Utjecaj spolnih hormona na N-glikozilaciju imunoglobulina G u žena

Jurić, Julija

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:579124

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Julija Jurić

UTJECAJ SPOLNIH HORMONA NA N-GLIKOZILACIJU IMUNOGLOBULINA G U ŽENA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Julija Jurić

UTJECAJ SPOLNIH HORMONA NA N-GLIKOZILACIJU IMUNOGLOBULINA G U ŽENA

DOKTORSKI RAD

Mentor:
dr. sc. Marija Pezer, znan. sur.

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Julija Jurić

EFFECT OF SEX HORMONES ON N-GLYCOSYLATION OF IMMUNOGLOBULIN G IN WOMEN

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Dr. Marija Pezer, Res. Assoc.

Zagreb, 2021.

Ovaj doktorski rad izrađen je u laboratoriju za glikobiologiju tvrtke Genos d.o.o. pod vodstvom znanstvene suradnice dr. sc. Marije Pezer u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

INFORMACIJE O MENTORICI

Znanstvena suradnica dr. sc. Marija Pezer (rođ. Maćešić) je 2003. godine diplomirala Molekularnu biologiju na Biološkom odsjeku PMF-a Sveučilišta u Zagrebu. Po završetku studija, zapošljava se u Istraživačkom institutu farmaceutske kompanije PLIVA gdje je provela 2 godine radeći kao istraživač – molekularni biolog. U PLIVI razvija i testira nove molekule usmjerene protiv neinfektivnih upalnih bolesti i uspostavlja novi Laboratorij za transgenska istraživanja.

Od 2008. godine radi kao mlađi, a kasnije i viši asistent u Dječjoj bolnici Srebrnjak u Zagrebu, gdje sljedećih šest godina istražuje osnovne mehanizme razvoja i napredovanja alergijskih bolesti u djece. U sklopu doktorata provela je tri mjeseca usavršavajući se na Sveučilištu Manchester u Velikoj Britaniji i godinu dana u Davosu na Švicarskom institutu za istraživanje alergija i astme. Doktorirala je 2013. godine, a 2017. godine stekla je zvanje znanstvenog suradnika u području prirodnih znanosti, polje biologija, znanstvena grana molekularna biologija i biokemija.

Od 2014. godine zaposlena je u Genosu, Laboratoriju za glikobiološka istraživanja, gdje radi na otkrivanju uloge različitih obrazaca glikozilacije imunoglobulina G u imunosnom odgovoru za razvoj personaliziranog pristupa očuvanju zdravlja. Autorica je preko 40 znanstvenih radova i dva poglavlja knjiga, te urednica jedne knjige iz užeg znanstvenog područja na engleskom jeziku.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Gordanu Laucu što mi je pružio priliku za rad i usvajanje novih znanja.

Također se zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Mariji Pezer na savjetima, pomoći i vodstvu u eksperimentalnom dijelu, kao i u pisanju doktorskog rada.

Svim suradnicima u Hrvatskoj i Kini želim zahvaliti na sudjelovanju na projektu koji je omogućio izradu ovog rada.

Posebno hvala mom kolegi dr. sc. Frani Vučkoviću na statističkoj analizi podataka, dr. sc. Felixu Agakovu iz Pharmatics Limited u Edinburgu na automatskoj integraciji kromatograma i dr. sc. Saši Kralik Oguić s Odjela za laboratorijsku endokronologiju Klinike za ženske bolesti i porode Kliničkog bolničkog centra Zagreb na pomoći pri mjerenju koncentracije hormona.

Također, veliko hvala svim mojim kolegama u Genosu i na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu na znanstvenim razgovorima, druženjima i savjetima.

Zahvaljujem se svojoj obitelji, roditeljima i prijateljima na podršci i vjeri u mene.

I na kraju, najveće hvala najmanjima, mojoj djeci Andriji, Jeleni i Nikoli, i mom mužu Ivanu.

„Svi ljudi koje kroz život upoznamo naši su učitelji.“

Robertina Tavra, Divya Yoga Centar

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

Utjecaj spolnih hormona na N-glikozilaciju imunoglobulina G u žena

JULIJA JURIĆ

Genos d.o.o. – Laboratorij za glikobiologiju, Borongajska cesta 83H,
10 000 Zagreb, Republika Hrvatska

N-glikozilacija je posttranslacijska modifikacija imunoglobulina G (IgG) koja se mijenja u bolestima, sa starenjam i pod utjecajem spolnih hormona. U ovom doktorskom radu tekućinskom kromatografijom ultravisoke učinkovitosti analizirani su glikanski profili protutijela IgG iz krvne plazme zdravih žena tijekom menstruacijskih ciklusa (MC) iz ukupno 12 vremenskih točaka – svakih 7 dana tijekom 3 mjeseca. Primijećene su periodične cikličke promjene N-glikozilacije povezane s fazama ciklusa i koncentracijom spolnih hormona. Estrogen i progesteron su povezani s povećanom razinom digalaktoziliranih i sijaliniziranih N-glikana u luteinskoj fazi, a testosteron je povezan s povećanom razinom agalaktoziliranih i monogalaktoziliranih N-glikana u folikularnoj fazi ciklusa. Najveću varijabilnost unutar osobe imali su sijalinizirani i agalaktozilirani N-glikani, dok se fukozilacija nije mijenjala tijekom MC. Prosječna varijabilnost N-glikozilacije u ciklusima svih ispitanica su vrlo male, do 0.8%, što omogućuje da se prikupljanje i analiza N-glikana protutijela IgG iz uzoraka krvi žena u studijama s velikim brojem ispitanika odvija neovisno o fazi MC.

(115 stranica, 19 slika, 9 tablica, 249 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: menstruacijski ciklus, N-glikozilacija, IgG, spolni hormoni, estrogen, žene

Mentor: dr. sc. Marija Pezer, znanstveni suradnik
Ocjenjivači: dr. sc. Gordan Lauc, prof.
dr. sc. Biljana Balen, prof.
dr. sc. Aleksandar Vojta, izv. prof.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

Effect of sex hormones on N-glycosylation of immunoglobulin G in women

JULIJA JURIĆ

Genos Ltd. – Glycoscience Research Laboratory, Borongajska cesta 83H,
10 000 Zagreb, Croatia

N-glycosylation is a post-translational modification of immunoglobulin G (IgG) that changes in diseases, with ageing and under the influence of sex hormones. In this doctoral dissertation, plasma-derived IgG from 12 time points – every 7 days during 3 months in the menstrual cycles (MC) of 70 healthy women was glycoprofiled by ultra-performance liquid chromatography. Periodic cyclic N-glycosylation changes which associated with MC phases and plasma sex hormone concentrations were observed. Estrogen and progesterone associated with increased digalactosylated and sialylated N-glycans in the luteal phase, while testosterone associated with increased agalactosylated and monogalactosylated N-glycans in the follicular phase of the MC. The highest intra-individual variation was observed for sialylated and agalactosylated N-glycans, whereas fucosylation did not change during the MC. The average N-glycosylation variability in the MC is very small on the cohort level, up to 0.8%, meaning that sample collection and IgG N-glycoprofiling of women in large cohort studies can take place independently of the MC phase.

(115 pages, 19 figures, 9 tables, 249 references, original in Croatian)

Keywords: menstrual cycle, N-glycosylation, IgG, sex hormones, estrogen, women

Supervisor: Dr. Marija Pezer, Research Associate
Reviewers: Dr. Gordan Lauc, Professor
Dr. Biljana Balen, Professor
Dr. Aleksandar Vojta, Associate Professor

SADRŽAJ

1 UVOD 1
2 LITERATURNI PREGLED 4
2.1 Spolni hormoni 4
2.1.2 Estradiol 5
2.1.3 Progesteron 5
2.1.1 Testosteron 5
2.2 Sinteza spolnih hormona 6
2.3 Regulacija sinteze spolnih hormona u jajnicima 8
2.4 Menstruacijski ciklus 10
2.5 Mehanizam djelovanja spolnih hormona 12
2.6 Općenito o glikozilaciji proteina 16
2.7 N-glikozilacija proteina 17
2.8 Sinteza N-glikana 18
2.9 Struktura i N-glikozilacija imunoglobulina G 21
2.10 Biološka uloga glikozilacije imunoglobulina G 23
2.10.1 Vezanje na Fcγ receptore 24
2.10.2 Vezanje za neonatalni Fc receptor 26
2.10.3 Aktivacija komplementa 26
2.10.4 Vezanje lektina 27
2.11 N-glikani i efektorske funkcije imunoglobulina G 28
2.12 N-glikozilacija imunoglobulina G u žena 30
3 MATERIJALI I METODE 34
3.1 Ispitanice 34
3.2 Koncept studije 35
3.3 Materijali 37
3.3.1 Kemikalije 37
3.3.2 Enzimi i komercijalni setovi reagencija 37
3.3.3 Pločice za pripremu i pročišćavanje uzoraka 37
3.3.4 Pribor i uređaji 38
3.4 Metode 39
3.4.1 Imunokemijska metoda određivanja koncentracije spolnih hormona 39
3.4.2 Analiza N-glikozilacije imunoglobulina G 40
3.4.3 Obrada i analiza podataka 43
4 REZULTATI 46
4.1 Karakteristike ispitanica 46

4.2 Koncentracija spolnih hormona 47
4.3 Analiza N-glikana tekućinskom kromatografijom ultravisoke učinkovitosti 51
4.4 Biološka varijabilnost N-glikana imunoglobulina G u kohorti 52
4.5 Varijabilnost izvedenih glikanskih svojstava imunoglobulina G na razini osobe 53
4.6 Varijabilnost izvedenih glikanskih svojstava imunoglobulina G u kohorti 54
4.7 Menstruacijski ciklusi ispitanica 55
4.8 Razvoj modela menstruacijskog ciklusa 56
4.9 Varijabilnost N-glikozilacije imunoglobulina G tijekom menstruacijskog ciklusa 57
4.10 Odnos N-glikozilacije imunoglobulina G i različitih faza menstruacijskog ciklusa 58
4.11 Odnos N-glikozilacije imunoglobulina G i spolnih hormona u menstruacijskom ciklusu 59
4.12 Utjecaj menstruacijskog ciklusa na N-glikozilaciju IgG na razini kohorte 62
5 RASPRAVA 64
6 ZAKLJUČCI 76
7 POPIS LITERATURE 78
8 POPIS KRATICA 94
9 PRILOZI 96
10 ŽIVOTOPIS 113

1 UVOD

Glikozilacija je posttranslacijski enzimski proces kovalentnog vezanja glikana (šećera) na proteine. Glikani određuju strukturu i funkciju proteina te imaju važnu ulogu u gotovo svim fiziološkim procesima (Varki, 2017.). Imunoglobulin G (IgG) je najzastupljeniji glikoprotein u ljudskoj plazmi i jedan je od glavnih posrednika u aktivaciji efektorskih stanica imunosnog sustava. Promijenjena N-glikozilacija molekule IgG povezana je s mnogim bolestima, te je stoga većina današnjih studija u ovom području usmjerena na istraživanje biomarkerskog potencijala N-glikana cirkulirajućih protutijela IgG u humanoj plazmi (Dube i Bertozzi, 2005.).

Mehanizam N-glikozilacije molekule IgG još nije u potpunosti razjašnjen (Taniguchi i sur., 2015.), no dosadašnja istraživanja su pokazala da žene tijekom života imaju drugačiji sastav glikana od muškaraca (Krištić i sur., 2014.; Pučić i sur., 2011.), te da se u zdravih žena najveće promjene u N-glikozilaciji ovog protutijela događaju uslijed dramatičnih promjena razine spolnih hormona (Chen i sur., 2012.). S promjenom razine estrogena i progesterona moguće je promijeniti i aktivnost bolesti (Hughes i Choubey, 2014.). Epidemiološke studije su pokazale da visoka razina estrogena u trudnoći dovodi do remisije upalnih i autoimunih bolesti u žena, poput reumatoidnog artritisa (RA) (van de Geijn i sur., 2009.), dok se sa smanjenjem razine spolnih hormona nakon poroda bolest ponovno aktivira (Bondt i sur., 2013.). Zaustavljanje proizvodnje spolnih hormona u jajnicima za vrijeme menopauze također je okidač za povećanu incidenciju ove bolesti u žena (Alpízar-Rodríguez i sur., 2017.). No, razlike u prevalenciji autoimunih (i drugih) bolesti među spolovima su odavno prepoznate. Još prije 20 godina Sjorgenov sindrom, sistemski eritemski lupus, autoimune bolesti štitnjače (Hashimotov sindrom i Gravesova bolest), reumatoidni artritis i multipla skleroza istaknute su kao najčešći autoimuni poremećaji od kojh primarno obolijevaju žene (Whitacre, 2001.). Promjenjena aktivnost kroničnih i upalnih bolesti zabilježena je i u menstruacijskom ciklusu, tijekom kojeg se izmjenjuju faze dominacije estrogena i progesterona praćene odgovarajućim razdobljima povećane ili smanjene aktivnosti ženskog imunosustava (Oertelt-Prigione, 2012.).

Na temelju dosadašnjih istraživanja izvedena je hipoteza da spolni hormoni utječu na N-glikozilaciju, a time i na funkciju protutijela IgG, dok posljedično mogu biti uključeni i u regulaciju ženskog imunosnog sustava. Hipoteza je izvedena na temelju rezultata dosadašnjih istraživanja o promijenjenoj N-glikozilaciji molekule IgG koja je opažena kao dio etiologije upalnih autoimunih bolesti u reproduktivno aktivnih žena (Bondt i sur., 2013.), analize N-glikana protutijela IgG zdravih osoba oba spola (Ercan i sur., 2017.) ili povećanjem incidencije autoimunih bolesti u žena s nastupanjem menopauze (Engdahl i sur., 2018.), no ono

što nedostaje je sustavno praćenje N-glikozilacije molekule IgG tijekom menstruacijskog ciklusa.

Cilj ovog istraživanja je stoga bio longitudinalno pratiti i usporediti glikanske profile molekula IgG iz krvne plazme zdravih žena u reproduktivnom razdoblju života u različitim fazama tijekom nekoliko uzastopnih menstruacijskih ciklusa te ispitati postoji li povezanost faze menstruacijskog ciklusa i koncentracije spolnih hormona s N-glikozilacijom ovog protutijela.

Budući da su prijašnja istraživanja vremenske stabilnosti N-glikozilacije molekule IgG pokazala veću varijabilnost glikana u žena, za razliku od glikana u muškaraca (Hanić, 2015.) ili glikana svih proteina plazme (Gornik i sur., 2009.), bile su očekivane vidljive promjene N-glikozilacije ovog protutijela tijekom ženskog menstruacijskog ciklusa. Međutim, opseg i dinamika tih promjena u menstrucijskom ciklusu, kao i njena povezanost s koncentracijom ženskih spolnih hormona, dosad nije bila poznata, te ju je bilo potrebno istražiti i utvrditi detaljnim analizama u sklopu ovog doktorskog rada.

Prvi dio istraživanja proveden je u Kini, a uključivao je regrutiranje, uzorkovanje i prikupljanje podataka o ispitanicama odabranima za sudjelovanje u studiji. Istraživanja su provedena na uzorcima krvne plazme zdravih Kineskinja etničke pripadnosti Han između 19 i 48 godina starosti koje su imale redovite menstruacijske cikluse. Uzorci krvi prikupljani su jednom tjedno, svakih 7 dana, tijekom 3 mjeseca neovisno o fazi menstruacijskog ciklusa pojedine žene. Istraživanje je obuhvaćalo 12 vremenskih točaka tijekom kojih su praćeni glikanski profili protutijela IgG, koncentracije ženskih spolnih hormona estradiola, progesterona i testosterona, te putem upitnika i zdravstveno stanje i trajanje menstruacijskih ciklusa svake ispitanice.

Drugi dio istraživanja sastojao se od laboratorijskog dijela i glikoanalitičkog dijela. Laboratorijske analize određivanja koncentracije spolnih hormona estradiola, progesterona i testosterona u uzorcima krvne plazme svih ispitanica u studiji provedene su korištenjem komercijalnih setova reagencija za detekciju hormona metodom kemiluminiscencije.

Glikoanalitički dio istraživanja uključivao je analizu N-glikozilacije molekule IgG u uzorcima krvne plazme svih ispitanica. Molekula IgG je prvo izolirana iz krvne plazme afinitetnom kromatografijom pomoću posebno dizajnirane pločice Protein G s 96-jažica koja je

punjena monolitom obloženim proteinom G koji specifično veže humana protutijela IgG. N-glikani su zatim enzimski oslobođeni s molekula IgG, fluorescentno obojani i pročišćeni korištenjem filtar pločice s hidrofilnom membranom, s koje su zaostali N-glikani eluirani dodatkom vode.

Glikanski profili molekule IgG određeni su analizom slobodnih N-glikana metodom tekućinske kromatografije ultravisoke učinkovitosti tijekom koje se N-glikani međusobno razdvajaju na temelju veličine i jačine hidrofilnih interakcija sa stacionarnom fazom u koloni. Kromatografskom analizom direktno su izmjerena 24 različita glikanska pika ili N-glikana molekule IgG. Radi lakše analize i razumijevanja bioloških procesa u kojima glikani sudjeluju, definirano je dodatnih šest izvedenih glikanskih svojstava grupiranjem N-glikana sličnih strukturnih osobina – agalaktozilirani (G0), monogalaktozilirani (G1), digalaktozilirani (G2), sijalinizirani (S), račvajući *N*-acetilglukozamin (GlcNAc) (B) i fukozilirani (F) N-glikani.

Analizom glikanskih podataka određene su promjene N-glikozilacije molekule IgG prvo u svim uzorcima jedne osobe, a zatim i u svim uzorcima na razini istražene grupe žena. Razina svakog od šest izvedenih glikanskih svojstava uspoređena je kroz 12 vremenskih točaka te je određen raspon intraindividualne varijabilnost N-glikozilacije protutijela IgG za svaku ispitanicu.

Za istraživanje promjena N-glikozilacije imunoglobulina G na razini svih ispitanica, konstruiran je model menstruacijskog ciklusa. U model su uvrštena samo glikanska mjerenja iz menstruacijskih ciklusa duljine od 26 do 34 dana, koji su odabrani prema anketnim podatcima sakupljenim od samih ispitanica. U modelu su simulirane dinamika i varijabilnost promjena za šest izvedenih glikanskih svojstava molekule IgG svih glikanskih mjerenja ispitanica.

Kako bi se istražila moguća povezanost spolnih hormona estradiola, progesterona i testosterona s N-glikozilacijom protutijela IgG na razini istražene grupe žena, uz analize asocijacije, korišten je model menstruacijskog ciklusa u kojem su praćena i uspoređena razdoblja najveće razine (pik) izvedenih glikanskih svojstava protutijela IgG i koncentracije navedenih spolnih hormona u uzorcima krvne plazme tijekom menstruacijskih ciklusa ispitanica.

2 LITERATURNI PREGLED

2.1 Spolni hormoni

Hormoni su kemijski glasnici koji usklađuju djelovanja različitih stanica i organa u tijelu (Goodman, 2009.). Izlučuju se iz posebnih stanica ili žlijezda u tjelesne tekućine, prenose do drugih, ciljnih stanica u tijelu i nadziru njihovu funkciju. S obzirom na način prijenosa signala učinci hormona mogu biti:

a) endokrini – hormon se iz stanice u kojoj je nastao prenosi krvlju do ciljne stanice na koju djeluje,
b) neurokrini – hormon koji potječe iz živčane stanice prenosi se u krv te dolazi do ciljne stanice,
c) parakrini – hormon se kroz međustaničnu tekućinu prenosi iz jedne stanice do susjedne stanice druge vrste i
d) autokrini – hormon nakon oslobađanja djeluje na stanicu koja ga je proizvela ili na susjedne stanice iste vrste.

S obzirom na kemijsku građu, hormoni se mogu svrstati u tri glavne skupine: derivate aminokiselina, peptide i proteine, te steroidne hormone. Steroidni hormoni se sintetiziraju iz kolesterola u testisima, jajnicima i posteljici, te kori nadbubrežnih žlijezda, a s obzirom na funkcije koje obavljaju mogu se podijeliti na:

a) glukokortikoide – reguliraju metabolizam hranjivih tvari i uporabu energije,
b) mineralokortikoide – reguliraju ravnotežu soli i vode,
c) androgene – nadziru spolne funkcije u muškarca, te
d) estrogene i progestogene – nadziru spolne funkcije u žena.

Steroidni hormoni koji nadziru spolne funkcije nazivaju se spolni hormoni, a zastupljeni su u različitim koncentracijama i u muškom i u ženskom organizmu (Berg i sur., 2002.). U ovom će se radu detaljno opisati svojstva i funkcije spolnih hormona testosterona, estradiola i progesterona u ženskom tijelu i pokušati razjasniti njihov utjecaj na N-glikozilaciju, najučestaliju i najvažniju posttranslacijsku modifikaciju protutijela imunoglobulina G.

2.1.2 Estradiol

Estron (E1), estradiol (E2) i estriol (E3) su tri steroidna spolna hormona iz grupe estrogena koji se međusobno razlikuju po strukturi i estrogenskom učinku (Vardanyan i Hruby, 2016.). Biološki najaktivniji estrogen je estradiol (12 puta jači od estrona, a 80 puta od estriola), koji je ujedno i glavni spolni hormon tijekom reproduktivnog razdoblja žene. Glavnina proizvodnje estradiola odvija se u jajnicima, ali moguća je i u drugim tkivima kao što su nadbubrežne žlijezde, jetra, mozak te masno tkivo, koje je glavni proizvođač estrogena za vrijeme menopauze (Simpson, 2002.). Uz estradiol, u jajnicima se proizvodi i estron, dok se estriol proizvodi u placenti tijekom trudnoće (Falah i sur., 2015.). Fiziološka koncentracija estradiola u krvnoj plazmi žena ovisi o fazama menstruacijskog ciklusa, a kreće se između 20-160 pg/mL u folikularnoj fazi, 34-400 pg/mL u ovulacijskoj fazi i 27-246 pg/mL u luteinskoj fazi menstruacijskog ciklusa. Estradiol regulira rad ženskog spolnog sustava i važan je za razvoj sekundarnih ženskih spolnih karakteristika tijekom puberteta, regulira fiziološke procese povezane s reproduktivnim sustavom poput menstruacijskog ciklusa, trudnoće i menopauze, ali utječe i na funkciju ostalih tkiva i organa kao što su koštano i masno tkivo, koža, jetra i mozak, i vrlo važno, imunosni sustav žena (Thomas i Potter, 2013.).

2.1.3 Progesteron

Progesteron (P) je steroidni spolni hormon iz grupe progestogena koji zajedno s estradiolom sudjeluje u regulaciji menstruacijskog ciklusa. Tijekom menstruacijskog ciklusa, progesteron se proizvodi u žutom tijelu jajnika, a za vrijeme trudnoće proizvodi ga posteljica. Fiziološka koncentracija progesterona u krvnoj plazmi mijenja se tijekom menstruacijskog ciklusa, a najviša je u luteinskoj fazi te se kreće između 19-76 nmol/L. Glavna funkcija progesterona je priprema ženskog tijela za implantaciju oplođene jajne stanice i održavanje trudnoće, no njegova uloga je značajna i za normalnu funkciju nereproduktivnog tkiva koštanog, kardiovaskularnog i neurološkog sustava (Li i sur., 2004.).

2.1.1 Testosteron

Testosteron (T) je steroidni spolni hormon iz grupe androgena. Najveća količina testosterona proizvodi se u testisima i stoga se smatra glavnim muškim spolnim hormonom. Testosteron se u 20 do 30 puta manjoj količini proizvodi i u ženskom tijelu, u jajnicima (Speroff i Fritz, 2005.). Funkcija testosterona u žena je održavanje tjelesnog zdravlja kosti i mišića, kognitivnih funkcija (antidepresiv), kardiovaskularnog sustava, te održavanja spolnog nagona

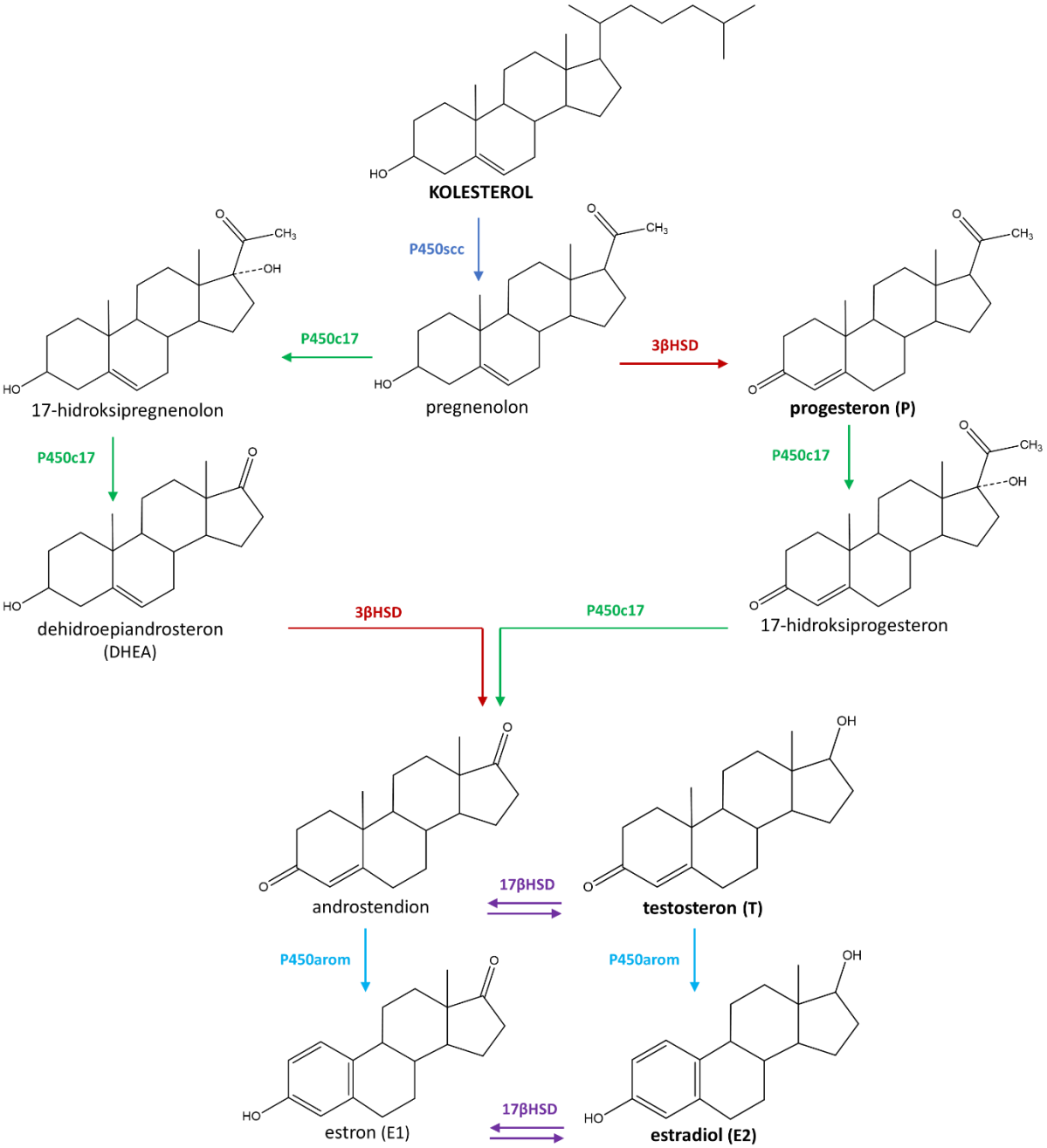
(Davis i Wahlin-Jacobsen, 2015.). Fiziološka koncentracija testosterona u krvnoj plazmi žena kreće se između 0,22-2,9 nmol/L (Sowers i sur., 2001.). Testosteron proizveden u jajnicima prvenstveno služi kao prekursor u sintezi glavnog ženskog spolnog hormona, estradiola.

2.2 Sinteza spolnih hormona

Spolni hormoni se u ženskom tijelu primarno proizvode u jajnicima, ali njihova proizvodnja je u manjoj količini moguća i u drugim žlijezdama (kora nadbubrežne žlijezde), organima (jetra i mozak) te u tkivima i stanicama (kosti i masno tkivo - adipociti). Tijekom trudnoće, stvaranje ženskih spolnih hormona estrogena i progesterona preuzima posteljica, dok se u menopauzi funkcija jajnika zaustavlja, a sinteza estrogena odvija se lokalno u tkivima u kojima i djeluju (Simpson i sur., 2000.).

Spolni hormoni se sintetiziraju iz kolesterola (Slika 1). Sinteza spolnih hormona započinje prebacivanjem slobodnog kolesterola iz stanične citoplazme u mitohondrij pomoću transportnog proteina StAR (engl. *steroid acute regulatory protein,* StAR) (Stocco, 2000.). Cijepanjem bočnog lanca kolesterola nastaje zajednički prekursor spolnih hormona, pregnenolon (Häggström i Richfield, 2014.), koji se u nizu biokemijskih reakcija koje kataliziraju hidroksisteroid dehidrogenaze (engl. *hydroxysteroid dehydrogenase,* HSD) i oksidativni enzimi koji sadrže hem citokrom P450 (Payne i Hales, 2004.) pretvara u dihidroepiandrosteron (DHEA) ili progesteron (P), a zatim u testosteron (T) koji se aromatizacijom prevodi u estradiol (E2).

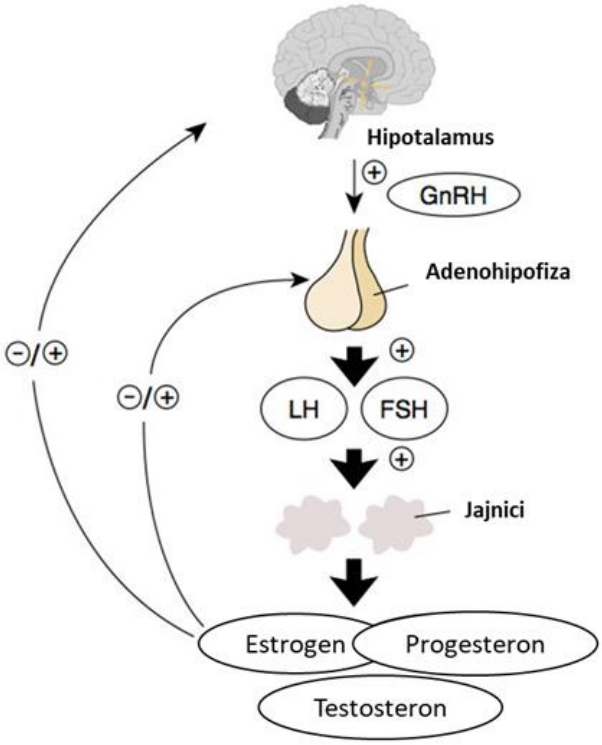
Steroidogene stanice mogu same proizvesti kolesterol iz acetata *de novo*, no ipak, glavni izvor kolesterola za sintezu spolnih hormona u sisavaca su lipoproteini niske gustoće (engl. *low density lipoprotein,* LDL). Oni cirkuliraju u krvnoj plazmi i ulaze u stanice endocitozom vezani za membranske LDL receptore (Ruiz-Cortés, 2012.). Višak slobodnog kolesterola se za potrebe steroidogeneze estrificira pomoću enzima acil-CoA kolesterol transferaze (engl. *acyl-CoA cholesterol acyltransferase*, ACAT) i skladišti u obliku lipidnih kapljica u citoplazmi stanice (Bremer i Miller, 2014.).



Slika 1: Biosinteza spolnih hormona u žena. Prvi korak je cijepanje bočnog lanca kolesterola djelovanjem citokroma P450scc nakon čega nastaje zajednički prekursor spolnih hormona, pregnenolon. U jajnicima se spolni hormoni stvaraju preko dihidroepiandrosterona (DHEA) koji se dvostrukom redukcijom enzimima 3βHSD i 17βHSD pretvara prvo u androstendion, a zatim i u testosteron, koji je direktni prekursor estradiola (E2). Za razliku od jajnika, u žutom se tijelu osnovni put biosinteze spolnih hormona odvija preko progesterona (P). 17βHSD – 17β-hidroksisteroid dehidrogenaza, 3βHSD – 3β-hidroksisteroid dehidrogenaza, Citokrom P450 – generičko ime za grupu oksidativnih enzima koji kataliziraju kemijske reakcije steroidogeneze u mitohondrijima i endoplazmatskom retikulumu, P450arom – aromataza, P450c17 – 17-hidroksilaza, P450scc – odcjepljuje bočni lanac kolesterola. Slika je nacrtana korištenjem programa za crtanje kemijskih struktura ChemDraw verzija 12.0.2. prema Šimunić, (2012.).

2.3 Regulacija sinteze spolnih hormona u jajnicima

Spolni hormoni imaju važnu ulogu u pripremi ženskih reproduktivnih organa i tijela za ovulaciju, oplodnju jajne stanice i konačno trudnoću. Regulacija proizvodnje ženskih spolnih hormona je složen proces, a svi mehanizmi regulacije odvijaju se preko osi hipotalamus-hipofiza-jajnici (engl. *hypothalamic-pituitary-ovarian axis*, HPO *axis*) (Slika 2).

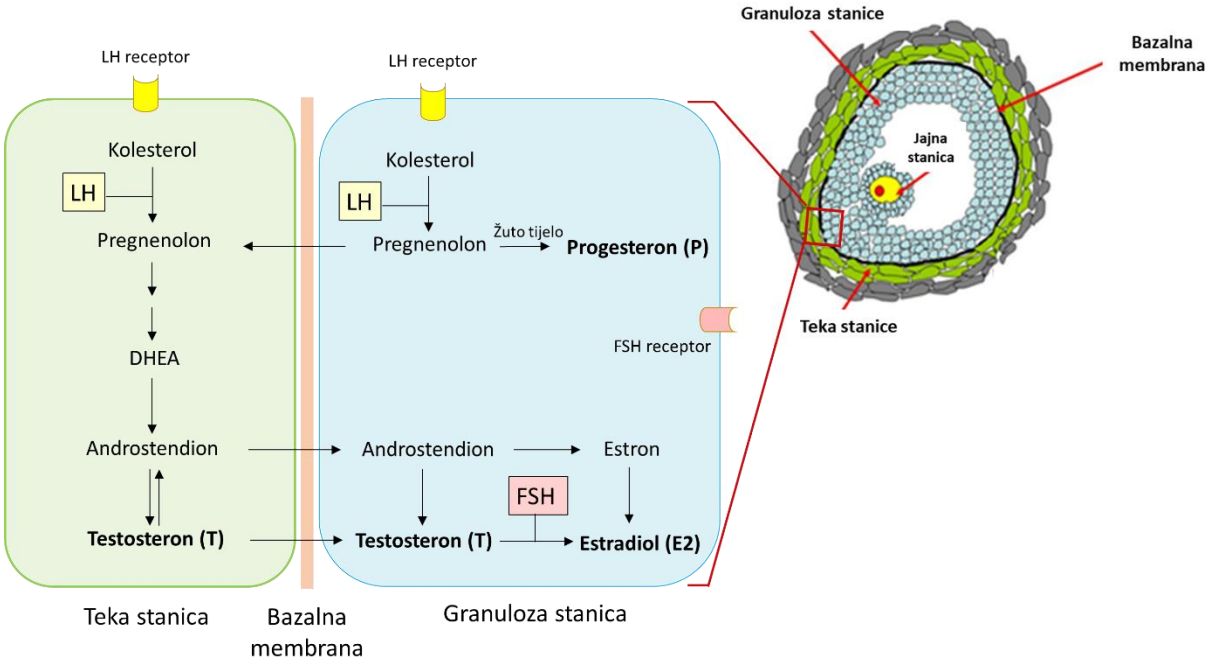


Slika 2: Os hipotalamus-hipofiza-jajnici (HPO *axis*). Ritmično otpuštanje hormona GnRH iz hipotalamusa potiče izlučivanje hormona FSH i LH iz adenohipofize koji potiču stvaranje ženskih spolnih hormona u jajnicima. Na aktivnost osi HPO djeluje mehanizam negativne i pozitivne povratne sprege koji je reguliran koncentracijom spolnih hormona u krvi. Na primjer, sazrijevanjem folikula povećava se koncentracija estrogena koji mehanizmom negativne povratne sprege smanjuje lučenje hormona GnRH iz hipotalamusa. No, visoka koncentracija estrogena sredinom ciklusa (12. – 14. dan) mehanizmom pozitivne povratne sprege potiče lučenje hormona LH iz adenohipofize, što uzrokuje ovulaciju. FSH – folikulostimulirajući hormon, GnRH - hormon za poticanje lučenja gonadotropina, LH – luteinizirajući hormon.

Tijekom reproduktivnog razdoblja žene, živčani signali iz arkuatnih jezgara hipotalamusa uzrokuju ritmično (pulsatilno) oslobađanje hormona za poticanje lučenja gonadotropina (engl. *gonadotropin-releasing hormone*, GnRH), koji se iz živčanih završetaka otpušta u portalni krvotok i prenosi do prednjeg dijela hipofize tj. adenohipofize. Adenohipofiza zatim izlučuje folikulostimulirajući hormon (engl. *follicle-stimulating hormone*, FSH) i

luteinizirajući hormon (engl. *luteinizing hormone*, LH) koji stimuliraju jajnike na stvaranje ženskih spolnih hormona ili steroidogenezu (Slika 3) (Strauss i sur., 2014.).

U jajniku su za sintezu estrogena potrebne usklađene kemijske reakcije dviju vrsta stanica, teka i granuloza stanica (Liu i Hsueh, 1986.). Teka stanice jajnika prevode kolesterol u androgene, androstendion i testosteron, no ne eksprimiraju aromatazu potrebnu za završni korak u sintezi estrogena, stoga oni slobodno difundiraju u granuloza stanice gdje se aromatiziraju u estrogene pod utjecajem hormona FSH. Nakon ovulacije, granuloza stanice žutog tijela pod utjecajem hormona LH dominantno proizvode progesteron, no zadržavaju i sposobnost sinteze estrogena. Stoga možemo reći da teka stanice jajnika stvaraju androgene, čiji je glavni predstavnik testosteron (T), a granuloza stanice jajnika stvaraju progesteron (P) i estradiol (E2).



Slika 3: Shematski prikaz dvostaničnog dvogonadotropnog sustava sinteze estrogena u jajnicima. DHEA – dihidroepiandrosteron, FSH – folikulostimulirajući hormon, LH – luteinizirajući hormon. Preuzeto i prilagođeno prema Falcone i Hurd, (2013.).

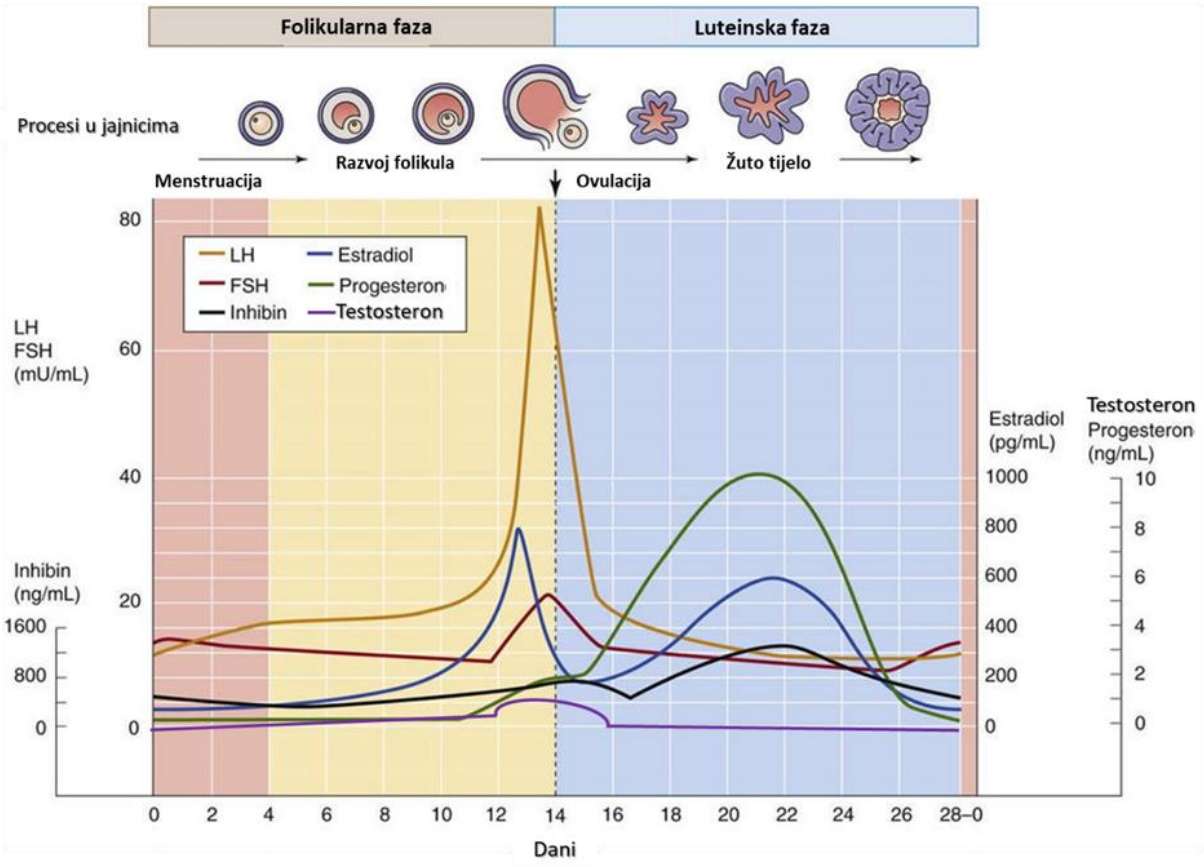
Putem negativne i pozitivne povratne sprege, koju na razini hipotalamusa i hipofize reguliraju spolni hormoni, usklađuju se dolazni i odlazni signali i održava urednom endokrina funkcija osovine HPO (Beshay i Carr, 2013.). Ova složena interakcija jedinstvena je među endokrinim sustavima u tijelu jer stvara mjesečni obrazac fluktuacija spolnih hormona koji se reflektira kroz menstruacijski ciklus žene.

2.4 Menstruacijski ciklus

Menstruacijski ciklus je središnji fiziološki proces u reproduktivnom razdoblju zdravih žena koji je rezultat složenog međudjelovanja hormona GnRH iz hipotalamusa, hormona hipofize LH i FSH, te spolnih hormona jajnika estradiola, progesterona i testosterona koji priprema reprodukcijske organe i tijelo žene za oplodnju i trudnoću. Menstruacijsko razdoblje u žena započinje prvom mjesečnicom (menarhom) oko 13. godine života i traje do 50-ih godina života kada dolazi do prirodne obustave rada jajnika te nastupa menopauza (Harlow i sur., 2013.). Idealno se smatra da menstruacijski ciklus traje 28 dana, ali takav ciklus ima malo žena. Razlika u duljini menstruacijskog ciklusa među ženama rezultat je dinamike porasta razine estrogena tijekom folikularne faze čije je trajanje različito u svakoj ženi, dok luteinska faza ovisi o žutom tijelu i traje 14 dana (Waller i sur., 1998.). S obzirom na varijabilnu duljinu folikularne faze, svi menstruacijski ciklusi u trajanju između 20 i 40 dana smatraju se normalnim menstruacijskim ciklusima zdravih žena (Mihm i sur., 2011.).

Tijekom folikularne i luteinske faze ciklički se izmjenjuju razdoblja dominacije estrogena (E) i progesterona (P), između kojih dolazi do kratkih intervala ovulacije i menstruacijskog krvarenja (Slika 4). Folikularna faza ciklusa obuhvaća promjene u jajniku u približno prva dva tjedna menstruacijskog ciklusa. Folikularna faza započinje menstruacijskim krvarenjem zbog ljuštenja endometrija iz prethodnog ciklusa, a karakterizira ju početno niska razina spolnih hormona. Zbog niske koncentracije estradiola i progesterona slabi negativna povratna sprega na hipotalamus te on započinje s lučenjem hormona GnRH. Hormon GnRH potiče adenohipofizu na lučenje hormona FSH, koji stimulira početak razvoja folikula, i hormona LH, koji zajedno s FSH potiče sintezu spolnih hormona u jajnicima. Razvoj folikula popraćen je stalnim povećanjem sinteze estradiola pod čijim utjecajem dolazi do ponovnog zadebljanja endometrija. Tijekom većeg dijela menstruacijskog ciklusa, spolni hormoni proizvedeni u jajnicima djeluju negativnom povratnom spregom na hipotalamus i hipofizu kako bi se smanjila proizvodnja i otpuštanje hormona FSH i LH, osim pred ovulaciju. Tada koncentracija estradiola dosegne vrhunac i aktivira mehanizam pozitivne povratne sprege na os HPO, čime se poveća osjetljivost adenohipofize na hormon GnRH iz hipotalamusa. Adenohipofiza u kratkom roku otpusti izrazito veliku količinu hormona LH u krvotok – LH skok (engl. *luteinizing hormone surge*) koji uzrokuje ovulaciju – izbacivanje jajne stanice iz zrelog folikula. LH skok je praćen povećanjem koncentracije hormona FSH, prethodi mu povećanje koncentracije progesterona koji pripomaže estradiolu u postizanju pozitivne

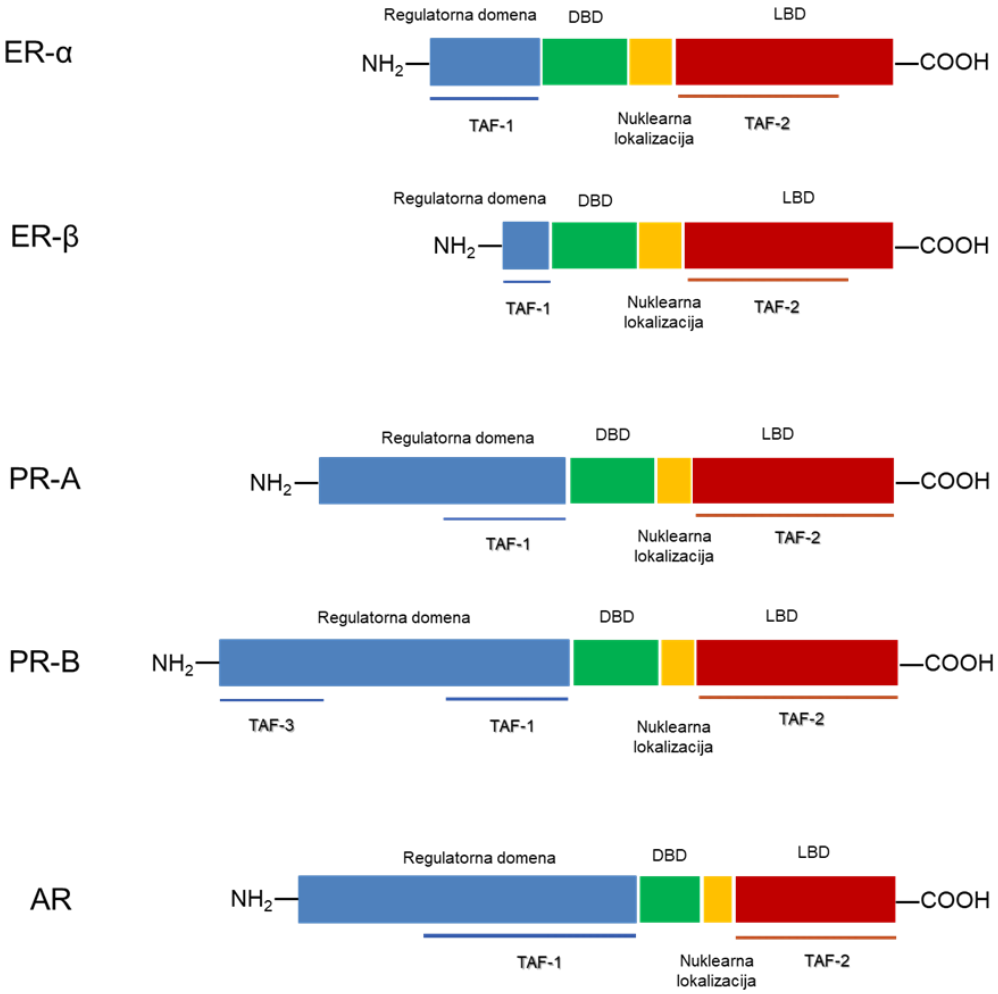
povratne sprege na os HPO, a za posljedicu ima povećanu proizvodnju testosterona u vrijeme ovulacije (Bui i sur., 2013.). Nakon ovulacije, koncentracija spolnih hormona naglo pada, a folikul se pretvara u žuto tijelo te počinje proizvoditi velike količine progesterona. Progesteron priprema sluznicu maternice za implantaciju oplođene jajne stanice tako što potiče žlijezde endometrija na nakupljanje glikogena i sekreciju niza glikoproteina, peptida i hormona rasta u šupljinu maternice. Uz visoke koncentracije progesterona, žuto tijelo proizvodi i znatne količine estrogena. Zbog ukupno visoke koncentracije spolnih hormona, sredinom luteinske faze ciklusa aktivira se mehanizam negativne povratne sprege te dolazi do postupnog smanjivanja proizvodnje hormona FSH i LH. Ako nije došlo do oplodnje i implantacije, žuto tijelo polagano prestaje s proizvodnjom estradiola i progesterona i degenerira, te nakon 14 dana od ovulacije završava luteinska faza. Na kraju luteinske faze razina spolnih hormona je minimalna, što uzrokuje oslobađanje proteolitičkih enzima te odumiranje i ljuštenje endometrija u obliku menstruacijskog krvarenja čime započinje novi menstruacijski ciklus.



