

# N-glikozilacija ukupnih plazmatskih proteina i imunoglobulina G u fibrilaciji aatrija

---

**Plavša, Branimir**

**Doctoral thesis / Doktorski rad**

**2024**

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:855145>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-06-29**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Branimir Plavša

**N-GLIKOZILACIJA UKUPNIH  
PLAZMATSKIH PROTEINA I  
IMUNOGLOBULINA G U FIBRILACIJI  
ATRIJA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Branimir Plavša

**N-GLIKOZILACIJA UKUPNIH  
PLAZMATSKIH PROTEINA I  
IMUNOGLOBULINA G U FIBRILACIJI  
ATRIJA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

prof. dr. sc. Gordan Lauc

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Branimir Plavša

***N*-GLYCOSYLATION OF TOTAL PLASMA  
PROTEINS AND IMMUNOGLOBULIN G  
IN ATRIAL FIBRILLATION**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

Prof. Gordan Lauc, PhD

Zagreb, 2024



## **INFORMACIJE O MENTORU**

Doktorski rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Gordana Lauca, na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u suradnji s Klinikom Magdalena i Kliničkom bolnicom Dubrava, u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## ZAHVALE

*Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Gordanu Laucu na ukazanom povjerenju, suradnji i svemu što sam naučio tijekom izrade ovog doktorata.*

*Veliko hvala i prof. dr. sc. Olgi Gornik Kljaić, predstojnici Zavoda za biokemiju i molekularnu biologiju, na prenesenom znanju, mnogim dugim neplaniranim razgovorima ali povrh svega na trudu i strpljenju.*

*Kolegama supatnicima s projekta, Borni, Dinku i Mateju ogromna hvala na izvrsnom društvu, poticajnim raspravama, vrhunskim izletima, ovaj, kongresima, osvojenim kvizovima te mnogim zajedničkim pivama.*

*Hvala i mladoj ekipi sa Zavoda, sadašnjoj i nekadašnjoj, Tomi, Najdi, Ani, Marku i Ivoni kao i svim ostalim članovima Zavoda na veseloj radnoj te još važnije, ponekad neradnoj atmosferi.*

*Mojoj ekipi 🏠, neizmjereno hvala na zajedništvu, bezbrojnim zajedničkim ručkovima, kavama i pivama te veselim druženjima koje su sigurno najsvjetlija točka studiranja, života i rada u Zagrebu*

*Naposljetku, najviše se zahvaljujem svojoj obitelji. Bratu Andriji, nevjesti Antoniji i malom Matiji, hvala vam na podršci, ali prije svega na društvu, radosti i veselju zbog kojih se uvijek rado vraćam u svoj Otok.*

*Mojim roditeljima, Ivanu i Boženki, neizmjerena hvala na svemu što su mi pružili, bez vas ne bih bio tu gdje jesam. Zaista ste ispunili onu staru narodnu: „Sve smo ti omogućili na tebi je samo da učiš“.*

## SAŽETAK

Fibrilacija atriya je bolest kompleksne patofiziologije čiji razvoj i perzistencija nisu uzrokovani samo nepravilnim električnim signaliziranjem u srcu nego i razvojem promjena u srčanom mišiću koje rezultiraju supstratom podložnim za nastanak i progresiju bolesti. Promjene poput razvoja intersticijske fibroze i akumulacije epikardijalnog adipoznog tkiva su uzrokovane lokalnim upalnim odgovorom te također potiču nastanak istog. *N*-glikani ukupnih plazmatskih proteina i imunoglobulina G su dokazani biljezi različitih bolesti, pogotovo onih u kojima je izražena upalna ili metabolička komponenta kao što su dijabetes, hipertenzija i kardiovaskularne bolesti. Sva navedena stanja su čimbenici rizika za fibrilaciju atriya te su stoga potencijalno povezani s razvojem i progresijom bolesti. Važna uloga *N*-glikozilacije proteina plazme, a posebno imunoglobulina G (IgG) u upalnom odgovoru, kao i spomenuta povezanost s čimbenicima rizika, motiviraju istraživanje *N*-glikozilacije ukupnih plazmatskih proteina i izoliranog IgG-a u fibrilaciji atriya. Kako bi ispitali potencijalne promjene, analizirali smo *N*-glikome IgG-a i ukupnih plazmatskih proteina 172 pacijenta s fibrilacijom atriya i usporedili ih s *N*-glikomima 54 kardiološki zdravih kontrola. Pacijenti su također bili podvrgnuti zahvatu kateterske ablacije te su uzorci prikupljeni u dvije vremenske točke, neposredno prije zahvata i nakon šest mjeseci, tijekom kojih su pacijenti praćeni za recidiv fibrilacije atriya. Analiza *N*-glikozilacije provedena je koristeći visoko-protočnu metodu temeljenu na tekućinskoj kromatografiji ultra-visoke učinkovitosti. Jedan oligomanozni glikan iz *N*-glikoma ukupnih plazmatskih proteina te šest glikana IgG-a pokazali su statistički značajne promjene između zdravih kontrola i osoba oboljelih od fibrilacije atriya. Promjene su bile izraženije u IgG-u, te su promjene vezane uz smanjenje razine struktura s račvajućim *N*-acetilglukozaminom bile specifične za fibrilaciju atriya. Uz to, četiri glikana u *N*-glikomu plazme, pretežito oligomanozne strukture, pokazale su značajne razlike između podskupine pacijenata koja je doživjela recidiv fibrilacije atriya nakon zahvata te one za koje je odsustvo fibrilacije atriya bilo stabilno unutar vremena ove studije. IgG *N*-glikom je također opsežno korelirao s CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc procjenom rizika od moždanog udara, gdje je opažen pomak IgG glikoma prema porupalnom fenotipu kako se CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc vrijednost povećava. Ovo je prvo istraživanje koje je usporedilo *N*-glikome proteina plazme i izoliranog IgG-a pacijenata s fibrilacijom atriya s zdravim kontrole te ovdje opisani rezultati daju temelj za daljnje glikomske studije fibrilacije atriya.

**Ključne riječi:** *N*-glikozilacija, *N*-glikani, fibrilacija atriya, *N*-glikani imunoglobulina G, *N*-glikani ukupnih plazmatskih proteina, UPLC

## SUMMARY

### Introduction

Atrial fibrillation is the most commonly diagnosed heart arrhythmia whose occurrence increases sharply with age. It is estimated that 6% of the population above 65 and 10% of the population above 80 suffers from atrial fibrillation. The prevalence is projected to keep increasing in the developed world due to an increase in population age as well as concurrent rise in the rates of conditions that are risk factors for developing atrial fibrillation such as diabetes, heart disease and obesity. Atrial fibrillation carries a significant mortality and morbidity burden due to increased risk of thromboembolic events such as stroke which is the most serious associated complication. The pathophysiology of atrial fibrillation is complex and multifaceted and involves an interaction between the aberrant electrical signaling in the heart and structural changes in the heart muscle itself. The changes include presence of interstitial fibrosis in the tissue of the atrium and accumulation of epicardial adipose tissue. Fibrotic tissue is poorly conductive and disrupts regular wave propagation through the atrium leading to irregular heartbeat. Epicardial adipose tissue on the other hand accumulates in the space between the pericardium and the epicardium and can infiltrate the heart muscle itself leading to disruption of signal transmission. It also secretes inflammatory cytokines that promote inflammation and further exacerbate interstitial fibrosis. These changes make up the substrate that is thought to be necessary for atrial fibrillation progression and persistence. Irregular electrical signals that cause the episodes of atrial fibrillation are thought to mainly come from proximal parts of the pulmonary veins in the form of rapidly firing ectopic foci that when combined with the substrate promote further persistence of the disease. Isolation of pulmonary veins via catheter ablation is therefore, along with antiarrhythmic therapy, one of the main therapeutic approaches to atrial fibrillation. The changes that bring about the substrate are inflammatory in nature and local inflammatory markers have been shown to be increased in people suffering from atrial fibrillation. Systemic inflammation is also implicated, and circulatory inflammatory markers have also been associated with atrial fibrillation. Many conditions that are risk factors for atrial fibrillation have an inflammatory background.

Inflammation is a complex process involving many different proteins and cell signaling pathways, most of which include glycoproteins. It is known that *N*-glycosylation, a ubiquitous posttranslational protein modification is one of the key regulatory mechanisms of inflammation. Most of the extracellular end membrane proteins are glycosylated, and glycosylation plays a

crucial role in their function, trafficking and interaction with other proteins and cells. *N*-glycosylation is the most common form of posttranslational modification of proteins and investigation of changes in plasma protein *N*-glycosylation has shown great promise as biomarkers for disease. This is due to the uniqueness of glycans in that they are not synthesized in a template-driven manner, but instead depend on the complex interaction of the microenvironment of the cell in which the glycoprotein is produced. This enables it to be changed in response to environmental changes such as the occurrence of disease. IgG is a key mediator of the immune system in the body and is also the most abundant glycoprotein in the serum. Glycans are critical for its effector functions and modulate its effect on the immune system enabling it to act in either a pro-inflammatory or anti-inflammatory fashion. Changes in plasma protein *N*-glycosylation and specifically IgG have been well documented in processes such as aging, chronic inflammation, as well as cardiometabolic diseases such as diabetes, cardiovascular disease, and hypertension. They have shown promise as sensitive biomarkers, and due to the known involvement of inflammation in the onset of atrial fibrillation as well as association of glycans with conditions which are closely associated with atrial fibrillation it may be useful to investigate the changes in IgG and total plasma proteins that might be occurring in atrial fibrillation.

## **Materials and methods**

This study included blood plasma samples from 226 individuals that were collected at Magdalena clinic and Dubrava clinical hospital. The Atrial fibrillation group was recruited at Magdalena clinic and included 172 patients suffering from atrial fibrillation that were indicated for catheter ablation procedure. The patients underwent a catheter ablation procedure performed using radiofrequency ablation technique. Blood plasma samples were collected at two timepoints, baseline sample was obtained before the procedure and another sample was collected at the six-month follow-up examination. In total 172 baseline samples and 106 follow-up samples were collected. Patients were monitored for atrial fibrillation recurrence for six months following the procedure. The control group consisted of 54 individuals for whom absence of atrial fibrillation and other cardiovascular diseases was confirmed. Control group samples were collected at Dubrava clinical hospital. In total IgG *N*-glycosylation and total plasma protein glycosylation analysis was performed on 332 samples. Total plasma protein and IgG glycoprofiling was performed using a high-throughput UHPLC method of released *N*-glycan analysis. For IgG *N*-glycan analysis, IgG was first isolated from 100  $\mu$ L of plasma using an automated protein G affinity chromatography method. For total plasma protein *N*-

glycoprofiling 10  $\mu$ L of plasma was used. After IgG isolation the analysis of both total plasma protein and IgG *N*-glycosylation followed the same procedure. Firstly, proteins were denatured by addition of sodium dodecyl sulfate (SDS) and incubation at 65 °C. To enable the activity of peptide *N*-glycosidase F (PNGaseF) enzyme, excess SDS was neutralized by the addition of Igepal CA-630. Glycan release was then achieved enzymatically by overnight treatment with PNGaseF at 37 °C. Released *N*-glycans were then fluorescently labelled with 2-aminobenzamide using a reductive amination reaction with 2-picoline borane as a reducing agent. Labelled glycans were separated from the matrix using solid-phase extraction on SUPOR filter plates. Glycans were eluted from the SUPOR membrane using ultra-pure water and prepared for ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) analysis which was performed on a Waters Acquity H-class system coupled with a fluorescence detector. Separation was performed on a Waters Glycan BEH Amide column. Chromatograms of total plasma protein *N*-glycans were separated into 39 peaks, labelled GP1-GP39, while the chromatograms of IgG *N*-glycans were separated into 24 peaks, labelled IGP1-IGP24. Integration was performed manually. Relative amount of each glycan in the sample was expressed as percentage of total integrated area. Besides 39 and 24 directly measured glycans, derived traits were calculated based on the individual glycan relative areas. Derived traits combined glycans with common structural features such as galactosylation or sialylation. Statistical analysis was performed using the R software. Glycans were batch corrected to minimize technical variation of the method and were then log-transformed to obtain a normal distribution enabling the use of parametric tests. Linear regression was used throughout to test for statistically significant changes. In each model age and sex were also included to account for their effect on the glycome. P-values were adjusted using Li-Ji method and significance threshold of  $p < 0.05$  was used.

## Results

Linear regression was used to assess differences between healthy controls and patients with atrial fibrillation. In the total plasma protein *N*-glycome one glycan, GP19 (Man9) was significantly increased in patients with atrial fibrillation ( $\beta = 0.075$ ,  $p$ -value 0.004). More extensive changes were noticed in the IgG *N*-glycome where IGP5 (Man5) ( $\beta = 0.123$ ,  $p$ -value 0.012), IGP9 (FA2[3]G1) ( $\beta = 0.065$ ,  $p$ -value 0.047), IGP20 (structure not determined) ( $\beta = 0.221$ ,  $p$ -value  $1 \times 10^{-7}$ ) and IGP21 (A2G2S2) ( $\beta = 0.166$ ,  $p$ -value  $6 \times 10^{-5}$ ) showed a statistically significant increase in patients with atrial fibrillation compared to healthy controls while IGP6 (FA2B) ( $\beta = -0.093$ ,  $p$ -value 0.022), IGP10 (FA2[6]BG1) ( $\beta = -0.083$ ,  $p$ -value 0.029) and

bisecting trait exhibited a decrease ( $\beta = -0.055$ , p-value 0.037). Differences in total plasma protein *N*-glycans were also observed when comparing pre-procedure *N*-glycomes of patients that experienced disease recurrence in the six-month follow-up after catheter ablation and those that did not experience a recurrence. These findings were significant even after adjusting for diabetes and hypertension as additional confounders. GP2 (Man5, FA2B) ( $\beta = 0.117$ , p-value 0.034), GP7 (Man6) ( $\beta = 0.094$ , p-value 0.037), GP9 (A2BG2) ( $\beta = 0.123$ , p-value 0.034), GP15 (A2BG2S1) ( $\beta = 0.12$ , p-value 0.024) and oligomannose trait ( $\beta = 0.069$ , p-value 0.012) all showed an increase in patients that had a recurrence of atrial fibrillation during the 6 months. No significant associations with disease recurrence and IgG *N*-glycans were found. When comparing pre- and post-procedure *N*-glycomes differences were found in the IgG *N*-glycome while no significant differences were observed in the total plasma protein *N*-glycome. Significant differences in IgG *N*-glycosylation entailed a decrease in the following structures: IGP5 (Man5) ( $\beta = -0.108$ , p-value 0.002), IGP17 (A2G2S1) ( $\beta = -0.086$ , p-value 0.018), IGP20 (structure not determined) ( $\beta = -0.19$ , p-value  $2 \times 10^{-8}$ ), IGP21 (A2G2S2) ( $\beta = -0.172$ , p-value  $2 \times 10^{-8}$ ). Finally, the IgG *N*-glycome correlated extensively with the CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc score for stroke risk. This is a compound risk score that takes into account multiple factors such as age, sex, fibrosis of the left atrium, diabetes, hypertension and previous occurrence of stroke. Many of these conditions are known to influence the IgG *N*-glycome and this is confirmed in our study where linear correlations of IgG *N*-glycans and traits were found with the value of the CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc score. Following traits exhibited an increasing linear trend: IGP4 (FA2) (p-value 0.044), IGP6 (FA2B) (p-value  $1 \times 10^{-4}$ ), bisecting (p-value 0.013) and agalactosylation (p-value 0.011). Decreasing linear trend was observed for IGP8 (FA2[6]G1) (p-value 0.034), IGP14 (FA2G2) (p-value 0.014), IGP18 (FA2G2S1) (p-value 0.029), IGP23 (FA2G2S2) (p-value 0.027), digalactosylation (p-value 0.026) and sialylation (p-value 0.013).

## Conclusions

We found that the plasma *N*-glycome and more extensively, the IgG *N*-glycome is altered in atrial fibrillation patients when compared to controls. Some of the changes are consistent with the changes in other conditions that are associated with atrial fibrillation, mainly diabetes and hypertension but nonetheless IgG *N*-glycome exhibits a unique signature when it comes to changes in bisecting structures FA2B and FA2[6]BG1 as well as the bisecting derived trait. Changes in plasma were shown when comparing patients that experienced a recurrence of atrial fibrillation after catheter ablation and could offer a potential predictive biomarker. Still, these findings would need to be replicated on a larger population before a predictive model could be

constructed. Interestingly, IgG *N*-glycome exhibited changes between the two timepoints. The changes were consistent with those noticed between healthy subjects and atrial fibrillation patients and were in the direction of the controls' *N*-glycome. This could indicate a return to a healthier baseline state following the absence of atrial fibrillation after the procedure. Extensive correlation of IgG *N*-glycome with the CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc risk score was found. The changes consisted of a decrease in galactosylation and sialylation as well as an increase in bisecting structures. This is consistent with changes in inflammation and aging and is perhaps unsurprising when looking at the factors that make up the risk score. Nonetheless, the linear trend showing compounding effects of additional risk factors, even after adjusting for age and sex, demonstrates the extensive changes in the IgG *N*-glycome in inflammatory and metabolic conditions such as diabetes and cardiovascular disease.

