

# Promjene N-glikanskih obrazaca imunoglobulina G i glikoproteina plazme uslijed ugradnje želučane premosnice

---

Orehovački, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:474739>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Helena Orehovački**

**Promjene N-glikanskih obrazaca  
imunoglobulina G i glikoproteina plazme  
uslijed ugradnje želučane premosnice**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom i izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Gordana Lauca i suvoditeljstvom dr. sc. Tamare Pavić.

Puno hvala mentoru prof. dr. sc. Gordanu Laucu na pruženoj prilici, ukazanom povjerenju, danoj podršci i usmjeravanju u fascinantan svijet znanosti.

Posebice zahvaljujem dr. sc. Tamari Pavić na silnoj pomoći, uloženom trudu, svim savjetima i smjernicama te na doprinosu u izradi ovog, meni izuzetno značajnog, diplomskog rada. Hvala na strpljenju, ljubaznosti i ugodnoj radnoj atmosferi!

Veliko hvala svim mojim kolegama, prijateljima i obitelji koji su bili uz mene tijekom cijelog studija i bili podrška u najtežim trenucima. Bez vas ništa ne bi bilo moguće!

Najveću zahvalnost dugujem majci Vesni. Hvala ti od srca za svu pomoć, potporu i što nikad nisi prestala vjerovati u mene...

# Sadržaj

Popis kratica	1
1. UVOD	6
1.1. Glikani	6
1.2. Glikoproteini	7
1.3. Glikozilacija proteina	7
1.4. N-glikani	8
1.5. Uloga glikana u upalnim bolestima	10
1.5.1. Promjene plazmatskih koncentracija N-glikana u upalnim bolestima	10
1.6. Protutijela	12
1.6.1. Struktura i uloga imunoglobulina G	12
1.6.2. Glikozilacija imunoglobulina G	12
1.6.3. N-glikom imunoglobulina G	13
1.6.4. Genski uvjetovane promjene glikoma imunoglobulina G	15
1.6.5. Promjene glikoma imunoglobulina G neovisne o genomu	15
1.6.6. Modulacija efektorskih funkcija imunoglobulina G N-glikozilacijom	16
1.7. Analiza glikozilacije proteina	19
1.7.1. Analiza N- i O-glikozilacije proteina	19
1.7.2. Visokoprotlačna metoda analize N-glikana	21
1.7.3. Utjecaj obrade uzoraka na rezultate analize	23
1.7.4. Adsorpcija proteina na graničnu površinu uzorka i čvrste tvari	23
1.8. Pretilost	25
1.8.1. Pretilost i dijabetes tipa 2	25
1.8.2. Pretilost i kronična upala	26
1.8.3. Dijabetes tipa 2 i kronična upala	26
1.9. Barijatrija (kirurško liječenje pretilosti)	28
1.9.1. Barijatrijska kirurgija u kontroli pretilosti i dijabetesa tipa 2	29
1.9.2. Dugoročni učinci barijatrijskog zahvata	29
1.9.3. Utjecaj barijatrijskog zahvata na N-glikom	30
2. OBRAZLOŽENJE TEME	31
3. MATERIJALI I METODE	33
3.1. Ispitanici	33

3.2.	Materijali	34
3.2.1.	Standardne kemikalije	34
3.2.2.	Enzimi	34
3.2.3.	Otopine i puferi	35
3.2.4.	Laboratorijska oprema i potrošni materijal	36
3.3.	Metode	37
3.3.1.	Izolacija imunoglobulina G iz humane plazme	37
3.3.1.	Postupak ispitivanja „ <i>low-bind</i> “ pločica	38
3.3.2.	Deglikozilacija imunoglobulina G i glikoproteina plazme	38
3.3.3.	Fluorescentno obilježavanje N-glikana	39
3.3.4.	HILIC-UPLC analiza N-glikana imunoglobulina G i proteina plazme	39
3.3.5.	Analiza podataka	41
4.	REZULTATI	45
4.1.	Promjene N-glikozilacijskih obrazaca imunoglobulina G i plazmatskih glikoproteina	45
4.2.	Testiranje utjecaja korištenog potrošnog materijala u analizi glikozilacije imunoglobulina G	62
5.	RASPRAVA	65
5.1.	Utjecaj korištenog potrošnog materijala u analizi N-glikozilacije imunoglobulina G	65
5.2.	Promjene N-glikanskih obrazaca imunoglobulina G i glikoproteina plazme	66
5.2.1.	Promjene u N-glikomu imunoglobulina G	67
5.2.2.	Promjene u N-glikomu glikoproteina plazme	68
6.	ZAKLJUČCI	71
7.	LITERATURA	73
8.	SAŽETAK/SUMMARY	94

## Popis kratica

2-AB	2-aminobenzamid (eng. <i>2-aminobenzamide</i> )
ADCC	stanična citotoksičnost ovisna o protutijelu (eng. <i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> )
AntF	udio N-glikana koje sadrže antenarnu fukozu u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka (eng. <i>antennary fucosylation</i> )
Asn	aminokiselina asparagin
B	udio N-glikana s Glc-NAc vezanim $\beta$ 1,4-vezom za manozu koja se nalazi na mjestu račvanja dviju grana u osnovnoj glikanskoj strukturi u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka (eng. <i>bisecting</i> )
BMI	indeks tjelesne mase (eng. <i>body mass index</i> )
BPD	zaobilaženje žuči i gušterače (eng. <i>biliopancreatic diversion</i> )
CDC	citotoksičnost ovisna o komplementu (eng. <i>complement-dependent cytotoxicity</i> )
C <sub>H</sub>	konstantna regija teškog lanca imunoglobulina G
C <sub>L</sub>	konstantna regija lakog lanca imunoglobulina G
CoreF	udio sržno fukoziliranih struktura u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka (eng. <i>core fucosylation</i> )
CRP	C-reaktivni protein (eng. <i>C-reactive protein</i> )
CVD	kardiovaskularna bolest (eng. <i>cardiovascular disease</i> )
DIA	dijastolički tlak (eng. <i>diastolic pressure</i> )
DMSO	dimetil sulfoksid (eng. <i>dimethyl sulfoxide</i> )
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (eng. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
EtOH	etanol (eng. <i>ethanol</i> )

EVA	etilen-vinil acetat (eng. <i>ethylene-vinyl acetate</i> )
F	udio N-glikana sa sržnom fukozom povezanom $\alpha$ 1,6 glikozidnom vezom za GlcNAc u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka (eng. <i>fucosylation</i> )
Fab	fragment koji veže antigen (eng. <i>antigen-binding fragment</i> )
Fc	fragment koji kristalizira (eng. <i>crystalizable fragment</i> )
Fc $\gamma$ R	Fc-gama receptor
G0	udio agalaktoziliranih N-glikana u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka
G1	udio monogalaktoziliranih N-glikana u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka
G2	udio digalaktoziliranih N-glikana u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka
G3	udio trigalaktoziliranih N-glikana u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka
G4	udio tetragalaktoziliranih N-glikana u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka
GalNAc	N-acetilgalaktozamin
GlcNAc	N-acetilglukozamin
GP	glikanski (kromatografski) pik (eng. <i>glycan peak</i> )
GU	glukozne jedinice (eng. <i>glucose units</i> )
HB	udio tri- i tetraantenarnih struktura u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka (eng. <i>high branching</i> )
HC	teški lanac imunoglobulina G (eng. <i>heavy chain</i> )
HILIC	tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (eng. <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i> )

HM	udio oligomanoznih N-glikana u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka (eng. <i>high mannose</i> )
hsCRP	visoko osjetljivi C-reaktivni protein (eng. <i>high-sensitivity C-reactive protein</i> )
IB	„ <i>immunoglobuline-binding</i> “ serija uzoraka
IgA	imunoglobulin A
IgD	imunoglobulin D
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IGP	glikanski (kromatografski) pik imunoglobulina G (eng. <i>immunoglobuline glycan peak</i> )
IL-6	interleukin 6
IVIg	intravenski imunoglobulin (eng. <i>intravenous immunoglobulin</i> )
kg	kilogram
LAGB	podvezivanje želuca podesivom želučanom vrpcom (eng. <i>laparoscopic adjustable gastric banding</i> )
LC	laki lanac imunoglobulina G (eng. <i>light chain</i> )
LB	udio mono- i biantenarnih struktura u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka (eng. <i>low branching</i> )
MBL	lektin koji veže manozu (eng. <i>mannose binding lectin</i> )
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (eng. <i>messenger ribonucleic acid</i> )
m <sup>2</sup>	kvadratni metar
NIH	Nacionalni instituti za zdravlje (eng. <i>National Institutes of Health</i> )



PB	2 - pikolin boran (eng. <i>2-picoline borane</i> )
PBS	fosfatni pufer (eng. <i>phosphate buffered saline</i> )
PNGaza F	peptid-N-glikozidaza (eng. <i>peptide-N<sup>f</sup>-(N-acetyl-β-D-glucosaminyl) asparagine amidase F</i> )
RYGB	proksimalna Roux-en-Y želučana premosnica (eng. <i>Roux-en-Y gastric bypass</i> )
S	udio sijaliziranih N-glikana u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka
S0	udio asijaliziranih N-glikana u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka
S1	udio monosijaliziranih N-glikana u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka
S2	udio disijaliziranih N-glikana u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka
S3	udio trisijaliziranih N-glikana u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka
S4	udio tetrasijaliziranih N-glikana u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka
SDS	natrijev dodecil sulfat (eng. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
Ser	aminokiselina serin
SG	vertikalna gastroplastika (eng. <i>sleeve gastrectomy</i> )
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (eng. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
SYS	sistolčki tlak (eng. <i>systolic pressure</i> )
Thr	aminokiselina treonin
TNF-α	faktor nekroze tumora-alfa (eng. <i>tumor necrosis factor-alpha</i> )
TRIS	tris (hidroksimetil) aminometan (eng. <i>tris (hydroxymethyl) aminomethane</i> )
UPLC	tekućinska kromatografija ultra-visoke djelotvornosti (eng. <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> )
V <sub>H</sub>	varijabilna regija teškog lanca imunoglobulina G

V<sub>L</sub>                    varijabilna regija lakog lanca imunoglobulina G

WHO                    Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organisation*)

# 1. UVOD

Otkriće trodimenzionalne strukture deoksiribonukleinske kiseline (eng. *deoxyribonucleic acid*, DNA) 1953. godine smatra se temeljem molekularne biologije i ključnim događajem koji je, u konačnici, rezultirao objašnjenjem njene funkcije. Slijedovi nukleotida u DNA, nazvani genom, sadrže u sebi informaciju za sintezu polipeptidnih lanaca koji nizom posttranslacijskih modifikacija zauzimaju krajnju proteinsku strukturu (Cooper i Hausman, 2007). Otkrivanjem poremećaja u strukturi nukleinskih kiselina nastojala se objasniti genska pozadina mnogih bolesti. Cjelokupan proces nastanka proteina iz informacije koju nosi DNA strogo je kontroliran te uvjetuje život samog organizma (Kobata, 1998). Samim time, poremećaj na razini tog procesa u stanici većinom vodi do njene smrti. Način na koji će stanica umrijeti reguliraju signalne molekule, a ovisi i o staničnoj liniji te uvjetima u kojima se ona u tom trenutku nalazi (Lockshin i Zakeri, 2007). S obzirom na to da abnormalnosti koje se javljaju na razini signalnih putova u stanici ne dovode do njene smrti, upravo se one intenzivno počinju promatrati kao temeljni uzrok mnogih bolesti. Promjene u signalizaciji posljedica su strukturnih modifikacija makromolekula koje, između ostalog, uvjetuje glikozilacija, a mogu dovesti do poremećaja u prijenosu informacija. Shodno tome, promatra se uloga glikana u nastanku pojedinih bolesti (Kobata, 1998; Ohtsubo i Marth, 2006).

## 1.1. Glikani

Glikani su među jednim od najkompleksnijih bioloških molekula koje se mogu pronaći u prirodi, a sastoje se od mnoštva različito povezanih i razgranatih monosaharidnih jedinica (Varki i sur., 2015). Sve stanice i brojne makromolekule u prirodi sadrže kovalentno vezane glikane (Varki i sur., 2017). Kao jedna od četiri temeljne makromolekule u stanici (zajedno s nukleinskim kiselinama, proteinima i lipidima), glikani imaju vrlo važnu ulogu u nastanku funkcionalnih makromolekula, staničnoj adheziji, komunikaciji između stanica, vezanju liganda za receptor i posljedičnoj aktivaciji signalnih putova (Marth i Grewal, 2008; Ohtsubo i Marth, 2006). Svi glikani nekog organizma čine glikom (Schnaar, 2016). Unatoč ogromnoj raznolikosti glikanskih struktura, ljudski glikom većinom je sastavljen od devet različitih monosaharidnih jedinica koje međusobno povezuju enzimi specifičnim mehanizmima na evolucijski konzerviran način (Schnaar, 2016; Ohtsubo i Marth, 2006). Što se makromolekula tiče, glikani se najčešće povezuju s lipidima i proteinima tvoreći pritom strukture koje jednim imenom nazivamo glikokonjugatima (Varki i sur., 2017).

## 1.2. Glikoproteini

Gotovo svi citoplazmatski i membranski vezani proteini koje stvaraju stanice višestaničnih organizama sadrže glikanske strukture (Kobata, 1998), najčešće kovalentno vezane za serinske, treoninske ili asparaginske ostatke polipeptidnih lanaca. S obzirom na to da glikani nemaju svoj točan genski zapis poput nukleinskih kiselina i polipeptida, njihov sastav se razlikuje ovisno o ekspresiji i unutarstaničnoj lokalizaciji enzima koji sudjeluju u njihovoj biosintezi (glikoziltransferaza i glikozidaza), vremenu zadržavanja glikana u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu, dostupnosti mjesta na proteinu pogodnih za glikozilaciju te koncentraciji visokoenergetskih nukleotidnih donora monosaharida unutar stanice. Glikoforme određenog proteina uvelike ovise o brojnim faktorima koji proizlaze i iz same ekspresije gena i iz metabolizma koji se odvija unutar stanice. Glikozilacija uzrokuje promjenu karakteristika proteina na način da mu se mijenja topljivost, dostupnost antigenih dijelova unutar strukture, lokalizacija na membrani te mu služi kao svojevrsna zaštita od proteolize. Promjena u glikanskim strukturama na proteinu može biti posljedica nekih patofizioloških procesa koji se odvijaju u stanici koja ga proizvodi, što, u konačnici, dovodi do odstupanja od njegove normalne funkcije (Clerc i sur., 2015; Gornik i Lauc, 2008; Hart i Copeland, 2011; Higai i sur., 2005; Nage i Yamaguchi, 2012; Schachter, 1986; Varki i sur., 2017). Glikozilacija proteina razlikuje se od osobe do osobe, ali ono što je važno jest da je izuzetno stabilna kod zdravog pojedinca, a do njene značajnije promjene dolazi upravo kod narušavanja homeostaze organizma, bilo da se radi o patofiziološkim procesima ili promjenama u stilu života (Clerc i sur., 2015).

## 1.3. Glikozilacija proteina

Enzimatski proces nastanka glikozidne veze naziva se glikozilacijom i on je esencijalan za normalnu funkciju i život svake stanice. Glikozilacija se odvija u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu (Marth i Grewal, 2008). Glikozilacijom proteina nastaju N-glikani i O-glikani, ovisno o novonastaloj vezi između glikana i polipeptidne okosnice, te glikozaminoglikani (Ohtsubo i Marth, 2006; Varki i sur., 2017). Potonji imaju sasvim drugačiji put biosinteze i modifikacije, a samim time i različitu funkciju od N- i O-glikana (Esko i Selleck, 2002).

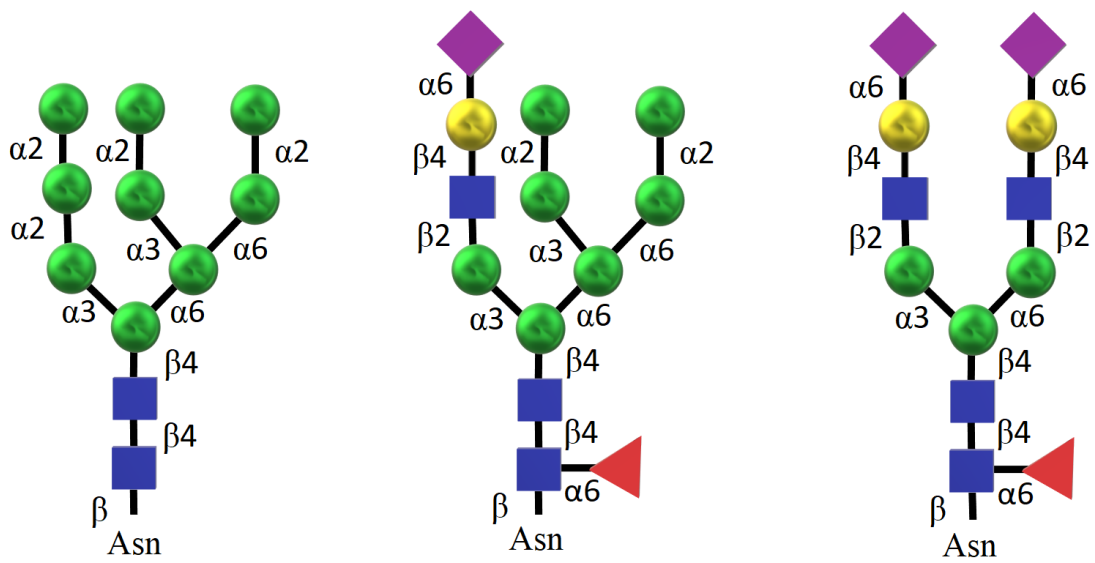
Ukoliko se radi o ugljikohidratnom lancu koji je N-acetilglukozaminskim ostatkom (GlcNAc) kovalentno vezan za aminokiselinu asparagin koja se nalazi unutar Asn-X-Ser/Thr slijeda (X

je bilo koja aminokiselina izuzev prolina) u polipeptidnom lancu, riječ je o N-glikanu (N-vezanom oligosaharidu). Kod O-glikana (O-vezanog oligosaharida) kovalentnom vezom su povezani najčešće N-acetilgalaktozamin (GalNAc) iz ugljikohidratnog dijela i aminokiselina serin ili treonin iz polipeptidnog dijela makromolekule (Varki i sur., 2017).

#### **1.4. N-glikani**

Sve N-glikane karakterizira jednak sržni dio strukture sastavljen od tri manozne jedinice i dva GlcNAc-a, a ovisno o daljnjem grananju i vrsti vezanih monosaharidnih jedinica razlikuju se tri osnovna tipa (**Slika 1**). Oligomanozni N-glikani sadrže dodatne grane povezanih manozna, kompleksni dvije ili više grana s barem jednom N-acetilglukozaminskom jedinicom na koju se mogu dodatno vezati galaktoza i sijalinska kiselina, a hibridni je kombinacija prethodna dva tipa (Gornik i Lauc, 2008; Varki i sur., 2017). Heterogenost N-glikana povećava se aktivnošću određenih glikoziltransferaza koje uvode dodatne monosaharide na specifična mjesta u strukturi (Nagae i Yamaguchi, 2012).

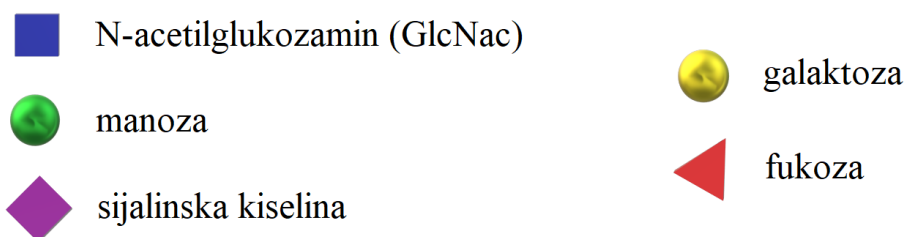
Analizom provedenom na 1 008 osoba došlo se do saznanja o vrlo velikoj varijabilnosti N-glikana u plazmi, a toj raznolikosti, uz genske i okolišne čimbenike, doprinose i dob i spol (Knežević i sur., 2009). No, ono što je važno jest da N-glikani pokazuju izuzetnu stabilnost u vremenu kod pojedine zdrave osobe, kako tijekom kratkog perioda, tako i tijekom godine dana. Glikozilacija je pod snažnom genskom kontrolom koja se mijenja u određenim patofiziološkim procesima. Upravo ta činjenica daje glikanima ulogu potencijalnih dijagnostičkih biomarkera bolesti (Gornik i sur., 2009).



OLIGOMANOZNI

HIBRIDNI

KOMPLEKSNI



**Slika 1.** Reprezentativni primjer tipova N-glikana građenih od monosaharidnih jedinica kojima su pridruženi određeni simbolični prikazi. Svi tipovi sadrže jednaku pentasaharidnu srž koja se sastoji od tri manoze i dva N-acetilglukozamina. Označene su vrste veza između monosaharida.

## 1.5. Uloga glikana u upalnim bolestima

Upalne bolesti karakterizira regrutacija limfocita u zahvaćena tkiva. Prvi i ključan korak u ulasku cirkulirajućih limfocita iz plazme u periferne limfne čvorove i leukocita u inflamatorna tkiva jest njihova adhezija na aktivirane endotelne stanice koje oblažu unutrašnju stranu stijenke krvnih žila. Selektini su dio porodice proteina koji vežu ugljikohidrate (lektini), a nalaze se na aktiviranim trombocitima (P-selektini), leukocitima (L-selektini) i endotelnim stanicama (E- i P-selektini). Razlog su inicijalne interakcije leukocita s aktiviranim endotelom i njihovo „kotrljanje“ do mjesta penetracije u tkivo. Selektini vežu sijažirane i fukozilirane epitope, a takvi su upravo terminalni dijelovi glikana na većini leukocita te endotelnih stanica limfnih čvorova i inflamatornih tkiva. U kontroli funkcije selektina važnu ulogu imaju i enzimatske aktivnosti glikoziltransferaze i sulfotransferaze koje su odgovorne za sintezu njihovih liganada. Ligandi L-selektina, koji se nalaze na limfocitima, pojačano su eksprimirani na endotelu kronično upaljenog tkiva (Dube i Bertozzi, 2005; Marth i Grewal, 2008).

Restrukturiranjem staničnog glikoma mijenja se i imunološki sustav, odnosno svi mehanizmi koji omogućuju njegovu funkciju. Ti procesi uključuju diferencijaciju, distribuciju i migraciju svih stanica imunskog sustava, aktivaciju receptora vezanjem citokina ili antigena, autoimunosne procese te apoptozu određenih leukocita (Marth i Grewal, 2008).

### 1.5.1. Promjene plazmatskih koncentracija N-glikana u upalnim bolestima

Ljudska plazma sadrži mnoštvo N-glikoziliranih proteina kojima se koncentracija mijenja u prisustvu određenih promjena (npr. upala, trudnoća, porod) ili bolesti organizma (npr. reumatoidni artritis, karcinom, hepatitis) (Bell i sur., 1987). Promjene u N-glikomu variraju od najmanjih pa sve do signifikantnih razlika koje mogu biti specifične za određena stanja, što je posebno važno za ona patološka, bilo akutna ili kronična. Takve promjene javljaju se dosta rano i mogu ponekad pratiti i progresiju same bolesti (Gornik i sur., 2012), a njihova važnost dokazana je u brojnim studijama koje su proučavale autoimune bolesti poput reumatoidnog artritisa, mnoge upalne bolesti, ali i rak (Axford, 1999; de Graaf i sur., 1993; Qiu i sur., 2008).

Nuklearnom magnetnom rezonancijom (eng. *nuclear magnetic resonance*, NMR), kao spektroskopskom metodom, moguće je detektirati protone iz N-acetiliranih šećernih struktura nakon enzimatskog cijepanja veza između N-acetilneuraminske kiseline, galaktoze i N-

acetilglukozamina, čime se može pratiti promjena u koncentraciji N-glikana (Bell i sur., 1987). GlycA je novi biomarker upale koji se sastoji upravo od signala koje daju protoni metilne skupine iz N-acetilne skupine GlcNAc-a koji se nalaze na glikoproteinima akutne faze, od kojih su najvažniji  $\alpha$ 1-kiseli glikoprotein, haptoglobin,  $\alpha$ 1-antitripsin,  $\alpha$ 1-antikimotripsin i transferin. Promjene serumskih koncentracija GlycA koreliraju s promjenama već postojećih biomarkera upale, poput C-reaktivnog proteina (eng. *C-reactive protein*, CRP), fibrinogena i interleukina 6 (IL-6) (McGarrah i sur., 2017). U studiji koja je u ispitivanje uključila 27 491 zdravih žena, praćenih ukupno 17,2 godine, dobivena je pozitivna korelacija između koncentracije GlycA i incidencije kardiovaskularnih događaja, a rezultati su uspoređeni s često korištenim biomarkerom kronične upale, visoko osjetljivim C-reaktivnim proteinom (eng. *high-sensitivity C-reactive protein*, hsCRP). Na temelju GlycA može se s vrlo dobrom točnošću predvidjeti mortalitet i incidencija pojave kardiovaskularnih događaja u nekoj populaciji (Akinkuolie i sur., 2016). Vrlo slični rezultati dobiveni su i prilikom istraživanja povezanosti GlycA i incidencije dijabetesa tipa 2 (Akinkuolie i sur., 2015).

Postoje određeni dokazi kako pušenje i konzumacija alkohola (Thompson i sur., 1991), uz indeks tjelesne mase (eng. *body mass index*, BMI), omjer struka i bokova te krvni tlak, imaju znatan utjecaj na N-glikozilaciju (Knežević i sur., 2010), a dokazana je i snažna povezanost određenih strukturalnih entiteta N-glikana s godinama, BMI indeksom, krvnim tlakom i razinom glukoze u krvi natašte u populacijama Han Kineza i Hrvata s otoka Korčule. Praćeni parametri predstavljaju čimbenike rizika za razvoj metaboličkog sindroma te bi, prema tome, N-glikani mogli vjerodostojno ukazivati na određene promjene u metabolizmu čovjeka i služiti kao potencijalni prediktori rizika za razvoj određenih kardiometaboličkih bolesti (Lu i sur., 2011). Dodatna potvrda o pozitivnoj korelaciji promjene plazmatskih N-glikana s rizikom oboljenja od metaboličkog sindroma proizlazi iz studije provedene nad 2 155 pojedinaca s Orkneyskih otoka (McLachan i sur., 2016).

S obzirom na sve veći broj studija koje prate promjene glikoma u određenim stanjima organizma, pitanje je vremena kada će profil N-glikana postati uvriježen biomarker za dijagnostiku i klasifikaciju rizika od oboljenja te preventivnu terapiju kroničnih bolesti (Adua i sur., 2017; Akinkuolie i sur., 2015; Akinkuolie i sur., 2016; Gornik i Lauc, 2008).



## 1.6. Protutijela

Imunoglobulini su glikoproteini koji, kao glavni sekretorni produkt stečenog imunološkog sustava, osiguravaju dugoročnu obranu protiv antigena kojima je organizam izložen. Detektirano je pet klasa imunoglobulina kod čovjeka (IgG, IgM, IgA, IgE i IgD), a svi dijele sličnost u strukturi imunoglobulinskih domena (Arnold i sur., 2007).

### 1.6.1. Struktura i uloga imunoglobulina G

Najzastupljenije protutijelo u ljudskom serumu je imunoglobulin G (IgG). Njegova koncentracija u krvi zdravih odraslih pojedinaca varira između 7 i 16 g L<sup>-1</sup> (Dati i sur., 2001). IgG se sastoji od dva teška (eng. *heavy chains*, HCs) i dva laka lanca (eng. *light chains*, LCs) (Hong i sur., 2009). Laki lanac sadrži jednu varijabilnu (V<sub>L</sub>) i jednu konstantnu domenu (C<sub>L</sub>) dok teški lanac sadrži tri konstantne (C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> i C<sub>H3</sub>) te jednu varijabilnu domenu (V<sub>H</sub>). Varijabilne regije teškog i lakog lanca sadrže mjesto prepoznavanja antigena poznatije kao Fab domena ili fragment koji veže antigen (eng. *antigen-binding fragment*, Fab) dok konstantne domene teškog lanca sačinjavaju Fc domenu, odnosno fragment koji kristalizira (eng. *crystalizable fragment*, Fc) i određuju efektorsku funkciju imunoglobulina (Arnold i sur., 2007; Kaneko i sur., 2006; Murphy i Weaver, 2016). Teški lanci postoje u pet izoformi (γ, μ, α, ε i δ), ovisno o klasi imunoglobulina, a u jednoj molekuli IgG-a nalaze se dva jednaka γ lanca povezana disulfidnim vezama, kako međusobno, tako i s lakim lancima. Laki lanci također dolaze u dvije izoforme (κ i λ), jednake za isti imunoglobulin (Arnold i sur., 2007). Upravo je IgG zaslužan za aktivaciju brojnih obrambenih mehanizama u imunološkom sustavu čovjeka. Ti mehanizmi rezultat su interakcije Fc regije IgG-a s određenim receptorima koji se nalaze na površini brojnih stanica imunološkog sustava. Vežanje Fab regije IgG-a za specifičan antigen određuje vrstu postreceptorske signalne kaskade, odnosno hoće li ona biti aktivacijska ili inhibicijska za određeni proces (Krapp i sur., 2003).

### 1.6.2. Glikozilacija imunoglobulina G

Svojstva proteina ne ovise samo o tome sadrže li vezane glikane već i o vrsti glikana koji su prisutni te njihovom mjestu vezanja (de Haan i sur., 2015). Dva do tri posto svoje ukupne molekularne mase IgG duguje glikozilaciji teškog lanca. Taj postotak se uvelike povećava kod drugih klasa imunoglobulina. Laki lanci ne sadrže konzervirano glikozilacijsko mjesto.

Oligosaharidi vezani za imunoglobuline vrlo su veliki te izuzetno fleksibilni kada im je to omogućeno njihovom prostornom lokacijom. Ta fleksibilnost je dosta izražena oko N-glikozidne veze (Arnold i sur., 2007). Iako su glikani sisavaca sastavljeni od limitiranog broja monosaharidnih vrsta, načini na koje oni mogu biti povezani i razgranati dodaje kompleksnost ukupnoj molekuli. Dobar primjer je N-acetilneuraminska kiselina (sijalinska kiselina) koja se često nalazi na terminalnom dijelu glikana kompleksnog tipa. Ukoliko je vezana  $\alpha$ 2,6 glikozidnom vezom za predzadnji šećer u nizu (galaktozu) djeluje protuupalno, dok  $\alpha$ 2,3-vezana sijalinska kiselina nema taj učinak (de Haan i sur., 2015).

