

Histokemijska analiza kiselih i neutralnih mucina u žljezdanom epitelu vrata maternice čovjeka

Smodek, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:346525>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana Smodek

**Histokemijska analiza kiselih i neutralnih
mucina u žljezdanom epitelu ljudskog vrata
maternice**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Ana Smodek

**Histochemical analysis of acidic and neutral
mucins in the glandular epithelium of the
human cervix**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za neurogenetiku i razvojnu genetiku Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Marije Ćurlin te suvoditeljstvom doc. dr. sc. Romane Gračan. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

ZAHVALA

Beskrajno sam zahvalna mojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Mariji Ćurlin, na cijelom ovom iskustvu. Nisam mogla ni zamisliti koliko strpljenja, razumijevanja i predanosti može biti u jednom mentoru. Bolje nisam mogla odabratи.

Hvala suvoditeljici ovog rada, doc. dr. sc. Romani Gračan na pomoći, savjetima i suradnji.

Zahvaljujem Roku Isteru na nesebičnoj pomoći sa statističkom obradom podataka.

Hvala svim mojim prijateljima, a posebno mojoj fantastičnoj petorki, na neizmjernoj potpori i smijehu koji su me vodili kroz teške trenutke studiranja i života. Hvala Marini, koja se veseli mojim uspjesima kao da su njezini.

Hvala Klari, koja mi je uljepšala studentske dane i postala prijateljica za cijeli život i Sari, koja je bila moj ljudski dnevnik.

Kao i do sada u životu, moje cure Daria, Dora i Nika pratile su me na ovom ludom putovanju, na čemu sam im zauvijek zahvalna.

Velik dio uspjeha dugujem mom Matku, koji me iz prvog reda bodri i navija i s kojim pomicem svoje granice.

Od srca hvala mojoj predivnoj obitelji – sestri Ivi, baki Danici i djedu Viktoru, na silnoj potpori, bodrenju, pomoći i riječima utjehe.

Najveću zahvalu dugujem mojim roditeljima. Ne znam kako mi se posrećilo da me baš vi vodite kroz život i budete vječni vjetar u moja leđa. Svi moji dosadašnji i budući uspjesi su posvećeni vama.

Svoj diplomski rad posvećujem Goranu, koji bi bio najponosniji.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Histokemijska analiza kiselih i neutralnih mucina u žljezdanom epitelu ljudskog vrata maternice

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Mucini su glikoproteini velike molekularne mase. Lubrificiraju i štite sluznicu te stvaraju propusni sloj za izmjenu plinova i hranjivih tvari s epitelom. Histokemijski mucine možemo svrstati u dvije velike skupine, kisele i neutralne mucine. Sluz u vratu maternice ciklički se mijenja pod utjecajem estrogena i progesterona i tako utječe na plodnost žene. S obzirom da su mucini glavna komponenta zaslžna za biofizikalna svojstva cervikalne sluzi, moguće je da mucini s različitim svojstvima kiselosti utječu na svojstva sluzi. Cilj ovog rada bio je usporediti udjele kiselih i neutralnih mucina u žljezdanim stanicama gornjeg i donjeg dijela cervikalnog kanala na uzorcima ljudskog tkiva endocerviksa te usporediti udjele kiselih i neutralnih mucina s razinama spolnih hormona u serumu. Uzorci tkiva endocerviksa i krvi uzeti su od 15 ispitanica koje su bile podvrgnute operativnom zahvatu (histerektomiji). Kiseli mucini u tkivu endocerviksa prikazani su bojanjem alcijanskim modrilom, a neutralni mucini reakcijom sa Schiffovim perjodnim reagensom. Rezultati istraživanja su pokazali da ne postoji korelacija položaja žlijezdi i udjela neutralnih i kiselih mucina niti faze ciklusa i udjela neutralnih i kiselih mucina. Također, ne postoji korelacija razine spolnih hormona i udjela neutralnih i kiselih mucina. Navedene korelacije potrebno je dodatno istražiti na većem broju ispitanica mlađe reproduktivne dobi.

(29 stranica, 12 slika, 3 tablice, 43 literaturnih navoda, 1 prilog, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: cervikalna sluz, cikličke promjene u jajniku, alcijansko modrilo, Schiffov perjodni reagens, položaj žlijezda u ljudskom vratu maternice.

Voditelj: izv. prof. dr.sc. Marija Ćurlin
Suvoditelj: doc. dr. sc. Romana Gračan

Ocjenzitelji:

Doc. dr. sc. Romana Gračan
Doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić
Prof. dr. sc. Željka Soldin

Rad prihvaćen: 7. srpnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Histochemical analysis of acidic and neutral mucins in the glandular epithelium of the human cervix

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Mucins are glycoproteins of high molecular weight. They lubricate and protect the mucosa and create a permeable layer for the exchange of gases and nutrients with the epithelium. Histochemically, mucins can be classified into two major groups, acidic and neutral mucins. The mucus in the cervix changes cyclically under the influence of estrogen and progesterone and thus affects a woman's fertility. Since mucins are the main component responsible for the biophysical properties of cervical mucus, it is possible that mucins with different acidity properties affect the properties of mucus. The aim of this study was to compare the proportions of acidic and neutral mucins in glandular cells of the upper and lower cervical canal on endocervical human tissue samples and to compare the proportions of acidic and neutral mucins with serum sex hormone levels. Endocervical tissue and blood samples were taken from 15 subjects who underwent surgery (hysterectomy). Acid mucins in endocervical tissue were shown by staining with Alcian blue, and neutral mucins by reaction with Schiff periodic reagent. The results of the study showed that there is no correlation between the position of the glands and the proportion of neutral and acidic mucins or the phase of the cycle and the proportion of neutral and acidic mucins. Also, there is no correlation between sex hormone levels and the proportion of neutral and acidic mucins. It is necessary to further investigate these correlations, in a larger number of subjects and with the participation of younger reproductive age.

(29 pages, 12 figures, 3 tables, 43 references, 1 attachment, original in Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: cervical mucus, cyclic changes in the ovary, Alcian blue, Schiff's periodic reagent, position of glands in the human cervix.

Supervisor: Assoc. Prof. Marija Ćurlin
Co-supervisor: Asst. Prof. Romana Gračan

Reviewers:

Asst. Prof. Romana Gračan

Asst. Prof. Mirela Sertić Perić

Prof. Željka Soldin

Thesis accepted: July 7th 2021

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 Građa ženskog spolnog sustava | 1 |
| 1.1.1 Vrat maternice | 1 |
| 1.2 Cervikalna sluz | 2 |
| 1.3 Mucini | 3 |
| 1.3.1 Građa mucina..... | 3 |
| 1.3.2 Vrste mucina..... | 4 |
| 1.3.3 Biosinteza mucina | 5 |
| 1.4 Izlučivanje sluzi..... | 5 |
| 1.5 Utjecaj pH na cervikalnu sluz..... | 6 |
| 1.6 Cikličke promjene u jajniku | 6 |
| 1.6.1 Utjecaj cikličkih promjena hormona na cervikalnu sluz | 8 |
| 1.7 Postupci prikazivanja kiselih i neutralnih mucina u tkivima | 9 |
| 1.7.1 Histokemijske metode prikazivanja mucina u tkivima..... | 9 |
| 2 CILJ RADA | 11 |
| 2.1 Opći cilj | 11 |
| 2.2 Specifični ciljevi..... | 11 |
| 3 MATERIJALI I METODE | 12 |
| 3.1 Uzorci tkiva vrata maternice..... | 12 |
| 3.2 Uzorci krvi..... | 12 |
| 3.3 Priprema histoloških rezova tkiva | 13 |
| 3.4 Bojanje AB – PAS..... | 13 |
| 3.5 Postupak kvantifikacije mucina..... | 14 |
| 3.6 Statistika | 15 |
| 4 REZULTATI | 16 |
| 4.1 Histokemijski prikaz neutralnih i kiselih mucina u žljezdanom tkivu endocerviksa..... | 16 |
| 4.2 Udio neutralnih i kiselih mucina izražen kao omjer obojanih površina C/P | 17 |
| 4.3 Statistička usporedba omjera C/P u gornjem i donjem dijelu cerviksa | 22 |
| 4.4 Korelacija omjera C/P i razine spolnih hormona u serumu | 22 |
| 5 RASPRAVA | 23 |
| 6 ZAKLJUČCI | 25 |

| | |
|---------------------------|----|
| 7 LITERATURA | 26 |
| 8 ŽIVOTOPIS | 30 |
| 9 PRILOG | 31 |

KRATICE

| | |
|--------------|--|
| AB | alcijansko modrilo, engl. <i>Alcian Blue</i> |
| C/P | omjer površina obojanih crvenom i plavom bojom |
| E2 | estradiol |
| FSH | folikulostimulirajući hormon |
| LH | luteinizirajući hormon |
| mRNA | glasnička ribonukleinska kiselina, engl. <i>Messenger ribonucleic acid</i> |
| MUC5B | mucin koji oblikuje gel, engl. <i>Gel-forming mucin</i> |
| MUC4 | transmembranski mucin, engl. <i>Membrane-spanning mucin</i> |
| PAS | Schiffov perjodni reagens, engl. <i>Periodic Acid Schiff</i> |

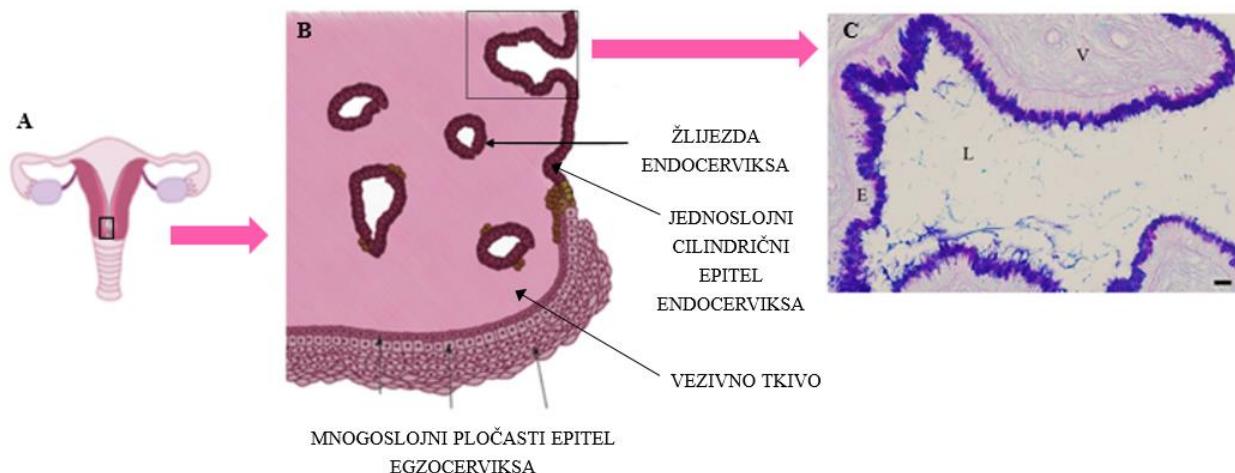
1 UVOD

1.1 Građa ženskog spolnog sustava

Ženski spolni sustav građen je od vanjskih i unutarnjih spolnih organa. Vanjske čine predvorje rodnice sa žljezdoma, Venerin brežuljak, velike i male usne te erekтивni organi, a unutarnje spolne organe čine rodnica, maternica (cerviks i korpus), jajovodi i jajnici (Šimunić i sur., 2001).

1.1.1 Vrat maternice

Vrat maternice (cerviks, grlić, lat. *cervix uteri*), je donji dio maternice koji je mišićno-vezivnim tkivom (istmusom) spojen na tijelo maternice (lat. *corpus uteri*). Cerviks je cilindrična struktura kroz koju prolazi kanal, dug oko 3 cm. Cervikalni kanal se sastoji od unutarnjeg djela, odnosno endocerviksa i vanjskog djela, egzocerviksa. Egzocervikalni dio kanala prekriven je mnogoslojnim pločastim epitelom koji se nastavlja na pločasti epitel rodnice, a endocervikalni dio kanala je prekriven jednoslojnim cilindričnim epitelom te se nastavlja na cilindrični epitel sluznice maternice (Slika 1). Na taj način cervikalni kanal povezuje maternicu i rodnicu. Ispod epitela, stijenka cerviksa građena je pretežito od elastičnih i kolagenih vlakana uz malo glatkih mišićnih stanica zbog čega nema kontraktilnu već više potpornu mehaničku funkciju (Leppert i Yu, 1991). Površina endocerviksa se sastoji od sustava usjeklina i tunela nazvanih "kriptama". Kripte su, kao i endocervikalni dio kanala, prekrivene jednoslojnim cilindričnim epitelom koji proizvodi sluz čitavom svojom površinom (Fluhmann, 1961). Iz tog razloga, endocervikalne kripte se često nazivaju i endocervikalnim žljezdoma.



Slika 1. A. Ženski reproduktivni sustav. B. Uvećani dio slike A – vrat maternice (cerviks). C. Histološki preparat žlezdanog tkiva vrata maternice obojan Schiffovim perjodnim reagensom (PAS) i alcijanskim modrilom (AB), s označenim dijelovima endocervikalne žlijezde i okolnog tkiva. E – jednoslojni cilindrični epitel, L – lumen, V – vezivo tkivo. Mjerna skala: 20 µm.

1.2 Cervikalna sluz

Cervikalna sluz je glikoproteinski gel koji uvelike utječe na normalnu funkciju i zaštitu ženskog spolnog sustava. Sadrži vodu (90-98%) i složenu smjesu anorganskih iona, aminokiselina, kolesterola, lipida, glukoze, askorbinske kiseline, polisaharida, mucina, plazma proteina, enzima i baktericidnih proteina (Gipson, 2001). Ispunjava endocervikalni kanal te kontrolira ulazak spermija, ali i mikroorganizama u unutarnje spolne organe žene (Tsibris, 1987). Glavna komponenta zaslužna za viskozna i elastična svojstva cervicalne sluzi su mucini (Bansil i Turner, 2006).

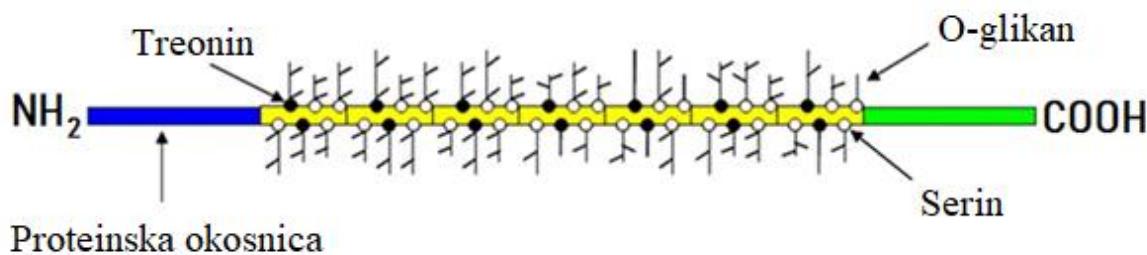
Istraživanja su pokazala da je cervicalna sluz čimbenik koji može utjecati na plodnost žena stoga je promatranje izlučene sluzi postala klinička metoda u istraživanju neplodnosti, ali i u praćenju plodnih dana s ciljem začeća (Katz, 1991). Cervikalna sluz može biti uzrok neplodnosti ukoliko ne stvara pogodan okoliš za spermije, primjerice zbog učestalih infekcija uslijed kojih je uočeno stvaranje drugačije sluzi koju Odeblad (1968) naziva tip Q. Osim toga, cervicalna sluz može biti uzrok neplodnosti ukoliko pH vrijednost nije prigodna za spermije, uslijed genetičkih poremećaja, primjerice cistična fibroza (Gervais i sur., 1996), hormonalnih poremećaja ili zbog nekih vanjskih utjecaja poput unosa droge, nikotina itd. (Turner, 1988).

1.3 Mucini

Mucini su izvanstanični glikoproteini velike molekularne mase. Za njihovu proizvodnju, skladištenje i sekreciju zaslužne su epitelne stanice sluznice respiratornog, gastrointestinalnog, auditornog i urogenitalnog sustava sisavaca (Kim i sur., 1991). Mucini lubrificiraju i štite sluznicu, olakšavaju prolazak sadržaja, održavaju hidratantni sloj iznad epitela, čine prepreku ulasku patogena i štetnih tvari te stvaraju propusni gelozni sloj za izmjenu plinova i hranjivih tvari s epitelom (Bansil i Turner, 2006).

1.3.1 Građa mucina

Strukturna osnova svih mucina je ista te se sastoji od jedne ili više O-glikoliziranih domena bogatih treoninom i/ili serinom i prolinom (Slika 2). Povezivanje oligosaharidnih lanaca s proteinskom osnovicom preko kisika, razlikuje mucine od ostalih glikoproteina. Manje glikozilirane regije sadrže manje serina i treonina ali su bogate cisteinom koji omogućuje stvaranje disulfidnih mostova između molekula mucina čime doprinose viskoznoj strukturi sluzi (Krause, 2000).



Slika 2. Shematski prikaz sekretornog mucina koji prikazuje okosnicu MUC proteina s pripadajućim O-glikanima vezanima na treonin ili serin unutar TR (*tandem repeat*) domena (preuzeto i prilagođeno od Rose, 2006).