Slika 4: Dinamika koncentracije spolnih hormona tijekom menstruacijskog ciklusa u žena. FSH – folikulostimulirajući hormon, inhibin – hormon kojeg proizvode jajnici kao signal hipofizi da zaustavi lučenje hormona FSH, LH – luteinizirajući hormon. Slika je preuzeta i prilagođena prema Boron i Boulpaep, (2016.).

2.5 Mehanizam djelovanja spolnih hormona

Spolni hormoni su neophodni za pravilan razvoj i funkcioniranje ljudskog tijela. U žena se spolni hormoni sintetiziraju s razvojem folikula tijekom menstruacijskog ciklusa i iz jajnika otpuštaju u krvotok. Spolni hormoni se tijelom prenose krvotokom vezani za proteine plazme albumin i globulin SHBG (engl. *sex hormone binding globulin*), dok samo 1-2% slobodno cirkulira u aktivnom obliku (Selby, 1990.). Spolni hormoni ostvaruju svoj učinak vezanjem za odgovarajuće nuklearne hormonske receptore (engl. *nuclear hormone receptors*, NHRs), prilikom čega nastaju kompleksi hormona i receptora koji djeluju kao transkripcijski faktori u ekspresiji ciljanih gena (Slika 5) (Ribeiro i sur., 1995.).



Slika 5: Shematski prikaz građe nuklearnih steroidnih receptora. Estrogenski (ER-α i ER-β), progesteronski (PR-A i PR-B) i androgeni (AR) receptori građeni su od varijabilne regulatorne domene, konzervirane domene koja veže molekulu DNA (engl. *DNA-binding domain*, DBD), domene koja signalizira translokaciju u jezgru, i umjereno konzervirane domene za vezanje hormona tj. liganda (engl. *ligand-binding domain*, LBD), koja je zajedno s DNA-vezujućom domenom neophodna za dimerizaciju i transkripcijsku aktivnost kompleksa hormona i receptora. Unutar domena nalazi se nekoliko područja za transkripciju gena (engl. *transcription activation function*, TAF). Dok je aktivnost TAF unutar regulatorne domene obično neovisna o ligandima, aktivnost TAF unutar domene LBD regulirana je vezanjem hormona. Preuzeto i prilagođeno prema Cui i sur., (2013.); Jacobsen i Horwitz, (2012.); Modi i sur., (2016.).

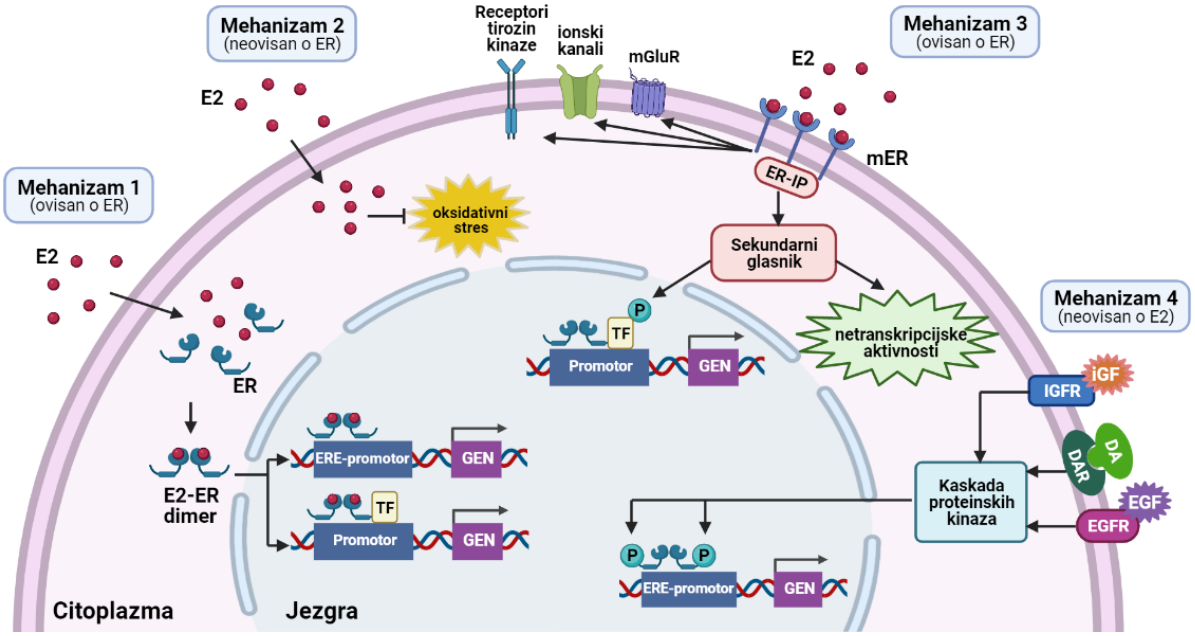
Nakon što slobodno difundiraju kroz membranu stanice, spolni hormoni se vežu za nuklearne hormonske receptore koji su u citosolu inaktivirani proteinima toplinskog stresa 90 (engl. *heat shock protein 90*, Hsp90), a sprječavaju interakcije nespecifičnih molekula s receptorom te ga drže u stabilnoj konformaciji za vezanje s hormonom (Picard, 2006.). Vezanjem hormona za receptor dolazi do otpuštanja proteina Hsp90 i aktivacije receptora. Kompleks hormona i receptora se u obliku dimera translocira do molekule DNA i veže na specifični slijed (engl. *hormone response element*, HRE) u promotorskoj regiji gena, gdje s raznim koaktivatorima čini transkripcijski aparat te potiče ekspresiju gena i sintezu proteina. Biološka aktivnost kompleksa hormona i receptora traje dok su vezani za molekulu DNA u jezgri stanice. Poluživot kompleksa estradiola i receptora relativno je velik, što objašnjava zašto baš ovaj estrogen ima najveću biološku aktivnost (Cipolletti i sur., 2020.).

Estrogenska aktivnost je posredovana nuklearnim estrogenskim receptorima ER-α i ER-β (engl. *estrogen receptor, ER*) smještenima u staničnoj citoplazmi, preko kojih estradiol pokreće spore genomske procese transkripcije gena (Ascenzi i sur., 2006.), dok estrogenski receptori smješteni na membrani stanica, mERα i mERβ (engl. *membrane estrogen receptors, mERs*), te GPR30 (engl. *G-protein coupled receptor, GPR*), pokreću brze fiziološke efekte neovisne o transkripciji gena, poput regulacije razine sekundarnog glasnika cAMP (engl. *cyclic adenosine monophosphate*) i iona Ca^{2+} unutar stanice (Slika 6) (Cui i sur., 2013.). Iako im to nije primarna funkcija, vezanje estradiola za receptore mER ipak može dovesti i do sinteze proteina pokretanjem sustava sekundarnih glasnika, prilikom čega protein kinaze fosforilacijom aktiviraju transkripcijske faktore unutar stanice (Marino i sur., 2006.).

Glavni progestogen kojeg proizvode jajnici je progesteron (P) koji na stanicu djeluje vezanjem za klasične nuklearne receptore PR-A i PR-B (engl. *progesterone receptor*) i na taj način regulira transkripciju gena, dok putem membranskih progesteronskih receptora mPR-α, -β i -γ (engl. *membrane progesterone receptor*) te PRMC-1 i -2 (engl. *progesterone receptor membrane component*) potiče brze fiziološke stanične odgovore (Kowalik i sur., 2013.).

Testosteron proizveden u jajnicima predstavlja primarni prekursor u sintezi najaktivnije forme ženskog estrogena, estradiola. No, najveću količinu testosterona u ženskom tijelu proizvode nadbubrežne žlijezde te se takav testosteron u cirkulaciji može smatrati pro-hormonom koji rjeđe ispoljava androgenu aktivnost sam, već se unutar ciljne stanice prevodi u biološki aktivniju formu, dihidrotestosteron (DHT), koji je glavni aktivator

androgenih receptora, ili se prevodi u estradiol, koji aktivira estrogenske receptore (Simpson, 2002.). Stanične receptore koji reagiraju na testosteron i druge androgene hormone čine klasični nuklearni receptor AR (engl. *androgen receptor*), kojim se regulira transkripcija gena unutar stanica (Davey i Grossmann, 2016.), i manje istraženi membranski androgeni receptori GPRC6A (engl. *G protein-coupled receptor family C group 6 member A*) (Pi i sur., 2010.) i ZIP9 (engl. *zinc transporter member 9*) (Berg i sur., 2014.), koji su odgovorni za poticanje brzih staničnih odgovora.



Slika 6: Djelovanje estrogena na stanicu. *Mehanizam 1*: Vezanje estradiola E2 na nuklearne receptore ER pokreće transkripcijsku promjenu gena sa ili bez slijeda ERE molekule DNA. Vezanje kompleksa E2-ER na promotorske regije gena bez slijeda ERE omogućuju transkripcijski faktori poput AP-1 i SP-1 (Kushner i sur., 2000.; Saville i sur., 2000.). *Mehanizam 2*: Antioksidacijska svojstva fenolnog prstena estradiola E2. *Mehanizam 3*: Vezanje estradiola E2 na receptor mER pokreće brze netranskripcijske učinke u stanici promjenom propusnosti membranskih ionskih kanala i aktivnosti sekundarnih glasnika te modifikacijom transkripcijskih faktora i ostalih membranskih receptora. Ovaj mehanizam uključen je u estrogensku regulaciju krvnog tlaka održavanjem odgovarajuće koncentracije iona Ca^{2+} i K^{+} (Menazza i Murphy, 2016.). *Mehanizam 4*: Receptor ER pokreće transkripcijsku promjenu gena neovisno o estrogenu. U ovom slučaju hormoni rasta mogu aktivirati kaskade protein-kinaza što dovodi do fosforilacije i dimerizacije estrogenskih receptora u jezgri, njihovog vezanja za slijed ERE, i transkripcijskih promjena gena bez prisustva estrogena (Ascenzi i sur., 2006.). AP-1 (engl. *activator protein 1*) – aktivacijski protein 1, DA (engl. *dopamine*) – dopamin, DAR (engl. dopamine receptor) – receptor dopamina, E2 – 17*β*-estradiol, EGF (engl. *epidermal growth factor*) – epidermalni faktor rasta (za diferencijaciju koštanih stanica; osteoblasta), EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*) - receptor epidermalnog faktora rasta, ER (engl. *estrogen receptor*) – estrogenski receptor, ERE (engl. *estrogen responsive element*) – slijed DNA koji reagira na estrogen, ER-IP (engl. *estrogen receptor interacting protein*) – protein koji je povezan s estrogenskim receptorom, iGF (engl. *insulin-like growth factor*) – faktor rasta sličan inzulinu, IGFR (engl. *insulin-like growth factor receptor*) – receptor faktora rasta sličnog inzulinu, mER (engl. *membrane estrogen receptor*) – membranski estrogenski receptor, SP-1 (engl. *specificity protein 1*) – protein specifičnosti 1, TF (engl. *transcription factor*) – transkripcijski faktor. Nacrtano korištenjem besplatnog web alata Biorender prema Cui i sur., (2013.).

Istraživanja na mišjem modelu pokazala su da je receptor ERα eksprimiran u reproduktivnim organima (maternici, jajnicima i dojkama), dok je receptor ERβ primarno eksprimiran u organima izvan reproduktivnog sustava (crijeva, koštana srž, pluća, mokraćni mjehur, endotelne stanice krvnih žila i mozak), što bi moglo upućivati na specifičnu ulogu koju svaki od njih ima u pojedinom tkivu, pa čak i u stanici u kojoj se eksprimira (Kuiper i sur., 1997.). U slučaju kada ista stanica eksprimira i ERα i ERβ, oni najčešće imaju suprotni učinak na transkripciju gena, jedan ju aktivira, a drugi inhibira (Marino i sur., 2006.).

S druge strane, za ljudske stanice je karakteristično da eksprimiraju receptore PR-A i PR-B u podjednakim omjerima, dok je dominacija jedne izoforme PR najčešće povezana s malignim oboljenjima (Mote i sur., 2007.). Izoforma PR-B nuklearnog progesteronskog receptora lakše stvara komplekse s koaktivatorima, i zbog toga aktivira transkripciju gena, dok kraća izoforma PR-A ima ulogu inhibitora transkripcijske aktivnosti receptora PR-B (Tung i sur., 2006.). Također, vezanje progesterona za receptore mPR može uzrokovati interakciju s drugim membranskim receptorima, kao na primjer s membranskim estrogenskim receptorima, što pokreće stanične signalne kaskade preko sekundarnih glasnika u putu proteinske kinaze Src te dolazi do promijenjene transkripcije gena (Ballaré i sur., 2003.). Zasad se vrlo malo toga zna o membranskim hormonskim receptorima, no postoje indikacije o njihovoj važnosti za održavanje normalne funkcije reproduktivnog, neuroendokrinog i imunosnog sustava, te metabolizmu stanice, a poremećena funkcija membranskih receptora, kao i klasičnih hormonskih receptora, rezultira razvojem tumorskih bolesti tih sustava (Cahill i Neubauer, 2021.; Lang i sur., 2013.; Sommer i Fuqua, 2001.).

Spolni hormoni su posebno važni za regulaciju spolnog sustava, spolno sazrijevanje, nastanak sekundarnih spolnih karakteristika i spolom određenih obrazaca ponašanja, regulaciju metaboličkih procesa u raznim tkivima (masnom tkivu, mišićima i kostima), te je između ostalog primijećeno da imaju i važan utjecaj na regulaciju humanog imunosustava (Taneja, 2018.).

2.6 Općenito o glikozilaciji proteina

Glikozilacija je enzimski proces kovalentnog vezanja ugljikohidrata (monosaharida) ili ugljikohidratnih lanaca (oligosaharida ili polisaharida), koji se nazivaju glikani, na proteine i lipide pri čemu nastaju glikokonjugati (Varki i sur, 2015.). Većina danas poznatih proteina, naročito u eukariotskim stanicama, modificirana je glikanima u glikoproteine (Apweiler i sur., 1999.). Glikoproteini dobivaju svoj glikanski dio prolazeći endoplazmatskim retikulumom (engl. *endoplasmic reticulum*, ER) i Golgijevim aparatom (engl. *Golgi apparatus*, GA) u sekrecijskom putu stanice. Nastali glikoproteini se izlučuju iz stanice ili mogu postati dio stanične membrane gdje posreduju u međustaničnom prepoznavanju, interakcijama između stanice i međustanične tekućine, te stanica i drugih molekula, ili pak služe kao fizička barijera na membrani (glikokaliks) u zaštiti od patogena (Möckl, 2020.).

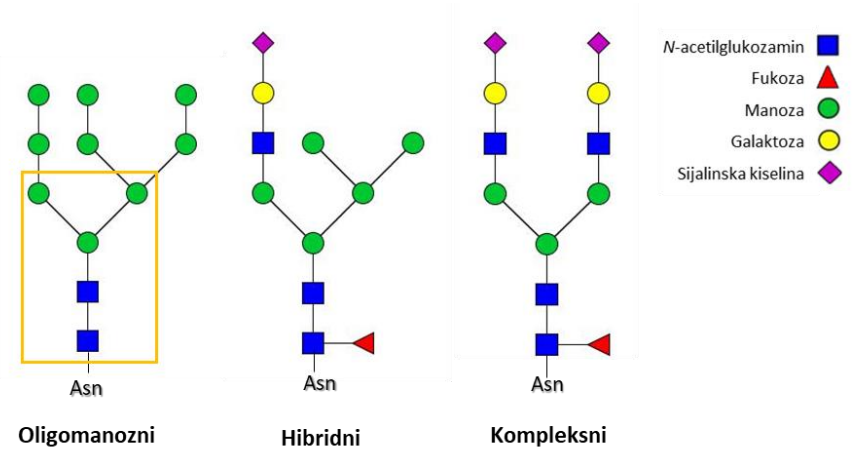
Glikani su važni strukturni elementi glikoproteina koji određuju fizikalno-kemijska svojstva kao što su topljivost, konformacija, smatanje i stabilnost molekule čiji su sastavni dio (Ohtsubo i Marth, 2006.; Sola i Griebenow, 2009.). Osim strukturnih komponenti, glikani su i aktivni dijelovi glikoproteina pri ostvarivanju raznih interakcija tijekom bioloških funkcija ključnih za razvoj, održavanje i preživljavanje organizma (Haltiwanger i Lowe, 2004.). Stoga, nastanak mutacija u slijedu molekule DNA koji dovodi do poremećene N-glikozilacije proteina uzrokuje razvoj teških nasljednih metaboličkih bolesti (engl. *congenital disorders of glycosylation*, CDG) (Ng i Freeze, 2018.), dok je potpuna nemogućnost stvaranja N-glikana embrionalno letalna (Marek i sur., 1999.).

Za razliku od aminokiselinskog slijeda u proteinu, slijed monosaharida u glikanu nije unaprijed određen u genomu, već su glikani sekundarni produkt aktivnosti gena (Taniguchi i sur, 2015). Čak 10% ljudskog genoma zaduženo je za stvaranje enzima i transportera potrebnih u sintezi glikana (Lauc i sur., 2014.). Na sastav glikana utječu broj, vrsta i redoslijed monosaharida, te način vezanja monosaharida i položaj atoma između kojih se veza stvara, a rezultat su okolišnih uvjeta stanice u datom trenutku. Stoga možemo reći da se fiziološko i biokemijsko stanje stanice direktno odražava na ukupnu populaciju glikanskih struktura ili glikom te stanice i ukupnog organizma. Zbog velike različitosti svojih struktura i fleksibilnosti na promjene, glikani su se tijekom evolucije održali kao molekule koje pridonose strukturnoj raznolikosti i preciznom podešavanju funkcije proteina, omogućavajući brzu prilagodbu stanice

i organizma na nove okolišne uvjete bez uvođenja mutacija u slijed molekule DNA (Lauc i Zoldoš, 2010.).

2.7 N-glikozilacija proteina

N-glikozilacija proteina je nakon fosforilacije i acetilacije treća najučestalija posttranslacijska modifikacija (engl. *post-translational modification*, PTM), a usko je povezana s razvrstavanjem i transportom aktivnih proteina do njihovih funkcionalnih odredišta (Khoury i sur., 2011.). Većina glikoproteina u eukariotskim stanicama modificirana je N-glikanima, koji izgledaju kao razgranati oligosaharidni lanci koji mogu sadržavati i do 20 monosaharidnih jedinica, a kovalentno su vezani za protein N-glikozidnom vezom (Slika 7).



Slika 7: Različiti tipovi N-glikana. Svi N-glikani imaju zajedničku pentasaharidnu srž – $Man_3GlcNAc_2$ (označeno žutim pravokutnikom) koja je građena od dva *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i tri manoze, te se mogu podijeliti u tri skupine: oligomanozni tip – na sržnu strukturu glikana vezane su samo manozne jedinice, hibridni tip – na sržnu strukturu glikana vezan je GlcNAc koji započinje granu, a druga grana sadrži samo manoze, i kompleksni tip – sadrži dvije antene s različitim monosaharidima (bez manoze). Monosaharidi su predstavljeni simbolima i obojani u skladu s preporukom Konzorcija za funkcionalnu genomiku (*The Consortium for Functional Glycomics*, 2012.).

N-glikozidna veza stvara se između reducirajućeg kraja unutarnjeg *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) N-glikana i dušikovog atoma bočnog ogranka asparagina (Asn) unutar konzervirane sekvence Asn-X-Ser/Thr proteinskog lanca, gdje X predstavlja bilo koju aminokiselinu osim prolina (Pro). U proteinu se nalazi velik broj potencijalnih N-glikozilacijskih mjesta, no hoće li ona zaista biti glikozilirana ovisi o konformaciji proteina tj. dostupnosti potencijalnog N-glikozilacijskog mjesta, i o aminokiselinama koje ga okružuju. Na primjer, aspartat i glutamat smanjuju mogućnost glikozilacije ako se nalaze na X mjestu unutar konzervirane sekvence potencijalnog N-glikozilacijskog mjesta (Varki i sur., 2015).

2.8 Sinteza N-glikana

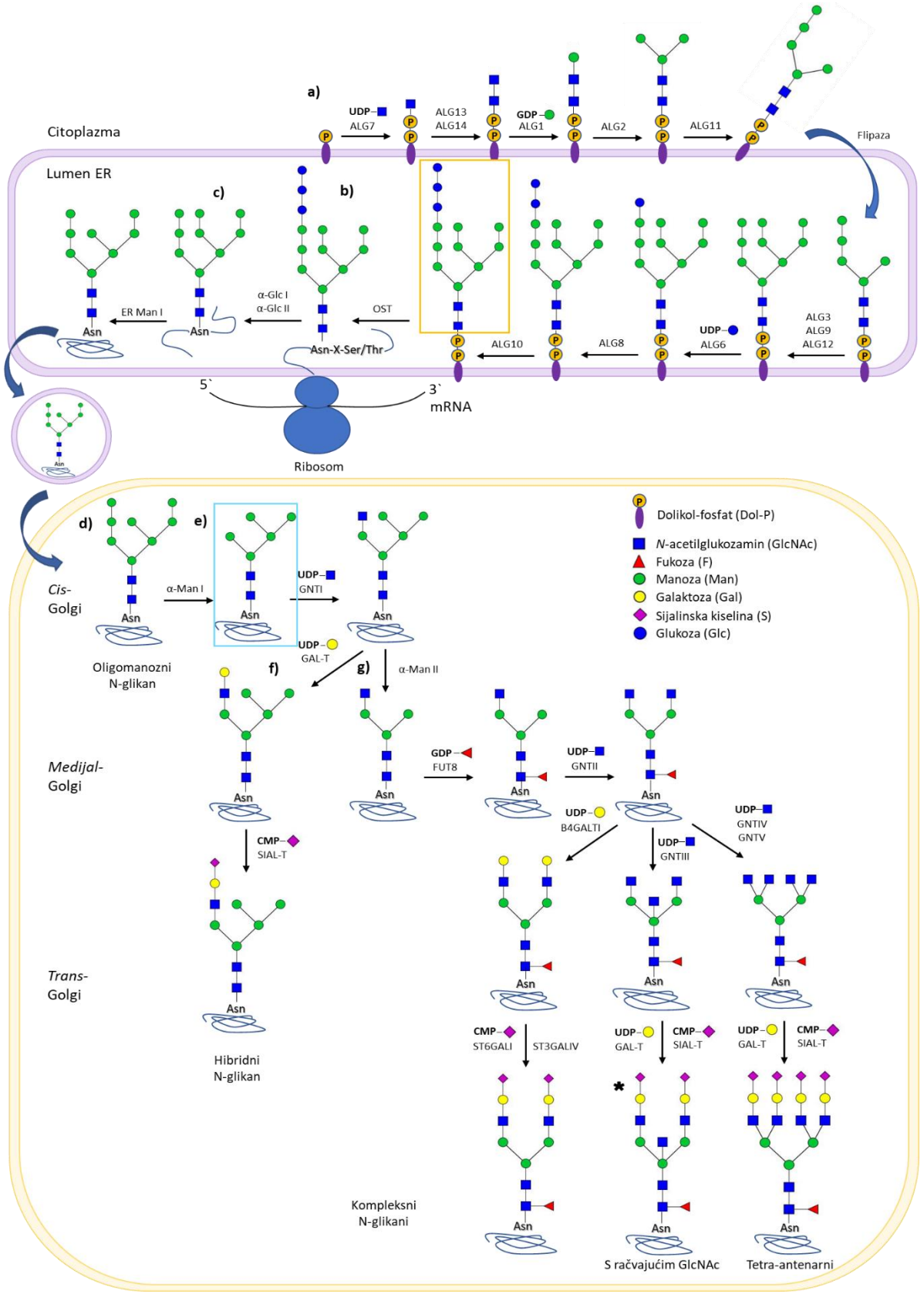
Sinteza N-glikana započinje usporedno sa sintezom proteina (kotranslacijski) u ER-u i nastavlja se posttranslacijskom doradom glikanskog dijela glikoproteina u GA prolaskom sekrecijskim putem stanice (Slika 8).

U biosintezi N-glikana sudjeluju lipidni nosač dolikol; aktivirani šećeri u obliku šećernih nukleotida UDP-, GDP- i CMP-šećer; te niz enzima glikoziltransferaza, koji dodaju monosaharide; glikozidaza, koje uklanjaju monosaharide; i transportera, koji kataliziraju složene reakcije glikozilacije (Kornfeld i Kornfeld, 1985.).

Kako bi monosaharidi mogli poslužiti u sintezi glikana, moraju biti aktivirani u obliku šećernih nukleotida. Aktivacija šećera u šećerne nukleotide odvija se u citoplazmi te se oni pomoću specifičnih transportera prebacuju preko membrane u ER i GA (Chen i sur., 2015.). N-vezani oligosaharidi raznih glikoproteina dorađuju se u različitoj mjeri, što ovisi o količini i tipu prisutnih enzima, ali i dostupnosti aktiviranih šećera enzimima koji kataliziraju ove modifikacije (Varki i sur., 2015).

Vjerojatno se čak polovica glikoproteina nastalih unutar ER-a razgrađuje i ne nastavlja daljnju doradu, najčešće zato što se nepravilno smataju (Frigerio i Lord, 2000.). Svi novonastali glikoproteini prolaze kontrolu kvalitete u ER-u koja započinje uklanjanjem terminalnih glukoznih jedinica na N-glikanskom dijelu molekule pomoću glukozidaza. Uklanjanje glukoznih jedinica omogućava interakciju glikoproteina s molekularnim šaperonima kalneksinom i kalretikulinom koji potpomažu pravilno smatanje novonastalog glikoproteina (Varki i sur., 2015). Glikoproteini koji ni tijekom nekoliko pokušaja ne uspiju postići pravilnu konformaciju usmjeravaju se u citosol gdje se razgrađuju u proteasomu, dok se glikoproteini s odgovarajućom konformacijom pomoću vezikula transportiraju na daljnju doradu u GA (Frigerio i Lord, 2000.).

Dok je biosinteza N-glikana u ER-u eukariota evolucijski dobro očuvan proces, dorada u Golgiju specifična je za vrstu i rezultira različitim oligosaharidnim strukturama vezanima za glikoproteine (Chung i sur., 2017.). Nakon izlaska iz ER-a, glikoproteini prolaze kroz odjeljke GA u *cis-trans* smjeru, prateći lokalizaciju enzima za daljnju doradu i sazrijevanje njihovih glikana (Moremen i sur., 2012.).



Slika 8: Biosinteza N-glikana u sekrecijskom putu stanice. N-glikozilacija eukariotskih proteina započinje u endoplazmatskom retikulumu (ER) prebacivanjem oligosaharidne preteče glikana na proteinski lanac prije nego što je translacija proteina u potpunosti završena, a nastavlja se doradom N-vezanog ugljikohidrata u Golgijevom aparatu (GA) prolaskom glikoproteina sekrecijskim putem stanice. Stvaranje osnovnog oligosaharida odvija se na

dolikol-fosfatu (Dol-P), lipidnom nosaču smještenom u membrani ER-a, na koji se uzastopno dodaju monosaharidne jedinice djelovanjem specifičnih glikoziltransferaza ALG (engl. *asparagine-linked glycosylation*) (Burda i Aebi, 1999.). Za sintezu N-glikana, monosaharidne jedinice moraju biti u obliku nukleotidnih šećera, te se putem posebnih transportera ubacuju u ER i GA. a) Stvaranje osnovnog olisaharida započinje s citoplazmatske strane ER-a gdje se na Dol-P redom dodaju dvije jedinice *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i pet manoznih jedinica (Man), nakon čega flipaza prebacuje sedmeročlani prekursor na luminalnu stranu ER-a gdje se se dodaju još četiri Man i tri glukozne (Glc) šećerne jedinice. b) Oligosaharil-transferaza (OST) prebacuje nastali 14-člani oligosaharidni prekursor N-glikana (narančasti pravokutnik) s Dol-P na asparagin (Asn) rastućeg polipeptidnog lanca unutar konzervirane sekvence Asn-X-Ser ili Asn-X-Thr. c) S glikanskog dijela novonastalog glikoproteina uklanjaju se Glc i dolazi do pravilnog smatanja glikoproteina. Uklanjanje jedne Man signalizira izlazak iz ER-a i premještanje glikoproteina pomoću transportnih vezikula u GA. d) N-glikani koji ne prolaze daljnju doradu u GA ostaju u oligomanoznom obliku. e) Dorada glikana u GA odvija se u *cis-trans* smjeru. Prvo se u *cis*-GA uklanjaju Man, čime nastaje zajednički prekursor hibridnih i kompleksnih N-glikana (plavi pravokutnik). f) Hibridni glikani nastaju dodatkom GlcNAc na vanjsku Man sržnog dijela glikana, što inicira stvaranje α-1,3 grane (engl. *antennae*) koja može biti produžena djelovanjem enzima u *medijalnom*- i *trans*-GA dodatkom Gal i sijalinske kiseline (S), dok je druga grana građena od jedinica Man. g) Kompleksni glikani nastaju uklanjanjem svih terminalnih jedinica Man. Paralelno se na unutarnji GlcNAc sržnog dijela glikana dodaje sržna fukoza (F), a dodatkom GlcNAc na vanjske Man sržnog dijela glikana inicira se stvaranje α-1,3 i α-1,6 grana. Tri- i tetra-antenarni N-glikani dobivaju se dodatnim vezanjem po jednog GlcNAc za svaku granu. GlcNAc se može dodati i na unutarnju Man sržnog dijela glikana, čime nastaje N-glikan s račvajućim GlcNAc. *Medijalni*- i *trans*-odjeljci GA sadrže enzime koji provode završne dorade N-glikana, kao što su galaktozilacija i sijalinizacija, dok je S ujedno i krajnja monosaharidna jedinica najsloženijeg biantenarnog N-glikana humanog imunoglobulina G (*). B4GALT1 – β-1,4-galaktoziltransferaza, CMP-S – citozin-difosfat *N*-acetilneuraminska (sijalinska) kiselina, ER Man I – manozidaza I u ER-u, GAL-T – galaktoziltransferaza, GDP-Man – gvanidin-difosfat manoza, GNTI – N-acetilglukozaminil transferaza I, GNTII – N-acetilglukozaminil transferaza II, GNTIII – *N*-acetilglukozaminil transferaza III, GNTIV – *N*-acetilglukozaminil transferaza IV, GNTV – *N*-acetilglukozaminil transferaza V, Ser – serin, SIAL-T – sijaliltransferaza, ST6GAL1 – β-galaktozamid α-2,6-sijaliltransferaza 1, Thr – treonin, UDP-Gal – uridin-difosfat galaktoza, UDP-Glc – uridin-difosfat glukoza, UDP-GlcNAc – uridin-difosfat *N*-acetilglukozamin, X – bilo koja aminokiselina osim prolina (Pro), α-Glc I – alfa glukozidaza I, α-Glc II – alfa glukozidaza II, α-Man I – alfa manozidaza I, α-Man II – alfa manozidaza II. Monosaharidi su predstavljeni simbolima i obojani u skladu s preporukom Konzorcija za funkcionalnu genomiku *(The Consortium for Functional Glycomics*, 2012.). Nacrtano korištenjem besplatnog web alata GlycanBuilder (Tsuchiya i sur., 2017.) prema Chung i sur., (2017.); Reily i sur., (2019.), Varki i sur, (2015.).

N-glikozilacija uvelike utječe na fizikalna svojstva poput topljivosti, konformacije i stabilnosti proteinske strukture, ali i na samu funkciju proteina (Dwek, 1998.). Stoga N-glikani kao bitni strukturni i funkcionalni dijelovi mnogih proteina imaju važnu biološku ulogu u gotovo svim fiziološkim procesima koji uključuju smatanje i usmjeravanje proteina na mjesto djelovanja te antigenost i očuvanje glikoproteina od degradacije proteazama. N-glikani su također važni za međustaničnu adheziju i signalizaciju, zatim proliferaciju, diferencijaciju i migraciju stanica, te razvoj, preživljavanje i imunost stanica, što je posebice važno za imunosni odgovor i obranu organizma (Varki, 2017.).

Sržna struktura N-glikana zajednička je za sve eukariotske i dio prokariotskih organizama, dok se razlike u glikanima primjećuju u terminalnim monosaharidnim jedinicama što je posljedica izloženosti organizma različitim patogenima. Interakcija između domaćina i patogena dovela je do evolucijskog razvoja velikog broja različitih glikanskih struktura

pronađenih u višestaničnim organizmima, pogotovu u područjima koja su učestalo u doticaju s mikrobima, kao što su površina sluznice i mucini koji se tamo izlučuju (McGuckin i sur., 2011.).

Za obranu organizma ljudi imaju razvijenu urođenu i stečenu (humoralnu) imunost, koju čini mnoštvo imunosnih stanica i raznih molekula koje potiču imunosne reakcije ili pak izvršavaju različite efektorske funkcije (Janeway, 2001.). Jedna od važnijih efektorskih molekula humoralnog sustava je protutijelo IgG, koje je ujedno i najzastupljeniji glikoprotein u ljudskoj plazmi (Clerc i sur., 2016.).

2.9 Struktura i N-glikozilacija imunoglobulina G

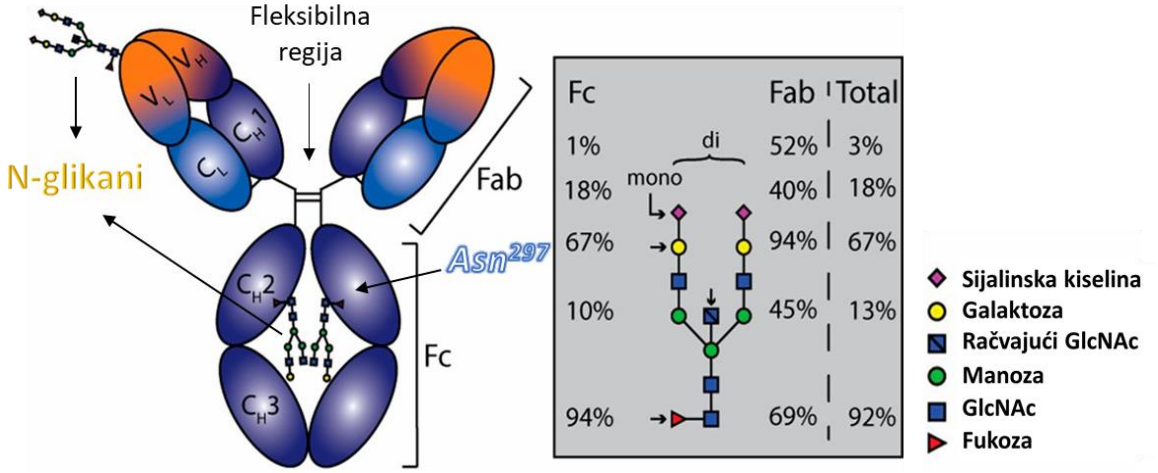
Imunoglobulini (engl. *immunoglobulins*, Igs) su cirkulirajuća gama-globulinska protutijela čija je zadaća prepoznati i pomoći iz tijela ukloniti štetne čimbenike poput bakterija i virusa, ali i stanice raka ili vlastite stanice inficirane virusom. Izlučuju ih krajnje diferencirani B limfociti, takozvane plazma stanice, tijekom humoralne imunoreakcije i obično čine 20% svih proteina krvne plazme (Janeway, 2001.).

Protutijela su građena od različitih kombinacija lakih (engl. *light*, L) i teških (engl. *heavy*, H) polipeptidnih lanaca koji se označavaju grčkim slovima. Laki lanci mogu biti κ (kappa) ili λ (lambda), dok teški lanci mogu biti α (alfa), δ (delta), ε (epsilon), γ (gama) ili μ (mi). S obzirom na tip teškog lanca od kojeg su građena, ljudska protutijela mogu se podijeliti u pet klasa ili izotipova: IgA, IgD, IgE, IgG i IgM (Schroeder i Cavacini, 2010.).

Imunoglobulini G čine 75% svih protutijela u cirkulaciji te s koncentracijom od otprilike 10 mg/mL (Gonzalez-Quintela i sur., 2008.) predstavljaju najbrojnije protutijelo u ljudskoj krvi. Molekule IgG mogu se podijeliti u četiri potklase: IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4 (Irani i sur., 2015.). Imunoglobulini G imaju dvije funkcionalne domene: fragmente za vezanje antigena (engl. *Fragment antigen binding*, Fab) i kristalizirajući fragment (engl. *Fragment crystallizable*, Fc), između kojih je fleksibilna regija (engl. *hinge region*) (Slika 9).

Molekula IgG je posttranslacijski modificirana kovalentno vezanim glikanima unutar konzerviranog N-glikozilacijskog mjesta u regiji C_H2 na svakom od dva teška lanca fragmenta Fc. Protutijela stvaraju N-glikozidnu vezu s glikanima preko dušikovog atoma asparaginskog ostatka na mjestu 297 (Asn^{297}) unutar konzervirane sekvence Asn-X-Ser/Thr.

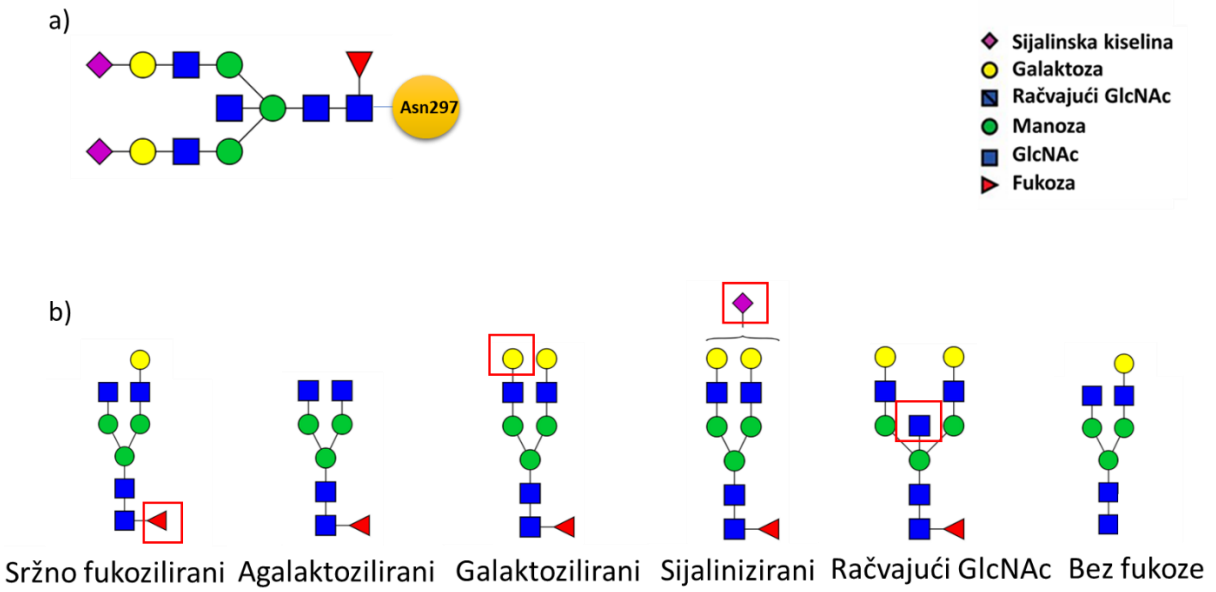
N-glikani molekule IgG su u pravilu kompleksni diantenarni glikani građeni od pentasaharidne srži koja se sastoji od dva GlcNAc na koje se nastavljaju tri Man. Sržna struktura N-glikana je u većoj ili manjoj mjeri nadalje modificirana dodatkom GlcNAc, galaktoze (Gal), sijalinske kiseline (S) i fukoze (F). Osim na Fc domeni, između 15% i 25% molekula IgG sadrži dodatne N-glikane na varijabilnom dijelu Fab domene protutijela (van de Bovenkamp i sur., 2016.). N-glikani Fab fragmenta imaju veći udio račvajućeg GlcNAc od N-glikana Fc fragmenta, te sadrže više sijalinskih kiselina (Bondt i sur., 2014.), koje su znatno manje zastupljene u strukturi N-glikana Fc fragmenta molekule IgG (npr. disijalinizirani glikani čine manje od 1% svih glikanskih struktura ovog protutijela) (Anumula, 2012.; van de Bovenkamp i sur., 2016.). Na humanom protutijelu IgG dosad je otkriveno preko 30 različitih glikanskih struktura (Pučić i sur., 2011.) koje su gotovo u potpunosti (>90%) modificirane fukozom vezanom za sržni dio N-glikana (Slika 10).



Slika 9: Struktura imunoglobulina G i usporedba sastava N-glikana Fc i Fab domene humanog protutijela. Imunoglobulin G je glikoprotein koji je građen od dvaju teških (H) lanca (50 - 70 kDa) i dvaju lakih (L) lanca (25 kDa) međusobno povezanih disulfidnim mostovima unutar fleksibilne regije koji stabiliziraju strukturu protutijela (Liu i May, 2012.). Teški lanci se sastoje se od tri konstantne (C_H1, C_H2 i C_H3) regije i jedne varijabilne V_H regije, dok se laki lanci sastoje od po jedne konstantne C_L i jedne varijabilne V_L regije. N-glikani su sastavni dijelovi Fc fragmenta svih molekula IgG, ali neke molekule IgG mogu imati N-glikane vezane i na varijabilnom dijelu Fab fragmenta. Zastupljenost pojedinih glikanskih struktura u ukupnoj količini detektiranih N-glikana posebno na Fc fragmentu, Fab fragmentu i na cijeloj molekuli IgG (Total) označena je u postotcima. Asn^{297} – asparaginski ostatak konzerviranog N-glikozilacijskog mjesta u C_H2 regiji teških lanaca Fc fragmenta protutijela IgG, Fab – fragment koji veže antigen, Fc – fragment koji kristalizira, GlcNAc – *N*-acetilglukozamin. Monosaharidi su predstavljeni simbolima i obojani u skladu s preporukom Konzorcija za funkcionalnu genomiku (*The Consortium for Functional Glycomics*, 2012.). Preuzeto i prilagođeno prema van de Bovenkamp i sur., (2016.).

2.10 Biološka uloga glikozilacije imunoglobulina G

Protutijelo IgG je najzastupljeniji glikoprotein u ljudskoj plazmi i važan je dio stečenog (humoralnog) imuniteta jer u obliku protutijela štiti organizam od napada patogenih bakterija, virusa i toksina. Djelovanje molekule IgG započinje kada varijabilna područja unutar Fab fragmenta protutijela prepoznaju specifične antigenske dijelove, nakon čega slijedi vezanje Fc fragmenta za odgovarajuće receptore i pokretanje imunoreakcija (Janeway, 2001.).



Slika 10: Sastav N-glikana ljudskog imunoglobulina G. a) Najveća i najsloženija glikanska struktura na protutijelu IgG je sržno fukozilirani diantenarni N-glikan s dvije galaktoze, dvije sijalinske kiseline i račvajućim *N*-acetilglukozaminom (GlcNAc). b) Ostali N-glikani molekule IgG su jednostavnije građe koja nastaje različitim kombinacijama uklanjanja jedne ili više terminalnih šećernih jedinica sijalinske kiseline, galaktoze, fukoze i GlcNAc s najsloženije glikanske strukture. Monosaharidi su predstavljeni simbolima i obojani u skladu s preporukom Konzorcija za funkcionalnu genomiku (*The Consortium for Functional Glycomics*, 2012.). Glikanske strukture nacrtane su korištenjem programa Glycoworkbench (Damerell i sur., 2012.) prema Lauc i sur., (2016.); Singh i sur., (2020.).

Protutijela IgG su iznimno raznolika, što im omogućuje prepoznavanje širokog spektra raznih antigenskih struktura. Raznolikost protutijela proizlazi iz funkcionalnog preslagivanja genskih segmenata unutar Ig lokusa tijekom ranih razvojnih stadija B stanica u koštanoj srži (Roth, 2014.). Rekombinacijom genskih segmenata V (engl. *variable*), D (engl. *diversity*) i J (engl. *joining*) za teški lanac, te genskih segmenata V i J za lake lance, dolazi do formiranja jedinstvenih kombinacija imunoglobulina G (Market i Papavasiliou, 2003.). Daljnji razvoj funkcionalnih B stanica nastavlja se u limfnim čvorovima i slezeni gdje se u doticaju s antigenima diferenciraju u plazma stanice koje štite organizam lučenjem antigen specifičnih IgG protutijela (Lebien i Tedder, 2008.).

