovima u četiri glikanske skupine.

Glikozilacija prema spolu, osim za sve ispitanike, uspoređena je i zasebno za ispitanike predpubertetske, kao i one nešto starije živote dobi. Utvrđeni rezultati suprotni su zapažanjima ranije opisanim u literaturi, jer su veće razlike prisutne kod mlađe populacije, dok kod starije populacije nije ustanovljena statistički značajna razlika. S obzirom da se radi o pacijentima koji boluju od šećerne bolesti tipa 1, u sljedećim istraživanjima potrebno je ispitati mogućnost njezinog utjecaja na zabilježene rezultate.

Rezultati dobiveni usporedbom zastupljenosti pojedinih glikanskih osobina u plazmatskim profilima ukazuju na odsutnost statistički značajne razlike među spolovima, kako kod mlađe tako i kod starije skupine ispitanika. Agalaktozilacija kod starije skupine jedina je od ispitivanih glikanskih karakteristika kod koje je izračunata P vrijednost bila znatnije niža od ostalih, odnosno relativno blizu granice prihvatanja statističke značajnosti.

Pretraživanje glikanskih profila obećavajući je temelj za razvoj novih i unaprjeđenje postojećih biomarkera različitih bolesti pa tako i šećerne bolesti tipa 1. Spolne razlike u glikozilaciji kod pacijenata s dijabetesom tipa 1, potvrđene ovim istraživanjem, svakako treba uzeti u obzir prilikom razvoja novih biomarkera. U idealnom slučaju potrebno je tražiti promjene specifične za šećernu bolest tipa 1, kod kojih ne postoji razlikovanje u spolu ili alternativno prilagoditi pristupe posebno ženskoj, a posebno muškoj populaciji.



## 7. LITERATURA

- Connelly M A, Gruppen E G, Otvos J D, Dullaart R P F. Inflammatory glycoproteins in cardiometabolic disorders, autoimmune diseases and cancer. *Clin Chim Acta*, 2016, 459, 177–186. doi: 10.1016/j.cca.2016.06.012.
- Ding N, Sun H N, Sun W, Qu Y, Liu X, Yao Y i sur. Human serum N-glycan profiles are age and sex dependent. *Age Ageing*, 2011, 40, 568–575. doi: 10.1093/ageing/afr084.
- Dube D H, Bertozzi, C R. Glycans in cancer and inflammation - potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4, 477–488. doi: 10.1038/nrd1751.
- Ercan A, Kohrt W M, Cui J, Deane K D, Pezer M, Yu E W i sur. Estrogens regulate glycosylation of IgG in women and men. *JCI Insight*, 2017, 2, 1–9. doi: 10.1172/jci.insight.89703.
- Freeze H H. Genetic defects in the human glycome. *Nat Rev Genet*, 2006, 7, 537–551. doi: 10.1038/nrg1894.
- Fuster M M, Esko J D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5, 526–542. doi: 10.1038/nrc1649.
- Gagneux P, Varki A. Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology*, 1999, 9, 747–755.
- Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers*, 2008, 25, 267–78.
- Huffman J E, Pučić-Baković M, Klarić L, Hennig R, Selman M H J, Vučković F i sur. Comparative performance of four methods for high-throughput glycosylation analysis of immunoglobulin G in genetic and epidemiological research. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13, 1598–1610. doi: 10.1074/mcp.M113.037465.
- Kerner W, Brückel J, German Diabetes Association. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2014, 122, 384–386. doi: 10.1055/s-0034-1366278.
- Knezević A, Polasek O, Gornik O, Rudan I, Campbell H, Hayward C i sur. Variability, heritability and environmental determinants of human plasma N-glycome. *J Proteome Res*, 2009, 8, 694–701. doi: 10.1021/pr800737u.
- Krištić J, Vučković F, Menni C, Klarić L, Keser T, Beceheli I i sur. Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2014, 69, 779–789. doi: 10.1093/gerona/glt190.
- Lauc G, Krištić J, Zoldoš V. Glycans - the third revolution in evolution. *Front Genet*, 2014, 5, 1–7. doi: 10.3389/fgene.2014.00145.
- Lauc G, Pezer M, Rudan I, Campbell H. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1860, 1574–1582. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.10.016.
- Lauc G, Vojta A, Zoldoš V. Epigenetic regulation of glycosylation is the quantum mechanics of biology. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840, 65–70. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.08.017.
- Lauc G, Zoldoš V. Protein glycosylation-an evolutionary crossroad between genes and environment. *Mol Biosyst*, 2010, 6, 2373–9. doi: 10.1039/c0mb00067a.

