

# Spolne i dobne razlike glikozilacije imunoglobulina G kod pacijenata s dijabetesom tipa 1

---

Matejčić, Sabina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

*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:163:891672>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-19**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sabina Matejčić**

**Spolne i dobne razlike glikozilacije  
imunoglobulina G kod pacijenata s dijabetesom  
tipa 1**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2018.

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

Ovim putem se zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Olgi Gornik i dr. sc. Tomi Keseru na svim savjetima, trudu, vremenu i strpljenju koji su mi pokazali tijekom izrade diplomskog rada. Zahvaljujem se dr. sc. Vesni Šimunović i cijelom timu Genosa na svim savjetima i pomaganju tijekom eksperimentalnog dijela. To su savjeti koje ću koristiti i dalje u svojem samostalnom radu.

Tijekom studija neizbrisiv trag su ostavili kolege, obitelj i drugi profesori kojima ovim putem zahvaljujem također.

## SADRŽAJ

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD.....                                                                              | 1  |
| 1.1. Glikozilacija.....                                                                   | 1  |
| 1.2. Glikani.....                                                                         | 1  |
| 1.2.1. N-glikani.....                                                                     | 1  |
| 1.2.2. O-glikani.....                                                                     | 3  |
| 1.3. Imunoglobulin G.....                                                                 | 3  |
| 1.3.1. Važnost glikozilacije IgG.....                                                     | 3  |
| 1.4. Dijabetes.....                                                                       | 4  |
| 1.4.1. Dijabetes tip I.....                                                               | 5  |
| 1.5. Analiza strukture glikana.....                                                       | 6  |
| 1.5.1. HILIC-UPLC.....                                                                    | 6  |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME.....                                                                 | 7  |
| 3. MATERIJALI I METODE.....                                                               | 8  |
| 3.1. Materijali.....                                                                      | 8  |
| 3.1.1. Biološki uzorci.....                                                               | 8  |
| 3.1.2. Enzimi.....                                                                        | 8  |
| 3.1.3. Anorganska otapala.....                                                            | 8  |
| 3.1.4. Organska otapala.....                                                              | 8  |
| 3.1.5. Otopine i puferi.....                                                              | 9  |
| 3.1.6. Laboratorijska oprema.....                                                         | 10 |
| 3.2. Protokol pripreme uzoraka.....                                                       | 11 |
| 3.2.1. Randomizacija.....                                                                 | 11 |
| 3.2.2. Izolacija plazmatskog IgG s Protein G pločicom.....                                | 11 |
| 3.2.3. Izolacija N-glikana s plazmatskih glikoproteina.....                               | 12 |
| 3.2.4. Obilježavanje i pročišćavanje N-glikana.....                                       | 12 |
| 3.3. Analiza uzoraka.....                                                                 | 13 |
| 3.3.1. Analiza izoliranih N-glikana HILIC-UPLC metodom.....                               | 13 |
| 4. REZULTATI.....                                                                         | 15 |
| 4.1. Primjer kromatograma plazmatskih glikana.....                                        | 15 |
| 4.2. Općeniti statistički prikaz dobivenih N-glikana.....                                 | 15 |
| 4.3. Usporedba prema spolu.....                                                           | 16 |
| 4.4. Usporedba glikozilacije kod ženskog spola u pubertetskoj i prepubertetskoj dobi..... | 18 |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.5. Usporedba kod muškog spola u pubertetskoj i prepubertetskoj dobi..... | 19 |
| 5. RASPRAVA.....                                                           | 21 |
| 6. ZAKLJUČAK.....                                                          | 22 |
| 7. LITERATURA.....                                                         | 23 |
| 8. SAŽETAK/SUMMARY.....                                                    | 25 |
| 8.1. Sažetak.....                                                          | 25 |
| 8.2. Summary.....                                                          | 26 |
| 9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD               |    |



## 1. UVOD

### 1.1. Glikozilacija

Glikozilacija je složen enzimski proces postranslacijske ili kotranslacijske modifikacije proteina i lipida vezanjem ugljikohidratnih struktura. Više od polovice poznatih proteina je glikozilirano, dok je sama stanica gotovo u potpunosti prekrivena ugljikohidratima vezanima na proteine i lipide membrane. Postoje razni načini na koje se ugljikohidrati mogu vezati što samo doprinosi složenosti strukture kao i potencijalne promjene funkcije molekule (Varki i sur., 2009). Kada govorimo o proteinima razlikujemo glikoproteine i proteoglikane zbog razlike u masi podjedinica.

Glikozilacija je iznimno složen proces u koji je uključen veliki broj gena. Cijeli proces još nije u potpunosti razjašnjen stoga daljnja istraživanja imaju dosta prostora za rasvijetliti kako se cijeli postupak točno odvija. Glikozilacija je odgovorna za pravilnu funkciju proteina, djeluje u zaštitom odgovoru organizma, komunikaciji među stanicama, sudjeluje u oplodnji stanice, kao i mnoge druge uloge od kojih će neke možda tek biti otkrivene (Varki i sur., 2009). Glikozilacija nam može pomoći u dijagnostici, praćenju i prognozi terapije, te objasniti točan uzrok kako bi terapija bila što učinkovitija.

### 1.2. Glikani

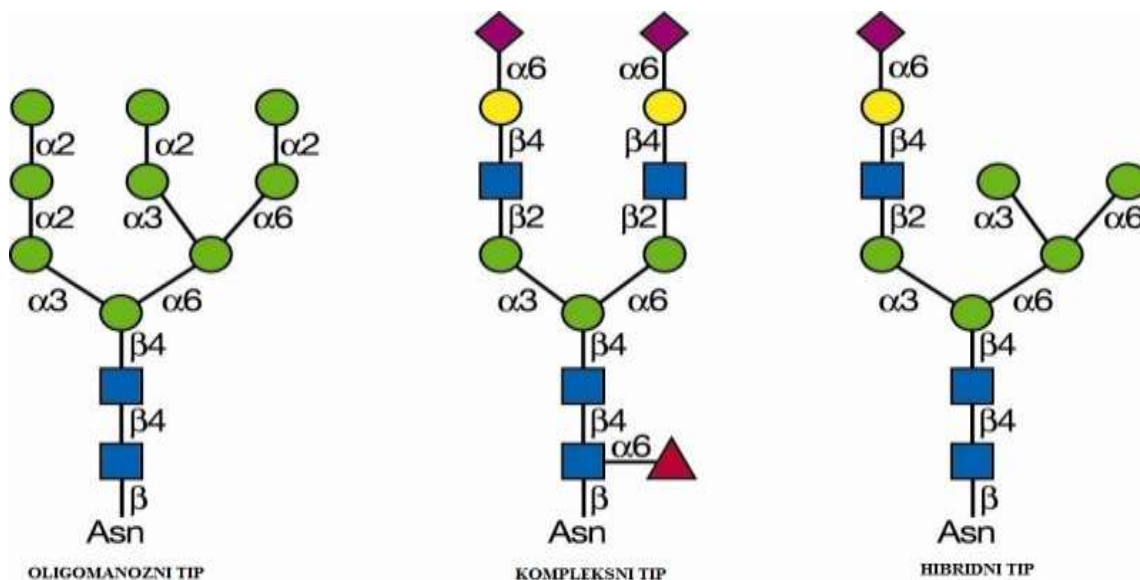
Glikani su kovalentno vezani na proteine te postoje N i O-vezani glikani. Sinteza N-glikana započinje u endoplazmatskom retikulumu i nastavlja se u golgijevom aparatu dok se O- vezani glikani sintetiziraju u golgijevom aparatu. Ime su dobili po skupini koja je s proteina vezana na ugljikohidratni dio. Hidroksilna skupina iz serina ili treonina te amino skupina iz asparagina (Varki i sur., 2009).

#### 1.2.1. N-glikani

N- glikani su najčešće vezani na acetilglukozamin i to u slijedu sekvenci asparagin- x- serin/treonin. Imaju dosta složenu sintezu, gdje se prvo 14 monosaharida veže na nosač dolikol fosfatu te zatim prenosi na protein. Taj početni dio je konzerviran u biljaka, kvasaca i metazoi. N-glikani utječu na cjelokupna svojstva glikoproteina tako što mu utječu na konformaciju, topljivost, antigenost i vezanje na glikan vezujuće proteine. N glikani služe kao oznake za određeni glikoprotein, te defekti u sintezi mogu dovesti do bolesti (Varki i sur., 2009).

Svi N-glikani imaju jednaku okosnicu ugljikohidrata koja se sastoji od dva N-acetil glukozamina i tri manoze koje su povezane na sljedeći način  $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-$

4GlcNAc $\beta$ 1–4GlcNAc $\beta$ 1-Asn-X-Ser/Thr te razlikujemo tri tipa glikana ovisno o ugljikohidratima koji su vezani na okosnicu. To su oligomanozni, kompleksni i hibridni tip. Oligomanozni tip N-glikana se sastoji od nekoliko manjih jedinica manoze, kompleksni tip može imati na sebi vezane N- acetilglukozamina, galaktozu i sijalinsku kiselinu, dok je hibridni tip kombinacija prethodna dva tipa, tj. njegovih ugljikohidrata što se može vidjeti na slici 1 i slici 2.



