

N-glikozilacija alfa-1 kiselog glikoproteina kao potencijalni biljeg za predviđanje točne terapijske doze varfarina

Kovač, Kevin

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:464803>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Kevin Kovač

**N-glikozilacija alfa-1 kiselog glikoproteina kao
potencijalni biljeg za predviđanje točne
terapijske doze varfarina**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod stručnim vodstvom dr. sc. Tome Kesera.

Zahvaljujem se dr.sc. Tomi Keseru na ukazanom povjerenju i mogućnosti izrade ovog diplomskog rada, izvanrednom mentorstvu, velikom strpljenju te savjetima pri pisanju.

Želim se zahvaliti i svojoj obitelji na pruženom razumijevanju, podršci i ljubavi tijekom čitavog studija. Također, veliko hvala svim prijateljima koji su bili tu kada je bilo najteže, s kojima sam proveo mnoge nezaboravne trenutke i koji su učinili ovaj studij pravim užitkom, a posebno onima koji će se prepoznati pod nazivom „Sile nečiste“.

SADRŽAJ

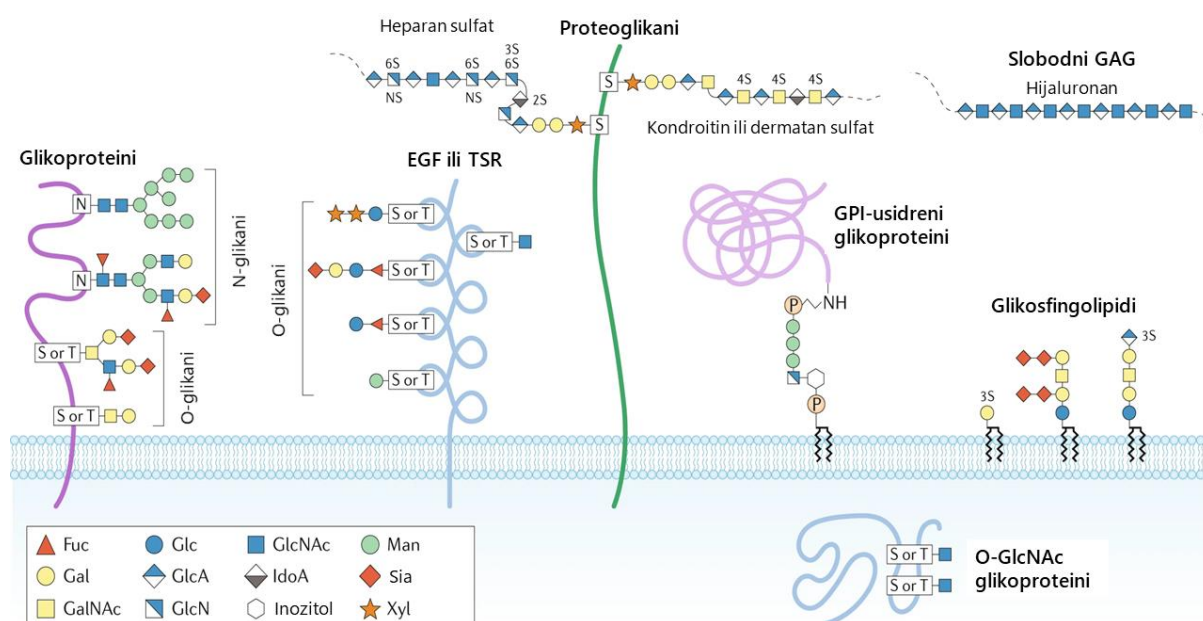
1. UVOD	1
1.1. Glikozilacija.....	2
1.1.1. Glikani u zdravlju i bolesti.....	3
1.2. Glikani: struktura i biosinteza.....	4
1.2.1. O-vezani glikani.....	4
1.2.2. N-vezani glikani.....	5
1.3. Varfarin	8
1.3.1. Indikacije i doziranje.....	8
1.3.2. Farmakokinetika i mehanizam djelovanja	10
1.4. Personalizirana medicina i farmakogenomika	11
1.4.1. Farmakogenomski testovi u terapiji varfarinom	12
1.5. Alfa-1 kiseli glikoprotein.....	13
1.5.1. Struktura, genske varijante i biološke uloge AGP-a.....	13
1.5.2. Glikozilacija AGP-a i vezanje varfarina	15
1.6. LC-ESI-MS	16
2. OBRAZLOŽENJE TEME	18
3. MATERIJALI I METODE	20
3.1. Materijali.....	21
3.2. Ispitanici.....	23
3.3. Metode	24
3.3.1. Obogaćivanje AGP-a	24
3.3.2. Redukcija, alkilacija i digestija tripsinom.....	25
3.3.3. HILIC-SPE obogaćivanje glikopeptida	25
3.3.4. RP-LC-ESI-MS(/MS)	25
3.3.5. Obrada podataka i statistička analiza	26
4. REZULTATI.....	27

5. RASPRAVA	35
6. ZAKLJUČAK	38
7. LITERATURA	40
8. SAŽETAK/SUMMARY	48
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/.....	53
BASIC DOCUMENTATION CARD	53

1.UVOD

1.1. Glikozilacija

Jedno od područja prirodnih znanosti koje je zadnjih godina naišlo na veliki interes znanstvene zajednice te bilježi izniman porast u količini prikupljenog znanja naziva se glikobiologija. To je područje znanosti koje se, jednostavno rečeno, bavi glikozilacijom, odnosno strukturom, biosintezom, biologijom i evolucijom ugljikohidratnih tvari karakterističnih svim živim bićima koje zovemo glikanima (Varki i sur., 2015-2017). Glikani se, procesom zvanim glikozilacija, u prirodi sintetiziraju pomoću posebnih enzima glikoziltransferaza koje prenose monosaharidne jedinice iz aktivnih nukleotidnih šećera na polipeptide, lipide i druge organske molekule (Freeze i sur., 2015-2017). Ovaj kompleksni kotranslacijski i posttranslacijski proces koji se događa u endoplazmatskom retikulumu (ER) i Golgijevom aparatu te za kojeg se smatra da zahvaća više od pola ukupnih proteina uključuje kovalentno vezanje N- i O-vezanih glikana, glikozaminoglikana (GAG), glikozilfosfatidilinozitolnih (GPI) sidra na peptidne okosnice tvoreći određene glikoproteinske strukture. Način glikozilacije značajno utječe na fizikalna svojstva proteina te na njihovu biološku ulogu. Također, vezanjem ugljikohidrata na lipide nastaju glikolipidi; oni uključuju strukture zvane glikosfingolipidima, a svi navedeni glikokonjugati su prikazani na Slici 1 (Krištić i Lauc, 2017; Reily i sur., 2019).



Slika 1. Najčešći oblici glikozilacijskih produkata kod ljudi (Reily i sur., 2019). Prikazani su glikokonjugati nastali vezanjem glikana na proteine ili lipide. Kod N-vezanih glikana vidimo da su njihove heterogene strukture vezane N-glikozidnom vezom na dušik asparagina (Asn) preko molekule N-acetilglukozamina (GlcNAc). Asn se mora nalaziti u blizini serina (Ser) ili treonina (Thr) unutar sekvence Asn-X-Ser/Thr, pri čemu je X bilo koja aminokiselina osim prolina. Dvije molekule GlcNAc na koje su vezane tri molekule manoze (Man) čine osnovnu strukturu svih N-vezanih glikana. Glikani vezani O-glikozidnom vezom pokazuju veliku raznolikost glikozilacije proteina, a na njih se vežu preko kisikovog atoma hidroksilne skupine Ser ili Thr unutar polipeptidnog lanca. GAG, glikozaminoglikan; EGF, epidermalni faktor rasta (eng. epidermal growth factor); TSR, ponavljanja trombospondina (thrombospondin type I repeats); N, asparagin; S, serin; T, treonin; Fuc, fukoza; Gal, galaktoza; GalNAc, N-acetilgalaktozamin; Glc, glukoza; GlcN, glukozamin; GlcNAc, N-acetilglukozamin; GlcA, glukouronska kiselina; IdoA, iduronska kiselina; Man, manozna; Sia, sialinska kiselina; Xyl, ksiloza.

1.1.1. Glikani u zdravlju i bolesti

Tijekom 20. stoljeća uloženi su veliki naponi s ciljem objašnjenja preciznih bioloških uloga glikana pronađenih u prirodi. Napravljeno je mnogo značajnih otkrića, pogotovo zadnjih godina s razvojem genomike i glikomike, čime su i mnoge biološke uloge glikana precizno razjašnjene. Naravno, velik broj njihovih uloga je ostao nepoznat, ali sa trenutnim znanjem u tom području biološke uloge glikana mogu se ugrubo svrstati u četiri različite kategorije. Razlikujemo strukturalne i modulatorne uloge koje uključuju fizičku zaštitu (primjer čega su mucini koji oblažu unutarnje sluznice), povećanje topljivosti makromolekula čime su omogućene visoke koncentracije proteina u plazmi, zaštita od proteaza, pravilno smatanje proteina i mnoge druge. Nadalje, dijelimo ih na one zaslužne za ekstrinzično prepoznavanje, odnosno za prepoznavanje glikana stranih organizama koje je posredovano putem glikan-vezujućih proteina. Mnogo je takvih primjera, a neki od njih su: urinarne infekcije uzrokovane glikan-ovisnim vezanjem F-pilusa uropatogene *E. coli*, virusni glikan-vezujući proteini zvani hemaglutinini koji predstavljaju „H“ u „H1N1“ influenza A virusa poznatog kao virus svinje gripe te kod imunog prepoznavanja PAMP-ova (eng. pathogen-associated molecular patterns) koji mogu biti glikokonjugati poput bakterijskih lipopolisaharida ili peptidoglikana. Također, imaju ulogu u intrinzičnom prepoznavanju, što je vidljivo kod međustanične signalizacije, međustaničnog povezivanja te procesa oplodnje jajne stanice. Konačno, zadnju kategoriju čini molekularna mimikrija glikana domaćina kojom mikroorganizmi na razne načine zaobilaze imunosti sustav domaćina (Varki, 2017).

Navedene su samo neke od velikog broja bioloških uloga glikana, ali dovoljno kako bi se naglasila njihova važnost za normalno funkcioniranje živih bića. Nasuprot njihovoj

relevantnosti u fiziološkim procesima, dokazana je i važna uloga glikana u patofiziološkim procesima zahvaljujući brojnim otkrićima u promjeni glikozilacije tijekom istih, što može biti uzrok ili posljedica raznih bolesti. Jedno od takvih otkrića je povezivanje genskih defekta u glikozilaciji s određenim poremećajima kasnije nazvanim kongenitalnim poremećajima glikozilacije (CDG, eng. congenital disorders of glycosylation). Činjenica kako su te bolesti teške u svojim manifestacijama jer zahvaćaju mnoge muskulaturne, neurološke i razvojne funkcije te što su često smrtonosne u embrionalnoj fazi dodatno ukazuje na ključnu ulogu glikana (Hansen i sur. 2015; Freeze i sur., 2015; Ng i Freeze, 2018). Također, otkrivene su brojne i značajne promjene u omjeru i sastavu različitih glikana u kroničnim bolestima poput: dijabetesa, upalne bolesti crijeva, raka i reumatoidnog artritisa (Fuster i Esko, 2005; Raghav i sur., 2006; Testa i sur., 2015; Trbojevic Akmacic i sur., 2015).

1.2. Glikani: struktura i biosinteza

Primarna struktura proteina jedan je od ključnih faktora koji uvjetuje broj glikanskih struktura vezanih na njega, mjesta tih glikozilacijskih mjesta te način kojim će se ti glikani vezati (Dwek, 1995). Kao što je već navedeno, glikozilacija se odvija kotranslacijski i posttranslacijski u biosintetskom sekretornom putu koji se sastoji od ER-a, Golgijevog aparata, transportnih vezikula, lizosoma i plazmatske membrane, ali kao iznimka se mogu spomenuti citosolni i nuklearni proteini koji na sebe mogu O-glikozidnom vezom vezati jednu molekulu N-acetilglukozamina (GlcNAc) (Wopereis i sur., 2006). Načini na koje glikani tvore glikokonjugate su prikazani na Slici 1, a detaljnije će se obraditi O- i N-vezani glikoproteini s fokusom na N-vezane glikane.

1.2.1. O-vezani glikani

O-vezana glikozilacija najčešće započinje u Golgijevom aparatu gdje se uz pomoć posebnih enzima ugljikohidratne jedinice prenose na -OH skupinu serinskih ili treoninskih ostatataka na polipeptidnom lancu. Jedna od najzastupljenijih skupina O-vezanih glikana koju nazivamo mucinima karakterizirana je velikim brojem heterogenih struktura nastalih vezanjem N-acetilgalaktozamina (GalNAc) s nukleotidnog šećera UDP-GalNAc pomoću GalNAc-tranferaze na peptidnu okosnicu koji daljnjom enzimatskom elongacijom prikladnim

transferazama tvori osnovne strukture podložne raznim modifikacijama. Uloge mucina su brojne i važne. Oblažu površinu unutarnje sluznicu respiratornog, intestinalnog i urogenitalnog trakta stvarajući barijeru kojom štite od različitih fizičkih i kemijskih čimbenika te od infekcija patogenima. Isto tako, utječu na strukturne značajke i adhezivna svojstva glikoproteina te sudjeluju u radu imunskog sustava. Također, istraženi su i O-vezani glikoproteini koji su povezani putem galaktoze (Gal), fukoze (Fuc), manoze (Man) ili GlcNac te su njihove funkcije raznolike. Razlikujemo i proteoglikane koji na svojoj peptidnoj okosnici imaju vezane dugačke lance glukozaminoglikana koji su po strukturi linearni polisaharidi načinjeni od više povezanih disaharidnih jedinica (Van Den Steen i sur., 1998; Brockhausen i Stanley, 2015-2017; Lindahl i sur., 2015-2017).

1.2.2. N-vezani glikani

Skupinu heterogenih oligosaharidnih struktura koje su N-glikozidnom kovalentnom vezom povezane na asparaginske (Asn) ostatke proteina zovemo N-vezanim glikanima. Kako bi došlo do povezivanja na protein Asn se mora nalaziti unutar određenog slijeda aminokiselina Asn-X-Ser/Thr, gdje „X“ predstavlja bilo koju aminokiselinu osim prolina. Iako rjeđe, moguće je povezivanje unutar slijeda Asn-X-Cys u kojemu je cistein (Cys) u reduciranom stanju. Ukoliko se na mjestu „X“ nalaze kisele aminokiseline (aspartat ili glutamat) može doći do poremećaja u glikozilaciji te posljedično ne dolazi do vezanja glikana na Asn unutar spomenutog slijeda. Također, moguće su određene konformacijske smetnje tijekom smatanja samog proteina koje onemogućuju vezanje N-glikana, stoga se sljedovi Asn-X-Ser/Thr unutar polipeptidnog lanca smatraju potencijalnim glikozilacijskim mjestima (Stanley i sur., 2015-2017).

