

# Glikozilacijski obrazac proteina u senilnoj makularnoj degeneraciji

---

**Bućan, Ivona**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:694744>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-25**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET

IVONA BUĆAN, dr. med.

**GLIKOZILACIJSKI OBRAZAC PROTEINA U SENILNOJ MAKULARNOJ  
DEGENERACIJI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

SPLIT, 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET

IVONA BUĆAN, dr. med.

**GLIKOZILACIJSKI OBRAZAC PROTEINA U SENILNOJ MAKULARNOJ  
DEGENERACIJI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

prof. dr. sc. Ozren Polašek

SPLIT, 2023.

Doktorska disertacija izrađena je u sklopu projekta CarboNyx kojeg je financirala Hrvatska zaklada za znanost, a čiji je voditelj prof. dr. sc. Ozren Polašek.

**Objavljeni znanstveni radovi za potrebe doktorske disertacije:**

1. **Bučan I**, Škunca Herman J, Jerončić Tomić I, Gornik O, Vatavuk Z, Bučan K, Lauc G, Polašek O. N-glycosylation patterns across the age-related macular degeneration spectrum. *Molecules*. 2022;27(6):1774. (čimbenik odjeka: 4,927)
2. Radman S\*, Raić S\*, **Bučan I\***, Pribisalić A, Dunatov J, Mudnić I, Boban M, Pella XF, Kolčić I, Polašek O. Searching for carbonylome biomarkers of aging – development and validation of the proteomic method for quantification of carbonylated protein in human plasma. *Croatian Medical Journal*. 2020;30;61(2):119–125. (čimbenik odjeka: 1,351)  
*(\*Prva 3 autora imaju jednaki doprinos.)*

*Hvala mojoj Obitelji na velikoj podršci tijekom školovanja.*

*Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Ozrenu Polašku na povjerenju, susretljivosti i pomoći  
tijekom izrade doktorskog rada.*

## Sadržaj

<b>Popis oznaka i kratica .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Uvod.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Senilna makularna degeneracija .....</b>	<b>4</b>
1.1.1 Definicija i kliničke značajnosti.....	4
1.1.2 Epidemiološka slika, socioekonomski i psihološki učinci.....	7
1.1.3 Rizični čimbenici .....	8
1.1.3.1 Demografski i okolišni čimbenici rizika .....	9
1.1.3.2 Genetički i molekularni čimbenici rizika .....	10
1.1.4 Paradigma starenja mrežnice i patogenetski mehanizmi .....	12
1.1.4.1 Patogenetske promjene Bruchove membrane .....	14
1.1.4.2 Patogenetske promjene retinalnog pigmentnog epitela.....	15
1.1.4.3 Degeneracija tkiva mrežnice, gubitak stanica i proces angiogeneze .....	16
1.1.5 Paraupalni proces .....	18
1.1.5.1 Imunološki sustav i upala na lokalnoj razini .....	19
1.1.5.2 Sistemska upala .....	24
1.1.6 Procjena čimbenika rizika, progresije i klasifikacijske ljestvice .....	25
1.1.7 Liječenje.....	31
<b>1.2 Glikozilacija proteina.....</b>	<b>32</b>
1.2.1 Biosinteza glikoproteina .....	32
1.2.2 Glikozilacijski obrazac imunoglobulina G .....	38
1.2.3 Promjene N-glikoma plazme .....	41
1.2.3.1 Varijabilnost i stabilnost N-glikoma plazme.....	41
1.2.3.2 Promjene N-glikoma plazme tijekom starenja .....	43
1.2.3.3 Utjecaj konstitucijskih i okolišnih čimbenika na proces glikozilacije .....	45
1.2.3.4 Promjene glikozilacijskog profila u upalnim i malignim stanjima .....	46

1.2.4 Glikoproteini druza senilne makularne degeneracije.....	47
1.2.5 Glikoproteini kao potencijalni biomarkeri senilne makularne degeneracije .....	49
<b>2 Cilj rada i hipoteze .....</b>	<b>52</b>
<b>3 Ispitanici i postupci .....</b>	<b>53</b>
3.1 Ispitanici.....	53
3.2 Fotografije stražnjeg segmenta oka .....	54
3.3 Analiza fotografija stražnjeg segmenta oka .....	55
3.4 Mjerenje razine glikana u plazmi.....	56
3.5 Statistički postupci .....	59
<b>4 Rezultati .....</b>	<b>60</b>
<b>5 Rasprava .....</b>	<b>72</b>
<b>6 Zaključak .....</b>	<b>81</b>
<b>7 Sažetak.....</b>	<b>82</b>
<b>8 Summary.....</b>	<b>83</b>
<b>Popis literature .....</b>	<b>84</b>
<b>Dodatak .....</b>	<b>100</b>
<b>Kratka biografija.....</b>	<b>103</b>

## Popis oznaka i kratica

2-AB	2-aminobenzamid
A	antene (engl. <i>antennae</i> )
AGEs	završni produkti glikacije (engl. <i>advanced glycation end product</i> )
AMD	s dobi povezana makularna degeneracija (engl. <i>age-related macular degeneration</i> )
AREDS	engl. <i>Age-Related Eye Disease Study</i>
ARMS2	gen suspektan za senilnu makulopatiju (engl. <i>age-related maculopathy susceptibility 2</i> )
Asn	asparagin
B	račvajući glikani (engl. <i>bisected</i> )
BM	Bruchova membrana
BMI	indeks tjelesne mase (engl. <i>body mass index</i> )
CC	koriokapilare (engl. <i>choriocapillaris</i> )
CCL2	kemokin ligand 2 (engl. <i>chemokine ligand 2</i> )
CCR2	kemokin receptor 2 (engl. <i>chemokine receptor 2</i> )
CD	oznaka diferencijacije (engl. <i>cluster of differentiation</i> )
CEP	karboskietilpirol (engl. <i>carboxyethylpyrrole</i> )
CFH	komplement čimbenik H (engl. <i>complement factor H</i> )
CI	interval pouzdanosti (engl. <i>confidence interval</i> )
CRP	C-reaktivni protein
CNV	koroidalna neovaskularizacija (engl. <i>choroidal neovascularization</i> )
CV	volumen kolone (engl. <i>column volume</i> )
CX3CL1	CX3 kemokin ligand 1 (engl. <i>C-X-3 chemokine ligand 1</i> )
CX3CR1	CX3 kemokin receptor 1 (engl. <i>C-X-3 chemokine receptor 1</i> )
DG	desijalinizirani glikani
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DHA	dokozaheksaenska kiselina (engl. <i>docosahexaenoic acid</i> )
ECM	extracelularni matriks (engl. <i>extracellular matrix</i> )
EODM	rani oblik makulopatije s druzama (engl. <i>early-onset drusen maculopathy</i> ili <i>early-onset macular drusen</i> )



ER	endoplazmatski retikulum
Fab	fragment antigen vezujuća regija (engl. <i>fragment antigen-binding</i> )
FAG	fluoresceinska angiografija
Fc	fragment kristalizirajuća regija (engl. <i>fragment crystallizable region</i> )
Fuc	fukoza (engl. <i>fucose</i> )
G0	negalaktozilirani ili agalaktozilirani glikani
GA	geografska atrofija
Gal	galaktoza
GalNAc	N-acetilgalaktozamin (engl. <i>N-acetylgalactosamine</i> )
GFAP	glijalni fibrilarni acidni protein
GlcNAc	N-acetilglukozamin (engl. <i>N-acetylglucosamine</i> )
GP	glikan pik
GPI	glikozilfosfatidilinozitol
H	teški lanci (engl. <i>heavy chains</i> )
HDL	lipoproteini velike gustoće (engl. <i>high-density lipoprotein</i> )
HILIC	hidrofilna interakcija (engl. <i>hydrophilic interaction</i> )
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
<i>HTRA1</i>	gen za serinsku proteazu 1 (engl. <i>high-temperature requirement A serine peptidase 1</i> )
Ig	imunoglobulini
IL	interleukin
L	laki lanci (engl. <i>light chains</i> )
LDL	lipoproteini male gustoće (engl. <i>low-density lipoprotein</i> )
MAC	membranski kompleks napada (engl. <i>membrane attack complex</i> )
Man	manoza
MASP-1	manan-vezujuća lektin serinska proteaza (engl. <i>mannan-binding lectin serine protease 1</i> )
MDA	malondialdehid
MHC	glavni histokompatibilni kompleks (engl. <i>major histocompatibility complex</i> )
MMP	matriksne metaloproteinaze
Neu5Ac	N-acetilneuraminska kiselina (engl. <i>N-acetylneuraminic acid</i> ) ili sijačna kiselina
OCT	optička koherentna tomografija (engl. <i>optical coherence tomography</i> )
OCTA	optička koherentna tomografska angiografija (engl. <i>optical coherence</i>

	<i>tomography angiography)</i>
OD	omjer izgleda (engl. <i>odds ratio</i> )
PBS	pufer za vezanje (engl. <i>binding-buffer solution</i> )
PEDF	čimbenik pigmentnog epitela (engl. <i>pigment epithelium derived-factor</i> )
PNGaze F	peptid N-glikozidaza F
PTLP	tirozin protein fosfataza (engl. <i>tyrosine protein phosphataze</i> )
RPE	retinalni pigmentni epitel
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
SDS	natrij-dodecil-sulfat (engl. <i>sodium-dodecyl-sulfat</i> )
SDS-PAGE	natrij-dodecil-sulfat poliakrilamid gel elektroforeza (engl. <i>sodium-dodecyl-sulfat polyacrylamide-gel-electrophoresis</i> )
Ser	serin
SMD	senilna makularna degeneracija
UHLPC	tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. <i>ultra high performance liquid chromatography</i> )
TGF- $\beta$	transformirajući čimbenik rasta $\beta$ (engl. <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
TIMP	tkivni inhibitor metaloproteinaza
TNF- $\alpha$	čimbenik tumorske nekroze $\alpha$ (engl. <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
Thr	treonin (engl. <i>threonine</i> )
Trp	triptofan (engl. <i>tryptophan</i> )
VEGF	vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> )

## **1      Uvod**

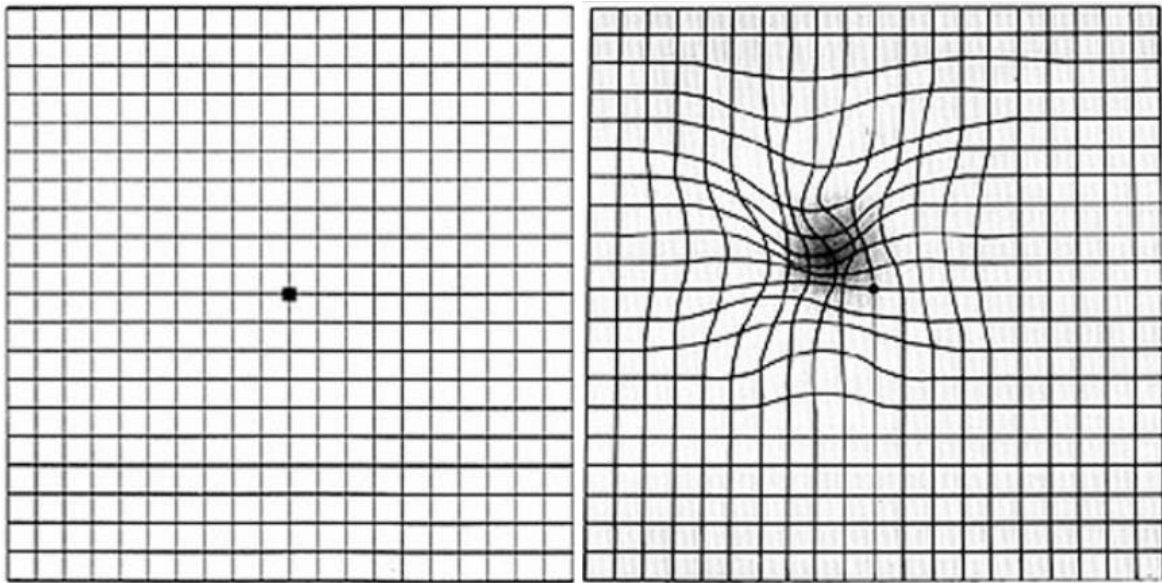
U prvom dijelu uvoda nalazi se pregled dosadašnjeg znanja o etiopatogenezi senilne makularne degeneracije, potencijalnim biomarkerima i važnosti glikozilacije u biološkim procesima.

### **1.1     Senilna makularna degeneracija**

#### **1.1.1   Definicija i kliničke značajnosti**

Senilna makularna degeneracija (SMD, od engl. *age-related macular degeneration* – AMD), prvi put opisana 1929. godine, primarno je degenerativno oboljenje centralnog dijela mrežnice – makule koja je odgovorna za rezoluciju finih detalja i slike. Uslijed patologije žilnično-mrežničkog dijela makule dolazi do progresivnog gubitka centralne vidne oštine i naposljetku nepovratne sljepoće, koja je određena najboljom ispravljenom vidnom oštrinom manjom od 0,1 na boljem oku. U populaciji iznad 55. godine života uzrok je za približno 50% slučajeva centralne sljepoće u Europi, SAD-u i Australiji. Senilna makularna degeneracija je složena višezročna bolest u čijoj patogenezi sudjeluju višestruki okolišni i genetički čimbenici uzrokujući promjene ekstracelularnog matriksa, nakupljanje lipida, proteina i njihovih nerazgradljivih mješavina, razvoj kronične upalne reakcije posredovane komplementom i imunološkim sustavom, kao i angiogenezu (1).

U početku je bolest obično bez simptoma, tek neki bolesnici primijete blagu središnju iskrivljenost vida, pogotovo prilikom čitanja pri lošem osvjetljenju, kao i smanjenu kontrastnu osjetljivost i sposobnost prilagodbe na mrak. Napredovanjem bolesti dolazi do značajne distorzije slike (metamorfopsija), paracentralnih i/ili centralnih skotoma u vidnom polju i pada vidne oštine što vodi gubitku mogućnosti obavljanja svakodnevnih aktivnosti kao što su čitanje, gledanje televizije, vožnja automobila i prepoznavanje lica (2, 3). Pacijentima kojima je već postavljena dijagnoza senilne makularne degeneracije, onima koji pripadaju rizičnoj skupini i starijoj populaciji preporučuju se samokontrole centralnog vidnog polja s pomoću Amslerove rešetke (Slika 1.).



**Slika 1.** Amslerova rešetka za samokontrolu centralnog vidnog polja (URL: <http://eyesight.nu/amsler-grid/>; pristupljeno: 20. rujna 2022.)

Karakteristične lezije SMD-a su druze, tvorbe žilnično-mrežničkog sloja koje su vidljive kliničkim pregledom ili na fotografiji fundusa u boji, čime možemo pratiti stanje na stražnjem polu oka. Druze, ovisno o veličini dijelimo na tvrde ili male promjera  $\leq 63 \mu\text{m}$ , srednje velike (intermedijarne), promjera  $> 63 \mu\text{m}$  i velike druze promjera  $> 125 \mu\text{m}$  (1). Na temelju histološke analize i elektronske mikroskopije riječ je o otpadnom materijalu, smještenom između bazalne membrane retinalnog pigmentnog epitela (RPE) i unutarnjeg kolagenoznog sloja Bruchove membrane (BM), a nazivamo ga bazalnim linearnim depozitom. U sastav depozita ulaze razne sastavnice uključujući neutralne lipide s esterificiranim i neesterificiranim kolesterolom koji čini više od 40% volumena, različiti proteini kao što su apolipoproteini, matriksne metaloproteinaze, inhibitori matriksnih metaloproteinaza, komplement, inhibitori komplementa, imunoglobulini (Ig) i mnogi drugi koji podliježu procesima glikozilacije, a što mijenja njihovu strukturu i funkciju (4, 5). Napredovanjem bolesti iz rane i/ili intermedijarne suhe forme, koja se odlikuje druzama i poremećajima retinalnog pigmentnog epitela, nastupa kasni stadij. Patofiziološki okidači koji na razini RPE-a, BM-a i koriokapilarnog (engl. *choriocappillaris*) sloja žilnice dovode do razvoja kasnog stadija bolesti još uvijek nisu dovoljno poznati (6).

Geografska atrofija (GA) suha je forma kasnog stadija karakterizirana skotomima u vidnom polju uslijed gubitka RPE-a, fotoreceptora i podležeg CC sloja. Histološke studije potvrdile su da se prvo događa atrofija RPE-a praćena funkcionalnim i strukturnim promjenama na razini fotoreceptora, a potom degeneracija CC sloja (6). Promjene nastupaju postupno, a vidna oštrina pacijenta ovisi o fovealnoj zahvaćenosti. U nazočnosti velikih druzi i hiperpigmentacijskih promjena prosječno vrijeme razvoja GA iznosi 5 do 6 godina, dok u slučaju hipopigmentacijskih promjena 2,5 godine (7, 8).

Neovaskularna forma eksudativni je oblik kasnog stadija SMD-a koji ovisno o lokalizaciji neovaskularizacije dijelimo na žilnični (engl. *choroidal neovascularization* – CNV) i mrežnični, kao i subfovealni, jukstafovealni i ekstrafovealni tip (2, 3). Razlikujemo klasičnu podjelu prema fluoresceinskoj angiografiji (FAG) i novu anatomsku podjelu temeljenu na angiografiji indocijanin zelenilom i optičkoj koherentnoj tomografiji i angiografiji (engl. *optical coherence tomography* – OCT; *optical coherence tomography angiography* – OCTA) (9–11). Neovaskularni SMD uključuje nekoliko tipičnih lezija, a to su prisutnost subretinalnog i/ili sub-RPE edema ili hemoragije, prekid kontinuiteta RPE-a (engl. *RPE tear*), odvajanje RPE-a (engl. *pigment epithelium detachment*) seroznog ili fibrovaskularnog tipa, tvrdi eksudati i subretinalno fibrovaskularno ožiljno tkivo (12).

Prilikom postavljanja dijagnoze senilne makularne degeneracije uzimamo u obzir i životnu dob pacijenta, a klinička studija MACUSTAR definirala je donju granicu životne dobi od 55 godina. Međutim, time se ne isključuje pojavnost istih kliničkih promjena u makuli i u mlađoj životnoj dobi. Rani oblik makulopatije s druzama ili rani oblik makularnih druzi (engl. *early-onset drusen maculopathy* ili *early-onset macular drusen* – EODM) u pacijenata ispod 55 godina ozbiljno je stanje koje u ranijoj životnoj dobi vodi gubitku vidne oštrine. Do sada nije jasno je li EODM zaseban entitet ili prema dobi rani oblik makularne degeneracije zbog nedovoljno istraženih fenotipskih i genotipskih karakteristika. U EODM-u razlikujemo predominantnu formu s velikim druzama u makuli, ekstramakularnu formu s malim, intermedijarnim i velikim druzama, hiperpigmentacijske promjene, degeneraciju retinalnog pigmentnog epitela, geografsku atrofiju i žilničnu neovaskularizaciju. Predominantni oblik povezan je s visokim rizikom progresije jer oko 45% pacijenata s EODM-om razvit će kasni stadij SMD-a u šestom desetljeću života barem u jednom oku (13).

### 1.1.2 Epidemiološka slika, socioekonomski i psihološki učinci

Prema Međunarodnoj klasifikaciji bolesti Svjetske zdravstvene organizacije, SMD je na prvom mjestu uzroka sljepoće u populaciji iznad 55. godine života u razvijenim zemljama i treći globalni uzrok sljepoće iza mrežnice i glaukoma, s udjelom od 8,7% bez obzira na dob i geografsko područje. S obzirom na starenje populacije suha forma SMD-a koja čini 80% svih slučajeva bolesti odgovorna je za približno 21% zakonske sljepoće u SAD-u, dok na eksudativnu formu koja je odgovorna za 90% slučajeva akutnog gubitka vida otpada 20% prijavljenih slučajeva (1). U zapadnim zemljama približno 1 – 3% ukupne populacije ima uznapredovali oblik bolesti s kasnim stadijem barem na jednom oku. Geografska atrofija i eksudativni oblik s neovaskularizacijom nisu međusobno isključive, pa 12% pacijenata razvija oba oblika SMD-a, uz česti razvoj GA nakon tretiranja CNV-a inhibitorima vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (engl. *vascular endothelial growth factor* – VEGF) (14).

Učestalost bolesti najviša je u populaciji europskog podrijetla. Tri su velike populacijske studije (*The Blue Mountains Eye Study, Beaver Dam Eye Study, Rotterdam Study*) s podacima o incidenciji i prevalenciji SMD-a u bijeloj rasi. Uzevši u obzir dob kao najrizičniji čimbenik nastanka i progresije bolesti prevalencija kasnog stadija SMD-a u sve 3 studije bila je 0,2% u životnoj dobi od 55. do 64. godine života i 13,1% u populaciji iznad 85 godina života, s većom incidencijom kod žena u svim starosnim skupinama (15). Metaanaliza temeljena na 14 kohortnih grupa u Europskom konzorciju epidemiologije očnih bolesti pokazala je da je prevalencija rane forme SMD-a 13,2% nasuprot 3,0% kasnog oblika u populaciji iznad 70. godine života (16).

Globalne metaanalize pokazale su gotovo dva puta veću prevalenciju SMD-a u Europljana u odnosu na Azijate (11,2% nasuprot 6,8% za rani stadij SMD-a; 12,3% nasuprot 7,4% za bilo koji oblik SMD-a) i afričku populaciju (11,2% nasuprot 7,1% za rani oblik SMD-a; 0,5% nasuprot 0,3% za kasni stadij SMD-a; 12,3% nasuprot 7,5% za bilo koji oblik SMD-a). Kad je riječ o kasnoj formi bolesti, prevalencija GA u pripadnika bijele rase u Europi (1,11%) bila je veća u odnosu na afričku populaciju (0,14%), Azijate (0,21%) i Hispanoamerikance (0,16%), dok se prevalencija eksudativnog oblika bolesti nije statistički značajno razlikovala (17). Kod azijske populacije češća je polipoidalna koroidalna vaskulopatija (engl. *polypoidal choroidal*

*vasculopathy*) u odnosu na okultni ili klasični tip CNV-a. Polipoidalna vaskulopatija čini 50% neovaskularne forme SMD-a kod Azijata u odnosu na bijelu rasu gdje se javlja kod 8 – 13% populacije. Mrežnična angiomatoza predstavlja 12 – 15% slučajeva neovaskularne forme (11, 18).

S obzirom na sveprisutni trend starenja populacije u mnogim zemljama, procjene su da više od 20% populacije iznad 70. godine života i 34% iznad 80. godine ima degeneraciju makule barem na jednom oku, što postaje važan javnozdravstveni problem zapadne medicine i razvijenih zemalja koje će snositi i veće ekonomske posljedice. U azijskim zemljama zbog promjene demografskih karakteristika i sveprisutnog zapadnjačkog stila života broj slučajeva SMD-a je u porastu. Globalna je procjena da će do 2040. oko 288 milijuna ljudi imati SMD te su zbog toga, kao i socioekonomskog izazova bolesti, brojna istraživanja usmjerena na razumijevanje utjecaja čimbenika rizika okoliša, patogenetskih mehanizama bolesti i potencijalnih biomarkera (17). Godišnji trošak američkog zdravstvenog sustava na obradu i liječenje pacijenata sa SMD-om je između 575 i 733 milijuna \$ (19). Unatoč tomu SMD ipak pokazuje pad prevalencije promjenom stila života i uvođenjem terapijskih inhibitora VEGF-a. Zadnje populacijske studije pokazale su da je zakonska sljepoća uzrokovana SMD-om smanjena za 50% u zapadnim zemljama uvođenjem navedene terapije (2, 3).

Senilna makularna degeneracija ima velike posljedice po kvalitetu života. U razdoblju od 5 godina 5% pacijenta s ranim stadijem bolesti razvit će kasnu formu, s porastom incidencije od 15% unutar 15 godina (15, 16). Provedene analize o kvaliteti života pokazale su da su pacijenti sa SMD-om, naročito kasnom formom bolesti, depresivni, nezadovoljni i pod većim stresom zbog nemogućnosti obavljanja svakodnevnih aktivnosti. Veći je i stupanj invalidnosti zbog većeg broja nezgoda pacijenata sa SMD-om, a neke studije pokazale su da je geografska atrofija povezana s različitim oblicima demencija i kognitivnog oštećenja (1, 2).

### **1.1.3 Rizični čimbenici**

Senilna makularna degeneracija višezročna je bolest koja nastaje interakcijom gena i okolišnih čimbenika rizika. Etiopatogeneza još uvijek nije u cijelosti razjašnjena, međutim, smatra se da je u patogenezi bolesti ključan oksidacijski stres. Oksidacijski stres uključuje gotovo sve poznate čimbenike rizika i gotovo sve pretpostavljene mehanizme patogeneze bolesti.

Progresija bolesti varira u ovisnosti o prisutnim identificiranim čimbenicima rizika, a upravo razumijevanje i identifikacija tih čimbenika otvara mogućnost procjene nastanka i progresije bolesti u svakog pojedinog pacijenta. Opisani su različiti demografski, okolišni, genetički, epigenetički, molekularni i fenotipski čimbenici rizika koji su povezani s nastankom i progresijom SMD-a. Napredak u novim modalitetima snimanja mrežnice i žilnice, kao i razvoj genske i molekularne tehnologije, otkrio je mnoge dosad nepoznate čimbenike rizika i omogućio razvoj boljih kliničkih klasifikacijskih ljestvica stadija i progresije SMD-a (20).

### **1.1.3.1 Demografski i okolišni čimbenici rizika**

Metaanalizom, koja je obuhvatila više od 94 000 ispitanika, identificirani su visokorizični i niskorizični čimbenici. Životna dob, pušački status, operacija mrežnice i pozitivna obiteljska anamneza SMD-a značajni su prediktori razvoja SMD-a. Rizični čimbenici s nižom značajnošću su viši tjelesni indeks mase (engl. *body mass indeks* – BMI), arterijska hipertenzija, kardiovaskularne bolesti i povišena razina fibrinogena u plazmi (21, 22).

Dob je najvažniji demografski čimbenik rizika. Zbog trenda starenja populacije u sljedećih 40 godina možemo očekivati porast prevalencije SMD-a, s nešto većom progresijom u geografsku atrofiju u odnosu na neovaskularnu formu. Prevalencija ranog stadija bolesti raste s 3,5% u dobnoj skupini od 55 – 59 godina na 17,6% u starijih od 85 godina. Za kasni oblik bolesti ove stope prevalencije rastu s 0,1% na 9,8% (16). Multietničke studije pokazale su i različitu prevalenciju ranog i kasnog stadija bolesti između ispitanika različite etničke pripadnosti. Smatra se da povišena razina melanina u stanicama RPE u populacija afričkog podrijetla djeluje kao ultravioletni filtar koji štiti stanice RPE-a i BM-a od izloženosti sunčevom zračenju (23).

Pušenje je uz starenje drugi značajni čimbenik rizika za razvoj SMD, koji izravno ovisi o broju konzumiranih cigareta u danu. Smatra se da pušenje dovodi do povećanja oksidacijskog stresa, agregacije trombocita, povišene razine fibrinogena, redukcije plazmatskih vrijednosti lipoproteina velike gustoće (engl. *high-density lipoprotein* – HDL) i antioksidansa (askorbinske kiseline i proteina sulfhidrilnih skupina), razvoja upale na razini RPE-a i ishemičnih vaskularnih promjena žilnice (22, 24). Pušenje je povezano s razvojem bilo kojeg oblika SMD-



a, s naglaskom na brzu progresiju GA. Potrebno je 20 godina da bivši pušači izjednače rizik nastanka bolesti u odnosu na osobe koje nikad nisu pušile (1, 20).

Visoki indeks tjelesne mase (BMI > 30), opseg struka i povećani omjer opsega struka i kukova rizični su čimbenici, no prvenstveno kasnog stadija. Pretilost dovodi do ekspresije čimbenika komplementa i citokina, što vodi razvoju upale i strukturnim promjenama RPE-a (25). Također, masno tkivo skladište je protektivnih karoteonoida i u slučaju porasta BMI-ja masno tkivo apsorbira navedene antioksidanse i čini ih manje dostupnima makuli (26). Odrediti preciznu kvantifikaciju potrebne fizičke aktivnosti za smanjivanje rizika nastanka SMD-a jako je teško, no recentne studije podupiru fizičku aktivnost i mediteransku prehranu kao način podizanja razine antioksidacijskih enzima u organizmu (27, 28).

Ispitanici s pozitivnom obiteljskom anamnezom SMD-a i osobnom anamnezom ateroskleroze, hiperkolesterolemije, arterijske hipertenzije i infarktom miokarda imaju visok rizik razvoja SMD-a. Uzimajući u obzir sve navedene čimbenike, ateroskleroza je najrelevantniji pokazatelj rizika koja dovodeći do arterijske hipertenzije može narušiti vaskularni protok u žilnici. Postoji značajna povezanost između ateroskleroze i pušenja, kao i pušenja i muškog spola. Poznavanje okolišnih čimbenika rizika, razumijevanje patogenetskih mehanizama koji uzrokuju oksidacijski stres i upalu što vodi patologiji makule omogućila bi razvoj strategija za prepoznavanje personaliziranog rizika kod visokorizičnih osoba (29, 30).

### **1.1.3.2 Genetički i molekularni čimbenici rizika**

Oksidacijski stres, promijenjen metabolizam lipida i upala tri su predominantna elementa patogeneze SMD-a povezana ne samo s okolišnim već i genetičkim čimbenicima rizika. Senilna makularna degeneracija bila je jedna od prvih istraživanih bolesti početkom 21. stoljeća, u sklopu projekta humanog genoma (1). U populacijsko-blizanačkim studijama, u kojima je proučavan kombinirani utjecaj okolišnih i genetičkih čimbenika rizika, zaključeno je da su genske inačice odgovorne za 46 – 71% patologije SMD-a. Više od 50 genskih inačica je identificirano, a one koje se najčešće dovode u vezu s povećanom učestalošću SMD-a i progresijom bolesti inačice su gena komplementa, gena povezanog sa SMD-om, čiji proteinski

produkt još nije identificiran te geni lipidnog metabolizma (*LIPC*, *CETP*, *SCARB1*, *ApoE*) (6, 20).

U genu *CFH* smještenom na kromosomu 1 dolazi do zamjene aminokiselina, tirozina s histidinom na poziciji 402, što vodi promjeni funkcije komplement čimbenika H (engl. *complement factor H* – *CFH*). Inačica *402H* u BM-u dovodi do povećane aktivacije alternativnog puta komplementa koji sudjeluje u patogenezi SMD-a (6, 31). U pacijenata s polimorfizmom *CFH Y402H* u ranijoj životnoj dobi nastupa neovaskularna forma bolesti. Također, lokus u *CFH* pokazao je snažniju povezanost s nastankom SMD-a u europskoj populaciji u odnosu na Azijate. Trećina pacijenata s EODM-om ima rijetke genske inačice *CFH* (13).

Gen *ARMS2* (od engl. *age-related maculopathy susceptibility*), koji je smatran rizičnim čimbenikom za SMD, smješten je na 10. kromosomu i preko inačice *A69S* povezan s nastankom SMD-a. Pretpostavlja se da je produkt gena *ARMS2* lokaliziran u vanjskoj membrani mitohondrija, koji su središnje organele u kontroli oksidacijskog stresa, iako su novije studije izvijestile da može biti dio citosola pa i ekstracelularnog matriksa (32). Rizični aleli gena *CFH* snažnije su povezani s progresijom u GA, dok su aleli *ARMS2* u većoj korelaciji s neovaskularnom formom bolesti. Pušenje povisuje rizik nastanka SMD-a za bilo koju gensku inačicu *CFH*, *ARMS2* i gena za serinsku proteazu koji kontrolira signalni put uključen u regulaciju depozita ekstracelularnog matriksa i angiogeneze (engl. *high-temperature requirement A serine peptidase 1* – *HTRA1*) (6, 31, 32). Neki autori pretpostavljaju da se 75% svih slučajeva SMD-a može objasniti genskim inačicama *CFH* i *ARMS2/HTRA1* (1).

Mali je broj studija koje su istraživale lokalni ili sistemski učinak molekularnih čimbenika na razvoj senilne makularne degeneracije. Provedene studije pokazuju zbunjujuće i oprečne rezultate u odnosu na kontrolne skupine slične životne dobi, no po svom ustroju nisu prospektivne studije koje bi uključivale mjerenje razine molekularnih čimbenika i predviđanje progresije bolesti u određenom razdoblju (20).

Istraživani su angiogeni i imunološki čimbenici, uključujući VEGF i transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (engl. *transforming growth factor  $\beta$*  – TGF- $\beta$ ) kao proangiogeni, i čimbenik pigmentnog epitela (engl. *pigment epithelium derived-factor* – PEDF) s protuangiogenim učinkom, čimbenici komplementa, citokini, C-reaktivni protein (CRP), intercelularne i vaskularne adhezijske molekule, kao i leukociti. U studije su uključeni i čimbenici oksidacijskog stresa, malondialdehid (MDA) i oksidirani lipoproteini male gustoće (eng. *low-density lipoprotein* – LDL) s povišenim lokalnim i sistemskim razinama, zatim antioksidacijski faktori vitamini (A, C, D, E), karotenoidi te cink, koji pripadaju skupini organskih pigmenata kojih ljudsko tijelo ne može sintetizirati već ih unosi putem hrane (20, 33). U studiji sa životnom dobi povezanih očnih bolesti (engl. *Age-Related Eye Disease Study* – AREDS) dokazana je učinkovitost suplementnog uzimanja  $\beta$ -karotena, luteina, zeaksantina i cinka (34, 35). Upravo i najveći potencijal među molekularnim čimbenicima imaju lutein i zeaksantin uz HDL-kolesterol, dokozaheksaensku kiselinu (engl. *docosahexaenoic acid* – DHA) i eikozapentaenoičnu kiselinu.

