

N-glikozilacija proteina u plazmi kao biljeg praćenja metaboličkoga sindroma

Cvetko, Ana

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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:163:601985>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ana Cvetko

***N*-GLIKOZILACIJA PROTEINA U
PLAZMI KAO BILJEG PRAĆENJA
METABOLIČKOGA SINDROMA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Olga Gornik Kljaić, prof.dr.sc.

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Ana Cvetko

**N-GLYCOSYLATION OF PLASMA
PROTEINS AS MONITORING MARKER
OF METABOLIC SYNDROME**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

Olga Gornik Kljaić, prof.dr.sc.

Zagreb, 2021.

INFORMACIJE O MENTORU

Doktorski rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen pod mentorstvom prof.dr.sc. Olge Gornik Kljaić, na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u suradnji s King's College u Londonu i Sveučilišnom bolnicom Oxford, u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je financiran projektom Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju (#KK.01.1.1.01.0010).

ZAHVALE

SAŽETAK

Metabolički sindrom obuhvaća poremećaje poput visceralne pretilosti te inzulinske rezistencije koja često prethodi šećernoj bolesti tipa 2. Istraživanja su spomenute poremećaje povezala s promjenama *N*-glikozilacije proteina plazme, jedne od najčešćih i najkompleksnijih post-translacijskih modifikacija. Glavni ciljevi ovog doktorskog rada jesu identificirati *N*-glikanske strukture prisutne na proteinima plazme koje: a) omogućavaju predikciju i rano prepoznavanje pojedinaca s povećanim rizikom razvoja inzulinske rezistencije i šećerne bolesti tipa 2, i b) su povezane s indeksom tjelesne mase te pretilošću i promjenama indeksa tjelesne mase kod pojedinaca podvrgnutih operaciji želuca. Analizirani su uzorci krvne plazme oko 2 000 ispitanika iz TwinsUK registra sakupljeni u više vremenskih točaka tijekom 20 godina pri čemu su bilježeni detaljni podaci o zdravstvenom statusu ispitanika poput dijagnoze inzulinske rezistencije i šećerne bolesti tipa 2, te uzorci krvne plazme 37 pretilih ispitanika okupljenih u Sveučilišnoj bolnici Oxford gdje su bili podvrgnuti restriktivnoj dijeti i operaciji želuca, a krv im je uzrokovana kontinuirano tijekom studije. Izolirani, pročišćeni te fluorescentno obilježeni *N*-glikani proteina plazme i imunoglobulina G analizirani su HILIC-UPLC metodom. Statistička obrada dobivenih rezultata pokazala je da se *N*-glikani proteina plazme u pojedinaca koji će razviti šećernu bolest tipa 2 i inzulinsku rezistenciju značajno razlikuju od ispitanika koji će ostati zdravi te se primijećene promjene počinju pojavljivati godinama prije službene dijagnoze što omogućuje uspješno pravovremeno identificiranje pojedinaca visokorizičnih za poremećaj u metabolizmu glukoze. Nadalje, opažene promjene *N*-glikana proteina plazme i imunoglobulina G u pretilih pojedinaca uslijed mršavljenja rezultat su podvrgavanja restriktivnoj dijeti i operaciji želuca. Iste promjene su primijećene i uslijed longitudinalnog praćenja pojedinaca kojima se mijenjao indeks tjelesne mase. Zaključno, primjenom *N*-glikana kao biljega ranog izdvajanja visokorizičnih pojedinaca te kao biljega praćenja metaboličkoga i upalnog statusa organizma, može se na vrijeme prevenirati i odgoditi razvoj ozbiljnih komorbiditeta koji se povezuju s metaboličkim sindromom, te čak i spriječiti pojavu samog sindroma, ali i pratiti učinkovitost terapijskog pristupa.

KLJUČNE RIJEČI

N-glikozilacija, *N*-glikani proteina plazme, *N*-glikani imunoglobulina G, HILIC-UPLC, pretilost, inzulinska rezistencija, metabolički sindrom, predikcija, biljezi

SUMMARY

Introduction: Metabolic syndrome includes disorders such as visceral obesity, inflammation, and insulin resistance. These disorders increase the risk of type 2 diabetes and cardiovascular diseases development and can also lead to premature mortality. Prevalence of both obesity and type 2 diabetes have risen dramatically in the last few years, leading to impaired quality of life for many patients and resulting in enormous hospitalization and treatment costs. However, using prediction biomarkers for early assessment of individuals at high risk of developing metabolic syndrome related disorders could result in timely diagnosis, leading to successful management of mentioned disorders which would have a positive impact on both the patients and the health care system. Studies have linked these disorders to changes in plasma N-glycosylation, one of the most common and complex post-translational modifications. N-glycosylation, a process regulated by a complex gene network, is known to influence both structure and function of proteins; for example, increased levels of core fucose on immunoglobulin G (IgG) disrupt bonding with its effector receptor, resulting in controlled activity of antibody-dependent cellular cytotoxicity. Few studies have shown similar changes of plasma protein N-glycosylation in individuals with diagnosed metabolic syndrome, while typical proinflammatory changes of IgG N-glycosylation profile were noticed in studies investigating individuals with increased body mass index (BMI), hyperlipidaemia, and obesity. Predictive nature of plasma protein N-glycans was also discovered in a longitudinal study of individuals developing type 2 diabetes and cardiovascular disorders during the study duration. Changes of N-glycans were noticed at the beginning of the disease development.

The main objectives of this study are to identify N-glycan structures present on plasma proteins that: a) allow prediction and early identification of individuals at increased risk of developing insulin resistance and type 2 diabetes and b) are associated with body mass index and obesity and body mass index changes in individuals undergoing bariatric surgery (restrictive gastric surgery).

Materials and methods: This study included blood plasma samples from about 2000 subjects from the TwinsUK registry collected at multiple time points over 20 years. For most of the patients blood was drawn three times during the study duration, continuously recording detailed data on the health status, lifestyle habits and disease development of the subjects. This study also included blood plasma samples of 37 obese subjects gathered at the Oxford University Hospital where they were subjected to a restrictive diet and bariatric surgery, and their blood

was sampled continuously throughout the study. The first blood sample was taken at the start of the study, the second after three weeks of dieting, the third at the day of the bariatric surgery, and then after the loss of 20% body weight and 12 months after surgery. During sample acquiring, their metabolic status and medical history information were noted. N-glycans of plasma proteins and IgG were analysed the same way for both cohorts. Proteins were firstly denatured with sodium dodecyl sulphate, after which the glycans were released from proteins using PNGase F. Released N-glycans were labelled with a fluorescent dye 2-aminobenzamide, and then purified using solid phase extraction followed by ultra-pure water elution. For IgG N-glycans, the protein was first isolated from plasma, after which the glycan separation procedure was the same. Isolated, purified and fluorescently labelled plasma protein and IgG N-glycans were analysed by hydrophilic interaction liquid chromatography on Waters Acquity UPLC using Waters BEH Glycan chromatographic columns. Chromatograms of plasma protein N-glycans were separated in 39 glycan peaks, while IgG N-glycans separated in 24 glycan peaks. The amount of N-glycans in each glycan peak was calculated as a percentage of total integrated area. To better express the changes in glycosylation profiles of analysed individuals derived glycan traits, such as total sialylation, fucosylation, galactosylation, were calculated using individual glycan peaks. Extracted N-glycan data were statistically processed using R, a software for statistical computing and graphical representation. Linear mixed model was used to longitudinally analyse samples from bariatric surgery patients, where time was modelled as a fixed effect, and patient information as a random effect, without additional modelling of age. To assess the BMI effect on glycans of individuals from the TwinsUK cohort, mixed model was also used, with N-glycans, either directly measured or derived traits, used as a dependent variable. BMI change and its absolute value were used as a fixed effect in the model. Patient age was used as a fixed effect and random slope since it correlates with N-glycans. General linear model was used to assess the effect of type 2 diabetes and insulin resistance development on N-glycans of TwinsUK patients, where disease status was used as an independent variable and glycan measurements as dependent variables. False discovery rate was controlled with Benjamini-Hochberg, with adjusted p-value < 0.05 considered as significant.

Results: Statistical processing of the obtained results showed that plasma protein N-glycans in individuals to be diagnosed with type 2 diabetes and insulin resistance differ significantly from healthy controls. Low branching and monosialylated plasma protein N-glycans were decreased, while high branching, trigalactosylated and trisialylated N-glycans were increased in individuals to be diagnosed. These observed changes were noticed to appear years before

official diagnosis, which allows successful timely identification of individuals at high risk of impaired glucose metabolism. Prediction model using the most informative glycan variables had an area under the curve (AUC) value of 0.77, while AUC of the model based on both mentioned glycans and BMI values was 0.78, meaning glycans carry additional valuable information about prediction of impaired glucose metabolism, but also encompass the information that the BMI data can provide.

Furthermore, observed significant changes in plasma and IgG N-glycans in obese individuals due to weight loss are the result of being subjected to a low-calorie, restrictive diet and bariatric surgery. Restrictive diet resulted in increase of low branching, less complex plasma protein N-glycans, and decrease in high branching, more complex structures with multiple galactose residues, which is a typical anti-inflammatory pattern of glycosylation changes, while changes in IgG N-glycans were not as significant. Bariatric surgery resulted in decreased agalactosylated N-glycans of plasma proteins, which mostly derive from IgG. Analysis of IgG N-glycan changes after surgery discovered increase in monosialylated and digalactosylated glycans, as well as decrease in agalactosylated glycans as seen in plasma protein N-glycans. Both plasma protein and IgG N-glycan post-surgery changes are typical signs of changing from pro-inflammatory to anti-inflammatory glycosylation profile.

In the TwinsUK cohort, the same changes as in the bariatric surgery cohort were observed due to longitudinal follow-up of individuals with changes in their BMI. Low branching, simpler structures of plasma protein N-glycans, such as digalactosylated and monosialylated glycans, were increased following the BMI decrease. Expectedly, more complex structures, such as trigalactosylated and trisialylated plasma protein N-glycans were observed as decreased following the weight loss expressed as BMI decrease. In IgG N-glycans, changes were also expressing shift towards anti-inflammatory IgG glycosylation profile, with agalactosylated structures showing decreased levels, and digalactosylated structures being increased.

Conclusion: In conclusion, the use of N-glycans as markers of timely identification of high-risk individuals and as monitoring markers of metabolic and inflammatory status of the organism, can prevent and delay the development of serious comorbidities associated with metabolic syndrome, and even prevent the occurrence of the syndrome itself, but also can monitor the efficacy of used therapeutic approach.

KEYWORDS

N-glycosylation, plasma protein N-glycans, IgG N-glycans, HILIC-UPLC, obesity, insulin resistance, metabolic syndrome, prediction marker

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. SVRHA I CILJ RADA.....	3
1.2. LITERATURNI PREGLED	4
1.2.1. Glikozilacija proteina i glikani	4
1.2.1.1. Tipovi eukariotskih <i>N</i> -glikana	5
1.2.1.2. Biosintetski put <i>N</i> -glikozilacije	6
1.2.1.3. Funkcije i uloge <i>N</i> -glikana	9
1.2.1.4. <i>N</i> -glikozilacija proteina plazme	9
1.2.1.4.1. Utjecaj <i>N</i> -glikozilacije proteina plazme na njihovo djelovanje.....	12
1.2.1.5. <i>N</i> -glikozilacija imunoglobulina G	13
1.2.1.5.1. Utjecaj <i>N</i> -glikozilacije IgG-a na njegovo djelovanje	15
1.2.1.6. Metode analize <i>N</i> -glikana	18
1.2.2. Metabolički sindrom	22
1.2.2.1. Visceralna pretilost	22
1.2.2.2. Inzulinska rezistencija	23
1.2.2.3. Šećerna bolest tipa 2	24
2. ISPITANICI, MATERIJALI I METODOLOGIJA ISTRAŽIVANJA	25
2.1. ISPITANICI	25
2.1.1. TwinsUK populacija	25
2.1.2. Oxford populacija.....	26
2.2. MATERIJALI	27
2.2.1. Anorganske kemikalije.....	27
2.2.2. Organske kemikalije.....	27
2.2.3. Enzimi	27
2.2.4. Otopine i puferi	27
2.2.5. Instrumenti	30
2.2.6. Potrošni materijal	30
2.2.7. Kolone za kromatografiju, pločica za izolaciju IgG-a, filteri	30
2.3. ANALIZA <i>N</i> -GLIKANA PROTEINA PLAZME	31
2.3.1. Dizajn eksperimenta	31
2.3.2. Izolacija imunoglobulina G.....	31
2.3.3. Deglikozilacija, označavanje <i>N</i> -glikana i njihovo pročišćavanje	32
2.3.4. Analiza tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti.....	32
2.4. STATISTIČKA ANALIZA	41

2.4.1.	Statistička analiza podataka iz TwinsUK populacije	41
2.4.1.1.	Poremećaj metabolizma glukoze (inzulinska rezistencija i šećerna bolest tipa 2) ..	41
2.4.1.2.	Promjena indeksa tjelesne mase	43
2.4.2.	Statistička analiza podataka iz Oxford populacije	45
3.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA	47
3.1.	<i>N</i> -GLIKANI PROTEINA PLAZME KAO BILJEG RANE IDENTIFIKACIJE I PRAĆENJA POREMEĆAJA U METABOLIZMU GLUKOZE	47
3.1.1.	Osobine ispitanika	47
3.1.2.	Usporedba <i>N</i> -glikana proteina plazme između ispitanika koji će razviti inzulinsku rezistenciju ili šećernu bolest tipa 2 i ispitanika koji će ostati zdravi	47
3.1.3.	Ponašanje <i>N</i> -glikana proteina plazme s približavanjem dijagnozi inzulinske rezistencije ili šećerne bolesti tipa 2	51
3.1.4.	Rana identifikacija dijagnosticiranih pojedinaca pomoću <i>N</i> -glikana proteina plazme	53
3.2.	<i>N</i> -GLIKANI PROTEINA PLAZME KAO BILJEG PROMJENE INDEKSA TJELESNE MASE	55
3.2.1.	Oxford populacija	55
3.2.1.1.	Osobine ispitanika	55
3.2.1.2.	Praćenje <i>N</i> -glikana proteina plazme nakon restriktivne dijeta te restriktivne operacije želuca	57
3.2.1.2.1.	Utjecaj nisko kalorijske restriktivne dijeta na <i>N</i> -glikane proteina plazme	57
3.2.1.2.2.	Utjecaj restriktivne operacije želuca na <i>N</i> -glikane proteina plazme	60
3.2.1.3.	Praćenje <i>N</i> -glikana imunoglobulina G nakon restriktivne dijeta te restriktivne operacije želuca	62
3.2.1.3.1.	Utjecaj nisko kalorijske restriktivne dijeta na <i>N</i> -glikane IgG-a	62
3.2.1.3.2.	Utjecaj restriktivne operacije želuca na <i>N</i> -glikane IgG-a	64
3.2.2.	TwinsUK populacija	66
3.2.2.1.	Osobine ispitanika	66
3.2.2.2.	Promjene <i>N</i> -glikana proteina plazme ovisno o indeksu tjelesne mase	66
3.2.2.3.	Promjene <i>N</i> -glikana IgG-a ovisno o indeksu tjelesne mase	69
4.	RASPRAVA	71
4.1.	<i>N</i> -GLIKOZILACIJA I RAZVOJ INZULINSKE REZISTENCIJE I ŠEĆERNE BOLESTI TIP 2	71
4.2.	<i>N</i> -GLIKOZILACIJA I PROMJENA INDEKSA TJELESNE MASE	74
4.2.1.	Praćenje <i>N</i> -glikana proteina plazme i IgG-a nakon restriktivne dijeta te restriktivne operacije želuca	74
4.2.2.	Ovisnost <i>N</i> -glikozilacije proteina plazme o promjeni indeksa tjelesne mase u TwinsUK populaciji	77

4.3. N-GLIKOZILACIJA I METABOLIČKI SINDROM.....	79
5. ZAKLJUČCI.....	81
6. POPIS LITERATURE	85
7. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH DJELA.....	102

KRATICE

2-AB = 2-aminobenzamid

2-PB = 2-pikolin boran

AUC = površina ispod krivulje (engl. *area under the curve*)

ADCC = stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima

AGP = α -1-kiseli glikoprotein

ANCA = antineutrofilna citoplazmatska protutijela

Asn (N) = Asparagin

BMI = indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

CI = područje pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

ER = endoplazmatski retikul

EU = jedinica emisije (eng. *emission unit*)

Fuc, F = fukoza

GA = Golgijev aparat

Gal, G = galaktoza

GalNAc = *N*-acetilgalaktozamin

Glc = glukoza

GP = glikanski pik

GPI = glikozilfosfatidilinozitol

GU = glukozna jedinica (engl. *glucose unit*)

HbA1c = glikirani hemoglobin

HDL = lipoprotein visoke gustoće (engl. *high-density lipoprotein*)

HILIC = tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography*)

HIV = virus humane imunodeficijencije

HPLC = tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*)

IgG = imunoglobulin G

IMS = spektrometrija temeljena na pokretljivosti iona (engl. *ion mobility spectrometry*)

IR = inzulinska rezistencija

ITM = indeks tjelesne mase

LC = tekućinska kromatografija (engl. *liquid chromatography*)

Man, M = manaza

MODY = dijabetes mladih koji se javlja u odrasloj dobi (engl. *maturity-onset diabetes of the young*)

MS = spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*)

MS/MS = tandemna spektrometrija masa (engl. *tandem mass spectrometry*)

Neu5Ac, S = *N*-acetilneuraminska kiselina

NMR = nuklearna magnetska rezonancija

OST = oligosaharil-transferaza

PBS = fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*)

PNGaza F = *N*-glikozidaza F

ROC = engl. *receiver operating characteristic*

SE = standardna pogreška (engl. *standard error*)

Ser (S) = Serin

SDS = natrijev dodecil-sulfat (engl. *sodium dodecyl sulphate*)

SPE = ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid phase extraction*)

Tris = tris(hidroksimetil)aminometan

UPLC = tekućinska kromatografija ultra-visoke djelotvornosti (engl. *ultra performance liquid chromatography*)

1. UVOD

U posljednjim desetljećima metabolički sindrom i s njime povezani poremećaji postali su među najzastupljenijim bolestima, pogotovo u razvijenijim dijelovima svijeta (1) - Svjetska zdravstvena organizacija je pretilost, značajku metaboličkoga sindroma, proglasila pandemijom (2), dok je šećerna bolest tipa 2, često ishod višegodišnjeg bolovanja od metaboličkoga sindroma (3, 4), u samom vrhu uzroka smrti (5) i visokih troškova liječenja (6, 7). No, uz problem rastuće prevalencije spomenutih bolesti, glavni izazov je pravovremena dijagnostika poremećaja povezanih s metaboličkim sindromom. Potreba za ranom identifikacijom pojedinaca koji boluju od ili su visokorizični za razvoj jedne od značajki metaboličkoga sindroma je odavno prepoznata (8). Na ovaj način, visokorizični pojedinci mogu biti na vrijeme usmjeravani ka promjeni načina života u vidu povećane tjelesne aktivnosti, promjene ishrane ili uvođenja farmakološkog liječenja, ali ne s ciljem lokalnog simptomatskog tretmana ili usporavanja već razvijenih komorbiditeta, nego kako bi se prvi simptomi spomenutih poremećaja odgodili ili se umanjio njihov intenzitet te kako uopće ne bi došlo do pojave popratnih komplikacija.

Nedavna istraživanja su ispitala utjecaj metaboličkoga sindroma, odnosno rizičnih faktora povezanih s metaboličkim sindromom, na *N*-glikane proteina plazme te su primijećene slične promjene *N*-glikana u tri neovisne populacije dijagnosticiranih pojedinaca što ukazuje na njihov biomarkerski potencijal. Osim u metaboličkom sindromu, promjene *N*-glikana proteina plazme, s naglaskom na *N*-glikane koji potječu s imunoglobulina G, najzastupljenijeg proteina plazme (9), uočene su i kod pojedinaca s hiperlipidemijom, povećanim indeksom tjelesne mase te kod pojedinaca s visceralnom pretilošću (10, 11). Razna istraživanja su pokazala da osobe dijagnosticirane sa šećernom bolesti tipa 2, ali i one s povećanim rizikom razvoja šećerne bolesti zbog hiperglikemije, pokazuju promjene profila *N*-glikana proteina plazme tipične za upalna stanja (12, 13). Prediktivnost *N*-glikana proteina plazme je opažena i u nedavnom longitudinalnom istraživanju promjena *N*-glikana proteina plazme u pojedinaca koji su razvili kardiovaskularnu bolest ili šećernu bolest tipa 2 tijekom perioda praćenja (14). Na temelju promijenjenih *N*-glikana znanstvenici su konstruirali i alat za procjenjivanje rizika od razvoja kardiometaboličkih poremećaja.

Razna prijašnja istraživanja su predstavila nekolicinu modela za predikciju šećerne bolesti tipa 2 (15–18), međutim, većina ih se temelji na poznatim biljezima ove bolesti, poput povećane razine glukoze natašte, glikiranog hemoglobina ili indeksa tjelesne mase. Činjenica je da su

povećane razine spomenutih biljega često posljedica metaboličkoga poremećaja u nastajanju te su stoga uglavnom neuspješni u identifikaciji visokorizičnih pojedinaca dovoljno rano u procesu nastanka bolesti.

S obzirom da metabolički sindrom podrazumijeva niz metaboličkih poremećaja, poput visceralne pretilosti, inzulinske rezistencije, upale, dislipidemije te arterijske hipertenzije (19), njegovo rano prepoznavanje i predikcija bi trebali obuhvaćati longitudinalno praćenje široke lepeze biljega indikativnih za spomenute poremećaje. Iz tog razloga, predstavljeni prediktivni modeli za metabolički sindrom se uglavnom oslanjaju na moderne tehnologije poput rudarenja podacima (engl. *data mining*) ili strojnog učenja (engl. *machine learning*), koje istovremeno pretražuju veliku količinu prethodno analiziranih podataka koji bi mogli najviše doprinosti razvoju metaboličkoga sindroma te koristeći njih izdvajaju visokorizične pojedince (20–22). Međutim, kao i kod šećerne bolesti tipa 2, ovakvi modeli često nisu u mogućnosti dovoljno rano iz populacije izdvojiti pojedince visokorizične za razvoj metaboličkoga sindroma budući da bi to podrazumijevalo sposobnost rane predikcije svih poremećaja koji povezani u cjelinu čine metabolički sindrom.

Uzevši u obzir dosadašnje modele za ranu identifikaciju visokorizičnih pojedinaca, i dalje postoji velika potreba za vrlo ranim prediktivnim biljezima, poput *N*-glikana čiji je prediktivni, ali i dijagnostički potencijal predstavljen u nizu istraživanja povezanih sa značajkama metaboličkoga sindroma. Prediktivni modeli temeljeni na promijenjenim *N*-glikanima mogli bi uspješno identificirati pojedince na samom početku razvoja njihovog metaboličkoga oštećenja, dok se još uvijek doimaju zdravima. Izdvojeni pojedinci bi na vrijeme bili upućeni djelovati blagonaklono po svoje zdravlje u obliku pravilne ishrane, fizičke aktivnosti ili prikladne farmakoterapije, čija bi se djelotvornost redovito mogla pratiti promjenama *N*-glikanskih profila tih pojedinaca.

1.1. SVRHA I CILJ RADA

Istraživanje u okviru ovog doktorskog rada usmjereno je na identifikaciju *N*-glikana proteina plazme koji su povezani s poremećajima obuhvaćenima metaboličkim sindromom (visceralna pretilost i poremećaj metabolizma glukoze) u svrhu pronalaska novih biljega ranog otkrivanja, praćenja te predikcije navedenih poremećaja.

Glavni ciljevi ovog istraživanja jesu identificirati *N*-glikanske strukture prisutne na proteinima plazme koje: a) omogućavaju predikciju i rano prepoznavanje pojedinaca s povećanim rizikom razvoja inzulinske rezistencije i šećerne bolesti tipa 2, b) su povezane s indeksom tjelesne mase te pretilošću i promjenama indeksa tjelesne mase kod pojedinaca podvrgnutih barijatrijskoj operaciji (restriktivnoj operaciji želuca). S obzirom na ozbiljnost ovih poremećaja te njihovo vrlo često nepravovremeno prepoznavanje koje dovodi do razvoja komplikacija, pronalazak novih potencijalnih biljega ranog otkrivanja bolesti od velike je važnosti. S druge strane, praćenje promjena *N*-glikana proteina plazme, potencijalnih novih kardiometaboličkih biljega, u stanju pretilosti jest potencijalno korisno i za praćenje uspješnosti terapijskog pristupa, ne samo u smanjenju tjelesne težine, već i u cjelokupnom poboljšanju metaboličkoga statusa pojedinca.

Prijašnja istraživanja ukazala su na prediktivni i dijagnostički potencijal *N*-glikana proteina plazme u raznim poremećajima povezanim s metaboličkim sindromom. Međutim, u ovom se istraživanju po prvi puta prospektivno analiziraju promjene *N*-glikana pojedinaca kod kojih će se razviti inzulinska rezistencija, patofiziološki poremećaj koji uglavnom prethodi šećernoj bolesti tipa 2. To će omogućiti otkrivanje promjena *N*-glikana u izrazito ranoj, klinički nemanifestiranoj fazi razvoja šećerne bolesti tipa 2 te potencijalno ukazati na uključenost *N*-glikozilacije u sam mehanizam razvoja spomenute bolesti.

Znanstveni doprinos ovog istraživanja jest pronalazak novih potencijalnih biljega koji bi samostalno, ili kao dio modela za procjenu rizika, iz populacije izdvajali pojedince s povećanim rizikom razvoja poremećaja koji su obuhvaćeni metaboličkim sindromom. Na osnovu poznavanja uloge ovih glikanskih struktura u (pato)fiziološkim procesima predložit će se njihova uloga u mehanizmu nastanka metaboličkoga sindroma, što bi rezultiralo boljim razumijevanjem same bolesti te identifikacijom potencijalnih terapijskih meta.

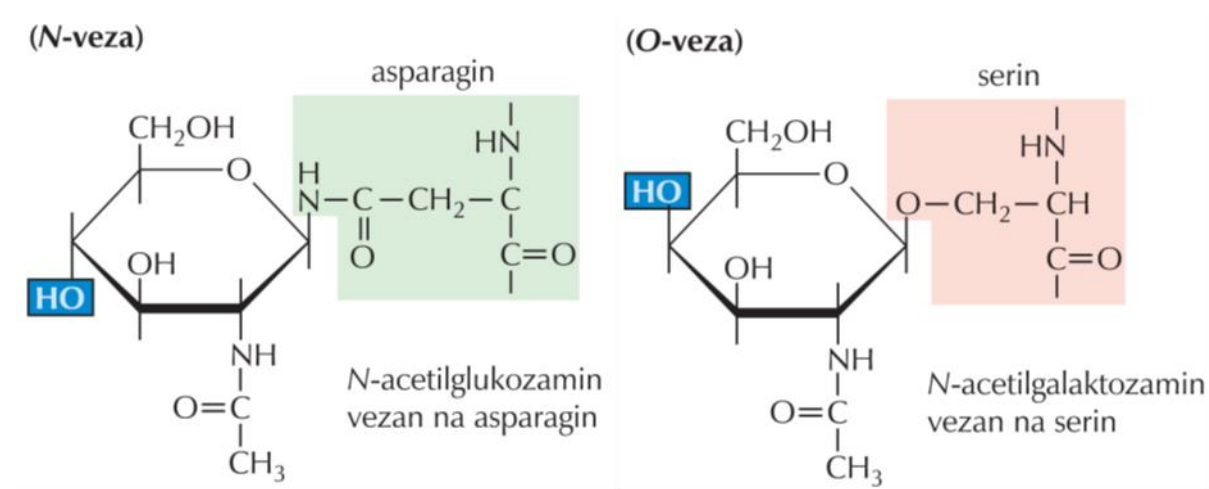
1.2. LITERATURNI PREGLED

1.2.1. Glikozilacija proteina i glikani

Post- i ko-translacijske modifikacije proteina su kemijske promjene koje se na proteinima mogu odviti tijekom ili nakon koraka translacije, a kao takve mogu biti povratne ili nepovratne (23, 24). Glikozilacija proteina podrazumijeva enzimski posredovan proces dodavanja oligosaharidnih struktura na polipeptidni slijed proteina (25), te spada među najčešće i najkompleksnije ko- i post-translacijske modifikacije (26, 27), budući da je pod kontrolom široke i kompleksne mreže gena kodirajućih za mnoštvo proteina čije je djelovanje isprepletano tijekom biosinteze glikana (28, 29). O velikoj kompleksnosti glikozilacije govori i podatak da skoro 200 glikoziltransferaza, enzima koji sudjeluju u glikozilaciji, određuje poziciju i strukturu sastavljenih glikanskih struktura (30).

Glikani su monosaharidi ili oligosaharidi kovalentno vezani na razne stanice ili makromolekule, poput spomenutih proteina (25). S obzirom da se mogu nalaziti na vanjskim membranama stanica, često sudjeluju u međustaničnim i međumolekulskim interakcijama; s druge strane, kad su lokalizirani u citoplazmi, nerijetko služe kao sigurnosni prekidači raznih molekularnih mehanizama (25). Na šećerni, odnosno glikanski dio glikoproteina ili nekog drugog glikokonjugata, uglavnom odlazi značajni dio ukupne mase (25).

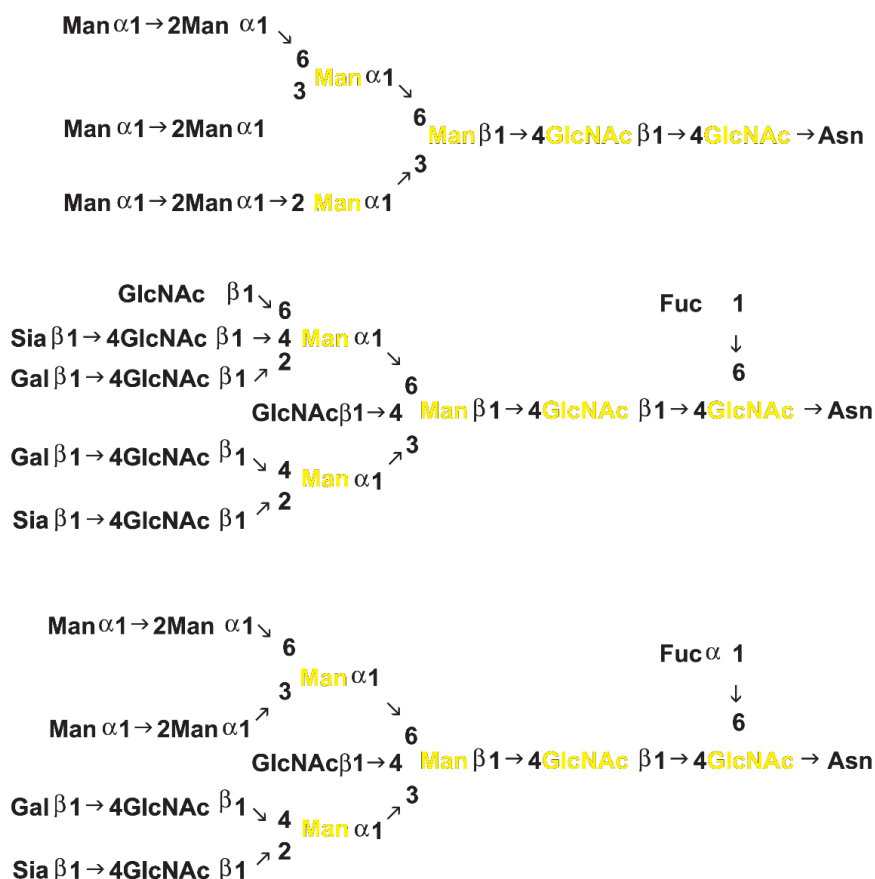
Glikoprotein jest glikokonjugat, odnosno spoj jedne ili više monosaharidnih jedinica s nesaharidnom jedinicom preko kovalentne veze. U slučaju glikoproteina, šećerne jedinice, odnosno glikani vezani su kovalentno na proteinsku strukturu. Najčešće prisutne vrste kovalentnih veza u glikoproteinima su *N*- i *O*-glikozidne veze, međutim u prirodi su još pronađene i *C*-, *S*- i *P*-glikozidne veze, kao i glikozilfosfatidilinozitolna (GPI) sidra (25). *N*- i *O*-glikozidna veza razlikuju se u monosaharidu preko kojeg je glikan vezan na proteinsku strukturu – u većini eukariotskih *N*-glikana tu ulogu ima *N*-acetilglukozamin (*N*-GlcNAc), a kod *O*-glikana *N*-acetilgalaktozamin (*N*-GalNAc). Osim u glikanskom dijelu, razlika između ovih tipova veza postoji i u mjestu vezanja na proteinskoj strukturi – kod *N*-glikana glikozidna veza se spaja na asparaginski ostatak Asn-X-Ser/Thr peptidnog slijeda (gdje je X bilo koja aminokiselina osim prolina), a kod *O*-glikana na hidroksilnu skupinu Ser/Thr ostatka (Slika 1) (25).



Slika 1 Prikaz *N*- i *O*-glikozidne veze. Preuzeto iz Cooper i Hausmann, 2010. (31)

1.2.1.1. Tipovi eukariotskih *N*-glikana

Svi eukariotski *N*-glikani sadrže zajedničku jezgenu sekvencu koja se sastoji od dva *N*-acetilglukozamina i tri manoze, a dijele se na tri tipa s obzirom na grananje, oligomanozni, hibridni i kompleksni tip (Slika 2) (32). Oligomanozni *N*-glikani na zajedničkoj jezgri imaju vezane još dvije do šest manoznih ostataka, dok se kod kompleksnih *N*-glikana na zajedničku jezgru nastavlja dvije ili više "antena", odnosno grana, koje započinju s *N*-acetilglukozaminom te se produljuju galaktozom i sijalinskom kiselinom. Hibridni tip *N*-glikana je spoj spomenutih tipova te je kao takav sastavljen od jedne grane kompleksnog tipa te jedne ili više grana oligomanoznog tipa (25, 32).



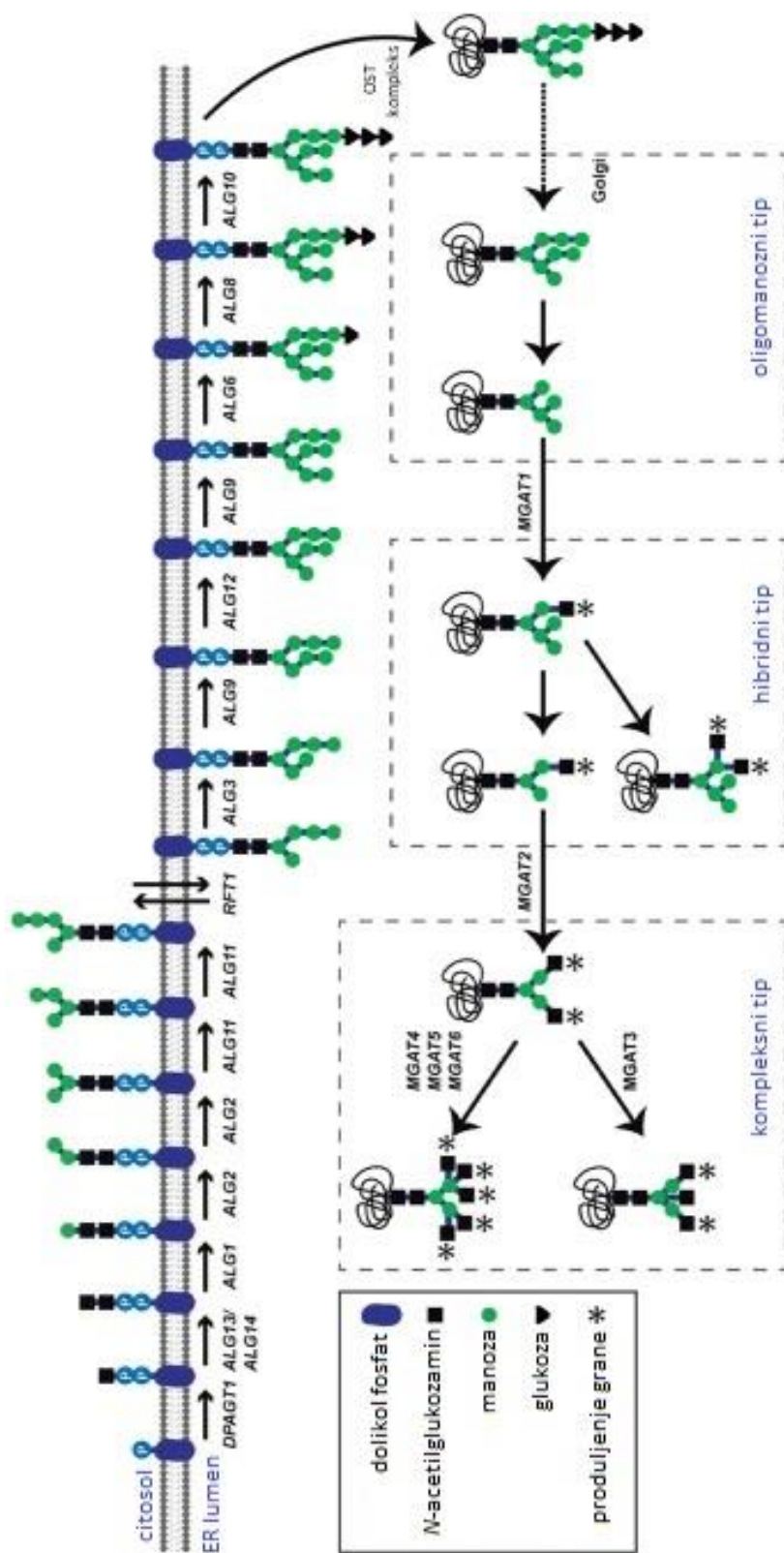
Slika 2 Prikaz primjera tri tipa *N*-glikana s obzirom na grananje. Od vrha prema dnu prikazani su oligomanozni, kompleksni i hibridni tip. Žutom bojom je označena zajednička jezgrena sekvenca koja se sastoji od tri manoze (Man) i dva *N*-acetilglukozamina (*N*-GlcNAc), kao i njezino vezanje na asparaginski (Asn) ostatak na proteinu. Sia = sijalinska kiselina, *N*-acetilneuraminska kiselina; Gal = galaktoza, Fuc = fukoza. Preuzeto i prilagođeno iz Gornik i Lauc, 2008. (32)

1.2.1.2. Biosintetski put *N*-glikozilacije

S obzirom na tematiku ovog rada, *N*-glikozilaciju se nikako ne smije zamijeniti s glikacijom, ne-enzimskim vezanjem šećera na proteine (33) uključenom u patofiziologiju razvoja šećerne bolesti (34).