1.3.2 Vrste mucina

Histokemijski mucine možemo svrstati u dvije velike skupine: neutralne i kisele mucine koji uključuju sulfomucine (sulfatirani mucini) i sijalomucine (karboksilirani mucini). S obzirom na biološku ulogu, mogu biti transmembranski, odnosno epitelni i gel – formirajući. Transmembranske mucine karakterizira COOH terminalna domena koja se veže za površinu stanične membrane dok gel-formirajući mucini dolaze u obliku gusto pakiranih polimernih struktura te su glavna sastavnica sluzi. Udio različitih vrsta mucina razlikuje se u različitim organima te ovisi i o fiziološkim i patološkim stanjima u kojem se organizam nalazi. Primjerice, pokazalo se da količina mucina poraste kod pacijenata oboljelih od raka debelog crijeva, dojki, jajnika, pluća, gušterače, ali i kod nekih upalnih procesa u raznim tkivima zbog čega se poznavanje mucina može dobro koristiti u dijagnostici (Ali i sur., 2012).

U literaturi je opisano 20 mucinskih gena (Ali i Mahmoud, 2007). Svaki gen pokazuje ekspresiju u nekoliko tkiva, a i zastupljenost određenih vrsta mucina varira u pojedinim tkivima. Gel formirajuće mucine u ljudskom organizmu kodiraju MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 te MUC19 (Kesimer i sur., 2010). U endocerviku je najzastupljeniji gel-formirajući mucin kojeg kodira MUC5B, a u cervikalnoj sluzi se nalaze i mucini koje kodiraju MUC2, MUC5AC i MUC6 (Ćurlin i Bursać, 2013).

1.3.2.1 Kiseli i neutralni mucini

Osnovna razlika između kiselih i neutralnih mucina je građa šećerne komponente. Kiseli mucini glikozilirani su šećerima koji sadrže karboksilne ili sulfatne skupine zbog čega su negativno nabijeni dok neutralni mucini sadrže šećere bez kiselih skupina (fukoza i galaktoza) te nemaju naboj. Proteinska osnova je uglavnom ista, ali se pokazalo da u građi neutralnih mucina sudjeluje više proline, leucina i valina dok kisele mucine u većoj mjeri čine treonin i serin (Bhattacharyya i sur., 1990). Andersch-Björkman i suradnici (2007) su biokemijskim analizama sluzi pokazali da se mucini razlikuju prije, za vrijeme i poslije ovulacije najviše po građi šećernih komponenti zbog čega postoji mogućnost da upravo kisi, odnosno neutralni mucini utječu i na strukturu cervikalne sluzi.

1.3.3 Biosinteza mucina

Biosinteza mucina prvi je korak proizvodnje i lučenja sluzi. Translacija MUC mRNA se događa na ribosomima, u citoplazmi, a proteinski se produkt, za vrijeme trajanja translacije, premješta u endoplazmatski retikulum. U endoplazmatskom retikulumu se događa početna N-glikozilacija djelovanjem N-acetylgalaktozaminil peptidiltransferaze, GalNAc, čime se mijenja konformacija globularnih apomucina u linearne molekule što olakšava O-glikozilaciju. O-glikozilacija se događa u Golgijevom tjelešcu (u cis-Golgiju) gdje se šećerni lanci dodaju hidroksilnim skupinama treonina i serina, sulfatiraju se šećerne komponente te se stvaraju oligomeri/multimeri povezani disulfidnim vezama (Perez-Vilar, 1999, 2007). Zreli mucini namijenjeni izlučivanju, nakupljaju se sekrecijskim mjeđurićima, u citoplazmi žljezdanih stanica, pri niskom pH i visokoj razini kalcijevih iona, Ca^{2+} (Muchekhu, 2010). Takvi uvjeti štite negativno nabijena mjesta mucina od elektrostatskog odbijanja što omogućuje kondenziranje mucina u zrncima (Verdugo, 1990). Izlučivanju, razmotavanju i širenju sluzi prethodi bubrenje sekrecijskih mjeđurića.

1.4 Izlučivanje sluzi

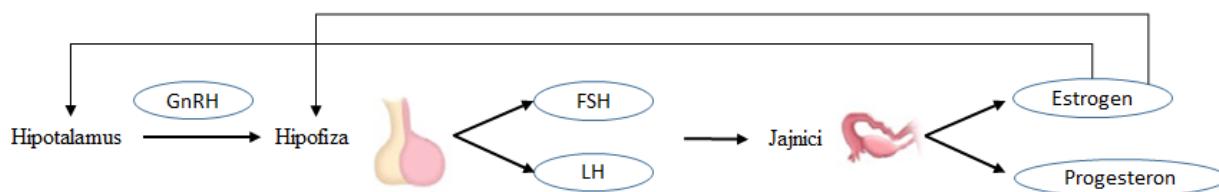
Egzocitirani mucini zadržavaju se u obliku zgusnutih nakupina, egzosoma, na površini stanica te moraju biti hidratirani kako bi sluz primila odgovarajuća reološka svojstva (Flori i sur., 2007). Za razliku od kalcijevih i oksonijevih iona, čija koncentracija utječe na „pakiranje“ sluzi u sekrecijske mjeđuriće, hidrogenkarbonatni ioni, HCO_3^- , utječu na konačno formiranje izlučene sluzi i na njezina odgovarajuća reološka svojstva (Skelin, 2018). Hidrogenkarbonatni ioni vežu na sebe katione (Ca^{2+} i H^+) koji štite mucine od elektrostatskih odbijanja i omogućuju gusto pakiranje mucina u sekrecijskim mjeđurićima. Kada su kationi uklonjeni, mucini se dekondenziraju, šire i volumen im se poveća 1000 puta u nekoliko sekundi (Verdugo, 1990). Osim toga, odbojne elektrostatske sile uzrokuju nizak koeficijent trenja između molekula mucina što smanjuje viskoznost sluzi te uzrokuje istjecanje sluzi iz endocervikalnih kripti u cervikalni kanal (Yang i sur., 2013). Odsustvo hidrogenkarbonatnih iona primijećeno je kod oboljelih od cistične fibroze, a uzrokuje zadržavanje sluzi u lumenu mukoznih žljezdi zbog prevelike viskoznosti (Muchekhu, 2010).

1.5 Utjecaj pH na cervikalnu sluz

Na strukturu cervikalne sluzi utječe promjena pH okoline. Raspored mucina u strukturi sluzi uvelike utječe na viskoznost sluzi (Odeblad, 2002). Primjerice, ako promotrimo građu najzastupljenijeg gel-formirajućeg mucina u cervikalnoj sluzi, MUC5B, možemo vidjeti da se sastoji od središnje regije i dvije vanjske regije. Središnja regija jako je hidrofilna te je sklona savijanju i stvaranju agregata dok su vanjske regije hidrofobne (Zbilut i sur., 2003). Izračunate su izoelektrične točke tih triju regija: izoelektrična točka središnje regije iznosi 8.1, a vanjskih regija 5.3 (desna) i 5.6 (lijeva). Zbog navedenih karakteristika, središnja regija mucina MUC5B sklona je stvaranju globularne strukture, pri ovulacijskoj pH vrijednosti (kompatibilno s izoelektričnom točkom središnje regije). Hidrofobni dijelovi središnje regije su prepoznati kao regije bogate cisteinom koji stvara disulfidne veze sa susjednim mucinima te tako stabilizira čitavu strukturu. Vanjske regije, pri smanjenju pH, imaju tendenciju povezivati se u niti koje stvaraju gustu, nepropusnu mrežu, a lateralno povezivanje mucina preko središnje regije je onemogućeno zbog elektrostatskih odbijanja (Brunelli i sur., 2007).

1.6 Cikličke promjene u jajniku

Sastav i reološka svojstva sluzi mijenjaju se pod utjecajem cikličkih hormona - estrogena i progesterona (Ćurlin i Bursać, 2013). Razine spolnih hormona žena ciklički se izmjenjuju kroz ovarijski ciklus tijekom kojeg se odvijaju tri faze – folikularna i luteinska faza te ovulacija koja se događa između te dvije faze. Čitav proces reguliran je hormonima hipotalamus (GnRH – gonadotropin-oslobađajući hormon) i hipofize (FSH – folikulostimulirajući hormon i LH – luteinizirajući hormon) što je shematski prikazano na slici 3.

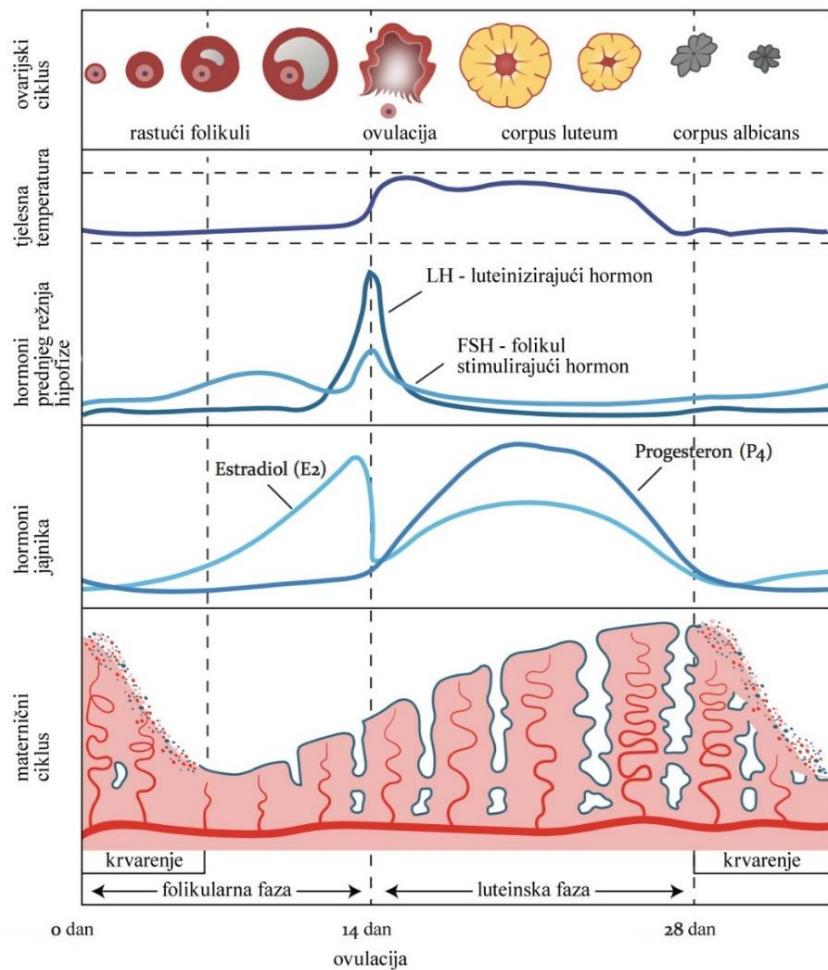


Slika 3. Shematski prikaz utjecaja hormona hipotalamusa na hipofizu koja lučenjem hormona potiče jajnike na lučenje estrogena i progesterona (preuzeto i prilagođeno od Koopman, 2013).

Tijekom folikularne faze, u jajniku raste i sazrijeva jajni folikul koji, netom prije ovulacije, sadrži zrelu jajnu stanicu, spremnu za oplodnju. Folikularna faza započinje prvim danom menstrualnog krvarenja kada je razina folikulostimulirajućeg hormona (FSH) visoka, a sazrijevanjem jajne stanice završava te slijedi ovulacija. Iako je ciklus svake žene drugačiji, folikularna faza u prosjeku traje 14 dana. Tijekom razvoja folikula, visoka razina FSH potiče lučenje estrogena koji, između ostalog, inicira promjene (zadebljanje) endometrija koji će prihvati oplođenu jajnu stanicu (ako do oplodnje dođe). Na početku folikularne faze nastane 20-30 folikula, ali samo jedan će stvoriti jajnu stanicu.

Po završetku folikularne faze, raste razina luteinizirajućeg hormona (LH) koji uzrokuje pucanje folikula i ovulaciju (izbacivanje zrele jajne stanice prema jajovodu). Ovulacija traje jedan do dva dana, a uglavnom se događa između 10 i 16 dana prije idućeg menstrualnog krvarenja (ljuštenja endometrija).

Luteinska faza se još naziva i faza žutog tijela budući da pod utjecajem LH, od ostatka folikula nastaje žuto tijelo (*lat. corpus luteum*) čija je glavna uloga proizvodnja progesterona i u manjoj mjeri estrogena. Ukoliko je došlo do oplodnje, a potom i do implantacije (prihvatanje oplođene jajne stanice u maternici), embrij proizvodi humani korionski gonadotropin (hCG) koji održava žuto tijelo. Žuto tijelo se povećava i nastavlja lučiti hormone koji utječu na bujanje sluznice maternice. U periodu od 13. do 17. tjedna trudnoće, žuto tijelo propada, a njegovu ulogu preuzima posteljica koja nastavlja lučiti hCG. Ako do oplodnje nije došlo, žuto tijelo propada te više ne luči hormone zbog čega opet dolazi do krvarenja, odnosno do kraja ciklusa (Slika 4).



Slika 4. Prikaz ovarijskog i menstruacijskog ciklusa žene.

preuzeto: <https://viosfertility.com/blog/the-menstrual-cycle/>

1.6.1 Utjecaj cikličkih promjena hormona na cervikalnu sluz

Tijekom svih navedenih faza i promjena razina spolnih hormona, dolazi i do promjena cervikalne sluzi u vidu količine ali i strukture (Katz, 1991). Već 1969., Odeblad dijeli cervikalnu sluz na tip E (estrogenska sluz) i na tip G (progesteronska sluz) s obzirom na promjene sastava sluzi uslijed cikličke promjene hormona estrogena i progesterona. Neposredno prije ovulacije, poraste razina estrogena zbog čega je i proizvodnja sluzi povećana (Brown i sur., 1985). U luteinskoj fazi sluz postaje gušća i viskozna, čime se stvara barijera za spermije. Ova promjena odgovara povećanoj razini progesterona (Gipson, 1999). Gel-formirajući mucini uzrok su viskoznosti cervikalne sluzi zbog čega bi sluz tijekom ovulacije, kad je razina estrogena visoka te se poveća količina mucina,

trebala biti vrlo viskozna. Ipak, to u stvarnosti nije tako. Sluz je tijekom ovulacije vrlo rijetka i elastična (Brown i sur., 1985). Iako nije u potpunosti jasno zašto je to tako, prepostavlja se da je uzrok tome pojačana hidratacija mucina, čime se zapravo njihova koncentracija smanjuje, a sluz postaje vodenasta (Kopito, 1973).

Osim cikličke promjenjivosti sluzi, prepostavlja se da endocervikalne žlijezde s različitim smještajem unutar cerviksa proizvode različitu vrstu sluzi, ovisno o stimulaciji estrogenom (Odeblad, 1959; Rudolfsson, 1971; Menarguez i sur., 2003). Prema toj hipotezi, žlijezde smještene u gornjem dijelu cervikalnog kanala izlučuju manje viskoznu sluz, a žlijezde iz nižih dijelova će proizvesti viskozniju sluz. Na viskoznost sluzi utječe i O-glikozilacija mucina što su opisali Andersch-Björkman i sur. (2007). Detektirali su veći broj neutralnih šećera mucina tijekom ovulacije (manje viskozna sluz) dok su glikani prije i poslije ovulacije sličnog sastava te su češće negativno nabijeni, odnosno sluz se sastoji od većeg broja kiselih mucina (viskozna sluz). S obzirom na to, prepostavka ovog rada je da se i udio kiselih odnosno neutralnih mucina razlikuje u gornjem i donjem dijelu cerviksa.

1.7 Postupci prikazivanja kiselih i neutralnih mucina u tkivima

Istraživanje mucina se, osim molekularnom i biokemijskom analizom cervikalne sluzi, provodi i na histološkim uzorcima epitelnog tkiva koje proizvodi cervikalnu sluz (Skelin, 2018). Na njima se različitim tehnikama mogu prikazati kisieli i neutralni mucini.

1.7.1 Histokemijske metode prikazivanja mucina u tkivima

Zbog visokog stupnja oligosaharidne supstitucije, za prikazivanje mucina koriste se histokemijske metode koje se temelje na prisutnosti ugljikohidrata: bojanje mucikarminom, PAS reakcijom, alcijanskim modrilom, koloidnim željezom, HID (engl. *high iron diamine*) tehnikom, metakromatskim bojama te kombinacije navedenih tehnika.

1.7.1.1 Bojanje Schiffovim perjodnim reagensom (PAS)

PAS (perjodna kiselina (HIO_4) - Schiff) je najsvestranije korištena i široko prihvaćena tehnika za prikaz ugljikohidrata te mucina. Vrijednost ove metode ogleda se u tome što pomoću nje možemo prikazati neutralne mucine, s obzirom na to da se mehanizam bojenja ne zasniva na prisutnosti kiselih skupina, nego na prisutnosti slobodnih aldehidnih skupina u sastavu monosaharidnih jedinica. Vrlo je osjetljiva metoda za prikaz neutralnih mucina, kao i kiselih mucina koji sadrže značajan udio sijalične kiseline u svojoj strukturi. Početnu reakciju čini oksidacija hidroksilnih skupina vezanih na susjedne ugljikove atome perjodnom kiselinom (HIO_4). Oksidacijom navedenih diola nastaju Schiff reaktivne aldehidne skupine. Nakon dodatka Schiffovog reagensa nastaje ljubičastocrveno (magenta) obojenje, a intenzitet boje dobivene nakon dodatka Schiffovog reagensa proporcionalan je koncentraciji reaktivnih hidroksilnih skupina (Bancroft, 2008). Kako bi se izbjegla pozitivna reakcija glikogena u bazalnoj membrani na PAS, obično se uzorci prethodno tretiraju amilazom.