**Keywords** *N*-glycosylation, *N*-glycans, Atrial fibrillation, Immunoglobulin G *N*-glycans, Total plasma protein *N*-glycans, UPLC



## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Glikozilacija proteina .....	2
1.1.1. <i>N</i> -glikozilacija .....	3
1.1.2. Biosinteza <i>N</i> -glikana .....	5
1.1.3. <i>N</i> -glikozilacija proteina plazme .....	8
1.1.4. <i>N</i> -glikozilacija imunoglobulina G .....	10
1.1.5. Analitički pristupi u određivanju <i>N</i> -glikana.....	12
1.2. Fibrilacija atriya .....	15
1.2.1. Klasifikacija fibrilacije atriya i faktori rizika.....	16
1.2.2. Patofiziologija fibrilacije atriya i metaboličke promjene u fibrilaciji atriya.....	17
1.2.3. Kateterska ablacija i predikcija rekurencije fibrilacije atriya nakon zahvata ...	18
1.3. Obrazloženje istraživanja i hipoteze .....	19
2. ISPITANICI, METODE I MATERIJALI .....	21
2.1. Ispitanici .....	22
2.2. Materijali .....	23
2.2.1. Kemikalije .....	23
2.2.2. Enzimi .....	23
2.2.3. Otopine i puferi .....	23
2.2.4. Potrošni materijal .....	23
2.2.5. Laboratorijski uređaji i oprema .....	24
2.2.6. Računalni programi .....	24
2.3. Metode.....	25
2.3.1. Dizajn eksperimenta .....	25
2.3.2. Izolacija IgG-a iz krvne plazme .....	25
2.3.3. Enzimatska deglikozilacija ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a.....	25
2.3.4. Fluorescentno obilježavanje oslobođenih <i>N</i> -glikana.....	26
2.3.5. Pročišćavanje obilježenih <i>N</i> -glikana ekstrakcijom na čvrstoj fazi.....	26
2.3.6. UHPLC analiza obilježenih <i>N</i> -glikana .....	26
2.4. Statistička analiza <i>N</i> -glikanskih podataka.....	35
3. REZULTATI.....	37

3.1.	Osobine ispitanika i deskriptivna statistika.....	38
3.2.	Povezanost <i>N</i> -glikana ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a s fibrilacijom atrijsa ..	42
3.3.	Povezanost <i>N</i> -glikana ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a s recidivom fibrilacije atrijsa nakon kateterske ablacije .....	47
3.4.	Promjene u <i>N</i> -glikozilaciji ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a nakon zahvata kateterske ablacije .....	50
3.5.	Povezanost <i>N</i> -glikozilacije ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a s CHA <sub>2</sub> DS <sub>2</sub> -VASc procjenom rizika.....	51
4.	RASPRAVA .....	54
4.1.	<i>N</i> -glikozilacija ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a pacijenata s fibrilacijom atrijsa u odnosu na zdrave kontrole.....	55
4.2.	<i>N</i> -glikozilacija ukupnih plazmatskih proteina kao prediktor recidiva fibrilacije atrijsa nakon kateterske ablacije.....	56
4.3.	Promjene <i>N</i> -glikoma IgG-a uslijed zahvata kateterske ablacije.....	57
4.4.	Povezanost <i>N</i> -glikoma IgG-a s CHA <sub>2</sub> DS <sub>2</sub> -VASc procjenom rizika od moždanog udara .....	58
5.	ZAKLJUČCI.....	60
6.	POPIS LITERATURE .....	63

## KRATICE

2-AB – 2-aminobenzamid

2-PB – 2-pikolin boran

ADCC – stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima

APTS – 8-aminopiren-1,3,6-trisulfonska kiselina

Asn (N) – Asparagin

BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

CGE-LIF – kapilarna gel elektroforeza spregnuta s laserskom indukcijom fluorescencije (engl. *capillary gel electrophoresis – laser induced fluorescence*)

CRP – C-reaktivni protein

Cys - cistein

Dol-P – dolikol fosfat

EAT – epikardijalno adipozno tkivo (engl. *epicardial adipose tissue*)

EKG - elektrokardiogram

ER – endoplazmatski retikulum

Fuc, F – fukoza

Gal, G – galaktoza

GDP – gvanidin difosfat

Glc – glukoza

GlcNAc – N-acetilglukozamin

GP – glikanski vršak (engl. *glycan peak*)

HILIC – tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*)

HNF1A – engl. *Hepatocyte nuclear factor 1A*

IgG – imunoglobulin G

MALDI – matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (engl. *matrix assisted laser desorption/ionization*)

Man, M – manoza

MS – masena spektrometrija

MS/MS – tandemaska spektrometrija masa (engl. *tandem mass spectrometry*)

MODY – šećerna bolest mladih koje se javlja u odrasloj dobi (engl. *maturity-onset diabetes of the young*)

Neu5Ac, S – *N*-acetilneuraminska kiselina, sijalinska kiselina

NMR – nuklearna magnetna rezonanca

OST – oligosaharil-transferaza

Ser, (S) – serin

PAGE – poliakrilamidna gel elektroforeza (engl. *polyacrylamide gel electrophoresis*)

PBS – fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*)

PNGazaF – Peptid N-glikozidaza F

SDS – natrijev dodecil-sulfat (engl. *sodium dodecyl sulphate*)

SPE – ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid phase extraction*)

Tris – tris(hidroksimetil)aminoetan

UDP – uridin difosfat

UHPLC – tekućinska kromatografija ultra-visoke djelotvornosti (engl. *ultra-high performance liquid chromatography*)

# 1. UVOD

## 1.1. Glikozilacija proteina

Glikozilacija je najzastupljenija posttranslacijska i kotranslacijska modifikacija proteina u kojoj se kompleksne oligosaharidne strukture, glikani, kovalentno vežu na polipeptidnu okosnicu. To je precizno kontroliran, enzimski posredovan proces koji je evolucijski visoko očuvan te je prisutan u svim eukariotima (1). Procjenjuje se da je preko 50% ukupnog proteoma glikozilirano, a taj udio je još veći u proteinima koji se izlučuju iz stanica ili eksprimiraju na staničnoj površini (2,3). Glikan se tipično sastoji od 10 do 15 monosaharida koji su povezani glikozidnom vezom. Repertoar monosaharida koji tvore glikane je relativno malen te su glikani sisavaca tipično izgrađeni od svega desetak različitih monosaharida: glukoze, galaktoze, manoze, *N*-acetilglukozamina (GlcNAc), *N*-acetilgalaktozamina, fukoze, glukuronske kiseline, ksiloze i sijalinske kiseline (4). Unatoč relativno ograničenom broju monomera od kojih su glikani izrađeni, glikom je iznimno kompleksan. Nekoliko tisuća različitih glikanskih determinanti moguće je dobiti kombinacijom relativno malog broja monosaharida variranjem broja, redoslijeda i vrste monosaharida te kombiniranjem različitih načina vezanja (5). Glikozilacija, stoga, uvelike pridonosi strukturnoj heterogenosti proteina, budući da isti protein može na sebi nositi različite glikane te često može sadržavati nekoliko glikozilacijskih mjesta na koje se vežu glikani. Na prosječan glikoprotein vezano je dva do pet glikana te se stoga procjenjuje da je glikoproteom višestruko kompleksniji od samog proteoma (6).

Prema vrsti kovalentne veze između glikana i proteina, glikozilacija se može podijeliti u četiri osnovne skupine:

- *N*-glikozilacija – GlcNAc s reducirajućeg kraja oligosaharidnog lanca povezuje se preko anomernog C atoma s dušikom u bočnom ogranku asparagina polipeptida (4).
- *O*-glikozilacija – anomerni C atom na reducirajućem kraju oligosaharida povezuje se s hidroksilnom skupinom u bočnom ogranku serina, treonina, hidroksiprolina ili hidroksilizina (4).
- *C*-glikozilacija – naziva se još i *C*-manozilacija, modifikacija u kojoj se manozna veže na C-2 atom indolnog prstena bočnog ogranka triptofana (7).
- *P*-glikozilacija – fosfoglikozilacija, oligosaharid se veže fosfodieterskom vezom na aminokiselinu serin (8).

Od navedenih vrsta *N*- i *O*- glikozilacija obuhvaćaju gotovo sve glikoproteine i najbolje su istražene dok su *P*- i *C*- glikozilacija razmjerno rijetke.

Za razliku od proteina i RNA čija je primarna struktura zapisana u slijedu nukleotida DNA, sinteza glikana ne odvija se prema nekom postojećem predlošku. Glikani se sintetiziraju kompleksnim biosintetskim putem u koji je uključen velik broj različitih enzima (9). Regulacija procesa glikozilacije i dalje nije u potpunosti razjašnjena. Smatra se da konačna struktura glikana na nekom proteinu ovisi o više faktora, uključujući ekspresiju glikoziltransferaza i glikozidaza, dostupnost supstrata te steričku dostupnost samog glikozilacijskog mjesta glikoziltransferazama. Genska regulacija uključuje gustu mrežu gena koja obuhvaća različite gene za enzime uključene u proces glikozilacije kao i mnoge gene za transkripcijske faktore (6,10). Prema procjenama 5-10% ljudskog genoma je na neki način uključeno u proces glikozilacije te je dosada pronađeno preko 700 gena koji kodiraju za različite proteine glikozilacijske mašinerije (11). Odsustvo predloška te dinamična priroda sinteze glikana čini proces glikozilacije podložnim različitim utjecajima unutar i van stanice. Promjene u aktivnosti enzima ili dostupnosti aktiviranih monosaharida odražavaju se na konačnu strukturu glikana te stoga ne iznenađuje da osim genske komponente velik broj čimbenika poput dobi, spola, rase, životnih navika poput pušenja, hormonalnog statusa te prisutnost ili odsustvo različitih bolesti dovode do promjena u glikozilaciji proteina što glikanima daje velik dijagnostički potencijal (12).

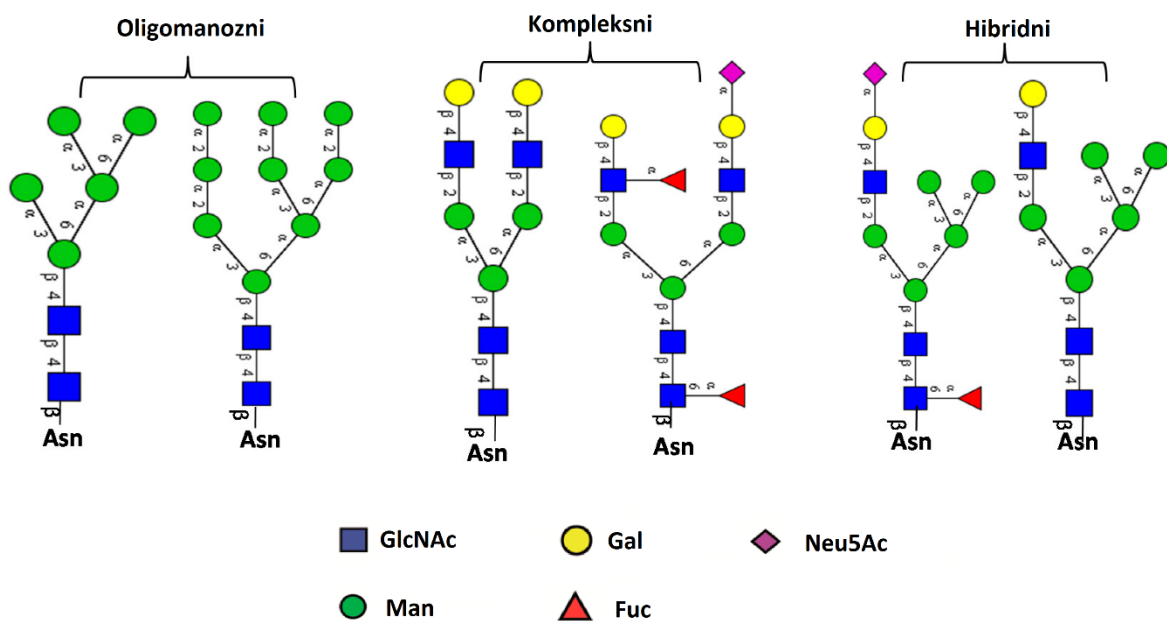
Glikanske strukture vezane na proteine značajno utječu na fizikalno-kemijska svojstva glikoproteina kao i na njihove biološke uloge (13). Brojni pokusi pokazali su da glikozilacija mijenja termodinamička, kinetička i strukturna svojstva proteina te tako proteinu pridodaje dodatne osobine koje nisu diktirane peptidnom sekvencijom (14). Glikani također igraju i važnu ulogu u inicijaciji ispravnog smatanja glikoproteina kao i u održavanju ispravne konformacije. Oligosaharidne strukture na proteinima su implicirane i u mnoštvu drugih bioloških procesa te igraju važnu ulogu u stabilnosti i razvrstavanju proteina, kontroli kvalitete u endoplazmatskom retikulumu (ER) te interakcijama na površini stanice (15).

### 1.1.1. *N*-glikozilacija

*N*-glikozilacija je najzastupljeniji oblik glikozilacije te samim time i najčešća posttranslacijska modifikacija proteina. *N*-glikozilirani proteini čine gotovo 90% ukupnog glikoproteoma te su stoga i najbolje istražena vrsta glikozilacije (2). Kako je već spomenuto, *N*-glikani su na protein vezani kovalentnom vezom između anomernog C atoma GlcNAc-a na reducirajućem kraju oligosaharida i atoma dušika u bočnom ogranku asparagina. Glikan se ne može vezati na bilo koji Asn u polipeptidnom lancu, već samo ako se nalazi u evolucijski očuvanom slijedu Asn-X-Ser/Thr/Cys gdje je X bilo koja aminokiselina osim prolina (16). Također, nisu sva teorijski

moгуća mjesta za vezanje *N*-glikana uvijek popunjena. Okupiranost veznih mjesta za *N*-glikane ovisi različitim faktorima te i dalje nije poznat točan mehanizam koji određuje prisustvo ili odsustvo glikana na potencijalnom glikozilacijskom mjestu. Procjenjuje se da je oko dvije trećine svih potencijalnih glikozilacijskih mjesta zaista glikozilirano (2).

Svi eukariotski *N*-glikani dijele zajedničku pentasaharidnu jezgru *N*-glikana koja se sastoji od tri manoze i dva GlcNAc-a povezanih u sekvencu Man $\alpha$ 1-3(Man $\alpha$ 1-6)Man $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-Asn. Eukariotske *N*-glikane možemo prema strukturi podijeliti u tri skupine: oligomanozni, koji izuzev GlcNAc-a jezgre sadržavaju samo manozne jedinice; kompleksni, koji sadrže GlcNAc jedinice vezane na manoze jezgre te tako tvore „antene“ kompleksnog glikana na koje mogu biti vezane druge glikanske jedinice; hibridni, u kojima su na Man $\alpha$ 1-6 granu vezane isključivo manozne jedinice dok su na Man $\alpha$ 1-3 granu vezane GlcNAc jedinice. Strukture glavnih skupina eukariotskih glikana prikazane su na Slici 1.



