Povezanost N-glikozilacije plazmatskih proteina s dobi kod djece sa šećernom bolesti tipa 1

Cvetko, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:163:195326

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Ana Cvetko

Povezanost N-glikozilacije plazmatskih proteina s dobi kod djece sa šećernom bolesti tipa 1

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

ZAHVALA

Od srca zahvaljujem dragoj mentorici, izv.prof.dr.sc Olgi Gornik na savjetima i pomoći oko izrade diplomskog rada, ali i tijekom studija. Zahvaljujem i dr.sc. Tomi Keseru na pomoći oko izrade eksperimentalnog dijela rada te Najdi Selak, mag.pharm., na svim savjetima, pomoći i druženju tijekom izrade diplomskog rada.

Hvala mojim roditeljima i braći na neprekidnoj podršci i ljubavi tijekom studija te svim prijateljima i dečku jer su uvijek bili uz mene.

SADRŽAJ

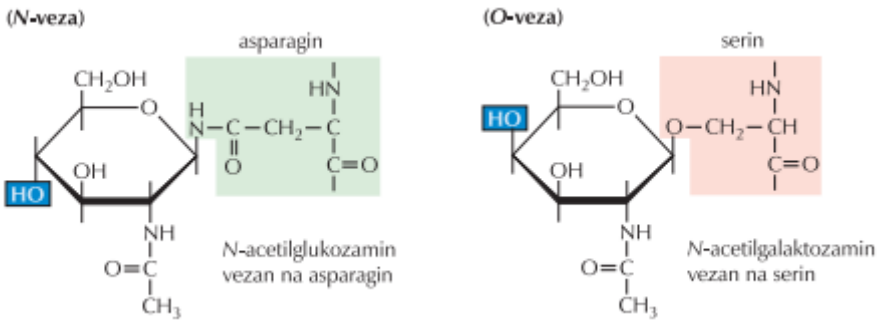
1. UVOD ... 1
1.1. GLIKOZILACIJA ... 1
1.1.1. Biosinteza O-vezanih glikana ... 2
1.1.2. Biosinteza N-vezanih glikana ... 3
1.1.3. Tipovi N-vezanih glikana ... 7
1.1.4. Glikozilacija u dječjoj dobi ... 7
1.2. ŠEĆERNA BOLEST ... 8
1.2.1. Šećerna bolest i glikozilacija ... 10
1.3. HILIC-UPLC (Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama) ... 10
2. OBRAZLOŽENJE TEME ... 12
3. MATERIJALI I METODE ... 13
3.1. MATERIJALI ... 13
3.1.1. Anorganske kemikalije ... 13
3.1.2. Organske kemikalije ... 13
3.1.3. Biološki materijali ... 13
3.1.4. Otopine i puferi ... 14
3.1.5. Laboratorijska oprema i pribor ... 15
3.2. ISPITANICI ... 15
3.3. PROTOKOL PRIPREME UZORAKA ... 16
3.3.1. Randomizacija uzoraka ... 16
3.3.2. Izolacija N-glikana s plazmatskih glikoproteina ... 16
3.3.3. Obilježavanje, pročišćavanje i ispiranje N-glikana plazme ... 16
3.4. ANALIZA IZOLIRANIH N-GLIKANA ... 18
3.4.1. Analiza izoliranih N-glikana HILIC-UPLC metodom (Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama) ... 18
3.4.2. Statistička obrada ... 18
4. REZULTATI I RASPRAVA ... 20
4.1. KROMATOGRAM IZOLIRANIH N-GLIKANA ... 20
4.1. POUZDANOST ANALIZE ... 22
4.2. REZULTATI ANALIZE UZORAKA ISPITANIKA ... 23
4.2.1. Korelacija dobi i N-glikozilacije plazmatskih proteina kod svih ispitanika ... 24
4.2.2. Korelacija dobi i N-glikozilacije plazmatskih proteina kod muških ispitanika ... 28
4.2.3. Korelacija dobi i N-glikozilacije plazmatskih proteina kod ženskih ispitanika ... 33
4.2.4. Potencijal N-glikana kao biomarkera u budućnosti ... 38
5. ZAKLJUČAK ... 40
6. LITERATURA ... 41

7. SAŽETAK/SUMMARY 42
7.1. SAŽETAK 42
7.2. SUMMARY 42
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. GLIKOZILACIJA

Proteini mogu biti posttranslacijski modificirani na razne načine, a jedan od najčešćih, pogotovo u eukariotskim stanicama, je glikozilacija. Glikozilacija je enzimski posredovana reakcija dodavanja jednog ili više ugljikohidratnih lanaca, to jest glikana, na lipide ili proteine, koji se tako modificirani nazivaju glikolipidi i glikoproteini te se uglavnom nalaze na staničnoj površini ili se izlučuju iz stanice. Međutim, mnogi proteini u jezgri i citosolu također mogu biti glikoproteini; to su, primjerice, neki transkripcijski faktori i protein lokaliziran u kompleksu jezgrenih pora. Glikani na proteinskoj strukturi mogu služiti kao mjesta prepoznavanja u međustaničnim interakcijama te sudjelovati i u nekim bitnim procesima poput smatanja proteina u stabilnu strukturu u endoplazmatskom retikulumu i usmjeravanja proteina u odgovarajuće stanične odjeljke (Cooper i Hausman, 2010). Glikoproteini su podijeljeni ovisno o mjestu vezanja ugljikohidratnih lanaca na N-vezane i O-vezane glikoproteine, a njihove strukture su vrlo različite i uglavnom se različiti šećerni ostaci pojavljuju u različitim tipovima glikoproteina. N–vezani glikani su s proteinom povezani preko N–acetilglukozamina (GlcNAc) vezanog za amidni dušik asparagina (Asn) dok su O–vezani glikani s proteinom povezani preko N-acetilgalaktozamina (GalNAc) vezanog za hidroksilnu skupinu serina (Ser) ili treonina (Thr).



Slika 1. Prikaz N- i O-vezanih glikana i pripadnih glikozidnih veza s aminokiselinskim ostacima proteina (Cooper i Hausman, 2010).

O-vezani glikoproteini su uglavnom kratki te često sadrže samo jedan do četiri šećerna ostatka dok, za razliku od njih, tipični N-vezani glikoproteini uvijek sadrže manozu te, kako je ranije navedeno, N-acetilglukozamin i često imaju nekolicinu grana od kojih svaka završava negativno nabijenim ostatkom sijalinske kiseline (Lodish i sur., 2000).

1.1.1. Biosinteza O-vezanih glikana

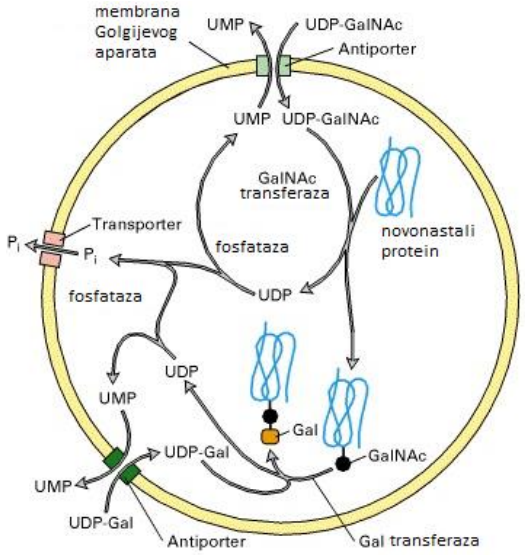
Neposredni prekursori korišteni u biosintezi glikana su nukleozid difosfatni ili monofosfatni šećeri: CMP[1]-N-acetilneuraminska kiselina, UDP[2]-galaktoza, UDP-N-acetilglukozamin i GDP[3]-manoza. Esterska veza između fosfatnog ostatka i ugljikovog atoma u šećeru (fosfodiesterska veza) je visokoenergetska veza s $\Delta G^{\circ\prime}$[4] hidrolize od otprilike -5 kcal/mol, a to znači da je transfer šećernog ostatka na akceptorsku hidroksilnu grupu, na Ser/Thr aminokiselinskom ostatku ili drugom šećernom ostatku, energetski povoljan budući da se energija za taj prijenos dobiva cijepanjem visokoenergetske esterske veze (Lodish i sur., 2000).

Sve poznate glikoziltransferaze koje djeluju na sekretorne proteine su integralni membranski proteini s aktivnim mjestima koja su okrenuta prema lumenu organela, a svaka je specifična i za određeni donorski šećerni nukleotid i za akceptorsku molekulu što je vidljivo u dolje navedenoj reakciji:

UDP-galaktoza (donor) + N-acetilgalaktozamin-protein (akceptor) $\xrightarrow{\text{UDP-galaktozil transferaza}}$ $\text{Gal}\,\beta 1 \rightarrow 3\,\text{N} - \text{acetilgalaktozamin} - \text{protein}$

Biosinteza O-vezanih glikana u glikoforinu i sličnim glikoproteinima započinje transferom N-acetilgalaktozamina s UDP-N-acetilgalaktozamina na hidroksilnu skupinu Ser/Thr aminokiselinskog ostatka u proteinu, a navedena reakcija je katalizirana N-acetilgalaktozamin transferazom koja se nalazi na hrapavom endoplazmatskom retikulumu ili u cis-Golgijevoj mreži. Zatim se proteini sele u trans-Golgijeve vezikule gdje se galaktozni ostatak dodaje N-acetilgalaktozaminu pomoću specifične trans-Golgi galaktoziltransferaze. U stanicama kralježnjaka biosinteza tipičnih O-vezanih glikana završena je dodatkom dva negativno nabijena ostatka N-acetilneuraminske kiseline s CMP prekursora; ove reakcije se odvijaju ili u trans-Golgiju ili u trans-Golgi mreži. Svi šećerni nukleotidi, korišteni u sintezi glikoproteina, ali i glikolipida, nastali su u citosolu iz nukleozid trifosfata i šećernih fosfata. Specifični antiportni proteini[5] (antiporteri), koji se nalaze u membranama hrapavog endoplazmatskog retikuluma i Golgijevih cisterni, kataliziraju unos donorskih šećernih nukleotida u lumen tih cisterni i posljedično izbacivanje nakupljenih slobodnih nukleotida (nukleozid fosfata) (Lodish i sur., 2000).

[1] CMP – citidin monofosfat
[2] UDP – uridin difosfat
[3] GDP – gvanozin difosfat
[4] $\Delta G^{\circ\prime}$ – promjena slobodne Gibbsove energije u reakciji
[5] Antiportni proteini kataliziraju nasuprotni unos tvari kroz membranu



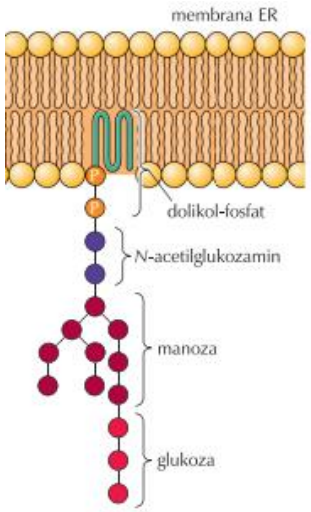
Slika 2. Prikaz djelovanja antiportera na membrani Golgijevog aparata (Lodish i sur., 2000)

Ovakve zamjene jednog donorskog šećernog nukleotida za jedan nukleotid održavaju stalnu koncentraciju šećernih nukleotida u hrapavom endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom lumenu, a to je prijeko potrebno za sinteze glikana. (Lodish i sur., 2000)

1.1.2. Biosinteza N-vezanih glikana

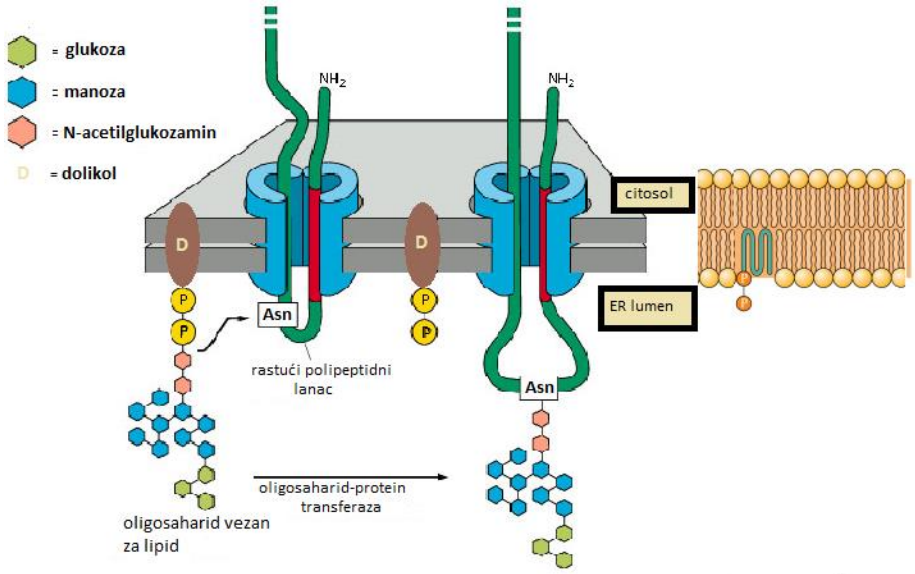
Biosinteza svih N-vezanih glikana započinje u hrapavom endoplazmatskom retikulumu dodatkom velikog oligosaharidnog prekursora koji je vezan preko pirofosfatnog ostatka za dolikol[6], dugolančanipoliizoprenoidni[6] lipid čvrsto uronjen u membranu endoplazmatskog retikuluma koji služi kao nosač za oligosaharid. Taj oligosaharidni prekursor je formiran na membrani endoplazmatskog retikuluma u kompleksnom nizu reakcija koje su katalizirane enzimima pričvršćenim za citosolnu i luminalnu stranu membrane hrapavog endoplazmatskog retikuluma te je nastali oligosaharidni dio okrenut prema lumenu endoplazmatskog retikuluma. Struktura tog prekursora je ista u životinja, biljaka i jednostaničnih eukariota – on je razgranati oligosaharid koji sadrži 3 glukozna ostatka, 9 manoznih ostataka i 2 molekule N-acetilglukozamina što se zapisuje u obliku $Glc_3Man_9(GlcNAc)_2$. (Lodish i sur., 2000)

[6] Poliizoprenoidi su linearni polimeri izoprenoida koji se sastoje od 2 ili više tisuća jedinica izoprena



Slika 3. Prikaz $Glc_3Man_9(GlcNAc)_2$ oligosaharida vezanog za dolikol preko pirofosfatnog ostatka (Cooper i Hausman, 2010)

Pet od četrnaest navedenih ostataka koji čine oligosaharidni prekursor je sadržano u strukturama svih N-vezanih glikana povezanih na sekretorne i membranske proteine. Cijeli $Glc_3Man_9(GlcNAc)_2$ oligosaharid je u cijelosti prenesen na asparaginski ostatak novosintetiziranog polipeptida pomoću katalitičkog djelovanja enzima oligosaharid-protein transferaze. Navedeni enzim je specifičan za ovakve reakcije prijenosa budući da su samo asparaginski ostaci u tripeptidnim slijedovima Asn-X-Ser i Asn-X-Thr[7] supstrati za tu transferazu. (Lodish i sur., 2000)



Slika 4. Prikaz reakcije prijenosa oligosaharida $Glc_3Man_9(GlcNAc)_2$ s dolikola na asparaginski ostatak rastućeg polipeptida katalizirane oligosaharid-protein transferazom (http://www.zoology.ubc.ca/~berger/B200sample/unit_8_protein_processing/golgi/lect28.htm)

[7] Asn je aminokiselina asparagin, Ser je serin, Thr treonin, a X je bilo koja aminokiselina osim prolina

Enzim oligosaharid-protein transferaza se sastoji od tri podjedinice – dvije su riboforini, obilni integralni proteini membrane endoplazmatskog retikuluma, čije se citosolne domene čvrsto vežu za veću podjedinicu ribosoma; treća podjedinica je locirana unutar lumena endoplazmatskog retikuluma i ona provodi reakciju prijenosa oligosaharidnog lanca na asparaginski ostatak u blizini rastućeg polipeptidnog lanca. Ne glikoziliraju se svi Asn-X-Ser/Thr slijedovi; brzo smatanje segmenta proteina u kojem je navedeni slijed može spriječiti prijenos $Glc_3Man_9(GlcNAc)_2$ oligosaharida na taj slijed, to jest na protein, budući da zbog smatanja nije dostupan djelovanju enzima. Odmah nakon prijenosa oligosaharida na novonastali, rastući polipeptid sva tri glukozna ostatka i određeni manozni ostatci su uklonjeni pomoću tri različita enzima (Lodish i sur., 2000).