Slika 1. Tri tipa N-glikana (Slika preuzeta i doradena Varki i sur. 2009.)



Slika 2. Ugljikohidratne podjedinice u srži tri tipa N-glikana (Slika preuzeta i doradena Varki i sur. 2009.)

Sinteza započinje na citoplazmatskoj strani endoplazmatskog retikuluma i to na nosaču dolikol fosfatu. Zapčinje s dodavanjem N-acetilglukozamina kojeg prenosi uridin difosfat N-acetilglukozamin na dolikol fosfat. Na nosač dolikol fosfat se veže 14 podjedinica ugljikohidrata prije nego li se one prenose na proteinski dio glikana. U 2/3 slučaja će to biti aminokiselinski slijed asparagina, zatim bilo koje aminokiseline osim prolina, te serin ili treonin. Prijenos N- glikana se odvija na luminalnoj strani endoplazmatskog retikula te se kotranslacijski prenosi na protein. U golgijevom aparatu na N- glikan djeluju glikoziltransferaze i glikozidaze koje utječu na konačan sastav ugljikohidrata, a samim time i funkciju cijele molekule (Varki i sur., 2009).



### 1.2.2.O-glikani

O- glikani su najčešće vezani preko N-acetilgalaktozamin na hidroksilnu skupinu serina ili treonina. Ovaj tip glikana se sastoji od dugih lanaca sastavljenih najčešće od serina i treonina. Pun je hidroksilnih skupina te tako na sebe lako veže vodu. O- glikane često nalazimo na mukoznim membranama pa ih zovemo mucinima. To je najčešći tip O-glikana. Osim N- acetilgalaktozamina, ugljikohidratne podjedinice u O- glikanima se mogu vezati na O- fukozu, O- ksilozu, O- manozu ili N-acetilglukozamin. O- glikani također izdižu funkcionalnu domenu proteina iznad membrane, poput LDL-receptora (Varki i sur., 2009).

Sinteza započinje s aktiviranim nukleotidima u Golgijevom aparatu koji donose ugljikohidratne podjedinice i puno je složenija od sinteze N-glikana.

### 1.3. Imunoglobulin G

Imunoglobulini su glikoproteini koji imaju važnu ulogu u imunosnom odgovoru tijela na antigene. Stvaraju ih plazma stanice kada dođu u kontakt s antigenom. Imunoglobulini se sastoje od dva tipa lanaca, lakog i teškog, a po teškom lancu su dobili ime. Razlikujemo 5 klasa imunoglobulina: IgA, IgE, IgD, IgM i IgG. Svaki od njih ima svoju ulogu u imunosnom odgovoru.

Imunoglobulin G je najzastupljeniji u tijelu (80% svih Ig) i predstavlja specifičan odgovor na strano tijelo. On je monomer, ima četiri podjedinice, dva teška lanca i dva laka. Ime su dobili po svojoj molekularnoj masi, a međusobno su povezani nekovalentnim vezama te učvršćena disulfidnim mostovima. Imunoglobulin ima dvije različite domene, Fab i Fc, od kojih je Fab ona koja prepoznaje i veže antigen preko vodikovih veza, percipira ga te blokira njegova aktivna mjesta. Poznata je kao varijabilna regija, te ih imamo dvije. Fc domena na sebe veže sustav komplementa, odgovorna je za fagocitozu, prolazak kroz placentu, određuje biološka svojstva, može se vezati na makrofage, odgovoran za anafilaktičku reakciju. Između te dvije domene se nalazi fleksibilna zglobova regija, koja se većinom sastoji od prolina, serina i treonina, međusobno povezuje različite domene te mijenja konformaciju (vezana Y ili slobodna forma T) (Varki i sur., 2009).

#### 1.3.1 Važnost glikozilacije IgG

Sve klase imunoglobulina su glikozilirane, pa tako i IgG čija glikozilacija pripada tipu N-glikana. Obično je glikoziliran samo teški lanac konstantne, a nešto manje i varijabilne regije, svega 15%. U patološkim stanjima, npr. multiplu mijelomu, možemo naći glikozilirane lake lance.

Glikozilacija utječe na konformaciju, pa samim time i na prepoznavanje Fc supstrata i fiksiranje komplekta. Sudjeluje izravno u imunom odgovoru, utječe na topljivost IgG, te na njegovo izlučivanje iz plazma stanica.

Neke su bolesti praćene promjenama glikozilacije IgG što je inače zvano „sugar printing“. Smanjena galaktozilacija IgG-a je povezana s Chronovom bolesti, juvenilnim kroničnim reumatoidnim artritismom (Gornik i Lauc., 2008; Parekh i sur., 1988). Inače galaktozilacija IgG se mijenja ovisno o dobi, raste do 25. godine života, a potom opada. U normalnoj trudnoći su isto primijećene povišene razine galaktozilacije. Manjak fukoze u okosnici N-glikana pospješuje vezanje domene Fc na limfocite, što omogućuje bolju učinkovitost antitijela.

#### 1.4. Dijabetes

Šećerna bolest nastaje zbog smanjenog lučenja inzulina, hormona gušterače koji izravno djeluje na smanjenje koncentracije glukoze u krvi. Regulacija koncentracije glukoze u krvi je složen enzimski proces u kojem sudjeluje još i glukagon i hormon rasta (<http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik>).

Postoje dva tipa dijabetesa melitusa, I tip i II tip. Tip I nastaje zbog razaranja  $\beta$  stanica Langerhasovih otočića koje proizvode inzulin, najčešće autoimuno, što dovodi do potpunog nedostatka tog hormona. Tip II nastaje izlučivanjem viših koncentracija inzulina, da bi se kasnijim tijekom bolesti došlo do smanjenja inzulina, što u potpunosti mijenja terapiju. Razlika između ovih tipova ima, no ono što je bitno za naglasiti da njihova nekadašnja imena juvenilni tip, o inzulinu ovisan za tip I, te adultni tip, o inzulinu neovisan za tip II nisu više adekvatni iako ih se i dalje može pronaći u stručnoj literaturi. Terapije se s vremenom izjednače dok tip I se zna javiti i u odrasloj populaciji, isto kao što se tip II dijabetesa melitusa sve češće pojavljuje među djecom (<http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik>).

**TABLICA 1. Razlike dijabetesa tipa I i tipa II**

| OBILJEŽJE                 | TIP I                         | TIP II                                               |
|---------------------------|-------------------------------|------------------------------------------------------|
| Dob pri nastupu           | Većinom <30 god.              | Većinom >30 god.                                     |
| Prateća pretilost         | Ne                            | Često                                                |
| Sklonost ketoacidozi      | Da                            | Ne                                                   |
| Endogeni inzulin u plazmi | Krajnje nizak ili nepostojeći | Ovisno o stupnju može biti nizak, uredan ili povišen |
| Sukladnost u bliznaca     | ≤50%                          | >90%                                                 |

|                                                        |    |                          |
|--------------------------------------------------------|----|--------------------------|
| Veza sa specifičnim HLA–D antigenima                   | Da | Ne                       |
| Protutijela na Langerhansove otočiće                   | Da | Ne                       |
| Hiperglikemija se popravlja na peroralne hipoglikemike | Ne | Da, na početku dijagnoze |

Hiperglikemija dovodi do polifagije, polidipsije i poliurije koji se smatraju ranim simptomima, dok daljnjom progresijom bolesti dolazi do brojnih komplikacija što dovodi do krvno-žilnih bolesti, periferne neuropatije i većom sklonosti prema infekcijama. Zato je osim rane dijagnoze bitno konstantno praćenje terapije kako bi se izbjegle akutne i kronične komplikacije.

U 2017. na svjetskoj razini oko 425 milijuna ljudi boluje od dijabetesa, a procjene World Health Organizationa i International Diabetes Federationa je da će se taj broj popeti na 629 milijuna do 2045. 352 milijuna ljudi je u rizičnoj skupini da oboli od tipa II dijabetesa melitusa (<https://www.idf.org/>).

U Hrvatskoj je ta brojka 2016. bila oko 284 000. Procjene su da svaki drugi oboljeli je nedijagnosticiran, tako da u stvarnosti su ove brojke duplo veće.

#### 1.4.1. Dijabetes tip I

Smatra se da autoimunskim odgovorom antitijela na  $\beta$  stanice Langerhasovih otočića dovodi do njihovog razaranja te posljedično do prestanka izlučivanja inzulina. Ovaj proces može trajati godinama prije nego li se koncentracije inzulina mjerljivo smanje.

Manje od 10% otpada na tip I od sveukupnih broja oboljelih od dijabetesa. Skandinavci i Sardi imaju veću prevalenciju dijabetesa tipa I što ne čudi s obzirom na to da u njihovim populacijama su češći geni sklonosti dijabetesu tipa I (<http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik>).

Etiologija nije sasvim poznata i dosta je komplicirana, no za sada postoje neke naznake da antitijela na autoantigene se pojavljuju kao odgovor na ozljedu  $\beta$  stanica, a ne njihov uzrok, no prisustvo antitijela je moguće detektirati u oko 90% oboljelih tako da je važan dijagnostički kriterij (Wu i sur., 2013).

