

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:346525>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-18**



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 Čurlin 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 Čurlin, na cijelom ovom iskustvu. Nisam mogla ni zamisliti koliko strpljenja, razumijevanja i predanosti može biti u jednom mentoru. Bolje nisam mogla odabrati.

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 neizmjerljivoj 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 pomičem 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 zaslužna 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 žljezdi 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 modriilo, Schiffov perjodni reagens, položaj žljezda u ljudskom vratu maternice.

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

Ocjenitelji:

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

Rooseveltovo 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 modriilo, 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>

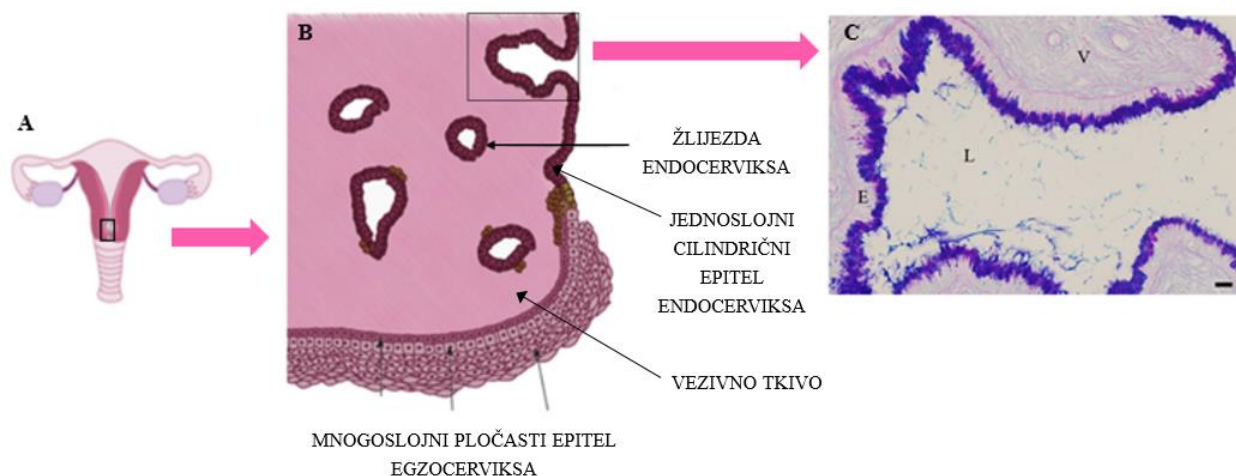
1 UVOD

1.1 Građa ženskog spolnog sustava

Ženski spolni sustav građen je od vanjskih i unutarnjih spolnih organa. Vanjske čine predvorje rodnice sa žlijezdama, Venerin brežuljak, velike i male usne te erektni 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, grlič, 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 žlijezdama.



Slika 1. A. Ženski reproduktivni sustav. B. Uvećani dio slike A – vrat maternice (cerviks). Prikaz građe egzocerviksa i endocerviksa (preuzeto i prilagođeno od Alzamil i sur., 2021). C. Uvećani dio slike B - histološki preparat žljezdanog tkiva vrata maternice obojan Schiffovim perjordnim reagensom (PAS) i alcijanskim modrilom (AB), s označenim dijelovima endocervikalne žlijezde i okolnog tkiva. E – jednoslojni cilindrični epitel, L – lumen, V – vezivno 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 cervikalne sluzi su mucini (Bansil i Turner, 2006).