1.7.1.2 Bojanje alcijanskim modrilom

Kisi mucini mogu se prikazati kationskim bojama (elektrostatskom interakcijom). Alcijansko modrilo (AB) tetravalentna je kationska boja sastavljena od kompleksa bakra i ftalocijanata s četiri izotioronijske skupine. Proizvedeno je mnoštvo različitih varijanti alcian modrila koje se razlikuju prema broju izotioronijskih skupina te načinu razrjeđivanja. Obzirom da izotioronijske skupine sadrže kvaterne amonijeve ione, pozitivno su nabijene zbog čega je moguća interakcija s određenim polianionima, iako točan mehanizam kojim alcian plavo boji ugljikohidrate nije poznat. Alcijansko modrilo 8GX preporučena je boja za histološke metode bojenja. Mijenjajući pH otopine AB moguće je prikazati različite vrste kiselih mucina. Svi kisi mucini, karboksilirani i sulfatirani, bit će ionizirani u obliku RCOO^- i SO_3^{2-} pri pH 2,5. U prisutnosti kiselih mucina dolazi do plavog obojenja. Često se koristi kombinacija AB i PAS metode bojenja za razlikovanje neutralnih od kiselih mucina (Mowry, 1956). Primjenom AB pri pH 2,5 svi kisi mucini obojat će se tamnoplavo. Dalnjom primjenom PAS tehnike bojenja, neutralni mucini obojat će se magenta bojom. Tkiva ili stanice koje sadrže i neutralne i kisele mucine, obojat će se tamnoplavo ili ljubičasto. S obzirom da se kombiniranom metodom prikazuju neutralni, kao i kisi mucini, ona je jedna od najosjetljivijih i najsveobuhvatnijih metoda za histološki prikaz mucina.

2 CILJ RADA

2.1 Opći cilj

Cilj ovog rada je usporediti udjele neutralnih i kiselih mucina u gornjem (kranijalnom) i donjem (kaudalnom) dijelu cervikalnog kanala te usporediti udjele neutralnih i kiselih mucina s razinama estrogena u serumu žena.

2.2 Specifični ciljevi

1. Prikazati neutralne mucine u tkivima endocerviksa bojanjem sa Schiffovim perjodnim reagensom (PAS) i kisele mucine alcijanskim modrilom (AB).
2. Izmjeriti površine tkiva obojane PAS-om i AB-om te odrediti udjele neutralnih i kiselih mucina u obojanim područjima endocervikalnog sekrecijskog epitela.
3. Statistički usporediti dobivene rezultate za gornji i donji dio cerviksa.
4. Statistički odrediti korelaciju između udjela neutralnih i kiselih mucina i razine spolnih hormona u serumu, zasebno za gornji i donji dio cerviksa.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Uzorci tkiva vrata maternice

Istraživanje je provedeno na uzorcima ljudskog tkiva endocerviksa i krvi uzetih od 15 ispitanica koje su bile podvrgnute operativnom zahvalu uklanjanja maternice i cerviksa (histerektomija) u Klinici za ženske bolesti i porode - KBC Zagreb. Sve ispitanice su žene u reproduktivnoj dobi, zdrave, ali u razdoblju perimenopauze (prosječna dob 48 ± 5 godina).

Ispitanice su odabране temeljem uključnih i isključnih kriterija. Uključni kriteriji su bili da je ispitanica prema anamnestičkim pokazateljima u reproduktivnoj dobi, a isključni kriteriji su bili: maligni procesi reproduktivnog sustava, hormonska kontracepcija unutar zadnjih šest mjeseci, intrauterina spirala unutar zadnjih godinu dana, nepravilnosti u nalazu Papanicolaou testa i menopauza (Skelin, 2018). Zbog stroge primjene isključnih kriterija, početnih 20 ispitanica smanjeno je na 15 ispitanica. Naknadna analiza hormona u krvi i patohistološka analiza tkiva maternice pokazala je da su od preostalih 15 ispitanica tri ispitanice bile u postmenopauzi, sedam ispitanica u folikularnoj fazi, a pet ispitanica u luteinskoj fazi ciklusa.

Ispitanice su bile obaviještene o postupku i svrsi istraživanja te su potpisale informirani pristanak za provođenje istraživanja i publikaciju rezultata.

Prikupljanje uzoraka i provođenje predloženog istraživanja odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu prilikom odobrenja teme doktorske disertacije za čiju izradu su prikupljeni navedeni uzorci (Obrazac DR.SC.-02 – Skelin Marta.doc).

3.2 Uzorci krvi

Uzorci krvi uzeti su iz ispitanica na dan operacije te odmah proslijedeni u biokemijski laboratorij Klinike za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb, gdje je kemiluminiscentnim postupkom (CMIA, engl. *chemiluminescent microparticle immuno assay*) na analizatoru Architect i1000 (Abbott, SAD) određena razina spolnih hormona (Tablica 1).

Tablica 1. Prikaz izmjerene razine hormona (E2 – estradiol, P4 – progesteron) te faza ciklusa (M – menopauza, F – folikularna, L – luteinska faza) svake ispitanice.

| HORMONI | | ISPITANICE | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|-----------------|------------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|------|
| | | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| | E2 pmol/L | 51 | 60 | 87 | 1587 | 585 | 414 | 1460 | 131 | 498 | 495 | 387 | 165 | 152 | 273 | 580 |
| | P4 nmol/L | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,6 | 0,7 | 0,7 | 1,3 | 0,5 | 0,4 | 0,6 | 13,6 | 7,8 | 6,4 | 39,5 | 25,5 |
| | Faza ciklusa | M | M | M | F | F | F | F | F | F | F | L | L | L | L | L |

3.3 Priprema histoloških rezova tkiva

Neposredno nakon operativnog zahvata, iz cerviksa je izrezan uzdužni isječak debljine 3 mm koji je poprečnim rezom podijeljen na dva dijela: gornji (kranijalni) i donji (kaudalni) dio. Dobiveni uzorci su fiksirani u 4% vodenoj otopini paraformaldehida u trajanju od 24 sata, nakon čega su stavljeni na ispiranje pod tekućom vodom preko noći. Uzorci su potom dehidrirani u ulaznom nizu etanola (20%, 50%, 70%, 96%, 99%, 2 x 100%) u svakoj otopini po 3-5 minuta. Uzorci su stavljeni u ksilol na 5 minuta, zatim u otopinu 1:1 ksilola i parafina Biowax (Bignost) na 5 minuta pri temperaturi od 58-60 °C te u 100% parafin, uz tri izmjene, na nekoliko sati pri 56 °C. Uklopljeni u parafin, uzorci su narezani na rezove debljine 5 µm pomoću rotacijskog mikrotoma (Leitz 1512) i pohranjeni na sobnu temperaturu.

3.4 Bojanje AB – PAS

Prije bojanja, svi su uzorci uronjeni na dva puta po 5 minuta u ksilol kako bi se napravila deparafinacija. Slijedila je dehidracija u silaznom nizu alkohola (100%, 100%, 96%, 70%, destilirana voda, po 3 minute u svakome). Uzorci su uronjeni u 1% vodenu otopinu alcijanskog modrila (Merck), pri pH 2,5 na 20 minuta, te su isprani u destiliranoj i tekućoj vodi u trajanju od 3 minute. Nakon toga, uzorci su uronjeni u 0,5% perjodnu kiselinu u mraku, na 10 minuta. Zatim su uronjeni u Schiffov reagens (Sigma-Aldrich), 30 minuta u mraku, a onda su opet isprani tekućom destiliranom vodom u trajanju od 3 minuta. Potom su uranjani u 0,5% K-metabisulfit (K₂S₂O₅), s time da je otopina promijenjena tri puta, pa su isprani u destiliranoj i tekućoj vodi, 3 minute. Na

kraju su uzorci ponovo dehidrirani ulaznim nizom alkohola (96%, 96%, 100%), uronjeni po 5 minuta u mješavinu ksilola i alkohola (1:1) te dva puta u ksilol. Rezovi su poklopljeni sredstvom za poklapanje Biomount (Biognost).

Obojani preparati su analizirani i fotodokumentirani mikroskopom BX53 s ugrađenom kamerom (Olympus) primjenom objektiva s povećanjem 40x.

3.5 Postupak kvantifikacije mucina

Uzorci tkiva gornjih i donjih dijelova cerviksa od 15 ispitanica (ukupno 30 uzoraka tkiva cerviksa), rezani su serijski te su iz svakog uzorka za analizu odabrana tri preparata, svaki peti rez u seriji. Na svakom preparatu analizirano je deset polja (kadrova na mikroskopskim snimkama tkiva primjenom objektiva povećanja 40x) koji su pomoću programa Paint.net (dotPDN LLC, Rick Brewster) izdvojeni kao zasebne slike. Predviđeno je da na taj način za daljnju analizu bude pripremljeno 900 slika, no s obzirom da na 13 preparata ili nije bilo žljezda ili nije bilo pozitivne reakcije niti na PAS niti na AB, pripremljeno je ukupno 770 slika.

Pripremljene slike su potom obrađene u programu Ilastik (program fondacije *Free Software Foundation* s licencom *General Public License, version 2* koja svakom korisniku dozvoljava dijeljenje i mijenjanje tog programa). Prvo je bilo potrebno istrenirati program da područja obojana PAS-om označi crvenom bojom, područja obojana AB-om plavom bojom, a pozadinu zelenom bojom. Program je treniran na 30 različitih slika, dok se nije postiglo precizno prepoznavanje obojanih područja. Svih 770 slika, Ilastik je obradio na isti, naučen način.

Udio neutralnih i kiselih mucina u obojanom epitelu prikazan je kao omjer površina epitela obojanih PAS-om (neutralni polisaharidi) i AB-om (kisi polisaharidi). Površina epitela obojena crveno PAS-om i površina epitela obojena plavo AB-om, određena je FIJI inačicom programa Image-J (National Institutes of Health, Wayne Rasband).

3.6 Statistika

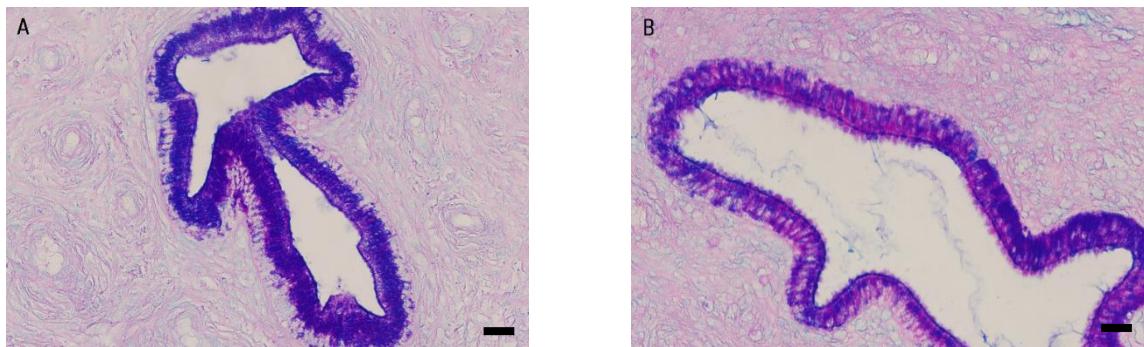
Nakon analize distribucije vrijednosti omjera C/P, provedena je statistička analiza njihovih logaritmiranih vrijednosti koje su pokazale lognormalnu distribuciju. Razlika u udjelu neutralnih i kiselih mucina u gornjem i donjem dijelu cerviksa te u udjelu neutralnih i kiselih mucina s obzirom na fazu ciklusa provedena je Hi kvadrat testom. Postupkom REML (engl. *restricted maximum likelihood*) i Hi kvadrat testom provjeroeno je postojanje interaktivnosti utjecaja faze ciklusa i položaja žljezda unutar cerviksa (gornji i donji) na udio neutralnih i kiselih mucina. Korelacija između udjela neutralnih i kiselih mucina u epitelu i razine estrogena i progesterona u serumu, testirana je također Hi kvadrat testom, nakon testiranja normalnosti raspodjele podataka i interaktivnosti utjecaja razine spolnih hormona i položaja žljezde na udio neutralnih i kiselih mucina. Značajnom razlikom smatrala se ona na razini stupnja vjerojatnosti od $p < 0,05$.

Svi statistički testovi provedeni su pomoću programa RStudio (AGPL v3, RStudio).

4 REZULTATI

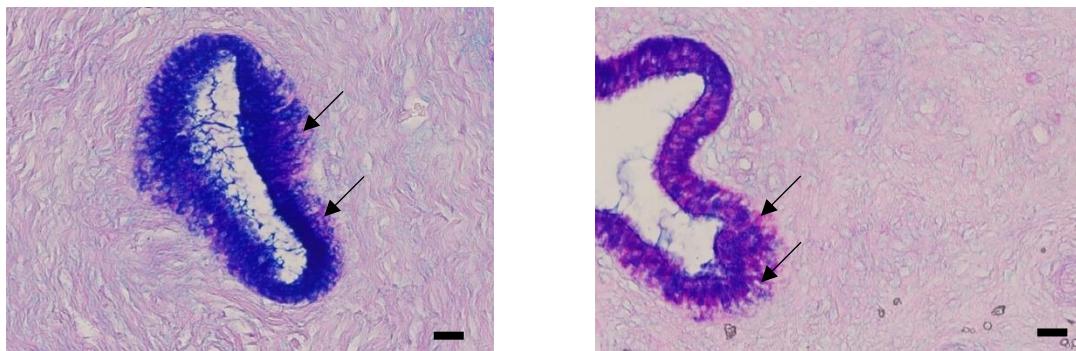
4.1 Histokemijski prikaz neutralnih i kiselih mucina u žlezdanom tkivu endocerviksa

Bojanjem uzoraka tkiva ljudskog endocerviksa, kombinacijom Schiffovog perjodnog reagensa (PAS) i alcijanskog modrila (AB), prikazani su neutralni i kiseli mucini. Neutralni mucini obojani su crveno, PAS-om, dok su kiseli mucini obojani plavo, AB-om (Slika 5).



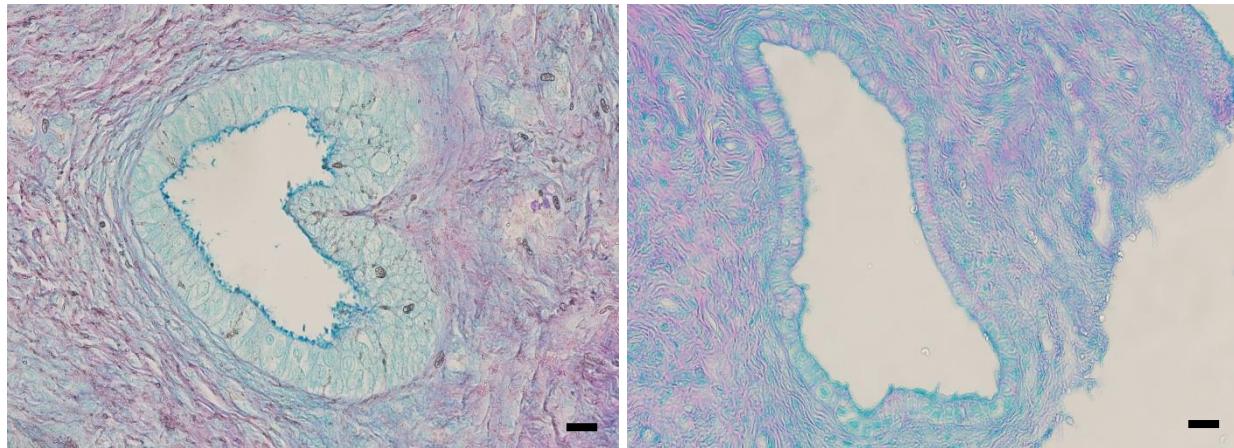
Slika 5. Histološki preparati žlezdanog tkiva ljudskog vrata maternice obojani Schiffovim perjodnim reagensom (PAS) i alcijanskim modrilom (AB). A. Žljezda s većim udjelom kiselih mucina, plavo obojanih AB-om. B. Žljezda s većim udjelom neutralnih mucina, crveno obojanih PAS-om. Mjerna skala: 20 µm.

Osim neutralnih mucina, crvenom bojom, PAS-om, obojan je i glikogen koji se obično nalazi u bazalnom dijelu (Slika 6). U daljnjoj analizi isključuju se bazalni dijelovi stanica, odnosno glikogen.



Slika 6. Histološki preparati žlezdanog tkiva ljudskog vrata maternice obojani Schiffovim perjodnim reagensom (PAS) i alcijanskim modrilom(AB). Glikogen se u bazalnim dijelovima stanica boji PAS-om (strelice). Mjerna skala: 20 µm.

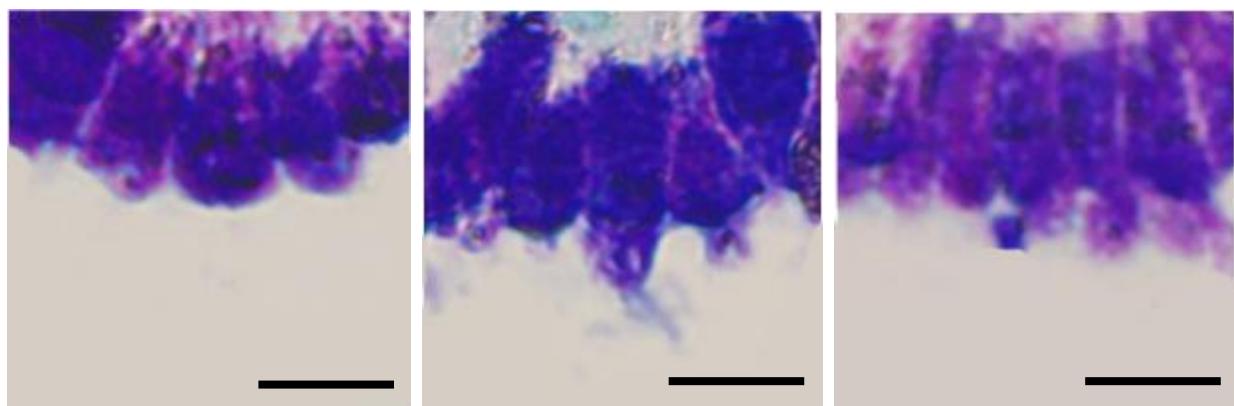
Na šest preparata, rezom nisu bile zahvaćene žljezde, stoga se ti preparati nisu koristili u daljnjoj obradi. S druge strane, žljezde na sedam preparata nisu pokazale pozitivnu reakciju na PAS i AB (Slika 7).