Povećani rizik od razvoja bolesti se povezuje s prehranom dojenčadi. Davanjem mliječnih proizvoda, visokim razinama nitrata u vodi i s niskim unosom vitamina D (Luopajarvi i sur., 2008). Prerano (<4. mjeseca) i prekasno (>7. mjeseca) davanje glutena i žitarica dojenčadi povećava stvaranje autoantitijela na stanice otočića gušterače.

## 1.5. Analiza strukture glikana

Struktura glikana je složena, pa je samim time i njegova analiza složena. Treba uzeti u obzir da osim različitih ugljikohidrata koji mogu biti vezan u glikanu, moramo uzeti u obzir konformaciju i poziciju veze, te analizirati neugljikohidratni dio glikana, u ovom slučaju proteina.

Moramo koristiti više metoda zbog složenosti strukture, sam uzorak moramo obraditi i predpripremiti za analizu s enzimima kako bismo dobili cijelu strukturu glikana. Za sam početak analize moramo prvo izvršiti probir glikana, pronaći među njima promjene te napraviti analizu. Za potrebe ovog rada smo koristili metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i spektrofotometriju masa.

### 1.5.1. HILIC-UPLC

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama razdjeljuje polarni analit između stacionarne i mobilne faze. U kolonama se nalazi stacionarna faza na kojoj su vezane polarnije skupine (poput amino, hidroksi ili amidne skupine), koje dobro zadržavaju polarne analite. Mobilna faza je nešto slabije polarna u odnosu na stacionarnu fazu, čini ju organsko otapalo u kombinaciji s vodom. Obično je organska otopina acetonitril, a zbog potrebe regulacije ionske jakosti i pH mobilne faze u nju se još dodaje amonij acetat ili amonij formijat. Povećanjem polarnosti mobilne faze eluiramo naš analit, tj. postupnim dodatkom vode ispiremo glikane s kolone. Detekcija samih glikana može biti na elektrokemijskom detektoru ili masenom spektrofotometru koji može ili ne mora imati fluorescentno obilježene glikane (Zauner i sur., 2011).

U ovom radu koristili smo detekciju s masenom spektroskopijom obilježeno s fluoroforom 2-aminobenzamidom.

HILIC UPLC je bolja za interpretaciju glikanske strukture pred ostalim kromatografijama jer u kraćem vremenu postiže ravnotežu između stacionarne i mobilne faze, pa je samim time analiza brža. Retencijsko vrijeme ovisi o hidrofilnosti analita što nam govori o njenoj veličini, naboju, sastavu, vezama i razgranatosti oligosaharida, no za interpretaciju rezultata su jednostavni i pouzdani.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Glikozilacija je iznimno složen proces koji je zaslužan za pravilno funkcioniranje makromolekula (Burton i Dwek, 2006). Njihova potpuna funkcija i etiologija u organizmu još nije u potpunosti razjašnjena, no ono što znamo je da je glikom promjenljiv u različitoj dobi i različitim stanjima organizma (Krištić i sur., 2014; Vanhooren i sur., 2007).

Uzrok nastanka dijabetesa tipa I još u potpunosti nije razjašnjen (Wu i sur., 2013), a pogađa sve više ljudi. Ono što znamo je da što je ranija dijagnoza bolesti, prije pojave simptoma, prognoza bolesti je bolja. Za imunoglobulin G znamo da se njegova glikozilacija mijenja s dobi u zdravoj populaciji, no ne znamo postoji li razlika između spolova, postoji li ikakva povezanost s dijabetesom tipa I, a informacije o ovoj promjeni u dječjoj dobi su također vrlo šture.

Cilj ovog rada je odrediti postoji li razlika između glikozilacije imunoglobulina G kod pacijenata oboljelih od dijabetesa tipa I ovisno o spolu djece i adolescenata, te ovisi li ta razlika o njihovoj dobi (prepubertetska i pubertetska populacija). Prema Rudan 2004 smo uzeli za ženski spol da je pubertetska dob iznad 10,5 godina života, dok kod muškog spola ta nam je granica 12,5. Usporedit ćemo 24 glikana IgG pomoću HILIC –UPLC-a kako bismo dobili pouzdane, brze i jednostavne rezultate.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Biološki uzorci

U ovom istraživanju koristili smo uzorke 249 pacijenta s dijagnozom bolesti dijabetes melitus tipa I. Uzorak plazme je oduzet unutar 3 mjeseca od postavljanja dijagnoze, a dobiveni su iz registra dječjeg dijabetesa u Danskoj („The Danish Society for Childhood Diabetes registry“). Dob pacijenata bila je od 25 dana života do 17 godina. Ženskog spola je 110 pacijenta, a muškog 139.

##### 3.1.2. Enzimi

**TABLICA 2. Enzimi korišteni u istraživanju**

| KEMIKA LIJA                      | PROIZVOĐAČ |
|----------------------------------|------------|
| PNGaza F (peptid N- glikozidaza) | Prozyme    |

##### 3.1.3. Anorganska otapala

**TABLICA 3. Anorganska otapala korištena u istraživanju**

| KEMIKA LIJA                                                | PROIZVOĐAČ     |
|------------------------------------------------------------|----------------|
| Amonijak                                                   | Emsure         |
| Amonijev bikarbonat                                        | Sigma          |
| Dinatrijev hidrogenfosfat Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Acros Organics |
| Kalijev dihidrogenfosfat KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>   | Sigma-Aldrich  |
| Kalijev klorid KCl                                         | Calbiochem     |
| Natrijev klorid NaCl                                       | Carlo Erba     |

##### 3.1.4. Organska otapala

**TABLICA 4. Organska otapala korištena u istraživanju**

| KEMIKA LIJA         | PROIZVOĐAČ    |
|---------------------|---------------|
| 2-aminobenzamid 2AB | Sigma-Aldrich |

|                                 |               |
|---------------------------------|---------------|
| 2-pikolin boran PB              | Sigma-Aldrich |
| Dimetil sulfoksid DMSO          | Sigma         |
| Etanol                          | Sigma-Aldrich |
| Formijatna kiselina 98-100%     | Emsure        |
| Hladni acetonitril ACN 96%      | Fluka         |
| Igepal CA-360                   | Sigma         |
| Ledena octena kiselina 100%     | Emsure        |
| Natrijev dodecil sulfat SDS     | Sigma         |
| TRIS (hidroksimetil aminometan) | Sigma-Aldrich |

### 3.1.5. Otopine i puferi

**TABLICA 5. Otopine i puferi korišteni u istraživanju**

| KEMIKA LIJA                                                      | PROIZVOĐAČ/NAČIN IZRADE                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1xPBS, phosphate buffer saline                                   | Za 1L pufera: u 100ml 10xPBS dodati vodu do 0,9 L, podestiti pH s NaOH pa dodati ostatak vode do 1L                                                                                                                                                                                                        |
| 5xPBS, phosphate buffer saline                                   | Za 100ml: 50ml 10xPBS-a preli u menzuru od 100ml i do 100ml nadopuniti s ultra čistom vodom                                                                                                                                                                                                                |
| 10xPBS, phosphate buffer saline                                  | Za 100ml: u 80ml ultra čiste vode dodati 8,0028g NaCl, 1,3832g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,2964g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,1976g KCl. Promješati, provjeriti pH i titrirati sa standardnom otopinom da pH bude 6,6-6,8. Pretočiti u menzuru od 100ml i nadopuniti s ultra čistom vodom. |
| 20% EtOH u 20mM TRIS + 0,1M NaCl; pH 7,4; neutralizacijski pufer | Za 500ml: u 100ml etanola dodati 1,21g TRIS, 2,922g NaCl, doliti ultra čiste vode do 350ml te podesiti pH na 7,2 pomoću HCl. Doliti ostatak vode do 500 ml i filtrirati.                                                                                                                                   |
| 30% octena kiselina u DMSO                                       | Za 3ml: 0,9ml octene kiseline promješati s 2,1ml DMSO                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Alkalni standard za pH metar; pH Buffer Solution 9,21 ± 0,02     | Mettler Toledo GmbH                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Amonijev bikarbonat, 1M, neutralizacijski pufer                  | Za 100ml pufera: 7,906g amonij bikarbonata otopiti u 100ml ultračiste vode                                                                                                                                                                                                                                 |
| Igepal 4%                                                        | Za 100ml: u 80ml ultra čiste vode dodati 4ml Igepala, otopiti na mješalu pri 65°C, nadopuniti do 100ml s ultra čistom vodom                                                                                                                                                                                |
| Kiseli standard za pH metar; pH Buffer Solution 4,01 ± 0,02      | Mettler Toledo GmbH                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

|                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Otopina za obilježavanje N-glikana      | Za 1 uzorak: u 25 $\mu$ L 30% otopine octene kiseline u DMSO dodati 0,4mg 2-aminobenzamida i 1,12mg 2-pikolin borana                                                                                                                                                  |
| Pufer amonijevog formijata, 2M, pH 4,4  | Za 500ml: uliti 300ml ultra čiste vode u posudu od 500ml dodati 37,75ml formijatne kiseline, ohladiti, miješati na magnetnom mješaču te polako dodavati oko 75ml NH <sub>4</sub> OH do pH 4,2, nakon postizanja sobne temperature dodati NH <sub>4</sub> OH do pH 4,4 |
| Pufer formijatne kiseline, 0,1M, pH 2,5 | Za 500ml: u posudu od 500ml dodati 1,885ml formijatne kiseline te nadopuniti do 500ml s ultra čistom vodom                                                                                                                                                            |
| SDS 1,33%                               | U 100ml vode otopiti 1,33g SDS                                                                                                                                                                                                                                        |