Kao i kod ostalih proteina, glikani na IgG-u imaju vrlo važnu ulogu u promjeni njegove konformacije i topljivosti te utječu na transport i sekreciju (Arnold i sur., 2007). No glikozilacija IgG-a usto je esencijalna za vezanje na sve Fc-gama receptore (Fc $\gamma$ R) (Kaneko i sur., 2006) koji se nalaze na raznim stanicama imunološkog sustava (makrofazima, neutrofilima, eozinofilima, limfocitima, stanicama prirodnim ubojicama) te služe kao poveznica između stanične i humoralne imunosti. Stimulacija stanica imunološkog sustava putem Fc $\gamma$ R može rezultirati posljedičnom aktivacijom stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelu (eng. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC), fagocitozom mikroorganizama, endocitozom imunskih kompleksa, oksidativnim praskom i otpuštanjem upalnih medijatora te regulacijom ostalih stanica u imunološkom sustavu (Mimura i sur., 2001; Shields i sur., 2001).

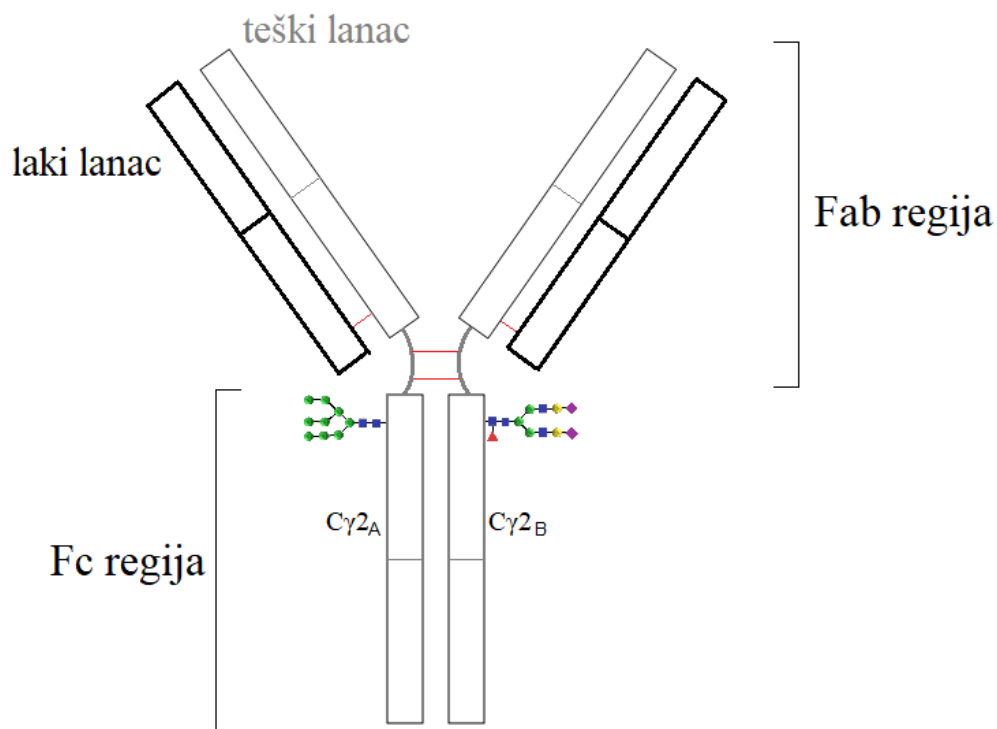
### 1.6.3. N-glikom imunoglobulina G

Sve vrste IgG-a u ljudskom serumu sadrže konzervirano N-glikozilacijsko mjesto (Asn-297) u svakoj od C $\gamma$ 2 domena unutar Fc regije (Arnold i sur., 2007) (**Slika 2**). Upravo za to mjesto glikozilacije pokazalo se da ima utjecaj na funkciju IgG-a u upali moduliranjem interakcija Fc regije imunoglobulina s Fc $\gamma$ R (Plomp i sur., 2016). Između 15 i 25 % serumskog IgG-a sadrži N-glikane u Fab regiji s drugačijim strukturnim modifikacijama od N-glikana Fc regije (Lloyd i sur., 2018; van de Bovenkamp i sur., 2016; Zauner i sur., 2013), a također pokazuju varijacije u određenim patofiziološkim procesima u organizmu (van de Bovenkamp i sur., 2016).

Fc $\gamma$ R se nalaze na leukocitima, imunoglobulinske su strukture, a međusobno se razlikuju po organizaciji i vrsti lanaca te po afinitetu za IgG. Podijeljeni su u tri vrste: Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) i Fc $\gamma$ RIII (CD16). Na koji od njih će se IgG vezati ovisi o njegovoj

konformaciji, slijedu aminokiselina u polipeptidnoj okosnici, promjenama u strukturi proteina ali i o njenoj glikozilaciji (Shields i sur., 2001).

Iako mogu biti prisutne i male količine glikana oligomanoznog i hibridnog tipa (Raju, 2008), najmnogobrojniji biantenarni N-glikani kompleksnog tipa esencijalni su za efektorske funkcije imunoglobulina putem interakcije s Fc $\gamma$ R i C1q komponentom komplementa (Kaneko i sur., 2013; Mimura i sur., 2001) te za očuvanje kvarterne strukture i stabilnosti Fc regije. U istoj molekuli IgG-a, dva Asn-297 mjesta u strukturi mogu biti različito glikozilirana jednim od ukupno 32 vrste glikana detektirane na ljudskom IgG-u koji su podijeljeni u tri porodice: IgG-G0, IgG-G1 i IgG-G2. Biantenarnim glikanima iz IgG-G2 porodice, obje grane završavaju galaktoznim jedinicama (takvih je oko 16 % od ukupne serumske koncentracije glikana IgG-a), dok onima iz IgG-G1 nedostaje galaktoza na jednoj od grana gdje se, u tom slučaju, izlaže N-acetilglukozaminski završetak (oko 35 % svih glikana). Kod IgG-G0 obje grane završavaju s GlcNAc, odnosno ne sadrže terminalne galaktoze (oko 35 % svih glikana). Oko 14 % preostalih glikana sadrže sijalizirane glikane iz porodica IgG-G1 i IgG-G2. Razlike još postoje i u prisustvu računajućeg GlcNAc-a (oko 30 % svih glikana) i sržne fukoze (oko 70 % svih glikana) (Arnold i sur., 2007).



**Slika 2.** Shematski prikaz strukture imunoglobulina G. Unutar C $\gamma$ 2 lanaca nalazi se asparagin (Asn-297) za koji su vezane N-glikanske strukture. Kratice strukturnih jedinica: Fab – fragment koji veže antigen, Fc – fragment koji kristalizira.

#### 1.6.4. Genski uvjetovane promjene glikoma imunoglobulina G

Velika studija iz 2008. godine dokazala je kako geni imaju vrlo važnu ulogu u ranoj detekciji rizika od dislipidemija i kardiovaskularnih bolesti (eng. *cardiovascular diseases*, CVDs), te su, uz već uvriježene rizične čimbenike CVD (vrijednosti lipida u krvi, BMI, dob i spol), vrlo važni u određivanju visokorizičnih pojedinaca (Aulchenko i sur., 2008). Upravo i u kompleksnom putu N-glikozilacije IgG-a sudjeluju brojni geni, od kojih samo nekolicina kodira za glikoziltransferaze, što ukazuje na to da enzimi nisu jedini odgovorni za krajnje strukture N-glikana. Varijacije u individualnom polimorfizmu jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP) imaju maleni utjecaj, ali kombinacijom njih nekoliko u izuzetno kompleksnom putu kao što je N-glikozilacija može nastati sasvim promijenjeni produkt, što je u ovom slučaju N-glikom IgG-a. Takve činjenice ukazuju na moguću poveznicu između genskih lokusa i autoimunih bolesti (Lauc i sur., 2013).

#### 1.6.5. Promjene glikoma imunoglobulina G neovisne o genomu

Uz starenje organizma (Gudelj i sur., 2015; Krištić i sur., 2014; Yu i sur., 2016), gensku regulaciju (Lauc i sur., 2013), spol (Krištić i sur., 2014; Yu i sur., 2016), razinu hormona (Ercan i sur., 2017; Jurić i sur., 2017) i prisustvo raznih bolesti (Vučković i sur., 2015), postoje i drugi faktori koji dokazano utječu na varijaciju glikoma IgG-a. Među njih ubrajamo lipidni profil (Krištić i sur., 2014; Yu i sur., 2016), krvni tlak (Krištić i sur., 2014; Yu i sur., 2016; Wang i sur., 2016), inzulin (Adua i sur., 2017; Krištić i sur., 2014; Russell i sur., 2018), jetreni enzimi (Yu i sur., 2016), urična kiselina i ureja (Krištić i sur., 2014; Yu i sur., 2016), fibrinogen, kalcij i glikirani hemoglobin (Krištić i sur., 2014) te čak i prisustvo glukoze u mediju koje se pokazalo važnim za glikozilaciju i sijalizaciju IgG-a (Liu i sur., 2014).

Što se metaboličkih parametara tiče, važno je naglasiti kako i oni koreliraju s proupalnim djelovanjem IgG-a utjecajem na modifikaciju njegovih glikana, a kao najvažniji su se pokazali BMI, opseg struka te postotak i vrsta masnog tkiva (Krištić i sur., 2014; Perković i sur., 2014; Russell i sur., 2017; Yu i sur., 2016). Masno, odnosno adipozno tkivo jest vrlo važan faktor, no posebice je važno naglasiti novija istraživanja koja pokazuju kako se prilikom praćenja promjena u glikozilaciji IgG-a u obzir treba uzeti distribucija adipoznog tkiva i da bi se trebale koristiti vrijednosti omjera struka i bokova te struka i visine zbog njihovog boljeg pojašnjenja varijacije glikoma IgG-a od BMI indeksa (Russell i sur., 2019).

S obzirom na to da se N-glikane IgG-a sve više proučava kao potencijalne biljege bolesti, njene progresije te odgovora na terapiju, potrebno je provesti još velik broj studija koje uključuju ne samo faktore koji direktno i indirektno moduliraju glikom IgG-a, već i one koji imaju utjecaj na bilo koji korak u biosintetskom putu IgG-a, njegovih receptora i komponenti komplekta, kako bi se abnormalno glikozilirani IgG mogao uistinu povezati s patofiziologijom određenih bolesti (Russell i sur., 2018).

#### 1.6.6. Modulacija efektorskih funkcija imunoglobulina G N-glikozilacijom

Odsustvo sržne fukoze, povezane  $\alpha$ 1,6 glikozidnom vezom za GlcNAc, utječe na povećanje afiniteta Fc-regije IgG-a za Fc $\gamma$ RIIIa receptore, a kao posljedica interakcije dolazi do pojačane aktivacije ADCC-a (Arnold i sur., 2007; Lin i sur., 2015; Masuda i sur., 2007; Raju, 2008; Shields i sur., 2002; Shinkawa i sur., 2003). U interakciji s receptorima sudjeluje onaj dio Fc regije koji je sterički dostupan samo prilikom nedostatka fukoze jedinice (Ferrara i sur., 2005). Prema tome, protutijela koja se koriste u terapiji karcinoma i čiji je temelj djelovanja aktivacija ADCC-a, mogla bi se davati pacijentima u manjima dozama ukoliko su defukozilirana, jer će postići gotovo jednako djelovanje kao i više doze sržno fukoziliranih protutijela (Shields i sur., 2002).

Iako je prisustvo glikana na IgG-u neophodno za vezanje za Fc $\gamma$ RI te C1q, afinitet Fc regije naspram njih ne mijenja se prisustvom ili odsustvom sržne fukoze (Shields i sur., 2002).

Kod povećane terminalne sijalizacije glikana, afinitet IgG-a za Fc $\gamma$ RIIIa receptore pada, kao i afinitet prema antigenima (Raju, 2008). Upravo ta 2,6-vezana sijalinska kiselina biantenarnog glikana odgovorna je i za supresiju upale vezanjem za Fc $\gamma$ RIIB (Kaneko i sur., 2006; Nimmerjahn i Ravetch, 2007) te drugim mehanizmima, neovisnima o aktivaciji tih receptora, kojima suprimira aktivnost različitih stanica imunološkog sustava među kojima su i B limfociti (Hess i sur., 2013). U usporedbi s konvencionalnim intravenskim imunoglobulinima (eng. *intravenous immunoglobulin*, IVIg) u terapiji hematoloških i imunoloških poremećaja, pojačano sijalizirani imunoglobulini pokazuju značajniji protuupalni učinak u daleko manjoj dozi te se sve više razmatraju kao potencijalna terapija autoimunih bolesti (Anthony i sur., 2011; Nimmerjahn i Ravetch, 2007).

Visoko galaktozilirani IgG pojačano se veže za Fc $\gamma$ RIIB što rezultira inhibitornom signalizacijom koja u konačnici dovodi do supresije proinflamatornih efektorskih funkcija

kemoatraktanata (Karsten i sur., 2012). U normalnim uvjetima, oko 35 % Fc glikana serumskog IgG-a je agalaktozilirano (Arnold i sur., 2007), a taj postotak značajno raste u prisustvu bolesti kao što su reumatoidni artritis (Parekh i sur., 1985; Parekh i sur., 1988), sistemski erimatozni lupus (Vučković i sur., 2015), upalne bolesti crijeva (Trbojević-Akmačić i sur., 2015a), kronična bubrežna bolest (Barrios i sur., 2016), hipertenzija (Wang i sur., 2016) i kolorektalni karcinom (Vučković i sur., 2016). Moguće objašnjenje smanjenja galaktozilacije jest niža razina ekspresije i promjena u posttranslacijskoj modifikaciji  $\beta$ 1,4 galaktoziltransferaze u stanicama koje proizvode protutijela, što je dokazano prilikom praćenja aktivnosti enzima u limfocitima određenih pacijenata (Dall'Olio i sur., 2013).

S obzirom na to da nema utjecaj na vezanje protutijela za Fc $\gamma$ RIIIa receptor, kao ni na afinitet protutijela prema antigenu, terminalna galaktoza ne mijenja aktivnost ADCC-a (Raju, 2008; Shinkawa i sur., 2003), ali njeno odsustvo uzrokuje povećano vezanje za C1q te za lektin koji veže manozu (eng. *mannose binding lectin*, MBL) čime dolazi do pojačane aktivacije komplementa, odnosno citotoksičnosti ovisne o komplementu (eng. *complement-dependent cytotoxicity*, CDC) (Peschke i sur., 2017; Troelsen i sur., 2006). Molekule imunoglobulina G s terminalnim GlcNAc jedinicama na glikanima Fc regije imaju povećani afinitet vezanja za C1q i pojačanu aktivnost CDC-a, no smatra se da je tome uzrok upravo posljedična neizloženost terminalnih galaktoza (Raju, 2008). Galaktozilacija IgG-a mijenja se postupno tijekom starenja organizma (Kristić i sur., 2014), dok kod poremećaja homeostaze, kao što je primjerice akutna upala, dolazi do njene vrlo brze izmjene (Novokmet i sur., 2014).

Opažena je remisija reumatoidnog artritisa (kronične autoimune bolesti) tijekom trudnoće, kada dolazi do porasta sijalizacije IgG-a, te ponovni relaps bolesti nakon poroda. U istoj studiji pratila se i koncentracija galaktoze vezane za glikane IgG-a te je zabilježen i njen porast tijekom relapsa bolesti, odnosno dokazano je kako agalaktozilirani IgG ima proupalni učinak (van de Geijn i sur., 2009). Do pada galaktozilacije u menopauzi dolazi zbog nedostatka estrogena (Kristić i sur., 2014), a taj hormonski utjecaj dokazan je i studijom provedenom nad muškarcima i ženama čime se došlo do spoznaje o jednom od važnih mehanizama koji leže u pozadini razlike imunološkog sustava između spolova (Ercan i sur., 2017).

Dodatna potvrda o protuupalnom učinku galaktoze proizlazi iz studije u kojoj je sudjelovalo 3 515 osoba s hrvatskih otoka Korčule i Visa te engleskog Orkneyskog otočja. Uočeno je da

osobe s nižim BMI indeksom imaju snižene razine galaktozilacije IgG-a (Perković i sur., 2014).

Do porasta ADCC-a dolazi i kod povećane koncentracije glikana s račvućim GlcNac-om, premda je taj utjecaj daleko manji od onog koji uzrokuje defukozilacija glikana (Shinkawa i sur., 2003). Navedena modifikacija uzrokuje i smanjenu aktivaciju komplementa, odnosno CDC-a (Schuster i sur., 2005). Ta spoznaja mogla bi biti korisna prilikom terapije tumorskim protutijelima koja izazivaju značajne nuspojave prilikom primjene prve doze, a smatra se da su posljedica aktivacije CDC-a (van der Kolk i sur., 2001). Jednom kad GlcNac-transferaza III katalizira reakciju vezanja račvućeg GlcNac-a, oligosaharid prestaje biti supstratom drugih enzima glikozilacije, među kojima je i fukozil transferaza (Schachter, 1986).

Pomoću navedenih studija validirani su rezultati istraživanja provedenog nad 1 886 pacijenata iz DiaGene studije, prvog takvog tipa, koje je opisalo poveznicu između dijabetesa tipa 2 i N-glikana IgG-a. Uočena je smanjena galaktozilacija i sijalizacija uz povećanu fukozilaciju N-glikana s račvućim GlcNac-om, ali i smanjenju fukozilaciju molekula bez račvućeg GlcNac-a. Navedene modifikacije povećavaju proupalni potencijal IgG-a za koji je dokazano da ima veliku ulogu u patofiziologiji dijabetesa tipa 2 (Lemmers i sur., 2017).

## 1.7. Analiza glikozilacije proteina

Heterogenost glikanskih struktura predstavlja velik izazov u njihovoj analizi. Kako bi se moglo odrediti njihova karakteristična svojstva, uključujući lokalizaciju na proteinu, strukturu i zastupljenost, analiza glikana često zahtijeva korištenje komplementarnih metoda (Zhang i sur., 2016). Razlikujemo tri različita pristupa analitici glikana. Oni uključuju karakterizaciju glikana na intaktnim glikoproteinima, na glikopeptidima te analizu oslobođenih glikana. Nedostatak analize intaktnih glikoproteina jest nedovoljno dobra separacija njihovih različitih glikoformi, pogotovo kada se radi o proteinu s mnogo glikoziliranih mjesta u strukturi te ukoliko je sam uzorak dosta kompleksan (Vreeker i Wuhrer, 2017). Velika prednost takvog pristupa jest detekcija i određivanje kompletnih glikanskih molekula, uključujući i one visoko kompleksne strukture, čime se dobiva uvid u heterogenost glikozilacije proteina (Zhang i sur., 2016). Mogućnost točne lokalizacije mjesta dostupnih glikozilaciji na proteinu omogućuje analiza glikopeptida, koja također doprinosi razumijevanju molekularne strukture proteina uvjetovane glikozilacijom (Vreeker i Wuhrer, 2017).

Oslobađanje oligosaharida s proteina ili polipeptida od interesa predstavlja najčešće korišten pristup u analitici glikana. Proces ne smije biti selektivan prema određenim glikanskim obrascima, mora uključiti korak efikasnog odvajanja oslobođenih glikana od peptidnih dijelova molekule te ne smije modificirati strukturu glikana (Merry i Astrautsova, 2003).

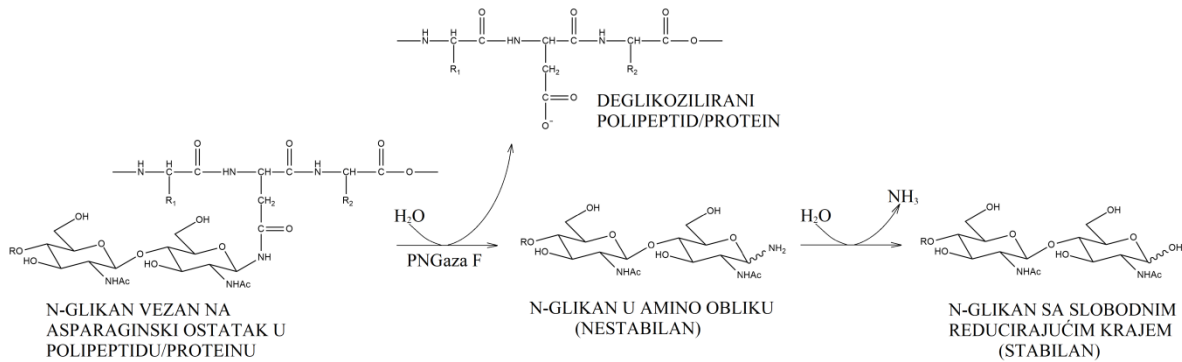
### 1.7.1. Analiza N- i O-glikozilacije proteina

Ovisno o tipu glikozilacije i količini analita u uzorku, oslobađanje se može izvršiti kemijskim ili enzimskim postupkom (Merry i Astrautsova, 2003; Vreeker i Wuhrer, 2017).

Gotovo sve tehnike oslobađanja O-vezanih glikana vrše se kemijskim putem, najčešće reduktivnom  $\beta$ -eliminacijom, a dobiveni slobodni oligosaharidi nalaze se u reduciranom obliku (alditoli) što onemogućuje obilježavanje fluorescentnom bojom. Samim time dolazi i do ograničenja u odabiru analitičke metode koja se može koristiti za njihovu karakterizaciju. Nedostatak univerzalnog enzima otežava postupak oslobađanja O-glikana enzimskim putem (Kozak i sur., 2014), za razliku od N-glikana koji se pretežno oslobađaju upravo na taj način, najčešće pomoću peptid-N-glikozidaze F (PNGase F) (Merry i Astrautsova, 2003), enzima dobivenog iz bakterijske vrste *Flavobacterium meningosepticum*, te peptid-N-glikozidazom A, izoliranom iz ploda badema (Wang i sur., 2014). Enzim PNGaza F cijepa vezu između



asparagina iz polipeptidnog lanca i sržnog GlcNAc-a N-glikana (Takahashi i Nishibe, 1978) (Slika 3).



**Slika 3.** Mehanizam enzimske deglikozilacije polipeptida ili proteina peptid N-glikozidazom F (PNGazom F).

Veću efikasnost u oslobađanju N-glikana s glikopeptida pokazuje PNGaza F, dok je prednost PNGaze A u širem spektru supstrata, koji obuhvaćaju i N-glikane koji na sržnom GlcNAc-u vezanom za asparaginski ostatak polipeptida sadrže  $\alpha$ 1,3-vezanu fukozu. N-glikani s takvom strukturom nisu supstrati PNGaze F, a najčešće su dio glikoma biljaka i beskralježnjaka. Za razliku od PNGaze F koja se efikasno dobiva tehnologijom rekombinantne DNA, korištenje PNGaze A zahtijeva kompliciranu metodu ekstrakcije i pročišćavanja. Dodatni nedostatak PNGaze A je u tome što se radi o glikoproteinu koji može deglikozilirati sam sebe, a to uvelike utječe na krajnje rezultate analize. Upravo zbog vrlo brzog razvoja N-glikoproteomike, dolazi do sve veće potrebe za novim tipovima PNGaza koje bi obuhvatile prednosti oba enzima (Wang i sur., 2014). Postoji još nekoliko vrsta enzima koji se rijetko koriste, ali mogu biti od velike važnosti u određenim uvjetima i za određene potrebe analize (Merry i Astrautsova, 2003; Royle i sur., 2006).

Kako bi se osigurala dostupnost svih supstrata enzimu i oslobađanje svih N-glikana, glikoprotein je potrebno prethodno denaturirati (Royle i sur., 2006a). U tu svrhu koristi se anionski detergent natrijev dodecil sulfat (eng. *sodium dodecyl sulfate*, SDS), čime se smanjuje količina enzima potrebna za potpunu deglikozilaciju glikoproteina (Tarentino i sur, 1985).

### 1.7.2. Visokoprotočna metoda analize N-glikana

Kako bi se osigurala točnost, preciznost i reproducibilnost rezultata istraživanja ljudskog glikoma, bilo je nužno razviti robustnu, učinkovitu i isplativu metodu, koja će također omogućiti analizu velikog broja uzoraka u što kraćem vremenu (Huffman i sur., 2014). Jedna od najčešće korištenih analitičkih tehnika je tekućinska kromatografija ultra-visoke djelotvornosti (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) s fluorescencijskom detekcijom obilježenih i pročišćenih glikana razdvojenih na temelju njihove hidrofilnosti (HILIC) (Huffman i sur., 2014; Spagou i sur., 2011; Zhang i sur., 2016).

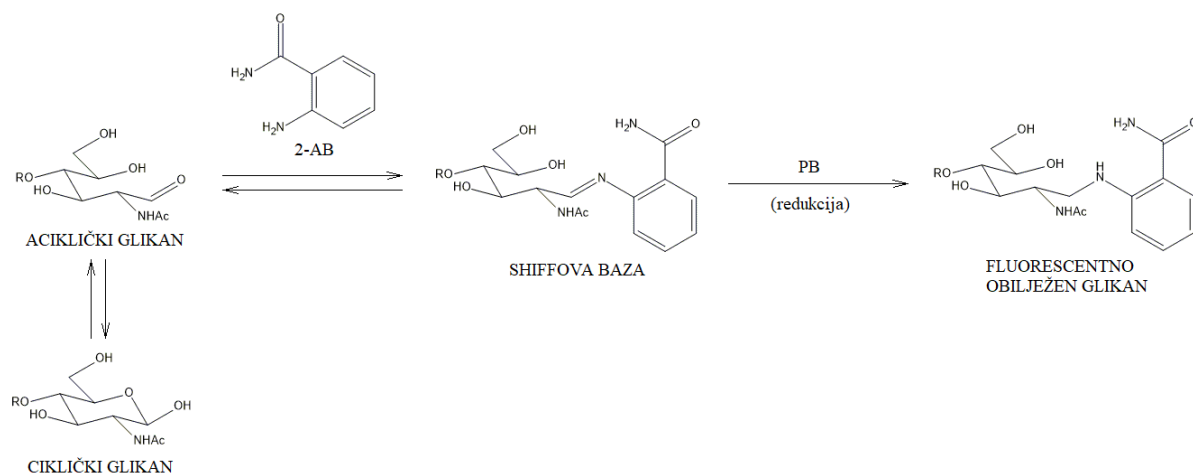
HILIC analiza smatra se podvrstom normalno-fazne kromatografije zbog uporabe hidrofilne stacionarne i hidrofobne mobilne faze (Boersema i sur., 2008), ali ono što ih razlikuje jest dosta kompleksniji separacijski mehanizam HILIC metode (Buszewski i Noga, 2012) te njena mogućnost korištenja otapala koja se miješaju s vodom u različitim omjerima. Time se omogućuje gradijent koncentracije mobilne faze tijekom analize i bolje razdvajanje analita (Boersema i sur., 2008), ali i bolja topljivost polarnih analita u takvim otapalima (Buszewski i Noga, 2012).

Retencijski mehanizam u HILIC analizi temelji se na razdjeljivanju analita između vodene faze, koju predstavlja adsorbirani sloj molekula vode na stacionarnoj fazi, i hidrofobnije mobilne faze (Hemström i Irgum, 2006). Što je analit hidrofilniji ima dulje retencijsko vrijeme, a elucija svih molekula s kolone postiže se postupnim povećavanjem udjela vode u mobilnoj fazi, odnosno povećanjem njene hidrofilnosti (Boersema i sur., 2008). Na hidrofilnost molekule utječu njena veličina, naboj, sastav i struktura te razgranatost i veze između jedinica. Separacija strukturnih izomera također je moguća, a upravo je to jedna od važnijih karakteristika HILIC analize (Mariño i sur., 2010).

Zbog nedostatka kromoforne i/ili fluoroforne skupine, glikane je potrebno derivatizirati što se postiže postupkom reduktivne aminacije koristeći pritom 2-aminobenzamid (**Slika 4**) (eng. *2-aminobenzamide*, 2-AB) kao jednu od najčešće korištenih fluorescentnih oznaka zbog njene kompatibilnosti s brojnim glikoanalitičkim i detekcijskim metodama (Mariño i sur., 2010; Ruhaak i sur., 2010; Vreeker i Wuhrer, 2017; Zhang i sur., 2016). Time se postiže detekcija glikanskih struktura, čak i onih prisutnih u femtomolarnim količinama (Royle i sur., 2006a).

S obzirom na to da se obilježavanje odvija na reducirajućem kraju oligosaharida, jedna molekula 2-AB reagira samo s jednim glikanom, odnosno stehiometrijski omjer u kojem se

odvija reakcija jest 1:1 (de Pra i sur., 2016; Guile i sur., 1996; Royle i sur., 2006b). Neselektivno obilježavanje oslobođenih glikana 2-AB-om omogućuje kvantitativnu analizu njihovih relativnih količina, neovisno o tome sadrže li naboj ili ne (Mariño i sur., 2010, Royle i sur., 2008).



**Slika 4.** Mehanizam fluorescentnog obilježavanja reducirajućeg kraja glikana. Primarna amino skupina fluorescentne oznake reagira s alhidnom skupinom glikana te nastaje Shiffova baza (imin) koji se dalje reducira uz reducens do sekundarnog amina. Kratice: 2-AB – 2-aminobenzamid, PB – 2-pikolin boran.

Kromatografski profil obilježenih glikana uspoređuje se s profilom oligomera glukoze, dobivenih hidrolizom dekstrana, koji su također fluorescentno obilježeni 2-AB-om („dekstranske ljestve“, eng. *dextran ladder*). Analizom linearnih glukoznih oligomernih lanaca dobivena retencijska vremena rastu s brojem monomera, a taj broj nazivamo glukoznim jedinicama (eng. *glucose units*, GU) te on služi za prikaz retencijskih vremena glikana analiziranog uzorka (de Pra i sur., 2016; Guile i sur., 1996; Royle i sur., 2006b). Eluacijom na mjestu određenog pika u kromatogramu može se pretpostaviti struktura glikana te pokušati interpretirati glikanski profil uzorka (Guile i sur., 1996).

### 1.7.3. Utjecaj obrade uzoraka na rezultate analize

Metode analize uključuju dugotrajan proces obrade i inkubacije uzoraka te postoji velika mogućnost gubitka analita putem nespecifičnih interakcija s laboratorijskim posuđem ili uređajima. Rezultat su izmijenjena svojstva analita i/ili smanjenje njegovog signala prilikom detekcije. Upravo zato vrlo je važno prevenirati takve gubitke, pogotovo kod analita prisutnih u vrlo niskim koncentracijama. Korištenjem relevantnih kontrola i standarada uspijeva se donekle kompenzirati takve nepovoljne događaje, međutim, problem nastaje kad dođe do gubitaka tolikih razmjera da je onemogućena detekcija preostale koncentracije analita (Dixit i sur., 2011).

### 1.7.4. Adsorpcija proteina na graničnu površinu uzorka i čvrste tvari

Tijekom analize protutijela se pasivno adsorbiraju na čvrstu fazu laboratorijskog pribora izrađenog najčešće od polistirena, polipropilena ili polivinil klorida. Mehanizam nije sasvim razjašnjen, a sam proces dovodi do varijacija među različitim analiziranim serijama uzoraka (French, 1986).

Svojstvo većine proteina jest da su velike amfipatske molekule što ih čini površinski aktivnim molekulama i stvara problem u kontroli njihove granične adsorpcije. Za takve interakcije su odgovorne intermolekularne, ali i intramolekularne sile (Hlady i Buijs, 1996; Mathes, 2010) koje mogu dovesti do promjene u konformaciji proteina nakon adsorpcije (Barbucci i Magnani, 1994; Kowalczyk i sur., 1994; Steadman i sur., 1992; Vermeer i sur., 1998) što može rezultirati velikom razlikom u adsorpciji i desorpciji proteina, odnosno dovesti do toga da je karakter adsorpcijskog procesa ireverzibilan. Teško je utvrditi točan razmjer tih konformacijskih promjena, locirati ih, a još teže predvidjeti ih. Potrebno je definirati i okarakterizirati točne modele površina kako bi se uspješno proučavala adsorpcija (Hlady i Buijs, 1996).