Biosinteza *N*-glikana u eukariotima može se podijeliti u dva dijela koja se odvijaju u endoplazmatskom retikulu i Golgijevom aparatu (25). Prvi dio biosinteze je visoko konzerviran put koji se odvija na membrani endoplazmatskog retikula preko lipidnog nosača dolikol fosfata (25). Oligosaharid sastavljen na dolikol fosfatu prenosi se na asparaginski ostatak Asn-X-Ser/Thr slijeda nekog sekretornog ili membranskog proteina tijekom njihove translokacije u endoplazmatski retikul. Stvaranje oligosaharida na dolikol fosfatu započinje reakcijom

prijenosa *N*-acetilglukozamin-1-fosfata sa supstrata uridin-difosfat-*N*-acetilglukozamina na dolikol fosfat pri čemu nastaje dolikol pirofosfat *N*-acetilglukozamin. Ovaj prvi korak u nastajanju oligosaharidnog kompleksa na dolikol fosfatu kataliziran je enzimom *N*-acetilglukozamin-1-transferazom, kodiranom *DPAGT1* genom. Slijedi niz reakcija, kataliziranih transferazama kodiranim genima *ALG13/14*, *ALG1*, *ALG2* te *ALG11*, tijekom kojih se još jedan *N*-acetilglukozaminski i pet manoznih ostataka prenose s uridin-difosfat-*N*-acetilglukozamina i gvanozin-difosfat-manoze na spomenuti dolikol pirofosfat *N*-acetilglukozamin pri čemu nastaje oligosaharid od pet manoznih i dva *N*-acetilglukozaminska ostatka na dolikol pirofosfatu. Nastali oligosaharidni prekursor vezan na dolikol pirofosfat translocira se s citosolne strane membrane endoplazmatskog retikula na luminalnu stranu uz pomoć enzima flipaze koji se povezuje s *RFT1* genom u kvascu. Slijedi produljivanje postojećeg oligosaharidnog prekursora dodatkom četiri manozna ostatka i tri glukoza ostatka s dolikol-fosfat-manoze i dolikol-fosfat-glukoze pomoću niza enzima kodiranih genima *ALG3*, *ALG9*, *ALG12*, *ALG6*, *ALG8* te *ALG10*, uslijed čega nastaje sazreli prekursor od tri glukoza, devet manoznih i dva *N*-acetilglukoza ostatka vezanih na dolikol pirofosfat. Ovaj četrnaestočlani oligosaharidni prekursor se naposljetku prenosi s lipidnog nosača na polipeptidni slijed proteina uz pomoć oligosahariltransferaze (OST) te se upućuje na daljnju obradu. Druga faza biosinteze započinje obradom kreiranog prekursora *N*-glikana glikozidazama i glikoziltransferazama u lumenu endoplazmatskog retikula, a nastavlja se u Golgijevom aparatu (25). Obrada glikana u endoplazmatskom retikulu podrazumijeva njihov "*trimming*", odnosno skraćivanje, ali i izdvajanje krivo smotanih glikoproteina koji se upućuju na razgradnju. U trenutku prelaska iz endoplazmatskog retikula u Golgijev aparat, većina glikoproteina sadržava *N*-glikane s osam ili devet manoznih ostataka, dok neki drugi glikoproteini, kao rezultat nekompletne obrade u endoplazmatskom retikulu, zadržavaju na svojoj strukturi glukoza ostatak. U medijalnom Golgijevom aparatu razne spomenute glikozidaze i glikoziltransferaze (kodirane genima *MGAT1-MGAT6*) započinju obradu postojeće glikanske strukture s ciljem kreiranja hibridnih i kompleksnih tipova *N*-glikana. Završna faza u biosintezi *N*-glikana, poznata i kao glikansko sazrijevanje, podrazumijeva dodavanje šećernih ostataka na zajedničku jezgru *N*-glikana, zatim produljenje "antena", odnosno grana glikanske strukture dodavanjem šećernih ostataka, te konačno ukrašavanje, to jest "*capping*" produljenih glikanskih grana dodavanjem raznih šećera (Slika 3). Mnogi enzimi koji sudjeluju u biosintezi *N*-glikana različito su eksprimirani s obzirom na fiziološko stanje stanice što utječe na raznovrsnost glikanskih struktura (25).



Slika 3 Pojednostavljeni prikaz biosinteze *N*-glikana. Prvi dio biosinteze *N*-glikana započinje s citosolne strane endoplazmatskog retikula te se odvija preko lipidnog nosača dolikol fosfata pri čemu niz enzima veže *N*-acetilglukozaminske i manozne ostatke na lipidni nosač. Zatim enzim flipaza translocira prekursor na luminalnu stranu endoplazmatskog retikula, gdje se nastavlja njegovo produjivanje dodatkom manoznih i glukoznih jedinica. Nastali četrnaesto-člani glikan (tri glukoze, devet manozna i 2 *N*-acetilglukozamina) prenosi se pomoću oligosahariltransferaza (OST) kompleksa na asparaginski (Asn) ostatak peptidnog lanca, nakon čega slijedi daljnja obrada nastalih glikoproteina – kontrola pravilnog smatanja te skraćivanje šećernog dijela. Takvi obradeni glikoproteini konačno odlaze u Golgijev aparat gdje ih obrađuju razni enzimi u svrhu nastajanja oligomanoznih, kompleksnih ili hibridnih *N*-glikana (25). Preuzeto i prilagođeno iz Varelas, Bouchie i Kukuruzinska, 2014. (35)

1.2.1.3. Funkcije i uloge *N*-glikana

Poznato je da post-translacijske modifikacije znatno utječu na strukturu i funkciju proteina (36). U slučaju *N*-glikozilacije, najčešće opisivani primjer modificiranja funkcije proteina odnosi se na prisutnost sržne fukoze na imunoglobulinu G koja steričkim ometanjem vezanja Fc fragmenta imunoglobulina G s Fc γ RIIIa receptorom sprječava pretjeranu aktivaciju stanične citotoksičnosti ovisne o antitijelima (engl. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) (37).

Neke od glavnih uloga *N*-glikana na staničnim proteinima, membranskim ili citoplazmatskim, jesu sudjelovanje u staničnoj signalizaciji ili staničnoj adheziji, kao i u interakciji s izvanstaničnim okolišem (38). Smatanje i stabilnost glikoproteina ovisi o modifikacijama vezanih *N*-glikana što značajno utječe na njihovu funkciju, a posljedično i na međusobnu interakciju glikanskih i/ili proteinskih dijelova glikoproteina (38). Uzevši u obzir široku lepezu glikanskih uloga, kao i činjenicu da je velika većina eukariotskih proteina glikozilirana (27), značajne promjene *N*-glikana primijećene su u mnogim fiziološkim i patofiziološkim stanjima koja su uzorkovana abnormalnim ili fiziološkim promjenama strukture, aktivnosti ili razine proteina (39, 40). Međutim, dok ne nastupi promjena homeostaze u pojedincu, bilo uslijed promjene životnog stila ili uslijed fizioloških ili patofizioloških promjena, glikozilacija proteina unutar pojedinca iznimno je stabilna (41).

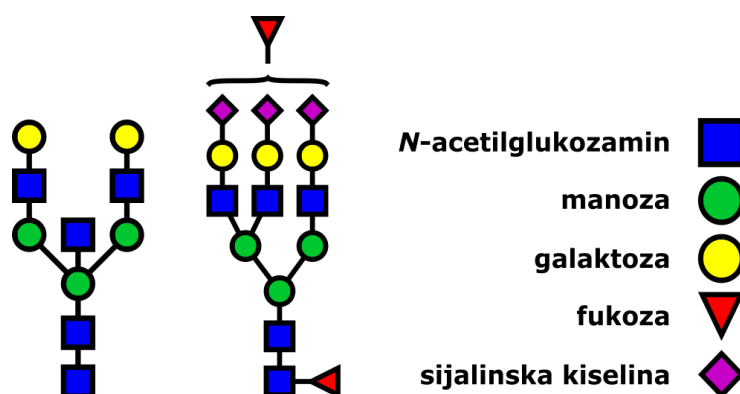
Glikani su esencijalni i za aktivnost i funkcioniranje imunskog sustava s obzirom da su gotovo sve ključne molekule urođenog i stečenog imunskog odgovora glikoproteini (42). Nadalje, na miševima je pokazana uska povezanost *N*-glikozilacije sa staničnim metabolizmom i unosom hranjivih tvari kroz heksozaminski biosintetski put (43). Stoga bi izučavanje i praćenje ljudskog *N*-glikoma, skupa svih *N*-glikana, rezultiralo vrijednim informacijama o upalnom i kardiometaboličkom statusu organizma. Štoviše, nedavna istraživanja su predložila ideju glikana kao funkcionalnih efektoru u raznim fiziološkim procesima kao i u nekolicini poremećaja i bolesti, poput šećerne bolesti i pretilošću izazvane inzulinske rezistencije (44–46). S obzirom na uključenost glikana u većinu fizioloških i patofizioloških procesa, interes za istraživanje potencijala glikana kao biljega raznih bolesti je sve veći (47).

1.2.1.4. *N*-glikozilacija proteina plazme

N-glikom proteina plazme jest skup svih glikanskih struktura prisutnih na glikoproteinima ljudske plazme/seruma. Interesantno je da albumin, najzastupljeniji protein u plazmi koji sačinjava otprilike 50 – 60 % ukupnih proteina plazme u zdravom pojedincu, nije glikozilirani

(48). Prvi sljedeći protein plazme po zastupljenosti jest imunoglobulin G (49), što ga ujedno čini i najzastupljenijim glikoproteinom plazme. Osim imunoglobulina G, te ostalih klasa imunoglobulina, neki od važnijih i češće proučavanijih glikoproteina plazme su α -1-kiseli glikoprotein (engl. *alpha-1-acid glycoprotein*, AGP), haptoglobin, transferin te α -1-antitripsin (9), čiji su *N*-glikozilacijski profili analizirani i zasebno (50–54), a za neke su čak i razvijene visokoprotočne metode analize (55). Pored velike raznovrsnosti glikoproteoma plazme (skup svih glikoproteina plazme) uslijed mnogobrojnosti različitih prisutnih proteina (49), glikanski dio neusporedivo više doprinosi toj raznovrsnosti (25). Svaki glikoprotein može na sebi nositi različite glikanske strukture, kreirane od mnogobrojnih kombinacija monosaharida (9). Nadalje, ti glikani mogu biti vezani na različitim glikozilacijskim mjestima, kojima, od glikoproteina do glikoproteina, varira popunjenost, ali i broj (9).

Glikanske strukture plazmatskih glikoproteina sastavljene su od nekolicine monosaharida: fukoze, galaktoze, manoze, *N*-acetilglukozamina i sijalinske kiseline, odnosno *N*-acetilneuraminske kiseline (9, 25). Fukoza može biti sržno ili antenarno vezana – antenarna fukoza u većini je slučajeva vezana za *N*-acetilglukozamin (56) vezan za jednu od dvije manoze koje označavaju početak grananja glikanske strukture. Galaktoza se veže na spomenuti *N*-acetilglukozamin, a sijalinska kiselina na galaktozu. Osim početnog dijela svake grane (antene), *N*-acetilglukozamin se može vezati i na središnju manozu zajedničke glikanske jezgre, te se tada naziva račvajući *N*-acetilglukozamin (engl. *bisecting*) (9, 25) (Slika 4).



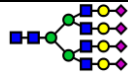
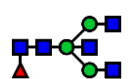
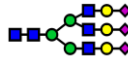


Slika 4 Prikaz tipičnih glikanskih struktura prisutnih na glikoproteinima ljudske plazme. Lijevo je prikazan glikan koji na zajedničku glikansku jezgru (dva *N*-acetilglukozamina i tri manoze) ima vezan račvajući *N*-acetilglukozamin na središnju manozu (središnji plavi kvadratić vezan na središnji zeleni kružić), dok se iz rubnih manoz odvajaju dvije antene, odnosno grane, vezanjem *N*-acetilglukozamina. Nadalje, grane se dodatno produljuju vezanjem po jedne galaktoze na svaki od spomenutih *N*-acetilglukozamina. Desna glikanska struktura prikazuje kompleksniji glikan. Iz lijeve manoze, koja je dio zajedničke jezgre, razdvajaju se dvije grane koje čine redom vezani *N*-acetilglukozamini, galaktoze

i sijalinske kiseline, dok se iz desne manoze odvaja samo jedna grana istog sastava. Na početnom jezgrenom *N*-acetilglukozaminu vezana je tzv. sržna fukoza, dok je na granama (antenama) vezana antenarna fukoza. Iako se u većini slučajeva antenarna fukoza veže za *N*-acetilglukozamin koji se nalazi u dnu grane, njezino se vezanje prikazuje vitičastom zagradom na vrhu grana jer nije točno određeno na kojem se, od tri moguća *N*-acetilglukozamina, ta fukoza i nalazi (9, 25).

Radi lakšeg tumačenja rezultata i karakterizacije glikanskih promjena primijećenih u raznim fiziološkim stanjima ili bolestima, glikanske strukture se mogu grupirati s obzirom na zajednička strukturalna svojstva. Pa se tako sve glikane proteina plazme koji sadrže sržno, odnosno jezgreno vezanu fukozu, naziva sržno fukozilirani (engl. *core fucosylated*), dok se one s dvije sijalinske kiseline naziva dijsijalinizirani (engl. *disialylated*), i tako dalje. Ove zajedničke strukturalne značajke glikanskih struktura nazivaju se derivirana svojstva (engl. *derived traits*) (Tablica 1).

Tablica 1 Popis deriviranih svojstava koji opisuju zajedničke strukturalne značajke *N*-glikoma proteina plazme. U tablici je naveden hrvatski i engleski naziv deriviranog svojstva, kratica te opis, a prikazana je i reprezentativna struktura za svako svojstvo.

Derivirano svojstvo <i>N</i> -glikoma proteina plazme	Opis deriviranog svojstva	Primjer glikanske strukture
Niska razgranatost (engl. <i>low branching</i> , LB)	Svi glikani koji sadrže jednu ili dvije grane.	
Visoka razgranatost (engl. <i>high branching</i> , HB)	Svi glikani koji sadrže tri ili više grana.	
Agalaktozilacija (engl. <i>agalactosylation</i> , G0)	Svi glikani koji ne sadrže galaktozu.	
Monogalaktozilacija (engl. <i>monogalactosylation</i> , G1)	Svi glikani koji sadrže jednu galaktozu.	
Digalaktozilacija (engl. <i>digalactosylation</i> , G2)	Svi glikani koji sadrže dvije galaktoze.	
Trigalaktozilacija (engl. <i>trigalactosylation</i> , G3)	Svi glikani koji sadrže tri galaktoze.	
Tetragalaktozilacija (engl. <i>tetragalactosylation</i> , G4)	Svi glikani koji sadrže četiri galaktoze.	
Neutralni glikani, asijalinizacija (engl. <i>neutral glycans, asialylation</i> , S0)	Svi neutralni glikani, odnosno oni koji ne sadrže sijalinsku kiselinu.	
Monosijalinizacija (engl. <i>monosialylation</i> , S1)	Svi glikani koji sadrže jednu sijalinsku kiselinu.	
Disijalinizacija (engl. <i>disialylation</i> , S2)	Svi glikani koji sadrže dvije sijalinske kiseline.	
Trisijalinizacija (engl. <i>trisialylation</i> , S3)	Svi glikani koji sadrže tri sijalinske kiseline.	

Tetrasijalinizacija (engl. <i>tetrasialylation</i> , S4)	Svi glikani koji sadrže četiri sijalinske kiseline.	
Učestalost račvajućeg <i>N</i> -acetilglukozamina (engl. <i>incidence of bisecting GlcNAc</i> , B)	Svi glikani koji sadrže račvajući <i>N</i> -acetilglukozamin.	
Antenarna fukozilacija (engl. <i>antennary fucosylation</i> , AF)	Svi glikani koji sadrže fukozu na anteni, odnosno grani.	
Sržna fukozilacija, (engl. <i>core fucosylation</i> , CF)	Svi glikani koji sadrže fukozu sržno vezanu, odnosno fukozu vezanu za jezgru glikana.	
Oligomanozni glikani (engl. <i>oligomannose</i> , <i>high mannose glycans</i> , HM)	Svi glikani koji sadrže puno manoznih jedinica.	

Bitno je napomenuti kako ovaj popis deriviranih svojstava nije "zlatni standard" deriviranih svojstava koje opisuju glikanske strukture na glikoproteinima, već opisuje najčešće opisivana derivirana svojstva.

Glavne glikanske strukture detektirane u većini glikoproteina plazme jesu biantenaran, digalaktozilirani i disijalinizirani glikan (glikan s dvije grane, na svakoj je po jedna galaktoza te na nju vezana jedna sijalinska kiselina) te biantenaran, digalaktozilirani i monosijalinizirani glikan (glikan s dvije grane, na svakoj po jedna galaktoza, ali na samo jednoj od njih vezana jedna sijalinska kiselina) (9). Jednostavnije strukture, s maksimalno dvije grane, većinom bez sijalinske kiseline, ali sa sržnom fukozom, potječu s imunoglobulina G (9). Kompleksnije, visoko razgranate strukture s tri ili četiri grane, manje su zastupljene od biantenarnih struktura, te uglavnom dolaze s proteina akutne faze, poput AGP-a (9, 57).

1.2.1.4.1. Utjecaj *N*-glikozilacije proteina plazme na njihovo djelovanje

Budući da većina sržno fukoziliranih i manje razgranatih *N*-glikana glikoproteoma plazme potječe s imunoglobulina G (9), njihov utjecaj na djelovanje imunoglobulina G bit će opisan u nadolazećem poglavlju.

Veća razgranatost i kompleksnost glikanskih struktura u ljudskom *N*-glikomu povezana je s raznim bolestima i upalnim stanjem organizma (39, 58–60), te se često tumači kao rezultat povećanih razina proteina akutne faze tijekom spomenutih patofizioloških stanja, čiji su glikani većinski visoko razgranati (61). Veća razgranatost i kompleksnost struktura očitava se u povećanoj galaktozilaciji i sijalinizaciji, pa su tako povećana tri- i tetrasijalinizacija te tri- i tetragalaktozilacija također zapažene u bolestima i upalnim stanjima (13, 39, 58, 61). Nagada se kako bi do povećane razgranatosti glikanskih struktura u šećernoj bolesti moglo doći uslijed

povećane razine glukoze koja dovodi do izmjene protoka kroz heksozaminski put, tijekom kojeg nastaje uridin difosfat *N*-acetilglukozamin, supstrat za *N*-vezanu glikozilaciju (13).

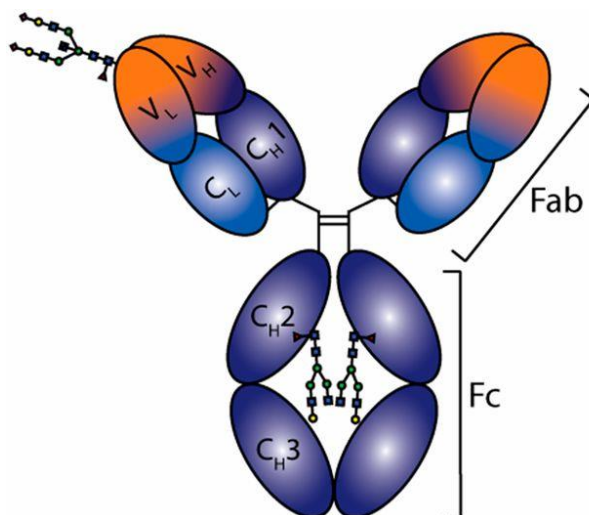
Povećana antenarna fukozilacija je također često zapažana u različitim bolestima (39, 58, 59). Budući da je antenarna fukoza većinom prisutna na kompleksnim, razgranatim glikanima, njeno povećanje se također povezuje s upalnim proteinima (62). No, pokazano je kako razina antenarne fukozilacije proteina plazme može uspješno izdvojiti pojedince koji boluju od šećerne bolesti zrele dobi kod mladih osoba (engl. *mature-onset diabetes of the young*, MODY), od onih oboljelih od šećerne bolesti tipa 1 ili 2, te od zdravih kontrola (63, 64), što bi uvelike pospješilo diferencijalnu dijagnostiku šećerne bolesti.

1.2.1.5. *N*-glikozilacija imunoglobulina G

Imunoglobulin G (IgG), uz imunoglobulin M, imunoglobulin A, imunoglobulin E i imunoglobulin D, čini imunoglobuline – glikoproteine plazme, poznate i pod nazivom protutijela (65). IgG jest najzastupljeniji imunoglobulin u plazmi, s prosječnom koncentracijom od 9 mg/mL (65), te najzastupljeniji glikoprotein (9, 49).

Građen od dva teška (H, engl. *heavy*) i dva laka (L, engl. *light*) lanca, od kojih svaki sadrži varijabilnu (V) i konstantu (C) regiju (66), imunoglobulin G jest glavna komponenta urođenog imunosnog odgovora, te se primarno izlučuje od strane B stanica tijekom sekundarnog imunosnog odgovora (67). Dok se laki lanac dijeli na dvije domene, V_L i C_L , teški lanac se dijeli na čak četiri – V_H , C_{H1} , C_{H2} i C_{H3} (66). Struktura IgG-a se dijeli na Fab regiju, odnosno onu koja prepoznaje antigen, te na Fc regiju, odnosno onu koja sudjeluje u interakciji s $Fc\gamma$ receptorima na imunosnim stanicama te s komplementom (66).

Fc regija IgG-a sadrži jedno visoko konzervirano glikozilacijsko mjesto na svakoj od dvije C_{H2} domene, dok su na Fab regiji ponekad eksprimirani *N*-glikani, čije glikozilacijsko mjesto nije konzervirano (9, 66) (Slika 5).



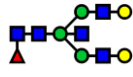
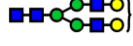
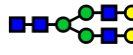
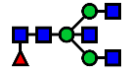

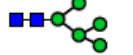
Slika 5 Prikaz strukture IgG-a. Na slici su označene varijabilne i konstantne domene teških i lakih lanaca, kao i Fab i Fc regija. Na C_{H2} domenama vidljive su tipične glikanske strukture prisutne na visoko konzerviranom glikozilacijskom mjestu Fc regije IgG-a. Prikazana je i tipična glikanska struktura koja je ponekad eksprimirana na Fab regiji. Preuzeto i prilagođeno iz Bovenkamp, Hafkenscheid, Rispens i Rombouts, 2016. (68)

Glikanske strukture koje su najzastupljenije na IgG-u kompleksnog su tipa s obzirom na grananje – biantenarne, mono- ili digalaktozilirane strukture sa sržnom fukozom (9). Glikozilacijsko mjesto Fc regije IgG-a većinski je zastupljeno spomenutim, sržno fukoziliranim, biantenarnim, mono- i digalaktoziliranim strukturama, dok Fab regija sadrži predominantno mono- i disijalinizirane strukture (9).

Kao i kod glikoproteina plazme, glikanske strukture koje se nalaze na IgG-u mogu se grupirati prema zajedničkim strukturnim značajkama. S obzirom da je IgG glikoziliran jednostavnijim i manje razgranatim strukturama, njegova glikozilacija je opisana s manje deriviranih svojstava (Tablica 2).

Tablica 2 Popis deriviranih svojstava koji opisuju zajedničke strukturne značajke *N*-glikoma imunoglobulina G. U tablici je naveden hrvatski i engleski naziv deriviranog svojstva, kratica te opis, a prikazana je i reprezentativna struktura za svako svojstvo.

Derivirano svojstvo <i>N</i> -glikoma imunoglobulina G	Opis	Primjer glikanske strukture
Agalaktozilacija (engl. <i>agalactosylation</i> , G0)	Svi glikani koji ne sadrže galaktozu.	
Monogalaktozilacija (engl. <i>monogalactosylation</i> , G1)	Svi glikani koji sadrže jednu galaktozu.	
Digalaktozilacija (engl. <i>digalactosylation</i> , G2)	Svi glikani koji sadrže dvije galaktoze.	

Neutralni glikani, asijalinizacija (engl. <i>neutral glycans, asialylation, S0</i>)	Svi neutralni glikani, odnosno oni koji ne sadrže sijalinsku kiselinu.	
Monosijalinizacija (engl. <i>monosialylation, S1</i>)	Svi glikani koji sadrže jednu sijalinsku kiselinu.	
Disijalinizacija (engl. <i>disialylation, S2</i>)	Svi glikani koji sadrže dvije sijalinske kiseline.	
Učestalost račvajućeg N-acetilglukozamina (engl. <i>incidence of bisecting GlcNAc, B</i>)	Svi glikani koji sadrže račvajući N-acetilglukozamin.	
Sržna fukozilacija, (engl. <i>core fucosylation, CF</i>)	Svi glikani koji sadrže fukozu sržno vezanu, odnosno fukozu vezanu za jezgru glikana.	
Oligomanozni glikani (engl. <i>oligomannose, high mannose glycans, HM</i>)	Svi glikani koji sadrže puno manoznih jedinica.	

Također, ponovno se napominje kako navedena derivirana svojstva nisu "zlatni standard" deriviranih svojstava kojima se opisuje glikozilacija IgG-a, već su ovdje navedena najčešće opisivana derivirana svojstva.

Prisutnost monosaharidnih jedinica u glikanskoj strukturi može na različite načine utjecati na strukturu, a posljedično i funkciju IgG-a.

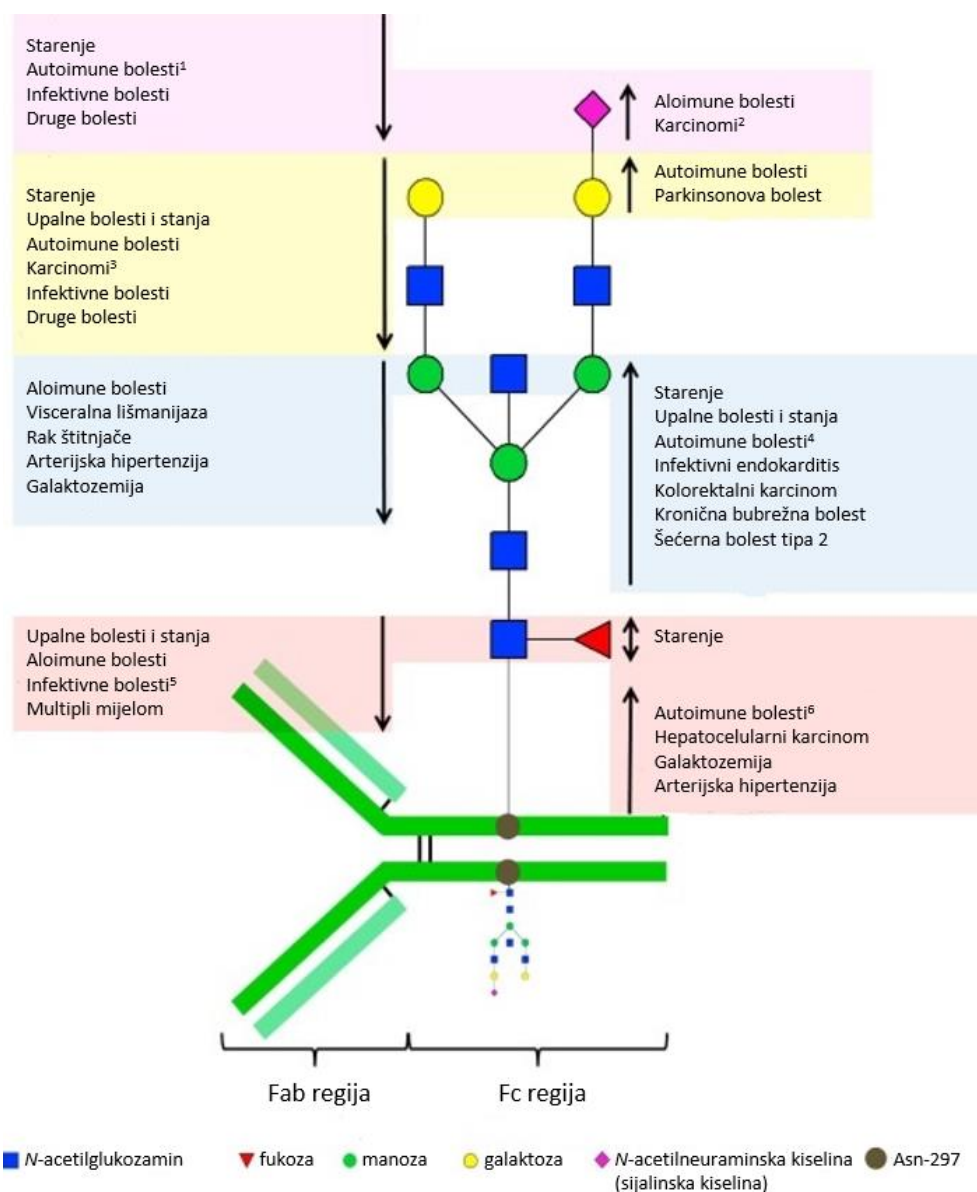
1.2.1.5.1. Utjecaj N-glikozilacije IgG-a na njegovo djelovanje

Već je spomenuto kako prisutnost sržne fukoze utječe na vezanje Fc regije IgG-a za njegov receptor, regulirajući aktivnost ADCC-a, te na taj način modificira njegovu efektorsku funkciju (37, 69).

Osim sržne fukoze, i prisutnost sijalinske kiseline utječe na djelovanje IgG-a. Istraživanje na mišjim modelima je pokazalo da se djelovanje IgG-a mijenja iz upalnog u protuupalno prisutnošću sijalinske kiseline na Fc regiji, dok je drugo istraživanje pokazalo kako protuupalno djelovanje intravenskog imunoglobulina (IVIG) potječe od hipersijalinizacije Fc regije (70). Naime, ostaci sijalinske kiseline u glikanima IgG-a smanjuju afinitet vezanja IgG-a za aktivirajuće Fc γ receptore što posljedično dovodi do smanjene citotoksičnosti IgG-a (71). Osim toga, sijalinska kiselina na IVIG-u utječe i na indukciju ekspresije inhibirajućeg receptora Fc γ RIIB receptora, eksprimiranog na B stanicama (71). Pojačana ekspresija ovog jedinog inhibirajućeg Fc receptora dovodi do njegovog povezivanja s receptorom za B stanice (engl. *B cell receptor, BCR*) rezultirajući porastom praga za aktivaciju B stanica te posljedičnim smanjenjem proizvodnje protutijela što dovodi do supresije upalnog stanja (72).

Više istraživanja je predložilo da ulogu u regulaciji aktivnosti ADCC-a ima i povećana prisutnost račvućeg *N*-acetilglukoamina na IgG-u (73). Sumnja se da pretjerana ekspresija enzima (β -1,4-*N*-acetilglukozamintransferaza III) koji katalizira dodavanje ove glikanske modifikacije rezultira poboljšavanjem vezanja IgG-a za aktivirajući Fc γ RIII receptor na NK stanicama uslijed čega se pospješuje djelotvornost ADCC-a (74). Međutim, nije posve sigurno utječe li prisutnost račvućeg *N*-acetilglukoamina direktno na aktivnost IgG-a ili posredno, s obzirom da opaženo kako dodavanje račvućeg *N*-acetilglukoamina blokira posljedične reakcije koje bi dovele do modifikacije IgG glikana dodavanjem sržne fukoze (75), za koju je poznato da njena prisutnost smanjuje, odnosno kontrolira aktivnost ADCC-a.

Uloga galaktoze na glikanima IgG-a znatno je kompleksnija, budući da su istraživanja predložila njeno sudjelovanje u poticanju i upalnih i protuupalnih aktivnosti IgG-a. Jedno istraživanje je pokazalo kako galaktozilacija Fc regije IgG-a potiče efikasnost citotoksičnosti ovisne o komplementu (engl. *complement-dependent cytotoxicity*, CDC) (76), dok su druga istraživanja pokazala da je agalaktozilacija, odnosno nedostatak galaktoze na glikanu, povezana s uspješnijim vezivanjem za manoza-vezujući lektin (engl. *mannose-binding lectin*, MBL) te posljedičnom aktivacijom komplementa (77, 78). Nadalje, pokazano je i kako galaktozilacija IgG-a pozitivno utječe na inhibirajuću signalnu kaskadu koja koči upalnu aktivnost kemoatraktanata (79). Povećana razina galaktozilacije IgG-a povezana je s mlađom kronološkom dobi (80), a izostanak galaktozilacije, odnosno agalaktozilacija, sa starenjem i mnogim bolestima s upalnom komponentom (40, 80) (Slika 6).



Slika 6 Prikaz promjena u *N*-glikomu IgG-a tijekom starenja i u raznim bolestima. Strelica prema dolje prikazuje pad, a strelica prema gore rast određenog glikozilacijskog deriviranog svojstva tijekom starenja ili u pacijenata oboljelih od raznih bolesti, nakon usporedbe sa zdravim osobama. Strelice prikazuju i promjene glikozilacije dobivene uspoređivanjem pacijenata u aktivnoj fazi bolesti s onima u remisiji. Promjene starenja se odnose samo na odraslu dob. ¹osim u autoimunoj hemolitičnoj anemiji; ²osim u kolorektalnom karcinomu i karcinomu jajnika; ³osim u raku štitnjače i multiplom mijelomu; ⁴osim u osteoartritisu, vaskulitisu povezanom s ANCA protutijelima i autoimunoj hemolitičnoj anemiji; ⁵osim u visceralnoj lišmanijazi i infekciji HIV-om; ⁶osim u sistemskom eritemskom lupusu, ulceroznom kolitisu, i vaskulitisu povezanom s ANCA protutijelima. Preuzeto i prilagođeno iz Gudelj, Lauc i Pezer, 2018. (40)

1.2.1.6. Metode analize *N*-glikana

Analiza *N*-glikana jest vrlo kompleksan i zahtjevan zadatak zbog raznovrsnosti samih monosaharida kao sastavnih jedinica glikana, ali i njihovog poretka i brojnosti u glikanskoj strukturi. Nadalje, monosaharidne jedinice mogu biti međusobno vezane glikozidnim vezama raznih orijentacija, te i cijela glikanska struktura može biti vezana na različitim mjestima na glikoproteinu. Za uspješnu analizu *N*-glikana i njihovih karakteristika ne postoji univerzalna analitička metoda, već se rješavanju problema pristupa korištenjem raznih analitičkih metoda (25).

Analizi glikozilacije može se pristupiti na tri načina – karakterizacijom glikana na intaktnim glikoproteinima; karakterizacijom glikopeptida; analizom strukture kemijski ili enzimatski otpuštenih glikana (81).

S obzirom da se analizom intaktnih glikana na glikoproteinima zadržava specifična veza glikanskog dijela s proteinom, ovaj način karakterizacije se smatra izvorom vrijednih informacija o interakciji šećernog i proteinskog dijela glikoproteina i posljedičnom utjecaju te interakcije na funkciju samog glikoproteina (82). Nedavna istraživanja su predstavila dva pristupa karakterizaciji kompozicije glikana na glikoproteinima – prvo je analiza kompozicije i dinamike glikanskog profila na intaktnom proteinu pomoću NMR spektroskopije (82), a drugo je razdvajanje intaktnih glikoproteina pomoću masene spektrometrije (MS) visoke rezolucije u kombinaciji sa strukturalnom analizom koristeći IMS-MS/MS metodu (spektrometrija temeljena na pokretljivosti iona povezana s tandemskom spektrometrijom masa) (83). Dvostruko izotopsko obilježavanje glikoproteina omogućava analizu NMR spektroskopijom što pruža informacije o strukturi i funkciji intaktnog glikoproteina pri fiziološkim uvjetima uz dodatne informacije o dinamici i pokretljivosti glikana (82). S druge strane, pristup analizi intaktnih glikana na glikoproteinima pomoću MS-a temelji se na prvotnoj separaciji glikoformi te posljedičnoj strukturalnoj analizi razdvojenih glikoformi karakterizacijom enzimatski otpuštenih glikana koristeći IMS-MS/MS metodu (83).

Karakterizacija intaktnog glikopeptida paralelno pruža dvije vrlo vrijedne informacije – strukturu glikana prisutnu na glikoproteinu te informaciju o glikozilacijskom mjestu spomenutog proteina, bitnu za razumijevanje funkcije i uloge glikoproteina od interesa, ali i njegovog glikoprofila (84). Najprimjenjivaniji pristup analizi intaktnog glikopeptida temelji se na MS-u. Za što uspješniju separaciju glikopeptida MS-om potrebno je prvo enzimatski razgraditi glikoprotein na više glikopeptida za što se uglavnom koristi razgradnja tripsinom

(84). Potom slijedi obogaćivanje glikopeptida sa svrhom što uspješnije karakterizacije jer su vrlo često slabo zastupljeni u otopini nakon tripsinizacije, za što se često koriste kuglice temeljene na hidrofilnim interakcijama (engl. *HILIC beads*). Na kraju se ovako obogaćeni glikopeptidi analiziraju MS/MS-om (84).

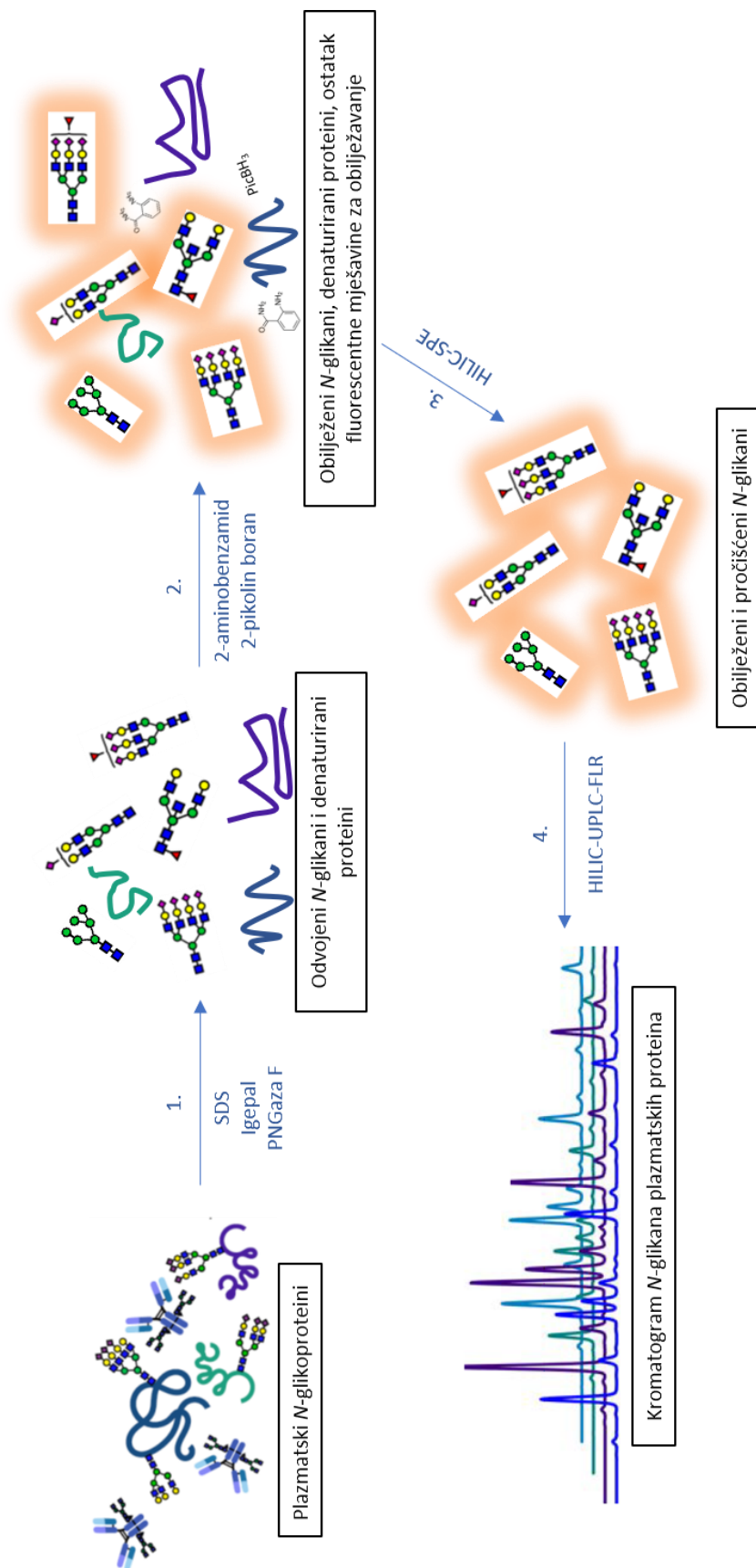
U ovom istraživanju analizi glikozilacije pristupilo se analizirajući enzimatski otpuštene glikane, stoga će u nastavku fokus biti na tome pristupu.