### 3.1.6. Laboratorijska oprema

**TABLICA 6. Laboratorijska oprema korištena u istraživanju**

| OPREMA                                                                    | PROIZVOĐAČ        |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| AB54-S analitička vaga                                                    | Mettler Toledo    |
| ABgene PCR pločica                                                        | ThermoFisher      |
| AcroPrep 96 GHP 0,2 $\mu$ m filter pločica od 1ml                         | Pall              |
| Highland analitička vaga                                                  | ADAM              |
| Magnetic Stirrer MSH 300 magnetski mješač                                 | Biosan            |
| Mikropipete (obične i multikanalne uz nastavke)                           | Ranin             |
| NanoDrop 8000 Spektrofotometar                                            | Thermo Scientific |
| pH metar Seven Compact                                                    | Mettler Toledo    |
| Pločice za sakupljanje uzoraka, polipropilen, volumena 1ml, za 96 uzoraka | Waters            |
| Shaker tresalica                                                          | GFL               |
| Vacuum manifold vakumska pumpa                                            | Pall Corporation  |
| Waters Acquity UPLC instrument                                            | Waters, Milford   |



### 3.2. Protokol pripreme uzoraka

#### 3.2.1. Randomizacija

Uzorke smo dobili miješanjem svih spremnika sa zamrznutim uzorcima kako bismo spriječili pojavljivanje predanalitički i analitičkih grešaka, te smo dodali na svaku mikrotitarsku pločicu po pet standarda koji su obrađeni na isti način kao i uzorci.

#### 3.2.2. Izolacija plazmatskog IgG s Protein G pločicom

Protein G pločica na sebi ima imobiliziran protein G koji ima izrazito veliku specifičnost vezanja imunoglobulina G. IgG ostaje očuvan nakon analize te ga možemo koristiti u više analiza, a sama pločica se može koristiti više desetaka puta ako se poštuju uvjeti ispiranja, pohrane i pripreme pločice.

##### Prekondicioniranje Protein G pločice

Prilikom ispiranja vakuumom tlak ne smije biti veći od 17 inHg, koristiti nastavke za pipetu od 1 mL za ovaj korak. Baciti pufer u kojem se nalazila pločica, zatim dodati 2 mL ultra čiste vode u svaku jažicu te isprati vakuumiranjem. Dodati 2 mL 1xPBS-a pa vakuumirati. Dodati 1 mL 0,1 M formijatne kiseline u svaku jažicu pa vakuumirati. S 2 mL 10xPBS-a neutralizirati pločicu te vakuumirati. Dodati 4 mL 1xPBS u svaku jažicu pa vakuumirati, no ostaviti oko 1 ml. Ne želimo je u potpunosti suhu.

##### Priprema uzoraka

Vorteksirati i centrifugirati uzorke plazme 3 minute na 13400 rpm ili 10 minuta na 3000 rpm. S nastavcima za pipete s filterima od 250 µL dodati standard plazme na unaprijed randomizirana mjesta u mikrotitarsku pločicu od 2 ml. Volumen standarda i plazme je 70 µL. Nastavcima od 1 ml dodati 490 µL 1xPBS u svaki uzorak. Zatim prenijeti razrijeđeni uzorak s nastavcima od 1 ml s filterima na 1 ml Acro Prep GHP 0,45 µm filter pločicu te ju skupiti u 2 ml mikrotitarsku pločicu koristeći vakuum do 10 inHg.

##### Vezanje i čišćenje IgG

Filtriranu plazmu (uzeti da je volumen cca 700 µL) prenijeti na pločicu Protein G koristeći nastavke od 1 mL s filterima i to dva puta, te zatim vakuumirati. Tlak ne smije prijeći 17 inHg te za iduće korake koristiti nastavke za pipete od 1 mL. Tri puta isprati svaku jažicu s 2 mL 1xPBS te vakuumom odstraniti tekućinu.

##### Elucija IgG

U ovom koraku tlak vakuuma ne smije prijeći 10 inHg. Protein G pločicu staviti iznad mikrotitarske pločice od 2 mL. Eluirati IgG s 0,1 M formijatnom kiselinom vakuumirati na pločicu od 2 ml. Dodati 170µL 1M amonijevog bikarbonata s nastavcima od 300 µL kako bi

se neutralizirala otopina i resuspendirati s pipetom. Pokriti s aluminijskom folijom pločicu s eluatom IgG te ju staviti na tresilicu dok ne budemo spremni za mjerenje IgG koncentracije.

#### Regeneracija i pohrana pločice Protein G

Koristiti nastavke za pipete od 1mL te paziti da tlak ne prijeđe 17 inHg. Dodati 2 mL 0,1 M formijatne kiseline pa vakuumirati. Dodati 2 mL 10xPBS u svaku jažicu pa vakuumirati. Dodati 4 mL 1xPBS p vakuumirati. Dodati 1 mL 20% etanola u 20mM TRIS-u i 0,1M NaCl, vakuumirati. Vratiti kapice na Protein G pločicu te dodati 1 mL 20% etanola u 20mM TRIS-u i 0,1M NaCl i pohraniti na 4°C.

#### Mjerenje koncentracija IgG i pohrana

Za UPLC analizu uzeti ćemo alikvot od 300 µL IgG eluata u pločicu od 1 mL, osušiti u Speed Vac i zamrznuti na -20°C do analize. Za MS analizu pločicu od 2mL s IgG eluatom zamrznuti na -20°C do analize. Provjera procedure je mjerenje koncentracije IgG na NanoDrop 800 spektrofotometru. Ultra čistu vodu koristiti kao slijepu probu, nakon toga mjeriti uzorke u mikrolitarskim količinama.

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

#### Denaturacija

Nakon što su postigli sobnu temperaturu dodati 1,33% SDS, 4% Igepal i 5xPBS u uzorak sljedećim redom. U svaku jažicu staviti 30 µL 1,33% SDS-a, te promiješati SDS s uzorkom pipetiranjem. Pločica se zatvori adhezivnom folijom i inkubira 10 minuta na 65°C. Nakon inkubacije ostaviti pločicu 30 minuta na sobnoj temperaturi da se ohladi. Nastavcima od 250 µL dodati u svaku jažicu po 10 µL 4% Igepala te promiješati otopinu pipetiranjem što aktivira SDS kojeg smo već dodali. Na tresilicu staviti pločicu s uzorcima na 15 minuta.

#### Deglikozilacija

Falkonicu s enzimom PNGazom F promiješati na tresalici te za svaki uzorak pomiješati 0,12 µL enzima i 10 µL 5xPBS. Pritom što manje držati u rukama falkonicu s enzimom jer se toplinom deaktivira. S nastavcima od 250 µL dodati po 10 µL enzimske miješavne, koja je svježe pripremljena, svakoj jažici i suspendirati pipetiranjem. Pločicu zatvoriti s adhezivnom folijom te inkubirati na 37°C tijekom 18 sati.

### 3.2.4. Obilježavanje i pročišćavanje N- glikana

#### Priprema otopine za obilježavanje

Prije vaganja 2 pikolin boran ostaviti na sobnoj temperaturi zbog lakšeg vaganja. Za jedan uzorak dodati 25 µL 30% octene kiseline u DMSO-u u 0,48 mg 2 aminobenzamida.

Vorteksirati do potpunog otapanja te onda dodati još 1,12 mg 2 pikolin borana. Opet vorteksirati do potpunog otapanja.

#### Obilježavanje uzorka

Koristeći 250 µL nastavke za pipetiranje dodati 25 µL otopine za obilježavanje u svaki uzorak te promiješati pipetiranjem. S adhezivnom folijom prekriti pločicu te staviti ju na tresilicu na 10 minuta. Zatim ju staviti na inkubaciju na 65°C kroz dva sata. Nakon inkubacije ostaviti pločicu na pola sata da se ohladi na sobnoj temperaturi da bi uzorak bio spreman na nanošenje na 1 ml filter AcroPrep GHP 0.2 µm

#### Prekondicioniranje GHP pločice

Za ovaj korak koristiti nastavke od 300 µL. Pipetirati 200 µL svježe pripremljenog 70% etanola u svaku jažicu te vakuumirati. Zatim pipetirati 200 µL ultra čiste vode u svaku jažicu te vakuumirati. U svaku jažicu dodati 200 µL hladnog 96% ACN-a te opet vakuumirati.

#### Nanošenje obilježenih N-glikana na GHP pločicu i pročišćavanje

Za ovaj korak koristiti nastavke od 1 mL. Dodati 700 µL hladnog 100% ACN-a u svaki uzorak, promiješati pipetiranjem te prenijeti cijeli volumen uzorka od oko 800 µL na GHP pločicu. Inkubirati 2 minute, pa isprati vakuumiranjem te paziti da tlak ne prijeđe 2 inHg. Pipetirati 200 µL hladnog i svježeg 96% ACN-a u svaku jažicu te vakuumirati, te ovaj korak s 96% ACN-om ponoviti još tri puta. Nakon završnog ispiranja GHP pločicu staviti na stalak pločicu od 1 ili 2 mL. Nanijeti 200 µL 96% ACN-a u svaku jažicu te centrifugirati 5 minuta na 1000 rpm.