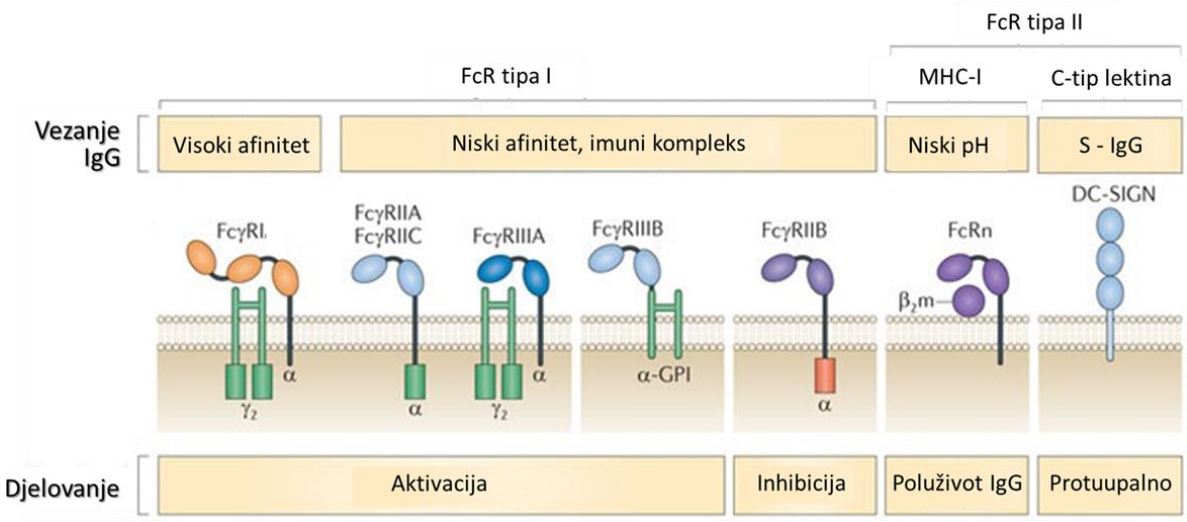
Pokretanje imunosnog odgovora zahtijeva vezanje Fc fragmenta protutijela IgG na Fc gama receptore (engl. *Fragment crystallizable gamma receptors*, FcγRs) (Nimmerjahn i Ravetch, 2007a.), lektine C-tipa (Arnold i sur., 2006.) i proteine komplementa (Diebolder i sur., 2014.).

2.10.1 Vezanje na Fcγ receptore

Fcγ receptori su strukturno homologni stanični receptori koji su prisutni na membranama efektorskih stanica imunosnog sustava – prirodno ubojitim stanicama (engl. *natural killer cells*, NK stanice), makrofazima, monocitima, bazofilima, eozinofilima, mastocitima, antigen prezetirajućim dendritičkim stanicama i B stanicama (Nimmerjahn i Ravetch, 2007a.). Njihova funkcija je da vezanjem molekule IgG pokrenu imunoreakcije, ali i kontroliraju potaknute upalne procese radi sprječavanja autoimunosti (Hargreaves i sur., 2015.). Čovjek ima pet različitih aktivirajućih Fcγ receptora - FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIC, FcγRIIIA i FcγRIIIB, te jedan inhibirajući receptor - FcγRIIB (Slika 11). Na većini efektorskih stanica imunosnog sustava prisutni su i aktivirajući i inhibirajući FcγR receptori koji su neophodni za precizno podešavanje praga stimulacije imunosnih stanica i regulacije njihove funkcije. Iznimka su NK stanice, koje eksprimiraju samo aktivirajuće receptore FcγR, i B stanice, koje exprimiraju samo inhibirajući receptor FcγRIIB (Nimmerjahn i Ravetch, 2007a.) .

Osim po aktivnosti, receptori FcγR se međusobno razlikuju i po afinitetu vezanja protutijela IgG. Samo receptor FcγRI s visokim afinitetom veže IgG monomere, dok svi ostali receptori vežu protutijela IgG u obliku imunokompleksa (Nimmerjahn i Ravetch, 2008.). Aktivacijom receptora FcγR pokreću se razne imunoreakcije, koje se mijenjaju ovisno o receptoru i vrsti efektorske stanice na kojoj se taj receptor nalazi (Ben Mkaddem i sur., 2019.). Prag aktivacije koji je postavljen koekspresijom aktivirajućih i inhibirajućih receptora FcγR određuje jačinu efektorskih reakcija u stanicama nakon vezanja protutijela IgG (Schwab i Nimmerjahn, 2013.). Glavne imunoreakcije posredovane aktivirajućim receptorima FcγR su stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima (engl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC), koja nastaje aktivacijom Fcγ receptora na NK stanicama, i fagocitoza ovisna o protutijelima (engl. *antibody-dependent cellular phagocytosis*, ADCP), koja nastaje aktivacijom receptora FcγR na makrofazima (Nimmerjahn i Ravetch, 2008.).

Aktivacija receptora FcγR uzrokuje i razne imunomodulatorne učinke prilikom kojih imunosne stanice otpuštaju proupalne molekule i kemijske spojeve kao što su citokini, u koje spadaju interferon gamma (engl. *interferone gamma*, IFN-γ) i faktor nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF-α), interleukini, kemokini koji su zaduženi za privlačenje neaktiviranih monocita, limfocita i neutrofila na mjesto infekcije, oksidativni spojevi koji povećavaju efikasnost fagocitoze pomoću neutrofila te dolazi do pojačane prezentacije antigena putem antigen prezentirajućih stanica (engl. *antigen presenting cell*, APC) kako bi došlo do aktivacije T limfocita, koji su važni u poticanju diferencijacije B stanica u plazma stanice i stvaranja protutijela (Nimmerjahn i Ravetch, 2008.; Paul i Lal, 2017.).



Slika 11: Shematski prikaz Fcγ receptora (FcγRs). FcγR su transmembranski receptori protutijela IgG na imunosnim stanicama. Vezanje domene Fc protutijela IgG za aktivacijske receptore FcγR efektorskih stanica uzrokuje fosforilaciju aktivacijske ITAM sekvence (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) (zeleni pravokutnik) i pokretanje stanične signalne kaskade, koja rezultira aktivacijom staničnih efektorskih funkcija poput fagocitoze, stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (engl. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC), te otpuštanja upalnih citokina i oksidacijskih molekula (Nimmerjahn i Ravetch, 2008.). Vezanjem domene Fc molekule IgG na inhibirajući receptor FcγRIIB aktivira se inhibicijska ITIM sekvenca (engl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*, ITIM) (crveni pravokutnik) te dolazi do defosforilacije i zaustavljanja stanične signalne kaskade, zbog čega izostaje efektorski odgovor imunosnih stanica (Nimmerjahn i Ravetch, 2007b.). Osim klasičnih aktivirajućih i inhibirajućih Fcγ receptora, koji spadaju u grupu FcR tipa I, na imunosnim stanicama se nalaze i neklasični Fc receptori, poznati kao FcR tipa II, u koje spadaju receptori slični C-tipu lektina, koji vežu samo sijalinizirane IgG glikoforme (DC-SIGN) i reguliraju protuupalnu funkciju protutijela IgG na makrofazima i dendritičkim stanicama, te MHC-I sličan neonatalni Fc receptor (FcRn), koji regulira poluživot protutijela IgG. Slika je preuzeta i prilagođena prema Schwab i Nimmerjahn, (2013.).

2.10.2 Vezanje za neonatalni Fc receptor

Neonatalni Fc receptor (engl. *neonatal fragment crystallizable receptor,* FcRn) spada u neklasične receptore FcR, a svojom strukturom podsjeća na molekule glavnog sustava tkivne podudarnosti tipa I (engl. *major histocompatibility complex I*, MHC-I) (Sutton i sur., 2003.). Receptor FcRn ima ključnu ulogu u transportu molekula IgG preko staničnih membrana. Njegova aktivnost dolazi do izražaja tijekom trudnoće kada se protutijela IgG iz majčine krvi vežu za receptor FcRn u placenti i otpuštaju u cirkulaciju fetusa, omogućavajući mu kratkotrajnu stečenu imunost u obliku majčinih protutijela sve dok djetetov imunosni sustav ne sazrije i ne osigura mu vlastitu zaštitu (Roopenian i Akilesh, 2007.).

Receptor FcRn je tijekom ljudskog života prisutan i na membranama stanica mnogih drugih tkiva gdje „spašava" protutijela IgG od razgradnje (Egmond i sur., 2015.). Taj se proces odvija u staničnim lizosomima, pri uvjetima niskog pH, pri čemu se protutijelo IgG reciklira putem recepora FcRn i ponovno vraća u izvanstanični prostor (Martin i sur., 2001.). Također, upravo prisutnost sijalinske kiseline na N-glikanima serumskih protutijela IgG osigurava njihov opstanak u cirkulaciji, a njeno uklanjanje rezultira brzim uklanjanjem proteina iz cirkulacije putem jetrenih receptora (engl. *asialoglycoprotein*, ASGPR) koji prepoznaju ostatak glikanskog lanca (Raju i sur., 2001.). Ovaj proces pokazuje važnost održavanja razine molekula IgG u cirkulaciji, omogućavajući im relativno dug poluživot u trajanju od 21 dan, u usporedbi s drugim potklasama ljudskih protutijela (Jefferis, 2014.).

2.10.3 Aktivacija komplementa

Protutijela IgG mogu pokrenuti imunosne reakcije i preko sustava komplementa (Basta, 2004.). Sustav komplementa se sastoji od oko 30 malih proteina sintetiziranih u jetri tzv. komponente komplementa, koji cirkuliraju u krvi u obliku inaktiviranih prekursora. Sustav komplementa aktivira se proteolizom jedne od komponenti komplementa čime se pokreće čitav niz daljnjih proteolitičkih reakcija koje rezultiraju kaskadom komplementa.

U klasičnom putu aktivacije komplementa, komponenta C1q sustava komplementa veže CH2 dio fragmenta Fc molekule IgG kada su ovo protutijelo i antigen vezani u imunokompleksu. Daljnjim proteolitičkim reakcijama nastaju komponente C3 i C5, koje posreduju u stvaranju kompleksa koji napada membranu označene stanice (engl. *membrane attack complex*, MAC) uzrokujući lizu te stanice u procesu zvanom citotoksičnost ovisna o komplementu (engl. *complement dependent cytotoxicity,* CDC) (Ricklin i sur., 2010.).

Do aktivacije ove efektorske funkcije može doći i alternativnim putem, kada CH1 domena molekule IgG bez vezanog antigena stupa u interakciju s aktivacijskim fragmentom C3b nastalim spontanom proteolizom komponente C3 sustava komplementa.

Važno je znati da su receptori FcγR i receptori komplementa često zajedno eksprimirani na prirođenim stanicama imunosnog sustava poput neutrofila, monocita, makrofaga i dendritičkih stanica, i imaju usklađeno djelovanje pri upalnom imunosnom odgovoru (Karsten i Köhl, 2012.). Također, djelovanje komplementa može dodatno aktivirati receptore komplementa na B stanicama i tako sniziti njihov prag aktivacije, čime proteini komplementa direktno posreduju u stvaranju protutijela tijekom stečenog (humoralnog) imunosnog odgovora (Carroll i Isenman, 2012.).

2.10.4 Vezanje lektina

Lektini su receptori za ugljikohidrate koji mogu razlikovati vlastite glikane od glikana patogenog porijekla (engl. *pathogen-associated molecular pattern*, PAMP), zbog čega su uključeni u mnoge fiziološke funkcije u tijelu, između ostalog i u regulaciju imunosnog odgovora (Geijtenbeek i Gringhuis, 2016.). Najpoznatiji primjer ovog mehanizma je aktivacija komplementa slobodnim lektinom koji veže manozu (engl. *mannose-binding lectin*, MBL), a događa se kao reakcija na prepoznate Man šećerne strukture na patogenima u serumu i tkivnim tekućinama (Wallis, 2002.). No, receptor MBL je nespecifični lektin koji osim Man može prepoznati i GlcNAc (Weis i sur., 1992.), čestu završnu šećernu jedinicu u strukturi N-glikana molekule IgG, zbog čega se aktivacija komplementa lektinskim putem može pokrenuti i protutijelom, što je karakteristično za patofiziološki mehanizam kod oboljelih od reumatoidnog artritisa (Garred i sur., 2000.; Malhotra i sur., 1995.). Također, na membranama stanica imunosnog sustava sisavaca nalaze se i lektini tipa C koji za svoju funkciju koriste ione Ca^{2+} i, slično lektinu MBL, pokreću upalni imunosni odgovor (Kerrigan i Brown, 2009.). No, zanimljivo je da u posebnim uvjetima N-glikozilacije molekule IgG neki od njih stvaraju membranske komplekse s inhibirajućim FcγRIIB receptorom i imaju protuupalno djelovanje (Karsten i Köhl, 2012.).

2.11 N-glikani i efektorske funkcije imunoglobulina G

Mnoga dosadašnja istraživanja pokazala su da su efektorske funkcije protutijela IgG, a u konačnici i krajnji imunosni odgovor, regulirani njegovom N-glikozilacijom (Li i sur., 2017.). Proteinski dijelovi molekula IgG koji dolaze u interakciju s receptorima, a kod manjeg broja ovih protutijela i dijelovi koji dolaze u doticaj s antigenom, prekriveni su N-glikanima. Stoga možemo slobodno reći da su N-glikani funkcionalne komponente protutijela IgG koje sudjeluju u regulaciji njegovih bioloških funkcija (Varki, 2017). Pokazano je da N-glikozilacija fragmenta Fab utječe na vezanje antigena (Wright i sur., 1991.) i uklanjanje protutijela IgG iz cirkulacije (Goetze i sur., 2011.; Huang i sur., 2006.), dok N-glikozilacija fragmenta Fc utječe na efektorske funkcije (Quast i sur., 2017.) te određuje hoće li molekula IgG djelovati proupalno ili protuupalno (Dashivets i sur., 2015.). Predispozicija molekule IgG za vezanje aktivirajućih ili inhibirajućih efektorskih liganada definirana je, između ostalog, specifičnom kombinacijom strukturno različitih N-glikana na Fc fragmentu ovog protutijela (de Taeye i sur., 2019.).

Dosad je pokazano da su molekule IgG, kojima nedostaje Gal, tzv. agalaktozilirane (G0) glikoforme ovog protutijela, uglavnom povezane s patofiziologijom upalnih i autoimunih bolesti jer djeluju kao pokretači upale alternativnim putem komplementa (Banda i sur., 2008.) i lektinskim putem komplementa (Arnold i sur., 2006.). S druge strane, općenito je prihvaćeno da prisustvo digalaktoziliranih (G2) N-glikana smanjuje upalni potencijal protutijela IgG tako što omogućuje kontakt protutijela s inhibirajućim FcγRIIB receptorom, koji dalje stvara kompleks s lektinskim receptorom 1 tipa C (engl. *dendritic cell-associated C-type lectin 1*, DECTIN-1) na površini neutrofila, što dovodi do zaustavljanja aktivacijske kaskade komplementa te rezultira protuupalnim djelovanjem protutijela(Karsten i sur., 2012.). No, u slučaju ako galaktoziliranim glikoformama molekule IgG nedostaje sržno vezana fukoza, pojačava se njihov afinitet za C1q komponentu komplementa i aktivira CDC (Dekkers i sur., 2017.; Peschke i sur., 2017.).

O važnosti glikanske strukture za funkciju glikoproteina dovoljno govori primjer N-glikozilacije molekule IgG, čija upalna aktivnost najviše ovisi upravo o promjeni samo jednog monosaharida na njegovom Fc fragmentu – sijalinske kiseline. Sijalinizirani N-glikani jedinstveni su po svojoj sposobnosti pokretanja protuupalnih efektorskih funkcija jer smanjuju sfinitet molekule IgG za aktivirajuće receptore FcR tipa I (Kaneko i sur., 2006.), a pojačavaju afinitet za inhibirajuće receptore FcR tipa II (Anthony i sur., 2008.), dok u isto vrijeme povećavaju ekspresiju inhibirajućeg receptora FcγRIIB na efektorskim stanicama (Pincetic i

sur., 2021.). Jedan od receptora FcR tipa II je protein DC-SIGN (engl. *dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin*), koji je vrlo je važan za protuupalnu funkciju protutijela IgG u terapeutskoj primjeni u obliku intravenskog globulinskog pripravka (engl. *intravenous immunoglobulin*, IVIg) (Jolles i sur., 2005.). Učinkovitost pripravaka IVIg u liječenju autoimunih i upalnih bolesti proizlazi iz povezivanja inhibirajućeg receptora FcγRIIB i receptora DC-SIGN na membrani stanica u prisustvu sijaliniziranih protutijela IgG, čime se podiže aktivacijski prag efektorskih funkcija imunosnih stanica makrofaga i dendritičkih stanica što djeluje protuupalno (Bayry i sur., 2009.). Iako je potvrđen nizom istraživanja (Anthony i Ravetch, 2010.; Anthony i sur., 2012.; Pincetic i sur., 2014.), značaj ovog mehanizma u protuupalnom djelovanju pripravka IVIg do danas je ostao predmet rasprave među znanstvenicima (Temming i sur., 2019.).

Sržno fukozilirani N-glikani čine preko 90% glikoformi protutijela IgG u plazmi, a približno su 100 puta manje efikasni u aktiviranju stanične ADCC (Shields i sur., 2002.) za razliku od nefukoziliranih glikoformi (Masuda i sur., 2007.). No, iako prisutnost sržne fukoze predstavlja „sigurnosni prekidač“ koji kontrolira upalnu prirodu protutijela IgG, tek je nedavno otkriveno da stanični receptor na NK stanicama, DECTIN-1, koji inače sudjeluje u pokretanju urođenog imunosnog odgovora na gljivične patogene (Brown, 2006.), ima ulogu receptora N-glikana molekule IgG sa sržno vezanom fukozom te sudjeluje u protuupalnim svojstvima ovog protutijela (Manabe i sur., 2019.).

2.12 N-glikozilacija imunoglobulina G u žena

Sva istraživanja o N-glikozilaciji molekule IgG, od samih početaka 80-ih godina prošlog stoljeća do danas, pokazuju da se sastav N-glikana ovog protutijela mijenja tijekom ljudskog života (Parekh i sur., 1988.). Utvrđeno je da se u zdravoj odrasloj populaciji sa starenjem povećava udio račvajućeg GlcNAc i agalaktoziliranih N-glikana, dok se u isto vrijeme udio digalaktoziliranih i sijaliniziranih N-glikana na molekuli IgG smanjuje (Pučić i sur., 2011.; Yamada i sur., 1997.). Od svih proučavanih glikanskih svojstava, najveće promjene primijećene su u razini galaktozilacije koja se do starosti smanji na 50% maksimalne vrijednosti koju je osoba imala tijekom života (Krištić i sur., 2014.). Posebno je zanimljivo da žene tijekom života imaju dinamičnije promjene N-glikozilacije molekule IgG u usporedbi s muškarcima, za koje se smatra da su povezane s razinom ženskih spolnih hormona (Krištić i sur., 2014.). Uz dob, spolni hormoni su vjerojatno drugi najvažniji fiziološki čimbenik koji utječe na N-glikozilaciju ovog protutijela (Kavur i sur., 2021.).

Spolno specifične promjene N-glikozilacije protutijela IgG započinju još u djetinjstvu (Cheng i sur., 2020.). U djevojčica se s pojavom puberteta povećava razina N-glikana s galaktozom i sijalinskim kiselinama, koji dosežu svoj maksimum s nastupanjem spolne zrelosti u ranoj odrasloj dobi, nakon dvadeste godine života (Krištić i sur., 2014.; Pucic Bakovic i sur., 2012.). Tijekom reproduktivnog razdoblja života, žene stoga imaju višu razinu digalaktoziliranih i sijaliniziranih N-glikana, a nižu razinu agalaktoziliranih N-glikana na protutijelima IgG od muškaraca (Baković i sur., 2013.). No, to vrijedi samo do ulaska u menopauzu kada se glikozilacijski status žena naglo mijenja prateći drastičnu promjenu koncentracije spolnih hormona zbog čega dolazi do značajnog pada razine galaktoziliranih i sijaliniziranih N-glikana na molekulama IgG (Chen i sur., 2012.). Žene u menopauzi stoga imaju višu razinu agalaktoziliranih N-glikana od muškaraca iste dobi, koja se sa starenjem razina ovih N-glikana na molekuli IgG nastavlja povećavati jednakom brzinom u oba spola (Baković i sur., 2013.; Chen i sur., 2012.).

Osim u zdravoj populaciji, promjene N-glikozilacije protutijela IgG prate pojavu mnogih patoloških stanja u ljudskom organizmu (Gudelj i sur., 2018a.). Maligna oboljenja – rak (Vučković i sur., 2016.; Wieczorek i sur., 2020.), razna upalna stanja – infekcije (Moore i sur., 2005.) i ozljede (Trbojević-Akmačić i sur., 2019.), autoimune bolesti (Ercan i sur., 2010.; Miyoshi i sur., 2015.; Su i sur., 2020.; Vučković i sur., 2015.), te nezdrave životne navike – pušenje (Wahl i sur., 2018.) i pretjeran unos hrane koji dovodi do pretilosti (Russell i sur.,

2018a.), uzrokuju promjene u sastavu N-glikana protutijela IgG, koje najčešće rezultiraju povećanjem razine agalaktoziliranih N-glikana – glavne komponente upalnog stanja organizma (Goulabchand i sur., 2014.).

Estradiol i progesteron su glavni spolni hormoni u žena za koje je poznato da sudjeluju u regulaciji imuniteta (Bouman i sur., 2005.). Žene stvaraju brže i jače imunosne reakcije u doticaju s patogenima, a nakon cijepljenja stvaraju veću količinu protutijela u usporedbi s muškarcima (Moulton, 2018.). Također, za razliku od muškaraca, žene su zaštićenije od bakterijskih i virusnih infekcija, no češće obolijevaju od autoimunih bolesti (Bhatia i sur., 2014.). Pretpostavka da su spolni hormoni važni modulatori tijeka bolesti vezana je uz istraživanja etiologije raznih autoimunih i upalnih bolesti u žena (Hughes i Choubey, 2014.). Iako točni mehanizmi u patologiji navedenih bolesti još uvijek nisu razjašnjeni, mnoga istraživanja pripisuju značajnu ulogu upravo promijenjenoj N-glikozilaciji molekule IgG (Gudelj i sur., 2018a.).

Nedavno je objavljeno da N-glikozilacija molekule IgG može biti modulirana faktorima poput spolnih hormona (Chen i sur., 2012.; Prados i sur., 2011.). Važna zapažanja o povezanosti spolnih hormona i N-glikozilacije protutijela IgG proizašle su iz istraživanja u kojima se uspoređivala aktivnost bolesti u žena prije, tijekom i nakon trudnoće (Bondt i sur., 2013.; van de Geijn i sur., 2009.; Selman i sur., 2012.), zatim otkrivanjem povećanog rizika nastanka bolesti koji prati razinu endogenih hormona u postmenopauzi (Krištić i sur., 2014; Kifer i sur., 2021.), ili usporedbom učestalosti bolesti u muškaraca i žena iste dobi (Cincinelli i sur., 2018.; Ngo i sur., 2014.; Whitacre i sur., 1999.). Do sada su znanstvenici uspjeli povezati vrlo nisku razinu estrogena u plazmi s povećanim rizikom razvoja reumatoidnog artritisa, učestale autoimune bolesti u žena u menopauzi (Engdahl i sur., 2018.; Huang i sur., 2017.). Povezanost razine ženskih spolnih hormona i N-glikozilacije molekule IgG naročito je vidljiva tijekom trudnoće. Kod žena koje boluju od reumatoidnog artritisa, visoka razina estrogena tijekom trudnoće potiče galaktozilaciju, a posebno sijalinizaciju molekule IgG, koja dovodi do remisije bolesti (van de Geijn i sur., 2009.). Unutar 6 tjedana nakon poroda, razina spolnih hormona se smanjuje (Selman i sur., 2012.) što u žena koje boluju od reumatoidnog artritisa uzrokuje ponovnu aktivaciju te autoimune bolesti praćene kombinacijom niske razine galaktozilacije i sijalinizacije (Bondt i sur., 2013.; van de Geijn i sur., 2009.) i visoke razine agalaktozilacije molekule IgG, koja nerijetko premašuje vrijednosti prije same trudnoće (Rook i sur., 1991.).

Što se tiče menstruacijskog ciklusa, žene općenito osjećaju pogoršanje simptoma kroničnih i akutnih bolesti netom prije menstruacije, ili tijekom menstruacije, kada je razina spolnih hormona niska (Oertelt-Prigione, 2012.). Dosad su zabilježene promjene u broju i aktivnosti imunosnih stanica (NK stanica, T i B limfocita) i protutijela s fazom menstruacijskog ciklusa ne samo lokalno u tkivima ženskog spolnog sustava (Safaeian i sur., 2009.), već i sistemski u cirkulaciji (Lee i sur., 2010.). Otkriće ovih imunosnih odgovora specifičnih za fazu menstruacijskog ciklusa potaknulo je ideju o cikličkom imunitetu žena koji se razvio kao spolno specifična evolucijska prilagodba na virulentnost patogena, ali i kao mehanizam kojim žensko tijelo odabire embrije koji imaju najveću sposobnost preživljavanja (Alvergne i Högqvist Tabor, 2018.).

Tijekom menstruacijskog ciklusa izmjenjuju se razdoblja snažne imunosne aktivnosti te reproduktivno povoljnih razdoblja sa smanjenim imunosnim reakcijama, koja su regulirana djelovanjem estrogena i progesterona. Poznato je da estrogen ima i upalna i protuupalna svojstva, koja ovise o njegovoj koncentraciji i omjeru između koncentracije estrogena i progesterona u tijelu (Khan i Ansar Ahmed, 2015.), dok progesteron uglavnom ima protuupalno djelovanje (Hughes, 2012.). Stoga, povišena razina estrogena i progesterona u luteinskoj fazi menstruacijskog ciklusa aktivira pomagačke T limfocite (engl. *T helper*, Th), koji se diferenciraju u podtip Th2, koji potiče proizvodnju protutijela, aktivira bazofile i mastocite. S druge strane, pri niskoj koncentraciji estrogena u većem dijelu folikularne faze menstruacijskog ciklusa nastaje podtip Th1 limfocita zadužen za razvoj specifične imunosti tj. aktivacije citotoksičnih limfocita T, makrofaga, NK-stanica, te reakcije kasne preosjetljivosti (Malenica, 2005). Ova saznanja upućuju na mogućnost da fluktuacija spolnih hormona tijekom menstruacijskog ciklusa utječe na N-glikozilaciju molekule IgG, a posljedično i na promjenu, ne samo staničnog, već i humoralnog imuniteta žene (Alvergne i Högqvist Tabor, 2018.).

Iako su mnoga dosadašnja istraživanja već ukazivala na povezanost ženskih spolnih hormona i N-glikozilacije protutijela IgG, ona je zaista potvrđena tek u hormonskim intervencijskim studijama. Prva takva studija objavljena je 2017. godine, a uključivala je korištenje sintetskih analoga hormona GnRH za supresiju aktivnosti osi HPO i proizvodnje spolnih hormona u reproduktivno aktivnih žena, žena u menopauzi, te muškaraca, a otkrila je ključnu ulogu estrogena za galaktozilaciju protutijela IgG u oba spola (Ercan i sur., 2017.). U istraživanju koje je uslijedilo, ponovljena je analiza glikanskih profila molekule IgG na istim uzorcima, ovaj put korištenjem najmodernije tehnologije tekućinske kromatografije ultravisoke

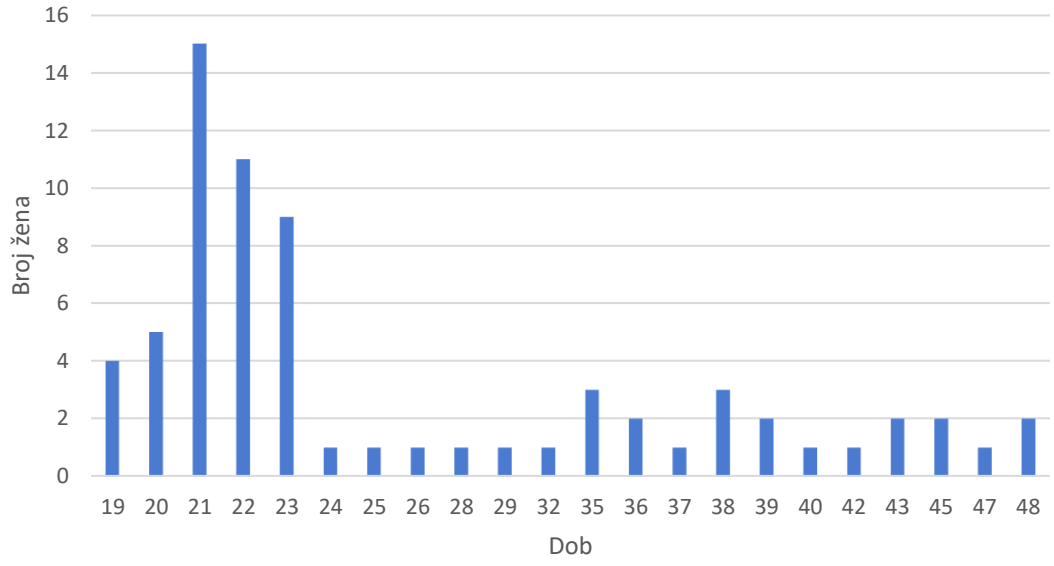
učinkovitosti. Osim promjena razine galaktozilacije, u ponovljenoj analizi tkrivena je povećana razina račvajućeg GlcNAc i smanjena razina sijalinizacije protutijela IgG u žena kod kojih je privremeno medicinski inducirana menopauza (Jurić i sur., 2020.).

Budući da se N-glikozilacija protutijela IgG stalno mijenja s obzirom na zdravstveno stanje osobe, N-glikani imaju veliki potencijal postati široko korišteni biomarkeri za dijagnozu raznih bolesti(Liu i sur., 2019.; Russell i sur., 2018b.), te je stoga potrebno temeljito istražiti sve čimbenike koji bi mogli utjecati na njegovu N-glikozilaciju. Osim već dobro poznatog utjecaja okolišnih i genetičkih faktora, još uvijek nema podataka o mogućim promjenama N-glikozilacije molekule IgG tijekom menstruacijskog ciklusa, niti je poznato treba li fazu menstruacijskog ciklusa uzimati u obzir prilikom uzorkovanja žena u epidemiološkim studijama. Glavni cilj ovog istraživanja je stoga bio longitudinalno pratiti i usporediti glikanske profile molekule IgG zdravih žena u reproduktivnom razdoblju života u različitim fazama tijekom nekoliko menstruacijskih ciklusa i ispitati postoji li povezanost faze menstruacijskog ciklusa i koncentracije spolnih hormona s razinom glikozilacijskih svojstava molekule IgG.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Ispitanice

U studiji su sudjelovale zdrave odrasle žene koje su uključene u istraživanje putem projekta *"The association between glycosylation of IgG and female menstrual cycle"* financiranog od strane Medicinskog fakulteta u Pekingu. Uključivanje je provedeno na temelju podataka o prethodnim menstruacijskim ciklusima, zdravstvenom stanju i životnim navikama svake osobe dobivenim putem eliminacijskog upitnika (u prilogu). Uključni kriteriji za sudjelovanje u studiji bili su: starost osobe (punoljetne osobe do menopauze) te redoviti i normalni menstruacijski ciklusi (Mihm i sur., 2011.). U studiju su se uključivale samo one žene koje nemaju dijagnosticirane bolesti za koje je poznato da utječu na promjene glikanskog profila molekule IgG. To su najčešće upalne bolesti poput autoimunih oboljenja, razne infekcije, te tumori (Gudelj i sur., 2018a.). Isključni kriteriji za sudjelovanje u studiji bili su: trudnoća, dojenje, menopauza, uzimanje oralnih kontracepcijskih sredstava ili drugih hormonskih terapija, pušenje cigareta te konzumacija alkohola. U studiju je uključeno sveukupno 70 zdravih odraslih Kineskinja etničke pripadnosti Han u rasponu od 19 do 48 godina starosti (Slika 12). Sve ispitanice su potpisale informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju, a studiju su odobrila Etička povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Medicinskog fakulteta u Pekingu. Studija je provedena u skladu s načelima Helsinške deklaracije.



Slika 12: Raspodjela broja žena po dobi u analiziranoj grupi žena (kohorta). N(žena)=70

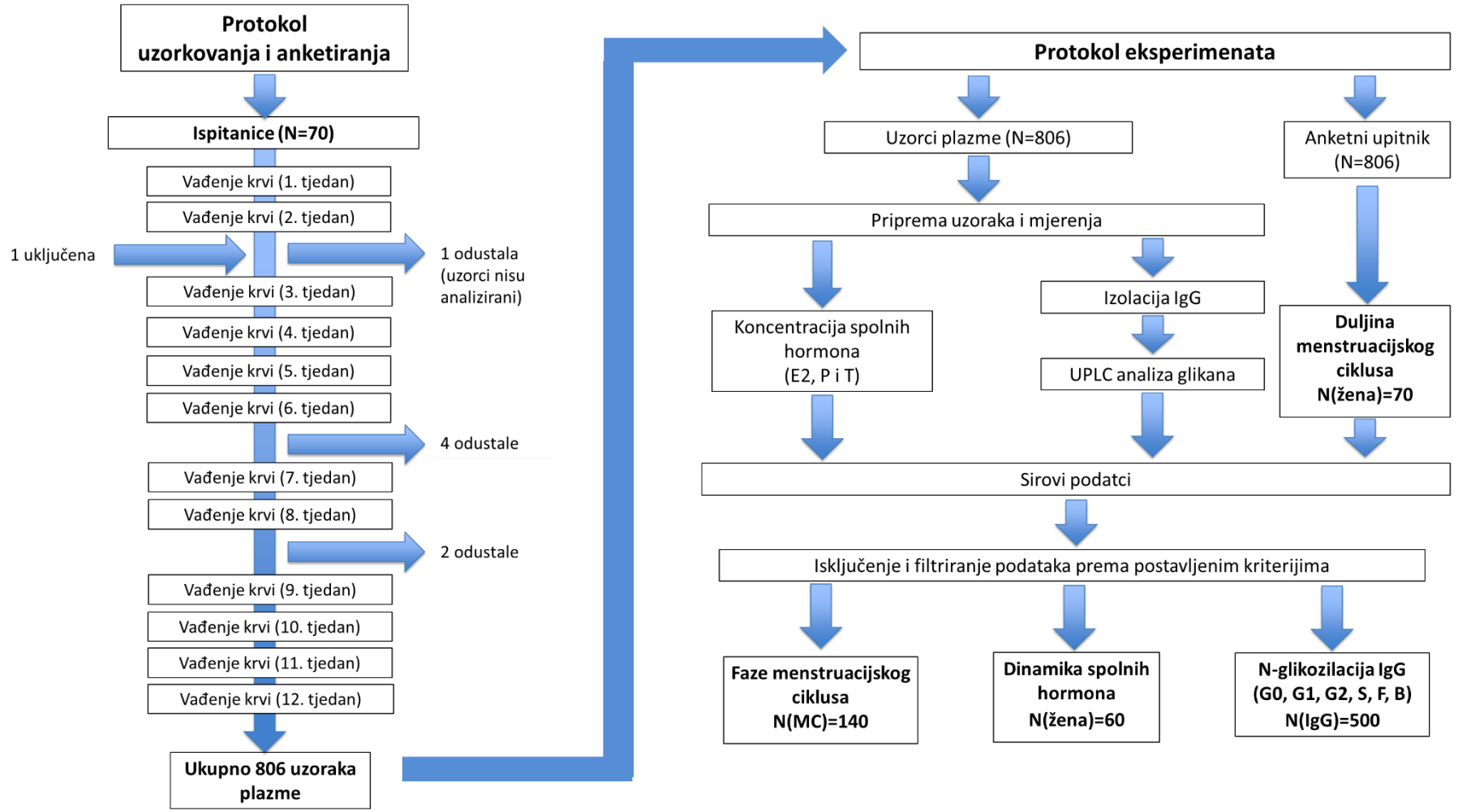
3.2 Koncept studije

U svrhu analize N-glikozilacije molekule IgG i koncentracije spolnih hormona, prikupljani su uzorci periferne krvi iz kojih je izdvojena krvna plazma. Uzorkovanje je provedeno od rujna do studenog 2016. godine, kroz dvanaest uzastopnih tjedana, jednom tjedno (ujutro), u pravilnim razmacima od sedam dana, te neovisno o fazi menstruacijskog ciklusa pojedine žene (Slika 13).

Od zdravih ispitanica uzeto je 5 mL pune krvi venepunkcijom u epruvete punjene antikoagulansom etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA) (BD Vacutainer) rutinskom procedurom u Naftnoj bolnici Jidong u kineskoj provinciji Hebei. Uzorci krvi inkubirani su 30 min na sobnoj temperaturi, nakon čega je uslijedilo centrifugiranje na 1670g tijekom 10 min na 4°C radi odvajanje plazme. Uzorci plazme čuvani su na -80°C do daljnje analize.

Prilikom svakog posjeta ispitanice su ispunile kratak upitnik vezano uz zdravstveno stanje i menstruacijski ciklus od zadnjeg vađenja krvi (u prilogu). Identitet ispitanica je zaštićen na način da je uzorak svake ispitanice kodiran brojem. Dobiveni podatci korišteni su za određivanje duljine trajanja menstruacijskog ciklusa svake žene za vrijeme trajanja studije. U svim uzorcima krvne plazme određena je koncentracija triju spolnih hormona - estradiola (17β-estradiol), progesterona i testosterona, kako bi se omogućilo praćenje faza menstruacijskih ciklusa u žena, i analizirani su N-glikozilacijski profili molekule IgG.

Sedam ispitanica nije uspjelo završiti predviđeni protokol uzorkovanja te je za njih prikupljeno manje od planiranih 12 uzoraka plazme. Kao razlozi odustajanja navedeni su fizički simptomi poput vrtoglavice i bljedila u licu, te niska razina željeza u krvi, dok je jedna ispitanica odustala zbog privatnih razloga. Nadalje, tijekom studije jedna je ispitanica oboljela od gripe, a dvije od prehlade te su koristile analgetike za ublažavanje simptoma bolesti poput snižavanja temperature i uklanjanja boli, zbog čega su njihovi podatci isključeni iz statističke obrade. U konačnici je, umjesto planiranih 840 uzoraka, tijekom studije prikupljeno 806 uzoraka plazme od 70 žena.



Slika 13: Shema protokola uzorkovanja i izvedenih eksperimenata u studiji. B – N-glikani s račvajućim GlcNAc, E2 – estradiol, F – N-glikani sa sržnom fukozom, G0 - N-glikani bez galaktoze, G1 – N-glikani s jednom galaktozom, G2 – N-glikani s dvije galaktoze, MC – menstruacijski ciklus, P – progesteron, S – glikani sa sijalinskom kiselinom, T – testosteron.

3.3 Materijali

3.3.1 Kemikalije

2-aminobenzamid (2-AB) (Sigma-Aldrich), 2-pikolin boran (2-PB) (Sigma-Aldrich), acetonitril (HPLC grade) (Scharlab), acetonitril (LC-MS) (J. T. Baker), amonijev klorid (NH_4Cl) (Acros Organics), amonijev hidrogenkarbonat (NH_4HCO_3) (Acros Organics), dimetil sulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich), etanol (Carlo Erba), mravlja kiselina (HCOOH) (Merck), igepal CA-630 (Sigma-Aldrich), kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) (Sigma-Aldrich), kalijev klorid (KCl) (EMD Milipore), kloridna kiselina (HCl) (Kemika), natrijev dodecil-sulfat (SDS) (Sigma-Aldrich), natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) (Acros Organics), natrijev hidrogenkarbonat ($NaHCO_3$) (Merck), natrijev hidroksid (NaOH) (Kemika), natrijev klorid (NaCl) (Carlo Erba), octena kiselina (CH_3COOH) (Merck), otopina amonijaka (Merck), tris(hidroksimetil)aminometan (Tris) (Acros Organics), ultračista voda (Millipore).

3.3.2 Enzimi i komercijalni setovi reagencija

ARC 2^{nd} Gen Testo RGT (Abbott Diagnostics)
ARC Estradiol RGT (Abbott Diagnostics)
ARC Pre-trigger solution (Abbott Diagnostics)
ARC Progesterone RGT (Abbott Diagnostics)
ARC Trigger solution (Abbott Diagnostics)
peptid-N-glikozidaza F (PNGaza F; 10 U/mL) (Promega)

3.3.3 Pločice za pripremu i pročišćavanje uzoraka

GHP Acroprep 0.20 µm filter pločica (Pall)
GHP Acroprep 0.45 µm filter pločica (Pall)
Pločica za prikupljanje uzoraka s 96 jažica, zapremnine 1 i 2 mL (Waters)
Protein G pločica (BIA Separations) - pločica monolita s proteinom G (96 jažica)

3.3.4 Pribor i uređaji

ABgene PCR pločice (Thermo Scientific)
Acquity UPLC Glycan BEH amidna kolona, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm x 100 mm (Waters)
Acquity UPLC H-Class tekućinska kromatografija ultravisokih performansi (Waters)
Analitička vaga Explorer® (OHAUS)
ARCHITECT® *i*1000SR analizator (Abbott Diagnostics)
Centrifuga *miniSpin* (Eppendorf)
Centrifuga model 5840 (Eppendorf)
Digestor DIGIM 15 AFM (SCHNEIDER)
Epruvete za vađenje krvi punjene antikoagulansom etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA) (BD Vacutainer® K2EDTA REF 368861)
Kružna tresilica model 3023 (GFL)
Laboratorijska pećnica LAB. HOT AIR OVEN (M.R.C.)
Laboratorijska tresilica Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)
Laboratorijski inkubator LAB. INCUBATOR (M.R.C.)
Magnetska miješalica MR 3000 D (Heildoph)
pH-metar FiveEasy^{TM} (METTLER TOLEDO)
Pipet-Lite XLS ručne mikropipete jedno- i višekanalne raznih volumena (Rainin)
Reakcijske tubice ARC (Abbott Diagnostics)
Refrigerated Vapor Traps RVT400 i vakuumska pumpa OFP400 (Thermo Scientific)
Rotacijski vakuum koncentrator Savant SC210A SpeedVac i Savant zamka za otapalo (Thermo Scientific)
Sistem za pročišćavanje vode Direct-Q 3UV (Millipore)
Spektrofotometar Nanodrop ND-8000 (Thermo Scientific)
Tehnička vaga model JL1502-G (METTLER TOLEDO)
Uređaj za filtriranje uz pomoć vakuuma (engl. *Vacuum Manifold*) i vakuumska pumpa (Pall)

3.4 Metode

3.4.1 Imunokemijska metoda određivanja koncentracije spolnih hormona

Koncentracije spolnih hormona estradiola, progesterona i testosterona izmjerene su u uzorcima krvne plazme kemiluminiscentnom imunokemijskom metodom posredovanom mikročesticama (engl. *chemiluminescent microparticle immuno assay*, CMIA) na automatiziranom sustavu ARCHITECT® *i*1000SR (Abbott Diagnostics) uz korištenje komercijalnih setova reagencija za detekciju hormona s promjenjivim testnim protokolima navedenog proizvođača (Stricker i sur., 2006.). Prije mjerenja koncentracija spolnih hormona, sustav je bilo potrebno kalibrirati pomoću otopina za kalibriranje na hormon čija se koncentracija određuje. Reakcijska smjesa za određivanje koncentracije spolnih hormona dobivena je miješanjem uzorka krvne plazme (200 μL) svake ispitanice, paramagnetskih mikročestica obloženih protutijelima na hormon od interesa te konjugata hormona od interesa obilježenog akridinom u jednokratnim reakcijskim tubicama ARC (Abbott Diagnostics). Na mikročestice obložene protutijelima prvo se vezao hormon iz plazme, a na preostala slobodna antitijela na mikročesticama vezao se akridinilirani konjugat hormona od interesa koji u doticaju s predaktivacijskom (engl. *pre-trigger solution;* H_2O_2, φ = 1.32%) i aktivacijskom (engl. *trigger solution;* NaOH, c = 0.35 M) otopinom pokreće reakciju kemiluminiscencije. Kemiluminiscentni signali detektirani su pomoću optike ARHITECT *i*System i izraženi su u relativnim svjetlosnim jedinicama (engl. *relative light units*, RLUs). Koncentracija hormona u plazmi obrnuto je proporcionalna detektiranim RLU jedinicama. Ova analiza provedena je u suradnji s Endokrinološkim laboratorijem Bolnice za ženske bolesti i porode Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

3.4.2 Analiza N-glikozilacije imunoglobulina G

3.4.2.1 Izolacija imunoglobulina G

Imunoglobulin G je izoliran iz uzoraka krvne plazme afinitetnom kromatografijom vezanjem na protein G pločicu s 96 jažica (BIA Separations) uz korištenje vakuum uređaja za filtriranje pločica (engl. *vacuum manifold*, Pall). Svi koraci izolacije protutijela IgG odvijaju se pri tlaku od oko 430 mm žive, osim pri nanošenju uzorka plazme i eluiranju molekula IgG, kada se koristi smanjeni tlak od oko 250 mm žive. Izolacija imunoglobulina G iz krvne plazme izvodi se u digestoru, a korištene otopine se prije upotrebe filtriraju kroz filtar 0.2 μm Supor PES (Nalgene).

Prije nanošenja uzoraka, Protein G pločica je bila pripremljena uzastopnim ispiranjem s otopinama, redom: 2 mL ultra čiste vode (18 MΩ/cm pri 25°C), 2 mL 1× koncentriranog pufera PBS pH 7.4 (137 mmol/L NaCl; 2.7 mmol/L Na_2HPO_4; 9.7 mmol/L KH_2PO_4; 2.2 mmol/L KCl; titrirano s NaOH do pH 7.4), 1 mL 0.1 mol/L HCOOH pH 2.5; 2 mL 10× koncentriranog pufera PBS pH 6.6; te je na kraju uravnotežena ispiranjem s 4 mL 1× koncentriranog pufera PBS pH 7.4.

Osim uzoraka plazme ispitanica (100 μL), na svaku pločicu je nasumično stavljeno po pet alikvota standardnog uzorka plazme (50 μL), a u jednu jažicu stavljeno je 700 μL 1× koncentriranog pufera PBS kao negativna kontrola. Uzorci plazme su promiješani i centrifugirani 10 min na 1479 g (centrifuga model 5840, Eppendorf). Zatim su razrijeđeni 1× koncentriranim puferom PBS pH7.4 u omjeru 1:7 (v/v) te filtrirani kroz filtar pločicu 0.45 μm GHP AcroPrep s 96 jažica (Pall) upotrebom vakuum uređaja za pločice (Pall). Filtrirani uzorci plazme naneseni su na Protein G pločicu i isprani tri puta s 2 mL 1× koncentriranog pufera PBS pH 7.4 kako bi se uklonili nevezani proteini. Vezani IgG je eluiran s Protein G pločice ispiranjem s 1 mL 0.1 mol/L HCOOH, te je neutraliziran sa 170 μL 1 mol/L NH_4HCO_3 čime je dobiven ukupni volumen od 1170 μL IgG eluata.

Protein G pločica je regenerirana radi mogućnosti ponovnog korištenja ispiranjem s 1 mL 0.1 mol/L HCOOH, 2 mL 10× koncentriranog pufera PBS pH 6.6, 4 mL 1× koncentriranog pufera PBS pH 7.4 te 1 mL pufera za skladištenje pločice (etanol φ = 20%, 20 mmol/L Tris; 0.1 mol/L NaCl; titrirano s HCl do pH 7.4), nakon čega je dodan još 1 mL pufera za skladištenje i pločica je spremljena na 4°C.

3.4.2.2 Određivanje koncentracije imunoglobulina G

Koncentracija imunoglobulina G izoliranog iz plazme određena je za svaki uzorak mjerenjem apsorbancije pri 280 nm pomoću spektrofotometra Nanodrop ND-8000 (Thermo Scientific). Od ukupno 1170 µL IgG eluata, 300 µL je izdvojeno za sušenje u rotacijskom vakuum koncentratoru SpeedVac Concentrator SC210A (Thermo Scientific). Osušeni uzorci korišteni su u narednim koracima, dok je preostali volumen IgG eluata spremljen na -20°C.