Enzim najčešće korišten za oslobađanje glikana s glikoproteina, kidajući vezu sržnog *N*-acetilglukozamina s asparaginskim ostatkom na proteinu, jest peptid-*N*-glikozidaza F, odnosno PNGaza F. Budući da su proteini vrlo često molekule velikih, gusto smotanih struktura, potrebno ih je denaturirati kako bi glikani bili dostupniji djelovanju enzima (81). Sastav ovako otpuštenih *N*-glikana, odnosno njihovih očuvanih struktura, može se analizirati i identificirati tekućinskom kromatografijom visoke (HPLC) ili ultra-visoke djelotvornosti (UPLC), ali i plinskom kromatografijom (GC) (81).

No, osim identifikacije sastava monosaharidnih jedinica u glikanskoj strukturi, vrlo je bitno uspješno odrediti i stereokemiju veza između ovih jedinica kao i razinu grananja te njihovu orijentaciju, budući da je ovakva detaljna analiza glikana bitna za proizvodnju biofarmaceutika, ali i prilikom otkrivanja novih biljega bolesti (81). U tu svrhu koriste se metode poput UPLC-a temeljenog na hidrofilnim interakcijama (HILIC) s fluorescencijskom detekcijom (FLR), kapilarne elektroforeze s laserski induciranom fluorescencijom (CE-LIF) te masene spektrometrije (MS) (81). Glavna prednost HILIC-UPLC-FLR metode, korištene u ovom istraživanju, jest uspješno razdvajanje struktura jednake mase, ali s različitom orijentacijom grana, tzv. strukturalnih izomera. CE-LIF pak ima kraće trajanje separacije glikana, međutim interpretacija dobivenih podataka je otežana zbog nepotpunih baza podataka, ali je i sama metoda manje robustna od UPLC metode (85). MS omogućuje identifikaciju kompozicije glikana s obzirom na masu, no nije u mogućnosti razdvojiti strukturalne izomere. Iz tog razloga, često se pristupa višedimenzionalnom analiziranju glikana povezivanjem HILIC-UPLC-FLR metode s MS-om kako bi se postiglo razdvajanje glikana prema kompoziciji monosaharidnih jedinica, orijentaciji grananja te masi (85, 86).

Analiza oslobođenih *N*-glikana HILIC-UPLC-FLR metodom podrazumijeva fluorescencijsku detekciju razdvojenih glikanskih struktura – budući da native glikanske strukture ne fluoresciraju, potrebno ih je obilježiti fluorescentnom bojom (87). Za tu svrhu vrlo često

korištena boja jest 2-aminobenzamid (2-AB), no sve se češće koristi i prokainamid zbog uspješnijeg fluoresciranja (86). Nakon obilježavanja, glikani se razdvajaju HILIC-UPLC metodom na temelju svoje hidrofilnosti koja utječe na duljinu trajanja interakcije s kolonom, dok fluorescencijski detektor pruža informaciju o zastupljenosti pojedine strukture u ukupnom glikomu (87) (Slika 7).



Slika 7 Pojednostavljeni prikaz protokola analize N-glikana proteina plazme metodom HILIC-UPLC-FLR koja je korištena u ovom istraživanju. 1. Glikoproteini plazme se denaturiraju natrijevim dodecilsulfatom (engl. sodium dodecyl sulphate, SDS), a zatim se dodaje Igepal kako bi neutralizirao višak SDS-a. PNGaza F potom cijepa veze proteina i N-glikana, koji su dostupniji njenom djelovanju nakon denaturacije proteina. 2. Odvojene N-glikane obilježava se fluorescentnom mješavinom sastavljenom od 2-aminobenzamida, fluorescentne boje, i 2-pikolin borana, reduktivne tvari. 3. Obilježene N-glikane je potrebno pročitati od zaostale fluorescentne mješavine i ostatka denaturiranih proteina te ostalih nečistoća. Pročišćavanje se provodi ekstrakcijom na čvrstoj fazi (engl. solid-phase extraction, SPE) koja se temelji na hidrofilnim interakcijama (HILIC). 4. Pročišćene i obilježene N-glikane analizira se HILIC-UPLC-FLR metodom.

1.2.2. *Metabolički sindrom*

Metabolički sindrom, odnosno zajednička pojava niza metaboličkih poremećaja povezanih s visceralnom pretilošću, prema zadnjim smjernicama izdanim od strane Međunarodne federacije za dijabetes dijagnosticira se u slučaju prisutnosti visceralne pretilosti uz prisutnost barem dva od sljedećih četiri stanja: povećana koncentracija triglicerida (ili prisutnost terapije za navedeni lipidni poremećaj), smanjena koncentracija HDL kolesterola (ili prisutnost terapije za navedeni lipidni poremećaj), arterijska hipertenzija (ili prisutnost terapije antihipertenzivima) te povećana koncentracija glukoze natašte (ili potvrđena dijagnoza šećerne bolesti tipa 2) (19, 88). Oštećenja raznih organa i organskih sustava, pogotovo jetre, gušterače i kardiovaskularnog sustava, česta su dijagnoza kod pojedinaca s metaboličkim sindromom (19). Takva oštećenja povećavaju rizik za razvoj ciroze jetre, šećerne bolesti tipa 2 i kardiovaskularnih bolesti koji su ujedno i vodeći razlog smrtnog ishoda pojedinaca koji pate od metaboličkoga sindroma (3, 19).

Budući da metabolički sindrom podrazumijeva niz metaboličkih poremećaja, nije definiran jedinstven mehanizam, odnosno molekularni put nastanka ove bolesti. Većina istraživanja kao glavni faktor patogeneze metaboličkoga sindroma spominju inzulinsku rezistenciju, čijoj pojavi dodatno doprinosi visceralna pretilost kroz povećanje zaliha slobodnih masnih kiselina (89). Osim što doprinosi inzulinskoj rezistenciji, visceralno masno tkivo, metabolički aktivno tkivo, lučenjem leptina i adiponektina, molekula koje sudjeluju u kontroli niza fizioloških funkcija poput upale, osjetljivosti na inzulin, potrošnje energije, raspodjeli masti i ostalih (90), povezuje se s metaboličkim sindromom i kardiovaskularnim bolestima (89). Uz inzulinsku rezistenciju i visceralnu pretilost, u razjašnjavanju mehanizma nastanka metaboličkoga sindroma sve češće se spominje upalno stanje organizma kao poveznicu dvaju spomenutih poremećaja (91, 92) – visceralna pretilost, pojačanjem proizvodnje citokina i kemokina (93), potiče pojavu upalnog stanja organizma što dovodi do kočenja signalne kaskade inzulinskog receptora (91). Tako nastalo trajno upalno stanje organizma dovodi do mnogih komorbiditeta poput raka, šećerne bolesti, kardiovaskularnih bolesti te spomenutog metaboličkoga sindroma (94).

1.2.2.1. *Visceralna pretilost*

Pretilost je od strane Svjetske zdravstvene organizacije definirana kao prekomjerno nakupljanje masnog tkiva na način da predstavlja ugrozu za zdravlje (95). Pod pojmom visceralna pretilost se konkretno misli na prekomjerno nakupljanje unutar-abdominalnog adipoznog tkiva (96), koje se smatra metabolički aktivnim budući da otpušta adipokine, metabolički aktivne tvari (97). Najprimjenjivanija jedinica za prisutnost pretilosti jest razina indeksa tjelesne mase (ITM)

(engl. *body mass index*), odnosno omjer tjelesne težine u kilogramima i kvadrirane vrijednosti tjelesne visine u metrima (kg/m^2), pri čemu su pojedinci s vrijednostima ITM-a između 25 i 30 okarakterizirani prekomjernom tjelesnom težinom, dok su oni s vrijednostima ITM-a preko 30 definirani kao pretili (98).

Svjetska prevalencija pretilosti je dramatično porasla u posljednjim desetljećima te se danas smatra pandemijom budući da je, prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, preko 650 milijuna pojedinaca, što je oko 13 % svjetske odrasle populacije, zabilježeno kao pretilo (2, 99).

Iako je mehanizam nastanka pretilosti naizgled vrlo jasan i logičan – pretjeran unos kalorija u kombinaciji s njihovom nedovoljnom potrošnjom rezultira prekomjernim nakupljanjem masnog tkiva – postavlja se pitanje zašto i kako se dogodi da organizam "štiti" taj nastali višak masnog tkiva (98). Ovo pitanje još uvijek nije posve razjašnjeno, no čini se da međudjelovanje genetičkih, epigenetičkih i razvojnih čimbenika povećava osjetljivost na okolišne čimbenike pretilosti (engl. *obesogenic environmental factors*), čineći pojedince visokorizičnim za razvoj pretilosti (98).

Promjene životnog stila, razne prehrambene restrikcije te fizička aktivnost su prvi pristup u tretiranju pretilosti, no čini se da su prilično neuspješni u dugotrajnom održavanju gubitka tjelesne težine i kontroli glikemije (100–102). Barijatrijska operacija se pokazala kao vrlo učinkovit način liječenja teške pretilosti (103). Posljedični gubitak tjelesne težine utječe na energetske ravnotežu i metabolizam, na način da doprinosi pojačanom odgovoru na inzulin, poboljšanju glikemijske kontrole i smanjenju ukupnog tjelesnog masnog tkiva, rezultirajući smanjenjem rizika za smrtnost i za razvoj kardiovaskularnih bolesti (104).

1.2.2.2. Inzulinska rezistencija

Inzulinska rezistencija (IR), definirana kao nemogućnost inzulina da poveća unos i iskorištenje glukoze u pojedinca koliko i u zdravoj populaciji (105), jest glavni rizični faktor za razvoj šećerne bolesti tipa 2 (106). Inzulinska rezistencija popraćena izrazito povećanom količinom masnog tkiva jest glavno obilježje predijabetesa, koji je nedavno prepoznat kao potencijalni glavni zdravstveni problem u podlozi razvoja metaboličkoga sindroma (3). Predijabetes se definira kao zdravstveno stanje u kojem je razina šećera u krvi iznad referentnih vrijednosti, ali nedovoljno za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti tipa 2 (107, 108). Nadalje, predijabetes praćen inzulinskom rezistencijom i uništenim beta stanicama odgovoran je za otprilike pet do 10 % pojedinaca novodijagnosticiranih sa šećernom bolesti tipa 2 svake godine (109).

Inzulinska rezistencija se uglavnom ne dijagnosticira u zdravstvenom sustavu jer je metoda koja se smatra "zlatnim standardom" za dijagnostiku inzulinske rezistencije (engl. *glucose clamp technique*) (110) često nedostupna u mnogim zdravstvenim ustanovama, ali i relativno kompleksna (111). Iz tog razloga, liječnici i drugo zdravstveno osoblje prilikom obrade pacijenta prije će se usmjeriti na dijagnozu predijabetesa mjereći razinu glukoze natašte te glikiranog hemoglobina ili će provesti test oralne tolerancije na glukozu (oGTT) (111). S ciljem što preciznije procjene osjetljivosti na inzulin, i drugih parametara koji koreliraju s inzulinskom rezistencijom, predstavljen je model procjene homeostaze (engl. *homeostasis model assessment*, HOMA) koji se temelji na vrijednostima glukoze i inzulina natašte (112), a nedugo nakon je predstavljena i nadograđena verzija ovog modela, nazvan HOMA2, koji je uspješnije uzimao u obzir varijacije u rezistenciji perifernih tkiva na glukozu (113).

1.2.2.3. Šećerna bolest tipa 2

Šećerna bolest tipa 2, kronični metabolički poremećaj, najčešće se opisuje trajnom hiperglikemijom, odnosno povećanjem razine glukoze u krvi (114). Trajna hiperglikemija rezultat je poremećenog izlučivanja inzulina i/ili poremećenog odgovora na inzulin (114, 115). Hiperglikemiji doprinose i nedjelotvornost glukoze uslijed neadekvatnog izlučivanja inzulina ili odgovora na nj, ali i nedovoljno postprandijalno smanjenje razina glukagona (115).

Ova kronična, neizlječiva bolesti zahvaća preko 400 milijuna ljudi u svijetu (116). Istraživanja su pokazala da od početka razvoja šećerne bolesti tipa 2 do pojave prvih simptoma, što je usko vezano i s dijagnozom same bolesti, može proći i niz godina (117, 118). Međutim, paralelno razvoju šećerne bolesti često dolazi i do pojave ozbiljnih kardioloških, metaboličkih i neuroloških komorbiditeta (119), što upravljanje i liječenje šećerne bolesti tipa 2 uglavnom svodi na rješavanje simptoma ili na usporavanje razvoja dodatnih zdravstvenih komplikacija. Iako su neka istraživanja predložila mogućnost "remisije" šećerne bolesti tipa 2, ovakve tvrdnje još uvijek nisu klinički dokazane (120, 121). Jasno je da šećerna bolest tipa 2 i njeni rizični čimbenici predstavljaju ogroman javnozdravstveni teret – identifikacija biljega koji mogu uspješno predvidjeti početak razvoja bolesti omogućila bi odgađanje ili čak prevenciju pojave ove kompleksne i ozbiljne bolesti.

2. ISPITANICI, MATERIJALI I METODOLOGIJA ISTRAŽIVANJA

2.1. ISPITANICI

2.1.1. *TwinsUK* populacija

U ovom istraživanju korišteni su uzorci krvne plazme oko 2 000 ispitanika iz *TwinsUK* registra (122). Uzorci su sakupljeni u više vremenskih točaka tijekom 20 godina te je ukupno sakupljeno 6 032 uzorka koji su analizirani u sklopu ovog istraživanja. Krv je uzorkovana tri puta tijekom perioda sakupljanja kod 1 865 ispitanika, dva puta kod 156 ispitanika te jednom kod 125 ispitanika. Ispitanicima su tijekom perioda praćenja osim uzorkovanja krvi, bilježeni detaljni podaci o zdravstvenom statusu i životnim navikama te je zabilježena svaka pojava bolesti.

Za ispitivanje promjena *N*-glikozilacije u poremećaju metabolizma glukoze ispitanici su izabrani na temelju prve potvrđene pojave poremećaja u metabolizmu glukoze: šećerna bolest tipa 2 (glukoza natašte viša od 7 mmol/L ili pismo liječnika u kojem potvrđuje dijagnozu), ili inzulinska rezistencija, IR (određena pomoću HOMA2 indeksa). Osim potvrđene pojave šećerne bolesti tipa 2 ili IR, trebao je biti dostupan barem jedan uzorak krvi ispitanika izvađen prije vremenske točke u kojoj je postavljena dijagnoza. Ispitanici u kontrolnoj skupini odabrani su na temelju izostanka dijagnoze šećerne bolesti tipa 2 i/ili IR tijekom cijelog perioda praćenja. Osim toga, kako bi kontrolna skupina obuhvaćala samo stvarno nedijagnosticirane ispitanike, uključeni su isključivo uzorci spomenutih ispitanika koji su bili uzorkovani barem pet godina prije njihove zadnje vremenske točke praćenja kako bi se isključili oni koji bi eventualno bili dijagnosticirani neposredno nakon posljednje vremenske točke. Niti skupina s pacijentima niti kontrolna skupina nisu sadržavale blizance. Ispitanici u kontrolnoj skupini su odabrani kako bi se podudarali po dobi s pacijentima.

Za ispitivanje promjena *N*-glikozilacije s promjenom indeksa tjelesne mase (ITM) tijekom perioda praćenja ispitanici su izabrani temeljem dostupnosti podataka o vrijednosti ITM-a tijekom perioda praćenja.

Svi ispitanici potpisali su informirani pristanak o sudjelovanju. *TwinsUK* studija je odobrena od strane Nacionalnog povjerenstva za etička istraživanja London-Westminster pod referentnim brojem EC04/015, kao i od Etičkog povjerenstva Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Istraživanje je provedeno u skladu s načelima Helsinške deklaracije.

2.1.2. *Oxford populacija*

U ovom istraživanju korišteni su uzorci krvne plazme 37 ispitanika koji su okupljeni u Sveučilišnoj bolnici Oxford. Svim ispitanicima je zabilježen njihov metabolički status i anamneze te su definirani kao prihvatljivi za studiju u suradnji s Nacionalnim institutom za izvrsnost zdravstva i njege (engl. *National Institute for Health and Care Excellence*) i prema lokalnim smjernicama. Ispitanicima je krv uzorkovana na početku studije te su bili podvrgnuti restriktivnoj dijeti (unos 900 kcal na dan, maksimalno 100 g ugljikohidrata dnevno) u trajanju od tri tjedna, nakon čega je uslijedila operacija podvezivanja želuca. Krv je dalje uzorkovana na sam dan operacije, zatim nakon gubitka 20 % tjelesne mase ($6,54 \pm 3,4$ mjeseci, prosjek \pm IQR) te u prosjeku 12 mjeseci nakon operacije ($12,47 \pm 6,55$ mjeseci, prosjek \pm IQR). Iz studije su isključeni ispitanici s prošlošću alkoholizma i/ili oni koji su na antikoagulacijskoj terapiji. Ispitanici su isključeni i u slučaju trudnoće, aktivne zlouporabe supstanci ili nekontroliranog psihološkog stanja (uključujući poremećaj u prehrani).

Svi ispitanici potpisali su informirani pristanak o sudjelovanju. Nacionalno povjerenstvo za etička istraživanja Ujedinjenog Kraljevstva dalo je etičko odobrenje za studiju pod referentnim brojem 16/YH/0247. Odobrenje je dalo i Etičko povjerenstvo Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Istraživanje je provedeno u skladu s načelima Helsinške deklaracije.

2.2. MATERIJALI

2.2.1. Anorganske kemikalije

Amonijak, otopina (NH_4OH) (Merck), amonijev bikarbonat (NH_4HCO_3) (Acros Organics), dinatrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) (Acros Organics), kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) (Sigma-Aldrich), kalijev klorid (KCl) (EMD Milipore), kloridna kiselina (HCl) (Merck), natrijev hidroksid (NaOH) (Merck), natrijev klorid (NaCl) (Carlo Erba).

2.2.2. Organske kemikalije

2-aminobenzamid (2-AB) (Sigma-Aldrich), 2-pikolin boran (2-PB) (Sigma-Aldrich), acetonitril (HPLC razina čistoće) (PanReac AppliChem), acetonitril (LC-MS razina čistoće) (VWR Chemicals), dimetil sulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich), etanol (Merck), formijatna kiselina (HCOOH) (Merck), igepal CA-360 (Sigma-Aldrich), ledena octena kiselina (CH_3COOH) (Merck), natrijev dodecil sulfat (SDS) (Sigma-Aldrich), tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS) (Sigma-Aldrich).

2.2.3. Enzimi

Peptid *N*-glikozidaza F (PNGaza F) (Promega).

2.2.4. Otopine i pufferi

- 0,1M HCOOH , pH 2,5

Za pripremu 100 mL pomiješati 0,377 mL formijatne kiseline s 80 mL destilirane vode. Prebaciti u menzuru i nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom. Provjeriti pH te filtrirati otopinu kroz 0,2 μm Supor filter. Spremiti na 4 °C.

- 0,1M NaOH

Za pripremu 100 mL otopiti 0,4 g NaOH u 80 mL destilirane vode. Otapanje pospješiti miješanjem na magnetskom mješaču i zagrijavanjem na 60 °C. Prebaciti u menzuru i nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom.

- 1M NH_4HCO_3

Za pripremu 100 mL otopiti 7,906 g NH_4HCO_3 u 80 mL destilirane vode, miješajući na magnetskom mješaču. Prebaciti u menzuru i nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom.

- 1M HCl

Za pripremu 100 mL pomiješati 8,47 mL HCl s 80 mL destilirane vode. Prebaciti u menzuru i nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom.

- 1M NaOH

Za pripremu 100 mL otopiti 4 g NaOH u 80 mL destilirane vode. Otapanje pospješiti miješanjem na magnetskom mješaču i zagrijavanjem na 60 °C. Prebaciti u menzuru i nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom.

- 1x PBS, puferirana otopina fosfatnih soli (engl. *phosphate buffer saline*, PBS)

Za pripremu 100 mL uliti 10 mL 10x PBS-a u menzuru te dodati destilirane vode do 90 mL. Provjeriti pH i po potrebi ga podesiti na 7,4 s 1M NaOH. Nadopuniti do 100 mL s destiliranom vodom. Filtrirati kroz 0,2 µm Supor filter te spremiti na 4 °C.

- 1,33 % SDS

Za pripremu 100 mL otopiti 1,33 g SDS-a u 80 mL ultra čiste vode. Otapanje pospješiti miješanjem na magnetskom mješaču. Nakon otapanja prelići u menzuru te nadopuniti do 100 mL ultra čistom vodom. Spremiti na 37 °C.

- 2 % SDS

Za pripremu 100 mL otopiti 2 g SDS-a u 80 mL ultra čiste vode. Otapanje pospješiti miješanjem na magnetskom mješaču. Nakon otapanja prelići u menzuru te nadopuniti do 100 mL ultra čistom vodom. Spremiti na 37 °C.

- 4 % Igepal

Za pripremu 100 mL dodati 4 mL igepal CA-360 u 80 mL ultra čiste vode te staviti miješati na magnetski mješač pri temperaturi od 65 °C. Nakon što se igepal CA-360 otopio, nadopuniti do 100 mL ultra čistom vodom. Spremiti na 4 °C.

- 5x PBS

Za pripremu 100 mL uliti 50 mL 10x PBS-a u menzuru te nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom i spremiti na 4 °C.

- 10x PBS

Za pripremu 100 mL dodati 8,0028 g NaCl, 1,3832 g Na₂HPO₄, 0,2964 g KH₂PO₄ i 0,1976 g KCl u 80 mL destilirane vode. Provjeriti pH otopine – mora biti između 6,6 i 6,8. Po potrebi titrirati s 1M NaOH ili 1M HCl. Nadopuniti destiliranom vodom do 100 mL. Filtrirati kroz 0,2 µm Supor filter.

- 20 % acetonitril

Za pripremu 1 L dodati 200 mL acetonitrila (HPLC razina čistoće) u menzuru te nadopuniti do 1 L s ultra čistom vodom.

- 20 % etanol u 20 mM TRIS-u + 0,1 M NaCl (pufer za skladištenje protein G pločice)

Za pripremu 100 mL pomiješati 20 mL etanola sa 60 mL destilirane vode u menzuri. Čvrsto protresti menzuru pa prelići otopinu u staklenu čašu. Otopiti 0,242 g TRIS-a i 0,5844 g NaCl u otopini pomoću magnetskog mješača. Provjeriti pH te ga podesiti na 7,4 pomoću 1M HCl. Otopinu prelići u menzuru te nadopuniti do 100 mL destiliranom vodom. Filtrirati kroz 0,2 µm Supor filter te spremiti na 4 °C.

- 30 % octena kiselina u DMSO

Za pripremu 1 mL pomiješati 0,3 mL octene kiseline s 0,7 mL DMSO.

- 70 % etanol

Za pripremu 100 mL dodati 70 mL etanola u menzuru te nadopuniti do 100 mL ultra čistom vodom. Spremiti na 4 °C.

- 96 % acetonitril

Za pripremu 100 mL dodati 96 mL acetonitrila (HPLC razina čistoće) u menzuru te nadopuniti do 100 mL ultra čistom vodom. Spremiti na 4 °C.

- amonijev formijat, 2M, pH 4,4

Za pripremu 500 mL uliti 300 mL ultra čiste vode u posudu volumena 500 mL te staviti hladiti. Kada je voda ohlađena, ali ne i zaleđena, dodati 37,75 mL formijatne kiseline te pustiti otopinu da se malo ohladi. Cijelo vrijeme miješati na magnetskom mješaču te provjeriti pH, koji mora biti < 2. Kad se otopina ohladila, polako dodavati oko 75 mL amonijaka dok pH ne dosegne 4,2. Pritom paziti da temperatura otopine ne prijeđe 20 °C.

Ostaviti preko noći na sobnoj temperaturi kako bi se pH stabilizirao. Dodavanjem amonijaka namjestiti pH otopine na 4,4.

- otopina za obilježavanje *N*-glikana

Za obilježavanje jednog uzorka otopiti 0,48 mg 2-AB i 1,12 mg 2-PB u 25 μ L 30 %-tne octene kiseline u DMSO.

- otopine za kalibraciju pH metra

pH Buffer Solution, alkalni standard, pH $9,21 \pm 0,02$; pH Buffer Solution, kiseli standard, pH $4,01 \pm 0,02$ (oboje Mettler Toledo GmbH).

2.2.5. *Instrumenti*

AB54-S analitička vaga (Mettler Toledo), Highland tehnička vaga (Adam Equipment), Magnetic Stirrer MSH 300 magnetski mješać (Biosan), pipete i mikropipete (Rainin), Savant SpeedVac centrifuga za ukoncentriravanje (Thermo Scientific), Seven Compact pH metar (Mettler Toledo), treskalica (GFL), vakumska pumpa (Pall), Waters Acquity UPLC (Waters).

2.2.6. *Potrošni materijal*

ABgene PCR pločice s 96 jažica (Thermo Scientific), *GHP Acroprep* 0,20 μ m filter pločice s polipropilenskom membranom (Pall), *GHP Acroprep* 0,45 μ m filter pločice s polipropilenskom membranom (Pall), nastavci za pipete (Rainin), mikrotitarske pločice s 96 jažica za sakupljanje uzoraka (Waters).

2.2.7. *Kolone za kromatografiju, pločica za izolaciju IgG-a, filteri*

Acquity UPLC Glycan BEH (engl. *bridged ethylene hybrid, BEH*) amidna kolona, 130 Å, 1,7 μ m, 2,1 mm x 150 mm (Waters), *Acquity UPLC Glycan BEH* amidna kolona, 130 Å, 1,7 μ m, 2,1 mm x 100 mm (Waters), protein G monolitna pločica s 96 jažica (Bia Separations), *Supor® PES Membrane* filter diskovi 0,2 μ m (Pall).

2.3. ANALIZA N-GLIKANA PROTEINA PLAZME

2.3.1. Dizajn eksperimenta

Prije početka analize uzorci se računalno randomiziraju nakon čega se manualno raspoređuju u mikrotitarske pločice s 96 jažica za sakupljanje uzoraka. Osim uzoraka ispitanika, na svaku pločicu dodaje se i uzorak ultra čiste vode (engl. *blank sample*) kao i standardni uzorci zbog uklanjanja eksperimentalne pogreške, odnosno kontroliranja ponovljivosti metode.

2.3.2. Izolacija imunoglobulina G

Izolacija IgG-a iz uzoraka plazme/seruma izvodi se prema protokolu koji se temelji na afinitetnoj kromatografiji (123). IgG se izolira na visokoprotočni način koristeći protein G monolitne pločice s 96 jažica iz početnog volumena plazme od 100 μ L. Plazma se razrjeđuje 7x koristeći 1x PBS ("vezujući pufer") te se takva razrijeđena plazma prenosi na *GHP Acroprep* 0,45 μ m filter pločicu s polipropilenskom membranom. Filter pločica s plazmom se postavlja na stalak vakuumske pumpe te se plazma filtrira. Filtrirana (engl. *flow-through*) plazma sakuplja se u mikrotitarsku pločicu za sakupljanje uzoraka te se uzorci iz nje prenose na protein G monolitnu pločicu.

Prije prenošenja filtrirane plazme protein G monolitnu pločicu potrebno je pripremiti prekondicioniranjem. Prvo se ispere pufer za skladištenje, zatim se pločica ispire s 2 mL ultra čiste vode, 2 mL 1x PBS-a i 1 mL 0,1M formijatne kiseline, po svakoj jažici. Nakon toga se neutralizira pomoću 2mL 10x PBS-a po jažici te se na kraju ekvilibrira s dva puta po 2 mL 1x PBS-a po jažici.

Nanošenje filtrirane plazme na protein G pločicu rezultira vezanjem IgG-a iz plazme za protein G na pločici. Nakon toga se protein G pločica ispire tri puta s 2 mL 1x PBS-a po jažici. Nakon ispiranja potrebno je na stalku za vakuumsku pumpu zamijeniti posudu za sakupljanje otpada s mikrotitarskom pločicom za sakupljanje uzoraka kako bi se uspješno sakupio IgG koji će se isprati s pločice. IgG se ispere s protein G pločice pomoću 1 mL 0,1M formijatne kiseline, po svakoj jažici. Mikrotitarska pločica sa sakupljenim IgG-om se uklanja sa stalka vakuumske pumpe te se u jažice dodaje 170 μ L 1M amonijevog bikarbonata (pufer za neutralizaciju) po jažici. Volumen od 300 μ L IgG eluata se alikvotira u novu mikrotitarsku pločicu za sakupljanje uzoraka te se stavlja ukoncentrirati sušenjem u centrifugi za ukoncentriravanje na otprilike 18h koliko je potrebno da se uzorci osuše. Preostali volumen IgG eluata se sprema u zamrzivač do ponovne potrebe za korištenjem.

Nakon izolacije IgG-a potrebno je regenerirati i pravilno uskladištiti protein G pločicu. Protein G pločicu se postavi u stalak vakuumske pumpe, a ispod nje se postavi posuda za sakupljanje otpada. Prvo se dodaje 2 mL 0,1M formijantne kiseline u svaku jažicu protein G pločice, zatim 2 mL 10x PBS-a pa isto toliko 1x PBS-a. Sve ove otopine se nanese na pločicu pa zatim filtriraju kroz nju paralelno ju ispirujući. Naposljetku se nanosi pufer za skladištenje protein G pločice te se pločica sprema na 4 °C.

2.3.3. Deglikozilacija, označavanje *N*-glikana i njihovo pročišćavanje

Osušeni i ukoncentrirani uzorci izoliranog IgG-a denaturiraju se resuspendiranjem u 30 µL 1,33 % SDS-a i posljedičnom desetominutnom inkubacijom na 65 °C. Početni volumen uzoraka za analizu *N*-glikana proteina plazme jest 10 µL plazme koji se denaturira s 20 µL 2 % SDS-a i također inkubacijom na 65 °C u trajanju od 10 minuta. Nakon denaturacije, protokol izolacije obilježenih i pročišćenih glikana je isti za uzorak IgG-a i plazme. Nakon denaturacije dodaje se 10 µL 4 % igepala kako bi se neutralizirao višak SDS-a. Nastala mješavina se zatim stavlja 15 minuta na treskalicu. Nakon miješanja *N*-glikani u uzorku se otpuštaju dodatkom 1,2 U PNGaze F u 10 mL 5x PBS-a po uzorku, nakon čega slijedi cijelo noćna inkubacija na 37 °C.

Otpušteni *N*-glikani obilježavaju se fluorescentnom bojom 2-AB-om. U svaki uzorak se dodaje 25 µL pripremljene mješavine za obilježavanje nakon čega se uzorci inkubiraju dva sata na 65 °C sa svrhom uspješnijeg obilježavanja. Ostatak boje, reduktivne tvari i ostale nečistoće uklanjaju se iz uzorka pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi koja se temelji na hidrofilnim interakcijama (HILIC-SPE) koristeći *GHP Acroprep* 0,20 µm filter pločicu s polipropilenskom membranom. Nakon dvosatne inkubacije u uzorke se dodaje 700 µL acetonitrila do volumnog udjela uzoraka od 96 % acetonitrila. Spomenuta filter pločica je prekondicionirana pomoću 200 µL 70 % etanola, ultra čiste vode i 96 % acetonitrila po jažici. Uzorci su zatim preneseni na filter pločicu koja je postavljena na stalak vakuumske pumpe. Pomoću vakuuma uklonjeno je otapalo iz uzoraka, a glikani se vežu za hidrofilno-obogaćene membrane jažica filter pločice. Potom slijedi ispiranje uzoraka pet puta s 200 µL 96 % acetonitrila po jažici, nakon čega se glikani ispiru, odnosno eluiraju s pločice ultra čistom vodom.

2.3.4. Analiza tekućinskom kromatografijom ultra-visoke djelotvornosti

Fluorescentno obilježeni *N*-glikani razdvojeni su pomoću HILIC metode na UPLC instrumentu koji se sastoji od kvaternog upravljača otapalima, upravljača uzorcima te fluorescentnog detektora. Ekscitacijska valna duljina detektora je 250 nm, dok je emisijska 428 nm. Instrumentom se upravlja pomoću *Empower 3* računalnog programa (serija 3471, Waters).

Glikani su razdvojeni pomoću Waters kromatografskih *Glycan BEH* kolona koje se temelje na BEH tehnologiji čestica, stacionarne faze UPLC kromatografske tehnike, pri čemu se 150 mm dugačka kolona koristi za odvajanje glikana proteina plazme, a ona od 100 mm duljine za IgG glikane. Kao otapalo A, odnosno hidrofilna frakcija mobilne faze, korišten je 100 mM amonijev formijat, pH 4,4. Otapalo B, hidrofobna frakcija mobilne faze, jest 100 % acetonitril, LC-MS razine čistoće. Za razdvajanje glikana proteina plazme korištena je metoda s linearnim gradijentom acetonitrila 70 – 53 % pri protoku od 0,561 mL/min tijekom analize koja traje 25 minuta (Tablica 3). Za razdvajanje IgG glikana korištena je metoda s linearnim gradijentom acetonitrila 75 - 62 % pri protoku od 0,4 mL/min tijekom analize koja traje 27 minuta (Tablica 4).

Tablica 3 Gradijent otapala tijekom HILIC-UPLC-FLR analize *N*-glikana proteina plazme.

Vrijeme (min)	Protok (mL/min)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)
00,00	0,561	30	70
01,47	0,561	30	70
24,81	0,561	47	53
25,50	0,250	100	0
28,00	0,250	100	0
29,00	0,250	30	70
32,50	0,561	30	70
45,00	0,400	0	100
55,00	0,0	0	100

Tablica 4 Gradijent otapala tijekom HILIC-UPLC-FLR analize *N*-glikana IgG-a.