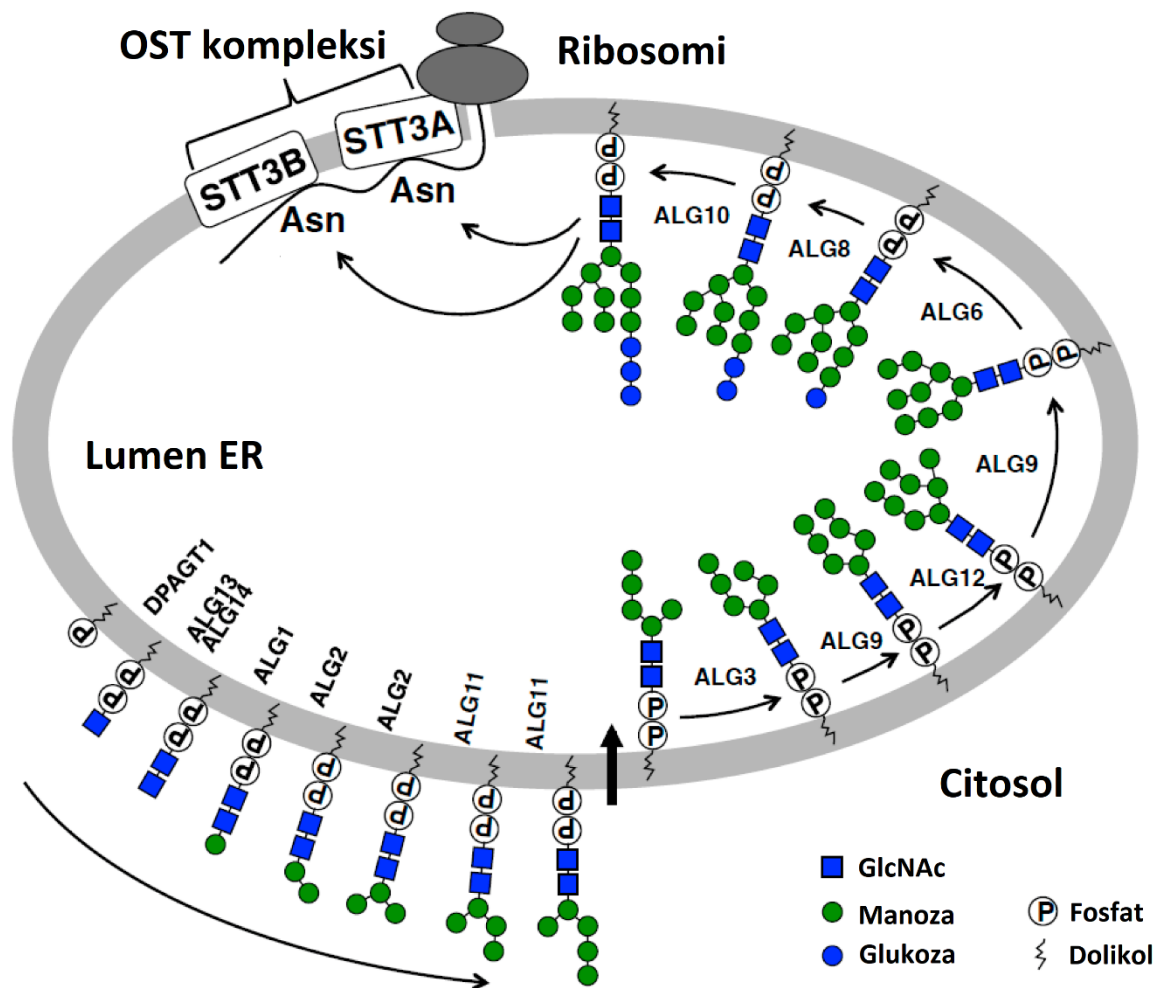
**Slika 1.** Tipovi eukariotskih *N*-glikana. GlcNAc – N-acetilglukozamin, Man – manozna, Gal – galaktoza, Fuc – fukoza, Neu5Ac – sijalinska kiselina. Preuzeto i prilagođeno iz (17).



### 1.1.2. Biosinteza *N*-glikana

Biosintetski put glikana odvija se u dvije faze, započinje u ER-u, a konačna dorada odvija se u Golgijevom tijelu. Prva faza je visoko očuvana u svih eukariota, odvija se u ER te rezultira nastankom glikanskog prekursora koji je zajednički svim eukariotima, a čijim se daljnjim doradivanjem u Golgijevom tijelu dobije mnoštvo različitih struktura koje su karakteristične za pojedine vrste ili pojedine stanice određenog organizma. Biosinteza *N*-glikana započinje na membrani ER-a s citoplazmatske strane gdje se glikanski intermedijari sintetiziraju na lipidnom nosaču dolikolu (Dol) koji se nalazi u membrani ER-a. Sve monosaharidne jedinice dodaju se enzimski posredovanim reakcijama u kojima se kao supstrat koriste aktivirani šećeri. Aktivirani monosaharidi dolaze u obliku nukleotidnih šećera poput UDP-Glc i GDP-Man ili u obliku monosaharida vezanih preko fosfata na drugu molekulu Dol-P (16).

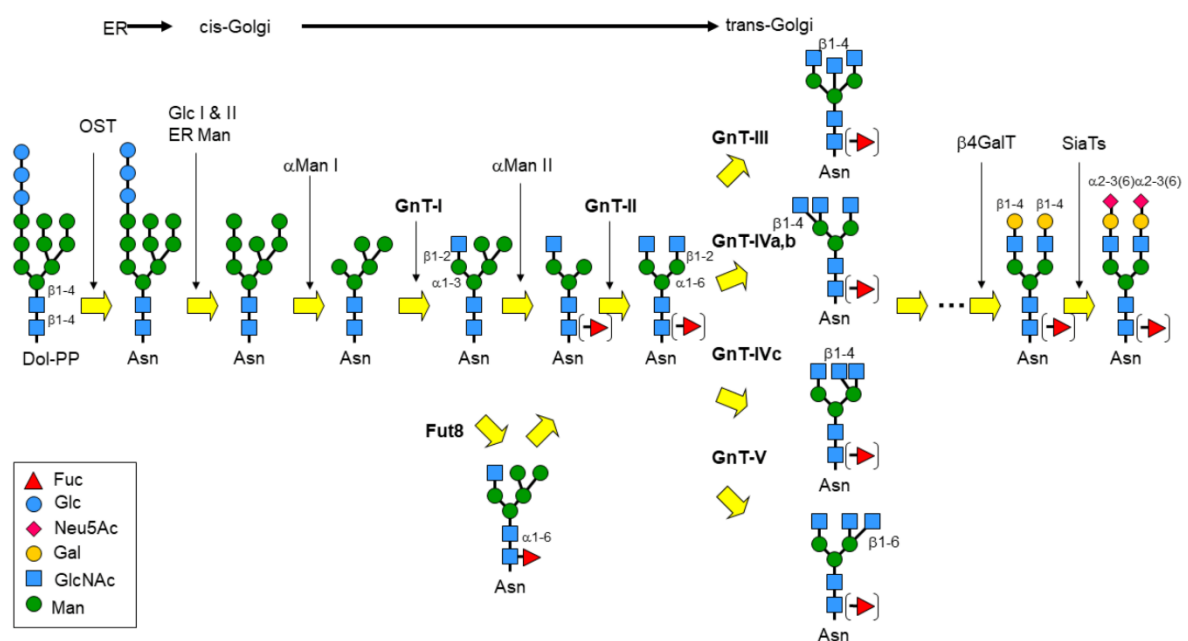
Biosintetski put *N*-glikana u ER-u shematski je prikazan na Slici 2 i opisan dalje u tekstu. Sinteza započinje na citoplazmatskoj strani ER-a dodavanjem *N*-acetilglukozamin-1-fosfata na dolikol fosfat u reakciji koju katalizira enzim kojeg kodira gen DPAGT1. Potom se sukcesivnim reakcijama dodaju još jedna molekula GlcNAc-a i pet molekula manoze te se nastaje prekursor Dol-P-P-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub>. Ove reakcije su redom katalizirane glikoziltransferazama koje kodiraju geni ALG13/14, ALG1, ALG2 i ALG11 koji kao donore koriste nukleotidne šećere. Ovaj prekursor se zatim putem enzima „flipaze“ translocira na luminalnu stranu ER-a. Sinteza završnog prekursora se zatim nastavlja djelovanjem glikoziltransferaza koje kodiraju geni ALG3, ALG9, ALG12, ALG6, ALG8 te ALG10 koje uz Dol-P-Man i Dol-P-Glc kao supstrat kataliziraju dodatak još četiri manoze i tri glukoze. Konačno nastaje oligosaharid strukture Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> koji je, kako je spomenuto, završni prekursor svih eukariotskih glikana. Ovaj oligosaharid se zatim cijeli prenosi na Asn u slijedu Asn-X-Ser/Thr/Cys rastućeg polipeptida. Prijenos glikanskog prekursora na protein kod sisavaca katalizira enzim oligosaharil-transferaza (OST) (16).



**Slika 2.** Shematski prikaz procesa *N*-glikozilacije koji se odvija u ER. Biosinteza započinje na citosolnoj strani ER dodavanjem GlcNAc-a na dolikol fosfat. Djelovanjem prikazanih enzima sukcesivnim dodavanjem šećera uz nastaje prekursor  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5\text{-P-P-Dol}$  koji zatim prelazi na luminalnu stranu ER-a. Daljnjim enzimski kataliziranim reakcijama na dolikolnom nosaču nastaje završni prekursor  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ . OST prenosi oligosaharid na Asn proteina tvoreći tako *N*-glikozidnu vezu. Kod sisavaca postoje dvije vrste katalitičkih podjedinica OST-a, STT3A i STT3B, koji tvore različite OST komplekse. STT3A katalizira kotranslacijsku *N*-glikozilaciju dok STT3B posreduje posttranslacijsku *N*-glikozilaciju. Preuzeto i prilagođeno iz (18).

*N*-glikan  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  se nakon vezanja na glikoprotein doručuje daljnjim prolaskom kroz ER i Golgijevo tijelo. Tijekom prolaska kroz ER dolazi do sekvencijalnog uklanjanja tri glukoze jedinice s glikana djelovanjem enzima  $\alpha$ -glukozidaza I i II. Konačno, prije transporta glikoproteina u Golgijevo tijelo, uglavnom dolazi do uklanjanja jedne manoze djelovanjem enzima kojeg kodira gen *MAN1B1* te glikoproteini prilikom izlaska iz ER-a nose *N*-glikane s 8 ili 9 manoze. Ukoliko zbog pogrešnog smatanja, koje može biti uzrokovano mutacijama ili

nepotpunim sklapanjem oligomernih jedinica, glikoprotein pokazuje sporu kinetiku smatanja te se samim time dulje zadržava u ER dolazi do cijepanja još jedne manozne jedinice djelovanjem enzima EDEM (engl. *ER degradation-enhancing  $\alpha$ -mannosidase I-like protein*) (19). *N*-glikane sa sedam manoznih jedinica prepoznaje protein OS9 koji djeluje kao lektin te ih označava za degradaciju u ER što je jedan od načina kojim se u ER-u kontrolira ispravno smatanje glikoproteina (20). Ukoliko je propisno smotan, glikoprotein se dalje prenosi u Golgijevo tijelo gdje se u daljnjim reakcijama dovršava sinteza konačnog *N*-glikana. Dorada glikana u Golgiju i nastanak različitih skupina *N*-glikana shematski je prikazana na Slici 3 i opisana dalje u tekstu.



**Slika 3.** Nastavak biosintetskog puta *N*-glikana u Golgijevom tijelu. GnT-I – V su *N*-acetilglukozamintransferaze koje kataliziraju dodatak GlcNAc-a tvoreći tako antene kompleksnih i hibridnih glikana ili u slučaju GnT-III glikan s računajućim GlcNAc-om;  $\alpha$ Man-I i II su manozidaze koje uklanjaju manoze prilikom dorade glikana u Golgiju; Fut8 je fukoziltransferaza koja katalizira dodatak fukoze na sržni GlcNAc;  $\beta$ 4GalT je galaktozil transferaza koja dodaje galaktozu na antene kompleksnih glikana; SiaT su sialittransferaze koje kataliziraju dodatak terminalnih sialinskih kiselina. Preuzeto iz (21)

Završna dorada *N*-glikana započinje u *cis*-golgiju cijepanjem tri manozne jedinice djelovanjem enzima  $\alpha$ 1-2 manozidaza IA, IB i IC te tako nastaje  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  struktura. Neki *N*-glikani mogu izbjeći daljnju doradu u Golgiju te u tim slučajevima na dovršenim glikoproteinima nalazimo oligomanozne glikane koji sadržavaju 5-9 manoznih jedinica. Ipak, većina *N*-glikana

na glikoproteinima je kompleksnog ili hibridnog tipa koji nastaju iz zajedničkog prekursora  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ . U medijalnom Golgiju djelovanjem enzima *N*-acetilglukozaminiltransferaza I ( $\text{GlcNAc-T1}$ ,  $\text{GnT-1}$ ) na  $\alpha$ 1-3 vezanu manozu dodaje se  $\text{GlcNAc}$ . Nakon dodatka  $\text{GlcNAc}$ -a na  $\alpha$ 1-3 granu glikana djelovanjem  $\alpha$ -manozidaze II cijepaju se dodatne dvije manoze s  $\alpha$ 1-6 vezane manoze jezgre. Nakon što su obje manoze uklonjene drugi  $\text{GlcNAc}$  dodaje se na  $\alpha$ 1-6 manozu djelovanjem  $\text{GlcNAc-TII}$  ( $\text{GnT-II}$ ). Ova struktura je početni korak u sintezi daljnjih *N*-glikana kompleksnog tipa. Hibridni glikani nastaju ukoliko ne dođe do djelovanja  $\alpha$ -manozidaze II na glikan  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ . Kako je prikazano na Slici 3 daljnje procesuiranje kompleksnih *N*-glikana može ići u različitim smjerovima te može uključivati dodavanje sržne fukoze, dodavanje račvujućeg  $\text{GlcNAc}$ -a, višestruko grananje dodatnim  $\text{GlcNAc}$  jedinicama te konačno dodatak galaktoza, sijalilinskih kiselina i antenarnih fukoza na grane kompleksnog glikana. Enzimi koji kataliziraju navedene reakcije te rezultirajuće strukture prikazane su na Slici 3.

#### 1.1.3. *N*-glikozilacija proteina plazme

Plazma je jedan od najlakše dostupnih bioloških materijala te nosi veliku količinu informacija o zdravstvenom stanju pojedinca. Analiza različitih proteina koji sačinjavaju plazmu česta je u praćenju različitih bolesti, dok je proteom plazme predmet intenzivnog istraživanja u pronalasku biljega za praćenje ljudskog zdravlja (22). Premda albumin, najzastupljeniji protein u ljudskoj krvnoj plazmi koji predstavlja 50-60% ukupnih plazmatskih proteina, nije glikozilirani većina proteina plazme su glikoproteini te u svojoj strukturi sadrže *N*-glikane (23,24). Budući da proteini plazme obavljaju velik broj različitih uloga za potpuno razumijevanje njihovih funkcija potrebno je razmatrati i njihovu glikozilaciju (13). *N*-glikom ukupnih plazmatskih proteina predstavlja sve glikanske strukture koje potječu s proteina plazme. Posljednjih desetljeća veliki su naponi uloženi u razvoj analitičkih tehnika koje su omogućile profiliranje *N*-glikoma ukupnih plazmatskih proteina visoko-protočnim metodama (25). To je omogućilo istraživanje promjena *N*-glikoma u različitim patofiziološkim stanjima. Pronađeno je da je *N*-glikom plazme unutar pojedinca relativno stabilan u odsustvu fizioloških ili patofizioloških promjena, no brzo pokazuje promjene kada dođe do poremećaja homeostaze (26,27). Kako je prethodno opisano, *N*-glikani ne nastaju prema predlošku te stoga omogućavaju brzu prilagodbu i promjenu kao odgovor na različite okolišne čimbenike. Neke od prvih velikih studija *N*-glikoma ukupnih plazmatskih proteina pronašle su asocijacije *N*-glikana s različitim čimbenicima i životnim navikama poput, pretilosti, pušenja, lipidnih

biljega, dobi i spola (12). Također, *N*-glikom plazme pokazuje određenu dozu nasljednosti, te su studije pokazale populacijske razlike u *N*-glikomu proteina plazme (28,29).

Osim promjena zbog životnih navika, epidemiološkim studijama ispitana je povezanost *N*-glikozilacije ukupnih plazmatskih proteina i velikog broja različitih bolesti (30). Promjene u *N*-glikozilaciji opisane su u akutnim upalnim stanjima, dijabetesu i kardiovaskularnim bolestima (31–33). Velik broj studija do sada je pokazao značajne promjene *N*-glikoma plazme u dijabetesu, neke od kojih su primjetne nekoliko godina prije otkrivanja same bolesti što predstavlja velik potencijal glikana kao biljega ranog otkrivanja dijabetesa (34–36). Juszcak i suradnici pokazali su kako je na temelju smanjene antenarne fukozilacije *N*-glikana plazme moguće razlikovati rijetki oblik monogenetskog dijabetesa HNF1A-MODY od dijabetesa tipa 1 i drugih vrsta MODY-ja (37). MODY se često krivo dijagnosticira kao dijabetes tip 1 što može dovesti do izbora krive terapije te lošijih terapijskih ishoda. *N*-glikani pružaju mogućnost diferenciranja ove vrste dijabetesa bez potrebe za sekvenciranjem gena (38). Nepravilna glikozilacija je također jedno od glavnih obilježja raka (39). Promjene u *N*-glikomu plazme, kao i na specifičnim proteinima, opisane su za različite vrste raka, poput kolorektalnog karcinoma i karcinoma dojke (40,41). Opisane promjene su uglavnom vezane uz fukozilaciju i sijalinizaciju te ukazuju na vrijednost *N*-glikana kao dodatnih biljega uz već postojeće biljege raka (42,43).