#### **1.1.4 Paradigma starenja mrežnice i patogenetski mehanizmi**

U skladu s „teorijom starenja slobodnih radikala” u podlozi tkivnog stresa i patogeneze SMD-a uzrokovane starenjem neravnoteža je između produkcije reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species* – ROS) uzrokovanih čimbenicima rizika koji vode razvoju upale i oštećenju tkiva te nemogućnosti njihove eliminacije putem cirkulirajućih antioksidansa i zaštitnih mehanizama (36, 37). Serumski markeri oksidacijskog stresa, MDA, karbonilirani proteini i ukupna razina oksidacijskog stresa povišeni su u serumu pacijenata sa SMD-om, dok je razina ukupnog antioksidacijskog kapaciteta smanjena (6). U odnosu na normalne starosne promjene druze u SMD-u pokazuju intenzivniju imunoreaktivnost tkivnih inhibitora metaloproteinaza (TIMP) i karboksietilpirolskih proteinskih produkata (engl. *carboxyethylpyrrole* – CEP) kao biomarkera oksidacijskog stresa pronađenih i u sloju fotoreceptora (38, 39). Mrežnica je tkivo s visokim metaboličkim indeksom, pa je antioksidacijski mehanizam bitan čimbenik njezine obrane (33).

Patologija SMD-a lokalizirana je na žilnično-mrežničnoj površini makule. Fovea, kao centralni dio makule veličine 1,5 mm, ima specifičnu strukturu građenu od čunjića bez prisutnosti krvnih

žila (fovealna avaskularna zona veličine 0,5 mm). Nutrijentima i kisikom opskrbljuje se putem žilnične cirkulacije preko BM-a i sloja RPE-a koji formiraju vanjsku krvno-mrežičnu barijeru (2, 3). Stanice retinalnog pigmentnog epitela imaju kritičnu ulogu u recikliranju oksidiranih otpadnih produkata metabolizma fotoreceptora. Tijekom biološkog starenja mrežnice, uslijed poremećaja metaboličkih procesa i nemogućnosti eliminiranja oksidacijski promijenjenih otpadnih produkata fotoreceptora zbiva se sedam koraka konačnog razvoja patologije SMD-a. U sedmerostrukom kaskadnom procesu dolazi do nakupljanja ekstracelularnog otpadnog materijala, zadebljanja BM-a, akumulacije intracelularnog debrisa – lipofuscina i završnih produkata glikacije (engl. *advanced glycation end product* – AGEs) u sloju RPE-a, defekata mitohondrijske deoksiribonukleinske kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid* – DNA), poremećaja stanične homeostaze, gubitka stanica RPE i funkcionalno povezanih fotoreceptora i naposljetku aktiviranja upalno-imunološko-angiogenog odgovora. Sve navedene promjene događaju se na razini kompleksa fotoreceptor/RPE/BM koji je prolongirano izložen oksidacijskom stresu uslijed fotooksidacije i visoko varijabilne žilnične hemodinamike te je i ciljno mjesto formiranja elementarne lezije SMD-a – druza (36, 38). Druze aktiviraju upalni, imunološki i angiogeni odgovor, a same komponente koje sudjeluju u odgovoru, ekstracelularni matriks (engl. *extracellular matrix* – ECM), stanice RPE-a, komplement, imunološke stanice i njihovi produkti, kao i čimbenici angiogeneze, podliježu promjenama strukture i funkcije (14, 36, 38, 39).

Strukturne i funkcionalne promjene mrežnice uzrokovane starenjem i oksidacijskim stresom čine tek okidače patofiziološkog procesa. Naime, promjene uzrokovane starenjem i oksidacijskim stresom nisu dostatne za razvoj makularne degeneracije bez implikacije imunološkog sustava i razvoja upale. Paraupalni je proces stanje adaptivnog odgovora tkiva, komplementa, makrofaga, mrežnične mikroglije i makroglije na oksidacijskim stresom prouzrokovana tkivna oštećenja, a u svrhu očuvanja bazalnih uvjeta i funkcionalnosti tkiva. Paraupalni proces posebno je važan u onim tkivima s vrlo visokim metabolizmom i neproliferativnim funkcionalnim stanicama (14, 36, 38). U početku karakteriziran je ekspresijom protuupalnih interleukina (IL-4, IL-10) i plastičnošću makrofaga s pomakom od proupalnih (M1) prema protuupalnim (M2) radi očuvanja funkcionalnosti mrežnice. U trenutku kad oksidacijskim stresom akumulirana oštećenja nadvladaju obranu organizma, tad dolazi do disregulacije paraupalnih reparativnih mehanizama, promjena polarizacije makrofaga prema M1 populaciji, aktivacije mrežnične mikroglije, aktivacije komplementa kao centralnog

dogadaja i povećanja ekspresije proupalnih citokina, što vodi razvoju patoloških promjena karakterističnih za SMD (38–41).

#### **1.1.4.1 Patogenetske promjene Bruchove membrane**

Bruchova membrana slojevita je heterogena struktura ekstracelularnog matriksa između žilnice i mrežnice koju čini unutarnja bazalna lamina RPE-a, vanjska kolagenska zona, elastična zona, unutarnja kolagenska zona i vanjska bazalna lamina koriokapilarnog sloja. Difuzijski kapacitet membrane iznimno je važan u održavanju stabilnosti protoka nutrijenata (glukoze, aminokiselina, lipida i kisika) prema mrežnici, ali i u eliminaciji otpadnih materijala u svrhu održavanja homeostaze te je disrupcija protoka jedan od glavnih okidača patologije SMD-a (42). Promjene vezane za višu životnu dob neovisno o patologiji SMD-a, izraženije u makuli u odnosu na periferiju, uključuju zadebljanje BM-a, akumulaciju lipida, smanjene difuzije aminokiselina, smanjenje elastičnosti u odgovoru na hidrostatski tlak i smanjenje difuzijskog kapaciteta makromolekula dekstrana i lipoproteina (42–45). Kompozicija lipidnih nakupina u BM-u makule i periferije mrežnice razlikuje se te su visoke razine esterificiranog kolesterola u makuli mogući razlog zbog čega je patologija SMD-a prisutna u centralnom dijelu mrežnice. Oksidirane lipide i lipoproteine uklanjaju makrofagi putem fagocitoze, a promjene populacije makrofaga rezultiraju nakupljanjem oksidiranih produkata u BM-u i CC sloju (45).

Modifikacije proteina ekstracelularnog matriksa BM-a i poremećaj remodeliranja uslijed oksidacijskog stresa jedan su od početnih koraka patologije SMD-a. Pretpostavlja se da modifikacije matriksnih metaloproteinaza (MMP), TIMP-a, vitronektina i klusterina uslijed oksidacijskog stresa i kronične upalne reakcije pridonose formiranju druza. Matriksne metaloproteinaze funkcionalna su komponenta održavanja difuzijskog kapaciteta BM-a sudjelujući u degradaciji želatinoznih komponenti ekstracelularnog matriksa. Proteinaze MMP2 i MMP9 postoje u inaktivnoj formi, a s godinama raste njihova ekspresija u makuli. U patološki promijenjenoj makuli značajno su povišene razine inaktivne forme MMP9, kao i snižene razine inaktivne forme MMP2 i aktivnih oblika. Sekvestriranje navedenih metaloproteinaza u visokomolekularne agregate nekovalentnim interakcijama s glikozaminoglikanima uslijed oksidacijskog stresa vodi smanjenju njihove aktivnosti i zadebljanju BM-a (43, 44). Kao protuteža MMP-u u mrežnici je prisutan TIMP-3. S godinama,

a posebno u SMD-u, dolazi do visoke ekspresije TIMP-3 u BM-u, družama i nekim retinalnim ganglijskim stanicama, dok u područjima atrofije RPE nije detektiran (39). Pojačana ekspresija proteina TIMP-3 može putem protuangiogenog učinka spriječiti razvoj CNV-a, ali i onemogućiti proces normalnog remodeliranja ECM-a putem matriksnih metaloproteinaza i pridonijeti zadebljanju BM-a i smanjenju difuzijskog kapaciteta. Određeni polimorfizmi TIMP-3 povezani su s bržim napredovanjem bolesti. Remodeliranje ECM, u znanstvenoj literaturi popularno pod nazivom „ECM turnover”, upravo ovisi o omjeru aktivnosti MMP-a i TIMP-a. Prema tome, disregulacija koja se očituje u niskim razinama aktivnih MMP-a i prekomjernoj ekspresiji proteina TIMP-3 u SMD-u vodi alteracijama BM-a, infiltraciji imunološkim stanicama i formiranju druža (39, 45).

#### **1.1.4.2 Patogenetske promjene retinalnog pigmentnog epitela**

Stanice retinalnog pigmentnog epitela glavni su homeostatski element mrežnice. Apikalna površina RPE-a u kontaktu je s fotoreceptorima i odgovorna je za fagocitozom posredovano recikliranje vanjskih segmenata, izvor je 11-*cis* retinola bitnog za vizualni ciklus i opskrbljivanje mrežnice nutrijentima (46). Bazalna strana sudjeluje u transportu istih nutrijenata iz BM-a i eliminaciji otpadnog materijala prema sloju CC. Jedan od koraka pretpostavljene patogeneze SMD-a nakupljanje je lipofucina i završnih produkata glikacije, prvenstveno u sloju retinalnog pigmentnog epitela, što posljedično dovodi do komplementom posredovane upale. Stanice retinalnog pigmentnog epitela sekrecijom imunosupresivnih čimbenika kao što su TGF- $\beta$ , somatostatin, trombospondin i PEDF, kao i fenomenom suprimiranja limfocita B i T, omogućuju imunološku privilegiranost očnog tkiva. Pigmentni epitelni čimbenik rasta u sloju RPE-a djeluje protuupalno i protuangiogeno, a izlučuju ga i Mullerove stanice s ulogom neuroprotektora (36, 38).

Lipofuscin je otpadni bioproduct vanjskog segmenta fotoreceptora nazočan u zdravom oku s povećanom detektabilnošću nakon 40. godine života i u patološki promijenjenom sloju RPE-a. Granule lipofuscina stvaraju se neenzimskom reakcijom iz retinaldehida u fotoreceptorima i putem fagocitoze ulaze u stanice RPE-a fuzirajući s lizosomima (46, 47). U tkivu visoke razine AGEs-a koreliraju s nakupinama lipofuscina u RPE, ali i u serumu pacijenata sa SMD-om. Istraživanja su pokazala da fluorofore lipofuscina *in vitro* induciraju apoptozu stanica RPE

izloženih plavom svjetlu kao izvoru oksidacijskog stresa, ali i da imaju sposobnost aktivacije komplementa, a to je centralni događaj u patogenezi SMD-a (47).

Stanice retinalnog pigmentnog epitela uslijed izlaganja kisikovim reaktivnim vrstama pokazuju oštećenja mitohondrijske i jezgrene DNA. Biološke promjene tijekom procesa starenja uključuju povećanje razine markera oksidacijskog oštećenja DNA, smanjenu ekspresiju reparatornih enzima DNA u ovisnosti o polimorfizmima gena, oštećenja mtDNA i višu prevalenciju mitohondrijskih heteroplazmičkih mutacija u sloju RPE-a i žilnici. Ultrastrukturalne promjene RPE-a kod normalnog procesa starenja i SMD-a uključuju smanjen broj i površinu mitohondrija s alteriranim i destruiranim membranama, gubitak krista i matriksa, proliferaciju peroksisoma i granula lipofuscina. Dokaz o važnosti mitohondrija stanica RPE u održavanju homeostaze mrežnice proizlazi i iz toga da ispitanici s dokazanim mutacijama mitohondrijskog genoma imaju slične pigmentacijske promjene u makuli kao i ispitanici sa SMD-om (48, 49).

#### **1.1.4.3 Degeneracija tkiva mrežnice, gubitak stanica i proces angiogeneze**

Starenjem i razvojem patologije mrežnice mijenja se izlučivanje čimbenika i funkcija RPE-a promjenom ekspresije gena prema apoptotičkim. Do sada nije poznato dolazi li primarno do degeneracije stanica RPE ili je riječ o poremećaju procesa uklanjanja otpadnog materijala nakon kojeg slijedi gubitak stanice RPE-a, potom funkcionalno povezanih fotoreceptora i CC sloja. U svijetlu novijih istraživanja pretpostavlja se da ipak dolazi do poremećaja procesa eliminacije otpadnog materijala putem BM-a i da akumulirani debris aktivira upalno-imunološki odgovor (36, 38, 45).

Stanice retinalnog pigmentnog epitela odumiru apoptozom aktiviranom kroničnim stresom endoplazmatskog retikuluma (ER) i poremećenim procesom autofagije. Kombinacija visoke metaboličke aktivnosti mrežnice, fotooksidacija, nakupljanje lipofuscina u RPE-u, smanjenje antioksidacijskog kapaciteta, poremećaj hemodinamike žilnice i depoziti sub-RPE rezultiraju stresom ER-a što vodi u začarani krug kroničnog oksidacijskog stresa potičući disregulaciju komplementa i konačnu patologiju SMD-a. Oksidacijski stres, hipoksija i upala u SMD-u aktiviraju staničnu autofagiju posredovanu lizosomima. Marker autofagije detektirani su u

velikim družama SMD-a, ali i u malim družama i prostoru sub-RPE u zdravih pojedinaca (14, 47). Nakupljanje lipofuscina i oksidacijskih oštećenja mtDNA jedan su od mehanizama koji reduciraju kapacitet lizosoma RPE-a te uzrokuje egzocitozu nepotpuno razgrađenog intracelularnog materijala koji nadalje potiče aktivaciju kaskade čimbenika komplementa i paraupalni proces (39).

Patološke promjene SMD-a vidljive su i u retrakciji dendrita fotoreceptora u vanjskom zrnatom sloju koji sadržava drugi neuron vidnog puta, a što posljedično dovodi do dendritičkog rasta postsinaptičkih bipolarnih stanica na periferiji mrežnice. Proces normalnog starenja karakteriziran je podjednakim gubitkom fotoreceptora i stanica RPE s većim specifičnim gubitkom štapića u makuli u odnosu na čunjiće koji su jedini fotoreceptori centralnog dijela foveje, što govori u prilog i većem kapacitetu preživljavanja čunjića i prisutnosti neuroprotektivnih čimbenika kao što je DHA. U uvjetima oksidacijskog stresa i povišenih razina PEDF-a dolazi do konverzije DHA u neurozaštitni faktor D1 koji inhibira citokinima posredovanu ciklooksigenazu i infiltraciju leukocita. Uokolo disciformnih ožiljaka u SMD-u detektirana je prisutnost čunjića, no ne i štapića (48, 49).

Žilnica je makrovaskularna struktura koja opskrbljuje nutrijentima CC sloj koji preko fenestriranih endotelnih stanica i BM-a predaje nutrijente mrežnici. Debljina žilnice, gustoća sloja CC, diameter fenestri i protok krvi smanjuju se s godinama, sa značajnom redukcijom u područjima druza, GA i disciformnim ožiljcima nasuprot neovaskularno-eksudativnog stadija bolesti kojeg prati povećanje debljine žilnice (49). Vaskularna gustoća sloja CC obrnuto korelira s gustoćom druza, a u GA nalazi se značajna redukcija gustoće CC i diametra fenestri što rezultira smanjenjem protoka i hipoksijom vanjskih slojeva mrežnice. Degenerativne promjene i atrofija CC nastaju sekundarno kao reakcija na oštećenja RPE-a, što je vidljivo u područjima atrofije RPE s još uvijek očuvanim CC slojem. U tim područjima intaktnog sloja CC postoji značajna konstrikcija kapilara i smanjenje diametra fenestri kao moguća reakcija na smanjenje ekspresije endotelne i neuralne sintetaze dušikovog oksida. U neovaskularnom stadiju bolesti oko CNV i dalje perzistira RPE i degenerativno izmijenjeni CC sloj (48–50). Upravo degenerativne promjene sloja CC jedan su od pretpostavljenih mehanizama intermitentne hipoksije koja vodi ekspresiji proangiogenih čimbenika. Intermitentna hipoksija posebno povisuje razinu oksidacijskog stresa, dok stanice kao odgovor na hipoksiju proizvode



hipoksijom inducirane čimbenike koji uz ROS stimuliraju proces angiogeneze povisujući proizvodnju VEGF-a (51, 52).

Usljed neravnoteže između proangiogenih čimbenika i njihovih inhibitora (endostatin, heparinaza, interferon, angiostatin, trombosponidin, PEDF i drugi) dolazi do procesa angiogeneze. Vaskularni endotelni čimbenik rasta povećava vaskularnu permeabilnost i promiče neovaskularizaciju te je time glavni ključ angiogene proliferacije uz druge proangiogene molekule kao što je bazični fibroblastni čimbenik rasta, placentni čimbenik rasta, trombocitni čimbenik rasta, angiopoetin, pleotropin, sintetaza dušikovog oksida, TGF- $\beta$  i IL-8 (51–53). Vaskularni endotelni čimbenik rasta dimerični je glikoprotein iz superobitelji trombocitnih čimbenika rasta unutar koje razlikujemo 5 čimbenika (A, B, C, D i placentni čimbenik rasta). Čimbenik VEGFA, čija je ekspresija dokazana u žilničnim neovaskulatima, najznačajniji je za intraokularnu angiogenezu. VEGFA 165 najzastupljenija je u neovaskularnoj formi uz nazočnost i drugih izoformi (121, 121b, 145, 189 i 206). VEGFA djeluje putem 3 receptora koji se nalaze na endotelnim stanicama krvnih žila uzrokujući njihovu aktivaciju i proliferaciju. Aktivirane endotelne stanice otpuštaju proteaze koje razgrađuju bazalnu membranu i počinju migrirati prema angiogenim čimbenicima rabeći integrine za ostvarivanje stanično-stanične adhezije i stvaranje novih krvnih žila. Receptor VEGFA tip 2 ima najveći afinitet vezanja i time je najznačajniji u angiogenom procesu, dok su tip 1 i 3 povezani s limfagiogenezom i regrutiranjem monocita (51, 52).

### **1.1.5 Paraupalni proces**

Mrežnica je imunološki privilegirano tkivo koje ima vlastiti endogeni imunološki sustav aktivan na niskim razinama zbog stalne izloženosti stresu, koordiniranim alternativnim putem aktivacije komplementa, makrofagima i mikroglijom u svrhu održavanja homeostaze (54). Paraupalni adaptivni odgovor na stres tkiva može se pojaviti na tri razine: stanice tkiva, imunološki sustav lokalnog tkiva i sistemski imunološki sustav (14). Na razini tkiva stanice RPE-a detektiraju promjene mikrouvjeta putem „toll-like” receptora, a regulacijom proteina toplinskog šoka i aktivacijom puteva autofagije pokušavaju popraviti subkliničko oštećenje kako bi se stanice mogle vratiti u bazalnu homeostazu. Imunološki sustav tkiva, makrofagi,

mikroglia i sustav komplementa prate proces oporavka i oslobađaju citokine i faktore rasta kako bi dodatno potaknuli popravak stanica pod stresom (14, 54–56).

Fenomen „senescent-associated secretory phenotype” stanje je u kojem stareće stanice luče proupalne citokine i kemokine kao što su, IL-5, IL-8, IL-1 $\alpha$ / $\beta$ , čimbenik tumorske nekroze  $\alpha$  (engl. *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  – TNF- $\alpha$ ), monocitni kemoatraktant protein-1/2, CX3C kemokin ligand 1 (engl. *C-X3-C chemokine ligand 1* – CX3CL1), inzulinski čimbenik rasta i kolonija granulocitnih stimulirajućih čimbenika (57). Proupalne molekule zatim stimuliraju rezidentne makrofage i sustav tkivnog komplementa, čime se potiče popravak i remodeliranje tkiva. Ako razina oštećenja premašuje reparativni kapacitet na razini tkiva, makrofagi oslobađaju citokine i kemokine kako bi regrutirali cirkulirajuće monocite i aktivirali sistemski imunološki sustav (14, 57). U slučaju dulje izloženosti stresu u kontekstu starenja oka disregulacija reparativnih paraupalnih mehanizama na razini RPE-a, komplementa i imunoloških stanica dovodi do sloma krvno-mrežnične barijere, gubitka imunološke privilegiranosti, kroničnog upalnog odgovora i patologije (14, 56).

### **1.1.5.1 Imunološki sustav i upala na lokalnoj razini**

Imunološki sustav, makrofagi, mikroglia, T-stanice i sustav komplementa dio su lokalnog paraupalnog odgovora. Tkivni stres niskog stupnja kod normalnog starenja i kod kroničnih bolesti uzrokuje subklinička oštećenja koja aktiviraju imunokompetentne stanice za održavanje homeostaze tkiva. Dokazi upućuju na to da su čimbenici komplementa, makrofagi i mikroglia tijekom starenja aktivni u mrežnici na niskim razinama, dok disregulacijom paraupalnog procesa dolazi do patoloških promjena (36).

#### *Makrofagi*

Makrofagi su stanice urođenog imunološkog sustava dihotomne prirode koje su sposobne sudjelovati u protu i/ili proupalnom odgovoru, imunološkoj aktivaciji ili supresiji, kao i održavanju tkivne homeostaze odnosno njezinoj destrukciji. Starenjem se mijenja ekspresija glavnog sustava tkivne podudarnosti klase II (engl. *major histocompatibility complex II* – MHC

II) na makrofazima u žilnici, što ukazuje na smanjenu sposobnost čišćenja patogena, a u isto vrijeme povećava se eksprimiranje komplement receptora tipa 1 (engl. *complement receptor 1* – CR1) koji je uključen u komplementom posredovanu fagocitozu (58). U zdravom tkivu makrofagi su uglavnom lokalizirani u žilnici, ali odlaganjem bazalnih depozita i stvaranjem druzi proangiogeni makrofagi prisutniji su u području BM-a. Makrofagi identificirani u područjima atrofije RPE, prekida kontinuiteta BM-a i CNV-a eksprimiraju receptore za oksidirane proteine i VEGF-a te se time sugerira njihova uloga u uklanjanju staničnog debrisa, ali i u procesu angiogeneze (40, 41).

Dvostruka priroda plastičnosti makrofaga može se pripisati dvjema podgrupama koje se nazivaju makrofagi M1 i M2, a sposobni su za izazivanje odgovora koji se odnose na pro/protuupalnu imunološku aktivaciju/supresiju i održavanje/destrukciju tkiva. Klasični makrofagi M1 su CD86+ (eng. *cluster of differentiation* – CD), odnosno imunološke efektorske stanice koje proizvode čimbenike koji rezultiraju proupalnim odgovorom i protuangiogenim učinkom (15). Alternativni makrofagi M2 stanice su CD163+ koje aktiviraju citokini IL-4 i IL-10, a opisani su kao protuupalne stanice koje potiču imunoregulaciju, remodeliranje/cijeljenje tkiva i tumorski rast, ali u određenim mikrouvjetima mogu biti proangiogeni. Na razini RPE aktivirani makrofagi M1 potiču ekspresiju komplement čimbenika B i C3, dok alternativni makrofagi M2 djeluju regulirajući inhibitore komplementa (59, 60).

Destabilizacijom omjera makrofaga M1 i M2 razvija se patologija SMD-a. Tijekom normalnog procesa starenja u mladih osoba makrofagi su polarizirani prema podgrupi M1, dok se u starijih zdravih ljudi povećanjem razine IL-10 na stražnjem polu oka makrofagi polariziraju prema populaciji M2 potencirajući razvoj CNV-a. Populacija M2 vjerojatno ima zaštitnu ulogu u očima pacijenata treće životne dobi jer pokušava suzbiti kumulativne učinke cjeloživotnog oksidacijskog stresa. U patologiji SMD-a događa se povratak na fenotip makrofaga M1, što može dodatno oštetiti tkivo mrežnice zbog proupalnog okruženja. S obzirom na to da je isti fenotip makrofaga prisutan u mladih zdravih ljudi i kod ispitanika sa patologijom SMD-a, pretpostavlja se da s godinama dolazi do gubitka imunološke privilegiranosti tkiva mrežnice. Budući da plastičnost makrofaga ovisi o mikrookruženju tkiva i s obzirom na promjenjivost podgrupe makrofaga tijekom godina, teško je zaključiti predominantni fenotip koji je zaslužan za patologiju SMD-a. Makrofagi M1 češće se nalaze u očima s GA, a makrofagi M2 kod neovaskularnog oblika, dok su u područjima CNV-a identificirane obe populacije (59, 60).

## Mikroglia

Mikroglia su rezidentni makrofagi centralnog živčanog sustava odgovorni za održavanje homeostaze okolnog tkiva. U zdravom tkivu mrežnice lokalizirani su u unutarnjim slojevima, sloju ganglijskih stanica, unutarnjem pleksiformnom i vanjskom pleksiformnom sloju. Visoko su plastični s brзом migracijom prema mjestu tkivnog stresa ili ozljede putem „toll-like” receptora kojim nadziru mikrookolišne uvjete. Starenjem dolazi do slabo razumljivih alteracija u ponašanju i polarizaciji stanica. Detektirane su povišene razine mikroglijalnih citokina IL-1 i IL-6 u mozgu pacijenata koji boluju od Alzheimerove bolesti koja, kao i SMD, pripada bolestima povezanim s dobi. Za mrežnicu, koja je podrijetlom neurološko tkivo, pretpostavljaju se slične promjene u populaciji mikroglije koje vode patologiji SMD-a (36, 38).

Mikroglia tijekom procesa starenja i stresa tkiva pokazuje tendenciju aktivacije u fagocite, ekspresije aktivacijskih markera i morfološke promjene povećanja staničnog tijela u ameboidnu formu i skraćivanje dendrita. U mladih ljudi lokalizirana je u slojevima unutarnje mrežnice, no s godinama migrira prema subretinalnom prostoru preuzimajući funkciju fagocitoze lipofuscina, što sugerira protektivnu ulogu održavanja homeostaze i funkcionalnosti tkiva. Međutim, daljnjim razvojem patoloških zbivanja dolazi do distrofije morfologije, redukcije dendrita i spore migracije prema mjestima tkivnog stresa. Subretinalna mikroglia u području RPE-a inducira sekreciju proupalnih i proangiogenih čimbenika, kao i razvoj kronične upale. *In vitro* je dokazano da mikroglijalne stanice u kontaktu s fotoreceptorima izazivaju njihovu smrt (61).

Poremećaj u imunološkom regulacijskom sustavu (makrofagi i mikroglia) može dovesti do disregulacije paraupalnog odgovora. Putevi kemokinskog liganda 2 i njegovog receptora (engl. *chemokine ligand 2* – CCL2; engl. *chemokine receptor 2* – CCR2), kao i CX3CL1 i njegovog receptora (engl. *C-X3-C chemokine receptor 1* – CX3CR1) dvije su glavne osi uključene u njihovu migraciju. Mikroglijalne stanice mrežnice ekspimiraju CCR2-CX3CR1+, dok makrofagi žilnice i cirkulirajući monociti mogu ekspimirati oboje. U ranim fazama starenja, kad su stanice RPE-a i fotoreceptori umjereno pod stresom, mikroglijalne stanice CX3CR1+ migriraju iz unutarnje mrežnice u subretinalni prostor kako bi održale homeostazu, otpuštaju kemokine prisutne i u serumu, kao što je CCL2 za regrutiranje makrofaga CCR2+ iz žilnice, i

monocite iz sistemske cirkulacije, a to ima protektivnu ulogu (61–63). Nedostatak funkcije monocita CCR2+ ili CX3CR1+ zbog genetičke ili epigenetičke modifikacije može dovesti do disregulacije imunološkog sustava, što rezultira poremećenim paraupalnim odgovorom i produkcijom upalnih citokina (62).

### *Makroglia*

Mullerove stanice i astrociti makroglialne su stanice ljudske mrežnice. Dok mrežnični astrociti smješteni u ganglijskom sloju aksona osiguravaju pravilnu vaskulogenezu tijekom razvoja, Mullerove stanice kao predominantno glijalne imaju funkciju održavanja mikrookolišne homeostaze neuronima, osiguravanja nutrijenata i antioksidacijskih čimbenika, regulacije recikliranja neurotransmitera i održavanja ravnoteže iona kalija (64).

Tijekom starenja mrežnice Mullerove stanice akumuliraju markere oksidacijskog stresa, što pokazuje povećanje imunoreaktivnosti peroksidiranih lipida. Tijekom oksidacijskog stresa gubitak stanica RPE i fotoreceptora rezultira remodeliranjem Mullerovih stanica, što omogućuje migraciju preostalih mrežičnih neurona radi održavanja funkcionalnosti tkiva. U područjima atrofije RPE/GA Mullerove stanice eksprimiraju glijalni fibrilarni acidni protein (GFAP) koji uzrokuje reaktivnu gliozu tijekom koje Mullerove stanice hipertrofiraju i proliferiraju u svrhu očuvanja imunološke privilegiranosti tkiva. Međutim, tijekom reaktivne glioze proizvode i signalne kemokine kojima privlače makrofage i mikroglialne stanice promovirajući upalu i apoptozu fotoreceptora. Astrociti također podliježu morfološkim promjenama u smislu povećanja broja staničnih organela kao kompenzatornog mehanizma smanjenja broja stanica i pritom eksprimiraju GPAP koji je nazočan i u družama (64, 65).

### *Sustav komplementa*

Fotooksidacija u fotoreceptorima i lokalni okidači oštećenja tkiva aktiviraju komplement, po principu primitivne enzimske kaskade, koji igra ključnu ulogu u urođenom i stečenom imunološkom odgovoru, odnosno uklanjanju imunološkog kompleksa i apoptotičkih stanica. Tri su puta aktivacije komplementa: klasični posredovan antigen-protutijelo kompleksom,

alternativni vezanjem na površinu patogena i lektinski vezanjem na polisaharidne komponente na mikrobiološkoj površini. Aktivacija sva tri puta rezultira proupalnim odgovorom koji uključuje stvaranje membranskog kompleksa napada (engl. *membrane attack complex* – MAC) koji posreduje staničnu lizu, oslobađanje proupalnih citokina i kemokina, kao i poboljšanje propusnosti kapilara (36, 66, 67). Disregulacija ili disfunkcija puteva komplementa uključena je u različita kritična autologna oštećenja, a to vodi razvoju širokog spektra patoloških zbivanja (38, 66). Čimbenici komplementa, C3a, C5a, C5b-9 terminalni kompleks, komplement čimbenik H, vitronektin i klusterin kao inhibitori komplementa i CR1/CD35, koji kontrolira proliferaciju B-stanica, identificirani su u družama mrežnice s pretpostavkom da čimbenike komplementa izlučuju lokalne stanice kao dio kroničnog upalnog odgovora (67–69).

Komplement čimbenik H, serumski glikoprotein koji se sintetizira u jetri, glavni je inhibitor alternativnog puta aktivacije komplementa (C3) na način da se veže na heparin na staničnim membranama i CRP kao odgovor na ozljedu tkiva. Čimbenik H u mrežnici sintetiziraju stanice RPE-a i žilnice s tendencijom pada tokom godina (70). Snažna aktivnost detektirana je u makuli, prostoru sub-RPE i oko žilničnih kapilara gdje se distribucija CFH-a podudara s distribucijom kompleksa C5b-9, dok su ekstramakularne lokacije pokazale manju aktivnost istih. U slučaju polimorfizma *CFH Y402H* dolazi do smanjenja inhibitorске funkcije i disregulirane aktivacije što posljedično dovodi do upale i citolitičkih odgovora (66, 70). Polimorfizmi *CFH-a* i *C3* povezani su i s jakošću vezanja na CRP. Određene genske inačice čimbenika komplementa C3 pokazuju nisku sposobnost vezanja za CFH, što vodi pojačanoj aktivaciji komplementa (71, 72). Pušenje kao rizični čimbenik može isto potaknuti aktivaciju C3 na razini RPE/žilnica i u kombinaciji s određenim haplotipom *CFH-a* dovesti do razvoja SMD-a (73).

### *T-stanice*

Stecheni imunološki odgovor odnosi se na antigen specifični odgovor generiranim limfocitima T i B. Starenjem organizma dolazi do postupnog slabljenja imunološkog odgovora, što se naziva imunosenescencija, kojoj u prilog govori promjena omjera memorijskih i naivnih T-stanica radi smanjenja funkcije timusa (74). Nejasno je na koji način T-limfociti CD4+, u odgovoru na mrežnične antigene prezentirane na stanicama RPE uslijed povećane ekspresije MHC II molekula, dovode do oštećenja tkiva. Osim toga, T-stanice prolaze kroz fenotipske

promjene s godinama, uključujući smanjenje kostimulacijske molekule CD28 koja je uključena u stvaranje antigen-specifičnih odgovora i povećanje markera CD56 koji se obično vidi na prirodnim stanicama ubojicama, koje omogućuju nespecifičnu reaktivnost antigena. U perifernoj krvi pacijenata sa SMD-om otkrivena je povećana učestalost T-stanica CD28-CD56+ u usporedbi s kontrolama što govori u prilog imunosenescenciji u patogenezi senilne makularne degeneracije (66, 74, 75).

Starenjem organizma uz polarizaciju makrofaga događaju se i promjene populacije stanica CD4+ povezane s povećanom ekspresijom proupalnih citokina u pacijenata sa SMD-om. Povišene razine proupalnih citokina, CCL2, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-17A, IL-22, TGF- $\beta$  i interferon gama (IFN- $\gamma$ ), prisutne su u tkivu mrežnice (76). T-stanice CD4+ potaknute čimbenikom komplementa C5a luče proupalne citokine, IL-22 i IL-17A, čije su razine povišene u serumu ispitanika s eksudativnim oblikom bolesti. *In vitro* IL-22 inducira apoptozu RPE-a, dok IL-17A potiče proizvodnju upalnih citokina IL-6, IL-8 i CCL2 iz stanica RPE inducirajući angiogenezu u humanim endotelnim stanicama žilnice (66, 77).