U načelu, sile koje doprinose interakcijama između proteina i površine jesu one elektrostatskog karaktera između proteina i otapala te proteina i površine. Najvažnije od njih su van der Waalove sile, hidrofobne sile i Coulombove sile, ali velik je i doprinos same strukturne reorganizacija proteina (Bremer, 2001; Hlady i Buijs, 1996). Primjerice, adsorpcija molekula na površinu polistirena događa se zbog intermolekularnih van der Waalovih privlačnih sila koje se prvenstveno temelje na polarnosti molekula, odnosno razlikuju se

molekule sa stalnim i s induciranim dipolom. Van der Waalsove sile su oko sto puta slabije od ionskih i kovalentnih sila (Esser, 2010).

Iako je promjena funkcije i konformacije proteina nakon površinske adsorpcije izuzetno bitna, u ovom kontekstu važniji su gubitci u koncentraciji koji prate adsorpciju IgG-a na površinu laboratorijskog posuđa (Cooper i sur., 1995) jer gubitak analizirane tvari može imati velik utjecaj na rezultate analize, pogotovo kada su koncentracije analita veoma malene, a matriks vrlo kompleksan (Dixit i sur., 2011). Istraživanje na filmovima etilen-vinil acetata (eng. *ethylene-vinyl acetate*, EVA) pokazalo je da njegovom modifikacijom možemo spriječiti vezanje IgG-a, koncentracije 2,5 ppm, u posudi od 50 mL ukupne površine 200 cm<sup>2</sup>, čak za 32 %. Kod većih koncentracija (50 ppm) vezanje za površinski film dovodi do gubitka od samo 4 % te njegove modifikacije nisu toliko neophodne (Cooper i sur., 1995). Kako bi se pokušala smanjiti adsorpcija IgG-a, također se proučavalo dodavanje surfaktanata, drugih proteina te visokih koncentracija soli u analiziranu otopinu (Felgner i Wilson, 1976; Macritchie, 1978).

Koliko adsorpcija IgG-a na površinu čvrstih tvari uzrokuje njegove konformacijske promjene i gubitak funkcije, nedovoljno se proučava iako može uvelike utjecati na rezultate istraživanja, bilo da se radi o namjernoj ili slučajnoj adsorpciji (Huang i sur., 2017). Svaki peptid ima svoja jedinstvena svojstva vezanja i svaka površina reagira s različitim skupinama na peptidu te ne postoji materijal koji bi bio pogodan za sve vrste proteinskih molekula. Prema tome, kao najbolja opcija ostaje individualno eksperimentalno određivanje optimalnog materijala koji će se koristiti tijekom analize (Goebel-Stengel i sur., 2011).

## 1.8. Pretilost

Pretilost je stanje prekomjernog nakupljanja masnog tkiva u organizmu (Lokuruka, 2013). Definira se i kao metabolički poremećaj kojeg prate brojni komorbiditeti. Osim što utječe na život pojedinaca, to je ujedno bolest koja izuzetno šteti društvu i iz ekonomskog aspekta. Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organisation*, WHO) opisuje pretilost kao jedan od najuočljivijih javnozdravstvenih problema kojem se, istovremeno, pridaje najmanje pažnje, kako u razvijenim, tako i u zemljama u razvoju (Haslam i James, 2005). BMI se opisuje kao pokazatelj uhranjenosti odraslih osoba, a jednak je količniku tjelesne težine iskazane u kilogramima (kg) i kvadratu visine pojedinca iskazane u kvadratnim metrima ( $m^2$ ). Prema kategorizaciji WHO-a, BMI veći od  $25,0 \text{ kg m}^{-2}$  smatra se stanjem prekomjerne tjelesne težine, a vrijednosti iznad  $30,0 \text{ kg m}^{-2}$  ukazuju na stanje pretilosti. Svrha indeksa je u tome da se uzima u obzir kao jedan od rizičnih faktora određenih bolesti povezanih s prekomjernom tjelesnom težinom i pretilošću ([www.euro.who.int](http://www.euro.who.int)).

Prema podacima WHO-a za 2016. godinu, više od 1,9 milijardi odraslih osoba (oko 39 % ukupne svjetske populacije) starijih od 18 godina, uključujući i osamnaestogodišnjake, ima prekomjernu tjelesnu težinu. Među njima je više od 650 milijuna pretilih (oko 13 % ukupne svjetske populacije). Ženski spol brojčano nadmašuje muški unutar obje navedene kategorije ([www.euro.who.int](http://www.euro.who.int)).

### 1.8.1. Pretilost i dijabetes tipa 2

BMI vrijednost iznad  $21 \text{ kg m}^{-2}$  prate povećani rizici od dijabetesa tipa 2, hipertenzije i dislipidemije što uvelike smanjuje očekivano trajanje života (Haslam i James, 2005). Jedna od mana BMI klasifikacije jest da prilikom izračuna ne uzima u obzir sastav tijela (Goossens, 2017) i samim time ne razlikuje prekomjernu tjelesnu težinu od mišićne hipertrofije. Unatoč svim nedostacima, BMI i dalje služi kao vrlo korisna mjera procjene općeg stanja neke populacije (Lokuruka, 2013) i visoko je povezan s incidencijom dijabetesa tipa 2, hipertenzije, kardiovaskularnih bolesti i kolelitijaze (Kopelman, 2000). To je posebice vidljivo u višegodišnjoj studiji koja je pratila povezanost promjene tjelesne težine i rizika od dijabetesa tipa 2 u više od stotine tisuća zdravih žena. Nakon korekcije dobi, ishod je ukazao na to da porast BMI vrijednosti zaista jest glavni rizični faktor za obolijevanje od dijabetesa tipa 2 (Colditz, 1995).

Najznačajnije metaboličke promjene povezane s pretilošću i akumulacijom adipoznog tkiva jesu poremećena tolerancija glukoze, smanjena osjetljivost stanica na inzulin te hiperinzulinemija (Frayn i Coppack, 1992) koje naposljetku dovode do trajne hiperglikemije i promjene lipidnog statusa u krvnoj plazmi (Koppelman, 2000).

Već su i studije na četiri sveučilišta iz sedamdesetih i osamdesetih godina 20. stoljeća pokazale čvrstu poveznicu između pretilosti i dijabetesa tipa 2 kod mlađih muškaraca bez šećerne bolesti u obiteljskoj anamnezi. Unos prekomjerne količine hrane tijekom šest mjeseci rezultirao je povećanjem tjelesne mase i individualnih BMI vrijednosti, a stanje je pratilo i povišenje vrijednosti inzulina, glukoze i triglicerida u krvi izmjerenih natašte te smanjena osjetljivost stanica na glukozu (Sims i sur., 1973). Studija iz 2001. godine opisuje utjecaj BMI vrijednosti, opsega struka te omjera opsega struka i bokova na mogućnost pojave dijabetesa tipa 2 u starijoj životnoj dobi kod pojedinaca uključenih u ispitivanje. Svi parametri pokazali su pozitivnu korelaciju (Stevens i sur., 2001). Nadalje, dvanaestogodišnja studija iz 1999. godine ukazuje na povezanost porasta BMI vrijednosti i rizika od dijabetesa tipa 2. Dugotrajnost stanja prekomjerne tjelesne težine i pretilosti također je u velikoj mjeri pridonjelo porastu rizika od te bolesti (Wannamethee i Sharper, 1999).

### 1.8.2. Pretilost i kronična upala

Da je visceralno adipozno tkivo jedan od mogućih uzroka metaboličkih bolesti (Fontana i sur., 2007; Koster i sur., 2010; Panagiotakos i sur., 2005) dokazala je studija na 25 enormno pretilih osoba kod kojih su pronađene povećane koncentracije proupalnih citokina izlučenih iz adipocita (adipokini), posebice proupalnog IL-6. Njegove koncentracije direktno koreliraju s koncentracijama CRP-a što upućuje na povezanost visceralnog masnog tkiva i sistemske upale u pretilih osoba. Za IL-6 je dokazano i da se nalazi u pozadini razvoja dijabetesa tipa 2 i CVD-a te je jedan od uzroka metaboličkih poremećaja u organizmu (Fontana i sur., 2007; Wang i sur., 2013).

### 1.8.3. Dijabetes tipa 2 i kronična upala

Sve više podataka ukazuje na čvrstu povezanost između kronične upale i dijabetesa tipa 2 praćenog inzulinskom rezistancijom (de Luca i Olefsky, 2008; Mavridis i sur., 2008; Xu i sur., 2003). Jedan od markera upale jest često istraživani proupalni citokin faktor nekroze

tumora-alfa (eng. *tumor necrosis factor-alpha*, TNF- $\alpha$ ) kojeg dominantno luče monociti i makrofazi, a ima velike biološke utjecaje na metabolizam lipida, koagulacijski proces i endotelnu funkciju (de Luca i Olefsky, 2008). Temeljem studija na životinjama došlo se do saznanja o povišenim koncentracijama tog proupalnog citokina kod pretilih jedinki glodavaca. TNF- $\alpha$  sintetizira se upravo u adipocitima te mu koncentracija raste paralelno s brojem masnih stanica. Pokazalo se i to da ima veliki utjecaj na pojavu inzulinske rezistencije, a samim time i na pojavu dijabetesa tipa 2 (Hotamisligil i sur., 1993; Hotamisligil i Spiegelman, 1994).

Kasnije je dokazan i porast koncentracije glasničke ribonukleinske kiseline (eng. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) za TNF- $\alpha$  receptor u adipoznom tkivu pretilih ljudi kao i međusobna ovisnost koncentracije inzulina u krvi i BMI vrijednosti o koncentraciji TNF- $\alpha$  (Hotamisligil i sur., 1995). U studiji koja je uključivala 18 pretilih žena, podvrgnutih operaciji ugradnje želučane prenosnice zbog prekomjerne debljine, dokazane su povećane koncentracije mRNA za TNF- $\alpha$  receptore kao i za sam ligand TNF- $\alpha$  u uzorcima adipoznog tkiva (Hube i sur., 1999).

Iako se kao glavni marker kronične upale proučavao najčešće TNF- $\alpha$ , studije na ostalim proteinima i upalnim medijatorima, koji su također bili u određenoj mjeri eksprimirani kod pretilih osoba, samo su dodatno potvrdile tezu da je dijabetes tipa 2 stanje kronične upale organizma (Alissa i sur., 2016; de Luca i Olefsky, 2008; Festa i sur., 2001; Panagiotakos i sur., 2005). Novija istraživanja okreću se dijagnostici, odnosno ispitivanjima može li se dijabetes tipa 2 predvidjeti na temelju povišenih koncentracija određenih biomarkera upale (Badawi i sur., 2010; Pradhan, 2001).



## 1.9. Barijatrija (kirurško liječenje pretilosti)

Uravnotežena i regulirana prehrana, fizička aktivnost i lijekovi temelj su liječenja dijabetesa tipa 2. Dugoročno gledano, sama promjena životnog stila pojedinca ne daje očekivane rezultate te se, unatoč tome što broj lijekova raste iz dana u dan, ne uspijeva postići adekvatna kontrola razine glukoze u krvi. Nadalje, većina antidijabetika uzrokuje porast tjelesne mase te ima vrlo visok rizik uzrokovanja hipoglikemije. U slučaju neuspjeha konvencionalne terapije, ugradnja želučane premosnice pokazala se vrlo dobrom alternativom smanjivši pojavnost komorbiditeta dijabetesa tipa 2 kao i sam prateći mortalitet (Rubino i sur., 2010).

Barijatrijska kirurgija jest grana kirurgije koja se bavi kirurškim liječenjem debljine. Zahvati koje uključuje mogu biti takvi da reduciraju obujam želuca, a samim time i unos hrane (restriksijski), ili se mogu temeljiti na zaobilaženju dijelova tankog crijeva u kojima se odvija apsorpcija hranjivih tvari (malapsorpcijski). Navedeni zahvati mogu se i kombinirati. Konačni rezultat je promjena u anatomiji gastrointestinalnog trakta, a samim time i smanjen kalorijski unos hrane.

U skupinu restriksijskih zahvata ubrajaju se vertikalna gastroplastika (eng. *sleeve gastrectomy*, SG) i podvezivanje želuca podesivom želučanom vrpcom (eng. *laparoscopic adjustable gastric banding*, LAGB). Proksimalna Roux-en-Y želučana premosnica (eng. *Roux-en-Y gastric bypass*, RYGB) te zaobilaženje žuči i gušterače (eng. *biliopancreatic diversion*, BPD) predstavnici su kombinacije operativnih tehnika kojima se smanjuje i unos hrane i njena apsorpcija. Potonji su pokazali i bolje rezultate u dugoročnoj kontroli dijabetesa tipa 2 od restriksijskih zahvata (Buchwald i sur., 2009; Koliaki i sur., 2017; Shah i Laferrère, 2017; [www.cochrane.org/hr](http://www.cochrane.org/hr); [www.hdd-hlz.org](http://www.hdd-hlz.org)).

Prema smjernicama Nacionalnih instituta za zdravlje (eng. *National Institutes of Health*, NIH) trenutne indikacije za barijatrijsku operaciju uključuju BMI jednak ili viši od  $40 \text{ kg m}^{-2}$  uz prisustvo barem dva komorbiditeta pretilosti. Jedan od njih je i dijabetes tipa 2, koji opravdava kiruršku intervenciju i kod bolesnika s BMI vrijednošću manjom od  $35 \text{ kg m}^{-2}$ , ukoliko se tjelesna masa nije uspjela smanjiti ni s jednim drugim terapijskim pristupom.

S obzirom na to da je dijabetes tipa 2 progresivna bolest karakterizirana neprestanim pogoršanjem funkcije  $\beta$ -stanica gušterače, endokrinolozi podržavaju proces naglog gubitka tjelesne težine već u počecima bolesti. Zato se i razmatra provođenje barijatrijskog zahvata

što ranije kako bi se sačuvala funkcija  $\beta$ -stanica te usporila progresija mikro- i makrovaskularnih komplikacija bolesti (Kashyap i sur., 2010).

#### 1.9.1. Barijatrijska kirurgija u kontroli pretilosti i dijabetesa tipa 2

U prvoj polovici 20. stoljeća razne studije zabilježile su porast kontrole glikemije kod pacijenata koji su zbog peptičke ulkusne bolesti ili karcinoma želuca podvrgnuti gastrektomiji, odnosno kirurškom postupku odstranjenja dijela želuca ili njegovom potpunom uklanjanju (Schwarz i sur., 1996; www.medicinenet.com). Time je započelo intenzivno proučavanje barijatrijskih zahvata u liječenju pretilosti i dijabetesa tipa 2 (Shah i Laferrère, 2017).

Studije su pokazale kako barijatrijski zahvati provedeni nad pretilim pacijentima imaju dugotrajan utjecaj na smanjenje tjelesne težine te na poboljšanje razina inzulina, glikiranog hemoglobina i glukoze u krvi. Dolazi do smanjenja rizika od komorbiditeta koji prate dijabetes tipa 2, a najčešći od njih su opstruktivna apneja, osteoartritis i kardiopulmonalni arrest. Ujedno se postiže optimizacija krvnog tlaka, smanjenje incidencije hiperlipidemije, poboljšanje stila života pacijenata i smanjenje sveukupnog mortaliteta (Pories i sur., 1995; Schauer i sur., 2003; Sjöström i sur., 2004).

Nevjerojatan je stupanj normalizacije glikemije vrlo brzo nakon operacije, a remisija dijabetesa tipa 2 traje godinama. Kontrola bolesti puno je učinkovitija od one postignute terapijskim intervencijama i promjenom životnih navika. Postavljaju se brojne teorije i istražuju razni faktori koji bi mogli razjasniti zašto točno dolazi do navedenog poboljšanja bolesti (Abbasi, 2017; Cătoi i sur., 2015).

#### 1.9.2. Dugoročni učinci barijatrijskog zahvata

Smanjenjem tjelesne težine niskokalorijskom dijetom koja prethodi barijatrijskom zahvatu dolazi do pada u veličini jetre, količini intercelularne masti u jetri i adipoznog tkiva. Smanjen je i rizik od neželjenih događaja koji prate zahvat i povećana je uspješnost same operacije (Colles i sur., 2006; Edholm i sur., 2010; Lewis i sur., 2006). Time je dokazano kako je neoperativnim mjerama također moguće postići slične rezultate brzog poboljšanja kontrole glukoze u krvi i inzulinske rezistencije kao i barijatrijskim metodama (Cătoi i sur., 2015), ali ključna razlika operacije i dijeta jest u tome što je gotovo nemoguće održati pretilo osobe

na takvom restriktivnom unosu hrane dulji vremenski period u svrhu zadržavanja svih poboljšanja koja prate taj nagli pad tjelesne mase (Abbasi, 2017). Ono što je dodatna prednost jest da nakon operacije želuca dolazi i do značajnih terapijskih ishoda koji se ne mogu postići smanjenjem tjelesne težine isključivo dijetom. Glavni mehanizmi u pozadini tih povoljnih metaboličkih efekata uključuju promjene u sastavu i raznolikosti mikrobiote gastrointestinalnog trakta, povećanje metaboličke aktivnosti smeđeg adipoznog tkiva, promjene u protoku i sastavu žučnih kiselina, poboljšanje inzulinske osjetljivosti stanica jetre i skeletnog mišićja te promjene u funkciji  $\beta$ -stanica gušterače i metabolizma glukoze u probavnom sustavu (Chondronikola i sur., 2016).

Jedna od hipoteza remisije dijabetesa tipa 2 nakon operacije želuca jest da je tome uzrok nagla normalizacija koncentracije inzulina natašte, ovisna isključivo o uklanjanju dijela gastrointestinalnog trakta (Reed i sur., 2011). Druge teorije uključuju inkretinski sustav, za koji se pokazalo da ima veliku ulogu u nastanku dijabetesa tipa 2, te ostale hormonske sustave koji reguliraju rad gastrointestinalnog trakta. Ovisno o vrsti zahvata i dijelu probavnog sustava koji se zaobilazi operacijom, dolazi do stabilizacije u izlučivanju različitih hormona nakon barijatrijskog zahvata (Cătoi i sur., 2015).

### 1.9.3. Utjecaj barijatrijskog zahvata na N-glikom

Sve do ove godine nije zabilježeno proučavanje utjecaja barijatrijskog zahvata na ljudski glikom. U istraživanju koje je uključivalo 54 žene, starije od 18 godina, podvrgnute RYGB ili SG zahvatu, praćene su promjene u vrijednostima GlycA, kao i promjene u koncentracijama ostalih varijabli povezanih s kroničnom upalom i pretilošću. Vrlo visoke vrijednosti GlycA prije operacije snižavaju se tijekom 12 mjeseci sve do razine kontrolne skupine (zdravi pojedinci normalne tjelesne težine), iako je gotovo polovica pacijenata i dalje ostala u kategoriji pretilih osoba (Manmadhan i sur., 2019).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

U prvom dijelu ovog diplomskog rada pokušalo se unaprijediti metodu analize N-glikana, otpuštenih s imunoglobulina G, testiranjem utjecaja korištenog plastičnog potrošnog materijala u predanalitičkom koraku. Naime, većina laboratorija i dalje koristi plastične pločice za sakupljanje uzoraka s 96 jažica, ali nisu sve jednakih svojstava i treba biti oprezan prilikom izbora i korištenja istih tijekom analize (Lundblad, 2011).

U analizi profila N-glikana IgG-a nalazi se korak izolacije protutijela iz uzoraka plazme, nakon kojeg slijedi ukoncentriravanje izolata IgG-a, sakupljenog u jednu takvu plastičnu pločicu, u vakuum uparivaču. Osušeni IgG stvara interakcije s unutarnjom površinom jažica te se mora temeljito i intenzivno resuspendirati otopinom SDS-a kako bi se denaturacija mogla provesti u potpunosti. IgG koji je potencijalno zaostao na graničnoj površini materijala i otopine, neće biti denaturiran te njegovi N-glikani neće biti dostupni enzimskom oslobađanju, što može rezultirati smanjenjem signala prilikom detekcije, odnosno određeni postotak glikoma IgG-a neće biti uključen u konačne rezultate čija je relevantnost time narušena. Stoga, kako bi se ispitale mogućnosti poboljšanja osjetljivosti postojeće metode, što je posebno važno u slučajevima ograničene početne količine analita, paralelno je ispitan utjecaj rutinski korištenih pločica za sakupljanje uzoraka i novih „*low-bind*“ pločica. Na temelju dobivenih rezultata odabran je najpovoljniji način pripreme glikana, koji je nadalje korišten u svim predstojećim eksperimentima.

Promjene u glikozilaciji uočene su u mnogim akutnim i kroničnim upalnim bolestima. Mogu biti vrlo specifične te služiti i u svrhu dijagnostike i u svrhu liječenja. Za razliku od akutnih upalnih bolesti koje karakteriziraju brojni visokodinamični procesi i teško je odrediti točan početak promjena glikozilacije karakterističnih upravo za te procese, za kronične bolesti postoji mnogo više podataka u literaturi zahvaljujući dugotrajnosti samog procesa upale (Gornik i Lauc, 2008; Varki i sur., 2017). Nigdje nije važnost prepoznavanja glikanskih struktura toliko dobro opisana kao tijekom infekcije i u imunološkom odgovoru organizma (Schnaar, 2016), a sve se više proučava njihova prognostička, dijagnostička i terapijska vrijednost upravo u upalnim bolestima organizma (Akinkuolie i sur., 2014).

Iz godine u godinu raste broj studija koje se bave proučavanjem humanog N-glikoma i njegovih promjena u vrlo kompleksnoj metaboličkoj i upalnoj bolesti kao što je dijabetes tipa 2 (Lemmers i sur., 2017). S obzirom na dugotrajnu remisiju dijabetesa tipa 2 nakon

barijatrijskog zahvata (Reed i sur., 2011) pretpostavlja se da dolazi i do smanjenja kronične upale kao jedne od temeljnih karakteristika bolesti (de Luca i Olefsky, 2008; Mavridis i sur., 2008; Xu i sur., 2003).

Cilj ovog istraživanja bio je analizirati promjene u N-glikozilaciji imunoglobulina G i ukupnih glikoproteina plazme ispitanika podvrgnutih ugradnji želučane prenosnice, uzorkovanih neposredno prije i šest mjeseci nakon barijatrijskog zahvata. Istraživanje je provedeno na ograničenom broju ispitanika u svrhu procijene korisnosti ispitivanja na mnogo većem broju ispitanika kako bi se utvrdila povezanost patofizioloških promjena koje su se dogodile kod pacijenata nakon provedenog zahvata, posebice potencijalnog smanjenja kronične upale i promjena u N-glikanskim profilima te mogućnosti korištenja uočenih glikanskih promjena kao prognostičkih biljega.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Ispitanici**

U istraživanje je uključeno 10 osoba ženskog spola, starosti od 26 do 59 godina (raspon varijacije = 33, medijan = 48, interkvartilni raspon = 4,25). Ispitanici su podvrgnuti barijatrijskom zahvatu kojem je prethodila niskokalorična dijeta te su bile kontinuirano praćene u određenim vremenskim razmacima uzimanjem uzoraka krvi u epruvete sa antikoagulansom EDTA. Centrifugiranjem uzoraka krvi odvojila se plazma, te su se potom uzorci pohranili na -20 °C i čuvali na niskoj temperaturi sve do trenutka analize.

Na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu zaprimljeno je 20 uzoraka plazme od strane Sveučilišta u Oxfordu, među kojima se temeljno razlikuju dva tipa. Jedan predstavlja uzorke uzete ispitanicima nakon dijete, neposredno prije operacije, te je označen s V5, a drugi tip uzoraka datira nakon barijatrijskog zahvata, odnosno 6 mjeseci nakon uzimanja prvog seta, i označen je s V8.

Oba seta uzoraka podvrgnuta su visokoprotočnoj metodi analize u svrhu dobivanja N-glikanskog profila proteina plazme, odnosno IgG-a.

## 3.2. Materijali

### 3.2.1. Standardne kemikalije

- 2-aminobenzamid (eng. *2-aminobenzamide*, 2-AB) (Sigma-Aldrich, SAD)
- 2-pikolin boran (eng. *2-picoline borane*, PB) (Sigma-Aldrich, SAD)
- acetonitril (eng. *acetonitrile*, ACN) (J.T. Baker, SAD)
- amonijev bikarbonat (Acros Organics, SAD)
- amonijev formijat (Sigma-Aldrich, SAD)
- dimetil sulfoksid (eng. *dimethyl sulfoxide*, DMSO) (Sigma-Aldrich, SAD)
- dinatrijev hidrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Sigma-Aldrich, SAD)
- etanol (eng. *ethanol*, EtOH) (Sigma-Aldrich, SAD)
- ledena octena kiselina (Merck, Njemačka)
- Igepal<sup>®</sup> CA 360 (eng. *octyl phenoxy polyethoxy ethanol*) (Sigma-Aldrich, SAD)
- kalijev dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Sigma-Aldrich, SAD)
- kalijev klorid (KCl) (Sigma-Aldrich, SAD)
- klorovodična kiselina (HCl) (Kemika, Hrvatska)
- mravlja kiselina (Merck, Njemačka)
- natrijev dodecil sulfat (eng. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) (Invitrogen Life Technologies, Japan)
- natrijev hidroksid (NaOH) (Sigma-Aldrich, SAD)
- natrijev klorid (NaCl) (Sigma-Aldrich, SAD)
- tris (hidroksimetil) aminometan (eng. *tris (hydroxymethyl) aminomethane*, TRIS) (Sigma-Aldrich, SAD)

### 3.2.2. Enzimi

- peptid-N-glikozidaza F (PNGaza F) (eng. *peptide-N<sup>4</sup>-(N-acetyl-β-D-glucosaminyl) asparagine amidase F*, PNGase F) (Promega, SAD)

### 3.2.3. Otopine i puferi

- fosfatni pufer (eng. *phosphate buffered saline*, PBS)
  - 10xPBS, pH 6,6 (za dobivanje jedne litre pufera izvaže se 80,028 g NaCl, 13,832 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,964 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i 1,976 g KCl te se navedene količine otope u ultra-čistoj vodi do ukupnog volumena od 1 L; smjesa se dobro izmješa, filtrira te joj se ispita pH i podešava po potrebi pomoću NaOH ( $c = 1 \text{ mol L}^{-1}$ ); otopina se čuva na sobnoj temperaturi)
  - 5xPBS (za dobivanje 200 mL pufera razrijedi se 100 mL 10xPBS-a sa 100 mL ultra-čiste vode ( $\psi = 1:1$ ) te se otopina profiltrira i čuva na 4 °C)
  - 1xPBS, pH 7,4 (za dobivanje 1 L pufera razrijedi se 100 mL 10xPBS-a s 900 mL ultra-čiste vode ( $\psi = 1:9$ ) te se otopina profiltrira i čuva na 4 °C)
- otopina SDS-a
  - 1,33 % SDS (otopi se 1,33 g SDS-a u 100 mL ultra-čiste vode; otopina se čuva na 35 °C)
  - 2 % SDS (otopi se 2,0 g SDS-a u 100 mL ultra-čiste vode; otopina se čuva na 35 °C)
- otopina Igepal-a
  - 4 %-tni Igepal (otopina se izrađuje miješanjem 2 mL Igepal<sup>®</sup>-a s 48 mL ultra-čiste vode i čuva se na 4 °C)
- otopina mravlje kiseline
  - 0,1 M ( $c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) mravlja kiselina, pH 2,5 (izrada 1 L otopine provodi se miješanjem 3,77 mL mravlje kiseline s ultra-čistom vodom do ukupnog volumena od 1 L; otopina se čuva na 4 °C)
- otopina amonijevog bikarbonata
  - 1 M ( $c = 1 \text{ mol L}^{-1}$ ) amonijev bikarbonat (100 mL otopine priprema se otapanjem 79,06 g amonijevog bikarbonata u 100 mL ultra-čiste vode; otopina se čuva na sobnoj temperaturi)
- otopina natrijevog hidroksida
  - 0,1 M ( $c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) natrijev hidroksid (za pripremu 500 mL otopine potrebno je u 500 mL ultra-čiste vode otopiti 2 g natrijevog hidroksida i nastaviti čuvati otopinu na sobnoj temperaturi)



- razrijeđeni etanol
  - 70 %-tni etanol (140 mL koncentriranog etanola pomiješa se sa 60 mL ultra-čiste vode za ukupni volumen otopine od 200 mL; otopina se uvijek priprema svježa)
- razrijeđeni acetonitril
  - 96 %-tni acetonitril (200 mL otopine dobivamo miješanjem 192 mL čistog acetonitrila i 8 mL ultra-čiste vode; otopina se uvijek priprema svježa)

#### 3.2.4. Laboratorijska oprema i potrošni materijal

- AB gene PCR pločice (Thermo Scientific, SAD)
- Acquity UPLC H-Class (Waters, Milford, SAD)
- AcroPrep GHP 0,2 µm filter pločice (Pall Corporation, SAD)
- AcroPrep GHP 0,45 µm filter pločice (Pall Corporation, SAD)
- analitička vaga (Explorer<sup>®</sup>) (OHAUS, SAD)
- CIM<sup>®</sup> protein G monolitska pločica s 96 jažica (BIA Separations, Slovenija)
- filteri za pufere (Nalgene<sup>™</sup> Rapid-Flow<sup>™</sup>, 0,2 µm) (Thermo Scientific, SAD)
- inkubator (DNI-50, 37 °C) (MRC, Izrael)
- „low-bind“ pločice za sakupljanje uzoraka (Eppendorf Deepwell Protein LoBind Plates), volumena jažica od 1 mL (Eppendorf, SAD)
- pećnica (DNO-50, 65 °C) (MRC, Izrael)
- pipete: jedno- i višekanalne (Rainin) (Mettler Toledo, SAD)
- pločice za sakupljanje uzoraka, volumena jažica od 1 i 2 mL (eng. *96-well collection plates*) (Waters, Milford, SAD)
- rotacioni vakuum uparivač (model Savant<sup>™</sup> SC210A SpeedVac<sup>™</sup>), zamka za otapalo (model Savant<sup>™</sup> Refrigerated Vapor Traps RVT400) i vakuumska pumpa (model OFP400) (Thermo Scientific, SAD)
- tresilica (model 3023) (eng. *vibration shaker*) (GFL, Njemačka)
- spektrofotometar (The Thermo Scientific NanoDrop 8000 Spectrophotometer) (Thermo Scientific, SAD)
- uređaj za centrifugiranje (Eppendorf centrifuge 5804) (Eppendorf, SAD)
- uređaj za filtriranje uz pomoć vakuuma (eng. *vacuum manifold*) i vakuumska pumpa (Pall Corporation, SAD)
- vakuumska pumpa (eng. *vacuum pump*) (Millipore Corporation, SAD)

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Izolacija imunoglobulina G iz humane plazme

Afinitetna kromatografija metoda je kojom se IgG izolira iz uzoraka plazme (Pučić i sur., 2011). Nakon odmrzavanja 30 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugiranja 10 minuta na 3 000 g, 70  $\mu$ L svakog uzorka plazme randomiziranim se postupkom prenese u pločicu za sakupljanje uzoraka (Waters, Milford, SAD). U nekoliko jažica nalazi se i standard humane plazme (70  $\mu$ L) te jedan slijepi, odnosno kontrolni uzorak (eng. *blank sample*). Potonji služe praćenju utjecaja okolišnih čimbenika tijekom pohrane i analize na rezultate, odnosno za provjeru međusobne kontaminacije uzoraka. Zatim se uzorci razrijede 5xPBS-om ( $\psi = 1:7$ ) i prenesu na AcroPrep GHP 0,45  $\mu$ m filter pločicu (Pall Corporation, SAD) te filtriraju u nove pločice za sakupljanje uzoraka. Uzorci se potom ostave na tresilici (model 3023) (GFL, Njemačka), a za to vrijeme započne se s pripremom pločice potrebne za visoko-protočno afinitetno pročišćavanje IgG-a iz uzoraka plazme. U te svrhe koristi se Protein G monolitska pločica s 96 jažica (BIA Separations, Slovenija) koja se priprema ispiranjem mehaničkih nečistoća s 2 mL ultra-čiste vode i 2 mL 1xPBS-a. Elucija prethodno zaostalih proteina vrši se ispiranjem mravljom kiselinom ( $c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), neutralizacija pločice ispiranjem s 2 mL 10xPBS-a, a uravnoteženje ispiranjem s 4 ml 1xPBS-a. Nakon što se uzorci prenesu na Protein G pločicu i isperu tri puta s 2 mL 1xPBS-a, IgG se eluira u pločicu za sakupljanje uzoraka s 1 mL mravlje kiseline ( $c = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) i odmah neutralizira sa 170  $\mu$ L amonijevog bikarbonata ( $c = 1 \text{ mol L}^{-1}$ ) te se smjesa dobro resuspendira višekratnim pipetiranjem. Protein G pločica se nadalje ispire i pohranjuje za buduće analize. Pomoću spektrofotometra (The Thermo Scientific NanoDrop 8000 Spectrophotometer) (The Thermo Scientific, SAD) izmjere se koncentracije IgG-a u eluatu. Apsorbancija se mjeri na valnoj duljini na kojoj proteini imaju apsorpcijski maksimum ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ). Svjetlost te valne duljine apsorbiraju prstenovi aromatskih aminokiselina u molekulama proteina. Čistoća uzorka određuje se omjerom apsorbcija na 260 i 280 nm. Uzorak se smatra onečišćenim, primjerice nukleinskim kiselinama, ukoliko je njegova vrijednost veća od 0,6.