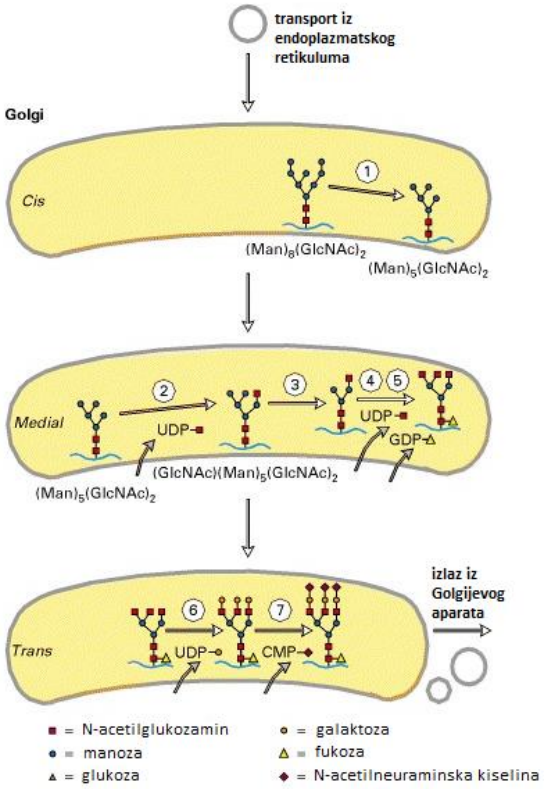
Dva od tri glukozna ostatka se odvajaju zasebnim enzimom nakon čega se kalretikulin, luminalni lektin[8] endoplazmatskog retikuluma, veže za novonastali glikoprotein te mu pomaže u smatanju. Nakon toga se preostali glukozni ostatak odvoji drugim enzimom te se time završava interakcija glikoproteina s kalretikulinom i on se odvaja od kalretikulina. Zatim se provjerava kvaliteta smatanja proteina provjeravanjem izloženih hidrofobnih regija. Ako nema niti jedne izložene hidorofobne regije, glikoprotein je pravilno smotan i odlazi u prijelazni endoplazmatski retikulum. U slučaju nepravilnog smatanja glikoproteina, enzim glukoziltransferaza, koja funkcionira i kao senzor namatanja, će ponovno dodati glukozni ostatak na protein-vezani oligosaharid i tako mu omogućiti ponovni kontakt s kalretikulinom koji pomaže u pravilnom smatanju tako da sprječava preklapanje susjednih aminokiselinskih segmenata. Oni proteini kod kojih je previše hidrofobnih regija izloženo ne mogu se pravilno smotati pa im se uklanjaju manozni ostatci, a proteini se usmjeravaju natrag u citosol na ubikvitiniranje i degradaciju u proteasom (Cooper i Hausman, 2010).

Ponekad se proteini spontano odvoje od kalretikulina i momentalno postanu deglukozilirani; ako se zatim uspiju pravilno smotati, neće biti reglukozilirani niti ponovno povezani s kalretikulinom te će otići dalje u Golgijev kompleks. Tako kalretikulin, poput Hsc70[9], pomaže spriječiti prerano smatanje segmenata novonastalog proteina te zadržava krivo smotane ili nesmotane proteine unutar endoplazmatskog retikuluma (Lodish i sur., 2000).

Novonastali proteini koji prolaze kroz N-vezanu glikozilaciju u endoplazmatskom retikulumu ulaze u Golgijev kompleks sadržavajući jedan ili više $Man_8(GlcNAc)_2$ oligosaharidnih lanaca. Cis, medijalne i trans cisterne Golgijeva kompleksa sadrže različit set enzima koji obavljaju različite modifikacije na sekretornim i membranskim proteinima kako se oni kreću kroz Golgijev kompleks prema izlazu iz stanice, stoga je jasno da svaka regija funkcionira kao

[8] Lektin je ugljikohidrat vezujući protein
[9] Hsc70 je heat shock protein koji ima ulogu šaperona

zaseban organel. U cis-Golgiju s oligosaharida se uklanjaju tri manozna ostatka (reakcija 1.) nakon čega se protein pomiče u medijalni Golgi gdje se u reakciju dodaje UDP-N-acetilglukozamin (reakcija 2.), a zatim se uklanjaju dva manozna ostatka (reakcija 3.) te dodaju još dva UDP-N-acetilglukozamina (reakcija 4.) i GDP-fukoza (reakcija 5.). Procesuiranje se završava u trans-Golgiju reakcijom dodatka tri UDP-galaktoze (reakcija 6.) koja je katalizirana galaktoziltransferazom te zatim vezanjem po jedne CMP-N-acetilneuraminske kiseline, to jest sijalinske kiseline, na svaki galaktozni ostatak (reakcija 7.). Svi dodani šećeri su preneseni na oligosaharid jedan po jedan iz šećer-nukleotidnih prekursora, koji su uvezeni iz citosola, pomoću specifičnim transferaza. Sve navedene reakcije su prikazane na slici 5. (Lodish i sur., 2000)

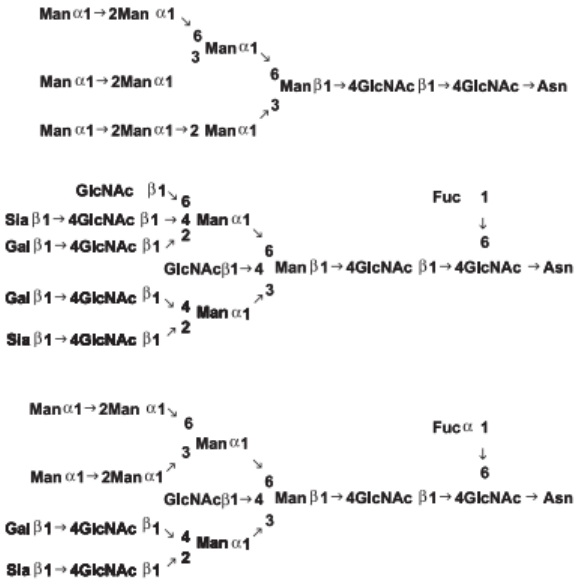


Slika 5. Prikaz reakcija kojima se modificiraju N-vezani glikani u Golgijevom aparatu (Lodish i sur., 2000)

Varijacije u strukturama N-vezanih glikana rezultat su razlika u procesuiranju oligosaharida u endoplazmatskom retikulumu i Golgiju jer se u nekim slučajevima prve dvije reakcije prikazane gore na slici (objašnjenje reakcija) neće odviti jer bitan dio strukture N-vezanog glikana nije dostupan enzimima koji kataliziraju te reakcije, a kao posljedica neće se odvijati nikakva daljnja modifikacija s ugljikohidratima budući da se ne stvara supstrat za sljedeći enzim u nizu. Tako nastali glikoproteini, koji mogu biti izlučeni, sadrže manozom bogati oligosaharid, ili $Man_8(GlcNAc)_2$ ili $Man_5(GlcNAc)_2$, umjesto složenog oligosaharida koji je nastao putem navedenim ranije i prikazanim na slici 5. (Lodish i sur., 2000).

1.1.3. Tipovi N-vezanih glikana

Kao što je prije navedeno, struktura N-vezanih glikana počinje vezivanjem N-acetilglukozamina za asparaginski ostatak u proteinu te oni uvijek sadrže mnogo manoznih jedinica u svojoj strukturi. Oni se mogu dalje razlikovati u grananju čime nastaju oligomanozni, kompleksni ili hibridni tipovi. Oligomanozni tip ima dvije do šest dodatnih manoza dok kompleksni tip ima dvije ili više grana s barem jednim N-acetilglukozaminom i galaktozom te po mogućnosti s jednom sijalinskom kiselinom na svakoj grani. Hibridni tip je mješavina ova dva tipa pa ima jednu granu sa strukturom kompleksnog tipa te jednu ili više grana sa strukturom oligomanoznog tipa (Gornik i Lauc, 2008).



Slika 6. Prikaz struktura osnovnih tipova N-vezanih glikana; redom od gornjeg prema donjem su prikazani oligomanozni, kompleksni i hibridni tip (Gornik i Lauc, 2008)

1.1.4. Glikozilacija u dječjoj dobi

U mnogim istraživanjima opažena je razlika u glikozilaciji s dobi kod odrasle populacije. U ukupnom plazmatskom glikomu, za razliku od IgG[10]glikoma, dob je imala samo manji, ne pretjerano značajan učinak. Veliki utjecaj dobi je primijećen kod galaktozilacije koja se smanjivala na manje od 50% svoje maksimalne vrijednosti dosegnute tijekom života (Krištić i sur., 2013).

Što se tiče dječje populacije, nema mnogo provedenih istraživanja iako su promjene u glikozilaciji plazmatskih proteina u raznim istraživanjima kod odrasle populacije povezane s trudnoćom, oralnom hormonalnom terapijom i menopauzom pa su promjene u glikozilaciji kod djece s nastupanjem puberteta očekivane. U jednom istraživanju koje je rađeno na

[10] IgG – imunoglobulin G

populaciji zdrave djece u dobi od 6 do 18 godina iz Hrvatske, s podjednakom raspodjelom po spolu, pronađeno je nekoliko značajnih korelacija između dobi i plazmatskih glikana, te dobi i IgG glikana međutim ti rezultati za ovaj rad nisu od interesa. Primijećeno je da se mnogo osobina glikanskog profila mijenja s dječjim rastom i razvojem, uključujući i smanjenje razgranatosti glikana, smanjenje galaktozilacije (tri- i tetragalaktozilirani glikani) te smanjenje sijalinizacije (tri- i tetrasijalinizirani glikani). Najveća povezanost je primijećena kod tetrasijaliniziranih glikana što se povezuje sa značajnim smanjenjem kompleksnosti glikanskih struktura s dobi, a to je popraćeno porastom u disijaliniziranim biantenarnim[11] glikanima s dobi. Nadalje, fukozilacija jezgre oligosaharidnog lanca i razina agalaktoziliranih plazma glikana značajno su padali s dobi dok je razina digalaktoziliranih glikana rasla. Usporedbom promjena plazmatskih glikana u dječjoj dobi s onima u odrasloj, opažene su velike razlike. Glavna razlika je porast agalaktoziliranih glikana s dobi u odraslih, dok je kod djece primijećeno da se razina istih smanjuje s dobi i doseže minimalnu razinu u ranoj odrasloj dobi. Kod odraslih razine glikana koje su pokazale značajnu korelaciju s dobi kod dječje populacije ili stagniraju ili su promjene s dobi puno sporije. Također je opaženo da su se plazmatski glikani kod djece jako razlikovali s pojavom puberteta. Zaključak provedenog istraživanja je da se sastav plazmatskih N-glikana u djece značajno razlikuje od istoga u odraslih te da se taj sastav puno brže mijenja s dječjim razvojem. Ovo zapažanje je jako bitno budući da se zna da su promjene u glikanskim strukturama često proučavane kao potencijalni dijagnostički biomarkeri (Pučić i sur., 2012).

1.2. ŠEĆERNA BOLEST

Diabetes mellitus ili šećerna bolest je kronični metabolički sindrom nastao zbog apsolutnog i/ili relativnog manjka inzulina, a okarakteriziran je kroničnom hiperglikemijom koju prate poremećaji u metabolizmu ugljikohidrata, masti i proteina (Štraus, 2009).

Zbog manjka inzulina glukoza ne ulazi u mišićne i masne stanice te se posljedično u njima potiče glikogenoliza i glukoneogeneza umjesto glikogeneze i glikolize što uzrokuje dodatno otpuštanje glukoze u krv i njeno nagomilavanje. Također dolazi i do povećane razgradnje masti što uzrokuje nakupljanje slobodnih masnih kiselina koje dolaze u jetru i pojačano se oksidiraju u acetil-CoA[12] kojeg ima više nego što jetra može iskoristiti. Kao rezultat nastaju ketonska tijela koja odlaze u periferna tkiva i tamo se razgrađuju umjesto glukoze, a odlaze i u urin. Zbog manjka inzulina smanjena je sinteza proteina što rezultira povećanjem

[11] Biantenarni glikan sadrži 2 grane N-acetilglukozamina
[12] Acetil-CoA je acetil koenzim A

koncentracije aminokiselina u krvi, a paralelno je inhibiran ciklus limunske kiseline jer nema dovoljno oksaloacetata koji se iskorištava u glukoneogenezi.

U svijetu je registrirano oko 190 milijuna osoba sa šećernom bolešću, a prema procjenama SZO-a[13] i IDF-a[14] taj će se broj do 2025. povećati na 300 milijuna. U Hrvatskoj je više od 170000 osoba oboljelih od šećerne bolesti, a procjenjuje se da je neotkrivenih još trećina tog broja (Štraus, 2009).