- Lebrilla C B, An H J. The prospects of glycan biomarkers for the diagnosis of diseases. *Mol Biosyst*, 2009, 5, 17–20. doi: 10.1039/b811781k.
- Marek K W, Vijay I K, Marth J D. A recessive deletion in the GlcNAc-1-phosphotransferase gene results in peri-implantation embryonic lethality. *Glycobiology*, 1999, 9, 1263–71.
- Pučić M, Mužinić A, Novokmet M, Škledar M, Pivac N, Lauc G, Gornik O. Changes in plasma and IgG N-glycome during childhood and adolescence. *Glycobiology*, 2012, 22, 975–982. doi: 10.1093/glycob/cws062.
- Štraus B, Petlevski R. Ugljikohidrati. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 111–118.
- Taniguchi N, Kizuka Y. Glycans and Cancer. U: Advances in cancer research. Drake R, Ball L, urednici, Cambridge, Academic Press, 2015, str. 11–51. doi: 10.1016/bs.acr.2014.11.001.
- Varki A, Cummings R D, Esko J D, Freeze H H, Stanley P, Bertozzi C R i sur. Essentials of Glycobiology. 2. izdanje, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009, ISBN: 9780879697709.
- Zauner G, Deelder A M, Wuhrer M. Recent advances in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) for structural glycomics. *Electrophoresis*, 2011, 32, 3456–3466. doi: 10.1002/elps.201100247.

## 8. SAŽETAK / SUMMARY

### 8.1. Sažetak

Glikozilacija kao jedna od najčešćih i najsloženijih posttranslacijska modifikacija ima izniman utjecaj na konačnu funkciju modificiranog proteina, ali isto tako i sama je pod velikim utjecajem prisutnih fizioloških faktora. Šećerna bolest tipa 1 stanje je autoimunog narušavanja  $\beta$  - stanica Langerhansovih otočića ili samih molekula inzulina, čiji osnovni uzrok nije razjašnjen. U potrazi za objašnjenjem pozadine ove bolesti, odnosno u nastojanju pronalaska novih biomarkera koji bi na nju mogli ukazati, analiza glikozilacije ponudila se kao perspektivan pristup s obzirom na već ustanovljenu povezanost glikozilacije s različitim bolestima i patološkim stanjima, među kojima i s bolestima autoimune prirode.

U istraživanju su sudjelovala 153 pacijenta u dobi između 2 i 19 godina, oboljela od šećerne bolesti tipa 1, kojima je pomoću HILIC-UPLC metode napravljen glikanski profil plazme. Dobiveni podaci obrađeni su i statistički uspoređeni prema spolu pomoću Mann-Whitney testa za nezavisne uzorke.

U prvom dijelu istraživanja promatrane su pojedinačne glikanske skupine gdje je ustanovljena statistički značajna razlika za GP9, GP11, GP15 i GP17. Naknadno su ispitanici podijeljeni na dvije skupine, jednu mlađu od 10 godina i jednu stariju od 11 za ženske i 12 za muške ispitanike. Razlike među spolovima utvrđene su za GP6, GP9, GP11, GP17 i GP23 kod mlađe skupine, dok kod starije skupine nije ustanovljena statistički značajna razlika. U drugom dijelu istraživanja usporedbom zastupljenosti pojedinih glikanskih osobina u profilima pacijenata nije ustanovljena statistički značajna razlika niti u jednoj kategoriji, kako kod mlađe tako ni kod starije skupine ispitanika.

Dobivenim rezultatima potvrđena je prisutnost spolnih razlika u glikanskim profilima plazme pacijenata oboljelih od šećerne bolesti tipa 1, što ukazuje da razlike treba uzeti u obzir prilikom razvoja novih biomarkera i dijagnostičkih testova, odnosno eventualnih novih pristupa u terapiji.

## 8.2. Summary

Glycosylation, as one of the most common and complex posttranslational modifications, has a profound effect on the final function of a modified protein but is also itself greatly affected by the physiological factors. Diabetes mellitus type 1 is a state where normal function of the beta cells of the pancreatic islets or the insulin molecules is compromised by an autoimmune response, even though the underlying cause is not yet known. In an effort to elucidate the cause of this disease and also to find new biomarkers that could possibly point to its development and presence, glycan analysis presented itself as a promising approach given the fact that glycosylation had already been connected to different diseases, some of which are also autoimmune.

Plasma samples of 153 type 1 diabetes patients, aged between 2 and 19 years, were analyzed using a HILIC-UPLC method in a way that glycan profiles were created for every patient. Obtained data was then sorted and statistically analyzed by comparing glycosylation according to gender, using the Mann-Whitney test for independent samples.

Individual glycan peaks were compared first, and analysis showed statistically significant difference between genders for GP9, GP11, GP15 and GP17. After sorting patients into two groups, one with patients younger than 10 years and another with patients older than 11 for females and 12 for males, differences were analyzed again. A younger group showed statistically significant difference in GP6, GP9, GP11, GP17 and GP23, but the older group didn't show any. Prevalences of several glycan characteristics in glycan profiles were also compared between genders, but statistically significant difference was not found for any of the analyzed characteristics in a younger group as well as in the older one.