3.4.2.3 Denaturacija i deglikozilacija imunoglobulina G u otopini

Osušeni uzorci IgG denaturirani su dodatkom 30 µL natrijevog dodecil sulfata (SDS, γ = 1.33%) te inkubirani 10 min na 65°C, nakon čega su ohlađeni na sobnoj temperaturi tijekom 30 min. Svakom uzorku je dodano 10 µL otopine Igepal CA-630 (φ = 4%) (Sigma Aldrich) kako bi se deaktivirao suvišak SDS-a, a pločica je inkubirana 15 min na sobnoj temperaturi. Molekule IgG su deglikozilirane dodatkom 10 µL 5× koncentriranog PBS pufera i 1.25 U enzima PNGase F (Promega). Enzim PNGaza F cijepa N-glikozidnu vezu između unutarnjeg GlcNAc-a srži N-glikana i asparaginskog ostatka proteinskog dijela molekule IgG. Reakcija oslobađanja N-glikana s molekule IgG provedena je inkubacijom uzoraka 18 h na 37°C.

3.4.2.4 Fluorescentno obilježavanje i pročišćavanje slobodnih N-glikana imunoglobulina G

Budući da glikani u svojoj strukturi ne posjeduju kromofore, nemoguće ih je detektirati spektrofotometrijskim metodama. Slobodni N-glikani se stoga obilježavaju fluorescentnom bojom 2-aminobenzamidom (2-AB). Postupak obilježavanja proveden je u digestoru korištenjem svježe otopine za obilježavanje N-glikana koja se priprema tako da se 2-AB (γ-= 19.2 mg/mL) i 2-pikolin boran (2-PB; γ = 44.8 mg/mL) otope u otopini octene kiseline (HAc) i dimetilsulfoksida (DMSO) u omjeru 30:70 (v/v). Nakon što je svakom uzorku dodano po 25 µL otopine za obilježavanje, uslijedila je inkubacija 2 h pri 65°C.

Nakon hlađenja 30 min na sobnoj temperaturi, svakom je uzorku dodano 700 µL ohlađenog acetonitrila (φ = 100%, 4 °C) te su uzorci prebačeni na filtar pločicu GHP AcroPrep 0.2 µm. Filtar pločica je prethodno bila pripremljena ispiranjem svake jažice s po 200 µL etanola (φ = 70%), ultračiste vode i ohlađenim acetonitrilom (φ = 96%, 4°C).

Između svakog od ovih koraka, filtar pločica je ispražnjena korištenjem uređaja za filtriranje pomoću vakuuma (Pall), pri čemu vakuum nije prelazio 50 mmHg.

Nakon prebacivanja na filtar pločicu GHP AcroPrep 0.2 µm, uzorci su inkubirani 2 min na sobnoj temperaturi. Tijekom inkubacije, slobodni N-glikani obilježeni bojom 2-AB vezali su se za hidrofilnu polipropilensku membranu pločice. Svaki uzorak je zatim ispran 4 puta s 200 µL ohlađenog acetonitrila (φ = 96%, 4°C). Tekućinskom kromatografijom temeljenom na hidrofilnim interakcijama uz ekstrakciju na čvrstoj fazi (engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography – solid phase extraction,* HILIC-SPE) iz uzoraka su uklonjena onečišćenja, kao što su proteini, suvišak fluorescentne boje i ostali reagensi. Eluiranje N-glikana obilježenih bojom 2-AB izvedeno je u dva istovjetna koraka: u svaku jažicu dodano je po 90 µL ultračiste vode, nakon čega je uslijedila inkubacija 15 min na sobnoj temperaturi uz protresanje na kružnoj tresilici model 3023 (GFL). N-glikani obilježeni bojom 2-AB eluirani su centrifugiranjem filtar pločice GHP AcroPrep 0.2 µm tijekom 5 min pri 164 g u centrifugi model 5840 (Eppendorf) te su sakupljeni u ABgene PCR pločice. Pročišćeni fluorescentno obojani N-glikani molekula IgG spremljeni su na - 20°C do daljnje upotrebe.

3.4.2.5 Analiza N-glikana imunoglobulina G tekućinskom kromatografijom

Fluorescentno obilježeni N-glikani molekule IgG analizirani su metodom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti temeljenom na hidrofilnim interakcijama (engl. *hydrophilic interaction ultra-performance liquid chromatography,* HILIC-UPLC) na amidnoj koloni ACQUITY UPLC® Glycan BEH (Waters, USA) duljine 100 mm, promjerom 2.1 mm i veličinom čestica 1.7 µm prema prethodno utvrđenom protokolu (Pučić i sur., 2011.). Navedena analiza provedena je na uređaju Acquity UPLC H-Class (Waters) kojeg čine modul za upravljanje otapalima (engl. *quaternary solvent manager,* QSM), modul za upravljanje uzorcima (engl. *sample manager,* SM) i fluorescencijski (FLR) detektor. Instrument je kontroliran programom Empower 3, verzija 3471 (Waters, USA).

Uzorci glikana se za analizu pripremaju miješanjem s acetonitrilom (φ = 100%) u omjeru uzorak : ACN = 20 : 80 (v/v). Za mobilnu fazu korišteni su amonijev formijat ($HCOONH_4$; c = 100 mM, pH 4.4) kao otapalo A, i acetonitril (φ = 100%) kao otapalo B, a sustav je između analiza ispiran otopinom acetonitrila (φ = 75%). Uzorci su ohlađeni na 10°C prije injektiranja, a odvajanje na koloni odvijalo se pri 60°C. Glikani se na koloni razdvajaju na temelju njihove različite interakcije sa stacionarnom, odnosno, mobilnom fazom pri čemu je

stacionarna faza polarna, a mobilnu fazu čini nepolarno otapalo s rastućim volumnim udjelom polarnog otapala. U postupku odvajanja korišten je linearni gradijent od 25-38% otapala A pri protoku od 0.40 mL/min tijekom analitičkog postupka u trajanju od 27 min. Razdvojeni glikani detektirani su pomoću FLR detektora pri valnoj duljini ekscitacije i emisije za fluorescentnu boju 2-AB (λ_{ex} = 250 nm, λ_{em} = 428 nm). Sustav je kalibriran pomoću vanjskog standarda kojeg čine fluorescentno obilježeni oligomeri glukoze (engl. *dextran ladder*) pri čemu je vrijeme zadržavanja glikana na koloni (engl. *retention time,* RT) izraženo u jedinicama glukoze (engl. *glucose units*, GU). Razdvajanjem N-glikana obilježenih bojom 2-AB opisanim postupkom tekućinske kromatografije nastaje karakteristični kromatogram od 24 glikanska pika čiji je sastav odrađen ranije (Pučić i sur., 2011.).

3.4.3 Obrada i analiza podataka

3.4.3.1 Uklanjanje varijacije glikanskih podataka uslijed serija eksperimenata

Kako bi se smanjila varijacija zbog serija eksperimenata (engl. *batch effect*) svi uzorci iste osobe, koji su sakupljani u 12 vremenskih točaka, bili su analizirani na istoj pločici. Na svaku pločicu su stoga nasumično raspoređeni uzorci plazme najviše tri do pet osoba tako da je prosjek godina ispitanica na svakoj pločici bio podjednak. Pločice su sadržavale i standardni uzorak plazme u pentaplikatu koji je služio za kontrolu nebiološke varijabilnosti, odnosno tehničke varijacije metode. Ovakvim analitičkim pristupom izbjegnuta je varijacija među pločicama te nije bilo potrebe izvoditi uobičajenu korekciju glikanskih podataka na razlike u serijama (engl. *batch correction*).

3.4.3.2 Obrada glikanskih podataka

Svaki kromatogram dobiven analizom N-glikana tekućinskom kromatografijom, integriran je na isti način i podijeljen na 24 glikanska pika. Glikanski podatci su najprije normalizirani na ukupnu površinu (engl. *total chromatographic area*). To znači da je površina svakog glikanskog (kromatografskog) pika podijeljena s ukupnom površinom tog kromatograma kako bi glikanska mjerenja različitih uzoraka bila usporediva. Relativni udio N-glikana u svakom piku prikazan je kao postotak ukupne integrirane površine (% area) (Pučić i sur., 2011.). Set od 20-ak ručno integriranih kromatograma korišten je kao predložak za automatsko intgriranje svih kromatograma N-glikana molekule IgG u ovoj studiji (Agakova i sur., 2017.).

3.4.3.3 Određivanje izvedenih glikanskih svojstava imunoglobulina G

Osim 24 direktno izmjerenih glikanskih svojstava, za molekulu IgG je dodatno izračunato šest izvedenih glikanskih svojstava koja grupiraju N-glikane određenih strukturnih osobina, što omogućuje lakšu analizu i razumijevanje bioloških procesa u kojima sudjeluju određene glikoforme protutijela IgG (Tablica 1). Izvedena svojstva stoga predstavljaju relativnu zastupljenost galaktoziliranih (N-glikani bez galaktoze – G0, s jednom galaktozom – G1 i s dvije galaktoze – G2), sijaliniziranih (N-glikani sa sijalinskom kiselinom – S), fukoziliranih (N-glikani sa sržnom fukozom – F) i N-glikana s račvajućim GlcNAc (engl. *bisecting*, B) u ukupnom N-glikomu molekula IgG.

Tablica 1: Formule za izračun izvedenih glikanskih svojstava molekula IgG.

Izvedena glikanska svojstva	Kromatografski pikovi
G0 (Agalaktozilirani N-glikani)	GP1+GP2+GP3+GP4+GP6
G1 (Monogalaktozilirani N-glikani)	GP7+GP8+GP9+GP10+GP11
G2 (Digalaktozilirani N-glikani)	GP12+GP13+GP14+GP15
S (Sijalinizirani N-glikani)	GP16+GP17+GP18+GP19+GP21+GP22+GP23+GP24
F (N-glikani sa sržnom fukozom)	GP1+GP4+GP6+GP8+GP9+GP10+GP11+GP14+GP15+GP16+GP18+GP19+GP23+GP24
B (N-glikani s račvajućim GlcNAc)	GP3+GP6+GP10+GP11+GP13+GP15+GP19+GP22+GP24

3.4.3.4 Povezanost dinamike spolnih hormona i glikanskih svojstava imunoglobulina G u menstruacijskom ciklusu

Vremenski pomak u dinamici spolnih hormona i glikanskih svojstava protutijela IgG utvrđen je usporedbom njihovih najviših vrijednosti u menstruacijskom ciklusu (MC). Najveća koncentracija spolnih hormona (E2, P i T) i najveća razina glikanskih svojstava (G0, G1, G2, S, F i B), određena je kao prosječni % menstruacijskog ciklusa (Pik) dobiven na razini svih menstruacijskih ciklusa različitog trajanja (između 26 i 34 dana) svih žena (Tablica 7). Normalizacijom svih ciklusa na prosječnu duljinu ciklusa (30 dana) prosječni %MC pretvoren je u dane (MC Pik) prema formuli:

$$\textbf{MC Pik (X)} = \textbf{Pik (X)} \times \textbf{MC duljina}$$

MC – menstruacijski ciklus, MC duljina = 30 dana (prosječna duljina MC u studiji), X = spolni hormon ili glikansko svojstvo.

Primjeri: MC Pik (E2) = 45% × 30 dana = 0.45 × 30 dana = 13.5 ~ 13. dan MC
MC Pik (S) = 84% × 30 dana = 0.84 × 30 dana = 25.2 ~ 25. dan MC

Vrijeme koje je prošlo od dana u kojem je primijećena najveća koncentracija pojedinog spolnog hormona (MC Pik (X_2)) do dana u kojem je primijećena najveća razina određenog glikanskog svojstva (MC Pik (X_1)) predstavlja vremenski pomak (MC Pomak) u dinamici ovih varijabli tijekom menstruacijskog ciklusa, a izračunata je prema formuli:

MC Pomak (X_1, X_2) = MC Pik (X_2) - MC Pik (X_1)

MC – menstruacijski ciklus, MC duljina = 30 dana (prosječna duljina MC u studiji), X_1 = spolni hormon, X_2 = glikansko svojstvo

Primjer: MC Pomak (S, E_2) = MC Pik (S) – MC Pik (E_2) = 25. dan – 13. dan = 12 dana

3.4.3.5 Statistička analiza podataka

Podatci su analizirani i vizualizirani pomoću programskog jezika *R* (verzija 3.0.1). Dinamika glikana i spolnih hormona u menstruacijskom ciklusu aproksimirana je modelom menstruacijskog ciklusa. Duljina menstruacijskih ciklusa u studiji standardizirana je normalizacijom duljine trajanja pojedinačnih menstruacijskih ciklusa na 100%, čime je omogućeno pozicioniranje i usporedba glikanskih podataka i koncentracija spolnih hormona unutar zajedničkog modela menstruacijskog ciklusa neovisno o trajanju svakog pojedinačnog menstruacijskog ciklusa. Glikanska mjerenja standardizirana su dijeljenjem svakog mjerenja s njegovom prosječnom vrijednosti kako bi se omogućila usporedba između različitih glikanskih svojstava.

Analiza povezanosti menstruacijskog ciklusa s glikanskim svojstvima izvedena je korištenjem linearnog mješovitog modela. U linearnom mješovitom modelu fiksirana varijabla bila je dob, dok je nasumična varijabla bila subjekt (osoba). Pretpostavljeni periodični obrazac longitudinalnih mjerenja glikana modeliran je kao linearna kombinacija sinusne i kosinusne funkcije za faze menstruacijskog ciklusa.

Analiza povezanosti koncentracije spolnih hormona s izvedenim glikanskim svojstvima provedena je korištenjem linearnog mješovitog modela. U linearnom mješovitom modelu fiksirana varijabla bila je dob, dok je nasumična varijabla bila subjekt (osoba). *p* vrijednosti su korigirane na višestruko testiranje Benjamini-Hochberg metodom. Korigirane *p* vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima.

4 REZULTATI

4.1 Karakteristike ispitanica

Prilikom odabira žena za istraživanje, prikupljeni su osnovni opći, antropometrijski i zdravstveni podatci vezani uz menstruacijski ciklus svake osobe. Opis ispitivane kohorte dan je u tablici 2. Prije uključivanja u studiju bio je djelomično poznat zdravstveni status ispitanica, odnosno bilo je poznato da ne boluju od akutne ili kronične bolesti, ne koriste hormonsku nadomjesnu terapiju i nisu u stanju trudnoće ili menopauze. Na taj je način osigurana selektivnost u odabiru ispitivane kohorte s ciljem da samo zdrave osobe sudjeluju u studiji, te da se isključi mogući utjecaj navedenih zdravstvenih faktora na N-glikozilaciju molekule IgG (Gudelj i sur., 2018a.).

U studiju je ukupno uključeno 70 zdravih žena. Sve ispitanice su izjavile da imaju redovite, normalne menstruacijske cikluse. Duljina menstruacijskih ciklusa ispitanica prije uključivanja u studiju prosječno je trajala 30 dana s menstruacijskim krvarenjima od 6 dana. Svoju prvu menstruaciju ispitanice su dobile u prosjeku s 13 godina. Iz rezultata je vidljivo da su ispitanice većinom visoko obrazovane osobe ili studentice mlađe životne dobi (prosječna dob analizirane grupe žena je 27 god.). Nadalje, sve ispitanice imaju zdrave životne navike (ne puše i ne konzumiraju alkohol), a velika većina ih ima zdravu tjelesnu težinu s normalnom količinom masnog tkiva u trbušnom dijelu tijela. Većinom su to slobodne, neudane žene koje još nisu pokušale zasnovati obitelj, zbog čega među ispitanicama prevladavaju osobe koje nikad nisu imale trudnoću, porod ili pobačaj.

Tablica 2: Karakteristike ispitanica uključenih u istraživanje.

Opći podatci		Antropometrijski podatci		Zdravstveni podatci	
Broj ispitanica (N)	70	Visina (cm)	161.4 ± 4.1	Povijest pušenja	NE
Nacionalnost	Han Kineskinje	Težina (kg)	56 ± 7.3	Povijest konzumiranja alkohola	NE
Spol	žene	Opseg struka (cm) (N=69)	75.6 ± 7.5	Trudnoća (broj po osobi)	
				0	47 (67.1%)
Dob kod uzorkovanja (god.)	27.3 ± 8	Opseg bokova (cm) (N=69)	95.1 ± 6.8	1	11 (15.7%)
Min	19			2	5 (7.1%)
Maks.	48			3	6 (8.6%)
				4	1 (1.4%)
Zanimanje		WHtR (N=69)		Porod (broj po osobi)	
Rad u tvrtki	17 (24.3%)	Neuhranjenost	2 (2.9%)	0	47 (67.1%)
Studentica	46 (65.7%)	Zdrava težina	55 (79.8%)	1	20 (28.6%)
Farmerica	5 (7.1%)	Pretilost	12 (17.3%)	2	3 (4.3%)
Medicinsko osblje	2 (2.9%)				
Umirovljenica	0			Pobačaj (broj po osobi)	
Ostalo	0			0	60 (85.7%)
				1	3 (4.3%)
Stupanj obrazovanja				2	7 (10%)
Osnovna škola	1 (1.4%)				
Niža srednja škola	9 (12.9%)			Pojava prve mjesečnice (god.)	13.3 ± 1
Viša srednja škola	6 (8.6%)				
Fakultet i više	54 (77.1%)			Redoviti menstruacijski ciklus	DA
Bračni status				Trajanje menstruacijskog ciklusa (dani)	30 ± 5.8
Neudana	47 (67.1%)				
Udana	20 (28.6%)				
Rastavljena	3 (4.3%)			Trajanje menstruacijskog krvarenja (dani)	5.6 ± 1
Udovica	0				

Kontinuirane varijable s normalnom raspodjelom prikazane su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Kategoričke varijable prikazane su kao postotci. WHtR (engl. *waist to height ratio*) – omjer opsega struka i visine kao pokazatelj distribucije masnog tkiva u trbušnom dijelu tijela (Baioumi, 2019.).

4.2 Koncentracija spolnih hormona

Koncentracije spolnih hormona estradiola (E2), progesterona (P) i testosterona (T) uspješno su određene korištenjem komercijalnih setova reagencija za detekciju hormona metodom kemiluminiscencije u svih 804 uzorka krvne plazme koji su prikupljeni od 70 ispitanica. Rezultati mjerenja koncentracija dani su u Tablici 3. Ovi rezultati uvršteni su u model zajedničkog menstruacijskog ciklusa kako bi se odredila dinamika spolnih hormona u ciklusu potrebna za analizu odnosa koncentracije spolnih hormona i glikanskih svojstava protutijela IgG u različitim fazama menstruacijskih ciklusa ispitanica, što je prikazano na slici 18.

Tablica 3: Koncentracije spolnih hormona u krvnoj plazmi ispitanica (01-70) u 12 vremenskih točaka (GM01-GM12). N(krvna plazma)=804, N(žene)=70

Spolni hormoni	Ispitanice (12 vremenskih točaka)																						
	GM0101	GM0102	GM0103	GM0104	GM0105	GM0106	GM0107	GM0108	GM0109	GM0110	GM0111	GM0112	GM0113	GM0114	GM0115	GM0116	GM0117	GM0118	GM0119	GM0120	GM0121	GM0122	GM0123
Testosteron (nmol/L)	0,68	1,05	1,11	0,84	1,17	0,57	0,76	1,32	0,92	1,14	1,2	0,8	0,89	0,95	0,97	1,12	1,07	0,51	0,86	0,97	0,97	0,51	/
Estradiol (pmol/L)	372	1003	234	388	39	261	169	111	140	244	456	79	1158	45	430	1101	175	146	91	424	243	456	/
Progesteron (nmol/L)	98,1	1,1	0,9	56,3	0,6	0,8	13,3	1	4,7	0,9	57,2	1,5	1,5	1,5	28,7	0,9	9,5	3,3	3,8	19,9	1,1	83,9	/
	GM0201	GM0202	GM0203	GM0204	GM0205	GM0206	GM0207	GM0208	GM0209	GM0210	GM0211	GM0212	GM0213	GM0214	GM0215	GM0216	GM0217	GM0218	GM0219	GM0220	GM0221	GM0222	GM0223
Testosteron (nmol/L)	0,72	0,76	1,09	0,8	0,92	1,03	0,83	1,39	0,86	1,56	1,12	1,08	0,74	0,95	0,89	0,96	0,94	0,76	0,94	0,92	1,25	0,5	/
Estradiol (pmol/L)	62	594	324	339	< 37	131	138	194	383	404	164	307	560	40	442	565	652	215	112	147	876	260	/
Progesteron (nmol/L)	1,4	45,1	6,8	6,4	0,6	1,4	1	9,5	0,7	17,7	3,5	1,2	41,5	0,5	38,6	43,2	78,1	0,6	0,6	1,3	3,5	1,1	/
	GM0301	GM0302	GM0303	GM0304	GM0305	GM0306	GM0307	GM0308	GM0309	GM0310	GM0311	GM0312	GM0313	GM0314	GM0315	GM0316	GM0317	GM0318	GM0319	GM0320	GM0321	GM0322	GM0323
Testosteron (nmol/L)	0,84	0,89	0,96	0,68	0,73	1,28	1	1,32	0,73	1,46	1,39	1,02	0,56	0,73	0,83	1,06	1,1	1,07	1,13	1,01	0,86	0,61	0,74
Estradiol (pmol/L)	402	94	436	626	50	540	660	867	201	461	416	201	97	38	308	288	232	817	1105	484	553	876	893
Progesteron (nmol/L)	1,1	1,2	33	58,1	0,4	1,1	0,7	51,2	36,4	17,1	0,8	6,4	2,7	0,6	0,8	15	11	1,5	2,7	0,8	27,9	1,5	1
	GM0401	GM0402	GM0403	GM0404	GM0405	GM0406	GM0407	GM0408	GM0409	GM0410	GM0411	GM0412	GM0413	GM0414	GM0415	GM0416	GM0417	GM0418	GM0419	GM0420	GM0421	GM0422	GM0423
Testosteron (nmol/L)	0,77	0,84	0,71	0,47	0,74	1,15	1,01	1,2	0,64	1,02	1,59	0,96	0,68	0,76	0,9	1,01	1,03	0,64	1,01	0,98	0,9	0,62	0,78
Estradiol (pmol/L)	344	127	37	119	43	370	632	56	220	94	550	604	134	52	730	331	520	611	927	229	207	278	197
Progesteron (nmol/L)	35,8	0,6	1	2,4	0,4	45,1	40,5	1,2	54,8	0,8	24,7	48,3	0,7	2,1	0,8	1,5	48,8	46,2	22,9	32,3	1,3	82,7	22
	GM0501	GM0502	GM0503	GM0504	GM0505	GM0506	GM0507	GM0508	GM0509	GM0510	GM0511	GM0512	GM0513	GM0514	GM0515	GM0516	GM0517	GM0518	GM0519	GM0520	GM0521	GM0522	GM0523
Testosteron (nmol/L)	0,86	0,88	0,92	0,76	1	1,41	0,86	1,74	0,89	1,46	1,43	1,08	0,8	0,67	0,82	1,25	1,04	0,63	0,77	1,08	0,97	0,6	0,87
Estradiol (pmol/L)	446	331	147	331	40	505	598	148	182	209	519	571	448	37	256	749	509	148	77	211	729	225	261
Progesteron (nmol/L)	75,5	0,5	1,1	0,9	0,4	58,1	33,5	1,2	1,3	0,9	28,5	1,1	0,5	0,6	58	0,8	0,8	4,9	1	10	0,6	7,9	20,4
	GM0601	GM0602	GM0603	GM0604	GM0605	GM0606	GM0607	GM0608	GM0609	GM0610	GM0611	GM0612	GM0613	GM0614	GM0615	GM0616	GM0617	GM0618	GM0619	GM0620	GM0621	GM0622	GM0623
Testosteron (nmol/L)	0,79	1,21	1,23	0,72	0,77	1,29	0,75	1,83	0,91	1,64	1,5	1,16	0,73	0,74	0,76	1,16	1,17	0,72	0,92	0,99	0,93	0,66	0,87
Estradiol (pmol/L)	185	206	801	308	54	177	180	416	715	202	340	265	247	56	241	399	497	288	136	51	318	135	56
Progesteron (nmol/L)	0,9	13,6	6,2	10,1	0,4	1,1	0,7	5	1,1	9	0,8	0,7	25,3	0,5	37,5	43,4	50,4	0,6	0,5	1,4	27,3	0,8	1,2
	GM0701	GM0702	GM0703	GM0704	GM0705	GM0706	GM0707	GM0708	GM0709	GM0710	GM0711	GM0712	GM0713	GM0714	GM0715	GM0716	GM0717	GM0718	GM0719	GM0720	GM0721	GM0722	GM0723
Testosteron (nmol/L)	/	1,14	0,85	/	0,86	1,26	0,98	1,3	0,72	1,06	1,67	1,04	/	0,62	0,76	1,11	0,82	1,01	1,08	1,02	0,86	0,73	0,76
Estradiol (pmol/L)	/	750	688	/	< 37	548	657	571	351	365	324	354	/	< 37	428	584	512	600	388	< 37	217	364	42
Progesteron (nmol/L)	/	57,1	115,3	/	0,4	1,1	0,8	37,4	59,6	22,9	10,5	13	/	0,6	0,7	45,3	51	3	4,3	0,9	33,4	5,3	0,9
	GM0801	GM0802	GM0803	GM0804	GM0805	GM0806	GM0807	GM0808	GM0809	GM0810	GM0811	GM0812	GM0813	GM0814	GM0815	GM0816	GM0817	GM0818	GM0819	GM0820	GM0821	GM0822	GM0823
Testosteron (nmol/L)	/	0,79	0,9	/	1,04	1,19	0,92	1,34	1,11	1,15	1,58	0,65	/	0,88	1,1	1	1,08	0,78	0,8	1,19	0,86	0,59	0,86
Estradiol (pmol/L)	/	121	117	/	38	352	639	46	227	81	651	404	/	61	409	233	166	423	523	253	131	1030	56
Progesteron (nmol/L)	/	1,1	4,2	/	0,7	42,2	54,5	2,5	12,1	1,6	42,8	32,7	/	0,8	1	1,3	0,9	53,3	16,8	1,6	0,8	61,3	0,8
	GM0901	GM0902	GM0903	GM0904	GM0905	GM0906	GM0907	GM0908	GM0909	GM0910	GM0911	GM0912	GM0913	GM0914	GM0915	GM0916	GM0917	GM0918	GM0919	GM0920	GM0921	GM0922	GM0923
Testosteron (nmol/L)	/	1,22	1,06	/	0,91	1,17	0,85	1,6	1,25	1,24	1,46	0,83	/	0,77	1,09	1,07	1,14	0,78	0,76	1,15	1,22	0,57	0,83
Estradiol (pmol/L)	/	175	99	/	125	530	388	157	269	208	161	78	/	43	1147	128	469	182	99	123	1435	1013	114
Progesteron (nmol/L)	/	0,7	0,8	/	0,4	49,5	32,2	1,2	0,9	0,9	1,9	0,8	/	0,6	11,1	0,9	0,5	6,9	0,7	8,5	1,1	1,5	1
	GM1001	GM1002	GM1003	GM1004	GM1005	GM1006	GM1007	GM1008	GM1009	GM1010	GM1011	GM1012	GM1013	GM1014	GM1015	GM1016	GM1017	GM1018	GM1019	GM1020	GM1021	GM1022	GM1023
Testosteron (nmol/L)	/	1,12	1,05	/	0,95	1,15	0,92	1,82	1,11	1,95	1,65	1,1	/	1,05	0,93	1,22	1,24	0,83	1,09	0,95	1,27	0,62	0,78
Estradiol (pmol/L)	/	621	276	/	485	143	185	289	315	559	923	351	/	67	938	180	272	275	477	406	956	189	318
Progesteron (nmol/L)	/	0,5	1	/	0,8	1,1	0,8	6	3,2	2,9	1,1	0,7	/	0,9	5,3	9,9	12,5	0,6	0,8	36,3	27,5	3,4	1,1
	GM1101	GM1102	GM1103	GM1104	GM1105	GM1106	GM1107	GM1108	GM1109	GM1110	GM1111	GM1112	GM1113	GM1114	GM1115	GM1116	GM1117	GM1118	GM1119	GM1120	GM1121	GM1122	GM1123
Testosteron (nmol/L)	/	0,91	1,13	/	1,16	1,27	1,21	1,33	0,96	1,6	1,51	1,27	/	0,77	0,91	1,19	1,17	0,95	0,84	0,96	1,05	0,79	0,73
Estradiol (pmol/L)	/	507	322	/	620	485	841	502	463	590	854	314	/	50	549	694	562	352	415	89	129	782	541
Progesteron (nmol/L)	/	31,8	33,5	/	0,9	1,1	0,8	32,1	54,1	18	41	15,8	/	0,5	1	46,2	23,3	2,5	19,3	1,7	3,4	10,3	1,3
	GM1201	GM1202	GM1203	GM1204	GM1205	GM1206	GM1207	GM1208	GM1209	GM1210	GM1211	GM1212	GM1213	GM1214	GM1215	GM1216	GM1217	GM1218	GM1219	GM1220	GM1221	GM1222	GM1223
Testosteron (nmol/L)	/	0,95	0,98	/	0,84	1,39	0,86	1,47	0,89	1,31	1,21	1,05	/	1,01	0,95	1,05	1,03	0,68	0,63	1,09	1,09	0,58	0,85
Estradiol (pmol/L)	/	406	614	/	76	593	607	154	124	80	357	614	/	48	368	125	165	475	81	118	481	584	1088
Progesteron (nmol/L)	/	22,2	56,8	/	0,6	43,6	38,8	2,8	1,9	1,8	13,4	41,1	/	1,2	0,9	3,8	1	53	2,2	1	0,8	16,5	2,3

Tablica 3: (nastavak)

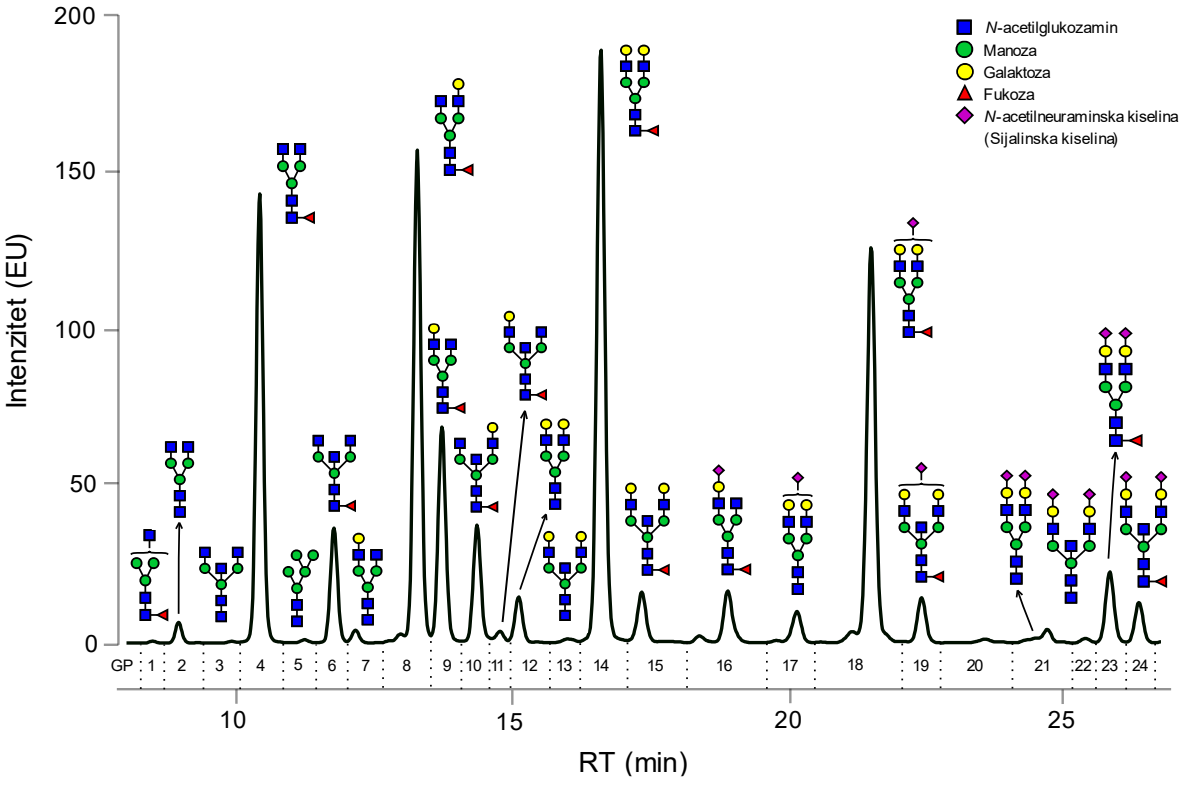
Spolni hormoni	Ispitanice (12 vremenskih točaka)																							
	GM0124	GM0125	GM0126	GM0127	GM0128	GM0129	GM0130	GM0131	GM0132	GM0133	GM0134	GM0135	GM0136	GM0137	GM0138	GM0139	GM0140	GM0141	GM0142	GM0143	GM0144	GM0145	GM0146
Testosteron (nmol/L)	0,79	1,22	1,14	0,9	1,29	1,28	1,29	1,45	1,78	1,16	1,32	1,31	1,03	0,98	1,55	1,13	1,86	1,08	1,45	1,68	1,15	1,39	0,9
Estradiol (pmol/L)	205	254	1018	198	191	486	354	158	422	192	560	1022	303	442	418	75	1680	991	328	693	416	142	558
Progesteron (nmol/L)	0,5	0,9	0,9	0,8	1,1	31	15,6	1	23,1	9,5	1,4	1,8	1,2	1,2	1	1,7	4	47,3	33,6	2,2	14,3	1,3	45,8
	GM0224	GM0225	GM0226	GM0227	GM0228	GM0229	GM0230	GM0231	GM0232	GM0233	GM0234	GM0235	GM0236	GM0237	GM0238	GM0239	GM0240	GM0241	GM0242	GM0243	GM0244	GM0245	GM0246
Testosteron (nmol/L)	1,1	1,61	1,02	0,94	1,23	1,1	1,11	1,87	1,61	1,16	1,04	1,23	1,42	1,2	2,29	1,61	1,48	1,02	1,54	1,4	1,12	1,78	0,91
Estradiol (pmol/L)	991	1043	477	491	699	213	81	401	869	428	293	519	1325	236	603	98	706	136	716	726	799	250	658
Progesteron (nmol/L)	1	3,5	25,1	0,4	0,9	6,3	1	0,9	53	33,1	30,3	28,9	1,8	30,6	4,3	0,9	63,1	1,9	80,4	23,8	51,5	1,2	47,4
	GM0324	GM0325	GM0326	GM0327	GM0328	GM0329	GM0330	GM0331	GM0332	GM0333	GM0334	GM0335	GM0336	GM0337	GM0338	GM0339	GM0340	GM0341	GM0342	GM0343	GM0344	GM0345	GM0346
Testosteron (nmol/L)	0,9	1,08	1,17	1	1,22	1,42	1,4	1,92	1,59	1,24	1,09	1,22	1,11	0,97	1,44	1,7	1,87	1,18	1,47	1,35	0,63	1,61	1,07
Estradiol (pmol/L)	519	577	509	439	355	244	138	685	106	127	801	375	702	490	599	165	680	203	81	143	211	156	120
Progesteron (nmol/L)	50	39,7	28,1	22,7	16	1,2	0,9	24,8	1,8	1,7	70,9	25,5	36,4	46,9	58,8	1,1	26,2	1	1,7	3,8	2,1	7,9	1,3
	GM0424	GM0425	GM0426	GM0427	GM0428	GM0429	GM0430	GM0431	GM0432	GM0433	GM0434	GM0435	GM0436	GM0437	GM0438	GM0439	GM0440	GM0441	GM0442	GM0443	GM0444	GM0445	GM0446
Testosteron (nmol/L)	0,86	0,99	1,05	0,82	1,14	1,4	1,63	1,39	1,32	1,27	1	1,17	0,97	0,9	1,21	1,6	1,8	1,54	1,54	1,3	0,86	1,41	0,88
Estradiol (pmol/L)	133	130	130	662	105	258	140	1012	191	229	137	141	153	122	175	366	287	1406	181	119	342	569	224
Progesteron (nmol/L)	3,7	5,4	0,8	27,2	1,2	0,9	1,4	41,1	0,9	1,2	1,3	1,1	2,1	1	2,7	0,8	1,6	3,5	0,8	0,5	0,8	43,3	27
	GM0524	GM0525	GM0526	GM0527	GM0528	GM0529	GM0530	GM0531	GM0532	GM0533	GM0534	GM0535	GM0536	GM0537	GM0538	GM0539	GM0540	GM0541	GM0542	GM0543	GM0544	GM0545	GM0546
Testosteron (nmol/L)	0,99	1,17	1,19	0,93	1,38	1,5	1,17	1,43	1,76	1,24	1,02	1,34	1,06	0,96	1,78	1,72	1,73	1,17	1,64	1,33	1,11	1,34	1,36
Estradiol (pmol/L)	129	94	1045	124	154	534	163	53	488	209	177	502	198	502	187	380	1639	861	262	140	451	96	172
Progesteron (nmol/L)	1	0,8	1	0,7	0,9	0,9	0,6	1	4,4	9,8	1	1,4	1	1	1,3	16,9	1,3	74,3	1,1	0,7	1,2	1,6	0,7
	GM0624	GM0625	GM0626	GM0627	GM0628	GM0629	GM0630	GM0631	GM0632	GM0633	GM0634	GM0635	GM0636	GM0637	GM0638	GM0639	GM0640	GM0641	GM0642	GM0643	GM0644	GM0645	GM0646
Testosteron (nmol/L)	1,04	1,26	1,18	1,14	1,59	1,67	1,76	1,88	1,42	1,09	1,23	1,51	0,82	0,91	1,26	1,42	1,57	1,09	1,47	2,13	1,63	1,53	1,32
Estradiol (pmol/L)	266	185	677	316	586	712	250	111	468	580	844	1174	498	323	369	637	612	472	330	858	1102	195	161
Progesteron (nmol/L)	0,7	0,8	49,4	0,8	3,3	29,4	10,9	1,1	20,6	36,4	3,7	10,1	0,7	45,6	0,5	24,7	81,9	17,3	28,5	1	4,2	1	0,8
	GM0724	GM0725	GM0726	GM0727	GM0728	GM0729	GM0730	GM0731	GM0732	GM0733	GM0734	GM0735	GM0736	GM0737	GM0738	GM0739	GM0740	GM0741	GM0742	GM0743	GM0744	GM0745	GM0746
Testosteron (nmol/L)	0,97	1,34	1,24	1,27	1,08	1,41	1,43	1,71	1,33	/	0,99	1,53	1,08	0,78	1,86	1,38	1,51	1,22	1,75	1,34	0,96	1,51	1,55
Estradiol (pmol/L)	208	397	414	390	475	880	623	358	124	/	635	304	411	412	217	92	326	152	714	632	439	175	180
Progesteron (nmol/L)	10,3	4,5	11,3	4,7	51,9	40,6	48,8	0,6	1,5	/	90	4,8	44,1	52,5	8,6	0,8	9,5	1,1	60,3	23,6	28,9	12,4	0,7
	GM0824	GM0825	GM0826	GM0827	GM0828	GM0829	GM0830	GM0831	GM0832	GM0833	GM0834	GM0835	GM0836	GM0837	GM0838	GM0839	GM0840	GM0841	GM0842	GM0843	GM0844	GM0845	GM0846
Testosteron (nmol/L)	0,93	1,27	1,14	0,82	1,26	1,25	1,1	1,86	1,96	/	0,93	1,29	0,79	0,95	1,25	1,37	1,46	1,39	1,61	1,1	0,96	1,71	1,81
Estradiol (pmol/L)	937	745	230	810	82	198	141	518	168	/	185	220	458	148	649	97	196	225	143	121	215	436	224
Progesteron (nmol/L)	36,9	75,3	0,7	54	2	1	1	17,4	1	/	2,9	1	28,7	0,8	52,1	0,8	0,7	0,6	0,6	2	1,4	40,1	0,5
	GM0924	GM0925	GM0926	GM0927	GM0928	GM0929	GM0930	GM0931	GM0932	GM0933	GM0934	GM0935	GM0936	GM0937	GM0938	GM0939	GM0940	GM0941	GM0942	GM0943	GM0944	GM0945	GM0946
Testosteron (nmol/L)	1,12	1,06	1,41	1,02	1,31	1,39	1,34	1,78	2,19	/	1,26	1,6	1,11	1,4	1,55	1,85	1,95	1,73	1,8	1,25	0,98	1,39	1,55
Estradiol (pmol/L)	122	74	522	136	246	292	118	754	654	/	117	274	140	172	143	141	716	1471	370	130	402	91	215
Progesteron (nmol/L)	0,9	3,7	1,1	1	0,8	0,9	1	33	2,6	/	1,2	1,6	1,3	1,1	1,5	1,5	1	1,2	1	0,9	0,7	1,9	0,8
	GM1024	GM1025	GM1026	GM1027	GM1028	GM1029	GM1030	GM1031	GM1032	GM1033	GM1034	GM1035	GM1036	GM1037	GM1038	GM1039	GM1040	GM1041	GM1042	GM1043	GM1044	GM1045	GM1046
Testosteron (nmol/L)	1,03	1,32	1,36	1,21	1,41	1,6	1,75	1,45	2,13	/	1,25	1,79	1,25	1,24	1,57	1,91	1,98	1,07	1,71	1,62	1,05	1,83	1,63
Estradiol (pmol/L)	152	181	555	425	422	1367	149	106	819	/	212	518	328	480	213	189	1311	1016	422	126	727	158	164
Progesteron (nmol/L)	0,6	0,9	31	0,8	1	1,1	0,9	0,7	46,1	/	1,2	3,5	1,6	1	0,6	1	14,6	31,9	45,3	0,7	0,8	1,8	0,8
	GM1124	GM1125	GM1126	GM1127	GM1128	GM1129	GM1130	GM1131	GM1132	GM1133	GM1134	GM1135	GM1136	GM1137	GM1138	GM1139	GM1140	GM1141	GM1142	GM1143	GM1144	GM1145	GM1146
Testosteron (nmol/L)	1,3	1,33	1,15	1,21	1,36	1,01	2,1	1,41	1,56	/	1,48	1,31	1,17	1,31	2,03	2,03	1,87	1,27	1,5	1,74	1,07	1,73	1,32
Estradiol (pmol/L)	243	214	499	257	290	664	175	114	125	/	628	284	377	373	1082	423	1148	983	621	128	681	252	150
Progesteron (nmol/L)	0,8	1,1	18	11,8	36,7	28,4	0,7	0,9	3,7	/	4,5	14	18,5	53,4	4,3	1,2	14,9	28	54,5	0,8	39,1	13,1	0,8
	GM1224	GM1225	GM1226	GM1227	GM1228	GM1229	GM1230	GM1231	GM1232	GM1233	GM1234	GM1235	GM1236	GM1237	GM1238	GM1239	GM1240	GM1241	GM1242	GM1243	GM1244	GM1245	GM1246
Testosteron (nmol/L)	1,24	1,57	1,09	1,03	1,13	0,89	1,83	1,52	1,73	/	1,26	1,34	1,18	1,05	1,42	2,13	1,66	1,14	1,62	1,75	1	1,43	1,21
Estradiol (pmol/L)	319	290	116	608	93	239	274	502	192	/	883	134	718	547	599	472	161	156	151	147	684	421	173
Progesteron (nmol/L)	3,5	5,3	0,9	43,5	1,6	5,5	0,9	0,8	1,2	/	98,6	1,8	43,7	48,2	47,3	17	1	1,3	1,1	0,6	31,5	33,6	1

Tablica 3: (nastavak)