Postoje dva glavna tipa šećerne bolesti koja se razlikuju u uzroku bolesti. Prvi je tip 1, kod kojeg do apsolutnog manjka inzulina dolazi zbog razaranja β-stanica Langerhansovih otočića gušterače. To razaranje je uzrokovano autoantitijelima na pojedine komponente β-stanica ili na inzulin te se ona pojavljuju u cirkulaciji već nekoliko mjeseci pa i godina prije pojave jasnih simptoma bolesti. Prisutnost tih autoantitijela u krvi znak je prisutnosti autoimunosnog tipa 1 šećerne bolesti. Kod nekih bolesnika se ta antitijela ne mogu dokazati, ali imaju prisutne simptome pa se oni svrstavaju u oboljele od idiopatskog tipa 1 šećerne bolesti. Tip 1 zahvaća oko 5-10% oboljelih od šećerne bolesti i javlja se najčešće u djetinjstvu. Njegova pojava je obično iznenadna i dramatična, a uključuje simptome poput izrazite žeđi (polidipsija) i suhoće usta, učestalog mokrenja (poliurija), jakog umora, stalne gladi, naglog gubitka mase, smetnji vida i ponavljanih infekcija. Oboljeli od tipa 1 šećerne bolesti su na terapiji različitim preparatima inzulina, a neke od novih strategija u liječenju ove bolesti usmjerene su na imunosupresivnu terapiju kako bi se smanjio autoimuni odgovor, na transplantaciju β-stanica koje proizvode inzulin te na gensku terapiju, odnosno na terapiju matičnim stanicama (Štraus, 2009).

Drugi tip, tip 2, pojavljuje se u odrasloj dobi te od njega boluje oko 90% oboljelih od šećerne bolesti. U ovom tipu bolesti, barem u početku, nema ovisnosti o inzulinu jer se isti sintetizira u dovoljnoj mjeri međutim dolazi ili do njegovog nedovoljnog lučenja iz gušterače ili do inzulinske rezistencije u perifernim tkivima koja je karakterizirana njegovom nemogućnosti da pravilno regulira ulazak glukoze u stanice perifernih tkiva. Posljedično dolazi do nakupljanja glukoze u krvi te manjka glukoze u stanicama pri čemu se ona ne može iskoristiti za dobivanje energije. Iako je primarna inzulinska rezistencija moguća i kod osoba s normalnom tjelesnom masom, glavni uzrok inzulinske rezistencije je visceralna pretilost. Višak visceralnog masnog tkiva otpušta povećane količine TNFα[15] koji pokreće lučenje slobodnih masnih kiselina u krvotok iz masnog tkiva, a to izravno utječe na smanjenje preuzimanja glukoze u mišićima, dovodi do sinteze triglicerida i povećava glukoneogenezu u

[13] SZO – Svjetska zdravstvena organizacija
[14] IDF – International Diabetes Federation
[15] TNFα – tumor necrosis factor α

jetri. Također, u pretilih osoba je više leptina, a posljedično manje adiponektina koji poboljšava inzulinsku rezistenciju smanjenjem koncentracije slobodnih masnih kiselina i glukoze u krvi. Kod bolesnika s tipom 2 šećerne bolesti postoji relativan manjak inzulina što znači da ga ipak ima dovoljno da spriječi neke od akutnih komplikacija bolesti poput dijabetičke ketoacidoze i hipoglikemije te bolest često ostaje dugo vremena neprepoznata. Za razliku od tipa 1, ovaj tip bolesti napreduje polagano i postupno, a okarakteriziran je simptomima poput polidipsije i poliurije, pospanosti, zamagljenog vida, svrbeža i žarenja u stopalima, a kod žena s čestim vaginalnim infekcijama (Štraus, 2009).

Osim ova dva glavna tipa postoji i gestacijski, to jest trudnički, tip šećerne bolesti koji je uzrokovan pojačanim lučenjem posteljičnih hormona koji dovode do inzulinske rezistencije, a time i povećane potrebe za inzulinom. Razlikujemo i MODY tip šećerne bolesti (engl. Mature Onset Diabetes of the Young) koji je prisutan kod mlađih osoba kao i tip 1, ali je po simptomima sličniji tipu 2. Postoji i stanje predijabetesa, poznato i kao dva stupnja poremećene regulacije glukoze, te osobe oboljele od tih poremećaja imaju puno veće šanse za razvijanje šećerne bolesti (Štraus, 2009).

1.2.1. Šećerna bolest i glikozilacija

Glikozilacija u šećernoj bolesti se odnosi na neenzimsko kovalentno vezanje[16] glukoze iz krvi na eritrocite, odnosno na hemoglobin u njima. Kod zdrave populacije je između 4,5-6% glukoze iz krvi kovalentno vezano na hemoglobin koji se tako modificiran naziva glikirani hemoglobin, odnosno hemoglobin A1c (HbA1c). Povećana koncentracija i dulja prisutnost glukoze u krvi omogućuje učestalije odvijanje glikacije i to ne samo na hemoglobinu nego i na ostalim proteinima u cirkulaciji. Budući da oboljeli od šećerne bolesti nemaju reguliranu koncentraciju glukoze u krvi te je ona prisutna dulje i u većim količinama, jasno je da će se kod njih odvijati učestalija glikacija hemoglobina. Udio hemoglobina A1c će posljedično biti veći od 6%, ali i češće će biti i vezanje glukoze na druge proteine čime se može narušiti njihova funkcija i struktura (http://www.diabetesincontrol.com/glycosylation/).

1.3. HILIC-UPLC[17] (Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama)

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti bazirana na hidrofilnim interakcijama pruža alternativan pristup za učinkovito razdvajanje malih polarnih čestica na polarnim

[16] Neenzimska glikozilacija se naziva glikacija
[17] Hydrophilic interaction chromatography-Ultra performance liquid chromatography

stacionarnim fazama. To je razdjelna kromatografija u kojoj je stacionarna faza polarnija od mobilne faze. Mobilna faza se najčešće sastoji od dva otapala koja su različite polarnosti, pri čemu je jedno manje polarno i koristi se u početku metode u većem udjelu, a drugo je polarnije te se kasnije tijekom metode sve više povećava njegov udio u mobilnoj fazi. Time se omogućava prvotno vezanje polarnih molekula za polarnu stacionarnu fazu, a zatim se povećavanjem udjela polarnijeg otapala počinju ispirati vezane molekule sa stacionarne faze te se omogućuje njihovo razdvajanje. Stacionarnu fazu uglavnom čine kolone čiste silike ili silika gela modificiranog s polarnim skupinama poput amidnih, dok su mobilna faza, najčešće formijatna kiselina kao slabije polarna (organska komponenta) i acetonitril kao polarnija komponenta mobilne faze. Ovaj oblik razdjelne kromatografije se u današnje vrijeme nametnuo kao standard za molekule koje su prepolarne da bi se zadržale u obrnuto-faznoj kromatografiji, ali su nedovoljno nabijene kako bi se učinkovito razdvojile u ionsko izmjenjivačkoj kromatografiji. Ova metoda je sve korištenija i zbog toga što upotrebom vrlo visokih tlakova za razdvajanje molekula i redukcijom veličine čestica stacionarne faze (od tuda i naziv tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti) omogućuje brzo i precizno razdvajanje, a posljedično i detekciju nekih vrlo malih molekula poput malih organskih kiselina, ali i nekih osnovnih droga (Buszewski i Noga, 2011).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nedavni razvoj pouzdanih analitičkih metoda omogućio je analizu glikozilacije proteina u većem broju uzoraka. Stoga je danas poznato da je glikozilacija ovisna o mnogim fiziološkim čimbenicima (npr. dob, spol, BMI), životnim navikama (npr. prehrana, pušenje, tjelesna aktivnost) te okolišnim čimbenicima. Kako je također pokazano da se glikanski profili osoba mijenjaju u mnogim bolestima, potrebno je razlikovati izvor ovih promjena. Šećerna bolest tip 1 je autoimuna bolest koja se javlja kod djece i čiji uzrok nije poznat. Posljednja istraživanja upućuju na postojanje potencijalne uloge glikozilacije u razvoju ove bolesti. Kako bi se ova uloga mogla ispitati, potrebno je znati kako npr. dob u kojoj se javlja bolest utječe na glikozilacijski obrazac N-glikana plazme. Promjene glikozilacije s dobi dobro su istražene u odrasloj populaciji, ali za dječju populaciju postoji jako malo informacija. Postoje neke indikacije da se glikozilacija kod djece ovisno o dobi mijenja potpuno drugačije nego kod odraslih ispitanika sve do dobi nakon puberteta. Stoga smo u ovome radu ispitali postoji li veza između N-glikozilacije plazmatskih proteina i dobi djece sa šećernom bolesti tipa 1.

Za određivanje N-glikanskog profila u uzorcima plazme djece sa šećernom bolesti koristila se metoda HILIC-UPLC, odnosno tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama, čiji se dobiveni podaci obrađuju računalno integrirajući pikove, nakon čega se dobiveni rezultati provlače kroz pripadajuće statističke testove.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Anorganske kemikalije

Tablica 1. Anorganske kemikalije

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
KCl, kalijev klorid	Calbiochem
KH_2PO_4, kalijev dihidrogenfosfat	Sigma-Aldrich
Na_2HPO_4, dinatrijev hidrogenfosfat	Acros Organics
NaCl, natrijev klorid	Carlo Erba
NH_4OH, amonijak	Emsure

3.1.2. Organske kemikalije

Tablica 2. Organske kemikalije

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

3.1.3. Biološki materijali

Tablica 3. Enzimi

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
PNGaza F (peptid N-glikozidaza)	Prozyme

3.1.4. Otopine i puferi

Tablica 4. Otopine i puferi

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
pH Buffer Solution, alkalni standard za pH metar, pH: 9,21 +/- 0,02	Mettler Toledo GmbH
pH Buffer Solution, kiseli standard za pH metar, pH: 4,01 +/- 0,02	Mettler Toledo GmbH
30% octena kiselina u DMSO	Za 3 mL: pomiješati 0,9 mL octene kiseline s 2,1 mL DMSO
Otopina za obilježavanje N-glikana	Za 1 uzorak: u 25 µL 30% octene kiseline u DMSO dodati 0,48 mg 2-aminobenzamida i 1,12 mg 2-pikolin borana
4% Igepal	Za 100 mL: u 80 mL ultra čiste vode dodati 4 mL Igepala, staviti na 65˚C i na mješač da se rastopi, zatim nadopuniti do 100 mL s ultra čistom vodom
2% SDS	Dodati 2 g SDS-a u 100 mL vode
10xPBS, phospate buffer saline	Za 100 mL: dodati 8,0028 g NaCl, 1,3832 g Na_2HPO_4, 0,2964 g KH_2PO_4, 0,1976 g KCl u 80 mL ultra čiste vode, provjeriti pH i titrirati sa standardnom otopinom da pH bude između 6,6 i 6,8, a zatim pretočiti u menzuru od 100 mL te do 100 mL nadopuniti s ultra čistom vodom
5xPBS, phospate buffer saline	Za 100 mL: 50 mL 10xPBS preliti u menzuru od 100 mL i do 100 mL nadopuniti s ultra čistom vodom
Pufer amonijev formijat, 2M, pH 4,4	Za 500 mL: uliti 300 mL ultra čiste vode u posudu od 500 mL, dodati 37,75 mL formijatne kiseline, ohladiti otopinu, miješati na magnetskom mješaču, polako dodavati oko 75 mL NH_4OH do pH 4,2 (početan pH je

	<2), nakon postizanja sobne temperature otopine dodavati NH_4OH do pH 4,4

3.1.5. Laboratorijska oprema i pribor

Tablica 5. Laboratorijska oprema i pribor

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

3.2. ISPITANICI

U ovo istraživanje je uključeno 153 ispitanika (81 muškog, a 72 ženskog spola), kod kojih je uzorak plazme uzet unutar 3 mjeseca od dijagnoze šećerne bolesti tipa 1. Dob ispitanika bila je od 2 do 19 godina. Uzorci plazme su dobiveni iz registra uzoraka dječjeg dijabetesa u Danskoj (The Danish Society for Childhood Diabetes Registry - DanDiabKids).

3.3. PROTOKOL PRIPREME UZORAKA

3.3.1. Randomizacija uzoraka

Kako bi se minimalizirao utjecaj predanalitičkih i analitičkih čimbenika na rezultate analize N-glikana plazmatskih proteina, uzorci su randomizirani. Na svaku mikrotitarsku pločicu stavljeno je i po 5 standarda koji su obrađeni na isti način kao i uzorci.

3.3.2. Izolacija N-glikana s plazmatskih glikoproteina

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

- Denaturacija

2% SDS, 4% Igepal i 5xPBS se izvade na sobnu temperaturu kako bi postigli željenu temperaturu. U svaki uzorak se dodaje 20 μL 2% SDS-a i promiješa se pipetiranjem. Pločica s uzorcima se zatvori s adhezivnim folijom te inkubira 10 minuta na 65˚C. Zatim se pločica izvadi van i ostavi 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga se svakom uzorku dodaje 10 μL 4% Igepala s 250 μL nastavcima za pipete te se promiješa pipetiranjem. Pločica s uzorcima se zatim stavlja na tresilicu (blago) na 15 minuta.

- Deglikozilacija

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

3.3.3. Obilježavanje, pročišćavanje i ispiranje N-glikana plazme

- Priprema otopine za obilježavanje glikana

Otopina za obilježavanje jednog uzorka priprema se dodavanjem 25 μL 30% octene kiseline u DMSO-u u 0,48 mg 2-aminobenzamida te se vorteksira do potpunog otapanja. Potpuno otopljenu otopinu se dodaje u 1,12 mg 2-pikolin borana i ponovno se sve vorteksira.

- Obilježavanje uzoraka

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

- Pretpriprema GHP pločice

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

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

Dodaje se 700 µL hladnog 100% ACN-a u svaki uzorak sa zasebnim nastavkom za pipete za svaki uzorak, promiješa se pipetiranjem te koristeći isti nastavak pažljivo se prenese ukupan volumen uzorka, koji iznosi oko 800 µL, u jažicu GHP pločice. Pločica se inkubira 2 minute, a zatim se vakuumira u otpad (kod korištenja vakuumske pumpe treba paziti da vakuum ne prijeđe 2 inHg). Zatim se pipetira 200 µL hladnog 96% ACN-a u svaku jažicu te vakuumira u otpad. Zadnji korak se ponovi još tri puta nakon čega se GHP pločica stavi na vrh stalka 1mL ili 2 mL pločica i pipetira se 200 µL hladnog 96% ACN-a u svaku jažicu te se GHP pločica centrifugira 5 minuta na 1000 rpm.