Vrijeme (min)	Protok (mL/min)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)
00,00	0,4	25	75
27,00	0,4	38	62
28,00	0,4	100	0
30,00	0,4	100	0
31,00	0,4	27	73
36,00	0,4	27	73
37,00	0,4	0	100
45,00	0,0	0	100

Uzorci se za analizu pripremaju miješanjem sa 100 % acetonitriplom (LC-MS razine čistoće) u omjeru 25:75 (v:v), pri čemu se volumen od 12,5 µL uzorka (obilježeni glikani) miješa s 37,5 µL acetonitrila. Metoda je kalibrirana pomoću vanjskog standarda hidroliziranih i 2-AB-om obilježenih glukoznih oligomera pomoću kojih su retencijska vremena pojedinih glikana

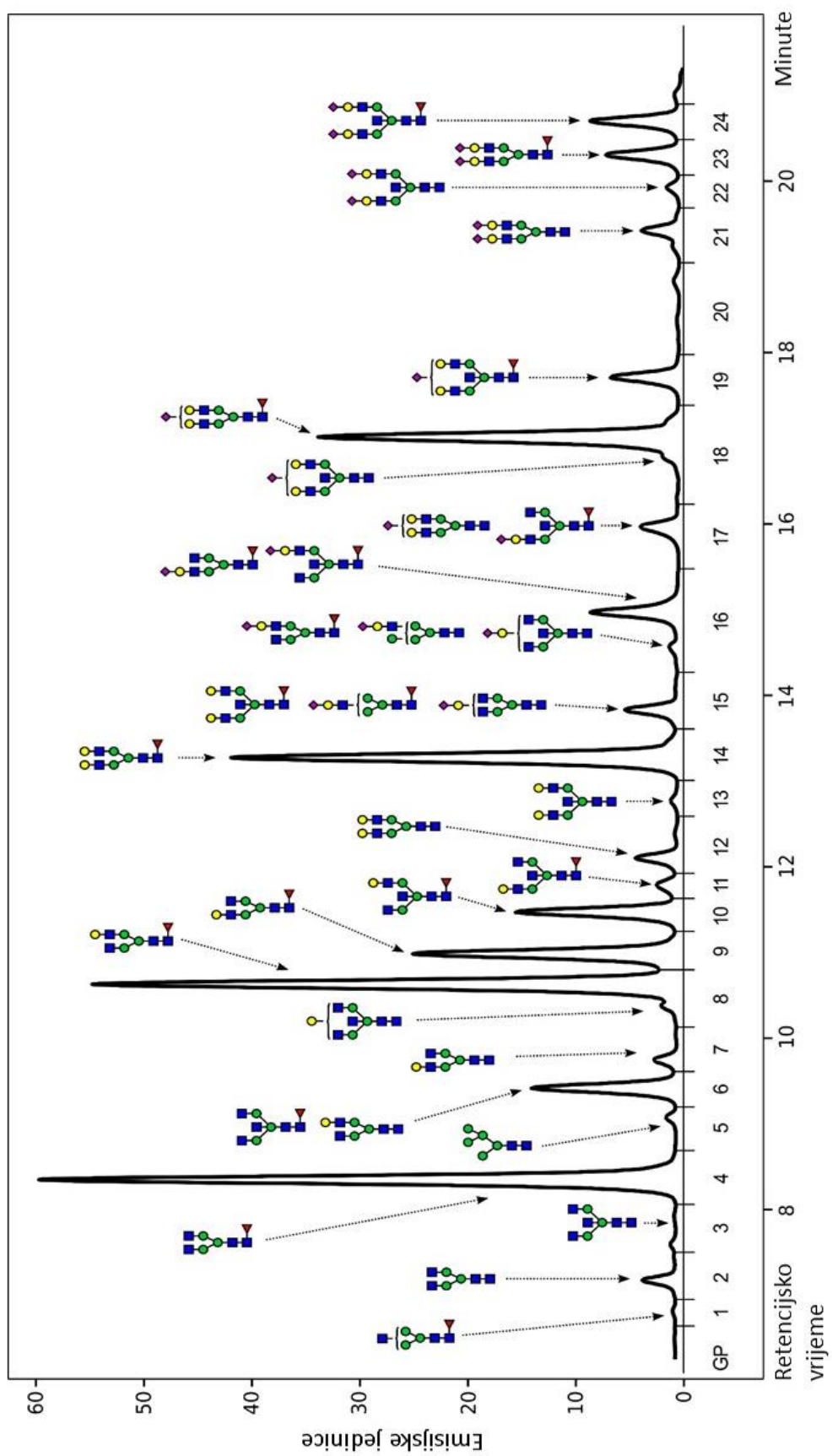
preračunata u glukozne jedinice. Kromatografsko razdvajanje glikana rezultira kromatogramima za IgG glikane i za glikane proteina plazme. U slučaju IgG glikana svi kromatogrami se razdvajaju na isti način u 24 glikanska vrška (engl. *glycan peak*, GP), odnosno glikanske skupine, a u slučaju glikana proteina plazme u 39 glikanskih skupina. Glikanske skupine IgG-a označavaju se slovima GP i brojevima od 1 do 24 (GP1, GP2, GP3, ..., GP24), a glikanske skupine proteina plazme slovima GP i brojevima od 1 do 39 (GP1 – GP39) (Slika 8, Slika 9, Tablica 5). Svaki GP je analiziran na temelju svoje pozicije eluiranja, odnosno ispiranja s kolone, te je mjereno u glukoznim jedinicama nakon čega je uspoređen s referentnim vrijednostima u bazi podataka *GlycoStore* (124). Količina glikana u svakom GP-u je izražena kao površina ispod vrška, odnosno kao postotak od ukupne integrirane površine, a izračunata je pomoću formule:

$$GP1 = \frac{GP1}{GP} \times 100$$

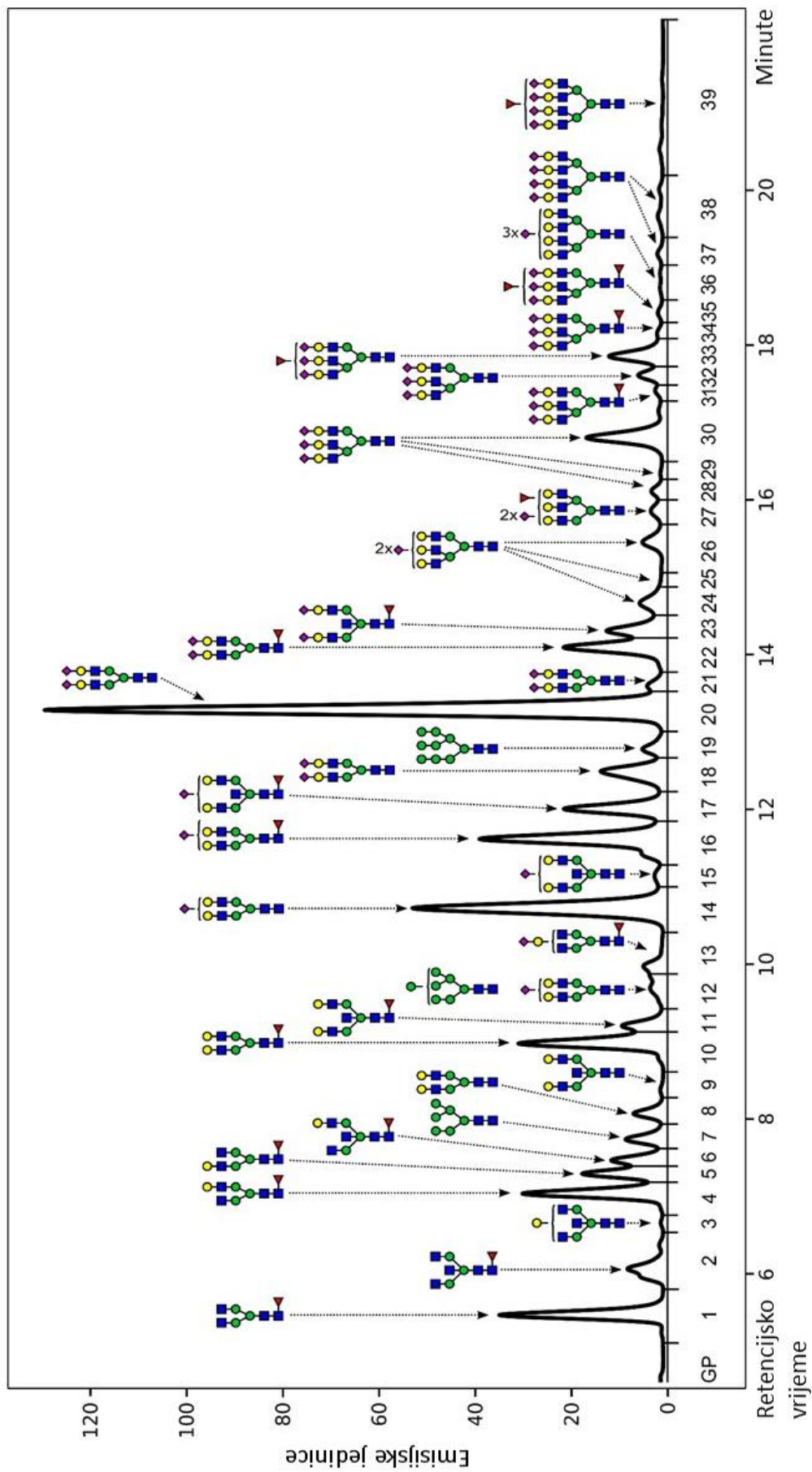
pri čemu GP predstavlja ukupnu integriranu površinu, odnosno zbroj svih pojedinačnih GP-ova (GP1 + GP2 + ... + GP39, za glikane proteina plazme, a GP24 za glikane IgG-a). Na isti način izračunava se i količina glikana za preostale GP-ove glikana proteina plazme ili IgG-a. Ovaj postupak zove se normalizacija GP-ova prema ukupnoj površini kromatograma.

Procesuiranje podataka je provedeno koristeći automatsku metodu s ugrađenim tradicionalnim algoritmom za integriranje kromatograma nakon čega je svaki kromatogram pregledan i ručno ispravljen kako bi se poklapala retencijska vremena i intervali integriranja za sve uzorke. U slučaju TwinsUK populacije, zbog velikog broja uzoraka (> 6000) dobiveni kromatogrami su poslani na automatsku integraciju (125).

Osim izravno mjerenih glikana u glikanskim vršcima, izračunata su i derivirana svojstva za IgG glikom i glikom proteina plazme. Formule korištene za derivirana svojstva navedene su u sljedećim tablicama: Tablica 6, Tablica 7, Tablica 8, Tablica 10, Tablica 11.



Slika 8 Prikaz kromatograma IgG N-glikana. Prikazane su sve glikanske strukture prisutne u pojedinom glikanskom vršku.



Slika 9 Prikaz kromatograma *N*-glikana proteina plazme. Prikazane su samo glikanske strukture koje su najzastupjenije u pojedinom glikanskom vršku.

Tablica 5 Detaljni opis glikanskih struktura, odnosno glikana prisutnih u glikanskim skupinama kromatograma IgG glikoma i glikoma proteina plazme (123,126).*

Glikom	Glikanska skupina (GP)	Kratice glikanskih struktura	Opis glikanskih struktura
IgG	GP1	FA1	sržno fukoziliran s jednom granom (monoantena)
IgG	GP2	A2	agalaktoziliran s dvije grane (biantena)
IgG	GP3	A2B	biantena s račvućim GlcNAc-om
IgG	GP4	FA2	sržno fukoziliran biantena
IgG	GP5	M5	glikan s pet manoznih jedinica
IgG	GP6	FA2B; A2[6]G1	sržno fukoziliran biantena s račvućim GlcNAc-om; monogalaktoziliran biantena
IgG	GP7	A2[3]G1	monogalaktoziliran biantena
IgG	GP8	A2BG1; FA2[6]G1	monogalaktoziliran biantena s račvućim GlcNAc-om; sržno fukoziliran, monogalaktoziliran biantena
IgG	GP9	FA2[3]G1	sržno fukoziliran, monogalaktoziliran biantena
IgG	GP10	FA2[6]BG1	sržno fukoziliran, monogalaktoziliran biantena s račvućim GlcNAc-om
IgG	GP11	FA2[3]BG1	sržno fukoziliran, monogalaktoziliran biantena s račvućim GlcNAc-om
IgG	GP12	A2G2	digalaktoziliran biantena
IgG	GP13	A2BG2	digalaktoziliran biantena s račvućim GlcNAc-om
IgG	GP14	FA2G2	sržno fukoziliran, digalaktoziliran biantena
IgG	GP15	A2G1S1; FA1G1S1; FA2BG2	monogalaktoziliran i monosijaliniziran biantena; sržno fukoziliran, monogalaktoziliran i monosijaliniziran monoantena; sržno fukoziliran, digalaktoziliran biantena s račvućim GlcNAc-om
IgG	GP16	A2BG1S1; FA2[6]G1S1; M1A1G1S1; FA2[6]BG1S1; FA2[3]G1S1	monogalaktoziliran i monosijaliniziran biantena s račvućim GlcNAc-om; sržno fukoziliran, monogalaktoziliran i monosijaliniziran biantena; monomanoziliran, monogalaktoziliran i monosijaliniziran biantena; sržno fukoziliran, monogalaktoziliran i monosijaliniziran biantena s račvućim GlcNAc-om; sržno fukoziliran, monogalaktoziliran i monosijaliniziran biantena
IgG	GP17	FA2[3]BG1S1; A2G2S1	sržno fukoziliran, monogalaktoziliran i monosijaliniziran biantena s račvućim GlcNAc-om; digalaktoziliran i monosijaliniziran biantena
IgG	GP18	A2BG2S1; FA2G2S1	digalaktoziliran i monosijaliniziran biantena s račvućim GlcNAc-om; sržno fukoziliran, digalaktoziliran i monosijaliniziran biantena

IgG	GP19	FA2BG2S1	sržno fukoziliran, digalaktoziliran i monosijaliniziran biantenar s račvajućim GlcNAc-om
IgG	GP20	struktura nije određena	struktura nije određena
IgG	GP21	A2G2S2	digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar
IgG	GP22	A2BG2S2	digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar s račvajućim GlcNAc-om
IgG	GP23	FA2G2S2	sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar
IgG	GP24	FA2BG2S2	sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar s račvajućim GlcNAc-om
Glikom	Glikanska skupina (GP)	Kratica glikanskih struktura	Opis glikanskih struktura
plazma	GP1	FA2	sržno fukoziliran biantenar
plazma	GP2	FA2B; M5	sržno fukoziliran biantenar s račvajućim GlcNAc-om; glikan s pet manoznih jedinica
plazma	GP3	A2BG1	monogalaktoziliran biantenar s račvajućim GlcNAc-om
plazma	GP4	FA2[6]G1	sržno fukoziliran, monogalaktoziliran biantenar
plazma	GP5	FA2[3]G1	sržno fukoziliran, monogalaktoziliran biantenar
plazma	GP6	FA2[6]BG1	sržno fukoziliran, monogalaktoziliran biantenar s račvajućim GlcNAc-om
plazma	GP7	M6; FA2[3]BG1	glikan sa šest manoznih jedinica; sržno fukoziliran, monogalaktoziliran biantenar s račvajućim GlcNAc-om
plazma	GP8	A2G2	digalaktoziliran biantenar
plazma	GP9	A2BG2	digalaktoziliran biantenar s račvajućim GlcNAc-om
plazma	GP10	FA2G2	sržno fukoziliran, digalaktoziliran biantenar
plazma	GP11	FA2BG2	sržno fukoziliran, digalaktoziliran biantenar s račvajućim GlcNAc-om
plazma	GP12	M7; A2G2S1; A1M4G1S1; A2BG1S1	glikan sa sedam manoznih jedinica; digalaktoziliran i monosijaliniziran biantenar; tetramanoziliran, monogalaktoziliran, monosijaliniziran monoantenar; monogalaktoziliran i monosijaliniziran biantenar s račvajućim GlcNAc-om
plazma	GP13	FA2G1S1; FA2BG1S1	sržno fukoziliran, monogalaktoziliran i monosijaliniziran biantenar; sržno fukoziliran, monogalaktoziliran i monosijaliniziran biantenar s račvajućim GlcNAc-om
plazma	GP14	A2G2S1	digalaktoziliran i monosijaliniziran biantenar
plazma	GP15	A2BG2S1	digalaktoziliran i monosijaliniziran biantenar s račvajućim GlcNAc-om
plazma	GP16	FA2G2S1	sržno fukoziliran, digalaktoziliran i monosijaliniziran biantenar

plazma	GP17	FA2BG2S1	sržno fukoziliran, digalaktoziliran i monosijaliniziran biantenar s račvujućim GlcNAc-om
plazma	GP18	A2G2S2; FA2G2S2	digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar; sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar
plazma	GP19	M9	glikan s devet manoznih jedinica
plazma	GP20	A2G2S2	digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar
plazma	GP21	A2G2S2; A3G3S1; FA2G2S2; A2BG2S2; A3F1G3S1	digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar; trigalaktoziliran i monosijaliniziran triantenar sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar; digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar s račvujućim GlcNAc-om; antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i monosijaliniziran triantenar
plazma	GP22	FA2G2S2	sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar
plazma	GP23	FA2BG2S2	sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar s račvujućim GlcNAc-om
plazma	GP24	A3G3S2; A3F1G3S1	trigalaktoziliran i disijaliniziran triantenar; antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i monosijaliniziran triantenar
plazma	GP25	A3G3S2; FA2F1G2S2; A3F1G3S2	trigalaktoziliran i disijaliniziran triantenar; sržno i antenarno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran biantenar; antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i disijaliniziran triantenar
plazma	GP26	A3G3S2; FA3G3S2	trigalaktoziliran i disijaliniziran triantenar; sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i disijaliniziran triantenar
plazma	GP27	A3F1G3S2; A3G3S3	antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i disijaliniziran triantenar; trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar
plazma	GP28	A3G3S3; A3F1G3S2	trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar; antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i disijaliniziran triantenar
plazma	GP29	A3G3S3; A3F1G3S2	trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar; antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i disijaliniziran triantenar
plazma	GP30	A3G3S3; A3F1G3S3	trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar; antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar
plazma	GP31	FA3G3S3; A3G3S3	sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar; trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar
plazma	GP32	A3G3S3	trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar

plazma	GP33	A3F1G3S3	antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar
plazma	GP34	FA3G3S3; A4G4S3	sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar; tetragalaktoziliran i trisijaliniziran tetraantenar
plazma	GP35	FA3F1G3S3; A4F1G4S3	sržno i antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar; antenarno fukoziliran, tetragalaktoziliran i trisijaliniziran tetraantenar
plazma	GP36	A4G4S3; A4F1G4S3	tetragalaktoziliran i trisijaliniziran tetraantenar; antenarno fukoziliran, tetragalaktoziliran i trisijaliniziran tetraantenar
plazma	GP37	A4G4S4; A4F1G4S3	tetragalaktoziliran i tetrasijaliniziran tetraantenar; antenarno fukoziliran, tetragalaktoziliran i trisijaliniziran tetraantenar
plazma	GP38	A4G4S4; A4F1G4S4; A4F1G4S3	tetragalaktoziliran i tetrasijaliniziran tetraantenar; antenarno fukoziliran, tetragalaktoziliran i tetrasijaliniziran tetraantenar; antenarno fukoziliran, tetragalaktoziliran i trisijaliniziran tetraantenar
plazma	GP39	A4F1G4S4; A4F2G4S4	antenarno fukoziliran, tetragalaktoziliran i tetrasijaliniziran tetraantenar; antenarno difukoziliran, tetragalaktoziliran i tetrasijaliniziran tetraantenar;

* F na početku kratice označava sržno fukozu; Mx označava broj manozu; Ax označava broj antena, odnosno grana; B označava račvujući GlcNAc; Gx označava broj galaktoza; Fx nakon Ax označava antenarnu fukozu; Sx označava broj sijalinskih kiselina; [3] i [6] označavaju na kojoj grani je vezana monosaharidna jedinica

2.4. STATISTIČKA ANALIZA

Sva statistička obrada podataka napravljena je koristeći programski jezik R (127).

Nakon integriranja kromatograma i ekstrakcije podataka iz Empower sustava, provodi se normalizacija mjerenja (engl. *total area normalisation*). Normalizacija se provodi na svakom uzorku s obzirom na cjelokupnu površinu kromatograma sa svrhom mogućnosti usporedbe dobivenih mjerenja. Normalizirana mjerenja se potom logaritamski transformiraju zbog njihove desnostrane asimetrične distribucije. Mjerenja, odnosno podaci se zatim korigiraju na razlike u serijama (engl. *batch correction*) (128). Normalizacija i korekcija na razlike u mjerenjima su postupci koji prethode kontroli kvalitete (engl. *quality control*, QC) mjerenja dobivenih kromatografskom analizom. Od početnih 6 032 uzorka, njih 5 889 je zadovoljilo QC, budući da se nalaze se unutar normalnog, očekivanog rasapa mjerenja, te je na njima provedena daljnja statistička analiza i usporedba.

2.4.1. Statistička analiza podataka iz TwinsUK populacije

2.4.1.1. Poremećaj metabolizma glukoze (inzulinska rezistencija i šećerna bolest tipa 2)

Za usporedbu *N*-glikana proteina plazme između ispitanika koji će biti dijagnosticirani s bolešću tijekom perioda praćenja i kontrolne skupine korišten je opći linearni model. Kao zavisna varijabla korišteni su izravno mjereni *N*-glikani proteina plazme ili izračunata derivirana svojstva (Tablica 6), dok je status bolesti (dijagnosticiran/nedijagnosticiran) korišten kao nezavisna varijabla. Dodatne varijable nisu uključivane u model budući da je kontrolna grupa izabrana kako bi se podudarala po dobi s ispitanicima koji će biti dijagnosticirani, te niti jedna skupina nije uključivala blizance. Zbog višestrukih analiza stopa lažnih otkrića kontrolirana je Benjamini-Hochberg metodom pri vrijednosti $p < 0,05$.

Tablica 6 Formule za izračun deriviranih svojstava *N*-glikoma proteina plazme u TwinsUK populaciji za analizu utjecaja poremećaja u metabolizmu glukoze.

Derivirano svojstvo	Formula
Niska razgranatost (LB)	$GP1 + GP2 + GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + 0,5xGP12 + GP13 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17 + GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23$
Visoka razgranatost (HB)	$GP24 + GP25 + GP26 + GP27 + GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP33 + GP34 + GP35 + GP36 + GP37 + GP38 + GP39$
Agalaktozilacija (G0)	$GP1 + GP2$
Monogalaktozilacija (G1)	$GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP13$

Digalaktozilacija (G2)	GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + 0,5xGP12 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17 + GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23
Trigalaktozilacija (G3)	GP24 + GP25 + GP26 + GP27 + GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP33 + GP34 + GP35
Tetragalaktozilacija (G4)	GP36 + GP37 + GP38 + GP39
Neutralni glikani, asijalinizacija (S0)	GP1 + GP2 + GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11
Monosijalinizacija (S1)	0,5xGP12 + GP13 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17
Disijalinizacija (S2)	GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23 + GP24 + GP25 + GP26 + GP27
Trisijalinizacija (S3)	GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP33 + GP34 + GP35 + GP36
Tetrasijalinizacija (S4)	GP37 + GP38 + GP39
Učestalost račvućeg <i>N</i> -acetilglukozamina (B)	GP2 + GP3 + GP6 + GP9 + GP11 + GP15 + GP17 + GP23
Antenarna fukoziilacija (AF)	GP27 + GP33 + GP35 + GP39
Sržna fukoziilacija (CF)	GP1 + GP2 + GP4 + GP5 + GP6 + GP10 + GP11 + GP13 + GP16 + GP17 + GP22 + GP23 + GP31 + GP34 + GP35
Oligomanozni glikani (HM)	GP7 + 0,5xGP12 + GP19

Ispitan je i diskriminativni potencijal izravno mjerenih *N*-glikana proteina plazme koji su značajno promijenjeni između dvije skupine, te je izračunat koristeći površinu ispod krivulje osjetljivosti dijagnostičkog testa (engl. *area under the curve*, AUC; *receiver operating characteristics*, ROC). Od spomenutih *N*-glikana proteina plazme korišteni su samo oni identificirani dvosmjernom *stepwise* regresijom, s ciljem isključivanja koreliranih glikana, izbjegavanja prekomjerne prilagodbe funkcije kao i pojednostavljenja modela. Modeli (glikanski + ITM podaci; samo glikanski podaci; samo ITM podaci) su napravljeni pomoću logističke regresije koristeći identificirane glikane i podatke o ITM-u. ROC krivulje i AUC vrijednosti korištene su za usporedbu modela.

Nakon identifikacije značajno promijenjenih glikana između dvije skupine, prikazana je promjena njihovih vrijednosti u ovisnosti o vremenskoj udaljenosti od dijagnoze. Svi dostupni uzorci pojedinaca koji su dijagnosticirani, u rasponu od 10 godine prije dijagnoze do dvije godine nakon dijagnoze, podijeljeni su u četiri skupine: 10 do osam godina, sedam do pet godina i četiri do dvije godine prije dijagnoze, i do dvije godine nakon dijagnoze. Ovako grupirani uzorci uključeni su u linearni mješoviti model. Vrijednosti glikana modelirane su kao zavisna varijabla, dok su spomenute vremenske skupine zajedno s dobi pri uzorkovanju

uključene kao nezavisna varijabla. Informacija o pacijentu uključena je kao nasumični efekt, budući da analizirani uzorci uključuju više vremenskih točaka istog pacijenta. Iz kreiranog modela su procijenjene prosječne glikanske vrijednosti za svaku vremensku skupinu koje su korigirane na dob kako bi se prikazao učinak isključivo vremenske udaljenosti od dijagnoze, a ne i starenja ispitanika, za koje je poznato da utječe na glikozilaciju (10).

2.4.1.2. Promjena indeksa tjelesne mase

U ovom istraživanju je analiziran *N*-glikom proteina plazme TwinsUK populacije. No, dosadašnja istraživanja na IgG-u pokazala su kako promjene u ITM-u također vrlo snažno utječu na njegov glikom (11, 129), dok su istraživanja na *N*-glikomu proteina plazme pokazala kako se s promjenom ITM-a najviše mijenjaju glikani koji većinski potječu s IgG-a (10, 130). Iz tog razloga je odlučeno u ovom istraživanju promatrati i utjecaj promjena ITM-a na IgG *N*-glikom, uz utjecaj na *N*-glikom proteina plazme. Formule za izračun deriviranih svojstava *N*-glikoma proteina plazme u TwinsUK populaciji u studiji promjene indeksa tjelesne mase prikazane su u Tablica 7.

Tablica 7 Formule za izračun deriviranih svojstava *N*-glikoma proteina plazme u TwinsUK populaciji za analizu utjecaja promjene ITM-a.

Derivirano svojstvo	Formula
Niska razgranatost (LB)	GP1 + GP2 + GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + 0,5xGP12 + GP13 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17 + GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23
Visoka razgranatost (HB)	GP24 + GP25 + GP26 + GP27 + GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP33 + GP34 + GP35 + GP36 + GP37 + GP38 + GP39
Agalaktozilacija (G0)	GP1 + GP2
Monogalaktozilacija (G1)	GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP13
Digalaktozilacija (G2)	GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + 0,5xGP12 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17 + GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23
Trigalaktozilacija (G3)	GP24 + GP25 + GP26 + GP27 + GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP33 + GP34 + GP35
Tetragalaktozilacija (G4)	GP36 + GP37 + GP38 + GP39
Neutralni glikani, asijalinizacija (S0)	GP1 + GP2 + GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11
Monosijalinizacija (S1)	0,5xGP12 + GP13 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17
Disijalinizacija (S2)	GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23 + GP24 + GP25 + GP26 + GP27
Trisijalinizacija (S3)	GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP33 + GP34 + GP35 + GP36

Tetrasijalinizacija (S4)	GP37 + GP38 + GP39
Učestalost račvajućeg <i>N</i> -acetilglukozamina (B)	GP2 + GP3 + GP6 + GP9 + GP11 + GP15 + GP17 + GP23
Antenarna fukozilacija (AF)	GP27 + GP33 + GP35 + GP39
Sržna fukozilacija (CF)	GP1 + GP2 + GP4 + GP5 + GP6 + GP10 + GP11 + GP13 + GP16 + GP17 + GP22 + GP23 + GP31 + GP34 + GP35
Oligomanozni glikani (HM)	GP7 + 0,5xGP12 + GP19

Kako je analiziran samo *N*-glikom proteina plazme TwinsUK populacije, IgG *N*-glikom je ekstrapoliran ih dobivenih podataka budući da je to jedini način dedukcije IgG *N*-glikozilacije iz analiziranih podataka. Istraživanja su pokazala kako prvih 11 glikanskih skupina *N*-glikoma proteina plazme potječe skoro isključivo s IgG-a (9) pa su njihove vrijednosti korištene za računanje deriviranih svojstava (Tablica 8). Prije računanja deriviranih svojstava, prvih 11 glikanskih skupina *N*-glikoma proteina plazme bilo je potrebno normalizirati na njihovu ukupnu površinu kromatograma (Tablica 9). Ta ukupna površina je izračunata zbrajanjem vrijednosti ovih 11 glikanskih skupina (GP1 + GP2 + ... + GP11).

Tablica 8 Formule za izračun deriviranih svojstava IgG *N*-glikoma iz prvih 11 glikanskih skupina (GP) *N*-glikoma proteina plazme koje primarno potječu s IgG-a u TwinsUK populaciji za analizu utjecaja promjene ITM-a.

Derivirano svojstvo	Formula
Agalaktozilacija (G0)	GP1 + GP2
Monogalaktozilacija (G1)	GP3 + GP4 + GP5 + GP6
Digalaktozilacija (G2)	GP8 + GP9 + GP10 + GP11
Učestalost račvajućeg <i>N</i> -acetilglukozamina (B)	GP2 + GP3 + GP6 + GP9 + GP11
Sržna fukozilacija (CF)	GP1 + GP2 + GP4 + GP5 + GP6 + GP10 + GP11
Oligomanozni glikani (HM)	GP7

Tablica 9 Formule korištene za ponovno izračunavanje relativnih zastupljenosti prvih 11 glikanskih skupina iz *N*-glikoma proteina plazme sa svrhom stjecanja IgG *N*-glikoma u TwinsUK populaciji.

Glikanska skupina	Formula
GP1	GP1 / GP1 + GP2 + ... + GP11 *100
GP2	GP2 / GP1 + GP2 + ... + GP11 *100
GP3	GP3 / GP1 + GP2 + ... + GP11 *100
GP4	GP4 / GP1 + GP2 + ... + GP11 *100
GP5	GP5 / GP1 + GP2 + ... + GP11 *100
GP6	GP6 / GP1 + GP2 + ... + GP11 *100
GP7	GP7 / GP1 + GP2 + ... + GP11 *100
GP8	GP8 / GP1 + GP2 + ... + GP11 *100
GP9	GP9 / GP1 + GP2 + ... + GP11 *100

GP10	$GP10 / GP1 + GP2 + \dots + GP11 * 100$
GP11	$GP11 / GP1 + GP2 + \dots + GP11 * 100$

Za procjenu učinka ITM-a na *N*-glikane TwinsUK uzoraka korišten je linearni mješoviti model (131), gdje su izravno mjereni *N*-glikani ili izračunata derivirana svojstva *N*-glikana korišteni kao zavisna varijabla. Promjena ITM-a te apsolutna vrijednost navedenog indeksa korišteni su kao fiksni efekti, odnosno nezavisna varijabla u modelu. Poznato je da starenje utječe na *N*-glikozilaciju (10, 80). Period praćenja TwinsUK populacije mjereno je u godinama (prosječno vrijeme praćenja iznosi oko osam godina) te je udaljenost između vremenskih točaka varirala između ispitanika, što je rezultiralo značajnim promjenama kronološke dobi ispitanika. Iz tog razloga dob je u model uključena kao fiksni efekt i nasumični nagib. Informacija o ispitaniku (*family and individual ID*) je uključena kao nasumični odsječak. Zbog višestrukih mjerenja u mješovitom modelu stopa lažnih otkrića kontrolirana je Benjamini-Hochberg metodom pri vrijednosti $p < 0,05$.

2.4.2. Statistička analiza podataka iz Oxford populacije

Linearni mješoviti model korišten je u svrhu longitudinalne analize uzoraka pacijenata iz Oxford studije. Vrijeme, odnosno vremenske točke praćenja u modelu su modelirane kao fiksni efekt odnosno nezavisna varijabla, a informacija o pacijentu kao nasumični efekt, dok su *N*-glikani proteina plazme i IgG-a, izravno mjereni ili derivirana svojstva (

Tablica 10, Tablica 11) modelirani kao zavisne varijable. Iako je rečeno kako starenje utječe na *N*-glikom, period praćenja u ovoj studiji se mjerio u mjesecima i svim ispitanicima je udaljenost između vremenskih točaka bila ista. To nije uzrokovalo promjenu dobi ispitanika značajnu za *N*-glikozilaciju te iz tog razloga dob ispitanika nije uključena u model. Prije analize mješovitim modelom, glikanski podaci su se transformirali u mjerenja s normalnom raspodjelom koristeći inverznu transformaciju rankova. Inverzna transformacija rankova omogućava uspoređivanje procijenjenih učinaka različitih glikana na način da svi glikani imaju standardiziranu varijancu. Zbog višestrukih mjerenja u mješovitom modelu stopa lažnih otkrića kontrolirana je Benjamini-Hochberg metodom pri vrijednosti $p < 0,05$.

Tablica 10 Formule za izračun deriviranih svojstava IgG *N*-glikoma u Oxford populaciji.

Derivirano svojstvo	Formula
Agalaktozilacija (G0)	$GP1 + GP2 + GP4 + GP6$
Monogalaktozilacija (G1)	$GP7 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP16$

Digalaktozilacija (G2)	GP12 + GP13 + GP14 + GP15 + GP17 + GP18 + GP19 + GP21 + GP22 + GP23 + GP24
Ukupna sijalinizacija (S total)	GP16 + GP17 + GP18 + GP19 + GP21 + GP22 + GP23 + GP24
Monosijalinizacija (S1)	GP16 + GP17 + GP18 + GP19
Disijalinizacija (S2)	GP21 + GP22 + GP23 + GP24
Učestalost račvajućeg <i>N</i> -acetilglukozamina (B)	GP6 + GP10 + GP11 + GP13 + GP15 + GP19 + GP22 + GP24
Sržna fukozilacija (CF)	GP1 + GP4 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP14 + GP15 + GP16 + GP18 + GP19 + GP23 + GP24

Tablica 11 Formule za izračun deriviranih svojstava *N*-glikoma proteina plazme u Oxford populaciji.

Derivirano svojstvo	Formula
Niska razgranatost (LB)	GP1 + GP2 + GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + 0,5xGP12 + GP13 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17 + GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23
Visoka razgranatost (HB)	GP24 + GP25 + GP26 + GP27 + GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP33 + GP34 + GP35 + GP36 + GP37 + GP38 + GP39
Agalaktozilacija (G0)	GP1 + GP2
Monogalaktozilacija (G1)	GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP13
Digalaktozilacija (G2)	GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + 0,5xGP12 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17 + GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23
Trigalaktozilacija (G3)	GP24 + GP25 + GP26 + GP27 + GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP33 + GP34 + GP35
Tetragalaktozilacija (G4)	GP36 + GP37 + GP38 + GP39
Neutralni glikani, asijalinizacija (S0)	GP1 + GP2 + GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11
Monosijalinizacija (S1)	0,5xGP12 + GP13 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17
Disijalinizacija (S2)	GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23 + GP24 + GP25 + GP26 + GP27
Trisijalinizacija (S3)	GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP33 + GP34 + GP35 + GP36
Tetrasijalinizacija (S4)	GP37 + GP38 + GP39
Učestalost račvajućeg <i>N</i> -acetilglukozamina (B)	GP2 + GP3 + GP6 + GP9 + GP11 + GP15 + GP17 + GP23
Antenarna fukozilacija (AF)	GP27 + GP33 + GP35 + GP39
Sržna fukozilacija (CF)	GP1 + GP2 + GP4 + GP5 + GP6 + GP10 + GP11 + GP13 + GP16 + GP17 + GP22 + GP23 + GP31 + GP34 + GP35
Oligomanozni glikani (HM)	GP7 + 0,5xGP12 + GP19

3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

3.1. N-GLIKANI PROTEINA PLAZME KAO BILJEG RANE IDENTIFIKACIJE I PRAĆENJA POREMEĆAJA U METABOLIZMU GLUKOZE

3.1.1. Osobine ispitanika

Ispitanicima uključenim u TwinsUK studiju tijekom perioda praćenja osim uzorkovanja krvi, bilježeni su detaljni podaci o zdravstvenom statusu i životnim navikama te je zabilježena svaka pojava bolesti.

Podskupina na kojoj se proučavao utjecaj poremećaja u metabolizmu glukoze na *N*-glikom proteina plazme sastoji se od 534 ispitanika, što uključuje ispitanike dijagnosticirane s IR ili šećernom bolesti tipa 2 i pripadajuće kontrole. Za uključenost ispitanika u bilo koju od ove dvije skupine, osim podatka o (ne)prisutnosti bolesti, obavezna je bila i dostupnost informacije o dobi ispitanika (u svakoj vremenskoj točki), razini ITM-a i spolu (Tablica 12).

Tablica 12 Deskriptivna statistika TwinsUK populacije (podskupina poremećaja u metabolizmu glukoze).

Karakteristike	TwinsUK populacija (podskupina poremećaja u metabolizmu glukoze)	
	Ispitanici dijagnosticirani s IR ili šećernom bolesti tipa 2 (ŠBT2)	Kontrolna skupina
Ukupni broj ispitanika, N	89 (IR/ŠBT2 = 52/47)	445
Ukupni broj ispitanica ženskog spola, %	100	100
Dob, prosječna vrijednost \pm SD, godine	55,07 \pm 9,01	55,06 \pm 8,95
ITM, prosječna vrijednost \pm SD, kg/m ²	28,15 \pm 4,78	25,21 \pm 3,99
Period praćenja, prosječna vrijednost \pm SD, godine	7,14 \pm 3,04	7,14 \pm 3,04

3.1.2. Usporedba *N*-glikana proteina plazme između ispitanika koji će razviti inzulinsku rezistenciju ili šećernu bolest tipa 2 i ispitanika koji će ostati zdravi

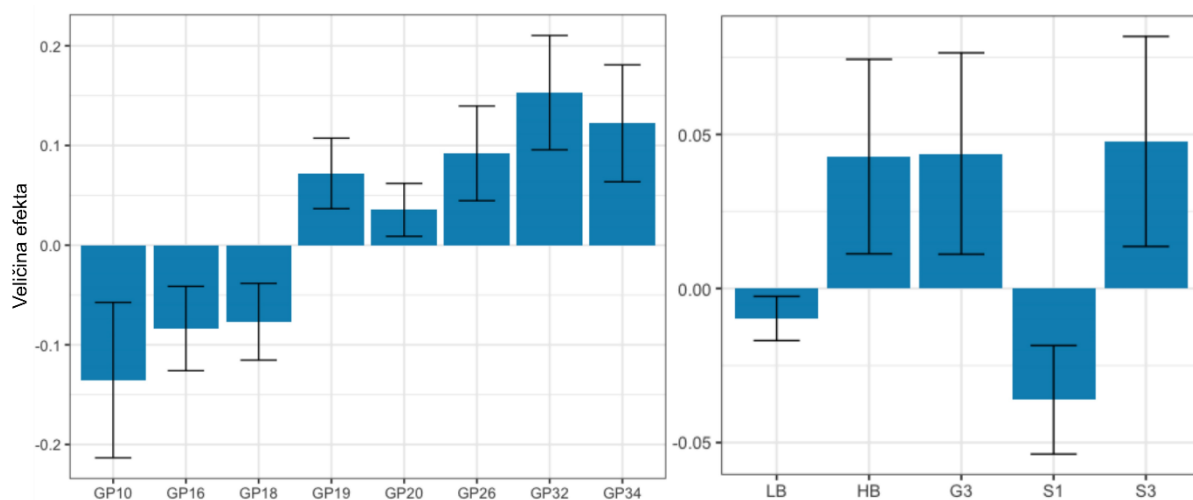
Opći linearni model je korišten kako bi se ispitalo postojanje razlika u izravno mjerenim *N*-glikanima i izračunatim deriviranim svojstvima između ispitanika koji će biti dijagnosticirani i kontrola. Za tu potrebu korišteni su uzorci iz posljednje vremenske točke uzorkovanja prije dijagnoze, odnosno neposredno prije vremenske točke u kojoj je ispitanik dijagnosticiran, pri čemu je prosječno vrijeme do dijagnoze iznosilo 4,65 \pm 2,36 godina. Od 39 izravno mjerenih

glikana, osam ih je pokazalo statistički značajnu razliku između ispitivanih skupina potaknutu razvojem poremećaja u metabolizmu glukoze: GP10, GP16 i GP18 imaju značajno niže vrijednosti u skupini ispitanika koji će biti dijagnosticirani, dok su vrijednosti GP19, GP20, GP26, GP32 i GP34 značajno više u istoj skupini (Tablica 13, Slika 10). Osim izravno mjenjenih glikana, ispitane su i promjene između ispitivanih skupina u izračunatim deriviranim svojstvima koje su, očekivano, potvrdile rezultate izravno mjenjenih glikana. Nisko razgranati (LB) i monosijalinizirani (S1) glikani su sniženi u oboljelih ispitanika, dok su visoko razgranati (HB), trigalaktozilirani (G3), i trisijalinizirani (S3) glikani povećani u istoj skupini (Tablica 13, Slika 10).

Tablica 13 Promjene u izravno mjenjenim *N*-glikanima proteina plazme i izračunatim deriviranim svojstvima između skupine ispitanika koji će biti dijagnosticirani i kontrolne skupine. Izračunati efekt je prirodni logaritam razlike u relativnim vrijednostima glikana ispitivanih skupina. Statistički značajne promjene su zadebljane.