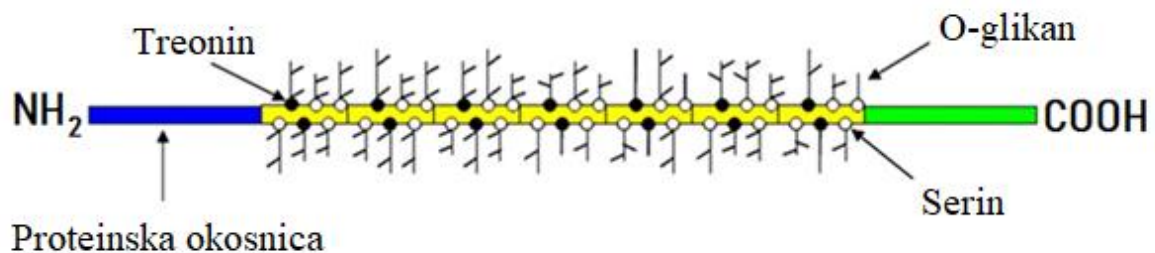
Istraživanja su pokazala da je cervikalna sluz čimbenik koji može utjecati na plodnost žena stoga je promatranje izlučene sluzi postala klinička metoda u istraživanju neplodnosti, ali i u praćenju plodnih dana s ciljem začeća (Katz, 1991). Cervikalna sluz može biti uzrok neplodnosti ukoliko ne stvara pogodan okoliš za spermije, primjerice zbog učestalih infekcija uslijed kojih je uočeno stvaranje drugačije sluzi koju Odeblad (1968) naziva tip Q. Osim toga, cervikalna 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 sekretnog 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 endocerviksu 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 prolina, leucina i valina dok kisele mucine u većoj mjeri čine treonin i serin (Bhattacharyya i sur., 1990). Andersch-Björkman i suradnici (2007) su biokemijskih analizama sluzi pokazali da se mucini razlikuju prije, za vrijeme i poslije ovulacije najviše po građi šećernih komponenti zbog čega postoji mogućnost da upravo kiseli, 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-acetilgalaktozaminil 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 mjehurićima, u citoplazmi žljezdanih stanica, pri niskom pH i visokoj razini kalcijevih iona, Ca^{2+} (Muchekehu, 2010). Takvi uvjeti štite negativno nabijena mjesta mucina od elektrostatskog odbijanja što omogućuje kondenziranje mucina u zncima (Verdugo, 1990). Izlučivanju, razmotavanju i širenju sluzi prethodi bubrenje sekrecijskih mjehurića.

1.4 Izlučivanje sluzi

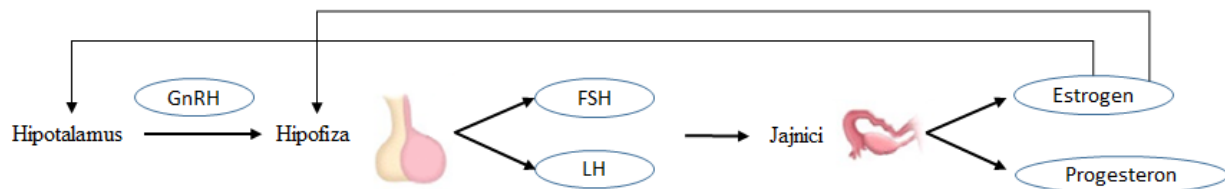
Egzocitirani mucini zadržavaju se u obliku zgusnutih nakupina, egzosoma, na površini stanica te moraju biti hidratirani kako bi sluz primila odgovarajuća reološka svojstva (Flori i sur., 2007). Za razliku od kalcijevih i oksonijevih iona, čija koncentracija utječe na „pakiranje“ sluzi u sekrecijske mjehuriće, 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 mjehurićima. 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 žlijezdi zbog prevelike viskoznosti (Muchekehu, 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 hipotalamusa (GnRH – gonadotropin-oslobađajući hormon) i hipofize (FSH – folikulostimulirajući hormon i LH – luteinizirajući hormon) što je shematski prikazano na slici 3.