### 1.1.5.2 Sistemska upala

Osim lokalno na razini tkiva u senilnoj makularnoj degeneraciji upala je prisutna i na sistemskej razini. U serumu ispitanika sa SMD-om povišeni su malondialdehidi, karbonil proteini i ukupna razina oksidacijskog stresa, dok je razina ukupnog antioksidacijskog kapaciteta smanjena (56, 78). Karboksietilpirol (engl. *carboxyethylpyrrole* – CEP) je bioproduct koji nastaje oksidacijom dokozaheksaenske kiseline u mrežnici. DHA je prekursor neuroprotektivnih faktora koja inhibira apoptozu i proces upale, dok uloga CEP-a nije do kraja razjašnjena iako eksperimentalna istraživanja pokazuju da sudjeluju u indukciji mrežnične atrofije i neovaskularizacije. Protutijela na CEP identificirana su u serumu ispitanika sa SMD-om, a kad se rabe uz markere genomske rizika daju približno 80% točnosti za određivanje predispozicije za razvoj SMD-a. Smatra se da sudjeluju u generiranju kronične upale i formiranju fenotipa bolesti (79).

Razine čimbenika komplementa C3a, Bb, C4a, C5a, C5b-9 i citokina IL-6, IL-18 i TNF- $\alpha$  u serumu koreliraju s kopijama alela *CFH Y402H* (66, 71, 76). Sistemske razine IL-6 koreliraju

s incidencijom i progresijom bolesti, dok IL-18 ima dvojak u ulogu promovirajući atrofiju RPE-a, a s druge strane inhibirajući razvoj CNV-a (80). Također, polimorfizam *CFH Y402H* povezan je s višim serumskim razinama CRP-a zbog smanjene sposobnosti vezanja na čimbenik komplementa H. Smanjena sposobnost vezanja proteina akutne faze upale inducira aktivaciju komplementa alternativnim putem, a velikim metaanalizama dokumentirano je da su serumске razine CRP > 3 mg/L povezane s dvostruko većim rizikom senilne makularne degeneracije (72).

Polarizacija makrofaga iz populacije M1 u M2 i promjene fenotipa stanica CD4<sup>+</sup> iz Th1 u Th2 populaciju praćene su povišenim serumskim razinama proupalnih citokina kao što su CCL2, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17A, IL-22, IFN- $\gamma$  i TGF- $\beta$  (57, 60, 74, 76). Ne nalazi se u literaturi dovoljno podataka o serumskim razinama protuupalnih citokina IL-10 i IL-4 u odnosu na kontrolne skupine odgovarajuće dobi te ostaje nejasno na koji način ravnoteža proupalnih i protuupalnih citokina generira fenotip bolesti (38).

#### **1.1.6 Procjena čimbenika rizika, progresije i klasifikacijske ljestvice**

U svijetu napretka i stavljanja fokusa na personaliziranu medicinu jako je važno prepoznati potencijalne pacijente koji imaju visoki rizik razvoja SMD-a. Procjenu čimbenika rizika u osoba koje nemaju SMD možemo učiniti rabeći pojednostavljeni upitnik procjene rizika Thea SMD (engl. *simplified Thea AMD risk-assessment scale* – STARS) koji grupira 12 čimbenika rizika u četiri kategorije:

1. demografski podaci: dob, spol i etnička pripadnost;
2. obiteljska anamneza;
3. osobna anamneza: pušenje, indeks tjelesne mase, hipertenzija, infarkt miokarda, hiperkolesterolemija;
4. parametri vezani za oči: boja šarenice, katarakta, refrakcija (29, 30).

Dijagnoza senilne makularne degeneracije u početku se postavljala na temelju kliničkog pregleda i/ili procjenom fotografije fundusa u boji kojima se bolest tradicionalno klinički klasificirala na rani stadij s nazočnim srednje velikim druzama i promjenama RPE-a, kao i kasni stadij s neovaskularizacijom ili geografskom atrofijom. Međunarodna klasifikacija senilne makularne degeneracije (engl. *international classification (IC) for age-related macular*



*degeneration*) iz 1995. godine napravljena je upravo za potrebe epidemioloških i kliničkih znanstvenih istraživanja (81). Danas postoje i mnogo specifičnije kliničke klasifikacije kao što su AREDS i Beckmanova klasifikacija (82). Prikaz klasifikacijskih ljestvica nalazi se u Tablici 1.

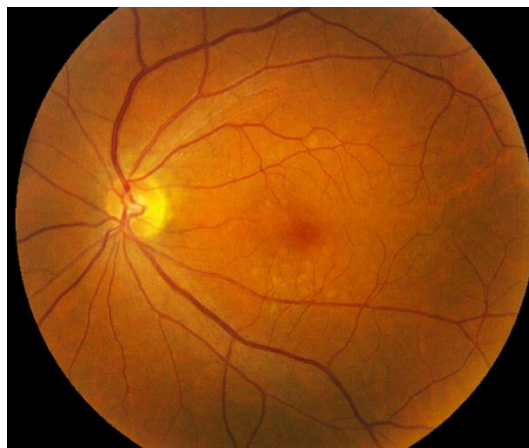
**Tablica 1.** Klasifikacijske ljestvice senilne makularne degeneracije

<p><b>IC klasifikacija (1995.) prema fotografiji fundusa neovisno o vidnoj oštini</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- rani stadij s druzama i/ili abnormalnostima RPE-a (hiper/hipopigmentacijske promjene RPE-a sa slabo vidljivim žilničnim krvnim žilama)</li><li>- kasni stadij s neovaskulatima i hemoragijama ili suha forme geografske atrofije (depigmentacijske promjene RPE-a s jasno vidljivim žilničnim krvnim žilama)</li></ul> <p><b>Klasifikacijska ljestvica AREDS</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- kategorija 1 (bez znakova SMD-a): nekoliko (5 – 15) manjih druzi (<math>\leq 63 \mu\text{m}</math>) ili bez druzi i pigmentnih promjena</li><li>- kategorija 2 (rani stadij SMD-a): više malih druzi (<math>&gt; 15</math>), nekoliko intermedijarnih druzi (<math>64 - 125 \mu\text{m}</math>) i/ili abnormalnosti RPE u jednom ili oba oka</li><li>- kategorija 3 (intermedijarni SMD): konfluencija intermedijarnih druzi (20 srednje velikih ili 65 manjih), jedna velika druzi (<math>&gt; 125 \mu\text{m}</math>) i/ili geografska atrofija bez zahvaćanja makule u jednom ili oba oka</li><li>- kategorija 4 (uznapredovali unilateralni oblik): uznapredovala suha forma geografske atrofije koja zahvaća makulu ili eksudativna forma s neovaskularizacijom u jednom oku: 4a) uznapredovali oblik u jednom oku, kategorija 1, 2 ili 3 u drugom oku 4b) uznapredovali oblik u jednom oku sa smanjenjem vidne oštine (<math>&lt; 20/32</math>) u drugom oku, no bez dijagnoze uznapredovalog oblika u drugom oku *uznapredovali oblik u oba oka.</li></ul> <p><b>Beckmanova klasifikacija</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- bez vidljivih starosnih promjena u makuli – bez druzi i pigmentnih promjena</li><li>- normalne starosne promjene: nekoliko manjih druzi (<math>\leq 63 \mu\text{m}</math>), bez pigmentnih promjena</li><li>- rani stadij: srednje velike druze (<math>64 - 125 \mu\text{m}</math>), bez pigmentnih promjena</li><li>- intermedijarni stadij: srednje velike druze s pigmentnim promjenama ili velike druze (<math>&gt; 125 \mu\text{m}</math>)</li><li>- kasni stadij: geografska atrofija ili neovaskularizacija u makuli.</li></ul>
--

Na sljedećim slikama prikaz je zdrave makule i stadiji senilne makularne degeneracije (URL: <http://www.eyerounds.org/atlas/pages/AMD.htm>; pristupljeno: 29. rujna 2022.).



**Slika 2a.** Makula bez promjena



**Slika 2b.** Više od 15 malih druza promjera  $\leq 63 \mu\text{m}$



**Slika 2c.** Intermedijarne druze u području donjeg dijela makule promjera 64 – 125  $\mu\text{m}$



**Slika 2d.** Velike druze promjera  $> 125 \mu\text{m}$  s pridruženim abnormalnostima RPE-a



**Slika 2e.** Geografska atrofija



**Slika 2f.** Neovaskularni stadij

Prema AREDS i Beckmannovoj klasifikaciji pacijentima se dodjeljuju bodovi s obzirom na nazočne čimbenika rizika (Tablica 2.). U Tablici 3. prikazana je 5-godišnja procjena rizika progresije u kasni stadij s obzirom na dodijeljene bodove (83).

**Tablica 2.** Pojednostavljena ljestvica AREDS dodjele rizičnih bodova s obzirom na klinički nalaz

Rizični bodovi	Klinički nalaz stražnjeg pola oka
0	Odsustvo velikih druze i pigmentnih promjena
1	Velike druze ili pigmentne promjene u jednom oku; srednje velike druze u oba oka
2	Velike druze i pigmentne promjene u jednom oku; velike druze ili pigmentne promjene u oba oka; kasni stadij u jednom oku
3	Velike druze i pigmentne promjene u jednom oku s jednom od promjena u drugom oku
4	Velike druze i pigmentne promjene u oba oka

**Tablica 3.** Petogodišnja procjena rizika progresije u kasni stadij

Rizični bodovi	Rizik progresije za pacijenta koji nema kasni stadij bolesti	Rizik progresije za pacijenta koji ima kasni stadij na 1 oku
0	0,4%	
1	3,1%	
2	11,8%	14,8%
3	25,9%	35,4%
4	47,3%	53,1%

Zadnja dva desetljeća uvođenjem tehnike OCT/OCTA i fundus autofluorescencije poboljšala se rezolucija detektiranih lezija. Navedene pretrage služe za praćenje veličine i lokalizacije druze, površine granica unifokalnih ili multifokalnih žarišta geografske atrofije, neovaskularizacije i uspješnosti liječenja inhibitorima protuVEGF. Program CAM (engl. *classification of atrophy meetings*) predložio je OCT kao standardnu metodu procjene stadija GA u kojoj razlikujemo sljedeće:

- inkompletna atrofija vanjske mrežnice (engl. *incomplete outer retina atrophy* – iORA): stanjenje vanjske mrežnice s očuvanim RPE-om; bez hipertransmisije svjetla ispod BM-a;
- kompletna vanjska atrofija mrežnice (engl. *complete outer retina atrophy* – cORA): značajno stanjenje vanjskih slojeva mrežnice, intaktni RPE s intermitentnom hipertransmisijom;
- inkompletna RPE i vanjska atrofija mrežnice (engl. *incomplete RPE and outer retina atrophy* – iRORA): degeneracija fotoreceptora, iregularnost ili prekid kontinuiteta RPE-a, diskontinuirana hipertransmisija u promjeru  $\leq 250 \mu\text{m}$ ;
- kompletna RPE i vanjska atrofija mrežnice (engl. *complete RPE and outer retina atrophy* – cRORA): degeneracija fotoreceptora i kompletna disrupcija RPE-a u promjeru  $> 250 \mu\text{m}$  (84).

U neovaskularnom stadiju prema klasičnoj podjeli razlikujemo:

- okultni tip s membranskom neovaskularizacijom ispod RPE-a i slabo vidljivom hiperfluorescencijom na FAG-u;
- klasični tip s neovaskulatima žilnice koji se formiraju poviše RPE-a u subretinalnom prostoru, a na FAG-u se detektira hiperfluorescencija u ranim fazama;
- miješani tip lezije uključuje kombinaciju okultne i klasične lezije;
- mrežnična angiomatoza s formiranjem neovaskulata u dubokom kapilarnom sloju mrežnice uz progresiju prema vanjskim slojevima i subretinalnom prostoru (9).

Nova podjela neovaskularnog stadija razlikuje:

- tip 1 s čistom okultnom neovaskularizacijom na FAG-u i pridruženo odignuće RPE-a poviše BM-a na OCT-u;
- tip 2 s čistom klasičnom lezijom;
- tip 3 retinalne angiomatoze;
- tip 4 koji se dijeli na predominantno tip 2, gdje je više od 50% lezije klasičnog tipa na FAG-u s odgovarajućim subretinalnim hiperrefleksivnim materijalom prisutnim na OCT-u, i minimalni tip 2 gdje je manje od 50% neovaskularne membrane klasičnog tipa s potvrđenom elevacijom RPE-a poviše BM-a na OCT-u, a što odgovara okultnoj leziji (10).

U novoj podjeli opisuje se i žilnična polipoidalna vaskulopatija kao podtip tipa 1 sa saćastom dilatacijom krvnih žila žilnice ispod BM-a, lokaliziranom najčešće oko optičkog diska (11).

### 1.1.7 Liječenje

Strategije liječenja SMD-a trebale bi uključivati kombiniranu primjenu dijetetskih mjera, promjene životnih navika i farmakološke intervencije uzimajući u obzir genetičku podlogu bolesti. Prevencija i liječenje ranog i intermedijarnog stadija bolesti kombiniranom peroralnom dijetom s visokom dozom antioksidansa smanjuje rizik progresije SMD-a u kasni oblik za 25% i reducira teški gubitak vidne oštine za 19%. Upravo je identifikacija intermedijarnog stadija kritična jer je unutar 5 godina rizik od progresije u kasni stadij između 12 – 50%, a takvi pacijenti imaju najviše koristi od promjena stila života (prestanak pušenja) i antioksidacijske terapije (33, 34).

Veliko multicentrično randomizirano kliničko istraživanje evaluiralo je dugodjelujuće učinke viših doza antioksidacijskih suplemenata na incidenciju SMD-a i mrežnice. Studija AREDS1 potvrdila je da suplementi s visokim sadržajem antioksidansa i minerala kao što su vitamin C, vitamin E,  $\beta$ -karoten, cink i bakar odgađaju progresiju u kasni oblik bolesti (33). Zbog kompetitivnog vezanja  $\beta$ -karotena i povećanog rizika raka pluća u bivših pušača zamjena s luteinom i zeaksantinom, kao i smanjenje razine cinka, ima isti učinak na progresiju bolesti, što se i potvrdilo u studiji AREDS2 (34).

Neovaskularna forma uzrokuje ozbiljan i brzi gubitak vida u odnosu na druge forme SMD-a. Studija koja je uključivala preko 100 000 ispitanika s CNV-om pokazala je da 16% njih bilo slijepo unutar 2 godine bez odgovarajućeg liječenja (130). Procjene su da kombinirana vitaminska profilaksa sa standardnom protuVEGF terapijom za neovaskularni oblik može reducirati sljepoću uzrokovanu SMD-om za 17,6% do 2050. godine (85). U rutinskoj kliničkoj primjeni nekoliko je inhibitora VEGF-a koji se primjenjuju kao intravitrealne injekcije, u intervalima od 4 tjedna i više (8, 12, 16 tjedana), s učinkom inhibicije endotelne proliferacije, reduciranja vaskularne permeabilnosti i suprimiranja neovaskularizacije (86).

Znajući da je imunoupalni proces veoma aktivan tijekom razvoja neovaskularizacije, potrebno je naglasiti važnost ne samo specifičnih nego i nespecifičnih imunomodulatora i protuupalnih lijekova kao adjuvantne terapije suhe i eksudativne forme (36). Kortikosteroidi inhibirajući kaskadu alternativnog puta komplementa uz prolongirani učinak predstavljaju važan parametar

kombinirane terapije s inhibitorima VEGF-a. Upravo određeni intraokularni kortikosteroidni implantanti za liječenje makularnog edema i neinfektivnog posteriornog uveitisa mogu predstavljati racionalnu adjuvatnu terapiju kod pacijenata koji lošije odgovaraju na terapiju inhibitorima VEGF-a (87).

Trenutno nema efektivnog tretmana za geografsku atrofiju koja uzrokuje 20% zakonske sljepoće u SAD-u. U istraživanjima se nalaze oprečni rezultati o učincima inhibitora komplementa eculizumaba i lampalizumaba i upotrebi bioloških lijekova kao što su blokatori TNF- $\alpha$  (infiximab, adalimumab) i inhibitor IL-2 (daklizumab) (88). Provode se i istraživanja djelotvornosti cilijarnih neurotrofičnih faktora, inhibitora oksidacijskog stresa i mrežničnih toksina (2). Također su i glikanske strukture istraživane kao potencijalne terapijske molekule. Asijalizirani triantenarni kompleksni N-glikan s tri vezane galaktoze na granama mala je molekula s potencijalnom ulogom u liječenju geografske atrofije. Pripada skupini glikana čiji je najpoznatiji predstavnik fetuin također nazočan u mrežnici iako s nepoznatom ulogom. Pokazalo se da isključivo glikani s terminalno vezanim galaktozama podupiru organizaciju vanjskog segmenta fotoreceptora prilikom deprivacije RPE-a. Na animalnim modelima s geografskom atrofiom NA3 prevenira degeneraciju vanjskog segmenta fotoreceptora u slučaju odsutnosti RPE-a, piknoze jezgri u unutarnjim segmentima i izlučivanje GFAP-a u uvjetima oksidacijskog stresa. Svojim neuroprotektivnim djelovanjem čuva debljinu mrežnice, sprječava reaktivnu gliozu putem Mullerovih stanica i promovira maturaciju adherentnih veza između Mullerovih stanica i fotoreceptora. Osim strukturalne djelotvornosti funkcionalnost NA3 glikana dokazana je očuvanim amplitudama a i b vala u elektroretinogramu (89).

## **1.2 Glikozilacija proteina**

### **1.2.1 Biosinteza glikoproteina**

Glikozilacija je složena posttranslacijska biosinteza ugljikohidratnih komponenti na proteinima unutar jezgre, citosola, endoplazmatskog retikuluma (ER) i Golgijevog kompleksa, što ih čini njihovom integralnom strukturalnom i funkcionalom komponentom. Proces je bitan za molekularne interakcije na staničnoj površini i u međustaničnom prostoru, kao i za homeostatske mehanizme u esencijalnim biološkim procesima (90, 91). U ljudskom genomu 5

– 10% gena odgovorno je za proces glikozilacije, a više od 40 – 50% bioloških proteina su glikoproteini. Glikoproteini su komponente urođenog i stečenog imunološkog sustava, čine adhezijske integrine i receptore staničnih membrana, sastavni su dio sekretornog, transportnog i signalnog sustava te sudjeluju u odgovoru akutne faze upale i procesu apoptoze (92–94). Sinteza proteina uvjetovana je genima, međutim trodimenzionalna konformacija i aktivne kovalentne modifikacije kojima proteini podliježu, uključujući i proces glikozilacije, kontrolirane su epigenetičkim, konstitucijskim i okolišnim čimbenicima (90, 91). Poremećaji enzima i mutacije oko 700 gena povezanih s glikanima koji kodiraju kinaze, epimeraze, transportere, glikotransferaze, glikozidaze, glikan-modificirajuće enzime i lektine uzrokom su kongenitalnih sistemskih bolesti s imunološkim, neurološkim, motoričkim i probavnim simptomima. Smatra se da je otprilike 1,4% svih poznatih bolesti uzrokovano mutacijama procesa glikozilacije (92).

Kombinacijom 13 različitih monosaharidnih jedinica i 8 aminokiselina nastaje ukupno 41 veza, uključujući procese N- i O-glikozilacije, C-manozilacije, fosfoglikacije i glijacijacije. U biosintezi sudjeluje 16 različitih enzima koji sudjeluju u aktivnom transportu aktiviranih pojedinačnih monosaharida ili monosaharid-1-fosfata na aminokiseline proteina, s iznimkom prijenosa pentasaharidne srži vezane na asparagin (Asn) u endoplazmatskom retikulumu i lipidnog sidra koje se vrši u bloku na odgovarajući polipeptid (90, 91). Složeni mehanizmi biosinteze dovode do različite prirode glikana vezanih na specifično mjesto na proteinu (mikroheterogenost) i varijacije broja dostupnih mjesta za proces glikozilacije (makroheterogenost). Različiti tipovi veza monosaharid-aminokiselina mogu postojati u istom proteinu ovisno o dostupnim enzimima, sekvenci i prostornoj konformaciji proteina, kao i okolišnim uvjetima. Mikroheterogenost glikana uvelike ovisi o mikrookolišnim uvjetima, a promjene temperature, otopljenog kisika i stupnja kiselosti vode alteracijama glikozilacijskog procesa. S obzirom na ovisnost glikozilacije o različitim okolišnim, konstitucijskim i epigenetičkim čimbenicima, kao i o staničnom miljeu, ekspresijskim čimbenicima stanice, čimbenicima rasta, dostupnim monosaharidima i gliko-enzimima proces je specifičan za svaku pojedinu stanicu i tkivo. Fiziološki i patološki procesi, razvoj, diferencijacija stanice i maligna transformacija utječu na strukturu glikana na peptidima, iz čega proilazi da jedna stanica u određenom trenutku može eksprimirati različite glikoproteine (92, 93).



Konformacija, solubilnost, stabilnost, zaštita proteina od razgradnje proteazama, smanjenje imunogenosti i usmjeravanje biološke aktivnosti rezultat je procesa N i O-glikozilacije. Deglikozilacija proteina vodi njihovoj agregaciji i biološkoj inaktivnosti dok sijalinizacija utječe na poluživotni vijek proteina u serumu produžujući njihovu cirkulaciju i sprječavajući djelovanje receptora na površini hepatocita koji sudjeluju u njihovoj degradaciji (141). Glikoproteini u tržišnoj biofarmakologiji čine 40% svih produkata, a od toga su trećina terapijska protutijela. Vrijednost glikoproteinskog tržišta iznosi više od 100 bilijuna dolara uz pretpostavku godišnjeg rasta od 15% (91). Djelovanje rekombinantnih protutijela za liječenje karcinoma i autoimunskih bolesti temelji se na procesu glikozilacije. Rekombinantni proteini proizvedeni u nehumanim sustavima podliježu procesima razgradnje u ljudskom organizmu i aktiviranju imunološkog sustava. Hipersenzitivna reakcija na takve glikane jedan je od izazova biofarmakologije u smislu postizanja određenog stupnja galaktozilacije, fukoziacije i sijalinizacije rekombinantnih proteina koji će onemogućiti reakciju imunološkog sustava, ali i osigurati biološku aktivnost glikoproteina kao lijeka (95).

### *Ugljikohidrati u glikanima*

Od svih poznatih uloga ugljikohidrata kao energetskih supstrata i dijela nukleinskih kiselina najzanimljivija i najmanje istražena njihova je uloga glikana. Glikan je zajednički naziv za glikozidnim vezama međusobno povezane monosaharide u proteoglikanima, glikoproteinima i glikolipidima. Razlika između proteoglikana i glikoproteina u molekularnoj je masi glikanskog dijela gdje kod proteoglikana čini 95% mase, dok u glikoproteinima varira između 1 – 70% mase. U strukturi glikokonjugata razlikujemo oligosaharidne komponente građene od 2 do 20 monosaharidnih jedinica ili polisaharidne komponente koje sadržavaju više od 20 monosaharida. Monosaharide u glikanima klasificiramo na sljedeći način: 1. s obzirom na broj atoma ugljika na trioze i heksoze; 2. prema funkcionalnoj grupi na aldoze i ketoze; 3. s obzirom na veličinu prstena na peteročlani ili šesteročlani; 4. prema orijentaciji hidroksilne skupine na anomeričnom atomu ugljika (D ili L,  $\alpha$  ili  $\beta$ ). Svaka hidroksilna skupina monosaharida potencijalno je novo mjesto formiranja glikanske veze (96–98).

Najčešći monosaharidi prisutni u N- i O-glikanima su heksoze: galaktoza (Gal), manoza (Man), fukoza (engl. *fucose* – Fuc), N-acetilglukozamin (engl. *N-acetylglucosamine* – GlcNAc), N-

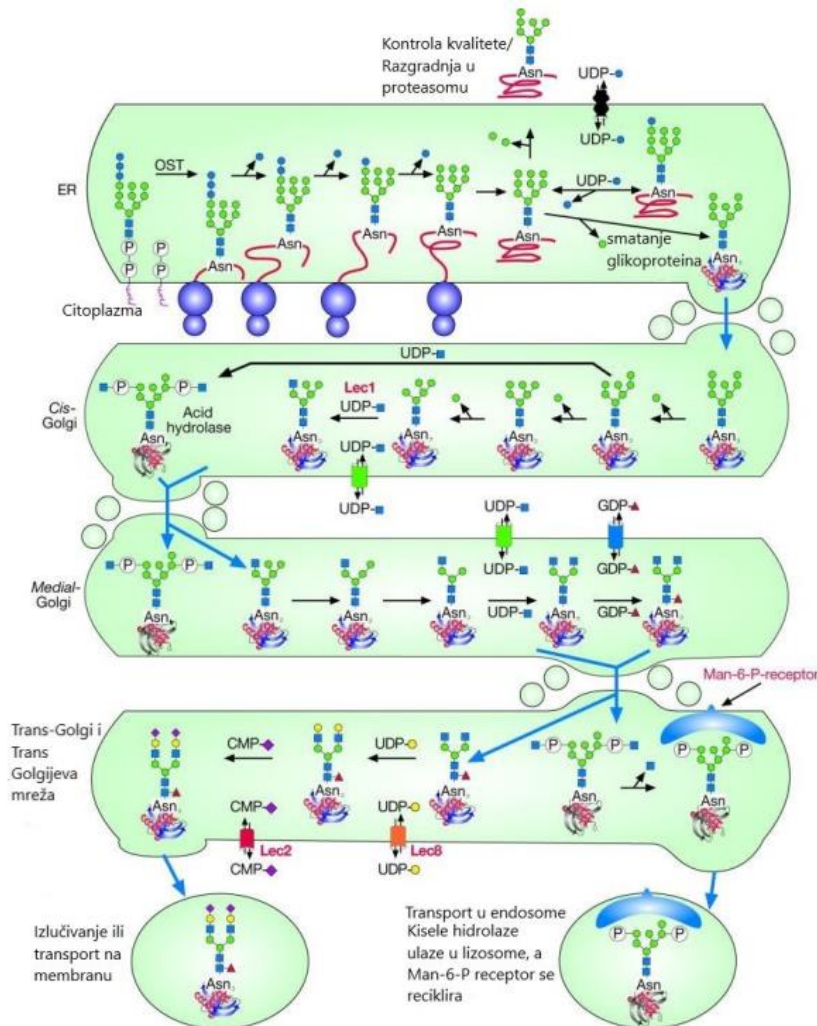
acetilgalaktozamin (engl. *N-acetylgalactosamine* – GalNAc) i sijalna kiselina s 9 ugljikovih atoma i karboksilnom skupinom na C-1 (engl. *N-acetylneuraminic acid* – Neu5Ac). Oligosaharidi nakon aktivnog vezanja na aminokiseline proteina podliježu modifikaciji putem fosforilacije, sulfacije i acetilacije (98).

### *N-glikozilacija*

Početni korak N-glikozilacije stvaranje je aktivnih monosaharida putem dolikol-fosfata ili nukleoidnih derivata na citosolnoj strani endoplazmatskog retikuluma, s iznimkom Neu5Ac čija se aktivacija događa u jezgri stanice, a zatim se premješta u Golgijev kompleks za konačne modifikacije. Na citosolnoj strani ER-a formira se heptasaharid (Man<sub>5</sub>, GlcNAc<sub>2</sub>) vezan na dolikol-fosfat putem enzima fosfotransferaze koji se zatim prenosi u lumen ER-a. Prijenos u lumen vrši se putem flipaze, a mutacije enzima flipaze dovode do brojnih kongenitalnih neuroloških poremećaja. Unutar ER-a nastaje završni prekursor (Glc<sub>3</sub>, Man<sub>9</sub>, GlcNAc<sub>2</sub>) u kojem su posljednja tri dodana glukozna ostatka signal završetka sinteze oligosaharida (96, 97).

Aktivirani prekursor (Glc<sub>3</sub>, Man<sub>9</sub>, GlcNAc<sub>2</sub>) djelovanjem oligosaharil-transferaza u bloku se prenosi na N-atom u bočnom lancu asparagina (engl. *Asparagine* – Asn) u ER-u. Asparagin se u proteinu uvijek nalazi u sekvenci Asn-X-Ser/Thr, pri čemu o kemijskim svojstvima amnokiseline X ovisi stopa glikozilacije. Ovu sekvencu sadržava 70% glikoproteina od kojih njih 70% sadržava N-glikozidnu vezu. Na položaju X nikad se ne nalazi prolin koji ima negativni utjecaj na stabilizaciju proteina. Daljnji koraci uključuju hidrolitičke reakcije važne za pravilno smatanje N-glikana. Glikozidazom se otpuštaju tri glukozna ostatka i manozidazom jedan manozni ostatak, pri čemu nastaje finalni prekursor (Man<sub>5</sub>, GlcNAc<sub>2</sub>) vezan s N-acetilglukozaminom na sekvencu proteina Asn-X-Ser/Thr koji se vezikulama premješta u Golgijev kompleks radi konačnih modifikacija (Slika 3.). Prije premještanja u Golgijev kompleks u ER-u dolazi do smatanja glikoproteina i provjere istoga, a u slučaju nepravilnosti protein se razgrađuje putem degradacijskog sustava ER-a ili ubikvitinskim putem u citosolu (96, 97). Poremećaj sustava za degradaciju dovodi do agregacije nepravilno smotanih proteina i neuroloških bolesti kao što je Parkinsonov poremećaj. Veza GlcNAc-β-Asn (prvotno opisana na ovalalbuminu 1961. godine) najraspostranjenija je ugljikohidratno-peptidna veza pronađena

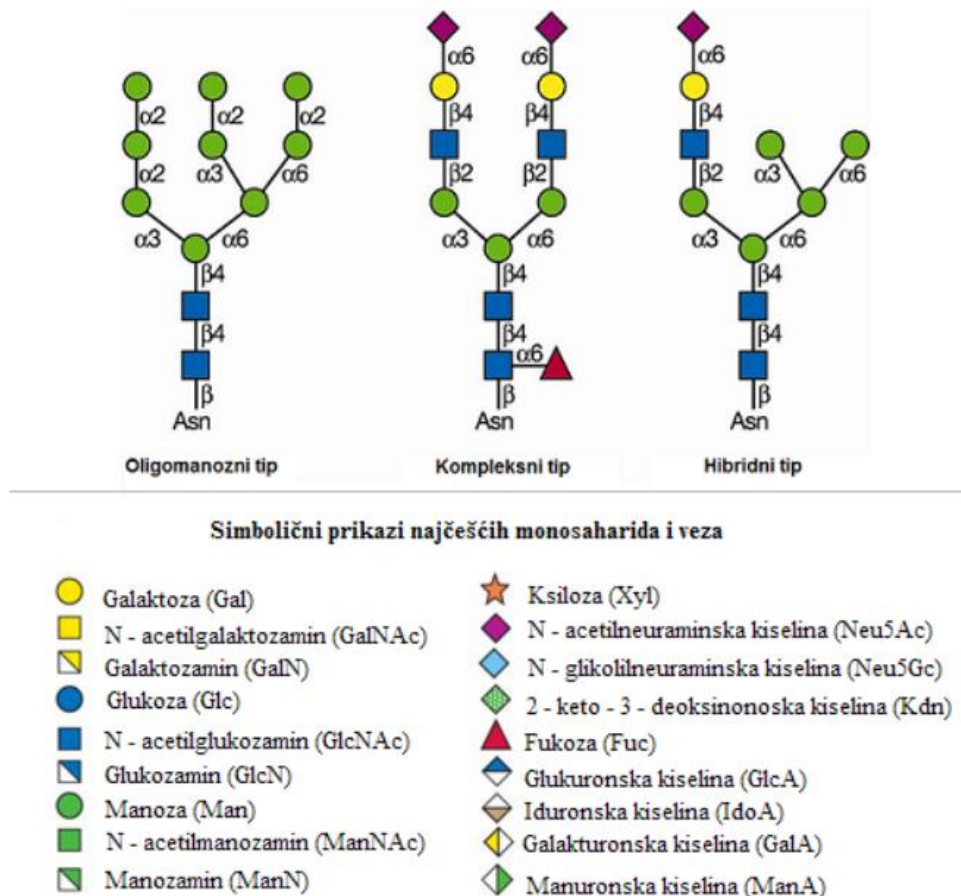
u eukariotima, na biološki aktivnim proteinima plazme, hormonima, enzimima, imunoglobulinima i staničnim receptorima (98).



**Slika 3.** Prikaz biosinteze N-glikana, preuzeto i uređeno prema Varki i ostali (99)

Tri su razreda N-glikana prema daljnjoj monosaharidnoj modifikaciji u Golgijevom kompleksu: oligomanozni ili visokomanozni, hibridni i kompleksni tip (Slika 4.). Hibridni N-glikani karakterizirani su nezamijenjenim terminalnim manoznim ostacima i substitucijom preostalih manoznih ostataka s GlcNAc. Kompleksni N-glikani ne sadržavaju slobodne terminalne manozne ostatke, već na mjestima  $\alpha$ -3 i  $\alpha$ -6 vežu ostatke GlcNAc kao ponavljajuće laktosamine (GlcNAc- $\beta$ (1-4)Gal) s dodatnom mogućnošću modifikacije vezanjem računajućeg GlcNAc na manozu i fukoze na GlcNAc pentasaharidne srži. Kompleksni N-glikani čine većinu proteina stanične površine i često završavaju s terminalnom Neu5Ac. N-acetilglukozamin dodane

sekvence u hibridnom i kompleksnom tipu glikana nazivaju se „antenama” (engl. *antennae* – A), a prema granjanju ostataka GlcNAc razlikujemo biantenarne, triantenarne i tetraantenarne (kompleksne) N-glikane (96, 97).



**Slika 4.** Tipovi N-glikana: oligomanozni, kompleksni i hibridni tip sa simboličnim prikazom najčešćih monosaharida, preuzeto i uređeno prema Varki i ostali (99)

### O-glikozilacija

Proces O-glikozilacije počinje aktivacijom GalNAc u citosolu djelovanjem GalNAc-transferaze, a potom se vrši transport u Golgijev kompleks. O-glikozidna veza nastaje u Golgijevom kompleksu vezanjem ugljikohidrata GalNAc na funkcionalnu hidroksilnu skupinu serina (engl. *serine* – Ser) ili treonina (engl. *threonine* – Thr). U odnosu na N-glikane s jednom pentasaharidnom jezgrom O-glikani se mogu klasificirati prema 8 različitih ugljikohidratnih

jezgri počevši s ostatkom GalNAc na koji se vežu različite monosaharidne komponente (GalNAc, GlcNAc, Gal, Man, Fuc, NeuAc5). Biološko značenje O-glikozidne veze povećanje je termostabilnosti, zaštita proteina od razgradnje proteazama, prepoznavanje jajne stanice i spermija prilikom oplodnje, kao i regulacija imunološkog odgovora (100, 101).