- Ispiranje (eluiranje) označenih N-glikana

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

3.4. ANALIZA IZOLIRANIH N-GLIKANA

3.4.1. Analiza izoliranih N-glikana HILIC-UPLC metodom (Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama)

Nakon izolacije N-glikana iz dobivenih uzoraka plazme, N-glikani se analiziraju metodom HILIC-UPLC na Waters Acquity UPLC instrumentu. Koristi se HILIC kolona za razdvajanje glikana veličine 2,1x150 mm i veličine čestica 1,7 μm. Kao mobilna faza koja nosi uzorak kroz kolonu koriste se 100 mM amonijev formijat, pH 4,4, kao otapalo A i ACN kao otapalo B. Koristeći program Empower zadaju se željeni uvjeti prikazani u tablici 6.

Tablica 6. Promjena udjela otapala A i B tijekom kromatografske analize

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

Temperatura kolone postavljena je na 25˚C, a temperatura uzoraka na 10˚C. Valna duljina ekscitacije fluorescentnog detektora namještena je na 250 nm, a valna duljina emisije na 428 nm. Nakon završetka analize slijedi obrada podataka u Empower programu. Nakon provedene automatske integracije dodatno se ručno integriraju površine pikova dobivenog kromatograma nakon čega slijedi statistička obrada u Excel-u i MedCalc-u.

3.4.2. Statistička obrada

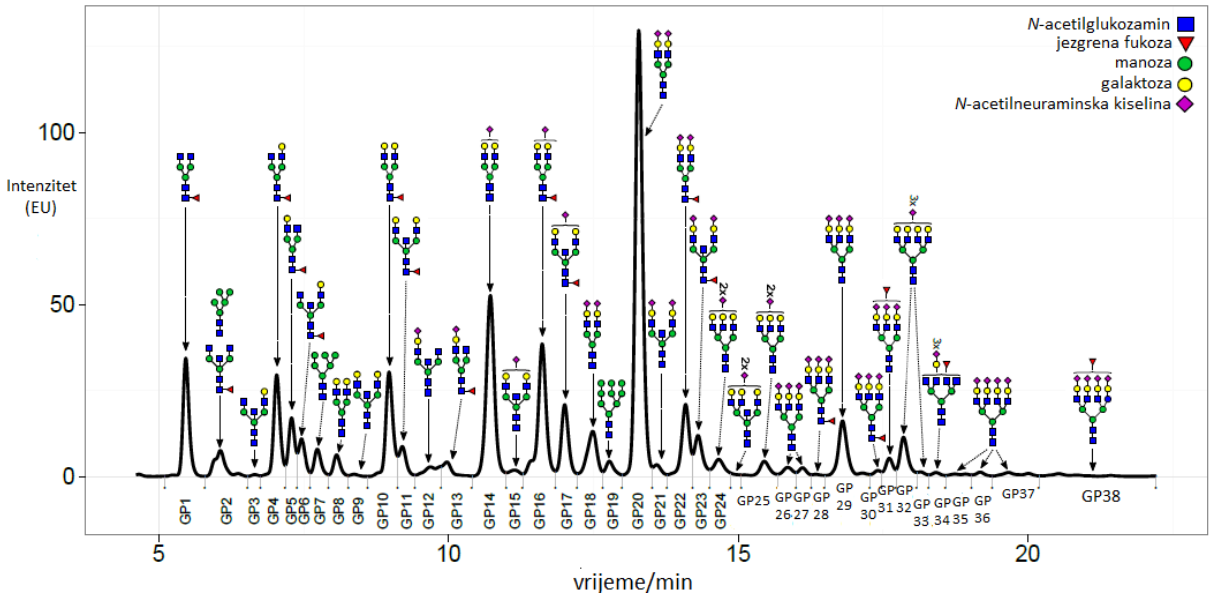
Rezultati dobiveni integriranjem površina pikova dobivenog kromatograma obrađeni su u MedCalc-u koristeći Spearmanov test korelacije budući da se radi o velikom uzorku (>30 ispitanika) koji nije razdijeljen po normalnoj razdiobi. Statističkom obradom u MedCalc-u izračunati su Spearmanovi koeficijenti korelacije (ϱ) i p vrijednosti za svaku glikansku skupinu prvo koristeći podatke svih ispitanika, a zatim zasebno za ispitanike muškog te ispitanike ženskog spola. Ovisno o dobivenoj p vrijednosti može se zaključiti je li korelacija između dobi i određene glikanske skupine značajna. Za razinu signifikantnosti odabrana je

vrijednost 0,05 što znači da je korelacija značajna ako je p vrijednost manja od 0,05. Ako je vrijednost Spearmanovog koeficijenta korelacije (ϱ) manja od 0, pravac na grafu koji prikazuje ovisnost vrste N-glikana o dobi će biti padajući što znači da će učestalost tih N-glikana biti sve manja s dobi. Ako je vrijednost Spearmanovog koeficijenta korelacije (ϱ) veća od 0, pravac će biti rastući što znači da učestalost određene vrste N-glikana rasti s dobi.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. KROMATOGRAM IZOLIRANIH N-GLIKANA

Na slici 7. prikazan je kromatogram nakon analize izoliranih N-glikana HILIC-UPLC metodom. N-glikani se razdvoje u glikanske skupine te je na slici prikazana struktura glavnih N-glikana za određenu glikansku skupinu.



Slika 7. Prikaz kromatograma dobivenih glikanskih skupina nakon razdvajanja N-glikana HILIC-UPLC metodom

Analizom provedenom za izradu ovog diplomskog rada dobiveno je 38 glikanskih skupina. U tablici 7. navedeni su glavni N-glikani za svaku glikansku skupinu.

Tablica 7. Glikanska skupina i pripadajući N-glikani

GLIKANSKA SKUPINA	N-glikan
GP[18]1	FA2
GP2	M5 FA2B
GP3	A2[6]BG1
GP4	FA2[6]G1
GP5	FA2[3]G1
GP6	FA2[6]BG1
GP7	M6

[18] GP je kratica od glycan peak što znači glikanska skupina

GP8	A2G2
GP9	A2BG2
GP10	FA2G2
GP11	FA2BG2
GP12	A2[3]BG1S1
GP13	FA2[3]G1S1
GP14	A2G2S1
GP15	A2BG2S1
GP16	FA2G2S1
GP17	FA2BG2S1
GP18	A2G2S2
GP19	M9
GP20	A2G2S2
GP21	A2BG2S2
GP22	FA2G2S2
GP23	FA2BG2S2
GP24	A3G3S2
GP25	A3BG3S2 A3G3S2
GP26	A3G3S3
GP27	A3G3S3
GP28	FA3G3S3
GP29	A3G3S3
GP30	FA3G3S3
GP31	A3G3S3F
GP32	A4G4S3
GP33	A4G4S3
GP34	A4G3S3F

GP35	A4G4S4
GP36	A4G4S4
GP37	A4G4S4
GP38	A4G4S4F
A= jezgra glikana (2 N-acetilglukozamina i 3 manoze) s granom N-acetilglukozamina (A2 su dvije grane, A3 tri grane) B= N-acetilglukozamin na mjestu grananja F= jezgrena fukoza	G= galaktoza M= manoza

4.1. POUZDANOST ANALIZE

Uz uzorke plazme ispitanika na svakoj pločici, 5 jažica je bilo ispunjeno sa standardnim otopinama i 1 jažica s vodom (blank) te su oni obrađivani jednako kao uzorci plazme. Voda je stavljena kako bi se primijetile eventualne interferencije zbog onečišćenja, a standardi kako bi se osigurala analitička pouzdanost. U tablici 8. dani su koeficijent varijacije za svaku pojedinu glikansku skupinu izračunati iz analize standarda.

Tablica 8. Koeficijenti varijacije standarda za svaku glikansku skupinu

GLIKANSKA SKUPINA	KV (%)	GLIKANSKA SKUPINA	KV (%)
GP1	4,7	GP20	1,3
GP2	0,9	GP21	1,9
GP3	6,3	GP22	2,9
GP4	3,7	GP23	4,8
GP5	4,6	GP24	5
GP6	3,2	GP25	4,3
GP7	1,1	GP26	4
GP8	9,1	GP27	1,5
GP9	3,3	GP28	5,2
GP10	2,4	GP29	1,9

GP11	2,2	GP30	3,5
GP12	2,6	GP31	2
GP13	4,7	GP32	3
GP14	4,7	GP33	4,1
GP15	3,8	GP34	2
GP16	2,4	GP35	6,1
GP17	4,5	GP36	7,9
GP18	1,3	GP37	5,1
GP19	2,4	GP38	5,3

Iz navedene tablice 7. vidljivo je da su koeficijenti varijacije standardnih otopina dobri što potvrđuje pouzdanost analitičke izvedbe.

4.2. REZULTATI ANALIZE UZORAKA ISPITANIKA

U ovom diplomskom radu analizirana je N-glikozilacija proteina iz 180 uzoraka plazme. Dio uzoraka, točnije njih 27, je izbačeno iz analize jer nije bilo podataka za dob ispitanika (16 uzoraka), jer se analizom nije dobio zadovoljavajući signal (10 uzoraka) te još jedan uzorak jer se naknadno uspostavilo da ispitanik nije imao šećernu bolest tipa 1 što ukupno čini 153 uzorka ispitanika koji su analizirani. U tablici 9. navedeni su minimum, maksimum i medijan za svaku glikansku skupinu.

Tablica 9. Vrijednosti N-glikana ukupnih proteina analiziranih iz plazme djece sa šećernom bolesti tipa 1

GLIKANSKA SKUPINA	MINIMUM (MIN)	MAKSIMUM (MAX)	MEDIJAN (M)	GLIKANSKA SKUPINA	MIN	MAX	M
GP1	1,81	8,97	4,35	GP20	19,45	32,15	23,91
GP2	1,21	3,07	1,88	GP21	0,48	0,82	0,6
GP3	0,02	0,12	0,05	GP22	2,48	6,76	3,54
GP4	1,68	7,79	4,32	GP23	0,39	2,44	1,24
GP5	0,56	3,18	1,69	GP24	1,02	3,9	2,15
GP6	0,45	1,63	0,94	GP25	1,13	3,28	1,8

GP7	0,79	1,49	1,06	GP26	0,46	1,9	0,97
GP8	1,56	3,02	2,33	GP27	0,36	1,17	0,64
GP9	0,06	0,2	0,1	GP28	0,12	0,38	0,21
GP10	2,51	7,91	4,92	GP29	2,2	7,74	3,92
GP11	0,4	1,33	0,78	GP30	0,18	0,72	0,39
GP12	1,26	2,19	1,68	GP31	0,55	2,22	0,99
GP13	0,23	0,79	0,48	GP32	0,96	4,49	2,15
GP14	13,32	19,14	16,0	GP33	0,2	0,61	0,34
GP15	0,3	0,74	0,41	GP34	0,15	0,54	0,29
GP16	4,38	8,08	6,1	GP35	0,35	0,93	0,55
GP17	0,69	2,72	1,5	GP36	0,15	0,98	0,41
GP18	1,9	5,12	3,63	GP37	0,45	1,54	0,8
GP19	0,76	1,4	0,97	GP38	0,25	1,34	0,59

4.2.1. Korelacija dobi i N-glikozilacije plazmatskih proteina kod svih ispitanika

Ispitana je korelacija N-glikana ukupnih plazmatskih proteina s dobi ispitanika (tablica 10.).

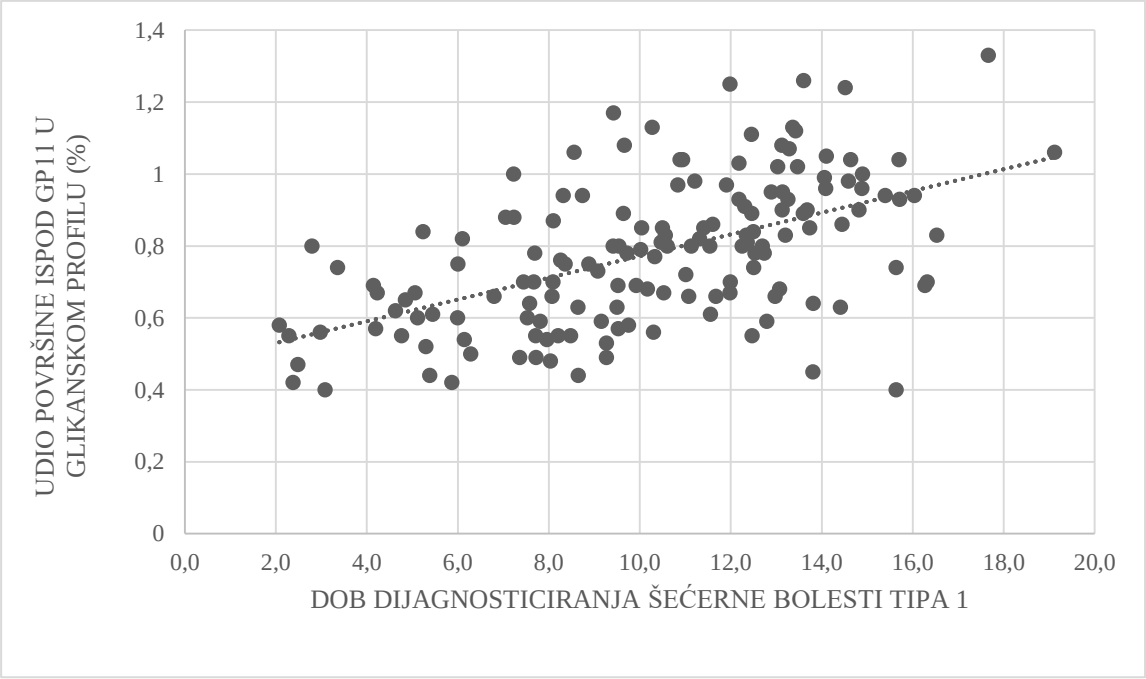
Tablica 10. Prikaz korelacije N-glikana ukupnih plazmatskih proteina s dobi ispitanika dana Spearmanovim koeficijentom korelacije (ϱ)

GLIKANSKA SKUPINA	**ϱ (Spearman)**	**p vrijednost**
GP1	0,1080	0,1824
GP2	0,1930	0,0166
GP3	0,4640	<0,0001
GP4	0,2150	0,0076
GP5	0,4600	<0,0001
GP6	0,4420	<0,0001
GP7	0,3080	0,0001
GP8	0,0325	0,6900
GP9	0,4270	<0,0001