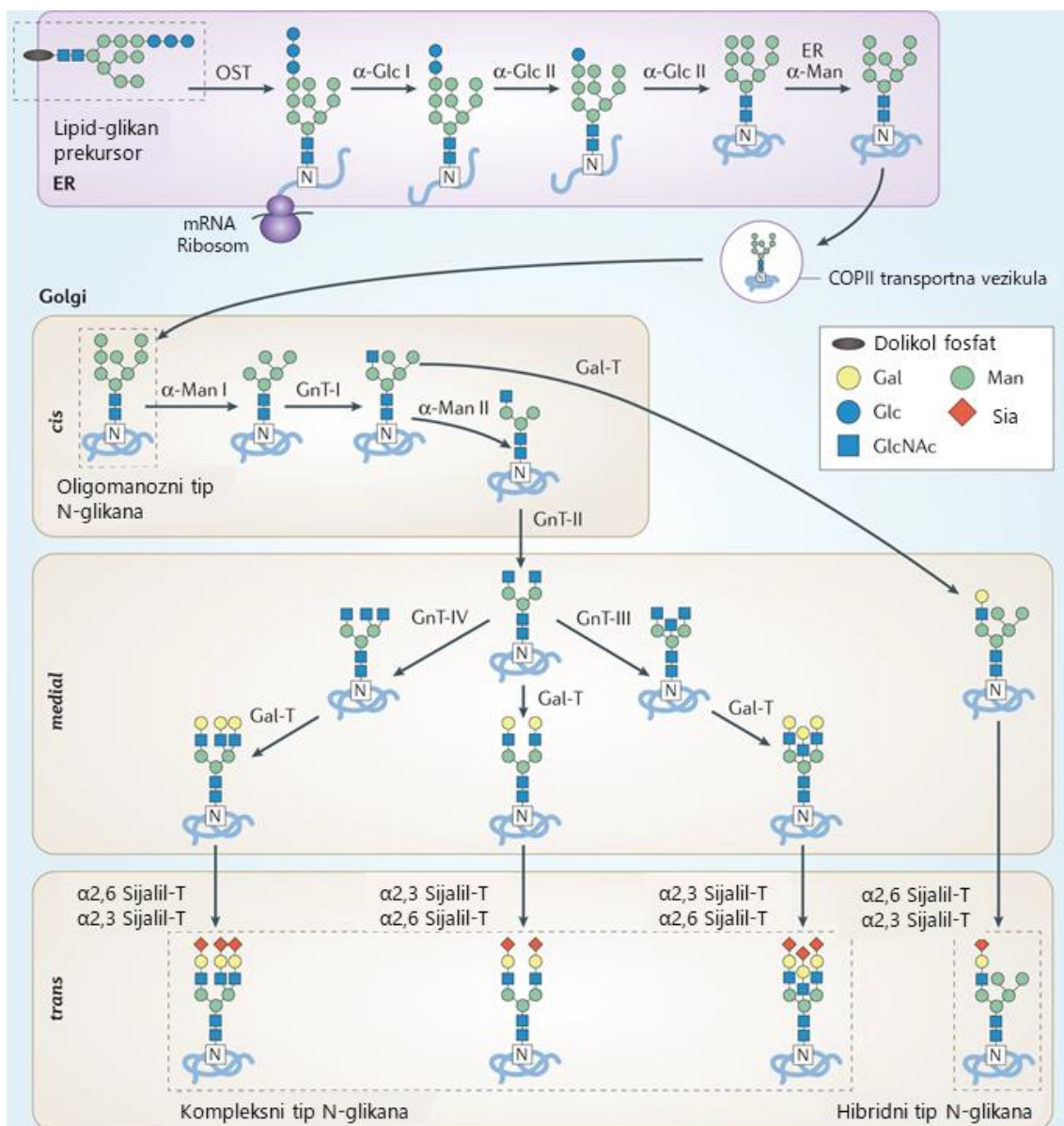
Početak biosinteze koji se odvija u ER-u jednak je u svim eukariotskim organizmima te se formira oligosaharidna struktura koja se kasnije na razne načine modulira u Golgijevom aparatu posebnim glikozidazama i glikoziltransferazama. Ta oligosaharidna struktura prvotno nastaje na citosolnoj strani ER-a pojedinačnim dodavanjem šećera određenim glikoziltransferazama koje koriste aktivirane nukleotidne šećere ili one vezane na dolikol. Prvi korak je vezanje GlcNac s UDP-GlcNac na posebnu organsku molekulu zvanu dolikol (Dol). To je po sastavu dugolančani poliiizoprenoidni lipid koja se nalazi u membrani ER-a te putem pirofosforilnog ostatka veže šećere i obavlja funkciju nosača. Šećeri se dodavaju dok na

citosolnoj strani ER-a ne nastane struktura $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ nakon čega se, uz aktivnost enzima flipaze, dobivena struktura prebacuje na drugu stranu dvoslojne membrane u lumen ER-a. Također, pojedinačni šećeri koji su vezani na dolikol sa citosolne strane dajući Dol-P-Man , odnosno Dol-P-Glc prebacuju se u lumen ER-a te koriste kako bi nastala konačna oligosaharidna struktura $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ (Lodish i sur., 2000; Stanley i sur., 2015-2017)

U sljedećem koraku se dobivena oligosaharidna struktura u cijelosti prenosi na potencijalna glikozilacijska mjesta nascentnog proteina. To je moguće uz djelovanje oligosaharil transferaze (OST), enzima kojem dvije riboforinske podjedinice dozvoljavaju prilazak nastajućem proteinu na koji treća podjedinica izvršava prijenos oligosaharida (Lodish i sur., 2000). Nadalje, glukoze koje su posljednje dodane se uklanjaju pomoću dviju α -glukozidaza (α -Glc I-II) te je taj proces dio kontrole kvalitete smatanja nastalih proteina posredovanog šaperonima poznatih kao kalneksin i kalretikulin. Ciklus koji uključuje šaperone kalneksin i kalretikulin smatra se iznimno važnim u procesu N-glikozilacije. Oni mogu prepoznati monoglukoziliranu strukturu $\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}_2$ s koje su glukozidazama uklonjene dvije Glc te pomažu proteinu na kojem se ta struktura nalazi da poprimi pravilnu strukturu. Činjenica da se u lumenu ER-a nalazi posebna glukoziltransferaza koja vraća Glc na $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ omogućuje proteinu da se spomenuti proces ponavlja te ukoliko njegovo pravilno smatanje nije moguće on se uzastopnim reakcijama prenosi u citosol gdje se ubikvitinira i određuje na proteosomalnu razgradnju (Bieberich, 2014; Reily i sur., 2019).

Zadnja reakcija u ER-a je uklanjanje jedne Man uz pomoć α -manozidaze (ER α -Man), čime nastaje $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ te se daljnje reakcije odvijaju Golgijevom aparatu. Manozidaze (α -Man I-II) u *cis*-Golgiju su zaslužne za nastanak $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ koji u *medijalnom*-Golgiju služi kao prekursor daljnjim reakcijama modifikacije. U *medijalnom*- i *trans*-Golgiju nalaze se brojni enzimi poput: GlcNAc-transferaza I-IV (GnT-I-IV), β 1,4 galaktoziltransferaze (Gal-T), α 2,3 sijaliltransferaze (α 2,3 Sijalil-T) i α 2,6 sijaliltransferaza (α 2,6 Sijalil-T) koji su zaslužni za široki dijapazon različitih N-glikanskih struktura. Konačni sastav N-glikanskih struktura na nekom glikoproteinu pod utjecajem je razine ekspresije svih gore navedenih enzima, konformacije i strukture proteina koja uvjetuje potencijalna glikozilacijska mjesta te vremenu provedenom u ER-u i Golgijevom aparatu (Reily i sur., 2019).

Biosinteza N-glikana dobiva se relativno velik broj heterogenih struktura, ali se one mogu podijeliti u tri osnovna tipa. Sva tri tipa dijele zajedničku jezgru koja je vezana na Asn proteina te sadrži tri Man i dva GlcNAc, a zapisuje se kao $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-Asn-X-Ser/Thr}$. Za oligomanozni tip je karakteristično što se na jezgru vežu samo molekule Man. Nadalje, razlikujemo hibridni te kompleksni tip N-glikana koji nastaju u *medijalnom*- i *trans*-Golgiju dodavanjem GlcNAc, Fuc, Gal te sijalinske kiseline (Sia) na postojeću jezgru. Spomenuti proces biosinteze te osnovni tipovi N-glikana su vidljivi na Slici 2 (Stanley i sur., 2015-2017; Reily i sur., 2019).



Slika 2. Dio biosinteze N-glikana u ER-u i Golgijevom aparatu (Reily i sur., 2019). Prikazana je biosinteza nakon što se na dolikolnom nosaču formira oligosaharidna struktura koja sadrži četrnaest monosaharidnih jedinica

Glc3Man9GlcNAc2-P-P-Dol. Proces se odvija u endoplazmatskom retikulumu (ER) i Golgijevom aparatu nizom reakcija posredovanim posebnim glikozidazama i glikoziltransferazama te su označena tri osnovna tipa N-glikana koja pritom nastaju; kompleksni, hibridni te oligomanozni tip N-glikana. OST, oligosaharil transferaza; α -Glc I-II, α -glukozidaze; ER α -Man, α -manozidaza u ER-u; α -Man I-II, α -manozidaze u *cis*-Golgiju; GnT-I-IV, GlcNAc-transferaze; Gal-T, β 1,4 galaktoziltransferaza; α 2,3 Sijalil-T, α 2,3 sijaliltransferaza; α 2,6 Sijalil-T, α 2,6 sijaliltransferaza; N, asparagin; Gal, galaktoza; Glc, glukoza; GlcNAc, N-acetilglukozamin; Man, manoza, Sia, sijalinska kiselina.

1.3. Varfarin

Jedan od dokaza kako je biljni svijet izvor iznimno potentnih farmakoloških spojeva je upravo priča o otkriću te upotrebi varfarina. Tijekom 1920-ih godina u zemljama Sjeverne Amerike događao se, tada neobjašnjiv, pomor stoke uzrokovan fatalnim krvarenjima. Kao uzrok je prepoznata pljesniva silaža koja je sadržavala žuti kokotac (*Melilotus officinalis*); biljku bogatom kumarinom, spojem za kojeg se dvadesetak godina kasnije dokazalo da ga pljesni oksidacijom prevode u 3,3'-metilen-bis(4-hidroksikumarin) tj. dikumarol koji pokazuje jaki antikoagulantni učinak (Stahmann i sur., 1941). To je bio spoj uzor na temelju kojega se daljnjim radom sintetizirao varfarin; spoj prvotno korišten za ubijanje štetnih glodavaca za kojeg je naknadno pronađena uporaba u ljudi i koji je danas najpropisivaniji lijek u antikoagulantnoj terapiji (Pirmohamed, 2006).

1.3.1. Indikacije i doziranje

Terapijske indikacije propisane za varfarin u Republici Hrvatskoj su sljedeće: liječenje i prevencija duboke venske tromboze i plućne embolije, sekundarna prevencija infarkta miokarda i prevencija tromboembolijskih komplikacija (moždani udar ili sistemska embolija) nakon infarkta miokarda te prevencija tromboembolijskih komplikacija u bolesnika s atrijskim fibrilacijama, s bolešću srčanih zalistaka ili s umjetnim srčanim zaliscima (<http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Martefarin-5-mg-tablete/14514/>). Dugo vremena je njegovo antikoagulantno djelovanje korišteno kao prva linija za mnoge indikacije, ali razvojem novih oralnih antikoagulantnih lijekova (NOAK) koji pokazuju bolje rezultate u određenim indikacijama isti se razmatraju kao alternativna terapija (Hicks i sur., 2016).

Jedan od najvećih nedostataka varfarina je njegov kompliciran režim doziranja koji zahtjeva praćenje mnogih faktora poput: dobi, spola, težine, bolesti. Također, poznato je kako stupa u interakcije s mnogim lijekovima te određenim prehranbenim namirnicama. Nadalje, zbog svog potentnog djelovanja i ozbiljnih indikacija u kojima se koristi, pacijenti optimalnom dozom izbjegavaju rizik nastanka krvnog ugruška ili krvarenja ukoliko je doza preniska, odnosno previsoka (Holbrook i sur., 2005). Stoga su pacijenti na terapiji varfarinom primorani redovno (ovisno o riziku i stabilnosti laboratorijskih vrijednosti, to može varirati od svakodnevne kontrole do svakih 4-12 tjedana) kontrolirati njegovu koncentraciju laboratorijskim krvnim pretragama, što se bitno olakšalo uvođenjem metoda samotestiranja koje su preporučene kod motiviranih pacijenata educiranih za provođenje istih te su takvi testovi kao i mogućnost samostalnog prilagođavanja doze pokazali odlične rezultate u smanjenju trombotskih incidenata (Heneghan i sur., 2012; Holbrook i sur., 2012).

Spomenuti laboratorijski test nazvan INR (eng. International normalized ratio) uveden je 1980-ih godina od strane Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, eng. World Health Organization) s ciljem kontrole te davanja uniformne i sigurne doze u antikoagulantnoj terapiji varfarinom. Naime, test koji je bio univerzalan prije uvođenja INR je test protrombinskog vremena (PV); konceptualno jednostavan test u kojem se mjeri vrijeme potrebno za stvaranje ugruška nakon dodavanja tkivnog tromboplastina, ali se nije pokazao idealnim zbog problema standardizacije korištenog tkivnog faktora. Tako je nastao INR, omjer PV-a pacijenta i srednjeg normalnog PV-a (predstavlja referentnu vrijednost) potenciran međunarodnim indeksom senzitivnosti (ISI, eng. International sensitivity index) te je prikazan formulom (Poller, 2004):

$$INR = \left(\frac{PV_{pacijent}}{PV_{srednji\ normalan}} \right)^{ISI}$$

Terapijski cilj za većinu indikacija je stabilan INR 2,0-3,0 (2,5 se smatra idealnom vrijednosti te se uzima kao cilj prilikom doziranja), dok se u profilaksi tromboembolijskih komplikacija u bolesnika s povećanim rizikom poput onih s umjetnim srčanim zaliscima uzimaju vrijednosti INR 2,5-3,5 (Holbrook i sur., 2012). Kako bi se postigle željene vrijednosti izrađeni su algoritmi doziranja koji su prilagođeni hitnosti antikoagulacijskog učinka i prisutnim rizičnim faktorima te obično podrazumijevaju početnu dozu od 10mg varfarina (u određenim slučajevima se preporuča početna doza od 5mg) koja ostaje relativno visoka prvih 3-5 dana, ovisno o INR vrijednostima koje se u početku svakodnevno mjere. Nakon što se postigne stabilna ciljna razina, za što je obično potrebno 5 do 6 dana, zadrži se optimalna doza te se

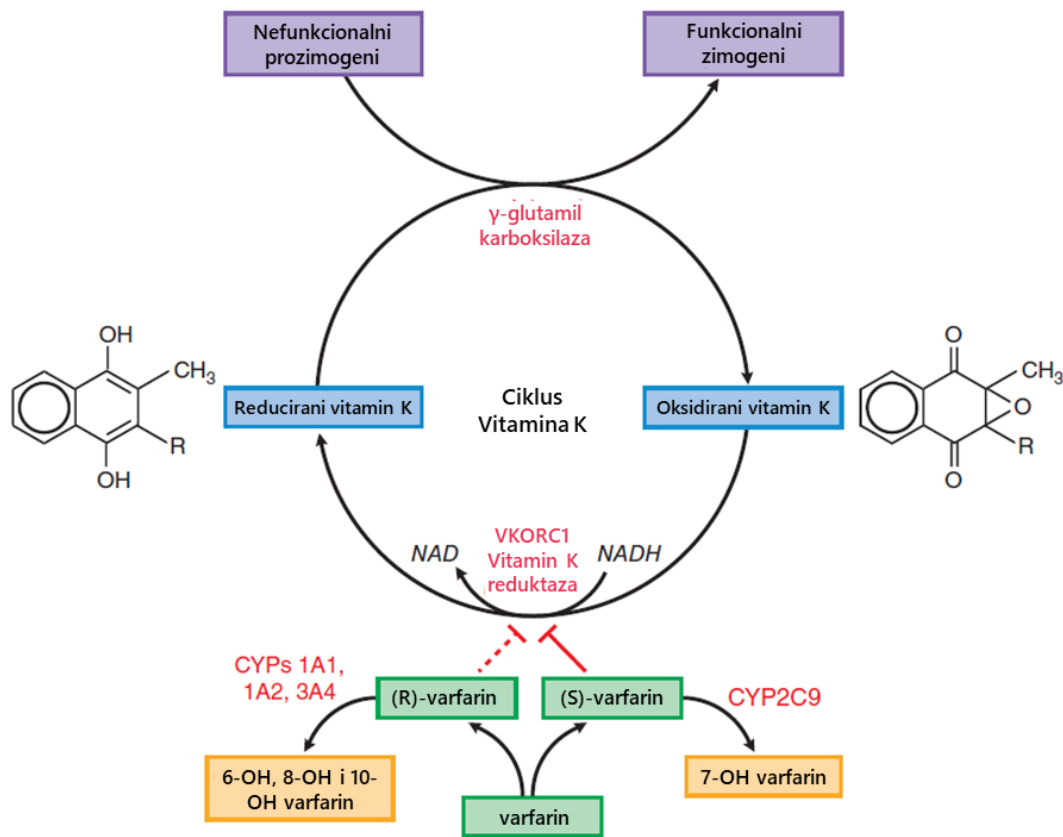
razmaci između mjerenja produljuju (<http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Martefarin-5-mg-tablete/14514/>).