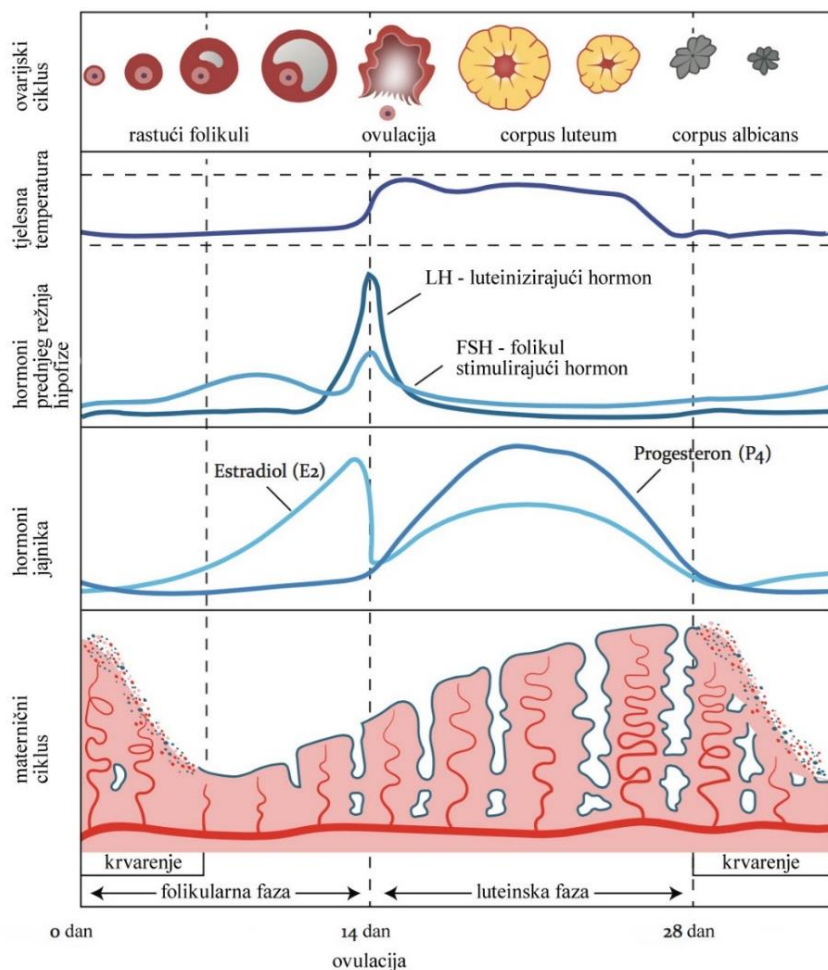


Slika 3. Shematski prikaz utjecaja hormona hipotalamusa na hipofizu koja lučenjem hormona potiče jajnike na lučenje estrogena i progesterona (preuzeto i prilagođeno od Koopman, 2013).

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 prihvatiti 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 (prihvaćanje 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 viskozija, 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, pretpostavlja se da je uzrok tome pojačana hidratacija mucina, čime se zapravo njihova koncentracija smanjuje, a sluz postaje vodenasta (Kopito, 1973).

Osim cikličke promjenjivosti sluzi, pretpostavlja 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 viskoziju 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, pretpostavka 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 kiseli 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

Kiseli mucini mogu se prikazati kationskim bojama (elektrostatskom interakcijom). Alcijansko modrilo (AB) tetravalentna je kationska boja sastavljena od kompleksa bakra i ftalocijanata s četiri izotiouronijske skupine. Proizvedeno je mnoštvo različitih varijanti alcian modrila koje se razlikuju prema broju izotiouronijskih skupina te načinu razrjeđivanja. Obzirom da izotiouronijske 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 kiseli 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 kiseli mucini obojat će se tamnoplavo. Daljnjom 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 kiseli mucini, ona je jedna od najosjetljivijih i najsvieobuhvatnijih 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 zahvatu 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 odabrane 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 Papanicolau 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 proslijeđeni 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.