#### Eluiranje označenih N-glikana

GHP pločicu staviti na vrh čiste i označene ABgen PCR pločice. S nastavcima od 300 µL dodati 90 µL ultra čiste vode na svaki uzorak i staviti na tresilicu 15 minuta. Centrifugirati GHP pločicu s ABgen pločicom 5 minuta na 1000 rpm kako bi se skupila prva frakcija eluata. Ponovno s nastavcima od 300 µL dodati 90 µL ultra čiste vode na svaki uzorak te pločice staviti na tresilicu 15 minuta. Centrifugirati 5 minuta na 1000 rpm za drugu frakciju eluata. Ukupan volumen eluata trebao bi biti oko 180 µL. Nakon provjere zatvoriti PCR pločicu s PCR poklopcem te pohraniti u zamrzivač.

### 3.3. Analiza uzoraka

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

Nakon razdvajanja analiziramo N-glikane HILIC-UPLC metodom na Waters Acquity UPLC instrumentu. Stacionarna faza, odnosno kolona, bila je veličine 2,1x150 mm i veličine čestica 1,7µm. Mobilna faza se sastoji od otapala A, 100mM amonijev formijat pH 4,4 i

otapalo B ACN u omjerima koji se nalaze u tablici 7. Valna duljina ekscitacije fluorescentnog detektora je na 250nm, a detekcija 42nm. Temperatura kolone je 25°C, a uzorka 10°C.

Nakon završetka analize provedena je obrada podataka u Empower softwareu. Dobivene površine pikova se ručno i automatski integriraju, te statistički obrađuju u MedCal v. 18.9. Sve skupine su uspoređene s Mann-Whitney testom, a s obzirom na to da imamo 24 glikanske skupine, Bonferroni korigirana p vrijednost nam je 0,002.

**TABLICA 7. Udio otapala A i B tijekom analize**

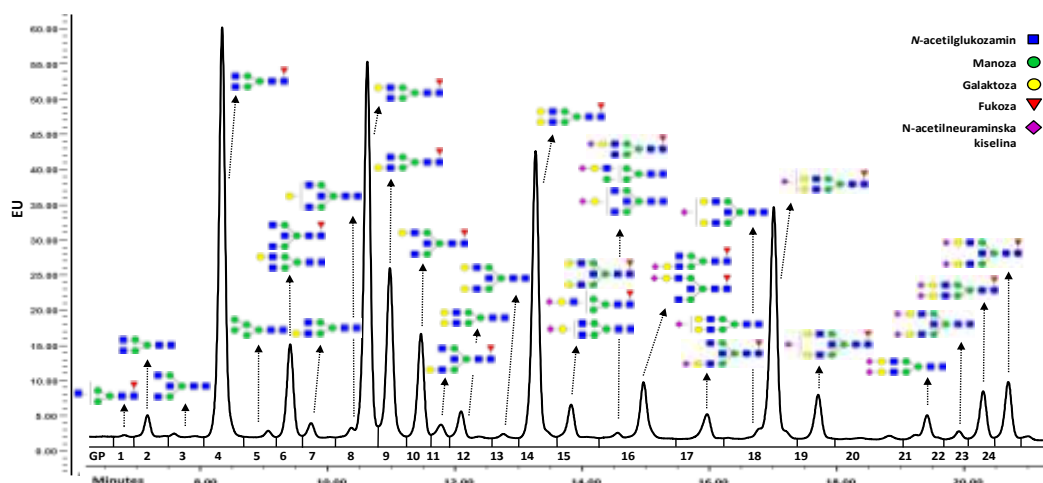
| <b>VRIJEME /min</b> | <b>PROTOK /ml/min</b> | <b>%A</b> | <b>%B</b> |
|---------------------|-----------------------|-----------|-----------|
| 0                   | 0,561                 | 30,0      | 70,0      |
| 1,47                | 0,561                 | 30,0      | 70,0      |
| 24,81               | 0,561                 | 47,0      | 53,0      |
| 25,50               | 0,250                 | 70,0      | 30,0      |
| 27,00               | 0,250                 | 70,0      | 30,0      |
| 28,00               | 0,250                 | 30,0      | 70,0      |
| 31,50               | 0,561                 | 30,0      | 70,0      |

## 4. REZULTATI

### 4.1. Primjer kromatograma plazmatskih N-glikana

HILIC-UPLC metodom glikani s manjim brojem ugljikohidratnih jedinica s obzirom na to da su manje hidrofilni prije izlaze s kolone. Prije izlaze glikani s manjim brojem podjedinica jer su manji, a razgranati glikani se dulje zadržavaju u koloni.

Na slici 2 možemo vidjeti primjer kromatograma plazmatskih N-glikana koji je dobiven ovom metodom. Podijeljen je u 24 skupine koje sadržavaju određene glikanske strukture. Površina ispod svakog pika predstavlja udio glikana u uzorku. Na apscisi je retencijsko vrijeme uzorka, a na ordinati intenzitet fluorescencije koja je izmjerena u određenom trenutku.



Slika 3. Primjer kromatograma N- glikana dobiven HILIC-UPLC analizom

### 4.2. Općeniti statistički prikaz dobivenih N-glikana

U tablici 8 možemo vidjeti općeniti statistički profil svih 24 skupina N-glikana koje smo izolirali u ovom istraživanju.

TABLICA 8. Opće statističke karakteristike izoliranih skupina N-glikana

|     | Minuimum | Maximum | Median  |
|-----|----------|---------|---------|
| GP1 | 0,03694  | 0,2551  | 0,07836 |
| GP2 | 0,04636  | 1,7488  | 0,2559  |
| GP3 | 0,04576  | 0,2037  | 0,09461 |

|      |         |         |         |
|------|---------|---------|---------|
| GP4  | 11,3240 | 39,5860 | 21,3139 |
| GP5  | 0,06448 | 0,2815  | 0,1105  |
| GP6  | 1,8992  | 11,2158 | 3,8053  |
| GP7  | 0,03939 | 0,7773  | 0,1818  |
| GP8  | 16,2332 | 24,8780 | 21,3430 |
| GP9  | 5,5495  | 11,5487 | 8,5112  |
| GP10 | 1,9981  | 6,6957  | 3,7825  |
| GP11 | 0,2323  | 0,8617  | 0,4100  |
| GP12 | 0,04580 | 2,2213  | 0,3358  |
| GP13 | 0,08905 | 0,3513  | 0,1523  |
| GP14 | 8,5310  | 26,6329 | 17,1377 |
| GP15 | 0,6827  | 2,6148  | 1,2885  |
| GP16 | 1,4476  | 3,4224  | 2,5020  |
| GP17 | 0,4578  | 1,3693  | 0,6778  |
| GP18 | 5,9059  | 19,4634 | 11,0570 |
| GP19 | 0,7396  | 3,5018  | 1,4654  |
| GP20 | 0,1004  | 0,3664  | 0,2001  |
| GP21 | 0,3503  | 1,9571  | 0,5003  |
| GP22 | 0,03201 | 0,2813  | 0,08747 |
| GP23 | 1,0192  | 4,1563  | 2,1741  |
| GP24 | 0,7129  | 2,6437  | 1,4231  |

#### 4.3. Usporedba prema spolu

Upotrebom Mann-Whitneyevog testa napravili smo razdiobu glikana prema spolu tj. međusobno usporedili svih 24 glikanskih skupina dobili statistički značajne razlike za skupine N-glikana GP10, GP11, GP15, GP23. Statistička značajnost postavljenja je na p vrijednost 0,002. Rezultati testa su prikazani u tablici 9.