Spolni hormoni	Ispitanice (12 vremenskih točaka)																								
	GM0147	GM0148	GM0149	GM0150	GM0151	GM0152	GM0153	GM0154	GM0155	GM0156	GM0157	GM0158	GM0159	GM0160	GM0161	GM0162	GM0163	GM0164	GM0165	GM0166	GM0167	GM0168	GM0169	GM0170
Testosteron (nmol/L)	1,04	1,33	1,3	1,3	0,58	1,24	1,37	1,48	1,87	0,7	0,75	1,22	1,52	1,16	1,11	2,06	1,04	1,23	1,35	1,55	1,46	1,59	1,06	1
Estradiol (pmol/L)	145	853	239	396	87	461	208	548	425	72	108	444	85	163	75	175	110	289	130	436	139	123	108	106
Progesteron (nmol/L)	1,6	46,6	13,2	1,6	0,6	29,6	1,4	1,5	1,1	1,1	1,3	1,4	1,3	0,7	2,3	1,5	3,8	7,6	1,6	24,8	1,3	1,5	3	0,7
	GM0247	GM0248	GM0249	GM0250	GM0251	GM0252	GM0253	GM0254	GM0255	GM0256	GM0257	GM0258	GM0259	GM0260	GM0261	GM0262	GM0263	GM0264	GM0265	GM0266	GM0267	GM0268	GM0269	GM0270
Testosteron (nmol/L)	1	1	1,09	1,59	0,75	1,36	1,72	1,66	2,07	1,35	1,14	1,06	1,82	1,75	1,44	1,89	1,3	1,53	1,74	1,57	1,72	1,87	1,21	1,33
Estradiol (pmol/L)	274	131	667	465	129	89	617	256	165	131	302	295	273	631	193	550	165	126	241	165	251	160	124	201
Progesteron (nmol/L)	1,2	1	30,1	2,5	0,5	1,3	0,9	22,2	8,6	1	0,8	8,9	0,9	2,3	0,8	1,3	1,1	0,7	1	8,1	0,9	0,7	1	0,7
	GM0347	GM0348	GM0349	GM0350	GM0351	GM0352	GM0353	GM0354	GM0355	GM0356	GM0357	GM0358	GM0359	GM0360	GM0361	GM0362	GM0363	GM0364	GM0365	GM0366	GM0367	GM0368	GM0369	GM0370
Testosteron (nmol/L)	1,03	1,47	1,14	1,21	0,96	1,35	1,1	1,59	2	1,58	1,2	1	1,97	1,51	1,48	1,82	1,12	1,47	1,34	1,39	2,01	1,94	1,71	1,33
Estradiol (pmol/L)	195	146	67	716	503	88	510	433	481	124	236	403	326	522	841	418	392	250	806	92	280	381	471	232
Progesteron (nmol/L)	7,3	0,7	1,6	29,7	0,8	2,3	36,2	37,3	17,6	1,4	19,5	26,5	3,4	34,1	1,3	28,9	0,7	1	1,7	1,1	6,4	1	1,3	14,6
	GM0447	GM0448	GM0449	GM0450	GM0451	GM0452	GM0453	GM0454	GM0455	GM0456	GM0457	GM0458	GM0459	GM0460	GM0461	GM0462	GM0463	GM0464	GM0465	GM0466	GM0467	GM0468	GM0469	GM0470
Testosteron (nmol/L)	1,25	1,39	1,26	0,99	0,8	1,46	1,32	1,78	2,27	1,48	0,78	0,92	1,31	1,41	1,35	1,66	1,39	1,59	1,18	1,58	2,18	2,35	1,72	1,11
Estradiol (pmol/L)	152	151	312	118	415	96	564	99	90	105	482	121	622	148	461	177	225	936	338	137	567	528	455	342
Progesteron (nmol/L)	0,7	0,7	0,6	1,6	29,3	1,4	37,1	1,2	1,4	0,9	51,6	1	62,3	3,9	10,9	6,1	27,6	0,9	10,8	1,2	33,2	34,3	21,2	34,7
	GM0547	GM0548	GM0549	GM0550	GM0551	GM0552	GM0553	GM0554	GM0555	GM0556	GM0557	GM0558	GM0559	GM0560	GM0561	GM0562	GM0563	GM0564	GM0565	GM0566	GM0567	GM0568	GM0569	GM0570
Testosteron (nmol/L)	0,98	1,71	1,87	1,35	0,79	1,62	1,43	1,83	2,73	1,62	0,88	1,2	1,84	1,73	1,5	1,7	1,07	1,27	1,35	1,77	1,54	1,48	1,18	1,01
Estradiol (pmol/L)	115	950	1720	301	92	154	146	195	360	149	107	141	124	137	151	163	333	546	124	751	141	973	326	122
Progesteron (nmol/L)	1,8	2,1	3,9	1	2,6	1,2	0,9	1,6	1,2	1,8	0,8	0,8	1,9	1,3	1,1	1,4	29	46,2	3,1	2,9	1,3	68,7	12,7	0,9
	GM0647	GM0648	GM0649	GM0650	GM0651	GM0652	GM0653	GM0654	GM0655	GM0656	GM0657	GM0658	GM0659	GM0660	GM0661	GM0662	GM0663	GM0664	GM0665	GM0666	GM0667	GM0668	GM0669	GM0670
Testosteron (nmol/L)	0,99	1,59	0,86	1,64	0,86	1,66	1,52	2,35	2,71	1,66	1	2,16	1,25	1,66	1,27	1,95	1,17	1,35	1,4	1,31	1,47	1,72	1,73	1,31
Estradiol (pmol/L)	126	754	95	1105	69	323	317	734	474	120	268	114	644	357	946	254	125	733	189	488	263	204	126	244
Progesteron (nmol/L)	1,1	43,6	3,3	2,6	0,5	2,8	1,2	2,6	15,4	1,7	0,5	0,7	1	0,9	1	1,4	1	25,4	1,4	67,1	0,8	0,9	1,5	0,8
	GM0747	GM0748	GM0749	GM0750	GM0751	GM0752	GM0753	GM0754	GM0755	GM0756	GM0757	GM0758	GM0759	GM0760	GM0761	GM0762	GM0763	GM0764	GM0765	GM0766	GM0767	GM0768	GM0769	GM0770
Testosteron (nmol/L)	1,11	1,41	1,4	1,12	0,76	1,42	1,44	1,38	2,46	1,65	1,3	1,03	2,06	1,81	1,42	2,01	1,29	1,3	1,71	1,26	2,19	1,92	1,88	1,31
Estradiol (pmol/L)	207	132	173	704	73	575	914	494	532	119	253	448	179	400	106	195	186	191	201	124	485	304	252	223
Progesteron (nmol/L)	1,5	2,5	1	39,9	0,5	33,2	1,4	39,5	16,8	1,3	9,8	28,4	0,9	19,5	2,3	10,3	0,9	0,8	1,8	6,7	3,5	0,8	1,2	18,9
	GM0847	GM0848	GM0849	GM0850	GM0851	GM0852	GM0853	GM0854	GM0855	GM0856	GM0857	GM0858	GM0859	GM0860	GM0861	GM0862	GM0863	GM0864	GM0865	GM0866	GM0867	GM0868	GM0869	GM0870
Testosteron (nmol/L)	1,12	1,27	1,32	1,14	0,84	1,45	1,2	0,93	2,86	1,68	0,84	0,83	2,77	1,38	1,48	1,46	1,18	1,89	1,76	1,4	2,22	1,96	2,4	1,36
Estradiol (pmol/L)	273	141	229	202	72	78	413	72	164	88	309	186	276	528	209	597	454	513	526	102	754	831	410	604
Progesteron (nmol/L)	5,4	0,6	0,7	4,4	0,6	1,9	62	1,8	1	0,9	32	8,3	0,7	31,1	1,4	35,3	0,7	0,7	4,5	1	39,8	6,8	7,5	76,2
	GM0947	GM0948	GM0949	GM0950	GM0951	GM0952	GM0953	GM0954	GM0955	GM0956	GM0957	GM0958	GM0959	GM0960	GM0961	GM0962	GM0963	GM0964	GM0965	GM0966	GM0967	GM0968	GM0969	GM0970
Testosteron (nmol/L)	0,94	2	1,53	1,36	0,92	1,45	/	1,66	2,68	1,73	1,23	1,05	2,52	1,59	1,86	1,56	1,51	2,13	1,01	1,96	/	1,78	1,74	1,46
Estradiol (pmol/L)	199	183	367	259	109	104	/	103	920	383	121	126	302	116	1093	99	291	519	67	152	/	669	401	112
Progesteron (nmol/L)	4,3	1,4	0,7	1,3	0,7	1,7	/	1	1,7	1,6	1,2	1,1	14,4	1,5	1,1	1,2	31,6	18,1	1,5	1,8	/	45,3	11,8	1,6
	GM1047	GM1048	GM1049	GM1050	GM1051	GM1052	GM1053	GM1054	GM1055	GM1056	GM1057	GM1058	GM1059	GM1060	GM1061	GM1062	GM1063	GM1064	GM1065	GM1066	GM1067	GM1068	GM1069	GM1070
Testosteron (nmol/L)	0,93	1,82	1,59	1,41	0,84	1,83	/	1,9	2,3	1,51	1,19	1,48	2,03	1,9	1,64	1,91	1,22	1,61	1,61	1,77	/	1,48	1,46	1,48
Estradiol (pmol/L)	136	159	262	258	97	127	/	783	513	367	374	179	500	144	311	148	521	1082	150	441	/	211	134	154
Progesteron (nmol/L)	1,3	0,9	0,7	4,4	0,7	1,3	/	1,5	43,5	25,4	0,7	0,9	24,4	1,3	19,6	1,5	45,9	57,9	2,3	1,2	/	2,2	1,3	0,7
	GM1147	GM1148	GM1149	GM1150	GM1151	GM1152	GM1153	GM1154	GM1155	GM1156	GM1157	GM1158	GM1159	GM1160	GM1161	GM1162	GM1163	GM1164	GM1165	GM1166	GM1167	GM1168	GM1169	GM1170
Testosteron (nmol/L)	0,94	1,64	1,64	1,6	0,79	1,73	/	1,54	2,43	1,59	1,37	1,41	1,93	2,03	1,41	1,63	1,15	1,33	1,77	1,28	/	2	1,95	1,48
Estradiol (pmol/L)	123	213	201	821	107	119	/	438	140	1,1	416	215	133	630	138	235	124	140	194	411	/	185	183	1082
Progesteron (nmol/L)	1,1	0,9	0,9	47,4	0,7	1,7	/	38,8	3,4	97	30,6	3,2	0,8	1,3	0,8	1,1	0,9	0,8	1,5	28	/	0,8	1,9	1,3
	GM1247	GM1248	GM1249	GM1250	GM1251	GM1252	GM1253	GM1254	GM1255	GM1256	GM1257	GM1258	GM1259	GM1260	GM1261	GM1262	GM1263	GM1264	GM1265	GM1266	GM1267	GM1268	GM1269	GM1270
Testosteron (nmol/L)	1,1	1,63	1,53	1,14	0,91	2,01	/	1,36	2,55	1,6	1,08	0,9	2,28	1,43	1,56	1,81	1,32	1,72	1,87	1,47	/	2,09	2,33	1,55
Estradiol (pmol/L)	121	196	265	200	138	150	/	134	183	161	686	413	294	466	327	522	210	221	342	267	/	379	990	680
Progesteron (nmol/L)	1,5	1	0,7	3,1	0,9	1,5	/	6,2	0,9	1,1	45,7	31,9	0,7	42,5	1,1	11,3	0,7	0,8	13,5	20,6	/	0,8	3,5	58,2

4.3 Analiza N-glikana tekućinskom kromatografijom ultravisoke učinkovitosti

Od ukupno prikupljenih 804 uzoraka krvne plazme od 70 žena, u 776 uzoraka uspješno je analiziran glikanski profil IgG metodom HILIC-UPLC čime nastaje karakteristični kromatogram u kojem su N-glikani odvojeni u 24 glikanska pika (Slika 14). Razlika u broju prikupljenih i uspješno analiziranih uzoraka krvne plazme proizlazi iz niskog intenziteta određenih kromatografskih pikova zbog čega neki kromatogrami nisu mogli biti uspješno integrirani tj. razdvojeni u glikanske pikove.



Slika 14: Reprezentativni HILIC-UPLC kromatogram 2-AB obilježenih N-glikana imunoglobulina G. Imunoglobulin G je izoliran iz uzorka krvne plazme u folikularnoj fazi menstruacijskog ciklusa jedne od ispitanica iz studije. Oslobođeni N-glikani molekule IgG fluorescentno su obilježeni bojom 2-aminobenzamidom (2-AB) i analizirani tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti temeljenom na hidrofilnim interakcijama (HILIC-UPLC) čime su odvojeni u 24 kromatografska pika (GP1-GP24). Radi jednostavnijeg prikaza kromatografskih podataka, za svaki glikanski pik prikazana je samo najzastupljenija glikanska struktura. Strukture N-glikana nacrtane su pomoću programa Glycoworkbench (Ceroni i sur., 2008.). Monosaharidi su predstavljeni simbolima i obojani u skladu s preporukom Konzorcija za funkcionalnu genomiku (*The Consortium for Functional Glycomics*, 2012.). GP – glikanski pik (engl. *glycan peak*), EU – jedinice emisije (engl. *emission units*), RT – vrijeme zadržavanja glikana na koloni (engl. *retention time*).

4.4 Biološka varijabilnost N-glikana imunoglobulina G u kohorti

Kako bi se utvrdilo postoje li promjene u N-glikozilaciji protutijela IgG tijekom 3-mjesečnog trajanja istraživanja, prvo je bilo potrebno odrediti biološku varijabilnost pojedinačnih glikana u svim analiziranim uzorcima. U tu je svrhu na pločicama između uzoraka analiziran uvijek jedan te isti uzorak poznatog glikanskog profila (standard), čija promjena predstavlja tehničku varijabilnost analitičke metode. Biološka varijabilnost N-glikana je izračunata kao omjer srednje vrijednosti varijacije uzorka poznatog glikanskog profila (standarda) na svim pločicama i svih uzoraka iz studije za svaki od 24 glikanska pika pomnožen sa 100%. Omjer manji od 100% znači da je biološka varijabilnost analiziranog glikanskog pika, tj. pojedinog N-glikana u kohorti veća od tehničke varijabilnosti metode. Biološka varijabilnost premašuje analitičku varijabilnost u 14 od 24 glikanska pika molekule IgG praćena u studiji (Tablica 4, Slika 14).

Tablica 4: Biološka varijabilnost pojedinačnih N-glikana molekule IgG na razini kohorte.

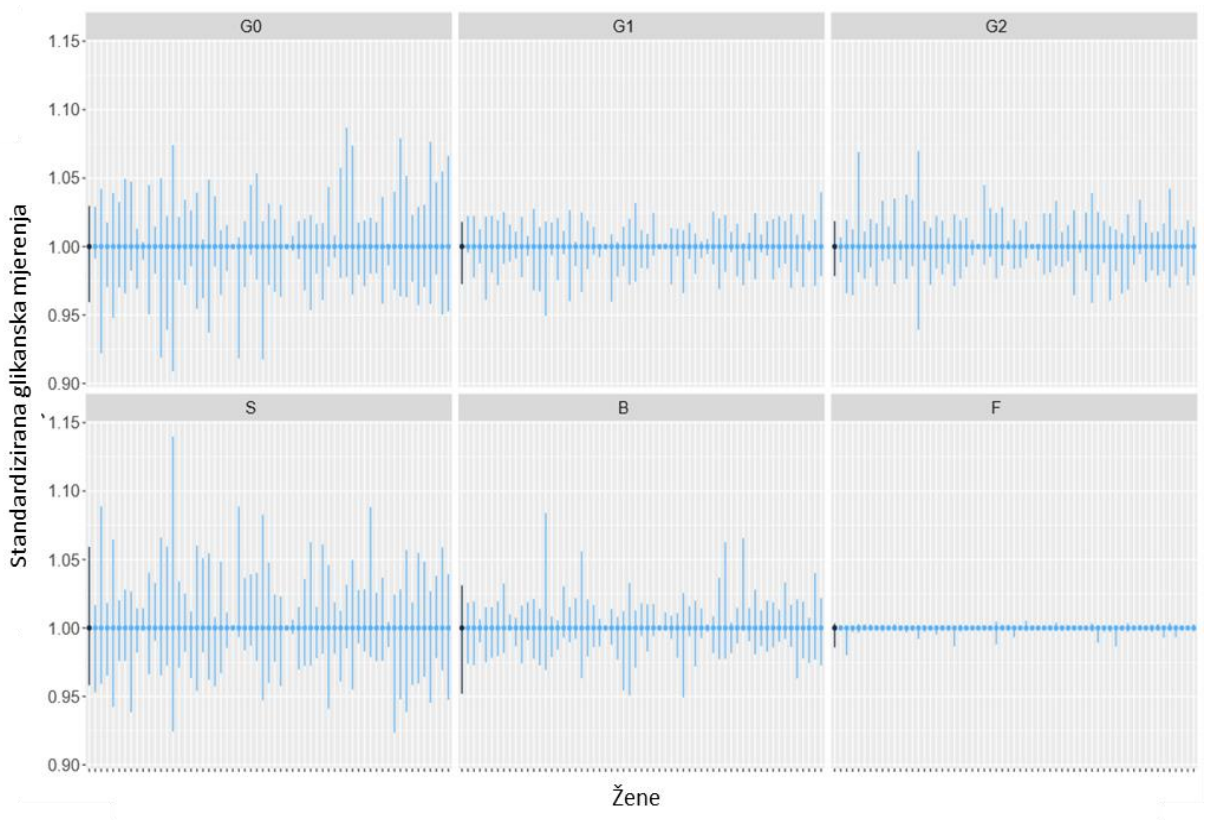
Glikanski pik (varijabla)	Standard	Uzorak	Omjer (%)	Glikanski pik (varijabla)	Standard	Uzorak	Omjer (%)
GP1	0.01861	0.00885	210	GP13	0.00567	0.0065	**87**
GP2	0.00938	0.00756	124	GP14	0.00007	0.00022	**32**
GP3	0.00919	0.01186	77	GP15	0.00065	0.00059	110
GP4	0.00019	0.00038	50	GP16	0.00018	0.0005	**36**
GP5	0.06191	0.04149	149	GP17	0.00319	0.00118	270
GP6	0.0003	0.00086	35	GP18	0.00027	0.00058	**47**
GP7	0.00602	0.00543	111	GP19	0.0024	0.00146	164
GP8	0.00012	0.00017	71	GP20	0.01086	0.01977	**55**
GP9	0.00029	0.00055	53	GP21	0.00599	0.00714	**84**
GP10	0.00008	0.00019	42	GP22	0.02226	0.01479	151
GP11	0.00318	0.00508	63	GP23	0.00186	0.00231	**81**
GP12	0.00237	0.00168	141	GP24	0.00299	0.00191	157

Podebljani su glikanski pikovi za koje je utvrđena biološka varijabilnost tijekom 3-mjesečnog trajanja studije. Strukture N-glikana u glikanskim pikovima prikazane su na slici 14. Standard – srednja vrijednost varijacije uzorka poznatog glikanskog profila na svim pločicama za svaki od 24 glikanska pika molekule IgG, Uzorak – srednja vrijednost varijacije uzoraka svih žena iz studije za svaki od 24 glikanska pika molekule IgG.

4.5 Varijabilnost izvedenih glikanskih svojstava imunoglobulina G na razini osobe

Nakon što je određena biološka varijabilnost pojedinačnih glikana protutijela IgG, na isti je način određena i varijabilnost glikanskih svojstava koja grupiraju N-glikane sličnih strukturnih osobina, poput glikana s jednom, dvije ili bez galaktoze, zatim glikane sa sijalinskom kiselinom, račvajućim GlcNAc i sržno vezanom fukozom, prvo za svaku osobu zasebno, a zatim i na razini kohorte.

Opseg promjena glikozilacijskih svojstava unutar jedne osobe bio je najizraženiji za sijalinizirane (najveća razlika između najniže i najviše vrijednosti približno 21%) i agalaktozilirane (najveća razlika između najniže i najviše vrijednosti približno 16%) N-glikane, dok su fukozilirani N-glikani imali najmanju intra-individualnu varijaciju (najveća razlika između najniže i najviše vrijednosti manja od 3%) tijekom menstruacijskih ciklusa (Slika 15).



Slika 15: Varijabilnost glikanskih svojstava N-glikana molekule IgG za svaku ženu. Plave okomite linije predstavljaju opseg varijabilnosti definiran najnižom i najvišom razinom agalaktoziliranih (G0), monogalaktoziliranih (G1), digalaktoziliranih (G2), sijaliniziranih (S) i fukoziliranih (F) glikana, te glikana s račvajućim GlcNAc (B) u ukupnom N-glikomu molekule IgG za svaku ženu tijekom 12 tjedana trajanja studije. Crne okomite linije predstavljaju opseg varijabilnosti istih glikanskih svojstava u uzorku poznatog glikanskog profila (standard) na svim pločicama.

4.6 Varijabilnost izvedenih glikanskih svojstava imunoglobulina G u kohorti

Varijabilnost glikanskih svojstava molekule IgG zatim je određena i na razini kohorte. Za analiziranu kohortu ispitanica izračunate su srednje vrijednosti, medijani, vrijednost prvog i trećeg kvartila, te minimalne i maksimalne vrijednosti izvedenih glikanskih svojstava IgG svih uzoraka. Razina pojedinih glikanskih svojstava dana je u tablici 5.

Analiza pokazuje da se razina agalaktozilacije N-glikana molekule IgG svih uzoraka Kineskinja etničke skupine Han u ovoj studiji kreće od 11.3% do 34.6%, monogalaktozilacije od 25% do 37.2%, digalaktozilacije od 15.6% do 30.2%, sijalinizacije do 16.1% do 33%, račvajućeg GlcNAc od 9.2% do 17.1%, te fukozilacije od 93.2% do 97.5%. Varijabilnost glikanskog svojstva definirana je rasponom vrijednosti prvog kvartila (Q1) i trećeg kvartila (Q3). U analiziranoj kohorti ispitanica otkrivena su značajna odstupanja u razini svih izvedenih glikanskih svojstava u usporedbi s vrijednostima izvedenih glikanskih svojstava u kontrolnim uzorcima standarda. Iz rezulatata je vidljivo da su fukozilacija i monogalaktozilacija imale najmanju varijabilnost unutar ispitivane grupe, dok je najvarijabilnije bilo glikansko svojstvo povezano s razinom agalaktozilacije molekule IgG.

Tablica 5: Raspon razine izvedenih glikanskih svojstava N-glikana molekule IgG u uzorcima plazme (n=776) grupe ispitanica (n=70) i kontrolnim uzorcima (n=56) standarda.

Glikansko svojstvo IgG (% površine)	GRUPA ISPITANICA						KONTROLNI UZORAK					
	Min.	Q1	Srednja vrijednost	Medijan	Q3	Maks.	Min.	Q1	Srednja vrijednost	Medijan	Q3	Maks.
G0	11,3	15,8	19,3	19,4	22,0	34,6	21,1	21,7	22,0	22,0	22,2	22,6
G1	25	31,0	32,2	32,6	33,6	37,2	37	38,0	38,2	38,2	38,4	38,9
G2	15,6	21,8	24,0	23,8	26,2	30,2	18,7	19,0	19,1	19,1	19,2	19,5
S	16,1	22,1	24,3	24,0	26,1	33,0	19,6	20,2	20,5	20,6	21,1	21,6
B	9,2	12,2	13,5	13,7	14,8	17,1	15,6	16,3	16,4	16,4	16,5	16,9
F	93,2	95,2	96,0	96,0	96,5	97,5	95,6	97,2	97,3	97,2	97,3	97,6

Prikazan je relativni udio galaktozilacije (G0 – agalaktozilacija, G1 – monogalaktozilacija i G2 – digalaktozilacija), sijalinizacije (S), račvajućeg GlcNAc (B) i fukozilacije (F) molekule IgG u ukupnoj integriranoj površini svih glikanskih svojstava. Q1 – prvi kvartil (25. percentila), Q3 – treći kvartil (75. percentila). Uzorak poznatog glikanskog profila (standard) korišten je kao kontrola tehničke varijabilnosti korištene metode.

4.7 Menstruacijski ciklusi ispitanica

Informacije o menstruacijskim ciklusima ispitanice su prijavljivale putem upitnika pri svakom vađenju krvi (u prilogu). Prikupljeni podatci korišteni su za izračun duljine trajanja menstruacijskih ciklusa tijekom studije. Opis menstruacijskih ciklusa ispitanica tijekom studije dan je u tablici 6.

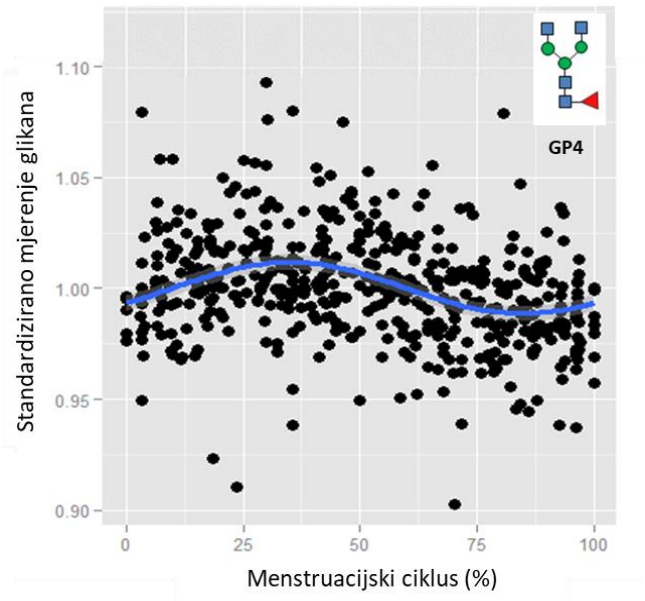
Tablica 6: Menstruacijski ciklusi ispitanica uključenih u studiju.

	Broj ispitanica (N)	Uzorci plazme (broj)	Menstruacijski ciklusi (broj)	Trajanje menstruacijskog ciklusa (dani)		Menstruacijski ciklusi po osobi (broj)	Uzorci plazme po menstruacijskom ciklusu (broj)
				Min	Max		
Analizirano	70	774	208	31.3 ± 6.8 20	72	3	4
Izdvojeno za statističku obradu	60 (85.6%)	500 (65%)	140 (67.3%)	30 ± 4 26	34	2	4

Iako su sve žene do uključivanja u studiju izjavile da imaju redovite i normalne menstruacijske cikluse, naši rezultati otkrili su određena odstupanja. Najizraženija odstupanja primijećena su vezano uz duljinu trajanja menstruacijskih ciklusa. Tijekom studije, najkraći menstruacijski ciklus bio je svega 20 dana, dok je najdulji trajao čak 72 dana. Unatoč velikoj razlici u duljini menstruacijskih ciklusa, provedena analiza pokazala je da 86% žena ima normalne menstruacijske cikluse u trajanju između 26 i 34 dana s prosječnom duljinom trajanja od 30 dana. Za statističku obradu odabrano je 140 normalnih menstruacijskih ciklusa – oko 70% od ukupnog broja zabilježenih menstruacijskih ciklusa, u kojima je prikupljeno 500 uzoraka plazme od 60 žena.

4.8 Razvoj modela menstruacijskog ciklusa

Kako bi se provele daljnje statističke analize, podatci iz odabranih 140 menstruacijskih ciklusa grupirani su unutar zajedničkog modela menstruacijskog ciklusa (Slika 16). S obzirom da odabrani menstruacijski ciklusi imaju različitu duljinu trajanja (od 26 do 34 dana), bilo ih je potrebno normalizirati. Normalizacija menstruacijskih ciklusa izvedena je tako da je duljina trajanja svakog menstruacijskog ciklusa normalizirana na 100% neovisno o trajanju svakog pojedinačnog menstruacijskog ciklusa. Na taj su se način glikanski podatci i podatci o koncentracijama spolnih hormona izmjereni u raznim vremenskim točkama pojedinačnih menstruacijskih ciklusa mogli jednostavno pozicionirati unutar zajedničkog modela menstruacijskog ciklusa i omogućiti potrebne statističke analize.

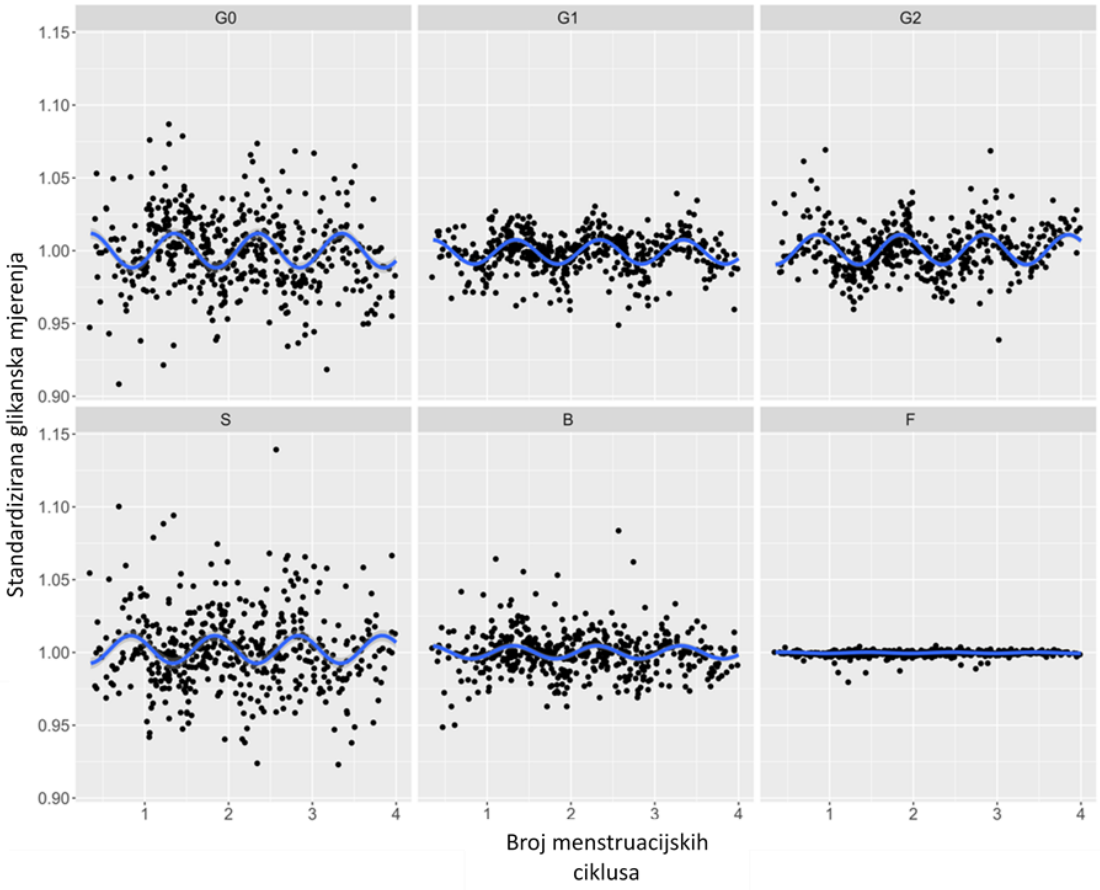


Slika 16: Model menstruacijskog ciklusa. Ogledni primjer primjene modela menstruacijskog ciklusa u određivanju dinamike glavne glikanske strukture u sastavu jednog od glikanskih pikova (GP4) HILIC-UPLC kromatograma N-glikoma molekule IgG tijekom menstruacijskog ciklusa. N(uzoraka)=500. Glikanska mjerenja standardizirana su dijeljenjem svakog mjerenja s njegovom prosječnom vrijednosti, što omogućava usporedbu varijabilnosti istog glikana IgG među ispitanicama. Duljina menstruacijskog ciklusa je normalizirana na 100%.

4.9 Varijabilnost N-glikozilacije imunoglobulina G tijekom menstruacijskog ciklusa

Jedan od glavnih ciljeva ove studije bio je utvrditi dolazi li do promjene glikanskog profila molekule IgG tijekom menstruacijskog ciklusa i postoji li povezanost razine glikanskih svojstava s koncentracijom spolnih hormona. Glikanski podatci iz 140 odabranih menstruacijskih ciklusa analizirani su u zajedničkom modelu menstruacijskog ciklusa.

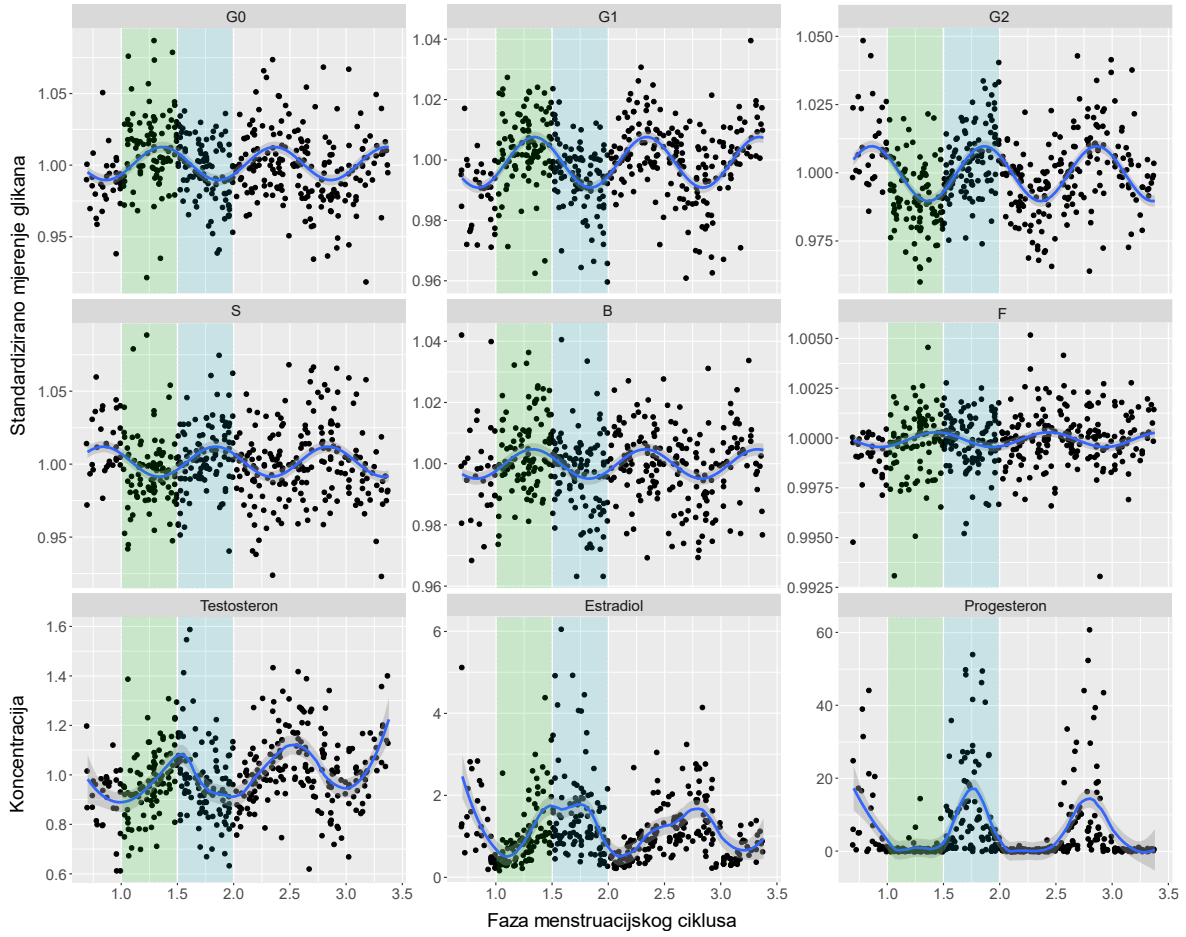
Provedenom analizom longitudinalnih glikanskih mjerenja na razini čitave kohorte ispitanica otkrivena je periodična ciklička dinamika promjene agalaktoziliranih, monogalaktoziliranih, digalaktoziliranih, sijaliniziranih i N-glikana s račvajućim GlcNAc u ukupnom N-glikomu molekule IgG, dok je razina fukoziliranih N-glikana tijekom menstruacijskog ciklusa ostala nepromijenjena (Slika 17).



Slika 17: Dinamika N-glikozilacije molekule IgG tijekom menstracijskih ciklusa. Plava krivulja opisuje promjenu razine šest izvedenih glikanskih svojstava molekule IgG – agalaktozilacije (G0), monogalaktozilacije (G1), digalaktozilacije (G2), sijalinizacije (S), račvajućeg GlcNAc (B) i sržne fukoze (F) kroz nekoliko uzastopnih menstruacijskih ciklusa. Glikanska mjerenja standardizirana su dijeljenjem svakog mjerenja s njegovom prosječnom vrijednosti što omogućava usporedbu varijabilnosti izvedenih glikanskih svojstava molekule IgG među ženama. Svaka točka predstavlja jedan uzorak. N(uzoraka)=500.

4.10 Odnos N-glikozilacije imunoglobulina G i različitih faza menstruacijskog ciklusa

Budući da je utvrđeno da se N-glikozilacija molekule IgG mijenja tijekom menstruacijskog ciklusa, utvrđene su i detaljno opisane promjene u sastavu N-glikana. Analizom dinamike N-glikozilacijskih profila utvrđena su dva obrasca s obzirom na smjer i opseg promjena glikanskih svojstava molekule IgG u pojedinim fazama menstruacijskog ciklusa (Slika 18). Iz rezultata je vidljivo da prva grupa glikana, u koju spadaju digalaktozilirani i sijalinizirani N-glikani, ima jedinstven obrazac promjena i doseže najveću razinu u luteinskoj fazi menstruacijskog ciklusa, dok grupa glikana koju čine agalaktozilirani, monogalaktozilirani i N-glikani s račvajućim GlcNAc ima obrazac promjena koji je suprotan opisanim promjenama u prethodnoj grupi glikana, i doseže najveću razinu u folikularnoj fazi menstruacijskog ciklusa.



Slika 18: Dinamika spolnih hormona i N-glikozilacije molekule IgG u menstruacijskom ciklusu. Plava krivulja opisuje varijabilnost izvedenih glikanskih svojstava molekule IgG – agalaktozilacija (G0), monogalaktozilacija (G1), digalaktozilacija (G2), sijalinizacija (S), prisutnost račvajućeg GlcNAc (B) i sržne fukoze (F), i koncentracije triju spolnih hormona – estradiola (E2; pmol/L), progesterona (P; nmol/L), i testosterona (T; nmol/L) kroz nekoliko uzastopnih menstruacijskih ciklusa. Menstruacijski ciklus je podijeljen na dva jednaka dijela: folikularnu (zelena) i luteinsku (plava) fazu. Analiza povezanosti izvedenih glikanskih svojstava s koncentracijom spolnih hormona nalazi se u tablici 6. Glikanska mjerenja standardizirana su dijeljenjem svakog mjerenja s njegovom prosječnom vrijednosti što omogućava usporedbu varijabilnosti izvedenih glikanskih svojstava molekule IgG među ženama. Svaka točka predstavlja jedan uzorak. N(uzoraka)=500.

4.11 Odnos N-glikozilacije imunoglobulina G i spolnih hormona u menstruacijskom ciklusu

Budući da je ustanovljeno da se u određenim fazama menstruacijskog ciklusa događaju uvijek iste promjene glikanskih svojstava, bilo je potrebno ispitati jesu li otkrivene promjene u N-glikozilaciji IgG povezane s promjenom koncentracije spolnih hormona tijekom menstruacijskog ciklusa. Dan menstruacijskog ciklusa u kojem su zabilježene najveće vrijednosti (pik) glikanskih svojstava molekule IgG i spolnih hormona dani su u tablici 7.

Tablica 7: Odnos između najveće koncentracije (pik) spolnih hormona i najveće razine (pik) izvedenih glikanskih svojstava imunoglobulina G u menstruacijskom ciklusu.

Spolni hormoni	Pik (%MC)	Dan MC	Glikanska svojstva IgG	Pik (%MC)	Dan MC	Vremenski pomak (dani)		
						T	E2	P
Testosteron (T)	55	16.	**G0**	35	10.	24	27	15
Estradiol (E2)	45	13.	**G1**	35	10.	24	27	15
Progesteron (P)	82	25.	**G2**	85	25.	9	12	/
			S	84	25.	9	12	/
			B	31	9.	23	26	14
			F	47	14.	/	/	29

Dan menstruacijskog ciklusa u kojem je zabilježena najveća srednja vrijednost spolnih hormona i izvedenih glikanskih svojstava molekule IgG te njihov međusobni vremenski pomak u menstruacijskom ciklusu izračunati su prema navedenim formulama u odjeljku 3.4.3 Obrada i analiza podataka.

Iz rezultata je vidljivo da je najveća razina digalaktozilacije i sijalinizacije molekule IgG u približno 25. danu luteinske faze, što je vremenski pomak od 12 dana nakon najviše koncentracije estradiola u približno 13. danu folikularne faze menstruacijskog ciklusa, a istovremeno s najvišom koncentracijom progesterona u luteinskoj fazi menstruacijskog ciklusa. Nadalje, najveća razina digalaktozilacije i sijalinizacije događa se 9 dana nakon najviše koncentracije testosterona, koja je u približno 16. danu menstruacijskog ciklusa (Tablica 7, Slika 18). S druge strane, najveća zastupljenost agalaktoziliranih, monogalaktoziliranih i N-glikana s račvajućim GlcNAc na protutijelu IgG nije pokazala podudarnost s niti jednom od točaka za koje su primijećene najveće koncentracije spolnih hormona tijekom menstruacijskog ciklusa. Umjesto toga, razina račvajućeg GlcNAc doseže svoj maksimum približno 9. dana menstruacijskog ciklusa, dok je razina agalaktozilacije i monogalaktozilacije N-glikana najveća oko 10. dana folikularne faze menstruacijskog ciklusa.

Budući da je otkrivena neusklađenost dinamike spolnih hormona i glikanskih svojstava protutijela IgG u menstruacijskom ciklusu, bilo je potrebno ispitati može li se pronaći veza između ovih vremenski pomaknutih događaja. Analiza povezanosti glikanskih svojstava molekule IgG s razinom spolnih hormona u menstruacijskom ciklusu dana je u tablici 8.

Tablica 8: Povezanost koncentracije spolnih hormona s dinamikom promjene N-glikozilacije molekule IgG u menstruacijskom ciklusu.

Izvedeno glikansko svojstvo IgG	Hormon	Pik glikanskog svojstva IgG (%MC)	Pik hormona (%MC)	Povezanost hormona s razinom glikanskog svojstva IgG	*p* vrijednost	Kor. *p* vrijednost[a]
G0	Testosteron	35	55	Pozitivni	**0.002**	**0.003**
	Estradiol	35	45	Pozitivni	0.211	0.253
	Progesteron	35	82	Negativni	**1.662×10^{-6}**	**9.972×10^{-6}**
G1	Testosteron	35	55	Pozitivni	**0.001**	**0.002**
	Estradiol	35	45	Negativni	**0.001**	**0.002**
	Progesteron	35	82	Negativni	**2.962×10^{-11}**	**2.665×10^{-10}**
G2	Testosteron	85	55	Negativni	**1.421×10^{-4}**	**5.116×10^{-4}**
	Estradiol	85	45	Pozitivni	0.074	0.095
	Progesteron	85	82	Pozitivni	**1.505×10^{-15}**	**2.708×10^{-14}**
S	Testosteron	84	55	Negativni	**0.016**	**0.024**
	Estradiol	84	45	Pozitivni	**0.032**	**0.045**
	Progesteron	84	82	Pozitivni	**4.404×10^{-4}**	**0.001**
B	Testosteron	31	55	Pozitivni	0.529	0.56
	Estradiol	31	45	Negativni	**0.002**	**0.004**
	Progesteron	31	82	Negativni	**2.595×10^{-5}**	**1.168×10^{-4}**
F	Testosteron	47	55	Pozitivni	**0.013**	**0.021**
	Estradiol	47	45	Pozitivni	0.285	0.32
	Progesteron	47	82	Negativni	0.784	0.784

Pik glikanskog svojstva molekule IgG – vremenska točka u fazi menstruacijskog ciklusa izražena u postotcima (%) u kojoj je primijećena najveća razina N-glikana sličnih strukturnih osobina tj. analiziranog glikanskog svojstva.
Pik hormona – vremenska točka u fazi menstruacijskog ciklusa izražena u postotcima (%) u kojoj je primijećena najveća koncentracija analiziranog spolnog hormona.
p vrijednosti opisuju statističku značajnost povezanosti koncentracije pojedinog hormona s razinom glikanskog svojstva u menstruacijskom ciklusu. [a]*p* vrijednosti su korigirane (engl. *adjusted*) na višestruko testiranje Benjamini-Hochberg metodom. Statistički značajnima smatrane su korigirane *p* vrijednosti manje od 0.05 (označene podebljano). Duljina trajanja jednog menstruacijskog ciklusa je 100%. Folikularna faza – 0% do 50% menstruacijskog ciklusa, luteinska faza – 50% do 100% menstruacijskog ciklusa.
MC – menstruacijski ciklus, G0 – agalaktozilirani N-glikani, G1 – monogalaktozilirani N-glikani, G2 – digalaktozilirani N-glikani, S – sijalinizirani N-glikani, B – N-glikani s račvajućim GlcNAc, F – sržno fukozilirani N-glikani.

Rezultati pokazuju kako su sva svojstva koja opisuju N-glikozilaciju ovog protutijela statistički značajno povezana s koncentracijom estradiola, progesterona i testosterona u menstruacijskom ciklusu. Analiza pokazuje da je visoka koncentracija estradiola povezana s povećanjem sijalinizacije, dok progesteron, uz sijalinizaciju, pokazuje povezanost i s povećanjem razine digalaktozilacije N-glikana molekule IgG u menstruacijskom ciklusu. Također, estradiol i progesteron pokazuju negativnu povezanost s N-glikanima koji sadrže račvajući GlcNAc ili jednu galaktozu, dok progesteron dodatno pokazuje negativnu povezanosti i sa razinom agalaktozilacije protutijela IgG.

S druge strane, testosteron pokazuje negativnu povezanost s razinom digalaktozilacije i sijalinizacije N-glikana, ali je povezan s povećanjem agalaktozilacije, monogalaktozilacije i fukozilacije molekule IgG tijekom menstruacijskog ciklusa. Također, testosteron nije povezan s razinom račvajućeg GlcNac, dok za estradiol i progesteron nije uočena povezanost s razinom fukozilacije ovog protutijela tijekom menstruacijskog ciklusa.

4.12 Utjecaj menstruacijskog ciklusa na N-glikozilaciju IgG na razini kohorte

S obzirom na otkrivene promjene glikanskih svojstava molekule IgG tijekom menstruacijskog ciklusa i njihovu povezanost s koncentracijom spolnih hormona bilo je potrebno ispitati koliki je opseg tih promjena tijekom menstruacijskog ciklusa u čitavoj kohorti. Opseg varijabilnosti izvedenih glikanskih svojstava protutijela IgG tijekom menstruacijskog ciklusa svih ispitanica dan je u tablici 9.

Iz rezultata je vidljivo da se prosječna varijabilnost praćenih glikanskih svojstava molekule IgG koja je povezana s fazom menstruacijskog ciklusa na razini kohorte kreće do 1.1% (Slika 18). Glikanska svojstva sa strukturnim osobinama povezanima s galaktozilacijom i sijalinizacijom najviše su se mijenjala tijekom menstruacijskog ciklusa – varijabilnost agalaktozilacije bila je 1.1%, a digalaktozilacije i sijalinizacije 1.0%. Umjereno promjenjivi bili su N-glikani s jednom galaktozom – monogalaktozilacija 0.8%, a N-glikani s račvajućim GlcNAc 0.5%, dok se razina fukozilacije nije ciklički mijenjala tijekom menstruacijskog ciklusa.

U ovoj studiji je također određeno koliki je doprinos faze menstruacijskog ciklusa ukupnoj varijabilnosti N-glikozilacije molekule IgG među svim prikupljenim uzorcima. Detaljne analize pokazuju da menstruacijski ciklus može objasniti od najmanje 0.06% varijabilnosti razine N-glikana s račvajućim GlcNAc (p=0.01) do najviše 0.72% varijabilnosti razine monogalaktoziliranih N-glikana (p=3.36 x 10^{-22}). Za usporedbu, razlike u N-glikozilaciji molekule IgG među ispitanicama mogu objasniti visokih 86% varijabilnosti razine račvajućeg GlcNAc, dok se razina agalaktozilacije između dviju ispitanica iz istog razloga može razlikovati za čak 98%. Rezultati stoga pokazuju da promjene N-glikozilacije protutijela IgG koje nastaju zbog samog menstruacijskog ciklusa čine manje od 0.8% varijabilnosti razine bilo kojeg glikanskog svojstava u ispitivanoj grupi žena.

Tablica 9: Povezanost menstruacijskog ciklusa i varijabilnosti N-glikozilacije IgG.

Izvedeno glikansko svojstvo IgG	Pik glikanskog svojstva IgG (%MC)	Varijabilnost glikanskog svojstva (%)	(SD)	OsobaVar (%)	MCVar (%)	*p* vrijednost	Kor. *p* vrijednost[a]
G0	35	1.1	0.05	98	0.12	**4.15×10^{-9}**	**8.30×10^{-9}**
G1	35	0.8	0.12	92	0.72	**1.12×10^{-22}**	**3.36×10^{-22}**
G2	85	1.0	0.08	99	0.30	**4.15×10^{-25}**	**2.49×10^{-24}**
S	84	1.0	0.07	90	0.26	**2.79×10^{-6}**	**4.19×10^{-6}**
B	31	0.5	0.04	86	0.06	**0.01**	**0.01**
F	47	0.0	0.05	93	0.10	0.09	0.09

Pik glikanskog svojstva molekule IgG – vremenska točka u fazi menstruacijskog ciklusa izražena u postotcima (%) u kojoj je primijećena najveća razina N-glikana sličnih strukturnih osobina tj. analiziranog glikanskog svojstva. Varijabilnost glikanskog svojstva – varijabilnost razine izvedenih glikanskih svojstava tijekom menstruacijskog ciklusa izražena u postotcima (%) i standardnim devijacijama (SD). Varijabilnost je izračunata kao razlika standardizirane srednje vrijednosti najveće razine i standardizirane srednje vrijednosti svih mjerenja analiziranog glikanskog svojstva IgG.
OsobaVar – varijabilnost glikanskog svojstva koja proizlazi iz razlika u N-glikozilaciji molekule IgG između osoba.
MCVar – varijabilnost glikanskog svojstva IgG koja se može objasniti fazom menstruacijskog ciklusa.
p vrijednosti opisuju statističku značajnost varijabilnosti glikanskih svojstava tijekom menstruacijskog ciklusa. [a]*p* vrijednosti su korigirane (engl. *adjusted*) na višestruko testiranje Benjamini-Hochberg metodom. Statistički značajnima smatrane su korigirane *p* vrijednosti manje od 0.05 (označene podebljano).
Duljina trajanja jednog menstruacijskog ciklusa je 100%, folikularna faza – 0% do 50% trajanja menstruacijskog ciklusa, luteinska faza – 50% do 100% trajanja menstruacijskog ciklusa.
MC – menstruacijski ciklus, SD – standardna devijacija, Var – varijabilnost, G0 – agalaktozilirani N-glikani, G1 – monogalaktozilirani N-glikani, G2 – digalaktozilirani N-glikani, S – sijalinizirani N-glikani, B – N-glikani s račvajućim GlcNAc, F – sržno fukozilirani N-glikani.