Slika 7. Histološki preparati žljezdanog tkiva ljudskog vrata maternice koji nisu imali pozitivnu reakciju na Schiffov perjodni reagens (PAS) niti na alcijansko modrilo (AB). Mjerna skala: 20 µm.

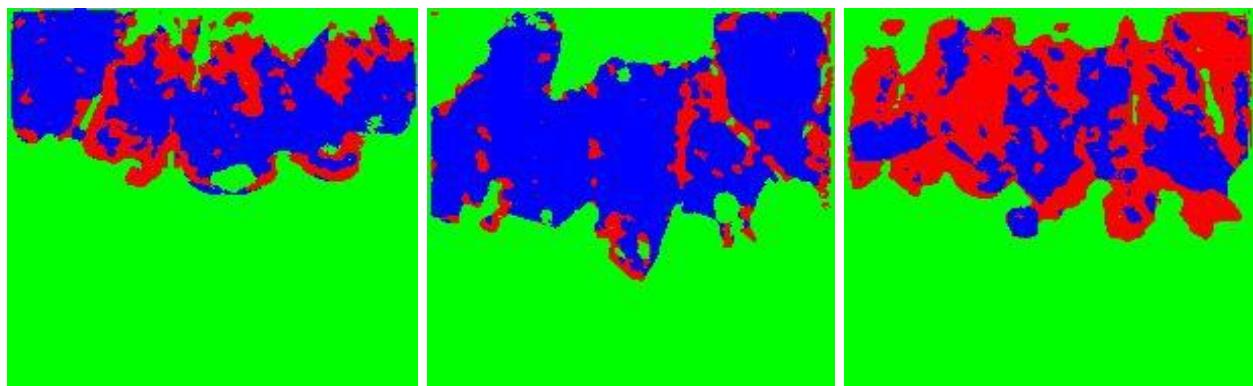
4.2 Udio neutralnih i kiselih mucina izražen kao omjer obojanih površina C/P

Kako bi se razlike u bojanju preparata, dobivenih iz gornjih i donjih dijelova endocerviksa ispitaničica iz različitih faza menstruacijskog ciklusa, mogle kvantitativno izraziti i statistički obraditi, bilo je potrebno obraditi svjetlosnomikroskopske snimke preparata na odgovarajući način (Slika 8).



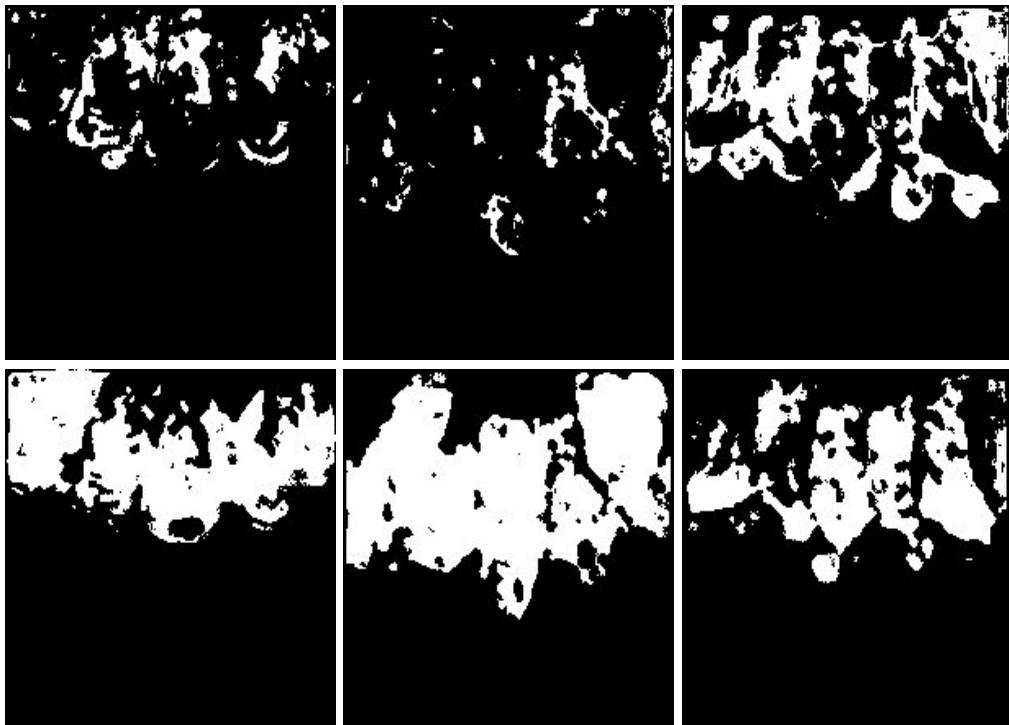
Slika 8. Primjeri polja izdvojenih iz snimki histoloških preparata žljezdanog tkiva ljudskog vrata maternice obojanih Schiffovim perjodnim reagensom (PAS) i alcijanskim modrilom (AB). Mjerna skala: 10 µm.

Svaka tako dobivena slika obrađena je u programu Ilastik. Crvenom bojom obojani su PAS-pozitivni dijelovi žlezdanog epitela, odnosno neutralni mucini. Plavom bojom obojani su AB-pozitivni dijelovi žlezdanog epitela, odnosno kiseli mucini. Pozadina (lumen žljezde, okolno tkivo, mjehurići i smeće) obojana je zelenom bojom. Program je istreniran tako da crvenu boju uz bazalnu membranu (glikogen) prepoznaje kao pozadinu koju prikazuje zelenom bojom. (Slika 9).



Slika 9. Izdvojena polja iz histoloških preparata žlezdanog tkiva ljudskog vrata maternice sa slike 8, obrađena programom Ilastik. Crvenom bojom obojani su neutralni mucini, plavom kiseli mucini, a zelenom pozadina.

Slike u .tif formatu dobivene programom Ilastik su obrađene u FIJI inačici programa Image-J, na način da su razdvojene na dva kanala: jedan koji prikazuje samo površinu prekrivenu crvenom bojom (neutralnim mucinima) i drugi koji prikazuje samo površinu prekrivenu plavom bojom (kiselim mucinima) (Slika 10).



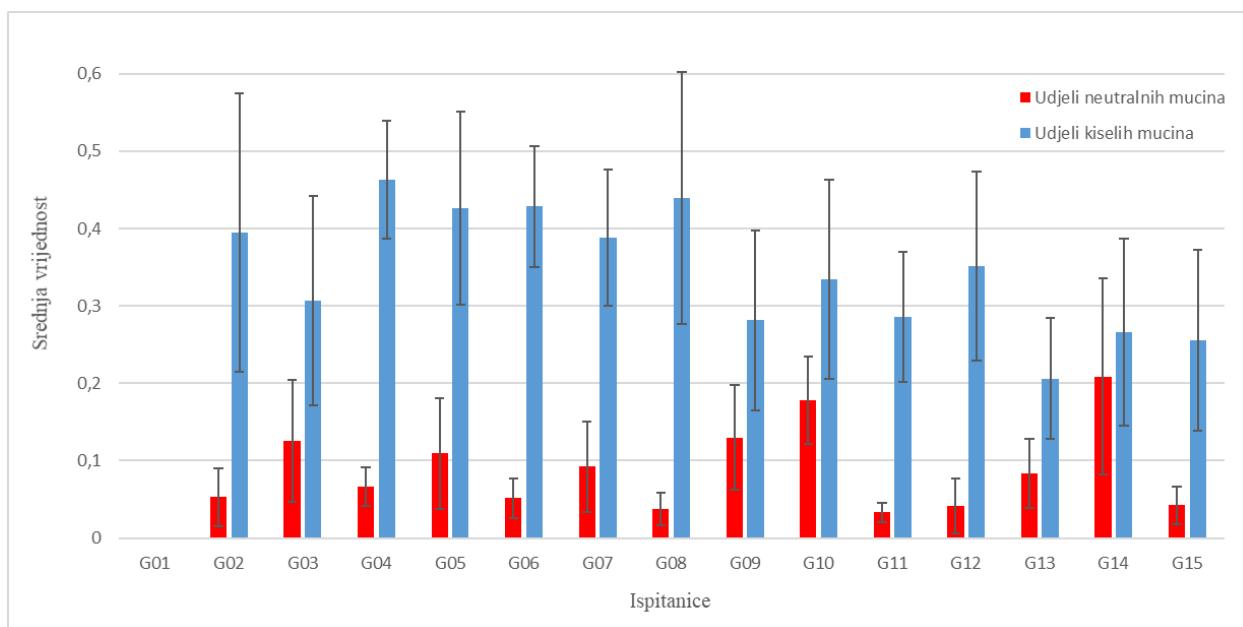
Slika 10. Izdvojena polja iz histoloških preparata žljezdanog tkiva ljudskog vrata maternice sa slike 8, razdvojena na crveni (gore) i plavi (dolje) kanal, u FIJI inačici programa Image-J.

U FIJI inačici programa Image-J, izmjerena je površina prekrivena crvenom, odnosno plavom bojom. U Excel tablici su prikazani rezultati mjerena svih 770 polja. Prikazane su pripadajuće vrijednosti za svaku ispitanicu, posebno za gornji, a posebno za donji dio cerviksa (Prilog). Udjeli crveno obojane površine i plavo obojane površine na analiziranom području postavljeni su u omjer (udio crvene boje na analiziranom području/udio plave boje na analiziranom području), čime je dobivena vrijednost koja je nazvana omjer C/P (Prilog). Ta se vrijednost koristila u daljnjoj statističkoj obradi.

U tablicama 2 i 3, prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije za svaku ispitanicu, posebno za gornji, a posebno za donji dio cerviksa.

Tablica 2. Srednje vrijednosti i pripadajuće standardne devijacije udjela neutralnih i kiselih mucina u gornjem dijelu cerviksa.

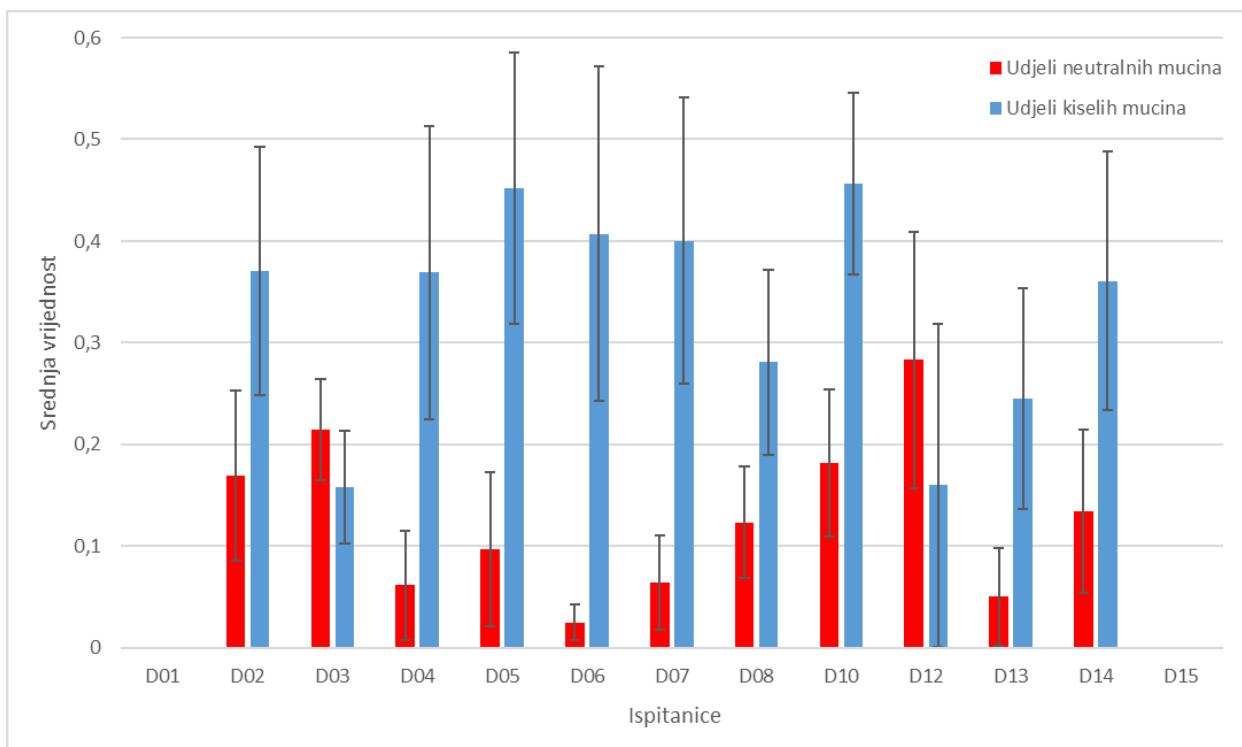
| SREDNJE VRIJEDNOSTI | | | STANDARDNE DEVIJACIJE | | |
|---------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
| Ispitanice | Udjeli neutralnih mucina | Udjeli kiselih mucina | Ispitanice | Udjeli neutralnih mucina | Udjeli kiselih mucina |
| G01 | / | / | G01 | / | / |
| G02 | 0,05305 | 0,39437 | G02 | 0,03761 | 0,17969 |
| G03 | 0,12536 | 0,30673 | G03 | 0,07907 | 0,13478 |
| G04 | 0,06629 | 0,46326 | G04 | 0,02512 | 0,07622 |
| G05 | 0,10917 | 0,42583 | G05 | 0,07113 | 0,12469 |
| G06 | 0,05139 | 0,42846 | G06 | 0,02584 | 0,07825 |
| G07 | 0,09206 | 0,38872 | G07 | 0,05834 | 0,08793 |
| G08 | 0,03788 | 0,43932 | G08 | 0,02095 | 0,16298 |
| G09 | 0,12998 | 0,2812 | G09 | 0,06719 | 0,11574 |
| G10 | 0,17785 | 0,33465 | G10 | 0,05651 | 0,12863 |
| G11 | 0,03295 | 0,28574 | G11 | 0,01264 | 0,08444 |
| G12 | 0,04142 | 0,35151 | G12 | 0,03541 | 0,12227 |
| G13 | 0,08376 | 0,20624 | G13 | 0,04438 | 0,07845 |
| G14 | 0,20882 | 0,26653 | G14 | 0,12684 | 0,12096 |
| G15 | 0,04271 | 0,255 | G15 | 0,02436 | 0,117 |



Slika 11. Grafički prikaz srednjih vrijednosti i standardnih devijacija udjela neutralnih i kiselih mucina u gornjem dijelu cerviksa.

Tablica 3. Srednje vrijednosti i pripadajuće standardne devijacije udjela neutralnih i kiselih mucina u donjem dijelu cerviksa.

| SREDNJE VRIJEDNOSTI | | | STANDARDNE DEVIJACIJE | | |
|---------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
| Ispitanice | Udjeli neutralnih mucina | Udjeli kiselih mucina | Ispitanice | Udjeli neutralnih mucina | Udjeli kiselih mucina |
| D01 | / | / | D01 | / | / |
| D02 | 0,16939 | 0,3708 | D02 | 0,08313 | 0,1224 |
| D03 | 0,21483 | 0,15818 | D03 | 0,04961 | 0,05554 |
| D04 | 0,06176 | 0,369 | D04 | 0,05359 | 0,1437 |
| D05 | 0,0969 | 0,45181 | D05 | 0,07565 | 0,1337 |
| D06 | 0,02525 | 0,40709 | D06 | 0,01762 | 0,16436 |
| D07 | 0,06408 | 0,40012 | D07 | 0,04605 | 0,14084 |
| D08 | 0,1232 | 0,28093 | D08 | 0,05483 | 0,0911 |
| D10 | 0,18201 | 0,45606 | D10 | 0,07265 | 0,08943 |
| D12 | 0,283 | 0,15989 | D12 | 0,12634 | 0,15867 |
| D13 | 0,05027 | 0,24538 | D13 | 0,04769 | 0,10874 |
| D14 | 0,13428 | 0,36083 | D14 | 0,08007 | 0,12752 |
| D15 | / | / | D15 | / | / |



Slika 12. Grafički prikaz srednjih vrijednosti i standardnih devijacija udjela neutralnih i kiselih mucina u donjem dijelu cerviksa.

4.3 Statistička usporedba omjera C/P u gornjem i donjem dijelu cerviksa

Iz statističke obrade isključena su polja koja nisu sadržavala žlijezde ili nisu pokazale pozitivnu reakciju na PAS i AB. Budući da oba uzorka tkiva ispitanice broj 1 (D01 i G01) nisu imala pozitivne reakcije niti na jednom preparatu, te su ispitanice izbačene iz statističke analize te je ukupan broj ispitanica uključenih u analizu bio 14.