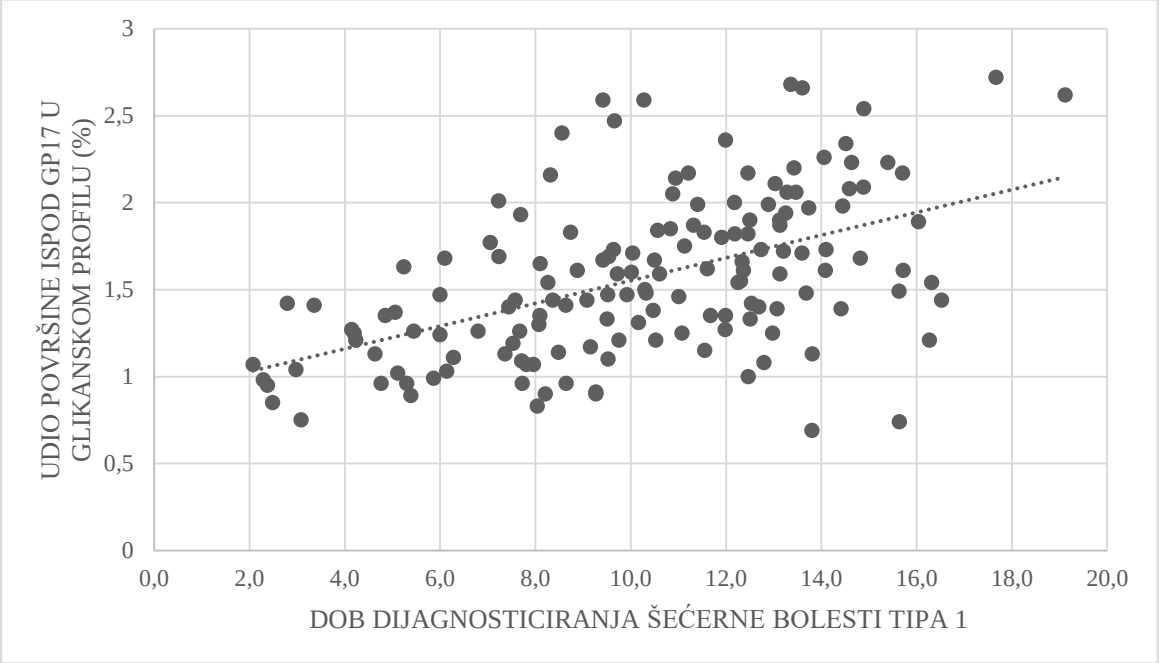
GP10	0,2640	0,0010
GP11	0,5520	<0,0001
GP12	-0,3740	<0,0001
GP13	0,3190	0,0001
GP14	-0,0912	0,2623
GP15	0,3010	0,0002
GP16	0,2150	0,0075
GP17	0,5190	<0,0001
GP18	-0,4570	<0,0001
GP19	0,0386	0,6354
GP20	-0,1280	0,1156
GP21	0,1160	0,1544
GP22	0,1920	0,0172
GP23	0,3830	<0,0001
GP24	-0,4670	<0,0001
GP25	-0,2840	0,0004
GP26	0,0209	0,7978
GP27	-0,5340	<0,0001
GP28	-0,3170	0,0001
GP29	-0,4770	<0,0001
GP30	-0,4140	<0,0001
GP31	-0,1200	0,1408
GP32	-0,0563	0,4896
GP33	-0,4010	<0,0001
GP34	-0,0945	0,2453
GP35	-0,2600	0,0012
GP36	-0,5060	<0,0001
GP37	-0,3730	<0,0001

GP38	-0,1110	0,1722

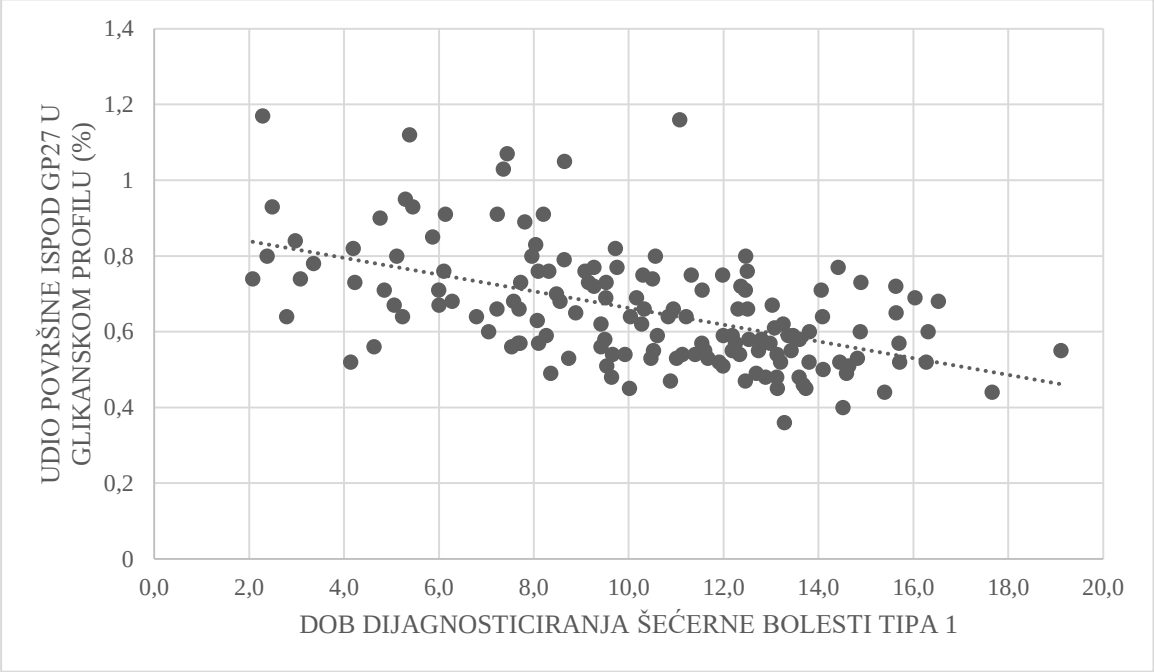
Iz rezultata prikazanih u navedenoj tablici vidljivo je da za neke glikanske skupine postoji značajna korelacija između dobi dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 te površine pika određene glikanske skupine u kromatogramu budući da je p vrijednost manja od 0,05. Prema tome, iz rezultata za sve ispitanike, značajna korelacija postoji za GP (glikansku skupinu) 2, GP3, GP4, GP5, GP6, GP7, GP9, GP10, GP11, GP12, GP13, GP15, GP16, GP17, GP18, GP22, GP23, GP24, GP25, GP 27, GP28, GP29, GP30, GP33, GP35, GP36, GP37. Kod svih ispitanika, to jest ispitanika oba spola, prisutno je 27 značajnih korelacija. Što je Spearmanov koeficijent korelacije ϱ bliži +/-1 to je korelacija između obilježja jača te je vjerojatnije postojanje funkcionalne veze između ta dva obilježja. Kod rezultata svih ispitanika najveći Spearmanovi koeficijenti korelacije ϱ prisutni su kod GP11, ϱ=0,5520; GP17, ϱ=0,5190; GP27, ϱ= -0,5340; GP36, ϱ= -0,5060. Prikazi tih korelacija su vidljivi u sljedećim grafovima.



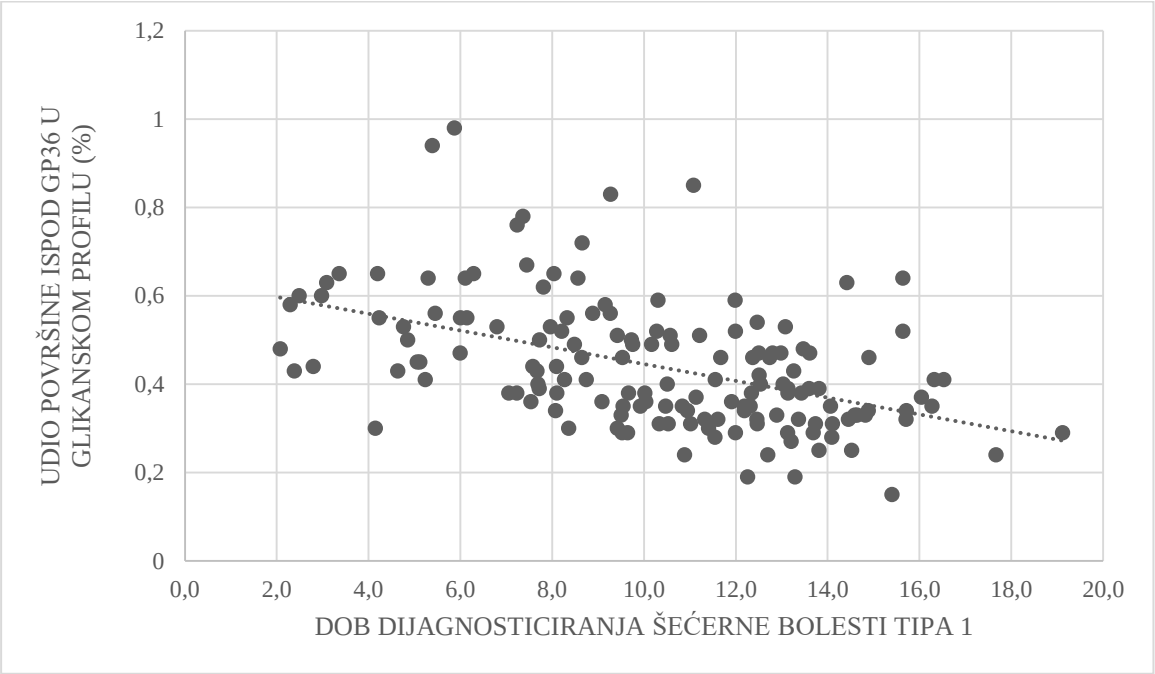
Graf 1. Prikaz ovisnosti udjela površine ispod GP11 u ukupnom glikanskom profilu o dobi dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 kod svih ispitanika (ispitanika oba spola)



Graf 2. Prikaz ovisnosti udjela površine ispod GP17 u ukupnom glikanskom profilu o dobi dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 kod svih ispitanika (ispitanika oba spola)



Graf 3. Prikaz ovisnosti udjela površine ispod GP27 u ukupnom glikanskom profilu o dobi dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 kod svih ispitanika (ispitanika oba spola)



Graf 4. Prikaz ovisnosti udjela površine ispod GP36 u ukupnom glikanskom profilu o dobi dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 kod svih ispitanika (ispitanika oba spola)

4.2.2. Korelacija dobi i N-glikozilacije plazmatskih proteina kod muških ispitanika

Ispitana je korelacija N-glikana ukupnih plazmatskih proteina s dobi muških ispitanika (tablica 11.).

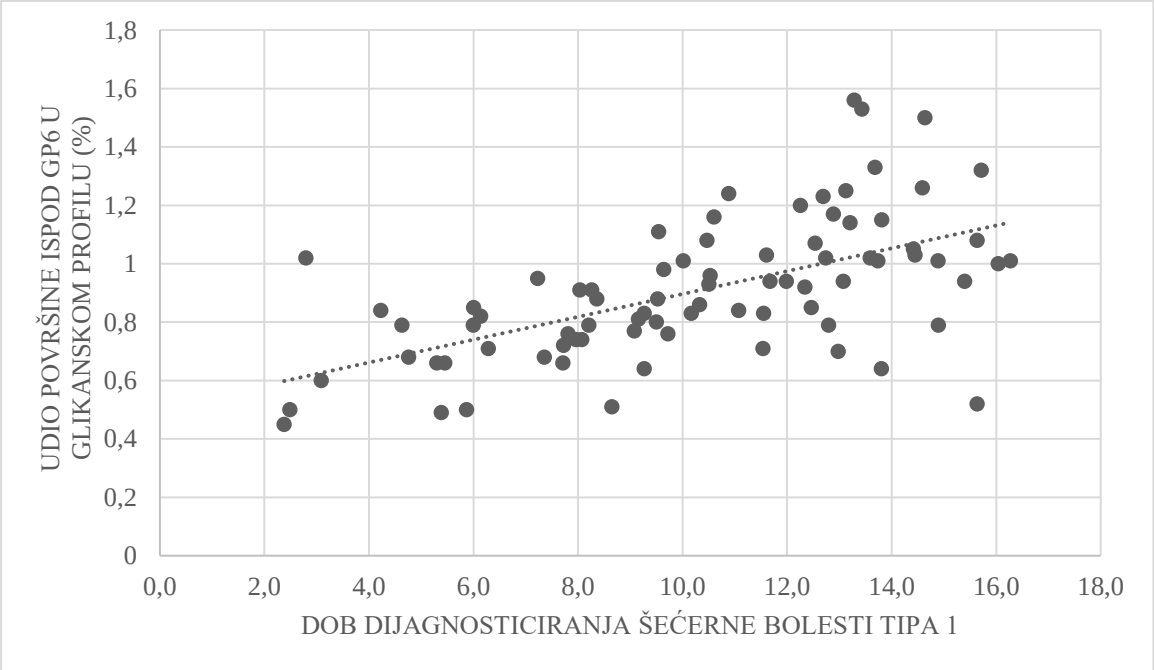
Tablica 11. Prikaz korelacije N-glikana ukupnih plazmatskih proteina s dobi muških ispitanika dana Spearmanovim koeficijentom korelacije (ϱ)

GLIKANSKA SKUPINA	**ϱ (Spearman)**	**p vrijednost**
GP1	0,2670	0,0158
GP2	0,3600	0,0010
GP3	0,4530	<0,0001
GP4	0,2980	0,0068
GP5	0,4920	<0,0001
GP6	0,6130	<0,0001
GP7	0,4170	0,0001
GP8	0,0483	0,6682
GP9	0,4670	<0,0001