### *C-manolizacija, fosfoglikozilacija i glipijacija*

C-manolizacija ili C-glikozilacija je posttranslacijska modifikacija transmembranskih i sekrecijskih proteina u kojoj se C-1 atom  $\alpha$ -manoza ostatka veže na C-2 atom aminokiseline prvog triptofana (engl. *tryptophan* – Trp) u sekvenci Trp-X-X-Trp. Proces se odvija u lumenu ER-a djelovanjem C-manozil-transferaze (102).

U C-manolizaciji nema aktivne funkcionalne grupe aminokiseline koja sudjeluju u vezi, dok u fosfoglikozilaciji spona ugljikohidrata (GlcNAc, Man, Fuc, ksiloze) s aminokiselinom serinom fosfordiesterskog je tipa djelovanjem specifične monosaharid-1-fosfotransferaze. Funkcija fosfoglikozilacije još uvijek nije poznata, a pretpostavlja se biološka uloga u imunološkom sustavu (103).

Glipijacija je posttranslacijska modifikacija vezanja glikozilfosfatidilinozitola (GPI) na protein. Na GPI-u na citosolnoj strani ER-a vežu se monosaharidi s dolikol-fosfata ili nukleotida, a potom se u lumenu ER-a manozafosfoetanolamin veže na karboksilnu skupinu proteina kasnije smještenih na staničnoj površini (104).

## **1.2.2 Glikozilacijski obrazac imunoglobulina G**

Imunoglobulini G najbrojniji, najvažniji i najbolje proučeni N-glikoproteini koji u homeostatskim uvjetima sudjeluju u kontroliranom imunološkom odgovoru. Čine 75% svih protutijela u organizmu prepoznavajući patogene i sudjelujući u pokretanju fagocitoze i stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima i/ili komplementu. Stabilna su protutijela koja izlučuju B-limfociti tijekom sekundarnog imunološkog odgovora sa serumskim poluživotom od 12 dana (95).

Imunoglobulini su glavne komponente stečenog imunološkog sustava klasificirane u 5 razreda (IgA, IgD, IgE, IgM i IgG). Građene su od dva teška lanca (engl. *heavy chains* – H) povezana disulfidnim vezama i dva laka lanca (engl. *light chains* – L) s varijabilnim ( $H_L$  i  $V_L$ ) i konzistentnim domenama ( $C_H$  i  $C_L$ ). Imunoglobulini G glikoproteini su građeni od lakih lanaca s po jednom varijabilnom ( $V_L$ ) i konzistentnom domenom ( $C_L$ ), kao i teških lanaca koji sadržavaju jednu varijabilnu ( $V_H$ ) i tri konzistentne domene ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ). Na lancima se nalaze fragment antigen vezujuća regija (engl. *fragment antigen-binding* – Fab), a koju sačinjavaju varijabilne domene ( $V_H$  i  $V_L$ ) i N-terminalno vezane konzistentne domene ( $C_{H1}/C_L$ ), kao i fragment kristalizirajuća regija (engl. *fragment crystallizable region* – Fc) na konzistentnim domenama teških lanaca ( $C_{H2}$  i  $C_{H3}$ ) odgovorna za uništavanje stranih tijela vezanjem na receptore Fc. Prema aminokiselinskoj sekvenci teških lanaca i položaju disulfidnih veza dijele se na 4 subklase (IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4) s različitim afinitetima vezanja na komplement i mogućnošću njegove aktivacije. N-glikozilacijski proces događa se uglavnom na teškim lancima, dok i laki lanci mogu sadržavati N- i O-vezane glikane (105, 106).

Glikani čine 15% molekularne mase IgG utječući na njihovu stabilnost, poluživot i funkciju regije Fc. Masena spektrometrija pokazala je da je ukupan N-glikom IgG plazme uglavnom kompleksnog tipa. Ukupno je 92% glikanskih struktura IgG u plazmi sa sržnom fukozom, 13% s računjućim GlcNAc, 18% monosijaliniziranih i 3% disijaliniziranih struktura (107–109). Glikanska struktura regije Fc IgG sličnog je profila s nešto manjim stupnjem sijalinizacije, dok regija Fab u odnosu na regiju Fc ima veći stupanj sijalinizacije s 40% sijaliniziranih struktura i 50% disijaliniziranih struktura, kao i veću razinu visokomanoznih (4%) i računjućih (45%) N-glikana (163). Subklase IgG sličnih su glikozilacijskih obrazaca, s time da IgG1 pokazuje veći stupanj galaktozilacije, a IgG2 veći stupanj sržne fukozilacije. IgG je jedini veliki protein plazme čiji glikanski dio ima sržnu fukozu i inkompletnu galaktozilaciju/sijalinizaciju (110, 111). U Tablici 4. navedene su glikanske strukture IgG plazme, regije Fc i Fab s najvećom učestalošću (107, 110).

**Tablica 4.** Najučestalije glikanske strukture imunoglobulina G, regije Fc i Fab u plazmi

Imunoglobulin G		Regija Fc	Regija Fab	
Struktura glikana*	%	%	Struktura glikana*	%
FA2G1	31	32	FA2BG2S1	21
FA2G2	23	27	A2G2S2	17
FA2G2S1	13	15	FA2BG2S2	16
FA2	10	9	FA2G2S2	16
FA2BG1	5	5	FA2G2S1	10

Legenda:

\*Svi glikani imaju pentasaharidnu srž (GlcNAc<sub>2</sub> Man<sub>3</sub>). F – predstavlja sržnu fukožu; Ax – broj (x) antena/grana GlcNAc na trimanozil srži (antenarnost); B – račvajući (engl. *bisected*) GlcNAc; Gx – broj (x) vezanih galaktoza na antenama/granama; Sx – broj (x) vezanih sijalnih kiselina za galaktozu na granama

Regija Fc IgG ima visokokonzervirano N-glikansko mjesto u području domene C<sub>H</sub>2 na mjestu Asn297, dok je regija Fab glikozilirana u 15 do 25% slučajeva. Visokokonzervirani N-glikan regije Fc podložan je modifikacijama u Golgijevom kompleksu vezanjem sržne fukoze, galaktoze, sijalne kiseline i račvajućeg ostatka GlcNAc. Upalni odgovor stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima i komplementu ovisi o glikozilacijskim modifikacijama regije Fc (112–114).

Vezanje regije Fc IgG na specifični receptor ovisi o stupnju sijalinizacije antenarnih galaktoza i fukoze pentasaharidne srži (engl. *core-fucosylation*). Vezanje sijalne kiseline (Neu5Ac) na biantenarni kompleksni N-glikan regije Fc smanjuje afinitet vezanja regije Fc, dok nedostatak terminalne sijalne kiseline i slobodni ostaci GlcNAc čine molekulu IgG proupalnom aktivacijom komplementa. Osim nedostataka terminalno vezane Neu5Ac i stupanj fukoze vanjske grane IgG korelira s aktivacijom komplementa putem lektina i proupalnim djelovanjem. Odsutstvo fukoze na pentasaharidnoj srži ima proupalni učinak poboljšavajući vezanje regije Fc na odgovarajući receptor. Upravo je zato više od 90% IgG glikanskih struktura sa sržnom fukozom u svrhu spječavanja pretjerane reakcije imunološkog sustava u kojem je

prevelika aktivnost u podlozi razvoja autoimunskih bolesti, a preniska aktivnost može voditi razvoju karcinoma (115–117).

Varijacije glikozilacije regije Fc, balansirajući između proupalnog i protuupalnog djelovanja, prisutne su tijekom procesa starenja, koreliraju s indeksom tjelesne mase i razinom lipida u krvi (118–120) te vode razvoju mnogih bolesti kao što je metabolički sindrom, šećerna bolest tip II, hipertenzija, upalne crijevne bolesti, reumatoidni artritis, sistemski eritematozni lupus, multipla skleroza, karcinomi, Parkinsonova bolest i demencija (92, 93, 121–126). U stanjima kad je potrebno zaštititi organizam od neželjenih patogena smanjuje se razina sijalinizacije regije Fc IgG (127).

Interindividualna razlika u glikozilacijskom profilu IgG velika je i ovisi o ekspresiji gena povezanih s glikanima, epigenetičkoj regulaciji, konstitucijskim i okolišnim čimbenicima, a to u konačnici vodi i razlikama u funkcioniranju imunološkog sustava (184). Opisane su promjene na razini specifičnih subklasa i glikozilacije IgG tijekom starenja, u trudnoći i raznim patološkim stanjima koje koreliraju s izmijenjenim imunološkim djelovanjem imunoglobulina (128, 129). Proces glikozilacije mijenja funkciju IgG i cjelokupnoga imunološkog sustava modulirajući vezanje na specifične receptore i efektorsko djelovanje protutijela, a promovirajući upalno ili protuupalno zbivanje (92).

### **1.2.3 Promjene N-glikoma plazme**

#### **1.2.3.1 Varijabilnost i stabilnost N-glikoma plazme**

Redoslijed aminokiselina u proteinima definiran je isključivo genetičkim slijedom nukleotida za razliku od procesa glikozilacije koji podliježe dinamičkim interakcijama među genima povezanim s glikanima, posttranslacijskim modifikacijama, konstitucijskim i okolišnim čimbenicima. Geni povezani s glikanima regulirani su na transkripcijskoj razini remodeliranjem kromatina, acetilacijama histona i metilacijom DNA. Unutarnji i vanjski čimbenici utječu na promjene navedenih modifikacija i sudjeluju u kreiranju epigenetičkog koda. Okolišni čimbenici, osim interakcijom s gliko-genima i putem epigenetičke regulacije, mogu mijenjati biološki proces sinteze glikana i glikoproteina mijenjajući dostupnost monosaharidnih supstrata, sintezu i aktivnost enzima, kao i signalnih molekula (130).



Na razini populacije velika je varijabilnost N-glikana proteina plazme ovisnog o dobi i spolu, dok je među ispitanicima (18 – 100 godina života) iz kohorte „10 001 Dalmatinac” u odnosu na sveukupne proteine plazme utvrđena i tri puta veća varijabilnost N-glikana IgG, što ukazuje na fenomen maskiranja glikozilacije pojedinog proteina (130). Uspoređujući dinamičnost promjena kod djece i u odrasloj populaciji utvrđene su izraženije promjene tijekom rasta i razvoja, pogotovo u razdoblju puberteta, dok se provedenim analizama tijekom jednogodišnjeg razdoblja glikozilacijski obrazac u odraslih ispitanika pokazao individualno stabilnim (131, 132).

Tijekom rasta djeteta (6 – 18 godina života) smanjuje se stupanj grananja (tri- i tetraantenarni prema biantenarnim), galaktozilacije (tri- i tetragalaktozilirani prema digalaktoziliranim) i sijalinizacije (tri- i tetrasijalinizirani prema disijaliniziranim). U plazmi dojenčadi prisutni su većinom tri- i tetrasijalinizirani N-glikani sa značajnim kasnijim pomakom prema disijaliniziranim biantenarnim N-glikanima, neovisno o spolu. Prije puberteta značajno se smanjuje razina glikana sa sržnom fukozom i zamjenjuju negalaktozilirani glikani s digalaktoziliranim strukturama, neovisno o spolu, i to posebno većim razinama negalaktoziliranih glikana kod dječaka između 11. i 14. godine života (132).

Glikozilacijski profil IgG razlikovao se prema spolu i prije nastupa puberteta, s većim razinama fukoziliranih sijaliniziranih struktura s račvajućim GlcNAc kod djevojčica. Trend istih promjena nastavio se i nastupom puberteta, kao i u kasnijoj životnoj dobi, što se povezuje s hormonskim statusom iako je i u dječaka u razdoblju od 6. do 18. godine života primijećen značajan porast račvajućeg GlcNAc na sijaliniziranim strukturama sa sržnom fukozom. Trend pada biantenarnih glikana sa sržnom fukozom u plazmi značajno korelira s padom istih glikanskih struktura IgG i porastom digalaktoziliranih formi IgG (naglašenije kod ženskog spola). Promjene koje su nazočne razlikuju se u odnosu na stariju životnu dob te ih je svakako potrebno uzeti u obzir prilikom dijagnostičkih i terapijskih procedura temeljenih na glikanima (132).

Unatoč tome što je glikozilacija iznimno individualno varijabilan proces podložan utjecajima, smatra se da je 30 – 50% glikozilacijskih obrazaca nasljedno s varijacijama ovisno o glikanskoj strukturi (133). Upravo individualna stabilnost glikozilacijskog obrasca tijekom razdoblja od

jedne godine u odraslih ukazuje na to da je proces ipak pod značajnom genetičkom kontrolom i da okolni utjecaji kojima je organizam izložen ne utječu na njega ako ne mijenjaju bazalne uvjete u organizmu (134). Preostalih 50 – 70% glikanskog profila ovisi o kombiniranom utjecaju epigenetičkih, konstitucijskih (dob, spol) i vanjskih čimbenika okoliša kao što su pušenje, prehrana i kolesterolski status, a što se dovodi u vezu s fiziološkim i patološkim procesom starenja organizma (135).

### **1.2.3.2 Promjene N-glikoma plazme tijekom starenja**

Promjene u glikanskom profilu koreliraju s fiziološkim parametrima povezanima s biološkom i kronološkom dobi. Molekularni parametri kojima se određuju biološka dob samim time imaju bitnu ulogu u prevenciji i prognozi bolesti povezanih sa starenjem, a sama biološka dob bolji je prediktor mortaliteta u odnosu na kronološku. Glikani kao markeri mogu poslužiti boljoj procjeni fiziološke starosti organizma od kronološke dobi, a negalaktozilirani serumski proteini i IgG bolje koreliraju s biološkom dobi od dužine telomera (136).

Glikozilacijski profil proteina plazme i IgG mijenja se ovisno o životnoj dobi i u zdravih osoba nakon četrdesete godine života, s ranijim nastupom i većim intezivitetom promjena kod žena. (130, 135). Najznačajnije korelacije između dobi i glikanskog profila proteina plazme primijećene su za negalaktozilirane i digalaktozilirane glikane, biantenarne negalaktozilirane glikane, disijaliniziranu formu biantenarnih glikana i sržnu fukozilaciju. Analizom uzoraka krvi kohorte „10 001 Dalmatinac” utvrđeno je da se tijekom starenja mijenja stupanj galaktozilacije N-glikana proteina plazme s trendom sličnih promjena na razini glikana IgG. Starenjem rastu forme negalaktoziliranih glikana (A2, FA2), uz posljedično smanjenje digalaktoziliranih struktura (A2G2, FA2G2, A2BG2, FA2BG2).

Galaktozilacija IgG1 (digalaktozilirane forme) raste do kasnih 20-ih godina djelujući protuupalno inhibicijom čimbenika aktivacije komplementa (132). Međutim, opisane su promjene stupnja galaktozilacije tijekom starenja gdje se događa porast negalaktoziliranih glikana i računavjućeg GlcNAc, koji pogoduje upalnim zbivanjima i stvaranju začarane petlje kroz koju organizam dodatno stari (130, 137). Negalaktozilirani IgG (IgG-G0) djeluju proupalno aktivacijom komplementa lektinskim putem, jačanjem adhezije na receptore Fc i

formiranjem agregata protutijela. Starenjem organizma i nakupljanjem IgG-G0 aktivna je upala niskog stupnja i formiraju se aberantni agregati IgG koji pak aktiviraju imunološki sustav i dolazi do višeg stupnja upale (116, 117).

Razine monogalaktoziliranih glikana proteina plazme ovise o poziciji galaktoze i prisutnosti račvajućeg GlcNAc. Prema istraživanjima račvajući GlcNAc na IgG možda ima utjecaj na smanjenje stupnja vezanja galaktoze i sržne fukoze (137). Tijekom starenja razina fukozilacije srži IgG nije se značajno mijenjala, što ukazuje da pronađene razlike u smanjenju stupnja sržne fukoze na razini N-glikana proteina plazme mogu biti posljedica smanjenja ukupne razine IgG u starijoj životnoj dobi, prvenstveno kod žena (130, 131). Smanjenjem produkcije digalaktoziliranih glikana pospješuje se sijalinizacija, pa stoga raste stupanj iste na digalaktoziliranim strukturama N-glikana proteina plazme i IgG. Međutim, ukupna sijalinizacija IgG smanjuje se u starijoj životnoj dobi (118, 130, 131). Indeks (GlycanAge indeks) predviđanja biološke i kronološke dobi temelji se na tri glikanske strukture IgG: FA2B – biantenarni glikan s račvajućim GlcNAc i sržnom fukozom; FA2G2 – digalaktozilirani biantenarni glikan sa sržnom fukozom; FA2BG2 – digalaktozilirani biantenarni glikan s račvajućim GlcNAc i sržnom fukozom (136).

Na razini N-glikana proteina plazme sa starenjem dolazi do smanjenja razine glikana sa sržnom fukozom, neovisno o spolu, i smanjenja stupnja antenarne fukozilacije kod žena u odnosu na muškarce kod kojih se zamjećuje porast. Vezanje fukoze na vanjske grane glikana i na pentasaharidnu srž ima suprotne imunološke učinke, vjerojatno odražavajući funkciju imunološkog sustava ovisnog o utjecaju spola i hormona. Razlike prema spolu postoje i u stupnju sijalinizacije, gdje se kod muškaraca di- i trisijalinizirani glikani zamjenjuju monosijaliniziranim u odnosu na žene kod kojih te promjene nisu izražene. Analizom glikanskog profila prema dekadama života muškarci su pokazali jednu statistički značajnu korelaciju s razinom negalaktoziliranih formi, dok su se sve grupe glikana u žena značajno razlikovale, s najintezivnijim promjenama u razdoblju premenopauze (40 – 49 godina života) i postmenopauze (50 – 59 godina života). Smatra se da je u žena obrazac glikozilacije više ovisan o hormonskim promjenama nego o dobi (130, 131).

### 1.2.3.3 Utjecaj konstitucijskih i okolišnih čimbenika na proces glikozilacije

Godine, spol, rasa, reproduktivni ciklus, životni stil, dijetetske navike, pušenje, konzumacija alkohola i drugi okolišni čimbenici poznati su modifikatori bioloških procesa u organizmu. Životni stil, fizička aktivnost i pušenje mogu putem epigenetičke regulacije ubrzati ili odgoditi proces starenja, pa biološka dob pojedinca ne mora odgovarati njegovoj kronološkoj dobi (135, 136). Pušenje tijekom intrauterinog i neonatalnog života djeluje kao modifikator obrasca glikozilacije (128). Na ispitanicima iz kohorte „10 001 Dalmatinac” (otoci Vis i Korčula) analiziran je N-glikom plazme u ovisnosti o utjecaju okolišnih čimbenika rizika, pušenju, indeksu tjelesne mase i kolesterolskom statusu kao indikatorima životnog stila. Primijećene su promjene razine galaktozilacije, sijalinizacije, antenarne fukoziacije i granjanja (135).

Starija životna dob, tjelesna masnoća i krvni tlak pozitivno koreliraju s povećanjem razine negalaktoziliranih glikana, smanjenjem digalaktoziliranih formi i povišenjem stupnja sijalinizacije biantenarnih struktura. Pretpostavlja se da se detektirani obrazac u kojem raste stupanj sijalinizacije digalaktoziliranih glikana postiže smanjenjem njihove produkcije, čime je omogućen maksimalni kapacitet vezanja NeuAc5 (135). Razine kolesterola u krvi, HDL-a, LDL-a i triglicerida, kao indikatora nezdravog načina života, značajno su povezane s povišenim stupnjem granjanja (tri- i tetraantenarnim strukturama), galaktozilacije (tri- i tetragalaktoziliranim glikanima), sijalinizacije i smanjenjem sržne fukoziacije (119, 135). Nizak stupanj kronične upale u pretilih osoba i povišene razine CRP-a također su praćene višim razinama tri- i tetrasijaliniziranih glikana (92). Konzumiranje duhanskih proizvoda korelira s visokim razinama tetraantenarnih i tetragalaktoziliranih glikana, sniženjem stupnja sržne fukoziacije i smanjenim razinama biantenarnih struktura u plazmi. Pušenje putem oksidacijskog stresa i promjenom obrasca granjanja djeluje proupalno (135).

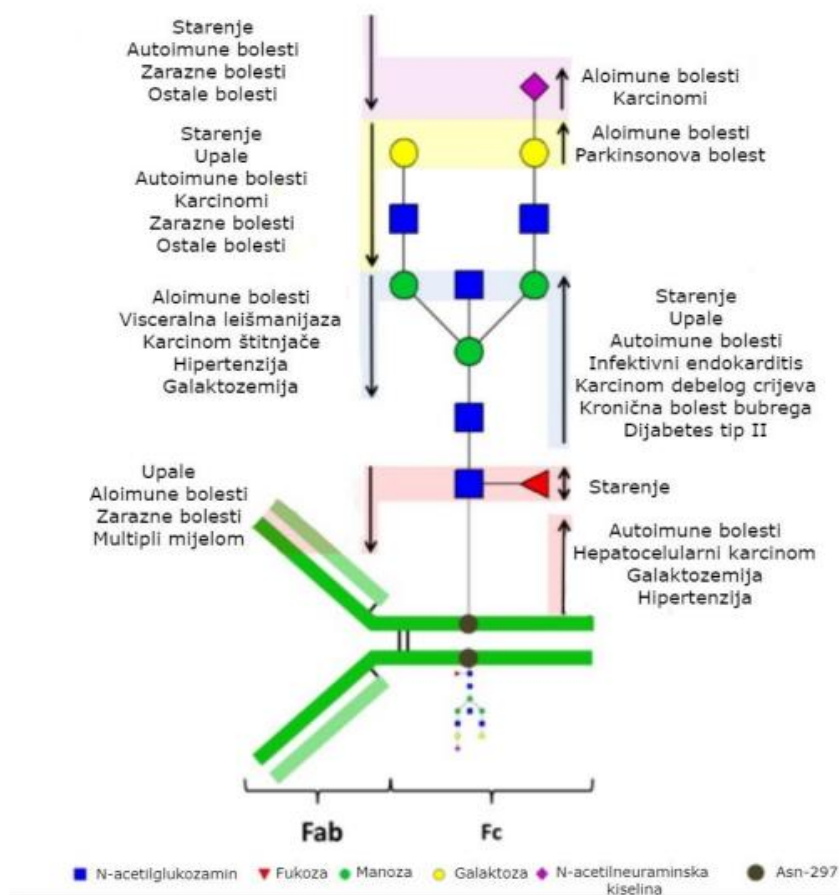
Na određene glikanske strukture konstitucijski i okolišni čimbenici različito utječu. Dob ima najveći utjecaj na rast razine negalaktoziliranih glikana, smanjenje razine digalaktoziliranih glikana i stupanj sržne fukoziacije, dok lipidi u plazmi koreliraju s povišenim stupnjem granjanja i većim razinama galaktozilacije. Sijalinizacija biantenarnih struktura korelira s dobi i tjelesnim indeksom, dok na razinu monogalaktoziliranih formi veći utjecaj imaju parametri tjelesne masnoće. Zamijećeno smanjenje biantenarnih glikana kod pušača može biti i odraz niske razine IgG, a što je za njih karakteristično (135). Biantenarni glikani sa sržnom fukozom

u plazmi većinom su imunoglobulini G, stoga i promjene ukupnog N-glikoma plazme u navedenim glikanskim strukturama većinom se odnose na IgG, pa indirektno indiciraju i promjenu imunološke funkcije (93). Analizom N-glikoma plazme kod pušača, bivših pušača u razdoblju od 5 godina i nepušača primijećene su i značajne razlike s obzirom na stupanj antenarne fukozilacije i razine negalaktoziliranih glikana (135).

#### **1.2.3.4 Promjene glikozilacijskog profila u upalnim i malignim stanjima**

Početni razvoj upale u organizmu u svrhu održavanja homeostatskih uvjeta dio je svih patoloških stanja. Osim lokalno u tkivu upalne biokemijske promjene nazočne su u serumu i plazmi. S obzirom na to da je proces glikozilacije pod utjecajem različitih okolišnih čimbenika i fiziološko/patoloških odgovora u organizmu, mnogi proteini u upalnim i patološkim stanjima podliježu modifikaciji. Različite upalne i maligne bolesti trigeri su sličnih promjena na razini N-glikana proteina plazme i IgG, što vodi i promjeni njihove funkcije (Slika 5.). Uzimajući u obzir koncentracije proteina u plazmi ili serumu do izražaja dolaze promijenjeni obrasci N-glikozilacije proteina:  $\alpha$ 1-kiseli-protein,  $\alpha$ 2-makroglobulin,  $\alpha$ 2-HS-glikoprotein, haptoglobin, antitrombin-III,  $\beta$ 2-glikoprotein, hemopeksin, vitronektin, fibrinogen i IgG (92, 93). Hemopeksin, vitronektin, fibrinogen i IgG imaju značajnu ulogu u formiranju druža i patologiji senilne makularne degeneracije (138, 139).

U ispitanika s reumatoidnim artritismom, primarnim osteoartritismom, miozitisom, ulceroznim kolitisom i Crohnovoj bolesti potvrđen je pomak prema degalaktoziliranim IgG (122, 123). Degalaktozilirani IgG najbolje su proučeni biomarker progresije bolesti u ispitanika s reumatoidnim artritismom čije razine koreliraju s težinom bolesti, stanjima progresije, destrukcijom zglobova i remisijom bolesti kao odgovorom na terapiju (140, 141). U trudnica s reumatoidnim artritismom visoki je stupanj galaktozilacije i sijalinizacije, kao i smanjenje račvajućeg GlcNAc regije Fc IgG u svrhu suprimiranja imuniteta majke (142). Utjecaj sijalinizacije i fukozilacije vanjske grane na funkciju IgG također je proučen u ispitanika s reumatoidnim artritismom. Uz smanjenu razinu galaktozilacije i sijalinizacije regije Fc, kao i više razine antenarne fukozilacije promovira se proupalno stanje (140, 141). Slične promjene galaktozilacije IgG nađene su i kod pacijenata s mikroskopskim poliangitisom, Wegenerovom granulomatozom i Churg-Strausovim sindromom. Utvrđene su i alteracije na razini specifičnih subklasa IgG kod miozitisa, ciroze i malignih tumora jetre (121).



**Slika 5.** Glikozilacijske promjene imunoglobulina G tijekom starenja i bolesti, preuzeto i uređeno prema Varki i ostali (99)

#### 1.2.4 Glikoproteini druzna senilne makularne degeneracije

Histokemijske i imunocitokemijske analize pokazale su da su druze građene od:

1. stanica i dijelova stanica (RPE, organeli i stanični fragmenti, lipofuscin, rodopsin, melanin, HLA-DR i CD antigeni žilničnih makrofaga i drugi);
2. lipida (glikolipidi, apolipoproteini, esterificirani i neesterificirani kolesterol i drugi);
3. ugljikohidrata (polisaharidi, glikokonjugati bogati galaktozaminom, glikokonjugati s terminalno vezanom glukozom/manozom, N-acetilglukozaminom i sijalnom kiselinom koja je konzistentna u različitim fenotipima druzna i drugi);
4. proteina (glikoproteina – metaloproteinaze i njihovi inhibitori, vitronektin, klusterin, kristalin, amiloid P, hemopeksin, komplement, imunoglobulini, fibrinogen, fibronektin i drugi) (68, 139, 143–145).

Makrofagi koji se nalaze u družama, područjima geografske atrofije i žilničnim neovaskularnim membranama eksprimiraju receptore za oksidirajuće lektine. Lektini su glikoproteini koji putem dva vezujuća mjesta reverzibilno vežu specifične saharidne komponente. Oligomanozni bi/triantenarni neračvajući i račvajući kompleksni N-glikani, N-acetil glukozamin, galaktoza i sijalni ostaci detektirani su u družama, RPE-u, BM-u i fotoreceptorima. Uklanjanjem sijalne kiseline koja je bila konzistentna u svim fenotipima družu neuroaminidazom otkriveni su subterminalno vezani galaktoza i N-acetil galaktozaminski ostaci. Sličan obrazac vezanja lektinskih proba nađen je kod tvrdih i mekih družu u makuli. Upravo slični glikozilacijski profili u družama, RPE-u, BM-u i fotoreceptorima podupiru hipotezu patogeneze senilne makularne degeneracije u kojoj sve navedene komponente zajednički djeluju u razvoju patologije mrežnice (143–145).

Lektinskim probama TIMP-3, vitronektin, klusterin i serumski albumin nađeni su kod 80% zdravih ispitanika i u 60% ispitanika sa senilnom makularnom degeneracijom, a N-glikoprotein kristalin, kojeg izlučuju stanice neurosenzorne mrežnice i RPE, znatno češće kod ispitanika sa senilnom makularnom degeneracijom (139). Od gore navedenih glikoproteina, koji su sastavni dio družu kao sistemski markeri oksidacijskog stresa, upalnih stanja i različitih bolesti s najvećom koncentracijom u plazmi ili serumu i izmijenjenim obrascima glikozilacije koji utječu na njihovu funkciju, navode se vitronektin, fibrinogen, hemopeksin i IgG (138).

Tkivni inhibitor metaloproteinaze 3 (TIMP-3) je glikoprotein ekstracelularnog matriksa epitelnih stanica oka, pluća i bubrega koji sudjeluju u remodeliranju ECM-a inhibirajući matriksne metaloproteinaze, inhibiciji angiogeneze putem receptora VEGF-2 i promociji apoptoze (39, 43). Sastavni dio družu i depozita povezanih s aterosklerozom, amiloidozom, dermalnom elastozaom i glomerulonefropatijama, što može govoriti u prilog sličnoj etiopatogenezi među bolestima je i vitronektin. Vitronektin (protein S) je adhezivni multifunkcionalni sijalizirani biantenarni N-glikoprotein ekstracelularnog matriksa koji inhibira MAC kompleks, sudjeluje u staničnoj adheziji i procesu zgrušavanja (143, 144, 146, 147). Ulogu u zaštiti od oksidacijskog stresa i eliminaciji staničnog otpada ima klusterin (apolipoprotein J) koji sadržava oligomanozne N-glikane (139, 147). Upravo inhibicija komplementa i angiogeneze putem klusterina modulira upalu i proces neovaskularizacije u SMD-u. Slično djelovanje kao klusterin ima i hemopeksin (beta-1B-glikoprotein). Riječ je o proteinu akutne faze i visokoafinitetnom antioksidansu eksprimiranom u mrežnici, kao i

perifernom i centralnom živčanom sustavu s povišenim sistemskim razinama u stanjima oksidacijskog stresa (148).

Fibronektin sadržava N- i O-glikozilacijska mjesta sa sijalnom kiselinom, a kao kemoatraktant pronađen je isključivo u mekim druzama s možebitnom ulogom u progresiji u neovaskularni stadij SMD-a (144). Registrirane su i povišene sistemske razine fibrinogena kao rizičnog čimbenika progresije u pacijenata sa SMD-om (138). Fibrinogen je N-glikozilirani protein sa sijalnom kiselinom i terminalno vezanim ostacima fukoze, galaktoze i GalNAc (149). Djeluje kao kofaktor agregacije trombocita, dio je krvnog ugruška u formi fibrina, sudjeluje u reepitelizaciji i, putem interferonskog puta, u zaštiti od infekcija u imunološkom odgovoru. Sijalinizacija utječe na solubilnost proteina, a promijenjeni obrasci vode formiranju drukčijih fibrinskih struktura i poremećenom procesu zgrušavanja i riziku krvarenja (150).

Glikanska struktura IgG nađena u druzama građena je od na asparagin vezane GlcNAc(fukoza)-GlcNAc-manoza-(manoza-GlcNAc)<sub>2</sub> s nazočnim varijacijama glikanskog profila koje uključuju vezanje galaktoza ili galaktoza-sijalna kiselina ostatka na jednom ili oba terminalna ostatka GlcNAc i/ili vezanje račvujućeg GlcNAc (139, 151). Promijenjeni profili IgG/IgM koji koreliraju sa stadijem bolesti pronađeni su u ispitanika sa SMD-om u mrežnici i serumu (138).

### **1.2.5 Glikoproteini kao potencijalni biomarkeri senilne makularne degeneracije**

Dosada se uglavnom govorilo o proteomici druza (68, 139, 143–145), gdje se najviše pažnje usmjerilo na već spomenute glikoproteine: TIMP-3, vitronektin, klusterin, hemopeksin, fibronektin, fibrinogen, komplement i imunoglobuline. Različite studije istraživale su sastav očne vodice i staklovine u pacijenata sa suhom i eksudativnom formom SMD-a te su obzirom na tkivne i sistemske razine izdvojile nekoliko potencijalnih biomarkera progresije bolesti, a to su: VEGF, PEDF, TGF- $\beta$  i ceruloplazmin (138, 152–154). Pigmentni epitelni čimbenik rasta nasuprot VEGF-a djeluje protuangiogeno i neurotrofično te upravo neravnoteža protuangiogenih i angiogenih molekula predisponira razvoj neovaskularne forme bolesti. Transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  sudjeluju u modifikaciji ekstracelularnog matriksa i napredovanju bolesti u završni fibrozni oblik, dok povišene razine feroksidaze ceruloplazmina kao akutnog biomarkera upale prate stanja oksidacijskog stresa i kronične upale što je karakteristično za SMD.



Iako je jako malo istraživanja o potencijalnim biomarkerima u serumu ili plazmi, mnoge komponente uključene u procese oksidacijskog stresa i imuniteta, citokini rasta, proteini toplinskog šoka i cijeljenja, proteini stanične determinacije, čimbenici hemostaze i neovaskularizacije, lipidnog metabolizma i drugi, identificirani su s povišenim ili sniženim sistemskim razinama u pacijenata sa SMD-om, ovisno o njihovoj ulozi u patofiziologiji i stadiju bolesti (155, 156). Relativna neprohodnost krvno-mrežnične barijere sprječava mnoge biološke komponente, koje su nazočne u oku, da budu nazočne u plazmi ili serumu.