5 RASPRAVA

U sklopu ovog doktorskog rada provedena su istraživanja u kojima su metodom tekućinske kromatografije ultravisoke učinkovitosti analizirani N-glikozilacijski profili protutijela IgG i određena je koncentracija spolnih hormona estradiola, progesterona i testosterona metodom kemiluminiscencije u 776 uzoraka krvne plazme 70 zdravih žena s normalnim menstruacijskim ciklusima. Uzorci su sakupljani tijekom 12 tjedana u pravilnim razmacima od 7 dana i neovisno o fazi menstrucijskog ciklusa pojedine žene. Analiza provedena na svim uzorcima u ispitivanoj grupi žena pokazala je da se sastav N-glikana protutijela IgG periodički ciklički mijenja s obzirom na fazu menstruacijskog ciklusa i povezan je s koncentracijom ženskih spolnih hormona. Povećanje razine digalaktoziliranih i sijaliniziranih N-glikana u luteinskoj fazi ciklusa povezano je s povećanom koncentracijom estradiola i progesterona, dok je povećanje razine agalaktoziliranih i monogalaktoziliranih N-glikana u folikularnoj fazi ciklusa povezano s povećanom koncentracijom testosterona. Iako su primijećene promjene N-glikozilacije molekule IgG na razini kohorte bile male, do 1.1%, glikanska svojstva povezana s galaktozilacijom i sijalinizacijom ovog protutijela imale su najveću varijabilnost i na razini svih uzoraka unutar ispitivane grupe žena i unutar jedne osobe.

Mnoga istraživanja su dosad pokazala važnost spolnih hormona, posebice estrogena, za biološku ulogu protutijela IgG u ženskom imunitetu (Khan i Ansar Ahmed, 2015.). Iako je sastav N-glikana vrlo važan za njegovu funkciju, još uvijek nije potpuno jasno koji sve faktori i na kojim mehanizmima reguliraju N-glikozilaciju ovog protutijela (Taniguchi i sur., 2015; Klarić i sur., 2020.). Pokazano je da N-glikozilacija služi za precizno podešavanje interakcija između IgG molekula i raznih Fc receptora te drugih liganada (Nimmerjahn i Ravetch, 2008.), te i najmanje promjene u sastavu N-glikana protutijela IgG imaju direktan učinak na imunosni odgovor kroz upalne procese koji su dio normalnog obrambenog mehanizma tijela, a njegov poremećaj povezan je s raznim patološkim stanjima (Seeling i sur., 2017.). Stoga je od iznimne je važnosti temeljito istražiti povezanost spolnih hormona i N-glikozilacije molekule IgG u zdravih žena, čime bi se stvorila baza za sva buduća istraživanja N-glikana tog protutijela te bi se omogućio bolji uvid u nastanak određenih patoloških stanja i razjasnio njihov utjecaj na imunosni sustav žena.

U mnogim istraživanjima uočene su razlike u N-glikozilaciji molekule IgG među ljudima. Procjenjuje se da je prosječna nasljednost N-glikoma molekule IgG oko 55% (Pučić i sur., 2011.), što bi značilo da geni samo djelomično određuju sastav N-glikana ovog protutijela neke osobe, dok preostale razlike među ljudima nastaju pod utjecajem raznih okolišnih

čimbenika (Zoldoš i sur., 2010., 2013.). Razlike u sastavu N-glikana molekule IgG među ljudima povezuju se s kronološkom dobi osobe (Krištić i sur., 2014.), različitim bolestima i upalnim procesima u organizmu (Plomp i sur., 2017.). Ono što dodatno komplicira razumijevanje procesa kojima nastaju raznovrsni glikanski obrasci je i moguć utjecaj spolnih hormona na N-glikozilaciju protutijela IgG (Ercan i sur., 2017.).

U ovom istraživanju je po prvi puta analizirana varijabilnost N-glikana molekule IgG s obzirom na fluktuaciju spolnih hormona u menstruacijskim ciklusima 70 zdravih žena u reproduktivnom razdoblju života korištenjem visokoprotočne tekućinske kromatografije. Longitudinalno praćenje glikanskih profila trajalo je tri mjeseca i obuhvaćalo je nekoliko uzastopnih menstruacijskih ciklusa tijekom kojih su otkrivene promjene N-glikozilacije ovog protutijela u plazmi žena. Biološka varijabilnost pojedinačnih glikana na razini svih uzoraka svih žena u istraženoj kohorti utvrđena je za najveće glikanske pikove koji zajedno čine 84% svih detektiranih glikanskih struktura molekule IgG (Pučić i sur., 2011.). Iz toga je vidljivo da se razina gotovo svih N-glikana ovog protutijela mijenja tijekom ženskog menstruacijskog ciklusa.

Radi boljeg razumijevanja biološkog značenja otkrivenih promjena, N-glikani molekule IgG sa sličnim strukturnim osobinama grupirani su u šest glikanskih svojstava. U nedavno objavljenom istraživanju koje je uključivalo 24 različite etničke grupe diljem svijeta, utvrđene su razlike N-glikozilacije molekule IgG među analiziranim populacijama koje se mogu objasniti podrijetlom ispitanika (Štambuk i sur., 2020.). Analiza pokazuje da raspon agalaktozilacije, monogalaktozilacije, digalaktozilacije, sijalinizacije, račvajućeg GlcNAc i fukozilacije u grupi Kineskinja koja je ispitivana u sklopu ovog doktorskog rada, ne pokazuje značajna odstupanja od prethodno utvrđenih raspona vrijednosti za ta ista glikanska svojstva u populaciji etničke grupe Han (Štambuk i sur., 2020.).

Zbog specifičnosti analize struktura N-glikana i cikličke prirode menstruacijskog ciklusa, daljnja obrada podataka nije se mogla provesti na već poznat i uobičajen način te je bilo potrebno razviti potpuno novu metodu analize. U tu je svrhu razvijen model „zajedničkog menstruacijskog ciklusa“. Analizom longitudinalnih mjerenja N-glikana, u modelu su otkrivene periodične cikličke promjene N-glikozilacije molekule IgG tijekom menstruacijskog ciklusa koje potječu od varijacija koje su zabilježene za gotovo sva izvedena glikanska svojstva praćena u studiji. Na razini kohorte, najveću varijabilnost imala su svojstva povezana s galaktozilacijom i sijalinizacijom molekule IgG. Rezultati su pokazali da se prosječna varijabilnost razine

agalaktoziliranih, digalaktoziliranih i sijaliniziranih N-glikana kreće oko 1%, umjereno promjenjiva razina zabilježena je za monogalaktozilirane i N-glikane s račvajućim GlcNAc uz prosječnu varijabilnost između 0.8% i 0.5%, dok razina fukoziliranih N-glikana nije pokazivala cikličke promjene tijekom menstruacijskog ciklusa.

U tom kontekstu, dan menstruacijskog ciklusa pokazao se kao važan faktor za procjenu varijabilnosti N-glikozilacije protutijela IgG u žena tijekom reproduktivnog razdoblja života (Ahmad i sur., 2002.). Doista, rezultati ove studije potvrđuju kako se najveća razina pojedinih glikanskih svojstava molekule IgG može povezati s određenom fazom menstruacijskog ciklusa. Pokazano je da razina agalaktoziliranih, monogalaktoziliranih i N-glikana s račvajućim GlcNAc doseže najveću vrijednost u folikularnoj fazi, dok se nakon ovulacije glikanski profil mijenja te dolazi do povećanja razine digalaktoziliranih i sijaliniziranih N-glikana koji imaju najveću vrijednost u luteinskoj fazi menstruacijskog ciklusa. Dobiveni rezultati jasno pokazuju da u prvom dijelu menstruacijskog ciklusa dominiraju glikanske strukture koje potiču upalnu funkciju protutijela IgG (Irvine i Alter, 2020.), dok se njihova razina u drugom dijelu menstruacijskog ciklusa smanjuje u korist glikanskih struktura koje omogućavaju njegovo protuupalno djelovanje (Kaneko i sur., 2006.; Karsten i sur., 2012.). Dobiveni rezultati su u skladu s prijašnjim istraživanjima u kojima je pokazano kako su promjene u ženskom imunitetu tijekom menstruacijskog ciklusa najvjerojatnije hormonski uvjetovane (Lee i sur., 2010.).

Jedino glikansko svojstvo za koje nije primijećena promjena tijekom menstruacijskog ciklusa je razina fukoziliranih N-glikana. Takvo otkriće nije iznenađujuće jer je poznato da fukozilacija humanog protutijela IgG ostaje stabilna tijekom odrasle dobi (Baković i sur., 2013.), dok su promjene najčešće povezane s razvojem raka i autoimunih bolesti (Martin i sur., 2018.; Vučković i sur., 2016.). Budući da su ispitanice bile zdrave žene kojima se zdravstveno stanje nije mijenjalo za vrijeme studije, a u dosadašnjim istraživanjima nije zabilježena povezanost promjene ukupne fukozilacije molekule IgG sa spolnim hormonima u zdravoj odrasloj populaciji žena, primijećena minimalna varijabilnost u razini fukozilacije tijekom menstruacijskog ciklusa je prema očekivanjima. Može se zaključiti da prethodne studije i naša nova otkrića zajedno podupiru pretpostavku da su promjene u humoralnom imunitetu tijekom menstruacijskog ciklusa sastavni dio mehanizama pomoću kojih fiziologija ženskog tijela balansira između reprodukcije i imuniteta, no ovo je prva studija koja je dala detaljnu karakterizaciju N-glikanskog profila molekule IgG i na taj način povezala njegovu biološku funkciju s fazom menstruacijskog ciklusa.

Uzimajući u obzir menstruacijski ciklus kao fiziološki proces tijekom kojeg se događaju sveobuhvatne promjene unutar mnogih sustava u tijelu žene, utvrđeno je da se menstruacijskim ciklusom može objasniti najviše 0.8% varijacija u N-glikozilaciji molekule IgG na razini svih uzoraka u ispitanoj kohorti žena. Ovakav rezultat je očekivan s obzirom na prethodno objavljene podatke u kojima je pokazano da spol objašnjava nešto manje od 1% varijacije u N-glikozilaciji Fc fragmenta ovog protutijela u populaciji (Štambuk i sur., 2020a.). Zbog dobro poznatog utjecaja dobi i spola osobe na strukturu N-glikana molekule IgG, prije svake statističke analize obavezna je korekcija svih glikanskih podataka na ove dvije varijable, što bi značilo da je korekcijom na spol kod žena obuhvaćena i korekcija utjecaja menstruacijskog ciklusa na promjenu glikanskog profila ovog protutijela. Zaključno, primijećeni trend pokazuje da N-glikozilacija ovog protutijela u žena ovisi o danu menstruacijskog ciklusa, ali je ovaj učinak manji od ukupnih razlika među spolovima na razini populacije, što znači da se prikupljanje i analiza krvnih uzoraka žena u studijama koje uključuju velik broj ispitanika može odvijati neovisno o fazi menstruacijskog ciklusa.

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je ispitati hipotezu o povezanosti koncentracije spolnih hormona s razinom glikanskih svojstava molekule IgG tijekom reproduktivnog razdoblja žene. Dosadašnja saznanja o utjecaju spolnih hormona na N-glikozilaciju ovog protutijela u žena temelje se na rezultatima epidemioloških studija koje su proučavale patološke mehanizme, ili u raznim bolestima (Hughes i Choubey, 2014.), ili tijekom normalnih fizioloških stanja poput trudnoće (Bondt i sur., 2013.) i menopauze (Engdahl i sur., 2018.), koji se mijenjaju s promjenom razine spolnih hormona. U nedavnom istraživanju na zdravim osobama otkriveno je da upravo estrogeni reguliraju N-glikozilaciju molekule IgG (Ercan i sur., 2017.), što se može povezati sa ublažavanjem simptoma autoimunih i upalnih bolesti (koje su povezane s poremećenom funkcijom protutijela IgG) tijekom trudnoće, kada je razina estrogena povećana, te ponovnom aktivacijom nakon poroda, kada se razina estrogena normalizira (Adams Waldorf i Nelson, 2008.). Promjene aktivnosti kroničnih i akutnih bolesti zabilježene su i tijekom različitih faza menstruacijskog ciklusa (Oertelt-Prigione, 2012.). Menstruacijski ciklus je stoga odabran kao izvrstan model za proučavanje povezanosti fiziološke razine tj. fluktuacije spolnih hormona i N-glikozilacije protutijela IgG te funkcije imunosustava zdravih žena u reproduktivnom razdoblju života.

Rezultati koji su predstavljeni u okviru ovog doktorskog rada ukazuju na veliku vjerojatnost da je ciklička priroda promjena N-glikozilacije molekule IgG povezana s

fluktuacijom spolnih hormona kroz menstruacijske cikluse. Stoga iznenađuje otkriće da se razdoblja menstruacijskog ciklusa u kojima je primijećen najveći udio N-glikana istih strukturnih osobina (pik izvedenih glikanskih svojstava) ne podudaraju s razdobljima najviših koncentracija spolnih hormona. Proizvodnja i N-glikozilacija molekula IgG potaknute su događajima koji utječu na imunosni sustav (Wuhrer i sur., 2015.), a prethode menstruacijskom ciklusu koji je u tijeku, kao na primjer promjena koncentracije ženskih spolnih hormona. Iako postoje studije o mogućem utjecaju spolnih hormona, posebice estrogena na sijalinizaciju i galaktozilaciju protutijela IgG (Engdahl i sur., 2018.; Ercan i sur., 2017.), usporedbom obrazaca dinamike spolnih hormona i glikanskih svojstava molekule IgG tijekom menstruacijskog ciklusa, otkriveno je da se točka menstruacijskog ciklusa u kojoj je primijećena najveća koncentracija estradiola ne poklapa s točkom menstruacijskog ciklusa u kojoj je prisutnost digalaktoziliranih i sijaliniziranih glikana najveća.

Učinak najveće koncentracije spolnih hormona tijekom menstruacijskog ciklusa na N-glikozilaciju molekule IgG vjerojatno je odgođen zbog relativno dugog poluživota IgG koji iznosi 21 dan (Irani i sur., 2015.), što bi značilo da je potrebno neko vrijeme da se „stare“ IgG glikoforme u cirkulaciji zamijene „novima“ kako bi učinak postao vidljiv. Dok estrogen postiže svoju najveću koncentraciju približno 13. dana folikularne faze, razina sijaliniziranih i digalaktoziliranih N-glikana je najveća sredinom luteinske faze i poklapa se s najvećom koncentracijom progesterona 25. dana menstruacijskog ciklusa. Nadalje, razina račvajućeg GlcNAc doseže najveću vrijednost 9. dana, a razina agalaktozilacije i monogalaktozilacije molekule IgG je najveća 10. dana folikularne faze menstruacijskog ciklusa. Ove analize pokazuju kako su promjene N-glikozilacije molekule IgG vidljive najranije 12 dana ili oko dva tjedna nakon promjene razine spolnih hormona u menstruacijskom ciklusu. Prema dobivenim rezultatima, obrazac “upalnih” G0 i N-glikana s račvajućim GlcNAc u folikularnoj fazi menstruacijskog ciklusa nastaje nakon luteinsko-folikularne faze, koja je prijelazna faza između dva menstruacijska ciklusa i za koju su karakteristične najniže razine proučavanih ženskih spolnih hormona (Reed i Carr, 2000.), dok obrazac “protuupalnih” G2 i S N-glikana u luteinskoj fazi menstruacijskog ciklusa nastaje uslijed razdoblja intenzivne proizvodnje spolnih hormona u jajnicima koja započinje proizvodnjom estrogena u folikularnoj fazi menstruacijskog ciklusa. To znači da je broj molekula IgG s povećanim udjelom galaktoziliranih i sijaliniziranih N-glikana u porastu već u luteinskoj fazi menstruacijskog ciklusa, te u slučaju oplodnje jajne stanice samo nastavlja rasti kroz trudnoću tijekom koje su protutijela sa smanjenim upalnim

svojstvima neophodna za uspostavljanje imunotolerancije majke, čime se omogućuje uspješan rast i razvoj fetusa (Farage i sur., 2009.).

Analiza povezanosti koncentracije pojedinačnih spolnih hormona u krvnoj plazmi i razine N-glikana molekule IgG pokazala je kako su estradiol i progesteron povezani s protuupalnim digalaktoziliranim i sijaliniziranim, a testosteron je povezan s proupalnim agalaktoziliranim glikoformama ovog protutijela tijekom menstruacijskog ciklusa. Otkriće kako je estradiol povezan s povećanom razinom sijalinizacije protutijela IgG u menstruacijskom ciklusu još jednom potvrđuje rezultate dosadašnjih istraživanja o utjecaju estrogena na N-glikozilaciju ovog proteina, ističući njegovu ulogu aktivatora transkripcije gena za β-galaktozamid α-2,6-sijaliltransferazu 1 (engl. *β-galactoside α-2,6-sialyltransferase 1*, ST6GAL1), glavnu glikoziltransferazu za dodavanje sijalinske kiseline na N-glikane molekule IgG u B limfocitima (Engdahl i sur., 2018.). No, odnedavno je poznat i alternativni način sijalinizacije N-glikana ovog protutijela koji je neovisan o B limfocitima (Jones i sur., 2016.). Budući da se pik koncentracije estradiola i razine sijalinizacije N-glikana pojavljuju u različitim vremenskim točkama, nije bilo dokaza koji bi potvrdili brzu sijalinizaciju cirkulirajućih protutijela IgG tijekom menstruacijskog ciklusa u ovom istraživanju.

Poznato je da su galaktozilirani N-glikani neophodni supstrati za terminalnu doradu sijalinskim kiselinama (Vidarsson i sur., 2014.). Sukladno tome, u ovom istraživanju je primijećeno da sijalinizacija i digalaktozilacija N-glikana molekule IgG imaju jednake obrasce promjena tijekom menstruacijskog ciklusa. To može značiti da su ova dva glikozilacijska svojstva najvjerojatnije regulirana povezanim mehanizmima u ER i GA (Hassinen i sur., 2011.), moguće stvaranjem heterodimernog kompleksa između β-1,4-galaktoziltransferaze (engl. *β-1,4-galactosyltransferase 1*, B4GALT1) i već spomenute sijaliltransferaze ST6GALT1 (Khoder-Agha i sur., 2019.), čija se enzimska aktivnost može regulirati putem estrogenskih receptora koji djeluju kao transkripcijski faktori unutar imunosustava (Cunningham i Gilkeson, 2011.). Iako je modulacijski učinak estradiola na N-glikozilaciju molekule IgG u ljudskoj plazmi već primijećen (Ercan i sur., 2017.), i postoje istraživanja u uvjetima *in vitro* na stanicama raka dojke u kojima su opisani mogući mehanizmi kojima estrogen utječe na stanične procese, poput prekomjerne ekspresije estrogenskih receptora (Nott i sur., 2009.) i tretiranja stanica estradiolom (Coser i sur., 2003.; Hah i sur., 2011.) koji rezultiraju povećanom transkripcijom galaktoziltransferaze B4GALT1. No, rezultati ovog doktorskog rada nisu uspjeli pokazati statistički značajnu povezanost koncentracije estradiola i galaktozilacije

molekule IgG. To bi moglo značiti da je estradiol općenito važan, ali vjerojatno nije ključni faktor koji određuje razinu digalaktozilacije N-glikana protutijela IgG tijekom menstruacijskog ciklusa, barem ne na način da u fiziološkom rasponu koncentracije, koja je karakteristična za menstruacijski ciklus, uzrokuje povećanu ekspresiju gena koji kodira galaktoziltransferazu B4GALT1, što je već sugerirano na mišjem modelu reumatoidnog artritisa (Engdahl i sur., 2018.), nego možda regulira aktivnost već sintetizirane količine ove galaktoziltransferaze balansiranjem između B4GALT1 u monomernom i homomernom obliku (Harrus i sur., 2018.), no to tek treba biti istraženo.

Zasad je poznato tek nekoliko studija koje su proučavale utjecaj ostalih spolnih hormona jajnika, poput testosterona i progesterona, na glikozilaciju humanih proteina (Medvedová i Farkas, 2004.). Zbog toga je ovo istraživanje još vrijednije jer će omogućiti nova saznanja u ovom području znanosti. Jedno od važnih otkrića ovog istraživanja je povezanost testosterona s velikim brojem strukturno različitih N-glikana molekule IgG u menstruacijskom ciklusu. Testosteron ima važnu ulogu za razvoj zrelih B i T limfocita te vezanjem za androgene receptore stvara kompleks koji ima funkciju transkripcijskog faktora mijenjajući generalnu ekspresiju gena u stanici (Tsai i O'Malley, 1994.). Vjerojatno na taj način može potaknuti i ekspresiju gena čiji produkti sudjeluju u N-glikozilaciji molekule IgG u B limfocitima. U muškaraca testosteron smanjuje ekspresiju gena za sijaliltransferazu, gensku aktivnost sijaliltransferaze, enzima koji dodaje sijalinske kiseline na glikane, i uzrokuje smanjenu vijabilnost stanica raka prostate (Munkley i sur., 2016.). Iako studije o utjecaju testosterona na imunitet muškaraca pokazuju da on djeluje protuupalno (Gubbels Bupp i Jorgensen, 2018.) i štiti od autoimunosti putem ograničavanja broja B limfocita (Wilhelmson i sur., 2018.), višak testosterona u žena je povezan s kroničnom upalom niskog stupnja (engl. *chronic low-grade inflammation*) koja je temeljni patološki mehanizam u policističnom sindromu jajnika (engl. *polycistic ovary syndrome*, PCOS) (Çakıroğlu i sur., 2016.). Kao potvrda prijašnjih studija, rezultati ovog istraživanja pokazuju pozitivnu povezanost testosterona s agalaktoziliranim N-glikanima koji se smatraju tzv. "upalnim" glikanima, a negativnu povezanost s digalaktoziliranim i sijaliziranim N-glikanima tzv. "protuupalnim" glikanima molekule IgG, što implicira da je testosteron povezan s upalnim djelovanjem ovog protutijela u žena tijekom menstruacijskog ciklusa. No ipak, u zdravih žena s normalnim menstruacijskim ciklusom, testosteron kojeg proizvode jajnici je važna zaliha spolnih hormona jer se djelovanjem aromataze direktno prevodi u biološki najaktivniji estrogen, estradiol, zbog čega

je testosteron neophodan za normalnu funkciju ženskog reproduktivnog sustava (Bereshchenko i sur., 2018.; Payne i Hales, 2004.).

Progesteron također ima snažna imunoregulacijska svojstva s posebnim naglaskom na uspostavljanju i održavanju imunotolerancije, koja se smatra najvažnijim obilježjem svake uspješne trudnoće (Shah i sur., 2019.). Djelovanje progesterona na imunitet uzrokuje podešavanje funkcije imunosnih stanica (Kyurkchiev i sur., 2011.) i protutijela (Kelemen i sur., 1996.; Prados i sur., 2011.), te smanjenu proizvodnju upalnih citokina (Tan i sur., 2012.), što vjerojatno rezultira dominacijom protutijela smanjene upalne aktivnosti. Dobiveni rezultati pokazuju da je progesteron povezan s povećanjem razine digalaktoziliranih i sijaliniziranih molekula IgG, čime je utvrđeno da je protuupalni glikoprofil ovog protutijela tijekom luteinske faze menstruacijskog ciklusa povezan s povećanom koncentracijom estradiola i progesterona. Svi dosadašnji rezultati ovog doktorskog rada koji se odnose na funkciju estradiola, progesterona i testosterona ukazuju na ključnu ulogu ovih spolnih hormona u regulaciji N-glikozilacije molekule IgG i usmjeravanju imuniteta žene tijekom menstruacijskog ciklusa, što otvara niz zanimljivih pitanja koja će vjerojatno biti predmet budućih studija.

Iz prethodnih studija je poznata važnost spolnog hormonskog statusa žene za promjene N-glikozilacije molekule IgG u pubertetu (Pucic Bakovic i sur., 2012.), trudnoći (van de Geijn i sur., 2009.) i menopauzi (Krištić i sur., 2014.), a ovo istraživanje pokazalo da isto vrijedi i za menstruacijski ciklus. No, do promijenjene N-glikozilacije ovog protutijela dolazi i uslijed raznih oboljenja kao što su rak (Adamczyk i sur., 2012.), upalne (Šimurina i sur., 2018.) i autoimmune bolesti (Huang i sur., 2017.; Sjöwall i sur., 2015.). Dosadašnja istraživanja su pokazala da su žene sklonije razvoju autoimunih bolesti i stvaranju pratećih autoreaktivnih protutijela (Whitacre, 2001.; Whitacre i sur., 1999.), dok su muškarci skloniji razvoju infekcija i malignih bolesti (Jaillon i sur., 2017.). Činjenica da postoji razlika u imunosnom odgovoru između muškaraca i žena promijenila je perspektivu daljnjih istraživanja, te se današnje studije okreću proučavanju spolno-specifičnih imunoreakcija (Taneja, 2018.) i s njima povezanim promjenama N-glikozilacije molekule IgG, koje se smatraju važnim procesom u kompleksnim mehanizmima razvoja bolesti (Lauc i sur., 2016.).

Dosad je pokazano da fiziološki procesi koji prate starenje organizma uzrokuju povećanu sterilnu upalnu aktivnost imunosnog sustava (engl. *imflammaging*) i dugoročno dovode do razvoja bolesti u osoba kasnije životne dobi (Franceschi i Campisi, 2014.). Nezdrav način života (Barrios i sur., 2016.; Nikolac Perkovic i sur., 2014.; Wang i sur., 2019.; Wu i sur.,

2020.) i opadanje razine spolnih hormona sa starenjem (Horstman i sur., 2012.) ubrzavaju ovaj ionako neizbježan proces, a njihove posljedice vidljive su kroz izražene promjene jednog ili nekoliko glikanskih svojstava protutijela IgG (Krištić i sur., 2014.). Naša znanstvena grupa je nedavno otkrila da prestanak proizvodnje spolnih hormona u jajnicima, fiziološki proces koji prethodi menopauzi, uzrokuje povećanje indeksa glikanske dobi tj. uzrokuje ubrzano biološko starenje zdravih žena s dotad normalnim menstruacijskim ciklusima (Jurić i sur., 2020.). Indeks glikanske dobi je novootkiveni biomarker biološke dobi osobe koji se određuje analizom N-glikozilacije protutijela IgG, a povezan je sa životnim stilom i biomarkerima rizika za nastanak bolesti, te se povećava s povećanjem razine N-glikana bez galaktoze i sijalinskih kiselina (Krištić i sur., 2014.). Iz toga je vidljivo da su bolesti i starenje praćeni sličnim promjenama N-glikozilacije molekule IgG i odraz su upalnog stanja organizma (Gudelj i sur., 2018a.). Glikani stoga nisu samo pasivni pokazatelji rizika za nastanak i razvoj bolesti (Štambuk i sur., 2020.), već određene glikanske promjene, kao na primjer postepeno povećanje razine agalaktozilacije N-glikana protutijela IgG tijekom života, aktivno doprinose nastanku i održavanju upalnih stanja, koja dalje potiču razvoj bolesti koje ovise o dobi osobe (Franceschi i sur., 2000., 2018.).

Zbog nesporne činjenice da su promjene N-glikozilacije popratni čimbenici starenja, zdravlja i razine spolnih hormona osobe, glikani su postali neizbježni subjekt u sve većem broju epidemioloških istraživanja. Razvoj modernih instrumenata i osjetljivih metoda za analizu N-glikana omogućila je otkrivanje čak i najmanjih promjena u glikanskoj strukturi godinama prije potpunog razvoja bolesti (Gudelj i sur., 2018b.). N-glikani molekule IgG stoga imaju velik biomarkerski potencijal i mogli bi se jednog dana koristiti u dijagnostičke, prognostičke i terapijske svrhe za bolesti koje su dominantne u žena, a povezane su sa ženskim spolnim hormonima (Whitacre i sur., 1999.).

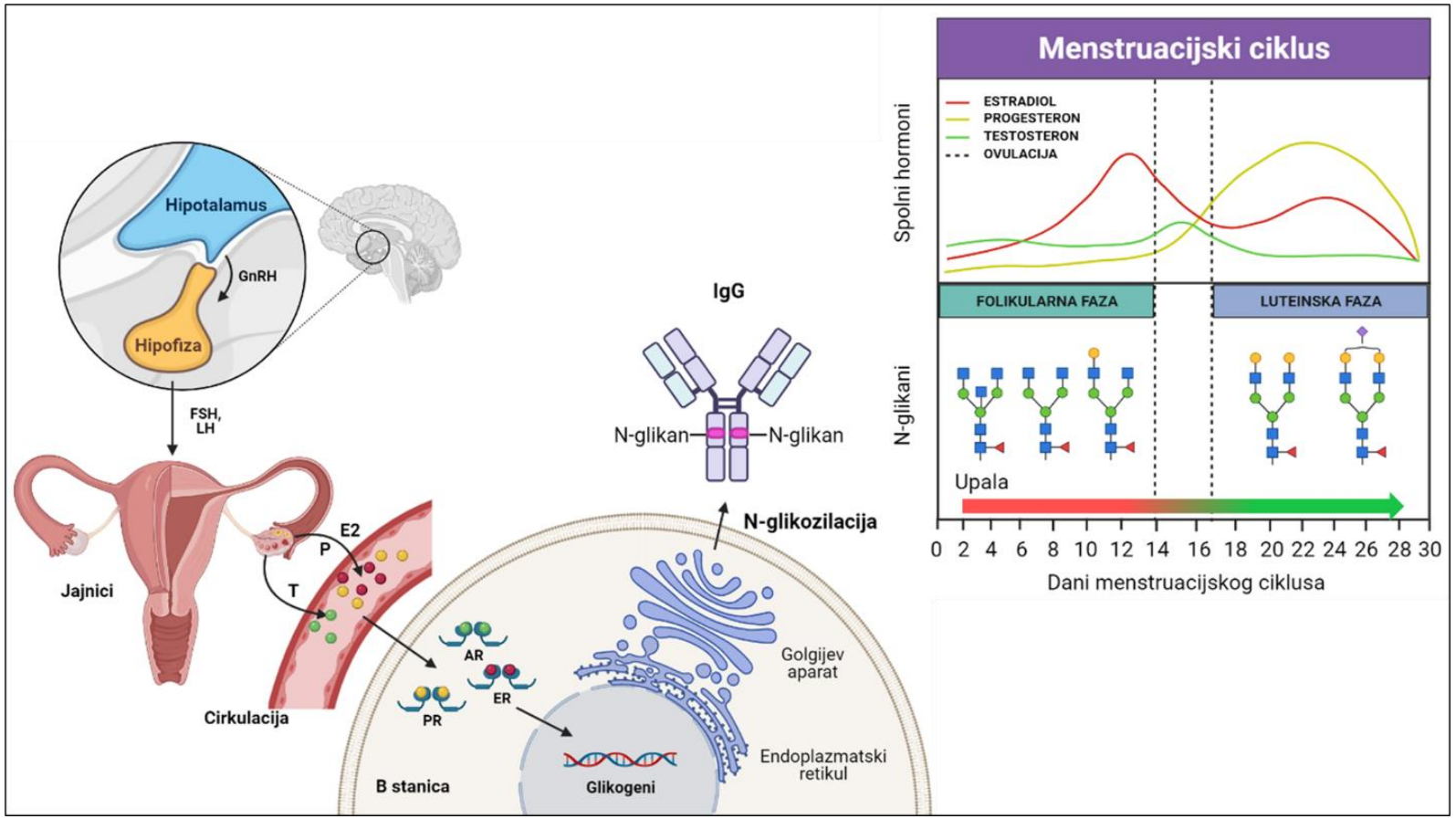
Ovo istraživanje je vođeno pretpostavkom kako analizom promjena razine N-glikana IgG, koji su važni pokazatelji bioloških procesa u tijelu, možemo otkriti bolest u ranom stadiju, prije razvoja težih simptoma, što bi bio važan korak prema personaliziranom praćenju zdravlja osobe. Jedan od ciljeva ovog istraživanja je stoga bio odrediti raspon fizioloških promjena N-glikozilacije molekule IgG tijekom menstruacijskih ciklusa za svaku ženu pojedinačno. Ovo istraživanje je pokazalo da specifičan glikanska svojstva ovog protutijela, poput povećane agalaktozilacije i smanjene sijalinizacije, za koje je poznato da su izravno povezane s mnogim bolestima (Gudelj i sur., 2018a.; Li i sur., 2021.), imaju najveći opseg promjena tijekom

menstruacijskog ciklusa na razini osobe. Rezultati pokazuju da razina sijalinizacije N-glikana u menstruacijskim ciklusima kod nekih osoba varira u rasponu od 10% do oko 20%, a razina agalaktozilacije varira u rasponu od 7% do 16%. To bi značilo da, ako žena ima 30% agalaktoziliranih N-glikana molekule IgG, uz varijaciju od 10%, razina agalaktozilacije IgG ovih N-glikana kod te osobe kretat će se u rasponu od 28,5% do 31,5% zbog utjecaja menstruacijskog ciklusa. Ova saznanja su vrlo važna za personalizirani nadzor ljudskog zdravlja.

U proces dugoročnog praćenja zdravlja uključivali bi se muškarci i žene još u reproduktivnom razdoblju života, što znači da bi na promjene sastava N-glikana protutijela IgG u žena mogli utjecati i spolni hormoni, čija se koncentracija mijenja s fazama menstruacijskog ciklusa. Svrha dugoročnog praćenja glikozilacijskih profila ovog protutijela bilo bi određivanje smjera promjene njegovih glikanskih svojstava, pri čemu bi kontinuirano povećanje razine agalaktozilacije tijekom godina moglo dugoročno upućivati na povećanje upalnog stanja organizma osobe (Gudelj i sur., 2018b.). Kada govorimo o ženama, rezultati ovog istraživanja pokazuju da bi analizu N-glikozilacije molekule IgG bilo poželjno provoditi uvijek u istom periodu menstruacijskog ciklusa jer bi u tom slučaju utjecaj različitih faza menstruacijskog ciklusa na glikanski profil bio minimalan. Model menstruacijskog ciklusa implicira da bi to razdoblje potencijalno moglo biti upravo sredinom folikularne faze, oko 10. dana menstruacijskog ciklusa kada su agalaktozilirani N-glikani u maksimumu funkcije, a digalaktozilirani i sijalinizirani N-glikani u minimumu funkcije, i time imaju najmanju promjenu. Na taj bi način detektirane razlike glikanskog profila predstavljale razinu sistemskog upalnog stanja organizma osobe, a ne hormonski uvjetovane razlike zbog testiranja u različitim fazama menstruacijskog ciklusa. Zasad se općenito može zaključiti da je analizu glikanskog profila protutijela IgG preporučljivo provoditi uvijek u istom periodu ciklusa, ali za točniju preporuku potrebno je napraviti novu studiju, na primjer neku koja bi mjerila svakodnevne promjene razine N-glikana tijekom menstruacijskog ciklusa, ili bi mjerila razinu N-glikana u nekoliko faza istodobno i kroz duži period od 10-12 menstruacijskih ciklusa što bi dalo detaljniji uvid u promjene N-glikozilacije protutijela IgG među ciklusima. Također, ovakav način analize glikanskih profila doprinio bi optimizaciji informativnosti i razvoju N-glikana molekule IgG u potencijalne dijagnostičke biomarkere ili biomarkere za personalizirano praćenje zdravlja žena u reproduktivnom razdoblju života.

Budući da je ovo prva studija u kojoj je menstruacijski ciklus poslužio kao model za longitudinalno praćenje utjecaja spolnih hormona na N-glikozilaciju protutijela IgG, uzorkovanje krvi ispitanica provodilo se jednom tjedno u jednakim vremenskim razmacima (svakih 7 dana) bez obzira na fazu menstruacijskog ciklusa, ali na velikom broju žena i tijekom duljeg razdoblja (kroz 3 mjeseca), što je u konačnici rezultiralo s najmanje dva menstruacijska ciklusa po osobi. Izmjerene koncentracije spolnih hormona u plazmi i N-glikanski profili ovog protutijela stoga nisu potpuna procjena svakodnevnih promjena koncentracije hormona i razine N-glikana tijekom menstruacijskog ciklusa. Buduće studije koje će detaljno istraživati biološke procese tijekom menstruacijskog ciklusa mogle bi razmotriti češće, čak i dnevno, prikupljenje uzoraka krvi kako bi mogle preciznije odrediti fiziološke promjene spolnih hormona.

Zbog biološke složenosti menstruacijskog ciklusa i N-glikozilacije molekule IgG, potrebne su dodatne hormonske intervencijske studije kojima bi se potvrdio mehanizam kojim pojedini spolni hormoni reguliraju jedinstvene promjene N-glikozilacije ovog protutijela tijekom menstruacijskog ciklusa. Kako bi se otkrilo koji su mehanizmi aktivirani prilikom njegove N-glikozilacije, najčešće se provode cjelogenomske studije asocijacije (engl. *genome wide association studies*, GWAS). Posljednja takva studija GWAS iz 2020. godine provedena je na N-glikomu molekule IgG, te je uz već poznate glikoziltransferaze B4GALT1, koja dodaje galaktozu, i ST6GAL1, koja dodaje sijalinske kiseline, identificirala i dodatne proteine, točnije transkripcijske faktore RUNX1, RUNX3, SPINK4 i ELL2, koji bi potencijalno mogli sudjelovati u signalizacijskom mehanizmu kojim estradiol utječe na N-glikozilaciju ovog protutijela (Klarić i sur., 2020.). Najnovije objavljeni podatci naše grupe pokazuju kako pri smanjenoj koncentraciji estradiola (razina kao u menopauzi) dolazi do promjene N-glikoma molekule IgG, no ne i N-glikoma ukupnih proteina plazme, što upućuje da estradiol primarno regulira N-glikozilaciju u B stanicama, ali ne i u jetri (Mijakovac i sur., 2021.). U usporedbi s estrogenom, slične intervencijske studije spolnim hormonima progesteronom (Prados i sur., 2011.) i testosteronom (Munkley i sur., 2016.; Svartberg i sur., 2004.) su rijetke, ali sugeriraju njihovu povezanost s razinom glikozilacije, zbog čega njihov pojedinačni učinak na N-glikozilaciju protutijela IgG tek treba biti istražen. Grafički sažetak predloženog utjecaja estradiola, progesterona i testosterona na N-glikozilaciju molekule IgG u menstruacijskom ciklusu pripremljen je prema prije objavljenim literaturnim navodima i originalnim rezultatima istraživanja u sklopu ovog doktorskog rada (Slika 19).



Slika 19. Grafički sažetak predloženog utjecaja ženskih spolnih horomona na N-glikozilaciju imunoglobulina G tijekom menstruacijskog ciklusa. Prema literaturnim navodima, progesteron regulira aktivnost oligosahariltransferaze koja prebacuje prekursor N-glikana s dolikolnog nosača na sintetizirajući protein (Prados i sur., 2011.) u ER, dok je estrogen važniji za daljnje preinake N-glikana jer aktivira transkripciju gena za glikoziltransferaze B4GALT1 i ST6GAL1 koje modificiraju krajeve N-glikana molekule IgG dodatkom galaktoze i sijalinskih kiselina u GA (Coser i sur., 2003.; Engdahl i sur., 2018.; Hah i sur., 2011.). Testosteron je povezan sa sijalinizacijom glikoproteina u stanicama raka prostate (Munkley, 2017.), no njegov utjecaj na N-glikozilaciju u žena tek treba biti istražen.GnRH – gonadotropin oslobađajući hormon, LH – luteinizirajući hormon, FSH – folikulostimulirajući hormon, E2 – 17β-estradiol (crvene točke), P – progesteron (žute točke), T – testosteron (zelene točke), AR – androgeni receptor, ER – estrogenski receptor, PR – progesteronski receptor, gliko-geni (engl. *glycogenes*) – geni koji kodiraju za enzime direktno uključene u N-glikozilaciju (npr. glikoziltransferaze, glikozidaze, transporteri šećernih nukleotida itd.) čiji broj se procjenjuje na oko 250 do 900 gena a čine 1-4% svih humanih gena, ovisno o literaturnom izvoru (Cummings i Pierce, 2014.; Kikuchi i Narimatsu, 2006.; Narimatsu, 2006.).

6 ZAKLJUČCI

- U ovom istraživanju uspješno je analizirana N-glikozilacija imunoglobulina G na 776 uzoraka u 70 zdravih žena. Metodom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti temeljenom na hidrofilnim interakcijama određeni su glikanski profili i varijabilnost glikanskih svojstava imunoglobulina G tijekom menstruacijskih ciklusa, što može biti korisno kod dizajniranja budućih glikanskih studija i razvoja potencijalnih testova koji mjere razlike N-glikozilacije ovog protutijela u reproduktivnom razdoblju života žena.

- Prosječna varijabilnost glikanskih svojstava molekule IgG koja je povezana s fazom menstruacijskog ciklusa je vrlo mala u svim uzorcima analizirane grupe žena – varijacija agalaktozilacije bila je 1.1%, a digalaktozilacije i sijalinizacije 1.0%, umjereno promjenjivi bili su glikani s jednom galaktozom – monogalaktozilacija 0.8%, a glikani s račvajućim GlcNAc 0.5%, dok se razina fukozilacije nije ciklički mijenjala tijekom menstruacijskog ciklusa.

- Simulacija dinamike N-glikozilacije molekule IgG u modelu menstruacijskog ciklusa pokazala je periodične cikličke obrasce koji su povezani s fazom menstruacijskog ciklusa i razinom spolnih hormona estradiola, progesterona i testosterona.

- Modelom menstruacijskog ciklusa pokazano je da digalaktozilirani i sijalinizirani N-glikani, za koje je poznato da omogućuju protuupalno djelovanje molekule IgG, dosežu najveću razinu u luteinskoj fazi menstruacijskog ciklusa, dok agalaktozilirani, monogalaktozilirani i N-glikani s račvajućim GlcNAc, koji omogućuju pojačano upalno djelovanje ovog protutijela, imaju suprotan obrazac promjena dosežući najveću razinu u folikularnoj fazi menstruacijskog ciklusa.

- Visoka koncentracija estrogena i progesterona u krvnoj plazmi povezana je s većom razinom digalaktoziliranih i sijaliniziranih N-glikana, dok je nasuprot tome, visoka koncentracija testosterona povezana s većom razinom N-glikana kojima nedostaju jedna ili obje galaktoze na krajevima antena.

- Menstruacijski ciklus pokazuje mali utjecaj na varijabilnost N-glikozilacije molekule IgG na razini svih uzoraka ispitivane grupe žena. Naime, menstruacijski ciklus može opisati do 0.8% varijabilnosti N-glikozilacije ovog protutijela u kohorti. To omogućava da se u studijama s velikim brojem ispitanika uzorci prikupljaju neovisno o fazi menstruacijskog ciklusa.

- S druge strane, opseg promjena glikozilacijskih svojstava molekule IgG unutar jedne osobe najizraženiji je za sijalinizirane (najveća razlika između najniže i najviše vrijednosti približno 21%) i agalaktozilirane (najveća razlika između najniže i najviše vrijednosti približno 16%) N-glikane, dok su fukozilirani N-glikani imali najmanju intraindividualnu varijaciju (najveća razlika između najniže i najviše vrijednosti manja od 3%) tijekom menstruacijskih ciklusa. To ukazuje na moguć značajan utjecaj faze menstruacijskog ciklusa na N-glikozilaciju IgG ovog protutijela na individualnoj razini.

- Ovo je prva studija koja je dala detaljnu karakterizaciju glikanskog profila molekule IgG tijekom menstrucijskog ciklusa i na taj način uspjela povezati promjene njegove N-glikozilacije s koncentracijom ženskih spolnih hormona estradiola, progesterona i testosterona u određenim fazama menstruacijskog ciklusa.

7 POPIS LITERATURE

Adamczyk B, Tharmalingam T, i Rudd PM (2012) Glycans as cancer biomarkers. Biochim Biophys Acta 1820: 1347–1353.

Adams Waldorf KM i Nelson JL (2008) Autoimmune disease during pregnancy and the microchimerism legacy of pregnancy. Immunol Invest 37: 631–644.

Agakova A, Vučković F, Klarić L, Lauc G, i Agakov F (2017) Automated Integration of a UPLC Glycomic Profile. Methods Mol Biol 1503: 217–233.

Ahmad N, Pollard TM, i Unwin N (2002) The optimal timing of blood collection during the menstrual cycle for the assessment of endogenous sex hormones: can interindividual differences in levels over the whole cycle be assessed on a single day? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 11: 147–151.

Alpízar-Rodríguez D, Pluchino N, Canny G, Gabay C, i Finckh A (2017) The role of female hormonal factors in the development of rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford) 56: 1254–1263.

Alvergne A i Högqvist Tabor V (2018) Is female health cyclical? Evolutionary perspectives on menstruation. Trends Ecol Evol 33: 399–414.

Anthony RM i Ravetch JV (2010) A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs. J Clin Immunol 30 Suppl 1: S9-14.

Anthony RM, Wermeling F, Karlsson MCI, i Ravetch JV (2008) Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. Proc Natl Acad Sci USA 105: 19571–19578.

Anthony RM, Wermeling F, i Ravetch JV (2012) Novel roles for the IgG Fc glycan. Ann N Y Acad Sci 1253: 170–180.

Anumula KR (2012) Quantitative glycan profiling of normal human plasma derived immunoglobulin and its fragments Fab and Fc. J Immunol Methods 382: 167–176.

Apweiler R, Hermjakob H, i Sharon N (1999) On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. Biochim Biophys Acta 1473: 4–8.

Arnold JN, Dwek RA, Rudd PM, i Sim RB (2006) Mannan binding lectin and its interaction with immunoglobulins in health and in disease. Immunol Lett 106: 103–110.

Ascenzi P, Bocedi A, i Marino M (2006) Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. Mol Aspects Med 27: 299–402.

Baioumi AYAA (2019) Chapter 3 - Comparing Measures of Obesity: Waist Circumference, Waist-Hip, and Waist-Height Ratios. In Book: Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity, 2nd Edition. Academic Press: 29–40.

Baković MP, Selman MHJ, Hoffmann M, Rudan I, Campbell H, Deelder AM, i sur. (2013) High-throughput IgG Fc N-glycosylation profiling by mass spectrometry of glycopeptides. J Proteome Res 12: 821–831.

Ballaré C, Uhrig M, Bechtold T, Sancho E, Di Domenico M, Migliaccio A, i sur. (2003) Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. Mol Cell Biol 23: 1994–2008.

Banda NK, Wood AK, Takahashi K, Levitt B, Rudd PM, Royle L, i sur. (2008) Initiation of the alternative pathway of murine complement by immune complexes is dependent on N-glycans in IgG antibodies. Arthritis Rheum 58: 3081–3089.

Barrios C, Zierer J, Gudelj I, Štambuk J, Ugrina I, Rodríguez E, i sur. (2016) Glycosylation profile of IgG in moderate kidney dysfunction. JASN 27: 933–941.

Basta M (2004) Activation and Inhibition of Complement by Immunoglobulins. In Book: The complement system: novel roles in health and disease. Springer US, Boston, MA: 517–529.

Bayry J, Bansal K, Kazatchkine MD, i Kaveri SV (2009) DC-SIGN and α2,6-sialylated IgG Fc interaction is dispensable for the anti-inflammatory activity of IVIg on human dendritic cells. Proc Natl Acad Sci USA 106: E24.