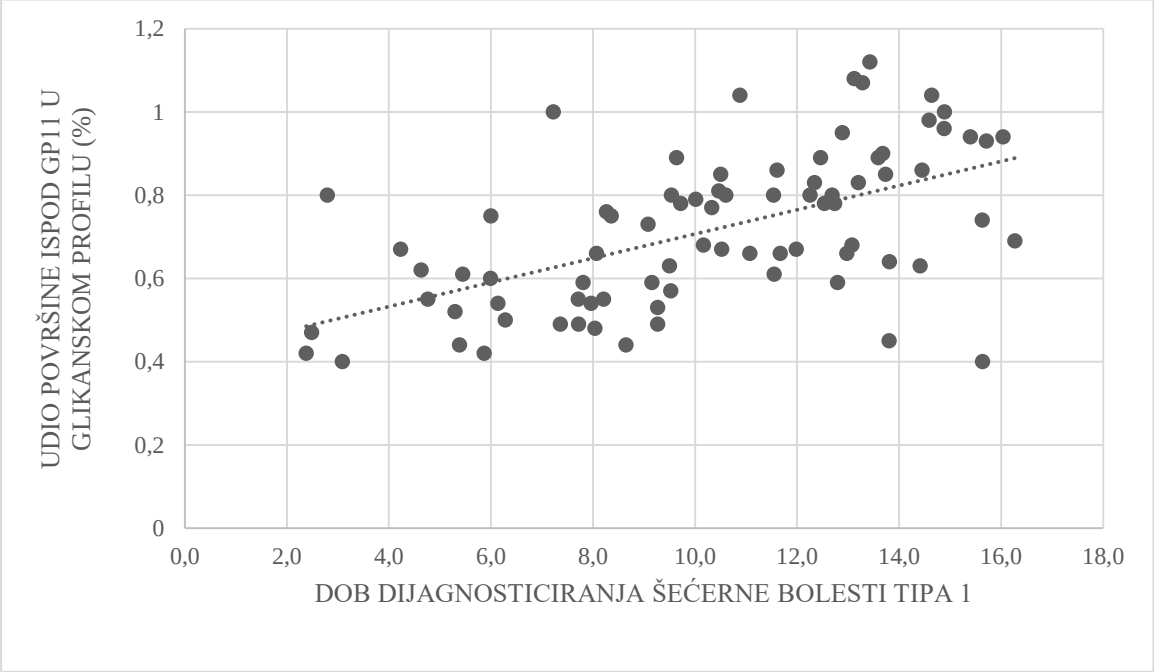
GP10	0,2230	0,0454
GP11	0,5850	<0,0001
GP12	-0,3110	0,0047
GP13	0,4150	0,0001
GP14	-0,0991	0,3785
GP15	0,3290	0,0027
GP16	0,1540	0,1691
GP17	0,5620	<0,0001
GP18	-0,4060	0,0002
GP19	0,0818	0,4679
GP20	-0,1430	0,2031
GP21	0,1650	0,1419
GP22	0,1840	0,1006
GP23	0,4670	<0,0001
GP24	-0,5420	<0,0001
GP25	-0,4640	<0,0001
GP26	0,1080	0,3364
GP27	-0,5730	<0,0001
GP28	-0,1850	0,0986
GP29	-0,5580	<0,0001
GP30	-0,4970	<0,0001
GP31	-0,2980	0,0088
GP32	-0,0303	0,7883
GP33	-0,4500	<0,0001
GP34	-0,0360	0,7497
GP35	-0,2680	0,0154
GP36	-0,4950	<0,0001
GP37	-0,3850	0,0004

GP38	-0,0728	0,5186

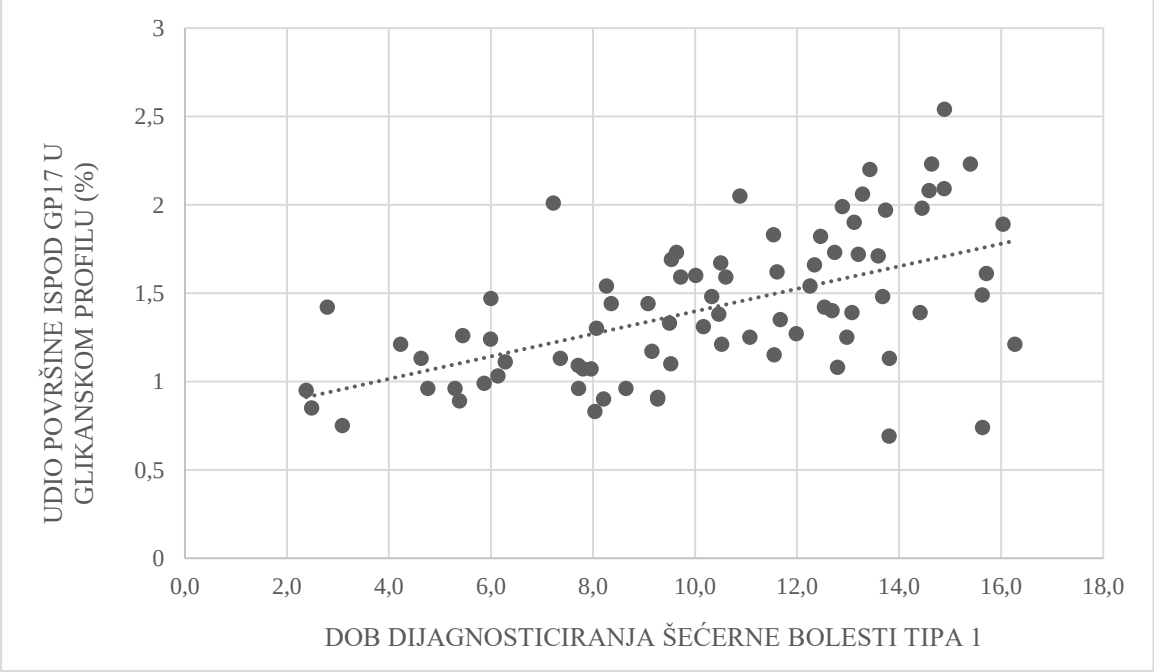
Iz rezultata prikazanih u navedenoj tablici vidljivo je da za neke glikanske skupine postoji značajna korelacija između dobi dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 te površine pika određene glikanske skupine u kromatogramu budući da je p vrijednost manja od 0,05. Iz rezultata za ispitanike muškog spola, značajna korelacija postoji za GP1, GP2, GP3, GP4, GP5, GP6, GP7, GP9, GP10, GP11, GP12, GP13, GP15, GP17, GP18, GP23, GP24, GP25, GP27, GP29, GP30, GP31, GP33, GP35, GP36, GP37. Kod muških ispitanika prisutno je 26 značajnih korelacija. Što je Spearmanov koeficijent korelacije ϱ bliži +/-1 to je korelacija između obilježja jača te je vjerojatnije postojanje funkcionalne veze između ta dva obilježja. Kod rezultata ispitanika muškog spola najveći Spearmanovi koeficijenti korelacije ϱ prisutni su kod GP6, ϱ=0,6130; GP11, ϱ=0,5850; GP17, ϱ=0,5620; GP24, ϱ= -0,5420; GP27, ϱ= -0,5730; GP29, ϱ= -0,5580. Prikazi tih korelacija su vidljivi u sljedećim grafovima.



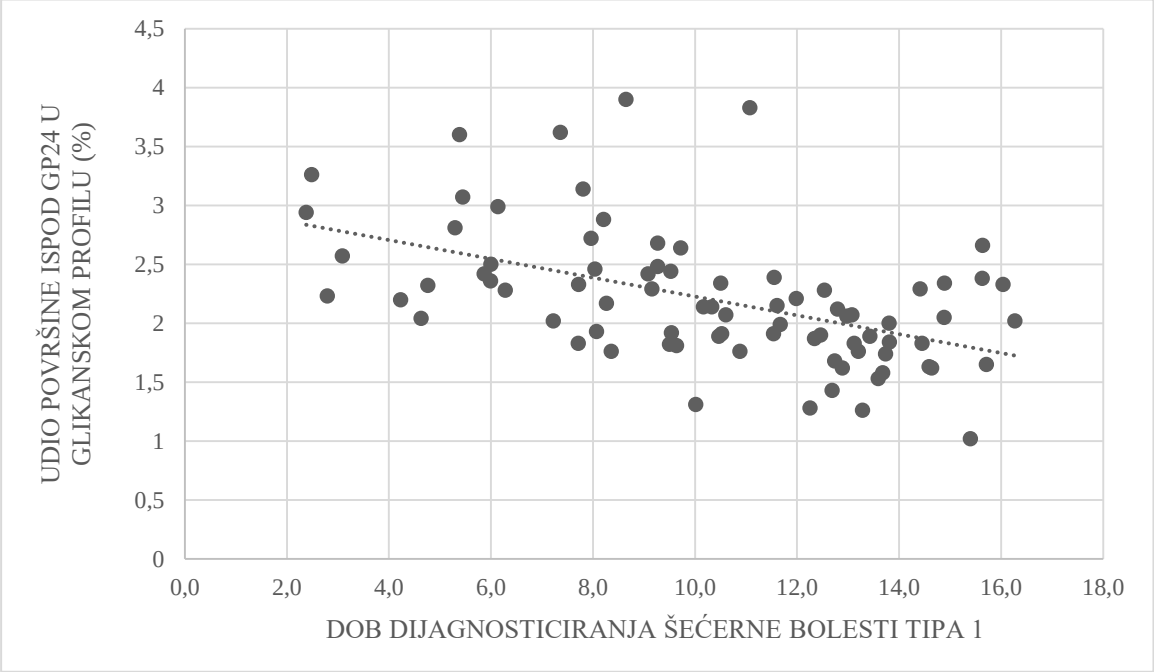
Graf 5. Prikaz ovisnosti udjela površine ispod GP6 u ukupnom glikanskom profilu o dobi dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 kod ispitanika muškog spola



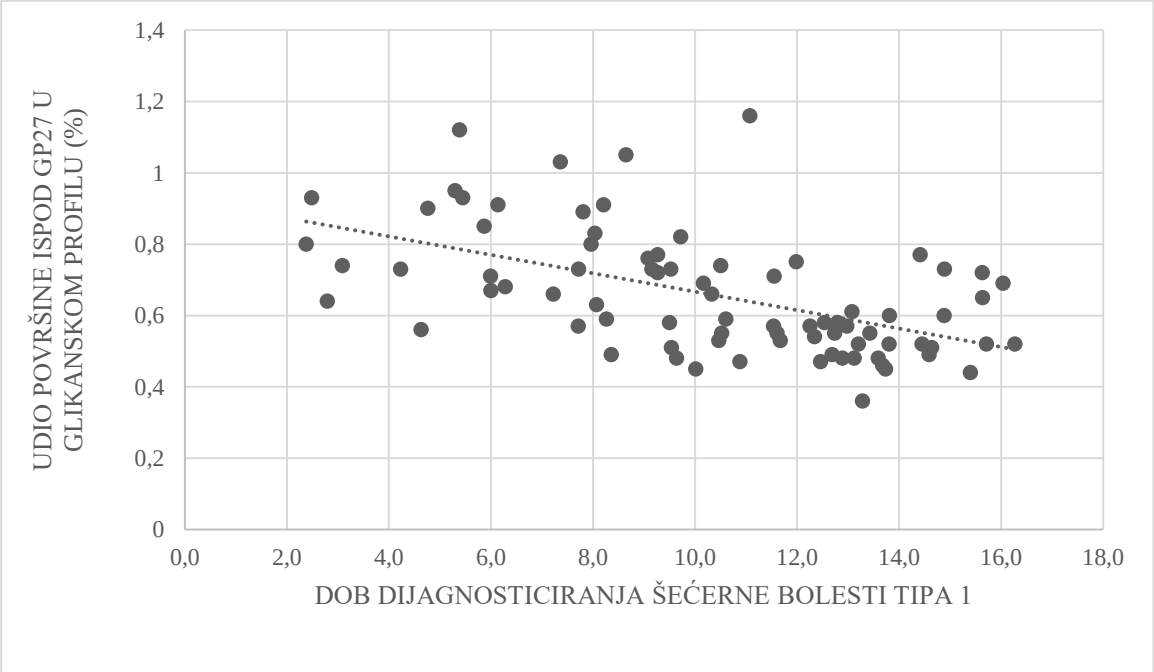
Graf 6. Prikaz ovisnosti udjela površine ispod GP11 u ukupnom glikanskom profilu o dobi dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 kod ispitanika muškog spola



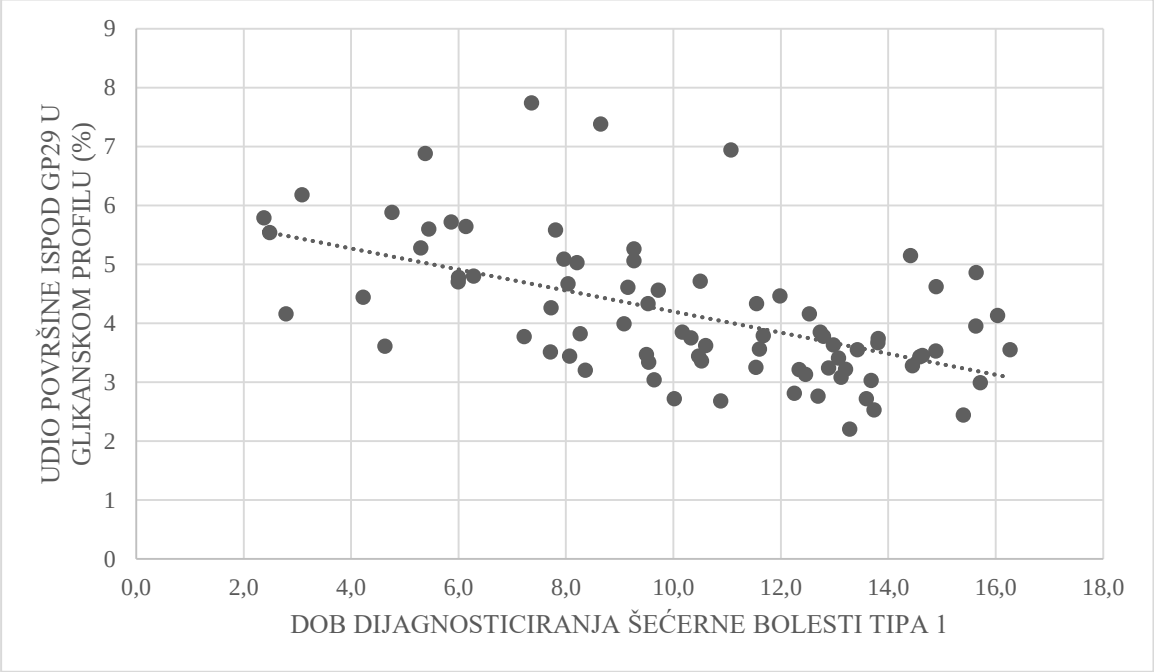
Graf 7. Prikaz ovisnosti udjela površine ispod GP17 u ukupnom glikanskom profilu o dobi dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 kod ispitanika muškog spola



Graf 8. Prikaz ovisnosti udjela površine ispod GP24 u ukupnom glikanskom profilu o dobi dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 kod ispitanika muškog spola



Graf 9. Prikaz ovisnosti udjela površine ispod GP27 u ukupnom glikanskom profilu o dobi dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 kod ispitanika muškog spola



Graf 10. Prikaz ovisnosti udjela površine ispod GP29 u ukupnom glikanskom profilu o dobi dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 kod ispitanika muškog spola

4.2.3. Korelacija dobi i N-glikozilacije plazmatskih proteina kod ženskih ispitanika

Ispitana je korelacija N-glikana ukupnih plazmatskih proteina s dobi ženskih ispitanika (tablica 12.).