**TABLICA 9. Usporedba razlike rezultata N-glikana prema spolu**

| Skupina     | M minimum     | F minimum     | M maksimum    | F maksimum    | M medijan     | F medijan     | P vrijednost  |
|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| GP1         | 0,04551       | 0,03694       | 0,2551        | 0,1641        | 0,07941       | 0,07674       | 0,1681        |
| GP2         | 0,04636       | 0,05182       | 1,1968        | 1,7488        | 0,2791        | 0,2211        | 0,0256        |
| GP3         | 0,05730       | 0,04576       | 0,2037        | 0,1970        | 0,09799       | 0,09010       | 0,0643        |
| GP4         | 12,0318       | 11,3240       | 39,5860       | 37,3735       | 21,3139       | 21,2763       | 0,1714        |
| GP5         | 0,06448       | 0,07286       | 0,2815        | 0,1895        | 0,1136        | 0,1030        | 0,0237        |
| GP6         | 1,8992        | 1,9685        | 11,2158       | 9,2396        | 3,7196        | 3,8915        | 0,3951        |
| GP7         | 0,03939       | 0,05537       | 0,6426        | 0,7773        | 0,1929        | 0,1680        | 0,1681        |
| GP8         | 16,6238       | 16,2332       | 24,8780       | 24,5580       | 21,7329       | 20,9333       | 0,0047        |
| GP9         | 5,5495        | 5,6555        | 11,5487       | 11,3010       | 8,5870        | 8,3653        | 0,8137        |
| <b>GP10</b> | <b>1,9981</b> | <b>2,1719</b> | <b>6,3564</b> | <b>6,6957</b> | <b>3,4990</b> | <b>4,0840</b> | <b>0,0001</b> |
| <b>GP11</b> | <b>0,2323</b> | <b>0,2503</b> | <b>0,8017</b> | <b>0,7628</b> | <b>0,3778</b> | <b>0,4319</b> | <b>0,0001</b> |
| GP12        | 0,04580       | 0,04961       | 1,3721        | 2,2213        | 0,3695        | 0,3109        | 0,5938        |
| GP13        | 0,08905       | 0,1032        | 0,2654        | 0,3513        | 0,1527        | 0,1515        | 0,4430        |
| GP14        | 8,7864        | 8,5310        | 26,6329       | 24,9264       | 16,9057       | 17,3195       | 0,0656        |
| <b>GP15</b> | <b>0,6827</b> | <b>0,8104</b> | <b>2,2772</b> | <b>2,6148</b> | <b>1,2275</b> | <b>1,3789</b> | <b>0,0001</b> |
| GP16        | 1,4476        | 1,6399        | 3,4224        | 3,1763        | 2,4735        | 2,5130        | 0,6476        |
| GP17        | 0,4578        | 0,451         | 1,2929        | 1,3693        | 0,6797        | 0,6765        | 0,8289        |
| GP18        | 6,1064        | 5,9059        | 19,4634       | 19,1728       | 10,9882       | 11,2983       | 0,5190        |
| GP19        | 0,7396        | 0,8710        | 3,5018        | 2,3094        | 1,4292        | 1,5205        | 0,0353        |
| GP20        | 0,1004        | 0,1106        | 0,3604        | 0,3173        | 0,1984        | 0,2025        | 0,8929        |
| GP21        | 0,3503        | 0,3768        | 1,9571        | 0,8738        | 0,5068        | 0,4957        | 0,2576        |
| GP22        | 0,03201       | 0,03827       | 0,1942        | 0,2813        | 0,08715       | 0,08784       | 0,5155        |
| <b>GP23</b> | <b>1,0192</b> | <b>1,2459</b> | <b>4,1563</b> | <b>3,7409</b> | <b>2,3134</b> | <b>2,0874</b> | <b>0,0021</b> |
| GP24        | 0,7129        | 0,8512        | 2,2236        | 2,6437        | 1,3937        | 1,4964        | 0,0490        |

#### 4.4. Usporedba glikozilacije IgG-a kod ženskog spola u pubertetskoj i prepubertetskoj dobi

Ukupno smo imali 110 uzoraka ženskih ispitanika, te smo tu skupinu podijelili na pubertetsku i prepubertetsku dob i usporedili je. Prema Rudan 2004 granicu smo postavili na 10,5 godina, svi ispitanici ispod te dobi su nam u prepubertetskoj skupini, njih 54, a preostalih 56 su u pubertetskoj skupini. Skupine N-glikana u GP1, GP3, GP4, GP9, GP12, GP15, GP19, GP20 pokazale su statistički značajnu razliku. U tablici 10 prikazani su svi rezultati.

**TABLICA 10. Usporedba razlike rezultata N-glikana kod žena ovisno o dobi**

| Skupina     | F <10,5<br>minimum | F >10,5<br>minimum | F<10,5<br>maksimum | F>10,5<br>maksimum | F<10,5<br>medijan | F>10,5<br>medijan | P<br>vrijednost |
|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| <b>GP1</b>  | <b>0,04369</b>     | <b>0,03694</b>     | <b>0,1641</b>      | <b>0,1598</b>      | <b>0,09136</b>    | <b>0,06604</b>    | <b>0,0001</b>   |
| GP2         | 0,05182            | 0,07704            | 0,8546             | 1,7488             | 0,2136            | 0,2226            | 0,4694          |
| <b>GP3</b>  | <b>0,05800</b>     | <b>0,04576</b>     | <b>0,1970</b>      | <b>0,1674</b>      | <b>0,1044</b>     | <b>0,08073</b>    | <b>0,0001</b>   |
| <b>GP4</b>  | <b>13,7286</b>     | <b>11,3240</b>     | <b>37,3735</b>     | <b>35,5955</b>     | <b>23,3695</b>    | <b>18,8224</b>    | <b>0,0002</b>   |
| GP5         | 0,07843            | 0,07286            | 0,1895             | 0,1688             | 0,1155            | 0,09794           | 0,0022          |
| GP6         | 2,4648             | 1,9685             | 9,2396             | 7,4186             | 4,0506            | 3,7298            | 0,0918          |
| GP7         | 0,05537            | 0,08678            | 0,7773             | 0,6294             | 0,1425            | 0,2064            | 0,0028          |
| GP8         | 16,2332            | 16,2468            | 24,5580            | 24,4587            | 21,0389           | 20,8854           | 0,3666          |
| <b>GP9</b>  | <b>5,6555</b>      | <b>6,6588</b>      | <b>10,8203</b>     | <b>11,3010</b>     | <b>7,7706</b>     | <b>8,9890</b>     | <b>0,0002</b>   |
| GP10        | 2,5599             | 2,1719             | 5,7663             | 6,6957             | 3,8258            | 4,2643            | 0,0022          |
| GP11        | 0,2567             | 0,2503             | 0,6318             | 0,7628             | 0,4224            | 0,4459            | 0,0224          |
| <b>GP12</b> | <b>0,04961</b>     | <b>0,1268</b>      | <b>1,7220</b>      | <b>2,2213</b>      | <b>0,2485</b>     | <b>0,4395</b>     | <b>0,0011</b>   |
| GP13        | 0,1032             | 0,1153             | 0,2292             | 0,3513             | 0,1485            | 0,1574            | 0,0403          |
| GP14        | 9,1697             | 8,5310             | 23,7113            | 24,9264            | 16,7121           | 1,4728            | 0,0091          |
| <b>GP15</b> | <b>0,8104</b>      | <b>0,9035</b>      | <b>2,0375</b>      | <b>2,6148</b>      | <b>1,2190</b>     | <b>1,5287</b>     | <b>0,0001</b>   |
| GP16        | 1,8126             | 1,6399             | 3,1294             | 3,1763             | 2,4405            | 2,5721            | 0,1026          |
| GP17        | 0,4581             | 0,4941             | 1,3693             | 1,1933             | 0,6578            | 0,6928            | 0,2585          |
| GP18        | 6,7264             | 5,9059             | 19,1728            | 15,8176            | 11,0357           | 11,3840           | 0,8342          |
| <b>GP19</b> | <b>0,8710</b>      | <b>1,1120</b>      | <b>2,3094</b>      | <b>2,2765</b>      | <b>1,3479</b>     | <b>1,6388</b>     | <b>0,0001</b>   |



|             |               |               |               |               |               |               |               |
|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>GP20</b> | <b>0,1106</b> | <b>0,1563</b> | <b>0,2599</b> | <b>0,3173</b> | <b>0,1834</b> | <b>0,2184</b> | <b>0,0001</b> |
| GP21        | 0,3768        | 0,3794        | 0,8110        | 0,8738        | 0,4802        | 0,5070        | 0,1014        |
| GP22        | 0,03827       | 0,04766       | 0,2813        | 0,1435        | 0,08555       | 0,09071       | 0,6887        |
| GP23        | 1,2459        | 1,3702        | 3,7409        | 3,4272        | 2,1863        | 2,0356        | 0,1636        |
| GP24        | 0,8512        | 1,0414        | 2,3834        | 2,6437        | 1,3992        | 1,5631        | 0,0188        |

#### 4.5. Usporedba kod muškog spola u pubertetskoj i prepubertetskoj dobi

Prema Rudan 2004 smo se ravnali opet kako bismo odredili granicu razlike za muški spol u prepubertetskoj dobi što nam je ispod 12,5 godina života, te imamo 89 takvih ispitanika, a preostalih 50 su stariji od 12,5 godina života. Ukupan broj uzoraka je 139. Koristili smo za usporedbu Mann Whitney test s p vrijednosti 0,002 te smo dobili statističku značajnu razliku za sljedeće skupine N-glikana: GP7, GP9, GP12, GP13, GP15, GP19. Svi podatci su u tablici 11.