Ben Mkaddem S, Benhamou M, i Monteiro RC (2019) Understanding Fc receptor involvement in inflammatory diseases: from mechanisms to new therapeutic tools. Front Immunol 10.

Bereshchenko O, Bruscoli S, i Riccardi C (2018) Glucocorticoids, sex hormones, and immunity. Front Immunol 9: 1332.

Berg AH, Rice CD, Rahman MS, Dong J, i Thomas P (2014) Identification and characterization of membrane androgen receptors in the ZIP9 zinc transporter subfamily: I. Discovery in female atlantic croaker and evidence ZIP9 mediates testosterone-induced apoptosis of ovarian follicle cells. Endocrinology 155: 4237–4249.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL, i Stryer L (2002) Biochemistry. W H Freeman.

Beshay V i Carr B (2013) Hypothalamic-pituitary-ovarian axis and control of the menstrual cycle. Clin Reprod Med and Surg: 31–42.

Bhatia A, Sekhon HK, i Kaur G (2014) Sex hormones and immune dimorphism. Sci World J 2014: 159150.

Bondt A, Selman MHJ, Deelder AM, Hazes JMW, Willemsen SP, Wuhrer M, i sur. (2013) Association between galactosylation of immunoglobulin G and improvement of rheumatoid arthritis during pregnancy is independent of sialylation. J Proteome Res 12: 4522–4531.

Bondt A, Rombouts Y, Selman MHJ, Hensbergen PJ, Reiding KR, Hazes JMW, i sur. (2014) Immunoglobulin G (IgG) Fab glycosylation analysis using a new mass spectrometric high-throughput profiling method reveals pregnancy-associated changes. Mol Cell Proteomics 13: 3029–3039.

Boron WF i Boulpaep EL (2016) Medical Physiology E-Book. Elsevier Health Sciences.

Bouman A, Heineman MJ, i Faas MM (2005) Sex hormones and the immune response in humans. Hum Reprod Update 11: 411–423.

van de Bovenkamp FS, Hafkenscheid L, Rispens T, i Rombouts Y (2016) The emerging importance of IgG Fab glycosylation in immunity. J. Immunol. 196: 1435–1441.

Bremer AA i Miller WL (2014) Chapter 18 - Regulation of Steroidogenesis. In Book: Cellular Endocrinology in Health and Disease. Elsevier: 207–227.

Brown GD (2006) Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. Nat Rev Immunol 6: 33–43.

Bui HN, Sluss PM, Blincko S, Knol DL, Blankenstein MA, i Heijboer AC (2013) Dynamics of serum testosterone during the menstrual cycle evaluated by daily measurements with an ID-LC-MS/MS method and a 2nd generation automated immunoassay. Steroids 78: 96–101.

Burda P i Aebi M (1999) The dolichol pathway of N-linked glycosylation. Biochim Biophys Acta 1426: 239–257.

Cahill MA i Neubauer H (2021) PGRMC proteins are coming of age: A special issue on the role of PGRMC1 and PGRMC2 in metabolism and cancer biology. Cancers 13: 512.

Çakıroğlu Y, Vural F, i Vural B (2016) The inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: association with obesity and IVF outcomes. J Endocrinol Invest 39: 899–907.

Carroll MC i Isenman DE (2012) Regulation of humoral immunity by complement. Immunity 37: 199–207.

Ceroni A, Maass K, Geyer H, Geyer R, Dell A, i Haslam SM (2008) GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. J Proteome Res 7: 1650–1659.

Chen G, Wang Y, Qiu L, Qin X, Liu H, Wang X, i sur. (2012) Human IgG Fc-glycosylation profiling reveals associations with age, sex, female sex hormones and thyroid cancer. J Proteomics 75: 2824–2834.

Chen L-Q, Cheung LS, Feng L, Tanner W, i Frommer WB (2015) Transport of sugars. Annu Rev Biochem 84: 865–894.

Cheng HD, Tirosh I, de Haan N, Stöckmann H, Adamczyk B, McManus CA, i sur. (2020) IgG Fc glycosylation as an axis of humoral immunity in childhood. J Allergy Clin Immunol 145: 710-713.e9.

Chung C-Y, Majewska NI, Wang Q, Paul JT, i Betenbaugh MJ (2017) N-glycosylation processing pathways across kingdoms. Cell 171: 258-258.e1.

Cincinelli G, Generali E, Dudam R, Ravindran V, i Selmi C (2018) Why women or why not men? Sex and autoimmune diseases. Indian J Rheumatol 13: 44.

Cipolletti M, Leone S, Bartoloni S, Busonero C, i Acconcia F (2020) Real-time measurement of E2:ERα transcriptional activity in living cells. BioRxiv 844761.

Clerc F, Reiding KR, Jansen BC, Kammeijer GSM, Bondt A, i Wuhrer M (2016) Human plasma protein N-glycosylation. Glycoconj J 33: 309–343.

Coser KR, Chesnes J, Hur J, Ray S, Isselbacher KJ, i Shioda T (2003) Global analysis of ligand sensitivity of estrogen inducible and suppressible genes in MCF7/BUS breast cancer cells by DNA microarray. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 13994–13999.

Cui J, Shen Y, i Li R (2013) Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. Trends Mol Med 19: 197–209.

Cummings RD i Pierce JM (2014) The challenge and promise of glycomics. Chem Biol 21: 1–15.

Cunningham M i Gilkeson G (2011) Estrogen receptors in immunity and autoimmunity. Clin Rev Allergy Immunol 40: 66–73.

Damerell D, Ceroni A, Maass K, Ranzinger R, Dell A, i Haslam SM (2012) The GlycanBuilder and GlycoWorkbench glycoinformatics tools: updates and new developments. Biol Chem 393: 1357–1362.

Dashivets T, Thomann M, Rueger P, Knaupp A, Buchner J, i Schlothauer T (2015) Multi-angle effector function analysis of human monoclonal IgG glycovariants. PLOS ONE 10: e0143520.

Davey RA i Grossmann M (2016) Androgen receptor structure, function and biology: from bench to bedside. Clin Biochem Rev 37: 3–15.

Davis SR i Wahlin-Jacobsen S (2015) Testosterone in women-the clinical significance. Lancet Diabetes Endocrinol 3: 980–992.

Dekkers G, Treffers L, Plomp R, Bentlage AEH, de Boer M, Koeleman CAM, i sur. (2017) Decoding the human immunoglobulin G glycan repertoire reveals a spectrum of Fc-receptor- and complement-mediated effector activities. Front Immunol 8: 877.

Diebolder CA, Beurskens FJ, de Jong RN, Koning RI, Strumane K, Lindorfer MA, i sur. (2014) Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. Science 343: 1260–1263.

Dube DH i Bertozzi CR (2005) Glycans in cancer and inflammation-potential for therapeutics and diagnostics. Nat Rev Drug Discov 4: 477–488.

Dwek RA (1998) Biological importance of glycosylation. Dev Biol Stand 96: 43–47.

Egmond M van, Bakema JE, i Woof JM (2015) Fc receptors in mucosal immunology. In Book: Mucosal Immunology, 4th Edition. Academic Press, London: 409–428.

Engdahl C, Bondt A, Harre U, Raufer J, Pfeifle R, Camponeschi A, i sur. (2018) Estrogen induces St6gal1 expression and increases IgG sialylation in mice and patients with rheumatoid arthritis: a potential explanation for the increased risk of rheumatoid arthritis in postmenopausal women. Arthritis Res Ther 20: 84.

Ercan A, Cui J, Chatterton DEW, Deane KD, Hazen MM, Brintnell W, i sur. (2010) Aberrant IgG galactosylation precedes disease onset, correlates with disease activity, and is prevalent in autoantibodies in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 62: 2239–2248.

Ercan A, Kohrt WM, Cui J, Deane KD, Pezer M, Yu EW, i sur. (2017) Estrogens regulate glycosylation of IgG in women and men. JCI Insight 2: e89703.

Falah N, Torday J, K. Quinney S, i M. Haas D (2015) Estriol review: Clinical applications and potential biomedical importance. Clin Res Trials 1.

Falcone T i Hurd WW (2013) Clinical reproductive medicine and surgery: a practical guide. Springer-Verlag, New York.

Farage MA, Neill S, i MacLean AB (2009) Physiological changes associated with the menstrual cycle: a review. Obstet Gynecol Surv 64: 58–72.

Franceschi C i Campisi J (2014) Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, Series A 69: S4–S9.

Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, i sur. (2000) Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. Ann N Y Acad Sci 908: 244–254.

Franceschi C, Garagnani P, Parini P, Giuliani C, i Santoro A (2018) Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. Nat Rev Endocrinol 14: 576–590.

Frigerio L i Lord JM (2000) Glycoprotein degradation: Do sugars hold the key? Curr Biol 10: R674–R677.

Garred P, Madsen HO, Marquart H, Hansen TM, Sørensen SF, Petersen J, i sur. (2000) Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: a cross sectional study. J Rheumatol 27: 26–34.

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

Geijtenbeek TBH i Gringhuis SI (2016) C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. Nat Rev Immunol 16: 433–448.

Goetze AM, Liu YD, Zhang Z, Shah B, Lee E, Bondarenko PV, i sur. (2011) High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans. Glycobiology 21: 949–959.

Gonzalez-Quintela A, Alende R, Gude F, Campos J, Rey J, Meijide LM, i sur. (2008) Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. Clin Exp Immunol 151: 42–50.

Goodman HM (2009) Chapter 1 - Introduction. In Book: Basic Medical Endocrinology, 4th Edition. Academic Press, San Diego: 1–27.

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

Goulabchand R, Vincent T, Batteux F, Eliaou J-F, i Guilpain P (2014) Impact of autoantibody glycosylation in autoimmune diseases. Autoimmun Rev 13: 742–750.

Gubbels Bupp MR i Jorgensen TN (2018) Androgen-Induced Immunosuppression. Front Immunol 9: 749.

Gudelj I, Lauc G, i Pezer M (2018a) Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. Cell Immunol 333: 65-79.

Gudelj I, Salo PP, Trbojević-Akmačić I, Albers M, Primorac D, Perola M, i sur. (2018b) Low galactosylation of IgG associates with higher risk for future diagnosis of rheumatoid arthritis during 10 years of follow-up. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis 1864: 2034–2039.

Häggström M i Richfield D (2014) Diagram of the pathways of human steroidogenesis. Wiki J Med 1.

Hah N, Danko CG, Core L, Waterfall JJ, Siepel A, Lis JT, i sur. (2011) A rapid, extensive, and transient transcriptional response to estrogen signaling in breast cancer cells. Cell 145: 622–634.

Haltiwanger RS i Lowe JB (2004) Role of glycosylation in development. Annu Rev Biochem 73: 491–537.

Hanić M (2015) Vremenska stabilnost N-glikoma krvne plazme i imunoglobulina G. magistrski rad, University of Zagreb. Faculty of Pharmacy and Biochemistry. Department of Biochemistry and Molecular Biology.

Hargreaves C, Rose M, Lee Z, Machado R, Iriyama C, Hollox E, i sur. (2015) Fcγ receptors: Genetic variation, function, and disease. Immunol Rev 268: 6–24.

Harlow SAD, Windham G, i Paramsothy P (2013) Menstruation and menstrual disorders: the epidemiology of menstruation and menstrual Dysfunction. Women and Health: 163–177.

Harrus D, Khoder-Agha F, Peltoniemi M, Hassinen A, Ruddock L, Kellokumpu S, i sur. (2018) The dimeric structure of wild-type human glycosyltransferase B4GalT1. PLoS One 13: e0205571.

Hassinen A, Pujol FM, Kokkonen N, Pieters C, Kihlström M, Korhonen K, i sur. (2011) Functional organization of Golgi N- and O-glycosylation pathways involves pH-dependent complex formation that is impaired in cancer cells. J Biol Chem 286: 38329–38340.

Horstman AM, Dillon EL, Urban RJ, i Sheffield-Moore M (2012) The role of androgens and estrogens on healthy aging and longevity. J Gerontol A Biol Sci Med Sci: Series A 67: 1140–1152.

Huang C, Liu Y, Wu H, Sun D, i Li Y (2017) Characterization of IgG glycosylation in rheumatoid arthritis patients by MALDI-TOF-MSn and capillary electrophoresis. Anal Bioanal Chem 409: 3731–3739.

Huang L, Biolsi S, Bales KR, i Kuchibhotla U (2006) Impact of variable domain glycosylation on antibody clearance: an LC/MS characterization. Anal Biochem 349: 197–207.

Hughes GC (2012) Progesterone and autoimmune disease. Autoimmun Rev 11: A502–A514.

Hughes GC i Choubey D (2014) Modulation of autoimmune rheumatic diseases by oestrogen and progesterone. Nat Rev Rheumatol 10: 740–751.

Irani V, Guy AJ, Andrew D, Beeson JG, Ramsland PA, i Richards JS (2015) Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases. Mol Immunol 67: 171–182.

Irvine EB i Alter G (2020) Understanding the role of antibody glycosylation through the lens of severe viral and bacterial diseases. Glycobiology 30: 241–253.

Jacobsen BM i Horwitz KB (2012) Progesterone Receptors, their Isoforms and Progesterone Regulated Transcription. Mol Cell Endocrinol 357: 18–29.

Jaillon S, Berthenet K, i Garlanda C (2017) Sexual dimorphism in innate immunity. Clin Rev Allergy Immunol.

Janeway C (2001) Immunobiology 5: the immune system in health and disease. Garland Pub., New York.

Jefferis R (2014) Chapter 17. Fc Protein Engineering. In Book: Antibody Fc. Academic Press, Boston, 297–316.

Jolles S, Sewell W a. C, i Misbah SA (2005) Clinical uses of intravenous immunoglobulin. Clin Exp Immunol 142: 1–11.

Jones MB, Oswald DM, Joshi S, Whiteheart SW, Orlando R, i Cobb BA (2016) B-cell-independent sialylation of IgG. Proc Natl Acad Sci USA 113: 7207–7212.

Jurić J, Kohrt WM, Kifer D, Gavin KM, Pezer M, Nigrovic PA, i sur. (2020) Effects of estradiol on biological age measured using the glycan age index.

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

Karsten CM i Köhl J (2012) The immunoglobulin, IgG Fc receptor and complement triangle in autoimmune diseases. Immunobiology 217: 1067–1079.

Karsten CM, Pandey MK, Figge J, Kilchenstein R, Taylor PR, Rosas M, i sur. (2012) Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. Nat Med 18: 1401–1406.

Kavur M, Lauc G, i Pezer M (2021) Chapter - Systems Glycobiology: Immunoglobulin G Glycans as biomarkers and functional effectors in aging and diseases. In Book: Comprehensive Glycoscience - Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering.

Kelemen K, Bognar I, Paal M, i Szekeres-Bartho J (1996) A progesterone-induced protein increases the synthesis of asymmetric antibodies. Cell Immunol 167: 129–134.

Kerrigan AM i Brown GD (2009) C-type lectins and phagocytosis. Immunobiology 214: 562–575.

Khan D i Ansar Ahmed S (2015) The immune system is a natural target for estrogen action: opposing effects of estrogen in two prototypical autoimmune diseases. Front Immunol 6: 635.

Khoder-Agha F, Harrus D, Brysbaert G, Lensink MF, Harduin-Lepers A, Glumoff T, i sur. (2019) Assembly of B4GALT1/ST6GAL1 heteromers in the Golgi membranes involves lateral interactions via highly charged surface domains. J Biol Chem 294: 14383–14393.

Khoury GA, Baliban RC, i Floudas CA (2011) Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. Sci Rep 1.

Kifer D, Deriš H, Cindrić A, Petrović T, Cvetko A, Trbojević-Akmačić I, i sur. (2021) Immunoglobulin G glycome composition in transition from pre-menopause to menopause. MedRxiv 2021.04.10.21255252.

Kikuchi N i Narimatsu H (2006) Bioinformatics for comprehensive finding and analysis of glycosyltransferases. Biochim Biophys Acta 1760: 578–583.

Klarić L, Tsepilov YA, Stanton CM, Mangino M, Sikka TT, Esko T, i sur. (2020) Glycosylation of immunoglobulin G is regulated by a large network of genes pleiotropic with inflammatory diseases. Sci Adv 6: eaax0301.

Kornfeld R i Kornfeld S (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annu Rev Biochem 54: 631–664.

Kowalik MK, Rekawiecki R, i Kotwica J (2013) The putative roles of nuclear and membrane-bound progesterone receptors in the female reproductive tract. Reprod Biol 13: 279–289.

Krištić J, Vučković F, Menni C, Klarić L, Keser T, Beceheli I, i sur. (2014) Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 69: 779–789.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, i sur. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. Endocrinology 138: 863–870.

Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, i sur. (2000) Estrogen receptor pathways to AP-1. J Steroid Biochem Mol Biol 74: 311–317.

Kyurkchiev D, Ivanova-Todorova E, Murdjeva M, i Kyurkchiev S (2011) Immunoregulation by progesterone: effects on immune cells and mesenchymal stem cells. Adv Neuroimmune Biol 1: 105–123.

Lang F, Alevizopoulos K, i Stournaras C (2013) Targeting membrane androgen receptors in tumors. Expert Opin Ther Targets 17: 951–963.

Lauc G i Zoldoš V (2010) Protein glycosylation--an evolutionary crossroad between genes and environment. Mol Biosyst 6: 2373–2379.

Lauc G, Krištić J, i Zoldoš V (2014) Glycans - the third revolution in evolution. Front Genet 5: 145.

Lauc G, Pezer M, Rudan I, i Campbell H (2016) Mechanisms of disease: The human N-glycome. Biochim Biophys Acta - Gen Subj 1860: 1574–1582.

Lebien T i Tedder T (2008) B lymphocytes: how they develop and function. Blood 112 (5): 1570–1580.

Lee S, Kim J, Jang B, Hur S, Jung U, Kil K, i sur. (2010) Fluctuation of peripheral blood T, B, and NK cells during a menstrual cycle of normal healthy women. J Immunol 185: 756–762.

Li D, Lou Y, Zhang Y, Liu S, li J, i Tao J (2021) Sialylated immunoglobulin G: a promising diagnostic and therapeutic strategy for autoimmune diseases. Theranostics 11: 5430–5446.

Li T, DiLillo DJ, Bournazos S, Giddens JP, Ravetch JV, i Wang L-X (2017) Modulating IgG effector function by Fc glycan engineering. PNAS 114: 3485–3490.

Li X, Lonard DM, i O'Malley BW (2004) A contemporary understanding of progesterone receptor function. Mech Ageing Dev 125: 669–678.

Liu H i May K (2012) Disulfide bond structures of IgG molecules. MAbs 4: 17–23.

Liu YX i Hsueh AJ (1986) Synergism between granulosa and theca-interstitial cells in estrogen biosynthesis by gonadotropin-treated rat ovaries: studies on the two-cell, two-gonadotropin hypothesis using steroid antisera. Biol Reprod 35: 27–36.

Liu D, Li Q, Zhang X, Wang H, Cao W, Li D, i sur. (2019) Systematic review: immunoglobulin G N-glycans as next-generation diagnostic biomarkers for common chronic diseases. OMICS 23: 607–614.

Malenica B (2005) Nespecifična i specifična imunost. Paediatr Croat 49 (Supl 1): 23-30.

Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM, Fischer PB, Dwek RA, i Sim RB (1995) Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. Nat Med 1: 237–243.

Manabe Y, Marchetti R, Takakura Y, Nagasaki M, Nihei W, Takebe T, i sur. (2019) The core fucose on an IgG antibody is an endogenous ligand of dectin-1. Angew Chem Int Ed Engl 58: 18697–18702.

Marek KW, Vijay IK, i Marth JD (1999) A recessive deletion in the GlcNAc-1-phosphotransferase gene results in peri-implantation embryonic lethality. Glycobiology 9: 1263–1271.

Marino M, Galluzzo P, i Ascenzi P (2006) Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. Curr Genomics 7: 497–508.

Market E i Papavasiliou FN (2003) V(D)J Recombination and the evolution of the adaptive immune system. PLOS Biology 1: e16.

Martin TC, Šimurina M, Ząbczyńska M, Kavur MM, Rydlewska M, Pezer M, i sur. (2020) Decreased IgG core fucosylation, a player in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, is associated with autoimmune thyroid diseases. Mol Cell Proteomics 19(5): 774-792.

Martin WL, West AP, Gan L, i Bjorkman PJ (2001) Crystal structure at 2.8 Å of an FcRn/heterodimeric Fc complex: mechanism of pH-dependent binding. Mol Cell 7: 867–877.

Masuda K, Kubota T, Kaneko E, Iida S, Wakitani M, Kobayashi-Natsume Y, i sur. (2007) Enhanced binding affinity for FcgammaRIIIa of fucose-negative antibody is sufficient to induce maximal antibody-dependent cellular cytotoxicity. Mol Immunol 44: 3122–3131.

McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P, i Florin TH (2011) Mucin dynamics and enteric pathogens. Nat Rev Microbiol 9: 265–278.

Medvedová L i Farkas R (2004) Hormonal control of protein glycosylation: role of steroids and related lipophilic ligands. Endocr Regul 38(2): 65–79.

Menazza S i Murphy E (2016) The expanding complexity of estrogen receptorsignaling in the cardiovascular system. Circ Res 118: 994–1007.

Mihm M, Gangooly S, i Muttukrishna S (2011) The normal menstrual cycle in women. Anim Reprod Sci 124: 229–236.

Mijakovac A, Jurić J, Kohrt WM, Krištić J, Kifer D, Gavin KM, i sur. (2021) Effects of estradiol on immunoglobulin G glycosylation: mapping of the downstream signalling mechanism. Front Immunol 12 : In press.

Miyoshi E, Shinzaki S, Fujii H, Iijima H, Kamada Y, i Takehara T (2015) Role of aberrant IgG glycosylation in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Proteon Clin Appl 10: 4.

Möckl L (2020) The emerging role of the mammalian glycocalyx in functional membrane organization and immune system regulation. Front Cell Dev Biol 8: 253.

Modi PK, Faiena I, i Kim IY (2016) Chapter 3 - Androgen receptor. In Book: Prostate cancer, 2nd Edition. Academic Press, San Diego: 21–28.

Moore JS, Wu X, Kulhavy R, Tomana M, Novak J, Moldoveanu Z, i sur. (2005) Increased levels of galactose-deficient IgG in sera of HIV-1-infected individuals. AIDS 19: 381–389.

Moremen KW, Tiemeyer M, i Nairn AV (2012) Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. Nat Rev Mol Cell Biol 13: 448–462.

Mote PA, Graham JD, i Clarke CL (2007) Progesterone receptor isoforms in normal and malignant breast. Ernst Schering Found Symp Proc: 77–107.

Moulton VR (2018) Sex hormones in acquired immunity and autoimmune disease. Front Immunol 9: 2279.

Munkley J (2017) Glycosylation is a global target for androgen control in prostate cancer cells. Endocr Relat Cancer 24: R49–R64.

Munkley J, Vodak D, Livermore KE, James K, Wilson BT, Knight B, i sur. (2016) Glycosylation is an androgen-regulated process essential for prostate cancer cell viability. EBioMedicine 8: 103–116.

Narimatsu H (2006) Human glycogene cloning: focus on beta 3-glycosyltransferase and beta 4-glycosyltransferase families. Curr Opin Struct Biol 16: 567–575.

Ng BG i Freeze HH (2018) Perspectives on glycosylation and its congenital disorders. Trends Genet 34: 466–476.

Ngo ST, Steyn FJ, i McCombe PA (2014) Gender differences in autoimmune disease. Front Neuroendocrin 35: 347–369.

Nikolac Perkovic M, Pucic Bakovic M, Kristic J, Novokmet M, Huffman JE, Vitart V, i sur. (2014) The association between galactosylation of immunoglobulin G and body mass index. Progress Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 48: 20–25.

Nimmerjahn F i Ravetch JV (2007a) Fc-receptors as regulators of immunity. Adv Immunol 96: 179–204.

Nimmerjahn F i Ravetch JV (2007b) The antiinflammatory activity of IgG: the intravenous IgG paradox. J Exp Med 204: 11.

Nimmerjahn F i Ravetch JV (2008) Fcgamma receptors as regulators of immune responses. Nat Rev Immunol 8: 34–47.

Nott SL, Huang Y, Li X, Fluharty BR, Qiu X, Welshons WV, i sur. (2009) Genomic responses from the estrogen-responsive element-dependent signaling pathway mediated by estrogen receptor alpha are required to elicit cellular alterations. J Biol Chem 284: 15277–15288.

Oertelt-Prigione S (2012) Immunology and the menstrual cycle. Autoimmun Rev 11: A486-492.

Ohtsubo K i Marth JD (2006) Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. Cell 126: 855–867.

Parekh R, Roitt I, Isenberg D, Dwek R, i Rademacher T (1988) Age-related galactosylation of the N-linked oligosaccharides of human serum IgG. J Exp Med 167: 1731–1736.

Paul S i Lal G (2017) The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. Front Immunol 8: 1124.

Payne AH i Hales DB (2004) Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. Endocr Rev 25: 947–970.

Peschke B, Keller CW, Weber P, Quast I, i Lünemann JD (2017) Fc-galactosylation of human immunoglobulin gamma isotypes improves C1q binding and enhances complement-dependent cytotoxicity. Front Immunol 8: 646.

Pi M, Parrill AL, i Quarles LD (2010) GPRC6A mediates the non-genomic effects of steroids. J Biol Chem 285: 39953–39964.

Picard D (2006) Chaperoning steroid hormone action. Trends Endocrinol Metab 17: 229–235.

Pincetic A, Bournazos S, DiLillo DJ, Maamary J, Wang TT, Dahan R, i sur. (2014) Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. Nat Immunol 15: 707–716.

Pincetic A, Maamary J, i Ravetch JV (2021) Therapeutic applications of sialylated IVIG. In Book: Glycoscience: Biology and Medicine. Springer Japan, Tokyo: 1–7.

Plomp R, Ruhaak LR, Uh H-W, Reiding KR, Selman M, Houwing-Duistermaat JJ, i sur. (2017) Subclass-specific IgG glycosylation is associated with markers of inflammation and metabolic health. Sci Rep 7: 12325.

Prados MB, La Blunda J, Szekeres-Bartho J, Caramelo J, i Miranda S (2011) Progesterone induces a switch in oligosaccharyltransferase isoform expression: consequences on IgG N-glycosylation. Immunol Lett 137: 28–37.

Pučić M, Knežević A, Vidič J, Adamczyk B, Novokmet M, Polašek O, i sur. (2011) High Throughput isolation and glycosylation analysis of IgG–variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. Mol Cell Proteomics 10.

Pucic Bakovic M, Muzinic A, Novokmet M, Skledar M, Pivac N, Lauc G, i sur. (2012) Changes in plasma and IgG N-glycome during childhood and adolescence. Glycobiology 22: 975–982.

Quast I, Peschke B, i Lünemann JD (2017) Regulation of antibody effector functions through IgG Fc N-glycosylation. Cell Mol Life Sci 74: 837–847.

Raju TS, Briggs JB, Chamow SM, Winkler ME, i Jones AJ (2001) Glycoengineering of therapeutic glycoproteins: in vitro galactosylation and sialylation of glycoproteins with terminal N-acetylglucosamine and galactose residues. Biochemistry 40: 8868–8876.

Reed BG i Carr BR (2000) The normal menstrual cycle and the control of ovulation. In Endotext: MDText.com Inc., South Dartmouth, MA, USA.

Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, i Novak J (2019) Glycosylation in health and disease. Nat Rev Nephrol 15: 346–366.

Ribeiro RC, Kushner PJ, i Baxter JD (1995) The nuclear hormone receptor gene superfamily. Annu Rev Med 46: 443–453.

Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, i Lambris JD (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. Nat Immunol 11: 785–797.

Rook GA, Steele J, Brealey R, Whyte A, Isenberg D, Sumar N, i sur. (1991) Changes in IgG glycoform levels are associated with remission of arthritis during pregnancy. J Autoimmun 4: 779–794.

Roopenian DC i Akilesh S (2007) FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. Nat Rev Immunol 7: 715–725.

Roth DB (2014) V(D)J Recombination: mechanism, errors and fidelity. Microbiol Spectr 2(6): 10.

Ruiz-Cortés ZT (2012) Gonadal sex steroids: production, action and interactions in mammals. In e-Book: Steroids - from physiology to clinical medicine.

Russell A, Kepka A, Trbojevic Akmacic I, Ugrina I, Song M, Hui J, i sur. (2018a) Increased central adiposity is associated with pro-inflammatory immunoglobulin G N-glycans. Immunobiol 224.

Russell A, Adua E, Ugrina I, Laws S, i Wang W (2018b) Unravelling immunoglobulin G Fc N-glycosylation: a dynamic marker potentiating predictive, preventive and personalised Medicine. Int J Mol Sci 19.

Safaeian M, Kemp T, Falk RT, Rodriguez AC, Hildesheim A, Williams M, i sur. (2009) Determinants and correlation of systemic and cervical concentrations of total IgA and IgG. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 18: 2672–2676.

Saville B, Wormke M, Wang F, Nguyen T, Enmark E, Kuiper G, i sur. (2000) Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. J Biol Chem 275: 5379–5387.

Schroeder HW i Cavacini L (2010) Structure and function of immunoglobulins. J Allergy Clin Immunol 125: S41-52.

Schwab I i Nimmerjahn F (2013) Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? Nat Rev Immunol 13: 176–189.

Seeling M, Brückner C, i Nimmerjahn F (2017) Differential antibody glycosylation in autoimmunity: sweet biomarker or modulator of disease activity? Nat Rev Rheumatol 13: 621–630.

Selby C (1990) Sex hormone binding globulin: origin, function and clinical significance. Ann Clin Biochem 27 (6): 532–541.

Selman MHJ, Derks RJE, Bondt A, Palmblad M, Schoenmaker B, Koeleman CAM, i sur. (2012) Fc specific IgG glycosylation profiling by robust nano-reverse phase HPLC-MS using a sheath-flow ESI sprayer interface. J Proteomics 75: 1318–1329.

Shah NM, Lai PF, Imami N, i Johnson MR (2019) Progesterone-related immune modulation of pregnancy and labor. Front Endocrinol 10: 198.

Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, i sur. (2002) Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcgamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. J Biol Chem 277: 26733–26740.

Simpson ER (2002) Aromatization of androgens in women: current concepts and findings. Fertil Steril 77 Suppl 4: S6-10.

Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Jones M, i sur. (2000) The role of local estrogen biosynthesis in males and females. Trends Endocrinol Metab 11: 184–188.

Šimunić V (2012) Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost - Medicinski pomognuta oplodnja IVF. Školska knjiga, Zagreb.

Šimurina M, de Haan N, Vučković F, Kennedy NA, Štambuk J, Falck D, i sur. (2018) Glycosylation of immunoglobulin G associates with clinical features of inflammatory bowel diseases. Gastroenterology 154: 1320-1333.e10.

Singh SS, Heijmans R, Meulen CKE, Lieverse AG, Gornik O, Sijbrands EJG, i sur. (2020) Association of the IgG N-glycome with the course of kidney function in type 2 diabetes. BMJ Open Diabetes Res Care 8: e001026.

Sjöwall C, Zapf J, von Löhneysen S, Magorivska I, Biermann M, Janko C, i sur. (2015) Altered glycosylation of complexed native IgG molecules is associated with disease activity of systemic lupus erythematosus. Lupus 24: 569–581.

Sola RJ i Griebenow K (2009) Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. J Pharm Sci 98: 1223–1245.

Sommer S i Fuqua SA (2001) Estrogen receptor and breast cancer. Semin Cancer Biol 11: 339–352.

Sowers MF, Beebe JL, McConnell D, Randolph J, i Jannausch M (2001) Testosterone concentrations in women aged 25–50 years: associations with lifestyle, body composition, and ovarian status. Am J Epidemiol 153: 256–264.

Speroff L i Fritz MA (2005) Clinical gynecologic endocrinology and infertility. 7th Edition Lippincott Williams & Wilkins.

Štambuk J, Nakić N, Vučković F, Pučić-Baković M, Razdorov G, Trbojević-Akmačić I, i sur. (2020a) Global variability of the human IgG glycome. Aging (Albany NY) 12: 15222–15259.

Štambuk T, Klasić M, Zoldoš V, i Lauc G (2020b) N-glycans as functional effectors of genetic and epigenetic disease risk. Mol Asp Med: 100891.

Stocco DM (2000) The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. J Endocrinol 164: 247–253.

Strauss JF, Modi B, i McAllister JM (2014) Chapter 18 - Defects in ovarian steroid hormone biosynthesis. In Book: Cellular Endocrinology in Health and Disease. Academic Press, Boston: 285–309.

Stricker R, Eberhart R, Chevailler M-C, Quinn FA, Bischof P, i Stricker R (2006) Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott ARCHITECT analyzer. Clin Chem Lab Med 44: 883–887.

Su Z, Xie Q, Wang Y, i Li Y (2020) Abberant Immunoglobulin G glycosylation in rheumatoid arthritis by LTQ-ESI-MS. Int J Mol Sci 21.

Sutton BJ, Beavil RL, i Beavil AJ (2003) Capter 8 - Immunoglobulin–Fc receptor interactions. In Book: Handbook of Cell Signaling. Academic Press, Burlington: 45–49.

Svartberg J, Jenssen T, Sundsfjord J, i Jorde R (2004) The associations of endogenous testosterone and sex hormone-binding globulin with glycosylated hemoglobin levels, in community dwelling men. The Tromsø Study. Diabetes Metab 30: 29–34.

de Taeye SW, Rispens T, i Vidarsson G (2019) The ligands for human IgG and their effector functions. Antibodies (Basel) 8.

Tan H, Yi L, Rote NS, Hurd WW, i Mesiano S (2012) Progesterone receptor-A and -B have opposite effects on proinflammatory gene expression in human myometrial cells: implications for progesterone actions in human pregnancy and parturition. J Clin Endocrinol Metab 97: E719-730.

Taneja V (2018) Sex hormones determine immune response. Front Immunol 9: 1931.

Taniguchi N, Endo T, Hart GW, Seeberger PH, i Wong CH (2015) Glycoscience: Biology and Medicine. Springer Japan.

Temming AR, Dekkers G, van de Bovenkamp FS, Plomp HR, Bentlage AEH, Szittner Z, i sur. (2019) Human DC-SIGN and CD23 do not interact with human IgG. Sci Rep 9: 9995.

The Consortium for Functional Glycomics (2012) Symbol and text nomenclature for representation of glycan structure.

Thomas MP i Potter BVL (2013) The structural biology of oestrogen metabolism. J Steroid Biochem Mol Biol 137: 27–49.

Trbojević-Akmačić I, Vučković F, Vilaj M, Skelin A, Karssen LC, Krištić J, i sur. (2019) Plasma N-glycome composition associates with chronic low back pain. Biochim Biophys Acta - Gen Subj 1862: 2124–2133.

Tsai MJ i O'Malley BW (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. Annu. Rev. Biochem. 63: 451–486.

Tsuchiya S, Aoki NP, Shinmachi D, Matsubara M, Yamada I, Aoki-Kinoshita KF, i sur. (2017) Implementation of GlycanBuilder to draw a wide variety of ambiguous glycans. Carbohydr Res 445: 104–116.

Tung L, Abdel-Hafiz H, Shen T, Harvell DME, Nitao LK, Richer JK, i sur. (2006) Progesterone receptors (PR)-B and -A regulate transcription by different mechanisms: AF-3 exerts regulatory control over coactivator binding to PR-B. Mol Endocrinol 20: 2656–2670.

Vardanyan R i Hruby V (2016) Chapter 27 - Steroid Hormones. In Book: Synthesis of Best-Seller Drugs. Academic Press, Boston: 459–493.

Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M i sur (2015) Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).

Varki A (2017) Biological roles of glycans. Glycobiology 27: 3–49.

Vidarsson G, Dekkers G, i Rispens T (2014) IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. Front Immunol 5: 520.

Vučković F, Krištić J, Gudelj I, Teruel M, Keser T, Pezer M, i sur. (2015) Association of systemic lupus erythematosus with decreased immunosuppressive potential of the IgG glycome. Arthritis Rheumatol 67: 2978–2989.

Vučković F, Theodoratou E, Thaçi K, Timofeeva M, Vojta A, Štambuk J, i sur. (2016) IgG glycome in colorectal cancer. Clin Cancer Res 22: 3078–3086.

Wahl A, Kasela S, Carnero-Montoro E, van Iterson M, Štambuk J, Sharma S, i sur. (2018) IgG glycosylation and DNA methylation are interconnected with smoking. Biochim Biophys Acta Gen Subj 1862: 637–648.

Waller K, Swan SH, Windham GC, Fenster L, Elkin EP, i Lasley BL (1998) Use of urine biomarkers to evaluate menstrual function in healthy premenopausal women. Am J Epidemiol 147: 1071–1080.

Wallis R (2002) Structural and functional aspects of complement activation by mannose-binding protein. Immunobiology 205: 433–445.

Wang H, Li X, Wang X, Liu D, Zhang X, Cao W, i sur. (2019) Next-generation (glycomic) biomarkers for cardiometabolic health: a community-based study of immunoglobulin G N-glycans in a Chinese Han population. OMICS 23: 649–659.

Weis WI, Drickamer K, i Hendrickson WA (1992) Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. Nature 360: 127–134.

Whitacre CC (2001) Sex differences in autoimmune disease. Nat Immunol 2: 777–780.

Whitacre CC, Reingold SC, i O'Looney PA (1999) A gender gap in autoimmunity. Science 283: 1277–1278.

Wieczorek M, Braicu EI, Oliveira-Ferrer L, Sehouli J, i Blanchard V (2020) Immunoglobulin G subclass-specific glycosylation changes in primary epithelial ovarian cancer. Front Immunol 11.

Wilhelmson AS, Lantero Rodriguez M, Stubelius A, Fogelstrand P, Johansson I, Buechler MB, i sur. (2018) Testosterone is an endogenous regulator of BAFF and splenic B cell number. Nat Commun 9: 2067.

Wright A, Tao MH, Kabat EA, i Morrison SL (1991) Antibody variable region glycosylation: position effects on antigen binding and carbohydrate structure. EMBO J 10: 2717–2723.

Wu Z, Li H, Liu D, Tao L, Zhang J, Liang B, i sur. (2020) IgG glycosylation profile and the glycan score are associated with Type 2 diabetes in independent Chinese populations: A case-control study. J Diabetes Res 2020: 5041346.

Wuhrer M, Selman MHJ, McDonnell LA, Kümpfel T, Derfuss T, Khademi M, i sur. (2015) Pro-inflammatory pattern of IgG1 Fc glycosylation in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. J Neuroinflammation 12: 235.

Yamada E, Tsukamoto Y, Sasaki R, Yagyu K, i Takahashi N (1997) Structural changes of immunoglobulin G oligosaccharides with age in healthy human serum. Glycoconj J 14: 401–405.

Zoldoš V, Grgurević S, i Lauc G (2010) Epigenetic regulation of protein glycosylation. Biomol Concepts 1: 253–261.

Zoldoš V, Novokmet M, Bečeheli I, i Lauc G (2013) Genomics and epigenomics of the human glycome. Glycoconj J 30: 41–50.

8 POPIS KRATICA

2-AB – 2-aminobenzamid

ACAT – acil-koenzim A kolesterol transferaza, engl. *acyl-CoA cholesterol acyltransferase*

ADCC – stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima, engl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*

ADCP – fagocitoza ovisna o protutijelima, engl. *antibody-dependent cellular phagocytosis*

AP-1 – aktivacijski protein 1, engl. *activator protein 1*

APC – antigen prezentirajuća stanica, engl. *antigen presenting cell*

AR – androgeni receptor, engl. *androgen receptor*

Asn – asparagin

B – račvajući *N*-acetilglukozamin (N-glikani s račvajućim *N*-acetilglukozaminom)

B4GALT1 – β-1,4-galaktoziltransferaza, engl. *β-1,4-galactosyltransferase 1*

cAMP – ciklički adenozin monofosfat, engl. *cyclic adenosine monophosphate*

CDC – citotoksičnost ovisna o komplementu, engl. *complement dependent cytotoxicity*

CDG – kongenitalni poremećaj glikozilacije, engl. *congenital disorders of glycosylation*

CMP – citozin monofosfat

DA – dopamin

DAR – dopaminski receptor, engl. *dopamine receptor*

DBD – domena koja veže DNA, engl. *DNA-binding domain*

DC-SIGN – međustanična adhezijska neintegrin vezujuća molekula 3 specifična za dendritičke stanice, engl. *dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin*

DECTIN-1 – dendritički lektinski receptor 1 tipa C, engl. *dendritic cell-associated C-type lectin 1*

DHEA – dihidroepiandrosteron

DHT – dihidrotestosteron

E – estrogen

E2 – 17*β*-estradiol

EGF – epidermalni faktor rasta, engl. *epidermal growth factor*

EGFR – receptor epidermalnog faktora rasta, engl. *epidermal growth factor receptor*

ER – endoplazmatski retikulum, engl. *endoplasmic reticulum*

ERE – DNA slijed koji reagira na estrogen, engl. *estrogen response element*

ER-IP – protein koji je povezan s estrogenskim receptorom, engl. *estrogen receptor interacting protein*

ER-α – estrogenski receptor alfa, engl. *estrogen receptor alpha*

ER-β – estrogenski recptor beta, engl. *estrogen receptor beta*

F – fukozilacija (N-glikani sa sržnom fukozom)

Fab – fragment koji veže antigen, engl. *Fragment antigen binding*

Fc – fragment koji kristalizira, engl. *Fragment crystallizable*

FcRn – neonatalni Fc receptor, engl. *neonatal Fragment crystallizable receptor*

FcγR – Fc gamma receptor, engl. *Fragment crystallizable gamma receptor*

FSH – folikulostimulirajući hormon, engl. *follicle-stimulating hormone*

G0 – agalaktozilacija (N-glikani bez galaktoze)

G1 – monogalaktozilacija (N-glikani s jednom galaktozom)

G2 – digalaktozilacija (N-glikani s dvije galaktoze)

GA – Golgijev aparat, engl. *Golgi apparatus*

Gal – galaktoza

GDP – gvanidin difosfat

GlcNAc – *N*-acetilglukozamin

GnRH – gonadotropin otpuštajući hormon, engl. *gonadotropin-releasing hormone*

GP – glikanski pik, engl. *glycan peak*

GPR30 – estrogenski receptor 30 vezan za G-protein, engl. *G-protein coupled receptor 30*

HILIC-UPLC – tekućinska kromatografija ultravisoke učinkovitosti temeljena na hidrofilnim interakcijama, engl. *hydrophilic interaction ultra-performance liquid chromatography*

HILIC-SPE – tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama uz ekstrakciju na čvrstoj fazi, engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography – solid phase extraction*

HPO – os hipotalamus-hipofiza-jajnici, engl. *hypothalamic-pituitary-ovarian axis*

HRE – element hormonskog odgovora, engl. *hormone response element*

HSD – hidroksisteroid dehidrogenaza

Hsp90 – protein toplinskog stresa 90, engl. *heat shock protein 90*

IFN-γ – interferon gamma, engl. *interferone gamma*

iGF – faktor rasta sličan inzulinu, engl. *insulin-like growth factor*

IGFR – receptor faktora rasta sličan inzulinu, engl. *insulin-like growth factor receptor*

IgG – imunoglobulin G

ITAM – tirozinska aktivacijska sekvenca imunoreceptora, engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

ITIM – tirozinska inhibicijska sekvenca imunoreceptora, engl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*

LBD – domena koja veže ligand, engl. *ligand-binding domain*

LDL – lipoproteini niske gustoće, engl. *low density lipoprotein*

LH – luteinizirajući hormon, engl. *luteinizing hormone*

MAC – kompleks za napad membrane, engl. *membrane attack complex*

MBL – lektin za vezanje manoze, engl. *mannose-binding lectin*

MC – menstruacijski ciklus, engl. *menstrual cycle*

mER – membranski estrogenski receptor, engl. *membrane estrogen receptor*

MHC – molekule glavnog sustava tkivne podudarnosti I, engl. *major histocompatibility complex I*

mPR – membranski proteinski receptor, engl. *membrane progesterone receptor*

NHR – nuklearni (jezgrin) hormonski receptor, engl. *nuclear hormone receptor*

NK stanice – prirodno ubojite stanice, engl. *natural killer cells*

P – progesteron

PAMP – molekularni obrazac povezan s patogenom, engl. *pathogen-associated molecular pattern*

PR – proteinski receptor, engl. *progesterone receptor*

PRMC – membranska komponenta progesteronskog receptora, engl. *progesterone receptor membrane component*

Pro – prolin

PTM – posttranslacijska modifikacija, engl. *post-translational modification*

S – sijalinizacija (N-glikani sa sijalinskom kiselinom)

Ser – serin

SHBG – globulin koji veže spolne hormone, engl. *sex hormone binding globulin*

SP-1 – protein specifičnosti 1, engl. *specificity protein 1*

ST6GAL1 – β-galaktozamid α-2,6-sijaliltransferaza 1

StAR – steroidogeni akutni regulatorni protein engl. *steroid acute regulatory protein*

T – testosteron

TAF – domena za aktivaciju transkripcije, engl. *transcription activation function*

TF – transkripcijski faktor, engl. *transcription factor*

Th1 – pomagački T limfociti 1, engl. *T helper lymphocites 1*

Th2 – pomagački T limfociti 2, engl. *T helper lymphocites 2*

Thr – treonin

TNF-α – faktor nekroze tumora alfa, engl. *tumor necrosis factor alpha*

UDP – uridin difosfat

9 PRILOZI

Upitnik 1

Dio A: Osnovne informacije

1. Ime:
2. Broj:
3. Datum rođenja:
4. Nacionalnost:
5. Visina (cm): Težina (kg):
6. Opseg struka (cm): Opseg bokova (cm):
7. Zanimanje

   ① Rad u tvrtki, ②Studentica, ③Farmerica, ④Medicinsko osoblje, ⑤Umirovljenica, ⑥Ostalo
8. Obrazovanje

   ①Osnovna škola, ②Niža srednja škola , ③Viša srednja škola, ④Fakultet i više
9. Bračni status

   ①Neudana, ②Udana, ③Razvedena, ④Udovica
10. Pušenje ①Da ②Ne
11. Pijenje alkohola ①Da ②Ne

Dio B: Zdravstveno stanje i menstruacijski ciklus

1. Povijest poroda

   Trudnoća (koliko puta): Porodi (koliko puta):

   Pobačaj (koliko puta):
2. Zdravi u zadnjih 12 mjeseci? ①Da ②Ne

   Ako NE:

   Bolest/Pobolijevanje: Trajanje:

   Datum početka: Datum završetka:
3. Dob prve menstruacije (godine):
4. Redoviti menstruacijski ciklus ①Da ②Ne

5. Prosječni menstruacijski ciklus (dani):

6. Prosječne menstruacije (dani):

Dio C: Naknadne informacije o menstruacijskim ciklusima

1. Datum vađenja krvi:

2. Zdravi? ① Da ② Ne

   Ako NE:

   Bolest/Pobolijevanje: Trajanje：

   Datum početka: Datum završetka:

3. 1. dan menstruacije u prošlom mjesecu:

4. 1. dan menstruacije u ovom mjesecu:

5. Korištenje oralnih kontraceptiva? ① Da ② Ne

6. Korištenje hormonske terapije? ① Da ② Ne

7. Korištenje ostalih lijekova? ① Da ② Ne

   Ako DA

   Kojih?