### 3.3.1. Postupak ispitivanja „low-bind“ pločica

Kako bi se ispitala mogućnost unaprjeđenja metode analize N-glikana otpuštenih s imunoglobulina G, paralelno su testirane rutinski korištene pločice za sakupljanje uzoraka (Waters, Milford, SAD) i nove „low-bind“ pločice (Eppendorf, SAD). Eksperiment je izvršen neposredno prije analize promjene u N-glikozilaciji imunoglobulina G i ukupnih glikoproteina plazme ispitanika podvrgnutih ugradnji želučane premosnice, a na temelju dobivenih rezultata eksperimenta odabran je najpovoljniji način pripreme glikana koji je nadalje korišten u svim predstojećim eksperimentima. Prema protokolima visokoprotočne metode, koja se koristi za analizu N-glikana (Trbojević-Akmačić i sur., 2015b; Trbojević-Akmačić i sur., 2016), analizirane su standardne otopine IgG-a unutar četiri različite serije uzoraka koje se međusobno razlikuju po vrsti pločice za sakupljanje uzoraka i načinu dodavanja otopine SDS-a u njihove jažice u kojima se nalazi osušeni IgG. Prva serija uzoraka (IB1) predstavlja profil glikana IgG-a dobiven nakon što se otopina SDS-a dodala uzorku uz blago resuspendiranje, a druga serija uzoraka (IB2) uključuje intenzivnije i temeljitije resuspendiranje otopine pipetom. U obje serije koristi se rutinski korištena pločica za sakupljanje uzoraka (Waters, Milford, SAD). S obzirom na to da je za „low-bind“ pločice definirano da se na njenu površinu, zbog kemijske modifikacije i njene pojačane hidrofилnosti, peptidi slabije vežu, čime se ne zahtijeva pojačano resuspendiranje, treća (IB3) i četvrta serija (IB4) jednake su, po tipu resuspendiranja, prvoj i drugoj, osim što se radi o drugom tipu pločice (Eppendorf, SAD).

### 3.3.2. Deglikozilacija imunoglobulina G i glikoproteina plazme

Postupci koji slijede nakon izolacije imunoglobulina G iz humane plazme izvode se prema utvrđenim protokolima, visokoprotočnom metodom (Trbojević-Akmačić i sur., 2015b; Trbojević-Akmačić i sur., 2016) (**Slika 5**). Nakon sušenja u uređaju za centrifugu s vakuum uparivačem, uzorci IgG-a denaturiraju se dodatkom 30  $\mu\text{L}$  1,33 % SDS-a ( $\gamma = 13,3 \text{ g L}^{-1}$ ) te inkubacijom u trajanju od 10 minuta na temperaturi od 65 °C. Uzorci plazme ( $V = 10 \mu\text{L}$ ) denaturiraju se dodatkom 20  $\mu\text{L}$  2% SDS-a ( $\gamma = 20 \text{ g L}^{-1}$ ) te inkubacijom 10 minuta na 65 °C. Od ovog koraka nadalje, postupak je u potpunosti isti za uzorke plazme i IgG-a. Nakon hlađenja dodaje se 10  $\mu\text{L}$  Igepal-a ( $\phi = 4 \%$ ), u svrhu deaktivacije suviška SDS-a, te se uzorci ostave 15 minuta na tresilici. Nakon dodatka Igepal-a, N-glikani se oslobađaju s polipeptida

dotatkom 10  $\mu\text{L}$  smjese koja se sastoji od 0,12  $\mu\text{L}$  PNGaze F i ostatak od 5xPBS-a te se uzorci inkubiraju 18 sati na 37  $^{\circ}\text{C}$ .

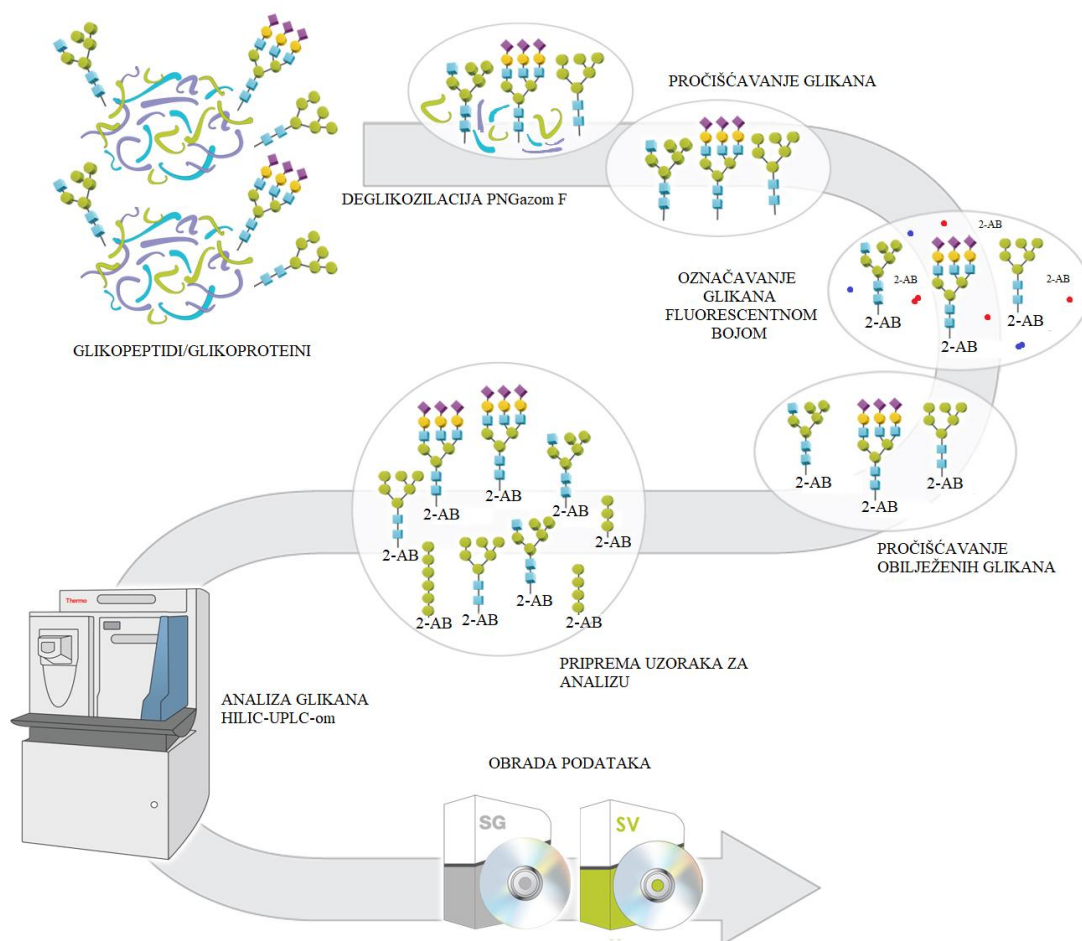
### 3.3.3. Fluorescentno obilježavanje N-glikana

Postupak obilježavanja N-glikana provodi se u digestoru. Smjesa potrebna za obilježavanje sadrži fluorescentnu boju 2-AB ( $\gamma = 19.2 \text{ mg ml}^{-1}$ ) i reducirajući agens PB ( $\gamma = 44.8 \text{ mg ml}^{-1}$ ) u smjesi ledene octene kiseline i DMSO-a ( $\psi = 30:70$ ) (Ruhaak i sur., 2010) (**Slika 4**). Svakom uzorku dodaje se 25  $\mu\text{L}$  smjese za obilježavanje. Uzorci se potom dobro promiješaju, ostave 10 minuta na tresilici te inkubiraju na temperaturi od 65  $^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 2 sata. Nakon hlađenja, u uzorke se dodaje 700  $\mu\text{l}$  ACN-a ( $\varphi = 100 \%$ ) i prebacuju se na AcroPrep GHP 0,2  $\mu\text{m}$  filter pločicu (Pall Corporation, SAD) prethodno pročišćenu s 200  $\mu\text{L}$  EtOH ( $\varphi = 70 \%$ ) i 200  $\mu\text{L}$  ultra-čiste vode te uravnoteženu s 200  $\mu\text{L}$  ACN-a ( $\varphi = 96 \%$ ). Nakon kratke inkubacije na GHP pločici u trajanju od 2 minute, otapalo se uklanja vakuum pumpom i uzorci se isperu pet puta s 200  $\mu\text{L}$  ACN-a ( $\varphi = 96 \%$ ). N-glikani eluiraju se s filter pločice pomoću ultra-čiste vode inkubacijom 15 minuta na tresilici i centrifugiranjem 5 minuta na 1 000 g te prikupljaju u AB gene PCR pločicu (Thermo Scientific, SAD) kao prva frakcija eluata. Postupak se ponavlja još jednom kako bi se prikupila i druga frakcija eluata. Pločica se zatvori i pohranjuje na -20  $^{\circ}\text{C}$  sve do daljnje uporabe.

### 3.3.4. HILIC-UPLC analiza N-glikana imunoglobulina G i proteina plazme

Fluorescentno obilježeni N-glikani razdvajaju se tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti temeljenoj na hidrofилnim interakcijama (HILIC-UPLC) na Acquity UPLC H-Class instrumentu (Hoffman i sur., 2014). Instrument se sastoji od kvaterne pumpe (eng. *quaternary solvent manager*) koja nudi mogućnost miješanja četiri različita otapala, automatskog injektora uzoraka (eng. *sample manager-flow trough needle*, SM-FTN) te fluorescentnog detektora (eng. *fluorescence detector*, FLD) podešenih valnih duljina ekscitacije ( $\lambda = 250 \text{ nm}$ ) i emisije ( $\lambda = 428 \text{ nm}$ ). Kontrolu uređaja omogućuje računalni program Empower 3 build 3471 (Waters, Milford, USA). Fluorescentno obilježeni N-glikani razdvajaju se na temelju hidrofилnosti (Mariño i sur., 2010) pomoću Waters BEH Glycan kromatografske kolone promjera BEH čestica 1,7  $\mu\text{m}$ , dimenzija 100 x 2,1 mm za razdvajanje glikana IgG-a te 150 x 2,1 mm za razdvajanje plazmatskih glikana. Mobilna faza sastoji se od amonijevog formijata ( $c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH vrijednosti 4,4 (otapalo A) i ACN-a ( $\varphi = 100 \%$ )

(otapalo B). Uzorci se pripremaju miješanjem s ACN-om ( $\phi = 100\%$ ) ( $\psi = 25 : 75$ ). Od pripremljenog volumena u iznosu od 50  $\mu\text{L}$  injektira se 40  $\mu\text{L}$ . Separacija N-glikana IgG-a odvija se uz linearni gradijent ACN-a od 75 % do 62 % pri brzini protoka od 0,4  $\text{mL min}^{-1}$  u trajanju od 27 minuta, a za separaciju glikana plazme volumni udio ACN-a linearno pada sa 70 % na 53 % tijekom 25 minuta pri brzini protoka od 0,56  $\text{mL min}^{-1}$ . Temperatura kolone prilikom analize glikana IgG-a održava se na 60  $^{\circ}\text{C}$ , a kod glikana plazme na 25  $^{\circ}\text{C}$ . Nema razlike u temperaturi čuvanja uzoraka prije injektiranja, a ona iznosi 10  $^{\circ}\text{C}$ . Fluorescentno obilježeni glikani detektiraju se pri valnoj duljini ekscitacije ( $\lambda = 250\text{ nm}$ ) i emisije ( $\lambda = 428\text{ nm}$ ) 2-AB-a. Kao vanjski standard služi smjesa obilježenih i pročišćenih N-glikana IgG-a ili proteina plazme, ovisno o analiziranom uzorku. Kalibracija sustava vrši se pomoću vanjskog standarda kojeg čine oligomeri glukoze dobiveni hidrolizom dekstrana, također fluorescentno obilježeni 2-AB-om („dekstranske ljestve“, eng. *dextran ladder*).



**Slika 5.** Slikovni prikaz visokoprotlačne metode analize N-glikana. Kratice: 2-AB – 2-aminobenzamid, PB – 2-pikolin boran (preuzeto i prilagođeno s <https://planetorbitrap.com/glycan-quantitation>).

### 3.3.5. Analiza podataka

Automatskom metodom integracije i ručnom doradom dobiveni su kromatogrami s 24 kromatografska pika (IGP1-IGP24) N-glikana IgG-a i 39 kromatografskih pikova (GP1-GP39) N-glikana plazmatskih proteina. Prema vremenu zadržavanja na koloni (retencijskom vremenu) određene su strukture glikana usporedbom s referentnim vrijednostima iz baze podataka „*GlycoStore*“ (baza dostupna na <https://glycostore.org/>) (Campbell i sur., 2008). Koncentracije glikana izražene su kao udjeli ukupne integrirane površine (eng. *total area normalization*) kako bi se mjerenja različitih uzoraka mogla uspoređivati.

Opisi N-glikanskih struktura koje eluiraju unutar određenog kromatografskog pika nalaze se u **Tablici 1** za N-glikom IgG-a te u **Tablici 2** za N-glikom plazmatskih proteina.

Statistička obrada podataka izvršena je pomoću računalnih programa Microsoft Excel<sup>®</sup> 2010 i R<sup>®</sup> (verzija 3.3.3.). Fisherovim egzaktnim testom vjerojatnosti analizirana je razina značajnosti razlike između relativnih udjela glikanskih pikova u kromatogramu u dvije vremenske točke, a pomoću Wilcoxonovog testa sume rangova provjereno je spadaju li uzorci u populaciju s istim medijanom, odnosno odredila se njihova različitost. Provedena je normalizacijska i korekcijska metoda kako bi se umanjila eksperimentalna varijacija analiziranih setova podataka te su dodatno izračunati derivirani glikanski parametri koji objedinjuju specifičnosti glikanskih struktura kao što su galaktozilacija, fukožilacija, sijalizacija te prisustvo račvajućeg GlcNAc-a (Krištić i sur., 2014).

**Tablica 1.** Sastav N-glikoma IgG-a koji je razdvojen u 24 kromatografska pika (IGP1-IGP24) metodom HILIC-UPLC. Strukture i prosječan udio pojedinog glikana u svakom kromatografskom piknu određeni su masenom spektrometrijom. Svi N-glikani sadrže osnovnu strukturu sastavljenu od dva N-acetilglukozamina (GlcNAc-a) i tri manozne jedinice.

Kromatografski pik	Glikanska struktura	Udio G.S. (%)	Kromatografski pik	Glikanska struktura	Udio G.S. (%)
IGP1	F(6)A1	100	IGP15	F(6)A2BG	83
IGP2	A2	100		F(6)A1G1S1	8
IGP3	A2B	100		A2G1S1	5
IGP4	F(6)A2	100		F(6)A2G2	4
IGP5	M5	63	IGP16a	F(6)A2[6]G1S1	63
	F(6)A2	37		M4A1G1S1	25
IGP6	F(6)A2B	97		IGP16b	A2BG1S1
	A2[6]G1	3	F(6)A2[3]G1S1		91
IGP7	A2[3]G1	75	IGP17	F(6)A2[6]BG1S1	9
	F(6)A2B	25		A2G2S1	89
IGP8a	A2BG1	93	IGP18a	F(6)A2[3]BG1S1	11
	F(6)A2[6]G1	7		A2BG2S1	91
IGP8b	F(6)A2[6]G1	100		F(6)A2G2S1	9
IGP9	F(6)A2[3]G1	100	IGP18b	F(6)A2G2S1	100
IGP10	F(6)A2[6]BG1	100	IGP19	F(6)A2BG2S1	100
IGP11	F(6)A2[3]BG1	100	IGP20	n.p.	-
IGP12	A2G2	91	IGP21	A2G2S2	100
	F(6)A2[3]BG1	9	IGP22	A2BG2S2	100
IGP13	A2BG2	87	IGP23	F(6)A2G2S2	100
	F(6)A2G2	13	IGP24	F(6)A2BG2S2	100
IGP14	F(6)A2G2	100			

Kratice strukturalnih jedinica: F(6) – sržna fukoza vezana  $\alpha$ 1,6-vezom na unutarnji GlcNAc, M<sub>x</sub> – broj (x) manozna vezan na GlcNAc jedinice osnovne strukture, A<sub>x</sub> – broj grana (GlcNAc-a) vezanih za manoze iz osnovne strukture, A2 – biantenarni (razgranati) glikan s obje GlcNAc jedinice povezane  $\beta$ 1,2-vezom za manoze iz osnovne strukture, B – GlcNAc vezan  $\beta$ 1,4-vezom na  $\beta$ 1,3-vezanu manozu (račvajući GlcNAc), G<sub>x</sub> – broj galaktoza vezanih  $\beta$ 1,4-vezom na granama, [3]G1 i [6]G1 označava je li galaktoza vezana za GlcNAc povezan s manozom vezanom  $\beta$ 1,3- ili  $\beta$ 1,6-vezom za GlcNAc jedinice osnovne strukture, S<sub>x</sub> – broj sijalinskih kiselina vezanih na galaktoze, n.p. – nije poznato (Pučić i sur., 2011).

**Tablica 2.** Glavne N-glikanske strukture plazmatskog N-glikoma u pojedinim kromatografskim pikovima (GP1-GP39) dobivenima metodom HILIC-UPLC. Svi N-glikani sadrže osnovnu strukturu sastavljenu od dva N-acetilglukozamina (GlcNAc-a) i tri manozne jedinice.

Kromatografski pik	Glikanska struktura	Kromatografski pik	Glikanska struktura
GP1	FA2	GP21	A2BG2S2
GP2	M5	GP22	FA2G2S2
	FA2B	GP23	FA2BG2S2
GP3	A2[6]BG1	GP24	A3G3S2
GP4	FA2[6]G1	GP25	A3BG3S2
GP5	FA2[3]G1	GP26	A3G3S2
GP6	FA2[6]BG1		FA3G3S2
GP7	M6	GP27	A3G3S3
GP8	A2G2	GP28	A3G3S3
GP9	A2BG2	GP29	FA3G3S3
GP10	FA2G2	GP30	A3G3S3
GP11	FA2BG2	GP31	FA3G3S3
GP12	A2[3]BG1S1	GP32	A3F1G3S3
GP13	FA2[3]G1S1	GP33	A4G4S3
GP14	A2G2S1	GP34	A4G4S3
GP15	A2BG2S1	GP35	A4F1G3S3
GP16	FA2G2S1	GP36	A4G4S4
GP17	FA2BG2S1	GP37	A4G4S4
GP18	A2G2S2	GP38	A4G4S4
GP19	M9	GP39	A4F1G4S4
GP20	A2G2S2		

Kratice strukturnih jedinica: F – kada stoji na početku strukture označava sržnu fukozu vezanu  $\alpha$ 1,6-vezom na unutarnji GlcNAc, Mx – broj (x) manozna vezan na GlcNAc jedinice osnovne strukture, Ax – broj grana (GlcNAc-a) vezanih za manoze iz osnovne strukture, A2 – biantenarni (razgranati) glikan s obje GlcNAc jedinice povezane  $\beta$ 1,2-vezom za manoze iz osnovne strukture, A3 – trostruko razgranati glikan s dvije GlcNAc jedinice povezane  $\beta$ 1,2-vezom, a trećom  $\beta$ 1,4-vezom za manoze iz osnovne strukture, A4 – četverostruko razgranati glikan s dvije GlcNAc jedinice povezane  $\beta$ 1,2-vezom, trećom  $\beta$ 1,4-vezom i četvrtom  $\beta$ 1,6-vezom za manoze iz osnovne strukture, B – GlcNAc vezan  $\beta$ 1,4-vezom na  $\beta$ 1,3-vezanu manozu (račvuajući GlcNAc), Gx – broj galaktoza vezanih  $\beta$ 1,4-vezom na granama, [3]G1 i



[6]G1 označava je li galaktoza vezana za GlcNAc povezan s manozom vezanom  $\beta$ 1,3- ili  $\beta$ 1,6-vezom za GlcNAc jedinice osnovne strukture, Fx – broj fukoza vezanih  $\alpha$ 1,3-vezom za antenarni GlcNAc, Sx – broj sijalinskih kiselina vezanih na galaktoze (Park i sur., 2018).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Promjene N-glikozilacijskih obrazaca imunoglobulina G i plazmatskih glikoproteina

Fluorescentno obilježeni glikani IgG-a i plazmatskih glikoproteina analizirani su kromatografskom metodom HILIC-UPLC nakon obrade uzoraka 10 ispitanika, prikupljenih u dvije vremenske točke. Između uzimanja uzoraka postoji vremenski odmak od šest mjeseci. Prikupljeni podaci ispitanika organizirani su i prikazani metodama deskriptivne statistike. Svi ispitanici su pretili osobe ženskog spola, starosti od 26 do 59 godina (raspon varijacije = 33, medijan = 48, interkvartilni raspon = 4,25), BMI indeksa od 41,69 do 56,02 (srednja vrijednost = 48,45, standardna devijacija = 3,77). Karakteristike ispitanika prikazane su u **Tablici 3**.

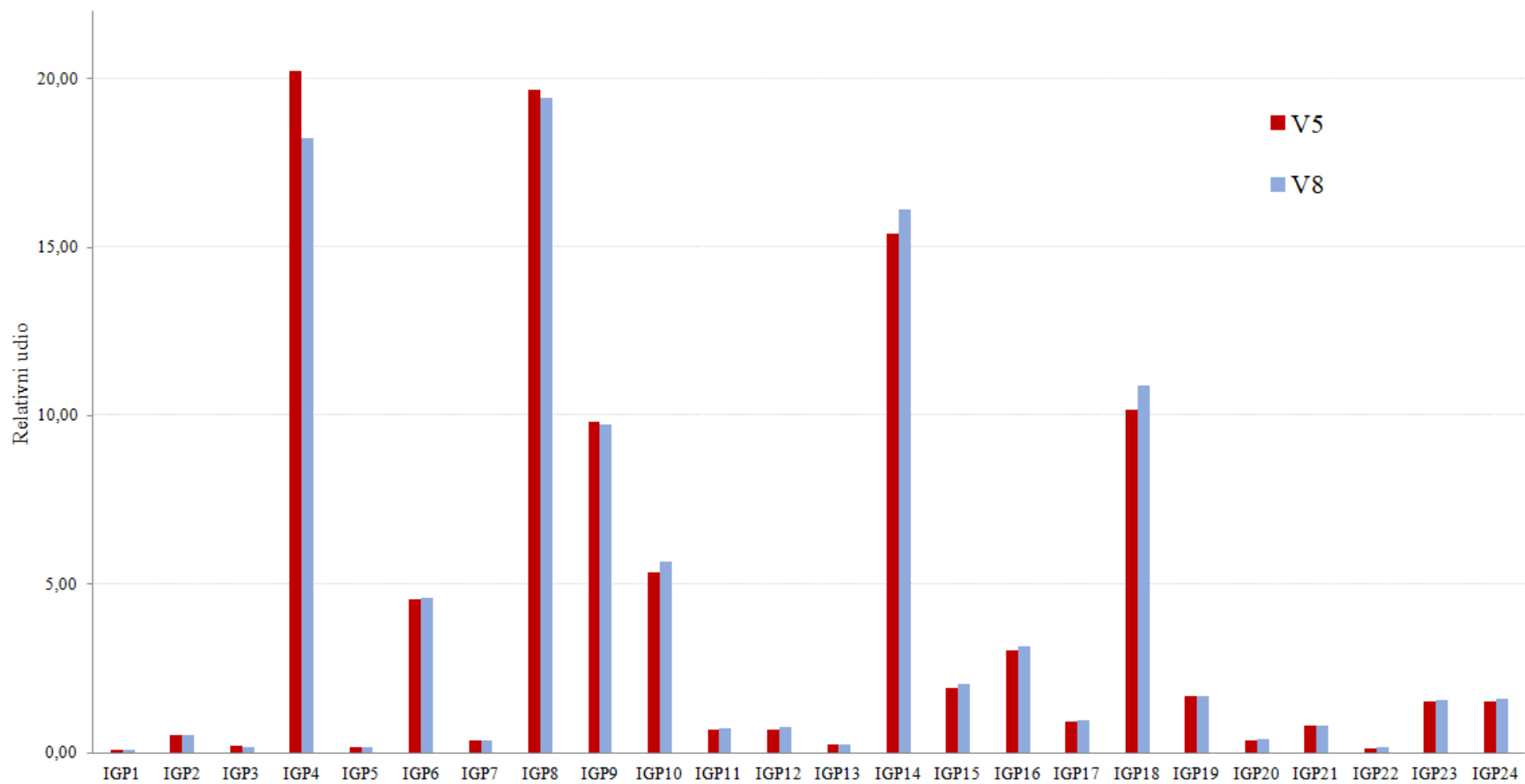
Visokoprotlačnom metodom analize, N-glikani plazmatskih proteina razdvojeni su u 39 (GP1-GP39), a N-glikani IgG-a u 24 (IGP1-IGP24) kromatografska pika, relativno kvantificiranih na način da svaki pik predstavlja određeni udio ukupne površine kromatograma, odnosno on predstavlja udio određenog N-glikana (ili više njih) u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka (Pavić i sur., 2018). Izračunati su i derivirani glikanski parametri koji objedinjuju glikane sa strukturnim sličnostima (**Tablica 4**, **Tablica 5**) te su slikovno prikazane samo relevantne promjene njihovih vrijednosti (**Slika 8**, **Slika 9**).

Međusobno su uspoređeni rezultati relativnih udjela N-glikana, dobivenih analizom uzoraka prikupljenih u dvije vremenske točke, kako bi se dobio uvid u nastale promjene na razini glikozilacije IgG-a i plazmatskih proteina šest mjeseci nakon barijatrijskog zahvata provedenog nad pretilim pacijentima. Promjene relativnih udjela kromatografskih pikova N-glikana, prikazane su na **Slici 6**, odnosno **Slici 7**, ovisno o tipu analiziranog uzorka.

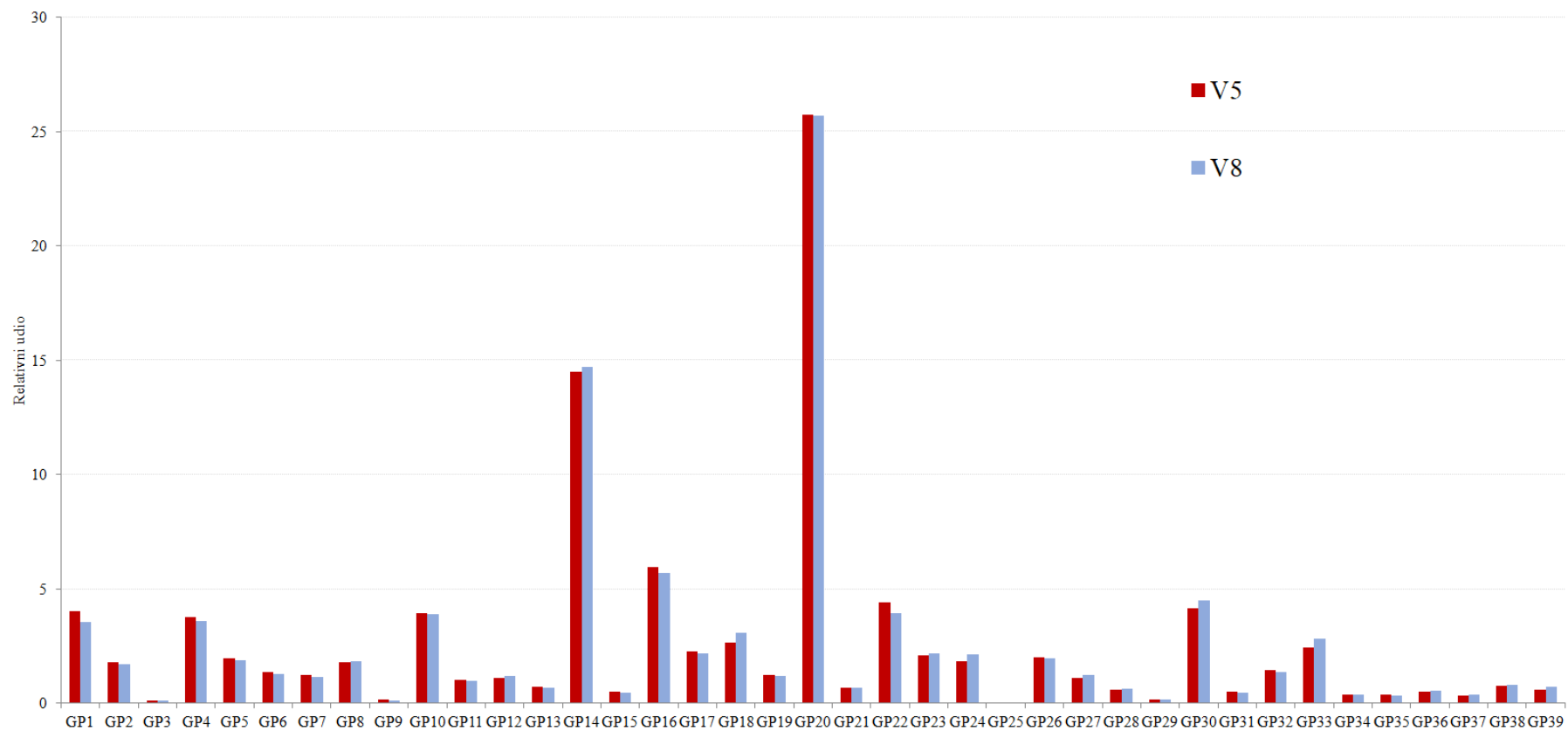
**Tablica 3.** Antropometrijske karakteristike ispitanika izmjerene u dvije vremenske točke (V5 – preoperativno, V8 – šest mjeseci nakon operacije). Pad BMI-ja (podebljane vrijednosti) rezultat je promjene u tjelesnoj masi (podcrtane vrijednosti) postignute dijetom i operacijom.