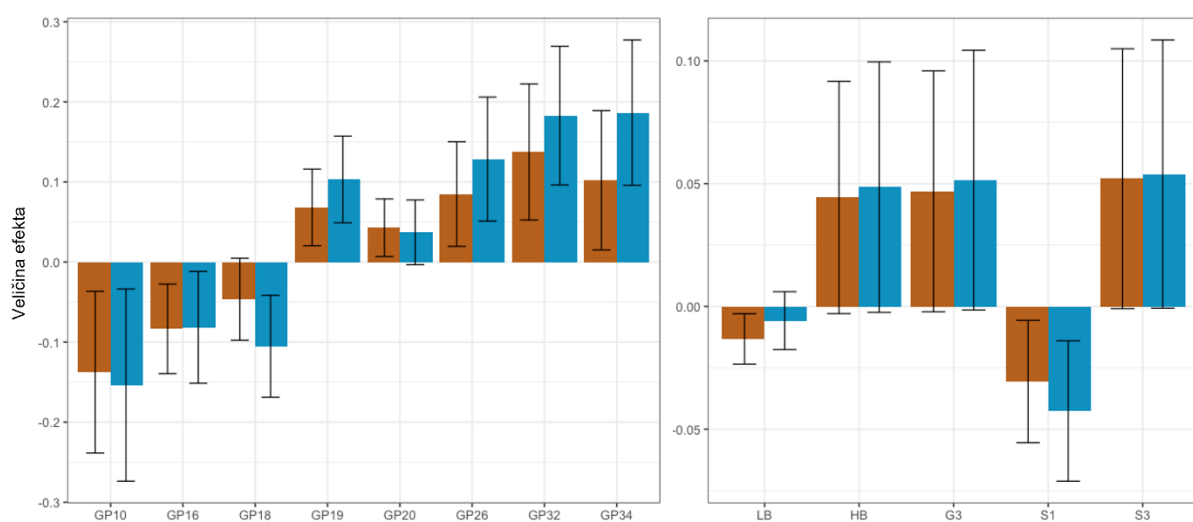
Izravno mjenjeni <i>N</i> -glikani proteina plazme	Efekt	Standardna pogreška	P vrijednost	Prilagođena p vrijednost
GP1	0,0410	0,0571	$4,73 \times 10^{-01}$	$6,52 \times 10^{-01}$
GP2	0,0043	0,0329	$8,95 \times 10^{-01}$	$8,95 \times 10^{-01}$
GP3	-0,0612	0,0518	$2,38 \times 10^{-01}$	$3,87 \times 10^{-01}$
GP4	-0,0637	0,0471	$1,77 \times 10^{-01}$	$3,52 \times 10^{-01}$
GP5	-0,0375	0,0547	$4,94 \times 10^{-01}$	$6,52 \times 10^{-01}$
GP6	-0,0077	0,0381	$8,40 \times 10^{-01}$	$8,67 \times 10^{-01}$
GP7	-0,0367	0,0274	$1,80 \times 10^{-01}$	$3,52 \times 10^{-01}$
GP8	-0,0477	0,0191	$1,28 \times 10^{-02}$	$5,53 \times 10^{-02}$
GP9	-0,0650	0,0389	$9,52 \times 10^{-02}$	$2,47 \times 10^{-01}$
GP10	-0,1354	0,0398	$7,15 \times 10^{-04}$	$3,99 \times 10^{-03}$
GP11	-0,0433	0,0360	$2,30 \times 10^{-01}$	$3,87 \times 10^{-01}$
GP12	-0,0479	0,0247	$5,31 \times 10^{-02}$	$1,88 \times 10^{-01}$
GP13	-0,0504	0,0608	$4,07 \times 10^{-01}$	$5,88 \times 10^{-01}$
GP14	-0,0035	0,0125	$7,80 \times 10^{-01}$	$8,45 \times 10^{-01}$
GP15	-0,0144	0,0309	$6,42 \times 10^{-01}$	$7,37 \times 10^{-01}$
GP16	-0,0837	0,0216	$1,20 \times 10^{-04}$	$9,38 \times 10^{-04}$
GP17	-0,0779	0,0386	$4,41 \times 10^{-02}$	$1,72 \times 10^{-01}$
GP18	-0,0768	0,0197	$1,06 \times 10^{-04}$	$9,38 \times 10^{-04}$
GP19	0,0720	0,0181	$7,64 \times 10^{-05}$	$9,38 \times 10^{-04}$
GP20	0,0354	0,0136	$9,19 \times 10^{-03}$	$4,48 \times 10^{-02}$
GP21	-0,0120	0,0212	$5,72 \times 10^{-01}$	$6,76 \times 10^{-01}$
GP22	0,0145	0,0241	$5,47 \times 10^{-01}$	$6,66 \times 10^{-01}$
GP23	-0,0516	0,0350	$1,41 \times 10^{-01}$	$3,23 \times 10^{-01}$
GP24	-0,0259	0,0249	$2,98 \times 10^{-01}$	$4,65 \times 10^{-01}$

GP25	-0,0235	0,0357	$5,10 \times 10^{-01}$	$6,52 \times 10^{-01}$
GP26	0,0921	0,0242	$1,61 \times 10^{-04}$	$1,05 \times 10^{-03}$
GP27	0,0245	0,0562	$6,63 \times 10^{-01}$	$7,39 \times 10^{-01}$
GP28	-0,0460	0,0326	$1,59 \times 10^{-01}$	$3,45 \times 10^{-01}$
GP29	-0,0657	0,0656	$3,17 \times 10^{-01}$	$4,76 \times 10^{-01}$
GP30	0,0171	0,0265	$5,19 \times 10^{-01}$	$6,52 \times 10^{-01}$
GP31	0,0897	0,0477	$6,04 \times 10^{-02}$	$1,96 \times 10^{-01}$
GP32	0,1530	0,0293	$2,44 \times 10^{-07}$	$9,52 \times 10^{-06}$
GP33	0,0088	0,0449	$8,45 \times 10^{-01}$	$8,67 \times 10^{-01}$
GP34	0,1223	0,0299	$5,10 \times 10^{-05}$	$9,38 \times 10^{-04}$
GP35	0,0864	0,0583	$1,39 \times 10^{-01}$	$3,23 \times 10^{-01}$
GP36	0,0395	0,0315	$2,10 \times 10^{-01}$	$3,87 \times 10^{-01}$
GP37	-0,0783	0,0453	$8,47 \times 10^{-02}$	$2,47 \times 10^{-01}$
GP38	0,0355	0,0294	$2,28 \times 10^{-01}$	$3,87 \times 10^{-01}$
GP39	0,0664	0,0395	$9,34 \times 10^{-02}$	$2,47 \times 10^{-01}$
Derivirano svojstvo N-glikana proteina plazme	Efekt	Standardna pogreška	P vrijednost	Prilagođena p vrijednost
LB	-0,0097	0,0037	$8,11 \times 10^{-03}$	$2,84 \times 10^{-02}$
HB	0,0428	0,0161	$8,07 \times 10^{-03}$	$2,84 \times 10^{-02}$
G0	0,0214	0,0436	$6,25 \times 10^{-01}$	$6,66 \times 10^{-01}$
G1	-0,0472	0,0424	$2,66 \times 10^{-01}$	$3,87 \times 10^{-01}$
G2	-0,0094	0,0065	$1,48 \times 10^{-01}$	$2,38 \times 10^{-01}$
G3	0,0438	0,0167	$8,88 \times 10^{-03}$	$2,84 \times 10^{-02}$
G4	0,0272	0,0276	$3,24 \times 10^{-01}$	$4,32 \times 10^{-01}$
S0	-0,0754	0,0350	$3,15 \times 10^{-02}$	$8,39 \times 10^{-02}$
S1	-0,0361	0,0090	$6,70 \times 10^{-05}$	$1,07 \times 10^{-03}$
S2	0,0193	0,0105	$6,77 \times 10^{-02}$	$1,42 \times 10^{-01}$
S3	0,0477	0,0174	$6,26 \times 10^{-03}$	$2,84 \times 10^{-02}$
S4	0,0258	0,0290	$3,74 \times 10^{-01}$	$4,60 \times 10^{-01}$
B	-0,0409	0,0238	$8,60 \times 10^{-02}$	$1,53 \times 10^{-01}$
AF	0,0252	0,0435	$5,62 \times 10^{-01}$	$6,43 \times 10^{-01}$
CF	-0,0394	0,0218	$7,08 \times 10^{-02}$	$1,42 \times 10^{-01}$
HM	0,0049	0,0129	$7,07 \times 10^{-01}$	$7,07 \times 10^{-01}$



Slika 10 Prikaz značajnih promjena u izravno mjenjenim *N*-glikanima proteina plazme (lijevo) i izračunatim deriviranim svojstvima (desno) između skupine ispitanika koji će biti dijagnosticirani i kontrolne skupine. Na apscisi se nalaze glikani (izravno mjereni ili derivirana svojstva), a na ordinati vrijednosti efekta i 95 %-tni interval pouzdanosti.

Ovakav smjer efekata promjena ostaje vidljiv i kad su zasebno testirane razlike između kontrolne skupine i ispitanika koji će biti dijagnosticirani s IR te onih koji će biti dijagnosticirani sa šećernom bolesti tipa 2 (Slika 11). Činjenica da su jednake promjene vidljive i kad se ispitanici koji će biti dijagnosticirani s IR promatraju odvojeno od onih koji će biti dijagnosticirani sa šećernom bolesti tipa 2 pokazuje kako pogoršanje *N*-glikoma proteina plazme počinje već na samom početku razvoja poremećaja u metabolizmu glukoze.

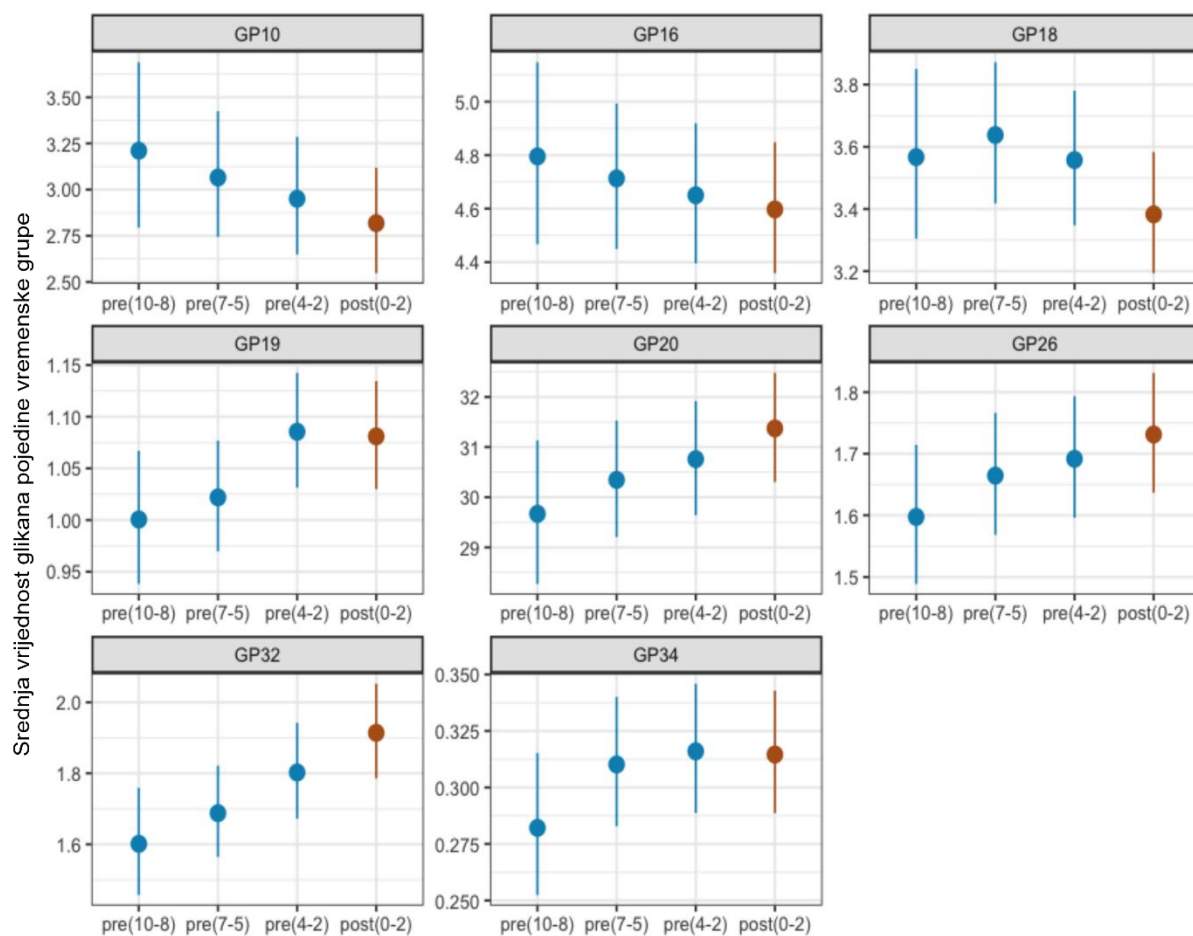


Slika 11 Prikaz značajnih promjena u izravno mjenjenim *N*-glikanima proteina plazme (lijevo) i izračunatim deriviranim svojstvima (desno) odvojeno između kontrolne skupine i ispitanika koji će biti dijagnosticirani s IR (smeđa) ili sa šećernom bolesti tipa 2 (plava). Na apscisi se nalaze glikani (izravno mjereni ili derivirana svojstva), a na ordinati vrijednosti efekta i 95 %-tni interval pouzdanosti.

3.1.3. Ponašanje N-glikana proteina plazme s približavanjem dijagnozi inzulinske rezistencije ili šećerne bolesti tipa 2

Nakon identifikacije značajno promijenjenih glikana između oboljelih i kontrolne skupine, ispitano je mijenjanje glikana oboljelih o udaljenosti od trenutka dijagnoze.

Vrijednosti značajno promijenjenih izravno mjerenih glikana oboljelih pojedinaca od najviše deset godine prije točke dijagnoze do dvije godine nakon točke dijagnoze grupirane su u četiri vremenske grupe ovisno o udaljenosti do trenutka dijagnoze. Prva vremenska grupa okuplja sve dostupne vrijednosti spomenutih glikana uzoraka vađenih osam do deset godina prije točke dijagnoze (10-8), druga vrijednosti spomenutih glikana uzoraka vađenih pet do sedam godina prije točke dijagnoze (7-5), treća vrijednosti spomenutih glikana uzoraka vađenih dvije do četiri godina prije točke dijagnoze (4-2), te četvrta vrijednosti spomenutih glikana uzoraka vađenih unutar dvije godine nakon dijagnoze (0-2). Na Slika 12 je vidljivo da se ispitanicima iste kronološke dobi glikani značajno brže pogoršavaju što je bliži trenutak dijagnoze.



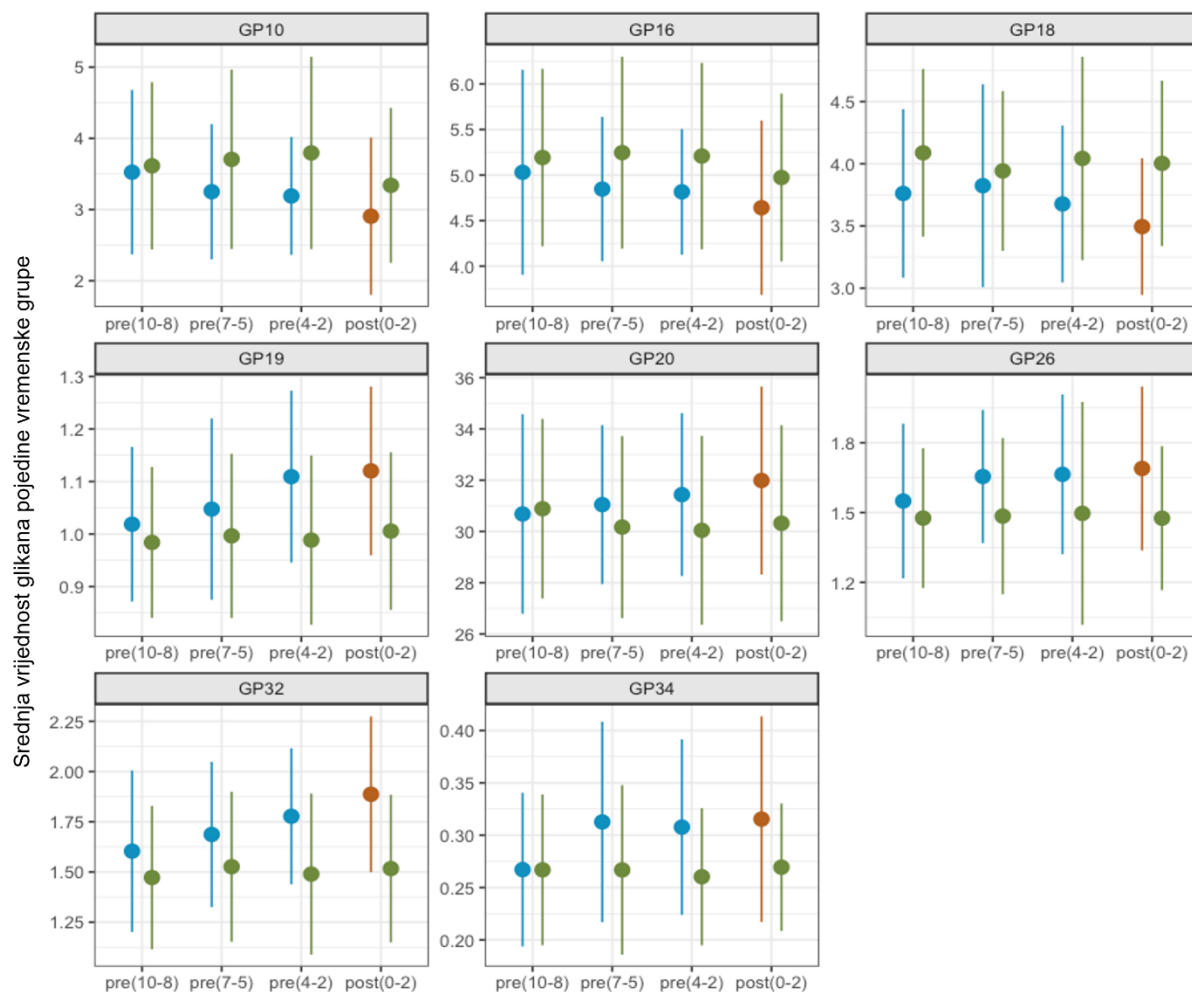
Slika 12 Prikaz promjena *N*-glikana proteina plazme oboljelih ispitanika kroz vrijeme s približavanjem trenutka dijagnoze. Na apscisi su prikazane vremenske grupe kreirane oko točke dijagnoze, pri čemu su plavo označene grupe prije dijagnoze, a smeđe one nakon dijagnoze. Na ordinati su prikazane prosječne vrijednosti glikana za svaku pojedinu vremensku točku s pripadajućim 95 %-tnim intervalnom pouzdanosti.

Dob ispitanika se nije razlikovala unutar vremenskih skupina što je omogućilo prikazivanje promjena u glikanima koje su rezultat utjecaja bolesti koja se razvija, a ne starenja ispitanika (Tablica 14).

Tablica 14 Prosječna dob oboljelih ispitanika i kontrolnih ispitanika u svakoj vremenskoj grupi kreiranoj u odnosu na vrijeme dijagnoze.

Vremenska grupa	Dob dijagnosticiranih ispitanika (prosječna vrijednost \pm SD), godine	Dob kontrolnih ispitanika (prosječna vrijednost \pm SD), godine	Broj dijagnosticiranih ispitanika, N	Broj kontrolnih ispitanika, N
10-8 godina prije dijagnoze	53,35 \pm 8,91	53,36 \pm 8,97	23	115
7-5 godina prije dijagnoze	54,78 \pm 8,40	54,77 \pm 8,40	37	185
4-2 godine prije dijagnoze	53,98 \pm 8,36	53,72 \pm 8,05	40	198
0-2 godine nakon dijagnoze	59,69 \pm 8,35	59,02 \pm 7,60	49	237

U svrhu jasnije vizualizacije pogoršavanja glikana s približavanjem trenutka dijagnoze (odnosno izraženijih promjena glikana), na Slika 13 su prikazane i vrijednosti glikana pojedinaca iz kontrolne skupine, koji su dobno podudarni s oboljelima, za svaku vremensku grupu kreiranu oko dijagnoze. Vidljivo je kako se glikani kontrolnih ispitanika ne mijenjaju značajno, dok se vrijednosti glikana oboljelih pojedinaca sve više udaljavaju od vrijednosti kontrolne skupine kako se približava trenutak dijagnoze. Čak i do deset godina prije dijagnoze vidljiva je razlika između glikana onih koji će biti dijagnosticirani i kontrolne skupine.

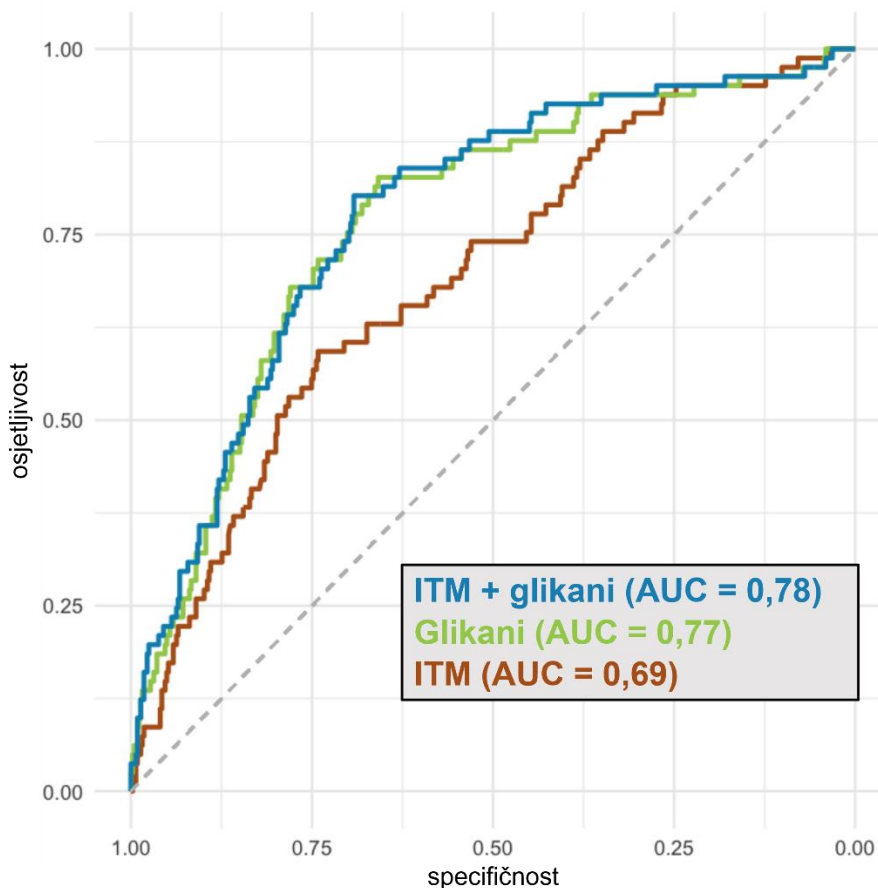


Slika 13 Prikaz promjena *N*-glikana proteina plazme oboljelih ispitanika kroz vrijeme s približavanjem trenutka dijagnoze i kontrolnih ispitanika. Na apscisici su prikazane vremenske grupe kreirane oko točke dijagnoze, pri čemu su plavo označene grupe prije dijagnoze, a smeđe one nakon dijagnoze, dok su zelenom označene vrijednosti kontrolne skupine. Na ordinati su prikazane prosječne vrijednosti glikana za svaku pojedinu vremensku točku s pripadajućim 95 %-tnim intervalnom pouzdanosti.

3.1.4. Rana identifikacija dijagnosticiranih pojedinaca pomoću *N*-glikana proteina plazme

U svrhu testiranja prediktivnog potencijala glikana izrađeni su modeli za ranu identifikaciju pojedinaca koji će biti dijagnosticirani s IR ili šećernom bolesti tipa 2. Ovi modeli se temelje na vrijednostima značajno promijenjenih glikana i/ili vrijednostima ITM-a, poznatog faktora rizika razvoja IR i šećerne bolesti tipa 2 (132), u točki prije dijagnoze. Budući da su neki GP-ovi međusobno zavisni, prije izrade modela napravljena je dvofaktorska *stepwise* linearna regresija kako bi se identificirali samo nezavisni glikani, odnosno oni koji nose najviše informacije (to su GP10, GP16, GP18, GP19, GP20 i GP34). AUC vrijednost modela temeljenog samo na identificiranim neovisnim glikanima ("gliko" model, AUC = 0,77)

minimalno je niža od AUC vrijednosti modela koji se temelji na istim glikanima i ITM-u ("gliko + ITM" model, AUC = 0,78), a osjetno viša od modela temeljenog isključivo na ITM-u ("ITM" model, AUC = 0,69) (Slika 14). Iz tih vrijednosti je jasno da glikani nose dodatnu, vrijednu informaciju o predikciji poremećaja u metabolizmu glukoze, ali i da obuhvaćaju gotovo čitavu informaciju iz ITM-a.



Slika 14 Prikaz ROC krivulja i pripadajućih AUC vrijednosti triju modela korištenih za identifikaciju pojedinaca koji će biti dijagnosticirani s IR ili šećernom bolesti tipa 2. Plavom ROC krivuljom označen je model koji se temelji na informaciji o ITM-u i glikanima, zelenom model koji koristi samo informaciju o glikanima, a smeđom model koji koristi samo ITM. Na apscisi je prikazana specifičnost krivulje, a na ordinati osjetljivost.

3.2. N-GLIKANI PROTEINA PLAZME KAO BILJEG PROMJENE INDEKSA TJELESNE MASE

3.2.1. *Oxford* populacija

3.2.1.1. Osobine ispitanika

Ispitanicima uključenim u *Oxford* studiju redovito je bilježena promjena razine ITM-a tijekom perioda praćenja, odnosno nakon dijeta i nakon operacije želuca. Primjetan je pad u razini ITM-a nakon nisko kalorijske dijeta iako je trajala samo tri tjedna. No, znatno veći i signifikantniji pad razine ITM-a primjetan je nakon operacije želuca, u prvoj postoperativnoj točki praćenja. Mršavljenje, odnosno sniženje razine ITM-a se nastavilo i tijekom narednih šest mjeseci pa je niža razina zabilježena i u drugoj postoperativnoj točki praćenja. Iz rezultata se može opaziti da je veća količina kilograma "izgubljena" u prvih šest mjeseci nakon operacije, te da se tempo mršavljenja u narednih šest mjeseci malo usporio, što je očekivano budući da ispitanici odmah nakon operacije moraju nastaviti s vrlo restriktivnom dijetom što rezultira brzim gubitkom kilograma u prvih par mjeseci nakon operacije. S odmicanjem perioda od operacije, ispitanici su upućeni na prilagodbu načina prehrane i polagani prijelaz na normalnu dijetu, što po konzistenciji hrane te po kalorijskoj vrijednosti, međutim to očekivano rezultira usporavanjem mršavljenja (133). Detaljni opis karakteristika *Oxford* populacije dostupan je u tablici 15.

Tablica 15 Deskriptivna statistika ispitanika Oxford populacije.

Karakteristike	Oxford populacija					
Ukupni broj ispitanika (N)	37					
Ispitanici podvignuti longitudinalnoj resekciji želuca poput rukava (engl. <i>sleeve gastrectomy</i>), N (%)	35 (68 %)					
Ispitanici podvignuti operaciji postavljanja Roux-en-Y želučane premosnice (engl. <i>Roux-en-Y gastric bypass, RYGB</i>) N (%)	12 (32 %)					
Ukupni broj ispitanika u svakoj vremenskoj točki (N)	Preoperativna restriktivna dijeta	Dan operacije	Prva postoperativna točka praćenja	Druge postoperativna točka praćenja		
	8	37	30	24		
Dob ispitanika, prosječna vrijednost \pm SD, godine	Na početku dijete	Na kraju dijete	U prvom postoperativnoj točki praćenja	U drugom postoperativnoj točki praćenja		
	46,5 \pm 9,27	46,5 \pm 9,27	48,15 \pm 9,34	49 \pm 9,34		
Vrijednost ITM-a* u svakoj vremenskoj točki, prosječna vrijednost \pm SD, kg/m ²	Na početku dijete	Na kraju dijete	U prvom postoperativnoj točki praćenja	U drugom postoperativnoj točki praćenja		
	48,53 \pm 4,13	46,60 \pm 4,21	36,01 \pm 5,07	32,82 \pm 5,17		
Broj ispitanica ženskog spola, N (%)	33 (89 %)					
Broj ispitanika dijagnosticiranih sa šećernom bolešću tipa 2, N (%)	6 (16 %)					

*Referentne vrijednosti ITM-a: <18.5 (pothranjenost), 18.5–24.9 (poželjna tjelesna težina), 25–29.9 (povećana tjelesna težina), >30 (pretilost). SD = standardna devijacija

3.2.1.2. Praćenje *N*-glikana proteina plazme nakon restriktivne dijeta te restriktivne operacije želuca

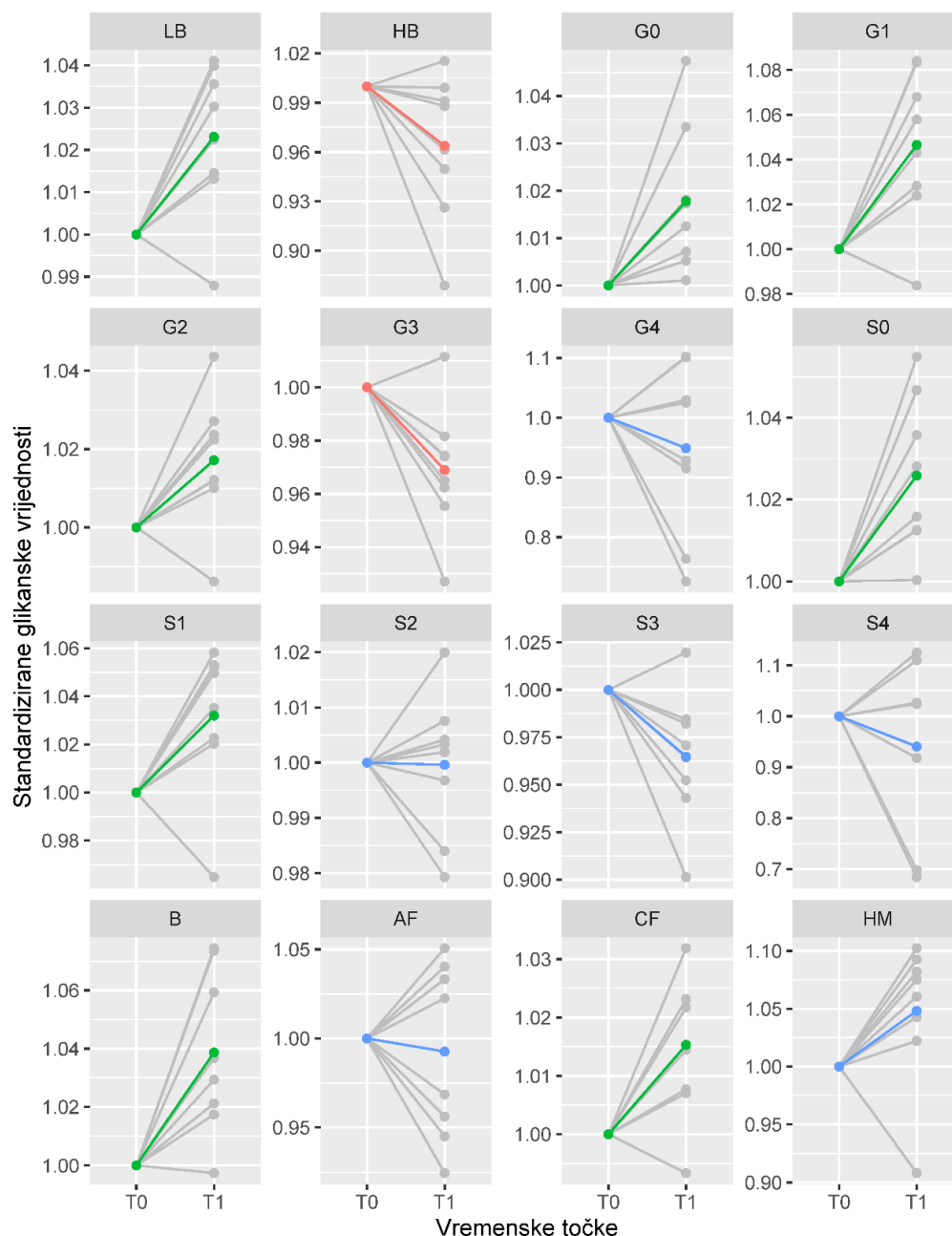
3.2.1.2.1. Utjecaj nisko kalorijske restriktivne dijeta na *N*-glikane proteina plazme

Linearni mješoviti model je korišten za ispitivanje utjecaja dijeta na derivirana svojstva glikana proteina plazme usporedbom vrijednosti glikana prije početka dijeta i nakon dijeta. Deset od 16 izračunatih deriviranih svojstava značajno je promijenjeno nakon dijeta. Jednostavnijim, manje razgranatim strukturama s najviše dvije galaktoze i jednom sijalinskom kiselinom (LB, G0, G1, G2, S0, S1) značajno se povećao udio u glikomu proteina plazme nakon dijeta, kao i strukturama sa sržnom fukozom (CF) i onima s računajućim GlcNAc-om (B). S druge strane, razine kompleksnih i razgranatijih (HB) struktura s tri galaktoze (G3) značajno su se snizile nakon dijeta (Tablica 16, Slika 15). Povećanje udjela manje kompleksnih glikanskih struktura sa sržnom fukozom koje većinom potječu s IgG-a zajedno sa smanjenjem razgranatijih, kompleksnih struktura, koje dolaze uglavnom s proteina akutne faze, govori o pozitivnom protuupalnom djelovanju dijeta koji je vidljiv na glikanskim promjenama usprkos relativno kratkom trajanju (tri tjedna) i malom broju ispitanika (uzorak krvi vađen prije početka dijeta je bio dostupan samo za osam ispitanika).

Tablica 16 Utjecaj restriktivne dijeta u trajanju od tri tjedna na *N*-glikane proteina plazme. Izračunati efekt je razlika u vrijednostima deriviranog svojstva glikana nakon i prije početka dijeta. Statistički značajne promjene su zadebljane.

Derivirano svojstvo	Efekt	Standardna pogreška	P vrijednost	Prilagođena p vrijednost
Niska razgranatost (LB)	0,6047	0,2092	2,33 x10⁻⁰²	4,65 x10⁻⁰²
Visoka razgranatost (HB)	-0,6484	0,2408	3,10 x10⁻⁰²	4,95 x10⁻⁰²
Neutralni glikani, asijalinizacija (S0)	0,4771	0,1184	5,00 x10⁻⁰³	1,60 x10⁻⁰²
Monosijalinizacija (S1)	0,6932	0,1875	7,70 x10⁻⁰³	2,05 x10⁻⁰²
Disijalinizacija (S2)	-0,0655	0,1793	7,26 x10 ⁻⁰¹	7,26 x10 ⁻⁰¹
Trisijalinizacija (S3)	-0,6587	0,2569	3,73 x10 ⁻⁰²	5,43 x10 ⁻⁰²
Tetrasijalinizacija (S4)	-0,2747	0,4195	5,34 x10 ⁻⁰¹	6,10 x10 ⁻⁰¹
Agalaktozilacija (G0)	0,5342	0,1271	4,00 x10⁻⁰³	1,60 x10⁻⁰²
Monogalaktozilacija (G1)	0,8115	0,1965	4,40 x10⁻⁰³	1,60 x10⁻⁰²
Digalaktozilacija (G2)	0,4828	0,1620	2,05 x10⁻⁰²	4,65 x10⁻⁰²

Trigalaktozilacija (G3)	-0,6842	0,1599	3,70 x10⁻⁰³	1,60 x10⁻⁰²
Tetragalaktozilacija (G4)	-0,3006	0,3822	4,57 x10 ⁻⁰¹	5,63 x10 ⁻⁰¹
Oligomanozni glikani (HM)	0,9520	0,4465	7,04 x10 ⁻⁰²	9,39 x10 ⁻⁰²
Učestalost račvajućeg N-acetilglukozamina (B)	0,4901	0,1817	3,08 x10⁻⁰²	4,95 x10⁻⁰²
Sržna fukozilacija (CF)	0,5414	0,1283	3,90 x10⁻⁰³	1,60 x10⁻⁰²
Antenarna fukozilacija (AF)	-0,0682	0,1180	5,81 x10 ⁻⁰¹	6,20 x10 ⁻⁰¹



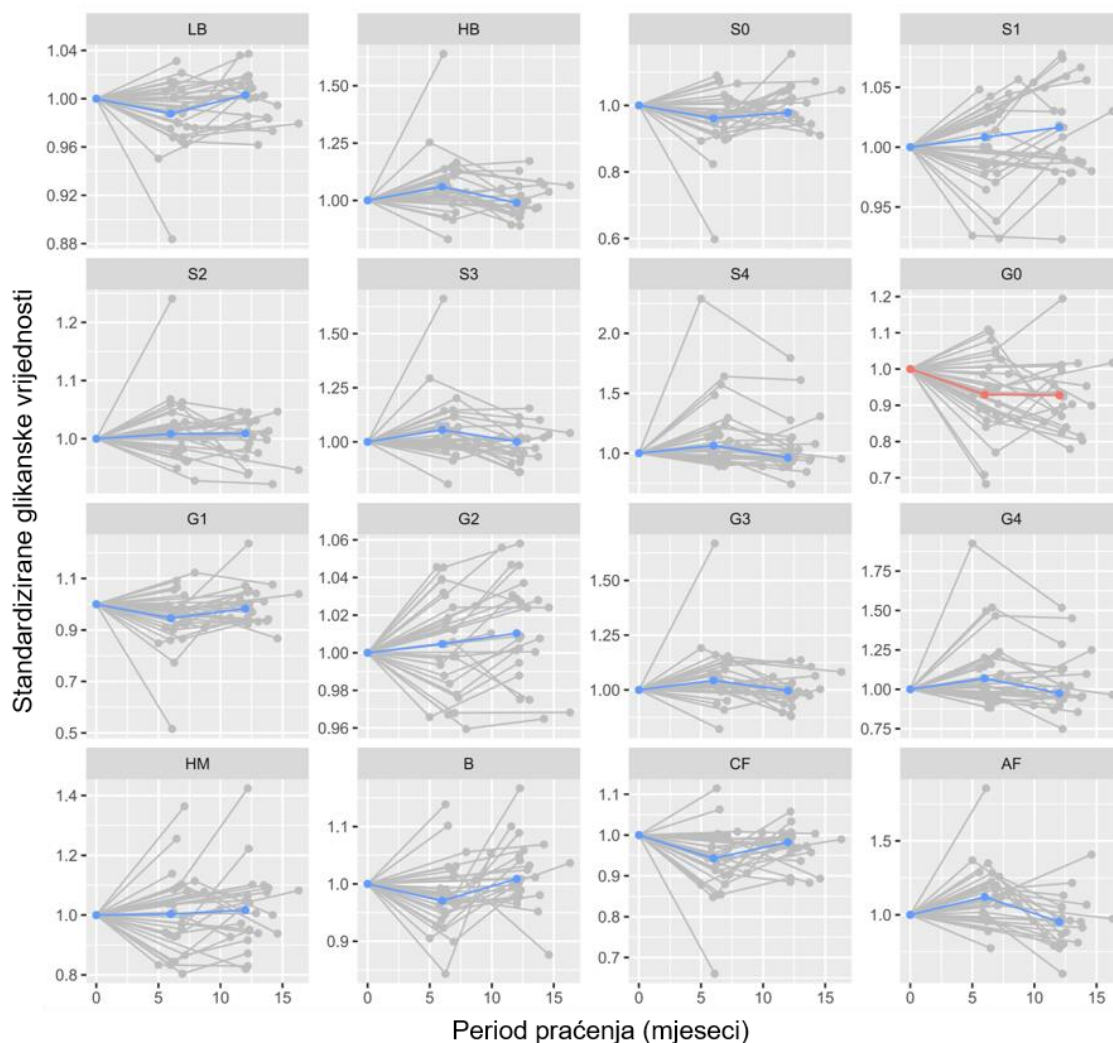
Slika 15 Utjecaj restriktivne dijeta u trajanju od tri tjedna na derivirana svojstva *N*-glikana proteina plazme. Na ordinati su prikazane standardizirane glikanske vrijednosti, a na apscisi vremenske točke. T0 je početak dijete, a T1 kraj dijete. Standardizirane vrijednosti deriviranih svojstava glikana u točki T0 dobivene su dijeljenjem s njihovim vrijednostima u točki T0 kako bi se sve ujednačile na vrijednost = 1 prije početka dijete. Standardizirane vrijednosti nakon dijete, u točki T1, dobivene su dijeljenjem vrijednosti izmjerenih nakon dijete s vrijednosti tog deriviranog svojstva prije dijete (vrijednosti u T0). Na taj način linija između standardizirane glikanske vrijednosti u točki T0 i one u točki T1 predstavlja promjenu vrijednosti glikana uslijed dijete standardiziranu za sva derivirana svojstva radi jednostavnije usporedbe. Crvena linija označava značajni pad vrijednosti deriviranog svojstva, zelena linija rast, a plava linija označava neznačajnu promjenu.