Prema najnovijim istraživanjima najveći potencijal u ranoj dijagnostici prevencije sljepoće uzrokovane SMD-om imaju upravo čimbenici oksidacijskog stresa, lipidnog metabolizma i komplementa: vinculin, manan-vezujuća lektin serinska proteaza (engl. *mannan-binding lectin serine protease 1* – MASP-1), kao i tirozin protein fosfataza (engl. *tyrosine protein phosphatase* – PTLP) (155, 156). Vinculin je membranski multifunkcionalni glikoprotein koji sudjeluje u stanično-matriksnoj i stanično-staničnoj adheziji. Ekspimiraju ga stanice RPE-a izložene tkivnom stresu. Pronađen je u mrežnici ispitanika s kasnim stadijem bolesti, dok ga u družama ranog stadija nema. Utvrđene su povišene razine vinculina u plazmi ispitanika s ranim stadijem bolesti, što može ukazivati na degeneraciju stanica RPE-a i početak sloma krvno-mrežnične barijere (156).

*In vitro* stanice RPE-a izložene oksidacijskom stresu također produciraju MASP-1 i PTLP. Glikoprotein MASP-1 dio je lektinskog puta aktivacije komplementa, dok je PTLP glikoprotein koji veže fosfolipide u plazmi i omogućuje njihov transfer. S obzirom na ulogu lipidnog metabolizma u patogenezi bolesti i dokaze o interakciji s komponentama imunološkog sustava i upale PTLP-a ima veliki potencijal kao sistemski biomarker. Sistemske razine PTLP-a rastu u stanjima akutne upale i povezane su s ekspresijom upalnih čimbenika u šećernoj bolesti tip II i kardiovaskularnim bolestima. Povišene razine glikoproteina PTLP i MASP-1 značajno koreliraju s neovaskularnim stadijem bolesti i rizičnim genotipom *ARMS2*. Zasada nema odgovora zbog čega su povišene razine proteina u ispitanika sa senilnom makularnom degeneracijom. Možebitni je razlog produkcija proteina uslijed izlaganja stanica RPE-a oksidacijskom stresu ili sistemska neravnoteža lipidnog metabolizma i procesa upale kao rezultat starenja organizma i cjeloživotnog stresa (155, 157).

Razvoj masene spektrometrije i tekućinske kromatografije visoke ili vrlo visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography* – HPLC; *ultra high performance liquid chromatography* – UHPLC) omogućio je analizu glikanskog profila plazme i razvoj novih biomarkera (158–161) te su upravo većina biomarkera koji se rabe u kliničkoj praksi po svojoj strukturi glikoproteini (94). Promjene na razini obrasca glikozilacije IgG nastupaju godinama prije postavljanja dijagnoze reumatoidnog artritisa (141), što otvara mogućnosti razvoja novih dijagnostičkih testova temeljenih na glikanima, ali i pretpostavke da se alteracije glikana IgG događaju i u drugim autoimunskim i kroničnim upalnim bolestima (94, 121–123). Promjene glikozilacije nazočne su u ranoj akutnoj fazi i razvojem kroničnih stadija bolesti, te analiza glikoproteina kao markera ima značajan potencijal i u oftalmologiji, budući su IgG dokazani u sastavu druza, Bruchove membrane, retinalnog pigmentnog epitela i u fotoreceptorima (143, 144) pa bi analiza glikanskog profila proteina i imunoglobulina G u plazmi bila značajna u rasvjetljivanju mehanizama uključenih u patogenezu SMD-a. Pretraživanjem literature nisu pronađene studije koje su istraživale glikanski profil plazme u pacijenata sa SMD-om. Također nije do kraja razjašnjeno na koji način izmijenjeni obrasci glikozilacije proteina utječu na razvoj i progresiju SMD-a i mogu li se u budućnosti glikani iskoristiti kao markeri u dijagnostici i prognozi bolesti te evaluaciji primijenjene terapije. Obzirom na epidemiološku sliku, tjelesne, psihološke i socioekonomske učinke prikaz glikanskog profila plazme pacijenata sa SMD-om pomoći će u usmjeravanju budućih studija na pronalazak lako dostupnog glikanskog biomarkera.

## 2 Cilj rada i hipoteze

Uzimajući u obzir sveprisutni trend starenja populacije i sve veću prevalenciju senilne makularne degeneracije, čiji je glavni rizični čimbenik životna dob, glavni primarni cilj ovog istraživanja je detekcija mogućih sistemskih biomarkera procesa glikozilacije u plazmi ispitanika koji boluju od ove bolesti, a koji su dostupni analizi. Istraživanje se zasniva na hipotezi da ispitanici sa senilnom makularnom degeneracijom imaju različiti glikozilacijski profil plazme u odnosu na kontrolnu skupinu.

Glavni ishod istraživanja razlika je dokazanih potencijalnih biomarkera u plazmi između ispitanika sa senilnom makularnom degeneracijom i kontrolne skupine, izraženih metričkom varijablom koja odražava razine ekspresije N-glikana proteina plazme i imunoglobulina G. Shodno tome, cilj je bio prikazati glikozilacijski profil plazme u ispitanika sa senilnom makularnom degeneracijom u odnosu na kontrolnu skupinu i usporediti dobivene vrijednosti između ispitivane i kontrolne skupine, kao i utvrditi postoji li među njima statistički značajna razlika. Ukoliko bi se utvrdila razlika u profilu plazme u vrijednostima glikana, analizirat će se povezanost niza varijabli glikozilacije s ishodom, pojavom ili odsustvom SMD-a. Ako bi se pak utvrdila povezanost promatranih varijabli sa senilnom makularnom degeneracijom, varijable bi iskoristili kao biomarkere patološkog procesa.

### 3 Ispitanici i postupci

#### 3.1 Ispitanici

Uzorak za istraživanje je populacijski, a uzet je iz studije „10 001 Dalmatinac” čiji je cilj bio detekcija genetičkih i okolišnih čimbenika rizika koji čine razliku između zdravlja i bolesti. Ukupni ispitivani uzorak (n = 2835) čine 591 ispitanik s otoka Visa, 1427 ispitanika s Korčule i 817 ispitanika iz Splita. Svi ispitanici su potpisali informirani pristanak odobren od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Splitu.

Istraživanje „10 001 Dalmatinac” (voditelj projekta: prof. dr. sc. Ozren Polašek) ima etičko odobrenje Medicinskog fakulteta u Splitu (klasa 003-08/11-03/0005, ur. br.: 2181-198-03-04/10-11-0008; 8. ožujka 2011.), Medicinskog fakulteta u Zagrebu (ref 018057; 7. svibnja 2001.), Multicentričnog etičkog povjerenstva Škotske (MREC/01/0/71; 24. listopada 2001.) i odbora Lothian NHS (11/AL/0222; 6. svibnja 2011.). Za potrebe izrade ove disertacije zatraženo je i dobiveno dodatno etičko odobrenje Medicinskog fakulteta u Splitu (klasa 003-08/20-03/0005, ur. br.: 2181-198-03-04-20-0100; 26. studenog 2020.).

Osobni podaci (ime i prezime, datum i mjesto rođenja, spol, bračni status, stupanj obrazovanja i mjesto zaposlenja), stil života (prehrambene navike, pušenje, konzumiranje alkohola), dijagnosticirane bolesti, terapija lijekovima i bolnička liječenja ispitanici su upitnikom. Procijenjen je socioekonomski status, prema godinama školovanja i indeksu materijalnog stanja (kompozitni indeks). Prema odgovorima na pitanja u upitniku ispitanici su klasificirani na aktivne pušače (i oni koji su prestali konzumirati duhanske proizvode u zadnjih 5 godina) i nepušače. Izvršena su mjerenja visine (cm), težine (kg), sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka (mmHg), kao i plućne funkcije (broj udisaja u minuti, zasićenje kisikom). Izračunat je SphygmoCor koeficijent za procjenu kardiovaskularnog statusa koji uzima u obzir augmentacijski indeks, brzinu pulsog vala te središnji sistolički i dijastolički tlak. Uzorci krvi uzeti su u epruvete s antikoagulansom, nakon čega je provedeno centrifugiranje i odvajanje plazme te su uzorci pohranjeni na – 70 °C, dok su uzorci seruma pohranjeni na – 20 °C. Provedene su biokemijske analize razine glukoze u serumu, HbA1c, kreatinina, ureje, urata, CRP-a, kolesterola, HDL-a, LDL-a, triglicerida, fibrinogena i inzulina. Izvršen je opći

oftalmološki pregled i snimljena fotografija očne pozadine fundus kamerom (Canon CR-DGi, Amstelveen, Nizozemska).

Ispitanici s bilateralnim fotografijama fundusa i uzorcima krvi za izolaciju plazme i imunoglobulina G, kao i profiliranje glikana uključeni su u daljnje istraživanje. Rizični čimbenici patogeneze SMD-a i isključujući kriteriji (godine života, socioekonomski status, prijavljena fizička aktivnost, konzumiranje duhanskih proizvoda, serumska mjerenja kolesterola, HDL-a, LDL-a, triglicerida, urata, glukoze i HbA1c, pozitivna anamneza hipertenzije ili uzimanja antihipertenzivnih lijekova, ispitanici s izmjerenim sistoličkim tlakom > 140 mmHg i dijastoličkim > 90 mmHg, giht, glaukom, visoka miopija) uzeti su u obzir u daljnjoj procjeni i analizi (162).

U kontrolnu skupinu uključeni su također ispitanici iz kohorte „10 001 Dalmatinac”, koji su bili podvrgnuti istom postupku i uzorkovanju plazme. Ispitanici iz kontrolne skupine nisu imali znakove SMD-a ili druge mrežnične bolesti na fotografiji fundusa. S obzirom na to da se obrazac glikozilacije mijenja u različitim bolestima, drugi komorbiditeti kao što su kardiovaskularne bolesti, šećerna bolest, kronične plućne bolesti, kronične upalne bolesti probavnog sustava, cistična fibroza, kronično bubrežno zatajenje, sepsa, reumatoidni artritis, sistemski eritematozni lupus, multipla skleroza, amiotrofična lateralna skleroza, karcinomi i neuropsihijatrijski poremećaji bili su isključujući kriteriji (93, 94).

### **3.2 Fotografije stražnjeg segmenta oka**

Fiksnom digitalnom fundus kamerom snimljene su nativne fotografije očne pozadine s makulom u centru. Nakon nativnih fotografija uslijedilo je snimanje s uporabom različitih filtara osvjetljenja i boje. Budući da se ispitanicima nisu kapale kapi za širenje zjenice proveo se postupak prilagodbe radi postizanja maksimalne kvalitete slike očne pozadine. Ispitanici su sjedili u zamračenoj prostoriji 10 – 20 minuta, koliko je potrebno oku za prilagodbu od jačeg svjetla do potpunog mraka. U istoj prostoriji bila je smještena i fundus kamera. Nakon prilagodbe namješteni su u sjedeći položaj iza kamere, s bradom i čelom oslonjenim za na to predviđeno mjesto na kameri i rečeno im je da gledaju u predmet fiksacije. Predmet fiksacije

bila je zelena točka vodilja unutar kamere koju su ispitanici trebali pratiti u svom vidnom polju ili ekstrakameralna fiksacija sa zelenim svjetlom izvan kamere za snimanje.

### **3.3 Analiza fotografija stražnjeg segmenta oka**

Analizirane su sve fotografije fundusa s jasno vidljivim makularnim područjem, a za utvrđivanje bolesti i stadija rabila se Međunarodna klasifikacija senilne makularne degeneracije iz 1995. godine (81). Prema toj klasifikaciji stupnjevanje senilne makularne degeneracije temelji se na fotografijama fundusa u boji, a razlikuje se:

- a) rani stadij bolesti s prisutnim druzama i/ili abnormalnostima RPE-a;
- b) kasni stadij neovaskularne forme s hemoragijama ili suhe forme geografske atrofije.

Klasifikacija ne uzima u obzir vidnu oštrinu i isključuje nazočnost mrežničnih bolesti kao što su dijabetična retinopatija, okluzivne bolesti arterija i vena mrežnice, epiretinalna membrana, ruptura makule, odignuće mrežnice, korioretinitis, malignitet i liječenje laserskom fotokoagulacijom.

Ispitanici su s obzirom na dostupne i pravilno označene fotografije fundusa desnog i lijevog oka podijeljeni u skupine:

1. ispitanici s jasno vidljivim makulama na fotografijama fundusa desnog i lijevog oka koji nemaju znakove SMD-a;
2. ispitanici s jasno vidljivim makulama na fotografijama fundusa desnog i lijevog oka koji imaju znakove SMD-a na jednom ili na oba oka, a bez nazočnosti drugih mrežničnih bolesti;
3. ispitanici s jasno vidljivim makulama na fotografijama fundusa desnog i lijevog oka koji imaju znakove drugih mrežničnih bolesti na jednom ili oba oka, a nisu uključeni u daljnje istraživanje;
4. skupina ispitanika koji su na fotografijama fundusa jednog oka imali jasno vidljivu makulu, urednu ili s prisutnim znakovima mrežničnih bolesti, a na fotografijama fundusa drugog oka nejasno makularno područje, zbog čega nije bila moguća procjena;
5. ispitanici na čijim fotografijama fundusa desnog i lijevog oka makula nije jasno vidljiva te nije bila moguća procjena.

### 3.4 Mjerenje razine glikana u plazmi

Za detekciju glikanskog profila plazme rabila se kombinacija standardiziranih protokola tehnikom hidrofilnih interakcija (engl. *hydrophilic interaction* – HILIC) na instrumentu HPLC ili UHPLC (158–161, 163–167). Metodom HILIC izoliraju se kromatografski vrškovi ili pikovi N-glikana plazme (glikan pik – GP) i pikovi izolata IgG (130, 131).

#### *Izolacija imunoglobulina G iz uzorka plazme*

Nakon pripreme uzorka plazme, koji se promiješao i centrifugirao na 3000 okretaja po minuti tijekom 10 minuta, pristupilo se izolaciji IgG iz uzoraka plazme korištenjem pločice monolita s proteinom G (GE Healthcare, Uppsala, Švedska) i pločice za sakupljanje (engl. *96-well collection plates*; Chromacol, Welwyn Garden City, UK) s mikroporama veličine 36  $\mu\text{m}$ . Pločice s proteinom G volumena 150  $\mu\text{L}$  pripremile su se ispiranjem s 10 volumena kolone (engl. *Column volume* – CV) ultra čiste vode (Purite Fusion 40 water purification system, Purite Ltd., Thame, UK) i kalibrirale s 10 pufera CV za vezanje (engl. *Binding-buffer Solution* – 1x PBS pH 7.4; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri). Uzorak plazme volumena od 50  $\mu\text{L}$  razrijedio se 10  $\times$  s PBS-om i aplicirao na pločicu s proteinom G. Protein G potom se veže za regiju Fc IgG. Nakon petominutne filtracije protein G pločica isprana je 5  $\times$  s 5 CV-a vezujućeg pufera radi uklanjanja nevezanih proteina. Zatim je uslijedilo eluiranje IgG s protein G pločice ispiranjem s 5 CV-a 0,1 M mravlje kiseline (Sigma-Aldrich). Eluati u 96-pločici za sakupljanje neutralizirani su (pH 7,0) s 1 M amonijevog bikarbonata (Sigma-Aldrich) kako bi se očuvala stabilnost IgG i spriječila desijalinizacija. Svaki korak u navedenoj proceduri urađen je pod vakuumom. Čistoća eluata IgG verificirana je elektroforezom na natrij-dodecil-sulfat poliakrilamidnom gelu (engl. *sodium-dodecyl-sulfat polyacrylamide-gel-electrophoresis* – SDS-PAGE; Invitrogen, Kalifornija).

#### *Deglikozilacija uzoraka plazme i IgG i fluorescentno obilježavanje glikana*

Uzorci plazme promiješani su i centrifugirani na 3000 okretaja/min u trajanju od 10 minuta, a 5  $\mu\text{L}$  svakog uzorka nanijelo se na 96-pločicu za sakupljanje uz dodatak 2  $\mu\text{L}$  5  $\times$  pufera za

uzorak (Sigma-Aldrich) pripremljenog s 1 mL 10%-tnog SDS-a, 2  $\mu$ L vode i 1  $\mu$ L ditionitritola (Sigma-Aldrich). Na isti način tretirano je 50  $\mu$ g svakog uzorka IgG. Pripremljeni uzorci inkubirali su se na 65 °C u trajanju od 15 minuta, a potom su alkalizirani s 1  $\mu$ L 100 mM jodoacetamida (Sigma-Aldrich) i ponovno inkubirani na 30 minuta u tamnoj sobi na sobnoj temperaturi. Svrha redukcije i alkalizacije uzoraka prije imobilizacije u gelu osiguranje je maksimalne učinkovitosti peptid-N-(N-acetil- $\beta$ -glukozaminil) asparagin amidaze F (skraćeno peptid N-glikozidaza F – PNGaza F). Uzorci plazme i IgG u 96-pločici za sakupljanje imobilizirani su u natrij-dodecil-sulfat-poliakrilamidnom gelu (s 10% SDS-a), a zatim je uslijedila denaturacija (H lanaca IgG) i ispiranje gela s acetonitrilom, kao i sušenje u vakuumu. Uzorcima je dodano 50  $\mu$ L 0,1 U/ml PNGaze F (ProZyme, Kalifornija, SAD). Zatvoreni su adhezivnom naljepnicom i inkubirani tijekom noći na temperaturi od 37 °C. Otpušteni glikani iz uzorka plazme i s IgG sakupljeni su u 96-pločicu volumena 2 mL i pripremljeni za bojenje.

Oslobođeni glikani zatim su se obilježili fluorescentnom 2-aminobenzamid bojom (LudgerTag 2-AB labeling kit Ludger Ltd., Abingdon, UK). Uzorcima s oslobođenim glikanima dodalo se 5  $\mu$ L 2-AB otopine, promiješalo 10 minuta, inkubiralo na 65 °C kroz 30 minuta, ponovno promiješalo i inkubiralo idućih 90 minuta. Uslijedilo je ispiranje viška 2-AB boje filtracijskim pločicama i acetonitrilom. Obilježeni glikani potom su eluirani u 96-pločicu za sakupljanje volumena od 2 mL s 400  $\mu$ L 200 mM amonijeve otopine djelovanjem gravitacije tijekom 20 – 30 minuta i potom osušeni u vakuumu.

#### *Određivanje N-glikana proteina u uzorcima plazme*

N-glikani proteina plazme obilježeni 2-AB bojom razdvojeni su na instrumentu HILIC-HPLC putem TSKgel Amide 80 kolone (dimenzija od 250  $\times$  4,6 mm, promjera čestica od 5  $\mu$ m; Tosoh Bioscience, Stuttgart, Njemačka) na temperaturi od 30 °C. Mobilna faza sastojala se od otapala A – 50 mM mravlje kiseline (Sigma-Aldrich), pH 4,4 prilagođenog s amonijevim hidroksidom, i acetonitrila (Sigma-Aldrich) kao otapala B. Za 60-minutnu detekciju rabio se fluorescencijski detektor (Waters 2475) valnih duljina od 330 do 420 nm. Analizom HILIC-HPLC N-glikani plazme podijeljeni su u 16 kromatografskih pikova (GP1 – GP16).



Daljnja obrada uključivala je razdvajanje glikanskih struktura prema broju sijalnih kiselina rabeći Prozyme GlycoSep C 75 mm × 7,5 mm kolonu (Prozyme) na 30 °C na instrumentu WAX (Weak Anion Exchange) – HPLC. Mobilna faza sastojala se od 20% acetonitrila u vodi kao otapala A i 0,1 M octene kiseline (Sigma-Aldrich) prilagođenog pH na 7,0 s amonijevim hidroksidom. Glikani su razdvojeni na temelju drukčijih naboja prema broju sijalnih kiselina (mono-, di-, tri- i tetrasijalizirani), a kalibracija sustava izvela se s fetuin N-glikanom (Sigma-Aldrich).

Potom su 2-AB-glikanske strukture obrađene sijalidazom. U epruvete za mikrocentrifugu volumena od 200 µL dodane su 2-AB-glikanske strukture i 1 µL 500 mM natrijev acetat inkubacijskog pufera pH 5,5, 1 µL ABS-a (*Arthrobacter ureafaciens* sijalidaze – α2-3,6,8,; Prozyme, San Leandro, Kalifornija) i voda do 10 µL. Pripravak je stavljen u inkubator na temperaturu od 37 °C u trajanju od 16 – 18 sati, potom propušten kroz uređaj za uklanjanje enzima (Micropure-EZ enzyme remover, Milipore, Billerica, MA) i apliciran na instrument HILIC-HPLC. Nakon provedenog postupka N-glikani plazme podijeljeni su u 13 kromatografskih pikova desijaliziranih glikana (DG1 – DG13) (130).

#### *Određivanje N-glikana imunoglobulina G u plazmi*

Fluorescentno označeni N-glikani IgG odijeljeni su s pomoću Waters BEH Glycan kromatografske kolone (dimenzija od 100 × 2,1 mm, promjer čestica BEH od 1,7 µm) na instrumentu Waters Acquity UPLC na temelju kromatografije hidrofilnih interakcija. Uređaj UPLC sastojao se od mobilne faze s otapalom A (100 mM amonijevog formijata (Sigma-Aldrich), pH 4,4), otapala B acetonitrila (Sigma-Aldrich), automatskog injektora uzoraka i fluorescencijskog detektora valnih duljina od 330 do 420 nm. Uzorci su bili na temperaturi od 5 °C prije injektiranja, a sami postupak odjeljivanja glikana provodio se na 60 °C. Potom se provela digestija fluorescentno obilježenih N-glikana IgG djelovanjem enzima (sijalidaze, fukozidaze, galaktozidaze, manozidaze; ProZyme, Kalifornija) u inkubatoru na temperaturi od 37 °C. Enzimi su potom uklonjeni filtracijskom pločicom AcroPrep 96 Filter Plates (Pall Corporation, SAD) i provela se ponovna analiza N-glikana IgG nakon digestije na instrumentu HILIC-UPLC (131).

### 3.5 Statistički postupci

U statističkoj analizi proveo se Kolmogorov-Smirnovljev test, a zatim su podaci analizirani binarnim i regresijskim testovima, uz izračun omjera izgleda (engl. *odds ratio* – OR) i 95% raspona pouzdanosti (engl. *confidence interval* – CI). Glavna analitička metoda logistička je regresija kojom se istraživala povezanost niza varijabli profila glikozilacije s ishodom, pojavom ili odsustvom senilne makularne degeneracije.

Analitički postupak proveden je u statističkom programu R, sa značajnošću postavljenom na  $P < 0,05$ . Kategorijski podaci prikazani su brojem i postotkom, dok su brojevi podaci predstavljeni srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom. Svi slučajevi senilne makularne degeneracije, bez obzira na jednostranu ili obostranu nazočnost bolesti na fotografijama stražnjeg pola oka, svrstani su u jednu skupinu, i uradila se analiza poznatih čimbenika rizika u odnosu na kontrolnu skupinu s pomoću logističke regresije. Model analize varijance (ANOVA) rabio se u bivarijantnoj analizi praćenju višestrukim uspoređivanjem glikanskih struktura među skupinama i kontrolama uporabom Bonferronijevog post hoc testa.

Ispitanici su podijeljeni u tri skupine s obzirom na dob i nazočnost bolesti:

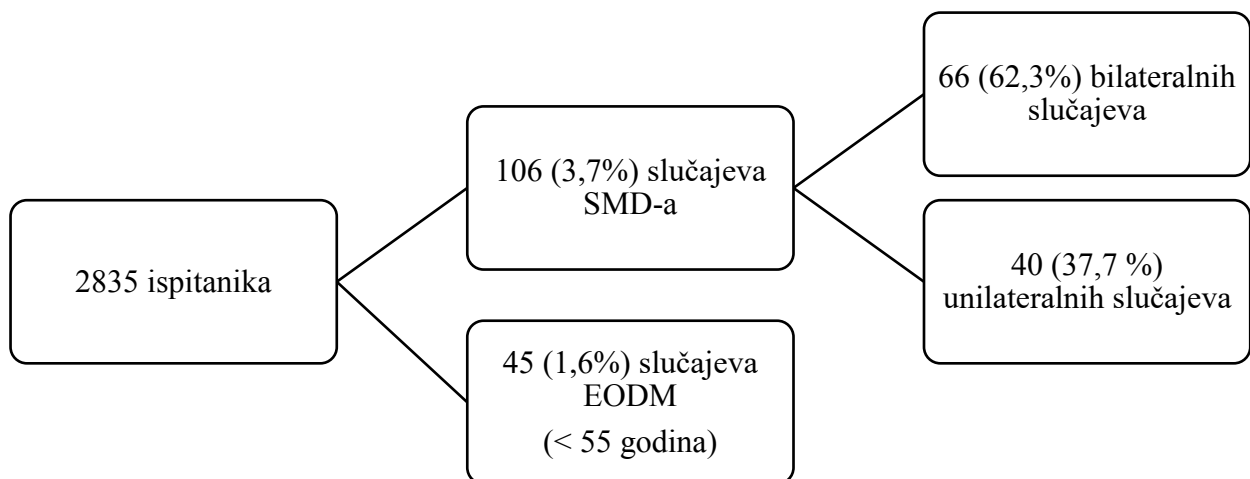
1. ispitanici stariji od 55 godina s bilateralnim (B) znakovima senilne makularne degeneracije;
2. ispitanici stariji od 55 godina s unilateralnim (U) znakovima senilne makularne degeneracije;
3. ispitanici mlađi od 55 godina s ranim oblikom makulopatije s družama (EODM).

Konačni analitički model prilagođen je prema dobi i spolu, kao mogućim zbunjujućim varijablama, uzimajući u obzir i identificirane lipidne frakcije kao rizične čimbenike senilne makularne degeneracije. U prvom modelu logističkom regresijom usporedili smo sve tri skupine ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu, a zatim kreirali model zasebne usporedbe svake skupine ispitanika s kontrolama uz razinu značajnosti postavljenu na  $P < 0,05$ .

## 4 Rezultati

U istraživanje je uključeno 2835 ispitanika iz kohorte „10 001 Dalmatinac“. Analizom dostupnih fotografija fundusa oba oka, uzimajući u obzir isključujuće kriterije, dijagnosticirano je 106 (3,7%) slučajeva unilateralne i bilateralne senilne makularne degeneracije u ispitanika životne dobi preko 55 godina. Od tog broja 66 (62,3%) ispitanika ima obostrane kliničke znakove bolesti, a kod njih 40 (37,7%) znakovi SMD-a ustanovljeni su na jednom oku. Nadalje, od ukupnog broja ispitanika njih 45 (1,6%), mlađih od 55 godina, imali su rani oblik makulopatije s druzama (EODM).

Shematski prikaz broja slučajeva SMD-a i EODM-a uključenih u istraživanje.



Korištenjem standardiziranog protokola N-glikani plazme podijeljeni su u 16 kromatografskih pikova (GP1 – GP16) i 13 pikova desijaliziranih glikana (DG1 – DG13) (Tablica 5.). Izračunati su i derivirani parametri koje čine glikani sličnih strukturnih svojstva, a na kraju je ukupno bilo 46 N-glikanskih frakcija plazme (130).

**Tablica 5.** Prikaz struktura N-glikana proteina plazme dobivenih metodom HILIC-HPLC standardiziranim protokolom

Glikan pik	Struktura*	Glikan pik	Struktura*
GP1	A2	GP7	FA2BG2 M7D3, M7D1 A2G2S(3)1 A2G2S(6)1
GP2	A2B A1G1 FA2		
GP3	M5 FA2B A2[6]G1 A2[6]BG1	GP8	A2BG2S(3)1 A2BG2S(6)1 M5A1G1S1 FA2G2S(3)1 FA2G2S(6)1 A3G3 FA2BG2S(3)1 FA2BG2S(6)1
GP4	A2[3]G1 A2[3]BG1 M4A1G1 FA2[6]G1 FA2[6]BG1 A1[6]G1S(3)1 A1[6]G1S(6)1 FA2[3]G1 FA2[3]BG1 M6D1, D2 A1[3]G1S(3)1 A1[3]G1S(6)1	GP9	A2F1G2S(3)1 A2F1G2S(6)1 M8D2, D3 A2G2S(3,3)2 A2G2S(3,6)2 A2G2S(6,6)2 M8D1, D3
		GP10	A2BG2S(3,3)2 A2BG2S(3,6)2 A2BG2S(6,6)2 A3BG3S(3)1 A3BG3S(6)1 FA2G2S(3,3)2 FA2G2S(3,6)2 FA2G2S(6,6)2
GP5	M6D3, A2BG2 A2[6]G1S(3)1 A2[6]G1S(6)1 A2G2 A2[3]G1S(3)1 A2[3]G1S(6)1	GP11	FA2BG2S(3,3)2 FA2BG2S(3,6)2 FA2BG2S(6,6)2 M9
GP6	FA2[6]G1S(3)1 FA2[6]G1S(6)1 FA2[6]BG1S(3)1 FA2[6]BG1S(6)1 M4A1G1S1 FA2G2 FA2[3]G1S(3)1 FA2[3]G1S(6)1 A2BG1S1 FA2[3]BG1S(3)1 FA2[3]BG1S(6)1	GP12	A2F1G2S2 A3G3S(3,3) A3G3S(3,6)2 A3G3S(6,6)2 A3BG3S(3,3)2 A3BG3S(3,6)2 A3BG3S(6,6)2 A3G3F1S2

**Tablica 5. (nastavak)** Prikaz struktura N-glikana proteina plazme dobivenih metodom HILIC-HPLC standardiziranim protokolom

Glikan pik	Struktura*	Glikan pik	Struktura*
GP13	FA3G3S(3,3)2 FA3G3S(3,6)2 FA3G3S(6,6)2 FA3BG3S(3,3)2 FA3BG3S(3,6)2 FA3BG3S(6,6)2 A3G3S(3,3,6)3 A3G3S(3,6,6)3 A3G3S(6,6,6)3	DG4	M4A1G1 A2[3]G1 A2[3]BG1 FA2[6]BG1 FA2[3]G1 FA2[3]BG1
		DG5	M6D1, D2 M6D3 A2G2 A2BG2
GP14	A3F1G3S(3,3,6)3 FA3F1G3S(6,6,6)3 A4G4S(6,6)2 A3F1G3S(3,6,6)3 A3F1G3S(6,6,6)3 A4G4S(6,6,6)3 A4F1G4S2 A4G4S3	DG6	FA2G2 M5A1G1 FA2BG2
		DG7	M7D3 A2F1G2 M7D1
GP15	A4G4S4 A4F1G4S3	DG8	A3G3 A2F2G2 FA3G3 M8D2, D3 M8D1, D3
GP16	A4G4S(6,6,6,6)4 A4G4S(3,6,6,6)4 A4BG4S4 FA4G4S4 A4F1G4S4 A4G4LacS4 A4F2G4S4 FA4F1G4S4	DG9	FA3BG3 A3F1G3
		DG10	M9 FA3F1G3
		DG11	A4G4 A4BG4 A3F2G3 FA4G4 A4F1G4
DG1	A2	DG12	A4F1G4
DG2	A2B A1G1 FA2	DG13	A4G4Lac A4F2G4 FA4F1G4
DG3	M5 FA2B A2[6]G1 A2[6]BG1		

Legenda:

\*Kratice N-glikanskih struktura: svi glikani imaju pentasaharidnu srž ( $\text{GlcNAc}_2 \text{Man}_3$ ); F označava sržnu fukožu ( $\alpha 1-6$ ) vezanu s proksimalnim GlcNAc; Mx, broj (x) manozna na GlcNAc srži; D1 predstavlja ( $\alpha 1-2$ ) vezanih manozna na  $\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}\alpha 1-6$  grani, D2 na  $\text{Man}\alpha 1-3\text{Man}\alpha 1-6$  grani, D3 na  $\text{Man}\alpha 1-3$  grani M6 i na  $\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-3$  grani M7 i M8; Ax, broj (x) antena/grana (GlcNAc) na trimanozil srži; A2, biantenarni s dva ( $\beta 1-2$ ) vezana GlcNAc; A3, triantenarni s dva ( $\beta 1-2$ ) vezana GlcNAc na obje manoze i treći ( $\beta 1-4$ ) vezani GlcNAc na ( $\alpha 1-3$ ) manozu; A4, A3 GlcNAc s dodatnim ( $\beta 1-6$ ) vezanim GlcNAc na ( $\alpha 1-6$ ) manozu; B, računajući ( $\beta 1-4$ ) vezani GlcNAc na ( $\alpha 1-3$ ) manozu; Gx, broj (x) ( $\beta 1-4$ ) galaktoza na antenama; [3]G1 i [6]G1 označavaju da je galaktoza vezana preko  $\alpha 1-3$  ili  $\alpha 1-6$  manoze; F(x), broj (x) ( $\alpha 1-3$ ) vezanih fukoza na GlcNAc antenama; Lac(x), broj (x) ekstenzija laktozamina ( $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ ); Sx, broj (x) sijalnih kiselina ( $\alpha 2-3/6$ ) vezanih za galaktozu (ako nema broja veze, točna je veza nepoznata)

U Tablici 6. dat je prikaz 24 kromatografska pika N-glikana IgG u uzorku plazme dobivena standardiziranim protokolom (131).