Broj uzorka	Spol	Dob (V5)	Visina (m)	Tjelesna masa (V5)/kg	BMI (V5)/ kg m <sup>-2</sup>	SYS (V5)/ mmHg	DIA (V5)/ mmHg	Dob (V8)	Tjelesna masa (V8)/kg	BMI (V8)/ kg m <sup>-2</sup>	SYS (V8)/ mmHg	DIA (V8)/ mmHg
001	Ž	48	1,67	<u>133,8</u>	<b>47,98</b>	121	97	48	<u>107,2</u>	<b>38,44</b>	113	72
003	Ž	48	1,55	<u>108,6</u>	<b>45,20</b>	120	72	48	<u>86,6</u>	<b>36,05</b>	119	73
004	Ž	50	1,62	<u>117,8</u>	<b>44,89</b>	134	86	50	<u>92,2</u>	<b>35,13</b>	142	96
005	Ž	45	1,85	<u>136,2</u>	<b>39,80</b>	117	86	45	<u>110,2</u>	<b>32,20</b>	127	81
006	Ž	47	1,625	<u>122,1</u>	<b>46,24</b>	138	81	48	<u>97,9</u>	<b>37,07</b>	143	94
007	Ž	60	1,656	<u>124</u>	<b>45,22</b>	131	80	61	<u>100,2</u>	<b>36,54</b>	115	68
008	Ž	50	1,645	<u>132,4</u>	<b>48,93</b>	119	69	51	<u>105,8</u>	<b>39,10</b>	100	52
010	Ž	38	1,53	<u>116,9</u>	<b>49,94</b>	127	69	38	<u>92,6</u>	<b>39,56</b>	128	78
011	Ž	26	1,61	<u>141,5</u>	<b>54,59</b>	115	69	26	<u>110,1</u>	<b>42,48</b>	106	70
012	Ž	51	1,6	<u>121,9</u>	<b>47,62</b>	177	88	52	<u>94,7</u>	<b>36,99</b>	136	94

\*SYS – sistolički tlak; DIA – dijastolički tlak; BMI – indeks tjelesne mase



**Slika 6.** Usporedba relativnih udjela glikanskih pikova IgG-a prije i šest mjeseci nakon barijatrijskog zahvata. Crvena boja – vremenska točka prije operacije (V5), plava boja – vremenska točka šest mjeseci nakon operativnog zahvata (V8).



**Slika 7.** Usporedba relativnih udjela glikanskih pikova plazmatskih proteina prije i šest mjeseci nakon barijatrijskog zahvata. Crvena boja – vremenska točka prije operacije (V5), plava boja – vremenska točka šest mjeseci nakon operativnog zahvata (V8).

**Tablica 4.** Derivirani glikanski parametri N-glikana IgG-a.

Derivirani glikanski parametar	Opis	Formula
G0	Udio agalaktoziliranih struktura u ukupnom N-glikomu IgG-a	IGP1 + IGP2 + IGP3 + IGP4 + IGP5 + IGP6
G1	Udio monogalaktoziliranih struktura u ukupnom N-glikomu IgG-a	IGP7 + IGP8 + IGP9 + IGP10 + IGP11 + IGP16
G2	Udio digalaktoziliranih struktura u ukupnom N-glikomu IgG-a	IGP12 + IGP13 + IGP14 + IGP15 + IGP17 + IGP18 + IGP19 + IGP21 + IGP22 + IGP23 + IGP24
S0	Udio asijaliziranih struktura u ukupnom N-glikomu IgG-a	IGP1 + IGP2 + IGP3 + IGP4 + IGP5 + IGP6 + IGP7 + IGP8 + IGP9 + IGP10 + IGP11 + IGP12 + IGP13 + IGP14 + IGP15
S1	Udio monosijaliziranih struktura u ukupnom N-glikomu IgG-a	IGP16 + IGP17 + IGP18 + IGP19
S2	Udio disijaliziranih struktura u ukupnom N-glikomu IgG-a	IGP21 + IGP22 + IGP23 + IGP24
S	Udio sijaliziranih struktura u ukupnom N-glikomu IgG-a	IGP16 + IGP17 + IGP18 + IGP19 + IGP21 + IGP22 + IGP23 + IGP24
B	Udio struktura koje sadrže račvajući GlcNAc u ukupnom N-glikomu IgG-a	IGP3 + IGP6 + IGP10 + IGP11 + IGP13 + IGP15 + IGP19 + IGP22 + IGP24
HM	Udio oligomanoznih struktura u ukupnom N-glikomu IgG-a	IGP5
CoreF	Udio sržno fukoziliranih struktura u ukupnom N-glikomu IgG-a	IGP1 + IGP4 + IGP6 + IGP8 + IGP9 + IGP10 + IGP11 + IGP14 + IGP15 + IGP16 + IGP18 + IGP19 + IGP23 + IGP24

Kratice deriviranih parametara: CoreF – sržna fukoza, M – manozna vezana za GlcNAc jedinice osnovne strukture, B – račvajući GlcNAc, G – galaktoza vezana β1,4-vezom na manozu, S – sijalinska kiselina vezana za galaktozu

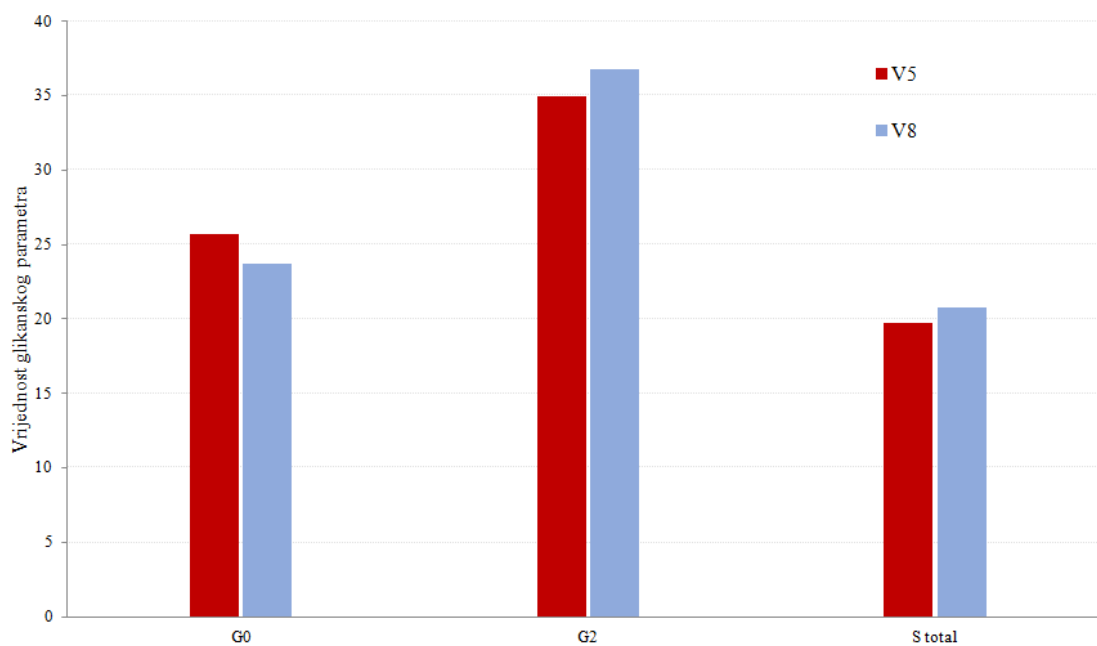
**Tablica 5.** Derivirani glikanski parametri N-glikana plazmatskih proteina.

Derivirani glikanski parametar	Opis	Formula
G0	Udio agalaktoziliranih struktura u ukupnom plazmatskom N-glikomu	GP1 + GP2/2
G1	Udio monogalaktoziliranih struktura u ukupnom plazmatskom N-glikomu	GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP12 + GP13
G2	Udio digalaktoziliranih struktura u ukupnom plazmatskom N-glikomu	GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17 + GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23
G3	Udio trigalaktoziliranih struktura u ukupnom plazmatskom N-glikomu	GP24 + GP25 + GP26 + GP27 + GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP35
G4	Udio tetragalaktoziliranih struktura u ukupnom plazmatskom N-glikomu	GP33 + GP34 + GP36 + GP37 + GP38 + GP39
S0	Udio asijaliziranih struktura u ukupnom plazmatskom N-glikomu	GP1 + GP2/2 + GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11
S1	Udio monosijaliziranih struktura u ukupnom plazmatskom N-glikomu	GP12 + GP13 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17
S2	Udio disijaliziranih struktura u ukupnom plazmatskom N-glikomu	GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23 + GP24 + GP25 + GP26
S3	Udio trisijaliziranih struktura u ukupnom plazmatskom N-glikomu	GP27 + GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP33 + GP34 + GP35

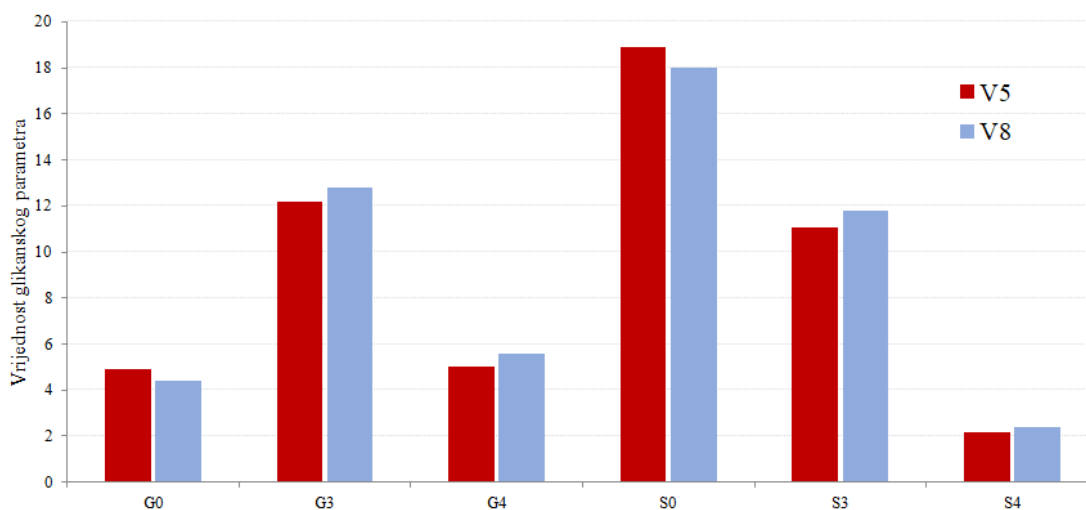
S4	Udio tetrasijaliziranih struktura u ukupnom plazmatskom N-glikomu	GP36 + GP37 + GP38 + GP39
B	Udio struktura koje sadrže račvujući GlcNAc u ukupnom plazmatskom N-glikomu	GP2/2 + GP3 + GP6 + GP9 + GP11 + GP12 + GP15 + GP17 + GP21 + GP23
HM	Udio oligomanoznih struktura u ukupnom plazmatskom N-glikomu	GP2/2 + GP7 + GP19
CoreF	Udio sržno fukoziliranih struktura u ukupnom plazmatskom N-glikomu	GP1 + GP2/2 + GP4 + GP5 + GP6 + GP10 + GP11 + GP13 + GP16 + GP17 + GP22 + GP23 + GP29 + GP31
AntF	Udio struktura koje sadrže antenarnu fukoza u ukupnom plazmatskom N-glikomu	GP32 + GP35 + GP39
LB	Udio mono- i biantenarnih struktura u ukupnom plazmatskom N-glikomu	GP1 + GP2/2 + GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP12 + GP13 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17 + GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23
HB	Udio trostruko i četverostruko razgranatih struktura u ukupnom plazmatskom N-glikomu	GP24 + GP25 + GP26 + GP27 + GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP33 + GP34 + GP35 + GP36 + GP37 + GP38 + GP39

Kratice deriviranih parametara: CoreF – sržna fukoza, M – manozna vezana za GlcNAc jedinice osnovne strukture, B – račvujući GlcNAc, G – galaktoza vezana β1,4-vezom na manozu, S – sijalinska kiselina vezana za galaktozu; AntF – antenarna fukoza povezana α1,3-vezom za sijalinske kiseline, LB – slaba razgranatost N-glikana, HB – visoka razgranatost N-glikana





**Slika 8.** Promjene vrijednosti deriviranih glikanskih parametara IgG-a u razdoblju od šest mjeseci. Crvena boja – vremenska točka prije operacije (V5), plava boja – vremenska točka šest mjeseci nakon operativnog zahvata (V8).



**Slika 9.** Promjene vrijednosti deriviranih glikanskih parametara plazmatskih proteina u razdoblju od šest mjeseci. Crvena boja – vremenska točka prije operacije (V5), plava boja – vremenska točka šest mjeseci nakon operativnog zahvata (V8).

Statističkom obradom glikanskih podataka dobivene su odgovarajuće p-vrijednosti. Prema **Tablici 6**, odnosno **Tablici 7**, ovisno o ispitivanom uzorku (IgG ili plazma), vidljivo je da su p-vrijednosti većinom veće od granice značajnosti koja iznosi 0,05. Izvršena je i dodatna korekcija po Bonferroniju, čime su se postigli stroži uvjeti za definiranje statistički značajne promjene vidljive u rezultatima analize dva seta uzoraka (Armstrong, 2014). Oni rezultati koji su i pokazivali značajnost, izgubili su je nakon korekcije na višestruko testiranje. Konačno, kao relativno značajni, uzeli su se u obzir oni rezultati s najmanjim iznosom p-vrijednosti. Za uzorke IgG-a to su redom IGP4, IGP10, IGP15, IGP16 i IGP20, a za uzorke plazme GP31, GP18, GP22, GP34, GP24, GP30, GP29 i GP37. Što se deriviranih glikanskih parametara tiče, nešto značajnija promjena u N-glikomu IgG-a uočena je kod glikana koji u strukturi sadrže račvujući GlcNAc (eng. *bisecting*, B) te kod agalaktoziliranih (G0) i digalaktoziliranih glikana (G2), a u N-glikomu proteina plazme kod oligomanoznih (eng. *high mannose*, HM) i višestruko razgranatih glikana (eng. *high branching*, HB).

Uz prikaz p-vrijednosti N-glikana i njihovih deriviranih parametara, naveden je i vremenski efekt, odnosno stupanj promjene prosječnog relativnog udjela kromatografskih pikova N-glikana te su slikovno prikazani N-glikani i derivirani parametri kod kojih je taj stupanj promjene najviše izražen. Značajniji pad u relativnom udjelu N-glikana IgG-a zabilježen je kod IGP2, IGP3 i IGP4 te agalaktoziliranih glikana (G0), a porast kod IGP12, IGP15, IGP20 i IGP22 te digalaktoziliranih (G2) i sijaliziranih (S) glikana (**Slika 10**). Kod plazmatskih glikoproteina najveći porast relativnih udjela pokazuju GP18, GP24, GP29, GP33, GP37 i GP39 te tri- i tetragalaktozilirani i sijalizirani glikani (G3, G4, S3, S4), a pad GP1, GP22, GP31 i GP34 te asijalizirani (S0) i agalaktozilirani glikani (G0) (**Slika 11**).

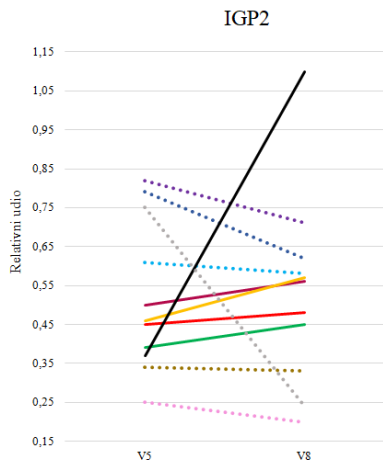
**Tablica 6.** Prikaz p-vrijednosti, korigirane p-vrijednosti i vremenskog efekta te njegove standardne devijacije za mjerene glikane u uzorku IgG-a. Podatci su poredani prema p-vrijednosti, redom od najmanjeg iznosa do najvećeg.

Glikan	Vremenski efekt	Standardna devijacija	p-vrijednost	Korigirana p-vrijednost	Glikan	Vremenski efekt	Standardna devijacija	p-vrijednost	Korigirana p-vrijednost
IGP4	-0,1004	0,0450	0,0420	0,4439	IGP8	-0,0105	0,0113	0,3624	0,6545
IGP10	0,0503	0,0260	0,0698	0,4439	IGP22	0,1044	0,1112	0,3709	0,6545
B	0,0326	0,0174	0,0795	0,4439	F	-0,0013	0,0018	0,4933	0,8221
IGP15	0,0707	0,0387	0,0849	0,4439	IGP1	0,0351	0,0622	0,5744	0,9069
IGP16	0,0386	0,0211	0,0935	0,4439	IGP2	-0,0737	0,1556	0,6379	0,9244
IGP20	0,0915	0,0545	0,1111	0,4439	IGP17	0,0171	0,0382	0,6593	0,9244
G0	-0,0805	0,0489	0,1185	0,4439	IGP19	0,0160	0,0427	0,7102	0,9244
G2	0,0533	0,0349	0,1432	0,4439	IGP9	-0,0088	0,0247	0,7217	0,9244
IGP13	0,0583	0,0406	0,1681	0,4439	IGP5	0,0179	0,0536	0,7395	0,9244
IGP12	0,0730	0,0503	0,1706	0,4439	IGP11	0,0108	0,0444	0,8081	0,9697
IGP3	-0,1811	0,1260	0,1775	0,4439	IGP21	0,0114	0,0669	0,8646	0,9936
IGP14	0,0504	0,0361	0,1776	0,4439	IGP6	-0,0080	0,0665	0,9039	0,9936
S	0,0471	0,0367	0,2175	0,4849	IGP7	0,0024	0,0714	0,9737	0,9936
IGP18	0,0653	0,0523	0,2263	0,4849	G1	-0,0002	0,0084	0,9786	0,9936
IGP24	0,0497	0,0479	0,3143	0,6286	IGP23	-0,0005	0,0564	0,9936	0,9936

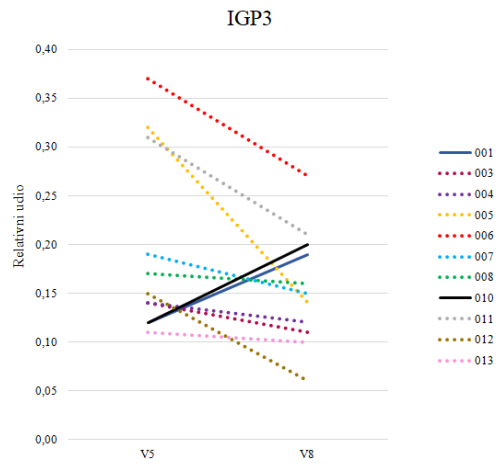
**Tablica 7.** Prikaz p-vrijednosti, korigirane p-vrijednosti i vremenskog efekta te njegove standardne devijacije za mjerene glikane u uzorku plazme. Podatci su poredani prema p-vrijednosti, redom od najmanjeg iznosa do najvećeg.

Glikan	Vremenski efekt	Standardna devijacija	p-vrijednost	Korigirana p-vrijednost	Glikan	Vremenski efekt	Standardna devijacija	p-vrijednost	Korigirana p-vrijednost
GP31	-0,1513	0,0365	0,0013	0,0684	GP38	0,0623	0,0583	0,2985	0,5650
GP18	0,1479	0,0408	0,0030	0,0802	G0	-0,0904	0,0886	0,3159	0,5774
HM	-0,0553	0,0172	0,0073	0,1075	GP16	-0,0496	0,0538	0,3653	0,6454
GP22	-0,1231	0,0417	0,0109	0,1075	GP8	0,0360	0,0423	0,4011	0,6857
GP34	-0,0947	0,0332	0,0138	0,1075	S0	-0,0486	0,0616	0,4340	0,7188
GP24	0,1290	0,0456	0,0138	0,1075	GP15	-0,0268	0,0375	0,4822	0,7591
GP30	0,0746	0,0275	0,0175	0,1075	GP14	0,0247	0,0353	0,4870	0,7591
GP29	0,1663	0,0622	0,0178	0,1075	GP2	-0,0344	0,0520	0,5117	0,7748
GP37	0,1278	0,0475	0,0183	0,1075	GP5	-0,0682	0,1114	0,5421	0,7797
HB	0,0635	0,0277	0,0408	0,2086	GP4	-0,0521	0,0856	0,5443	0,7797
LB	-0,0125	0,0056	0,0451	0,2086	GP26	-0,0217	0,0368	0,5591	0,7798
GP12	0,0749	0,0359	0,0515	0,2086	GP21	0,0073	0,0137	0,5945	0,8079
GP33	0,1095	0,0512	0,0517	0,2086	G1	-0,0340	0,0699	0,6276	0,8316
GP7	-0,0770	0,0361	0,0551	0,2086	GP25	-0,0288	0,0708	0,6852	0,8478

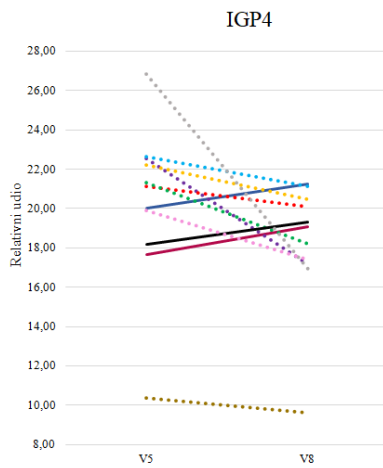
GP27	0,0800	0,0400	0,0655	0,2315	GP3	-0,0318	0,0826	0,7015	0,8478
S3	0,0572	0,0290	0,0742	0,2459	S2	0,0082	0,0242	0,7354	0,8478
GP28	0,0704	0,0387	0,0881	0,2747	GP11	-0,0255	0,0759	0,7390	0,8478
G3	0,0466	0,0281	0,1179	0,3471	GP23	0,0207	0,0618	0,7392	0,8478
G4	0,0826	0,0507	0,1282	0,3576	GP6	-0,0200	0,0615	0,7457	0,8478
S4	0,0881	0,0569	0,1442	0,3820	GP9	-0,0152	0,0478	0,7518	0,8478
GP32	-0,0716	0,0494	0,1633	0,4122	GP17	-0,0228	0,0891	0,7995	0,8827
GP36	0,0589	0,0420	0,1795	0,4189	B	-0,0066	0,0415	0,8738	0,9451
GP19	-0,0472	0,0335	0,1818	0,4189	GP10	-0,0099	0,0745	0,8939	0,9475
GP35	-0,0686	0,0512	0,1943	0,4291	S1	0,0008	0,0202	0,9684	0,9944
GP39	0,1142	0,0856	0,2053	0,4351	G2	0,0004	0,0166	0,9791	0,9944
GP1	-0,1180	0,1054	0,2725	0,5554	GP20	0,0002	0,0308	0,9944	0,9944
GP13	-0,0904	0,0842	0,2905	0,5650					



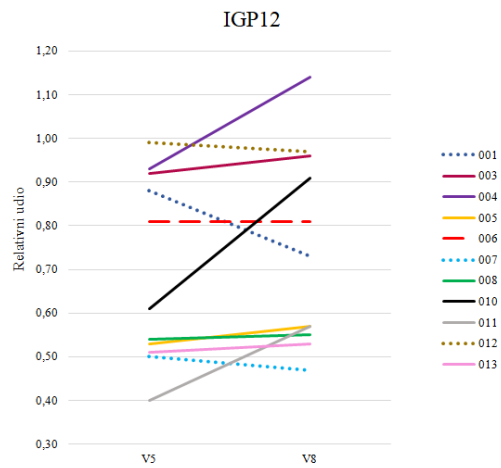
**Slika 10.a**



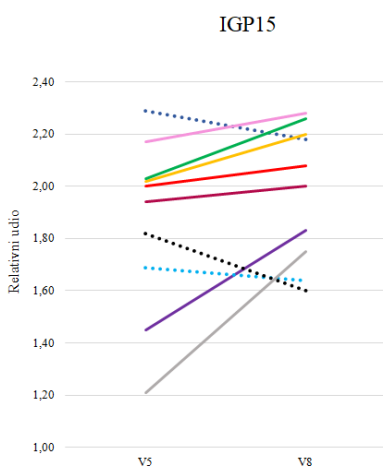
**Slika 10.b**



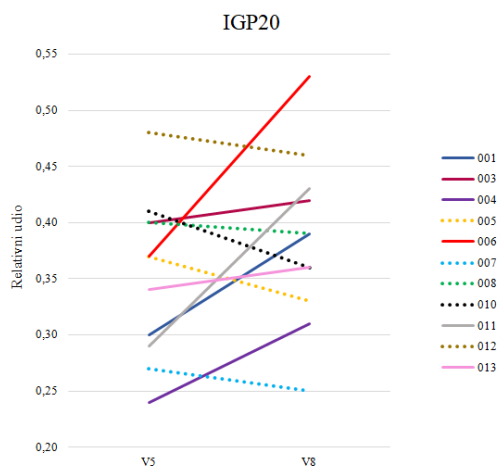
**Slika 10.c**



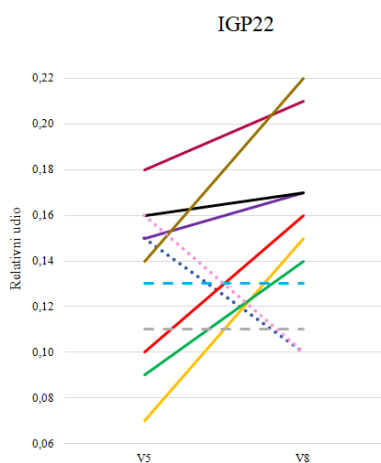
**Slika 10.d**



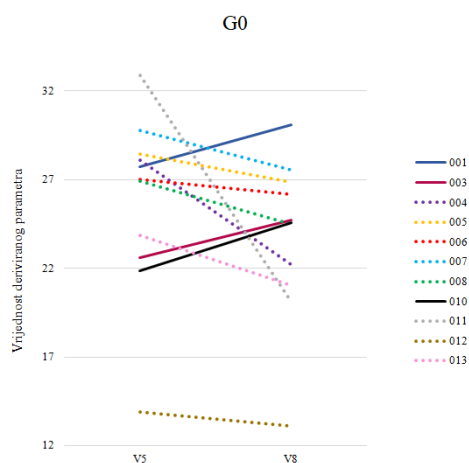
**Slika 10.e**



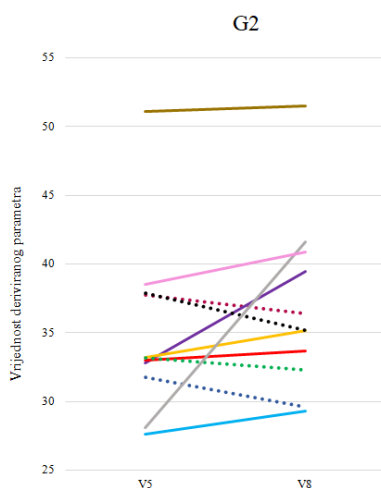
**Slika 10.f**



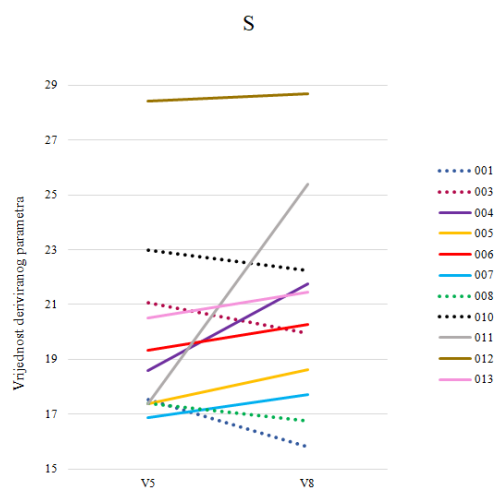
**Slika 10.g**



**Slika 10.h**

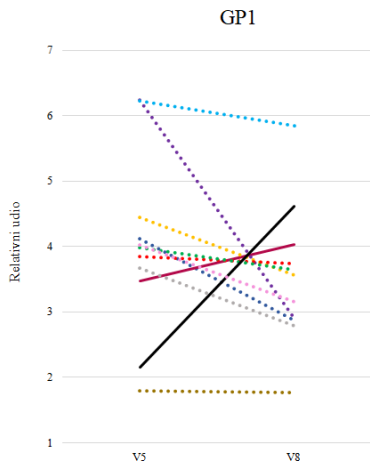


**Slika 10.i**

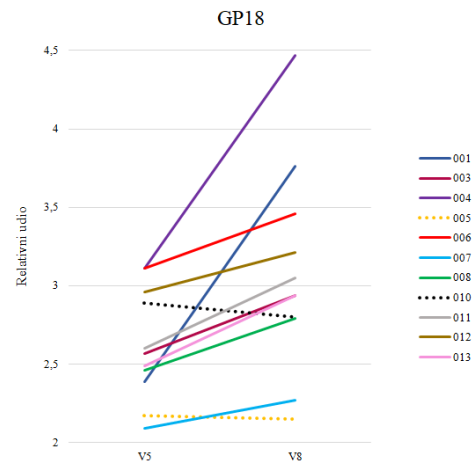


**Slika 10.j**

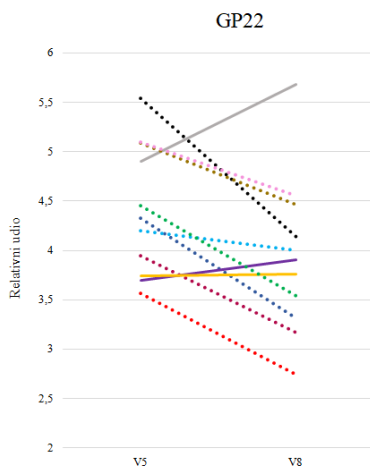
**Slika 10.** Slikovni prikazi promjena prosječnih relativnih udjela N-glikanskih struktura IgG-a u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka i prosječnih vrijednosti njegovih deriviranih glikanskih parametara kod kojih je taj stupanj promjene najviše izražen. Smanjenje relativnog udjela ističe se kod IGP2 (**Slika 10.a**), IGP3 (**Slika 10.b**) i IGP4 (**Slika 10.c**) te agalaktoziliranih glikana (G0) (**Slika 10.h**), a porast kod IGP12 (**Slika 10.d**), IGP15 (**Slika 10.e**), IGP20 (**Slika 10.f**) i IGP22 (**Slika 10.g**) te digalaktoziliranih (G2) (**Slika 10.i**) i sijaliziranih (S) glikana (**Slika 10.j**). Na slici se nalazi i IGP20 zbog izraženijeg stupnja promjene unatoč tome što se točna struktura navedenog kromatografskog pika ne zna sa sigurnošću.