Ograničenje profiliranja ukupnog *N*-glikoma plazme visoko-protocnim tehnikama poput tekućinske kromatografije ultra-visoke djelotvornosti (UHPLC) ili masene spektrometrije temeljene na matricom potpomognutoj eSORpciji i ionizaciji (MALDI-MS) jest gubitak informacije o tome dolazi li promjena u glikozilaciji s nekog specifičnog proteina ili je riječ o generalnoj promjeni u glikozilacijskoj mašineriji. Studije na pojedinačnim izoliranim proteinima nude precizniju informaciju o glikozilacijskim promjenama te su tako istraživane promjene glikozilacije IgG-a, transferina, haptoglobina, C3 komponente komplementa, AGP-a i mnogih drugih proteina (44–48). Mnoga od ovih istraživanja koriste specifičnost koju pruža MS analiza glikopeptida te tako omogućuje određivanje specifičnih glikoformi točno određenog proteina plazme, kao što je to u primjeru metoda za analizu glikozilacije C3 komponente komplementa ili AGP-a (47,48). Uz navedena ograničenja, *N*-glikom ukupnih plazmatskih proteina ipak predstavlja važan izvor informacija u praćenju i ranom-otkrivanju velikog broja različitih stanja.

#### 1.1.4. N-glikozilacija imunoglobulina G

IgG je najzastupljeniji glikoprotein i drugi najzastupljeniji protein u ljudskoj plazmi (22). Sastoji se od četiri polipeptidna lanca, dva identična  $\gamma$  teška lanca, te dva identična  $\kappa$  ili  $\lambda$  laka lanca koji su međusobno povezani disulfidnim mostovima. Laki i teški lanci sastoje se od varijabilne domene na N-kraju polipeptida te konstantne regije prema C-kraju. Varijabilna regija teškog lanca i CH1 domena konstantne regije teškog lanca zajedno s lakim lancem tvore Fab regiju (engl. *antigen-binding* fragment), dok CH2 i CH3 domene teških lanaca tvore Fc regiju (engl. *fragment crystallizable*) (49). Struktura IgG molekule shematski je prikazana na Slici 4. Na temelju različitih varijanti teškog lanca ljudski IgG možemo podijeliti u četiri podskupine: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (50). Sve varijante ljudskog IgG-a sadržavaju konzervirano glikozilacijsko mjesto u Fc regiji na poziciji Asn-297 te stoga uvijek nose dva N-glikana. U varijabilnoj regiji, rekombinacijom i somatskom hipermutacijom, može doći do nastanka N-glikozilacijskog mjesta, te otprilike 10-15% svih IgG klonova nosi jedan ili više glikana na Fab regiji (51,52).

IgG ima ključnu ulogu u humoralnoj imunosti koja nije ograničena samo na prepoznavanje antigena. Aktivacija komplekta klasičnim putem jedna je od dobro opisanih efektorskih funkcija IgG-a (53). Osim spomenutih funkcija, druge važne efektorske funkcije poput citotoksičnosti ovisne o protutijelima (ADCC), IgG ispoljava putem receptora za Fc regiju IgG-a koje nazivamo Fc $\gamma$  receptori. U ljudskom tijelu eksprimirano je pet ili šest Fc $\gamma$  receptora koje ovisno o njihovom učinku na imunski sustav možemo grupirati u aktivirajuće receptore [Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIc (ovu izoformu receptora eksprimiraju samo neki pojedinci (54)), Fc $\gamma$ RIIIa], inhibitorne receptore (Fc $\gamma$ RIIb) te glikozilfosfatidilinozitol (GPI) usidrene Fc receptore (55). Ovi receptori nalaze se na svim stanicama imunskog sustava, uključujući neutrofile, mastocite, makrofage i prirodne stanice ubojice (NK, engl. *natural killer cells*) (56).

Funkcionalna istraživanja su pokazala kako je prisutnost N-glikana ključna za efektorske funkcije IgG-a budući da u odsustvu glikana IgG gubi mogućnost vezanja za Fc receptore (57). Također, specifične promjene u strukturi samog N-glikana moduliraju afinitet IgG-a za različite klase Fc receptora te tako omogućavaju da IgG djeluje pro- ili protu-upalno ovisno o strukturnim karakteristikama vezanih N-glikana. Većina IgG-a u serumu sadrži fukozilirane glikane koji u odnosu na afukozilirane glikoforme imaju manji afinitet za aktivirajuće Fc $\gamma$ RIII receptore te tako imaju slabiji potencijal za aktivaciju ADCC-a (58). Učinci galaktozilacije i sialinizacije, za razliku od fukozilacije, nisu u potpunosti razjašnjeni funkcionalnim studijama.



gdje je pronađeno da u odnosu na zdravu populaciju pacijenti s reumatoidnim artritismom imaju veći udio agalaktoziliranih glikoformi IgG-a (63). Ovaj uzorak glikozilacije, kojeg karakteriziraju gubitak sijalinizacije i galaktozilacije, je od tada repliciran nekoliko puta, te je primijećen i u drugim upalnim bolestima poput multiple skleroze i sistemskog eritemskog lupusa (64,65). Funkcionalne studije su kako je prethodno spomenuto počele razjašnjavati povezanost opisanih promjena glikozilacije s efektorskim funkcijama IgG-a. Također, jasna korelacija je uspostavljena s dobi, te su promjene koje se vide u upalnim stanjima također progresivno prisutne kako osoba stari što glikane IgG-a čini jednim od najboljih biljega biološke dobi pojedinca (66). Osim autoimunih bolesti i starenja, pretpostavlja se da kronična upala igra ulogu u razvoju mnogih drugih stanja poput metaboličkih i kardiovaskularnih bolesti. Pokazalo se da glikozilacija IgG-a značajno korelira s razvojem ateroskleroze kao i različitim faktorima rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (67). Također, nekoliko studija ustanovilo je povezanost s dijabetesom i inzulinskom rezistencijom (68,69).

#### 1.1.5. Analitički pristupi u određivanju *N*-glikana

Analiza *N*-glikana predstavlja velik metodološki izazov, prvenstveno zbog raznovrsnosti samih glikanskih struktura te fizikalno-kemijskih svojstava glikanskih molekula. Velika strukturna raznolikost glikana se očituje na više razina, različite monosahardine jedinice koje tvore glikan mogu se zbog prirode glikozidne veze povezati na iznimno velik broj načina, uključujući i grananje što uvelike doprinosi velikom broju mogućih struktura (70). Kod strukturne analize stoga nije dovoljno samo odrediti vrstu i redosljed monosaharida nego i vrstu vezanja između tih jedinica, budući da različite vrste vezanja rezultiraju različitim trodimenzionalnim strukturama (71). Glikani također u svojoj strukturi ne sadrže funkcionalne skupine koje bi služile kao kromofori ili fluorofori te ih stoga bez prethodne derivatizacije nije moguće detektirati standardnim UV-VIS ili fluorescentnim detektorima.

Najrašireniji analitički pristupi u analizi i karakterizaciji *N*-glikana su analiza kemijski ili enzimski oslobođenih glikana, analiza glikopeptida nastalih enzimskim cijepanjem glikoproteina te analiza intaktnih glikoproteina (72). Metode temeljene na analizi oslobođenih derivatiziranih glikana su najrobusnije glikoanalitičke metode te imaju najveći potencijal za visoko-protočne analize, dok je prednost metoda temeljenih na analizi intaktnih proteina specifičnost informacije vezane za određeni protein. Metode analize glikopeptida nude najveću specifičnost, mogućnost određivanja glikozilacije iz kompleksnog matriksa, kao i veliku količinu informacija o strukturi glikana, no tehnički su zahtjevne i manje robusne od metoda



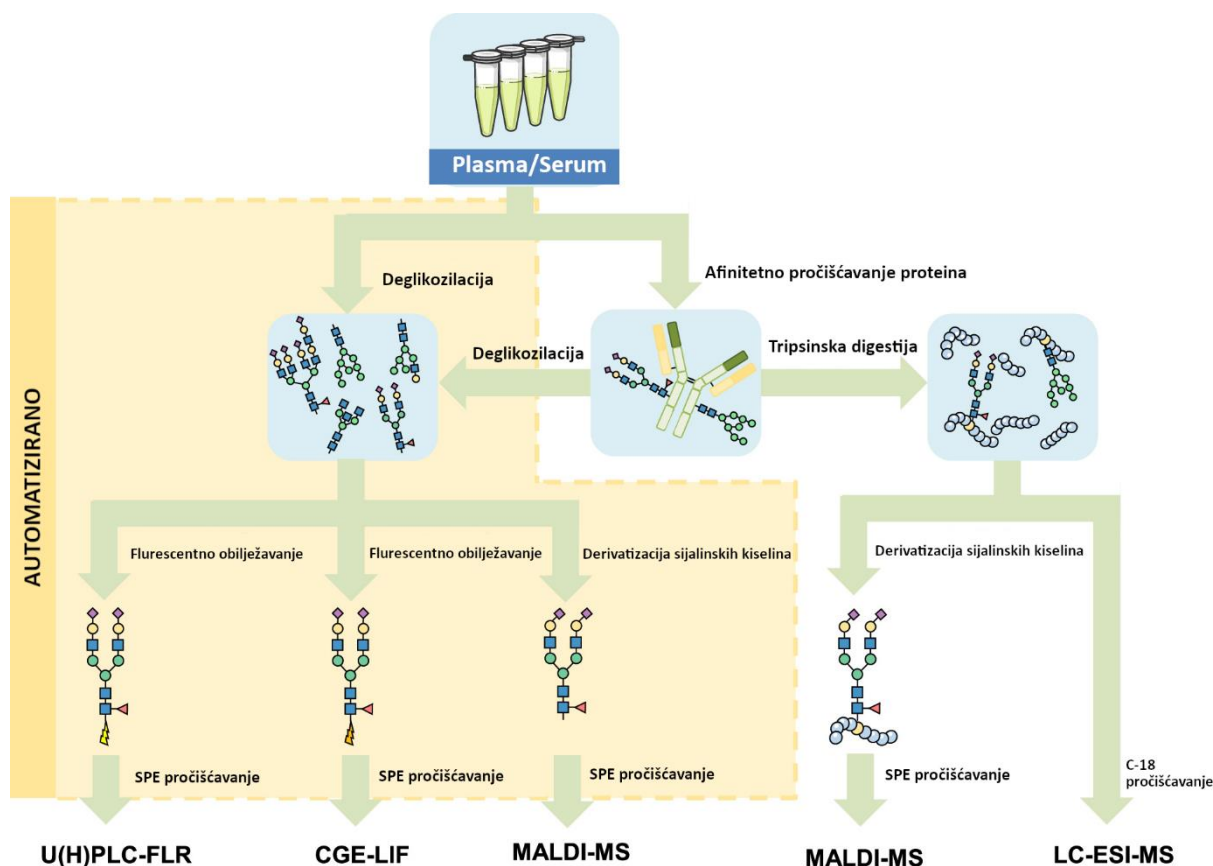
temeljenih na analizi oslobođenih glikana (73). Na Slici 5 shematski su prikazani najčešći analitički pristupi određivanju *N*-glikana.

Analiza intaktnih glikoproteina podrazumijeva provođenje analize na ukupnom glikokonjugatu bez odvajanja glikana od proteina ili enzimskog cijepanja proteina. Dvije najraširenije tehnike koje se koriste prilikom provođenja analize intaktnih glikoproteina su NMR i MS (74). MS analiza intaktnih glikoproteina najčešće se koristi kod karakterizacije terapijskih protutijela budući da je repertoar glikana u rekombinantnim protutijelima relativno uzak te je riječ o čistom proteinu, kojem je točno poznata peptidna sekvenca. Tehnika izbora u MS analizi intaktnih protutijela je MS visoke rezolucije uz odvajanje na temelju ionske pokretljivosti (IMS-MS, engl. *ion mobility spectrometry-mass spectrometry*) (75). Kada je riječ o kompleksnom uzorku, ili kada sekvenca, a samim time i masa proteina nije poznata, kao što je to slučaj kod IgG-a iz seruma, MS analiza intaktnih proteina nije metoda izbora.

Glikopeptidna analiza je metoda temeljena na masenoj spektrometriji gdje se glikoprotein djelovanjem jedne ili više proteaza cijepa na manje peptide dok glikan ostaje kovalentno vezan na glikopeptid. Ovakav pristup analizi masenom spektrometrijom naziva se „*bottom-up*“ pristupom. Najčešće korišteni enzim je tripsin, no koriste se i druge proteaze poput Glu-C i Lys-C. Ukoliko je sekvenca proteina poznata, moguće je predvidjeti peptide koji će nastati djelovanjem specifičnih enzima, te poznavajući masu peptidnog dijela, moguće je odrediti i masu glikana vezanog na određeni glikopeptid. Glikopeptidi se najčešće analiziraju UHPLC-MS tehnikom. Na temelju mase glikana, peptida i fragmentacijskog spektra u slučaju tandem MS/MS tehnika, moguće je dobiti i informaciju ne samo o kompoziciji glikana nego i o samoj sekvenci monosaharidnih jedinica u glikanu. Prednost ove metode je dobivanje informacija o glikozilaciji točno određenog glikozilacijskog mjesta na poznatom proteinu, za razliku od analize intaktnih glikoproteina gdje nemamo informaciju o glikozilaciji na pojedinom glikozilacijskom mjestu (76).

Najraširenije metode za analizu glikana temelje se na analizi oslobođenih glikana, što je ujedno i pristup koji je korišten u ovom istraživanju te će stoga biti detaljnije opisan. Ovisno o vrsti veze između glikana i proteina razvijene su različite strategije za oslobađanje *N*- i *O*- glikana. *N*-glikane je moguće odvojiti od proteina koristeći specifične enzime koji cijepaju glikozidnu vezu između glikana i proteina. Peptid *N*-glikozidaza F (PNGazaF) cijepa vezu između bočnog ogranka asparagina i početnog GlcNAc-a svih vrsta *N*-glikana (77), osim u rijetkim strukturama u kojima je fukoza vezana na GlcNAc  $\alpha$ 1-3 glikozidnom vezom (78). Navedene glikanske

strukture nalazimo kod insekata i biljaka, te je za istraživanja *N*-glikozilacije kod ljudi PNGazaF enzim izbora. Prije tretiranja amidazama ili glikozidazama glikoproteine je potrebno denaturirati kako bi se opustila trodimenzionalna struktura proteina koja može spriječiti pristup enzima *N*-glikozilacijskom mjestu. Oslobođanje glikana može se provesti iz SDS-PAGE vrpce te na soulubiliziranim ili otopljenim proteinima (79,80).



**Slika 5.** Shematski prikaz najčešćih metoda analize *N*-glikozilacije proteina. Žuto su označene metode koje su dosada automatizirane te tako nude najveću protočnost. Preuzeto i prilagođeno iz (73)

*N*-glikane je nakon oslobođanja s glikoproteina moguće analizirati na nekoliko načina, od kojih su najzastupljeniji UHPLC, CGE-LIF i MS (73). Zbog svoje specifične kemijske strukture kako je prethodno navedeno, oslobođene *N*-glikane je prije analize UHPLC i CGE-LIF metodama potrebno kemijski derivatizirati vezanjem fluorescentne boje na glikan kako bi ga se moglo detektirati fluorescentnim detektorima UHPLC i CGE-LIF sustava. Za UHPLC analize kao fluorofor najčešće se koristi 2-aminobenzamid (2-AB). 2-AB sadrži primarni amin koji u reakciji s aldehidnom skupinom reducirajućeg kraja glikana tvori imin, koji se nakon redukcije prevodi u stabilni sekundarni amin. Prednost obilježavanja 2-AB-om je stehiometrijsko vezanje jedne molekule fluorofora na jednu molekulu glikana što omogućava kvantifikaciju na temelju

intenziteta fluorescencije (81). Premda je 2-AB i dalje fluorofor izbora za velike glikomske studije, u posljednje vrijeme razvijene su alternativne fluorescentne boje, poput prokainamida i *RapiFluor-MS* boja, koje nude bolje intenzitete fluorescencije i veću učinkovitost ionizacije u MS-u. Navedene boje mogu biti metode izbora kod analize malih količina glikana. Istraživanja su pokazala da sve navedene boje imaju zadovoljavajuću osjetljivost i ponovljivost za analizu glikozilacije IgG-a (82). Kod CGE-LIF analiza, kao boja najčešće se koristi APTS (73), koja se veže na glikan na isti način kako je to opisano za 2-AB. Za razliku od UHPLC-a, boje prikladne za CGE-LIF analize moraju osim fluorofora na sebi nositi i negativni naboj kako bi se omogućila separacija elektroforezom (83). Strukturnu analizu nakon separacije UHPLC-om moguće je provesti digestijom egzoglikozidazama koje cijepaju specifične vrste glikozidnih veza, te je praćenjem pomaka u kromatogramu nakon sekvencijalnog tretiranja egzoglikozidazama moguće utvrditi glikansku sekvencu u pojedinom kromatografskom vršku (84). Sprezanjem UHPLC-FLR tehnike s ortogonalnim tehnikama poput masene spektrometrije također je moguće dobiti veliku količinu informacija o sastavu glikana unutar glikanskog vrška (28). UHPLC u usporedbi s CGE-LIF metodom nudi bolju robusnost i, budući da je u širokoj primjeni, bolji pristup bazama podataka za usporedbu i interpretaciju dobivenih rezultata. CGE-LIF metoda je pak, osjetljivija te omogućava analizu većeg broja uzoraka u kraćem vremenu (85).