1.3.2. Farmakokinetika i mehanizam djelovanja

Biodostupnost varfarina je gotovo kompletna kada se uzima oralno, intravenski ili rektalno te se maksimalna koncentracija postiže za 2-8 sati. Gotovo sav je vezan za plazmatske proteine (oko 99%) od čega skoro cijelim dijelom za humani serumski albumin (HSA), što potencijalno utječe na njegovo dugo poluvrijeme života (varira 25-60 sati) te ga čini lijekom s uskim terapijskim indeksom jer je samo slobodna frakcija farmakološki aktivna. Međutim, pokazano je kako je afinitet vezanja varfarina na alfa-1 kiseli glikoprotein (AGP) usporediv s onim na HSA te je simulacijom distribucije vezanja varfarina na serumske proteine predviđen značajan udio koji je vezan na AGP (oko 5%), unatoč činjenici da je koncentracija HSA višestruko veća od AGP-a. Varfarin dolazi kao racemična smjesa (S)- i (R)-varfarina od kojih je (S) enantiomer 3-5 puta potentniji u svom farmakološkom učinku (Katzung, 2018; Goodman i sur., 2018; Urien i sur., 1982). Izlučivanje (S)-varfarina je većinom (>85%) posredovano CYP2C9 koji katalizira 6- i 7- hidroksilacijske reakcije u kojima je (S)-7- hidroksivarfarin predominantni metabolit. S druge strane, metabolizam (R)-varfarina je kompliciraniji gdje nastaju 6-, 7-, 8- i 10-hidroksilirani metaboliti. Glavni jetreni enzim koji katalizira reakciju 6-hidroksilacije (71%) je CYP1A2, ali on bitno ne utječe na 7- i 8-hidroksilaciju. Nadalje, CYP2C19 je zaslužan za 8-hidroksilaciju, ali ne i za 6- i 7-hidroksilaciju te se 10-hidroksilacija događa isključivo uz CYP3A4 (Maddison i sur., 2013).

Koagulacijski faktori II, VII, IV i X te antikoagulacijski proteini C i S sintetiziraju se u jetri te je za njihovu aktivaciju potrebna γ -glutamil karboksilaza kojom se γ -karboksiliraju glutamatni aminokiselinski ostatci. U tom procesu reducirani oblik vitamina K služi kao kofaktor pri čemu nastaje njegov epoksidni oblik te kako bi ciklus bio održiv potrebno je djelovanje vitamin K epoksid reduktaze (VKORC1) koja ga vraća u reducirani oblik (Slika 3). Terapeutske doze varfarina blokiraju djelovanje VKORC1 pri čemu dolazi do smanjenja koagulacijskih faktora za 30-70%. Djelovanje koagulacijskih faktora koji su već u cirkulaciji nije zahvaćeno varfarinom te do antikoagulacijskog učinka dolazi nakon što oni budu potrošeni. Paradoksalno, pri uvođenju terapije varfarinom može doći do prokoagulacijskog učinka zbog različitih vremena poluživota spomenutih koagulacijskih faktora i antikoagulacijskih proteina. U tom slučaju prvo dolazi do trošenja antikoagulacijskih proteina

te se kod pacijenata u hiperkoagulabilnim stanjima uvijek uz varfarin daje brzodjelujući parenteralni antikoagulans (heparin, niskomolekularni heparin ili fondaparinuks) tijekom 4-5 dana dok se ne postigne adekvatni antikoagulacijski učinak varfarina (Katzung, 2018; Goodman i sur., 2018).



Slika 3. Ciklus vitamina K i mehanizam djelovanja varfarina (Goodman i sur., 2018).

1.4. Personalizirana medicina i farmakogenomika

Tehnološki napredak u modernoj medicini nameće novu dogmu u pristupu liječenja pacijenata, a postoje naznake kako su neki od temelja tog pristupa poznati još za vrijeme antičkih Grka te su pronađeni u sačuvanim Hipokratovim zapisima (Konstantinidou i sur., 2017). Personalizirana medicina je područje zdravstvene zaštite koja uzima u obzir jedinstvene kliničke, genske i genomske informacije te one dobivene od okoline svakog pojedinog pacijenta. To je integrirani, koordinirani i na dokazima temeljeni pristup individualizacije skrbi pacijenata u kontinuumu od zdravlju do bolesti. Ono čemu personalizirana medicina stremi je optimizacija zdravstvene zaštite pacijenata koja uključuje terapiju, vrstu i doze lijekova te

strategije prevencije koje se razlikuju za svakog pojedinca, time dajući optimalnu te prilagođenu zdravstvenu skrb. Jedan od ključnih faktora takvom pristupu su informacije dobivene iz gena tj. genoma (Ginsburg i Willard, 2009). Farmakogenetika je definirana kao znanost o varijacijama u sekvenci DNA povezanim s odgovorom na lijekove te je podskup farmakogenomike koje je definirana kao znanost o varijacijama u sekvenci DNA i karakteristikama RNA povezanim s odgovorom na lijekove (https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-e-15-establish-definitions-genomic-biomarkers-pharmacogenomics-pharmacogenetics-genomic-data_en.pdf). Razvoj tehnologija omogućio je pristup informacijama koje se nalaze u ljudskom genomu, ali za primjenu personalizirane medicine potrebne su tehnologije kojima se mogu prepoznati one određenih pojedinaca kao i ono što od njega proizlazi; transkriptom, proteom i metabolom. Proteklih godina su prepoznati razni farmakogenomski testovi s potencijalom izmjene standardne medicinske prakse te su mnogi s tom svrhom implementirani (Ginsburg i Willard, 2009).

1.4.1. Farmakogenomski testovi u terapiji varfarinom

Velika varijabilnost doze (oko 50%) u terapiji varfarinom posljedica je genskih polimorfizama kod enzima CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 i CYP2C klastera (poput rs12777823) te mnogih drugih negenskih faktora (Johnson i sur., 2017). CYP2C9 je enzim koji je primarno zaslužan za metabolizam (S)-varfarina te je poznato više od 60 varijanti njegovih alela koji su posljedica polimorfizma pojedinačnog nukleotida (SNP, eng. single-nucleotide polymorphism) od kojih je čak 18 povezano sa smanjenom aktivnošću enzima. Fenotip kod pojedinaca referiranih „normalnim metabolizatorima“ posljedica je homozigotnog CYP2C9*1 alela, dok su aleli CYP2C9*2 i CYP2C9*3 pronađeni da najviše smanjuju funkciju enzima u populaciji europskog porijekla, sa smanjenjem od 30-40%, odnosno 80-90%. Pacijenti koji imaju homozigotne *2 ili *3 alele imaju povećan rizik od krvarenja u terapiji varfarinom, potrebno je dulje vremena do postizanja stabilnog INR-a te su za to potrebne manje doze (Johnson i sur., 2017; Aithal i sur.,1999; Lee i sur., 2002). Nadalje, na metabolizam varfarina bitno utječu i polimorfizmi gena VKORC1 koji kodira enzim vitamin K epoksid reduktazu. Preciznije, polimorfni aleli u kojima je gvanin zamijenjen adeninom u promotorskoj regiji gena (VKORC1 -1639G>A), čime dolazi do značajnog smanjenja ekspresije enzima te potrebe za manjim dozama varfarina kod pacijenata koji imaju jednu ili dvije takve varijante u odnosu na -1639G/G homozigote (Rieder i sur.,2005; Limdi i sur., 2010).

Važnost ovih otkrića prepoznato je uvođenjem napomene u sažetak opisa svojstava lijeka o rezultatima genskih testiranja za CYP2C9 i VKORC1 te su na temelju tih otkrića razvijeni detaljni algoritmi kojima se prilagođava doza varfarina s obzirom na navedene genske varijante koje se također bitno razlikuju ovisno o genskom podrijetlu (Johnson i sur., 2017). Međutim, kliničke smjernice, na temelju studija o isplativosti uvođenja farmakogenomskih testiranja u terapiju varfarinom (Meckley i sur., 2010) te manjkom kvalitete i dokaza randomiziranih kliničkih studija, nisu opravdale rutinsko korištenje takvih testova (Meckley i sur., 2010; Holbrook i sur., 2012). Ipak, novija istraživanja su pokazala da doziranje varfarinom vođeno farmakogenomskim testiranjima pokazuje bolje rezultate od onih u standardnoj kliničkoj praksi (Pirmohamed i sur., 2013; Shaw i sur., 2015; Tse i sur., 2018; Yang i sur., 2019). Također, uspješno su provedene studije u kojima je takav pristup uveden u kliničku praksu te je dokazana isplativost uvođenja farmakogenomskih testova (Verhoef i sur., 2016; Jorgensen i sur., 2019).

1.5. Alfa-1 kiseli glikoprotein

Alfa-1 kiseli glikoprotein (AGP), također poznat kao orosomukoid (ORM), serumski je protein koji pokazuje kiselost svojstva ($pK_a = 2,6$) te iznimnu topljivost u polarnim otapalima, a prvi put je opisan još sredinom 20. stoljeća (Schmid, 1950, 1989; Weimer i sur., 1950). Obilježava ga velika količina vezanih ugljikohidrata koji čine oko 45% ukupne mase od kojih je značajan udio sijalinska kiselina zbog čega ima negativan naboj (Bteich, 2019). Spada u serumske proteine akutne faze te se njegova koncentracija značajno povećava tijekom različitih upala, a primijećeno je povećanje i tijekom kroničnih bolesti poput reumatoidnog artritisa (Gornik i Lauc, 2008). Primarno mjesto sinteze je u jetri te je ekspresija njegovog gena pod utjecajem raznih regulatornih medijatora poput glukokortikoida, interleukina i faktora tumorske nekroze (Fournier i sur. 2000).

1.5.1. Struktura, genske varijante i biološke uloge AGP-a

Humani AGP čini jedan polipeptidni lanac od 183 aminokiseline s dvije disulfidne veze te mu molekulska masa iznosi 41-43kDa (Fournier i sur., 2000) . Visoko sijalinizirani kompleksni N-vezani glikani različitog stupnja grananja (bi-, tri- i tetra-antenari) mogu se

vezati na pet različitih glikozilacijskih mjesta (Asn-15, -38, -54, -75, -85) na glikoproteinu (Taguchi i sur., 2013).

Ukupni humani AGP kodiraju tri gena (AGP-A, AGP-B i AGP-B') koji se nalaze na kromosomu 9 pri čemu AGP-A (ORM1) kodira zastupljeniji oblik AGP-a u serumu, dok identični geni AGP-B i AGP-B' (ORM2) onaj manje zastupljeni. ORM1 kodira tri genske varijante: F1, F2 i S koje se zajednički označavaju kao varijante F*S te se međusobno razlikuju do 5 aminokiselina. S druge strane, gen ORM2 kodira varijantu A koja se od onih kodiranih ORM1 genom razlikuje u 20-ak aminokiselina (Tablica 1) (Taguchi i sur., 2013; Smith i Waters, 2019). Navedene genske varijante se razlikuju u plazmatskim koncentracijama kod zdravih pojedinaca s time da je ta razlika dodatno naglašena tijekom patofizioloških procesa (Eap i Baumann, 1989). Nadalje, uočene su strukturalne razlike između navedenih varijanti. Vezna mjesta obiju varijanti sadrže dva jednaka reznja, ali je kod genskih varijanti F*S vezno mjesto šire zbog dodatnog trećeg reznja koji potencijalno utječe na selektivnost vezanja različitih liganda (Herve i sur., 1993; Nishi i sur. 2011).

Tablica 1. Genske varijante humanog AGP-a (Smith i Waters, 2019).

Gen*	Protein*	Skup varijanti	Pojedinačne varijante	Reznjevi veznog mjesta	Selektivnost vezanja	Omjer varijanti (F1*S/A)	
						Normalno	Bolest
ORM1	AGP-A	F1*S	F1 F2 S	I, II, III	Manja	2-3	do 8
ORM2	AGP-B AGP-B'	A	A A	I, II	Veća	1	1

*Nomenklatura za gene i proteine se u literaturi koristi naizmjenično

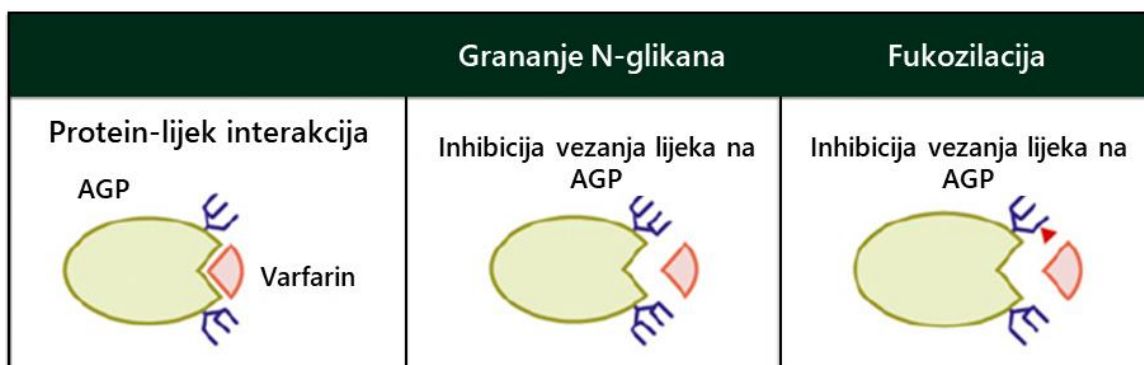
Biološka uloga AGP-a nije do kraja razjašnjena, ali se smatra kako je to glikoprotein s važnim imunomodulatornim te protuupalnim ulogama (Fournier i sur., 2000). Uzimajući u obzir njegova svojstva te činjenicu kako spada u pozitivne proteine akutne faze može se pretpostaviti da AGP sudjeluje u vezanju egzogenih i endogenih upalnih medijatora, a kao primjer se može navesti njegovo vezanje te neutralizacija toksičnog bakterijskog lipopolisaharida (Moore i sur., 1997). Također, dokazani su protektivni učinci kod infekcija parazitom *P. falciparum* te bakterijom *K. pneumoniae*, kao i protektivni učinci kod

inflamatornog hepatitisa, hipovolemičkog šoka, edematoznog pankreatitisa i drugih patofizioloških stanja (Hochepped i sur. 2003). Nadalje, AGP je uz albumin najvažniji serumski protein koji veže i transportira lijekove te posljedično utječe na bioraspoloživost istih. Zahvaljujući svojim fizikalno-kemijskim svojstvima AGP poglavito veže bazične lijekove, a djeluje i kao transportni protein endogenih molekula steroidne te kateholaminske strukture (Israili i Dayton, 2001).