3.2.1.2.2. Utjecaj restriktivne operacije želuca na *N*-glikane proteina plazme

Utjecaj operacije želuca na glikane ispitan je promjenom, odnosno razlikom između vrijednosti deriviranih svojstava kroz vrijeme praćenja ispitanika nakon operacije. Samo jedno derivirano svojstvo glikana proteina plazme pokazalo je značajnu promjenu nakon operacije želuca – vrijednosti agalaktoziliranih glikana (G0) značajno padaju tijekom postoperativnog oporavka nakon dijete (Tablica 17, Slika 16).

Tablica 17 Utjecaj operacije želuca na *N*-glikane proteina plazme. Izračunati efekt je promjena deriviranog svojstva glikana tijekom mjeseci nakon operacije želuca. Statistički značajne promjene su zadebljane.

Derivirano svojstvo	Efekt	Standardna pogreška	P vrijednost	Prilagođena p vrijednost
Niska razgranatost (LB)	-0,0054	0,0125	6,70 x10 ⁻⁰¹	7,65 x10 ⁻⁰¹
Visoka razgranatost (HB)	0,0070	0,0134	6,03 x10 ⁻⁰¹	7,65 x10 ⁻⁰¹
Neutralni glikani, asijalinizacija (S0)	-0,0044	0,0093	6,38 x10 ⁻⁰¹	7,65 x10 ⁻⁰¹
Monosijalinizacija (S1)	0,0277	0,0126	3,22 x10 ⁻⁰²	1,29 x10 ⁻⁰¹
Disijalinizacija (S2)	0,0006	0,0115	9,61 x10 ⁻⁰¹	9,61 x10 ⁻⁰¹
Trisijalinizacija (S3)	0,0022	0,0135	8,73 x10 ⁻⁰¹	9,31 x10 ⁻⁰¹
Tetrasijalinizacija (S4)	0,0093	0,0149	5,37 x10 ⁻⁰¹	7,65 x10 ⁻⁰¹
Agalaktozilacija (G0)	-0,0273	0,0071	5.26x10⁻⁰⁴	8.42x10⁻⁰³
Monogalaktozilacija (G1)	-0,0077	0,0101	4,44 x10 ⁻⁰¹	7,65 x10 ⁻⁰¹
Digalaktozilacija (G2)	0,0225	0,0099	2,80 x10 ⁻⁰²	1,29 x10 ⁻⁰¹
Trigalaktozilacija (G3)	0,0084	0,0131	5,19 x10 ⁻⁰¹	7,65 x10 ⁻⁰¹
Tetragalaktozilacija (G4)	0,0090	0,0147	5,43 x10 ⁻⁰¹	7,65 x10 ⁻⁰¹
Oligomanozni glikani (HM)	0,0127	0,0152	4,05 x10 ⁻⁰¹	7,65 x10 ⁻⁰¹
Učestalost račvujućeg <i>N</i> -acetilglukozamina (B)	0,0069	0,0076	3,71 x10 ⁻⁰¹	7,65 x10 ⁻⁰¹
Sržna fukozilacija (CF)	-0,0223	0,0098	2,69 x10 ⁻⁰²	1,29 x10 ⁻⁰¹
Antenarna fukozilacija (AF)	-0,0097	0,0100	3,36 x10 ⁻⁰¹	7,65 x10 ⁻⁰¹



Slika 16 Utjecaj operacije želuca na *N*-glikane proteina plazme tijekom perioda praćenja. Na ordinati je prikazana standardizirana vrijednost glikana, a na apscisi period praćenja u mjesecima. Standardizirane vrijednosti deriviranih svojstava glikana u točki 0 (na dan operacije) dobivene su dijeljenjem s glikanskim vrijednostima (mjerenjima) u točki 0 kako bi se sve ujednačile na vrijednost = 1 prije operacije. Standardizirane vrijednosti nakon operacije, u točki šest mjeseci nakon, dobivene su dijeljenjem vrijednosti izmjerenih oko šest mjeseci postoperativno s vrijednosti tog deriviranog svojstva prije operacije (u točki 0). Isti postupak je ponovljen i za standardizirane vrijednosti u točki 12 mjeseci nakon operacije. Na taj način linije između standardizirane glikanske vrijednosti na dan operacije i onih u točkama šest i 12 mjeseci nakon operacije predstavljaju promjenu vrijednosti glikana nakon operacije standardiziranu za sva derivirana svojstva radi jednostavnije usporedbe. Crvena linija označava značajni pad vrijednosti deriviranog svojstva, a plava linija označava neznačajnu promjenu.

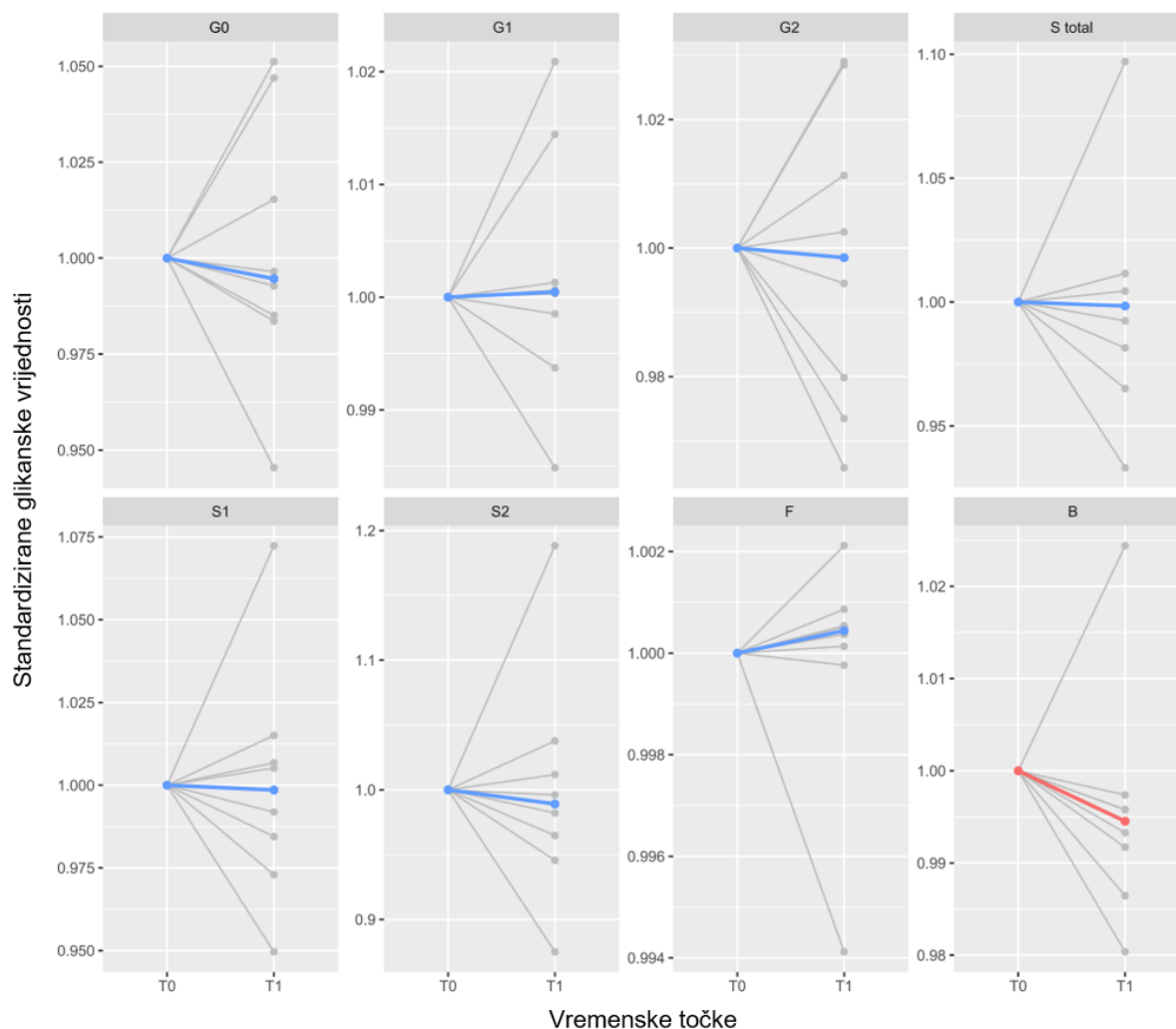
3.2.1.3. Praćenje *N*-glikana imunoglobulina G nakon restriktivne dijetete te restriktivne operacije želuca

3.2.1.3.1. Utjecaj nisko kalorijske restriktivne dijetete na *N*-glikane IgG-a

Linearni mješoviti model je korišten za ispitivanje utjecaja dijetete na derivirana svojstva IgG glikoma usporedbom vrijednosti glikana prije početka dijetete i nakon dijetete. Samo jedno derivirano svojstvo pokazalo je statistički značajnu promjenu nakon dijetete – učestalost računajućeg GlcNAc-a na glikanskim strukturama značajno je pala nakon dijetete (Tablica 18, Slika 17).

Tablica 18 Utjecaj restriktivne dijetete u trajanju od tri tjedna na *N*-glikane IgG-a. Izračunati efekt je razlika u vrijednostima deriviranog svojstva glikana nakon i prije početka dijetete. Statistički značajne promjene su zadebljane.

Derivirano svojstvo	Efekt	Standardna pogreška	P vrijednost	Prilagođena p vrijednost
Učestalost računajućeg <i>N</i>-acetilglukozamina (B)	-0,2801	0,0743	4,30 x10⁻⁰³	3,41 x10⁻⁰²
Agalaktozilacija (G0)	-0,0493	0,1876	7,93 x10 ⁻⁰¹	7,93 x10 ⁻⁰¹
Monogalaktozilacija (G1)	0,1122	0,1869	5,53 x10 ⁻⁰¹	7,93 x10 ⁻⁰¹
Digalaktozilacija (G2)	-0,0539	0,1387	6,99 x10 ⁻⁰¹	7,93 x10 ⁻⁰¹
Ukupna sijalinizacija (S total)	0,0941	0,2090	6,54 x10 ⁻⁰¹	7,93 x10 ⁻⁰¹
Monosijalinizacija (S1)	0,1354	0,1878	4,78 x10 ⁻⁰¹	7,93 x10 ⁻⁰¹
Disijalinizacija (S2)	-0,0869	0,2474	7,27 x10 ⁻⁰¹	7,93 x10 ⁻⁰¹
Sržna fukožilacija (CF)	0,0810	0,2416	7,39 x10 ⁻⁰¹	7,93 x10 ⁻⁰¹



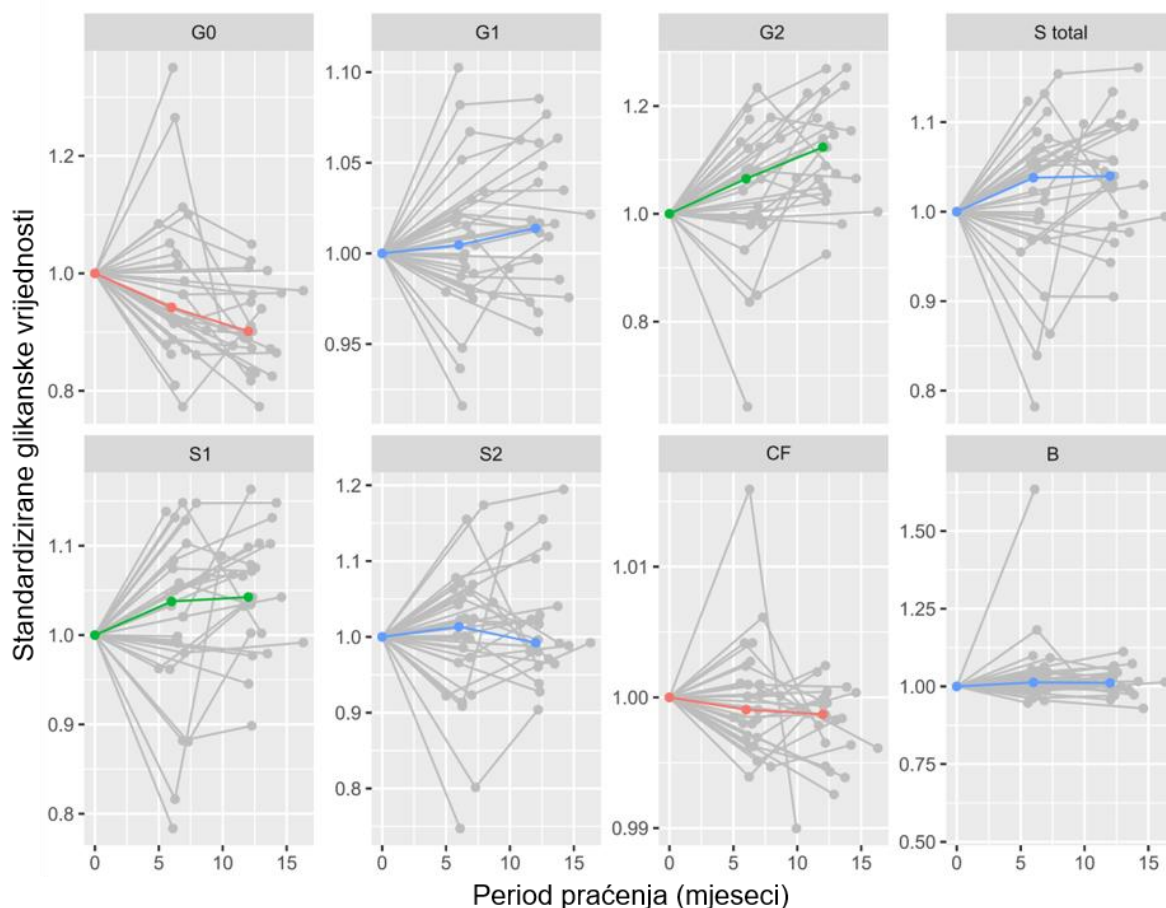
Slika 17 Utjecaj restriktivne dijeta u trajanju od tri tjedna na *N*-glikane IgG-a. Na ordinati su prikazane standardizirane glikanske vrijednosti, a na apscisi vremenske točke. T0 je početak dijeta, a T1 kraj dijeta. Standardizirane vrijednosti deriviranih svojstava glikana u točki T0 dobivene su dijeljenjem s njihovim vrijednostima u točki T0 kako bi se sve ujednačile na vrijednost = 1 prije početka dijeta. Standardizirane vrijednosti nakon dijeta, u točki T1, dobivene su dijeljenjem vrijednosti izmjerenih nakon dijeta s vrijednosti tog deriviranog svojstva prije dijeta (vrijednosti u T0). Na taj način linija između standardizirane glikanske vrijednosti u točki T1 i one u točki T2 predstavlja promjenu vrijednosti glikana uslijed dijeta standardiziranu za sva derivirana svojstva radi jednostavnije usporedbe. Crvena linija označava značajni pad vrijednosti deriviranog svojstva, a plava linija označava neznačajnu promjenu.

3.2.1.3.2. Utjecaj restriktivne operacije želuca na *N*-glikane IgG-a

Utjecaj operacije želuca na glikom IgG-a ispitan je promjenom, odnosno razlikom između vrijednosti deriviranih svojstava kroz vrijeme praćenja ispitanika nakon operacije s vrijednosti prije operacije. Čak četiri od osam deriviranih svojstava IgG glikoma pokazalo je značajnu promjenu nakon operacije želuca. Vrijednosti digalaktoziliranih (G2) i monosijaliniziranih (S1) glikana rastu nakon operacije, dok vrijednosti sržno fukoziliranih (CF) i agalaktoziliranih (G0) glikana padaju tijekom postoperativnog oporavka (Tablica 19, Slika 18).

Tablica 19 Utjecaj operacije želuca na *N*-glikane IgG-a. Izračunati efekt je promjena deriviranog svojstva glikana tijekom mjeseci nakon operacije želuca. Statistički značajne promjene su zadebljane.

Derivirano svojstvo	Efekt	Standardna pogreška	P vrijednost	Prilagođena p vrijednost
Učestalost račvajućeg <i>N</i> -acetilglukozamina (B)	0,0173	0,0083	4,01 x10 ⁻⁰²	6,27 x10 ⁻⁰²
Agalaktozilacija (G0)	-0,0339	0,0078	9,23 x10⁻⁰⁵	7,38 x10⁻⁰⁴
Monogalaktozilacija (G1)	0,0206	0,0107	8,18 x10 ⁻⁰²	9,35 x10 ⁻⁰²
Digalaktozilacija (G2)	0,0275	0,0072	3,75 x10⁻⁰⁴	1,50 x10⁻⁰³
Ukupna sijalinizacija (S total)	0,0171	0,0083	4,70 x10 ⁻⁰²	6,27 x10 ⁻⁰²
Monosijalinizacija (S1)	0,0193	0,0080	1,97 x10⁻⁰²	3,94 x10⁻⁰²
Disijalinizacija (S2)	0,0048	0,0080	5,48 x10 ⁻⁰¹	5,48 x10 ⁻⁰¹
Sržna fukozilacija (CF)	-0,0155	0,0064	1,74 x10⁻⁰²	3,94 x10⁻⁰²



Slika 18 Utjecaj operacije želuca na *N*-glikane IgG-a tijekom perioda praćenja. Na ordinati je prikazana standardizirana vrijednost glikana, a na apscisi period praćenja u mjesecima. Standardizirane vrijednosti deriviranih svojstava glikana u točki 0 (na dan operacije) dobivene su dijeljenjem s glikanskim vrijednostima (mjerenjima) u točki 0 kako bi se sve ujednačile na vrijednost = 1 prije operacije. Standardizirane vrijednosti nakon operacije, u točki šest mjeseci nakon, dobivene su dijeljenjem vrijednosti izmjerenih oko šest mjeseci postoperativno s vrijednosti tog deriviranog svojstva prije operacije (u točki 0). Isti postupak je ponovljen i za standardizirane vrijednosti u točki 12 mjeseci nakon operacije. Na taj način linije između standardizirane glikanske vrijednosti na dan operacije i onih u točkama šest i 12 mjeseci nakon operacije predstavljaju promjenu vrijednosti glikana nakon operacije standardiziranu za sva derivirana svojstva radi jednostavnije usporedbe. Crvena linija označava značajni pad vrijednosti deriviranog svojstva, zelena linija rast, a plava linija označava neznčajnu promjenu.

3.2.2. *TwinsUK* populacija

3.2.2.1. Osobine ispitanika

Podskupina na kojoj se proučavao utjecaj promjene u razini ITM-a tijekom perioda praćenja na *N*-glikane proteina plazme i IgG-a sastoji se od 3 742 uzorka koji su uzorkovani na ukupno 1 680 ispitanika. Za uključenost ispitanika u studiju o utjecaju ITM-a na glikane obavezna je bila i dostupnost informacije o razini ITM-a tijekom perioda praćenja, dobi ispitanika (u svakoj vremenskoj točki), i spolu (Tablica 20).

Tablica 20 Deskriptivna statistika *TwinsUK* populacije (ITM podskupina).

Karakteristike	<i>TwinsUK</i> populacija (podskupina s podacima o ITM-u)
Ukupni broj ispitanika (N)	1 680
Ukupni broj uzoraka (N)	3 742
Dob ispitanika u početnoj vremenskoj točki, prosječna vrijednost \pm SD, godine	53,23 \pm 10,86
Period praćenja, prosječna vrijednost \pm SD, godine	7,90 \pm 5,66
Ukupan broj ispitanica ženskog spola, N (%)	1 680 (100)
Vrijednosti ITM-a u početnoj vremenskoj točki, prosječna vrijednost \pm SD, kg/m ²	25,45 \pm 4,53

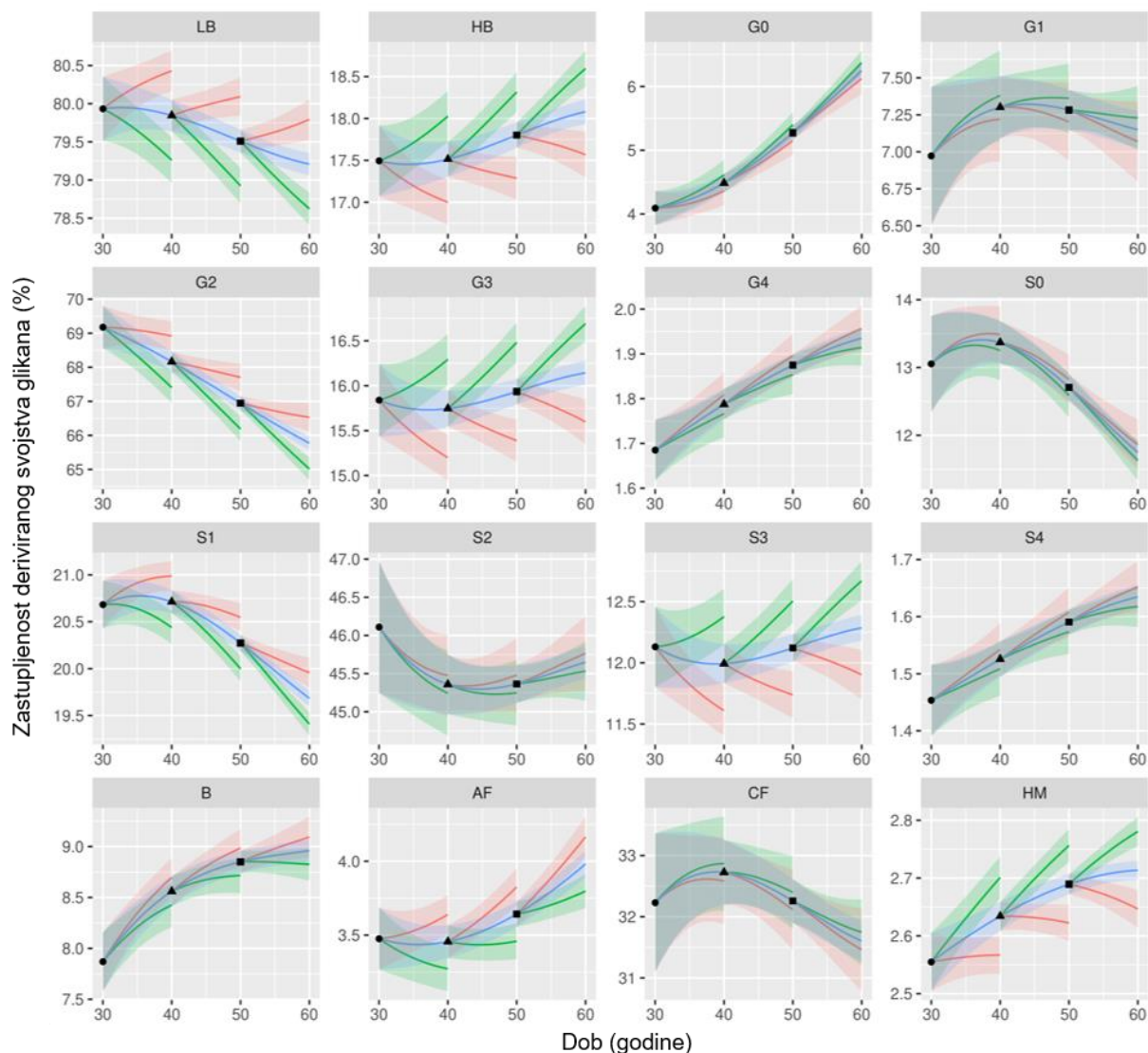
3.2.2.2. Promjene *N*-glikana proteina plazme ovisno o indeksu tjelesne mase

Linearni mješoviti model je korišten za testiranje utjecaja mijenjanja ITM-a tijekom perioda praćenja na profil *N*-glikana proteina plazme. Osam deriviranih svojstava glikoma proteina plazme značajno se promijenilo uslijed promjene u razini ITM-a tijekom perioda praćenja. Derivirana svojstva koja opisuju jednostavnije, manje razgranate glikane (LB, G2, S1) te antenarno fukozilirani (AF) glikani su porasli nakon smanjenja tjelesne težine, što je izraženo kao smanjenje ITM-a tijekom perioda praćenja. S druge strane, vrijednosti onih deriviranih svojstava koja opisuju kompleksnije i razgranatije glikane (HB, G3, S3) te oligomanoznih (HM) glikana snizile su se pod utjecajem smanjenja ITM-a (

Tablica 21). Usporedba utjecaja starenja i promjene u vrijednosti ITM-a tijekom vremena na glikane proteina plazme prikazana je na Slika 19.

Tablica 21 Promjene *N*-glikana proteina plazme s longitudinalno praćenom promjenom tjelesne težine izraženom kao smanjenje ITM-a. Izračunati efekt predstavlja utjecaj promjene u vrijednosti ITM-a (promjena u vrijednosti glikana sa smanjenjem ITM-a od 1 kg/m²) na vrijednosti glikana proteina plazme. Statistički značajne promjene su zadebljane.

Derivirano svojstvo	Efekt	Standardna pogreška	P vrijednost	Prilagođena p vrijednost
Niska razgranatost (LB)	0,1170	0,0197	3,09 x10⁻⁰⁹	1,89 x10⁻⁰⁸
Visoka razgranatost (HB)	-0,1028	0,0201	3,19 x10⁻⁰⁷	1,17 x10⁻⁰⁶
Agalaktozilacija (G0)	-0,0251	0,0184	1,72 x10 ⁻⁰¹	2,63 x10 ⁻⁰¹
Monogalaktozilacija (G1)	-0,0160	0,0214	4,57 x10 ⁻⁰¹	5,46 x10 ⁻⁰¹
Digalaktozilacija (G2)	0,1516	0,0333	5,35 x10⁻⁰⁶	1,64 x10⁻⁰⁵
Trigalaktozilacija (G3)	-0,1093	0,0184	3,09 x10⁻⁰⁹	1,89 x10⁻⁰⁸
Tetragalaktozilacija (G4)	0,0042	0,0040	2,93 x10 ⁻⁰¹	4,03 x10 ⁻⁰¹
Neutralni glikani, asijalinizacija (S0)	0,0235	0,0295	4,26 x10 ⁻⁰¹	5,20 x10 ⁻⁰¹
Monosijalinizacija (S1)	0,0548	0,0117	2,82 x10⁻⁰⁶	9,11 x10⁻⁰⁶
Disijalinizacija (S2)	0,0233	0,0391	5,52 x10 ⁻⁰¹	6,46 x10 ⁻⁰¹
Trisijalinizacija (S3)	-0,0767	0,0151	4,04 x10⁻⁰⁷	1,39 x10⁻⁰⁶
Tetrasijalinizacija (S4)	0,0034	0,0036	3,43 x10 ⁻⁰¹	4,40 x10 ⁻⁰¹
Učestalost račvajućeg <i>N</i> -acetilglukozamina (B)	0,0269	0,0148	6,88 x10 ⁻⁰²	1,22 x10 ⁻⁰¹
Antenarna fukozilacija (AF)	0,0367	0,0091	5,53 x10⁻⁰⁵	1,45 x10⁻⁰⁴
Sržna fukozilacija (CF)	-0,0285	0,0525	5,87 x10 ⁻⁰¹	6,62 x10 ⁻⁰¹
Oligomanozni glikani (HM)	-0,0134	0,0025	6,90 x10⁻⁰⁸	3,16 x10⁻⁰⁷



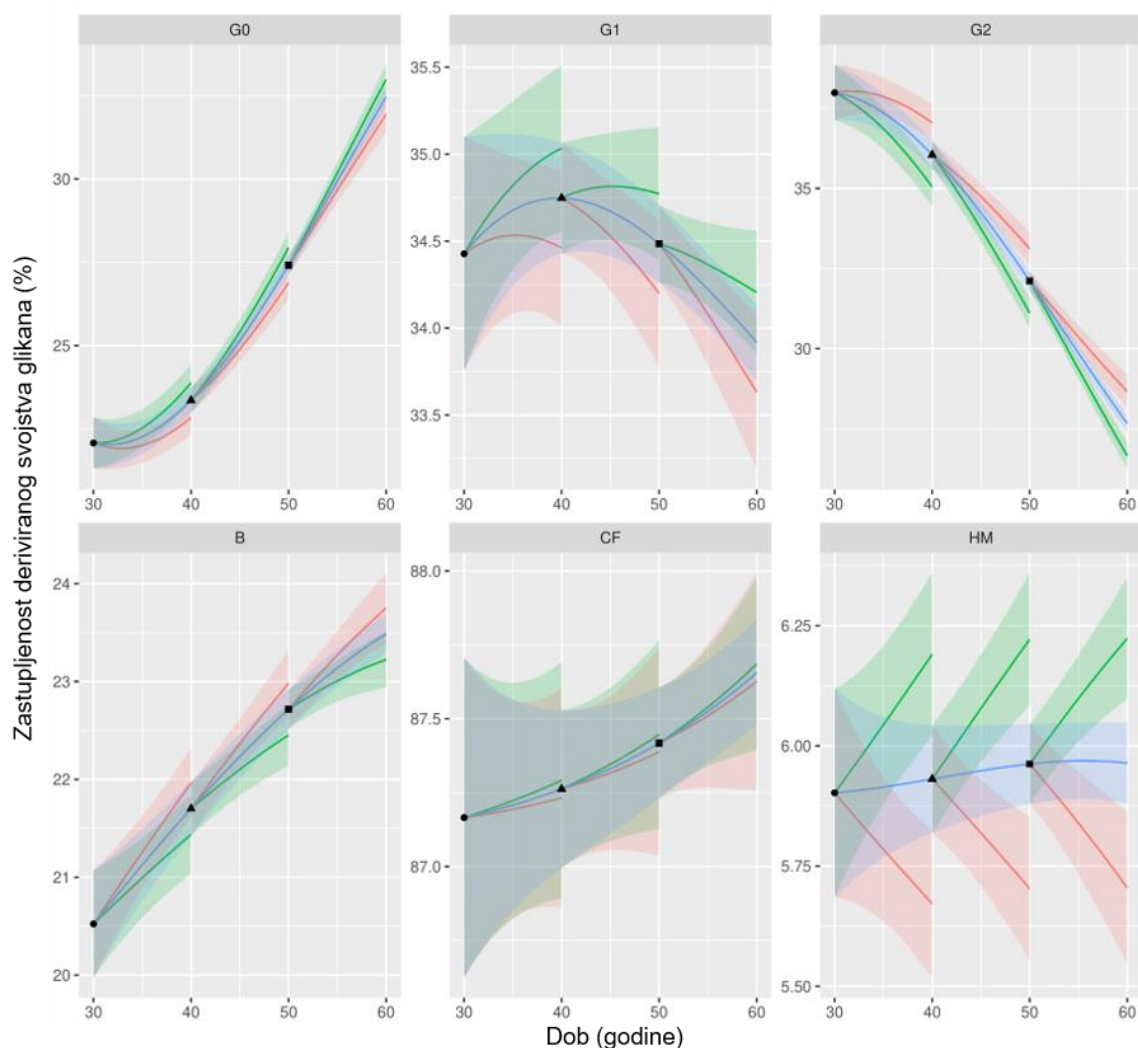
Slika 19 Promjene *N*-glikana proteina plazme s longitudinalno praćenom promjenom tjelesne težine izraženom kao promjena ITM-a. Promjene u deriviranim svojstvima glikana su prikazane grafovima s linijama koje prikazuju hipotetsko starenje ispitanica TwinsUK studije. Crna točka predstavlja početnu točku tridesetogodišnjakinje, crni trokut četrdesetogodišnjakinje te crni kvadrat pedesetogodišnjakinje. Sve ove ispitanice imaju početni ITM od 25 kg/m^2 . Plave linije predstavljaju promjene glikana proteina plazme tijekom starenja pri stabilnom, nepromijenjenom ITM-u. Zelene linije predstavljaju promjene glikana tijekom starenja uz povećanje ITM-a (0.5 kg/m^2 godišnje, tijekom deset godina), a crvene linije uz smanjenje ITM-a (0.5 kg/m^2 godišnje, tijekom deset godina). Osjenčani prostor predstavlja 95 %-tni interval pouzdanosti. Utjecaj dobi, odnosno starenja na glikane je prikazan zaobljenjem krivulje, dok je utjecaj promjene ITM-a prikazan udaljenošću zelene/crvene linije od plave.

3.2.2.3. Promjene *N*-glikana IgG-a ovisno o indeksu tjelesne mase

Budući da je na TwinsUK populaciji analiziran samo *N*-glikom proteina plazme, a mnoga istraživanja su pokazala kako ITM značajno utječe na IgG glikom, poput u ovom istraživanju ispitanog utjecaja smanjenja ITM-a uslijed dijete te operacije želuca na IgG glikane Oxford populacije. Iz tog razloga je odlučeno je iz glikana proteina plazme pojedinaca okupljenih u TwinsUK populaciji, kojima se mijenjao ITM, ekstrapolirati dio kromatograma koji većinski dolazi od glikana IgG-a. Linearni mješoviti model je korišten za testiranje utjecaja mijenjanja ITM-a tijekom perioda praćenja na derivirana svojstva koja opisuju zajedničke značajke IgG glikana. Od šest izračunatih deriviranih svojstava, čak tri je pokazalo značajnu promjenu uslijed promjene u razini ITM-a tijekom perioda praćenja. Udio digalaktoziliranih (G2) glikana značajno je porastao tijekom perioda praćenja sa smanjenjem ITM-a, dok su se vrijednosti agalaktoziliranih (G0) i oligmanoznih (HM) glikana smanjile (Tablica 22). Usporedba utjecaja starenja i promjene u vrijednosti ITM-a tijekom vremena na glikane IgG-a prikazana je na Slika 20.

Tablica 22 Promjene *N*-glikana IgG-a (ekstrapolirani iz prvih 11 GP-ova glikana proteina plazme) s longitudinalno praćenom promjenom tjelesne težine izraženom kao smanjenje ITM-a. Izračunati efekt predstavlja utjecaj promjene u vrijednosti ITM-a (promjena u vrijednosti glikana sa smanjenjem ITM-a od 1 kg/m²) na vrijednosti glikana IgG-a. Statistički značajne promjene su zadebljane.

Derivirano svojstvo	Efekt	Standardna pogreška	P vrijednost	Prilagođena p vrijednost
Agalaktozilacija (G0)	-0,1048	0,0397	8,43x10⁻⁰³	1,79x10⁻⁰²
Monogalaktozilacija (G1)	-0,0573	0,0343	9,53x10 ⁻⁰²	1,25x10 ⁻⁰¹
Digalaktozilacija (G2)	0,2004	0,0403	6,88x10⁻⁰⁷	5,85x10⁻⁰⁶
Učestalost račvajućeg <i>N</i> -acetilglukozamina (B)	0,0526	0,0262	4,49x10 ⁻⁰²	6,94x10 ⁻⁰²
Sržna fukozilacija (CF)	-0,0059	0,0285	8,36x10 ⁻⁰¹	8,89x10 ⁻⁰¹
Oligomanozni glikani (HM)	-0,0519	0,0119	1,33x10⁻⁰⁵	5,66x10⁻⁰⁵



Slika 20 Promjene *N*-glikana IgG-a s longitudinalno praćenom promjenom tjelesne težine izraženom kao promjena ITM-a. Promjene u deriviranim svojstvima glikana su prikazane grafovima s linijama koje prikazuju hipotetsko starenje ispitanica TwinsUK studije. Crna točka predstavlja početnu točku tridestogodišnjakinje, crni trokut četrdesetogodišnjakinje te crni kvadrat pedesetogodišnjakinje. Sve ove ispitanice imaju početni ITM od 25 kg/m². Plave linije predstavljaju promjene IgG glikana tijekom starenja pri stabilnom, nepromijenjenom ITM-u. Zelene linije predstavljaju promjene glikana tijekom starenja uz povećanje ITM-a (0.5 kg/m² godišnje, tijekom deset godina), a crvene linije uz smanjenje ITM-a (0.5 kg/m² godišnje, tijekom deset godina). Osjenčani prostor predstavlja 95 %-tni interval pouzdanosti. Utjecaj dobi, odnosno starenja na glikane je prikazan zaobljenjem krivulje, dok je utjecaj promjene ITM-a prikazan udaljenošću zelene/crvene linije od plave.

4. RASPRAVA

4.1. *N*-GLIKOZILACIJA I RAZVOJ INZULINSKE REZISTENCIJE I ŠEĆERNE BOLESTI TIP 2

Rezultati istraživanja provedenog u sklopu ovog doktorskog rada pokazuju značajne razlike u *N*-glikanima proteina plazme između pojedinaca koji će biti dijagnosticirani s inzulinskom rezistencijom ili šećernom bolesti tipa 2 i onih koji će ostati zdravi. Ova razlika omogućava uspješnu identifikaciju pojedinaca s predispozicijom razvoja poremećaja u metabolizmu glukoze znatno prije kliničke dijagnoze. Primijećeno je da pojedinci koji su okarakterizirani kao zdravi, a kasnije će tijekom longitudinalnog praćenja biti dijagnosticirani s poremećajem u metabolizmu glukoze, imaju značajno veći udio kompleksnih i visokorazgranatih glikanskih struktura u *N*-glikomu nego ispitanici iz kontrolne skupine. Veća razgranatost i kompleksnost glikana prezentirana je povećanjem udjela stupnja grananja, galaktozilacije i sijalinizacije glikanskih struktura (HB, G3, S3), te paralelnim značajnim smanjenjem niskorazgranatih i monosijaliniziranih struktura (LB, S1).

Porast u kompleksnosti i razgranatosti struktura glikoma proteina plazme jedno je od glavnih obilježja mnogih patofizioloških stanja povezanih s upalom (134), ali i starenja (39). Osim toga, porast kompleksnosti glikoma je primijećen i kod pojedinaca sa šećernom bolesti tipa 2 (12–14). Spekulira se da bi porast razgranatosti glikoma proteina plazme mogao odražavati poremećaj metabolizma glukoze u vidu hiperglikemije. Naime, povećana razina glukoze rezultira izmijenjenim tokom kroz heksozaminskih put, u kojem se proizvodi supstrat za *N*-glikozilaciju (13, 45).