## 1.2. Fibrilacija atrijsa

Fibrilacija atrijsa je najčešće dijagnosticirana srčana aritmija karakterizirana nepravilnim i brzim kontrakcijama pretklijetke što rezultira nepravilnim i neučinkovitim srčanim radom. Prevalencija iste naglo se povećava s dobi. Prema nedavnim procjenama 6% ljudi iznad 65 godina odnosno 10% ljudi iznad 80 godina boluje od fibrilacije atrijsa. Prevalencija se konzistentno povećava u zapadnom svijetu čak i kad se uzme u obzir starenje populacije. Predviđa se da će se trend porasta prevalencije nastaviti u budućnosti (86,87). Uz to, trećina pacijenata s dijagnosticiranom fibrilacijom atrijsa nemaju primjetne simptome premda i dalje imaju povećani rizik od komplikacija vezanih s fibrilacijom atrijsa (88). Također, procjenjuje se da u SAD-u 17% svih slučajeva fibrilacije atrijsa bude nedijagnosticirano (89). Doživotni rizik od razvitka bolesti u zapadnom svijetu je oko 1 prema 3 što fibrilaciju atrijsa čini važnim javnozdravstvenim problemom budućnosti (90). Fibrilacija atrijsa je značajan izvor morbiditeta i mortaliteta u starijoj populaciji i povezana je s šesterostrukim povećanjem rizika od moždanog udara, odnosno s dvostrukim povećanjem ukupne smrtnosti (91).

Dijagnoza fibrilacije atriya postavlja se EKG-om, što zbog epizodične prirode bolesti, naročito u ranijim fazama bolesti otežava postupak otkrivanja te donošenja ispravnih terapijskih odluka (92). Kako je već spomenuto, odsustvo simptoma ne znači i manji rizik od komplikacija te je rano otkrivanje bolesti, naročito kod asimptomatskih bolesnika, iznimno važno (88). U tu svrhu razvija se nekoliko pristupa, poput kontinuiranog praćenja koristeći pametne uređaje poput satova ili narukvica (93). Također, predložene su različite procjene rizika, koji uzimaju u obzir različite karakteristike pacijenta poput dobi, spola, životnih navika i prisutnosti komorbiditeta, no nijedan nije u široj kliničkoj upotrebi (94). Na temelju patofizioloških saznanja o fibrilaciji atriya radi se i na razvoju serumskih biljega koji bi poboljšali postupak probira i ranog otkrivanja osoba koje boluju od fibrilacije atriya.

#### 1.2.1. Klasifikacija fibrilacije atriya i faktori rizika

Fibrilaciju atriya možemo klasificirati na temelju učestalosti, dugotrajnosti epizoda i odgovora na terapiju u tri osnovne skupine: paroksizmalnu, perzistentnu i permanentnu (91). Paroksizmalna fibrilacija atriya podrazumijeva epizode koje završavaju spontano, obično unutar sedam dana. Kod perzistentne fibrilacije atriya potrebna je farmakološka terapija ili električna kardioverzija kako bi se dovelo do terminacije epizode. Fibrilacija atriya koje se ne može zaustaviti kardioverzijom i fibrilacija atriya koja ne odgovara na terapiju duže od godinu dana klasificira se kao perzistentna (95). Posljednjih desetljeća epidemiološke studije identificirale su velik broj čimbenika rizika koji su povezani s razvojem fibrilacije atriya. Longitudinalne studije pokazale su da fibrilacija atriya asocira s dobi, hipertenzijom, kongestivnim zatajenjem srca, koronarnom bolesti srca i dijabetesom (96). Daljnje studije potvrdile su opisane povezanosti te identificirale još hipertrofiju lijeve klijetke, muški spol i pretilost kao dodatne čimbenike rizika za razvoj i progresiju fibrilacije atriya (97). Mogući zajednički patofiziološki mehanizmi još nisu u potpunosti razjašnjeni no razumijevanje doprinosa navedenih čimbenika rizika te prikladne intervencije povezane s istima su pokazale korist u liječenju fibrilacije atriya (98).

Kod pacijenata s fibrilacijom atriya tipično dolazi do progresivnog povećanja učestalosti i produljenja trajanja epizoda fibrilacije atriya. Smatra se da simptomi fibrilacije atriya, odnosno nepravilno električno signaliziranje i kontrakcije srca, dodatno dovode do promjena koje čine pacijente s fibrilacijom atriya podložnima za daljnje epizode fibrilacije atriya premda neke od tih promjena prethode razvoju same bolesti (99). Stoga, otklanjanje podražaja koji izazivaju nepravilan rad srca, primjerice zahvatima poput kateterske ablacije, nudi potencijalne koristi

koje nisu vezane samo uz smanjenje frekvencije simptoma, nego i u zaustavljanju daljnjih patoloških promjena u srcu koje bi dovele do progresije bolesti.

### 1.2.2. Patofiziologija fibrilacije atriya i metaboličke promjene u fibrilaciji atriya

Patogeneza fibrilacije atriya je kompleksna i multifaktorijalna te uključuje elektrofiziološke promjene u srcu kao i strukturne i mehaničke promjene u samom srčanom mišiću. Općenito, smatra se da patofiziologija fibrilacija atriya uključuje podražaje koji iniciraju fibrilaciju atriya, supstrat koji podražava razvoj fibrilacije te druge faktore rizika koji utječu na razvoj bolesti, što sve ukupno rezultira progresijom bolesti u perzistentnije oblike fibrilacije atriya (100). Od elektrofizioloških promjena najznačajnija je prisutnost inicirajućih podražaja u obliku brzo-okidajućih pulsova s ektopičnih žarišta koji se nalaze u predjelu lijevog atriya i proksimalnog dijela plućnih vena (101). Strukturne promjene srčanog mišića koje karakteriziraju fibrilaciju atriya uključuju dilataciju samog atriya, intersticijsku fibrozu u srčanom mišiću te akumulaciju epikardijalnog adipoznog tkiva (EAT). Navedene promjene sačinjavaju „supstrat“ koji je potreban za razvoj i postojanost fibrilacije atriya (91). Intersticijska fibroza pretkljetke je najizraženiji čimbenik strukturnih promjena prisutnih u fibrilaciji atriya. Fibrozno tkivo koje se akumulira u pretkljetki je kruto i slabo provodljivo, što dovodi do elektrofiziološke i mehaničke disfunkcije pretkljetke (102). Istraživanja su pokazala da do razvoja intersticijske fibroze u fibrilaciji atriya dolazi putem nekoliko mehanizama poput lokalne upale, oksidativnog stresa i neurohormonalne aktivacije. Lokalna upala dovodi do aktivacije fibroblasta koji proizvode kolagen i deponiraju ga u izvanstanični matriks, što dovodi do povećane količine fibroznog tkiva (103). Razvoj fibroze je posredovan kompleksnom interakcijom raznovrsnih signalnih puteva koji uključuju faktor rasta vezivnog tkiva (engl. *connective tissue growth factor*, CTGF), angiotenzin II, faktor rasta podrijetlom iz trombocita (engl. *platelet derived growth factor*, PDGF) te transformirajući faktor rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*, TGF- $\beta$ ) (104). Lokalni upalni odgovor je ključni patofiziološki proces uključen u razvoj fibroze pretkljetke, a posredovan je upalnim signaliziranjem što dovodi do aktivacije fibroblasta.

Istraživanja su također pronašla poveznicu između EAT, vrste adipoznog tkiva koje se nalazi između epikardija i perikardija, i fibrilacije atriya. Istraživanje u sklopu Framingham studije srca (engl. *Framingham heart study*) pronašlo je značajnu povezanost volumena perikardijalnog masnog tkiva i fibrilacije atriya, neovisno o ostalim mjerama adipoziteta poput BMI i opsega struka (105). Spomenuta asocijacija je također replicirana u studijama drugih istraživačkih skupina (106,107). Pokazalo se da je EAT također povezan s rekurencijom fibrilacije atriya nakon zahvata kateterske ablacije (108,109). Pretpostavlja se da je uloga EAT u razvoju

fibrilacije atriya posredovana mehanizmima upalnog signaliziranja molekulama koje luči sam EAT, kao i infiltracijom masnog tkiva u sam srčani mišić (110). EAT luči medijatore upale i adipocitokine te tako potiče fibrozu miokarda pretkljetke (111). Aktivin-A, citokini poput faktora tumorske nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- $\alpha$ ) i interleukina 6 (IL-6) te metaloproteinaze matriksa su potencijalni efektori fibroze povezani s fibrilacijom atriya. EAT je također povezano s infiltracijom masnog tkiva u miokard što potencijalno pridonosi nepravilnom provođenju valova depolarizacije budući da povećava heterogenost u provodljivosti srčanog mišića (112).

Uloga sistemske upale je također tema od velikog interesa u istraživanju patofiziologije fibrilacije atriya. Istraživanja su pokazala povećane razine serumskih upalnih biljega poput C-reaktivnog proteina (CRP) i IL-6 u pacijentima s fibrilacijom atriya (113). Navedene molekule su predložene kao potencijalni biljezi razvoja fibrilacije atriya, kao i prediktivni biljezi rekurencije fibrilacije atriya nakon kateterske ablacije. Drugi potencijalni biljezi koji su istraživani uključuju natriuretski peptid tip B (engl. *B-type natriuretic peptide*, BPN), galektin-3, endotelin-1, renin i aldosteron (114–116). Usprkos istraživanjima, uporaba serumskih biljega nije u širokoj upotrebi i pronalazak novih ili kombinacija više različitih biljega je možda potrebna kako bi se razvio prikladan dijagnostički alata za fibrilaciju atriya.

### 1.2.3. Kateterska ablacija i predikcija rekurencije fibrilacije atriya nakon zahvata

Kateterska ablacija je jedan od ključnih terapijskih pristupa liječenju fibrilacije atriya. Cilj kateterske ablacije je ciljano uklanjanje okidača fibrilacije atriya ili modifikacija aritmogenog supstrata. Ablacijske lezije rezultiraju tkivom koje slabo provodi depolarizacijske signale te time izoliraju okidače koji iniciraju fibrilaciju atriya, prekidaju aritmogene puteve u srčanom mišiću ili moduliraju autonomnu inervaciju pretkljetke (117). U kliničkoj praksi postoji nekoliko različitih tehnika kojom se postiže kontrolirani nastanak lezija od kojih su najvažnije ablacija radiofrekvencijom, metodom „točku po točku“ i ablacija kriobalonom. Radiofrekvencijska ablacija se temelji na korištenju lokaliziranog izvora topline koje dovodi do nekroze tkiva i formiranja ablacijskih lezija. Kontinuirane lezije se kreiraju „točku po točku“, obično uz navođenje sustavom za 3D elektro-anatomske mapiranje. Toplinski učinak se proizvodi dostavljanjem električne struje kroz srčani mišić putem jedne ili više elektroda dostavljenih do srca kateterom (118). Krioblacija se temelji na smrzavanju tkiva koristeći balon pod tlakom, koji se kateterom dostavlja do ciljanog mjesta za ablaciju. Injektiranje tekućeg dušikovog oksida rezultira smrzavanjem zahvaćenog tkiva što dovodi do ireverzibilne stanične smrti i formacije ablacijske lezije (119).

Izolacija plućnih vena je dominantni ablacijski postupak u kliničkoj praksi zbog prethodno opisane važne uloge plućnih vena u inicijaciji epizoda fibrilacije atrijske (101). Premda je kateterska ablacija siguran postupak s niskim stopama komplikacija (120), više faktora je potrebno uzeti u obzir kako bi se probrali pacijenti s očekivanom nižom stopom uspješnosti zahvata poput prisutnosti srčanih bolesti, pretilosti ili apneje kao i karakteristike poput veličine lijeve pretklijetke, dobi i vrste fibrilacije atrijske (121). Trenutne smjernice preporučuju katetersku ablaciju kao terapiju druge linije za pacijente sa simptomatskom paroksizmalnom ili perzistentnom fibrilacijom atrijske kojima terapija antiaritmikima nije uspješna (122). Iako je kateterska ablacija važan terapijski pristup u liječenju fibrilacije atrijske, stopa recidiva nakon zahvata je i dalje relativno visoka. Jedna meta-analiza pokazala je kako se stope recidiva nakon jednog zahvata kreću od 40-50%, dok nakon više zahvata stopa pada na 20% (123). Kako bi se poboljšali terapijski ishodi i individualizirao pristup liječenju fibrilacije atrijske, u zadnje vrijeme veliki naponi uloženi su u pronalazak dobrih prediktora recidiva nakon kateterske ablacije (124). Osim spomenutih kliničkih karakteristika samog pacijenta, sve više se istražuje potencijal serumskih biljega za predikciju rekurencije. Pronađeno je da razine određenih plazmatskih proteina poput IL-6 i BNP-a mogu doprinijeti uspješnom probiru pacijenata koji će doživjeti rekurenciju, premda nijedan od navedenih biljega nije zadovoljavajući da bi samostalno ušao u kliničku praksu (125).

### 1.3. Obrazloženje istraživanja i hipoteze

Do sada nema studija koje su uspoređivale *N*-glikome zdravih osoba i osoba oboljelih od fibrilacije atrijske, no u mnogim stanjima povezanim s fibrilacijom atrijske, poput dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti, hipertenzije i starenja, opisane su promjene u *N*-glikozilaciji ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a. Mehanizmi koji povezuju navedena stanja sa samom bolesti i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni te utvrđivanje sličnosti u uzorcima *N*-glikozilacije može indicirati zajedničke podležće patofiziološke čimbenike. Glikozilacija također igra važnu ulogu u lokalnom i sistemskom upalnom odgovoru koji je potencijalno bitan faktor koji doprinosi nastanku i progresiji fibrilacije atrijske, a čija uloga u samoj patogenezi nije u potpunosti istražena. Osim uspoređivanja glikoma zdravih osoba i pacijenata s fibrilacijom atrijske, ovim istraživanjem želimo ispitati promjene povezane sa zahvatom radiofrekventne kateterske ablacije, kao i potencijal glikana kao prediktora uspješnosti zahvata u postizanju dugoročne odsutnosti bolesti. Određeni broj serumskih biljega, uglavnom upalnih markera poput interleukina i CRP-a predloženi su kao potencijalni prediktori rekurenciji, no trenutno ne postoji zadovoljavajući biljeg te bi glikani mogli sami, ili u kombinaciji s drugim biljezima,

služiti kao sredstvo probira pacijenata koji bi imali najveću korist od zahvata. Sve navedeno motivira istraživanje *N*-glikozilacije ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a u fibrilaciji atrijske te je stoga osmišljeno i provedeno ovo istraživanje.

Osnovna hipoteza ovog istraživanja je sljedeća:

- *N*-glikozilacija ukupnih plazmatskih proteina i imunoglobulina G promijenjena je kod ispitanika s fibrilacijom atrijske u odnosu na kardiološki zdrave kontrole te omogućava predviđanje tijeka bolesti kod osoba podvrgnutih zahvatu kateterske ablacije.