**Tablica 6.** Prikaz struktura N-glikana imunoglobulina G u uzorku plazme dobivenih metodom HILIC-UPLC

Glikan pik	Struktura*	Glikan pik	Struktura*
GP1	F(6)A1	GP15	F[6]A2BG2 F[6]A1G1S1 A2G1S1 F(6)A2G2
GP2	A2		
GP3	A2B		
GP4	F(6)A2		
GP5	M5 F(6)A2	GP16a	F(6)A2(6)G1S1 M4A1G1S1 A2BG1S1 F(6)A2[3]G1S1 F[6]A2(6)BG1S1
GP6	F(6)A2B A2(6)G1	GP16b	
GP7	A2[3]G1 F(6)A2B	GP17	A2G2S1 F(6)A2[3]BG1S1
G8a	A2BG1	GP18a	A2BG2S1 F(6)A2G2S1 F(6)A2G2S1
GP8b	F(6)A2[6]G1 F(6)A2[6]G1		
GP9	F(6)A2[3]G1	GP18b	F(6)A2G2S1
GP10	F(6)A2[6]BG1	GP19	F(6)A2BG2S1
GP11	F(6)A2[3]BG1	GP20	Nepoznato
GP12	A2G2 F(6)A2[3]BG1	GP21	A2G2S2
GP13	A2BG2 F(6)A2G2	GP22	A2BG2S2
GP14	F(6)A2G2	GP23	F(6)A2G2S2
		GP24	F(6)A2BG2S2

Legenda:

\*Sve glikanske strukture imaju pentasaharidnu srž (GlcNAc<sub>2</sub> Man<sub>3</sub>). F – sržna fukoza  $\alpha$ (1-6) vezana na proksimalni GlcNAc srži; Mx – broj (x) vezanih manozna na GlcNAc srži; Ax – broj (x) antena/grana GlcNAc na trimanozil srži; Gx – broj (x) galaktoza vezanih  $\beta$ (1-4) vezom na grane; [3]G1 i [6]G1 su galaktoze vezane na ( $\alpha$ 1-3) ili ( $\alpha$ 1-6) manozu; Sx – broj (x) sijalnih kiselina na galaktozama

Analizom dobnih, konstitucijskih, socioekonomskih, kardiovaskularnih i biokemijskih čimbenika rizika ispitanici s unilateralnim i bilateralnim znakovima senilne makularne degeneracije bili su starije životne dobi s poremećajem metabolizma lipida, uključujući frakcije ukupnog kolesterola, triglicerida, LDL-a i HDL-a u serumu. U Tablici 7. prikazani su podaci dobiveni logističkom regresijom s omjerima izgleda i 95%-tnim rasponom pouzdanosti.

**Tablica 7.** Prilagođeni omjeri izgleda za čimbenike rizika za senilnu makularnu degeneraciju; logistička regresija, s omjerima izgleda (OR) i 95%-tnim rasponom pouzdanosti (CI)

ČIMBENICI RIZIKA	P	OR [95% CI]
<b>Starost (godine)</b>	<b>&lt; 0,001</b>	1,04 [1,02 – 1,06]
Spol		
Muški ( <i>usp.</i> )		1,00
Ženski	0,065	1,47 [0,98 – 2,23]
Godine školovanja	0,101	1,05 [0,99 – 1,11]
Materijalni status (kompozitni indeks)	0,632	0,98 [0,92 – 1,05]
Indeks tjelesne mase	0,926	1,00 [0,96 – 1,05]
Pušenje (da/ne)	0,883	1,03 [0,68 – 1,56]
Hipertenzija (izmjerena ili povijest bolesti)	0,795	1,05 [0,72 – 1,55]
Dijabetes (terapija ili povijest bolesti)	0,403	0,71 [0,31 – 1,60]
Giht (terapija ili povijest bolesti)	0,135	0,48 [0,18 – 1,26]
Glaukom (terapija ili povijest bolesti)	0,143	1,79 [0,82 – 3,90]
Samoprijavljena razina fizičke aktivnosti	0,977	1,00 [0,79 – 1,27]
Augmentacijski indeks	0,289	0,99 [0,96 – 1,01]
Brzina pulsog vala	0,872	1,01 [0,92 – 1,11]
Centralni sistolički krvni talk	0,880	1,00 [0,98 – 1,02]
Centralni dijastolički krvni talk	0,309	1,01 [0,99 – 1,04]
Urati (serum)	0,496	1,01 [1,00 – 1,02]
Glukoza (serum)	0,662	0,97 [0,82 – 1,13]
HbA1c (serum)	0,113	0,81 [0,63 – 1,05]
<b>Kolesterol (serum)</b>	<b>0,001</b>	2,03 [1,35 – 3,05]
<b>Trigliceridi (serum)</b>	<b>&lt; 0,001</b>	1,28 [1,11 – 1,46]
<b>HDL (serum)</b>	<b>0,005</b>	2,41 [1,30 – 4,46]
<b>LDL (serum)</b>	<b>0,001</b>	2,13 [1,39 – 3,27]



Ispitanici su prema dobi i znakovima bolesti podijeljeni u tri skupine. Prvu skupinu (1) čine ispitanici stariji od 55 godina s bilateralnim (B) znakovima senilne makularne degeneracije, drugu skupinu (2) ispitanici s unilateralnom (U) manifestacijom bolesti; treću skupinu (3) ispitanici mlađi od 55 godina s ranim oblikom makulopatije s druzama (EODM).

Bivarijantnom analizom i višestrukim uspoređivanjem provedenim među skupinama te s kontrolnom skupinom identificirane su različitosti u glikanskim strukturama proteina plazme i imunoglobulina G. Zabilježene su razlike u sljedećim kromatografskim pikovima glikana: GP2, GP6-8, DG8, DG12, DG13, G0, IgG\_GP3, IgG\_GP4, IgG\_GP6, IgG\_GP14, IgG\_GP15, IgG\_GP18 i IgG\_GP23.

Višestrukim uspoređivanjem nisu zabilježene značajne razlike među skupinama ispitanika i kontrola u piku GP7, DG7, IgG\_GP3 i IgG\_GP23. Razine glikana u piku GP6 (eB 0,026), DG6 (eB 0,026), GP8 (eB 0,008), DG8 (eB 0,008) i IgG\_GP15 (eB 0,005) značajno su se razlikovale usporedbom prve i treće skupine ispitanika, s višim razinama u plazmi kod ispitanika treće skupine.

U piku GP2 (ce 0,033; eB 0,013; eU 0,036) i DG2 (ce 0,033; eB 0,013; eU 0,036) nađene su značajne razlike usporedbom ispitanika s makularnom degeneracijom mlađih od 55 godina u odnosu na kontrole, kao i istih s ispitanicima koji imaju jednostrane i obostrane znakove senilne makularne degeneracije. Razine pripadajućih glikanskih strukutra bile su niže u trećoj skupini ispitanika.

Razine glikanskih strukutra u piku DG12 (cB 0,017) i DG13 (cB < 0,001; eB 0,001) bile su značajno više u ispitanika starijih od 55 godina s obostranim znakovima bolesti u odnosu na kontrole, uz značajnu razliku pika DG13 kod prve i treće skupine ispitanika.

Razina agalaktoziliranih glikana G0 (ce 0,017; eU 0,023; UB 0,005) značajno je bila niža u ispitanika s degeneracijom makule mlađih od 55 godina u usporedbi s kontrolama, a nađene su i značajne razlike usporedbom prve i druge, kao i druge i treće skupine.

Glikanske strukture pika IgG\_GP4 (cB < 0,001; ce 0,004; eB < 0,001) u usporedbi s kontrolama značajno su niže u ispitanika s makularnom degeneracijom mlađih od 55 godina i značajno više u ispitanika starijih od 55 godina s obostranim promjenama u makuli. Nađene su i razlike usporedbom navedene dvije skupine.

Značajna razlika glikanskih struktura pika IgG\_GP6 (cB 0,003; ce 0,010; eB < 0,001; eU 0,019), IgG\_GP14 (ce 0,002; cB 0,018; eB < 0,001; eU 0,002) i IgG\_GP18 (cB 0,008; ce 0,001; eB < 0,001; eU < 0,001) u odnosu na kontrole registrirana je među ispitanicima mlađim od 55 godina i starijim od 55 godina s obostranim znakovima SMD-a. Također su nađene razlike usporedbom prve i treće, kao i prve i druge skupine ispitanika. Bilateralne slučajeve prate više razine IgG\_GP6, dok u ispitanika s ranim nastupom promjena u makuli primjetan je rast IgG\_GP14 i IgG\_GP18.

U Tablicama 8. i 9. prikazani su N-glikani plazme i imunoglobulina G sa statistički značajnom razlikom dobivenom usporedbom predloženih skupina ispitanika s kontrolama (cijeli set glikanskih mjerenja nalazi se u dodacima, Tablica D1.).

**Tablica 8.** Statistički značajni rezultati analize N-glikana proteina plazme u ispitanika s bilateralnom (B) i unilateralnom (U) manifestacijom SMD-a te ranim oblikom makulopatije s družama (EODM) u usporedbi s kontrolnom skupinom

<b>Glikan Pik</b>	<b>Bilateralni (B) SMD</b>	<b>Unilateralni (U) SMD</b>	<b>EODM (e)</b>	<b>Kontrole (c)</b>	<b>P (F)</b>	<b>*Značajnost parova</b>
GP2	4,13 ± 1,23 (1,90 – 7,14)	4,35 ± 1,25 (3,01 – 6,37)	2,75 ± 0,81 (1,59 – 4,66)	3,74 ± 1,39 (1,06 – 12,65)	0,009 (3,84)	ce 0,033; eB 0,013; eU 0,036;
GP6	3,44 ± 0,74 (2,13 – 4,91)	3,78 ± 0,51 (3,27 – 4,85)	4,28 ± 1,00 (2,82 – 6,41)	3,77 ± 0,91 (1,49 – 7,39)	0,043 (2,72)	eB 0,026
GP7	11,97 ± 4,08 (8,32 – 26,34)	10,01 ± 1,1 (8,17 – 11,42)	10,00 ± 1,26 (8,14 – 13,15)	10,75 ± 2,42 (6,53 – 29,18)	0,038 (2,82)	
GP8	8,8 ± 1,19 (6,06 – 11,01)	9,42 ± 0,87 (7,86 – 10,39)	10,43 ± 2,10 (7,45 – 16,51)	9,41 ± 1,55 (5,74 – 14,93)	0,016 (3,45)	eB 0,008
DG2	4,13 ± 1,23 (1,90 – 7,14)	4,35 ± 1,25 (3,01 – 6,37)	2,75 ± 0,81 (1,59 – 4,66)	3,74 ± 1,39 (1,06 – 12,65)	0,009 (3,84)	ce 0,033; eB 0,013; eU 0,036;
DG6	3,44 ± 0,74 (2,13 – 4,91)	3,78 ± 0,51 (3,27 – 4,85)	4,28 ± 1,00 (2,82 – 6,41)	3,77 ± 0,91 (1,49 – 7,39)	0,043 (2,72)	eB 0,026
DG7	11,97 ± 4,08 (8,32 – 26,34)	10,01 ± 1,10 (8,17 – 11,42)	10,00 ± 1,26 (8,14 – 13,15)	10,75 ± 2,42 (6,53 – 29,18)	0,038 (2,82)	
DG8	8,8 ± 1,19 (6,06 – 11,01)	9,42 ± 0,87 (7,86 – 10,39)	10,43 ± 2,10 (7,45 – 16,51)	9,41 ± 1,55 (5,74 – 14,93)	0,016 (3,45)	eB 0,008
DG12	0,93 ± 0,46 (0,42 – 2,29)	0,78 ± 0,20 (0,36 – 1,06)	0,73 ± 0,25 (0,39 – 1,14)	0,75 ± 0,30 (0,10 – 2,46)	0,029 (3,03)	cB 0,017
DG13	0,95 ± 0,57 (0,32 – 2,30)	0,70 ± 0,19 (0,34 – 0,97)	0,60 ± 0,24 (0,28 – 1,15)	0,68 ± 0,28 (0,18 – 1,95)	< 0,001 (7,75)	cB < 0,001; eB 0,001
G0	4,48 ± 1,20 (2,23 – 7,38)	4,67 ± 1,18 (3,41 – 6,76)	3,01 ± 0,81 (1,77 – 4,83)	4,07 ± 1,36 (1,39 – 12,84)	0,004 (4,42)	ce 0,017; eU 0,023; UB 0,005

**Tablica 9.** Prikaz statistički značajnih rezultata analize N-glikana imunoglobulina G u ispitanika s bilateralnom (B) i unilateralnom (U) manifestacijom SMD-a te ranim oblikom makulopatije s druzama (EODM) u usporedbi s kontrolnom skupinom

Glikan Pik	Bilateralni (B) SMD	Unilateralni (U) SMD	EODM (e)	Kontrole (c)	P (F)	*Značajnost parova
IgG_GP3	0,12 ± 0,02 (0,08 – 0,15)	0,11 ± 0,05 (0,04 – 0,18)	0,08 ± 0,01 (0,07 – 0,09)	0,10 ± 0,03 (0,03 – 0,18)	0,049 (3,05)	
IgG_GP4	25,22 ± 5,54 (13,66 – 39,43)	22,52 ± 4,02 (18,57–29,68)	16,19 ± 4,88 (6,93 – 23,3)	20,99 ± 6,14 (6,48 – 47,89)	< 0,001 (9,69)	cB < 0,001; ce 0,004; eB < 0,001
IgG_GP6	6,58 ± 1,60 (4,60 – 12,08)	6,37 ± 1,35 (4,78 – 8,93)	4,43 ± 1,10 (2,42 – 6,17)	5,61 ± 1,63 (2,10 – 12,86)	< 0,001 (8,17)	cB 0,003; ce 0,010; eB < 0,001; eU 0,019
IgG_GP14	9,75 ± 2,51 (4,81 – 17,54)	9,30 ± 2,29 (6,84 – 13,72)	14,59 ± 3,45 (8,74 – 20,94)	11,6 ± 3,67 (3,39 – 25,82)	< 0,001 (8,50)	ce 0,002; cB 0,018; eB < 0,001; eU 0,002
IgG_GP15	1,41 ± 0,28 (0,76 – 2,31)	1,50 ± 0,23 (1,14 – 1,80)	1,76 ± 0,38 (1,14 – 2,49)	1,55 ± 0,36 (0,75 – 3,54)	0,009 (3,85)	eB 0,005
IgG_GP18	7,69 ± 1,63 (4,39 – 12,05)	7,20 ± 1,51 (5,05 – 9,86)	11,27 ± 2,65 (6,47 – 17,31)	9,07 ± 2,53 (3,29 – 19,38)	< 0,001 (10,06)	cB 0,008; ce 0,001; eB < 0,001; eU < 0,001
IgG_GP23	1,83 ± 0,57 (0,86 – 3,43)	1,79 ± 0,34 (1,18 – 2,23)	2,25 ± 0,50 (1,31 – 3,32)	2,07 ± 0,63 (0,70 – 4,67)	0,40 (2,79)	

\*usporedba ispitivanih skupina i kontrola (engl. *pair-wise comparisons across groups*); (cB) vrijednost označava razliku između bilateralnih slučajeva SMD-a i kontrolne skupine; (cU) vrijednost je razlika unilateralnih slučajeva SMD-a nasuprot kontrolne skupine; (ce) vrijednost je rezultat post-hoc testa usporedbe skupine ispitanika s ranim oblikom makulopatije s druzama i kontrola; (eU) vrijednost razliku između skupine ispitanika s ranim oblikom makulopatije s druzama i unilateralnih slučajeva SMD-a; (eB) vrijednost razliku između skupine ispitanika s ranim oblikom makulopatije s druzama i bilateralnih slučajeva SMD-a; (UB) vrijednost označava razliku između unilateralnih i bilateralnih slučajeva senilne makularne degeneracije; prikazani su statistički značajni rezultati (*značajnost parova*)

Daljnja analiza statistički značajnih pikova glikana proteina plazme i imunoglobulina G dobivenih u prethodnom koraku prilagođena je prema dobi i spolu, kao i identificiranim rizičnim čimbenicima lipidnog metabolizma (kolesterol, trigliceridi, LDL, HDL). Značajan rezultat (DG13) dobiven usporedbom sve tri skupine ispitanika s kontrolnom skupinom ( $P = 0,008$ ), sa značajno višim izgledima u ispitanika s degenerativnim promjenama makule.

U zasebnim modelima usporedbe između skupine ispitanika mlađih od 55 godina s druzama u makuli i kontrolne skupine nije bilo statistički značajnih rezultata.

Usporedbom kontrolne skupine s grupom ispitanika s unilateralnim oblikom senilne makularne degeneracije pronađeni su značajno niži izgledi za pik IgG\_GP18 ( $P = 0,009$ ), marginalno sniženi izgledi za IgG\_GP4 ( $P = 0,043$ ) i marginalno povišeni izgledi za pik GP6 ( $P = 0,045$ ).

Na kraju, grupa ispitanika starijih od 55 godina s obostranim znakovima bolesti imala je značajno veće izgledi za pik DG13 ( $P < 0,001$ ), praćene porastom razine GP7 ( $P = 0,012$ ) i G0 ( $P = 0,047$ ), kao i neznatno sniženim izgledom za GP2 ( $P = 0,049$ ), a svi dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 10.

**Tablica 10.** Rezultati analize statistički značajnih pikova glikana proteina plazme i imunoglobulina G sve tri skupine ispitanika i kontrolne skupine, prilagođeni prema dobi, spolu i rizičnim čimbenicima lipidnog metabolizma metodom logističke regresije

<b>Prediktor</b>	<b>Kontrole vs. sve skupine</b>	<b>Kontrole vs. EODM</b>	<b>Kontrole vs. unilateralni SMD</b>	<b>Kontrole vs. bilateralni SMD</b>
GP2	-			0,049; 0,61 (0,39 – 1,16)
GP6	-	-	0,045; 2,42 (1,01 – 5,65)	-
GP7	-		-	0,012; 1,16 (1,02 – 1,30)
DG13	0,008; 2,96 (1,28 – 6,43)	-	-	< 0,001; 7,90 (2,94 – 20,95)
G0	-	-	-	0,047; 1,83 (0,89 – 3,14)
IgG_GP4	-	-	0,043; 0,83 (0,68 – 0,99)	-
IgG_GP18	-	-	0,009; 0,43 (0,22 – 0,79)	-

[Prvi stupac prikazuje model usporedbe naspram kontrolne skupine; sljedeći stupci prikazuju zasebne modele usporedbe skupina ispitanika s kontrolama. Prikazani su statistički značajni rezultati, izraženi kao P, s OR (95% CI)]

## 5 Rasprava

U ovom istraživanju detektirane promjene glikozilacije upućuju na složenu prirodu progresije makularne degeneracije povezane sa starenjem i postepeni pad imunoloških regulacijskih mehanizama praćenih sniženim razinama digalaktoziliranih biantenarnih glikana sa sržnom fukozom i terminalno vezanom sijalnom kiselinom (IgG\_GP18) u ispitanika s jednostranim znakovima bolesti te porast tetraantenarnih glikanskih struktura s fukozilacijom vanjske grane (DG13) u ispitanika s obostranim znakovima senilne makularne degeneracije.

U ispitanika mlađih od 55 godina s ranim nastupom degeneracije makule prisutna je aktivacija protuupalnih mehanizama, dok kod ispitanika starijih od 55 godina s unilateralnim oblikom SMD-a dolazi do imunološke disregulacije i pojave jakih proupalnih signala u bilateralnim slučajevima SMD-a (162). Sličan generalizirani obrazac promjena identificiran je u ispitanika s fibrozom jetre, što ukazuje na određenu razinu sličnosti nastanka bolesti u različitim organima (168). U pacijenata sa senilnom makularnom degeneracijom i pacijenata s fibrozom jetre bolest prolazi kroz različite stadije progresije praćene početnom fazom aktivacije reparativnih mehanizama, a zatim disregulacijom lokalnih i sistemnih imunoloških komponenti, kao i ekspresijom konačnog fenotipa bolesti.

Senilna makularna degeneracija multikompleksna je bolest u čijoj patogenezi sudjeluju različiti mehanizmi, a u dosadašnjim studijama istraživane su različite molekule kao potencijalni markeri. Međutim, nije nađen dovoljno specifičan marker koji bi zadovoljio dijagnostičke kriterije (138). U mnogim bolestima različite etiopatogeneze (reumatoidni artritis, pankreatitis, kolangitis, šećerna bolest, upalne bolesti crijeva, kronične opstruktivne bolesti pluća) proučavan je glikozilacijski profil proteina plazme gdje su detektirane promjene povećanja granjanja uz rast tri- i tetraantenarnih glikanskih struktura, te povišene razine fukoziliranih, tri- i tetrasijaliziranih glikana plazme uz povećanje broja vezanih manoza (169–171). Međutim, generalizirani obrazac proteina plazme ne pruža dovoljno specifične podatke o određenom procesu u organizmu stoga je jedan od najpročavanijih glikanski profil imunoglobulina G s obzirom na njegovu ulogu u imunološkom sustavu.

Druze senilne makularne degeneracije imaju visok udio glikolnih konjugata i zbog toga obrazac glikozilacije proteina predstavlja jednu od potencijalnih meta naprednih istraživanja kojima bi se dodatno razjasnila patogeneza bolesti. Upravo prisustvo konzistentne sijačne kiseline u svim fenotipima druza upućuje na ulogu procesa glikozilacije u najranijoj fazi razvoja druza. Lektinskim probama dokazani su mnogi glikoproteini u sastavu druza, među kojima i IgG čiji se obrazac glikozilacije mijenja s godinama i nazočnošću bolesti (68, 143–145). U prethodnim studijama pokazalo se da je promijenjeni profil protutijela IgG i IgM prisutan osim u mrežnici i u plazmi ispitanika sa senilnom makularnom degeneracijom i da značajno korelira sa stadijem bolesti (138). Pretpostavljena teorija akumuliranja inzulta izazvanih oksidacijskim stresom, disregulacija paraupalnog odgovora, upalno-imunološka hipoteza starenja organizma i razvoja bolesti povezanih s dobi (36, 38) te glikozilacijski obrazac koji mijenja funkciju proteina koji sudjeluju u upalno-imunološkom odgovoru dovode u fokus analizu glikanskog profila proteina i imunoglobulina G u plazmi kojom bi se mogli detektirati određeni mehanizmi uključeni u patogenezu bolesti.

Rezultati prikazani u Tablicama 8. i 9., a dobiveni usporedbom ispitanika s degeneracijom makule mlađih od 55 godina i kontrolne skupine sugeriraju nelinearni obrazac promjena upalnog signala s manjom razinom agalaktoziliranih struktura (G0) i određenih struktura s račvajućim GlcNAc bez terminalno vezane sijačne kiseline i galaktoze (GP2, DG2, IgG\_GP4, IgG\_GP6), kao i veći stupanj protuupalnih di-galaktoziliranih biantenarnih glikanskih struktura s vezanom fukozom na pentasaharidnoj srži i terminalnom Neu5Ac (IgG\_GP14, IgG\_GP18). Fukoza na pentasaharidnoj srži regije Fc IgG posreduje u sprječavanju protutijelima ili kompleksom posredovane stanične citotoksičnosti, dok slično imunosupresivno djelovanje imaju i terminalno vezane sijačne kiseline smanjujući afinitet regije Fc maskiranjem ostataka GlcNAc (172–175).

Detektirane promjene glikozilacije u ispitanika s degeneracijom makule mlađih od 55 godina sugeriraju da nakupljanje otpadnog materijala u mrežnici kod mlađih ljudi može pokrenuti reparativne imunosupresijske mehanizme u sklopu paraupalnog procesa radi očuvanja homeostaze i funkcionalnosti, što je i opisano u prethodnim studijama (14, 36, 38, 54–57). Mrežnica je, kao i mozak, visoko sofisticirano tkivo koje ima specijalne zaštitne mehanizme suprimiranja upalno-imunološke reakcije (56). Lokalne stanice u mrežnici, stanice RPE-a i neuroni eksprimiraju različite imunomodulatore kojima suprimiraju mikrogliju/makroglafu,



aktivaciju T-stanica i komplementa te induciraju smrt infiltrirajućih imunoloških stanica. Ako je vanjska krvno-mrežnična barijera intaktna, također ni cirkulirajuće antigen prezentirajuće stanice neće detektirati oksidacijskim stresom inducirane endogene alarmine u mrežnici (54–57).

Daljnja multivarijantna analiza glikanskih struktura u ispitanika mlađih od 55 godina s druzama makule, prilagođena prema dobi, spolu i rizičnim čimbenicima lipidnog metabolizma, nije polučila značajan rezultat, što može upućivati na zbunjujuće čimbenike. Stoga je u budućnosti potrebno težiti boljem ustroju studija upravo i zbog velikog rizika progresije makularne degeneracije kod mlađih pacijenata u neovaskularni stadij bolesti (13). Veća kohortna skupina ispitanika s ranom makularnom degeneracijom mlađih od 55 godina, kao i multipla glikanska mjerenja iz različitih uzoraka suza i plazme, uz kontinuirano praćenje ispitanika pomoći će u boljem razumijevanju procesa glikozilacije u ranim fazama nastanka i progresije bolesti u mlađoj dobnoj skupini. Poznavanje čimbenika rizika i razumijevanje paraupalnog odgovora, koji je prisutan već u ranoj fazi bolesti, omogućilo bi možda razvoj dijagnostičkih, prognostičkih i terapijskih noviteta, posebno značajnih za one pacijente s makularnom degeneracijom na jednom oku, mlađih od 55 godina i/ili nositelja značajnog genetičkog rizika za razvoj bolesti (36, 38).

U ispitanika starijih od 55 godina, kod kojih je dobno zadovoljen kriterij senilne makularne degeneracije, rezultati sugeriraju disregulaciju paraupalnog procesa. Jednostrana prezentacija bolesti može predstavljati prolaznu fazu prema bilateralnom obliku ili, ovisno o okolišnim, genetičkim i fenotipskim karakteristikama, i manji temeljni rizik pojave i progresije bolesti u odnosu na bilateralne slučajeve SMD-a (162, 176). Prema podacima prikazanim u Tablici 8. i 9., ispitanici s jednostranom prezentacijom SMD-a imali su povišene razine agalaktoziliranih glikana (G0), više razine određenih glikanskih struktura s računjućim GlcNAc bez terminalne sialne kiseline i galaktoze (GP2, DG2, IgG\_GP6), kao i snižene razine digalaktoziliranih biantenarnih struktura sa sržnom fukozom (IgG\_GP14, IgG\_GP18) naspram skupine ispitanika mlađih od 55 godina s druzama makule. Međutim, multivarijantnom analizom nisu nađene značajne razlike. Iz Tablice 10. vidljivo je da usporedbom jednostranih slučajeva SMD-a s kontrolom skupinom multivarijantnom analizom su otkriveni značajno niži izgledi za digalaktozilirane biantenarne glikane sa sržnom fukozom i terminalno vezanom Neu5Ac

(IgG\_GP18), što se u prethodnim studijama pokazalo značajnim u funkcioniranju imunološkog sustava (172–175).

U prethodnim studijama dokazana je korelacija glikanskih struktura IgG\_GP18 s hiperlipidemijom (119), koja se i u ranijim studijama pokazala rizičnim čimbenikom razvoja senilne makularne degeneracije, kao i kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti (29, 30). U ovom istraživanju pokazano je da ispitanici sa senilnom makularnom degeneracijom imaju poremećen metabolizam lipida u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 7.). Dislipidemija potiče razvoj kronične upale praćene povišenim razinama IL-6 (119). U prethodnim studijama kod ispitanika sa senilnom makularnom degeneracijom zabilježen je lokalni i sistemski porast IL-6 koji promovira aktivaciju limfocita i proteina akutne faze (72, 177), a smatra se jednim od mogućih modulatora procesa glikozilacije IgG (178). Ukupni kolesterol, trigliceridi i povišene razine LDL-a promoviraju upalno stanje pozitivno korelirajući s IgG\_GP6, kao i smanjenjem IgG\_GP18 (119). Slične promjene porasta račvajućih struktura i smanjenja stupnja galaktozilacije i sijalizacije, praćene slobodnim ostacima GlcNAc, detektirane su i u šećernoj bolesti tip II, hipertenziji i ishemijskom moždanom udaru (92). Pretpostavlja se da račvajući GlcNAc ima negativni utjecaj na stupanj galaktozilacije, sijalizacije i sržne fukozilacije biantenarnih struktura, što je većina plazmatskih imunoglobulina G (131). Istodobno, uz sniženi IgG\_GP18, u ovom istraživanju prezentirani su u Tablici 10. i marginalno povišeni izgledi za monogalaktozilirane monosijalizirane biantenarne glikane s račvajućim GlcNAc i oligomanozne strukture (GP6), što je prethodno implicirano s povećanim rizikom za brojne bolesti.

Nađene promjene glikanskih struktura, prilagođene dobi i spolu, u ispitanika s unilateralnom senilnom makularnom degeneracijom u odnosu na kontrolnu skupinu mogu predstavljati slom reparativnih paraupalnih mehanizama. S obzirom na veliku ulogu imunološkog sustava u odgovoru na tkivni stres nasuprot činjenici da u senilnoj makularnoj degeneraciji nema intenzivne imunološke reakcije (starenjem organizma dolazi i do fenomena imunosenescencije) pretpostavka je da u patogenezi upravo dolazi do disregulacije paraupalnog procesa, sloma reparativnih mehanizama i kronične upale niskog stupnja aktivnosti. Kronična upala niskog stupnja aktivnosti kritični je događaj u mnogim ljudskim bolestima povezanim sa životnom dobi i u imunološko privilegiranim tkivima. Slični mehanizmi su i u podlozi razvoja

ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti, šećerne bolesti tip II i neurodegenerativnih bolesti (55, 57).

Akumulirana oštećenja u kontekstu starenja oka nadvladavaju mogućnost reparativnih kapaciteta tkiva, što vodi razgradnji vanjske krvno-mrežnične barijere, disregulaciji lokalnih i sistemskih komponenti, ekstracelularnog matriksa, retinalnog pigmentnog epitela, mrežnične mikroglije, makrofaga/dendritičkih stanica, limfocita B, limfocita T, citokina, kemokina, čimbenika komplementa i angiogeneze. Disbalans pro/protuupalnih mehanizama, gubitak imunološke privilegiranosti, promjene populacije makrofaga i T-stanica, kao i aktivacija sustava komplementa povezane su s povećanom ekspresijom proupalnih citokina u mrežnici (CCL2, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-17A, IL-22, TGF- $\beta$  i IFN- $\gamma$ ), što vodi razvoju druzna, geografske atrofije i neovaskularne forme SMD-a (36–41, 54–57).

U ranijim studijama potvrđene su i povišene sistemske razine čimbenika komplementa, citokina i protutijela u ispitanika sa SMD-om (71–73, 76, 78, 79). Međutim, ostaje nejasno na koji točno način sistemske razine proupalnih čimbenika utječu na lokalna patološka zbivanja u mrežnici. Pretpostavlja se da aktivirane sistemske imunološke stanice i citokini uslijed sloma krvno-mrežnične barijere regrutirani u makulu pridonose patologiji. Razina sistemske imunološke aktivacije niskog stupnja teža je u ispitanika sa senilnom makularnom degeneracijom u usporedbi s kontrolnom skupinom iste dobi, što može odražavati intrinzičnu prekomjernu reaktivnost imunološkog sustava tj. disregulaciju sistemskih paraupalnih mehanizama uzrokovanu akumulacijom oksidacijskih oštećenja tijekom starenja (179). Osim procesa starenja razloge veće imunološke aktivnosti i disregulacije paraupalnog procesa treba tražiti i u poremećaju antioksidacijskog sustava, komplementa, makrofaga i limfocita uslijed genetičke predispozicije ili epigenetičkog utjecaja okolišnih čimbenika rizika. S druge strane, malo je podataka o serumskim razinama protuupalnih citokina, IL-10 i IL-4, u odnosu na kontrolne skupine odgovarajuće dobi i ostaje nejasno na koji način ravnoteža proupalnih i protuupalnih citokina generira fenotip bolesti (75, 76).

Najizraženija proupalna promjena otkrivena je u ispitanika starijih od 55 godina s obostranim znakovima SMD-a na fotografiji fundusa. U svim stadijima i fenotipima senilne makularne degeneracije impliciran je određeni stupanj upale koji vrhunac doseže razvojem eksudativne

forme (36, 38). Prema podacima prezentiranim u Tablici 8. i 9., usporedbom s kontrolnom skupinom i ispitanicima mlađim od 55 godina s druzama makule u skupini ispitanika s bilateralnim znakovima SMD-a otkrivene su povišene razine tetraantenarnih glikana s fukozilacijom vanjske grane (DG12, DG13), porast određenih glikanskih struktura s račvajućim GlcNAc bez vezane galaktoze i terminalne Neu5Ac (GP2, DG2, IgG\_GP4, IgG\_GP6) i snižene razine digalaktoziliranih biantenarnih glikana sa sržnom fukozom i terminalnom Neu5Ac (IgG\_GP14, IgG\_GP18). U uzorku glikana multivarijantnom analizom prilagođenom dobi, spolu i lipidnim čimbenicima rizika nađeni su povišeni izgledi za tetraantenarne strukture s fukozilacijom vanjske grane (DG13), praćene povišenjem određenih glikana s račvajućim GlcNAc i odsutnom sržnom fukozom, kao i visokomanoznim strukturama (GP7) uz neznatno sniženi GP2 (Tablica 10.).

Analizama stabilnosti i varijabilnosti identificirane su glikanske strukture ovisne o genetičkoj regulaciji u odnosu na one koje su pod većim utjecajem okolišnih čimbenika. Upravo su strukture pika DG13 podložnije utjecaju okolišnih čimbenika rizika koji su jedan od važnih čimbenika razvoja senilne makularne degeneracije (180). Povišene razine tetraantenarnih glikana s antenarnom fukozilacijom prethodno su identificirane u multiploj sklerozi, ulceroznom kolitisu, Crohnovoj bolesti i terminalnim fazama karcinoma (124, 125, 181, 182). U odnosu na sržnu fukozu antenarna fukozilacija korelira s aktivacijom komplementa putem lektina. Također, razine ukupnog kolesterola u krvi, HDL-a, LDL-a i triglicerida, kao indikatora nezdravog načina života, pozitivno koreliraju s povišenim stupnjem granjanja, tri- i tetraantenarnim strukturama, fukozilacijom vanjske grane, smanjenjem sržne fukozilacije i vezanim manozama (92, 119, 135).