   Datum početka: Datum završetka:

Upitnik 2

Dio A: Osnovne informacije

1. ID (identifiacijski broj):
2. Pušenje ① Da ② Ne
3. Pijenje alkohola ① Da ② Ne

Part B: Naknadne informacije

1. Datum vađenja krvi:
2. Zdravi? ① Da ② Ne

   Ako NE:

   Bolest/Pobolijevanje: Trajanje :

   Datum početka: Datum završetka :
3. 1. dan menstruacije u prošlom mjesecu:
4. 1. dan menstruacije u ovom mjesecu:
5. Korištenje oralnih kontraceptiva? ① Da ② Ne
6. Korištenje hormonske terapije? ① Da ② Ne
7. Korištenje ostalih lijekova? ① Da ② Ne

   Ako DA

   Kojih?

   Datum početka: Datum završetka:

Research Paper

Effects of estradiol on biological age measured using the glycan age index

Julija Jurić[1], Wendy M. Kohrt[2,3], Domagoj Kifer[4], Kathleen M Gavin[2,3], Marija Pezer[1], Peter A. Nigrovic[5,6], Gordan Lauc[1,4]

[1]Genos Glycoscience Research Laboratory, Zagreb, Croatia
[2]Division of Geriatric Medicine, School of Medicine, University of Colorado Anschutz Medical Campus, Aurora, CO 80045, USA
[3]Eastern Colorado VA Geriatric Research, Education and Clinical Center, Aurora, CO 80445, USA
[4]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia
[5]Division of Rheumatology, Inflammation, and Immunity, Brigham and Women´s Hospital, Boston, MA 02115, USA
[6]Division of Immunology, Boston Children´s Hospital, Boston, MA 02115, USA

Correspondence to: Gordan Lauc; **email:** glauc@pharma.hr
Keywords: biological age, glycan age, estrogen, aging biomarkers, glycosylation
Received: June 26, 2020 **Accepted:** August 25, 2020 **Published:** October 13, 2020

Copyright: © 2020 Jurić et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Glycan age is a recently developed biomarker based on glycans attached to immunoglobulin G (IgG). In large population cohorts, glycan age associates well with lifestyle and disease-risk biomarkers, while some studies suggested that glycan changes precede development of several age-associated diseases. In this study we evaluated effects of estrogen on the glycan age. Gonadal hormones were suppressed in 36 healthy young women by gonadotropin releasing hormone agonist therapy for 6 months. In 15 of them estradiol was supplemented, while 21 received placebo resulting in very low estrogen levels during intervention. IgG was isolated from plasma samples before intervention, after 6 months of intervention and after subsequent 4month recovery. Deprivation of gonadal hormones resulted in median increase of glycan age for 9.1 years (IQR 6.8 – 11.5 years, $p = 3.73 \times 10^{-8}$), which was completely prevented by transdermal estradiol therapy (change in glycan age = -0.23 years, IQR (-2.20 – 2.98). After the recovery period glycan age returned to baseline values in both groups. These results suggest that IgG glycans and consequently also the glycan age are under strong influence of gonadal hormones and that estradiol therapy can prevent the increase of glycan age that occurs in the perimenopausal period.

INTRODUCTION

The existence of inter-individual differences in the pace of biological aging is an intriguing concept that tries to explain why some people stay healthy until very late chronological age, while other people age faster and have a shorter life expectancy. A number of biomarkers aimed at an objective estimation of biological age have been developed in the past several years, one of them being the glycan age, which is based on analyzing glycans attached to immunoglobulin G (IgG) [1]. A key feature of a good biomarker of biological age is that the difference between chronological and biological age should correlate with known biomarkers of an unhealthy lifestyle and that increased biological age should predict future disease development. Glycans attached to IgG change significantly with age [1] and have been suggested as a promising biomarker of biological age [2]. Furthermore, since glycosylation affects interactions between IgG and different Fcγ receptors and other ligands, changes in glycosylation have direct effects on the function of the immune system [3], with multiple functional implications.

The decrease in IgG galactosylation was first reported over 35 years ago in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis [4]. This was subsequently confirmed in multiple studies, which also reported that it not only associated with disease activity and progression, but also predicted response to therapy and preceded the development of the disease for up to several years [5]. Decreased IgG galactosylation was reported to associate with many other autoimmune diseases including juvenile onset rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, Crohn's disease, ulcerative colitis, Sjögren's syndrome, neonatal lupus, coeliac disease and myasthenia gravis [6]. Most of the studies related to IgG glycosylation alterations during aging reported that early adulthood IgG glycosylation is characterized by the highest abundance of digalactosylated and the lowest amount of agalactosylated structures, and with aging a decrease in galactosylation and an increase in agalactosylation can be seen [6]. IgG glycans have been shown to be a reliable biomarker of aging that explained up to 64% of variation in chronological age [1, 7]. However, IgG glycans are not only biomarkers but also functional effectors that participate in the process of aging. According to the inflammaging concept, the agerelated gradual decrease in IgG galactosylation level due to chronic low-grade sterile inflammation in the elderly exacerbates inflammation, creating a feedback loop in which the agalactosylated IgG species represent both a biomarker of aging and a contributor to its pathogenesis [8, 9].

Large population studies [1, 10] and our recent study of an intervention cohort suggest that estrogens regulates IgG glycosylation [11], which may explain why IgG glycome in premenopausal females reflects apparent lower biological age. Unfortunately, the published estrogen intervention study was based on the analysis of glycans released from all proteins in the plasma proteome, thus it was not possible to reliably differentiate IgG glycans from glycans released from other proteins. This prevented the calculation of glycan age from the available data since glycan age is based on IgG glycans. Aiming to evaluate the effects of ovarian sex hormone suppression followed by estradiol supplementation on biological age measured by the glycan age we reanalysed samples from the same intervention study using state of the art glycoprofiling technology [12].

RESULTS

IgG glycosylation was analyzed in 36 healthy premenopausal women that were treated on an investigational basis with the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogue leuprolide to lower gonadal steroids to postmenopausal levels and then randomized to placebo or transdermal estradiol (Figure 1) [13]. Plasma samples were collected at baseline (T1), after five months of hormonal suppression by monthly leuprolide injections plus either estradiol or placebo patches (T2), and four months after the end of intervention

when natural hormonal cycling was restored (T3). The concentration of hormones at the baseline and differences from the baseline after intervention and after recovery timepoint are presented in Table 1.

Suppression of ovarian sex hormones production resulted in a median increase of glycan age by 9.1 years, which was completely abolished by estradiol therapy (Figure 2, Table 2). Both the extent of change in hormone levels (Table 1) and the extent of change in glycan age varied significantly, thus we wondered whether the estradiol baseline levels or the extent of changes in estradiol levels correlated with the extent of change in glycan age. The analysis did not reveal any statistically significant correlation between these two parameters (Figures 3A and 3B). Then we checked whether the change in glycan age correlated with baseline chronological age, baseline glycan age or the difference between chronological and glycan ages. Intuitively one would expect a larger increase in glycan age in chronologically younger women and indeed we observes an inverse correlation between the extent of change induced by suppression of gonadal hormones and age ($r = -0.54$, $p = 1.1x10^{-2}$, Figure 3E). Interestingly, much stronger correlation was observed for the initial glycan age ($r = -0.84$, $p = 1.57x10^{-6}$, Figure 3C) and the difference between glycan age and the chronological age ($r = -0,66$, $p = 1,07x10^{-3}$, Figure 3D) suggesting that low glycan age is strongly dependent on gonadal hormones.

DISCUSSION

One of the key requirements for an aging biomarker is that it is responsive to interventions that beneficially affect the biology of aging, but convincing evidence of this is still missing for any aging biomarker [14]. In this study, we showed that the removal of gonadal hormones resulted in a rapid increase of glycan age, which was completely prevented by estradiol treatment, a therapy proven to be of benefit to some perimenopausal women [15]. Glycan age is a measure of biological age that is based on the analysis of IgG glycosylation [16]. Glycans attached to IgG are functionally important because they regulate inflammation at multiple levels [17, 18] and are considered to be one of the important drivers of inflammaging [9]. IgG glycosylation was reported to correlate with numerous unhealthy states and conditions including serum levels of glucose, insulin, hemoglobin A1c, triglycerides, total cholesterol, low-density lipoprotein, high-density lipoprotein, fibrinogen, d-dimer, uric acid, creatinine, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and C reactive protein, as well as body mass index and waist circumference, systolic and diastolic blood pressure, smoking, hypertension, kidney function, diabetes and cardiovascular disease risk score [1, 19, 28, 20–27]. In addition, average heritability of the IgG glycome is estimated to be 55% [29, 30], which means the remaining variability is a result of environmental factors and different (patho)physiological variables related to age and lifestyle. However, the regulation and mechanisms underlying the age-related changes in IgG glycosylation remain mostly undiscovered, primarily due to the lack of research focusing on this question. Based on the results of many observational and molecular studies IgG glycans are proposed to play a role as both a biomarker and a functional contributor to the aging process, as well as to some age-related diseases. Here arises probably the most exciting aspect of the relationship between aging and IgG glycosylation: the potential of IgG glycans to distinguish between healthy and unhealthy aging, and to monitor the effect of introduced life-style changes on biological age.

Large studies of adult human populations indicated that IgG glycans without galactose and sialic acid that are the main component of the increased glycan age increase with the onset of menopause [1], while in girls they decrease with the onset of puberty [10, 31]. This indicated that estrogens may be relevant, but since many things change during puberty and menopause, the change in glycan age could not have been directly attributed to the change in estrogen concentration. In our study, suppression of gonadal hormones in premenopausal women resulted in a considerable

(median 9.1 glycan age years) increase in glycan age that was statistically highly significant. Moreover, the change was observed in all study participants that received placebo treatment, and treatment with estradiol was sufficient to completely prevent the increase in biological age.

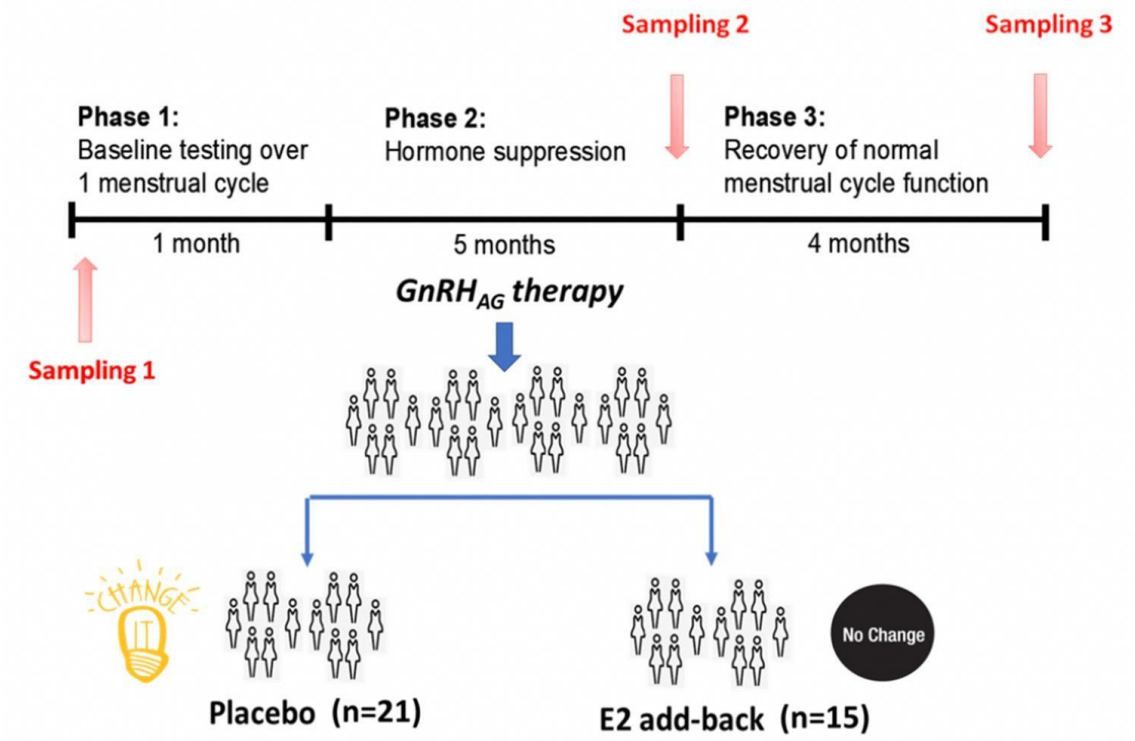


Figure 1. Design of the gonadal hormone suppression intervention study.

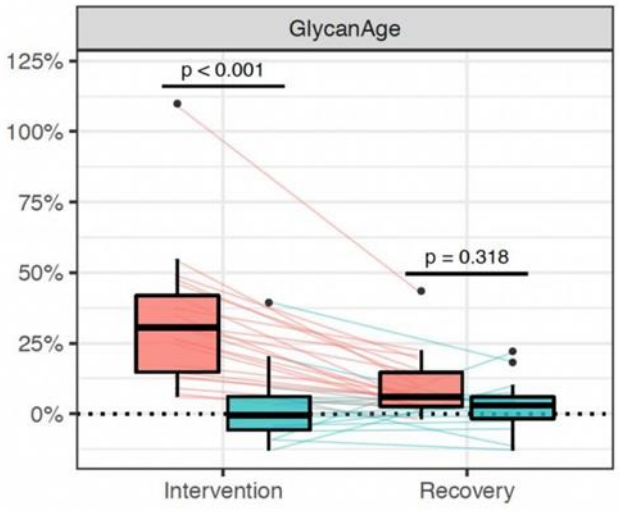


Figure 2. Box-plot of the distribution of changes in glycan age in 36 women undergoing gonadal hormone suppression for 6 months. Statistically significant increase in glycan age was observed in the placebo group (n = 25, red box), while supplementation with estradiol prevented this change (n = 15, blue box). Whiskers represent minimum and maximum value. Dots represent outliers.

Table 1. The concentration of hormones at baseline and differences from baseline after the intervention and at recovery.

Variable	Intervention	Concentration At baseline median (IQR)	Difference in concentration relative to baseline			
			Intervention median (IQR)	p_I	Recovery median (IQR)	p_R
estradiol ***pg/mL***	Placebo	54.0 (44.5 - 79.2)	-31.5 (-53.5 to -19.8)	0.001	-7.5 (-45.2 to 25.5)	0.989
	Estradiol	57 (46 - 78)	-15.0 (-35.0 to 29.5)		-1 (-32 to 30)	
estrone ***pg/mL***	Placebo	52 (37 - 67)	-19 (-32 to -11)	0.001	-1 (-16 to 13)	0.989
	Estradiol	55.0 (39.0 – 68.0)	3.0 (-10.5 to 20.0)		0.0 (-10.5 to 23.0)	
FSH ***mIU/mL***	Placebo	5.95 (4.40 - 8.02)	-1.10 (-3.35 to -0.05)	0.001	0.00 (-1.15 to 1.40)	0.471
	Estradiol	6.60 (4.95 - 9.15)	-5.10 (-7.25 to -3.05)		-1.85 (-3.03 to 0.45)	
LH ***mIU/mL***	Placebo	4.60 (3.55 - 5.10)	-4.00 (-4.88 to -2.88)	0.768	-0.700 (-1.450 to 0.725)	0.815
	Estradiol	4.90 (3.00 - 6.55)	-4.70 (-6.05 to -2.70)		-0.70 (-3.35 to 0.35)	
progesterone ***ng/mL***	Placebo	0.4 (0.3 - 0.7)	-0.1 (-0.4 to 0.0)	0.989	0.0 (-0.2 to 0.2)	0.760
	Estradiol	0.4 (0.3 - 0.6)	-0.1 (-0.2 to 0.0)		0.1 (-0.2 to 0.6)	
SHBG ***nmol/L***	Placebo	52 (30 - 63)	-8 (-16 to -2)	0.094	2 (-6 to 5)	0.760
	Estradiol	35.0 (29.5 - 54.0)	-2.0 (-6.5 to 8.5)		-1.0 (-5.0 to 1.5)	
testosterone ***ng/dL***	Placebo	28.0 (17.0 - 32.2)	-4.0 (-10.8 to 0.0)	0.760	0.0 (-2.0 to 6.9)	0.760
	Estradiol	29.0 (23.5 - 35.5)	-4.0 (-8.5 to 1.0)		0.0 (-3.0 to 7.0)	

p values describe statistical significance of difference between estradiol and placebo group after intervention (p_I) and recovery (p_R). p values smaller than 0.05 in bold.
IQR – limits of the interquartile range (1st quartile - 3rd quartile). FSH - Follicle-stimulating hormone;
LH - Luteinizing hormone; SHBG - sex hormone-binding globulin.

Table 2. Chronological age (years) at the baseline, and differences in glycan age relative to the baseline after the intervention and after recovery timepoint.

Intervention	Age (years) At baseline Median (IQR)	Difference in GLYCAN AGE (years) Relative to baseline. Sampling after:			
		Intervention Median (IQR)	P_i	Recovery Median (IQR)	P_r
PLACEBO (N = 21)	39.0(33.0 – 41.0)	9.10(6.83 - 11.52)		2.31(1.19 - 4.34)	
ESTRADIOL (N = 15)	38.0(29.5 – 43.5)		3.73□10-8		0.318
		-0.23(-2.20 - 2.98)		1.31(-0.81 - 2.88)	

p values describe statistical significance of difference between estradiol and placebo group after intervention (p_I) and recovery (p_R).

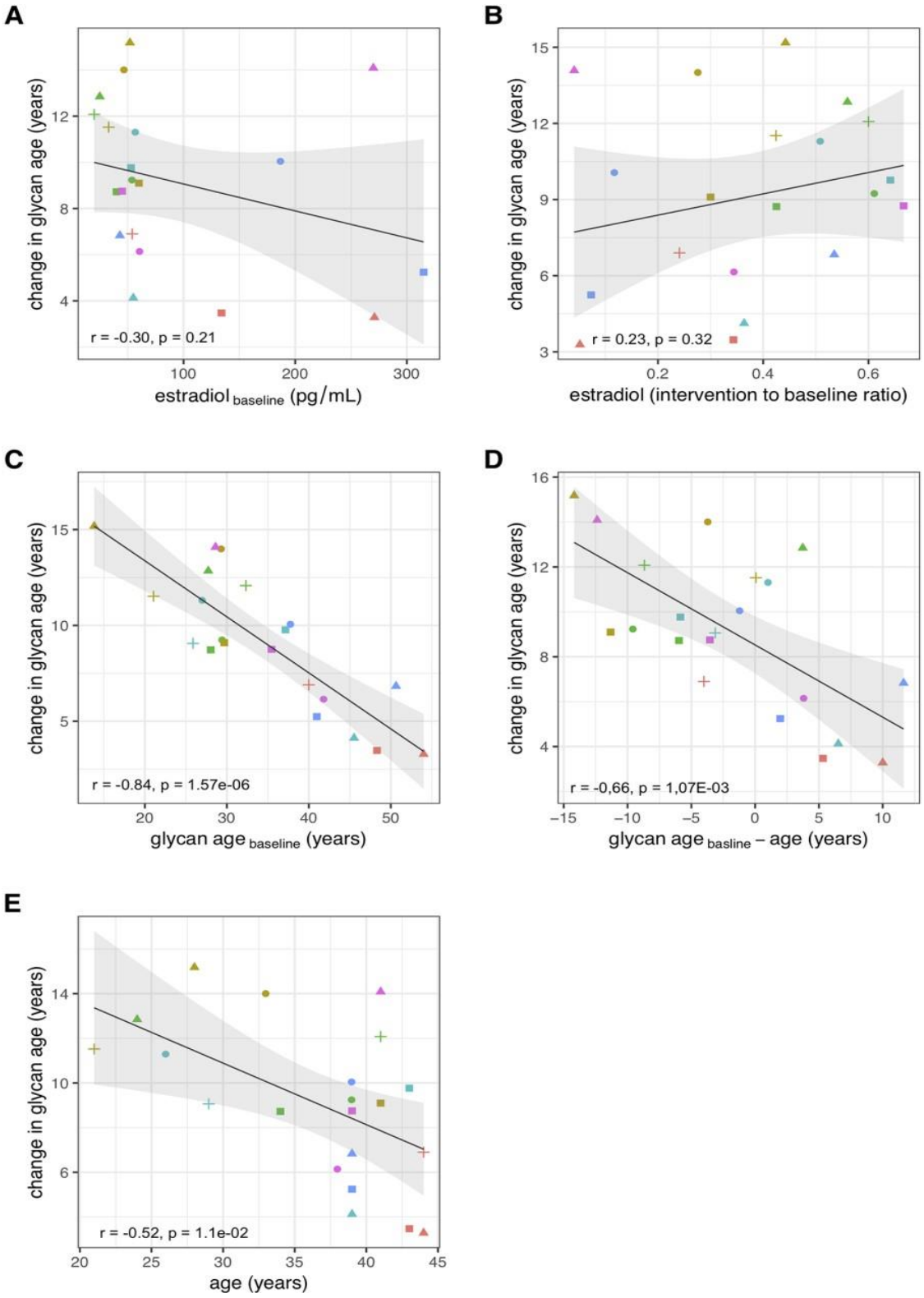


Figure 3. Correlations between the change in glycan age caused by gonadal hormone suppression and baseline estradiol concentration (**A**), change in estradiol concentration (**B**), glycan age (**C**), change in glycan age (**D**) and age (**E**).

The extent of changes in both hormone levels (Table 1) and glycan age (Figure 2) varied considerably between individual participants. Aiming to determine what contributed to the extent of change within each individual, we evaluated the associations of changes in glycan age levels with basal hormone levels, changes in hormone levels, basal glycan age level and the difference between glycan age and chronological age. We did not find a significant correlation between the change in glycan age and the baseline serum estradiol concentration or the change in serum estradiol concentration after the intervention, indicating importance of some other unknown potential confounders or mediators. However, both basal glycan age and the difference between chronological and glycan age were strongly inversely correlated with the change in glycan age. This suggests that, despite being evidently important, estradiol is only one of the factors that define the glycan age of an individual.

Despite extensive research, progress in the development of biomarkers that could reliably quantify inter-individual differences in aging is still limited [32]. One of the important elements that is still missing is the ability to change the biomarker with lifestyle changes or pharmacological interventions. Recently a modest improvement in epigenetic age was reported in a small group of individuals undertaking quite radical pharmacological intervention [33] and glycan age was shown to slightly improve by exercise [34]. However, all these changes were modest compared to the effects of the suppression of gonadal hormones, which more than doubled glycan age in some of the participants. Treatment with estradiol was sufficient to completely abolish this effect. It is intriguing to speculate that hormone treatment could also prevent the increase of glycan age that occurs around menopause, but this still needs to be investigated. Furthermore, since IgG glycosylation is a functionally relevant modification that regulates the immune system, this discovery opens the option to look for downstream pathways that may be a more specific target for therapy than broadly acting estrogens.

MATERIALS AND METHODS

Institutional approval

This study was conducted at the University of Colorado Anschutz Medical Campus (CU-AMC). Procedures followed were in accordance with the ethical standards of and approved by the Colorado Multiple Institutional Review Board (COMIRB) and the Scientific Advisory and Review Committee at the University of Colorado Anschutz Medical Campus (CU-AMC). The study was registered on ClinicalTrials.gov (NCT00687739) on May 28, 2008.

Participants and screening procedures

Participants were healthy eumenorrheic premenopausal women (n = 36). In accordance with the Declaration of Helsinki, volunteers provided written informed consent to participate, with the knowledge that the risks of the study included menopause-like effects (e.g., weight gain, bone loss, menopausal symptoms). Main inclusion criteria were age (25 to 49 y) and normal menstrual cycle function (no missed cycles in previous year, cycle length 28±5 d and confirmation of ovulatory status (ClearPlan Easy, Unipath Diagnostics, Waltham, MA). Exclusion criteria were pregnancy or lactation, use of hormonal contraception, oral glucocorticoids, or diabetes medications, smoking, or body mass index (BMI)>39 kg/m^2. Volunteers underwent screening procedures, as described previously [13].

Experimental design and study procedures

The parent trial was a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial to determine the effects of estradiol (E2) deficiency on body composition and energy expenditure, bone mineral density, components of energy expenditure and physical activity in premenopausal women [13, 35]. In short, all participants underwent suppression of ovarian sex hormones with gonadotropin releasing hormone agonist therapy ($GnRH_{AG}$, leuprolide acetate 3.75 mg, Lupron; TAP Pharmaceutical Products, Inc; Lake Forest, IL) in the form of monthly intramuscular injections. A single injection of leuprolide acetate produces an initial stimulation (for 1 to 3 wk) followed by a prolonged suppression of pituitary gonadotropins FSH and LH, while repeated monthly dosing suppresses ovarian hormone secretion [36]. The absence of pregnancy was confirmed by a urine pregnancy test before each dosing. After screening procedures were completed, eligible volunteers underwent baseline testing during the early folicular phase (days 2 to 6 after onset of menses) of the menstrual cycle. At the beginning of the next menstrual cycle participants began with 5-month $GnRH_{AG}$ therapy to chronically suppress ovarian function. Participants were randomized to receive either transdermal E2 0.075 mg/d (Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Berkeley, CA) or placebo patches ($GnRH_{AG}$+E2, n=15; $GnRH_{AG}$+PL, n=21). In order to reduce the risk of endometrial hyperplasia, but in the same time minimizing the exposure to progesterone, women randomized to E2 received medroxyprogesterone acetate (5mg/d, as a pill) for 12 days every other month (end of month 2 and 4, and after completion of followup testing). During these monthly visits, participants were under supervision of the research nurse practitioner. Participants were asked to report changes in use of medications or health (e.g., doctor visits, hospitalizations), as well as any study-related problems/ concerns over the past 4 weeks. The E_2 regimen was expected to maintain serum E2 concentrations in the mid-to-late follicular phase range (100 to 150 pg/mL).

Sample collection

Blood samples for sex hormones and glycans were collected in three timepoints: during baseline testing (T1), during week 20 of the hormonal intervention (T2), and at the spontaneous recovery of the normal menstrual cycle function (T3). A single sample (~5 mL) was obtained in the morning (~8 AM), after an overnight fast (at least 10 hours). Baseline samples were obtained immediately before the first $GnRH_{AG}$ injection. Serum was separated from each collected sample upon blood withdrawal and stored at -80°C until analysis.

Sex hormones

Collected sera were analyzed for numerous sex hormones. Estrone (E1), estradiol (E2) and progesterone (P) were determined by radioimmunoassay (RIA, Diagnostic Systems Lab, Webster, TX). Total testosterone (T) was analyzed by chemiluminescence immunoassay (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA) and sex hormone-binding globulin (SHBG) by immunoradiometric assay (Diagnostic Systems Laboratory).

N-glycosylation of immunoglobulin G

The whole procedure was performed according to already published protocol [29]. In short, IgG was isolated from sera samples by affinity chromatography using 96-well Protein G plate (BIA

Separations, Slovenia). The isolated IgG was denaturated with the addition of SDS (Invitrogen, USA) and incubation at 65°C. The excess of SDS was neutralized by the addition of Igepal-CA630 (Sigma-Aldrich, USA) and N-glycans were released with the addition of PNGase F (Promega, USA) in PBS buffer followed by overnight incubation at 37°C. The released glycans were fluorescently labelled with 2-AB (Merck, Germany). Free label and reducing agent were removed from the samples by using hydrophilic interaction liquid chromatography solid phase extraction (HILIC-SPE). IgG N-glycans were eluted with ultrapure water and stored at -20°C until use. Fluorescently labelled Nglycans were separated using HILIC on an Acquity UPLC H Class Instrument (Waters, USA) that consists of sample manager, quaternary solvent manager and fluorescence (FLR) detector. The instrument was under the control of Empower 3 software, build 3471 (Waters, USA). Labelled N-glycans were separated on an amide ACQUITY UPLC® Glycan BEH chromatography column (Waters, USA), 100 x 2.1 mm i.d., 1.7 μm BEH particles, with 100 mM ammonium formate, pH 4.4, as solvent A and 100% ACN as solvent B. Samples were kept at 10°C before injection, and separation was performed at 60°C. The separation method used a linear gradient of 25-38% solvent A at a flow rate of 0.40 mL/min in a 27 min analytical run. Fluorescently labelled N-glycans were detected by FLR detector with excitation and emission wavelengths set at 250 and 428 nm. Data processing included an automatic integration algorithm that was manually corrected to maintain the same intervals of integration for all the samples. IgG Nglycan samples were all separated into 24 chromatographic peaks. The relative amount of glycans in each chromatographic peak was expressed as the percentage of the total integrated area (% Area).

Statistical analysis

Area under chromatogram peaks was normalized to the total chromatogram area, then each glycan peak was logit transformed and batch corrected using ComBat method (R package 'sva') [37]. Data were back transformed, and derived glycan traits were calculated as a sum or ratio of selected directly measured glycan peaks based on particular glycosylation features (i.e. sialylation or fucosylation). GlycanAge was calculated according to Krištić et al. [1]: age model coefficients were trained using 1116 females (18 – 98 years old) from The Croatian National Biobank "10 001 Dalmatians" [38]. IgG N-glycome from the biobank was measured in the same laboratory and prepared in the same way as estrogen-study data. GlycanAge expressed in years was calculated using the following formula:

$$\text{Glycan age} = 56.08 + 776.01\ GP6 - 5376.83\ (GP6)^2 - 215.10 \times GP14 - 30.70 \times GP15$$

where GP<*n*> is *n*-th peak in chromatogram expressed as proportion of total chromatogram area.

Strength of the associations were estimated using Pearson's correlation coefficient. All statistical analyses were performed in R programming software (version 3.6.3) [39].

AUTHOR CONTRIBUTIONS

GL, PAN and MP conceptualized and designed the research. JJ performed the IgG glycosylation analysis and analyzed the data. WMK and KMG provided samples and data from the intervention study. DK calculated the glycan age and performed statistical analysis. GL wrote the manuscript. All authors edited the manuscript in line with their expertise.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the members of our research groups who carried out the day-to-day activities for the project. Finally, we want to thank the women who volunteered to participate in the study for their time and efforts.

CONFLICTS OF INTEREST

G. Lauc is the founder and owner of Genos Ltd, a private research organization that specializes in highthroughput glycomic analyses and has several patents in this field. J. Jurić and M. Pezer are employees of Genos Ltd. G. Lauc is also co-founder of GlycanAge Ltd and is listed as an inventor on patents EP3011335B1 and US9910046B2 that protect the use of GlycanAge® to predict biological age. All other authors declare no conflicts of interest.

FUNDING

Glycosylation analysis was performed in Genos Glycoscience Research Laboratory and partly supported by the European Structural and Investment Funds IRI grant (#KK.01.2.1.01.0003), Centre of Competence in Molecular Diagnostics (#KK.01.2.2.03.0006) and Croatian National Centre of Research Excellence in Personalized Healthcare grant (#KK.01.1.1.01.0010). PAN was supported by the US National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases grant P30AR070253.

REFERENCES

1. 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, Sarac J, et al. Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2014; 69:779–89. https://doi.org/10.1093/gerona/glt190 PMID:24325898

2. Dall'Olio F, Vanhooren V, Chen CC, Slagboom PE, Wuhrer M, Franceschi C. N-glycomic biomarkers of biological aging and longevity: a link with inflammaging. Ageing Res Rev. 2013; 12:685–98. https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.02.002 PMID:22353383

3. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcgamma receptors as regulators of immune responses. Nat Rev Immunol. 2008; 8:34–47. https://doi.org/10.1038/nri2206 PMID:18064051

4. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, Rademacher TW, Mizuochi T, Taniguchi T, Matsuta K. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. Nature. 1985; 316:452–57. https://doi.org/10.1038/316452a0 PMID:3927174

5. Lauc G, Pezer M, Rudan I, Campbell H. Mechanisms of disease: the human n-glycome. Biochim Biophys Acta. 2016; 1860:1574–82. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.10.016 PMID:26500099

6. Gudelj I, Lauc G, Pezer M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. Cell Immunol. 2018; 333:65–79. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.07.009 PMID:30107893

7. Gudelj I, Keser T, Vučković F, Škaro V, Goreta SŠ, Pavić T, Dumić J, Primorac D, Lauc G, Gornik O. Estimation of human age using n-glycan profiles from bloodstains. Int J Legal Med. 2015; 129:955–61. https://doi.org/10.1007/s00414-015-1162-x PMID:25787342

8. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. Ann N Y Acad Sci. 2000; 908:244–54. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x PMID:10911963

9. Franceschi C, Garagnani P, Parini P, Giuliani C, Santoro A. Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. Nat Rev Endocrinol. 2018; 14:576–90. https://doi.org/10.1038/s41574-018-0059-4 PMID:30046148

10. 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; 22:975–82. https://doi.org/10.1093/glycob/cws062 PMID:22426998

11. Ercan A, Kohrt WM, Cui J, Deane KD, Pezer M, Yu EW, Hausmann JS, Campbell H, Kaiser UB, Rudd PM, Lauc G, Wilson JF, Finkelstein JS, Nigrovic PA. Estrogens regulate glycosylation of IgG in women and men. JCI Insight. 2017; 2:e89703. https://doi.org/10.1172/jci.insight.89703 PMID:28239652

12. Hanić M, Lauc G, Trbojević-Akmačić I. N-glycan analysis by ultra-performance liquid chromatography and capillary gel electrophoresis with fluorescent labeling. Curr Protoc Protein Sci. 2019; 97:e95. https://doi.org/10.1002/cpps.95 PMID:31517449

13. Shea KL, Gavin KM, Melanson EL, Gibbons E, Stavros A, Wolfe P, Kittelson JM, Vondracek SF, Schwartz RS, Wierman ME, Kohrt WM. Body composition and bone mineral density after ovarian hormone suppression with or without estradiol treatment. Menopause. 2015; 22:1045–52. https://doi.org/10.1097/GME.0000000000000430 PMID:25783468

14. Justice JN, Kritchevsky SB. Putting epigenetic biomarkers to the test for clinical trials. Elife. 2020; 9:e58592. https://doi.org/10.7554/eLife.58592 PMID:32515735

15. Lobo RA. Hormone-replacement therapy: current thinking. Nat Rev Endocrinol. 2017; 13:220–31. https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.164 PMID:27716751

16. Vilaj M, Gudelj I, Trbojević-Akmačić I, Lauc G, Pezer M. IgG Glycans as a Biomarker of Biological Age. In: Moskalev A, editor. Biomarkers of Human Aging Healthy Ageing and Longevity. Cham: Springer; 2019. p. 81–99. https://doi.org/10.1007/978-3-030-24970-07

17. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. Annu Rev Immunol. 2008; 26:513–33. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607. 090232 PMID:18370923

18. Seeling M, Brückner C, Nimmerjahn F. Differential antibody glycosylation in autoimmunity: sweet biomarker or modulator of disease activity? Nat Rev Rheumatol. 2017; 13:621–30. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.146 PMID:28905852

19. Nikolac Perkovic M, Pucic Bakovic M, Kristic J, Novokmet M, Huffman JE, Vitart V, Hayward C, Rudan I, Wilson JF, Campbell H, Polasek O, Lauc G, Pivac N. The association between galactosylation of immunoglobulin G and body mass index. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2014; 48:20–25. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.08.014 PMID:24012618

20. Barrios C, Zierer J, Gudelj I, Štambuk J, Ugrina I, Rodríguez E, Soler MJ, Pavić T, Šimurina M, Keser T, Pučić-Baković M, Mangino M, Pascual J, et al. Glycosylation profile of IgG in moderate kidney dysfunction. J Am Soc Nephrol. 2016; 27:933–41. https://doi.org/10.1681/ASN.2015010109 PMID:26185202

21. Wang Y, Klarić L, Yu X, Thaqi K, Dong J, Novokmet M, Wilson J, Polasek O, Liu Y, Krištić J, Ge S, Pučić-Baković M, Wu L, et al. The association between glycosylation of immunoglobulin G and hypertension: a multiple ethnic cross-sectional study. Medicine (Baltimore). 2016; 95:e3379. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003379 PMID:27124023

22. Gao Q, Dolikun M, Štambuk J, Wang H, Zhao F, Yiliham N, Wang Y, Trbojević-Akmačić I, Zhang J, Fang H, Sun Y, Peng H, Zhao Z, et al. Immunoglobulin G n-glycans as potential postgenomic biomarkers for hypertension in the kazakh population. OMICS. 2017; 21:380–89. https://doi.org/10.1089/omi.2017.0044 PMID:28692416

23. Keser T, Vučković F, Barrios C, Zierer J, Wahl A, Akinkuolie AO, Štambuk J, Nakić N, Pavić T, Periša J, Mora S, Gieger C, Menni C, et al. Effects of statins on the immunoglobulin G glycome. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2017; 1861:1152–58. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.02.029 PMID:28263871

24. Menni C, Gudelj I, Macdonald-Dunlop E, Mangino M, Zierer J, Bešić E, Joshi PK, Trbojević-Akmačić I, Chowienczyk PJ, Spector TD, Wilson JF, Lauc G, Valdes AM. Glycosylation profile of immunoglobulin G is crosssectionally associated with cardiovascular disease risk score and subclinical atherosclerosis in two independent cohorts. Circ Res. 2018; 122:1555–64. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312174 PMID:29535164

25. Yu X, Wang Y, Kristic J, Dong J, Chu X, Ge S, Wang H, Fang H, Gao Q, Liu D, Zhao Z, Peng H, Pucic Bakovic M, et al. Profiling IgG n-glycans as potential biomarker of chronological and biological ages: a community-based study in a Han Chinese population. Medicine (Baltimore). 2016; 95:e4112. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004112 PMID:27428197

26. Lemmers RF, Vilaj M, Urda D, Agakov F, Šimurina M, Klaric L, Rudan I, Campbell H, Hayward C, Wilson JF, Lieverse AG, Gornik O, Sijbrands EJ, et al. IgG glycan patterns are associated with type 2 diabetes in independent European populations. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2017; 1861:2240–49. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.06.020 PMID:28668296

27. Wu Z, Li H, Liu D, Tao L, Zhang J, Liang B, Liu X, Wang X, Li X, Wang Y, Wang W, Guo X. IgG glycosylation profile and the glycan score are associated with type 2 diabetes in independent Chinese populations: a case-control study. J Diabetes Res. 2020; 2020:5041346. https://doi.org/10.1155/2020/5041346 PMID:32587867

28. Wang H, Li X, Wang X, Liu D, Zhang X, Cao W, Zheng Y, Guo Z, Li D, Xing W, Hou H, Wu L, Song M, et al. Nextgeneration (glycomic) biomarkers for cardiometabolic health: a community-based study of immunoglobulin G *N*-Glycans in a Chinese Han population. OMICS. 2019; 23:649–59. https://doi.org/10.1089/omi.2019.0099 PMID:31313980

29. Pucić M, Knezević A, Vidic J, Adamczyk B, Novokmet M, Polasek O, Gornik O, Supraha-Goreta S, Wormald MR, Redzić I, Campbell H, Wright A, Hastie ND, et al. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgGvariability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. Mol Cell Proteomics. 2011; 10:M111.010090. https://doi.org/10.1074/mcp.M111.010090 PMID:21653738

30. Menni C, Keser T, Mangino M, Bell JT, Erte I, Akmačić I, Vučković F, Pučić Baković M, Gornik O, McCarthy MI, Zoldoš V, Spector TD, Lauc G, Valdes AM. Glycosylation of immunoglobulin g: role of genetic and epigenetic influences. PLoS One. 2013; 8:e82558. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082558 PMID:24324808

31. Cheng HD, Tirosh I, de Haan N, Stöckmann H, Adamczyk B, McManus CA, O'Flaherty R, Greville G, Saldova R, Bonilla FA, Notarangelo LD, Driessen GJ, Holm IA, et al. IgG fc glycosylation as an axis of humoral immunity in childhood. J Allergy Clin Immunol. 2020; 145:710–13.e9. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.10.012 PMID:31669096

32. Moskalev A, editor. Biomarkers of Human Aging. Springer International Publishing; 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-24970-0

33. Fahy GM, Brooke RT, Watson JP, Good Z, Vasanawala SS, Maecker H, Leipold MD, Lin DT, Kobor MS, Horvath S. Reversal of epigenetic aging and immunosenescent trends in humans. Aging Cell. 2019; 18:e13028. https://doi.org/10.1111/acel.13028 PMID:31496122

34. Tijardović M, Marijančević D, Bok D, Kifer D, Lauc G, Gornik O, Keser T. Intense physical exercise induces an anti-inflammatory change in IgG N-glycosylation profile. Front Physiol. 2019; 10:1522. https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01522 PMID:31920720

35. Melanson EL, Lyden K, Gibbons E, Gavin KM, Wolfe P, Wierman ME, Schwartz RS, Kohrt WM. Influence of estradiol status on physical activity in premenopausal women. Med Sci Sports Exerc. 2018; 50:1704–09. https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001598 PMID:29509642

36. Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypopthalamic gonadotropin-releasing hormone. Science. 1978; 202:631–33. https://doi.org/10.1126/science.100883 PMID:100883

37. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. Bioinformatics. 2012; 28:882–3. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts034 PMID:22257669

38. Rudan I, Marusić A, Janković S, Rotim K, Boban M, Lauc G, Grković I, Dogas Z, Zemunik T, Vatavuk Z, Bencić G, Rudan D, Mulić R, et al. "10001 dalmatians:" Croatia launches its national biobank. Croat Med J. 2009; 50:4–6. https://doi.org/10.3325/cmj.2009.50.4 PMID:19260138

39. Team RDC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria; 2009. http://www.r-project.org

10 ŽIVOTOPIS

Julija Jurić, dip. ing. mol. biol., rođena je 15.2.1984. godine u Ptuju, Republika Slovenija. Školovala se u Zagrebu gdje je završila jezičnu gimnaziju i diplomski studij molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (PMF) Sveučilišta u Zagrebu 2008. godine sa završnim radom "Analiza dužinskih varijanti intergenske razmaknice gena za rRNA u genomu krasta kitnjaka" pod vodstvom prof. Vlatke Zoldoš.

Od ožujka 2008. godine bila je zaposlena kao DNA analitičar na Zavodu za medicinsku genetiku i reproduktivno zdravlje Klinike za dječje bolesti Zagreb. Krajem iste godine zapošljava se u Forenzičkom laboratoriju, a od 2016. postaje članom glikobiološke grupe laboratorija Genos d.o.o. u Zagrebu, gdje radi i danas.

Doktorski studij biologije upisala je 2009. godine na Biološkom odsjeku PMF-a u Zagrebu. Koautorica je 9 znanstvenih radova objavljenih u znanstvenim časopisima s međunarodnom recenzijom. Svoja istraživanja predstavljala je u sklopu stranih i domaćih znanstvenih skupova s posterskim i usmenim priopćenjima. Aktivno se bavi popularizacijom znanosti te piše članke namijenjene široj publici u kojima na jednostavan i razumljiv način objašnjava najnovija znanstvena otkrića. Julija Jurić je udana i majka troje djece.

ZNANSTVENO USAVRŠAVANJE

- 2017 – NOVA Medical School, Lisabon, Međunarodni video kolegij glikobiologije i glikokemije – I. semestar ak.god. 2016/17.

ZNANSTVENE PUBLIKACIJE

1. Sharapov SZ, Shadrina AS, Tsepilov YA, Elgaeva EE, Tiys ES, Feoktistova SG, Zaytseva OO, Vuckovic F, Cuadrat R, Jäger S, Wittenbecher C, Karssen LC, Timofeeva M, Tillin T, Trbojević-Akmačić I, Štambuk T, Rudman N, Krištić J, Šimunović J, Momčilović A, Vilaj M, **Jurić J**, Slana A, Gudelj I, Klarić T, Puljak L, Skelin A, Kadić AJ, Van Zundert J, Chaturvedi N, Campbell H, Dunlop M, Farrington SM, Doherty M, Dagostino C, Gieger C, Allegri M, Williams F, Schulze MB, Lauc G, Aulchenko YS. Replication of 15 loci involved in human plasma protein N-glycosylation in 4802 samples from four cohorts. Glycobiology 31(2):82-88 (2021).

2. **Jurić J**, Kohrt WM, Kifer D, Gavin KM, Pezer M, Nigrovic PA, Lauc G. Effects of estradiol on biological age measured using the glycan age index. Aging 12(19):19756-19765 (2020).

3. Simunovic J, Vilaj M, Trbojevic-Akmacic I, Momcilovic A, Vuckovic F, Gudelj I, **Juric J**, Nakic N, Lauc G, Pezer M. Comprehensive N-glycosylation analysis of immunoglobulin G from dried blood spots. Glycobiology. 29(12):817-821 (2019).

4. Adua E, Memarian E, Russell A, Trbojević-Akmačić I, Gudelj I, **Jurić J**, Roberts P, Lauc G, Wang W. Utilization of N-glycosylation profiles as risk stratification biomarkers for suboptimal health status and metabolic syndrome in a Ghanaian population. Biomark Med 13(15):1273-1287 (2019).

5. Sarin HV, Gudelj I, Honkanen J, Ihalainen JK, Vuorela A, Lee JH, Jin Z, Terwilliger JD, Isola V, Ahtiainen JP, Häkkinen K, **Jurić J**, Lauc G, Kristiansson K, Hulmi JJ, Perola M. Molecular Pathways Mediating Immunosuppression in Response to Prolonged Intensive Physical Training, Low-Energy Availability, and Intensive Weight Loss. Front Immunol 10:907 (2019).

6. Adua E, Memarian E, Russell A, Trbojević-Akmačić I, Gudelj I, **Jurić J**, Roberts P, Lauc G, Wang W. High throughput profiling of whole plasma N-glycans in type II diabetes mellitus patients and healthy individuals: A perspective from a Ghanaian population. Arch Biochem Biophys 661:10-21(2019).

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

8. Šprem N, Safner T, Treer T, Florijančić T, **Jurić J**, Cubric-Curik V, Frantz AC, Curik I. Are the dinaric mountains a boundary between continental and mediterranean wild boar populations in Croatia? Eur J Wildl Res 62, 167–177 (2016).

9. Šprem N, Salajpal K, Safner T, Đikić D, **Jurić J**, Curik I, Đikić M, Cubric-Curik V. Genetic analysis of hybridization between domesticated endangered pig breeds and wild boar. Livestock Sci 162:1-4 (2014).

ZNANSTVENI SKUPOVI I RADIONICE

2021.

- IMFORFUTURE Ageing Workshop (virtualno) – usmeno izlaganje

2020.

- INNOGLY 2020 – Training in glycoanalysis and glycoinformatics (virtualno)
- NIH & FDA Glycoscience Research Day, Maryland, USA (virtualno)
- Writing popular-science articles Workshop, Zagreb, Hrvatska
- 4. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Zagreb, Hrvatska – usmeno izlaganje

2019.

- Analiza proteina spregnutim metodama tekućinske kromatografije i spektrometrije masa, Zagreb, Hrvatska
- 3. Simpozij studenata PMF-a, Zagreb, Hrvatska – usmeno izlaganje
- Waters´Science in Your Applications Workshop – From (Bio)Pharma to Food and Environmental, Zagreb, Hrvatska
- 11th ISABS and 2nd Human Glycome Project, Split, Hrvatska – poster
- Glyco25 – 25th Symposium on Glycoconjugates, Milano, Italija – poster

2018.

- 2nd GlycoCom and 1st Human Glycome Project Meeting, Dubrovnik, Hrvatska – poster

2017.

- 1st EuPA Proteomics School, Split, Hrvatska – poster
- 28th Joint Glycobiology Meeting, Aachen, Njemačka – usmeno izlaganje i poster
- 12th Jenner Glycobiology and Medicine Symposium, Dubrovnik, Hrvatska – poster

NAGRADE I PRIZNANJA

- 2005-2008 Državna stipendija za osobito nadarene studente