Osnovni ciljevi ovog istraživanja su:

- Identificirati *N*-glikanske strukture ukupnih plazmatskih proteina i imunoglobulina G koje se razlikuju kod osoba oboljelih od fibrilacije atrijske i kardiološki zdravih kontrola
- Usporediti pred- i post-operativne *N*-glikome pacijenata podvrgnutih zahvatu radiofrekventne kateterske ablacije s obzirom na kasniju ponovnu pojavu fibrilacije atrijske



## 2. ISPITANICI, METODE I MATERIJALI

## 2.1. Ispitanici

U istraživanju u sklopu ovog doktorskog rada korišteni su uzorci ljudske plazme od 226 ispitanika. Uzorci su skupljeni u dva centra, Klinička Bolnica Dubrava i Klinika Magdalena. Skupina ispitanika s fibrilacijom atrijske skrupljena je u Klinici Magdalena, a sastojala se od 172 pacijenta koji su bili indicirani za zahvat kateterske ablacije. Uključni kriteriji bili su sljedeći: (1) dvije ili više simptomatske epizode fibrilacije atrijske zabilježena na EKG-u, u trajanju od više od 5 minuta; (2) dob iznad 18 godina; (3) indikacija kateterske ablacije; (4) dana privola za prisustvovanje u studiji i potpisan informirani pristanak. Pacijenti koji su ispunjavali sljedeće kriterije nisu uzeti u obzir za uključnje u studiju: (1) permanentna fibrilacija atrijske; (2) prethodni zahvat kateterske ablacije; (3) ejskcijska frakcija lijeve kljetke izmjerena ehokardiografijom <50 %; (4) infarkt miokarda u anamnezi; (5) primarna kardiomiopatija; (6) akutno upalno stanje; (7) CRP > 10 mg/L; (8) kronična upalna bolest; (9) maligni tumor u anamnezi; (10) hiper- ili hipotireoza u anamnezi; (11) terapija heparinom, intravenskim imunoglobulinima ili hormonska terapija; (12) transfuzija krvi. Pacijenti su podvrgnuti zahvatu kateterske ablacije uz uzorkovanje krvne plazme za analizu N-glikozilacije na pregledu prije zahvata te na kliničkom pregledu šest mjeseci nakon zahvata. Kod svih pacijenata kateterska ablacija provedena je radiofrekventnom metodom, tehnikom „točku po točku“. Tijekom šest mjeseci rekurencija fibrilacije atrijske praćena je transtelefonim EKG-om, a na kliničkom pregledu nakon šest mjeseci učinjen je 24-satni holter EKG pregled. Uzorci plazme kardiološki zdravih kontrola prikupljeni su u KB Dubrava. Potvrđeno je odsustvo fibrilacije atrijske i drugih kardioloških stanja. Kontrolni uzorci su probrani na način da raspodjela po dobi i spolu u kontrolnoj skupini odgovara skupini s fibrilacijom atrijske.

Plazma je dobivena iz pune krvi dobivene venepunkcijom u vakuetu s K3EDTA kao antikoagulansom. Nakon 10 minuta krv je centrifugirana na 1620×g 10 min. Krvna plazma je alikvotirana u epruvete od 2 mL te spremljena na -20 °C do daljnje analize.

Svi ispitanici potpisali su informirani pristanak, a studija je odobrena od strane etičkih povjerenstava ukljućenih institucija: etičkog povjerenstva KB Dubrava, etičkog povjerenstva klinike Magdalena i etičkog povjerenstva Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje je provedeno u skladu s odredbama Helsinške deklaracije.

## 2.2. Materijali

### 2.2.1. Kemikalije

2-aminobenzamid (2-AB) (Sigma-Aldrich), 2-pikolin boran (2-PB) (Sigma-Aldrich), acetonitril (HPLC čistoća) (PanReac AppliChem), acetonitril (LC-MS čistoća) (VWR Chemicals), amonijak, otopina (NH<sub>4</sub>OH), amonijev hidrogenkarbonat (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) (Acros Organics), dimetil sulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich), etanol (Merck), igepal CA-630 (Sigma-Aldrich), kalijev dihidrogenfosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich), kalijev klorid (KCl) (EMD Milipore), klorovodična kiselina (HCl) (Merck), mravlja kiselina (Merck), natrijev dodecil sulfat (SDS) (Sigma-Aldrich), natrijev hidrogenfosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Acros Organics), natrijev hidroksid (NaOH) (Merck), natrijev klorid (NaCl) (Carlo Erba), octena kiselina, tris(hidroksimetil)aminoetan (TRIS) (Sigma-Aldrich)

### 2.2.2. Enzimi

Peptid N-glikozidaza F (PNGazaF) (Promega)

### 2.2.3. Otopine i puferi

0,1 M octena kiselina, 1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 1M HCl, 1M NaOH, 1×PBS – puferirana otopina fosfatnih soli (engl. phosphate buffered saline PBS) (10×PBS razrijeđen vodom 10 puta, pH podešen titracijom na 7,4), 1,33% SDS (13,3 g/L), 2% SDS (20 g/L), 4% Igepal (v/v), 5×PBS (10×PBS razrijeđen vodom 2 puta), 10×PBS (80,03 g/L NaCl, 13,83 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,96 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,976 g/L KCl, pH = 6,6), 20% acetonitril HPLC čistoće (v/v), 20 mM TRIS + 0.1M NaCl u 20% etanolu - pufer za skladištenje protein G pločice, 30% octena kiselina u DMSO (v/v), 70% etanol (v/v), 96% acetonitril LC-MS čistoće (v/v), 100 mM amonijev formijat pH = 4,4.

Sve navedeno su vodene otopine osim ako nije drugačije naglašeno. Otopine korištene za izolaciju IgG-a filtrirane su kroz PES filter 0,2 µm.

### 2.2.4. Potrošni materijal

ABgene PCR pločice s 96 jažica (Thermo Scientific), SUPOR Acroprep filter pločica s 96 jažica, pore 0.2 µm (Pall), SUPOR Acroprep filter pločica s 96 jažica, pore 0.45 µm (Pall), nastavci za pipete (Rainin), mikrotitarske pločice kapaciteta s 96 jažica, volumen jažice 1 mL (Waters), mikrotitarske pločice s 96 jažica, volumen jažice 2 mL (Waters), PES membranski filter za otopine, veličina pora 0,2 µm (Pall).

### 2.2.5. Laboratorijski uređaji i oprema

Acquity UPLC Glycan BEH (engl. bridged ethylene hybrid) amidna kolona, veličina pora 130Å, veličina čestica 1,7 µm, dimenzije 2,1 mm x 150 mm (Waters), Acquity UPLC Glycan BEH amidna kolona, veličina pora 130 Å, veličina čestica 1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm (Waters), Acquity UPLC H-class kromatografski sustav (Waters, SAD), pH metar Seven Compact (Mettler Toledo, SAD), analitička vaga AB54-S (Mettler Toledo, SAD), inkubator (MRC, Izrael), magnetski mješač Magnetic Stirrer MSH300 (Biosan, Latvija), mikropipete (Raini, SAD), tehnička vaga Highland (Adam Equipment, UK), treskalica (GFL, Njemačka), vakuumska centrifuga SpeedVac (Thermo Scientific, SAD), vakuumsko postolje (Milipore Corporation, SAD), vakuumska pumpa (Pall, SAD), protein G monolitna pločica s 96 jažica (BIA Sartorius, Njemačka).

### 2.2.6. Računalni programi

Empower računalni program za upravljanje Acquity UPLC sustavom (Waters, SAD), R programski jezik (verzija 4.0.5).

## 2.3. Metode

### 2.3.1. Dizajn eksperimenta

Svi prikupljeni uzorci plazme su u svrhu smanjenja eksperimentalne pogreške nasumično raspoređeni u mikrotitarsku pločicu od 96 jažica. Raspored je određen na način da raspodjela po spolu, dobi i statusu bolesti na svakoj pločici bude uniformna. Na svaku pločicu dodan je po jedan uzorak ultra-čiste vode kao negativna kontrola te pet replika uzoraka krvne plazme zdravih dobrovoljaca u svrhu kontrole kvalitete cijelog postupka. Raspored uzoraka za analizu glikana ukupnih plazmatskih proteina i izoliranog IgG-a bio je identičan. Sve analize provedene su sekvencijalno u što kraćem vremenskom roku kako bi se smanjila tehnička varijacija metode.

### 2.3.2. Izolacija IgG-a iz krvne plazme

Izolacija IgG-a iz krvne plazme provedena je koristeći afinitetnu kromatografiju na monolitnoj pločici od 96 jažica. 100  $\mu$ L krvne plazme razrijeđeno je s 700  $\mu$ L 1xPBS-a te je tako razrijeđena plazma filtrirana na SUPOR filter pločici od 96 jažica uz vakuum. Filtrirana i razrijeđena plazma nanesa je na Protein G pločicu koja je prethodno isprana 0,1 M mravljom kiselinom te potom neutralizirana i isprana PBS-om. Razrijeđena plazma je propuštena kroz monolit protein G pločice koristeći vakuum pumpu. Vezani IgG potom je ispran 3 puta 1xPBS-om. Konačno, IgG je eluiran s pločice dodatkom 1000  $\mu$ L 0,1 M mravlje kiseline. Mravlja kiselina je neutralizirana dodatkom 170  $\mu$ L 1 M otopine amonijevog bikarbonata. Za daljnju analizu korišten je alikvot od 300  $\mu$ L te je u vakuum koncentраторu SpeedVac uklonjeno otapalo kako bi se dobio suhi IgG.

### 2.3.3. Enzimatska deglikozilacija ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a

Prethodno izoliran i osušen IgG prvo je solubiliziran i denaturiran dodatkom 30  $\mu$ L SDS (13,3 g/L) i inkubacijom na 60 °C u trajanju od 10 minuta. Za analizu ukupnih plazmatskih proteina denaturacija je provedena dodatkom 20  $\mu$ L SDS-a (20 g/L). Daljnji tijek analize bio je identičan za ukupne plazmatske proteine i IgG. Nakon denaturacije dodano je 10  $\mu$ L neionskog deterdženta Igepal CA-630 (4% v/v), a potom je u svaki uzorak dodano je 0,12 U enzima PNGase F te je reakcija provedena preko noći na 37 °C.

#### 2.3.4. Fluorescentno obilježavanje oslobođenih *N*-glikana

*N*-glikani oslobođeni PNGaz-om F su nakon inkubacije bez pročišćavanja fluorescentno obilježeni 2-AB-om. Reakcija je provedena dodatkom 25  $\mu\text{L}$  smjese 2-AB i PB (19,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 44,8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) otopljenih u smjesi octene kiseline i DMSO-a (30%, v/v). Reakcija reduktivne aminacije provedena je tijekom 2h na 65 °C.

#### 2.3.5. Pročišćavanje obilježenih *N*-glikana ekstrakcijom na čvrstoj fazi

*N*-glikani obilježeni 2-AB-om pročišćeni su od suviška boje, reducensa i zaostalih proteina ekstrakcijom na čvrstoj fazi. Reakcijska smjesa je razrijeđena dodatkom 700  $\mu\text{L}$  ACN-a te je ukupna smjesa prenesena na SUPOR filter pločicu od 96 jažica (PALL Corporation, SAD). Smjesa je inkubirana 2 minute kako bi se *N*-glikani vezali za hidrofilnu membranu. Otapalo je uklonjeno vakuumom, a *N*-glikani su isprani pet puta dodatkom 200  $\mu\text{L}$  96% ACN-a i vode (v/v). Obilježeni *N*-glikani su naposljetku eluirani s SUPOR membrane dodatkom dva puta po 90  $\mu\text{L}$  ultra-čiste vode. Pročišćeni *N*-glikani su zatim spremljeni na -20 °C do kromatografske analize.

#### 2.3.6. UHPLC analiza obilježenih *N*-glikana

Tekućinska kromatografija provedena je na Acquity H-class UHPLC sustavu s fluorescencijskim detektorom. Sustav je bio kontroliran Empower 3 softverom. Eksitacijska valna duljina detektora iznosila je 250 nm, dok je emisijska valna duljina iznosila 428 nm. Odvajanje je provedeno koristeći Waters BEH amidne kolone, unutaršnjeg promjera 2,1 mm, veličine čestica 1,7  $\mu\text{m}$  i veličine pora 130 Å. Za analizu *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina korištena je kolona duljine 150 mm, dok je za analizu *N*-glikana IgG-a korištena kolona duljine 100 mm. Kao otapalo A korištena je 100 mM otopina amonijevog formijata (pH = 4,4), a kao otapalo B korišten je ACN LC-MS čistoće. Linearni gradijent otapala za analizu *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina bio je 30-47 % otapala A, uz protok od 0,561 mL/min kroz 25 min (Tablica 1). Odvajanje je provedeno na 25 °C. Za analizu *N*-glikana IgG-a korišten je linearni gradijent od 25-38 % otapala A, uz protok od 0,4 mL/min kroz 29 min (Tablica 2). Odvajanje je provedeno na 60 °C. Nakon analize svakog uzorka, kolona je isprana otapalom A, te ekvilibrirana u početne uvjete kao što detaljno prikazano u Tablicama 1 i 2.

**Tablica 1.** Gradijent otapala korišten za odvajanje *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina

Vrijeme (min)	Protok (mL/min)	Otapalo A (%)	Otapalo B(%)
0,00	0,561	30	70
1,47	0,561	30	70
24,81	0,561	47	53
25,50	0,250	100	0
28,00	0,250	100	0
29,00	0,250	30	70
32,50	0,561	30	70

**Tablica 2.** Gradijent otapala korišten za odvajanje *N*-glikana IgG-a

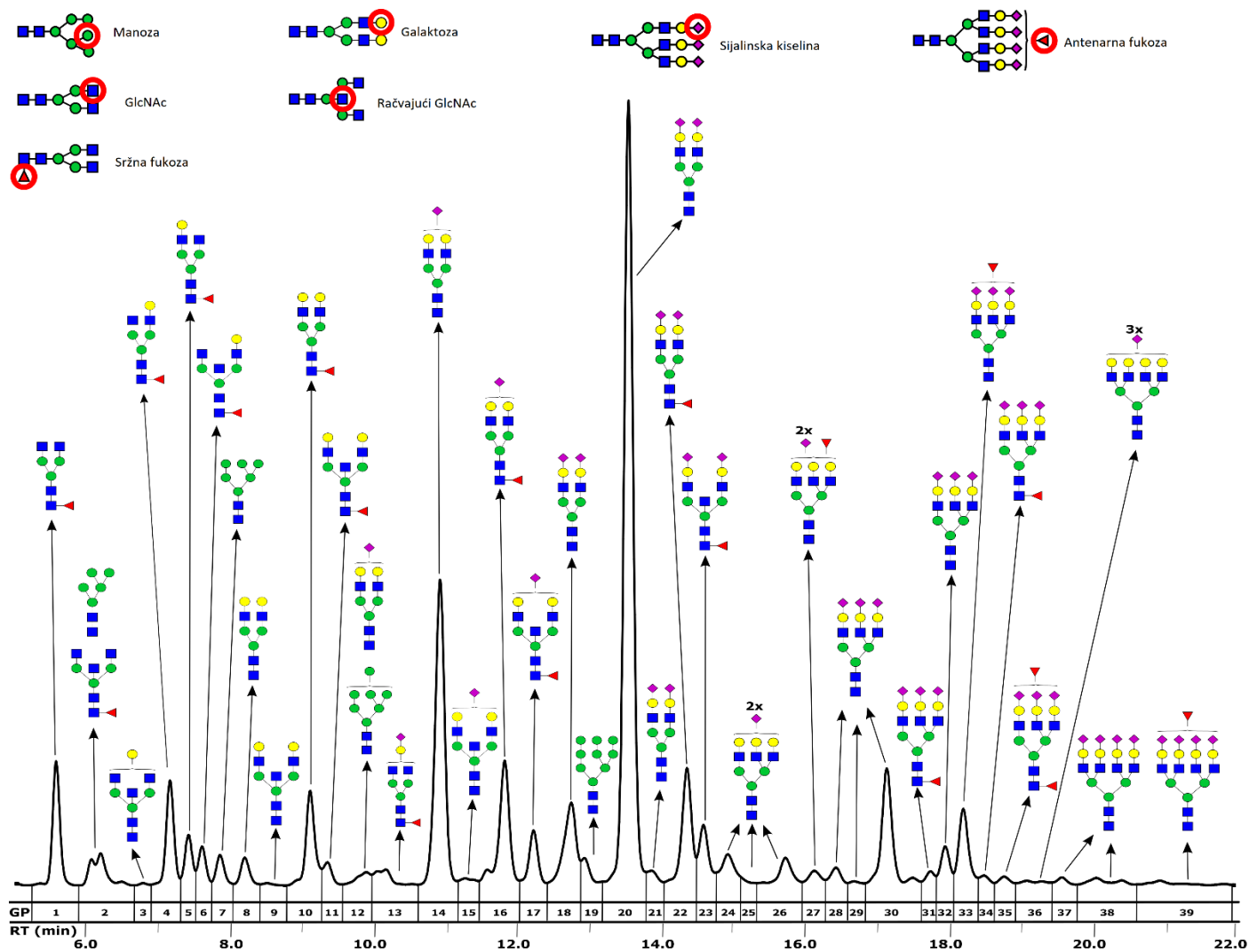
Vrijeme (min)	Protok (mL/min)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)
0,00	0,4	25	75
29,00	0,4	38	62
30,00	0,4	100	0
32,00	0,4	100	0
33,00	0,4	25	75
38,00	0,4	25	75

Pročišćeni *N*-glikani za kromatografsku analizu pripremljeni razrijeđivanjem s ACN-om LC-MS čistoće. Za *N*-glikane ukupnih plazmatskih proteina 15  $\mu$ L pročišćenih glikana pomiješano je s 35  $\mu$ L ACN-a, dok je za *N*-glikane IgG-a 12,5  $\mu$ L pročišćenih glikana pomiješano s 37,5  $\mu$ L ACN-a. Za analizu *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina injektirano je 20  $\mu$ L smjese uzorka, dok je za *N*-glikane IgG-a injektirano 40  $\mu$ L smjese uzorka. Prije svake sekvence analize prikladnost sustava provjerena je injektiranjem standardnog uzorka *N*-glikana plazme odnosno IgG-a pripremljenog *in-house*.