Prema rezultatima prikazanim u Tablici 10., bilateralne slučajeve SMD-a karakterizirale su i značajno povišene razine agalaktoziliranih glikana (G0), što je zabilježeno i u drugim upalnim i autoimunskim bolestima (121–123, 140–142). Među najbolje istraženim bolestima svakako se ističe reumatoidni artritis kod kojeg se IgG-G0 može koristiti kao prognostički marker destrukcije zglobova, pa čak i u juvenilnom obliku bolesti (141). Strukture IgG-G0 sa slobodnim ostacima GlcNAc aktiviraju komplement vežući se na čimbenik komplementa C1q (173). Promjene glikozilacije regije Fc IgG, u smislu smanjenog stupnja galaktozilacije, vode smanjenju protuupalne funkcije i promociji upalnog stanja. Suprotne promjene galaktozilacije IgG tijekom starenja i trudnoće primjeri su na koji način funkcija IgG, pa i cjelokupnog

imunološkog sustava, ovisi o navedenoj modifikaciji. Proučavajući incidenciju i progresiju reumatoidnog artritisa studije su pokazale da u trudnoći dolazi do kompletne remisije bolesti u 75% slučajeva uslijed pada razine agalaktoziliranih IgG, vjerojatno zbog imunoendokrinološkog supresivnog djelovanja progesterona. U postpartalnom razdoblju nastupa egzacerbacija bolesti zbog aktivacije IL-6, smanjenja razine galaktoziltransferaza i skoka IgG-G0 (128, 178). Osim IL-6 vjerojatan je i utjecaj drugih proupalnih i protuupalnih citokina u generiranju konačnog fenotipa bolesti.

Sve tri skupine ispitanika u jednoj kategoriji u odnosu na kontrolnu skupinu značajno su se razlikovale samo u porastu tetraantenarnih glikana s fukozilacijom vanjske grane u piku DG13 (Tablica 10.). Takav rezultat otkriva nedostatke provedenog istraživanja u smislu poprečne prirode studije temeljene na jednostrukom mjerenju glikanskih struktura iz jednog dostupnog biološkog uzorka. Buduće studije prilikom ustroja trebale bi težiti preciznijoj procjeni i klasifikaciji ispitanika prema fenotipu bolesti uz kontinuirano kliničko praćenje, prvenstveno s obzirom na složenost same bolesti. Višestrukim mjerenjem glikana iz različitih dostupnih bioloških uzoraka, suza i plazme, kroz različite stadije progresije bolesti, izbjegli bi se eventualno lažno negativni rezultati u spektru progresije, čime bi se omogućilo bolje razumijevanje etiopatogeneze bolesti (162, 183, 184).

Unatoč tomu što se zadnjih godina prema velikoj količini dokaza pokazalo da je ključni događaj u patogenezi senilne makularne degeneracije imunološko-upalni proces, potrebne su daljnje studije kako bismo odgovorili na pitanje zašto paraupalni odgovor postaje disreguliran na lokalnoj i sistemskej razini (36, 38). U patogenezi SMD-a mnogi procesi su i dalje nedovoljno razjašnjeni, a pitanja koja se nameću su sljedeća:

1. Koji je prvi događaj koji vodi egzacerbaciji starosnih promjena prema patološkim?
2. Gdje nastupaju prve strukturne promjene na razini kompleksa Bruchova membrana-retinalni pigmentni epitel-fotoreceptori?
3. Događa li se prvo smrt fotoreceptora ili smrt stanica retinalnog pigmentnog epitela?
4. Na koji način stanice umiru (49)?
5. U kojem trenutku dolazi do upalno-imunološkog odgovora i mogu li se ti putevi modulirati?
6. Na koji način organizam regulira ravnotežu između proupalnih i protuupalnih medijatora?

7. Razlikuje li se upalno-imunološki proces ovisno o genotipu i fenotipu bolesti?
9. Postoji li u organizmu određen stupanj sistemske upale i na koji način plazmatske razine proupalnih citokina djeluju lokalno na razini tkiva (69, 72)?
10. Ima li obrazac glikozilacije lokalnih i sistemskih proteina upalno-imunološkog odgovora ulogu u patogenezi (138, 162)?

Trend starenja populacije stavlja u fokus inovativne dijagnostičke i terapijske mogućnosti za bolesti povezane sa starenjem. „Je li starenje proupalno stanje organizma?“ jedno je od glavnih pitanja na koje znanost još treba dati odgovor. Dolazi li starenjem do promjene obrasca glikozilacije i razvoja upale ili promjene glikozilacije dovode do kronične upale niskog stupnja, starenja organizma i razvoja bolesti? Može li se putem glikanskog profila plazme razlikovati zdravo od bolesnog starenja? Također, možemo li putem lako dostupnih bioloških uzoraka, kao što je plazma, detektirati rane promjene lokalnih i sistemskih patoloških zbivanja povezanih sa starenjem (136, 137)? Jedan od dokaza proupalne teorije starenja i razvoja bolesti su i detektirane promjene glikanskog profila plazme i IgG kod kojih s godinama dolazi do pada razine galaktozilacije i sijalizacije, kao i porasta račvajućeg GlcNAc, a to dovodi do promocije proupalnog stanja u organizmu (118, 130, 131).

Analiza glikoproteina kao markera ima značajan potencijal i u oftalmologiji, budući su IgG dokazani u sastavu druza, Bruchove membrane, retinalnog pigmentnog epitela i u fotoreceptorima (143, 144) pa bi buduće studije svakako detaljnije trebale razmotriti ulogu procesa glikozilacije u složenim obrascima formiranja konačnog fenotipa kombinacijom s drugim potencijalnim biomarkerima. Upravo promjene obrasca glikozilacije IgG koje nastupaju godinama prije postavljanja dijagnoze reumatoidnog artritisa (141), otvaraju mogućnosti razvoja novih dijagnostičkih testova temeljenim na glikanima, ali i pretpostavke da se alteracije glikana IgG događaju i u drugim autoimunim i kroničnim upalnim bolestima (92, 121–123).

Za što personaliziraniji pristup u predviđanju nastanka i progresije bolesti potrebna su daljnja istraživanja biorasploživosti molekularnih čimbenika, među kojima su i glikani, a zatim i njihova upotreba u modelima predviđanja. U ispitanika s jednostranom prezentacijom senilne

makularne degeneracije potencijalni glikanski marker predstavljaju snižene razine digalaktosiliranih biantenarnih glikana sa sržnom fukozom i terminalno vezanom sijalnom kiselinom [IgG\_GP18 ( $P < 0,009$ )], a u ispitanika s obostranim znakovima senilne makularne degeneracije porast tetraantenarnih glikanskih struktura s fukozilacijom vanjske grane [DG13 ( $P < 0,001$ )]. Kvantifikacija svih poznatih čimbenika rizika (demografski, okolišni, genetički, epigenetički, molekularni i fenotipski) u personaliziranim modelima predviđanja naposljetku može dovesti do preventivnih strategija i personaliziranih savjeta, što će svakako imati povoljan klinički učinak, poboljšanje kvalitete života pacijenata i smanjenje troškova liječenja.

## 6 Zaključak

Nakon provedenih istraživanja glikana plazme i/ili imunoglobulina G u ispitivanoj skupini bolesnika sa senilnom makularnom degeneracijom i usporedbom s kontrolnom skupinom može se zaključiti slijedeće:

1. Ispitanici s jednostranim i obostranim znakovima senilne makularne degeneracije bili su starije životne dobi s poremećenim metabolizmom lipida koji je i prethodno impliciran kao rizični čimbenik nastanka i progresije bolesti. Multivarijantnom analizom glikanskih struktura u ispitanika s makularnom degeneracijom mlađih od 55 godina nije dobiven statistički značajan rezultat.
2. U ispitanika starije životne dobi s jednostranom prezentacijom senilne makularne degeneracije najznačajniji rezultat predstavljaju snižene razine digalaktosiliranih biantenarnih glikana sa sržnom fukozom i terminalno vezanom sijalnom kiselinom [IgG\_GP18 ( $P < 0,009$ )], što upućuje na slom reparativnih mehanizama i poremećaj imunološke regulacije.
3. U ispitanika s obostranim znakovima senilne makularne degeneracije najznačajniji rezultat predstavlja porast tetraantenarnih glikanskih struktura s fukozilacijom vanjske grane [DG13 ( $P < 0,001$ )], što odgovara promociji upalnog stanja u organizmu.
4. Iz svega navedenog razvidno je da se glikani plazme i/ili imunoglobulina G mogu koristiti kao biomarkeri senilne makularne degeneracije. No, u budućim studijama bilo bi potrebno povećati broj ispitanika, preciznije definirati ustroj studije, klasifikaciju bolesti, provesti višestruka mjerenja glikanskih struktura iz različitih bioloških uzoraka te kontinuirano klinički pratiti bolesnike.



## 7 Sažetak

Senilna makularna degeneracija (SMD) bolest je centralnog dijela mrežnice. Vodeći je uzrok sljepoće u populaciji iznad 55 godina života i treći globalni uzrok sljepoće iza mrene i glaukoma. Brojna su istraživanja usmjerena na razumijevanje etiopatogeneze i pronalazak potencijalnih biomarkera.

Glikozilacija je proces posttranslacijske modifikacije proteina. Imunoglobulini G (IgG) najbolje su proučeni N-glikoproteini koji sudjeluju u kontroliranom imunološkom odgovoru, a razlika u glikozilacijskom profilu IgG ovisi o genetičkoj i epigenetičkoj regulaciji, kao i konstitucijskim i okolišnim čimbenicima. Promjene glikozilacije nazočne su u ranoj akutnoj fazi i razvojem kroničnih stadija bolesti, pa bi analiza glikanskog profila proteina i imunoglobulina G u plazmi bila značajna u rasvjetljivanju mehanizama uključenih u patogenezu SMD-a.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati promjene obrasca glikozilacije sveukupnih proteina i imunoglobulina G u plazmi, u različitim skupinama ispitanika s degenerativnim promjenama u makuli iz kohorte „10, 001 Dalmatinac” te ih usporediti s relevantnom kontrolnom skupinom.

Ispitanici s jednostranim i obostranim znakovima senilne makularne degeneracije bili su starije životne dobi, s poremećenim metabolizmom lipida. Multivarijantnom analizom glikanskih struktura u ispitanika s makularnom degeneracijom mlađih od 55 godina nije dobiven statistički značajan rezultat. U ispitanika starije životne dobi s jednostranom prezentacijom senilne makularne degeneracije najznačajniji rezultat predstavljaju snižene razine digalaktoziliranih biantenarnih glikana sa sržnom fukozom i terminalno vezanom sijalnom kiselinom [IgG\_GP18 ( $P < 0,009$ )], što upućuje na slom reparativnih mehanizama i poremećaj imunološke regulacije. U ispitanika s obostranim znakovima senilne makularne degeneracije najznačajniji rezultat predstavlja porast tetraantenarnih glikanskih struktura s fukozilacijom vanjske grane [DG13 ( $P < 0,001$ )], što odgovara promociji upalnog stanja u organizmu.

Sve tri skupine ispitanika u jednoj kategoriji u odnosu na kontrolnu skupinu značajno su se razlikovale samo u porastu tetraantenarnih glikana s fukozilacijom vanjske grane. Takav rezultat otkriva nedostatke provedenog istraživanja u smislu poprečne prirode studije temeljene na jednostrukom mjerenju glikanskih struktura iz jednog dostupnog biološkog uzorka. Ustroj budućih studija trebao bi se temeljiti na preciznijoj procjeni i klasifikaciji ispitanika prema fenotipu bolesti, uz kontinuirano kliničko praćenje i višestruko mjerenje glikana iz različitih bioloških uzoraka.

## 8 Summary

Age-related macular degeneration (AMD) is a disease of the central portion of the retina. It is the leading cause of blindness in over-55 population and the third cause of blindness globally, after cataracts and glaucoma. Numerous research projects are devoted to elucidating the etiopathogenesis and identifying potential biomarkers.

Glycosylation is the post-translational modification process for proteins. Immunoglobulin G (IgG) is well-studied N-glycoprotein that participates in the homeostatic control of the immune response. The interindividual variation in the glycosylation profile of IgG is affected by the expression of glycan-related genes, epigenetic regulation, as well as constitutional and environmental factors. Glycosylation changes are present in the early acute phase and the development of chronic stages of the disease; therefore, the analysis of the glycan profile of proteins and immunoglobulin G in plasma would be significant in identifying the processes involved in the pathogenesis of AMD.

The objective of this study was to compare the glycosylation patterns of total proteins and immunoglobulin G in plasma from different groups of 10,001 Dalmatian subjects with macula degeneration to a relevant control group.

The subjects with unilateral and bilateral signs of AMD were elderly people and had dysfunctional lipid metabolism. The multivariate analysis of glycan structures did not produce a significant result in subjects under 55 years of age with macular degeneration. The most significant result regarded lower odds for di-galactylated bi-antennary glycans with core fucose and terminally attached sialic acid [IgG\_GP18 ( $P < 0,009$ )] in unilateral cases of AMD. The described alterations in glycan structures may indicate a failure of reparative para-inflammatory mechanisms. The most significant result revealed increased odds for tetra-antennary structures with fucosylation of the outer branch grane [DG13 ( $P < 0,001$ )], which is a strong indicator of inflammation, in bilateral cases of AMD.

Only the increase in tetra-antennary glycans with fucosylation of the outer branch was significantly different between the three subject groups in one category and the control group. This result reveals the limitations of the conducted research due to the cross-sectional nature of the study based on a single measurement of glycan structures from a single available biological sample. Future studies should aim for a more precise evaluation and classification of subjects according to disease phenotype, with continuous clinical monitoring and multiple measurements of glycans in various biological samples.

## Popis literature

1. Velez-Montoya R, Oliver SC, Olson JL, Fine SL, Quiroz-Mercado H, Mandava N. Current knowledge and trends in age-related macular degeneration: genetics, epidemiology, and prevention. *Retina*. 2014;34(3):423–41.
2. Mitchell P, Liew G, Gopinath B, Wong TY. Age-related macular degeneration. *Lancet*. 2018;392(10153):1147–59.
3. Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY. Age-related macular degeneration. *Lancet*. 2012;379(9827):1728–38.
4. Rudolf M, Clark ME, Chimento MF, Li CM, Medeiros NE, Curcio CA. Prevalence and morphology of druse types in the macula and periphery of eyes with age-related maculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:1200–09.
5. Li CM, Clark ME, Rudolf M, Curcio CA. Distribution and composition of esterified and unesterified cholesterol in extra-macular drusen. *Exp Eye Res*. 2007;85:192–201.
6. Campagne ML, LeCouter J, Yaspan BL, Ye W. Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities. *J Pathol*. 2014;232:151–164.
7. Klein R, Meuer SM, Knudtson MD, Iyengar SK, Klein BE. The epidemiology of retinal reticular drusen. *Am J Ophthalmol*. 2008;145:317–26.
8. Sparrow JR, Zhou J, Cai B. DNA is a target of the photodynamic effects elicited in A2E-laden RPE by blue-light illumination. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:2245–51.
9. Macular Photocoagulation Study Group. Argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy. Three-year results from randomized clinical trials. *Arch Ophthalmol*. 1986;104:694–701.
10. Patel R, Wang J, Campbell JP, Kiang L, Lauer A, Flaxel C, et al. Classification of Choroidal Neovascularization Using Projection-Resolved Optical Coherence Tomographic Angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59:4285–91.
11. Wong CW, Yanagi Y, Lee WK, Ogura Y, Yeo I, Wong TY, et al. Age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in Asians. *Prog Retin Eye Res*. 2016;53:107–39.
12. Harding SP. Neovascular age-related macular degeneration: decision making and optimal management. *Eye (Lond)*. 2010;24:497–505.

13. Breuk A, Heesterbeek TJ, Bakker B, Verzijden T, Lechanteur YTE, Klawer CCW, i ostali. Evaluating the occurrence of rare variants in the complement factor H gene in patients with early-onset drusen maculopathy. *JAMA Ophthalmol.* 2021;139:1218–26.
14. Chen M, Heping Xu. Parainflammation, chronic inflammation and age-related macular degeneration. *J Leukoc Biol.* 2015;98:713–25.
15. Klein R, Meuer SM, Myers CE, Buitendijk GHS, Rochtchina E, Choudhury F, i ostali. Harmonizing the classification of age-related macular degeneration in the three-continent AMD consortium. *Ophthalmic Epidemiol.* 2014;21:14–23.
16. Colijn JM, Buitendijk GHS, Prokofyeva E, Alves D, Cachulo ML, Khawaya AP, i ostali. Prevalence of age-related macular degeneration in Europe: the past and the future. *Ophthalmol.* 2017;124:1753–63.
17. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng CY, i ostali. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health.* 2014;2:106–16.
18. Gupta B, Jyothi S, Sivaprasad S. Current treatment options for retinal angiomatous proliferans (RAP). *Br J Ophthalmol.* 2010;94:672–77.
19. Rein DB, Zhang P, Wirth KE, Lee P. The economic burden of major adult visual disorders in the United States. *Arch Ophthalmol.* 2006;124:1754–60.
20. Heesterbeek TJ, Lorés-Motta L, Hoyng CB, Lechanteur YTE, Hollander AI. Risk factors for progression of age-related macular degeneration. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2020;40(2):140–70.
21. Chakravarthy U, Wong TY, Fletcher A, Piau E, Evans C, Zlateva G, i ostali. Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol.* 2010;13:10:31.
22. Fraser-Bell S, Wu J, Klein R, Azen SP, Varma R. Smoking, alcohol intake, estrogen use, and age-related macular degeneration in latinos: The Los Angeles Latino Eye Study. *Am J Ophthalmol.* 2006;141:79–87.
23. Age-Related Eye Disease Study Research Group. Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3. *Ophthal.* 2000;107:2224–32.
24. Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Yates JRW, Bradley M et al. Smoking and age related macular degeneration: the number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. *Br J Ophthalmol.* 2006;90:75–80.

25. Seddon JM, Cote J, Davis N, Rosner B. Progression of age-related macular degeneration: association with body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio. *Arch Ophthalmol.* 2003;121:785–92.
26. Adams MKM, Simpson JA, Aung KZ, Makeyeva GA, Giles GG, English DR, i ostali. Abdominal obesity and age-related macular degeneration. *AM J Epidemiol.* 2011;173:1246–55.
27. McGuinness MB, Karahalios A, Simpson JA, Guymer RH, Robman LD, Hodge AM, i ostali. Past physical activity and age-related macular degeneration: The Melbourne Collaborative Cohort Study. *Br J of Ophthalmol.* 2016;100:1353–58.
28. Merle BMJ, Colijn JM, Cougnard-Grégoire A, de Koning-Backus APM, Delyfer MN, Kieft-de Jong JC, et al. Mediterranean Diet and Incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration: The EYE-RISK Consortium. *Ophthalmol.* 2019;126:381–90.
29. Bućan, K, Lukić M, Bosnar D, Kopic A, Jukić T, Konjevoda S, i ostali. Analysis of association of risk factors for age-related macular degeneration. *Eur. J. Ophthalmol.* 2021;32:410–16.
30. Delcourt C, Souied E, Sanchez A, Bandello F, STARS Survey Group. Development and validation of a risk score for age-related macular degeneration: The STARS Questionnaire. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58:6399–407.
31. Clark SJ, Perveen R, Hakobyan S, Morgan BP, Sim RB, Bishop PN, i ostali. Impaired binding of the age-related macular degeneration-associated complement factor H 402H allotype to Bruch's membrane in human retina. *J Biol Chem.* 2010;285:30192–202.
32. Wang G, Scott WK, Agarwal A, Haines JL, Pericak-Vance MA. Coding variants in ARMS2 and the risk of age-related macular degeneration. *JAMA Ophthalmol.* 2013;131:804–05.
33. Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol.* 2001;119:1417–36.
34. Age-Related Eye Disease Study 2 Research Group. Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *JAMA.* 2013;309:2005–15.
35. Krinsky NI, Landrum JT, Bone RA. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annu Rev Nutr.* 2003;23:171–201.

36. Parmeggiani F, Romano MR, Costagliola C, Semeraro F, Incorvaia F, D'Angelo S, i ostali. Mechanisms of Inflammation in Age-Related Macular Degeneration. *Mediators Inflamm.* 2012;546786.
37. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontol.* 1956;11(3):298–300.
38. Ardeljan D, Chan CC. Aging is not a disease: distinguishing age-related macular degeneration from aging. *Prog Retin Eye Res.* 2013;37.
39. Kamei, M., Hollyfield, JG. TIMP-3 in Bruch's membrane: changes during aging and in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:2367–75.
40. Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophages polarization comes of age. *Immunity.* 2005; 23:344–46.
41. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trend in Immunol.* 2004; 25:677–86.
42. Hussain AA, Starita C, Hodgetts A, Marshall J. Macromolecular diffusion characteristics of ageing human Bruch's membrane: implications for agerelated macular degeneration (AMD). *Exp. Eye Res.* 2010;90:703–10.
43. Hussain AA, Lee Y, Zhang JJ, Marshall J. Disturbed matrix metalloproteinase activity of Bruch's membrane in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:4459–66.
44. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803: 55–71.
45. Curcio CA, Johnson M, Rudolf M, Huang JD. The oil spill in ageing Bruch membrane. *Br J Ophthalmol.* 2011;95:1638–45.
46. Sparrow JR, Gregory-Roberts E, Yamamoto K, Blonska A, Ghosh SK, Ueda K et al. The bisretinoids of retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res.* 2012;31:121–35.
47. Chen PM, Gombart ZJ, Chen JW. Chloroquine treatment of ARPE-19 cells leads to lysosome dilation and intracellular lipid accumulation: possible implications of lysosomal dysfunction in macular degeneration. *Cell Biosci.* 2011;1:10.
48. Lin H, Xu H, Liang FQ, Liang H, Gupta P, Havey AN, i ostali. Mitochondrial DNA damage and repair in RPE associated with aging and age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:3521–29.

49. Bhutto IA, Luttly G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol Aspects Med.* 2012;33:295–317.
50. Bhutto IA, Baba T, Merges C, McLeod DS, Luttly GA. Low nitric oxide synthases (NOSs) in eyes with age-related macular degeneration (AMD). *Exp Eye Res.* 2010;90:155–167.
51. Joukov V, Kaipainen A, Jeltsch M, Pajusola K, Olofsson B, Kumar V, i ostali. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C. *J Cell Physiol.* 1997;173:211–21.
52. Mousa SA, Mousa SS. Current status of vascular endothelial growth factor inhibition in age-related macular degeneration. *BioDrugs.* 2010;24:183–94.
53. Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, i ostali. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res.* 1997;57:963–69.
54. Ambati J, Atkinson JP, Gelfand BD. Immunology of age-related macular degeneration. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:438–51.
55. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2014;69:4–9.
56. Blasiak J, Petrovski G, Vereb Z, Facsko A, Kaarniranta K. Oxidative stress, hypoxia, and autophagy in the neovascular processes of age-related macular degeneration. *Biomed Res Int.* 2014;2014:768026.
57. Tchkonina T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest.* 2013;123:966–72.
58. Herrero C. Immunosenescence of macrophages: reduced MHC class II gene expression. *Exp Gerontol.* 2002;37:389–94.
59. Skeie JM, Mullins RF. Macrophages in neovascular age-related macular degeneration: friends or foes? *Eye (Lond).* 2009;23:747–55.
60. Cao X, Shen D. Macrophage polarization in the maculae of age-related macular degeneration. *Pathol Int.* 2011;61:528–35.
61. Sennlaub F, Auvynet C, Calippe B, Lavalette S, Poupel L, Hu SJ, i ostali. CCR2(+) monocytes infiltrate atrophic lesions in age-related macular disease and mediate photoreceptor degeneration in experimental subretinal inflammation in Cx3cr1 deficient mice. *EMBO Mol Med.* 2013;5:1775–93.

62. Tuo J, Smith BC, Bojanowski CM, Meleth AD, Gery I, Csaky KG, et al. The involvement of sequence variation and expression of CX3CR1 in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *FASEB J*. 2004;18:1297–99.
63. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19:71–82.
64. Bringmann, A, Kohen, L, Wolf, S, Wiedemann, P, Reichenbach, A. Age-related decrease of potassium currents in glial (Muller) cells of the human retina. *Can J Ophthalmol*. 2003;38:464–68.
65. Wu KH, Madigan MC, Billson FA, Penfold PL. Differential expression of GFAP in early v late AMD: a quantitative analysis. *Br J Ophthalmol*. 2003;87:1159–66.
66. Knickelbein JE, Chan CC, Sen HN, Ferris FL, Nussenblatt RB. Inflammatory mechanisms of age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol Clin*. 2015;55(3):63–78.
67. Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, Sarma JV, Barnum SR, Lambris JD, et al. Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(7):2328–33.
68. Mullins RF, Russell SR, Anderson DH, Hageman GS. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J*. 2000;14:835–46.
69. Reynolds R, Hartnett ME, Atkinson JP, Giclas PC, Rosner B, Seddon JM. Plasma complement components and activation fragments: associations with age-related macular degeneration genotypes and phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(12):5818–27.
70. Hageman G, Anderson D, Johnson L, Hancox L, Taiber A, Hardisty L, et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Nat Acad Sci. USA*. 2005;102:7227–32.
71. Cao S, Ko A, Partanen M, Pakzad-Vaezi K, Merkur AB, Albiani DA, et al. Relationship between systemic cytokines and complement factor H Y402H polymorphism in patients with dry age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2013;156:1176–83.
72. Seddon JM, George S, Rosner B, Rifai N. Progression of age-related macular degeneration: prospective assessment of C-reactive protein, interleukin 6, and other cardiovascular biomarkers. *Arch Ophthalmol*. 2005;123:774–82.
73. Zhan X, Larson DE, Wang C, Koboldt DC, Sergeev YV, Fulton RS, et al. Identification of a rare coding variant in complement 3 associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2013;45:1375–79.



74. Faber C, Singh A, Kruger Falk M, Juel HB, Sorensen TL, Nissen MH. Age-related macular degeneration is associated with increased proportion of CD56(+) T cells in peripheral blood. *Ophthalmol.* 2013;120:2310–16.
75. Goronzy JJ, Weyand CM. Immune aging and autoimmunity. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69:1615–23.
76. Nassar K, Grisanti S, Elfar E, Luke J, Luke M, Grisanti S. Serum cytokines as biomarkers for age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2015;253:699–704.
77. Zhong H, Sun X. Contribution of Interleukin-17A to Retinal degenerative diseases. *Front Immunol.* 2022;13:847937.
78. Klein R, Myers CE, Cruickshanks KJ, Gangnon RE, Danforth LG, Sivakumaran TY, et al. Markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction and the 20-year cumulative incidence of early age-related macular degeneration: The Beaver Dam Eye Study. *JAMA Ophthalmol.* 2014;132:446–55.
79. Gu X, Meer SG, Miyagi M, Rayborn ME, Hollyfield JG, Crabb JW, et al. Carboxyethylpyrrole protein adducts and autoantibodies, biomarkers for age-related macular degeneration. *J Biol Chem.* 2003;278:42027–35.
80. Ijima R, Kaneko H, Ye F, Nagasaka Y, Takayama K, Kataoka K, et al. Interleukin-18 induces retinal pigment epithelium degeneration in mice. *Invest Ophthalmol Visual Sci.* 2014;55:6673–78.
81. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol.* 1995;39:367–74.
82. Ferris FL 3rd, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K, et al. Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmol.* 2013;120:844–51.
83. Age-Related Eye Disease Study Research Group. A simplified severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 18. *Arch Ophthalmol.* 2005;123:1570–74.
84. Sadda SR, Guymer R, Holz FG, Schmitz-Valckenberg S, Curcio CA, Bird AC, et al. Consensus definition for atrophy associated with age-related macular degeneration on OCT: Classification of atrophy Report 3. *Ophthalmol.* 2018;125:53748.
85. Rein DB, Wittenborn JS, Zhang X, Honeycutt AA, Lesesne SB, Saaddine J, et al. Forecasting age-related macular degeneration through the year 2050: the potential impact of new treatments. *Arch Ophthalmol.* 2009;127:533–40.

86. Yu JS, Carlton R, Agashivala N, Hassan T, Wykoff CC. Brolucizumab vs aflibercept and ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: a cost-effectiveness analysis. *J Manag Care Spec Pharm*. 2021;27(6):743–52.
87. Wang Y, Wang VM, Chan CC. The role of anti-inflammatory agents in age-related macular degeneration (AMD) treatment. *Eye*. 2011;25(2):127–39.
88. Arias L, Caminal JM, Badia MB, Rubio MJ, Catala J, Pujol O. Intravitreal infliximab in patients with macular degeneration who are nonresponders to antivascular endothelial growth factor therapy. *Retina*. 2010;30(10):1601–08.
89. Chintalapudi SR, Wang X, Wang X, Shi Y, Kocak M, Palamoor M, i ostali. NA3 glycan: a potential therapy for retinal pigment epithelial deficiency. *FEBS J*. 2019;286:4876–88.
90. Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiol*. 2002;12(4):43–56.
91. Berger M, Kaup M, Blanchard V. Protein glycosylation and its impact on biotechnology. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2012;127:165–85.
92. Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers*. 2008;25:267–78.
93. Clerc F, Reiding KR, Jansen BC, Kammeijer GSM, Bondt A, Wuhrer M. Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconj J*. 2016;33:309–43.
94. Almeida A, Kolarich D. The promise of protein glycosylation for personalised medicine. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1860(8):1583.
95. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol*. 2007;25:21–50.
96. Burda, P. and Aebi, M. The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1426:239–57.
97. Bieberich E. Synthesis, Processing, and Function of N-glycans in N-glycoproteins, *Advance Neurobiol*. 2014;9:47–70.
98. Johansen PG, Marshall RD, Neuberger A. Carbohydrates in protein. The preparation and some of the properties of a glycopeptide from hen egg ovalbumin. *Biochem. J*. 1961;78:518–27.
99. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, i ostali. *Essentials of glycobiology*, 2. izdanje; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2009.

100. Clausen H, Bennett EP. A family of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferases control the initiation of mucin-type O-glycosylation. *Glycobiol.* 1996;6:635–46.
101. Comer FI, Hart GW. O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate. *J Biol Chem.* 2000;275:29179–82.
102. Doucey M, Hess A, Cacan D, Hofsteenge R. Protein C-mannosylation is enzyme-catalysed and uses dolichyl-phosphate-mannose as a precursor. *Mol Biol Cell.* 1998;9:291–300.
103. Haynes PA. Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation? *Glycobiol.* 1998;8:1–5.
104. Ferguson MAJ. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci.* 1999;112:2799–809.
105. Zauner G, Selman MH, Bondt A, Rombouts Y, Blank D, Deelder AM, et al. Glycoproteomic analysis of antibodies. *Mol Cell Proteomics.* 2013;12(4):856–65.
106. Karsten CM, Pandey MK, Figge J, Kilchenstein R, Taylor PR, Rosas M, et al. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nat Med.* 2012;18:1401–06.
107. Stadlmann J, Pabst M, Altmann F. Analytical and functional aspects of antibody sialylation. *J Clin Immunol.* 2010;30:15–19.
108. Dalziel M, McFarlane I, Axford JS. Lectin analysis of human immunoglobulin G N-glycan sialylation. *Glycoconj J.* 1999;16:801–07.
109. Wuhler M, Stam JC, van de Geijn FE, Koeleman CAM, Verrips CT, Dolhain RJE, et al. Glycosylation profiling of immunoglobulin G (IgG) subclasses from human serum. *Proteomics.* 2007;7:4070–81.
110. Yuan W, Sanda M, Wu J, Koomen J, Goldman R. Quantitative analysis of immunoglobulin subclasses and subclass specific glycosylation by LC–MS–MRM in liver disease. *J Proteome.* 2015;116:24–33.
111. Ferrara C, Grau S, Jager C, Sondermann P, Brunker P, Waldhauer I, et al. Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγRIII and antibodies lacking core fucose. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108:12669–74.
112. Masuda K, Kubota T, Kaneko E, Iida S, Wakitani M, Kobayashi-Natsume Y, et al. Enhanced binding affinity for FcγRIIIa of fucose-negative antibody is sufficient to induce maximal antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Mol Immunol.* 2007;44:3122–31.

113. Kao D, Danzer H, Collin M, Groß A, Eichler J, Stambuk J, i ostali. A monosaccharide residue is sufficient to maintain mouse and human IgG subclass activity and directs IgG effector functions to cellular Fc receptors, *Cell Rep.* 2015;13(11):2376–85.
114. Bondt A, Rombouts Y, Selman MH, Hensbergen PJ, Reiding KR, Hazes JM, i ostali. Immunoglobulin G (IgG) Fab glycosylation analysis using a new mass spectrometric high-throughput profiling method reveals pregnancy-associated changes. *Mol Cell Proteomics.* 2014;13(11):3029–92.
115. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:513–33.
116. Gornik O, Pavić T, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins - Implications on evolution and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820:1318–26.
117. Raju TS. Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Curr. Opin Immunol.* 2008;20(4):471–78.
118. 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.
119. Liu D, Chu X, Wang H, Dong J, Ge SQ, Zhao ZY, i ostali. The changes of immunoglobulin G N-glycosylation in blood lipids and dyslipidaemia. *J Transl Med.* 2018;16:235.
120. Parekh R, Isenberg D, Rook G, Roitt I, Dwek R, Rademacher T. A comparative analysis of disease-associated changes in the galactosylation of serum IgG. *J Autoimmun.* 1989;2(2):101–14.
121. Wuhrer M, Stavenhagen K, Koeleman CA, Selman MH, Harper L, Jacobs BC, i ostali. Skewed Fc glycosylation profiles of anti-proteinase 3 immunoglobulin G1 autoantibodies from granulomatosis with polyangiitis patients show low levels of bisection, galactosylation, and sialylation. *J Proteome Res.* 2015;14(4):1657–65.
122. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, i ostali. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature.* 1985;316(6027):452–57.
123. Nakagawa H, Hato M, Takegawa Y, Deguchi K, Ito H, Takahata M, i ostali. Detection of altered N-glycan profiles in whole serum from rheumatoid arthritis patients. *J. Chromatogr. B Anal. Technol Biomed Life Sci.* 2007;853:133–37.