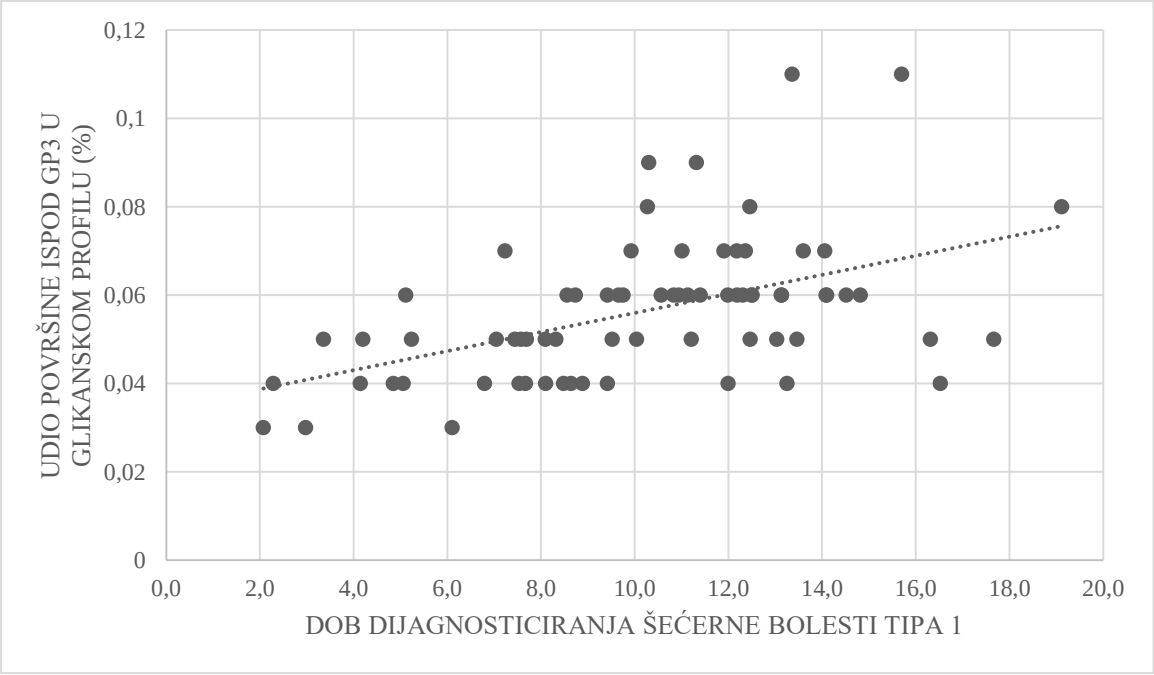
Tablica 12. Prikaz korelacije N-glikana ukupnih plazmatskih proteina s dobi ženskih ispitanika dana Spearmanovim koeficijentom korelacije (ϱ)

GLIKANSKA SKUPINA	**ϱ (Spearman)**	**p vrijednost**
GP1	-0,0751	0,5308
GP2	0,0234	0,8455
GP3	0,5170	<0,0001
GP4	0,1220	0,3066
GP5	0,4180	0,0003
GP6	0,2670	0,0232
GP7	0,2090	0,0777
GP8	0,0200	0,8674
GP9	0,4710	<0,0001

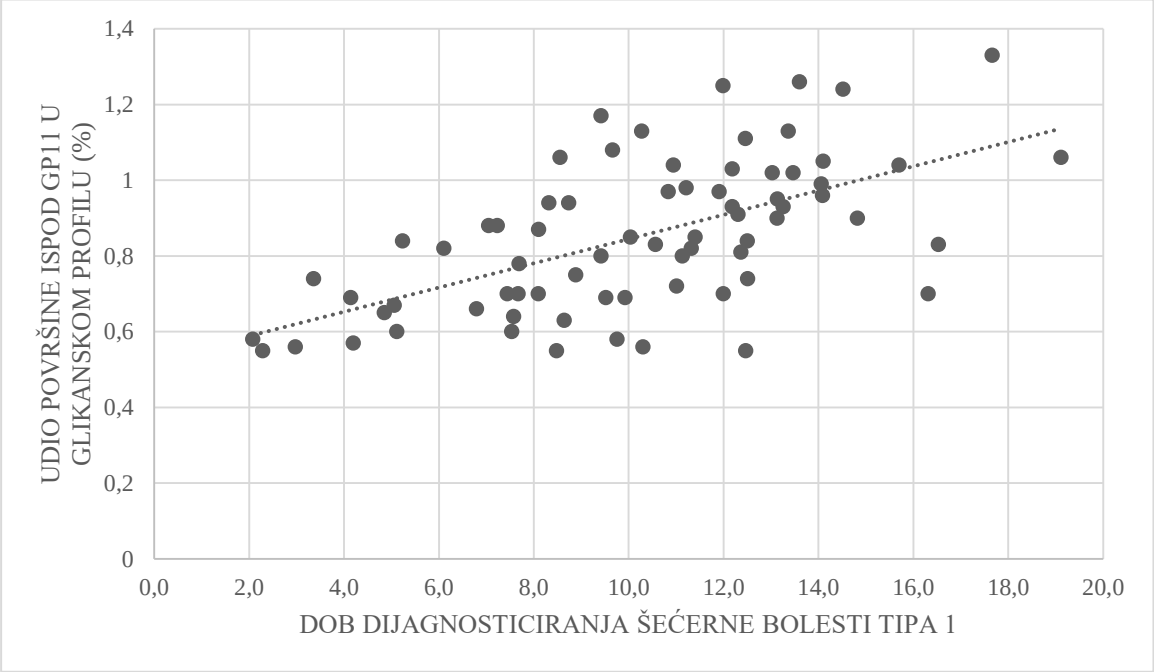
GP10	0,3580	0,0020
GP11	0,5980	<0,0001
GP12	-0,3880	0,0007
GP13	0,1930	0,1044
GP14	-0,0937	0,4339
GP15	0,3100	0,0080
GP16	0,3210	0,0060
GP17	0,5410	<0,0001
GP18	-0,5160	<0,0001
GP19	-0,0021	0,9859
GP20	-0,1310	0,2725
GP21	0,0737	0,5383
GP22	0,2130	0,0727
GP23	0,3030	0,0098
GP24	-0,3410	0,0034
GP25	-0,0486	0,6852
GP26	-0,0809	0,4992
GP27	-0,4480	0,0001
GP28	-0,4660	<0,0001
GP29	-0,3460	0,0029
GP30	-0,2770	0,0186
GP31	0,0731	0,5419
GP32	-0,0892	0,4559
GP33	-0,3110	0,0078
GP34	-0,1540	0,1971
GP35	-0,2550	0,0310
GP36	-0,5140	<0,0001
GP37	-0,3660	0,0016

GP38	-0,1780	0,1345

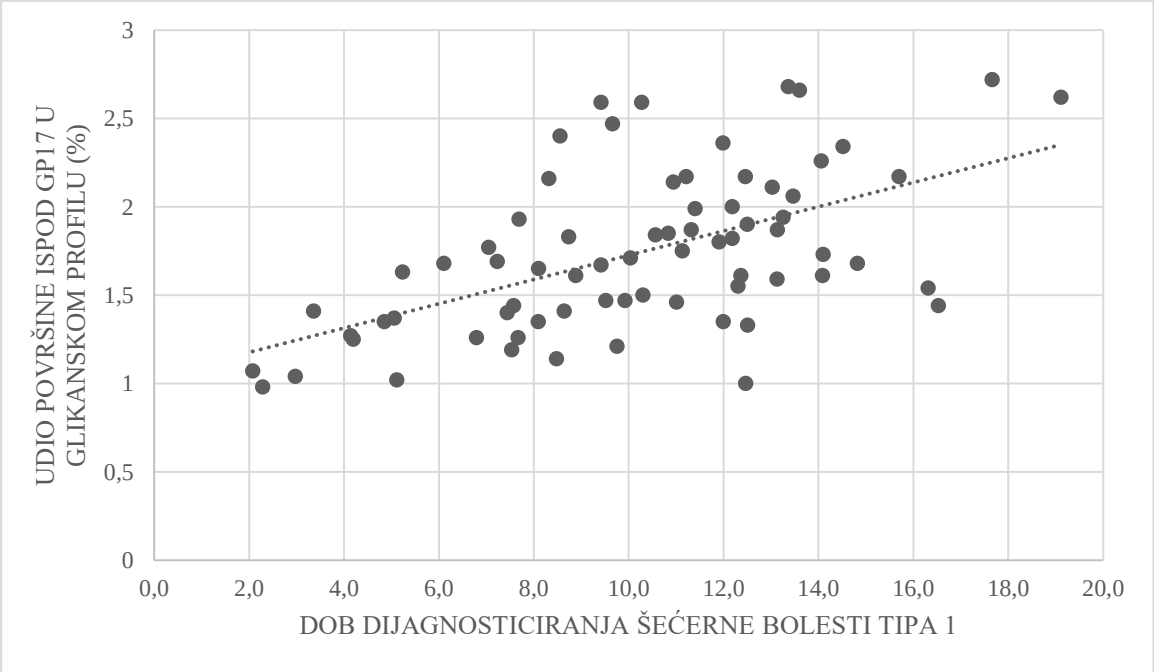
Iz rezultata prikazanih u navedenoj tablici vidljivo je da za neke glikanske skupine postoji značajna korelacija između dobi kada je ispitanicima dijagnosticirana šećerna bolest tipa 1 te površine pika određene glikanske skupine u kromatogramu budući da je p vrijednost manja od 0,05. Iz rezultata za ispitanike ženskog spola, značajna korelacija postoji za GP3, GP5, GP6, GP9, GP10, GP11, GP12, GP15, GP16, GP17, GP18, GP23, GP24, GP27, GP28, GP29, GP30, GP33, GP35, GP36, GP37. Vidljivo je da je najmanje značajnih korelacija između dobi dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 i površina pikova glikanskih skupina kod ženskih ispitanika (21). Što je Spearmanov koeficijent korelacije ϱ bliži +/-1 to je korelacija između obilježja jača te je vjerojatnije postojanje funkcionalne veze između ta dva obilježja. Kod rezultata ispitanika ženskog spola najveći Spearmanovi koeficijenti korelacije ϱ prisutni su kod GP3, ϱ=0,5170; GP11, ϱ=0,5980; GP17, ϱ=0,5410; GP18, ϱ= -0,5160; GP36, ϱ= -0,5140. Prikazi tih korelacija su vidljivi u sljedećim grafovima.



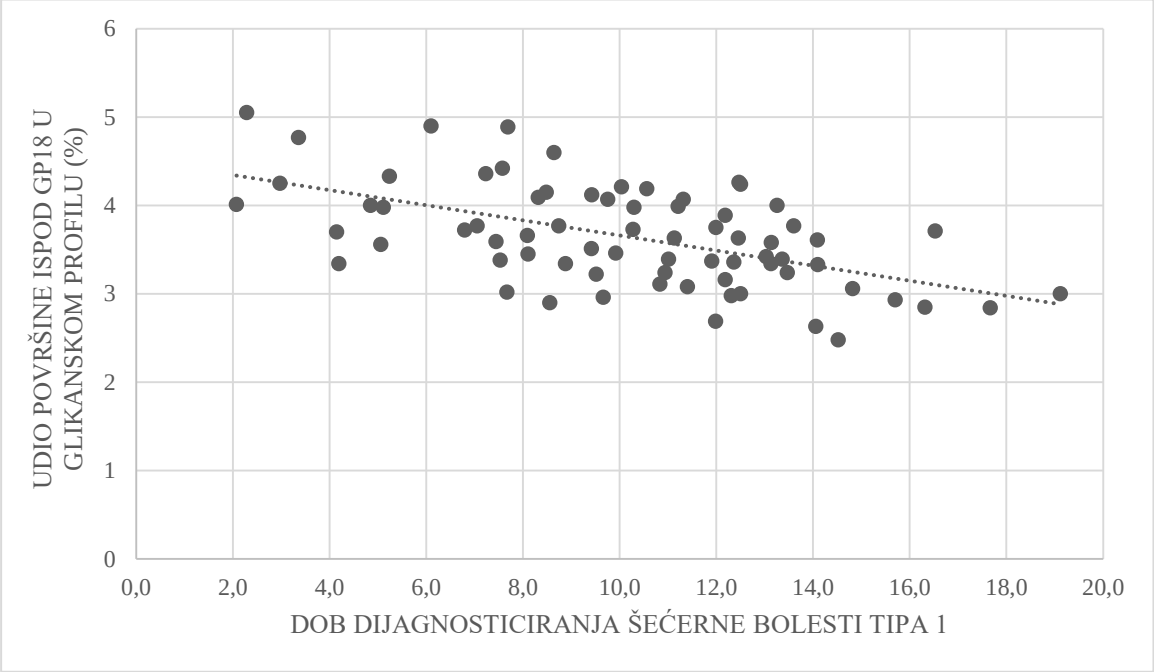
Graf 11. Prikaz ovisnosti udjela površine ispod GP3 u ukupnom glikanskom profilu o dobi dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 kod ispitanika ženskog spola



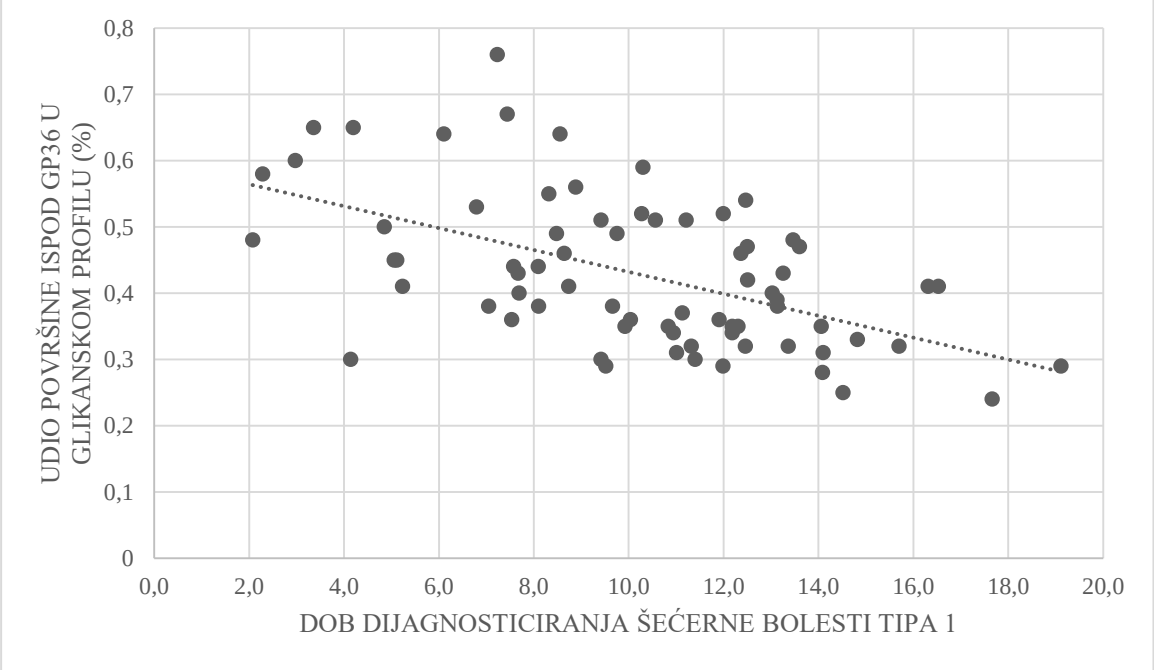
Graf 12. Prikaz ovisnosti udjela površine ispod GP11 u ukupnom glikanskom profilu o dobi dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 kod ispitanika ženskog spola