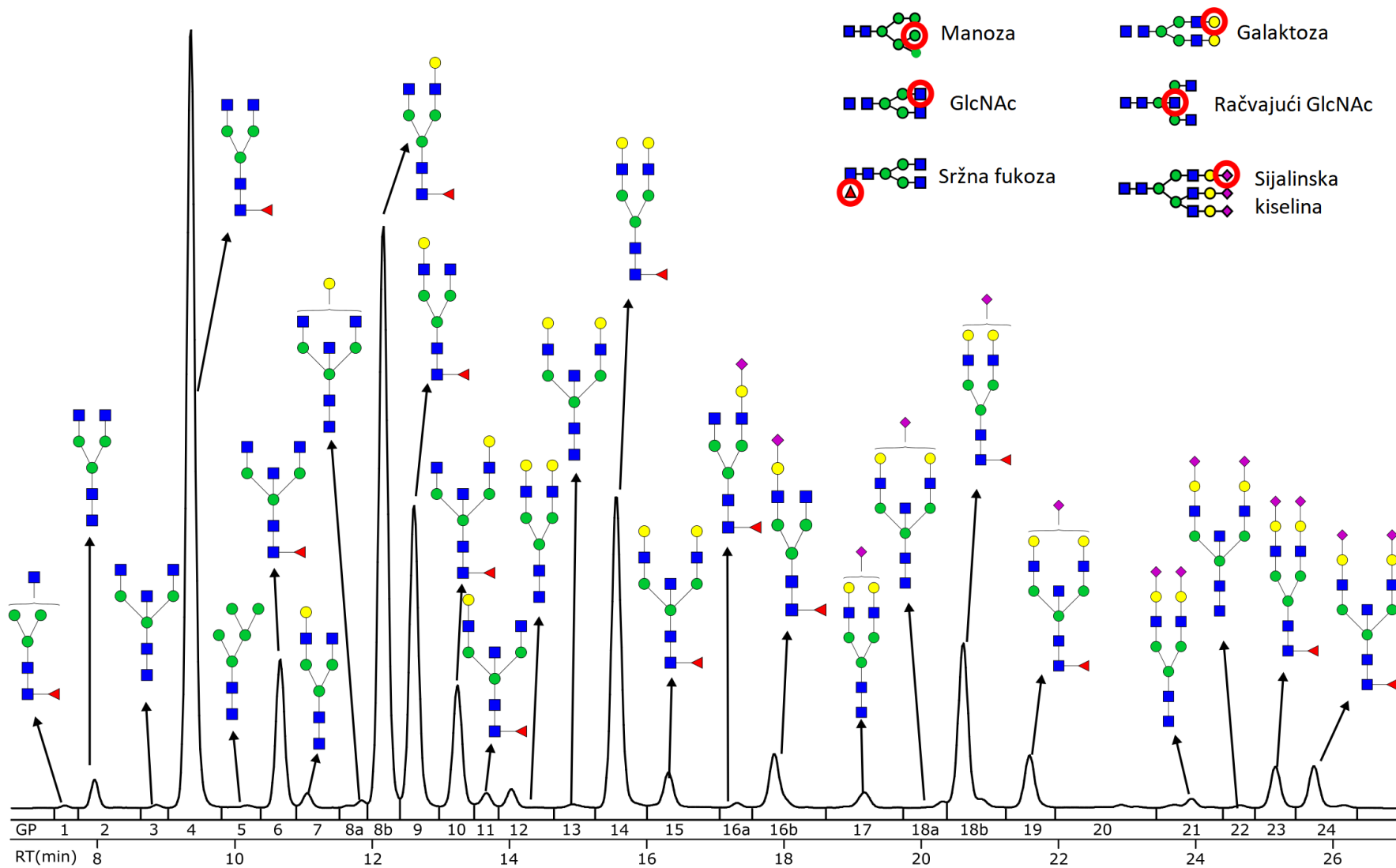
Svi dobiveni kromatogrami ručno su procesuirani na isti način koristeći softver Empower kako bi se integracijom dobile površine ispod pojedinog kromatografskog vrška. *N*-glikani ukupnih plazmatskih proteina razdvojeni su u 39 kromatografskih vršaka označeni GP1-GP39 (engl. *glycan peak*, GP). Glikanske strukture u svakom kromatografskom vršku prethodno su potvrđene LC-MS analizom (40). Reprezentativni kromatogram s prikazanim strukturama u

svakom glikanskom vršku prikazan je na Slici 6, dok je detaljan opis svih struktura u svakom kromatografskom vršku dan u Tablici 3. *N*-glikani IgG-a razdvojeni su u 24 kromatografska vrška označeni IGP1-IGP24 (engl. *IgG glycan peak*, IGP). Glikanske strukture su kao i kod plazme prethodno potvrđene koristeći LC-MS (28). Reprezentativni kromatogram *N*-glikana IgG-a s prikazanim strukturama u svakom glikanskom vršku prikazan je na Slici 7, dok je detaljan opis svih struktura u svakom kromatografskom vršku dan u Tablici 4. Relativni udio glikana u svakom pojedinom kromatografskom vršku izračunat je kao udio površine vrška u ukupnoj površini kromatograma.





**Slika 6.** Reprezentativni UHPLC-FLR kromatogram *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina s prikazanim dominantnim strukturama u svakom kromatografskom vršku.



**Slika 7.** Reprezentativni UHPLC-FLR kromatogram *N*-glikana IgG-a s prikazanim dominantnim strukturama u svakom kromatografskom vršku.

**Tablica 3.** Opis glikanskih struktura u kromatogramu *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina

Glikanski vršak (GP)	Glikanska struktura – kratica	Glikanska struktura – prikaz	Opis strukture
GP1	FA2		sržno fukoziliran, biantenarni
GP2	FA2B M5		sržno fukoziliran, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om
GP3	A2BG1		Monogalaktoziliran, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om
GP4	FA2[6]G1		sržno fukoziliran, monogalaktoziliran, biantenarni
GP5	FA2[3]G1		sržno fukoziliran, monogalaktoziliran, biantenarni
GP6	FA2[6]BG1		sržno fukoziliran, monogalaktoziliran, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om
GP7	M6		oligomanozni sa šest manoznih jedinica
GP8	A2G2		digalaktoziliran, biantenarni
GP9	A2BG2		digalaktoziliran, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om
GP10	FA2G2		sržno fukoziliran, digalaktoziliran, biantenarni
GP11	FA2BG2		sržno fukoziliran, digalaktoziliran, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om
GP12	M7 A2G2S1		oligomanozni sa sedam manoznih jedinica; digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni
GP13	FA2G1S1		sržno fukoziliran, monogalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni
GP14	A2G2S1		digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni
GP15	A2BG2S1		digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om
GP16	FA2G2S1		sržno fukoziliran, digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni

GP17	FA2BG2S1		sržno fukoziliran, digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om
GP18	A2G2S2		digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni
GP19	M9		oligomanozni s devet manoznih jedinica
GP20	A2G2S2		digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni
GP21	A2G2S2		digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni
GP22	FA2G2S2		sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni
GP23	FA2BG2S2		sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni s račvujućim GlcNAc-om
GP24	A3G3S2		trigalaktoziliran i disijaliniziran, triantenarni
GP25	A3G3S2		trigalaktoziliran i disijaliniziran, triantenarni
GP26	A3G3S2		trigalaktoziliran i disijaliniziran, triantenarni
GP27	A3F1G3S2		antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i disijaliniziran, triantenarni
GP28	A3G3S3		trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni
GP29	A3G3S3		trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni
GP30	A3G3S3		trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni
GP31	FA3G3S3		sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni
GP32	A3G3S3		trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni
GP33	A3F1G3S3		antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni
GP34	FA3G3S3		sržno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni

GP35	FA3F1G3S3		sržno i antenarno fukoziliran, trigalaktoziliran i trisijaliniziran, triantenarni
GP36	A4G4S3		tetragalaktoziliran i trisijaliniziran, tetraantenarni
GP37	A4G4S4		tetragalaktoziliran i tetrasijaliniziran, tetraantenarni
GP38	A4G4S4		tetragalaktoziliran i tetrasijaliniziran, tetraantenarni
GP39	A4F1G4S4		antenarno fukoziliran, tetragalaktoziliran i tetrasijaliniziran, tetraantenarni

**Tablica 4.** Opis glikanskih struktura u kromatogramu *N*-glikana IgG-a

Glikanski vršak (IGP)	Glikanska struktura – kratica	Glikanska struktura – prikaz	Opis strukture
IGP1	FA1		sržno fukoziliran, monoantenarni
IGP2	A2		biantenarni
IGP3	A2B		biantenarni s računjućim GlcNAc-om
IGP4	FA2		sržno fukoziliran, biantenarni
IGP5	M5		oligomanozni s pet manoznih jedinica
IGP6	FA2B		sržno fukoziliran, biantenarni s računjućim GlcNAc-om
IGP7	A2[3]G1		monogalaktoziliran, biantenarni; sržno fukoziliran
IGP8	FA2[6]G1		sržno fukoziliran, monogalaktoziliran, biantenarni
IGP9	FA2[3]G1		sržno fukoziliran, monogalaktoziliran, biantenarni

IGP10	FA2[6]BG1		sržno fukoziliran, monogalaktoziliran, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om
IGP11	FA2[3]BG1		sržno fukoziliran, monogalaktoziliran, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om
IGP12	A2G2		digalaktoziliran, biantenarni
IGP13	A2BG2		digalaktoziliran, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om
IGP14	FA2G2		sržno fukoziliran, digalaktoziliran, biantenarni
IGP15	FA2BG2		sržno fukoziliran, digalaktoziliran, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om
IGP16	FA2[3]G1S1		sržno fukoziliran, monogalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni
IGP17	A2G2S1		digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni
IGP18	FA2G2S1		sržno fukoziliran, digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni
IGP19	FA2BG2S1		sržno fukoziliran, digalaktoziliran i monosijaliniziran, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om
IGP20	struktura nije određena	N/A	struktura nije određena
IGP21	A2G2S2		digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni
IGP22	A2BG2S2		digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om
IGP23	FA2G2S2		sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni
IGP24	FA2BG2S2		sržno fukoziliran, digalaktoziliran i disijaliniziran, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om

## 2.4. Statistička analiza N-glikanskih podataka

Sve statističke analize i vizualizacije podataka napravljene su koristeći R programski jezik (verzija 4.0.5) i pakete koji su navedeni dalje u tekstu.

Podaci su normalizirani na ukupnu površinu kromatograma (engl. *total area normalization*), pri čemu se udio svakog kromatografskog vrška dijeli s ukupnom površinom kromatograma. Zbog desno nagnute distribucije glikanskih svojstava podaci su logaritamski transformirani kako bi se dobila normalna distribucija što je omogućilo korištenje parametarskih testova za statističku analizu asocijacija glikana. Normalnost razdiobe glikanskih svojstava testirana je Shapiro-Wilk testom. Kako bi se smanjio udio tehničke varijacije metode zbog analize većeg broja uzoraka podijeljenog u nekoliko serija provedena je korekcija na razlike u serijama (engl. *batch correction*). Korekcije je provedena na logaritamski transformiranim podacima koristeći ComBat metodu R paketa *sva* (126).

Osim direktno mjerenih glikanskih svojstava izračunata su i derivirana glikanska svojstva koja grupiraju glikane na temelju zajedničkih strukturnih svojstava (npr. galaktozilacija, fukozilacija, sijalinizacija). Formule za izračun deriviranih svojstava prikazane su u Tablici 5. Za izračun su korištene vrijednosti *N*-glikana korigirane na razlike u serijama te su naknadno također logaritamski transformirane.

Za utvrđivanje statistički značajnih asocijacija korišteni su linearni modeli. Logaritamski transformirana glikanska svojstva korištena su kao kontinuirana zavisna varijabla dok su kao nezavisne varijable korištene varijable za koje se htjela ispitati asocijacija. Dob i spol su uključeni u sve modele kao kovarijate zbog prethodno poznatog utjecaja na sastav *N*-glikoma ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a (12,44).  $CHA_2DS_2-VASc$  procjena rizika izračunat je za sve pacijente s fibrilacijom atrijske kao što su predložili Lip i suradnici (127). Zbog malog broja pacijenata s  $CHA_2DS_2-VASc$  vrijednostima iznad 4, svi pacijenti s vrijednostima iznad 4 su spojeni u jednu kategoriju označenu s „>4“.  $CHA_2DS_2-VASc$  vrijednost je u modelu tretirana kao nezavisna ordinirana kategorička varijabla s vrijednostima od 0 do >4 uz dob i spol kao kovarijate kao i u ostalim analizama. P-vrijednosti su korigirane za višestruko testiranje koristeći metodu koju su predložili Li i Ji (128). Navedena metoda je korištena zbog međusobne povezanosti *N*-glikanskih mjerenja. Metoda se temelji na Benjamini-Hochberg metodi, a sastoji se od izračuna broja nezavisnih mjerenja u skupu podataka na koji treba korigirati p-vrijednost. Prag značajnosti za korigirane p-vrijednosti bio je 0,05.

**Tablica 5.** Formule korištene za izračun deriviranih svojstava *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a.

Derivirano svojstvo	Formula
<b>Plazma</b>	
Nisko razgranati glikani ( <b>LB</b> )	GP1+GP2+GP3+GP4+GP5+GP6+GP8+GP9+GP10+GP11+GP12+GP13+GP14+GP15+GP16+GP17+GP18+GP20+GP21+GP22+GP23
Visoko razgranati glikani ( <b>HB</b> )	GP24+GP25+GP26+GP27+GP28+GP29+GP30+GP31+ GP32+GP33+GP34+GP35+GP36+GP37+GP38+GP39
Agalaktozilirani glikani ( <b>G0</b> )	GP1+0.5xGP2
Monogalaktozilirani glikani ( <b>G1</b> )	GP3+GP4+GP5+GP6+GP13
Digalaktozilirani glikani ( <b>G2</b> )	GP8+GP9+GP10+GP11+0.5xGP12+GP14+GP15+GP16+GP17+GP18+GP20+GP21+GP22+GP23
Trigalaktozilirani glikani ( <b>G3</b> )	GP24+GP25+GP26+GP27+GP28+GP29+GP30+GP31+ GP32+GP33+GP34+GP35
Tetragalaktozilirani glikani ( <b>G4</b> )	GP36+GP37+GP38+GP39
Neutralni glikani ( <b>S0</b> )	GP1+0.5xGP2+GP3+GP4+GP5+GP6+GP8+GP9+GP10+ GP11
Monosijalinizirani glikani ( <b>S1</b> )	0.5xGP12+GP13+GP14+GP15+GP16+GP17
Disijalinizirani glikani ( <b>S2</b> )	GP18+GP20+GP21+GP22+GP23+GP24+GP25+GP26+ GP27
Trisijalinizirani glikani ( <b>S3</b> )	GP28+GP29+GP30+GP31+GP32+GP33+GP34+GP35+ GP36
Tetrasijalinizirani glikani ( <b>S4</b> )	GP37+GP38+GP39
Glikani s račvujućim GlcNAc-om ( <b>B</b> )	0.5xGP2+GP3+GP6+GP9+GP11+GP15+GP17+ GP23
Oligomanozni glikani ( <b>M</b> )	0.5xGP2+GP7+0.5xGP12+GP19
Sržno fukozilirani glikani ( <b>CF</b> )	GP1+0.5xGP2+GP4+GP5+GP6+GP10+GP11+GP13+GP16+GP17+GP22+GP23+GP31+GP34+GP35
Glikani s antenarnom fukozom ( <b>AF</b> )	GP27+GP33+GP35+GP39
<b>IgG</b>	
Agalaktozilirani glikani ( <b>G0</b> )	IGP1+IGP2+IGP3+IGP4+IGP6
Monogalaktozilirani glikani ( <b>G1</b> )	IGP7+IGP8+IGP9+IGP10+IGP11
Digalaktozilirani glikani ( <b>G2</b> )	IGP12+IGP13+IGP14+IGP15
Slijalinizirani glikani ( <b>S</b> )	IGP16+IGP17+IGP18+IGP19+IGP20+IGP21+IGP22+IGP23+IGP24
Glikani s račvujućim GlcNAc-om ( <b>B</b> )	IGP3+IGP6+IGP10+IGP11+IGP13+IGP15+IGP19+IGP22+IGP24
Sržno fukozilirani glikani ( <b>CF</b> )	IGP1+IGP4+IGP6+IGP8+IGP9+IGP10+IGP11+IGP14+IGP15+ IGP16+IGP18+IGP19+IGP23+IGP24



### 3. REZULTATI

### 3.1. Osobine ispitanika i deskriptivna statistika

*N*-glikozilacija ukupnih plazmatskih proteina i izoliranog IgG-a uspješno je analizirana u 332 uzorka pacijenata s fibrilacijom atrijske i zdravih kontrola. Uzorci pacijenata s fibrilacijom atrijske prikupljeni su u dvije vremenske točke, neposredno prije zahvata kateterske ablacije i šest mjeseci nakon zahvata. Od 172 pacijenta koji su analizirani na početku studije, za 106 je prikupljen i uzorak nakon šest mjeseci, dok su za 170 pacijenta prikupljeni podaci o recidivu. U kontrolnoj skupini analizirana su 54 uzorka. Karakteristike populacije analiziranih uzoraka prikazani su u Tablici 6. *N*-glikani su analizirani UHPLC metodom te su izračunati relativni udjeli pojedinog glikanskog vrška kao i derivirana svojstva koja predstavljaju udjele glikana s pojedinim zajedničkim strukturnim značajkama. U Tablicama 7 i 8 prikazana je deskriptivna statistika relativnih udjela pojedinog glikana i deriviranih svojstava za *N*-glikome ukupnih plazmatskih proteina (Tablica 7) odnosno IgG-a (Tablica 8) razdvojenih po skupinama. Iskazane su vrijednosti nakon provedene korekcije za razlike u serijama.