**TABLICA 11. Usporedba razlike rezultata N-glikana kod muškaraca ovisno o dobi**

| Skupina     | M <12,5<br>minimum | M >12,5<br>minimum | M <12,5<br>maksimum | M >12,5<br>maksimum | M <12,5<br>medijan | M >12,5<br>medijan | P<br>vrijednost |
|-------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| GP1         | 0,05059            | 0,04551            | 0,2551              | 0,1281              | 0,08426            | 0,07237            | 0,0034          |
| GP2         | 0,04636            | 0,06075            | 1,1968              | 1,1746              | 0,2318             | 0,3511             | 0,0024          |
| GP3         | 0,05730            | 0,05742            | 0,1653              | 0,2037              | 0,09662            | 0,1027             | 0,4168          |
| GP4         | 14,9931            | 12,0318            | 39,5860             | 31,8174             | 22,3244            | 20,5575            | 0,0355          |
| GP5         | 0,06448            | 0,07333            | 0,2815              | 0,2468              | 0,1136             | 0,1139             | 0,4451          |
| GP6         | 2,2519             | 1,8992             | 11,2158             | 8,5683              | 3,8446             | 3,6488             | 0,6418          |
| <b>GP7</b>  | <b>0,03939</b>     | <b>0,07293</b>     | <b>0,6426</b>       | <b>0,6347</b>       | <b>0,1584</b>      | <b>0,2365</b>      | <b>0,0001</b>   |
| GP8         | 16,6238            | 17,9676            | 24,8780             | 24,2682             | 21,7329            | 21,7602            | 0,4880          |
| <b>GP9</b>  | <b>5,5495</b>      | <b>7,0493</b>      | <b>11,5487</b>      | <b>11,1651</b>      | <b>8,2428</b>      | <b>8,9875</b>      | <b>0,0001</b>   |
| GP10        | 1,9981             | 2,5098             | 6,3564              | 5,8771              | 3,3636             | 3,7872             | 0,0152          |
| GP11        | 0,2323             | 0,2607             | 0,8617              | 0,6816              | 0,3614             | 0,4024             | 0,0391          |
| <b>GP12</b> | <b>0,04580</b>     | <b>0,1430</b>      | <b>1,3721</b>       | <b>1,0460</b>       | <b>0,3055</b>      | <b>0,4540</b>      | <b>0,0020</b>   |
| <b>GP13</b> | <b>0,08905</b>     | <b>0,1277</b>      | <b>0,2507</b>       | <b>0,2654</b>       | <b>0,1378</b>      | <b>0,1673</b>      | <b>0,0001</b>   |

|             |               |               |               |               |               |               |               |
|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| GP14        | 8,7864        | 10,8505       | 23,5295       | 26,6329       | 17,1354       | 16,8892       | 0,9057        |
| <b>GP15</b> | <b>0,6827</b> | <b>1,0254</b> | <b>2,2772</b> | <b>2,1143</b> | <b>1,1540</b> | <b>1,3255</b> | <b>0,0001</b> |
| GP16        | 1,6580        | 1,4476        | 3,4224        | 3,1922        | 2,4523        | 2,5884        | 0,0748        |
| GP17        | 0,4578        | 0,5242        | 1,2929        | 1,0845        | 0,6743        | 0,6927        | 0,2612        |
| GP18        | 6,1064        | 6,3052        | 17,8651       | 19,4634       | 11,2545       | 10,7322       | 0,0741        |
| <b>GP19</b> | <b>0,7396</b> | <b>0,9908</b> | <b>2,3305</b> | <b>3,5018</b> | <b>1,3204</b> | <b>1,5611</b> | <b>0,0001</b> |
| GP20        | 0,1004        | 0,1327        | 0,3604        | 0,3135        | 0,1963        | 0,2028        | 0,0928        |
| GP21        | 0,3503        | 0,3827        | 1,9571        | 0,6889        | 0,4943        | 0,5329        | 0,0065        |
| GP22        | 0,03201       | 0,03936       | 0,1942        | 0,1622        | 0,08537       | 0,09171       | 0,1063        |
| GP23        | 1,0192        | 1,0635        | 3,8881        | 4,1563        | 2,3789        | 2,2111        | 0,7855        |
| GP24        | 0,7746        | 0,7129        | 2,1138        | 2,2236        | 1,3338        | 1,5174        | 0,0038        |

## 5. RASPRAVA

U plazmi mlađe djece, od 6 do 18 godina života, Pučić i sur., 2012 su pokazali prisutnost veće količine složenijih glikanskih struktura (tetra- i trisijaliziranih N-glikana) te da se s godinama sržna fukozacija N-glikana plazme smanjuje kao i razina agalaktozilacije, dok se povećava digalaktolizacija i disijalizacija. U male djece nisu pronašli razlike N- glikozilacije s obzirom na spol, već tek u pubertetskoj dobi.

Ding i sur., 2011 su utvrdili statističku značajnu razliku u N-glikozilaciju ovisno o spolu. Više sržno  $\alpha$ -1,6-fukoziliranih glikana je nađeno u žena, dok su u muškaraca to  $\alpha$ -1,3-fukozilirani N-glikani, no bitno je napomenuti da se u navedenom istraživanju radi o dobnoj skupini od 31 godine na više.

Kaneko i sur., 2006 su utvrdili povezanost autoimunih bolesti s drugačijom sijalinizacijom Fc domene IgG što dovodi do promjene njene funkcije u organizmu. Također je utvrđena povezanost između gena koji su odgovorni za N-glikozilaciju imunoglobulina G i dijabetesa tipa I (Lauc i sur., 2013)

Ovim istraživanjem je utvrđena statistički značajna razlika u profilu N- glikana imunoglobulina G u djece pretpubertetske i pubertetske dobi, što je u korelaciji s malobrojnim istraživanjima na tu temu. Također je pronađena razlika N-glikana IgG u muške i ženske djece i adolescenata što se slaže s ranijim istraživanjima.

Nova istraživanja terapija autoimunih bolesti izazvanih poremećajem N-glikozilacije imunoglobulina G su dosta obećavajuća, te postoji veliki potencijal za nova otkrića u terapiji i samoj etiologiji autoimunih bolesti pa tako i dijabetesa tipa I (Albert i sur., 2008; Collin i sur., 2008; Burton i Dwek, 2006; Kaneko i sur., 2006).

## 6. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada je bio utvrditi postoji li razlika u glikozilaciji imunoglobulina G kod djece i adolescenata oboljelih od dijabetesa tipa I, te utvrditi postoji li razlika N- glikana IgG ovisno o dobi i spolu istih ispitanika.

- Postoje razlike između N-glikozilacije imunoglobulina G ovisno o pretpubertetskoj i pubertetskoj dobi. Kod ženskog spola je ona statistički značajna u 8 glikana, kod muškog spola u 6 glikana.
- Kod razlike N-glikozilacije ovisno o dobi, u oba spola razlika je statistički značajna u ista četiri glikana.
- Postoje razlike u N-glikozilaciji ovisno o spolu u ispitanika s bolesti dijabetesom tipa I u četiri glikana IgG.
- Jedna skupina N-glikana GP15 je različita ovisno o dobi i spolu u dijabetesu tipa I, te je svakako zanimljivija za buduća istraživanja.
- S obzirom na to da su N-glikani promjenjivi u fiziološkom i patofiziološkom stanju, za bolje razumijevanje bolesti bit će potrebno još budućih istraživanja koja će rasvijetliti postoji li između ovih razlika nešto što do sada nismo znali o etiologiji i razvoju dijabetesa tipa I, te pomoći u ranijoj dijagnozi i učinkovitijoj terapiji.

## 7. LITERATURA

1. Albert H, Collin M, Dudziak D, Ravetch JV, Nimmerjahn F. In vivo enzymatic modulation of IgG glycosylation inhibits autoimmune disease in an IgG subclass-dependent manner. *PNAS*, 2008, 105, 15005-15009.
2. Burton DR, Dwek RA. Immunology sugar determines antibody activity. *Science*, 2006, 313, 627–628.
3. Collin M, Shannon O, Bjorck L. IgG glycan hydrolysis by a bacterial enzyme as a therapy against autoimmune conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105, 4265–4270.
4. Ding N, Nie H, Sun X, Sun W, Qu Y, Liu X, Yao Y, Liang X, Chen CC, Li Y. Human serum N-glycan profiles are age and sex dependent. *Age Ageing*, 2011, 40, 568-575.
5. Gornik O, Lauc G. Glycosylation of Serum Proteins in Inflammatory Diseases. *Disease Markers*, 2008, 25, 267-278.
6. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2016. godinu, 2017, Zagreb, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, str. 322.
7. International Diabetes Federation, 2018, <https://www.idf.org/>, pristupljeno 25.8.2018.
8. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science*, 2006, 313, 670-673.
9. Knezevic A, Gornik O, Polasek O, Pucic M, Redzic I, Novokmet M, Rudd P. M, Wright AF, Campbell H, Rudan I, Lauc G. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology* 2010, 20, 959–969.
10. Krištić J, Vučković F, Menni C, Klarić L, Keser T, Beceheli I, Pučić-Baković M, Novokmet M, Mangino M, Thaqi K, Rudan P, Novokmet N, Šarac J, Missoni S, Kolčić I, Polašek O, Rudan I, Campbell H, Hayward C, Aulchenko Y, Valdes A, Wilson JF, Gornik O, Primorac D, Zoldoš V, Lauc G. Glycans Are a Novel Biomarker of Chronological and Biological Ages. *JGA*, 2014, 69, 779–789.
11. Lauc G, Huffman JE, Pučić M, Zgaga L, Adamczyk B, Mužinić A, Novokmet M, Polašek O, Gornik O, Krištić J, Keser T, Vitart V, Scheijen B, Uh HW, Molokhia M, Patrick AL, McKeigue P, Kolčić I, Lukić IK, Swann O, van Leeuwen FN, Ruhaak RL, Houwing-Duistermaat JJ, Slagboom PE, Beekman M, de Craen AJM, Deelder AM, Zeng Q, Wang W, Hastie ND, Gyllenstein U, Wilson JF, Wuhler M, Wright AF, Rudd PM, Hayward C, Aulchenko Y, Campbell H, Rudan I. Loci Associated with N-