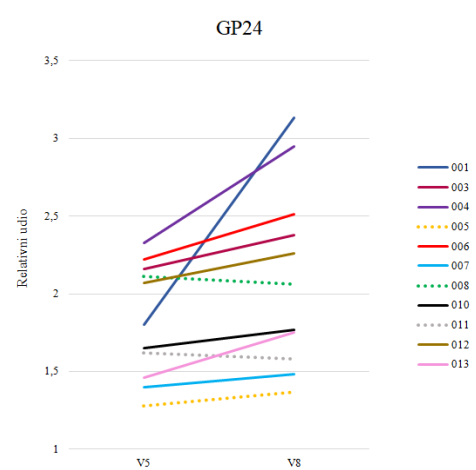
**Slika 11.a**



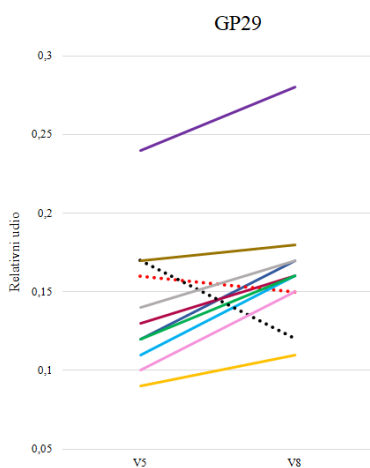
**Slika 11.b**



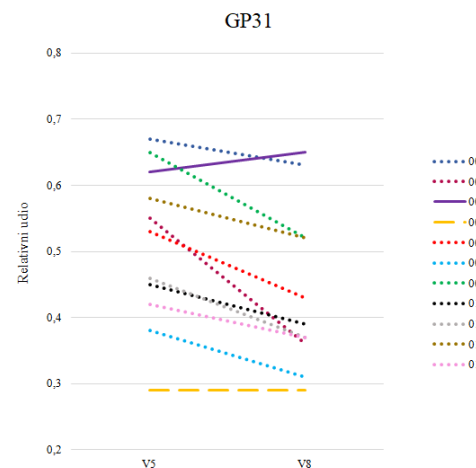
**Slika 11.c**



**Slika 11.d**

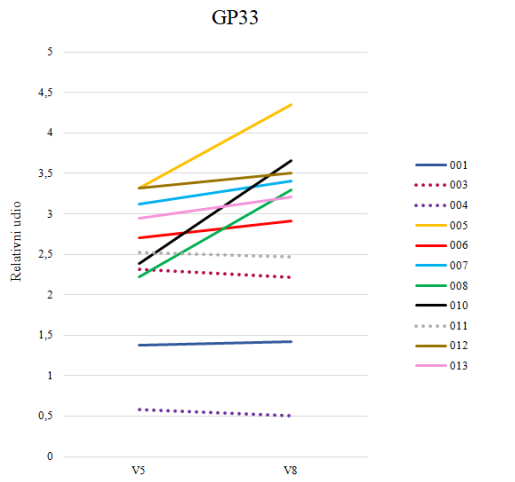


**Slika 11.e**

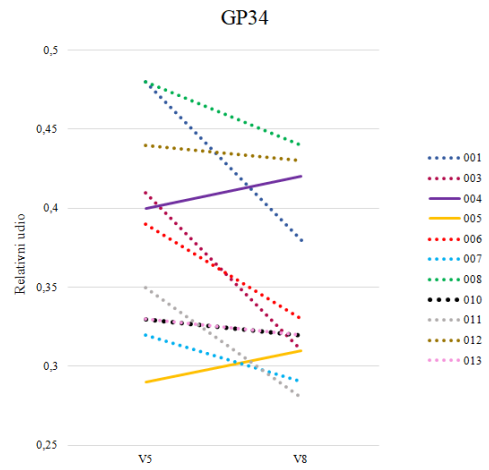


**Slika 11.f**

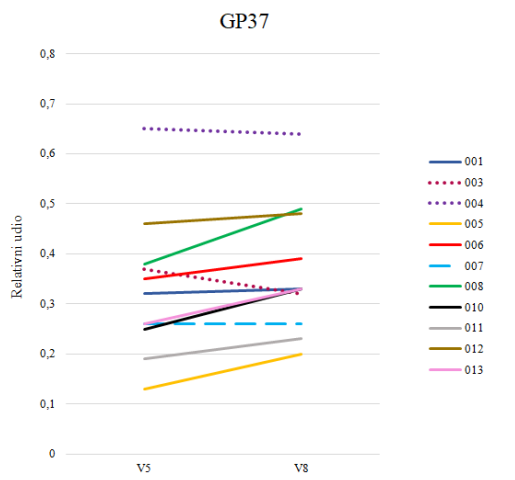




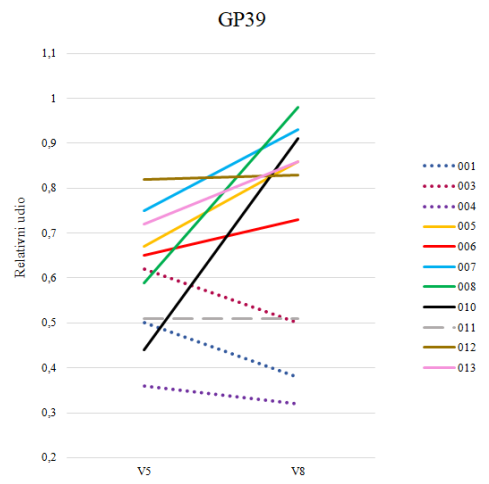
**Slika 11.g**



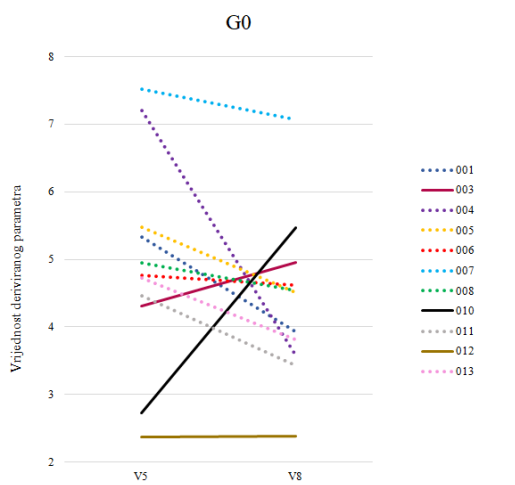
**Slika 11.h**



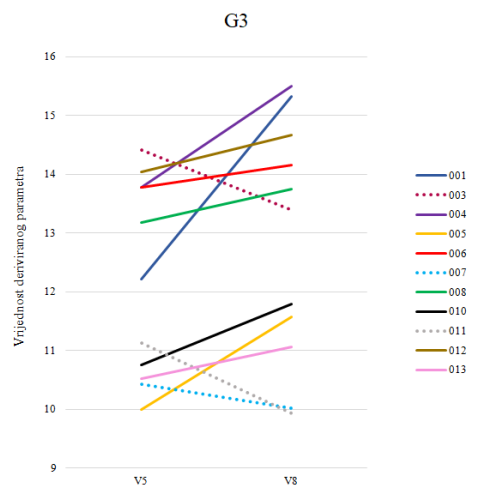
**Slika 11.i**



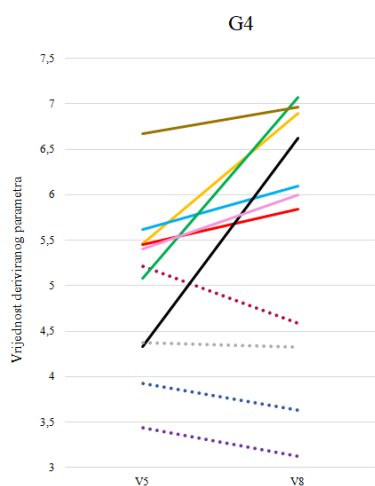
**Slika 11.j**



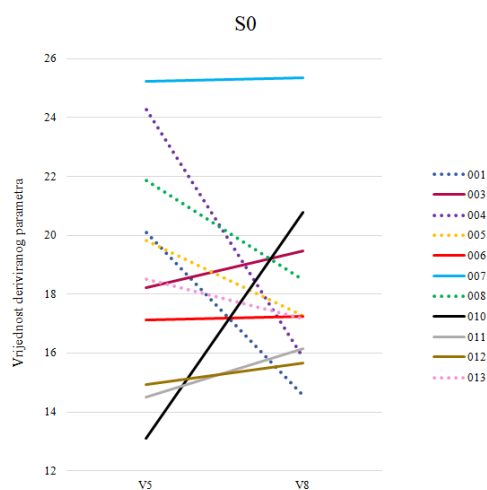
**Slika 11.j**



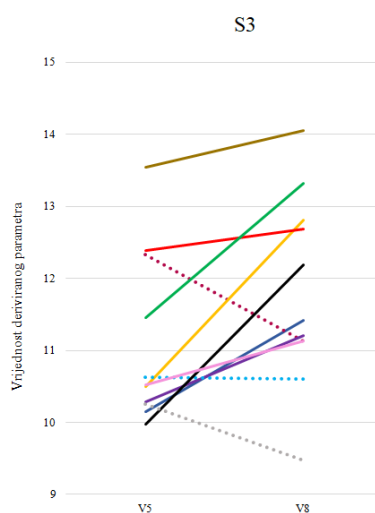
**Slika 11.k**



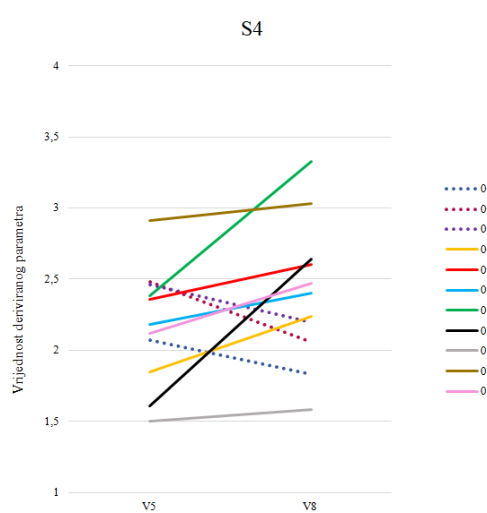
**Slika 11.l**



**Slika 11.m**



**Slika 11.n**



**Slika 11.o**

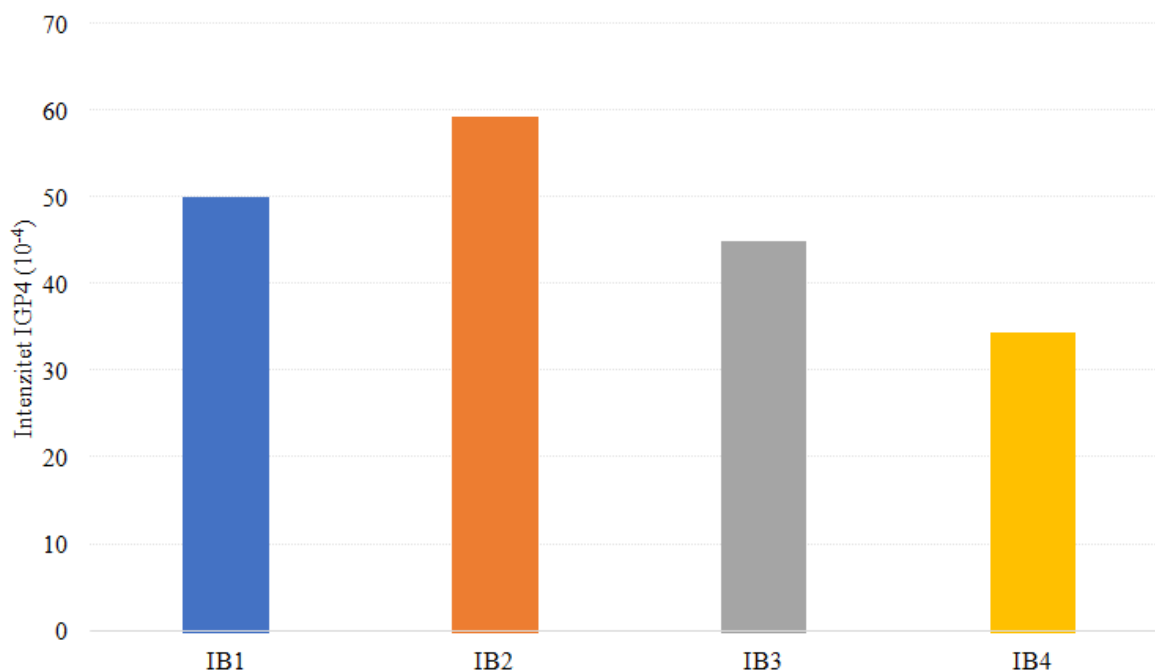
**Slika 11.** Slikovni prikazi promjena prosječnih relativnih udjela N-glikanskih struktura plazmatskih glikoproteina u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka i prosječnih vrijednosti njihovih deriviranih glikanskih parametara kod kojih je taj stupanj promjene najviše izražen. Porast relativnog udjela ističe se kod GP18 (**Slika 11.b**), GP24 (**Slika 11.d**), GP29 (**Slika 11.e**), GP33 (**Slika 11.g**), GP37 (**Slika 11.i**) i GP39 (**Slika 11.j**) te tri- i tetragalaktoziliranih i sijaliziranih glikana (G3 (**Slika 11.k**), G4 (**Slika 11.l**), S3 (**Slika 11.n**), S4(**Slika 11.o**)), a pad kod GP1 (**Slika 11.a**), GP22 (**Slika 11.c**), GP31 (**Slika 11.f**) i GP34 (**Slika 11.h**) te kod asijaliziranih (S0) (**Slika 11.m**) i agalaktoziliranih glikana (G0) (**Slika 11.j**).

## 4.2. Testiranje utjecaja korištenog potrošnog materijala u analizi glikozilacije imunoglobulina G

Fluorescentno obilježeni glikani IgG-a analizirani su kromatografskom metodom HILIC-UPLC nakon testiranja dviju vrsta pločica za sakupljanje uzoraka. Svaka pločica podijeljena je na dvije serije uzoraka koje se međusobno razlikuju po intenzitetu resuspendiranja prilikom dodavanja otopine SDS-a u jažice sa osušenim IgG-om. U prve dvije serije (IB1, IB2) ispituje se rutinski korištena pločica za sakupljanje uzoraka (Waters, Milford, SAD). Dok se u prvoj seriji (IB1) otopina SDS-a dodaje uzorku uz blago resuspendiranje, u drugoj seriji uzoraka (IB2) resuspendiranje pipetom je intenzivnije i temeljitije. U druge dvije serije (IB3, IB4) ispituje se „*low-bind*“ pločica za sakupljanje uzoraka (Eppendorf, SAD). Postupak resuspendiranja treće serije (IB3) jednak je prvoj seriji uzoraka, a postupak resuspendiranja četvrte serije (IB4) jednak je drugoj seriji uzoraka. Detaljan opis cijelog postupka nalazi se u poglavlju 3.3. (METODE). Za potrebe ispitivanja, u sve četiri serije uzoraka koristi se isti uzorak IgG-a s točno definiranom koncentracijom.

Visokoprotočnom metodom analize, N-glikani IgG-a razdvojeni su u 24 (IGP1-IGP24) kromatografska pika, relativno kvantificiranih na način da svaki pik predstavlja određeni udio ukupne površine kromatograma, odnosno on predstavlja udio određenog N-glikana (ili više njih) u ukupnom N-glikomu analiziranog uzorka (Pavić i sur., 2018).

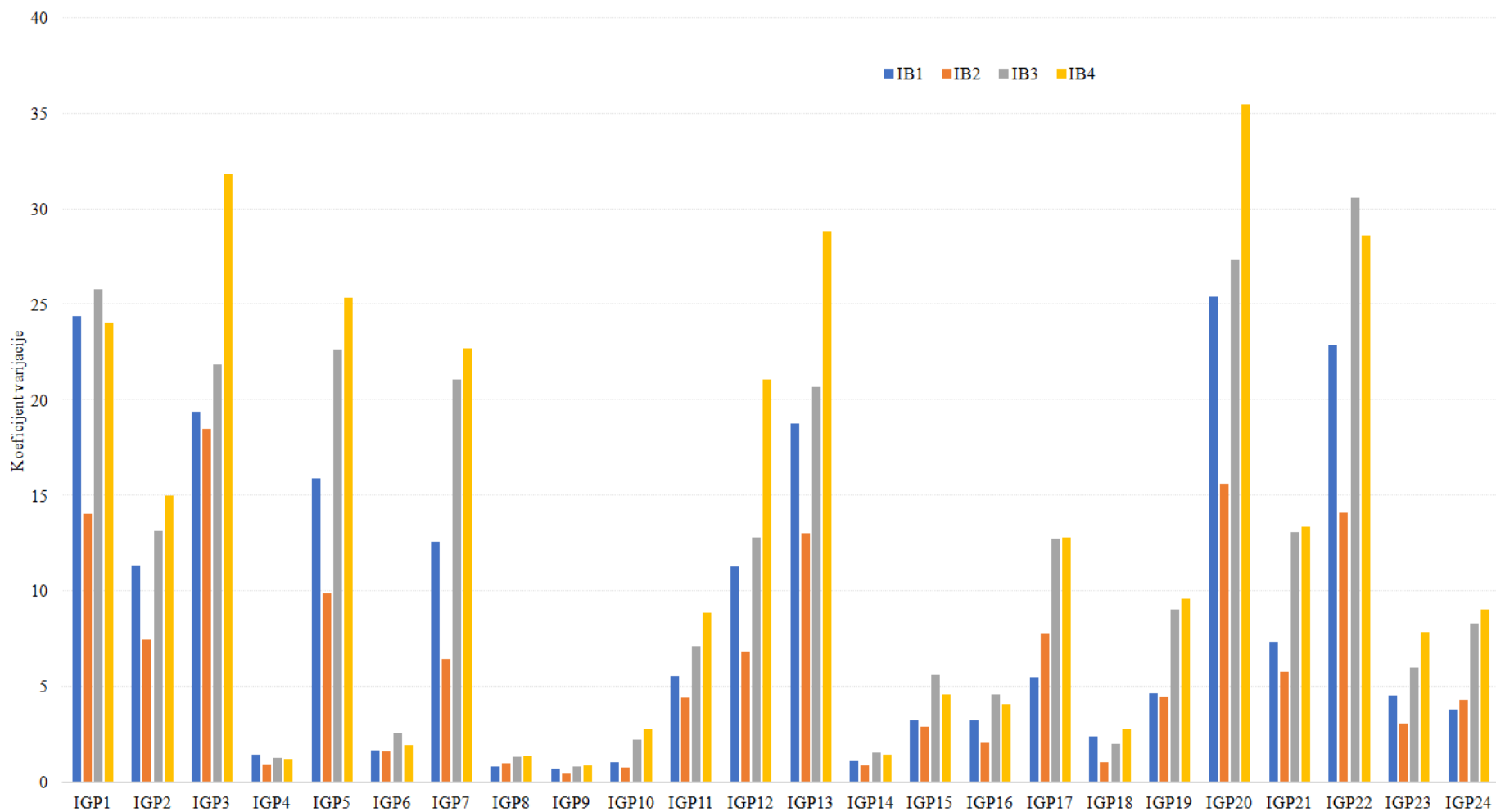
Svakoj seriji (IB1-IB4) pripada ukupno 48 uzoraka, odnosno polovica jažica od ukupno 96, koliko ih sadrži svaka testirana pločica za sakupljanje uzoraka. Uspoređena su sva četiri različita uvjeta pripreme glikana IgG-a prema intenzitetu najvećeg pika, što je u ovom slučaju IGP4. Intenzitet fluorescencije (detekcijski signal) najvećeg pika predstavlja, na neki način, mjeru osjetljivosti metode i upućuje nas na odabir najpovoljnijeg uvjeta pripreme kod analize glikana. Aritmetičke sredine intenziteta IGP4 izračunate su iz 48 vrijednosti dobivenih iz 48 uzoraka svake od četiri serije IB1-IB4 (**Slika 12**).



**Slika 12.** Srednje vrijednosti intenziteta IGP4 iz svake serije uzoraka (IB1-IB4).

Kada analiziramo određene podatke, nastojimo koristiti onu metodu koja bi nam omogućavala stalno dobivanje istih rezultata, odnosno želimo da je koeficijent varijacije između rezultata malen. Koeficijent varijacije predstavlja mjeru disperzije ili, jednostavnije rečeno, prosječno odstupanje od prosjeka, a jednak je omjeru standardne devijacije dobivenih vrijednosti i njihove aritmetičke sredine. U mnogim laboratorijima koristi se kao prikaz varijabilnosti metoda ili ispitivanja kojima se dobivaju jednake vrste rezultata, a za razliku od srednje vrijednosti, omogućava usporedbu te varijabilnosti neovisno o ukupnoj koncentraciji uzorka (Parsons i sur., 2009; Reed i sur., 2002).

Izračuni koeficijenta varijacije relativnih udjela za svaki od 24 glikanska kromatografska pika, u 48 ispitivanih uzoraka, za četiri testirana uvjeta pripreme glikana (IB1-IB4), prikazani su na **Slici 13**.



**Slika 13.** Koefficijent varijacije relativnih udjela za svaki od 24 kromatografska pika, u 48 ispitivanih uzoraka, za četiri testirana uvjeta pripreme glikana (IB1-IB4).

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Utjecaj korištenog potrošnog materijala u analizi N-glikozilacije imunoglobulina G

Rezultati eksperimenta ukazuju na to da se intenzivnim i temeljitim resuspendiranjem uzoraka koji se nalaze u rutinski korištenoj pločici za sakupljanje uzoraka (Waters, Milford, SAD), prilikom dodavanja otopine SDS-a, dobije najbolji odgovor detekcijskog uređaja, odnosno da se u uzorcima obrađenima na taj način (serija uzoraka IB1) na kraju analize nalazilo najviše oslobođenih i obilježenih N-glikana.

Ono što nije utvrđeno eksperimentom nad pločicama jest točnost u postizanju rezultata. S obzirom na nepristupačnost standardnih uzoraka za svaki pojedini glikanski pik u kromatogramu, isključivo temeljem usporedbi dobivenih vrijednosti, može se pretpostaviti koja bi metoda bila optimalna za analizu. Korištenjem rutinskog postupka analize, nastoji se postići reproducibilnost rezultata, odnosno da se oni mogu međusobno usporediti neovisno o dobivenim vrijednostima koncentracije N-glikana.

Mjerenjem istog uzorka 48 puta pri identičnim uvjetima, odredila se reproducibilnost metode. Korištenjem koeficijenta varijacije uočeno je najbolje podudaranje dobivenih rezultata kod serije IB2 jer je vrijednost koeficijenta najmanja za gotovo svaki kromatografski pik.

Način pripreme uzoraka koji je pokazao najbolju osjetljivost i reproducibilnost jest onaj, prethodno definiran u protokolima visokoprotodne metode analize glikoma, a uključuje rutinski korištenu pločicu za sakupljanje uzoraka (Waters, Milford, SAD). Kada se u njenim jažicama nalazi osušeni IgG, dodatkom otopine SDS-a, neophodno je izvršiti temeljito i intenzivno resuspendiranje uzoraka pipetom. Time se smanjuju gubitci koji nastaju vezanjem IgG-a za unutarnju površinu jažica. Navedena priprema uzoraka odabrana je kao najpogodnija u predanalitičkom koraku analize i svi su daljnji eksperimenti provedeni na taj način.

## 5.2. Promjene N-glikanskih obrazaca imunoglobulina G i glikoproteina plazme

U ovom radu istraživane su promjene u N-glikozilaciji imunoglobulina G i ukupnih glikoproteina plazme ispitanika podvrgnutih ugradnji želučane prenosnice, uzorkovanih neposredno prije i šest mjeseci nakon operacije. Dobiveni rezultati ukazuju na to da barijatrijskim zahvatom dolazi do promjene N-glikoma plazmatskih glikoproteina i IgG-a, međutim, opažene su promjene izvan granica statističke značajnosti, najvjerojatnije zbog vrlo malenog broja analiziranih uzoraka. Neke promjene bile su značajne, ali isključivo prije Bonferronijeve korekcije na višestruko testiranje.

Istraživanje ima brojne limitirajuće čimbenike od kojih su najvažniji upravo ti da je provedena na vrlo malenom broju ispitanika, homogenih prema više kriterija, u relativno kratkom vremenskom periodu (gotovo sve p-vrijednosti su iznad statistički značajne granične vrijednosti). Nije ustvrđeno koliko su relevantni dobiveni rezultati kod postizanja mnogo većeg gubitka tjelesne mase, posebice ako se radi o nekim drugim metodama mršavljenja, te nije specificirano koji oblik zahvata je proveden nad pacijentima. Također nije poznato koji su načini kontrole bolesti prethodili operaciji i kakav je bio njihov učinak na kontrolu razine šećera u krvi. Takvi podatci su važni jer navedeni parametri imaju određeni utjecaj na promjene u glikomu IgG-a i glikoproteina plazme (Lyons i sur., 2015). Također se mora uzeti u obzir da metoda koju koristimo za analizu IgG glikoma ne razlučuje glikane vezane na različite regije na protutijelu (Holland i sur., 2006). Jedinu snagu dokaza samoj studiji daje činjenica da su pojedine osobe same sebi kontrola.

Plazma je izuzetno kompleksan medij i ono što je vrlo važno uzeti u obzir jest činjenica da nije točno utvrđeno jesu li promjene u N-glikomu uzoraka plazme posljedica promjene glikozilacije individualnih proteina ili su rezultat promjene njihovih koncentracija u plazmi (Pavić i sur., 2018). Velika većina N-glikana detektiranih u uzorku plazme potječe od IgG-a, transferina, haptoglobina i  $\alpha$ 1-kiselog glikoproteina (Ercan i sur., 2010) što ukazuje na činjenicu da su promjene N-glikoma plazme vjerojatno posljedica promjena glikozilacije, odnosno koncentracije nekih od tih glikoproteina. Suprotno od N-glikoma IgG-a, N-glikani proteina plazme nisu sasvim slijedili očekivane obrasce promjene koji prate upalna stanja u organizmu.

### 5.2.1. Promjene u N-glikomu imunoglobulina G

Istraživanja su pokazala da odsustvo sržne fukoze na N-glikanima IgG-a ima proupalni učinak. Analizom rezultata našeg istraživanja uočen je nešto veći porast u relativnim udjelima N-glikana s fukozom vezanom  $\alpha$ 1,6 glikozidnom vezom za unutrašnji GlcNAc (IGP15 (**Slika 10.e**), IGP10 i IGP16). Upravo te strukture su i galaktozilirane, što je također jedna od karakteristika protuupalnog IgG-a (Collins i sur., 2013). Od fukoziliranih N-glikana kojima relativni udio pada jest IGP4 (**Slika 10.c**), ali ono što se mora uzeti u obzir jest vrlo visok udio strukture koja ga sačinjava (FA2) u N-glikomu IgG-a, što bitno utječe na povećanje njegove statističke značajnosti u studijama.

Aktivnost  $\alpha$ 1,6-fukozil-transferaze koja katalizira reakciju vezanja sržne fukoze kompetitivno je inhibirana prethodnim vezanjem GlcNAc-a za manozu koja se nalazi na mjestu račvanja dviju grana u osnovnoj glikanskoj strukturi (Schachter, 1986). Upravo zato se padom relativnih udjela glikana sa sržnom fukozom (IGP4) (**Slika 10.c**) očekuje porast onih s račvujućim GlcNAc-om. To je vidljivo i iz prikazanih rezultata gdje se uočila nešto veća promjena u porastu relativnog udjela takvih glikanskih struktura na IgG-u (porast IGP10, IGP15 (**Slika 10.e**) i IGP22 (**Slika 10.g**) te povećanje vrijednosti deriviranog glikanskog parametra B (eng. *bisecting*, B)). Iako su takve glikanske strukture povezane s proupalnim djelovanjem IgG-a, ono nije u tolikoj mjeri izraženo kao kod nedostatka sržne fukoze (Shinkawa i sur., 2003), a njihova točna uloga u bolestima još uvijek je nepoznata te se intenzivno istražuje.

Nadalje, da se proupalni potencijal IgG-a smanjio, vidljivo je iz rezultata koji ukazuju na povećanje relativnih udjela sijaliziranih N-glikana (**Slika 10.j**). Od individualnih N-glikanskih struktura koje sadrže sijalinsku kiselinu jedino IGP22 (**Slika 10.g**), kao disijaliziran nefukozilirani, i IGP16, kao monosijaliziran fukozilirani N-glikan, pokazuju nešto značajniju promjenu.

Ono što je suprotno od očekivanog sudeći po dosadašnjim studijama (Barrios i sur., 2016; Vučković i sur., 2015; Vučković i sur., 2016; Wang i sur., 2016) jest porast fukozilacije u strukturama s račvujućim GlcNAc-om. U studijama koje su proučavale upalne i autoimune bolesti također dolazi do porasta struktura s navedenim obrascem te se u našim rezultatima očekivalo njihovo smanjenje. No, s obzirom na to da se radi o istraživanjima na sasvim



drugačijim stanjima u organizmu i različitim profilima ispitanika, teško je uspoređivati navedene rezultate.

Prema daljnjim rezultatima analize, opažen je porast relativnih udjela galaktoziliranih glikoformi IgG-a (**Slika 10.h**), odnosno pad agalaktoziliranih (**Slika 10.i**), što ukazuje na povećanje protuupalnog djelovanja IgG-a. To je vidljivo i iz nešto značajnijeg porasta relativnih udjela IGP12 (**Slika 10.d**), IGP15 (**Slika 10.e**) i IGP22 (**Slika 10.g**), od kojih su svi redom digalaktozilirani te IGP10 i IGP16 koji su monogalaktozilirani. Točan mehanizam pada galaktozilacije u upalnim bolestima još uvijek nije poznat, no smatra se da je uzrok tome smanjena aktivnost galaktoziltransferaza i glikoziltransferaza iz B-limfocita (Furukawa i sur., 1990). Naime, upravo upala ima veliki utjecaj na njihovo sazrijevanje i diferencijaciju, što je dokazano istraživanjima na TNF- $\alpha$ , jednom od važnih biomarkera upale (de Luca i Olefsky, 2008; Jelinek i Lipsky, 1987).