1.5.2. Glikozilacija AGP-a i vezanje varfarina

Zahvaljujući naprednim tehnikama analize koje daju specifične informacije o glikozilaciji svakog glikozilacijskog mjesta dobivena su vrijedna saznanja o važnosti te varijabilnosti N-glikozilacije AGP-a. Izraženoj mikroheterogenosti AGP-a pridonosi činjenica kako se na svih pet glikozilacijskih mjesta mogu vezati N-glikani koji se razlikuju u broju grana i terminalnim šećerima te je masenom spektrometrijom uočeno 80-ak različitih glikopeptida (Imre i sur., 2005). Jedan od karakterističnih terminalnih šećera na AGP-u je sijalinska kiselina, a neki glikani mogu imati i terminalno α 1-3 vezanu fukozu pri čemu tvore sijalil Lewis X antigen (Gornik i Lauc, 2008). Promjene u sastavu vezanih terminalnih šećera te relativnog omjera N-vezanih glikana s različitim stupnjem grananja pokazane su kod akutnih bolesti, ali i kod kroničnih bolesti poput reumatoidnog artritisa, nekih vrsta raka te dijabetesa (Elliott i sur., 1997; Poland i sur., 2001; Hashimoto i sur., 2004; Higai i sur., 2005; Ceciliani i Pocacqua, 2007).

Iako se na AGP značajno ne vežu kiseli lijekovi, postoje iznimke, među kojima je i varfarin (Israili i Dayton, 2001). Kristalografska struktura AGP-a pokazuje kako se u blizini njegovog veznog mjesta nalaze glikozilacijska mjesta Asn-38 i -75 te je provedena studija na asijaliniziranom AGP-u u kojoj je pokazano kako povećana razgranatost i terminalna fukozilacija N-glikana smanjuju afinitet vezanja varfarina (Slika 4) (Wu i sur., 2018). Također, varijabilnosti AGP-a pridonose i različite genske varijante za koje se sugerira da imaju različite afinitete vezanja lijekova. Preciznije, provedena je studija koja je pokazala kako ORM1*S varijanta zahtjeva manje doze za postizanje optimalne antikoagulantne terapije te kako je to još jedan polimorfni gen koji utječe na pravilno doziranje u terapiji varfarinom (Wang i sur., 2013).



Slika 4. Shematski prikaz promjene u glikozilaciji AGP-a i utjecaja na vezanje varfarina (Wu i sur., 2018).

1.6. LC-ESI-MS

Masena spektrometrija (MS) je analitička tehnika koja omogućava precizno određivanje razlika u strukturi te je jedna od presudnih tehnika u tumačenju bioloških uloga glikoproteina (Harvey, 2001). Pojednostavljeno, svaki se maseni spektrometar sastoji od četiri dijela: ulaza za uzorak, ionizacijskog izvora, analizatora masa te ionskog detektora. Analiza bioloških uzoraka bitno je olakšana otkrićem ionizacijske tehnike elektroraspršenja (ESI, eng. electrospray ionization) u kojoj načelno ne dolazi do velike fragmentacije uzorka te je njome omogućeno uparivanje MS uređaja na uređaje tekućinske kromatografije (LC, eng. liquid chromatography) (Pitt, 2009).

LC-ESI-MS je snažna analitička tehnika u kojoj se komponente analita razdvajaju u pogodnom otapalu na temelju razlike u vremenu zadržavanja na koloni unutar sustava tekućinske kromatografije. Zatim se uzorak relativno niskom brzinom protoka unosi u maseni spektrometar gdje u jakom električnom polju dolazi do raspršenja i nastanka sitnih ioniziranih čestica. Kako bi došlo do prenošenja nastalih čestica u analizator masa te se dodatno poboljšalo raspršenje koristi se struja plinovitog dušika (N_2) koja ide uz kapilaru kroz koju se dovodi uzorak. Za hvatanje tih ioniziranih čestica te uklanjanje ostatka otapala zaslužna je grijana kapilara (100-300 °C) koja ih prevodi u analizator masa koji se nalazi pod visokim vakuumom (Banerjee i Mazumdar, 2012). Uz ESI postoje i druge ionizacijske tehnike poput: elektron ionizacije (EI, eng. electron ionization), kemijske ionizacije (CI, eng. chemical ionization), ionizacije brzim atomskim bombardiranjem analita (FAB, eng. fast atom bombardment), matriksom potpomognute laserske desorpcije (MALDI, eng. matrix-assisted laser desorption ionization) i druge (de Hoffmann i Stroobant, 2007).

Također, razlikujemo i više vrsta masenih analizatora. Onaj u kojem se ioni razdvajaju sukladno njihovoj m/z vrijednosti unutar oscilirajućeg polja stvorenog pomoću četiri paralelno postavljene šipke pod naponom nazivamo kvadrupolnim analizatorom. U takvom uređaju se ioni razdvajaju na temelju stabilnosti njihove putanje. Dodatno se na analitičkoj snazi dobiva tandemskom masenom spektroskopijom gdje se unutar istog instrumenta u sekvenci nalazi više analizatora. U slučaju trostrukog kvadrupola između dva kvadrupola nalazi se kolizijska ćelija punjena inertnim plinom sa svrhom dodatne fragmentacije analita propuštenog prvim kvadrupolom. Nadalje, analizatorima vremena leta ili TOF analizatorima (TOF, eng. time of flight) separacija iona se provodi na temelju razlike u njihovoj brzini. Ioni nastali ionizacijom ubrzavaju se električnim poljem kojim dobivaju jednaku kinetičku energiju te se na temelju vremena potrebnog da stignu do detektora određuje njihova masa i naboj. Novije tehnologije omogućile su razne tandemске analizatore među kojima je i kvadrupolni analizator vremena leta (qTOF). Rezultati se dobivaju softverskom obradom informacija dobivenih detektorom kojih također ima više vrsta te se odabiru ovisno o dizajnu instrumenta i planirane analize (de Hoffmann i Stroobant, 2007).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Personaliziranom medicinom postavljen je cilj optimizacije zdravstvene zaštite pacijenata koja uključuje terapiju, vrstu i doze lijekova te strategije prevencije koje se razlikuju za svakog pojedinca, time dajući optimalnu te prilagođenu zdravstvenu skrb (Ginsburg i Willard, 2009). Skupina pacijenata koja zasigurno zahtijeva ovakav pristup je ona na antikoagulantnoj terapiji varfarinom. To je lijek uske terapijske širine, što znači da je potrebno uzeti u obzir sve parametre koji uvjetuju njegovo doziranje s ciljem smanjenja rizika od nuspojava te bržeg postizanja stabilne i optimalne terapijske doze. Danas je poznato da postoji velika varijabilnost doze (oko 50%) u terapiji varfarinom koja je posljedica genskih polimorfizama enzima (ponajviše enzima CYP2C9 i VKORC1) te mnogih drugih negenskih faktora (Johnson i sur., 2017). Nadalje, postoje naznake kako interindividualnoj varijaciji doze pridonose genske varijante alfa-1 kiselog glikoproteina te njegova N-glikozilacija (Wang i sur., 2013; Wu i sur., 2018).

AGP je plazmatski glikoprotein koji sadrži velik udio vezanih N-glikana te je, *in vitro* na asijaliniziranom AGP-u, dokazano da visoka razgranatost i fukozilacija istih smanjuju njegov afinitet vezanja varfarina, što potencijalno utječe i na samu terapiju varfarinom. Ovim radom se htio ispitati utjecaj N-glikozilacije humanog AGP-a na terapiju varfarinom *in vivo* te njegov N-glikom kao potencijalni biomarker u individualizaciji terapije. Zbog iznimne heterogenosti N-glikana humanog AGP-a koja je posljedica 5 različitih glikozilacijskih mjesta od kojih sva mogu vezati glikane različitog stupnja razgranatosti i stupnja sijalinizacije ili fukozilacije za analizu uzoraka korištena je reverzno-fazna LC-MS metoda kojom su dobivene informacije svojstvene svakom glikozilacijskom mjestu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Tablica 2. Anorganske kemikalije.

Kemikalija	Proizvođač
2M Amonijev bikarbonat (NH_4HCO_3)	Acros Organics, Geel, Belgija
70% Perklorna kiselina	Merck, Darmstadt, Njemačka
Fosfotungistična kiselina	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, SAD
35% Klorovodična kiselina (HCl)	VWR International, Radnor, PA, SAD
10N Natrijev hidroksid (NaOH)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, SAD

Tablica 3. Organske kemikalije.

Kemikalija	Proizvođač
Acetonitril (ACN)	VWR International, Radnor, PA, SAD
1,5% RapiGest SF surfaktant	Waters, Milford, MA, SAD
Ditiotrietol (DTT)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, SAD
Jodoacetamid	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, SAD
50mM Octena kiselina	Promega, Madison, WI, SAD
Chromabond® HILIC kuglice	Macherey-Nagel, Düren, Njemačka
0,1% Trifluorooctena kiselina (TFA)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, SAD

Tablica 4. Enzimi.

Enzim	Proizvođač
TPCK-tretirani tripsin	Promega, Madison, WI, SAD

Tablica 5. Pripremljene otopine i suspenzije.

Otopine i suspenzije	Priprema
1,2M Perklorna kiselina	Za 10mL otopine: dodaje se 1034 μ L 70% perklorne kiseline i ostatak (8966 μ L) vode
2% Fosfotungistična kiselina u 2N HCl	Za 1mL otopine: dodaje se 0,02g fosfotungistične kiseline, 177 μ L 35% HCl-a i ostatak (823 μ L) vode
1M HCl	Za 1mL otopine: dodaje se 88 μ L 35% HCl-a i ostatak (912 μ L) vode
0,1N NaOH	Za 10mL otopine: dodaje se 100 μ L 10N NaOH i ostatak (9900 μ L) vode
30mM NH ₄ HCO ₃	Za 1mL otopine: dodaje se 15 μ L 2M NH ₄ HCO ₃ i ostatak (985 μ L) vode
15% RapiGest u 30mM NH ₄ HCO ₃	Za ~ 0.670 mL otopine: dodaje se 657 μ L 30mM NH ₄ HCO ₃ u 10 μ g RapiGest-a koji se nalazi u originalnoj bočici
200mM DTT	Za 0,5mL otopine: dodaje se 0,0154g DTT-a u 0,5mL vode
60mM DTT	Za 1mL otopine: dodaje se 300 μ L 200mM DTT-a i ostatak (700 μ L) vode
160mM Jodoacetamid	Za 1mL otopine: dodaje se 0,0296g jodoacetamida u 1mL vode
0,4 μ g/ μ L Otopina tripsina	Za 0,4mL otopine: pripremi se 1mg/mL otopina tripsina u 50mM octenoj kiselini te se 160 μ L takve otopine pomiješa s 240 μ L vode
0,1% TFA	Za 1000ml otopine dodaje se 1ml TFA u 1000ml vode
50mg/mL Suspenzija Chromabond® HILIC kuglica u 0,1% TFA	Za 10mL suspenzije: dodaje se 0,5g Chromabond® HILIC kuglica u 10mL 0,1% TFA ?
90% ACN	Za 1000ml otopine dodaje se 100ml vode u 900ml ACN-a
90% ACN + 0,1% TFA	Za 1000ml otopine dodaje se 100ml vode u 900ml ACN-a i 1ml TFA

Tablica 6. Laboratorijska oprema i pribor.

Oprema i pribor	Proizvođač
PCR pločice u formatu s 96 jažica	Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD
Jouan CT centrifuga	Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD
Polipropilenska filter pločica s 96 jažica	Orochem, Naperville, IL, SAD
Vakuumska pumpa	Millipore Corporation, Billerica, MA, SAD)
SpeedVac vakuumski koncentrat	Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD
NanoACQUITY UPLC sustav	Waters, Milford, MA, SAD
Compact qTOF maseni spektrometar	Bruker Daltonics, Bremen, Njemačka
CaptiveSpray nanoBooster ionski izvor	Bruker Daltonics, Bremen, Njemačka
Acclaim PepMap100 C8 (5 mm×300 μm i.d.) pretkolona	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD
Halo C18 nano-LC (150 mm×75 μm i.d.) kolonu s 2.7μm HALO česticama fuzionirane jezgre	Advanced Materials Technology, Wilmington, DE, SAD
Mikropipete	Mettler-Toledo Rainin, Oakland, CA, SAD
Vaga	Ohaus, Parsippany, NJ, SAD

3.2. Ispitanici

Uzorci na kojima je provedena analiza zaprimljeni su s odijela kardiologije Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ te su s njima dostavljeni i podaci o pacijentima. U studiju je uključeno 58 ispitanika u dobi od 42 do 96 godina koji su na antikoagulantnoj terapiji varfarinom (Tablica 7). Iz dobivenog krvnog uzorka je centrifugiranjem odvojena krvna plazma koja je do trenutka analize skladištena na -20 °C.

Tablica 7. Deskriptivna statistika pacijenata uključenih u studiju

Ukupni broj pacijenata, N	58
Muški spol, N (%)	31 (53,4)
Ženski spol, N (%)	27 (46,6)
Dob u godinama, \bar{x} ($x_{min} - x_{max}$)	73,2 (42 – 96)
INR, M (IQR)	1,95 (2,6 – 1,575)
$x_{min} - x_{max}$	1,3 – 5,4
Dnevna doza varfarina u mg, M (IQR)	5 (5-3)
$x_{min} - x_{max}$	0 – 10

3.3. Metode

3.3.1. Obogaćivanje AGP-a

Iz dobivenih uzoraka humane plazme AGP je obogaćen precipitacijom „seromukoidne“ frakcije (Hellerstein i sur., 1985). U PCR pločicu s 96 jažica prebačeno je 50 μ L svakog uzorka plazme te je dodano isto toliko 1,2M perklorne kiseline rezultirajući koncentracijom perklorne kiseline od 0,6M. Nakon toga su uzorci stavljeni u centrifugu 20 minuta na 1200g pri temperaturi od 5°C. Pomoću 3D isprintanih adaptera i centrifugiranjem na 15g tijekom 30 sekundi, supernatant dobiven prvotnim centrifugiranjem je prebačen u novu PCR pločicu. Potom je dodano 1/10 (\approx 70 μ L) volumena 2% fosfotungistične kiseline u 2N HCl i ponovo stavljeno u centrifugu 20 minuta na 1200g pri temperaturi od 5°C. Zatim se ponavlja proces prebacivanja supernatanta u praznu PCR pločicu pomoću 3D adaptera i centrifugiranjem na 15g tijekom 30 sekundi čime se u preostalom precipitatu dobije „seromukoidna“ frakcija s obogaćenim AGP-om. U završnom koraku se treba dobiti bistra otopina dodavanjem \approx 40 μ L 0,1N NaOH u preostali precipitat.

3.3.2. Redukcija, alkilacija i digestija tripsinom

Pripremljena otopina 1,5% RapiGest SF surfaktanta dodaje se solubiliziranom precipitatu i stavlja na inkubaciju u peć na 5 minuta pri 60°C. Kao reducirajuće sredstvo koristi se 5µL 60mM ditionitrieta (DTT) koji je dodan uzorcima ohlađenim na sobnu temperaturu te su vraćeni na inkubaciju od 30 minuta pri 60°C. Uzorci se ponovo ohlade do sobne temperature i dodaje im se 5µL 160mM jodoacetamida koji djeluje kao alkilirajuće sredstvo i takvi se stave na tresilicu tijekom inkubacije u mraku od 30 minuta. Višak jodoacetamida je poništen dodavanjem 1µL 200mM DTT-a. Prije digestije tripsinom potrebno je podesiti pH vrijednost, što se postiže dodavanjem 1µL 2M amonijeva bikarbonata. Dodavanjem 4µL 0,4µg/µL TPCK-tretiranog tripsina započet je proces tripsinizacije te su uzorci stavljeni na inkubaciju preko noći na 37°C. Sljedeći dan se razgradio ostatak surfaktanta RapiGest SF koji bi mogao ometati tijekom kasnije analize dodavanjem 2µL 1N HCl te inkubacijom od 45 minuta na 37°C.