		ISPITANICE														
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15
HORMONI	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 objektivna 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 objektivna 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 žlijezda 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 (kiselni 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

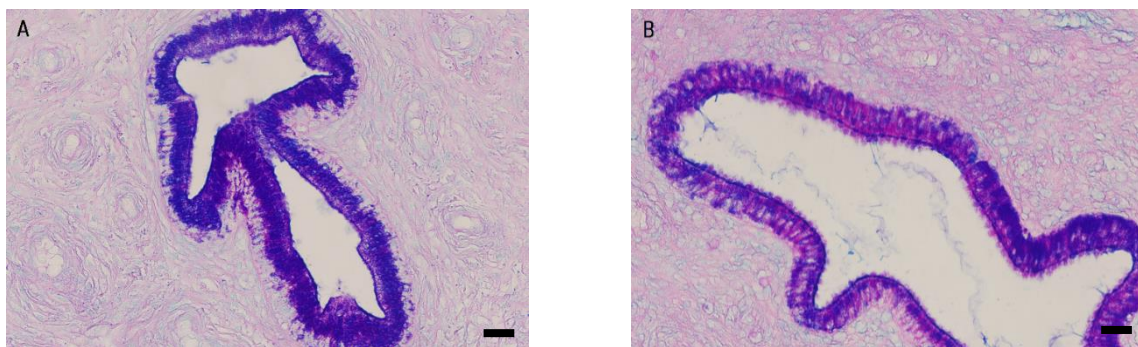
Nakon analize distribucije vrijednosti omjera C/P, provedena je statistička analiza njihovih logaritmiranih vrijednosti koje su pokazale lognormalnu distribuciju. Razlika u udjelu neutralnih i kiselih mucina u gornjem i donjem dijelu cerviksa te u udjelu neutralnih i kiselih mucina s obzirom na fazu ciklusa provedena je Hi kvadrat testom. Postupkom REML (engl. *restricted maximum likelihood*) i Hi kvadrat testom provjereno je postojanje interaktivnosti utjecaja faze ciklusa i položaja žlijezda 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 žlijezde 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

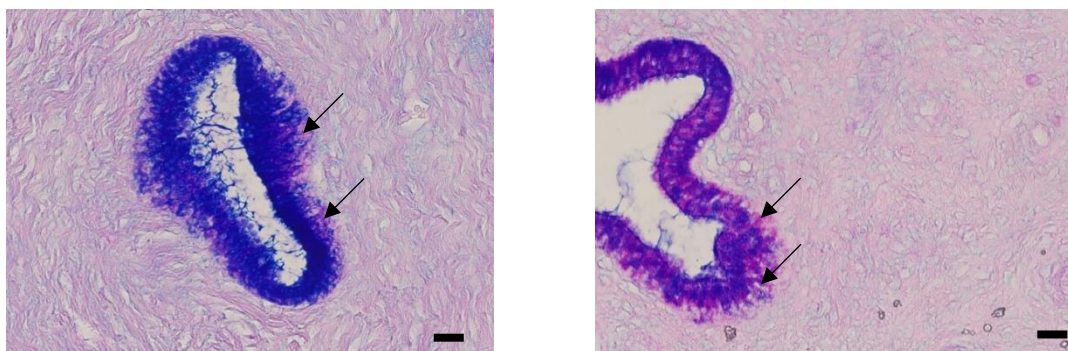
4.1 Histokemijski prikaz neutralnih i kiselih mucina u žljezdanom tkivu endocerviksa

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).