Dvije glikanske skupine koje su najznačajnije promijenjene u ispitanika koji će biti dijagnosticirani s IR ili šećernom bolesti tipa 2 su GP32 (p vrijednost = $9,52 \times 10^{-06}$) i GP34 (p vrijednosti = $9,38 \times 10^{-04}$). U obje glikanske skupine nalaze se visokorazgranate kompleksne glikanske strukture. GP32 sadržava trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar (A3G3S3), dok GP34 sadržava većinski sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran triantenar (FA3G3S3) te manje zastupljen tetragalaktoziliran i trisijaliniziran tetraantenar (A4G4S3). Glikan A3G3S3 u plazmi primarno dolazi s α -1 kiseloga glikoproteina (AGP), dok glikan A4G4S3 u potpunosti potječe s ovog proteina akutne upalne faze (9), čije su povećane razine značajno povezane sa šećernom bolesti u mnogim istraživanjima (135–137). Štoviše, glikanska skupina GP32 je prepoznata kao značajno povezana sa šećernom bolesti tipa 2 u nedavno objavljenom istraživanju procjene rizika od kardiometaboličkih poremećaja (14). Uzevši u

obzir otkrivene značajne povezanosti AGP-a i za njega karakterističnih glikanskih struktura sa šećernom bolesti, ne čudi da je nedavno objavljen rad o razvoju visokoprotodne metode za analizu *N*-glikozilacije AGP-a koja je testirana na populaciji pojedinaca s povećanim rizikom za razvoj šećerne bolesti tipa 2 (55).

Praćenjem ponašanja glikozilacije proteina plazme kroz vrijeme, primijećeno je da promjene u udjelu značajnih glikanskih struktura počinju i do deset godina prije kliničke prezentacije i dijagnoze inzulinske rezistencije ili šećerne bolesti tipa 2. Ove promjene *N*-glikana proteina plazme karakteristične za upalno stanje postaju sve izraženije s približavanjem dijagnozi što je u skladu s ranije objavljenim istraživanjem koje je pokazalo da se pomoću *N*-glikana proteina plazme može predvidjeti razvoj šećerne bolesti tipa 2 šest do osam godina prije pojave bolesti (14). No, bitno je naglasiti kako rezultati zapaženi u ovom istraživanju dodatno naglašavaju potencijal glikana kao biljega predikcije i rane identifikacije pojedinaca s visokim rizikom razvoja šećerne bolesti tipa 2 i inzulinske rezistencije, te posljedično i rizikom razvoja metaboličkoga sindroma, budući da su u ovom istraživanju većinom uključeni ispitanici koji su dijagnosticirani s IR kao prvom pojavom poremećaja u metabolizmu glukoze. S obzirom da IR vrlo često prethodi razvoju šećerne bolesti tipa 2 čak i do 10 godina (138, 139), te je jedna od glavnih komponenti metaboličkoga sindroma (3), analiza promjena glikana u ispitanika kojima je IR dijagnosticirana kao prvi znak poremećaja metabolizma glukoze pokazuje prediktivni potencijal glikana još ranije u životu visokorizičnog pojedinca. Vrlo rana identifikacija visokorizičnih pojedinaca može dovesti do prevencije ili odgode razvoja inzulinske rezistencije te posljedične šećerne bolesti tipa 2 i metaboličkoga sindroma, što bi značajno popravilo kvalitetu života tih osoba, ali i smanjilo troškove u zdravstvu.

Kako bi se odredila vrijednost diskriminacije *N*-glikana proteina plazme u identifikaciji osoba s visokim rizikom za razvoj IR ili šećerne bolesti tipa 2, izrađen je "gliko" model koji se temelji na glikanskim strukturama koje su najznačajnije i najinformativnije za identifikaciju ispitanika koji će biti dijagnosticirani s poremećajem metabolizma glukoze. Model temeljen isključivo na spomenutim glikanskim strukturama pokazao je značajno bolju sposobnost diskriminacije od modela temeljenog isključivo na ITM-u (AUC "gliko" modela = 0,77, dok je AUC "ITM" modela 0,69) te skoro identičnu diskriminativnu moć kao i model temeljen na glikanima i ITM-u zajedno (AUC = 0,78). Ove vrijednosti pokazuju značajnu dodanu vrijednost i informaciju koju glikani sadržavaju kao i činjenicu da je gotovo sva informacija koju ITM doprinosi sposobnosti diskriminacije modela obuhvaćena glikanima. Predstavljen "gliko" model pokazao

je sličan prediktivni potencijal kao i drugi modeli za predikciju šećerne bolesti tipa 2 koji se temelje na uobičajenim biljezima šećerne bolesti (140). Klinička vrijednost "gliko" modela bi se mogla dodatno unaprijediti dodavanjem drugih poznatih rizičnih faktora te biljega za šećernu bolest, ali nažalost takvi podaci nisu bili dostupni za ispitanike u ovom istraživanju.

Ispitivanje longitudinalnih promjena *N*-glikana u ispitanika koji će biti dijagnosticirani s IR ili šećernom bolesti tipa 2, te izrada prediktivnog modela temeljenog na promijenjenim glikanskim strukturama u sklopu ovog istraživanja dodatno naglašava ulogu *N*-glikoma proteina plazme u ranoj identifikaciji i predikciji poremećaja u metabolizmu glukoze. Pokazano je kako se *N*-glikom proteina plazme ne mijenja samo godinama prije razvoja šećerne bolesti tipa 2, nego i prethodi dijagnozi IR što pokazuje da se oštećenje glikoma počinje manifestirati i ranije nego što su prethodna istraživanja pokazala. Uzimajući u obzir njihovu vrlo ranu manifestaciju, promjene glikoma proteina plazme su zasigurno povezane s razvojem šećerne bolesti tipa 2, za čiju pojavu simptoma često mora proći dugi niz godina (117, 118), ali i s povezanim kardiometaboličkim poremećajima poput metaboličkoga sindroma. Još uvijek nije poznato jesu li ove promjene u glikomu uzrok ili posljedica, međutim, sada je sigurno da glikani proteina plazme imaju važnu ulogu u razvoju šećerne bolesti i povezanih kardiometaboličkih poremećaja. Rana identifikacija promjena glikana u pojedinca mogla bi upozoriti na mogući razvoj bolesti te omogućiti kliničaru i pacijentu da poduzmu odgovarajuće mjere kako bi spriječili ili odgodili razvoj i pojavu bolesti.

4.2. N-GLIKOZILACIJA I PROMJENA INDEKSA TJELESNE MASE

4.2.1. Praćenje *N*-glikana proteina plazme i IgG-a nakon restriktivne dijete te restriktivne operacije želuca

O utjecaju restriktivne dijete i barijatrijske operacije na *N*-glikom proteina plazme i IgG-a ne zna se mnogo. U ovom istraživanju analizirane su promjene *N*-glikoma uslijed smanjenja ITM-a do kojeg je došlo zbog dijete i operativnog zahvata na ispitanicima uključenim u Oxford studiju.

Nisko kalorijska restriktivna dijeta je rezultirala mnogim značajnim promjenama u *N*-glikomu proteina plazme koje se mogu sumirati kao porast niskorazgranatih, mono- i biantenarnih struktura (LB, G0, G1, G2, S0, S1) te sržno fukoziliranih struktura (CF) koje glavnom potječu s IgG-a, popraćen paralelnim sniženjem razine visokorazgranatih, triantenarnih, kompleksnijih (HB, G3) struktura. Ove glikanske promjene su direktno suprotne onima koje su zapažene u stanjima slabije glikemijske kontrole (13, 14), ali i raznim upalnim bolestima i stanjima, poput kronične opstruktivne plućne bolesti, upalne bolesti crijeva i multiple skleroze (58, 134, 141, 142), što sugestira da smanjenje ITM-a dovodi do postepene atenuacije upale, patofiziološkog stanja organizma koje se sve češće spominje kao poveznica između pretilosti i metaboličkoga sindroma (91, 92, 94). Pretilost se povezuje s kroničnim upalnim stanjem koje je izraženije kad je popraćeno hiperglikemijom i povećanom razinom slobodnih masnih kiselina (143–145). Prekomjerna prehrana ima glavnu ulogu u gubitku glikemijske kontrole i posljedičnom razvoju šećerne bolesti tipa 2 kroz heksozaminski biosintetski put koji je osjetljiv na hranjive tvari te je visoko responsivan na razine glukoze (146). Povećan protok kroz heksozaminski put, koji je rezultat hiperglikemije i prekomjerne prehrane, dovodi do proizvodnje visokorazgranatih *N*-glikana (147). Povećana razina sržno fukoziliranih glikanskih struktura, za koje se zna da pretežito potječu s IgG-a (9), povezuje se s kontrolom pretjerane aktivnosti ADCC-a, snažnog upalnog odgovora imunskog sustava posredovanog interakcijom IgG-a sa svojim receptorom (37). Ovi rezultati pokazuju kako čak i kraći period restriktivne dijete umanjuje upalno stanje organizma u pretilog pojedinca čime pozitivno utječe na opći metabolički status, što je vidljivo značajnim smanjenjem kompleksnosti i razgranatosti *N*-glikoma proteina plazme. Još jedna zapažena značajna promjena u *N*-glikomu proteina plazme nakon nisko kalorijske dijete jest povećanje struktura s račvajućim *N*-acetilglukozaminom. Naime, prisutnost račvajućeg *N*-acetilglukozamina na glikanskoj strukturi ometa rad ostalih *N*-acetilglukozamintransferaza koje sudjeluju u kreiranju tri- i tetraantenarnih struktura, što za posljedicu ima smanjenu

biosintezu visokorazgranatih *N*-glikana (148), čija je smanjena zastupljenost nakon restriktivne dijete zapažena u ovom istraživanju.

S druge strane, restriktivna dijeta nije pokazala tako snažan utjecaj na IgG *N*-glikom što može biti posljedica relativno kratkog trajanja dijete (tri tjedna) koje odgovara poluvremenu života IgG-a. Naime, zapažena je samo jedna značajna promjena deriviranih svojstava *N*-glikoma IgG-a, smanjenje zastupljenosti struktura s račvajućim *N*-acetilglukozaminom (B). Visoka razina prisutnosti glikanskih struktura s račvajućim *N*-acetilglukozaminom povezuje se s povećanim afinitetom IgG-a za Fc γ R receptore što vodi do pojačane aktivnosti ADCC-a i ostalih efektorskih funkcija imunskih stanica (40, 73). Stoga, smanjenje razine glikana s račvajućim *N*-acetilglukozaminom na IgG-u smanjuje, odnosno drži pod kontrolom njegovu upalnu aktivnost. Čak štoviše, nekolicina je istraživanja objavila da razine ovih glikana rastu sa starenjem, neovisno o spolu (123, 149), što vodi do zaključka da ovo smanjenje razine glikana s račvajućim *N*-acetilglukozaminom uslijed mršavljenja pogoduje smanjenju biološke dobi, odnosno "pomlađivanju organizma". Osim sa starenjem, povećane razine spomenutih glikanskih struktura IgG-a zapažene su kod osoba koje boluju od šećerne bolesti tipa 2 (150) i kod osoba s povećanim rizikom za kardiovaskularne incidente (151). Zaključno, promjene zapažene na glikomu proteina plazme i IgG-a nakon dijete impliciraju da se upalno stanje organizma znatno popravlja čak i nakon ovakvog kratkog perioda značajne kalorijske restrikcije, te da su jasna refleksija vrlo brzo primjetnog poboljšanja metaboličkoga stanja organizma.

Nakon restriktivne dijete, ispitanici su bili podvrgnuti barijatrijskoj operaciji želuca nakon čega su praćeni od strane liječnika kroz otprilike narednih 12 mjeseci, tijekom kojeg perioda im je krv uzorkovana još dva puta, nakon postignutog 20 %-tnog smanjenja tjelesne mase (oko šest mjeseci nakon operativnog zahvata) te nakon 12 mjeseci od operacije. Tijekom postoperativnog perioda praćenja ispitanice su longitudinalne promjene glikoma proteina plazme i IgG glikoma operiranih ispitanika, kojima se smanjivala razina ITM-a, odnosno koji su mršavili. Značajne longitudinalne promjene zapažene su na deriviranim svojstvima glikoma proteina plazme i IgG glikoma. Na glikomu proteina plazme značajne promjene zabilježene su jedino na agalaktoziliranim glikanskim strukturama (G0), čija je zastupljenost smanjena uslijed postoperativnog smanjenja ITM-a. Iako su agalaktozilirani glikani jedna od glikanskih specija koje se ubrajaju u niskorazgranate glikanske strukture glikoma proteina plazme, oni primarno potječu s IgG glikoma (9) gdje se povezuju sa starenjem. Naime, razine glikana IgG-a koji na

sebi imaju galaktozne ostatke smanjuju se s porastom kronološke dobi, te je kod starijih pojedinaca karakteristično za vidjeti povećanu razinu agalaktoziliranih (G0) glikana u kombinaciji sa smanjenjem digalaktoziliranih (G2) glikana, dok je kod mlađe populacije primijećen suprotan trend (40, 80). Značajno smanjenje agalaktoziliranih (G0) glikana popraćeno sa statistički neznačajno povećanom razinom digalaktoziliranih glikana proteina plazme, upućuje na smanjenje upalnog stanja organizma koje se povezuje s pretilošću, ali i sa smanjenjem biološke dobi tumačenom kroz glikanske promjene.

Promjene zapažene na IgG glikomu tijekom longitudinalnog postoperativnog perioda praćenja su primjetnije nego na glikomu proteina plazme. Očekivano, zapažen je značajni pad agalaktoziliranih (G0) glikanskih struktura popraćen značajnim porastom digalaktoziliranih (G2) glikanskih struktura. Povećana zastupljenost agalaktoziliranih glikanskih struktura povezuje se sa starenjem, zatim s tipičnim upalnim obrascem glikoprofila IgG-a te raznim upalnim bolestima (40), tako da se primijećen pad razina agalaktoziliranih glikanskih struktura IgG-a u ispitanika povezuje sa smanjenjem upalne aktivnosti organizma. S druge strane, zapažen porast digalaktoziliranih glikanskih struktura nakon smanjenja ITM-a uslijed barijatrijske operacije, također je pokazatelj smanjenja upalne aktivnosti cirkulirajućeg IgG-a. Kao što je spomenuto, povećana razina galaktozilacije IgG-a, pogotovo u vidu povećanih razina digalaktoziliranih glikanskih specija, povezuju se s mlađom kronološkom dobi te opisuje zdravlje/odsutnost bolesti ljudskog organizma, odnosno biološku dob osobe (40, 152). Zapaženi rezultati ukazuju na činjenicu da mršavljenje uslijed restriktivne dijeta i barijatrijske operacije može inicirati smanjenje biološke dobi, odnosno pomlađivanje zdravstvenoga i metaboličkoga stanja organizma.

Osim utjecaja na galaktozilaciju, mršavljenje uslijed barijatrijske operacije značajno je povisilo i razinu monosijaliniziranih (S1) glikanskih struktura IgG-a. Sijalinska kiselina jedna je od glavnih modulatora protuupalne aktivnosti IgG-a modificiranjem njegove interakcije s receptorima (71). Osim modulacije protuupalne aktivnosti IgG-a, razina sijalinizacije IgG-a je implicirana i u patogenezi pretilošću-inducirane IR i hipertenzije (46,153). Istraživanja su pokazala da hiposijalinizirani IgG djeluje kao ligand inhibirajućeg IgG receptora FcγRIIB, eksprimiranog na mikrovaskularnom endotelu, što dovodi do indukcije pretilošću-izazvane IR i hipertenzije. No, s druge strane, otkriveno je kako sijalinizirani IgG održava osjetljivost na inzulin i normalni vazomotorni tonus, čak i kod pretilih miševa. Ista znanstvena grupa je napravila još jedno vrlo bitno otkriće – suplementacija s prekursorom sijalinske kiseline

restaurira IgG sijalinizaciju, što bi se moglo pokazati kao potencijalni pristup popravku ljudskog kardiometaboličkoga zdravlja uz jedinstvenu intervenciju (46, 154). Rezultati zapaženi u ovom istraživanju pokazuju kako bi sličan, pozitivan učinak na kardiometaboličko zdravlje ljudi mogao biti postignut i mršavljenjem.

Longitudinalno praćeno mršavljenje nakon operacije je pokazalo utjecaj i na još jedno derivirano svojstvo IgG glikoma - sržno fukozilaciju (CF). Sržno fukozilirani glikani pokazali su značajno smanjenje u zastupljenosti. Iako ostale promjene u deriviranim svojstvima IgG-a upućuju na snažne protuupalne promjene IgG glikoprofila, smanjenje razina sržno fukoziliranih struktura IgG-a povezuje se s učestalijim vezanjem IgG-a s FcγRIIIA receptorom što dovodi do posljedične ADCC (155).

4.2.2. Ovisnost N-glikozilacije proteina plazme o promjeni indeksa tjelesne mase u TwinsUK populaciji

Utjecaj promjene ITM-a na N-glikozilaciju ispitan je i na TwinsUK populaciji ispitanika praćenih u više vremenskih točaka tijekom kojih je došlo do promjene ITM-a.

Promjene N-glikana proteina plazme uslijed mijenjanja ITM-a izraženog kao njegovo smanjenje mogu se opisati kao značajno povećanje niskorazgranatih, jednostavnih, biantenarnih, digalaktoziliranih i monosijaliniziranih struktura (LB, G2, S1), popraćeno sa značajnim smanjenjem u razinama visokorazgranatih, kompleksnih glikanskih struktura (HB, G3, S3) te oligomanozih struktura (HM). Osim povećanja jednostavnijih glikanskih struktura, značajno je povećana i antenarna fukozilacija (AF), derivirano glikansko svojstvo koje se najčešće mijenja zajedno s visokom razgranatošću i ostalim deriviranim svojstvima koja opisuju kompleksne glikanske strukture, budući da su sve zajedno jedna od glavnih obilježja glikoprofila akutno-upalnih proteina. No, efekt porasta antenarno fukoziliranih struktura nije jednake amplitude kao onaj koji opisuje porast niske razgranatosti, digalaktozilacije pa čak i monosijalinizacije, implicirajući kako je utjecaj mršavljenja na smanjenje općeg upalnog stanja organizma koje se povezuje s viškom kilograma znatno izraženiji, nego utjecaj na pojačanje upalnog stanja koje se najčešće povezuje s povećanom antenarnom fukozilacijom glikana proteina plazme. Osim toga, efekt porasta antenarne fukozilacije je znatno manji i od efekta smanjenja deriviranih svojstava koja opisuju kompleksne i visokorazgranate glikane (HB, G3, S3), što također implicira na značajno smanjenje kronične upale povezane s pretiulošću. Činjenica da su značajne promjene glikana proteina plazme, koje upućuju na popravak zdravstvenog stanja pojedinca u vidu smanjenja upale, primjetne i prilikom promjene ITM-a

ispitanika koji nisu klasificirani kao pretili, već kao osobe s povećanom tjelesnom težinom (prosječna razina ITM-a u početnoj točki = $25,45 \pm 4,53$), te su istovjetne onima primijećenim kod pretilih pojedinaca nakon nisko kalorijske dijeta te barijatrijske operacije, govori o velikom benefitu smanjenja ITM-a čak i kad ono nije toliko drastično kao kod pretilih operiranih ispitanika. Značajno smanjenje razina oligomanoznih glikanskih struktura primijećeno u istraživanju na glikomu proteina plazme TwinsUK ispitanika ide u prilog ostalim zapaženim promjenama koje upućuju na smanjenje upalnog stanja organizma. Naime, oligomanozni glikani, te oni koji završavaju s *N*-acetilglukozaminskim ostatkom, su vezujući ligandi za MBL (77, 156). MBL pripada skupini proteina zvani kolektini te se veže za fukoze, manoze i *N*-acetilglukozaminske šećerne ostatke pri čemu dolazi do aktivacije komplementa, iznimno bitne sastavnice urođenog imuniteta (157), lektinskim putem (77, 158). Povećane razine oligomanoznih glikanskih struktura, koje se povezuju s upalnim odgovorom putem aktivacije komplementa, opažene su u raznim istraživanjima bolesti s upalnom komponentom, poput multiple skleroze i reumatoidnog artritisa (58).

Osim na glikomu proteina plazme, značajne promjene uslijed longitudinalno praćenog mijenjanja ITM-a primijećene su i na IgG glikomu koji je ekstrapoliran iz prvih 11 glikanskih skupina glikoma proteina plazme. Naime, zapažene su istovremene suprotne promjene u agalaktozilaciji i digalaktozilaciji. Agalaktozilirani glikani (G0) su značajno smanjeni, dok su digalaktozilirani glikani (G2) značajno povećani uz promjenu ITM-a izraženu kao njegovo smanjenje. Ovakve promjene primijećene su i kod pretilih pojedinaca iz Oxford populacije uslijed postoperativnog mršavljenja, te se osim s poboljšanjem kardiometaboličkoga statusa organizma kroz atenuaciju upalnog stanja, povezuju i sa smanjenjem biološke dobi. Nadalje, kao i kod glikoma proteina plazme, značajno smanjenje oligomanoznih struktura zapaženo je i u IgG glikomu što također upućuje na suzbijanje upalnog stanja organizma kao posljedica promjene ITM-a.

4.3. N-GLIKOZILACIJA I METABOLIČKI SINDROM

Rezultati istraživanja utjecaja mijenjanja ITM-a na glikane dviju populacija, Oxford i TwinsUK, pokazali su da mršavljenje ima jak utjecaj na upalno stanje organizma i biološku dob kroz izmjenu glikanskih obrazaca. Promjene zapažene u glikomu proteina plazme i IgG-a upućuju na smanjenje upalne aktivnosti cirkulirajućeg IgG-a i proteina akutne faze kao i na smanjenje biološke dobi organizma. Potencijal glikana kao biljega kardiometaboličkoga zdravlja organizma te biološke dobi je izniman s obzirom da su pozitivne promjene u glikanskom profilu uočljive ne samo kod pretilih pojedinaca koji su bili podvrgnuti restriktivnoj dijeti te operaciji želuca, već i kod pojedinaca iz TwinsUK studije čiji je prosječni ITM u početnoj točki perioda praćenja bio znatno niži. Činjenica je kako su glikani vrlo responsivni na oporavak metaboličkoga zdravlja organizma uslijed regulacije tjelesne težine i ITM-a s obzirom na opažene promjene koje ukazuju na atenuaciju upalnog stanja u organizmu, te su stoga vrijedni uključivanja u daljnje studije kao potencijalni novi biljezi kardiometaboličkoga zdravlja organizma i biološke dobi. *N*-glikom zajedno s ostalim parametrima koji opisuju kardiometaboličko stanje organizma, poput ITM-a, krvnog tlaka, glukoze u krvi itd., u stanju je vrlo uspješno procijeniti cjelokupni boljitak kardiometaboličkoga zdravlja u pojedinaca koji su promijenili tjelesnu težinu kroz različite modifikacije životnog stila, a pogotovo onih koji su bili podvrgnuti restriktivnoj dijeti i barijatrijskoj operaciji.

N-glikom proteina plazme u TwinsUK populaciji ispitanika koji su tijekom perioda praćenja bili dijagnosticirani s IR ili šećernom bolesti tipa 2 pokazao je značajan potencijal kao biljeg predikcije i rane identifikacije ispitanika s visokim rizikom razvoja spomenutih poremećaja. Ne samo da su značajno promijenjeni glikani izdvojili visokorizične pojedince sa zadovoljavajućom uspješnošću (AUC = 0,77) već su promjene na glikanima tipične za šećernu bolest tipa 2 bile primjetne kod tih ispitanika godinama prije službene dijagnoze IR ili šećerne bolesti tipa 2. Kombiniranje postojećih biljega poremećaja metabolizma glukoze (glikirani hemoglobin, oGTT test, itd.) s glikanima proteina plazme uvelike bi doprinijelo uspješnijoj prediktivnosti modela za ranu identifikaciju visokorizičnih osoba.

Metabolički sindrom je vrlo kompleksno zdravstveno stanje koje obuhvaća razne metaboličke poremećaje, poput visceralne pretilosti, inzulinske rezistencije, upale i arterijske hipertenzije. Metabolički sindrom značajno doprinosi razvoju šećerne bolesti tipa 2 i kardiometaboličkih incidenata te nažalost može rezultirati i preuranjenim smrtnim ishodom. No, primjenom glikanskih parametara kao biljega ranog izdvajanja pojedinaca visokorizičnih za razvoj

poremećaja metabolizma glukoze i upalnog stanja organizma te kao biljega praćenja boljitka metaboličkoga zdravlja osobe i atenuacije upalnog stanja mršavljenjem i generalnim unapređenjem životnog stila, moguće je na vrijeme prevenirati i odgoditi razvoj ozbiljnih komorbiditeta koji se povezuju s metaboličkim sindromom, te čak i spriječiti pojavu samog sindroma, ali i pratiti učinkovitost terapijskog pristupa.

5. ZAKLJUČCI

N-glikom proteina plazme u pojedinaca koji će biti dijagnosticirani sa šećernom bolesti tipa 2 i inzulinskom rezistencijom statistički se značajno razlikuje od zdravih kontrola.

1. Jednostavnije, manje razgranate glikanske strukture imaju statistički značajno sniženu zastupljenost u dijagnosticiranih pojedinaca pri usporedbi s kontrolama.
2. Kompleksne i razgranatije glikanske strukture značajno su više zastupljene u dijagnosticiranih pojedinaca pri usporedbi s kontrolama što je karakteristika upalnog glikoprofila primijećenog u mnogim bolestima.
3. Značajne promjene u *N*-glikomu proteina plazme dobivene usporedbom dijagnosticiranih pojedinaca s kontrolama, primijećene su i u izravno mjerenim glikanima te u deriviranim glikanskim svojstvima.
4. Značajne promjene u *N*-glikomu proteina plazme dobivene usporedbom dijagnosticiranih pojedinaca s kontrolama, primijećene su i u izravno mjerenim glikanima te u deriviranim glikanskim svojstvima u slučaju odvojene usporedbe kontrolne skupine s ili pojedincima sa šećernom bolešću tipa 2 ili pojedincima s inzulinskom rezistencijom.
5. Najznačajnije promijenjene glikanske strukture (GP32 i GP34) potječu većinski s AGP-a, proteina plazme akutne faze. Analiza promjena *N*-glikoma AGP-a ovih ispitanika potencijalno bi mogla pokazati još veću značajnost.

N-glikom proteina plazme u pojedinaca koji će biti dijagnosticirani sa šećernom bolesti tipa 2 i inzulinskom rezistencijom počinje se pogoršavati te pokazivati upalne karakteristike godinama prije službene dijagnoze.

1. Usporedba značajno promijenjenih *N*-glikana proteina plazme u dijagnosticiranih pojedinaca s kontrolama iste dobi primijećeno je kako se spomenuti glikani razlikuju između skupina čak i do 10 godina prije službene dijagnoze.
2. Značajno promijenjeni *N*-glikani proteina plazme dijagnosticiranih pojedinaca pogoršavaju se i sve više razlikuju od glikana kontrolne skupine iste dobi kako se trenutak dijagnoze približava.

Koristeći model koji se temelji na značajno promijenjenim neovisnim *N*-glikanima proteina plazme moguće je sa zadovoljavajućom učinkovitošću izdvojiti pojedince koji će u budućnosti biti dijagnosticirani sa šećernom bolesti tipa 2.

1. Model koji se temelji samo na glikanima ima gotovo podjednaku učinkovitost kao i model koji, osim glikana, uključuje i informaciju o ITM-u ispitanika (AUC = 0,77 i AUC = 0,78), dok model koji se temelji samo na ITM-u ima lošiju učinkovitost (AUC = 0,69) što znači da je sva informacija o ranoj identifikaciji visokorizičnih pojedinaca koja se dobiva iz ITM-a obuhvaćena glikanima, te da glikani nose dodatnu, vrijednu informaciju.
2. Model koji se temelji na glikanima, kao i onaj koji uz glikane uključuje i ITM podatke, ima učinkovitost usporedivu s drugim predstavljenim modelima za ranu identifikaciju visokorizičnih pojedinaca.
3. S obzirom na vrlo rani početak promjena u *N*-glikoprofilu visokorizičnog pojedinca (do 10 godina prije dijagnoze), model koji se temelji na glikanima mogao bi vrlo rano u razvoju bolesti uspješno identificirati spomenute pojedince.

Nisko kalorijska, restriktivna, ali kratkotrajna dijeta rezultira značajnim promjenama u *N*-glikomu proteina plazme i imunoglobulina G u pretilih pojedinaca.

1. Usporedba *N*-glikoma proteina plazme pretilih pojedinaca nakon i prije dijete rezultirala je značajnim promjenama u vidu smanjenja zastupljenosti kompleksnijih, visoko razgranatih struktura, a povećanja jednostavnijih, manje razgranatih struktura sa sržnom fukozom. Ovakve promjene predstavljaju atenuaciju upalnog stanja organizma povezanog s pretilošću kao rezultat smanjenja tjelesne težine uslijed dijete.
2. Usporedba *N*-glikoma imunoglobulina G pretilih pojedinaca nakon i prije dijete rezultirala je značajnim promjenama u vidu smanjenja zastupljenosti glikana koji sadrže račvajući *N*-acetilglukozamin. Ovakva promjena također je karakteristična za atenuaciju upalne aktivnosti imunoglobulina G, budući da se glikanske strukture koje sadrže račvajući *N*-acetilglukozamin povezuju s povećanim afinitetom imunoglobulina G za njegove aktivirajuće receptore što rezultira pojačanim ADCC-om.

Barijatrijska operacija želuca rezultira značajnim promjenama u *N*-glikomu proteina plazme i imunoglobulina G u pretilih pojedinaca.

1. Usporedba *N*-glikoma proteina plazme pretilih pojedinaca nakon i na dan operacije rezultirala je značajnim promjenama u vidu smanjenja zastupljenosti agalaktoziliranih (G0) glikanskih struktura. Agalaktozilirani glikani većinom potječu s imunoglobulina G te se povezuju sa starenjem i upalnim promjenama u organizmu. Smanjenje ovih glikanskih struktura predstavlja smanjenje upalne aktivnosti u organizmu uslijed smanjenja tjelesne težine i popravljnja metaboličkoga statusa organizma.
2. Usporedba *N*-glikoma imunoglobulina G pretilih pojedinaca nakon i na dan operacije rezultirala je značajnim promjenama u vidu smanjenja zastupljenosti agalaktoziliranih (G0) i sržno fukoziliranih (CF) struktura, te povećanja zastupljenosti digalaktoziliranih (G2) i monosijaliniziranih (S1) struktura. Dok se agalaktozilirani glikani (G0) povezuju sa starenjem i upalnim procesima, digalaktozilirane (G2) glikanske strukture povezuju se s pomlađivanjem i zdravljem organizma budući da su zastupljenije u mladim zdravim pojedinaca nego u starih i bolesnih. Povećanje monosijaliniziranih (S1) glikana se povezuje s protuupalnom aktivnošću imunoglobulina G budući da prisutnost sijalinske kiseline na imunoglobulinu G mijenja njegovu aktivnost iz upalne u protuupalnu modificirajući njegovu interakciju s receptorima.

Promjena ITM-a u pojedinaca povećane tjelesne težine rezultira značajnim promjenama u *N*-glikomu proteina plazme i imunoglobulina G.

1. Usporedba *N*-glikoma proteina plazme pojedinaca koji su tijekom perioda praćenja promijenili tjelesnu težinu u vidu smanjenja ITM-a rezultirala je značajnim smanjenjem zastupljenosti kompleksnih i visoko razgranatih glikanskih struktura, te povećanjem jednostavnijih, manje razgranatih struktura, što su promjene karakteristične za smanjenje upalnog stanja.
2. Usporedba *N*-glikoma imunoglobulina G, ekstrapoliranog iz plazmatskog glikoprofila, pojedinaca koji su tijekom perioda praćenja promijenili tjelesnu težinu u vidu smanjenja ITM-a rezultirala je značajnim smanjenjem zastupljenosti agalaktoziliranih glikana te povećanjem zastupljenosti digalaktoziliranih glikana, što je karakteristično za glikoprofil mlađih

pojedinaца. Ove promjene su identične onima primijećenim kod pretilih pojedinaца nakon barijatrijske operacije želuca.

Promjene u glikoprofilu imunoglobulina G primijećene nakon promjene tjelesne težine kod pretilih pojedinaца i pojedinaца s povećanom tjelesnom težinom upućuju na smanjenje biološke dobi organizma.

1. Promjene sumirane kao smanjenje agalaktoziliranih struktura te povećanje digalaktoziliranih struktura glikoma imunoglobulina G, primijećene su i kod pretilih pojedinaца Oxford populacije podvrgnutih barijatrijskoj operaciji, ali i kod pojedinaца TwinsUK populacije kojima se ITM mijenjao tijekom perioda praćenja.
2. Ove promjene upućuju na "pomlađivanje" biološke dobi što se povezuje s poboljšanjem zdravlja cjelokupnog organizma.

Primjena glikanskih parametara kao biljega ranog izdvajanja pojedinaца visokorizičnih za razvoj poremećaja metabolizma glukoze, u vidu šećerne bolesti tipa 2 ili inzulinske rezistencije, i upalnog stanja organizma te kao biljega praćenja boljitka metaboličkoga zdravlja osobe i atenuacije upalnog stanja mršavljenjem i generalnim unapređenjem životnog stila, može na vrijeme prevenirati i odgoditi razvoj ozbiljnih komorbiditeta koji se povezuju s metaboličkim sindromom, te čak i spriječiti pojavu samog sindroma, ali i pratiti učinkovitost terapijskog pristupa.

6. POPIS LITERATURE

1. Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep* [Internet]. 2018 [citirano 30. ožujka 2021.];20(2). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5866840/>
2. Obesity and overweight [Internet]. [citirano 20. svibnja 2020.]. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
3. Mayans L. Metabolic Syndrome: Insulin Resistance and Prediabetes. *FP Essent*. 2015 Aug;435:11–6.
4. Shin J, Lee J, Lim S, Ha H, Kwon H, Park Y, et al. Metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes, and its clinical interpretations and usefulness. *J Diabetes Investig*. 2013 Jul 8;4(4):334–43.
5. The top 10 causes of death [Internet]. [citirano 30. ožujka 2021.]. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
6. Riddle MC, Herman WH. The Cost of Diabetes Care—An Elephant in the Room. *Diabetes Care*. 2018 May 1;41(5):929–32.
7. Five Most Expensive Diseases :: NABR.ORG [Internet]. [citirano 30. ožujka 2021.]. Dostupno na: <https://www.nabr.org/biomedical-research/importance-biomedical-research/five-most-expensive-diseases>
8. Ignacio de Artola J. Metabolic Syndrome: Early Identification and a Proactive Approach Are Warranted. *Am Fam Physician*. 2004 Apr 15;69(8):1868.
9. Clerc F, Reiding KR, Jansen BC, Kammeijer GSM, Bondt A, Wuhrer M. Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconj J*. 2016 Jun 1;33(3):309–43.
10. Knežević A, Gornik O, Polašek O, Pučić M, Redžić I, Novokmet M, et al. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology*. 2010 Aug;20(8):959–69.

11. Liu D, Li Q, Dong J, Li D, Xu X, Xing W, et al. The Association Between Normal BMI With Central Adiposity And Proinflammatory Potential Immunoglobulin G N-Glycosylation. *Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2019 Nov 14;12:2373–85.
12. Dotz V, Lemmers RFH, Reiding KR, Hipgrave Ederveen AL, Lieverse AG, Mulder MT, et al. Plasma protein N-glycan signatures of type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 2018 Dec 1;1862(12):2613–22.
13. Keser T, Gornik I, Vučković F, Selak N, Pavić T, Lukić E, et al. Increased plasma N-glycome complexity is associated with higher risk of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2017 Dec 1;60(12):2352–60.
14. Wittenbecher C, Štambuk T, Kuxhaus O, Rudman N, Vučković F, Štambuk J, et al. Plasma N-Glycans as Emerging Biomarkers of Cardiometabolic Risk: A Prospective Investigation in the EPIC-Potsdam Cohort Study. *Diabetes Care.* 2020 Jan 7;dc191507.
15. Abbasi A, Peelen LM, Corpeleijn E, van der Schouw YT, Stolk RP, Spijkerman AMW, et al. Prediction models for risk of developing type 2 diabetes: systematic literature search and independent external validation study. *BMJ.* 2012 Sep 18;345(sep18 2):e5900–e5900.
16. Razavian N, Blecker S, Schmidt AM, Smith-McLallen A, Nigam S, Sontag D. Population-Level Prediction of Type 2 Diabetes From Claims Data and Analysis of Risk Factors. *Big Data.* 2015 Dec;3(4):277–87.
17. Wu H, Yang S, Huang Z, He J, Wang X. Type 2 diabetes mellitus prediction model based on data mining. *Inform Med Unlocked.* 2018 Jan 1;10:100–7.
18. Zou Q, Qu K, Luo Y, Yin D, Ju Y, Tang H. Predicting Diabetes Mellitus With Machine Learning Techniques. *Front Genet [Internet].* 2018 [citirano 8. svibnja 2020.];9. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2018.00515/full>
19. Mendrick DL, Diehl AM, Topor LS, Dietert RR, Will Y, La Merrill MA, et al. Metabolic Syndrome and Associated Diseases: From the Bench to the Clinic. *Toxicol Sci.* 2018 Mar;162(1):36–42.

20. Worachartcheewan A, Shoombuatong W, Pidetcha P, Nopnithipat W, Prachayasittikul V, Nantasenamat C. Predicting Metabolic Syndrome Using the Random Forest Method. *Sci World J.* 2015 Jul 28;2015:e581501.
21. Choe EK, Rhee H, Lee S, Shin E, Oh S-W, Lee J-E, et al. Metabolic Syndrome Prediction Using Machine Learning Models with Genetic and Clinical Information from a Nonobese Healthy Population. *Genomics Inform* [Internet]. 2018 Dec [citirano 30. ožujka 2021.];16(4). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6440667/>
22. Eyvazlou M, Hosseinpouri M, Mokarami H, Gharibi V, Jahangiri M, Cousins R, et al. Prediction of metabolic syndrome based on sleep and work-related risk factors using an artificial neural network. *BMC Endocr Disord.* 2020 Nov 12;20(1):169.
23. Posttranslational Modification - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [citirano 30. ožujka 2021.]. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/posttranslational-modification>
24. Brenner's Encyclopedia of Genetics - 2nd Edition [Internet]. [citirano 30. ožujka 2021.]. Dostupno na: <https://www.elsevier.com/books/brenners-encyclopedia-of-genetics/maloy/978-0-12-374984-0>
25. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 3rd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015.
26. Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology.* 2002 Apr 1;12(4):43R-56R.
27. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database11Dedicated to Prof. Akira Kobata and Prof. Harry Schachter on the occasion of their 65th birthdays. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 1999 Dec 17;1473(1):4–8.
28. Lauc G, Zoldoš V. Protein glycosylation--an evolutionary crossroad between genes and environment. *Mol Biosyst.* 2010 Dec;6(12):2373–9.