3.3.3. HILIC-SPE obogaćivanje glikopeptida

Koristeći se ekstrakcijom na čvrstoj fazi uz kromatografiju temeljenoj na hidrofilnim interakcijama (eng. Hydrophilic interaction chromatography based solid-phase extraction, HILIC-SPE), na polipropilenskoj filter pločici s 96 jažica obogaćeni su tripsinizacijom dobiveni glikopeptidi. U svaku jažicu je dodano 0,1mL pripremljene 50mg/mL suspenzije Chromabond® HILIC kuglica. Ispod filter pločice je postavljena pločica za otpad i tako su postavljene iznad vakuumske pumpe pomoću koje se uklanjalo otapalo. Jažice se prvotno kondicioniraju dvostrukim ispiranjem s 250 µL 0,1% TFA nakon čega su stave u početne uvjete ispiranjem dva puta s 250µl 90% acetonitrilom (ACN) + 0,1% TFA. Uzorci s glikopeptidima su razrijeđeni sa 450µL ACN + 0,1% TFA te prebačeni u filter pločicu iznad vakuumske pumpe gdje su dva puta isprani s 250µl ACN + 0,1% TFA. Potom se umjesto pločice za otpad stavlja PCR pločica i obogaćeni glikopeptidi se eluiraju s 200 µl 0,1% TFA. Dobivenom eluatu se ostatak otpala ukloni u SpeedVac vakuumskom koncentratoru i skladišti se na -20°C do analize.

3.3.4. RP-LC-ESI-MS(/MS)

Tripsinizacijom dobiveni AGP glikopeptidi odijeljeni su pomoću nano ACQUITY UPLC sustava spregnutog na Compact maseni spektrometar s CaptiveSpray nanoBooster ionskim izvorom. Dodan je ACN u struju dušika kako bi se povećala ionizacija glikopeptida. Potom je uzorcima dodano 30µL ultračiste vode čime su glikopeptidi razrijeđeni 10 puta te su

uneseni u Acclaim PepMap100 C8 (5 mm×300 μm i.d.) pretkolonu gdje su ispirani 3 minute s 0,1% TFA pri protoku od 40μL/min. Razdvajanje glikopeptida AGP-a na temelju razlika u peptidnoj osnovi provedeno je u Halo C18 nano-LC koloni (150 mm×75 μm i.d.) s 2.7μm HALO česticama fuzionirane jezgre. Gradijentna elucija provedena je na temperaturi kolone od 30°C s brzinom protoka od 1 μL/min. Udio 80% ACN-a se tijekom prvih 5 minuta povećao od 0% do 20% te od 20% do 50% tijekom preostalih 11,5 minuta.

Fragmentacijski spektar glikanskog i peptidnog dijela snimljen je za svaki dobiveni analit. Maseni spektri su snimljeni na frekvenciji od 0,5 Hz unutar raspona masa od m/z 100 do m/z 4000. Kolizijska i ionska energija su bile postavljene na 4 eV, a kolizijska ćelija ispunjena argonom. Za određivanje sastava i strukture glikana korišteni su softveri GlycoWorkbench (Ceroni i sur., 2008) i GlycoMod (Cooper i sur., 2001)

3.3.5. Obrada podataka i statistička analiza

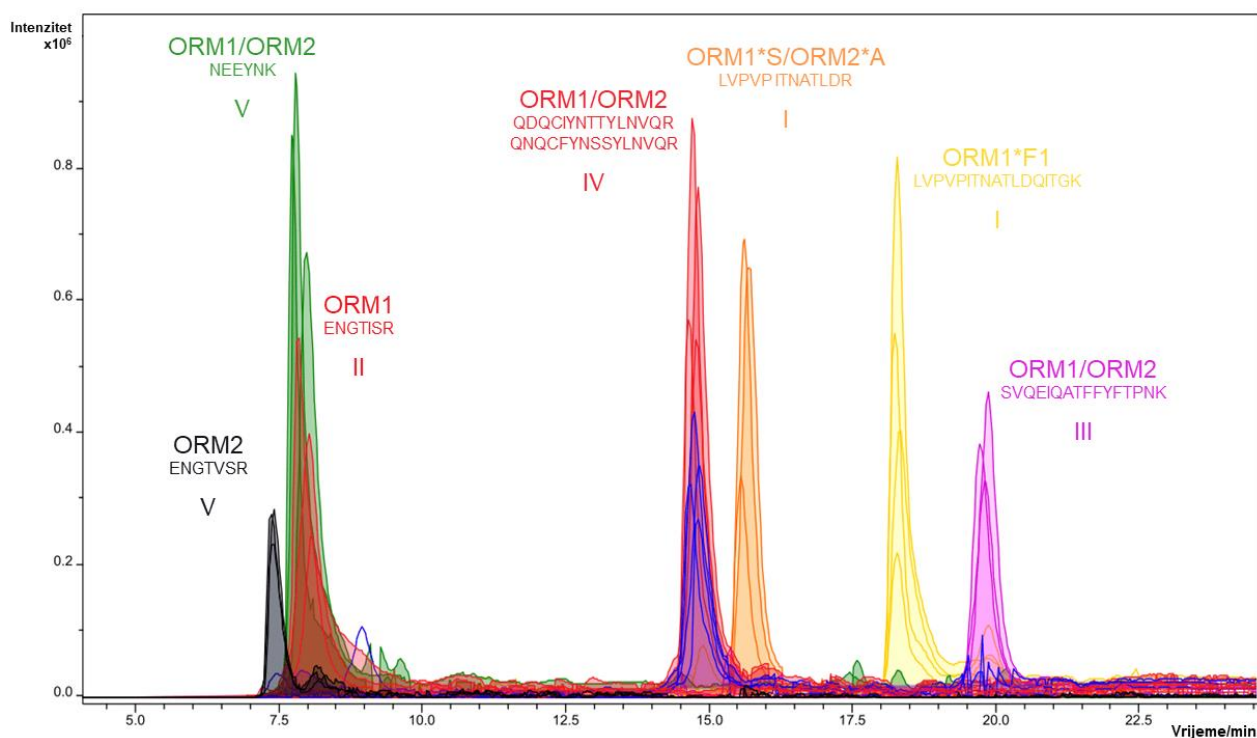
Koristeći se MSConvert alatom (ProteoWizard verzija 3), datoteke korištene u obradi prebačene su u mzXML oblik prije ekstrakcije podataka. LaCyTools (verzija 1.0.11.0.1 b.9) je korišten za automatsku relativnu kvantifikaciju rezultata dobivenih MS-om. Za usklađivanje kromatograma je uzeto pet najsnažnijih glikopeptidnih signala te je na trostruko i četverostruko nabijenim ionima izvršena integracija vršaka tako da sadrže najmanje 90% teorijske izotopne distribucije. Kao kontrola kvalitete u dokazivanju prisutnosti glikopeptida kod određenog signala služili su omjer signala i šuma (veći od 9) integriranog signala, devijacija od teorijske izotopne distribucije (manja od 25%) i točnost mase (između -35 i 35ppm). Kako bi se izbjegla varijacija u jačini signala između uzoraka te omogućila njihova međusobna usporedba, zbrojeni izvučeni signali za trostruko i četverostruko nabijene ione su normalizirani prema ukupnoj integriranoj površini po glikozilacijskom mjestu.

Na tako dobivenim vrijednostima signala N-glikane provedena je regresijska analiza kojom se htio dokazati učinak i statistička značajnost sastava N-glikana i doziranja varfarina. Kao statistički značajni rezultati uzeli su se rezultati s p-vrijednosti nižom od granične ($p < 0,05$).

Analiza i vizualizacija podataka izvršena je u Microsoft Excel-u (vezija 2007.).

4. REZULTATI

Provedenom reverzno-faznom LC-MS analizom htio se dobiti detaljni uvid u sastav glikana svakog pojedinačnog glikozilacijskog mjesta AGP-a te usporediti N-glikanski profil između pacijenata koji primaju različite doze varfarina. Promatrane glikanske strukture potječu s ukupno sedam različitih glikozilacijskih mjesta koja su posljedica pet glikozilacijskih mjesta na samom AGP-u te različitih genskih varijanti koje se ekspimiraju. Tripsinizacijom su dobiveni glikopeptidni fragmenti, a oni koji obuhvaćaju glikozilacijsko mjesto te time sadrže glikane dodatno su obogaćeni ekstrakcijom na čvrstoj fazi uz kromatografiju temeljenoj na hidrofilnim interakcijama. Glikopeptidi su razdvojeni temelju razlike u njihovim peptidnim okosnicama korištenjem reverzno-faznog nanoUPLC sustava spregnutog s ESI-qTOF masenim spektrometrom. Rezultati analize su prikazani na Slici 5.



Slika 5. Kromatogram izoliranih iona (eng. Extracted ion chromatogram, EIC) za neke od najzastupljenijih glikana za svako glikozilacijsko mjesto i gensku varijantu. Pikovima karakterističnim za određeno vrijeme zadržavanja u istoj boji je nadodano od koje genske varijante potječu analizirani glikani tog glikozilacijskog mjesta te peptidni slijed na kojem se nalaze. Za označavanje glikozilacijskih mjesta korišteni su rimski brojevi.

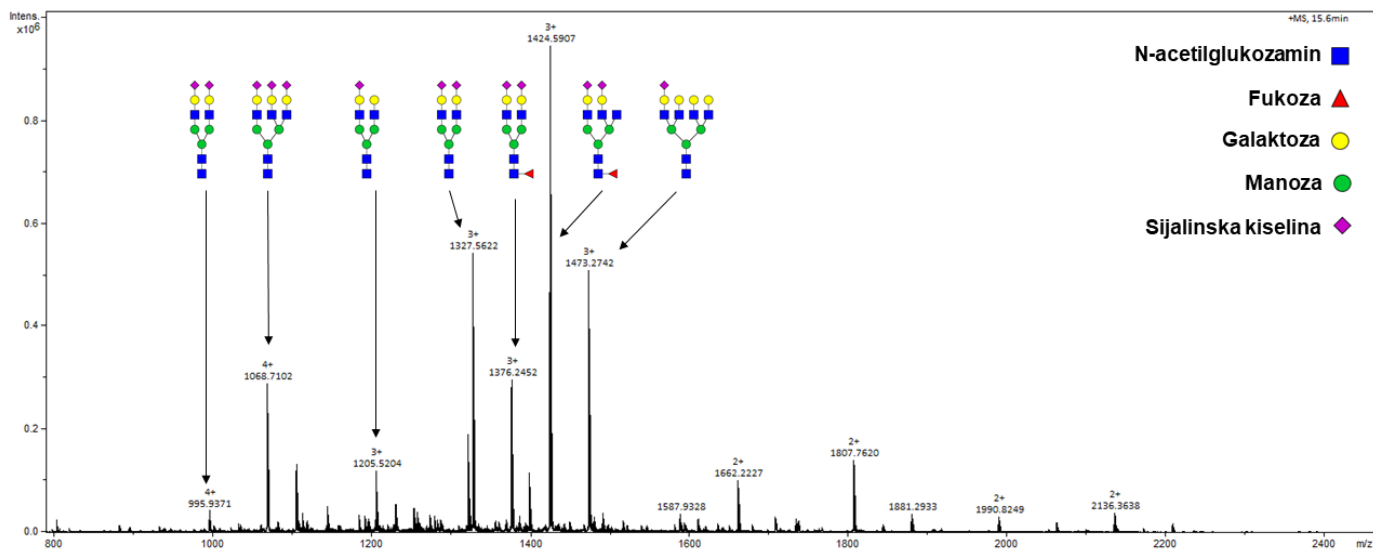
Kako bi se dobile detaljnije informacije za svako glikozilacijsko mjesto, točnije, vrstu i relativnu količinu pojedinih glikana koji se na njima nalaze, provedena je analiza masenih spektara istih. Uspoređivane su m/z vrijednosti dobivenih signala s m/z vrijednostima teoretskih N-glikana pretraživanih za svako glikozilacijsko mjesto. Iste su prikazane u Tablici 8. zajedno s formulom koja odgovara sastavu tih glikana i vremenom zadržavanja na koloni.

Tablica 8. (nastavak).

IIORMN5H6S1F1	3220.2070	1074.4096	806.0590	495	IORMIF1N7H8S4	5661.3741	1888.1320	1416.3508	1113
IIORMN5H6S2F1	3511.3025	1171.4414	878.8329	495	IORMIF1N7H8S2F1	5225.2411	1742.7543	1307.3176	1113
IIORMN5H6S3F1	3802.3979	1268.4732	951.6067	495	IORMIF1N7H8S3F1	5516.3366	1839.7861	1380.0914	1113
IIORMN5H6S3F2	3948.4558	1317.1592	988.1212	495	IORMIF1N7H8S4F1	5807.4320	1936.8179	1452.8653	1113
IIORMN6H7S1	3439.2813	1147.4344	860.8276	495	IORMIF1N8H9S3	5735.4109	1912.8109	1434.8600	1113
IIORMN6H7S2	3730.3767	1244.4662	933.6015	495	IORMIF1N8H9S4	6026.5063	2009.8427	1507.6338	1113
IIORMN6H7S3	4021.4722	1341.4980	1006.3753	495	IORMIF1N8H9S4F1	6172.5642	2058.5287	1544.1483	1113
IIORMN6H7S4	4312.5676	1438.5298	1079.1492	495	IIIORMN4H5S1	3832.6235	1278.5485	959.1632	1195
IIORMN6H7S1F1	3585.3392	1196.1204	897.3421	495	IIIORMN4H5S2	4123.7190	1375.5803	1031.9370	1195
IIORMN6H7S2F1	3876.4346	1293.1522	970.1159	495	IIIORMN4H5S2F1	4269.7769	1424.2662	1068.4515	1195
IIORMN6H7S3F1	4167.5301	1390.1840	1042.8898	495	IIIORMN5H5S1	4035.7029	1346.2416	1009.9330	1195
IIORMN6H7S4F1	4458.6255	1487.2158	1115.6636	495	IIIORMN5H5S2	4326.7983	1443.2734	1082.7069	1195
IIORMN6H7S2F2	4022.4926	1341.8381	1006.6304	495	IIIORMN5H5S2F1	4472.8562	1491.9594	1119.2213	1195
IIORMN6H7S3F2	4313.5880	1438.8699	1079.4043	495	IIIORMN5H6S1	4197.7557	1400.2592	1050.4462	1195
IIORMN6H7S4F2	4604.6834	1535.9017	1152.1781	495	IIIORMN5H6S2	4488.8512	1497.2910	1123.2201	1195
IIORMN7H8S2	4095.5089	1366.1769	1024.8845	495	IIIORMN5H6S3	4779.9466	1594.3228	1195.9939	1195
IIORMN7H8S3	4386.6044	1463.2087	1097.6584	495	IIIORMN5H6S1F1	4343.8137	1448.9452	1086.9607	1195
IIORMN7H8S4	4677.6998	1560.2405	1170.4322	495	IIIORMN5H6S2F1	4634.9091	1545.9770	1159.7345	1195
IIORMN7H8S2F1	4241.5668	1414.8629	1061.3990	495	IIIORMN5H6S3F1	4926.0045	1643.0088	1232.5084	1195
IIORMN7H8S3F1	4532.6623	1511.8947	1134.1728	495	IIIORMN5H6S3F2	5072.0624	1691.6947	1269.0229	1195
IIORMN7H8S4F1	4823.7577	1608.9265	1206.9467	495	IIIORMN6H7S1	4562.8879	1521.9699	1141.7293	1195
IIORMN8H9S3	4751.7365	1584.9195	1188.9414	495	IIIORMN6H7S2	4853.9834	1619.0017	1214.5031	1195
IIORMN8H9S4	5042.8320	1681.9513	1261.7153	495	IIIORMN6H7S3	5145.0788	1716.0335	1287.2770	1195
IIORMN8H9S4F1	5188.8899	1730.6372	1298.2297	495	IIIORMN6H7S4	5436.1742	1813.0653	1360.0508	1195
IVORMIN4H5S1	3828.5664	1277.1961	958.1489	889	IIIORMN6H7S1F1	4708.9458	1570.6559	1178.2437	1195
IVORMIN4H5S2	4119.6619	1374.2279	1030.9227	889	IIIORMN6H7S2F1	5000.0413	1667.6877	1251.0176	1195
IVORMIN4H5S2F1	4265.7198	1422.9139	1067.4372	889	IIIORMN6H7S3F1	5291.1367	1764.7195	1323.7914	1195
IVORMIN5H5S1	4031.6458	1344.8892	1008.9187	889	IIIORMN6H7S4F1	5582.2321	1861.7513	1396.5653	1195
IVORMIN5H5S2	4322.7412	1441.9210	1081.6926	889	IIIORMN6H7S2F2	5146.0992	1716.3737	1287.5321	1195
IVORMIN5H5S2F1	4468.7991	1490.6070	1118.2071	889	IIIORMN6H7S3F2	5437.1946	1813.4055	1360.3059	1195
IVORMIN5H6S1	4193.6986	1398.9068	1049.4319	889	IIIORMN6H7S4F2	5728.2900	1910.4373	1433.0798	1195
IVORMIN5H6S2	4484.7941	1495.9386	1122.2058	889	IIIORMN7H8S2	5219.1156	1740.7125	1305.7862	1195
IVORMIN5H6S3	4775.8895	1592.9704	1194.9796	889	IIIORMN7H8S3	5510.2110	1837.7443	1378.5600	1195
IVORMIN5H6S1F1	4339.7565	1447.5928	1085.9464	889	IIIORMN7H8S4	5801.3064	1934.7761	1451.3339	1195
IVORMIN5H6S2F1	4630.8520	1544.6246	1158.7203	889	IIIORMN7H8S2F1	5365.1735	1789.3984	1342.3006	1195
IVORMIN5H6S3F1	4921.9474	1641.6564	1231.4941	889	IIIORMN7H8S3F1	5656.2689	1886.4302	1415.0745	1195
IVORMIN5H6S3F2	5068.0053	1690.3424	1268.0086	889	IIIORMN7H8S4F1	5947.3643	1983.4620	1487.8483	1195
IVORMIN6H7S1	4558.8308	1520.6176	1140.7150	889	IIIORMN8H9S3	5875.3432	1959.4550	1469.8431	1195
IVORMIN6H7S2	4849.9263	1617.6494	1213.4888	889	IIIORMN8H9S4	6166.4386	2056.4868	1542.6169	1195
IVORMIN6H7S3	5141.0217	1714.6812	1286.2627	889	IIIORMN8H9S4F1	6312.4965	2105.1728	1579.1314	1195
IVORMIN6H7S4	5432.1171	1811.7130	1359.0365	889					