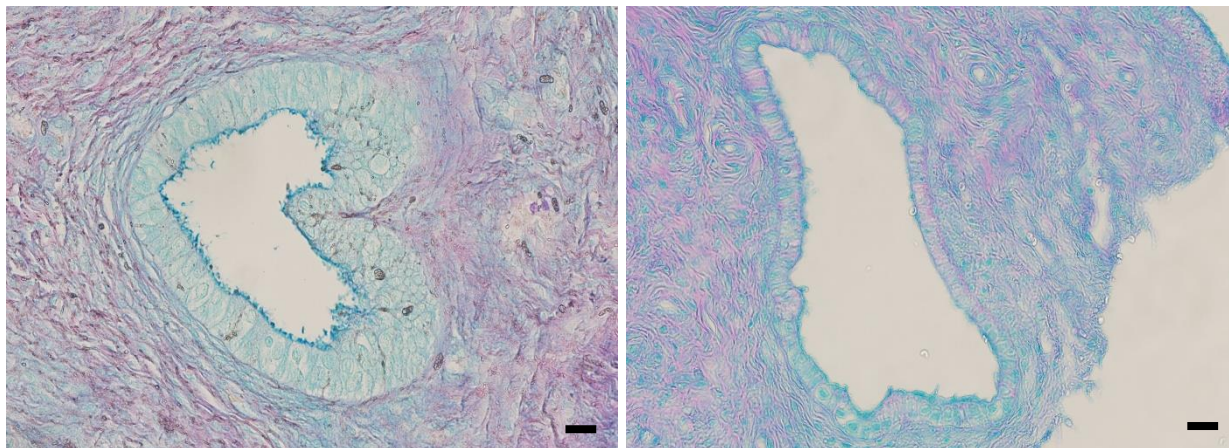
Slika 5. Histološki preparati žljezdanog tkiva ljudskog vrata maternice obojani Schiffovim perjodnim reagensom (PAS) i alcijanskim modrilom (AB). A. Žlijezda s većim udjelom kiselih mucina, plavo obojanih AB-om. B. Žlijezda s većim udjelom neutralnih mucina, crveno obojanih PAS-om. Mjerna skala: 20 μ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

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 žljezdanog 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 μ m.

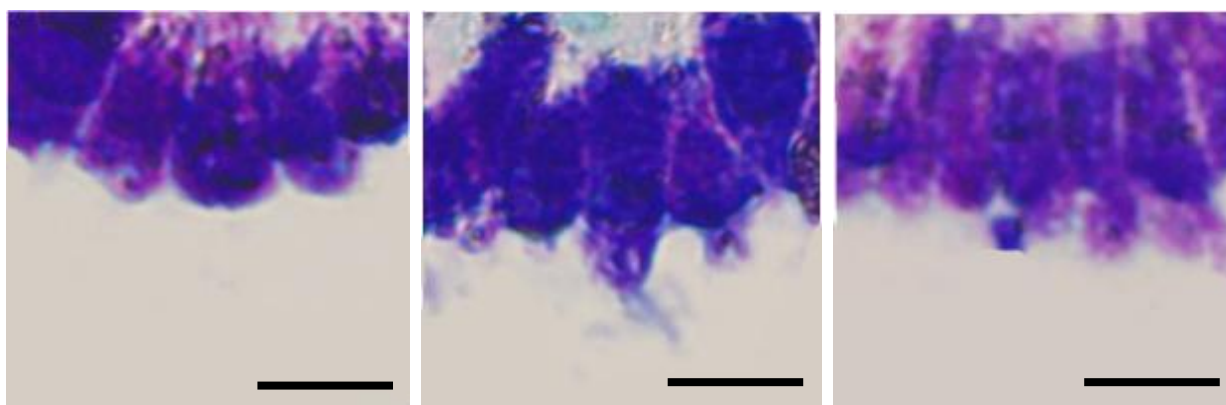
Na šest preparata, rezom nisu bile zahvaćene žlijezde, stoga se ti preparati nisu koristili u daljnjoj obradi. S druge strane, žlijezde na sedam preparata nisu pokazale pozitivnu reakciju na PAS i AB (Slika 7).