Na galaktozilaciju N-glikana IgG-a velik utjecaj imaju i spolni hormoni što se mora uzeti u obzir ukoliko su ispitanici osobe obaju spolova (Ercan i sur., 2017). Iako je, prema statističkoj analizi podataka, nedostatak ovog istraživanja njegova homogenost s obzirom na spol, u ovom slučaju to je prednost jer dodatne korekcije rezultata u odnosu na spolne hormone nisu bile potrebne. Pad galaktozilacije prati i razdoblje menopauze (Kristić i sur., 2014), ali nije poznato nalazi li se neka od ispitanica u navedenom stanju pa se korekcija rezultata nije mogla izvršiti niti prema tom parametru.

Nakon provedene operacije, došlo je do pada tjelesne težine, a posljedično i BMI vrijednosti. Pokazalo se da osobe s višim BMI indeksom imaju snižene razine galaktozilacije IgG-a (Perković i sur., 2014), a upravo tu korelaciju možemo uočiti i u rezultatima ove studije, iako nije ispitana njena statistička značajnost, što bi moglo biti tema nekog budućeg istraživanja.

### 5.2.2. Promjene u N-glikomu glikoproteina plazme

U upalnim stanjima organizma i bolesti opažen je porast fukozilacije N-glikana proteina plazme (Miyoshi i sur., 2012; Takahashi i sur., 2009). U odsustvu upale, preko 70 % IgG-a je sržno fukozilirano (Arnold i sur., 2007) što bitno utječe na njegovu funkciju, dok je kod proteina plazme najzastupljenija biantenarna digalaktozilirana i disijalizirana struktura bez sržne fukoze (Doherty, 2018). U rezultatima je uočen porast udjela takve strukture (GP18) (**Slika 11.b**) te smanjenje udjela slične strukture s dodatkom sržne fukoze (GP22) (**Slika**

**11.c).** Navedene promjene su jedine koje nose neku relativnu važnost s obzirom na ostale koje obuhvaćaju prisustvo ili odustvo sržne fukoze.

Fukozilacija triantenarnih N-glikana plazmatskih proteina u pozitivnoj je korelaciji s biomarkerima upale (Clerc i sur., 2018; Knežević i sur., 2010), no prema našim rezultatima dolazi do njihovog porasta (GP29 (**Slika 11.e**) i pada (GP31 (**Slika 11.f**) te je nemoguće donijeti smislene zaključke na temelju promjene udjela samo dva kromatografska pika, uzevši u obzir i činjenicu da nema statističke značajnosti navedenih podataka.

Za GP1, koji pretežno sadrži biantenarnu, sržno fukoziliranu strukturu, uočen je porast vrijednosti kod pacijenata s različitim tipovima karcinoma (Doherty i sur., 2018). Zbog njegove velike učestalosti na IgG-u, smatra se da je u uzorku plazme pretežno podrijetlom s njegove površine te, s obzirom na uočeno smanjenje IGP4 (**Slika 10.c**), bilježimo pad GP1 (**Slika 11.a**) u našim rezultatima analize.

Prethodnim studijama dokazano je da su tri- i tetrasijalizirani N-glikani proteina plazme povišeni u upalnim bolestima (Clerc i sur., 2018; Keser i sur., 2017; Novokmet i sur., 2014; Trbojević-Akmačić i sur., 2018; Zhang i sur., 2019), kod različitih karcinoma, a pokazuju i pozitivnu korelaciju s koncentracijom CRP-a (Doherty i sur., 2018). Objašnjenje leži u činjenici da takvi N-glikani često imaju dodanu  $\alpha$ 1,3-vezanu fukozu čime se inicira nastanak antigene strukture nazvane sijalil Lewis X. Upravo u upalnim bolestima dolazi do porasta koncentracija plazmatskih proteina koji sadrže takve strukture, posebice proteina akutne faze (npr.  $\alpha$ 1-kiselog glikoproteina), zbog njihove regulatorne uloge u kemotaksiji leukocita (Brinkman-van der Linden EC i sur., 1998; Gornik i Lauc, 2008). Iz navedenih saznanja, logično je da bi smanjenjem upale udjeli sijaliziranih višestruko razgranatih glikana trebali padati (Collins i sur., 2013). Međutim, ishod naše studije neočekivano ukazuje na porast udjela tri- i tetrasijaliziranih glikana (S3 (**Slika 11.n**), S4 (**Slika 11.o**)) te onih višestruko razgranatih (HB), a pad udjela asijaliziranih N-glikanskih struktura (S0) (**Slika 11.m**), premda uočene promjene nisu bile statistički značajne. Što se sijalil Lewis X antigena tiče, vidi se porast u relativnom udjelu GP39 (**Slika 11.j**). Zanimljivi rezultati dobiveni su jednim istraživanjem u kojem se proučavala glikozilacija plazmatskih proteina u multiplom mijelomu. Uočen je pad relativnih udjela trostruko razgranatih N-glikanskih struktura dok se relativni udjeli tetraantenarnih gotovo nisu promijenili. Smatra se da je uzrok tome izrazito povećana koncentracija IgG-a u multiplom mijelomu, čime njegovi biantenarni N-glikani uvelike nadmašuju koncentracije ostalih N-glikana proteina plazme (Zhang i sur., 2019).

Dakle, odgovor na pitanje jesu li promjene u N-glikomu visokospecifične za određeno stanje organizma ili ih se može promatrati kao uvriježene obrasce ostaje nepoznat i zahtijeva još mnoštvo dodatnih istraživanja.

Porast sijalizacije biantenarnih sržno fukoziliranih N-glikana uočen je u akutnim (Novokmet i sur., 2014) i kroničnim upalnim bolestima, npr. u upalnim bolestima crijeva (Clerc i sur., 2018). Prema tome, pretpostavlja se pad njihovih udjela ukoliko se upala smanji, što je vidljivo prema ponašanju GP22 (**Slika 11.c**).

U multiplom mijelomu povećana je sijalizacija triantenarnih fukoziliranih N-glikana što se može povezati s upalnim promjenama do kojih dolazi progresijom bolesti (Zhang i sur., 2019). Pad u relativnim udjelima takvih struktura zabilježen je kod anti-TNF terapije u liječenju reumatoidnog artritisa (Collins i sur., 2013). U rezultatima ove studije dolazi do porasta (GP29 (**Slika 11.e**)) i pada (GP31 (**Slika 11.f**)) udjela sijaliziranih triantenarnih fukoziliranih N-glikana. Teško je donijeti točan zaključak o ponašanju takvih glikanskih struktura nakon zahvata provedenog nad ispitanicima ovog istraživanja upravo zbog malog broja relevantnih glikanskih pikova i slabe statističke značajnosti u analizi podataka.

Uočeno je povećanje galaktozilacije N-glikana proteina plazme prema porastu udjela di- i trigalaktoziliranih struktura (G3 (**Slika 11.l**), i G4 (**Slika 11.k**)) te prema padu agalaktoziliranih glikoformi (G0 (**Slika 11.j**)). Istovremeno s uočenim porastom koncentracije CRP-a, jednog od važnih biomarkera upale (McGarrah i sur., 2017), došlo je do pada u galaktozilaciji N-glikana serumskih glikoproteina (Collins i sur., 2013), a slični rezultati su primjećeni i kod drugih upalnih i autoimunih bolesti (Doherty i sur., 2018; Gornik i Lauc, 2008; Vučković i sur., 2015). Dobiveni rezultati ove studije u skladu su s potvrđenim protuupalnim učinkom galaktoze (Perković i sur., 2014).

Do pada u relativnim udjelima oligomanoznih struktura (HM) dolazi kod pacijenata oboljelih od multiplog mijeloma, a pretpostavlja se da razlog tome leži u smanjenoj glikozilaciji onih proteina plazme kojima takvi N-glikani sačinjavaju visok udio glikoma, a to su  $\alpha$ 2-makroglobulin, apolipoprotein B-100 te IgD, IgE i IgM (Zhang i sur., 2019). Točna uloga oligomanoznih tipova N-glikana nije poznata te se intenzivno proučava. Uočen je njihov porast u oboljelih od karcinoma dojke (de Leoz i sur., 2011) te su kao sržno fukozilirane strukture u većoj količini detektirani kod karcinoma (Balog i sur., 2012). U rezultatima naše studije dolazi do pada vrijednosti deriviranog glikanskog parametra HM što je u skladu s pretpostavkom da se takve strukture povećavaju u bolestima i upalnim procesima.

## 6. ZAKLJUČCI

Nove pločice koje su trebale poslužiti za optimizaciju metode i dobivanje točnijih rezultata podbacile su nad rutinski korištenom pločicom za sakupljanje uzoraka. Povećana hidrofilnost materijala možda i dovodi do smanjenog vezanja IgG-a, ali vrlo vjerojatno pojačano veže oslobođene, izrazito hidrofilne N-glikane, čime uvelike utječe na krajnje rezultate u negativnom smislu. Zaključak eksperimenta jest da nove pločice nisu zadovoljile potrebe koje analiza zahtijeva te se u daljnjem ispitivanju N-glikoma IgG-a ostaje pri već uvriježenom procesu analize.

Koliko je poznato, ovo je prva studija u kojoj se istražilo kako kirurško liječenje debljine utječe na promjenu glikozilacije IgG-a i glikoproteina plazme. S obzirom na to da se primarno htjelo saznati dolazi li do smanjenja kronične upale u organizmu, najvažnije promjene u N-glikomu IgG-a jesu one koje ukazuju na smanjenje njegovog proupalnog potencijala, a uključuju porast udjela struktura koje sadrže sržnu fukozu te onih s terminalno vezanom galaktozom i sijalinskom kiselinom. Smanjenje upale na razini glikoproteina plazme uočeno je padom sijalizacije biantenarnih sržno fukoziliranih struktura, povećanjem galaktozilacije većine N-glikana te smanjenjem udjela oligomanoznih struktura u ukupnom N-glikomu proteina plazme. Nažalost, nisu svi rezultati u potpunosti slijedili očekivane obrasce promjene koji prate pad upale u organizmu.

Ono što se postiglo ovim istraživanjem jest uvid u korist koju bi mogla postići mnogo veća studija te se uočila potreba za njenim provođenjem jer nam dobiveni rezultati, zbog ograničenog broja ispitanika, mogu služiti samo kao naznaka da zaista dolazi do smanjenja upale u organizmu barijatrijskim zahvatom. Uključivanjem više osoba u istraživanje, rezultati bi postali statistički značajniji i moglo bi se sa određenom sigurnošću pretpostaviti korist provođenja barijatrijskog zahvata kod pretilih ljudi. Ukoliko bi se takvim istraživanjima postigli slični ili bolji rezultati od onih dobivenih ovom studijom, moglo bi se raspravljati i o promjenama indikacija za navedeni operativni zahvat, odnosno njegovo uvođenje pri nižim BMI vrijednostima kod pretilih osoba, naročito onih oboljelih od dijabetesa tipa 2, s obzirom na sve dugotrajne koristi koje se njime dokazano postižu.

Dobiveni rezultati samo su jedni u nizu onih koji ukazuju na obećavajuću ulogu N-glikana kao biomarkera koji bi se koristio u prognostičke, dijagnostičke i terapijske svrhe. Porastom broja studija koje proučavaju njihovo ponašanje u mnogim bolestima, otkrivaju se sve

delikatnije i specifičnije promjene N-glikoma te je pitanje vremena kada će se svaka od tih promjena moći točno detektirati, locirati i povezati s određenim inicijalnim događajem u organizmu oboljelih osoba.

## 7. LITERATURA

Abbasi J. Unveiling the „Magic“ of Diabetes Remission After Weight-Loss Surgery. *The Journal of the American Medical Association*, 2017, 317(6), 571

Adua E, Russell A, Roberts P, Wang Y, Song M, Wang W. Innovation Analysis on Postgenomic Biomarkers: Glycomics for Chronic Diseases. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 2017, 21(4), 183-196

Akinkuolie AO, Buring JE, Ridker PM, Mora S. A Novel Protein Glycan Biomarker and Future Cardiovascular Disease Events. *Journal of the American Heart Association*, 2014, 3(5), e001221

Akinkuolie AO, Glynn RJ, Padmanabhan L, Ridker PM, Mora S. Circulating N-Linked Glycoprotein Side-Chain Biomarker, Rosuvastatin Therapy, and Incident Cardiovascular Disease: An Analysis From the JUPITER Trial. *Journal of the American Heart Association*, 2016, 5(7), e003822

Akinkuolie AO, Pradhan AD, Buring JE, Ridker PM, Mora S. Novel Protein Glycan Side-Chain Biomarker and Risk of Incident Type 2 Diabetes Mellitus. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2015, 35(6), 1544-1550

Alissa EM, Maisa'a M, Alama NA, Ferns GA. Role of omentin-1 and C-reactive protein in obese subjects with subclinical inflammation. *Journal of Clinical & Translational Endocrinology*, 2016, 3, 7-11

Anthony RM, Kobayashi T, Wermeling F, Ravetch JV. Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature*, 2011, 475(7354), 110-113

Armstrong RA. When to use the Bonferroni correction. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 2014, 34(5), 502-508

Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. *Annual Review of Immunology*, 2007, 25(1), 21-50

Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I, Boomsma D, Heid IM, Pramstaller PP, Penninx BW, Janssens AC, Wilson JF, Spector T, Martin NG, Pedersen NL, Kyvik KO, Kaprio J, Hofman A, Freimer NB, Jarvelin MR, Gyllensten U, Campbell H, Rudan I, Johansson A, Marroni F,

Hayward C, Vitart V, Jonasson I, Pattaro C, Wright A, Hastie N, Pichler I, Hicks AA, Falchi M, Willemsen G, Hottenga JJ, de Geus EJ, Montgomery GW, Whitfield J, Magnusson P, Saharinen J, Perola M, Silander K, Isaacs A, Sijbrands EJ, Uitterlinden AG, Witteman JC, Oostra BA, Elliott P, Ruukonen A, Sabatti C, Gieger C, Meitinger T, Kronenberg F, Döring A, Wichmann HE, Smit JH, McCarthy MI, van Duijn CM, Peltonen L; ENGAGE Consortium. Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nature Genetics*, 2008, 41(1), 47-55

Axford JS. Glycosylation and rheumatic disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1999, 1455(2-3), 219-229

Badawi A, Klip A, Haddad P, Cole DE, Bailo BG, El-Sohehy A, Karmali M. Type 2 diabetes mellitus and inflammation: Prospects for biomarkers of risk and nutritional intervention. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 2010, 3, 173-186

Balog CI, Stavenhagen K, Fung WL, Koeleman CA, McDonnell LA, Verhoeven A, Mesker WE, Tollenaar RA, Deelder AM, Wuhrer M. N-glycosylation of colorectal cancer tissues: a liquid chromatography and mass spectrometry-based investigation. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012, 11(9), 571-585

Barbucci R, Magnani A. Conformation of human plasma proteins at polymer surfaces: the effectiveness of surface heparinization. *Biomaterials*, 1994, 15, 955-962

Barijatrijska kirurgija, <http://hdd-hlz.org>, pristupljeno 23.4.2019.

Barrios C, Zierer J, Gudelj I, Štambuk J, Ugrina I, Rodríguez E, Soler MJ, Pavić T, Šimurina M, Keser T, Pučić-Baković M, Mangino M, Pascual J, Spector TD, Lauc G, Menni C. Glycosylation Profile of IgG in Moderate Kidney Dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2016, 27(3), 933-941

Bell JD, Brown JCC, Nicholson JK, Sadler PJ. Assignment of resonances for 'acute-phase' glycoproteins in high resolution proton NMR spectra of human blood plasma. *FEBS Letters*, 1987, 215(2), 311-315

Body mass index – BMI, <http://www.euro.who.int>, pristupljeno 8.4.2019.

Boersema PJ, Mohammed S, Heck AJR. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2008, 391(1), 151-159

Bremer MEGE. Immunoglobulin adsorption on modified surfaces. Netherlands, Wageningen University-dizertacija, 2001

Brinkman-van der Linden EC, de Haan PF, Havenaar EC, van Dijk W. Inflammation-induced expression of sialyl LewisX is not restricted to alpha1-acid glycoprotein but also occurs to a lesser extent on alpha1-antichymotrypsin and haptoglobin. *Glycoconjugate Journal*, 1998, 15(2), 177-182

Buchwald H, Estok R, Fahrback K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ, Bantle JP, Sledge I. Weight and Type 2 Diabetes after Bariatric Surgery: Systematic Review and Meta-analysis. *The American Journal of Medicine*, 2009, 122(3), 248-256

Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) - a powerful separation technique. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2012, 402(1), 231-247

Campbell MP, Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM. GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis. *Bioinformatics*, 2008, 24(9), 1214-1216

Cătoi AF, Pârvu A, Mureșan A, Busetto L. Metabolic Mechanisms in Obesity and Type 2 Diabetes: Insights from Bariatric/Metabolic Surgery. *Obesity Facts*, 2015, 8(6), 350-363

Chondronikola M, Harris LLS, Klein S. Bariatric surgery and type 2 diabetes: are there weight loss-independent therapeutic effects of upper gastrointestinal bypass? *Journal of Internal Medicine*, 2016, 280(5), 476-486

Clerc F, Novokmet M, Dotz V, Reiding KR, de Haan N, Kammeijer GSM, Dalebout H, Bladergroen MR, Vukovic F, Rapp E; IBD-BIOM Consortium, Targan SR, Barron G, Manetti N, Latiano A, McGovern DPB, Annese V, Lauc G, Wuhrer M. Plasma N-Glycan Signatures Are Associated With Features of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 2018, 155(3), 829-843

Clerc F, Reiding KR, Jansen BC, Kammeijer GSM, Bondt A, Wuhrer M. Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconjugate Journal*, 2015, 33(3), 309-343.

Colditz GA. Weight Gain as a Risk Factor for Clinical Diabetes Mellitus in Women. *Annals of Internal Medicine*, 1995, 122(7), 481-486



Colles SL, Dixon JB, Marks P, Strauss BJ, O'Brien PE. Preoperative weight loss with a very-low-energy diet: quantitation of changes in liver and abdominal fat by serial imaging. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2006, 84(2), 304-311

Collins ES, Galligan MC, Saldo R, Adamczyk B, Abrahams JL, Campbell MP, Ng CT, Veale DJ, Murphy TB, Rudd PM, Fitzgerald O. Glycosylation status of serum in inflammatory arthritis in response to anti-TNF treatment. *Rheumatology (Oxford)*, 2013, 52(9), 1572-1582

Cooper GM, Hausman RE. *The cell: A Molecular Approach, Fourth Edition*. ASM Press, c/o The American Society for Microbiology, 1752 N Street NW, Washington, 2007, 108-111

Cooper S, Bamford CH, Tsuruta T. *Polymer Biomaterials in Solution, as Interfaces and as Solids: A Festschrift Honoring the 60th Birthday of Dr. Allan S. Hoffman, 1st Edition*, Utrecht, the Netherlands, CRC Press, 1995, 120-121

Dall'Olio F, Vanhooren V, Chen CC, Slagboom PE, Wuhrer M, Franceschi C. N-glycomic biomarkers of biological aging and longevity: a link with inflammaging. *Ageing Research Reviews*, 2013, 12(2), 685-698

Dati F, Johnson AM, Whicher JT. The Existing Interim Consensus Reference Ranges and the Future Approach. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2001, 39(11), 1134-1136

de Graaf TW, van der Stelt ME, Anbergen MG, van Dijk W. Inflammation-induced expression of sialyl Lewis X-containing glycan structures on alpha 1-acid glycoprotein (orosomuroid) in human sera. *Journal of Experimental Medicine*, 1993, 177(3), 657-666

de Haan N, Reiding KR, Habberger M, Reusch D, Falck D, Wuhrer M. Linkage-specific sialic acid derivatization for MALDI-TOF-MS profiling of IgG glycopeptides. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(16), 8284-8291

de Leoz ML, Young LJ, An HJ, Kronewitter SR, Kim J, Miyamoto S, Borowsky AD, Chew HK, Lebrilla CB. High-mannose glycans are elevated during breast cancer progression. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011, 10(1), M110.002717

de Luca C, Olefsky JM. Inflammation and Insulin Resistance. *FEBS Lett*, 2008, 582(1), 97-105

de Pra M, van Cann B, Sauter P. UHPLC Analysis of 2-AB-labeled Dextran Ladder and Assignment of Glucose Units to Unknown Glycans, Thermo Fisher Scientific, 2016, dostupno na <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/industrial/pharma-biopharma/biopharmaceutical-analytical-testing/glycan-analysis/labeled-glycan-workflow.html>, pristupljeno 20.5.2019.

Dixit C, Vashist SK, MacCraith BD, O’Kennedy R. Evaluation of apparent non-specific protein loss due to adsorption on sample tube surfaces and/or altered immunogenicity. *The Analyst*, 2011, 136(7), 1406

Doherty M, Theodoratou E, Walsh I, Adamczyk B, Stöckmann H, Agakov F, Timofeeva M, Trbojević-Akmačić I, Vučković F, Duffy F, McManus CA, Farrington SM, Dunlop MG, Perola M, Lauc G, Campbell H, Rudd PM. Plasma N-glycans in colorectal cancer risk, *Scientific Reports*, 2018, 8, 8655

Dube DH, Bertozzi CR. Glycans in cancer and inflammation - potential for therapeutics and diagnostics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005, 4(6), 477-488

Edholm D, Kullberg J, Haenni A, Karlsson FA, Ahlström A, Hedber J, Ahlström H, Sundbom M. Preoperative 4-Week Low-Calorie Diet Reduces Liver Volume and Intrahepatic Fat, and Facilitates Laparoscopic Gastric Bypass in Morbidly Obese, 2010, *Obesity Surgery*, 21(3), 345-350

Ercan A, Cui J, Chatterton DE, Deane KD, Hazen MM, Brintnell W, O'Donnell CI, Derber LA, Weinblatt ME, Shadick NA, Bell DA, Cairns E, Solomon DH, Holers VM, Rudd PM, Lee DM. Aberrant IgG galactosylation precedes disease onset, correlates with disease activity, and is prevalent in autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 2010, 62(8), 2239-2248

Ercan A, Kohrt WM, Cui J, Deane KD, Pezer M, Yu EW, Hausmann JS, Campbell H, Kaiser UB, Rudd PM, Lauc G, Wilson JF, Finkelstein JS, Nigrovic PA. Estrogens regulate glycosylation of IgG in women and men. *JCI Insight*, 2017, 2(4), e89703

Esko JD, Selleck SB. Order Out of Chaos: Assembly of Ligand Binding Sites in Heparan Sulfate. *Annual Review of Biochemistry*, 2002, 71(1), 435-471

Esser P. Principles in Adsorption to Polystyrene. Thermo Fischer Scientific Inc., 2010, Technical Bulletin: 06a

Felgner PL, Wilson JE. Hexokinase binding to polypropylene test tubes. Artfactual activity losses from protein binding to disposable plastics. *Analytical Biochemistry*, 1976, 74(2), 631-635

Ferrara C, Stuart F, Sondermann P, Brünker P, Umaña P. The Carbohydrate at FcγRIIIa Asn-162. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 281(8), 5032-5036

Festa A, D'Agostino R Jr, Williams K, Karter A, Mayer-Davis E, Tracy R, Haffner S. The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation. *International Journal of Obesity*, 2001, 25(10), 1407-1415

Fontana L, Villareal DT, Weiss EP, Racette SB, Steger-May K, Klein S, Holloszy JO; Washington University School of Medicine CALERIE Group. Calorie restriction or exercise: effects on coronary heart disease risk factors. A randomized, controlled trial. *The American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2007, 293(1), E197-202

Frayn KN, Coppack SW. Insulin resistance, adipose tissue and coronary heart disease. *Clinical Science*, 1992, 82(1), 1-8

French MAH. *Immunoglobulins in Health and Disease*. Dordrecht, Springer Science + Business Media, 1986, 96

Furukawa K, Matsuta K, Takeuchi F, Kosuge E, Miyamoto T, Kobata A. Kinetic study of a galactosyltransferase in the B cells of patients with rheumatoid arthritis. *International Immunology*, 1990, 2(1), 105-112

Glycan quantification, <https://planetorbitrap.com>, pristupljeno 2.6.2019.

Goebel-Stengel M, Stengel A, Taché Y, Reeve JR. The importance of using the optimal plasticware and glassware in studies involving peptides. *Analytical Biochemistry*, 2011, 414(1), 38-46

Goossens GH. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obesity Facts*, 2017, 10(3), 207-215

Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Disease Markers*, 2008, 25, 267-278

Gornik O, Pavić T, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins - implications on evolution and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2012, 1820(9), 1318-1326

Gornik O, Wagner J, Pučić M, Knežević A, Redžić I, Lauc G. Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology*, 2009, 19(12), 1547-1553

Guile GR, Rudd PM., Wing DR, Prime SB, Dwek RA. A Rapid High-Resolution High-Performance Liquid Chromatographic Method for Separating Glycan Mixtures and Analyzing Oligosaccharide Profiles. *Analytical Biochemistry*, 1996, 240(2), 210-226

Gudelj I, Keser T, Vučković F, Škaro V, Goreta SŠ, Pavić T, Dumić J, Primorac D, Lauc G, Gornik O. Estimation of human age using N-glycan profiles from bloodstains. *The International Journal of Legal Medicine*, 2015, 129, 955-961

Hart GW, Copeland RJ. Glycomics Hits the Big Time. *Cell*, 2010, 143(5), 672-676

Haslam DW, James WPT. Obesity. *The Lancet*, 2005, 366(9492), 1197-1209

Hemström P, Irgum K. Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*, 2006, 29, 1784-1821

Hess C, Winkler A, Lorenz AK, Holecska V, Blanchard V, Eiglmeier S, Schoen AL, Bitterling J, Stoehr AD, Petzold D, Schommartz T, Mertes MM, Schoen CT, Tiburzy B, Herrmann A, Köhl J, Manz RA, Madaio MP, Berger M, Wardemann H, Ehlers M. T cell-independent B cell activation induces immunosuppressive sialylated IgG antibodies. *Journal of Clinical Investigation*, 2013, 123(9), 3788-3796

Higai K, Aoki Y, Azuma Y, Matsumoto K. Glycosylation of site-specific glycans of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1725(1), 128-135

Hlady V, Buijs J. Protein adsorption on solid surfaces. *Current Opinion in Biotechnology*, 1996, 7(1), 72-77

Holland M, Yagi H, Takahashi N, Kato K, Savage CO, Goodall DM, Jefferis R. Differential glycosylation of polyclonal IgG, IgG-Fc and IgG-Fab isolated from the sera of patients with ANCA-associated systemic vasculitis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1760(4), 669-677

Hong J, Lee A, Han H, Kim J. Structural characterization of immunoglobulin G using time-dependent disulfide bond reduction. *Analytical Biochemistry*, 2009, 384(2), 368-370

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 1995, 95(5), 2409-2415

Hotamisligil GS, Shargill N, Spiegelman B. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 1993, 259(5091), 87-91

Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor Necrosis Factor: A Key Component of the Obesity-Diabetes Link. *Diabetes*, 1994, 43(11), 1271-1278.

Huang Z, Raghuwanshi VS, Garnier G. Functionality of Immunoglobulin G and Immunoglobulin M Antibody Physisorbed on Cellulosic Films. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2017, 5, 41

Hube F, Birgel M, Lee YM, Hauner H. Expression pattern of tumour necrosis factor receptors insubcutaneous and omental human adipose tissue: role of obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *European Journal of Clinical Investigation*, 1999, 29(8), 672-678

Huffman JE, Pučić-Baković M, Klarić L, Hennig R, Selman MHJ, Vučković F, Novokmet M, Krištić J, Borowiak M, Muth T, Polašek O, Razdorov G, Gornik O, Plomp R, Theodoratou E, Wright AF, Rudan I, Hayward C, Campbell H, Deelder AM, Reichl U, Aulchenko YS, Rapp E, Wuhrer M, Lauc G. Comparative Performance of Four Methods for High-throughput Glycosylation Analysis of Immunoglobulin G in Genetic and Epidemiological Research. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2014, 13(6), 1598-1610

Jelinek DF, Lipsky PE. Enhancement of human B cell proliferation and differentiation by tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin 1. *The Journal of Immunology*, 1987, 139(9), 2970-2976

Jurić J, Peng H, Song M, Šimunović J, Trbojević-Akmačić I, Hanić M, Zha F, Wang Y, Liu, J, Gao Q, Wang H, Pezer M, Wang W, Lauc G. Immunoglobulin G glycosylation in menstrual cycle. 12th Jenner Glycobiology and Medicine Symposium on Translational glycobiology, From Bench to Bedside, Dubrovnik, Hrvatska, 2017, poster, sažetak, znanstveni

Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*, 2006, 313(5787), 670-673

Karsten CM, Pandey MK, Figge J, Kilchenstein R, Taylor PR, Rosas M, McDonald JU, Orr SJ, Berger M, Petzold D, Blanchard V, Winkler A, Hess C, Reid DM, Majouli IV, Strait RT, Harris NL, Köhl G, Wex E, Ludwig R, Zillikens D, Nimmerjahn F, Finkelman FD, Brown GD, Ehlers M, Köhl J. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nature Medicine*, 2012, 18(9), 1401-1406

Kashyap SR, Gatmaitan P, Brethauer S, Schauer P. Bariatric surgery for type 2 diabetes: Weighing the impact for obese patients. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 2010, 77(7), 468-476

Keser T, Gornik I, Vučković F, Selak N, Pavić T, Lukić E, Gudelj I, Gašparović H, Biočina B, Tilin T, Wennerström A, Männistö S, Salomaa V, Havulinna A, Wang W, Wilson JF, Chaturvedi N, Perola M, Campbell H, Lauc G, Gornik O. Increased plasma N-glycome complexity is associated with higher risk of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2017, 60, 2352-2360

Kirurški zahvati za liječenje debljine, <https://www.cochrane.org/hr>, pristupljeno 23.4.2019.