Formulom su prikazani teoretski sastavi N-glikana za svako glikozilacijsko mjesto te su poredani sukladno vremenu zadržavanja na koloni u sekundama, t_r ; svakom teoretskom glikanu je naznačena njegova masa kao i omjer mase i naboja, m/z ; ORM, kratica za orosomukoid i drugi naziv za alfa-1 kiseli glikoprotein; rimski brojevi (I,II,III,IV,V) ispred ORM označavaju glikozilacijsko mjesto; rimski brojevi (I,II) i slova (S,A) nakon ORM odnose se na gensku varijantu; Oznake u nastavku odnose se na ugljikohidrate od kojih su sačinjeni glikani i broj nakon svake ukazuje na to koliko je takvih jedinica prisutno u pojedinom glikanu: N, N-acetilglukozamin; H, heksoza (manoza i galaktoza); F, fukoza, S, sijalinska kiselina

Primjer dobivenih signala vidljiv je na Slici 6. na kojoj je maseni spektar prvog glikozilacijskog mjesta AGP-a genske varijante ORM1*F1 sa zabilježenim glikanskim strukturama za najintenzivnije signale.



Slika 6. Spektar snimljen ESI-qTOF masenim spektrometrom za prvo glikozilacijsko mjesto ORM1*F1 genske varijante. U Tablici 8. vidljive su teoretske m/z vrijednosti pretraživanih glikana te su uz najintenzivnije signale, koji se prema m/z vrijednostima s njima podudaraju, označene prikladne strukture N-glikana.

S ciljem pojednostavljenja interpretacije i kvalitetnijeg razumijevanja značaja velike količine dobivenih informacija provedeno je grupiranje glikopeptida unutar svakog od sedam glikozilacijskih mjesta prema njihovim strukturnim karakteristikama, čime je dobiveno ukupno 24 deriviranih svojstva koja su na kraju promatrana. Kriteriji za grupiranje bili su prisutnost fukoze i razgranatost glikana te su sva derivirana svojstva zajedno s formulama glikopeptida koji čine svako od njih prikazani u Tablici 9.

Tablica 9. Derivirana svojstva i njihove formule dobivene iz direktno izmjenjenih glikopeptidnih struktura.

Derivirano svojstvo	Formula
IIIORM_ant2	IIIORM1N4H5S2
IIIORM_ant3	IIIORM1N5H6S2 + IIIORM1N5H6S3 + IIIORM1N5H6S3F1
IIIORM_ant4	IIIORM1N6H7S2 + IIIORM1N6H7S3 + IIIORM1N6H7S4 + IIIORM1N6H7S3F1
IIIORM_F1	IIIORM1N5H6S3F1 + IIIORM1N6H7S3F1
IIORM_ant2	IIORM1N4H5S1 + IIORM1N4H5S2
IIORM_ant3	IIORM1N5H6S2 + IIORM1N5H6S3 + IIORM1N5H6S3F1
IIORM_F1	IIORM1N5H6S3F1
IORMIF_ant2	IORMIF1N4H5S1 + IORMIF1N4H5S2
IORMIF_ant3	IORMIF1N5H6S2 + IORMIF1N5H6S3 + IORMIF1N5H6S2F1 + IORMIF1N5H6S3F1

Tablica 9. (nastavak).

IORMIF_F1	IORMIF1N5H6S2F1 + IORMIF1N5H6S3F1
IORMISORMIIA_ant2	IORMISORMIIA1N4H5S1 + IORMISORMIIA1N4H5S2
IORMISORMIIA_ant3	IORMISORMIIA1N5H6S2 + IORMISORMIIA1N5H6S3 + IORMISORMIIA1N5H6S2F1 + IORMISORMIIA1N5H6S3F1
IORMISORMIIA_F1	IORMISORMIIA1N5H6S2F1 + IORMISORMIIA1N5H6S3F1
IVORMI_ant2	IVORMI1N4H5S2
IVORMI_ant3	IVORMI1N5H6S2 + IVORMI1N5H6S3 + IVORMI1N5H6S2F1 + IVORMI1N5H6S3F1
VORMI_ant4	IVORMI1N6H7S1 + IVORMI1N6H7S2 + IVORMI1N6H7S3 + IVORMI1N6H7S4 + IVORMI1N6H7S2F1 + IVORMI1N6H7S3F1 + IVORMI1N6H7S4F1 + IVORMI1N7H8S3 + IVORMI1N7H8S4
ORMI_F1	IVORMI1N5H6S2F1 + IVORMI1N5H6S3F1 + IVORMI1N6H7S2F1 + IVORMI1N6H7S3F1 + IVORMI1N6H7S4F1
VORMI_ant3	VORMI1N5H6S2 + VORMI1N5H6S3 + VORMI1N5H6S3F1
VORMI_ant4	VORMI1N6H7S3 + VORMI1N6H7S4 + VORMI1N6H7S2F1 + VORMI1N6H7S3F1 + VORMI1N6H7S4F1 + VORMI1N7H8S3 + VORMI1N7H8S4
VORMI_F1	VORMI1N5H6S3F1 + VORMI1N6H7S2F1 + VORMI1N6H7S3F1 + VORMI1N6H7S4F1
VORMII_ant2	VORMII1N4H5S2
VORMII_ant3	VORMII1N5H6S2 + VORMII1N5H6S3 + VORMII1N5H6S2F1 + VORMII1N5H6S3F1
VORMII_ant4	VORMII1N6H7S2 + VORMII1N6H7S3 + VORMII1N6H7S4 + VORMII1N6H7S2F1 + VORMII1N6H7S3F1 + VORMII1N6H7S4F1 + VORMII1N7H8S3 + VORMII1N7H8S4
VORMII_F1	VORMII1N5H6S2F1 + VORMII1N5H6S3F1 + VORMII1N6H7S2F1 + VORMII1N6H7S3F1 + VORMII1N6H7S4F1

ORM, kratica za orosomukoid i drugi naziv za alfa-1 kiseli glikoprotein; rimski brojevi (I,II,III,IV,V) ispred *ORM* označavaju glikozilacijsko mjesto; rimski brojevi (I,II) i slova (S,A) nakon *ORM* odnose se na gensku varijantu; Oznake u nastavku odnose se na zajednička svojstva glikana: *ant2* - bi-antenari, *ant3*, tri-antenari; *ant4*, tetra-antenari; *F1*, fukozilirani glikani; *Sx/Gy*, omjer prisutnih sijalinskih kiselina i galaktoza; Oznake u nastavku odnose se na ugljikohidrate od kojih su sačinjeni glikani i broj nakon svake ukazuje na to koliko je takvih jedinica prisutno u pojedinom glikanu: *N*, *N*-acetilglukozamin; *H*, heksoza (manoza i galaktoza); *F*, fukoza, *S*, sijalinska kiselina

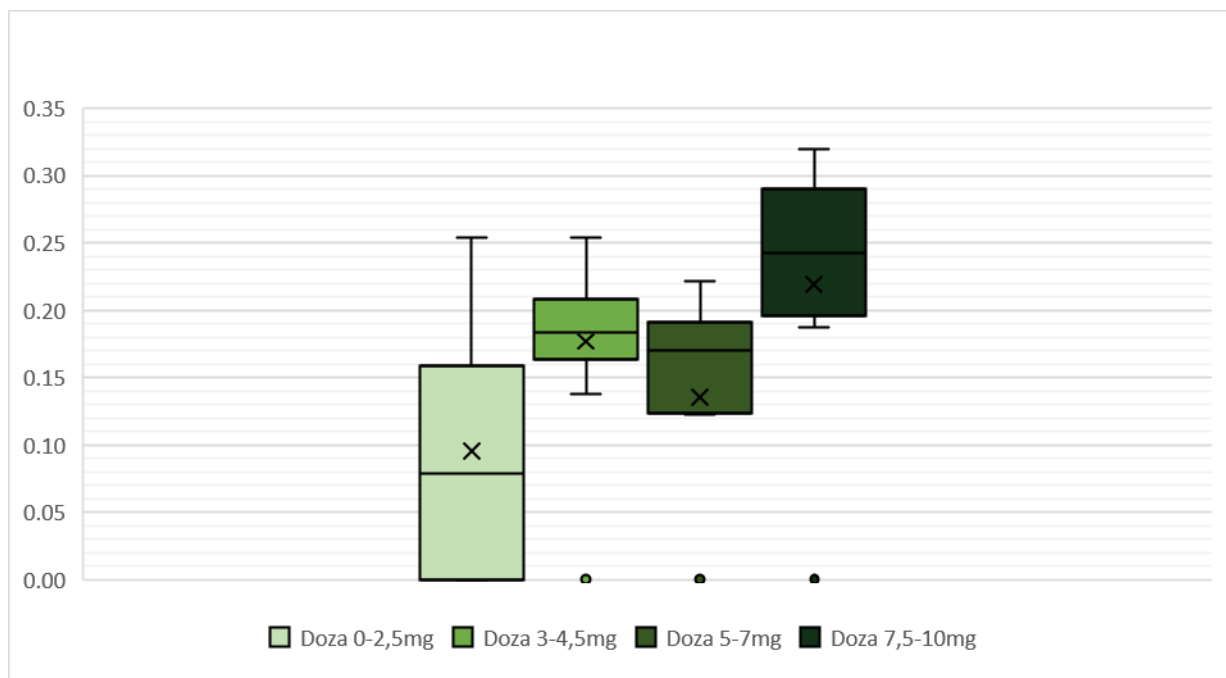
Povezanost između pojedinog deriviranog svojstva i terapijske doze varfarina analizirana je regresijskom analizom te je jedini statistički značajan rezultat dobiven na glikozilacijskom mjestu IORMIF za bi-antenarne glikane. Preciznije, pokazalo se da pristupnost bi-antenarnih glikana na tom glikozilacijskom mjestu rezultira potrebom za većom dozom varfarina, što se može objasniti jačim vezanjem lijeka na AGP i posljedično manjom slobodnom frakcijom lijeka koja je aktivna. Također, može se spomenuti, iako se nije pokazalo statistički značajnim, kako postoji trend u kojem prisutnost manje razgranatih glikana na ostalim glikozilacijskim mjestima utječe na potrebu za većom dozom varfarina, dok prisutnost fukoziliranih glikana rezultira slabijim vezanjem varfarina na AGP te potrebom za manjom dozom (Tablica 10).

Tablica 10. Rezultati regresijske analize deriviranih svojstava N-glikana pacijenata na terapiji varfarinom.

Derivirano svojstvo	Koeficijent	Interval pouzdanosti (95% CI)		Značajnost p
		Donji	Gornji	
IIIORM_ant2	0.000993015	-0.001224982	0.003211011	0.373629479
IIIORM_ant3	0.002545076	-0.001033063	0.006123215	0.159743086
IIIORM_ant4	-0.001843894	-0.005912634	0.002224846	0.367853238
IIIORM_F1	-0.004087221	-0.00924216	0.001067718	0.117844866
IIORM_ant2	0.001344141	-0.004170843	0.006859125	0.627285944
IIORM_ant3	-0.001344141	-0.006859125	0.004170843	0.627285944
IIORM_F1	-0.003471859	-0.008640372	0.001696654	0.183841113
IORMIF_ant2	0.010818736	0.001030932	0.020606539	0.030900106
IORMIF_ant3	0.018173929	-0.020531679	0.056879537	0.350946292
IORMIF_F1	0.001170865	-0.016948031	0.019289761	0.897464017
IORMISORMIIA_ant2	-0.00045433	-0.004990568	0.004081907	0.841710068
IORMISORMIIA_ant3	0.00045433	-0.004081907	0.004990568	0.841710068
IORMISORMIIA_F1	-0.005831181	-0.013808538	0.002146177	0.148703019
IVORMI_ant2	0.000438889	-0.000851038	0.001728817	0.498307785
IVORMI_ant3	0.001457583	-0.002567191	0.005482357	0.471179089
IVORMI_ant4	-0.001896472	-0.006400178	0.002607233	0.402511039
IVORMI_F1	-0.005870015	-0.013083785	0.001343755	0.108696292
VORMI_ant3	-6.40559E-05	-0.002922144	0.002794033	0.964349158
VORMI_ant4	-0.000943672	-0.005073498	0.003186153	0.648907482
VORMI_F1	-0.006551383	-0.014289586	0.001186821	0.095439035
VORMII_ant2	0.000364597	-0.000229094	0.000958288	0.223754373
VORMII_ant3	0.000518376	-0.002402634	0.003439385	0.723547426
VORMII_ant4	-0.000882973	-0.004204169	0.002438223	0.596430352
VORMII_F1	-0.005348162	-0.012689811	0.001993488	0.15007003

ORM, kratica za orosomukoid i drugi naziv za alfa-1 kiseli glikoprotein; rimski brojevi (I,II,III,IV,V) ispred *ORM* označavaju glikozilacijsko mjesto; rimski brojevi (I,II) i slova (S,A) nakon *ORM* odnose se na gensku varijantu; oznake u nastavku odnose se na zajednička svojstva glikana: *ant2* - bi-antenari, *ant3*, tri-antenari; *ant4*, tetra-antenari; *F1*, fukozilirani glikani; *Sx/Gy*, omjer prisutnih sijalinskih kiselina i galaktoza

Grafički prikaz je napravljen za jedino derivirano svojstvo koje se pokazalo statistički značajnim i za potrebe istoga su pacijenti podijeljeni u skupine ovisne o dozi varfarina koju primaju (Slika 7). Jasno je je vidljivo kako pristunost bi-antenarnih glikana na glikozilacijskom mjestu IORMIF rezultira potrebom za veću dozu varfarina.