124. Saldova R, Shehni AA, Haakensen VD, Steinfeld I, Hilliard M, Kifer I, i ostali. Association of N-glycosylation with breast carcinoma and systemic features using high-resolution quantitative UPLC. *J Proteome Res.* 2014;13:2314–27.
125. Saldova R, Fan Y, Fitzpatrick JM, Watson RW, Rudd PM. Core fucosylation and alpha2-3 sialylation in serum N-glycome is significantly increased in prostate cancer comparing to benign prostate hyperplasia. *Glycobiol.* 2011;21(2):195–205.
126. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science.* 2006;313:670–73.
127. Kibe T, Fujimoto S, Ishida C, Togari H, Wada Y, Okada S, i ostali. Glycosylation and placental transport of immunoglobulin G. *J Clin Biochem Nutr.* 1996;21:57–63.
128. van de Geijn FE, Wuhrer M, Selman MH, Willemsen SP, de Man YA, Deelder AM, i ostali. 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.* 2009;11:193.
129. Ruhaak LR, Uh HW, Beekman M, Hokke CH, Westendorp RGJ, Houwing-Duistermaat J, i ostali. Plasma protein N-glycan profiles are associated with calendar age, familial longevity and health. *J Proteome Res.* 2011;10:1667–74.
130. Knežević A, Polašek O, Gornik O, Rudan I, Campbell H, Hayward C, i ostali. Variability, heritability and environmental determinants of human plasma N-glycome. *J Proteome Res.* 2009;8:694–701.
131. Pučić M, Knežević A, Vidić J, Adamczyk B, Novokmet M, Polašek O, i ostali. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol Cell Proteomics.* 2011 Oct.
132. Pučić M, Mužinić A, Novokmet M, Skledar M, Pivac N, Lauc G, i ostali. Changes in plasma and IgG N-glycome during childhood and adolescence. *Glycobiol.* 2012;22:975-982.
133. Zoldoš V, Novokmet M, Bečeheli I, Lauc G. Genomics and epigenomics of the human glycome. *Glycoconj J.* 2013;30:41–50.
134. Gornik O, Wagner J, Pucić M, Knezević A, Redzic I, Lauc G. Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiol.* 2009;19:1547–53.
135. Knežević A, Gornik O, Polašek O, Pučić M, Redžić I, Novokmet M, i ostali. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiol.* 2010;20:959–69.

136. Krištić J, Vučković F, Menni C, Klarić L, Keser T, Beceheli I, i ostali. Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014;69(7):779–89.
137. Ruhaak, LR, Uh HW, Beekman M, Koeleman CA, Hokke CH, Westendorp RG, i ostali. Decreased levels of bisecting GlcNAc glycoforms of IgG are associated with human longevity. 2010. *PLoS One*. 2010;5(9).
138. Kersten E, Paun CC, Schellevis RL, Hoyng CB, Delcourt C, Lengyel I, i ostali. Systemic and ocular fluid compounds as potential biomarkers in age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*. 2018;63(1):9–39.
139. Crabb JW, Miyagi M, Gu X, Shadrach K, West KA, Sakaguchi H, i ostali. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99:14682–87.
140. Albrecht S, Unwin L, Muniyappa M, Rudd PM. Glycosylation as a marker for inflammatory arthritis. *Cancer Biomark*. 2014;14:17–28.
141. Gudelj I, Salo PP, Trbojević-Akmačić I, Albers M, Primorac D, Perola M, i ostali. 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*. 2018;1864:2034–39.
142. Bondt A, Selman MH, Deelder AM, Hazes JM, Willemsen SP, Wuhler M, i ostali. Association between galactosylation of immunoglobulin G and improvement of rheumatoid arthritis during pregnancy is independent of sialylation. *J. Proteome Res*. 2013;12:4522–31.
143. D'Souza Y, Jones CJ, Bonshek R. Glycoproteins of drusen and drusen-like lesions. *J Mol Histol*. 2008;39(1):77–86.
144. D'Souza YB, Jones CJ, Bonshek RE. Comparison of lectin binding of drusen, RPE, Bruch's membrane, and photoreceptors. *Mol Vis*. 2009;15:906–11.
145. Hageman GS, Mullins RF. Molecular composition of drusen as related to substructural phenotype. *Mol Vis*. 1999;5:28–38.
146. Uchibori-Iwaki H, Yoneda A, Oda-Tamai S, Kato S, Akamatsu N, Otsuka M, i ostali. The changes in glycosylation after partial hepatectomy enhance collagen binding of vitronectin in plasma. *Glycobiol*. 2000;10:865–74.
147. Preissner KT, Reuning U. Vitronectin in vascular context: facets of a multitasking matricellular protein. *Semin Thromb Hemost*. 2011;37(04):408–24.
148. Tolosano E, Altruda F. Hemopexin: structure, function, and regulation. *DNA Cell Biol*. 2002;21:297–306.

149. L Hote C, Berger S, Bougerie S, Duval-Iflah Y, Julien R, Karamanos Y. Use of porcine fibrinogen as a model of glycoprotein to study the binding specificity of K88 lectin. *Infect Immunity*. 1995;63:1927–32.
150. Dang CV, Shin CK, Bell WR, Nagaswami C, Weisel JW. Fibrinogen sialic-acid residues are low affinity calcium-binding sites that influence fibrin assembly. *J Biol Chem*. 1989;264:15104–08.
151. Shields RL, Lai J, Keck R, Hong K, Meng YG, Weikert SHA, Presta LG. Lack of fucose on human IgG1 N-Linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibodydependent cellular toxicity. *J Biol Chem*. 2002;277:26733–40.
152. Kim TW, Kang JW, Ahn J, Lee EK, Cho KC, Han BNR, i ostali. Proteomic analysis of the aqueous humor in age-related macular degeneration (AMD) Patients. *J Proteome Res*. 2012;11:4034–43.
153. Kang GY, Bang JY, Choi AJ, Yoon J, Lee WC, Choi S, i ostali. Exosomal proteins in the aqueous humor as novel biomarkers in patients with neovascular age-related macular degeneration. *J Proteome Res*. 2014;13:581–95.
154. Nobl M, Reich M, Dacheva I, Siwy J, Mullen W, Schanstra JP, i ostali. Proteomics of vitreous in neovascular age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*. 2016;146:107–17.
155. Kim HJ, Ahn SJ, Woo SJ, Hong HK, Suh EJ, Ahn S, i ostali. Proteomics-based identification and validation of novel plasma biomarkers phospholipid transfer protein and mannan-binding lectin serine protease-1 in age-related macular degeneration. *Sci Rep*. 2016;6:32548.
156. Kim HJ, Woo SJ, Suh EJ, Ahn J, Park JH, Hong HK, i ostali. Identification of vinculin as a potential plasma marker for age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:7166–76.
157. Desrumaux CM, Mak PA, Boisvert WA, Masson D, Stupack D, Jauhiainen M, i ostali. Phospholipid transfer protein is present in human atherosclerotic lesions and is expressed by macrophages and foam cells. *J Lipid Res*. 2003;44:1453–61.
158. Bones J, Mittermayr S, O'Donoghue N, Guttman A, Rudd PM. Ultra performance liquid chromatographic profiling of serum N- glycans for fast and efficient identification of cancer associated altera- tions in glycosylation. *Anal Chem*. 2010;82:10208–15.
159. Ceroni, A, Maass K, Geyer H, Geyer R, Dell A, Haslam SM. GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J Proteome Res*. 2008;7:1650–59.

160. Tetala KK, van Beek TA. Bioaffinity chromatography on monolithic supports. *J Sep Sci*. 2010;33:422–38.
161. Gupalova TV, Lojkina OV, Pa` la` gnuk VG, Totolian AA, Tennikova TB. Quantitative investigation of the affinity properties of different recombinant forms of protein G by means of high-performance monolithic chromatography. *J Chromatogr*. 2002;949:185–93.
162. Bućan I, Škunca Herman J, Jerončić Tomić I, Gornik O, Vatavek Z, Bućan K, i ostali. N-Glycosylation Patterns across the Age-Related Macular Degeneration Spectrum. *Mol*. 2022;27:1774.
163. Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM. Detailed structural analysis of n-glycans released from glycoproteins in SDS-PAGE gel bands using HPLC combined with exoglycosidase array digestions. *Methods Mol Biol* 2006; 347:125–143.
164. Tarentino AL, Gomez CM, Plummer TH Jr. Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide: N-glycosidase F. *Biochem*. 1985; 24:4665–4671.
165. Bigge JC, Patel TP, Bruce JA, Goulding PN, Charles SM, Parekh RB. Nonselective and Efficient Fluorescent Labeling of Glycans Using 2-Amino Benzamide and Anthranilic Acid. *Anal Biochem*. 1995; 230(2):229–238.
166. Ahn J, Bones J, Yu YQ, Rudd PM, Gilar M. Separation of 2-aminobenzamide labeled glycans using hydrophilic interaction chromatography columns packed with 1.7 microm sorbent. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2010;878:403–08.
167. Royle L Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM. Detailed structural analysis of N-glycans released from glycoproteins in SDS-PAGE gel bands using HPLC combined with exoglycosidase array digestions. *Methods Mol Biol*. 2006;347:125–43.
168. Gligorijević N, Minić S, Križáková M, Katrlík J, Nedić, O. Structural changes of fibrinogen as a consequence of cirrhosis. *Thromb Res*. 2018;166:43–49.
169. Vujasinović M, Maier P, Maetzel H, Valente R, Pozzi-Mucelli R, Moro CF, i ostali. Immunoglobulin G subtypes-1 and 2 differentiate immunoglobulin G4-associated sclerosing cholangitis from primary sclerosing cholangitis. *United Eur Gastroenterol J*. 2020;8:584–93.
170. Pavić T, Dilber D, Kifer D, Selak N, Keser T, Ljubičić Đ, i ostali. N-glycosylation patterns of plasma proteins and immunoglobulin G in chronic obstructive pulmonary disease. *J Transl Med*. 2018;16:323.
171. Yamaguchi Y, Barb AW. A synopsis of recent developments defining how N-glycosylation impacts immunoglobulin G structure and function. *Glycobiol*. 2020;30:214–25.



172. Schaffert A, Hanić M, Novokmet M, Zaytseva O, Krištić J, Lux A, i ostali. Minimal B cell extrinsic IgG glycan modifications of pro- and anti-inflammatory IgG preparations in vivo. *Front Immunol.* 2019;10:3024.
173. Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM, Fischer PB, Dwek RA, Sim RB. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat Med.* 1995;1:237–43.
174. Lin CW, Tsai MH, Li ST, Tsai TI, Chu KC, Liu YC, i ostali. A common glycan structure on immunoglobulin G for enhancement of effector functions. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2015;112:10611–16.
175. Pagan JD, Kitaoka M, Anthony RM. Engineered sialylation of pathogenic antibodies in vivo attenuates autoimmune disease. *Cell.* 2018;172:564–77.
176. Joachim N, Colijn JM, Kifley A, Lee KE, Buitendijk GHS, Klein BEK, i ostali. Five-year progression of unilateral age-related macular degeneration to bilateral involvement: The Three Continent AMD Consortium report. *Br J Ophthalmol.* 2017;101:1185–92.
177. Krogh Nielsen M, Subhi Y, Molbech CR, Falk MK, Nissen MH, Sorensen TL. Systemic levels of interleukin-6 correlate with progression rate of geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019;60:202–08.
178. Hitsumoto Y, Thompson SJ, Zhang YW, Rook GA, Elson CJ. And Relationship between interleukin 6, agalactosyl IgG and pristane-induced arthritis, *Autoimmun.* 1992;11:247–54.
179. Scholl HP, Charbel Issa P, Walier M, Janzer S, Pollok-Kopp B, Borncke F, i ostali. Systemic complement activation in age-related macular degeneration. *PLoS ONE.* 2008;3:2593.
180. Lauc G, Vojta A, Zoldoš V. Epigenetic regulation of glycosylation is the quantum mechanics of biology. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1840:65–70.
181. Cvetko A, Kifer D, Gornik O, Klarić L, Visser E, Lauc G, i ostali. Glycosylation alterations in multiple sclerosis show increased proinflammatory potential. *Biomedicin.* 2020;8:410.
182. Miyahara K, Nouse K, Saito S, Hiraoka S, Harada K, Takahashi S, i ostali. Serum glycan markers for evaluation of disease activity and prediction of clinical course in patients with ulcerative colitis. *PLoS ONE.* 2013;8:74861.
183. Messina A, Palmigiano A, Tosto C, Romeo DA, Sturiale L, Garozzo D, i ostali. Tear N-glycomics in vernal and atopic keratoconjunctivitis. *Allergy.* 2021;76:2500–09.

184. Nguyen-Khuong T, Everest-Dass AV, Kautto L, Zhao Z, Willcox MD, Packer NheeH. Glycomic characterisation of basal tears and changes with diabetes and diabetic retinopathy. *Glycobiol.* 2015;25:269–83.

## Dodatak

**Tablica D1.** Prikaz svih rezultata glikanskih mjerenja u plazmi po skupinama ispitanika

Glikanska frakcija	Bilateralni (B) SMD	Unilateralni (U) SMD	EODM (e)	Kontrole (c)	P(F)	*Značajnost parova
Plazma glikani						
GP1	0,17 ± 0,07 (0,10 – 0,37)	0,18 ± 0,06 (0,08 – 0,27)	0,12 ± 0,06 (0,05 – 0,25)	0,17 ± 0,12 (0,03 – 2,11)	0,438 (0,91)	
GP2	4,13 ± 1,23 (1,90 – 7,14)	4,35 ± 1,25 (3,01 – 6,37)	2,75 ± 0,81 (1,59 – 4,66)	3,74 ± 1,39 (1,06 – 12,65)	0,009 (3,84)	ce 0,033; eU 0,036; eB 0,013
GP3	2,14 ± 0,37 (1,27 – 2,72)	2,34 ± 0,33 (1,87 – 2,97)	2,00 ± 0,30 (1,58 – 2,48)	2,09 ± 0,46 (1,07 – 5,97)	0,318 (1,18)	
GP4	5,17 ± 1,26 (2,87 – 7,22)	5,89 ± 0,91 (4,62 – 7,82)	5,43 ± 1,03 (3,64 – 7,29)	5,4 ± 1,25 (1,99 – 11,07)	0,522 (0,75)	
GP5	2,34 ± 0,35 (1,60 – 2,97)	2,29 ± 0,30 (1,93 – 2,83)	2,53 ± 0,44 (2,04 – 3,78)	2,42 ± 0,43 (1,35 – 4,09)	0,459 (0,86)	
GP6	3,44 ± 0,74 (2,13 – 4,91)	3,78 ± 0,51 (3,27 – 4,85)	4,28 ± 1,00 (2,82 – 6,41)	3,77 ± 0,91 (1,49 – 7,39)	0,043 (2,72)	eB 0,026
GP7	11,97 ± 4,08 (8,32 – 26,34)	10,01 ± 1,1 (8,17 – 11,42)	10,00 ± 1,26 (8,14 – 13,15)	10,75 ± 2,42 (6,53 – 29,18)	0,038 (2,82)	
GP8	8,8 ± 1,19 (6,06 – 11,01)	9,42 ± 0,87 (7,86 – 10,39)	10,43 ± 2,10 (7,45 – 16,51)	9,41 ± 1,55 (5,74 – 14,93)	0,016 (3,45)	eB 0,008
GP9	37,78 ± 2,68 (31,95 – 42,03)	38,41 ± 1,96 (34,71 – 40,52)	38,02 ± 2,52 (32,94 – 40,91)	37,93 ± 3,09 (22,64 – 50,5)	0,962 (0,10)	
GP10	7,26 ± 1,5 (4,18 – 10,25)	6,74 ± 1,25 (5,26 – 8,66)	7,53 ± 1,24 (5,22 – 10,12)	7,32 ± 1,59 (3,39 – 15,54)	0,676 (0,51)	
GP11	2,10 ± 0,66 (1,15 – 4,21)	2,06 ± 0,69 (1,24 – 3,19)	1,81 ± 0,37 (1,39 – 2,71)	2,05 ± 0,69 (0,81 – 5,7)	0,584 (0,65)	
GP12	1,61 ± 0,41 (0,95 – 2,52)	1,71 ± 0,49 (1,36 – 2,96)	1,87 ± 0,72 (1,16 – 3,20)	1,8 ± 0,53 (0,65 – 3,72)	0,306 (1,21)	
GP13	4,62 ± 1,45 (1,82 – 7,47)	5,10 ± 0,86 (3,74 – 6,29)	5,40 ± 1,37 (3,28 – 7,97)	5,28 ± 1,47 (0,59 – 11,18)	0,154 (1,75)	
GP14	7,19 ± 1,72 (4,27 – 10,68)	6,40 ± 0,89 (5,25 – 7,99)	6,34 ± 1,28 (4,43 – 9,68)	6,46 ± 1,44 (2,51 – 12,54)	0,094 (2,14)	
GP15	0,44 ± 0,18 (0,10 – 0,84)	0,53 ± 0,13 (0,39 – 0,79)	0,55 ± 0,21 (0,21 – 0,89)	0,53 ± 0,19 (0,06 – 1,51)	0,141 (1,82)	
GP16	0,83 ± 0,40 (0,31 – 2,03)	0,80 ± 0,34 (0,50 – 1,59)	0,95 ± 0,34 (0,31 – 1,64)	0,87 ± 0,31 (0,11 – 2,53)	0,656 (0,54)	
DG1	0,17 ± 0,07 (0,10 – 0,37)	0,18 ± 0,06 (0,08 – 0,27)	0,12 ± 0,06 (0,05 – 0,25)	0,17 ± 0,12 (0,03 – 2,11)	0,438 (0,91)	
DG2	4,13 ± 1,23 (1,90 – 7,14)	4,35 ± 1,25 (3,01 – 6,37)	2,75 ± 0,81 (1,59 – 4,66)	3,74 ± 1,39 (1,06 – 12,65)	0,009 (3,84)	ce 0,033; eU 0,036; eB 0,013
DG3	2,14 ± 0,37 (1,27 – 2,72)	2,34 ± 0,33 (1,87 – 2,97)	2,00 ± 0,30 (1,58 – 2,48)	2,09 ± 0,46 (1,07 – 5,97)	0,318 (1,18)	
DG4	5,17 ± 1,26 (2,87 – 7,22)	5,89 ± 0,91 (4,62 – 7,82)	5,43 ± 1,03 (3,64 – 7,29)	5,4 ± 1,25 (1,99 – 11,07)	0,522 (0,75)	
DG5	2,34 ± 0,35 (1,60 – 2,97)	2,29 ± 0,30 (1,93 – 2,83)	2,53 ± 0,44 (2,04 – 3,78)	2,42 ± 0,43 (1,35 – 4,09)	0,459 (0,86)	
DG6	3,44 ± 0,74 (2,13 – 4,91)	3,78 ± 0,51 (3,27 – 4,85)	4,28 ± 1,00 (2,82 – 6,41)	3,77 ± 0,91 (1,49 – 7,39)	0,043 (2,72)	eB 0,026
DG7	11,97 ± 4,08 (8,32 – 26,34)	10,01 ± 1,1 (8,17 – 11,42)	10,00 ± 1,26 (8,14 – 13,15)	10,75 ± 2,42 (6,53 – 29,18)	0,038 (2,82)	
DG8	8,80 ± 1,19 (6,06 – 11,01)	9,42 ± 0,87 (7,86 – 10,39)	10,43 ± 2,1 (7,45 – 16,51)	9,41 ± 1,55 (5,74 – 14,93)	0,016 (3,45)	eB 0,008

**Tablica D1. (nastavak)** Prikaz svih rezultata glikanskih mjerenja u plazmi po skupinama ispitanika

Glikanska frakcija	Bilateralni (B) SMD	Unilateralni (U) SMD	EODM (e)	Kontrole (c)	P(F)	*Značajnost parova
Plazma glikani						
DG11	2,25 ± 0,60 (1,05 – 3,68)	2,41 ± 0,42 (1,9 – 3,07)	2,20 ± 0,47 (1,52 – 3,04)	2,36 ± 0,57 (0,9 – 5,03)	0,496 (0,80)	
DG12	0,93 ± 0,46 (0,42 – 2,29)	0,78 ± 0,2 (0,36 – 1,06)	0,73 ± 0,25 (0,39 – 1,14)	0,75 ± 0,30 (0,1 – 2,46)	0,029 (3,03)	cB 0,017
DG13	0,95 ± 0,57 (0,32 – 2,30)	0,7 ± 0,19 (0,34 – 0,97)	0,60 ± 0,24 (0,28 – 1,15)	0,68 ± 0,28 (0,18 – 1,95)	< 0,001 (7,75)	cB < 0,001; eB 0,001
Monosialo	24,69 ± 4,13 (20,04 – 37,71)	22,9 ± 1,62 (20,5 – 25,53)	23,72 ± 3,2 (19,47 – 31,43)	23,83 ± 3,44 (11,88 – 42,36)	0,512 (0,77)	
Disialo	57,38 ± 2,65 (51,33 – 61,62)	59,06 ± 0,92 (58,02 – 60,88)	58,18 ± 2,03 (53,96 – 61,92)	58,06 ± 2,32 (47,4 – 67,67)	0,269 (1,31)	
Trisialo	14,88 ± 2,48 (8,26 – 19,00)	15,21 ± 1,6 (11,88 – 16,68)	14,8 ± 1,7 (10,98 – 17,51)	14,84 ± 2,08 (6,06 – 22,27)	0,962 (0,10)	
Tetrasialo	3,05 ± 1,21 (0,91 – 6,56)	2,83 ± 0,82 (1,5 – 4,14)	3,30 ± 1,46 (1,01 – 6,17)	3,27 ± 1,52 (0,64 – 12,99)	0,725 (0,44)	
BAMS	31,22 ± 4,17 (25,57 – 43,14)	29,77 ± 1,29 (27,61 – 32,22)	30,07 ± 2,47 (26,82 – 34,76)	30,27 ± 3,15 (21,36 – 46,67)	0,467 (0,85)	
BADS	71,43 ± 4,93 (57,68 – 76,99)	72,42 ± 1,5 (70,55 – 75,33)	69,81 ± 3,54 (63,11 – 75,71)	71,2 ± 4,00 (54,04 – 84,43)	0,438 (0,91)	
BA	79,87 ± 3,41 (74,26 – 86,9)	79,81 ± 1,87 (77 – 82,76)	79,95 ± 2,5 (76,34 – 84,86)	79,88 ± 2,61 (70,74 – 89,68)	0,999 (0,01)	
TRIA	16,05 ± 2,4 (10,08 – 19,7)	16,36 ± 1,42 (13,79 – 18,31)	16,47 ± 2,04 (12,28 – 20,26)	16,35 ± 2,05 (8,79 – 24,34)	0,899 (0,20)	
TA	4,08 ± 1,38 (2,31 – 8,20)	3,83 ± 0,65 (2,94 – 4,79)	3,58 ± 0,77 (2,38 – 5,02)	3,77 ± 0,82 (1,54 – 7,38)	0,225 (1,46)	
C-FUC	21,64 ± 4,53 (12,13 – 31,5)	21,47 ± 3,32 (16,4 – 26,76)	24,61 ± 5,45 (18,06 – 39,68)	22,71 ± 4,38 (10,43 – 36,42)	0,167 (1,69)	
A-FUC	3,50 ± 1,24 (1,79 – 6,51)	3,05 ± 0,68 (2,18 – 4,04)	3,11 ± 0,62 (2,14 – 4,59)	3,11 ± 0,98 (1,43 – 11,05)	0,261 (1,34)	
A2	0,19 ± 0,07 (0,12 – 0,40)	0,20 ± 0,07 (0,1 – 0,3)	0,13 ± 0,06 (0,07 – 0,25)	0,18 ± 0,11 (0,04 – 2,01)	0,345 (1,11)	
G0	4,48 ± 1,20 (2,23 – 7,38)	4,67 ± 1,18 (3,41 – 6,76)	3,01 ± 0,81 (1,77 – 4,83)	4,07 ± 1,36 (1,39 – 12,84)	0,004 (4,42)	ce 0,017; eU 0,023; UB 0,005
G1	9,16 ± 1,34 (6,45 – 11,67)	9,94 ± 1,19 (8,18 – 12,36)	9,04 ± 1,23 (7,19 – 11,39)	9,29 ± 1,48 (5,00 – 19,19)	0,493 (0,80)	
G2	66,23 ± 3,73 (58,56 – 78,22)	65,2 ± 2,03 (62,27 – 69,33)	67,89 ± 2,25 (64,06 – 71,33)	66,53 ± 2,74 (56,43 – 79,18)	0,110 (2,01)	
G3	13,42 ± 2,54 (8,49 – 17,91)	13,21 ± 1,21 (10,84 – 14,67)	13,62 ± 2,32 (9,64 – 17,8)	13,54 ± 2,18 (6,24 – 22,54)	0,960 (0,10)	
G4	1,28 ± 0,54 (0,41 – 2,69)	1,33 ± 0,45 (0,91 – 2,38)	1,49 ± 0,52 (0,52 – 2,53)	1,41 ± 0,48 (0,32 – 3,29)	0,461 (0,86)	
IgG glikani						
IgG_GP1	0,22 ± 0,21 (0,05 – 1,06)	0,32 ± 0,25 (0,08 – 0,75)	0,19 ± 0,14 (0,05 – 0,55)	0,20 ± 0,17 (0,02 – 1,55)	0,170 (1,68)	
IgG_GP2	0,96 ± 0,32 (0,40 – 1,86)	1,16 ± 0,71 (0,37 – 2,65)	0,60 ± 0,25 (0,21 – 1,21)	0,88 ± 0,58 (0,14 – 9,39)	0,060 (2,47)	
IgG_GP4	25,22 ± 5,54 (13,66 – 39,43)	22,52 ± 4,02 (18,57 – 29,68)	16,19 ± 4,88 (6,93 – 23,3)	20,99 ± 6,14 (6,48 – 47,89)	< 0,001 (9,69)	ce 0,004; cB < 0,001; eB < 0,001
IgG_GP3	0,12 ± 0,02 (0,08 – 0,15)	0,11 ± 0,05 (0,04 – 0,18)	0,08 ± 0,01 (0,07-0,09)	0,10 ± 0,03 (0,03-0,18)	0,049 (3,05)	

**Tablica D1. (nastavak)** Prikaz svih rezultata glikanskih mjerenja u plazmi po skupinama ispitanika

Glikanska frakcija	Bilateralni (B) SMD	Unilateralni (U) SMD	EODM (e)	Kontrole (c)	P(F)	*Značajnost parova
IgG glikani						
IgG_GP5	0,24 ± 0,10 (0,10 – 0,56)	0,33 ± 0,16 (0,15 – 0,69)	0,29 ± 0,19 (0,08-0,92)	0,28 ± 0,14 (0,07-1,64)	0,297 (1,23)	
IgG_GP6	6,58 ± 1,60 (4,6-12,08)	6,37 ± 1,35 (4,78-8,93)	4,43 ± 1,10 (2,42-6,17)	5,61 ± 1,63 (2,1-12,86)	< 0,001(8,17)	ce 0,010; cB 0,003; eU 0,019; eB < 0,001
IgG_GP7	0,70 ± 0,36 (0,25-1,61)	0,9 ± 0,47 (0,32-1,78)	0,59 ± 0,28 (0,27-1,29)	0,72 ± 0,42 (0,11-4,06)	0,323 (1,16)	
IgG_GP8	16,69 ± 1,99 (13,57-20,33)	15,84 ± 2,17 (12,26-18,37)	17,27 ± 2,87 (11,4-22,98)	16,65 ± 2,21 (0,52-22,65)	0,446 (0,89)	
IgG_GP15	1,41 ± 0,28 (0,76 – 2,31)	1,5 ± 0,23 (1,14 – 1,8)	1,76 ± 0,38 (1,14 – 2,49)	1,55 ± 0,36 (0,75 – 3,54)	0,009 (3,85)	eB 0,005
IgG GP16	3,21 ± 0,52 (2,35 – 4,88)	3,29 ± 0,25 (2,88 – 3,62)	3,26 ± 0,36 (2,55 – 3,89)	3,16 ± 0,50 (1,71 – 4,82)	0,644 (0,56)	
IgG_GP17	2,32 ± 1,47 (0,67 – 7,21)	2,98 ± 1,68 (1,44 – 5,88)	2,55 ± 1,54 (0,59 – 5,80)	2,79 ± 1,83 (0,46 – 13,61)	0,444 (0,89)	
IgG_GP18	7,69 ± 1,63 (4,39 – 12,05)	7,2 ± 1,51 (5,05 – 9,86)	11,27 ± 2,65 (6,47 – 17,31)	9,07 ± 2,53 (3,29 – 19,38)	< 0,001 (10,06)	ce 0,001; cB 0,008; eU < 0,001; eB < 0,001
IgG_GP19	2,20 ± 0,60 (1,44 – 3,81)	2,34 ± 0,37 (2,06 – 3,22)	2,32 ± 0,61 (1,50 – 3,92)	2,35 ± 0,60 (1,12 – 9,03)	0,535 (0,73)	
IgG_GP20	0,53 ± 0,28 (0,14 – 1,13)	0,89 ± 0,66 (0,29 – 2,07)	0,61 ± 0,51 (0,14 – 2,26)	0,62 ± 0,45 (0,08 – 3,46)	0,199 (1,55)	
IgG GP21	2,72 ± 1,86 (0,45 – 7,40)	4,93 ± 3,54 (1,95 – 12)	3,67 ± 3,57 (0,48 – 15,60)	3,52 ± 2,78 (0,39 – 22,46)	0,153 (1,76)	

\*usporedba ispitivanih skupina i kontrola (engl. *pair-wise comparisons across groups*); (cB) vrijednost označava razliku između bilateralnih slučajeva SMD-a i kontrolne skupine; (cU) vrijednost je razlika unilateralnih slučajeva SMD-a nasuprot kontrolne skupine; (ce) vrijednost je rezultat post-hoc testa usporedbe skupine ispitanika s ranim oblikom makulopatije s družama i kontrola; (eU) vrijednost razliku između skupine ispitanika s ranim oblikom makulopatije s družama i unilateralnih slučajeva SMD-a; (eB) vrijednost razliku između skupine ispitanika s ranim oblikom makulopatije s družama i bilateralnih slučajeva SMD-a; (UB) vrijednost označava razliku između unilateralnih i bilateralnih slučajeva senilne makularne degeneracije; prikazani su statistički značajni rezultati (*značajnost parova*)

## Kratka biografija

### Osobni podaci

Datum i mjesto rođenja: 30. prosinca 1993., Split

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa: Šoltanska 10, 21 000 Split

E-mail: ivona1993bucan@gmail.com

### Obrazovanje

2012. – 2018. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, studij medicine

2008. – 2012. Opća gimnazija „Marko Marulić”, Split

2006. – 2008. Osnovna škola „Kraljica Jelena”, Solin

2000. – 2006. Osnovna škola „Vjekoslav Parać”, Solin

2000. – 2008. Škola za strane jezike „Smarag”

2005. Informatički tečaj „Alles commerce”

### Usavršavanje

2020. Specijalizacija iz oftalmologije i optometrije, Klinika za očne bolesti, KBC Split

05/2022. 21. Kongres Hrvatskog oftalmološkog i optometrijskog društva (rad u sekciji mladih: Retinal Ciliopathy in the Patient with Transplanted Kidney: Case Report)

04/2022. Tečaj prve kategorije: Dijagnostička primjena ultrazvuka u oftalmologiji, Klinika za očne bolesti, KBC Split

09/2021. 20. Kongres Hrvatskog oftalmološkog i optometrijskog društva (rad u sekciji mladih: Glycosylated Proteins as Biomarkes of Age-Related Macular Degeneration)

2018. – 2021. Doktorski studij: Translacijska istraživanja u biomedicini i zdravstvu

2019. – 2020. Rad u primarnoj zdravstvenoj zaštiti

2018. – 2019. Pripravnički staž za doktora medicine, KBC Split

Ostala znanja i vještine

Aktivno se služim engleskim jezikom (razina B2). Posjedujem vozačku dozvolu B kategorije.

Posjedujem uvjerenje o osposobljenosti za rad na osobnim računalima u programima Microsoft Windows, Microsoft Word i Microsoft Excel.

Publikacije:

1. Bućan I, Bjeloš M, Marković I, Bućan D. Retinal ciliopathy in the patient with transplanted kidney: case report. *Int J Mol Sci.* 2022;8;23(14):7582.
2. Bućan I, Škunca Herman J, Jerončić Tomić I, Gornik O, Vatavek Z, Bućan K, Lauc G, Polašek O. N-glycosylation patterns across the age-related macular degeneration spectrum. *Mol.* 2022;27(6):1774.
3. Radman S, Raić S, Bućan I, Pribisalić A, Dunatov J, Mudnić I, Boban M, Pellay XF, Kolčić I, Polašek O. Development and validation of the proteomic method for quantification of carbonylated protein in human plasma. *Croat Med J.* 2020; 30;61(2):119–125.
4. Bućan K, Pleština Borjan I, Bucan I, Simunovic Paradik M, Borjan I. Genetic background of a recurrent unusual combined form of retinal vein occlusion: a case report. *Case Rep Ophthalmol.* 2018;9:248–53.
5. Bućan K, Matas A, Marin Lovrić J, Batistić D, Pleština Borjan I, Puljak L, Bućan I. Epidemiology of ocular trauma in children requiring hospital admission: a 16-year retrospective cohort study. *J Glob Health.* 2017;7(1):010415.
6. Bućan K, Bojić L, Fabijanić D, Galetović D, Čapkun V, Karlica Utrobičić D, Bućan I. Left ventricular systolic function in selected type 1 diabetic patients with or without diabetic retinopathy and microalbuminuria. *Acta Clin Croat.* 2014;53:383.