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

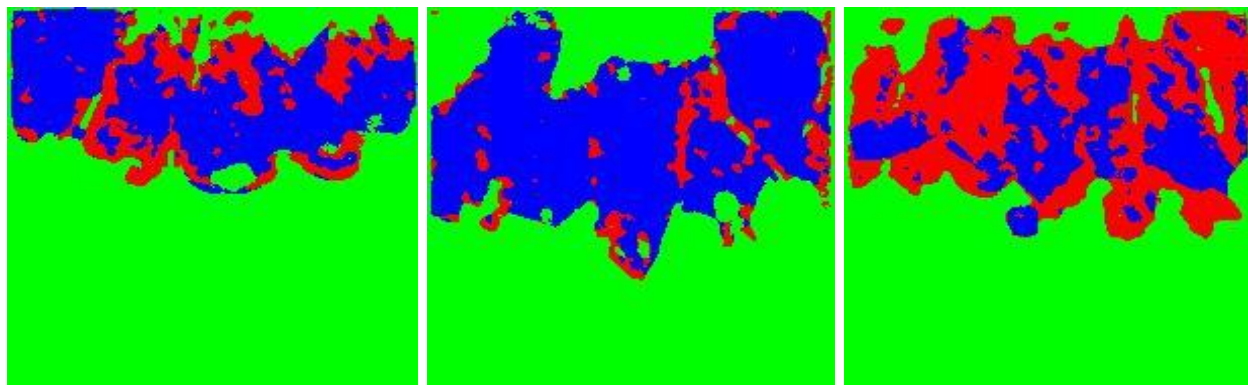
4.2 Udio neutralnih i kiselih mucina izražen kao omjer obojanih površina C/P

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



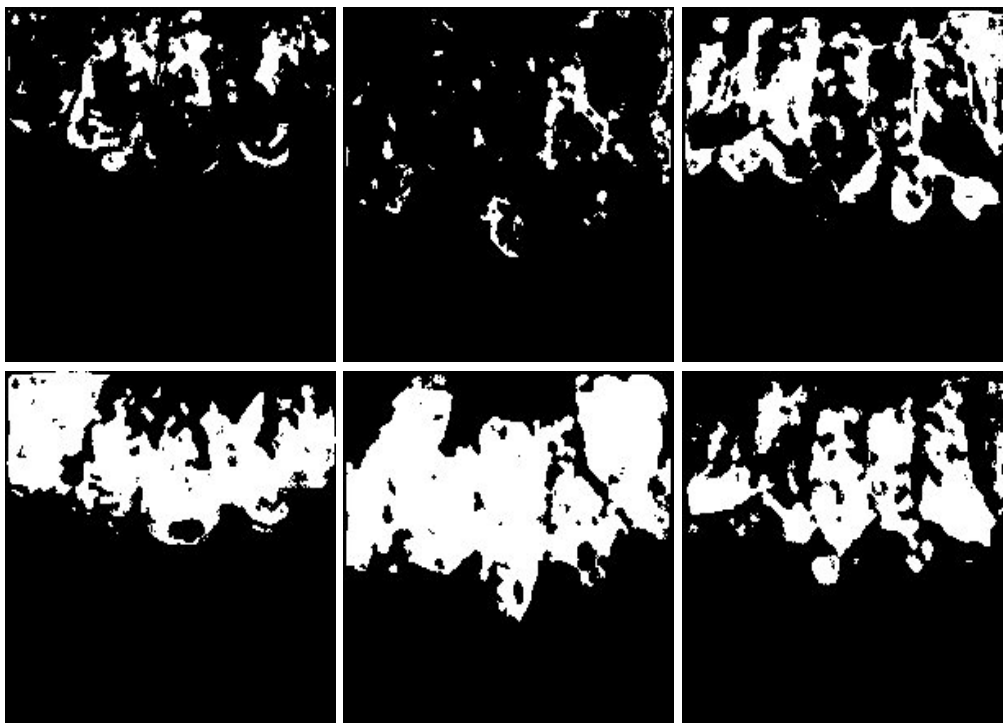
Slika 8. Primjeri polja izdvojenih iz snimki histoloških preparata žljezdanog tkiva ljudskog vrata maternice obojanih Schiffovim perijodnim reagensom (PAS) i alcijanskim modrilom (AB). Mjerna skala: 10 μ m.

Svaka tako dobivena slika obrađena je u programu Ilastik. Crvenom bojom obojani su PAS-pozitivni dijelovi žljezdanog epitela, odnosno neutralni mucini. Plavom bojom obojani su AB-pozitivni dijelovi žljezdanog epitela, odnosno kiseli mucini. Pozadina (lumen žlijezde, 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 žljezdanog 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).