Testiranje interaktivnosti utjecaja faze ciklusa te položaja žlijezda unutar cerviksa (gornji i donji) na udio neutralnih i kiselih mucina pokazalo je da utjecaj faza ciklusa na rezultate testiranja korelacije položaja žlijezda i udjela neutralnih i kiselih mucina nije značajan ($\text{Hi kvadrat} = 2,4802$, $p = 0,2894$). Stoga je testiranje korelacije omjera C/P i položaja žlijezda provedeno prema aditivnom modelu, koji isključuje interaktivni utjecaj faze ciklusa i položaja žlijezda unutar cerviksa (gornji i donji) na udio neutralnih i kiselih mucina.

Primjenom Hi kvadrat testa pokazano je da korelacija položaja žlijezda u cerviksu i omjera C/P nije značajna ($\text{Hi kvadrat} = 2,102$, $p = 0,1271$). Drugim riječima, ne postoji razlika u udjelu neutralnih i kiselih mucina u gornjem i donjem dijelu cerviksa.

Također, pokazano je da ni korelacija faze ciklusa i omjera C/P nije značajna ($\text{Hi kvadrat} = 1,7688$, $p = 0,413$).

4.4 Korelacija omjera C/P i razine spolnih hormona u serumu

Kako bi se testirala povezanost omjera C/P i razine spolnih hormona, zasebno za gornji i donji dio cerviksa, predložen je linearni miješani model koji prepostavlja da korelacija omjera C/P i razine spolnih hormona ovisi o položaju žlijezde unutar cerviksa (gornji ili donji dio). Testiranjem tog modela, pokazano je da ne postoji navedena interakcija ($\text{Hi kvadrat} = 3,2523$, $p = 0,1967$) te da zasebna statistička analiza korelacije omjera C/P i razine spolnih hormona za gornji i donji dio cerviksa neće dati statistički značajnu razliku. Stoga je u analizi prihvaćen aditivni model koji isključuje utjecaj položaja žlijezde na korelaciju omjera C/P i razine spolnih hormona. Primjenom Hi kvadrat testa na sve uzorke tkiva (i gornje i donje dijelove cerviksa), pokazano je da korelacija omjera C/P i razine spolnih hormona nije značajna niti za estradiol ($\text{Hi kvadrat} = 3,8455$, $p = 0,1462$) niti za progesteron ($\text{Hi kvadrat} = 2,3074$, $p = 0,3155$).

5 RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je usporediti udjele neutralnih i kiselih mucina u gornjem i donjem dijelu ljudskog cerviksa te usporediti utjecaj spolnih hormona na udjele neutralnih i kiselih mucina. Kako je struktura cervikalne sluzi određena, između ostalog, vrstom mucina koji prevladavaju u žljezdanom epitelu, postavljena je pretpostavka da je u gornjem dijelu ljudskog cerviksa veći udio neutralnih mucina (manje viskozna sluz), za razliku od donjeg dijela, gdje je veći udio kiselih mucina (viskoznija sluz). Osim toga, s obzirom na faze ciklusa u kojima su se nalazile ispitanice u vrijeme uzimanja uzoraka, kao i izmjerena razina hormona (E2 i P4), bilo je očekivano je da će viša razina estrogena (folikularna faza, pri ovulaciji) biti povezana s manje viskoznom sluzi, odnosno da će kod tih ispitanica biti zamijećen veći udio neutralnih mucina.

Rezultati su pokazali da ne postoji korelacija položaja žlijezda i udjela neutralnih i kiselih mucina (omjer C/P u rezultatima), što nije u skladu s istraživanjima koja su proveli Odeblad (1959), Rudolfsson (1971) i Menarguez (2003) u kojima zaključuju da na drugačiju strukturu sluzi utječe položaj žlijezdi koje proizvode sluz pod stimulacijom estrogena.

Isto tako, faza ciklusa žene, prema ovom istraživanju, nije povezana s udjelom neutralnih i kiselih mucina u promatranom području žljezdanog epitela cerviksa. Budući da se razine hormona u jajnicima razlikuju u različitim fazama smatra se da faza ciklusa u kojoj se nalazi žena utječe na strukturu sluzi, odnosno na udio neutralnih i kiselih mucina u žljezdanom epitelu (Gipson, 1999). Tijekom folikularne faze raste razina estrogena u serumu, a time se luči više sluzi koja je obično vodenasta. Sukladno istraživanju koje su proveli Andersch-Björkman i sur. (2007), vodenasta sluz, tijekom ovulacije, proizvod je žlijezdi s većim udjelom neutralnih mucina, dok je sluz prije ovulacije (folikularna faza) i poslije ovulacije (luteinska faza) viskoznija te proizvod žlijezdi s većim udjelom kiselih mucina. Uzimajući sve navedeno u obzir, moguće je navesti nekoliko razloga koji su mogli utjecati na dobivene rezultate istraživanja, koji nisu u skladu s očekivanjima. Prvenstveno, na rezultate je vjerojatno utjecala činjenica da su sve ispitanice bile u perimenopauzi. Starenjem cerviksa smanjuje se lučenje vodenaste sluzi te se uglavnom luči viskozna sluz, što upućuje na promjene u žljezdanom epitelu cerviksa. Nadalje, unatoč pažljivom probiru ispitanica, nije u potpunosti isključeno da su ispitanice imale zdravstvenih problema koji su mogli utjecati na stanje cerviksa i cervikalne sluzi. Također, poznato je da je raspon normalnih vrijednosti razina

spolnih hormona tijekom folikularne i luteinske faze ciklusa relativno širok te da postoje značajne individualne razlike u razinama spolnih hormona i reakciji cervikalnih žlijezda na hormonske poticaje, pa je teško na relativno malom broju uzoraka postići ujednačenost rezultata (Brown, 2010). Rezultati bi bili precizniji kada bi se moglo usporediti vrijednosti omjera C/P kod iste žene u različitim fazama ciklusa. U ovom istraživanju imali smo dostupne podatke za svaku ženu samo u jednom trenutku unutar menstruacijskog ciklusa.

Na dobivene rezultate može utjecati i sam postupak bojanja, odabir polja unutar obojanih preparata te način obrade tih polja programima Ilastik i ImageJ. Upotrebom alcijanskog modrila i Schiffovog reagensa, prikazuju se neutralni i kiseli mucini, pri čemu je važan redoslijed bojanja jer se bojanjem alcijanskim modrilom bojaju svi kiseli mucini te se blokira pozitivna reakcija na PAS. Kako bi se izbjegla pozitivna reakcija glikogena na PAS, preporučuje se korištenje amilaze prije tretmana PAS-om (Dos Santos i sur., 2014). Budući da u ovom istraživanju nije korištena amilaza, bilo je potrebno istrenirati program Ilastik da na bazalnim dijelovima stanice zanemari crveno obojenje jer se smatra da je na tom području došlo do pozitivne reakcije glikogena na PAS, a ne kiselih mucina. Iako se usporedbom izvornih slika polja i slika obrađenih u Ilastiku program pokazao preciznim, moguće je da postoje pogreške u obradi.

Protokol bojanja modificiran je prema protokolu proizvođača Schiffovog reagensa korištenog u bojanju (Sigma), a specifično je ispiranje u tekućoj vodi nakon svakog bojanja. Različiti protokoli se razlikuju i po trajanju inkubacija u pojedinim otopinama, što svakako može utjecati na reakciju tkiva na AB i PAS. Tijekom cijelog postupka vodila se briga o ravnomjernom raspoređivanju uzoraka u serijama, kao i ujednačenom postupku, a na odabir polja utjecala je i prisutnost i brojnost žlijezda.

S obzirom na sve navedeno, prijedlog je da se u budućim istraživanjima analizira veći broj uzoraka, odnosno da u istraživanju sudjeluje veći broj ispitanica. Kako je teško doći do velikog broja ispitanica i uzoraka tkiva mladih žena (histerektomija se uglavnom provodi kod žena u visokoj reproduktivnoj dobi), vrlo dobra alternativa su brisevi ljudskog endocerviksa. Briseve je puno jednostavnije prikupiti te se mogu primijeniti i za žene u mlađoj reproduktivnoj dobi, čime se ujedno povećava i raznolikost i broj uzoraka. Važno je dodatno istražiti ove korelacije jer sva nova saznanja o cervikalnoj sluzi te čimbenicima koji na nju utječu, mogu pomoći pri rješavanju problema neplodnosti te u mnogim područjima medicinske dijagnostike.

6 ZAKLJUČCI

U ovom radu analizirani su udjeli neutralnih i kiselih mucina u žljezdanom epitelu gornjeg i donjeg cervikalnog kanala, na uzorcima ljudskog tkiva endocerviksa (N=15). Radene su usporedbe udjela neutralnih i kiselih mucina s razinama spolnih hormona u serumu ispitanica.

1. Neutralni i kiseli mucini se mogli primjereno razlikovati primjenom histokemijskog bojanja Schiffovim perjodnim reagensom (PAS) i alcijanskim modrilom (AB) na 14 ispitanica. Neutralni mucini pokazali su pozitivnu reakciju na PAS, a kiseli mucini na AB.
2. Analizirani omjeri površina obojanih PAS-om i AB-om u žljezdanom epitelu endocerviksa, upotrebom programa FIJI, pokazali su da ne postoji statistički značajna korelacija položaja žlijezda i udjela neutralnih i kiselih mucina, kao ni faze menstruacijskog ciklusa i udjela neutralnih i kiselih mucina.
3. Nije potvrđena statistički značajna korelacija između udjela neutralnih i kiselih mucina i razine spolnih hormona (estrogena i progesterona) u serumu ispitanica te je pokazano da to vrijedi jednako za gornji kao i za donji dio cerviksa.
4. Kako bi se potvrdili ili opovrgnuli rezultati dobiveni ovim istraživanjem, s obzirom na važnost poznavanja cervikalne sluzi radi boljeg shvaćanja neplodnosti žena, potrebna su daljnja istraživanja, po mogućnosti na većem broju ispitanica te na brisevima endocerviksa koji bi omogućili sudjelovanje ispitanica mlađe reproduktivne dobi.

7 LITERATURA

1. Ali U., Nagi A.H., Naseem N., Ullah E. (2012): Mucin Histochemistry in Tumours of Colon, Ovaries and Lung. *Journal of Cytology & Histology*. 3, 163.
2. Alzamil L., Nikolakopoulou K., Turco M. Y. (2021): Organoid systems to study the human female reproductive tract and pregnancy. *Cell Death Differ.* 28, 35–51.
3. Andersch-Björkman Y., Thomsson K. A., Larsson J. M. H., Ekerhovd E., Hansson G. C. (2007): Large Scale Identification of Proteins, Mucins, and Their O-Glycosylation in the Endocervical Mucus during the Menstrual Cycle. *Molecular & Cellular Proteomics*. 6(4), 708–716.
4. Bansil R. and Turner B. S. (2006): Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 11 (2–3), 164–170.
5. Bhattacharyya S. N., Veit B. C., Manna B., Enriquez J. I., Walker M. P., Khorrami A. M., Kaufman B. (1990): Neutral and acidic human tracheobronchial mucus. *Inflammation*. 14(4), 355–373.
6. Brown, J. B. (2010): Types of ovarian activity in women and their significance: the continuum (a reinterpretation of early findings). *Human Reproduction Update*. 17(2), 141–158.
7. Brown J. B., Harrisson P., Smith M. A. (1985): A study of returning fertility after childbirth and during lactation by measurement of urinary oestrogen and pregnanediol excretion and cervical mucus production. *Journal of biosocial science. Supplement*. 9, 5–23.
8. Brunelli R., Papi M., Arcovito G., Bompiani A., Castagnola M., Parasassi T., Sampaolesi B., Vincenzoni F., De Spirito M. (2007): Globular structure of human ovulatory cervical mucus. *The FASEB Journal*. 21, 3872–3876.
9. Curlin M., Bursac D. (2013): Cervical mucus: from biochemical structure to clinical implications. *Frontiers in Bioscience*. 5, 507–515.
10. Davies J. R., Carlstedt I. (2000): Isolation of large gel-forming mucins. *Methods in Molecular Biology*. 125, 3–13.
11. Dos Santos M. L., Arantes F. P., Santiago K. B., Dos Santos J. E. (2015): Morphological characteristics of the digestive tract of Schizodon knerii (Steindachner, 1875),

- (Characiformes: Anostomidae): An anatomical, histological and histochemical study. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 87(2), 867–878.
12. Flori F., Secciani F., Capone A., Paccagnini E., Caruso S., Ricci M. G., i suradnici (2007): Menstrual cycle-related sialidase activity of the female cervical mucus is associated with exosome-like vesicles. *Fertility and Sterility*. 88(4), 1212–1219.
 13. Fluhmann C. F. (1961): Focal Hyperplasia (Tunnel Clusters) of the Cervix Uteri. *Obstetrics & Gynecology*. 17(2), 206.
 14. Gamble M., Bancroft J. D. (2008): Theory and Practice of Histological Techniques, 6th ed. Churchill Livingstone.
 15. Gervais R., Dumur V., Letombe B., Larde A., Rigot J. M., Roussel P., et al. (1996): Hypofertility with thick cervical mucus: another mild form of cystic fibrosis? *JAMA*. 276(20), 1638.
 16. Gipson I. K., Spurr-Michaud S., Moccia R., Zhan Q., Toribara N., Ho S. B., Gargiulo A. R., Hill J. A. (1999): MUC4 and MUC5B transcripts are the prevalent mucin messenger ribonucleic acids of the human endocervix. *Biology of Reproduction*. 60, 58–64.
 17. Gipson I. K. (2001): Mucins of the human endocervix. *Frontiers in Bioscience*. 6(1), 1245–1255.
 18. Katz D.F. (1991): Human cervical mucus: research update. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 165(6 Pt 2), 1984–1986.
 19. Kesimer M., Makhov A. M., Griffith J. D., Verdugo P., Sheehan J. K. (2010): Unpacking a gel-forming mucin: a view of MUC5B organization after granular release. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 298(1), L15–L22.
 20. Kim Y. S., Gum J. R. Jr., Byrd J. C., Toribara N. W. (1991): The structure of human intestinal apomucins. *The American Review of Respiratory Disease*. 144, (3 Pt 2), 10–14.
 21. Kopito L. E., Kosasky H. J., Sturgis S. H., Lieberman B. L., Shwachman H. (1973): Water and electrolytes in human cervical mucus. *Fertility and Sterility*. 24, 499–506.
 22. Krause W. J. (2000): Brunner's glands: a structural, histochemical and pathological profile. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. 35, 255.
 23. Leppert P. C., Yu S. Y. (1991): Three-dimensional structures of uterine elastic fibers: scanning electron microscopic studies. *Connective Tissue Research*. 27(1), 15–31.

24. Menárguez M., Pastor L. M., Odeblad E. (2003): Morphological characterization of different human cervical mucus types using light and scanning electron microscopy. *Human Reproduction*. 18(9), 1782–1789.
25. Mowry R.W. (1956): Alcian blue techniques for the histochemical study of acidic carbohydrates. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 4, 407.
26. Muchekehu R. W., Quinton P. M. (2010): A new role for bicarbonate secretion in cervico-uterine mucus release. *The Journal of Physiology*. 588(13), 2329–2342.
27. Odeblad E. (1959): The Physics of the Cervical Mucus. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*. 38, 44–58.
28. Odeblad E. (1968): The Functional Structure of Human Cervical Mucus. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*. 47, 57–79.
29. Odeblad E. (1969): Types of human cervical secretion. *Acta Europaea fertilitatis*. 1, 99–116.
30. Odeblad E. (2002): Investigations on the Physiological Basis for Fertility Awareness, *Bulletin Natural Family Planning Council of Victoria*. 29(1), 2–11.
31. Perez-Vilar J., Hill R. L. (1999): The Structure and Assembly of Secreted Mucins. *Journal of Biological Chemistry*, 274(45), 31751–31754.
32. Perez-Vilar J. (2007): Mucin granule intraluminal organization. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 36(2), 183–190.
33. Rose M. C. (2006): Respiratory Tract Mucin Genes and Mucin Glycoproteins in Health and Disease. *Physiological Reviews*. 86(1), 245–278.
34. Rudolfsson C. (1971): Nuclear magnetic resonance and cytometric studies on mucus from single cervical glands. *International Journal of Fertility and Sterility*. 16, 147.
35. Skelin M., Bursać D., Kozina V., Winters T., Macan M., Ćurlin M. (2018): Key molecules in the GABA signalling pathway are present in mouse and human cervical tissue. *Reproduction, Fertility and Development*. 30(9), 1267–1275.
36. Šimunić V. i suradnici (2001): Ženski spolni organi., *Ginekologija*. Naklad Ljevak, Zagreb. 1–10.
37. Tsibris J. C. M. (1987): Cervical Mucus. In: Gold J.J., Josimovich J.B. (eds) *Gynecologic Endocrinology*. Springer, Boston, MA. 175–183.

38. Turner P. (1988): Recent observations on drugs and human fertility. *Postgraduate Medical Journal*. 64(754), 578–80.
39. Verdugo P. (1990): Goblet Cells Secretion and Mucogenesis. *Annual Review of Physiology*. 52(1), 157–176.
40. Zbilut J. P., Colosimo A., Conti F., Colafranceschi M., Manetti C., Valerio M., Webber C. L., Giuliani Jr. A. (2003): Protein aggregation/folding: the role of deterministic singularities of sequence hydrophobicity as determined by nonlinear signal analysis of acylphosphatase and Abeta (1–40). *Biophysical Journal*. 85, 3544–3557.
41. Yang N., Garcia M. A. S., Quinton P. M. (2013): Normal mucus formation requires cAMP-dependent HCO³⁻ secretion and Ca²⁺-mediated mucin exocytosis. *The Journal of Physiology*. 591(18), 4581–4593.
42. <http://www.dsddgenetics.org/index.php?id=48.%20Used%20with%20Permission%20from%20Professor%20Peter%20Koopman,%20PhD,%20FAA%20from%20http://www.dsddgenetics.org> Koopman P. (pristupljeno 3.7.2021.)
43. <https://viosfertility.com/blog/the-menstrual-cycle/> (pristupljeno 3.7.2021.)