Slika 7. Stupčastim dijagramom s trakama pogreške prikazan utjecaj bi-antenarnih N-glikana na glikozilacijskom mjestu IORMIF na visinu doze kod pacijenata na terapiji varfarinom. Dijagrami su različito obojeni u odnosu na dozu varfarina (u mg) koju pacijenti na antikoagulantnoj terapiji primaju

5. RASPRAVA

Utjecaj sastava N-glikana humanog AGP-a na afinitet vezanja varfarina koji je dokazan na desijaliziranom AGP-u *in vitro* (Wu i sur., 2018.), ovim radom se htio ispitati *in vivo* na pacijentima koji kao antikoagulantnu terapiju primaju varfarin. Točnije, pokazalo se kako fukozilacija i razgranatost N-glikana AGP-a smanjuje vezanje varfarina na isti, s time da se utjecaj fukozilacije pokazao značajnijim, a ovim radom se htio provjeriti utjecaj N-glikozilacije u kliničkim uvjetima te potencijal iste kao biljega za predviđanje i optimizaciju terapijske doze varfarina. Upravo zahvaljujući novo razvijenoj metodi koja omogućava visokoprotočnu izolaciju i analizu glikozilacije alfa-1 kiselog proteina te reverzno-faznom LC-MS metodom koja daje informacije svojstvene svakom glikozilacijskom mjestu, to je omogućeno.

Rezultati dobiveni regresijskom analizom pokazali su statističku značajnost samo kod glikozilacijskog mjesta IORMIF za N-glikane niske razine grananja, odnosno bi-antenne N-glikane. Također, vidljiv je trend koji bi potvrdio rezultate *in vitro* studije gdje fukozilacija i veća razgranatost N-glikana rezultiraju slabijim vezanjem varfarina, odnosno većom razinom slobodnog varfarina i potrebom za manjom dozom, ali to se nije pokazalo statistički značajnim. Isto tako, *in vitro* se pokazalo kako fukozilacija više utječe na smanjeni afinitet vezanja varfarina, dok u *in vivo* studiji to nije primijećeno. Pacijenti od kojih su uzeti uzorci plazme dobivali su različite doze varfarina, ali izmjerene INR vrijednosti nisu kod svih pacijenata bile unutar optimalnih vrijednosti, što zasigurno utječe na pouzdanost dobivenih rezultata. Također, velika varijabilnost doze u terapiji varfarinom posljedica je genskih polimorfizama enzima te mnogih drugih negenskih faktora koji se moraju uzeti u obzir (Johnson i sur., 2017). Nadalje, broj analiziranih uzoraka je relativno malen te je za jednoznačne rezultate potrebno provesti analizu većeg broja reprezentativnih uzoraka obrađenih sofisticiranijim statističkim metodama koje bi umanjile mogućnost pogreške.

Za AGP je pokazano kako je jedan od najvažnijih serumskih transportnih proteina koji poglavito veže bazične lijekove, ali iznimno može vezati i kisele lijekove, čemu kao primjer služi upravo varfarin (Israili i Dayton, 2001). Iako AGP pokazuje usporedivo visok afinitet vezanja za varfarin s albuminom, njegova homeostatska razina je puno niža u odnosu na albumin te je samim time moguće da promjene u vezanju varfarina na AGP izazvane promjenom u glikozilaciji budu kompenzirane vezanjem na albumin (Urien i sur., 1986). Razina kojom sastav N-glikana AGP-a utječe na vezanje varfarina i količinu njegove aktivne slobodne frakcije, iako se može pokazati statistički značajnom, vrlo vjerojatno nije dovoljna da se pokaže od kliničke značajnosti te određivanje glikozilacije AGP-a s ciljem optimizacije

terapije varfarina nema potencijal kakav su pokazali farmakogenomski testovi na enzime CYP2C9 i VKORC1. Međutim, klinički značaj promjene u glikozilaciji AGP na vezanje varfarina mogao bi biti uočljiv prilikom patofizioloških stanja u kojima se ukupna razina AGP-a povećava i/ili ukupna razina albumina smanjuje, što je dokazano u brojnim stanjima koja su mogući komorbiditeti pacijenata na antikoagulantnoj terapiji. Također, promjene u N-glikozilaciji mogle bi se pokazati značajnim kod utjecaja na farmakokinetiku bazičnih lijekova koji se prvenstveno vežu na AGP, a u manjoj mjeri za albumin. Za takve bi lijekove utjecaj sastava N-glikana AGP-a na njihovo vezanje te posljedično doziranje mogao pokazati klinički značaj.

6. ZAKLJUČAK

Za N-glikozilaciju je dokazano kako je od presudne važnosti u mnogim staničnim procesima te su promjene u N-glikomu povezane s mnogim patofiziološkim procesima, a zanimljivo je kako se smatra da mnoge biološke uloge N-glikana još nisu razjašnjene. Pomoću visokoprotočne LC-MS metode kojom su dobivene specifične informacije o glikozilaciji za svako glikozilacijsko mjesto AGP-a provedena je analiza N-glikoma istoga na uzorcima pacijenata koji kao antikoagulantnu terapiju primaju varfarin. Ideja za određivanjem N-glikozilacije AGP-a kao potencijalnog biljega za optimizaciju terapije varfarinom dobivena je na temelju *in vitro* studije u kojoj je dokazano da povećano grananje N-glikana i fukozilacija smanjuju afinitet vezanja varfarina, što bi trebalo rezultirati višom razinom aktivne slobodne frakcije lijeka te u konačnici potrebom za manjom dozom. Rezultatima ovog rada u kojem se određivala N-glikozilacija AGP-a *in vivo* djelomično su potvrđeni zaključci *in vitro* studije. Od svih analiziranih deriviranih svojstava pronađeno je samo jedno koje se pokazalo statistički značajnim. Pokazano je da povećana razina bi-antenarnih glikana na glikozilacijskom mjestu IORMIF rezultira većom dozom varfarina. Ostali rezultati nisu statistički značajni, ali vidljiv je trend u kojem razgranatiji i fukozilirani N-glikani pridonose manjoj dozi varfarina, što se potencijalno može pripisati smanjenom afinitetu vezanja varfarina na AGP. Iako je vidljiv utjecaj N-glikozilacije na doziranje varfarina, taj učinak nije dovoljan da bude klinički značajan te dobiveni rezultati nisu dovoljni da se potvrdi početna hipoteza, ali nije isključena mogućnost da se ista potvrdi na većem broju reprezentativnijih uzoraka.

7. LITERATURA

Aithal GA i sur. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications, *Lancet*, 1999, 353(9154), 717–719.

Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte, *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 40.

Bieberich E Synthesis, Processing, and Function of N-glycans in N-glycoproteins, in *Advances in neurobiology*, 2014, 47–70.

Brockhausen I, Stanley P, O-GalNAc Glycans, U: Essentials of Glycobiology [Internet], urednici Varki A, Cummings RD, Esko JD, Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017, poglavlje 10.

Bteich M. An overview of albumin and alpha-1-acid glycoprotein main characteristics: highlighting the roles of amino acids in binding kinetics and molecular interactions, *Heliyon*, 2019, e02879.

Ceciliani F, Pocacqua V. The Acute Phase Protein & Alpha1-Acid Glycoprotein: A Model for Altered Glycosylation During Diseases, *Current Protein & Peptide Science*, 2007, 8(1), pp. 91–108.

Ceroni A i sur. GlycoWorkbench: A tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans, *Journal of Proteome Research*, 2008, 7(4), 1650–1659.

Cooper CA, Gasteiger E, Packer NH. GlycoMod--a software tool for determining glycosylation compositions from mass spectrometric data.', *Proteomics*, 2001, 1(2), 340–9.

Dwek RA, Glycobiology: "Towards understanding the function of sugars", *Biochemical Society Transactions*, 1995, 23(1), 1–25.

Eap CB, Baumann P. The genetic polymorphism of human alpha 1-acid glycoprotein., *Progress in clinical and biological research*, 1989, 300, 111–25.

Elliott MA i sur. Investigation into the concanavalin A reactivity, fucosylation and oligosaccharide microheterogeneity of alpha 1-acid glycoprotein expressed in the sera of patients with rheumatoid arthritis.', *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, 1997, 688(2), 229–37.

Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein, *Biochimica et Biophysica*

Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology, 2000, 157–171.

Freeze HH, Neurological Aspects of Human Glycosylation Disorders, *Annual Review of Neuroscience*, 2015, 38(1), 105–125.

Freeze HH, Hart GW, Schnaar RL. Glycosylation Precursors, U: Essentials of Glycobiology [Internet], urednici Varki A, Cummings RD, Esko JD, Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017, poglavlje 5.

Fuster MM, Esko JD. The sweet and sour of cancer: Glycans as novel therapeutic targets', *Nature Reviews Cancer*, 2005, 526–542.

Ginsburg GS, Willard HF. Genomic and personalized medicine: foundations and applications, *Translational Research*, 2009, 277–287.

Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases, *Disease Markers*, 2008, 25(4–5), 267–278.

Hansen L. A glycogene mutation map for discovery of diseases of glycosylation, *Glycobiology*. 2015, 25(2), 211-224.

Harvey DJ, Identification of protein-bound carbohydrates by mass spectrometry, *Proteomics*, 2001, 1(2), 311–28.

Hashimoto S i sur. α 1-acid glycoprotein fucosylation as a marker of carcinoma progression and prognosis, *Cancer*, 2004, 101(12), 2825–2836.

Hellerstein MK i sur. Isolation of alpha 1-acid glycoprotein from human plasma using high-performance liquid chromatography, *Analytical Biochemistry*, 1985, 146(2), 366–371.

Heneghan C, Ward A, Perera R. Self-monitoring of oral anticoagulation: Systematic review and meta-analysis of individual patient data, *The Lancet*, 2012, 379(9813), 322–334.

Herve F i sur. Evidence for differences in the binding of drugs to the two main genetic variants of human alpha 1-acid glycoprotein., *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1993, 36(3), 241–249.

Hicks T, Stewart F, Eisinga A. NOACs versus warfarin for stroke prevention in patients with AF: a systematic review and meta-analysis, *Open Heart*, 2016, 3(1), e000279.

Higai K i sur. Glycosylation of site-specific glycans of α 1-acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 2015,

1725(1), 128–135.

Hochepeid T i sur. α 1-acid glycoprotein: An acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties, *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2003, 25–34.

Hoffmann E, Stroobant V. Mass Spectrometry: principles and applications, Chichester, John Wiley and Sons, 2007, 1-215.

Holbrook A i sur. Evidence-based management of anticoagulant therapy. Antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines', *Chest*, 2012, 141, e152S-e184S.

Holbrook AM i sur. Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions, *Archives of Internal Medicine*, 2005, 1095–1106.

ICH Topic E15 Definitions for genomic biomarkers, pharmacogenomics, pharmacogenetics, genomic data and sample coding categories Step 4 Note for guidance on definitions for genomic biomarkers, pharmacogenomics, pharmacogenetics, genomic data and sample coding categories, 2007, https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-e-15-establish-definitions-genomic-biomarkers-pharmacogenomics-pharmacogenetics-genomic-data_en.pdf (Pristupljeno 03.05.2020).

Imre T i sur. Glycosylation site analysis of human alpha-1-acid glycoprotein (AGP) by capillary liquid chromatography - Electrospray mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 2005, 40(11), 1472–1483.

Israili ZH, Dayton PG. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs, *Drug Metabolism Reviews*, 2001, 161–235.

Johnson, JA. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Pharmacogenetics-Guided Warfarin Dosing: 2017 Update, *Clin Pharmacol Ther*, 2017, 102(3), 397-404.

Jorgensen AL i sur. Implementation of genotype-guided dosing of warfarin with point-of-care genetic testing in three UK clinics: A matched cohort study, *BMC Medicine* 2019, 17(1), 76.

Katzung BG. Basic & Clinical Pharmacology. New York, McGraw- Hill, 2018, str. 608–624

Konstantinidou MK i surr. Are the Origins of Precision Medicine Found in the Corpus Hippocraticum?, *Molecular Diagnosis and Therapy*, 2017, 21(6), 601–606.

Krištić J, Lauc G. Ubiquitous importance of protein glycosylation', in *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1–12.

Lee CR, Goldstein JA, Pieper JA. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: A comprehensive review of the in-vitro and human data, *Pharmacogenetics*, 2002, 251–263.

Limdi NA i sur. Warfarin pharmacogenetics: A single VKORC1 polymorphism is predictive of dose across 3 racial groups, *Blood*. American Society of Hematology, 2010, 115(18), 3827–3834.

Lindahl U, Couchman J, Kimata K, et al. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. U: Essentials of Glycobiology [Internet], urednici Varki A, Cummings RD, Esko JD, Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017, poglavlje 17.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL i sur. Protein Glycosylation in the ER and Golgi Complex, U: Molecular Cell Biology, urednici, Lodish H, Berk A, Zipursky SL i sur., New York: W. H. Freeman; 2000, poglavlje 17.7.

Maddison J i sur. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of single dose (R)- and (S)-warfarin administered separately and together: relationship to VKORC1 genotype', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2013, 75(1), 208–216.

Martefarin 5 mg tablete - Baza lijekova | Lijekovi HALMED, 2019, <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Martefarin-5-mg-tablete/14514/> (Pristupljeno 01.05.2020.).

Meckley LM. i sur. A policy model to evaluate the benefits, risks and costs of warfarin pharmacogenomic testing, *Pharmacoeconomics*, 2010, 28(1), 61–74.

Moore DF i sur. Alpha-1-acid (AAG, orosomucoid) glycoprotein: interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis, *Inflammation*, 1997, 21(1), 69–82.

Ng BG, Freeze HH. Perspectives on Glycosylation and Its Congenital Disorders, *Trends in Genetics*, 2018, 466–476.

Nishi K i sur. Structural insights into differences in drug-binding selectivity between two forms of human α 1-acid glycoprotein genetic variants, the A and F1*S forms', *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(16), 14427–14434.

Goodman LS, Brunton LL, Chabner B, Knollmann BC. Goodman & Gilman's Pharmacological

Basis of Therapeutics. New York: McGraw-Hill, 2011, 585-604.

Pirmohamed M. Warfarin: Almost 60 years old and still causing problems, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2006, 509–511.

Pirmohamed M i sur. A Randomized Trial of Genotype-Guided Dosing of Warfarin, *New England Journal of Medicine*, 2013, 369(24), 2294–2303.

Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry, *The Clinical biochemist. Reviews*, 2009, 30(1), 19–34.

Poland DCW i sur. Increased α 3-fucosylation of α 1-acid glycoprotein in Type I diabetic patients is related to vascular function', *Glycoconjugate Journal*, 2001, 18(3), 261–268.

Poller L. International Normalized Ratios (INR): the first 20 years, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2004, 2(6), 849–860.

Raghav SK i sur. Altered expression and glycosylation of plasma proteins in rheumatoid arthritis', *Glycoconjugate Journal*, 2006, 23(3–4), 167–173.

Reily C i sur. Glycosylation in health and disease, *Nature Reviews Nephrology*, 2019, 346–366.

Rieder MJ i sur. Effect of *VKORC1* Haplotypes on Transcriptional Regulation and Warfarin Dose, *New England Journal of Medicine*, 2005, 352(22), 2285–2293.

Schmid K. Preparation and properties of an acid glycoprotein prepared from human plasma, *Journal of the American Chemical Society*, 1950, 2816.

Schmid K. Human plasma alpha 1-acid glycoprotein--biochemical properties, the amino acid sequence and the structure of the carbohydrate moiety, variants and polymorphism, *Progress in clinical and biological research*, 1989, 7–22.