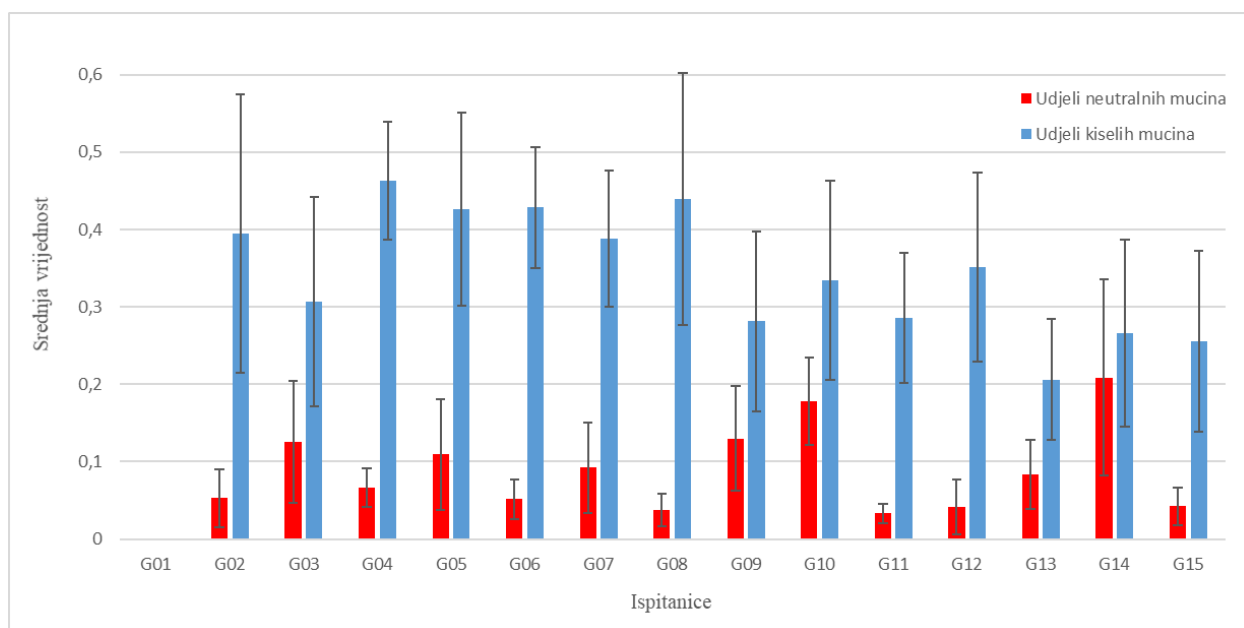
Slika 10. Izdvojena polja iz histoloških preparata žljezdanog tkiva ljudskog vrata maternice sa slike 8, razdvojena na crveni (gore) i plavi (dolje) kanal, u FIJI inačici programa Image-J.

U FIJI inačici programa Image-J, izmjerena je površina prekrivena crvenom, odnosno plavom bojom. U Excel tablici su prikazani rezultati mjerenja 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 (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 (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 (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 pretpostavlja 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 (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 (Hi kvadrat =3,8455, $p = 0,1462$) niti za progesteron (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 (viskozija sluz). Osim toga, s obzirom na faze ciklusa u kojima su se nalazile ispitanice u vrijeme uzimanja uzoraka, kao i izmjerenih 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) viskozija 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 viskozija 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 mogle 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). Rađene su usporedbe udjela neutralnih i kiselih mucina s razinama spolnih hormona u serumu ispitanica.