- Glycosylation of Human Immunoglobulin G Show Pleiotropy with Autoimmune Diseases and Haematological Cancers. *PLOS Genetics*, 2013, DOI: 10.1371/journal.pgen.1003225.
12. Luopajarvi K, Savilahti E, Virtanen SM, Ilonen J, Knip M, Akerblom HK, Vaarala O. Enhanced levels of cow's milk antibodies in infancy in children who develop type 1 diabetes later in childhood. *Pediatr Diabetes*, 2008, 9, 434-441.
  13. MSD priručnik dijagnostike i terapije, 2014., <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik>, pristupljeno 1.8.2018.
  14. Parekh R, Roitt I, Isenberg D, Dwek R, Rademacher T. Age-related galactosylation of the N-linked oligosaccharides of human serum IgG. *JEM*, 1988, 167, 1731 -1736.
  15. Pucic M, Muzinic A, Novokmet M, Skledar M, Pivac N, Lauc G, Gornik O. Changes in plasma and IgG N-glycome during childhood and adolescence. *Glycobiology*, 2012, 22, 975-982.
  16. Rudan V. Normalni adolescentni razvoj. *MEDIX*, 2004, 52, 37-38.
  17. Vanhooren V, Desmyter L, Liu XE, Cardelli M, Franceschi C, Federico A, Libert C, Laroy W, Dewaele S, Contreras R, Chen C. N-glycomic changes in serum proteins during human aging. *Rejuvenation Res*, 2007, 10, 521–531a.
  18. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. Essentials of Glycobiology: Structural Basis of Glycan Diversity; N-Glycans; Structures Common to Different Glycans; Principles of Glycan Recognition; Structural Analysis of Glycans. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
  19. Wu YL, Ding YP, Gao J, Tanaka Y, Zhang W. Risk factors and primary prevention trials for type 1 diabetes. *Int J Biol Sci*, 2013, 9, 666-679.
  20. Zauner G, Deelder AM, Wuhler M. Recent advances in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) for structural glycomics. *Electrophoresis*, 2011, 32, 3456-3466.

## 8. SAŽETAK/SUMMARY

### 8.1. Sažetak

Glikozilacija je složen enzimski proces posttranslacijskih modifikacija makromolekula koji nije u potpunosti poznat, no znamo da je pravilna glikozilacija ključna za normalnu funkciju makromolekula. Etiologija dijabetesa tipa I još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, no znamo da dolazi do pojave autoantitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića, te da se bolest pojavljuje u mlađoj populaciji. Glikozilacija imunoglobulina G je promijenjena u nekim autoimunim bolestima. Sve više ljudi obolijeva od dijabetesa, a predviđa se veći broj novooboljelih zbog suvremenog načina života.

Ovim radom ispitali smo uzorke plazme 249 pacijenta oboljelih od tipa dijabetesa I, te pokušali pronaći razlike između N-glikana imunoglobulina G ovisno o prepubertetskoj i pubertetskoj dobi te spolu. Dob pacijenata bila je od 25 dana života do 17 godina.

Koristeći HILIC-UPLC metodu za dobivanje glikanskog profila te Mann-Whitneyev test za obradu nezavisnih uzoraka nađena je razlika u N-glikanima ovisno o spolu i dobi pacijenata. Razlike u glikanima GP10, GP11, GP15 i GP23 su nađene ovisno o spolu svih dobnih skupina. Žensku skupinu smo podijelili na prepubertetsku dob do 10,5 godina života i pubertetsku dob te dobili statistički značajnu razliku u glikanima GP1, GP3, GP4, GP9, GP12, GP15, GP19, GP20. Za mušku skupinu prepubertetska dob je bila do 12,5 godina života te smo ju usporedili s pubertetskom skupinom i dobili razliku u GP7, GP9, GP12, GP13, GP15 i GP19. Daljnja istraživanja će biti potrebna da se utvrdi uzrok promjena, te mogu li se ta nova saznanja koristiti za dijagnostiku ili terapiju bolesti.

## 8.2. Summary

Glycosylation is a complex enzymatic process of posttranslational modification of macromolecules that is not fully known, but we know that the correct glycosylation is crucial for the normal function of macromolecules. The etiology of type I diabetes is still not fully clear, but we know there are autoantibodies to  $\beta$  cell islets of Langerhans, and that the disease is found in the younger population. Immunoglobulin G glycosylation has been altered in some autoimmune diseases. More and more people are suffering from diabetes, and a number of new patients are expected to rise due to modern lifestyle.

In this analysis we examined the plasma of 249 patients suffering from diabetes type I, and we tried to find differences between the N-glycan immunoglobulin G depending on pre-teenager and teenager age and sex. Age of patients was from 25 days to 17 years.

Using the HILIC-UPLC method for obtaining the glycemic profile and the Mann-Whitney test for independent assays, we found there was a difference in N-glycans depending on the sex and age of the patient. Differences in glycans GP10, GP11, GP15 and GP23 were found depending on the sex of all age groups. Women group was divided in preteenager age to 10.5 years of age and teenager age, and there was a statistically significant difference in glycan GP1, GP3, GP4, GP9, GP12, GP15, GP19, GP20. For the male group, the preteenager age was 12.5 years and we compared it to the teenager group and got the difference between GP7, GP9, GP12, GP13, GP15 and GP19. Further research will be needed to determine the cause of the change, and can that new findings be used to diagnose or treat the disease.



## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### Spolne i dobne razlike glikozilacije imunoglobulina G kod pacijenata s dijabetesom tipa 1

**Sabina Matejčić**

#### SAŽETAK

Glikozilacija je složen enzimski proces posttranslacijskih modifikacija makromolekula koji nije u potpunosti poznat, no znamo da je pravilna glikozilacija ključna za normalnu funkciju makromolekula. Etiologija dijabetesa tipa I još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, no znamo da dolazi do pojave autoantitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića, te da se bolest pojavljuje u mlađoj populaciji.

Ispitali smo uzorke plazme 249 pacijenta oboljelih od tipa dijabetesa I, te pokušali pronaći razlike između N-glikana imunoglobulina G ovisno o prepubertetskoj i pubertetskoj dobi te spolu. Dob pacijenata bila je od 25 dana života do 17 godina.

Koristeći HILIC-UPLC metodu za dobivanje glikanskog profila te Mann-Whitneyev test za obradu nezavisnih uzoraka nađena je razlika u N-glikanima ovisno o spolu i dobi pacijenata. Razlike u glikanima GP10, GP11, GP15 i GP23 su nađene ovisno o spolu svih dobnih skupina. Žensku skupinu smo podijelili na prepubertetsku dob do 10,5 godina života i pubertetsku dob te dobili statistički značajnu razliku u glikanima GP1, GP3, GP4, GP9, GP12, GP15, GP19, GP20. Za mušku skupinu prepubertetska dob je bila do 12,5 godina života te smo ju usporedili s pubertetskom skupinom i dobili razliku u GP7, GP9, GP12, GP13, GP15 i GP19. Daljnja istraživanja će biti potrebna da se utvrdi uzrok promjena.

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

Rad sadrži: 30 stranica, 3 grafičkih prikaza, 11 tablica i 20 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Glikozilacija, Imunoglobulin G, Diabetes, N-glikani, HILIC-UPLC

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Toma Keser**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Tamara Pavić**, znanstvena suradnica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2018.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of biochemistry and molecular biology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Gender and age differences in glycosylation of immunoglobulin G in type 1 diabetes patients

**Sabina Matejčić**

#### SUMMARY

Glycosylation is a complex enzymatic process of posttranslational modification of macromolecules that is not fully known, but we know that the correct glycosylation is crucial for the normal function of macromolecules. The etiology of type I diabetes is still not fully clear, but we know there are autoantibodies to  $\beta$  cell islets of Langerhans, and that the disease is found in the younger population.

In this analysis we examined the plasma of 249 patients suffering from diabetes type I, and we tried to find differences between the N-glycan immunoglobulin G depending on pre-teenager and teenager age and sex. Age of patients was from 25 days to 17 years.

Using the HILIC-UPLC method for obtaining the glycemic profile and the Mann-Whitney test for independent assays, we found there was a difference in N-glycans depending on the sex and age of the patient. Differences in glycans GP10, GP11, GP15 and GP23 were found depending on the sex of all age groups. Women group was divided in preteenager age to 10.5 years of age and teenager age, and there was a statistically significant difference in glycan GP1, GP3, GP4, GP9, GP12, GP15, GP19, GP20. For the male group, the preteenager age was 12.5 years and we compared it to the teenager group and got the difference between GP7, GP9, GP12, GP13, GP15 and GP19. Further research will be needed to determine the cause of the change.

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

Thesis includes: 30 pages, 3 figures, 11 tables and 20 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Glycosylation , Immunoglobulin G, Diabetes, N- glycans, HILIC-UPLC

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

Reviewers: **Toma Keser, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Tamara Pavić, Ph.D.** Associate of Science, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: september 2018.