29. Lauc G, Rudan I, Campbell H, Rudd PM. Complex genetic regulation of protein glycosylation. *Mol Biosyst.* 2010 Feb;6(2):329–35.
30. Schjoldager KT, Narimatsu Y, Joshi HJ, Clausen H. Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Dec;21(12):729–49.
31. Cooper GM, Hausman RE. *Stanica: Molekularni pristup. V. izdanje. Medicinska naklada Zagreb; 2010.*
32. Gornik O, Lauc G. Glycosylation of Serum Proteins in Inflammatory Diseases. *Dis Markers.* 2008;25(4–5):267–78.
33. Yan SF, Ramasamy R, Naka Y, Schmidt AM. Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ Res.* 2003 Dec 12;93(12):1159–69.
34. Yan SF, D'Agati V, Schmidt AM, Ramasamy R. Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): a formidable force in the pathogenesis of the cardiovascular complications of diabetes & aging. *Curr Mol Med.* 2007 Dec;7(8):699–710.
35. Varelas X, Bouchie MP, Kukuruzinska MA. Protein N-glycosylation in oral cancer: Dysregulated cellular networks among DPAGT1, E-cadherin adhesion and canonical Wnt signaling. *Glycobiology.* 2014 Jul;24(7):579–91.
36. Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol.* 2003 Mar;21(3):255–61.
37. Sakae Y, Satoh T, Yagi H, Yanaka S, Yamaguchi T, Isoda Y, et al. Conformational effects of N-glycan core fucosylation of immunoglobulin G Fc region on its interaction with Fcγ receptor IIIa. *Sci Rep.* 2017 Oct 23;7(1):13780.
38. Zhao Y-Y, Takahashi M, Gu J-G, Miyoshi E, Matsumoto A, Kitazume S, et al. Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. *Cancer Sci.* 2008;99(7):1304–10.
39. Dotz V, Wuhrer M. N-glycome signatures in human plasma: associations with physiology and major diseases. *FEBS Lett.* 2019 Nov;593(21):2966–76.

40. Gudelj I, Lauc G, Pezer M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell Immunol.* 2018 Nov;333:65–79.
41. Gornik O, Wagner J, Pucić M, Knezević A, Redzic I, Lauc G. Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology.* 2009 Dec;19(12):1547–53.
42. Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, Wilson IA, Dwek RA. Glycosylation and the immune system. *Science.* 2001 Mar 23;291(5512):2370–6.
43. Ryczko MC, Pawling J, Chen R, Abdel Rahman AM, Yau K, Copeland JK, et al. Metabolic Reprogramming by Hexosamine Biosynthetic and Golgi N-Glycan Branching Pathways. *Sci Rep.* 2016 Mar;6(1):23043.
44. Abdel Rahman AM, Ryczko M, Nakano M, Pawling J, Rodrigues T, Johswich A, et al. Golgi N-glycan branching N-acetylglucosaminyltransferases I, V and VI promote nutrient uptake and metabolism. *Glycobiology.* 2015 Feb;25(2):225–40.
45. Ohtsubo K, Chen MZ, Olefsky JM, Marth JD. Pathway to diabetes through attenuation of pancreatic beta cell glycosylation and glucose transport. *Nat Med.* 2011 Aug 14;17(9):1067–75.
46. Tanigaki K, Sacharidou A, Peng J, Chambliss KL, Yuhanna IS, Ghosh D, et al. Hyposialylated IgG activates endothelial IgG receptor FcγRIIB to promote obesity-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 2018 Jan 2;128(1):309–22.
47. Etxebarria J, Reichardt N-C. Methods for the absolute quantification of N-glycan biomarkers. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 2016 Aug;1860(8):1676–87.
48. All About Albumin [Internet]. Elsevier; 1995 [citirano 7. travnja 2021.]. Dostupno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780125521109X50004>
49. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2002 Nov;1(11):845–67.
50. Jeong S, Oh MJ, Kim U, Lee J, Kim J-H, An HJ. Glycosylation of serum haptoglobin as a marker of gastric cancer: an overview for clinicians. *Expert Rev Proteomics.* 2020 Feb 1;17(2):109–17.

51. Zhu J, Wu J, Yin H, Marrero J, Lubman DM. Mass Spectrometric N-Glycan Analysis of Haptoglobin from Patient Serum Samples Using a 96-Well Plate Format. *J Proteome Res.* 2015 Nov 6;14(11):4932–9.
52. Quaranta A, Sroka-Bartnicka A, Tengstrand E, Thorsén G. N-Glycan profile analysis of transferrin using a microfluidic compact disc and MALDI-MS. *Anal Bioanal Chem.* 2016;408:4765–76.
53. Gornik O, Gornik I, Gasparović V, Lauc G. Change in transferrin sialylation is a potential prognostic marker for severity of acute pancreatitis. *Clin Biochem.* 2008 May;41(7–8):504–10.
54. Yin H, An M, So P-K, Wong MY-M, Lubman DM, Yao Z. The analysis of alpha-1-antitrypsin glycosylation with direct LC-MS/MS. *Electrophoresis.* 2018 Sep;39(18):2351–61.
55. Keser T, Tijardović M, Gornik I, Lukić E, Lauc G, Gornik O, et al. High-throughput and site-specific N-glycosylation analysis of human alpha-1-acid glycoprotein offers a great potential for new biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2021 Jan 22;100044.
56. Rebello OD, Nicolardi S, Lageveen-Kammeijer GSM, Nouta J, Gardner RA, Mesker WE, et al. A Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization—Mass Spectrometry Assay for the Relative Quantitation of Antennary Fucosylated N-Glycans in Human Plasma. *Front Chem [Internet].* 2020 [citirano 7. travnja 2021.];8. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2020.00138/full>
57. Alfadda AA, Fatma S, Chishti MA, Al-Naami MY, Elawad R, Mendoza CDO, et al. Orosomucoid Serum Concentrations and Fat Depot-Specific mRNA and Protein Expression in Humans. *Mol Cells.* 2012 Jan 31;33(1):35–41.
58. Cvetko A, Kifer D, Gornik O, Klarić L, Visser E, Lauc G, et al. Glycosylation Alterations in Multiple Sclerosis Show Increased Proinflammatory Potential. *Biomedicines.* 2020 Oct;8(10):410.

59. West CA, Wang M, Herrera H, Liang H, Black A, Angel PM, et al. N-linked glycan branching and fucosylation are increased directly in HCC tissue as determined through in situ glycan imaging. *J Proteome Res.* 2018 Oct 5;17(10):3454–62.
60. Rudman N, Gornik O, Lauc G. Altered N-glycosylation profiles as potential biomarkers and drug targets in diabetes. *FEBS Lett.* 2019 Jul 8;593.
61. Chavan MM, Kawle PD, Mehta NG. Increased sialylation and defucosylation of plasma proteins are early events in the acute phase response. *Glycobiology.* 2005 Sep 1;15(9):838–48.
62. Sarrats A, Saldova R, Pla E, Fort E, Harvey DJ, Struwe WB, et al. Glycosylation of liver acute-phase proteins in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Proteomics Clin Appl.* 2010;4(4):432–48.
63. Juszczak A, Pavić T, Vučković F, Bennett AJ, Shah N, Medvidović EP, et al. Plasma Fucosylated Glycans and C-Reactive Protein as Biomarkers of HNF1A-MODY in Young Adult-Onset Nonautoimmune Diabetes. *Diabetes Care.* 2019 Jan 1;42(1):17–26.
64. Thanabalasingham G, Huffman JE, Kattla JJ, Novokmet M, Rudan I, Gloyn AL, et al. Mutations in HNF1A result in marked alterations of plasma glycan profile. *Diabetes.* 2013 Apr;62(4):1329–37.
65. Justiz Vaillant AA, Jamal Z, Ramphul K. Immunoglobulin. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [citirano 7. travnja 2021.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513460/>
66. Yagi H, Yanaka S, Kato K. Structure and Dynamics of Immunoglobulin G Glycoproteins. In: Yamaguchi Y, Kato K, editors. *Glycobiophysics* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2018 [citirano 7. travnja 2021.]. p. 219–35. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1104). Dostupno na: http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-2158-0_11
67. Leusen JHW, Nimmerjahn F. The Role of IgG in Immune Responses. In: Nimmerjahn F, editor. *Molecular and Cellular Mechanisms of Antibody Activity* [Internet]. New York,

- NY: Springer New York; 2013 [citirano 7. travnja 2021.]. p. 85–112. Dostupno na: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-7107-3_4
68. Bovenkamp FS van de, Hafkenscheid L, Rispens T, Rombouts Y. The Emerging Importance of IgG Fab Glycosylation in Immunity. *J Immunol*. 2016 Feb 15;196(4):1435–41.
69. Martin TC, Šimurina M, Ząbczyńska M, Kavur MM, Rydlewska M, Pezer M, et al. Decreased immunoglobulin G core fucosylation, a player in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, is associated with autoimmune thyroid diseases. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2020 Jan 1 [citirano 6. veljače 2020.]; Dostupno na: <https://www.mcponline.org/content/early/2020/02/05/mcp.RA119.001860>
70. Lauc G, Pezer M, Rudan I, Campbell H. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2016;1860(8):1574–82.
71. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*. 2006 Aug 4;313(5787):670–3.
72. Smith KGC, Clatworthy MR. FcγRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nat Rev Immunol*. 2010 May;10(5):328–43.
73. Chen Q, Tan Z, Guan F, Ren Y. The Essential Functions and Detection of Bisecting GlcNAc in Cell Biology. *Front Chem* [Internet]. 2020 [citirano 7. travnja 2021.];8. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2020.00511/full#h3>
74. Davies J, Jiang L, Pan L-Z, LaBarre MJ, Anderson D, Reff M. Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FCγRIII. *Biotechnol Bioeng*. 2001;74(4):288–94.
75. Schachter H. Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell*. 1986 Mar;64(3):163–81.
76. 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. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Jun 6 [citirano 7. travnja 2021.];8. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5459932/>
77. Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM, Fischer PB, Dwek RA, Sim RB. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat Med*. 1995;1(3):7.
 78. Nimmerjahn F, Anthony RM, Ravetch JV. Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for in vivo activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 15;104(20):8433–7.
 79. Cm K, Mk P, J F, R K, Pr T, M R, et al. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nat Med*. 2012 Sep 1;18(9):1401–6.
 80. Krištić J, Vučković F, Menni C, Klarić L, Keser T, Beceheli I, et al. Glycans Are a Novel Biomarker of Chronological and Biological Ages. *J Gerontol Ser A*. 2014 Jul;69(7):779–89.
 81. Mariño K, Bones J, Kattla JJ, Rudd PM. A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nat Chem Biol*. 2010 Oct;6(10):713–23.
 82. Unione L, Lenza MP, Ardá A, Urquiza P, Laín A, Falcón-Pérez JM, et al. Glycoprofile Analysis of an Intact Glycoprotein As Inferred by NMR Spectroscopy. *ACS Cent Sci*. 2019 Sep 25;5(9):1554–61.
 83. Quaranta A, Spasova M, Passarini E, Karlsson I, Ndreu L, Thorsén G, et al. N-Glycosylation profiling of intact target proteins by high-resolution mass spectrometry (MS) and glycan analysis using ion mobility-MS/MS. *Analyst*. 2020 Mar 2;145(5):1737–48.
 84. Cao L, Qu Y, Zhang Z, Wang Z, Prykova I, Wu S. Intact glycopeptide characterization using mass spectrometry. *Expert Rev Proteomics*. 2016 May;13(5):513–22.
 85. Huffman JE, Pučić-Baković M, Klarić L, Hennig R, Selman MHJ, Vučković F, et al. Comparative Performance of Four Methods for High-throughput Glycosylation Analysis

- of Immunoglobulin G in Genetic and Epidemiological Research. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2014 Jun;13(6):1598–610.
86. Keser T, Pavić T, Lauc G, Gornik O. Comparison of 2-Aminobenzamide, Procainamide and RapiFluor-MS as Derivatizing Agents for High-Throughput HILIC-UPLC-FLR-MS N-glycan Analysis. *Front Chem [Internet]*. 2018 Jul 26 [citirano 30. studenog 2020.];6. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6070730/>
87. Zhang X, Reed CE, Birdsall RE, Yu YQ, Chen W. High-Throughput Analysis of Fluorescently Labeled N-Glycans Derived from Biotherapeutics Using an Automated LC-MS-Based Solution. *SLAS Technol Transl Life Sci Innov*. 2020 Aug 1;25(4):380–7.
88. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med*. 2006;23(5):469–80.
89. Rochlani Y, Pothineni NV, Kovelamudi S, Mehta JL. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2017 Aug;11(8):215–25.
90. Fasshauer M, Blüher M. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2015 Jul 1;36(7):461–70.
91. Emanuela F, Grazia M, Marco DR, Maria Paola L, Giorgio F, Marco B. Inflammation as a Link between Obesity and Metabolic Syndrome. *J Nutr Metab*. 2012 Mar 1;2012:e476380.
92. Esposito K, Giugliano D. The metabolic syndrome and inflammation: association or causation? *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD*. 2004 Oct;14(5):228–32.
93. Romeo GR, Lee J, Shoelson SE. Metabolic Syndrome, Insulin Resistance and Roles of Inflammation-Mechanisms and Therapeutic Targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Aug;32(8):1771–6.
94. Ellulu MS, Patimah I, Khaza'ai H, Rahmat A, Abed Y. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Arch Med Sci AMS*. 2017 Jun;13(4):851–63.

95. Medanić D, Pucarín-Cvetković J. PRETILOST – JAVNOZDRAVSTVENI PROBLEM I IZAZOV. *Acta Medica Croatiae Časopis Akad Med Znan Hrvatske*. 2012;66(5):347–54.
96. Tchernoof A, Després J-P. Pathophysiology of Human Visceral Obesity: An Update. *Physiol Rev*. 2013 Jan 1;93(1):359–404.
97. Wang Y-W, Zhang J-L, Jiao J-G, Du X-X, Limbu SM, Qiao F, et al. Physiological and metabolic differences between visceral and subcutaneous adipose tissues in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. 2017 Aug 16;313(5):R608–19.
98. Schwartz MW, Seeley RJ, Zeltser LM, Drewnowski A, Ravussin E, Redman LM, et al. Obesity Pathogenesis: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev*. 2017 Aug 1;38(4):267–96.
99. Han TS, Lean ME. A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *JRSM Cardiovasc Dis*. 2016 Dec;5:2048004016633371.
100. Maciejewski ML, Arterburn DE, Van Scoyoc L, Smith VA, Yancy WS, Weidenbacher HJ, et al. Bariatric Surgery and Long-term Durability of Weight Loss. *JAMA Surg*. 2016 Nov 1;151(11):1046–55.
101. Schauer PR, Bhatt DL, Kirwan JP, Wolski K, Aminian A, Brethauer SA, et al. Bariatric Surgery versus Intensive Medical Therapy for Diabetes - 5-Year Outcomes. *N Engl J Med*. 2017 Feb 16;376(7):641–51.
102. Look AHEAD Research Group, Wing RR, Bolin P, Brancati FL, Bray GA, Clark JM, et al. Cardiovascular effects of intensive lifestyle intervention in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2013 Jul 11;369(2):145–54.
103. Nguyen NT, Kim E, Vu S, Phelan M. Ten-year Outcomes of a Prospective Randomized Trial of Laparoscopic Gastric Bypass Versus Laparoscopic Gastric Banding. *Ann Surg*. 2018 Jul;268(1):106–13.
104. O'Brien P. Bariatric surgery and type 2 diabetes: a step closer to defining an optimal approach. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019 Dec 1;7(12):889–91.

105. Lebovitz HE. Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001;109(Suppl 2):S135–48.
106. Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, et al. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med*. 1993 Dec 30;329(27):1988–92.
107. CDC. Prediabetes - Your Chance to Prevent Type 2 Diabetes [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2020 [citirano 1. travnja 2021.]. Dostupno na: <http://bit.ly/2hMpYrt>
108. Lee CMY, Colagiuri S, Woodward M, Gregg EW, Adams R, Azizi F, et al. Comparing different definitions of prediabetes with subsequent risk of diabetes: an individual participant data meta-analysis involving 76 513 individuals and 8208 cases of incident diabetes. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2019 Dec 1;7(1):e000794.
109. Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. Prediabetes: A high-risk state for developing diabetes. *Lancet*. 2012 Jun 16;379(9833):2279–90.
110. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 1979 Sep 1;237(3):E214.
111. Insulin Resistance & Prediabetes | NIDDK [Internet]. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. [citirano 1. travnja 2021.]. Dostupno na: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/what-is-diabetes/prediabetes-insulin-resistance>
112. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985 Jul;28(7):412–9.
113. Song YS, Hwang Y-C, Ahn H-Y, Park C-Y. Comparison of the Usefulness of the Updated Homeostasis Model Assessment (HOMA2) with the Original HOMA1 in the

- Prediction of Type 2 Diabetes Mellitus in Koreans. *Diabetes Metab J.* 2016 Aug;40(4):318–25.
114. Goyal R, Jialal I. Diabetes Mellitus Type 2. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [citirano 1. travnja 2021.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513253/>
115. Smushkin G, Vella A. What is type 2 diabetes? *Med Abingdon Engl UK Ed.* 2010 Nov 1;38(11):597–601.
116. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019 Nov;157:107843.
117. Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *The Lancet.* 2017 Jun;389(10085):2239–51.
118. Harris MI, Klein R, Welborn TA, Knudman MW. Onset of NIDDM occurs at Least 4-7 yr Before Clinical Diagnosis. *Diabetes Care.* 1992 Jul 1;15(7):815–9.
119. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol.* 2018 Feb;14(2):88–98.
120. Hallberg SJ, Gershuni VM, Hazbun TL, Athinarayanan SJ. Reversing Type 2 Diabetes: A Narrative Review of the Evidence. *Nutrients* [Internet]. 2019 Apr 1 [citirano 30. travnja 2020.];11(4). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6520897/>
121. Amer OE, Sabico S, Alfawaz HA, Aljohani N, Hussain SD, Alnaami AM, et al. Reversal of Prediabetes in Saudi Adults: Results from an 18 Month Lifestyle Intervention. *Nutrients* [Internet]. 2020 Mar 18 [citirano 30. travnja 2020.];12(3). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7146361/>
122. Verdi S, Abbasian G, Bowyer RCE, Lachance G, Yarand D, Christofidou P, et al. TwinsUK: The UK Adult Twin Registry Update. *Twin Res Hum Genet Off J Int Soc Twin Stud.* 2019;22(6):523–9.

123. Pučić M, Knežević A, Vidič J, Adamczyk B, Novokmet M, Polašek O, et al. High Throughput Isolation and Glycosylation Analysis of IgG–Variability and Heritability of the IgG Glycome in Three Isolated Human Populations. *Mol Cell Proteomics*. 2011 Oct;10(10):M111.010090.
124. Zhao S, Walsh I, Abrahams JL, Royle L, Nguyen-Khuong T, Spencer D, et al. GlycoStore: a database of retention properties for glycan analysis. *Bioinforma Oxf Engl*. 2018 15;34(18):3231–2.
125. Agakova A, Vučković F, Klarić L, Lauc G, Agakov F. Automated Integration of a UPLC Glycomic Profile. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2017;1503:217–33.
126. Zaytseva OO, Freidin MB, Keser T, Štambuk J, Ugrina I, Šimurina M, et al. Heritability of Human Plasma N -Glycome. *J Proteome Res*. 2020 Jan 3;19(1):85–91.
127. R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
128. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics*. 2012 Mar 15;28(6):882–3.
129. Nikolac Perkovic M, Pucic Bakovic M, Kristic J, Novokmet M, Huffman JE, Vitart V, et al. The association between galactosylation of immunoglobulin G and body mass index. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014 Jan;48:20–5.
130. Lu J-P, Knežević A, Wang Y-X, Rudan I, Campbell H, Zou Z-K, et al. Screening Novel Biomarkers for Metabolic Syndrome by Profiling Human Plasma N-Glycans in Chinese Han and Croatian Populations. *J Proteome Res*. 2011 Nov 4;10(11):4959–69.
131. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J Stat Softw*. 2015 Oct 7;67(1):1–48.
132. Fruh SM. Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management. *J Am Assoc Nurse Pract*. 2017 Oct;29(Suppl 1):S3–14.

133. Sherf Dagan S, Goldenshluger A, Globus I, Schweiger C, Kessler Y, Kowen Sandbank G, et al. Nutritional Recommendations for Adult Bariatric Surgery Patients: Clinical Practice. *Adv Nutr.* 2017 Mar 10;8(2):382–94.
134. Novokmet M, Lukić E, Vučković F, –Durić Ž, Keser T, Rajšl K, et al. Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation. *Sci Rep.* 2014 Mar 11;4(1):4347.
135. McMillan DE. Increased levels of acute-phase serum proteins in diabetes. *Metabolism.* 1989 Nov 1;38(11):1042–6.
136. Alquoqa RS, Kasabri V, Naffa R, Akour A, Bustanji Y. Cross-sectional correlates of myeloperoxidase and alpha-1-acid glycoprotein with adiposity, atherogenic and hematological indices in metabolic syndrome patients with or without diabetes. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 2018 Jun 13;9(9):283–91.
137. Akbay E, Yetkin I, Ersoy R, Kulaksizoğlu S, Törüner F, Arslan M. The relationship between levels of alpha-1-acid glycoprotein and metabolic parameters of diabetes mellitus. *Diabetes Nutr Metab.* 2004 Dec;17(6):331–5.
138. Freeman AM, Pennings N. Insulin Resistance. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [citirano 14. siječnja 2021.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507839/>
139. Warram JH, Martin BC, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med.* 1990 Dec 15;113(12):909–15.
140. Hanley AJG, Williams K, Gonzalez C, D’Agostino RB, Wagenknecht LE, Stern MP, et al. Prediction of Type 2 Diabetes Using Simple Measures of Insulin Resistance: Combined Results From the San Antonio Heart Study, the Mexico City Diabetes Study, and the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes.* 2003 Feb 1;52(2):463–9.
141. Pavić T, Dilber D, Kifer D, Selak N, Keser T, Ljubičić Đ, et al. N-glycosylation patterns of plasma proteins and immunoglobulin G in chronic obstructive pulmonary disease. *J Transl Med.* 2018 Nov 21;16.

142. Clerc F, Novokmet M, Dotz V, Reiding KR, de Haan N, Kammeijer GSM, et al. Plasma N-Glycan Signatures Are Associated With Features of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2018 Sep 1;155(3):829–43.
143. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol*. 2004 Jan;25(1):4–7.
144. Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation*. 2004 Sep 21;110(12):1564–71.
145. Ni Y, Zhao L, Yu H, Ma X, Bao Y, Rajani C, et al. Circulating Unsaturated Fatty Acids Delineate the Metabolic Status of Obese Individuals. *EBioMedicine*. 2015 Sep 6;2(10):1513–22.
146. Dennis JW, Nabi IR, Demetriou M. Metabolism, Cell Surface Organization, and Disease. *Cell*. 2009 Dec 24;139(7):1229–41.
147. Lau KS, Partridge EA, Grigorian A, Silvescu CI, Reinhold VN, Demetriou M, et al. Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell*. 2007 Apr 6;129(1):123–34.
148. Miwa HE, Song Y, Alvarez R, Cummings RD, Stanley P. The bisecting GlcNAc in cell growth control and tumor progression. *Glycoconj J*. 2012 Dec;29(8–9):609–18.
149. Ruhaak LR, Uh H-W, Beekman M, Koeleman CAM, Hokke CH, Westendorp RGJ, et al. Decreased Levels of Bisecting GlcNAc Glycoforms of IgG Are Associated with Human Longevity. *PLOS ONE*. 2010 Sep 7;5(9):e12566.
150. Lemmers RFH, Vilaj M, Urda D, Agakov F, Šimurina M, Klaric L, et al. IgG glycan patterns are associated with type 2 diabetes in independent European populations. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. 2017 Sep;1861(9):2240–9.
151. Menni C, Gudelj I, MacDonald-Dunlop E, Mangino M, Zierer J, Bešić E, et al. Glycosylation Profile of Immunoglobulin G Is Cross-Sectionally Associated with Cardiovascular Disease Risk Score and Subclinical Atherosclerosis in Two Independent Cohorts. *Circ Res*. 2018;122(11):1555–64.

152. Štambuk J, Nakić N, Vučković F, Pučić-Baković M, Razdorov G, Trbojević-Akmačić I, et al. Global variability of the human IgG glycome [Internet]. *Biochemistry*; 2019 Feb [citirano 31. siječnja 2020.]. Dostupno na: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/535237>
153. Sundgren NC, Vongpatanasin W, Boggan BMD, Tanigaki K, Yuhanna IS, Chambliss KL, et al. IgG receptor FcγRIIB plays a key role in obesity-induced hypertension. *Hypertension*. 2015 Feb 21;65(2):456–62.
154. Peng J, Vongpatanasin W, Sacharidou A, Kifer D, Yuhanna IS, Banerjee S, et al. Supplementation With the Sialic Acid Precursor N-Acetyl-D-Mannosamine Breaks the Link Between Obesity and Hypertension. *Circulation*. 2019 Dec 10;140(24):2005–18.
155. Iida S, Kuni-Kamochi R, Mori K, Misaka H, Inoue M, Okazaki A, et al. Two mechanisms of the enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) efficacy of non-fucosylated therapeutic antibodies in human blood. *BMC Cancer*. 2009 Feb 18;9(1):58.
156. Arnold JN, Wormald MR, Suter DM, Radcliffe CM, Harvey DJ, Dwek RA, et al. Human Serum IgM Glycosylation: IDENTIFICATION OF GLYCOFORMS THAT CAN BIND TO MANNAN-BINDING LECTIN*. *J Biol Chem*. 2005 Aug 12;280(32):29080–7.
157. Ghebrehiwet B. The complement system: an evolution in progress. *F1000Research* [Internet]. 2016 Dec 12 [citirano 26. travnja 2021.];5. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5155499/>
158. Kalia N, Singh J, Kaur M. The ambiguous role of mannose-binding lectin (MBL) in human immunity. *Open Med*. 2021 Jan 1;16(1):299–310.

7. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH DJELA

Ana Cvetko rođena je u Zagrebu 14.09.1993. godine, gdje je završila osnovnu školu i gimnaziju. Tijekom srednje škole sudjelovala je na Državnim natjecanjima iz matematike i grčkog jezika te na natjecanjima iz raznih drugih predmeta poput kemije, logike, engleskog i hrvatskog jezika, te zemljopisa. Osnovnoškolsko i gimnazijsko obrazovanje završila je s 5.0 uspjehom nakon svih 12 godina. Osim sudjelovanja u raznim nastavnim aktivnostima, aktivno je bila uključena u mnoge izvannastavne aktivnosti, poput Učeničkog zbora te natjecateljske odbojke. Tijekom 3. i 4. razreda srednje škole primala je stipendiju grada Zagreba što se nastavilo i na prvu godinu fakultetskog obrazovanja. Od 2012. do 2017. g. studirala je medicinsku biokemiju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu. Diplomirala je kao najbolji student medicinske biokemije u generaciji. Tijekom studija bila je članica odbojkaškog tima s kojim je osvojila prvo mjesto na Sveučilišnom prvenstvu 2013. godine, te je bila potpredsjednica Studentskog zbora, kao i član Fakultetskog vijeća i Nastavnog povjerenstva. Sudjelovala je u mnogim aktivnostima Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije, te je bila dio Organizacijskog odbora za 4. Simpozij studenata farmacije i medicinske biokemije, i glavni organizator Dana karijera 2017.

Od veljače 2018. do danas zaposlena je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu kao asistentica na projektu na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju u sklopu projekta Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju. Akademske godine 2017./18. upisala je poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu.

Objavila je četiri znanstvena i jedan stručni rad, održala jedno usmeno priopćenje na međunarodnom kongresu te sudjelovala na više domaćih i međunarodnih kongresa s posterskim priopćenjima.

Znanstveni radovi (CC):

1. Kifer, Domagoj; Louca, Panayiotis; **Cvetko, Ana**; Deriš, Helena; Cindrić, Ana; Grallert, Harald; Peters, Annette; Polašek, Ozren; Gornik, Olga; Mangino, Massimo et al.

N-glycosylation of immunoglobulin G predicts incident hypertension. // Journal of hypertension, 38 (2021), 34285147, 7 doi:10.1097/hjh.0000000000002963 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

2. Stupin, Ana; **Cvetko, Ana**; Kralik, Gordana; Mihalj, Martina; Šušnjara, Petar; Kolobarić, Nikolina; Breškić Ćurić, Željka; Lukinac, Ana Marija; Kibel, Aleksandar; Selthofer-Relatić, Kristina et al.

The effect of n-3 polyunsaturated fatty acids enriched hen eggs consumption on IgG and total plasma protein N-glycosylation in healthy individuals and cardiovascular patients. // *Glycobiology*, 2021 (2021) doi:10.1093/glycob/cwab051 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

3. Greto, Valentina L.; **Cvetko, Ana**; Štambuk, Tamara; Dempster, Niall J.; Kifer, Domagoj; Deriš, Helena; Cindrić, Ana; Vučković, Frano; Falchi, Mario; Gillies, Richard S. et al.

Extensive weight loss reduces glycan age by altering IgG N-glycosylation. // *International journal of obesity*, N/A (2021), N/A, 11 doi:10.1038/s41366-021-00816-3 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

4. **Cvetko, Ana**; Kifer, Domagoj; Gornik, Olga; Klarić, Lucija; Visser, Elizabeth; Lauc, Gordan; Wilson, James F.; Štambuk, Tamara

Glycosylation Alterations in Multiple Sclerosis Show Increased Proinflammatory Potential. // *Biomedicines*, 8 (2020), 10; 410, 14 doi:10.3390/biomedicines8100410 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

5. Mayer, Ljiljana; Langer, Sanja; Gaće, Mihaela; Hrabač, Pero; Šoštarić, Milica; Fijan, Ines; Špacir Prskalo, Zvezdana; **Cvetko, Ana**; Periša, Josipa; Štefančić, Ljilja et al.

Prediction score for complications after colorectal cancer surgery based on neutrophils/lymphocytes ratio, percentage of immature granulocytes, IG and IT ratios. // *Libri Oncologici : Croatian Journal of Oncology*, 47 (2019), 1; 1-5 (recenziran, članak, stručni)

Sažeci sa skupova:

1. **Cvetko, Ana**; Kifer, Domagoj; Deris, Helena; Cindric, Ana; Spector, Tim D.; Padmanabhan, Sandosh; Lauc, Gordan; Menni, Cristina

PLASMA N-GLYCOME AS INCIDENCE HYPERTENSION PREDICTOR. // *Journal of Hypertension*

Glasgow, Škotska: Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health), 2021. str. e110-e110 doi:10.1097/01.hjh.0000745536.48469.73 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

2. **Cvetko, Ana**; Kifer, Domagoj; Wilson, Jim; Lauc, Gordan; Pavić, Tamara

N-glycosylation of plasma proteins and immunoglobulin G in multiple sclerosis. // GlycoT 2020 12th International Symposium on Glycosyltransferases

Boston, SAD, virtualno, 2020. str. x-x (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

3. **Cvetko, Ana**; Kifer, Domagoj; Wilson, Jim; Lauc, Gordan; Pavić, Tamara

N-glycosylation of plasma proteins and immunoglobulin G in multiple sclerosis. // 11th ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine Book of Abstracts

Split, Hrvatska, 2019. str. 153-153 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

4. Rudman, Najda; Kifer, Domagoj; Simunović, Vesna; Kaur, Simranjeet; **Cvetko, Ana**; Keser, Toma; Pavić, Tamara; Klarić, Lucija; Pociot, Flemming; Morahan, Grant; Gornik, Olga
Genetic association study and plasma protein N- glycan profiling in children newly diagnosed with type 1 diabetes and their healthy siblings. // Infodan doktorskog studija "Farmaceutsko-biokemijske znanosti"

Zagreb, Hrvatska, 2019. (poster, neobjavljeni rad, znanstveni)

5. Selak, Najda; Kifer, Domagoj; Simunović, Vesna; Kaur, Simranjeet; **Cvetko, Ana**; Keser, Toma; Pavić, Tamara; Klarić, Lucija; Pociot, Flemming; Morahan, Grant; Gornik, Olga
Genetic association study and plasma protein N- glycan profiling in children newly diagnosed with type 1 diabetes and their healthy siblings. // Glycoconjugate journal / Sonnino, Sandro (ur.).

New York: Springer, 2019. str. 364-364 doi:10.1007/s10719-019-09880-4 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

6. Selak, Najda; Kifer, Domagoj; Simunović, Vesna; Kaur, Simranjeet; **Cvetko, Ana**; Keser, Toma; Pavić, Tamara; Klarić, Lucija; Pociot, Flemming; Morahan, Grant; Gornik, Olga
N-glycan structures associated with activation of the complement system are increased in children with type 1 diabetes. // 29th Joint Glycobiology meeting 2018 book of abstracts
Gent, Belgija, 2018. str. 69-69 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

7. Selak, Najda; Kifer, Domagoj; Simunović, Vesna; Kaur, Simranjeet; **Cvetko, Ana**; Keser, Toma; Pavić, Tamara; Klarić, Lucija; Pociot, Flemming; Morahan, Grant; Gornik, Olga
N-glycan structures associated with activation of the complement system are increased in children with type 1 diabetes. // 2nd GlycoCom 2018 and 1st Human Glycome Project Meeting book of abstract

Dubrovnik, Hrvatska, 2018. str. 110-111 (poster, recenziran, sažetak, znanstveni)

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Doktorski rad

N-glikozilacija proteina u plazmi kao biljeg praćenja metaboličkoga sindroma

Ana Cvetko

SAŽETAK

Metabolički sindrom obuhvaća poremećaje poput visceralne pretilosti te inzulinske rezistencije koja često prethodi šećernoj bolesti tipa 2. Istraživanja su spomenute poremećaje povezala s promjenama *N*-glikozilacije proteina plazme, jedne od najčešćih i najkompleksnijih post-translacijskih modifikacija. Glavni ciljevi ovog doktorskog rada jesu identificirati *N*-glikanske strukture prisutne na proteinima plazme koje: a) omogućavaju predikciju i rano prepoznavanje pojedinaca s povećanim rizikom razvoja inzulinske rezistencije i šećerne bolesti tipa 2 i b) su povezane s indeksom tjelesne mase te preti lošću i promjenama indeksa tjelesne mase kod pojedinaca podvrgnutih operaciji želuca. Analizirani su uzorci krvne plazme oko 2 000 ispitanika iz TwinsUK registra sakupljeni u više vremenskih točaka tijekom 20 godina pri čemu su bilježeni detaljni podaci o zdravstvenom statusu ispitanika poput dijagnoze inzulinske rezistencije i šećerne bolesti tipa 2, te uzorci krvne plazme 37 pretilih ispitanika okupljenih u Sveučilišnoj bolnici Oxford gdje su bili podvrgnuti restriktivnoj dijeti i operaciji želuca, a krv im je uzrokovana kontinuirano tijekom studije. Izolirani, pročišćeni te fluorescentno obilježeni *N*-glikani proteina plazme i imunoglobulina G analizirani su HILIC-UPLC metodom. Statistička obrada dobivenih rezultata pokazala je da se *N*-glikani proteina plazme u pojedinaca koji će razviti šećernu bolest tipa 2 i inzulinsku rezistenciju značajno razlikuju od ispitanika koji će ostati zdravi te se primijećene promjene počinju pojavljivati godinama prije službene dijagnoze što omogućuje uspješno pravovremeno identificiranje pojedinaca visokorizičnih za poremećaj u metabolizmu glukoze. Nadalje, opažene promjene *N*-glikana proteina plazme i imunoglobulina G u pretilih pojedinaca uslijed mršavljenja rezultat su podvrgavanja restriktivnoj dijeti i operaciji želuca. Iste promjene su primijećene i uslijed longitudinalnog praćenja pojedinaca kojima se mijenjao indeks tjelesne mase. Zaključno, primjenom *N*-glikana kao biljega ranog izdvajanja visokorizičnih pojedinaca te kao biljega praćenja metaboličkoga i upalnog statusa organizma, može se na vrijeme prevenirati i odgoditi razvoj ozbiljnih komorbiditeta koji se povezuju s metaboličkim sindromom, te čak i spriječiti pojavu samog sindroma, ali i pratiti učinkovitost terapijskog pristupa.

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

Rad sadrži: 104 stranice, 20 slika, 22 tablice i 158 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *N*-glikozilacija, *N*-glikani proteina plazme, *N*-glikani imunoglobulina G, HILIC-UPLC, pretilost, inzulinska rezistencija, metabolički sindrom, predikcija, biljezi

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

Ocjenjivači:

Rad prihvaćen: 2021.

Basic documentation card

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

Doctoral dissertation

N-glycosylation of plasma proteins as monitoring marker of metabolic syndrome

Ana Cvetko

SUMMARY

Metabolic syndrome includes disorders such as visceral obesity and insulin resistance, which often precedes type 2 diabetes. Studies have linked these disorders to changes in plasma N-glycosylation, one of the most common and complex post-translational modifications. The main objectives of this study are to identify N-glycan structures present on plasma proteins that: a) allow prediction and early identification of individuals at increased risk of developing insulin resistance and type 2 diabetes and b) are associated with body mass index and obesity and body mass index changes in individuals undergoing bariatric surgery (restrictive gastric surgery). Blood plasma samples of about 2000 subjects from the TwinsUK registry collected at multiple time points over 20 years were analysed, recording detailed data on the health status of subjects, as well as blood plasma samples of 37 obese subjects gathered at the Oxford University Hospital where they were subjected to a restrictive diet and bariatric surgery, and their blood was sampled continuously throughout the study. Isolated, purified and fluorescently labelled plasma protein and immunoglobulin G N-glycans were analysed by HILIC-UPLC method. Statistical processing of the obtained results showed that plasma protein N-glycans in individuals to be diagnosed with type 2 diabetes and insulin resistance differ significantly from healthy controls, and that the observed changes begin to appear years before official diagnosis, which allows successful timely identification of individuals at high risk of impaired glucose metabolism. Furthermore, observed significant changes in plasma and immunoglobulin G N-glycans in obese individuals due to weight loss are the result of being subjected to a low-calorie, restrictive diet and bariatric surgery. The same changes were observed due to longitudinal follow-up of individuals with changes in their body mass index. In conclusion, the use of N-glycans as markers of timely identification of high-risk individuals and as monitoring markers of metabolic and inflammatory status of the organism, can prevent and delay the development of serious comorbidities associated with metabolic syndrome, and even prevent the occurrence of the syndrome itself, but also can monitor the efficacy of used therapeutic approach.

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

Thesis includes: 104 pages, 20 figures, 22 tables and 158 references. Original is in Croatian language.

Keywords: N-glycosylation, plasma protein N-glycans, IgG N-glycans, HILIC-UPLC, obesity, insulin resistance, metabolic syndrome, prediction marker

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

Reviewers:

The thesis was accepted: 2021