Graf 13. Prikaz ovisnosti udjela površine ispod GP17 u ukupnom glikanskom profilu o dobi dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 kod ispitanika ženskog spola



Graf 14. Prikaz ovisnosti udjela površine ispod GP18 u ukupnom glikanskom profilu o dobi dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 kod ispitanika ženskog spola



Graf 15. Prikaz ovisnosti udjela površine ispod GP36 u ukupnom glikanskom profilu o dobi dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 kod ispitanika ženskog spola

4.2.4. Potencijal N-glikana kao biomarkera u budućnosti

Rezultati eksperimentalnog djela ovog diplomskog rada pokazuju da postoji korelacija između dobi dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1 i nekih glikanskih skupina. Glikanske skupine 11 i 17 koje obuhvaćaju N-glikane FA2BG2 i FA2BG2S1, pokazale su najveću korelaciju s dobi nakon obrade rezultata za sve ispitanike, ali i nakon zasebne obrade rezultata ispitanika ženskog spola. Te glikanske skupine pokazuju veliku korelaciju s dobi i kod zasebne obrade rezultata ispitanika muškog spola, međutim najveću korelaciju kod obrade tih podataka pokazuje glikanska skupina 6 koja obuhvaća N-glikan FA2[6]BG1.

Usporedbom dobivenih rezultata s postojećim podacima o glikozilaciji u zdravoj dječjoj populaciji primijećene su neke sličnosti.

1) Sijalinizacija i razgranatost N-glikana padaju s porastom dječje dobi

Od 38 glikanskih skupina dobivenih razdvajanjem na HILIC-UPLC-u, 26 ih sadrži sijalinizirane N-glikane koji su razgranati. Kod 18 od navedenih 26 primjećuje se pad u njihovoj učestalosti s porastom dječje dobi. Od preostalih 8, šest glikanskih skupina sadrže N-glikane koji su digalaktozilirani čija učestalost raste s dječjom dobi.

2) Jezgrena fukozilacija pada s porastom dječje dobi

Jezgrenu fukozu sadrže N-glikani u 17 glikanskih skupina. Kod pet od navedenih 17 (šest kod skupine ženskih ispitanika) primjećuje se pad u njihovoj učestalosti s porastom dječje dobi. Dio preostalih glikanskih skupina koje ne pokazuju pad sadrži N-glikane koji su digalaktozilirani i čija učestalost s dobi raste.

3) Agalaktozilacija, tri- i tetra-galaktozilacija padaju s porastom dječje dobi

Agalaktozilirani ili tri- ili tetra-galaktozilirani N-glikani prisutni su u 17 glikanskih skupina. Kod 13 od navedenih 17 (15 kod skupine ženskih ispitanika) primjećuje se pad u njihovoj učestalosti s porastom dječje dobi.

4) Digalaktozilacija raste s porastom dječje dobi

Digalaktozilirani N-glikani prisutni su u 13 glikanskih skupina. Kod 10 od navedenih 13 primjećuje se porast u njihovoj učestalosti s porastom dječje dobi. Preostale tri glikanske skupine sadrže sijalinizirane N-glikane te je kod njih primijećen pad u učestalosti.

S obzirom na navedene usporedbe dobivenih rezultata s poznatim podacima o zdravoj dječjoj populaciji može se zaključiti da postoji korelacija između glikozilacije u zdravoj i bolesnoj dječjoj populaciji.

Što se tiče usporedbe s odraslom populacijom, iz postojeće literature je poznato da se glikozilacija značajno razlikuje između dječje i odrasle dobi[19]. Kod odraslih je primijećen porast agalaktozilacije s dobi, a kod djece pad. U dobivenim rezultatima primijećen je pad agalaktozilacije s porastom dječje dobi pa se može zaključiti da se glikozilacija bolesne dječje populacije razlikuje od glikozilacije odrasle populacije.

[19] Podaci se odnose na zdravu dječju i odraslu populaciju

5. ZAKLJUČAK

Šećerna bolest tipa 1, kao jedna od najraširenijih bolesti na svijetu, zahvaća sve više mlade populacije kojoj se navedena bolest često otkrije već u poodmaklom stanju jer u početku svojeg razvoja u organizmu bude prikrivena te nakon određenog vremena nastupa iznenada i vrlo dramatično. Zbog toga pacijenti budu narušenog općeg zdravlja, a moguć je i razvoj težih komplikacija te se javlja potreba za ranim uvođenjem teške terapije. S obzirom na sve navedeno, idealno bi bilo pronaći biomarkere koji bi u ranoj, prikrivenoj fazi razvoja šećerne bolesti mogli otkriti njeno postojanje – smatra se da bi to mogli biti N-glikani. Istraživanjem provedenim u ovom diplomskom radu zaključilo se da neki N-glikani pokazuju značajnu korelaciju s dobi dijagnosticiranja šećerne bolesti tipa 1, pogotovo glikanska skupina 6 koja obuhvaća N-glikan FA2[6]BG1 za ispitanike muškog spola. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da se kod ispitivanja dijagnostičke vrijednosti N-glikana za šećernu bolest tipa 1, treba uzeti u obzir i utjecaj dobi na glikanske profile. Također, uzimajući u obzir važnost glikana u patofiziologiji drugih autoimunih bolesti, nesumnjivo je da će se daljnjim istraživanjima u ovom polju otkriti nova saznanja o N-glikanima kao potencijalnim biomarkerima autoimunih bolesti.

6. LITERATURA

1) Surmacz L, Swiezevska E. What We Do and Do Not Know About the Cellular Function of Polyisoprenoids. U: Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms: New Concepts and Experimental Approaches. Bach TJ, Rohmer M, urednici, New York, Springer, 2013, str. 307.
2) Buzewski B, Noga S. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) – A Powerful Separation Technique. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 402, 231-247.
3) Cooper GM, Hausman RE. Stanica: Molekularni pristup. Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 335-336.
4) ER, Golgi and Protein Processing, http://www.zoology.ubc.ca/~berger/B200sample/unit_8_protein_processing/golgi/lect28.htm, pristupljeno 18.2.2017.
5) Glycosylation: What is it, how it affects patients with diabetes, 2004., http://www.diabetesincontrol.com/glycosylation/, pristupljeno 20.2.2017.
6) Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Disease markers*, 2008, 25, 267-278.
7) Krištić J, Vučković F et al. Glycans are a Novel Biomarker of Chronological and Biological Ages. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2014, 69 (7), 779-789.
8) Lodish H, Berk A, Zipursky SL et al. Molecular Cell Biology. New York, W.H. Freeman, 2000, section 17.7, str. 701-742.
9) Pučić M, Mužinić A, Novokmet M, Škledar M, Pivac N, Lauc G, Gornik O. Changes in plasma and IgG N-glycome during childhood and adolescence. *Glycobiology*, 2012, 22 (7), 975-982.
10) Štraus B, Petlevski R. Ugljikohidrati. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 113-116.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. SAŽETAK

Glikozilacija je jedna od najčešćih posttranslacijskih modifikacija proteina te ima važnu ulogu u mnogim bolestima. Šećerna bolest tipa 1 je među najraširenijim autoimunosnim bolestima današnjice čiji uzrok kod djece nije poznat. S obzirom na razvoj suvremenih analitičkih metoda omogućena je analiza glikozilacije u velikom broju uzoraka te je primijećeno da glikozilacija ovisi o raznim navikama i tjelesnim čimbenicima. Istraživanjima je ustanovljeno da se glikanski profili mijenjaju u raznim bolestima pa je bitno otkriti izvor ovih promjena. Iz navedenih razloga je u ovom radu ispitan utjecaj dobi na glikozilaciju proteina u uzorcima plazme ispitanika dobivenih iz registra uzoraka dječjeg dijabetesa u Danskoj (engl. The Danish Society for Childhood Diabetes Registry – DanDiabKids).

Analiza N-glikana u navedenim uzorcima provedena je HILIC-UPLC metodom, a dobiveni podaci su statistički obrađeni u Excel-u i MedCalc-u Spearmanovim testom korelacije. Usporedbom dobi ispitanika s dobivenim rezultatima analize glikana primjećena je korelacija u nekim glikanskim skupinama od kojih je najveći Spearmanov koeficijent korelacije primjećen u populaciji muških ispitanika za glikansku skupinu 6.

Također je primjećena i usporedivost dobivenih rezultata bolesne dječje populacije s postojećim podacima o ovisnosti između glikozilacije i dobi zdrave dječje populacije. Glikozilacija kod bolesne dječje populacije se, kao i kod zdrave dječje populacije, značajno razlikuje u usporedbi s glikozilacijom odrasle populacije. Ovim istraživanjem dokazana je povezanost između N-glikozilacije plazmatskih proteina i dobi kod djece sa šećernom bolesti tipa 1.

7.2. SUMMARY

Glycosylation, being one of the most common posttranslational modifications of proteins, plays an important role in many diseases such as diabetes. Diabetes mellitus type 1 is among the most widespread autoimmune diseases of our time, whose cause is unknown. Considering the development of modern analytical methods, glycosylation analysis is enabled in a large number of samples and it is noticed that glycosylation depends on many different habits and physical factors. Studies have shown that glycan profiles are changing in different diseases so it is important to discover the source of these changes. Therefore, this paper tested the impact of age on the glycosylation of proteins in plasma samples of subjects of The Danish Society for Childhood Diabetes Registry – DanDiabKids. N-glycan analysis of the above mentioned samples were done by HILIC-UPLC and the data were statistically processed in Excel and

MedCalc using Spearman's correlation test. Comparing age of subjects with glycan analysis results we noticed a correlation in some of the glycan peaks, with the highest Spearman's correlation coefficient being noticed in glycan peak 6 for male subjects.

We noticed the comparability between the results of the sick children population and existing data on correlation between glycosylation and the age of healthy children population. Glycosylation in sick children, as in the healthy children population, is significantly different from glycosylation in adults. This research proved the connection between N-glycosylation of plasma proteins and age of children with diabetes mellitus type 1.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Povezanost N-glikozilacije plazmatskih proteina s dobi kod djece sa šećernom bolesti tipa 1

Ana Cvetko

SAŽETAK

Glikozilacija je jedna od najčešćih posttranslacijskih modifikacija proteina te ima važnu ulogu u mnogim bolestima. Šećerna bolest tipa 1 je među najraširenijim autoimunosnim bolestima današnjice čiji uzrok kod djece nije poznat. S obzirom na razvoj suvremenih analitičkih metoda omogućena je analiza glikozilacije u velikom broju uzoraka te je primijećeno da glikozilacija ovisi o raznim navikama i tjelesnim čimbenicima. Istraživanjima je ustanovljeno da se glikanski profili mijenjaju u raznim bolestima pa je bitno otkriti izvor ovih promjena. Iz navedenih razloga je u ovom radu ispitan utjecaj dobi na glikozilaciju proteina u uzorcima plazme ispitanika dobivenih iz registra uzoraka dječjeg dijabetesa u Danskoj (engl. The Danish Society for Childhood Diabetes Registry – DanDiabKids).
Analiza N-glikana u navedenim uzorcima provedena je HILIC-UPLC metodom, a dobiveni podaci su statistički obrađeni u Excel-u i MedCalc-u Spearmanovim testom korelacije. Usporedbom dobi ispitanika s dobivenim rezultatima analize glikana primjećena je korelacija u nekim glikanskim skupinama od kojih je najveći Spearmanov koeficijent korelacije primjećen u populaciji muških ispitanika za glikansku skupinu 6. Također je primjećena i usporedivost dobivenih rezultata bolesne dječje populacije s postojećim podacima o ovisnosti između glikozilacije i dobi zdrave dječje populacije. Glikozilacija kod bolesne dječje populacije se, kao i kod zdrave dječje populacije, značajno razlikuje u usporedbi s glikozilacijom odrasle populacije. Ovim istraživanjem dokazana je povezanost između N-glikozilacije plazmatskih proteina i dobi kod djece sa šećernom bolesti tipa 1.

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

Rad sadrži: 47 stranica, 22 grafička prikaza, 12 tablica i 10 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

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

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Olga Gornik**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Nada Vrkić, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: travanj 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

The correlation between N-glycosylation of plasma proteins and age in children with diabetes mellitus type 1

Ana Cvetko

SUMMARY

Glycosylation, being one of the most common posttranslational modifications of proteins, plays an important role in many diseases such as diabetes. Diabetes mellitus type 1 is among the most widespread autoimmune diseases of our time, whose cause is unknown. Considering the development of modern analytical methods, glycosylation analysis is enabled in a large number of samples and it is noticed that glycosylation depends on many different habits and physical factors. Studies have shown that glycan profiles are changing in different diseases so it is important to discover the source of these changes. Therefore, this paper tested the impact of age on the glycosylation of proteins in plasma samples of subjects of The Danish Society for Childhood Diabetes Registry – DanDiabKids. N-glycan analysis of the above mentioned samples were done by HILIC-UPLC and the data were statistically processed in Excel and MedCalc using Spearman's correlation test. Comparing age of subjects with glycan analysis results we noticed a correlation in some of the glycan peaks, with the highest Spearman's correlation coefficient being noticed in glycan peak 6 for male subjects.
We noticed the comparability between the results of the sick children population and existing data on correlation between glycosylation and the age of healthy children population. Glycosylation in sick children, as in the healthy children population, is significantly different from glycosylation in adults. This research proved the connection between N-glycosylation of plasma proteins and age of children with diabetes mellitus type 1.

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

Thesis includes: 47 pages, 22 figures, 12 tables and 10 references. Original is in Croatian language.

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

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

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

The thesis was accepted: April 2017.