8 ŽIVOTOPIS

Ana Smodek rođena je 22. ožujka 1998. godine u Zagrebu. Osnovnoškolsko obrazovanje stekla je u Osnovnoj školi Nikola Tesla, a srednjoškolsko u općoj XI. Gimnaziji (2012.-2016.). Osnovnu glazbenu naobrazbu stekla je u Osnovnoj glazbenoj školi Rudolf Matz (2005.-2009.). Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije (nastavnički smjer) upisala je 2016. godine. Posjeduje C1 razinu engleskog jezika.

9 PRILOG

Prilog rada je tablica sirovih podataka. Sadrži oznake ispitanica, pripadajuće faze menstruacijskog ciklusa, položaj žlezdanog epitela u ljudskom vratu maternice te opisuje pripadajuće preparate – redni broj preparata (od maksimalno 3 po uzorku) te redni broj analiziranog polja. U tablici se nalaze i vrijednosti omjera C/P (omjer površina obojanih crvenom i plavom bojom) za svako analizirano polje izdvojeno iz snimki histoloških preparata žlezdanog tkiva ljudskog vrata maternice obojanih Schiffovim perjodnim reagensom (PAS) i alcijanskim modrilom (AB).

| ID ispitanice | Faza ciklusa | Položaj | Rednji broj preparata | Redni broj polja | Omjer C/P |
|---------------|--------------|---------|-----------------------|------------------|-----------|
| I02 | F | D | 1 | 0 | 0,42245 |
| I02 | F | D | 1 | 2 | 0,44859 |
| I02 | F | D | 1 | 3 | 0,10495 |
| I02 | F | D | 1 | 4 | 0,09272 |
| I02 | F | D | 1 | 5 | 0,05601 |
| I02 | F | D | 1 | 6 | 0,14751 |
| I02 | F | D | 1 | 7 | 0,37290 |
| I02 | F | D | 1 | 8 | 0,52012 |
| I02 | F | D | 1 | 9 | 0,40057 |
| I02 | F | D | 1 | 10 | 0,27258 |
| I02 | F | D | 2 | 1 | 0,08995 |
| I02 | F | D | 2 | 2 | 0,10652 |
| I02 | F | D | 2 | 3 | 0,22864 |
| I02 | F | D | 2 | 4 | 0,19801 |
| I02 | F | D | 2 | 5 | 0,08229 |
| I02 | F | D | 2 | 6 | 0,22917 |
| I02 | F | D | 2 | 7 | 0,17288 |
| I02 | F | D | 2 | 8 | 0,01890 |
| I02 | F | D | 2 | 9 | 0,02565 |
| I02 | F | D | 2 | 10 | 0,00701 |
| I02 | F | D | 3 | 1 | 0,01222 |
| I02 | F | D | 3 | 2 | 0,12736 |
| I02 | F | D | 3 | 3 | 0,42829 |
| I02 | F | D | 3 | 4 | 0,25759 |
| I02 | F | D | 3 | 5 | 0,30906 |
| I02 | F | D | 3 | 6 | 0,40642 |
| I02 | F | D | 3 | 7 | 0,01968 |
| I02 | F | D | 3 | 8 | 0,10680 |
| I02 | F | D | 3 | 9 | 0,14737 |
| I02 | F | D | 3 | 10 | 0,07888 |
| I02 | F | G | 1 | 1 | 0,09020 |
| I02 | F | G | 1 | 2 | 0,08462 |
| I02 | F | G | 1 | 3 | 0,18626 |
| I02 | F | G | 1 | 4 | 0,21357 |
| I02 | F | G | 1 | 5 | 0,15972 |
| I02 | F | G | 1 | 6 | 0,11907 |
| I02 | F | G | 1 | 7 | 0,13910 |
| I02 | F | G | 1 | 8 | 0,09698 |
| I02 | F | G | 1 | 9 | 0,20573 |
| I02 | F | G | 1 | 10 | 0,13792 |
| I02 | F | G | 2 | 1 | 0,13277 |
| I02 | F | G | 2 | 2 | 0,05884 |
| I02 | F | G | 2 | 3 | 0,09465 |
| I02 | F | G | 2 | 4 | 0,06127 |
| I02 | F | G | 2 | 5 | 0,06963 |
| I02 | F | G | 2 | 6 | 0,12063 |
| I02 | F | G | 2 | 7 | 0,19741 |

| | | | | | |
|-----|---|---|---|----|---------|
| I02 | F | G | 2 | 8 | 0,09272 |
| I02 | F | G | 2 | 9 | 0,16924 |
| I02 | F | G | 2 | 10 | 0,18449 |
| I02 | F | G | 3 | 1 | 0,16929 |
| I02 | F | G | 3 | 2 | 0,09286 |
| I02 | F | G | 3 | 3 | 0,21931 |
| I02 | F | G | 3 | 4 | 0,16917 |
| I02 | F | G | 3 | 5 | 0,16661 |
| I02 | F | G | 3 | 6 | 0,20540 |
| I02 | F | G | 3 | 7 | 0,15489 |
| I02 | F | G | 3 | 8 | 0,20294 |
| I02 | F | G | 3 | 9 | 0,29221 |
| I02 | F | G | 3 | 10 | 0,07819 |
| I03 | F | D | 1 | 0 | 0,27508 |
| I03 | F | D | 1 | 2 | 0,48241 |
| I03 | F | D | 1 | 3 | 1,14646 |
| I03 | F | D | 1 | 4 | 1,11564 |
| I03 | F | D | 1 | 5 | 0,15945 |
| I03 | F | D | 1 | 6 | 0,12260 |
| I03 | F | D | 1 | 7 | 0,06274 |
| I03 | F | D | 1 | 8 | 0,08322 |
| I03 | F | D | 1 | 9 | 0,01939 |
| I03 | F | D | 1 | 10 | 0,03853 |
| I03 | F | D | 2 | 1 | 0,25513 |
| I03 | F | D | 2 | 2 | 0,30340 |
| I03 | F | D | 2 | 3 | 0,17705 |
| I03 | F | D | 2 | 4 | 0,24546 |
| I03 | F | D | 2 | 5 | 1,30731 |
| I03 | F | D | 2 | 6 | 0,39402 |
| I03 | F | D | 2 | 7 | 0,19420 |
| I03 | F | D | 2 | 8 | 0,38340 |
| I03 | F | D | 2 | 9 | 0,04608 |
| I03 | F | D | 2 | 10 | 0,01752 |
| I03 | F | D | 3 | 1 | 0,09948 |
| I03 | F | D | 3 | 2 | 0,06853 |
| I03 | F | D | 3 | 3 | 0,10565 |
| I03 | F | D | 3 | 4 | 0,20581 |
| I03 | F | D | 3 | 5 | 0,24765 |
| I03 | F | D | 3 | 6 | 0,28900 |
| I03 | F | D | 3 | 7 | 0,08393 |
| I03 | F | D | 3 | 8 | 0,18503 |
| I03 | F | D | 3 | 9 | 0,07036 |
| I03 | F | D | 3 | 10 | 0,20506 |
| I03 | F | G | 1 | 1 | 0,09197 |
| I03 | F | G | 1 | 2 | 0,09874 |
| I03 | F | G | 1 | 3 | 0,12751 |
| I03 | F | G | 1 | 4 | 0,14482 |
| I03 | F | G | 1 | 5 | 0,15207 |
| I03 | F | G | 1 | 6 | 0,21500 |
| I03 | F | G | 1 | 7 | 0,16625 |

| | | | | | |
|-----|---|---|---|----|---------|
| I03 | F | G | 1 | 8 | 0,15804 |
| I03 | F | G | 1 | 9 | 0,11624 |
| I03 | F | G | 1 | 10 | 0,06536 |
| I03 | F | G | 2 | 1 | 0,67854 |
| I03 | F | G | 2 | 2 | 0,32842 |
| I03 | F | G | 2 | 3 | 0,18377 |
| I03 | F | G | 2 | 4 | 0,29979 |
| I03 | F | G | 2 | 5 | 0,06664 |
| I03 | F | G | 2 | 6 | 0,11070 |
| I03 | F | G | 2 | 7 | 0,16113 |
| I03 | F | G | 2 | 8 | 0,08460 |
| I03 | F | G | 2 | 9 | 0,15939 |
| I03 | F | G | 2 | 10 | 0,33933 |
| I03 | F | G | 3 | 1 | 0,18426 |
| I03 | F | G | 3 | 2 | 0,56360 |
| I03 | F | G | 3 | 3 | 0,15208 |
| I03 | F | G | 3 | 4 | 0,32986 |
| I03 | F | G | 3 | 5 | 0,61786 |
| I03 | F | G | 3 | 6 | 1,32429 |
| I03 | F | G | 3 | 7 | 0,79961 |
| I03 | F | G | 3 | 8 | 0,38248 |
| I03 | F | G | 3 | 9 | 0,43794 |
| I03 | F | G | 3 | 10 | 0,25967 |
| I04 | L | D | 1 | 0 | 0,34116 |
| I04 | L | D | 1 | 2 | 0,24029 |
| I04 | L | D | 1 | 3 | 0,15997 |
| I04 | L | D | 1 | 4 | 0,44062 |
| I04 | L | D | 1 | 5 | 0,19543 |
| I04 | L | D | 1 | 6 | 0,11105 |
| I04 | L | D | 1 | 7 | 0,28731 |
| I04 | L | D | 1 | 8 | 0,42420 |
| I04 | L | D | 1 | 9 | 0,48957 |
| I04 | L | D | 1 | 10 | 0,53135 |
| I04 | L | D | 2 | 1 | 0,09925 |
| I04 | L | D | 2 | 2 | 0,21617 |
| I04 | L | D | 2 | 3 | 0,24896 |
| I04 | L | D | 2 | 4 | 0,35030 |
| I04 | L | D | 2 | 5 | 0,24734 |
| I04 | L | D | 2 | 6 | 0,10140 |
| I04 | L | D | 2 | 7 | 0,11049 |
| I04 | L | D | 2 | 8 | 0,11177 |
| I04 | L | D | 2 | 9 | 0,23740 |
| I04 | L | D | 2 | 10 | 0,25060 |
| I04 | L | D | 3 | 1 | 1,81381 |
| I04 | L | D | 3 | 2 | 0,59846 |
| I04 | L | D | 3 | 3 | 0,72218 |
| I04 | L | D | 3 | 4 | 1,16822 |
| I04 | L | D | 3 | 5 | 0,60113 |
| I04 | L | D | 3 | 6 | 0,89079 |
| I04 | L | D | 3 | 7 | 0,49732 |

| | | | | | |
|-----|---|---|---|----|---------|
| I04 | L | D | 3 | 8 | 0,55485 |
| I04 | L | D | 3 | 9 | 0,57735 |
| I04 | L | D | 3 | 10 | 0,94495 |
| I04 | L | G | 1 | 1 | 0,19241 |
| I04 | L | G | 1 | 2 | 0,03351 |
| I04 | L | G | 1 | 3 | 0,16790 |
| I04 | L | G | 1 | 4 | 0,14627 |
| I04 | L | G | 1 | 5 | 0,17240 |
| I04 | L | G | 1 | 6 | 0,07268 |
| I04 | L | G | 1 | 7 | 0,03266 |
| I04 | L | G | 1 | 8 | 0,11634 |
| I04 | L | G | 1 | 9 | 0,27072 |
| I04 | L | G | 1 | 10 | 0,12379 |
| I04 | L | G | 2 | 1 | 0,00000 |
| I04 | L | G | 2 | 2 | 0,00000 |
| I04 | L | G | 2 | 3 | 0,00000 |
| I04 | L | G | 2 | 4 | 0,00000 |
| I04 | L | G | 2 | 5 | 0,00000 |
| I04 | L | G | 2 | 6 | 0,00000 |
| I04 | L | G | 2 | 7 | 0,00000 |
| I04 | L | G | 2 | 8 | 0,00000 |
| I04 | L | G | 2 | 9 | 0,00000 |
| I04 | L | G | 2 | 10 | 0,00000 |
| I04 | L | G | 3 | 1 | 0,00000 |
| I04 | L | G | 3 | 2 | 0,00000 |
| I04 | L | G | 3 | 3 | 0,00000 |
| I04 | L | G | 3 | 4 | 0,00000 |
| I04 | L | G | 3 | 5 | 0,00000 |
| I04 | L | G | 3 | 6 | 0,00000 |
| I04 | L | G | 3 | 7 | 0,00000 |
| I04 | L | G | 3 | 8 | 0,00000 |
| I04 | L | G | 3 | 9 | 0,00000 |
| I04 | L | G | 3 | 10 | 0,00000 |
| I05 | L | D | 1 | 0 | 0,64743 |
| I05 | L | D | 1 | 2 | 0,69576 |
| I05 | L | D | 1 | 3 | 0,37852 |
| I05 | L | D | 1 | 4 | 0,11735 |
| I05 | L | D | 1 | 5 | 0,25881 |
| I05 | L | D | 1 | 6 | 0,36035 |
| I05 | L | D | 1 | 7 | 0,31411 |
| I05 | L | D | 1 | 8 | 0,13264 |
| I05 | L | D | 1 | 9 | 0,85839 |
| I05 | L | D | 1 | 10 | 0,46847 |
| I05 | L | D | 2 | 1 | 0,00000 |
| I05 | L | D | 2 | 2 | 6,13077 |
| I05 | L | D | 2 | 3 | 2,67017 |
| I05 | L | D | 2 | 4 | 1,70914 |
| I05 | L | D | 2 | 5 | 1,90159 |
| I05 | L | D | 2 | 6 | 0,45310 |
| I05 | L | D | 2 | 7 | 2,14451 |

| | | | | | |
|-----|---|---|---|----|---------|
| I05 | L | D | 2 | 8 | 4,24635 |
| I05 | L | D | 2 | 9 | 1,16284 |
| I05 | L | D | 2 | 10 | 0,15308 |
| I05 | L | D | 3 | 1 | 0,00000 |
| I05 | L | D | 3 | 2 | 0,00000 |
| I05 | L | D | 3 | 3 | 0,00000 |
| I05 | L | D | 3 | 4 | 0,00000 |
| I05 | L | D | 3 | 5 | 0,00000 |
| I05 | L | D | 3 | 6 | 0,00000 |
| I05 | L | D | 3 | 7 | 0,00000 |
| I05 | L | D | 3 | 8 | 0,00000 |
| I05 | L | D | 3 | 9 | 0,00000 |
| I05 | L | D | 3 | 10 | 0,00000 |
| I05 | L | G | 1 | 1 | 0,24820 |
| I05 | L | G | 1 | 2 | 0,18078 |
| I05 | L | G | 1 | 3 | 0,30007 |
| I05 | L | G | 1 | 4 | 0,50012 |
| I05 | L | G | 1 | 5 | 0,25537 |
| I05 | L | G | 1 | 6 | 0,19062 |
| I05 | L | G | 1 | 7 | 0,19235 |
| I05 | L | G | 1 | 8 | 0,43327 |
| I05 | L | G | 1 | 9 | 0,22258 |
| I05 | L | G | 1 | 10 | 0,11235 |
| I05 | L | G | 2 | 1 | 0,07535 |
| I05 | L | G | 2 | 2 | 0,08515 |
| I05 | L | G | 2 | 3 | 0,08256 |
| I05 | L | G | 2 | 4 | 0,04275 |
| I05 | L | G | 2 | 5 | 0,02843 |
| I05 | L | G | 2 | 6 | 0,01770 |
| I05 | L | G | 2 | 7 | 0,00647 |
| I05 | L | G | 2 | 8 | 1,00000 |
| I05 | L | G | 2 | 9 | 0,02132 |
| I05 | L | G | 2 | 10 | 0,04208 |
| I05 | L | G | 3 | 1 | 0,02295 |
| I05 | L | G | 3 | 2 | 0,01068 |
| I05 | L | G | 3 | 3 | 0,03928 |
| I05 | L | G | 3 | 4 | 0,06790 |
| I05 | L | G | 3 | 5 | 0,07986 |
| I05 | L | G | 3 | 6 | 0,02665 |
| I05 | L | G | 3 | 7 | 0,15597 |
| I05 | L | G | 3 | 8 | 0,08026 |
| I05 | L | G | 3 | 9 | 0,13529 |
| I05 | L | G | 3 | 10 | 0,08987 |
| I06 | L | D | 1 | 0 | 0,48660 |
| I06 | L | D | 1 | 2 | 0,40491 |
| I06 | L | D | 1 | 3 | 0,59431 |
| I06 | L | D | 1 | 4 | 0,68661 |
| I06 | L | D | 1 | 5 | 0,26777 |
| I06 | L | D | 1 | 6 | 0,43269 |
| I06 | L | D | 1 | 7 | 0,62213 |