1. Neutralni i kiseli mucini se 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 menstrualnog 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 mucin. *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., Sampaolese 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. Mucikehu 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 Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 38, 44–58.
28. Odeblad E. (1968): The Functional Structure of Human Cervical Mucus. *Acta Obstetrica 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., Čurlin 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 HCO_3^- secretion and Ca^{2+} -mediated mucin exocytosis. *The Journal of Physiology*. 591(18), 4581–4593.
42. <http://www.dsdgenetics.org/index.php?id=48.%20Used%20with%20Permission%20from%20Professor%20Peter%20Koopman,%20PhD,%20FAA%20from%20http://www.dsdgenetics.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 žljezdanog 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 žljezdanog 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

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

106	L	D	1	8	1,97990
106	L	D	1	9	0,48157
106	L	D	1	10	0,56446
106	L	D	2	1	0,02921
106	L	D	2	2	0,06868
106	L	D	2	3	0,10386
106	L	D	2	4	0,12984
106	L	D	2	5	0,11448
106	L	D	2	6	0,11621
106	L	D	2	7	0,08695
106	L	D	2	8	0,16973
106	L	D	2	9	0,14088
106	L	D	2	10	0,14818
106	L	D	3	1	0,05344
106	L	D	3	2	0,06920
106	L	D	3	3	0,11093
106	L	D	3	4	0,02616
106	L	D	3	5	0,07653
106	L	D	3	6	0,10840
106	L	D	3	7	0,12907
106	L	D	3	8	0,06848
106	L	D	3	9	0,10048
106	L	D	3	10	0,04053
106	L	G	1	1	0,23665
106	L	G	1	2	0,38923
106	L	G	1	3	1,50682
106	L	G	1	4	0,49160
106	L	G	1	5	0,45295
106	L	G	1	6	0,45617
106	L	G	1	7	0,30380
106	L	G	1	8	0,30941
106	L	G	1	9	0,23175
106	L	G	1	10	0,77496
106	L	G	2	1	0,21738
106	L	G	2	2	0,15031
106	L	G	2	3	0,14055
106	L	G	2	4	0,14814
106	L	G	2	5	0,17574
106	L	G	2	6	0,38154
106	L	G	2	7	0,21415
106	L	G	2	8	0,57780
106	L	G	2	9	0,54999
106	L	G	2	10	0,25027
106	L	G	3	1	0,32932
106	L	G	3	2	0,44111
106	L	G	3	3	0,65594
106	L	G	3	4	0,86008
106	L	G	3	5	0,54711
106	L	G	3	6	0,56830
106	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

107	F	G	2	8	0,10124
107	F	G	2	9	0,20071
107	F	G	2	10	0,07238
107	F	G	3	1	0,11691
107	F	G	3	2	0,03636
107	F	G	3	3	0,13562
107	F	G	3	4	0,07404
107	F	G	3	5	0,02802
107	F	G	3	6	0,13527
107	F	G	3	7	0,09262
107	F	G	3	8	0,13256
107	F	G	3	9	0,09885
107	F	G	3	10	0,10992
108	L	D	1	0	0,12236
108	L	D	1	2	0,24610
108	L	D	1	3	0,11656
108	L	D	1	4	0,20085
108	L	D	1	5	0,18448
108	L	D	1	6	0,10573
108	L	D	1	7	0,16195
108	L	D	1	8	0,24231
108	L	D	1	9	0,19694
108	L	D	1	10	0,24100
108	L	D	2	1	0,86109
108	L	D	2	2	0,13396
108	L	D	2	3	0,23852
108	L	D	2	4	0,39963
108	L	D	2	5	0,58616
108	L	D	2	6	1,31422
108	L	D	2	7	0,46874
108	L	D	2	8	0,61753
108	L	D	2	9	0,54666
108	L	D	2	10	0,33434
108	L	D	3	1	1,23772
108	L	D	3	2	0,39188
108	L	D	3	3	0,63135
108	L	D	3	4	0,67732
108	L	D	3	5	1,44343
108	L	D	3	6	0,25385
108	L	D	3	7	0,22745
108	L	D	3	8	0,26325
108	L	D	3	9	0,20703
108	L	D	3	10	0,94924
108	L	G	1	1	1,34353
108	L	G	1	2	0,74137
108	L	G	1	3	2,90888
108	L	G	1	4	0,24405
108	L	G	1	5	0,11129
108	L	G	1	6	0,13294
108	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