Shaw K i sur. Clinical Practice Recommendations on Genetic Testing of CYP2C9 and VKORC1 Variants in Warfarin Therapy, *Therapeutic Drug Monitoring*, 2015, 428–436.

Smith SA, Waters NJ. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations for Drugs Binding to Alpha-1-Acid Glycoprotein, *Pharmaceutical Research*, 2019, 1–19.

Stahmann MA, Huebner CF, Link KP. Studies on the hemorrhagic sweet clover disease V. identification and synthesis of the hemorrhagic agent, *J Biol Chem*. 1941, 138. 513-527.

Stanley P, Taniguchi N, Aebi M. N-glycans, U: Essentials of Glycobiology [Internet], urednici Varki A, Cummings RD, Esko JD, Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017, poglavlje 9.

Van Den Steen P. Concepts and principles of O-linked glycosylation, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 151–208.

Taguchi K, Nishi K, Chuang VTG, Maruyama T, Otagiri M. Molecular aspects of human alpha-1 acid glycoprotein – structure and function, U: Acute phase proteins, urednici, Janciauskiene S, London, IntechOpen, 2013, poglavlje 6.

Testa R i sur. N-Glycomic Changes in Serum Proteins in Type 2 Diabetes Mellitus Correlate with Complications and with Metabolic Syndrome Parameters, *PloS one*, 2015, 10(3), e0119983.

Trbojevic Akmacic I i sur. Inflammatory bowel disease associates with proinflammatory potential of the immunoglobulin G glycome, *Inflammatory Bowel Diseases*, 2015, 21(6), 1237–1247.

Tse G i sur. Genotype-guided warfarin dosing vs . conventional dosing strategies: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2018, 84(9), 1868–1882.

Urien S i sur. Evidence for binding of certain acidic drugs to α 1-acid glycoprotein, *Biochemical Pharmacology*, 1982, 31(22), 3687–3689.

Varki, A. Biological roles of glycans, *Glycobiology*, 2017, 27(1), 3–49.

Varki A, Cummings RD, Esko JD i sur. Essentials of Glycobiology [Internet], Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017.

Verhoef TI i sur. Cost-effectiveness of pharmacogenetic-guided dosing of warfarin in the United Kingdom and Sweden, *Pharmacogenomics Journal*, 2016, 16(5), 478–484.

Wang LS i sur. Influence of ORM1 polymorphisms on the maintenance stable warfarin dosage, *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2013, 69(5), 1113–1120.

Weimer HE, Mehl JW, Winzler RJ. Studies on the mucoproteins of human plasma. V. Isolation and characterization of a homogeneous mucoprotein, *The Journal of biological chemistry*, 1950, 185(2), 561–8.

Wopereis S i sur. Mechanisms in Protein O-Glycan Biosynthesis and Clinical and Molecular Aspects of Protein O-Glycan Biosynthesis Defects: A Review, *Clinical Chemistry*, 2006, Oxford Academic, 52(4), pp. 574–600.

Wu D i sur. N-glycan microheterogeneity regulates interactions of plasma proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(35), 8763–8768.

Yang T i sur. Genotype-guided dosing versus conventional dosing of warfarin: A meta-analysis of 15 randomized controlled trials, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 2019, 44(2), pp. 197–208.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Alfa-1 kiseli glikoprotein (AGP) ili orosomukoid (ORM) plazmatski je protein čija su svojstva povezana s velikom količinom vezanih N-glikana različite kompleksnosti koji su razmješteni na pet različitih glikozilacijskih mjesta na proteinu te čine otprilike 45% njegove ukupne mase. Iako biološka uloga AGP-a nije sasvim razjašnjena, utjecaj sastava vezanih N-glikana i promjene u njegovoj glikozilaciji povezane su s raznim imunomodulatornim, protuupalnim i patološkim procesima. Također, njegova sposobnost vezanja lijekova čini ga, uz albumin, najvažnijim serumskim transportnim proteinom te on bitno utječe na bioraspoloživost istih.

Jedan od takvih lijekova za koje se pretpostavlja da N-glikom AGP-a utječe na njegov afinitet vezanja je upravo varfarin. Varfarin je relativno star, ali i danas najpropisivaniji lijek u antikoagulantnoj terapiji unatoč kompliciranom režimu doziranja i brojnim interakcijama s drugim lijekovima. Iznimno je potentnog djelovanja i uzimajući u obzir njegovu usku terapijsku širinu i izražene interindividualne razlike u terapiji, potrebno je redovno raditi laboratorijske testove kojima se osigurava optimalna doza te smanjuje rizik od nastanka krvnog ugruška ili krvarenja ukoliko je doza preniska, odnosno previsoka. Jedan od uzroka varijabilnosti doze u terapiji varfarinom, uz brojne negenske faktore, pronađen je u genskim polimorfizmima enzima CYP2C9 i VKORC1. Uzimanjem u obzir jedinstvene kliničke i genske informacije, što je jedna od temeljnih odrednica personalizirane medicine, te stremljenjem prema individualizaciji terapije, predloženo je provođenje farmakogenomskih testova na spomenute polimorfizme enzima s ciljem optimizacije terapije varfarinom.

In vitro studijom na asijaliniziranom AGP-u dokazano da visoka razgranatost i fukozilacija njegovih N-glikana smanjuje afinitet vezanja varfarina te se ovim radom htio ispitati utjecaj N-glikozilacije humanog AGP-a na doziranje tijekom terapije varfarinom *in vivo*. Metoda kojom je obogaćen AGP iz uzoraka plazme pacijenata koji primaju različite doze varfarina podrazumijevala je precipitaciju kiselinama i proteolitičku razgradnju tripsinom. Glikopeptidi AGP-a daljnje su obogaćeni ekstrakcijom na čvrstoj fazi te su potom analizirani reverzno-faznom LC-MS metodom. Rezultati dobiveni regresijskom analizom, kojom se htjela dokazati povezanost N-glikozilacije AGP-a i doziranja varfarina, pokazali su se statistički značajnim samo kod glikozilacijskog mjesta IORMIF za bi-antenne N-glikane, ali, iako nije statistički značajno, vidljiva je sklonost da se povećanjem grananja i fukozilacije N-glikana AGP-a smanjuje potrebna doza varfarina. Provedenim *in vivo* istraživanjem djelomično su potvrđeni rezultati *in vitro* studije te su za dokaz kliničkog značaja promjene u N-glikozilaciji

AGP-a kod doziranja varfarina potrebne daljnje studije s većim brojem reprezentativnih uzoraka i sofisticiranijim metodama statističke analize.

Alpha-1 acid glycoprotein or orosomucoid is a plasma protein whose characteristics are associated with a high abundance of bound N-glycans of different complexity that are arranged across five different glycosylation sites on the protein and contribute to roughly 45% of its total mass. Although the biological role of AGP is not completely elucidated, the effect of the composition of the bound N-glycans and the changes in its glycosylation are related with different immunomodulatory, anti-inflammatory and pathological processes. In addition, its ability to bind drugs makes it, alongside albumin, the most important serum transport protein and it has a major effect on the bioavailability of those drugs.

One of the drugs for which it is assumed that the N-glycome of AGP affects its binding affinity is warfarin. Warfarin is a relatively old drug, but even today it is the most proscribed drug in anticoagulant therapy, despite its complicated dosing regime and numerous interactions with other drugs. It is a highly potent drug and considering its narrow therapeutic range and expressed inter-individual differences in therapy, it is required to continuously do laboratory tests which ensure optimal dosing, as well as reduce the risk of a blood clot or bleeding when the dose is too low or too high, respectively. One of the reasons for dose variability in warfarin therapy, besides many non-genetic factors, was found in genetic polymorphisms of the enzymes CYP2C9 and VKORC1. By taking into consideration unique clinical and genetic information, one of the fundamental determinants of personalized medicine, and by striving towards therapy individualization, pharmacogenomic tests are proposed to be conducted for the aforementioned enzymes with the aim to optimize warfarin therapy.

An *in vitro* study on asialo-AGP demonstrated that high branching and fucosylation of its N-glycans reduces the binding affinity of warfarin. This study wanted to analyze the effect of human AGP N-glycosylation on the dosing of warfarin during therapy *in vivo*. The method which was used for the enrichment of AGP from plasma samples of patients who take different doses of warfarin included precipitation using acids and proteolytic cleavage using trypsin. The AGP glycopeptides were further enriched with solid phase extraction and analyzed using a reverse-phased LC-MS method. The results of the regression analysis, which was used to demonstrate the connection between AGP N-glycosylation and warfarin dosing, have showed a statistically significant change only at the glycosylation site IORMIF for bi-antennary N-glycans, but, although not statistically significant, a trend was visible in which higher branching and fucosylation of AGPs N-glycans result in the need for a lower warfarin dose. The conducted *in vivo* research has partially confirmed the results of the *in vitro* study. However, in order to prove the clinical significance of N-glycosylation change in AGP with

warfarin dosing further research with a greater and more representative sample size as well as more sophisticated statistical methods is needed.

**8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/
BASIC DOCUMENTATION CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

N-glikozilacija alfa-1 kiselog glikoproteina kao potencijalni biljeg za predviđanje točne terapijske doze varfarina

Kevin Kovač

SAŽETAK

Alfa-1 kiseli glikoprotein (AGP) ili orosomukoid (ORM) plazmatski je protein čija su svojstva povezana s velikom količinom vezanih N-glikana različite kompleksnosti koji su razmješteni na pet različitih glikozilacijskih mjesta na proteinu te čine otprilike 45% njegove ukupne mase. Iako biološka uloga AGP-a nije sasvim razjašnjena, utjecaj sastava vezanih N-glikana i promjene u njegovoj glikozilaciji povezane su s raznim imunomodulatornim, protuupalnim i patološkim procesima. Također, njegova sposobnost vezanja lijekova čini ga, uz albumin, najvažnijim serumskim transportnim proteinom te on bitno utječe na bioraspoloživost istih.

Jedan od takvih lijekova za koje se pretpostavlja da N-glikom AGP-a utječe na njegov afinitet vezanja je upravo varfarin. Varfarin je relativno star, ali i danas najpropisivaniji lijek u antikoagulantnoj terapiji unatoč kompliciranom režimu doziranja i brojnim interakcijama s drugim lijekovima. Iznimno je potentnog djelovanja i uzimajući u obzir njegovu usku terapijsku širinu i izražene interindividualne razlike u terapiji, potrebno je redovno raditi laboratorijske testove kojima se osigurava optimalna doza te smanjuje rizik od nastanka krvnog ugruška ili krvarenja ukoliko je doza preniska, odnosno previsoka. Jedan od uzroka varijabilnosti doze u terapiji varfarinom, uz brojne negenske faktore, pronađen je u genskim polimorfizmima enzima CYP2C9 i VKORC1. Uzimanjem u obzir jedinstvene kliničke i genske informacije, što je jedna od temeljnih odrednica personalizirane medicine, te stremljenjem prema individualizaciji terapije, predloženo je provođenje farmakogenomskih testova na spomenute polimorfizme enzima s ciljem optimizacije terapije varfarinom.

In vitro studijom na asijaliziranom AGP-u dokazano da visoka razgranatost i fukozilacija njegovih N-glikana smanjuje afinitet vezanja varfarina te se ovim radom htio ispitati utjecaj N-glikozilacije humanog AGP-a na doziranje terapije varfarinom *in vivo*. Metoda kojom je obogaćen AGP iz uzoraka plazme pacijenata koji primaju različite doze varfarina podrazumijevala je precipitaciju kiselinama i proteolitičku razgradnju tripsinom. Glikopeptidi AGP-a daljnje su obogaćeni ekstrakcijom na čvrstoj fazi te su potom analizirani reverzno-faznom LC-MS metodom. Rezultati dobiveni regresijskom analizom, kojom se htjela dokazati povezanost N-glikozilacije AGP-a i doziranja varfarina, pokazali su se statistički značajnim samo kod glikozilacijskog mjesta IORMIF za bi-antenarne N-glikane, ali, iako nije statistički značajno, vidljiva je sklonost da se povećanjem grananja i fukozilacije N-glikana AGP-a smanjuje potrebna doza varfarina. Provedenim *in vivo* istraživanjem djelomično su potvrđeni rezultati *in vitro* studije te su za dokaz kliničkog značaja promjene u N-glikozilaciji AGP-a kod doziranja varfarina potrebne daljnje studije s većim brojem reprezentativnih uzoraka i sofisticiranijim metodama statističke analize.

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

Rad sadrži: 52 stranica, 7 grafičkih prikaza, 10 tablica i 76 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: varfarin, alfa-1 kiseli glikoprotein, N-glikozilacija, LC-MS

Mentor: **Dr. sc. Toma Keser**, viši asistent – poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Toma Keser**, viši asistent – poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Olga Gornik Kljaić, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Miranda Sertić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: Rujan 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Biochemistry and Molecular Biology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Alpha-1 acid glycoprotein N-glycosylation as a potential marker for prediction of required therapeutic warfarin dose

Kevin Kovač

SUMMARY

Alpha-1 acid glycoprotein or orosomucoid is a plasma protein whose characteristics are associated with a high abundance of bound N-glycans of different complexity that are arranged across five different glycosylation sites on the protein and contribute to roughly 45% of its total mass. Although the biological role of AGP is not completely elucidated, the effect of the composition of the bound N-glycans and the changes in its glycosylation are related with different immunomodulatory, anti-inflammatory and pathological processes. In addition, its ability to bind drugs makes it, alongside albumin, the most important serum transport protein and it has a major effect on the bioavailability of those drugs.

One of the drugs for which it is assumed that the N-glycome of AGP affects its binding affinity is warfarin. Warfarin is a relatively old drug, but even today it is the most proscribed drug in anticoagulant therapy, despite its complicated dosing regime and numerous interactions with other drugs. It is a highly potent drug and considering its narrow therapeutic range and expressed inter-individual differences in therapy, it is required to continuously do laboratory tests which ensure optimal dosing, as well as reduce the risk of a blood clot or bleeding when the dose is too low or too high, respectively. One of the reasons for dose variability in warfarin therapy, besides many non-genetic factors, was found in genetic polymorphisms of the enzymes CYP2C9 and VKORC1. By taking into consideration unique clinical and genetic information, one of the fundamental determinants of personalized medicine, and by striving towards therapy individualization, pharmacogenomic tests are proposed to be conducted for the aforementioned enzymes with the aim to optimize warfarin therapy.

An *in vitro* study on asialo-AGP demonstrated that high branching and fucosylation of its N-glycans reduces the binding affinity of warfarin. This study wanted to analyze the effect of human AGP N-glycosylation on the dosing of warfarin during therapy *in vivo*. The method which was used for the enrichment of AGP from plasma samples of patients who take different doses of warfarin included precipitation using acids and proteolytic cleavage using trypsin. The AGP glycopeptides were further enriched with solid phase extraction and analyzed using a reverse-phased LC-MS method. The results of the regression analysis, which was used to demonstrate the connection between AGP N-glycosylation and warfarin dosing, have showed a statistically significant change only at the glycosylation site IORMIF for bi-antennary N-glycans, but, although not statistically significant, a trend was visible in which higher branching and fucosylation of AGPs N-glycans result in the need for a lower warfarin dose. The conducted *in vivo* research has partially confirmed the results of the *in vitro* study. However, in order to prove the clinical significance of N-glycosylation change in AGP with warfarin dosing further research with a greater and more representative sample size as well as more sophisticated statistical methods is needed.

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

Thesis includes: 52 pages, 7 figures, 10 tables and 76 references. Original is in Croatian language.

Keywords: warfarin, alpha-1 acid glycoprotein, N-glycosylation, LC-MS

Mentor: **Toma Keser, Ph.D.** Senior Teaching Assistant – Postdoctoral Researcher, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Toma Keser, Ph.D.** Senior Teaching Assistant – Postdoctoral Researcher, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Olga Gornik Kljaić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Miranda Sertić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020.