| | | | | | |
|-----|---|---|---|----|---------|
| I06 | L | D | 1 | 8 | 1,97990 |
| I06 | L | D | 1 | 9 | 0,48157 |
| I06 | L | D | 1 | 10 | 0,56446 |
| I06 | L | D | 2 | 1 | 0,02921 |
| I06 | L | D | 2 | 2 | 0,06868 |
| I06 | L | D | 2 | 3 | 0,10386 |
| I06 | L | D | 2 | 4 | 0,12984 |
| I06 | L | D | 2 | 5 | 0,11448 |
| I06 | L | D | 2 | 6 | 0,11621 |
| I06 | L | D | 2 | 7 | 0,08695 |
| I06 | L | D | 2 | 8 | 0,16973 |
| I06 | L | D | 2 | 9 | 0,14088 |
| I06 | L | D | 2 | 10 | 0,14818 |
| I06 | L | D | 3 | 1 | 0,05344 |
| I06 | L | D | 3 | 2 | 0,06920 |
| I06 | L | D | 3 | 3 | 0,11093 |
| I06 | L | D | 3 | 4 | 0,02616 |
| I06 | L | D | 3 | 5 | 0,07653 |
| I06 | L | D | 3 | 6 | 0,10840 |
| I06 | L | D | 3 | 7 | 0,12907 |
| I06 | L | D | 3 | 8 | 0,06848 |
| I06 | L | D | 3 | 9 | 0,10048 |
| I06 | L | D | 3 | 10 | 0,04053 |
| I06 | L | G | 1 | 1 | 0,23665 |
| I06 | L | G | 1 | 2 | 0,38923 |
| I06 | L | G | 1 | 3 | 1,50682 |
| I06 | L | G | 1 | 4 | 0,49160 |
| I06 | L | G | 1 | 5 | 0,45295 |
| I06 | L | G | 1 | 6 | 0,45617 |
| I06 | L | G | 1 | 7 | 0,30380 |
| I06 | L | G | 1 | 8 | 0,30941 |
| I06 | L | G | 1 | 9 | 0,23175 |
| I06 | L | G | 1 | 10 | 0,77496 |
| I06 | L | G | 2 | 1 | 0,21738 |
| I06 | L | G | 2 | 2 | 0,15031 |
| I06 | L | G | 2 | 3 | 0,14055 |
| I06 | L | G | 2 | 4 | 0,14814 |
| I06 | L | G | 2 | 5 | 0,17574 |
| I06 | L | G | 2 | 6 | 0,38154 |
| I06 | L | G | 2 | 7 | 0,21415 |
| I06 | L | G | 2 | 8 | 0,57780 |
| I06 | L | G | 2 | 9 | 0,54999 |
| I06 | L | G | 2 | 10 | 0,25027 |
| I06 | L | G | 3 | 1 | 0,32932 |
| I06 | L | G | 3 | 2 | 0,44111 |
| I06 | L | G | 3 | 3 | 0,65594 |
| I06 | L | G | 3 | 4 | 0,86008 |
| I06 | L | G | 3 | 5 | 0,54711 |
| I06 | L | G | 3 | 6 | 0,56830 |
| I06 | L | G | 3 | 7 | 0,31884 |

| | | | | | |
|-----|---|---|---|----|---------|
| I06 | L | G | 3 | 8 | 0,53211 |
| I06 | L | G | 3 | 9 | 0,37644 |
| I06 | L | G | 3 | 10 | 0,30552 |
| I07 | F | D | 1 | 0 | 0,04651 |
| I07 | F | D | 1 | 2 | 0,03796 |
| I07 | F | D | 1 | 3 | 0,03729 |
| I07 | F | D | 1 | 4 | 0,03373 |
| I07 | F | D | 1 | 5 | 0,07794 |
| I07 | F | D | 1 | 6 | 0,10447 |
| I07 | F | D | 1 | 7 | 0,03791 |
| I07 | F | D | 1 | 8 | 0,07313 |
| I07 | F | D | 1 | 9 | 0,04606 |
| I07 | F | D | 1 | 10 | 0,02611 |
| I07 | F | D | 2 | 1 | 0,06031 |
| I07 | F | D | 2 | 2 | 0,03791 |
| I07 | F | D | 2 | 3 | 0,05102 |
| I07 | F | D | 2 | 4 | 0,00980 |
| I07 | F | D | 2 | 5 | 0,10936 |
| I07 | F | D | 2 | 6 | 0,16704 |
| I07 | F | D | 2 | 7 | 0,12750 |
| I07 | F | D | 2 | 8 | 0,14857 |
| I07 | F | D | 2 | 9 | 0,03769 |
| I07 | F | D | 2 | 10 | 0,22366 |
| I07 | F | D | 3 | 1 | 0,02682 |
| I07 | F | D | 3 | 2 | 0,02751 |
| I07 | F | D | 3 | 3 | 0,03361 |
| I07 | F | D | 3 | 4 | 0,07676 |
| I07 | F | D | 3 | 5 | 0,08972 |
| I07 | F | D | 3 | 6 | 0,01264 |
| I07 | F | D | 3 | 7 | 0,01547 |
| I07 | F | D | 3 | 8 | 0,04020 |
| I07 | F | D | 3 | 9 | 0,14269 |
| I07 | F | D | 3 | 10 | 0,09314 |
| I07 | F | G | 1 | 1 | 0,08644 |
| I07 | F | G | 1 | 2 | 0,15730 |
| I07 | F | G | 1 | 3 | 0,24750 |
| I07 | F | G | 1 | 4 | 0,13249 |
| I07 | F | G | 1 | 5 | 0,27102 |
| I07 | F | G | 1 | 6 | 0,10260 |
| I07 | F | G | 1 | 7 | 0,09407 |
| I07 | F | G | 1 | 8 | 0,11848 |
| I07 | F | G | 1 | 9 | 0,10396 |
| I07 | F | G | 1 | 10 | 0,27143 |
| I07 | F | G | 2 | 1 | 0,06031 |
| I07 | F | G | 2 | 2 | 0,08434 |
| I07 | F | G | 2 | 3 | 0,05815 |
| I07 | F | G | 2 | 4 | 0,15449 |
| I07 | F | G | 2 | 5 | 0,10136 |
| I07 | F | G | 2 | 6 | 0,10260 |
| I07 | F | G | 2 | 7 | 0,11799 |

| | | | | | |
|-----|---|---|---|----|---------|
| I07 | F | G | 2 | 8 | 0,10124 |
| I07 | F | G | 2 | 9 | 0,20071 |
| I07 | F | G | 2 | 10 | 0,07238 |
| I07 | F | G | 3 | 1 | 0,11691 |
| I07 | F | G | 3 | 2 | 0,03636 |
| I07 | F | G | 3 | 3 | 0,13562 |
| I07 | F | G | 3 | 4 | 0,07404 |
| I07 | F | G | 3 | 5 | 0,02802 |
| I07 | F | G | 3 | 6 | 0,13527 |
| I07 | F | G | 3 | 7 | 0,09262 |
| I07 | F | G | 3 | 8 | 0,13256 |
| I07 | F | G | 3 | 9 | 0,09885 |
| I07 | F | G | 3 | 10 | 0,10992 |
| I08 | L | D | 1 | 0 | 0,12236 |
| I08 | L | D | 1 | 2 | 0,24610 |
| I08 | L | D | 1 | 3 | 0,11656 |
| I08 | L | D | 1 | 4 | 0,20085 |
| I08 | L | D | 1 | 5 | 0,18448 |
| I08 | L | D | 1 | 6 | 0,10573 |
| I08 | L | D | 1 | 7 | 0,16195 |
| I08 | L | D | 1 | 8 | 0,24231 |
| I08 | L | D | 1 | 9 | 0,19694 |
| I08 | L | D | 1 | 10 | 0,24100 |
| I08 | L | D | 2 | 1 | 0,86109 |
| I08 | L | D | 2 | 2 | 0,13396 |
| I08 | L | D | 2 | 3 | 0,23852 |
| I08 | L | D | 2 | 4 | 0,39963 |
| I08 | L | D | 2 | 5 | 0,58616 |
| I08 | L | D | 2 | 6 | 1,31422 |
| I08 | L | D | 2 | 7 | 0,46874 |
| I08 | L | D | 2 | 8 | 0,61753 |
| I08 | L | D | 2 | 9 | 0,54666 |
| I08 | L | D | 2 | 10 | 0,33434 |
| I08 | L | D | 3 | 1 | 1,23772 |
| I08 | L | D | 3 | 2 | 0,39188 |
| I08 | L | D | 3 | 3 | 0,63135 |
| I08 | L | D | 3 | 4 | 0,67732 |
| I08 | L | D | 3 | 5 | 1,44343 |
| I08 | L | D | 3 | 6 | 0,25385 |
| I08 | L | D | 3 | 7 | 0,22745 |
| I08 | L | D | 3 | 8 | 0,26325 |
| I08 | L | D | 3 | 9 | 0,20703 |
| I08 | L | D | 3 | 10 | 0,94924 |
| I08 | L | G | 1 | 1 | 1,34353 |
| I08 | L | G | 1 | 2 | 0,74137 |
| I08 | L | G | 1 | 3 | 2,90888 |
| I08 | L | G | 1 | 4 | 0,24405 |
| I08 | L | G | 1 | 5 | 0,11129 |
| I08 | L | G | 1 | 6 | 0,13294 |
| I08 | L | G | 1 | 7 | 0,39050 |

| | | | | | |
|-----|---|---|---|----|---------|
| I08 | L | G | 1 | 8 | 2,89295 |
| I08 | L | G | 1 | 9 | 0,12116 |
| I08 | L | G | 1 | 10 | 0,37886 |
| I08 | L | G | 2 | 1 | 1,42522 |
| I08 | L | G | 2 | 2 | 0,47575 |
| I08 | L | G | 2 | 3 | 0,52112 |
| I08 | L | G | 2 | 4 | 0,78481 |
| I08 | L | G | 2 | 5 | 1,79333 |
| I08 | L | G | 2 | 6 | 0,33348 |
| I08 | L | G | 2 | 7 | 0,61664 |
| I08 | L | G | 2 | 8 | 3,79371 |
| I08 | L | G | 2 | 9 | 0,74589 |
| I08 | L | G | 2 | 10 | 1,52595 |
| I08 | L | G | 3 | 1 | 0,72076 |
| I08 | L | G | 3 | 2 | 0,18522 |
| I08 | L | G | 3 | 3 | 0,31182 |
| I08 | L | G | 3 | 4 | 0,35932 |
| I08 | L | G | 3 | 5 | 0,98641 |
| I08 | L | G | 3 | 6 | 2,08361 |
| I08 | L | G | 3 | 7 | 0,77122 |
| I08 | L | G | 3 | 8 | 0,74806 |
| I08 | L | G | 3 | 9 | 1,59364 |
| I08 | L | G | 3 | 10 | 1,75912 |
| I10 | F | D | 1 | 0 | 0,15070 |
| I10 | F | D | 1 | 2 | 0,79544 |
| I10 | F | D | 1 | 3 | 0,05381 |
| I10 | F | D | 1 | 4 | 0,08536 |
| I10 | F | D | 1 | 5 | 0,06277 |
| I10 | F | D | 1 | 6 | 0,14971 |
| I10 | F | D | 1 | 7 | 0,21172 |
| I10 | F | D | 1 | 8 | 0,23856 |
| I10 | F | D | 1 | 9 | 0,07679 |
| I10 | F | D | 1 | 10 | 0,13572 |
| I10 | F | D | 2 | 1 | 0,13167 |
| I10 | F | D | 2 | 2 | 0,04775 |
| I10 | F | D | 2 | 3 | 0,16710 |
| I10 | F | D | 2 | 4 | 0,06691 |
| I10 | F | D | 2 | 5 | 0,15802 |
| I10 | F | D | 2 | 6 | 0,38127 |
| I10 | F | D | 2 | 7 | 0,31498 |
| I10 | F | D | 2 | 8 | 0,08189 |
| I10 | F | D | 2 | 9 | 0,07845 |
| I10 | F | D | 2 | 10 | 0,03716 |
| I10 | F | D | 3 | 1 | 0,16368 |
| I10 | F | D | 3 | 2 | 0,30736 |
| I10 | F | D | 3 | 3 | 0,19512 |
| I10 | F | D | 3 | 4 | 0,20109 |
| I10 | F | D | 3 | 5 | 0,06728 |
| I10 | F | D | 3 | 6 | 0,09497 |
| I10 | F | D | 3 | 7 | 0,04181 |

| | | | | | |
|-----|---|---|---|----|---------|
| I10 | F | D | 3 | 8 | 0,24827 |
| I10 | F | D | 3 | 9 | 0,26323 |
| I10 | F | D | 3 | 10 | 0,21389 |
| I10 | F | G | 1 | 1 | 0,19995 |
| I10 | F | G | 1 | 2 | 0,39093 |
| I10 | F | G | 1 | 3 | 0,30150 |
| I10 | F | G | 1 | 4 | 0,25909 |
| I10 | F | G | 1 | 5 | 0,26431 |
| I10 | F | G | 1 | 6 | 0,12564 |
| I10 | F | G | 1 | 7 | 0,21503 |
| I10 | F | G | 1 | 8 | 0,19713 |
| I10 | F | G | 1 | 9 | 0,12310 |
| I10 | F | G | 1 | 10 | 0,20521 |
| I10 | F | G | 2 | 1 | 0,21028 |
| I10 | F | G | 2 | 2 | 0,14522 |
| I10 | F | G | 2 | 3 | 0,33439 |
| I10 | F | G | 2 | 4 | 0,07622 |
| I10 | F | G | 2 | 5 | 0,13748 |
| I10 | F | G | 2 | 6 | 0,07844 |
| I10 | F | G | 2 | 7 | 0,15796 |
| I10 | F | G | 2 | 8 | 0,20505 |
| I10 | F | G | 2 | 9 | 0,46801 |
| I10 | F | G | 2 | 10 | 0,68910 |
| I10 | F | G | 3 | 1 | 0,00000 |
| I10 | F | G | 3 | 2 | 0,00000 |
| I10 | F | G | 3 | 3 | 0,00000 |
| I10 | F | G | 3 | 4 | 0,00000 |
| I10 | F | G | 3 | 5 | 0,00000 |
| I10 | F | G | 3 | 6 | 0,00000 |
| I10 | F | G | 3 | 7 | 0,00000 |
| I10 | F | G | 3 | 8 | 0,00000 |
| I10 | F | G | 3 | 9 | 0,00000 |
| I10 | F | G | 3 | 10 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 1 | 0 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 1 | 2 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 1 | 3 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 1 | 4 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 1 | 5 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 1 | 6 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 1 | 7 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 1 | 8 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 1 | 9 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 1 | 10 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 2 | 1 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 2 | 2 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 2 | 3 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 2 | 4 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 2 | 5 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 2 | 6 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 2 | 7 | 0,00000 |

| | | | | | |
|-----|---|---|---|----|---------|
| I12 | L | D | 2 | 8 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 2 | 9 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 2 | 10 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 3 | 1 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 3 | 2 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 3 | 3 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 3 | 4 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 3 | 5 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 3 | 6 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 3 | 7 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 3 | 8 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 3 | 9 | 0,00000 |
| I12 | L | D | 3 | 10 | 0,00000 |
| I12 | L | G | 1 | 1 | 0,03593 |
| I12 | L | G | 1 | 2 | 0,01052 |
| I12 | L | G | 1 | 3 | 0,02738 |
| I12 | L | G | 1 | 4 | 0,13424 |
| I12 | L | G | 1 | 5 | 0,03053 |
| I12 | L | G | 1 | 6 | 0,30551 |
| I12 | L | G | 1 | 7 | 0,34668 |
| I12 | L | G | 1 | 8 | 0,39919 |
| I12 | L | G | 1 | 9 | 0,15929 |
| I12 | L | G | 1 | 10 | 0,18014 |
| I12 | L | G | 2 | 1 | 0,17535 |
| I12 | L | G | 2 | 2 | 0,29686 |
| I12 | L | G | 2 | 3 | 0,23575 |
| I12 | L | G | 2 | 4 | 0,18417 |
| I12 | L | G | 2 | 5 | 0,14311 |
| I12 | L | G | 2 | 6 | 0,07888 |
| I12 | L | G | 2 | 7 | 0,10476 |
| I12 | L | G | 2 | 8 | 0,23127 |
| I12 | L | G | 2 | 9 | 0,21294 |
| I12 | L | G | 2 | 10 | 0,28746 |
| I12 | L | G | 3 | 1 | 0,17538 |
| I12 | L | G | 3 | 2 | 0,19070 |
| I12 | L | G | 3 | 3 | 0,14613 |
| I12 | L | G | 3 | 4 | 0,08172 |
| I12 | L | G | 3 | 5 | 0,18890 |
| I12 | L | G | 3 | 6 | 0,19373 |
| I12 | L | G | 3 | 7 | 0,13206 |
| I12 | L | G | 3 | 8 | 0,13663 |
| I12 | L | G | 3 | 9 | 0,25931 |
| I12 | L | G | 3 | 10 | 0,32289 |
| I13 | F | D | 1 | 0 | 0,27252 |
| I13 | F | D | 1 | 2 | 0,28657 |
| I13 | F | D | 1 | 3 | 0,27854 |
| I13 | F | D | 1 | 4 | 0,29763 |
| I13 | F | D | 1 | 5 | 0,35626 |
| I13 | F | D | 1 | 6 | 0,23454 |
| I13 | F | D | 1 | 7 | 0,38422 |