Knežević A, Gornik O, Polašek O, Pučić M, Redžić I, Novokmet M, Rudd PM, Wright AF, Campbell H, Rudan I, Lauc G. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology*, 2010, 20(8), 959-969

Knežević A, Polašek O, Gornik O, Rudan I, Campbell H, Hayward C, Wright A, Kolčić I, O'Donoghue N, Bones J, Rudd PM, Lauc G. Variability, Heritability and Environmental Determinants of Human Plasma N-Glycome. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8, 694-701

Kobata, A., A retrospective and prospective view of glycopathology, *Glycoconjugate Journal*, 1998, 15, 323-331

Koliaki C, Liatis S, le Roux CW, Kokkinos A. The role of bariatric surgery to treat diabetes: current challenges and perspectives. *BMC Endocrine Disorders*, 2017, 17, 50

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*, 2000, 404(6778), 635-643

Koster A, Stenholm S, Alley DE, Kim LJ, Simonsick EM, Kanaya AM, Visser M, Houston DK, Nicklas BJ, Tylavsky FA. Body fat distribution and inflammation among obese older adults with and without metabolic syndrome. *Obesity*, 2010, 18(12), 2354-2361

Kowalczyk D, Slomkowaki S, Wang FW. Changes in conformation of human serum albumin (HSA) and gamma globulins ( $\gamma$ -G) upon adsorption to polystyrene and poly (styrene/acrolein) latexes: studies by fluorescence spectroscopy. *The Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 1994, 9, 282-309

Kozak RP, Royle L, Gardner RA, Bondt A, Fernandes D.L, Wuhrer M. Improved nonreductive O-glycan release by hydrazinolysis with ethylenediaminetetraacetic acid addition. *Analytical Biochemistry*, 2014, 453, 29-37

Krapp S, Mimura Y, Jefferis R, Huber R, Sondermann P. Structural Analysis of Human IgG-Fc Glycoforms Reveals a Correlation Between Glycosylation and Structural Integrity. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 325(5), 979-989

Krištić J, Vučković F, Menni C, Klarić L, Keser T, Beceheli I, Pučić-Baković M, Novokmet M, Mangino M, Thaqi K. Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. *Journals of Gerontology: Series A. Biological sciences and medical sciences*, 2014, 69(7), 779-789

Lauc G, Huffman JE, Pučić M, Zgaga L, Adamczyk B, Mužinić A, Novokmet M, Polašek O, Gornik O, Krištić J, Keser T, Vitart V, Scheijen B, Uh HW, Molokhia M, Patrick AL, McKeigue P, Kolčić I, Lukić IK, Swann O, van Leeuwen FN, Ruhaak LR, Houwing-Duistermaat JJ, Slagboom PE, Beekman M, de Craen AJ, Deelder AM, Zeng Q, Wang W, Hastie ND, Gyllensten U, Wilson JF, Wuhrer M, Wright AF, Rudd PM, Hayward C, Aulchenko Y, Campbell H, Rudan I. Loci associated with N-glycosylation of human immunoglobulin G show pleiotropy with autoimmune diseases and haematological cancers. *Haematological Cancers. PLoS Genetics*, 2013, 9(1), e1003225

Lemmers RFH, Vilaj M, Urda D, Agakov F, Šimurina M, Klarić L, Rudan I, Campbell H, Hayward C, Wilson JF, Lieve AG, Gornik O, Sijbrands EJG, Lauc G, van Hoek. IgG glycan patterns are associated with type 2 diabetes in independent European populations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2017, 1861(9), 2240-2249

Lewis M, Phillips M, Slavotinek J, Kow L, Thompson C, Toouli J. Change in Liver Size and Fat Content after Treatment with Optifast® Very Low Calorie Diet. *Obesity Surgery*, 2006, 16(6), 697-701

Lin CW, Tsai MH, Li ST, Tsai TI, Chu KC, Liu YC, Lai MY, Wu CY, Tseng YC, Shivatare SS, Wang CH, Chao P, Wang SY, Shih HW, Zeng YF, You TH, Liao JY, Tu YC, Lin YS, Chuang HY, Chen CL, Tsai CS, Huang CC, Lin NH, Ma C, Wu CY, Wong CH. A common glycan structure on immunoglobulin G for enhancement of effector functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(34), 10611-10616

Liu B, Spearman M, Doering J, Lattová E, Perreault H, Butler M. The availability of glucose to CHO cells affects the intracellular lipid-linked oligosaccharide distribution, site occupancy and the N-glycosylation profile of a monoclonal antibody. *Journal of Biotechnology*, 2014, 170, 17-27

Lloyd KA, Steen J, Amara K, Titcombe PJ, Israelsson L, Lundström SL, Zhou D, Zubarev RA, Reed E, Piccoli L, Gabay C, Lanzavecchia A, Baeten D, Lundberg K, Mueller DL, Klareskog L, Malmström V, Grönwall C. Variable domain N-linked glycosylation and negative surface charge are key features of monoclonal ACPA: Implications for B-cell selection. *The European Journal of Immunology*, 2018, 48(6), 1030-1045

Lockshin RA, Zakeri Z, Cell death in health and disease, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2007, 11(6), 1214-1224

Lokuruka MNI. A literature review of role of obesity in adult health with reference to Africa. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 2013, 13

Lu JP, Knežević A, Wang YX, Rudan I, Campbell H, Zou ZK, Lan J, Lai QX, Wu JJ, He Y, Song MS, Zhang L, Lauc G, Wang W. Screening Novel Biomarkers for Metabolic Syndrome by Profiling Human Plasma N-Glycans in Chinese Han and Croatian Populations. *Journal of Proteome Research*, 2011, 10(11), 4959-4969

Lundblad RL. *Development and Application of Biomarkers*, Boca Raton, Florida, CRC Press, Tylor & Francis Group, 2011, 265

Lyons JJ, Milner JD, Rosenzweig SD. Glycans Instructing Immunity: The Emerging Role of Altered Glycosylation in Clinical Immunology. *Frontiers in Pediatrics*, 2015, 3, 54



- Macritchie F. Proteins at interfaces. *Advances in protein chemistry*, 1978, 32, 283-326
- Manmadhan A, Lin BX, Zhong J, Parikh M, Berger JS, Fisher EA, Heffron SP. Elevated GlycA in severe obesity is normalized by bariatric surgery. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2019, 21(1),178-182
- Mariño K, Bones J, Kattla JJ, Rudd PM. A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nature Chemical Biology*, 2010, 6(10), 713-723
- Marth JD, Grewal PK. Mammalian glycosylation in immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2008, 8(11), 847-887
- Masuda K, Kubota T, Kaneko E, Iida S, Wakitani M, Kobayashi-Natsume Y, Kubota A, Shitara K, Nakamura K. Enhanced binding affinity for FcγRIIIa of fucose-negative antibody is sufficient to induce maximal antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Molecular Immunology*, 2007, 44(12), 3122-3131
- Mathes JM. Protein Adsorption to Vial Surfaces: Quantification, Structural and Mechanistic Studies. Munich, Ludwig Maximilian University of Munich-dizertacija, 2010
- Mavridis G, Souliou E, Diza E, Symeonidis G, Pastore F, Vassiliou AM, Karamitsos D. Inflammatory cytokines in insulin-treated patients with type 2 diabetes. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2008, 18(7), 471-476
- McGarrah RW, Kelly JP, Craig DM, Haynes C, Jessee RC, Huffman KM, Kraus WE, Shah SH. A Novel Protein Glycan-Derived Inflammation Biomarker Independently Predicts Cardiovascular Disease and Modifies the Association of HDL Subclasses with Mortality. *Clinical Chemistry*, 2017, 63(1), 288-296
- McLachlan F, Timofeeva M, Bermingham M, Wild S, Rudan I, Lauc G, Wang W, Campbell H, Wilson J, Theodoratou E. A Case-control Study in an Orcadian Population Investigating the Relationship between Human Plasma N-glycans and Metabolic Syndrome. *Journal of Glycomics & Lipidomics*, 2016, 6(3)
- Medical Definition of Gastrectomy, <https://www.medicinenet.com>, pristupljeno 23.4.2019.
- Merry T, Astrautsova S. Chemical and Enzymatic Release of Glycans from Glycoproteins. *Methods in Molecular Biology*, 2003, 213, 27-40

Mimura Y, Sondermann P, Ghirlando R, Lund J, Young SP, Goodall M, Jefferis R. Role of Oligosaccharide Residues of IgG1-Fc in FcγRIIb Binding. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(49), 45539-45547

Miyoshi E, Moriwaki K, Terao N, Tan CC, Terao M, Nakagawa T, Matsumoto H, Shinzaki S, Kamada Y. Fucosylation is a promising target for cancer diagnosis and therapy. *Biomolecules*, 2012, 2(1), 34-45

Murphy K, Weaver C. *Janeway's Immunobiology*-Garland Science, Ninth Edition, Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 711 Third Avenue, New York, NY, 10017, USA i 3 Park Square, Milton Park, Abingdon, OX14 4RN, UK, 2017, 141, 422

Nagae M, Yamaguchi Y. Function and 3D Structure of the N-Glycans on Glycoproteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(7), 8398-8429

Nimmerjahn F, Ravetch, JV. The antiinflammatory activity of IgG: the intravenous IgG paradox. *The Journal of Experimental Medicine*, 2007, 204(1), 11-15

Novokmet M, Lukić E, Vučković F, Đurić Ž, Keser T, Rajšl K, Remondini D, Castellani G, Gašparović H, Gornik O, Lauc G. Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation. *Scientific Reports*, 2014, 4(1)

Obesity and overweight, 2018, <http://www.euro.who.int>, pristupljeno 8.4.2019.

Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell*, 2006, 126(5), 855-867

Panagiotakos DB, Pitsavos C, Yannakoulia M, Chrysohoou C, Stefanadis C. The implication of obesity and central fat on markers of chronic inflammation: The ATTICA study. *Atherosclerosis*, 2005, 183(2), 308-315

Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, Rademacher TW, Mizuochi T, Taniguchi T, Matsuta K, Takeuchi F, Nagano Y, Miyamoto T, Kobata A. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature*, 1985, 316(6027), 452-457

Parekh RB, Roitt IM, Isenberg DA, Dwek RA, Ansell BM, Rademacher TW. Galactosylation of IgG associated oligosaccharides: reduction in patients with adult and juvenile onset rheumatoid arthritis and relation to disease activity. *The Lancet*, 1988, 1(8592), 966-969

Park DI, Štambuk J, Razdorov G, Pučić-Baković M, Martins-de-Souza D, Lauc G, Turck CW. Blood plasma/IgG N-glycome biosignatures associated with major depressive disorder symptom severity and the antidepressant response. *Scientific Reports*, 2018, 8(1),179

Parsons HM, Ekman DR, Collette TW, Viant MR. Spectral relative standard deviation: a practical benchmark in metabolomics. *Analyst*, 2009,134(3), 478-485

Pavić T, Dilber D, Kifer D, Selak N, Keser T, Ljubičić Đ, Vukić Dugac A, Lauc G. N-glycosylation patterns of plasma proteins and immunoglobulin G in chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Translational Medicine*, 2018, 16, 323

Perković MN, Baković MP, Krištić J, Novokmet M, Huffman JE, Vitart V, Hayward C, Rudan I, Wilson JF, Campbell H, Polašek O, Lauc G, Pivac N. The association between galactosylation of immunoglobulin G and body mass index. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2014, 48, 20-25

Peschke B, Keller CW, Weber P, Quast I, Lünemann JD. Fc-Galactosylation of Human Immunoglobulin Gamma Isotypes Improves C1q Binding and Enhances Complement-Dependent Cytotoxicity. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8, 646

Plomp R, Bondt A, de Haan N, Rombouts Y, Wuhrer M. Recent Advances in Clinical Glycoproteomics of Immunoglobulins (Igs). *Molecular & Cellular Proteomics*, 2016, 15(7), 2217-2228

Pories WJ, Swanson MS, Mac Donald KG, Long SB, Morris PG, Brown BM, Barakat HA, de Ramon RA, Israel G, Dolezal JM, Dohm L. Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. *Annals of Surgery*, 1995, 222(3), 339-352

Pradhan AD. C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. *The Journal of the American Medical Association*, 2001, 286(3), 327

Pučić M, Knežević A, Vidić J, Adamczyk B, Novokmet M, Polašek O, Gornik O, Šupraha-Goreta S, Wormald MR, Redžić I, Campbell H, Wright A, Hastie ND, Wilson JF, Rudan I, Wuhrer M, Rudd PM, Josić D, Lauc G. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011, 10(10), M111.010090

Qiu Y, Patwa TH, Xu L, Shedden K, Misek DE, Tuck M, Jin G, Ruffin MT, Turgeon DK, Synal S, Bresalier R, Marcon N, Brenner DE, Lubman DM. Plasma glycoprotein profiling for colorectal cancer biomarker identification by lectin glycoarray and lectin blot. *Journal of proteome research*, 2008, 7(4), 1693-1703

Raju TS. Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Current Opinion in Immunology*, 2008, 20(4), 471-478

Reed GF, Lynn F, Meade BD. Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2002, 9(6), 1235-1239

Reed MA, Pories WJ, Chapman W, Pender J, Bowden R, Barakat H, Gavin TP, Green T, Tapscott E, Zheng D, Shankley N, Yieh L, Polidori D, Piccoli SP, Brenner-Gati L, Dohm L. Roux-en-Y Gastric Bypass Corrects Hyperinsulinemia Implications for the Remission of Type 2 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2011, 96(8), 2525-2531

Royle L, Dwek RA, Rudd PM. Determining the Structure of Oligosaccharides N- and O-Linked to Glycoproteins. *Current Protocols in Protein Science*, 2006a, 12.6.1-12.6.45

Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM. Detailed structural analysis of N-glycans released from glycoproteins in SDS-PAGE gel bands using HPLC combined with exoglycosidase array digestions. *Methods in Molecular Biology*, 2006b, 347, 125-143

Royle L, Campbell MP, Radcliffe CM, White DM, Harvey DJ, Abrahams JL, Kim YG, Henry GW, Shadick NA, Weinblatt ME, Lee DM, Rudd PM, Dwek RA. HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. *Analytical Biochemistry*, 2008, 376(1), 1-12

Rubino F, Schauer PR, Kaplan LM, Cummings DE. Metabolic Surgery to Treat Type 2 Diabetes: Clinical Outcomes and Mechanisms of Action. *Annual Review of Medicine*, 2010, 61(1), 393-411

Ruhaak LR, Zauner G, Huhn C, Bruggink C, Deelder AM, Wuhrer M. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 397(8), 3457-3481

Russell A, Adua E, Ugrina I, Laws S, Wang W. Unravelling Immunoglobulin G Fc N-Glycosylation: A Dynamic Marker Potentiating Predictive, Preventive and Personalised Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(2), 390

Russell A, Kepka A, Akmačić IT, Hui J, Hunter M, Ugrina I, Laws S, Wang W. Higher levels of abdominal body fat are associated with an increase in pro-inflammatory immunoglobulin G N-glycans: results from the Busselton Healthy Ageing Study. Paper presented at the 12th Jenner Glycobiology and Medicine Symposium Translational Glycobiology: From Bench to Bedside, Dubrovnik, Croatia, 2017, poster, sažetak, znanstveni

Russell AC, Kepka A, Trbojević-Akmačić I, Ugrina I, Song M, Hui J, Hunter M, Laws SM, Lauc G, Wang W. Increased central adiposity is associated with pro-inflammatory immunoglobulin G N-glycans. *Immunobiology*, 2019, 224(1), 110-115

Schachter H. Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Biochemistry and Cell Biology*, 1986, 64(3), 163-181

Schauer PR, Burguera B, Ikramuddin S, Cottam D, Gourash W, Hamad G, Eid GM, Mattar S, Ramanathan R, Barinas-Mitchel E, Harsha Rao R, Kuller L, Kelley D. Effect of Laparoscopic Roux-En Y Gastric Bypass on Type 2 Diabetes Mellitus, 2003, *Annals of Surgery*, 238(4), 467-485

Schnaar RL. Glycobiology simplified: diverse roles of glycan recognition in inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 2016, 99(6), 825-838

Schuster M, Umana P, Ferrara C, Brünker P, Gerdes C, Waxenecker G, Wiederkum S, Schwager C, Loibner H, Himmler G, Mudde GC. Improved Effector Functions of a Therapeutic Monoclonal Lewis Y-Specific Antibody by Glycoform Engineering. *Cancer Research*, 2005, 65(17), 7934-7941

Schwarz A, Büchler M, Usinger K, Rieger H, Glasbrenner B, Friess H, Kunz R, Beger HG. Importance of the duodenal passage and pouch volume after total gastrectomy and reconstruction with the Ulm pouch: prospective randomized clinical study. *World Journal of Surgery*, 1996, 20(1), 60-66

Shah A, Laferrère B. Diabetes after Bariatric Surgery. *Canadian Journal of Diabetes*, 2017, 41(4), 401-406

Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SHA, Presta LG. Lack of Fucose on Human IgG1N-Linked Oligosaccharide Improves Binding to Human FcγRIII and Antibody-dependent Cellular Toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(30), 26733-26740

Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG. High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and Design of IgG1 Variants with Improved Binding to the FcγR. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(9), 6591-6604

Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, Hanai N, Shitara K. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(5), 3466-3473

Sims EAH, Danforth E, Horton ES, Bray GA, Glennon JA, Salans LB. Endocrine and Metabolic Effects of Experimental Obesity in Man. *Proceedings of the 1972 Laurentian Hormone Conference*, 1973, 29, 457-496

Sjöström L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, Dahlgren S, Larsson B, Narbro K, Sjöström CD, Sullivan M, Wedel H. Lifestyle, Diabetes, and Cardiovascular Risk Factors 10 Years after Bariatric Surgery. *New England Journal of Medicine*, 2004, 351(26), 2683-2693

Spagou K, Wilson ID, Masson P, Theodoridis G, Raikos N, Coen M., Holmes E, Lindon JC, Plumb RS, Nicholson JK, Want EJ. HILIC-UPLC-MS for Exploratory Urinary Metabolic Profiling in Toxicological Studies. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(1), 382-390

Steadman BL, Thompson KC, Middaugh CR, Matsuno K, Vrona S, Lawson EQ, Lewis RV. The effects of surface adsorption on the thermal stability of proteins. *Biotechnology & Bioengineering*, 1992, 40, 8-15

Stevens J, Couper D, Pankow J, Folsom AR, Duncan BB, Nieto FJ, Jones D, Tyroler HA. Sensitivity and specificity of anthropometrics for the prediction of diabetes in a biracial cohort. *Obesity Research*, 2001, 9(11), 696-705

Takahashi M, Kuroki Y, Ohtsubo K, Taniguchi N. Core fucose and bisecting GlcNAc, the direct modifiers of the N-glycan core: their functions and target proteins. *Carbohydrate Research*, 2009, 344(12), 1387-1390

Takahashi N, Nishibe H. Some Characteristics of a New Glycopeptidase Acting on Aspartylglycosylamine Linkages. *The Journal of Biochemistry*, 1978, 84(6), 1467-1473

Tarentino AL, Gomez CM, Plummer TH. Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide: N-glycosidase F. *Biochemistry*, 1985, 24(17), 4665-4671

Thompson S, Matta KL, Turner GA. Changes in fucose metabolism associated with heavy drinking and smoking: A preliminary report. *Clinica Chimica Acta*, 1991, 201(1-2), 59-64

Trbojević-Akmačić I, Ventham NT, Theodoratou E, Vučković F, Kennedy NA, Krištić J, Nimmo ER, Kalla R, Drummond H, Štambuk J, Dunlop MG, Novokmet M, Aulchenko Y, Gornik O, Campbell H, Pučić Baković M, Satsangi J, Lauc G; IBD-BIOM Consortium. Inflammatory bowel disease associates with proinflammatory potential of the immunoglobulin G glycome. *Inflammatory bowel diseases*, 2015a, 21(6), 1237-1247

Trbojević-Akmačić I, Ugrina I, Štambuk J, Gudelj I, Vučković F, Lauc G, Pučić-Baković M. High-throughput glycomics: Optimization of sample preparation. *Biochemistry (Moscow)*, 2015b, 80(7), 934-942

Trbojević-Akmačić I, Vilaj M, Lauc G. High-throughput analysis of immunoglobulin G glycosylation. *Expert Review of Proteomics*, 2016, 13(5), 523-534

Trbojević-Akmačić I, Vučković F, Vilaj M, Skelin A, Karssen LC, Krištić J, Jurić J, Momčilović A, Šimunović J, Mangino M, De Gregori M, Marchesini M, Dagostino C, Štambuk J, Novokmet M, Rauck R, Aulchenko YS, Primorac D, Kapural L, Buyse K, Mesotten D, Williams FMK, van Zundert J, Allegri M, Lauc G. Plasma N-glycome composition associates with chronic low back pain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2018, 1862(10), 2124-2133

Troelsen LN, Garred P, Madsen HO, Jacobsen S. Genetically determined high serum levels of mannose-binding lectin and agalactosyl IgG are associated with ischemic heart disease in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 2006, 56(1), 21-29

van de Bovenkamp FS, Hafkenscheid L, Rispens T, Rombouts Y. The Emerging Importance of IgG Fab Glycosylation in Immunity. *The Journal of Immunology*, 2016, 196(4), 1435-1441

van de Geijn FE, Wuhrer M, Selman MH, Willemsen SP, de Man YA, Deelder AM, Hazes JM, Dolhain RJ. Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study. *Arthritis Research and Therapy*, 2009, 11(6): R193

van der Kolk LE, Grillo-Lopez AJ, Baars JW, Hack CE, van Oers MH. Complement activation plays a key role in the side-effects of rituximab treatment. *British Journal of Haematology*, 2001, 115, 807-811

Varki A i sur., urednici. *Essentials of Glycobiology, Third Edition. U: Glycans in Acquired Human Diseases*, Freeze HH, Kinoshita T, Varki A, urednici, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015-2017, 46

Varki A i sur., urednici. *Essentials of Glycobiology, Third Edition. U: Historical Background and Overview*, Kornfeld S, Varki A, urednici, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015-2017, 1

Varki A i sur., urednici. *Essentials of Glycobiology, Third Edition. U: N-Glycans*, Stanley P, Taniguchi N, Aebi M, urednici, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015-2017, 9

Varki A, Cummings RD, Aebi M, Packer NH, Seeberger PH, Esko JD, Stanley P, Hart G, Darvill A, Kinoshita T, Prestegard JJ, Schnaar RL, Freeze HH, Marth JD, Bertozzi CR, Etzler ME, Frank M, Vliegthart JF, Lütke T, Perez S, Bolton E, Rudd P, Paulson J, Kanehisa M, Toukach P, Aoki-Kinoshita KF, Dell A, Narimatsu H, York W, Taniguchi N, Kornfeld S. Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. *Glycobiology*, 2015, 25(12), 1323-1324

Vermeer AW, Bremer MG, Norde W. Structural changes of IgG induced by heat treatment and by adsorption onto a hydrophobic Teflon surface studied by circular dichroism spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1425(1), 1-12

Vreeker GCM, Wuhrer M. Reversed-phase separation methods for glycan analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, 409(2), 359-378



Vučković F, Krištić J, Gudelj I, Teruel M, Keser T, Pezer M, Pučić-Baković M, Štambuk J, Trbojević-Akmačić I, Barrios C. Association of systemic lupus erythematosus with decreased immunosuppressive potential of the IgG glycome. *Arthritis & Rheumatology*, 2015, 67(11), 2978-2989

Vučković F, Theodoratou E, Thači K, Timofeeva M, Vojta A, Štambuk J, Pučić-Baković M, Rudd PM, Đerek L, Servis D, Wennerström A, Farrington SM, Perola M, Aulchenko Y, Dunlop MG, Campbell H, Lauc G. IgG Glycome in Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*, 2016, 22(12), 3078-3086

Wang T, Cai ZP, Gu XQ, Ma HY, Du YM, Huang K, Volgmeir J, Liu L. Discovery and characterization of a novel extremely acidic bacterial N-glycanase with combined advantages of PNGase F and A. *Bioscience Reports*, 2014, 34(6), 673-684

Wang X, Bao W, Liu J, Ouyang YY, Wang D, Rong S, Xiao X, Shan ZL, Zhang Y, Yao P, Liu LG. Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 2013, 36(1), 166-175

Wang Y, Klarić L, Yu X, Thači K, Dong J, Novokmet M, Wilson J, Polasek O, Liu Y, Krištić J, Ge S, Pučić-Baković M, Wu L, Zhou Y, Ugrina I, Song M, Zhang J, Guo X, Zeng Q, Rudan I, Campbell H, Aulchenko Y, Lauc G, Wang W. The Association Between Glycosylation of Immunoglobulin G and Hypertension: A Multiple Ethnic Cross-Sectional Study. *Medicine (Baltimore)*. 2016, 95(17), e3379

Wannamethee SG, Sharper AG. Weight change and duration of overweight and obesity in the incidence of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 1999, 22(8), 1266-1272

Wuhrer M, Selman MHJ, McDonnell LA, Kümpfel T, Derfuss T, Khademi M, Olsson T, Hohlfeld R, Meinl E, Krumbholz M. Pro-inflammatory pattern of IgG1 Fc glycosylation in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Journal of Neuroinflammation*, 2015, 12, 1-14

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 2003, 112(12), 1821-1830

Yu X, Wang Y, Krištić J, Dong J, Chu X, Ge S, Wang H, Fang H, Gao Q, Liu D, Zhao Z, Peng H, Pučić-Baković M, Wu L, Song M, Rudan I, Campbell H, Lauc G, Wang W. Profiling

IgG N-glycans as potential biomarker of chronological and biological ages: A community-based study in a Han Chinese population. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(28), e4112

Zauner G, Selman MH, Bondt A, Rombouts Y, Blank D, Deelder AM, Wuhrer M. Glycoproteomic analysis of antibodies. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, 12(4), 856-865

Zhang L, Luo S, Zhang B. Glycan analysis of therapeutic glycoproteins. *Mabs*, 2016, 8(2), 205-215

Zhang Z, Westhrin M, Bondt A, Wuhrer M, Standal T, Holst S. Serum protein N-glycosylation changes in multiple myeloma. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 2019, 1863(5), 960-970

## 8. SAŽETAK

Pretilost i dijabetes tipa 2 metabolički su poremećaji i jedni od glavnih javnozdravstvenih problema današnjice. Prati ih stanje kronične upale organizma, međusobno su čvrsto povezani te predstavljaju glavne indikacije za provođenje kirurškog zahvata za liječenje debljine. Navedenom kirurškom intervencijom dolazi do dugotrajne remisije dijabetesa tipa 2 i naglog pada tjelesne mase.

Promjene u ljudskom N-glikomu mogu biti specifične za određena stanja u organizmu te se N-glikane proučava kao potencijalne biljege bolesti, njene progresije i odgovora na terapiju. S ciljem utvrđivanja povezanosti patofizioloških promjena nakon operacije s promjenama N-glikozilacije, u ovom istraživanju analizirani su i uspoređeni N-glikanski profili imunoglobulina G i ukupnih glikoproteina plazme desetorice ispitanika prije ugradnje želučane prenosnice i šest mjeseci nakon operativnog zahvata.

Dobiveni rezultati pokazuju određene promjene u N-glikozilacijskom profilu ispitanika između navedenih vremenskih točaka, međutim, opažene razlike nisu dosegle statističku značajnost, najvjerojatnije zbog ograničenog broja ispitanika.

Nadalje, opažene glikozilacijske promjene kreću se u suprotnom smjeru od onih koje se obično uočavaju u upalnim stanjima, što sugerira da je došlo do smanjenja razine upale nakon provedenog operacijskog zahvata. N-glikani imunoglobulina G i glikoproteina plazme time dobivaju ulogu potencijalnih dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera za liječenje pretilosti i dijabetesa tipa 2 barijatrijskim zahvatom.

## **SUMMARY**

Obesity and type 2 diabetes are metabolic disorders which represent significant public healthcare burden globally. Both of them are associated with chronic low-grade inflammation, have a great interdependence and are the main indication for bariatric surgery. This procedure enables long-term type 2 diabetes remission and a significant loss of weight.

Human N-glycome alterations can be specific for certain conditions, hence N-glycans are studied as potential prognostic markers for disease activity, progression and treatment. In order to determine associations between pathophysiological changes after surgery and alterations in N-glycosylation, we analyzed and compared immunoglobulin G and plasma glycoprotein N-glycan profiles from ten subjects, sampled at the baseline and six months after bariatric surgery. There was no statistically significant difference in N-glycome after the mentioned period, probably due to a limited number of examinees.

According to the results, there are several clues that the reduction of inflammation has occurred among the patients. Immunoglobulin G and plasma glycoprotein N-glycans thereby show potential as diagnostic and prognostic biomarkers for bariatric treatment of obesity and type 2 diabetes.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### PROMJENE N-GLIKANSKIH OBRAZACA IMUNOGLOBULINA G I GLIKOPROTEINA PLAZME USLIJED UGRADNJE ŽELUČANE PREMOSNICE

Helena Orehovački

#### SAŽETAK

Pretilost i dijabetes tipa 2 metabolički su poremećaji i jedni od glavnih javnozdravstvenih problema današnjice. Prati ih stanje kronične upale organizma, međusobno su čvrsto povezani te predstavljaju glavne indikacije za provođenje kirurškog zahvata za liječenje debljine. Navedenom kirurškom intervencijom dolazi do dugotrajne remisije dijabetesa tipa 2 i naglog pada tjelesne mase.

Promjene u ljudskom N-glikomu mogu biti specifične za određena stanja u organizmu te se N-glikane proučava kao potencijalne biljege bolesti, njene progresije i odgovora na terapiju. S ciljem utvrđivanja povezanosti patofizioloških promjena nakon operacije s promjenama N-glikozilacije, u ovom istraživanju analizirani su i uspoređeni N-glikanski profili imunoglobulina G i ukupnih glikoproteina plazme desetorice ispitanika prije ugradnje želučane premosnice i šest mjeseci nakon operativnog zahvata.

Dobiveni rezultati pokazuju određene promjene u N-glikozilacijskom profilu ispitanika između navedenih vremenskih točaka, međutim, opažene razlike nisu dosegle statističku značajnost, najvjerojatnije zbog ograničenog broja ispitanika.

Nadalje, opažene glikozilacijske promjene kreću se u suprotnom smjeru od onih koje se obično uočavaju u upalnim stanjima, što sugerira da je došlo do smanjenja razine upale nakon provedenog operacijskog zahvata. N-glikani imunoglobulina G i glikoproteina plazme time dobivaju ulogu potencijalnih dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera za liječenje pretilosti i dijabetesa tipa 2 barijatrijskim zahvatom.

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

Rad sadrži: 95 stranica, 13 grafičkih prikaza, 7 tablica i 192 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: glikozilacija, N-glikani, barijatrija, upala, biomarkeri, HILIC-UPLC

Mentor: **Dr. sc. Gordan Lauc**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Ocjenjivači: **Dr. sc. Gordan Lauc**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: rujan 2019.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### N-GLYCOSYLATION CHANGES OF PLASMA PROTEINS AND IMMUNOGLOBULIN G IN BARIATRIC SURGERY

**Helena Orehovački**

#### SUMMARY

Obesity and type 2 diabetes are metabolic disorders which represent significant public healthcare burden globally. Both of them are associated with chronic low-grade inflammation, have a great interdependence and are the main indication for bariatric surgery. This procedure enables long-term type 2 diabetes remission and a significant loss of weight.

Human N-glycome alterations can be specific for certain conditions, hence N-glycans are studied as potential prognostic markers for disease activity, progression and treatment. In order to determine associations between pathophysiological changes after surgery and alterations in N-glycosylation, we analyzed and compared immunoglobulin G and plasma glycoprotein N-glycan profiles from ten subjects, sampled at the baseline and six months after bariatric surgery. There was no statistically significant difference in N-glycome after the mentioned period, probably due to a limited number of examinees.

According to the results, there are several clues that the reduction of inflammation has occurred among the patients. Immunoglobulin G and plasma glycoprotein N-glycans thereby show potential as diagnostic and prognostic biomarkers for bariatric treatment of obesity and type 2 diabetes.

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

Thesis includes: 95 pages, 13 figures, 7 tables and 192 references. Original is in Croatian language.

Key words: glycosylation, N-glycans, bariatric surgery, inflammation, biomarkers, HILIC-UPLC

Mentor: **Gordan Lauc, Ph.D.** *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Reviewers: **Gordan Lauc, Ph.D.** *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*  
**Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** *Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*  
**Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D.** *Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: September 2019.