Results obtained in this study show that there is a gender difference between glycan profiles of type 1 diabetes patients. Those differences should be accounted for in development of new glycan-based diagnostic tests or therapeutics.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## Spolne razlike N-glikozilacije plazmatskih proteina kod pacijenata dječje dobi oboljelih od šećerne bolesti tipa 1

Marko Tijardović

### SAŽETAK

Glikozilacija kao jedna od najčešćih i najsloženijih posttranslacijska modifikacija ima izniman utjecaj na konačnu funkciju modificiranog proteina, ali isto tako i sama je pod velikim utjecajem prisutnih fizioloških faktora. Šećerna bolest tipa 1 stanje je autoimunog narušavanja  $\beta$  - stanica Langerhansovih otočića ili samih molekula inzulina, čiji osnovni uzrok nije razjašnjen. U potrazi za objašnjenjem pozadine ove bolesti, odnosno u nastojanju pronalaska novih biomarkera koji bi na nju mogli ukazati, analiza glikozilacije ponudila se kao perspektivan pristup s obzirom na već ustanovljenu povezanost glikozilacije s različitim bolestima i patološkim stanjima, među kojima i s bolestima autoimune prirode.

U istraživanju su sudjelovala 153 pacijenta u dobi između 2 i 19 godina, oboljela od šećerne bolesti tipa 1, kojima je pomoću HILIC-UPLC metode napravljen glikanski profil plazme. Dobiveni podaci obrađeni su i statistički uspoređeni prema spolu pomoću Mann-Whitney testa za nezavisne uzorke.

U prvom dijelu istraživanja promatrane su pojedinačne glikanske skupine gdje je ustanovljena statistički značajna razlika za GP9, GP11, GP15 i GP17. Naknadno su ispitanici podijeljeni na dvije skupine, jednu mlađu od 10 godina i jednu stariju od 11 za ženske i 12 za muške ispitanike. Razlike među spolovima utvrđene su za GP6, GP9, GP11, GP17 i GP23 kod mlađe skupine, dok kod starije skupine nije ustanovljena statistički značajna razlika. U drugom dijelu istraživanja usporedbom zastupljenosti pojedinih glikanskih osobina u profilima pacijenata nije ustanovljena statistički značajna razlika niti u jednoj kategoriji, kako kod mlađe tako ni kod starije skupine ispitanika.

Dobivenim rezultatima potvrđena je prisutnost spolnih razlika u glikanskim profilima plazme pacijenata oboljelih od šećerne bolesti tipa 1, što ukazuje da razlike treba uzeti u obzir prilikom razvoja novih biomarkera i dijagnostičkih testova, odnosno eventualnih novih pristupa u terapiji.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 32 stranice, 4 grafička prikaza, 14 tablica i 23 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: glikozilacija, N-glikani, plazma, šećerna bolest, HILIC-UPLC

Mentor: **Dr. sc. Olga Gornik**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Olga Gornik**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Nada Vrkić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2017.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical biochemistry  
Department of Biochemistry and Molecular Biology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Gender differences in N-glycosylation of plasma proteins in children with type 1 diabetes mellitus

Marko Tijardović

#### SUMMARY

Glycosylation, as one of the most common and complex posttranslational modifications, has a profound effect on the final function of a modified protein but is also itself greatly affected by the physiological factors. Diabetes mellitus type 1 is a state where normal function of the beta cells of the pancreatic islets or the insulin molecules is compromised by an autoimmune response, even though the underlying cause is not yet known. In an effort to elucidate the cause of this disease and also to find new biomarkers that could possibly point to its development and presence, glycan analysis presented itself as a promising approach given the fact that glycosylation had already been connected to different diseases, some of which are also autoimmune.

Plasma samples of 153 type 1 diabetes patients, aged between 2 and 19 years, were analyzed using a HILIC-UPLC method in a way that glycan profiles were created for every patient. Obtained data was then sorted and statistically analyzed by comparing glycosylation according to gender, using the Mann-Whitney test for independent samples. Individual glycan peaks were compared first, and analysis showed statistically significant difference between genders for GP9, GP11, GP15 and GP17. After sorting patients into two groups, one with patients younger than 10 years and another with patients older than 11 for females and 12 for males, differences were analyzed again. A younger group showed statistically significant difference in GP6, GP9, GP11, GP17 and GP23, but the older group didn't show any. Prevalences of several glycan characteristics in glycan profiles were also compared between genders, but statistically significant difference was not found for any of the analyzed characteristics in a younger group as well as in the older one.

Results obtained in this study show that there is a gender difference between glycan profiles of type 1 diabetes patients. Those differences should be accounted for in development of new glycan-based diagnostic tests or therapeutics.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 32 pages, 4 figures, 14 tables and 23 references. Original is in Croatian language.

Keywords: glycosylation, N-glycans, plasma, diabetes mellitus, HILIC-UPLC

Mentor: **Olga Gornik, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Olga Gornik, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Nada Vrkić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2017.