| | | | | | |
|-----|---|---|---|----|---------|
| I13 | F | D | 1 | 8 | 0,40096 |
| I13 | F | D | 1 | 9 | 0,35844 |
| I13 | F | D | 1 | 10 | 0,68149 |
| I13 | F | D | 2 | 1 | 0,15423 |
| I13 | F | D | 2 | 2 | 0,23403 |
| I13 | F | D | 2 | 3 | 0,38513 |
| I13 | F | D | 2 | 4 | 1,09666 |
| I13 | F | D | 2 | 5 | 3,08198 |
| I13 | F | D | 2 | 6 | 0,87647 |
| I13 | F | D | 2 | 7 | 0,12304 |
| I13 | F | D | 2 | 8 | 0,33739 |
| I13 | F | D | 2 | 9 | 0,25540 |
| I13 | F | D | 2 | 10 | 0,70789 |
| I13 | F | D | 3 | 1 | 0,25390 |
| I13 | F | D | 3 | 2 | 0,43633 |
| I13 | F | D | 3 | 3 | 0,26952 |
| I13 | F | D | 3 | 4 | 0,49113 |
| I13 | F | D | 3 | 5 | 0,40549 |
| I13 | F | D | 3 | 6 | 0,90678 |
| I13 | F | D | 3 | 7 | 1,17774 |
| I13 | F | D | 3 | 8 | 0,48600 |
| I13 | F | D | 3 | 9 | 0,61650 |
| I13 | F | D | 3 | 10 | 0,79685 |
| I13 | F | G | 1 | 1 | 0,01776 |
| I13 | F | G | 1 | 2 | 0,07102 |
| I13 | F | G | 1 | 3 | 0,08258 |
| I13 | F | G | 1 | 4 | 0,11146 |
| I13 | F | G | 1 | 5 | 0,10491 |
| I13 | F | G | 1 | 6 | 0,15722 |
| I13 | F | G | 1 | 7 | 0,16013 |
| I13 | F | G | 1 | 8 | 0,02598 |
| I13 | F | G | 1 | 9 | 0,03954 |
| I13 | F | G | 1 | 10 | 0,03314 |
| I13 | F | G | 2 | 1 | 0,05503 |
| I13 | F | G | 2 | 2 | 0,01629 |
| I13 | F | G | 2 | 3 | 0,06120 |
| I13 | F | G | 2 | 4 | 0,02483 |
| I13 | F | G | 2 | 5 | 0,08426 |
| I13 | F | G | 2 | 6 | 0,00981 |
| I13 | F | G | 2 | 7 | 0,04676 |
| I13 | F | G | 2 | 8 | 0,05607 |
| I13 | F | G | 2 | 9 | 0,06360 |
| I13 | F | G | 2 | 10 | 0,07923 |
| I13 | F | G | 3 | 1 | 0,21116 |
| I13 | F | G | 3 | 2 | 0,15816 |
| I13 | F | G | 3 | 3 | 0,30127 |
| I13 | F | G | 3 | 4 | 0,15998 |
| I13 | F | G | 3 | 5 | 0,14788 |
| I13 | F | G | 3 | 6 | 0,24012 |
| I13 | F | G | 3 | 7 | 0,10658 |

| | | | | | |
|-----|---|---|---|----|---------|
| I13 | F | G | 3 | 8 | 0,13404 |
| I13 | F | G | 3 | 9 | 0,29598 |
| I13 | F | G | 3 | 10 | 0,12302 |
| I14 | P | D | 1 | 0 | 0,43011 |
| I14 | P | D | 1 | 2 | 0,52711 |
| I14 | P | D | 1 | 3 | 1,18582 |
| I14 | P | D | 1 | 4 | 1,07861 |
| I14 | P | D | 1 | 5 | 1,75728 |
| I14 | P | D | 1 | 6 | 0,40504 |
| I14 | P | D | 1 | 7 | 0,48203 |
| I14 | P | D | 1 | 8 | 0,24893 |
| I14 | P | D | 1 | 9 | 0,42616 |
| I14 | P | D | 1 | 10 | 0,26945 |
| I14 | P | D | 2 | 1 | 0,11373 |
| I14 | P | D | 2 | 2 | 0,10162 |
| I14 | P | D | 2 | 3 | 0,21045 |
| I14 | P | D | 2 | 4 | 0,16436 |
| I14 | P | D | 2 | 5 | 0,16834 |
| I14 | P | D | 2 | 6 | 0,11869 |
| I14 | P | D | 2 | 7 | 0,17534 |
| I14 | P | D | 2 | 8 | 1,28774 |
| I14 | P | D | 2 | 9 | 0,33011 |
| I14 | P | D | 2 | 10 | 0,55700 |
| I14 | P | D | 3 | 1 | 1,35279 |
| I14 | P | D | 3 | 2 | 0,86970 |
| I14 | P | D | 3 | 3 | 1,35331 |
| I14 | P | D | 3 | 4 | 1,07083 |
| I14 | P | D | 3 | 5 | 0,28684 |
| I14 | P | D | 3 | 6 | 0,80540 |
| I14 | P | D | 3 | 7 | 0,42085 |
| I14 | P | D | 3 | 8 | 0,25941 |
| I14 | P | D | 3 | 9 | 0,22363 |
| I14 | P | D | 3 | 10 | 0,49016 |
| I14 | P | G | 1 | 1 | 0,11076 |
| I14 | P | G | 1 | 2 | 0,41260 |
| I14 | P | G | 1 | 3 | 0,16526 |
| I14 | P | G | 1 | 4 | 0,28008 |
| I14 | P | G | 1 | 5 | 0,23439 |
| I14 | P | G | 1 | 6 | 0,03780 |
| I14 | P | G | 1 | 7 | 0,04096 |
| I14 | P | G | 1 | 8 | 0,12405 |
| I14 | P | G | 1 | 9 | #DIV/0! |
| I14 | P | G | 1 | 10 | 0,41178 |
| I14 | P | G | 2 | 1 | 0,10736 |
| I14 | P | G | 2 | 2 | 0,21314 |
| I14 | P | G | 2 | 3 | 0,03540 |
| I14 | P | G | 2 | 4 | 0,27287 |
| I14 | P | G | 2 | 5 | 0,42984 |
| I14 | P | G | 2 | 6 | 0,10647 |
| I14 | P | G | 2 | 7 | 0,07114 |

| | | | | | |
|-----|---|---|---|----|---------|
| I14 | P | G | 2 | 8 | 0,33980 |
| I14 | P | G | 2 | 9 | 0,34064 |
| I14 | P | G | 2 | 10 | 0,07291 |
| I14 | P | G | 3 | 1 | 0,04847 |
| I14 | P | G | 3 | 2 | 0,04989 |
| I14 | P | G | 3 | 3 | 0,08386 |
| I14 | P | G | 3 | 4 | 0,04372 |
| I14 | P | G | 3 | 5 | 0,02076 |
| I14 | P | G | 3 | 6 | 0,14787 |
| I14 | P | G | 3 | 7 | 0,10032 |
| I14 | P | G | 3 | 8 | 0,14026 |
| I14 | P | G | 3 | 9 | 0,14996 |
| I14 | P | G | 3 | 10 | 0,10348 |
| I15 | F | D | 1 | 0 | 1,22946 |
| I15 | F | D | 1 | 2 | 0,67938 |
| I15 | F | D | 1 | 3 | 0,53401 |
| I15 | F | D | 1 | 4 | 0,74529 |
| I15 | F | D | 1 | 5 | 1,63618 |
| I15 | F | D | 1 | 6 | 1,82303 |
| I15 | F | D | 1 | 7 | 2,23693 |
| I15 | F | D | 1 | 8 | 1,55675 |
| I15 | F | D | 1 | 9 | 1,48494 |
| I15 | F | D | 1 | 10 | 2,51056 |
| I15 | F | D | 2 | 1 | 4,04447 |
| I15 | F | D | 2 | 2 | 2,43783 |
| I15 | F | D | 2 | 3 | 2,02487 |
| I15 | F | D | 2 | 4 | 1,11092 |
| I15 | F | D | 2 | 5 | 0,80704 |
| I15 | F | D | 2 | 6 | 0,73902 |
| I15 | F | D | 2 | 7 | 2,12393 |
| I15 | F | D | 2 | 8 | 2,07331 |
| I15 | F | D | 2 | 9 | 1,03016 |
| I15 | F | D | 2 | 10 | 1,39738 |
| I15 | F | D | 3 | 1 | 0,73090 |
| I15 | F | D | 3 | 2 | 0,69070 |
| I15 | F | D | 3 | 3 | 0,74643 |
| I15 | F | D | 3 | 4 | 0,53250 |
| I15 | F | D | 3 | 5 | 0,90627 |
| I15 | F | D | 3 | 6 | 0,77221 |
| I15 | F | D | 3 | 7 | 0,80029 |
| I15 | F | D | 3 | 8 | 0,90355 |
| I15 | F | D | 3 | 9 | 1,18979 |
| I15 | F | D | 3 | 10 | 1,32281 |
| I15 | F | G | 1 | 1 | 0,76132 |
| I15 | F | G | 1 | 2 | 0,71470 |
| I15 | F | G | 1 | 3 | 0,49121 |
| I15 | F | G | 1 | 4 | 0,46745 |
| I15 | F | G | 1 | 5 | 0,79638 |
| I15 | F | G | 1 | 6 | 0,78790 |
| I15 | F | G | 1 | 7 | 0,36149 |

| | | | | | |
|-----|---|---|---|----|---------|
| I15 | F | G | 1 | 8 | 0,41420 |
| I15 | F | G | 1 | 9 | 0,22554 |
| I15 | F | G | 1 | 10 | 0,42769 |
| I15 | F | G | 2 | 1 | 1,13581 |
| I15 | F | G | 2 | 2 | 0,37835 |
| I15 | F | G | 2 | 3 | 0,30784 |
| I15 | F | G | 2 | 4 | 1,06354 |
| I15 | F | G | 2 | 5 | 0,51581 |
| I15 | F | G | 2 | 6 | 1,12520 |
| I15 | F | G | 2 | 7 | 1,69455 |
| I15 | F | G | 2 | 8 | 0,82989 |
| I15 | F | G | 2 | 9 | 0,96862 |
| I15 | F | G | 2 | 10 | 0,28600 |
| I15 | F | G | 3 | 1 | 0,13154 |
| I15 | F | G | 3 | 2 | 0,13885 |
| I15 | F | G | 3 | 3 | 0,26931 |
| I15 | F | G | 3 | 4 | 1,06354 |
| I15 | F | G | 3 | 5 | 0,16184 |
| I15 | F | G | 3 | 6 | 0,13907 |
| I15 | F | G | 3 | 7 | 0,17682 |
| I15 | F | G | 3 | 8 | 0,23291 |
| I15 | F | G | 3 | 9 | 0,18139 |
| I15 | F | G | 3 | 10 | 1,58727 |
| I16 | P | D | 1 | 0 | 1,12096 |
| I16 | P | D | 1 | 2 | 1,22047 |
| I16 | P | D | 1 | 3 | 0,86859 |
| I16 | P | D | 1 | 4 | 1,26393 |
| I16 | P | D | 1 | 5 | 0,88622 |
| I16 | P | D | 1 | 6 | 1,11142 |
| I16 | P | D | 1 | 7 | 3,34519 |
| I16 | P | D | 1 | 8 | 1,24271 |
| I16 | P | D | 1 | 9 | 0,87440 |
| I16 | P | D | 1 | 10 | 1,29604 |
| I16 | P | D | 2 | 1 | 1,48758 |
| I16 | P | D | 2 | 2 | 1,29654 |
| I16 | P | D | 2 | 3 | 1,71823 |
| I16 | P | D | 2 | 4 | 1,47863 |
| I16 | P | D | 2 | 5 | 1,26963 |
| I16 | P | D | 2 | 6 | 3,08661 |
| I16 | P | D | 2 | 7 | 1,90006 |
| I16 | P | D | 2 | 8 | 2,97427 |
| I16 | P | D | 2 | 9 | 1,87209 |
| I16 | P | D | 2 | 10 | 1,03702 |
| I16 | P | D | 3 | 1 | 1,46931 |
| I16 | P | D | 3 | 2 | 1,46605 |
| I16 | P | D | 3 | 3 | 1,80044 |
| I16 | P | D | 3 | 4 | 1,28076 |
| I16 | P | D | 3 | 5 | 2,01368 |
| I16 | P | D | 3 | 6 | 2,15090 |
| I16 | P | D | 3 | 7 | 0,88318 |

| | | | | | |
|-----|---|---|---|----|---------|
| I16 | P | D | 3 | 8 | 1,31487 |
| I16 | P | D | 3 | 9 | 0,90592 |
| I16 | P | D | 3 | 10 | 0,91688 |
| I16 | P | G | 1 | 1 | 0,12585 |
| I16 | P | G | 1 | 2 | 0,20190 |
| I16 | P | G | 1 | 3 | 0,30971 |
| I16 | P | G | 1 | 4 | 0,19755 |
| I16 | P | G | 1 | 5 | 0,47231 |
| I16 | P | G | 1 | 6 | 0,19239 |
| I16 | P | G | 1 | 7 | 0,12801 |
| I16 | P | G | 1 | 8 | 0,13317 |
| I16 | P | G | 1 | 9 | 0,27408 |
| I16 | P | G | 1 | 10 | 0,22695 |
| I16 | P | G | 2 | 1 | 0,62009 |
| I16 | P | G | 2 | 2 | 0,80165 |
| I16 | P | G | 2 | 3 | 0,55173 |
| I16 | P | G | 2 | 4 | 0,73041 |
| I16 | P | G | 2 | 5 | 0,53306 |
| I16 | P | G | 2 | 6 | 0,30308 |
| I16 | P | G | 2 | 7 | 0,40151 |
| I16 | P | G | 2 | 8 | 0,66739 |
| I16 | P | G | 2 | 9 | 0,68969 |
| I16 | P | G | 2 | 10 | 0,67850 |
| I16 | P | G | 3 | 1 | 0,28660 |
| I16 | P | G | 3 | 2 | 0,24415 |
| I16 | P | G | 3 | 3 | 0,25243 |
| I16 | P | G | 3 | 4 | 0,35269 |
| I16 | P | G | 3 | 5 | 0,36471 |
| I16 | P | G | 3 | 6 | 0,53725 |
| I16 | P | G | 3 | 7 | 0,70976 |
| I16 | P | G | 3 | 8 | 0,60412 |
| I16 | P | G | 3 | 9 | 0,54254 |
| I16 | P | G | 3 | 10 | 0,41920 |
| I17 | F | D | 1 | 0 | 0,23555 |
| I17 | F | D | 1 | 2 | 0,28629 |
| I17 | F | D | 1 | 3 | 0,64857 |
| I17 | F | D | 1 | 4 | 0,61838 |
| I17 | F | D | 1 | 5 | 0,92441 |
| I17 | F | D | 1 | 6 | 0,74900 |
| I17 | F | D | 1 | 7 | 0,77670 |
| I17 | F | D | 1 | 8 | 0,22142 |
| I17 | F | D | 1 | 9 | 0,19718 |
| I17 | F | D | 1 | 10 | 0,32161 |
| I17 | F | D | 2 | 1 | 0,38281 |
| I17 | F | D | 2 | 2 | 0,53373 |
| I17 | F | D | 2 | 3 | 0,36004 |
| I17 | F | D | 2 | 4 | 0,41701 |
| I17 | F | D | 2 | 5 | 0,59677 |
| I17 | F | D | 2 | 6 | 0,40909 |
| I17 | F | D | 2 | 7 | 0,61518 |

| | | | | | |
|-----|---|---|---|----|---------|
| I17 | F | D | 2 | 8 | 0,46568 |
| I17 | F | D | 2 | 9 | 0,24111 |
| I17 | F | D | 2 | 10 | 0,30579 |
| I17 | F | D | 3 | 1 | 0,17891 |
| I17 | F | D | 3 | 2 | 0,11920 |
| I17 | F | D | 3 | 3 | 0,14933 |
| I17 | F | D | 3 | 4 | 0,33744 |
| I17 | F | D | 3 | 5 | 0,44763 |
| I17 | F | D | 3 | 6 | 0,65460 |
| I17 | F | D | 3 | 7 | 0,68674 |
| I17 | F | D | 3 | 8 | 0,79471 |
| I17 | F | D | 3 | 9 | 0,20901 |
| I17 | F | D | 3 | 10 | 0,11202 |
| I17 | F | G | 1 | 1 | 0,65201 |
| I17 | F | G | 1 | 2 | 0,47215 |
| I17 | F | G | 1 | 3 | 1,04366 |
| I17 | F | G | 1 | 4 | 0,69938 |
| I17 | F | G | 1 | 5 | 0,67705 |
| I17 | F | G | 1 | 6 | 1,25243 |
| I17 | F | G | 1 | 7 | 0,36727 |
| I17 | F | G | 1 | 8 | 0,83544 |
| I17 | F | G | 1 | 9 | 0,63345 |
| I17 | F | G | 1 | 10 | 1,10401 |
| I17 | F | G | 2 | 1 | 0,24311 |
| I17 | F | G | 2 | 2 | 0,43866 |
| I17 | F | G | 2 | 3 | 0,49818 |
| I17 | F | G | 2 | 4 | 0,51869 |
| I17 | F | G | 2 | 5 | 0,26919 |
| I17 | F | G | 2 | 6 | 0,29999 |
| I17 | F | G | 2 | 7 | 0,30752 |
| I17 | F | G | 2 | 8 | 0,29583 |
| I17 | F | G | 2 | 9 | 0,49477 |
| I17 | F | G | 2 | 10 | 0,28897 |
| I17 | F | G | 3 | 1 | 0,20073 |
| I17 | F | G | 3 | 2 | 0,47458 |
| I17 | F | G | 3 | 3 | 1,08490 |
| I17 | F | G | 3 | 4 | 0,43705 |
| I17 | F | G | 3 | 5 | 0,61563 |
| I17 | F | G | 3 | 6 | 0,69647 |
| I17 | F | G | 3 | 7 | 1,02038 |
| I17 | F | G | 3 | 8 | 1,10133 |
| I17 | F | G | 3 | 9 | 0,62535 |
| I17 | F | G | 3 | 10 | 0,65751 |