**Tablica 6.** Deskriptivna statistika ispitivane populacije

		Fibrilacija atriya	Kontrolna skupina
N		172	54
Dob (godine)		64 (57-69)	64 (57-69)
Ženski spol		63 (36 %)	19 (35%)
ITM		28.9 (4.37)	
Klasifikacija FA			
	Paroksizmalna	135 (78%)	
	Perzistentna	37 (22%)	
CHA <sub>2</sub> DS <sub>2</sub> -VASc			
	0	33 (19%)	
	1	48 (28%)	
	2	45 (26%)	
	3	36 (21%)	
	>4	10 (6%)	
Hipertenzija			
	Ne	58 (34%)	
	Da	114 (66%)	
Diabetes melitus			
	Ne	159 (92%)	
	Da	13 (8%)	
Koronarna bolest srca			
	Ne	153 (89%)	
	Da	19 (11%)	
Moždani udar ili TIA			
	Ne	165 (96%)	
	Da	7 (4%)	
Recidiv nakon 6 mjeseci			
	Ne	120 (70%)	
	Da	50 (29%)	
	Nema podataka	2 (1%)	
Fibroza atriya <sup>#</sup>			
	Ne	21 (12%)	
	Blaga	43 (25%)	
	Izražena	103 (60%)	
	Nema podataka	5 (3%)	

Dob je iskazana kao medijan i interkvartilni raspon. Sve ostale kategoričke varijable su iskazane kao broj (N) i udio (%). ITM je iskazan kao prosječna vrijednost i standardna devijacija. TIA – tranzijentni ishemijski napad, AF – fibrilacija atriya, ITM – indeks tjelesne mase.

<sup>#</sup> Prisutnost atrijske fibroze izmjerena metodom elektroanatomskog mapiranja napona kao što je opisano u (129). Blaga fibroza je definirana kao postotak fibrotične površine u ukupnoj površini lijevog atriya <5%, dok je >5% smatrano izraženom fibrozom.

**Tablica 7.** Deskriptivna statistika *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina osoba oboljelih od fibrilacije atrijske i zdravih kontrola. Iskazane su vrijednosti nakon kontrole za razlike u serijama.

Glikan	Fibrilacija atrijske								
	Kontrolna skupina			Prva vremenska točka			Druga vremenska točka		
	Medijan	Q1	Q3	Medijan	Q1	Q3	Medijan	Q1	Q3
GP01	4,72	3,71	6,18	4,80	3,10	5,86	4,39	3,04	5,66
GP02	2,27	1,97	2,58	2,04	1,75	2,42	2,03	1,76	2,47
GP03	0,08	0,07	0,11	0,07	0,05	0,10	0,07	0,05	0,09
GP04	3,64	2,97	4,17	3,68	2,58	4,42	3,46	2,64	4,17
GP05	1,73	1,33	2,23	1,99	1,25	2,51	1,87	1,27	2,39
GP06	1,28	1,12	1,60	1,21	0,99	1,46	1,23	0,98	1,42
GP07	0,99	0,92	1,09	1,00	0,91	1,12	1,01	0,88	1,11
GP08	1,29	1,23	1,42	1,30	1,17	1,42	1,25	1,15	1,39
GP09	0,09	0,08	0,10	0,09	0,07	0,10	0,08	0,07	0,10
GP10	3,24	2,65	3,62	3,28	2,58	3,93	3,16	2,52	3,77
GP11	0,73	0,62	0,85	0,72	0,57	0,84	0,68	0,56	0,83
GP12	1,08	0,97	1,20	1,06	0,98	1,18	1,07	0,96	1,20
GP13	0,62	0,54	0,76	0,71	0,47	0,87	0,65	0,47	0,85
GP14	12,78	11,77	13,29	12,72	11,73	13,64	12,64	11,70	13,70
GP15	0,36	0,33	0,39	0,35	0,31	0,40	0,34	0,31	0,41
GP16	4,99	4,40	5,53	5,01	4,52	5,66	5,03	4,39	5,63
GP17	1,90	1,59	2,29	1,85	1,60	2,23	1,80	1,50	2,20
GP18	3,31	2,89	3,66	3,37	3,00	3,75	3,41	3,10	3,74
GP19	1,09	1,02	1,21	1,20	1,09	1,29	1,16	1,06	1,29
GP20	27,49	26,14	29,13	27,38	25,00	30,68	28,12	25,43	29,85
GP21	0,62	0,56	0,69	0,63	0,57	0,68	0,64	0,58	0,70
GP22	4,17	3,79	4,61	4,35	3,80	5,05	4,57	3,74	5,36
GP23	2,25	1,80	2,56	2,22	1,79	2,70	2,21	1,82	2,77
GP24	1,56	1,23	1,99	1,63	1,33	1,89	1,66	1,39	1,90
GP25	0,27	0,23	0,30	0,27	0,24	0,30	0,27	0,24	0,30
GP26	1,70	1,47	1,94	1,66	1,47	1,89	1,75	1,54	1,92
GP27	1,07	0,83	1,34	1,00	0,77	1,22	1,01	0,79	1,22
GP28	0,61	0,44	0,77	0,61	0,51	0,72	0,63	0,53	0,76
GP29	0,15	0,13	0,18	0,17	0,14	0,19	0,16	0,14	0,18
GP30	4,40	3,51	5,21	4,42	3,81	5,30	4,59	3,92	5,32
GP31	0,45	0,35	0,54	0,44	0,35	0,52	0,45	0,38	0,55
GP32	1,51	1,28	1,79	1,41	1,16	1,64	1,48	1,25	1,72
GP33	3,22	2,41	3,80	3,02	2,28	3,61	3,09	2,28	3,64
GP34	0,35	0,30	0,41	0,32	0,28	0,38	0,34	0,30	0,39
GP35	0,39	0,32	0,51	0,36	0,28	0,45	0,39	0,29	0,47
GP36	0,44	0,39	0,53	0,43	0,38	0,50	0,44	0,40	0,48
GP37	0,36	0,27	0,43	0,34	0,28	0,42	0,34	0,29	0,41
GP38	0,77	0,66	0,88	0,76	0,68	0,87	0,79	0,68	0,85
GP39	0,67	0,56	0,81	0,61	0,51	0,76	0,59	0,49	0,76
HB	18,06	16,58	19,12	17,89	15,85	19,42	17,95	16,67	19,47

LB	79,77	78,63	81,08	79,61	78,08	81,81	79,61	78,18	80,73
G0	5,96	4,65	7,30	5,92	4,01	6,96	5,40	3,98	6,86
G1	7,67	6,30	8,77	7,84	5,40	9,32	7,28	5,53	8,74
G2	63,71	61,54	66,46	64,56	62,28	67,18	64,74	62,57	67,53
G3	15,69	14,36	17,06	15,64	13,89	17,05	15,77	14,72	17,32
G4	2,34	1,97	2,56	2,16	1,96	2,50	2,24	2,01	2,43
S0	18,57	15,23	21,43	18,84	13,75	21,79	17,48	14,23	20,18
S1	21,19	20,64	21,78	21,37	20,60	22,27	21,49	20,47	22,39
S2	42,84	40,88	44,76	42,40	39,77	46,53	43,42	40,91	46,18
S3	11,46	10,56	12,30	11,39	10,08	12,47	11,52	10,71	12,68
S4	1,91	1,60	2,09	1,73	1,55	2,01	1,77	1,58	1,94
B	7,88	7,19	8,36	7,78	6,68	8,85	7,85	6,43	8,78
M	3,80	3,63	3,96	3,78	3,57	4,06	3,75	3,53	4,08
CF	31,90	29,25	35,65	32,58	27,58	37,09	32,02	28,27	35,68
AF	5,38	4,18	6,43	5,00	3,89	6,05	5,08	3,84	6,15

**Tablica 8.** Deskriptivna statistika *N*-glikana IgG-a osoba oboljelih od fibrilacije atrijske i zdravih kontrola. Iskazane su vrijednosti nakon kontrole za razlike u serijama.

Glikan	Fibrilacija atrijske								
	Kontrolna skupina			Prva vremenska točka			druga točka		
	Medijan	Q1	Q3	Medijan	Q1	Q3	Medijan	Q1	Q3
GP01	0,08	0,07	0,10	0,08	0,07	0,10	0,08	0,07	0,10
GP02	0,92	0,66	1,25	0,78	0,52	1,08	0,68	0,48	1,10
GP03	0,10	0,09	0,12	0,10	0,09	0,12	0,10	0,09	0,12
GP04	24,85	21,75	29,47	25,01	20,92	28,11	25,18	21,11	28,28
GP05	0,18	0,15	0,19	0,19	0,17	0,24	0,18	0,16	0,21
GP06	6,97	5,96	8,13	6,20	5,24	7,18	6,29	5,24	7,58
GP07	0,48	0,40	0,61	0,43	0,31	0,58	0,41	0,30	0,60
GP08	18,24	17,36	18,91	18,28	17,32	19,31	18,37	17,38	19,37
GP09	9,58	8,86	10,35	10,29	9,37	11,18	10,15	9,37	11,38
GP10	5,60	4,85	6,50	5,20	4,59	5,77	5,28	4,62	5,97
GP11	0,81	0,73	0,89	0,77	0,67	0,85	0,77	0,67	0,86
GP12	0,74	0,59	0,96	0,66	0,47	0,93	0,62	0,43	0,84
GP13	0,21	0,19	0,25	0,22	0,19	0,26	0,22	0,19	0,25
GP14	11,64	9,45	13,31	11,37	9,71	13,77	11,55	9,69	13,46
GP15	1,80	1,55	1,98	1,68	1,52	1,91	1,69	1,45	1,95
GP16	2,85	2,70	3,19	3,04	2,70	3,36	3,06	2,77	3,33
GP17	0,90	0,79	0,99	0,93	0,82	1,08	0,87	0,78	1,00
GP18	7,62	6,42	8,59	7,75	6,40	8,95	7,86	6,11	9,09
GP19	1,85	1,54	2,15	1,79	1,60	2,05	1,79	1,55	2,08
GP20	0,26	0,22	0,29	0,31	0,26	0,38	0,27	0,23	0,30
GP21	0,56	0,52	0,60	0,65	0,56	0,79	0,57	0,53	0,63
GP22	0,11	0,09	0,13	0,10	0,08	0,13	0,09	0,08	0,12
GP23	1,28	1,04	1,50	1,41	1,13	1,65	1,39	1,15	1,65

GP24	1,66	1,39	1,99	1,71	1,44	1,93	1,71	1,44	1,93
G0	32,81	29,62	37,10	32,51	27,30	37,01	32,70	27,75	37,06
G1	34,98	34,19	36,11	35,03	33,99	36,45	35,15	34,06	36,55
G2	14,66	11,93	15,86	14,21	12,24	16,84	14,15	11,94	16,55
S	17,49	15,61	18,62	18,22	16,14	19,49	17,96	15,85	19,57
B	19,46	17,36	20,87	17,97	16,56	19,64	18,12	16,60	19,61
CF	95,43	94,75	96,16	95,67	94,41	96,30	95,96	94,66	96,59

### 3.2. Povezanost *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a s fibrilacijom atrijske miokardijalne mase

Kako bi utvrdili razlike u *N*-glikozilaciji ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a između pacijenata s fibrilacijom atrijske miokardijalne mase i zdravih kontrola usporedili smo *N*-glikome pacijenata s fibrilacijom atrijske miokardijalne mase u prvoj vremenskoj točki i *N*-glikome zdravih kontrola. Prva vremenska točka odabrana je za usporedbu budući da predstavlja stanje nakon duljeg perioda prisustva bolesti te nam tako daje uvid u razlike između zdravih osoba i osoba koje boluju od fibrilacije atrijske miokardijalne mase. Statistička analiza linearnom regresijom pokazala je značajne razlike u jednom glikanskom svojstvu ukupnih plazmatskih proteina i sedam glikanskih svojstava IgG-a. U *N*-glikomu ukupnih plazmatskih proteina GP19 (Man9) je bio zastupljeniji kod pacijenata s fibrilacijom atrijske miokardijalne mase u odnosu na kontrole ( $\beta$ -koeficijent 0,075, *p*-vrijednost 0,004). U *N*-glikomu IgG-a IGP5 (Man5) ( $\beta$ -koeficijent 0,123, *p*-vrijednost 0,012), IGP9 (FA2[3]G1) ( $\beta$ -koeficijent 0,065, *p*-vrijednost 0,047), IGP20 (struktura nije utvrđena) ( $\beta$ -koeficijent 0,221, *p*-vrijednost  $1 \times 10^{-7}$ ), IGP21 (A2G2S2) ( $\beta$ -koeficijent 0,166, *p*-vrijednost  $6 \times 10^{-5}$ ) su bili zastupljeniji kod pacijenata s fibrilacijom atrijske miokardijalne mase dok je obrnuta asocijacija utvrđena za IGP6 (FA2B) ( $\beta$ -koeficijent -0,093, *p*-vrijednost 0,022) i IGP10 (FA2[6]BG1) ( $\beta$ -koeficijent -0,083, *p*-vrijednost 0,029) i derivirano svojstvo koje mjeri udio računajućeg GlcNAc-a ( $\beta$ -koeficijent -0,055, *p*-vrijednost 0,037). Rezultati linearne regresije prikazane za *N*-glikom ukupnih plazmatskih proteina prikazani su u Tablici 9, dok su za *N*-glikom IgG-a prikazani u Tablici 10. Statistički značajne promjene prikazane su grafički na Slici 8.

**Tablica 9.** Povezanost izravno mjerenih i deriviranih glikanskih svojstava ukupnih plazmatskih proteina s fibrilacijom atrija. Statistički značajne promjene su podebljane.

Glikan	$\beta$ -koeficijent (95% CI)*	P-vrijednost	Prilagođena P-vrijednost#
GP01	-0,105 (-0,248, 0,037)	0,1465	0,379
GP02	-0,094 (-0,163, -0,024)	0,0083	0,095
GP03	-0,145 (-0,273, -0,017)	0,0265	0,252
GP04	-0,055 (-0,177, 0,067)	0,3784	0,674
GP05	0,001 (-0,145, 0,146)	0,9925	0,993
GP06	-0,12 (-0,205, -0,035)	0,0057	0,081
GP07	-0,016 (-0,072, 0,04)	0,5771	0,82
GP08	-0,005 (-0,048, 0,039)	0,8363	0,941
GP09	-0,022 (-0,097, 0,053)	0,5597	0,82
GP10	0,009 (-0,083, 0,102)	0,8422	0,941
GP11	-0,036 (-0,124, 0,052)	0,4179	0,722
GP12	-0,005 (-0,051, 0,041)	0,8351	0,941
GP13	0,021 (-0,08, 0,122)	0,6823	0,884
GP14	0,009 (-0,027, 0,045)	0,6128	0,832
GP15	0,001 (-0,064, 0,066)	0,9819	0,993
GP16	0,038 (-0,013, 0,09)	0,1457	0,379
GP17	-0,001 (-0,094, 0,092)	0,9815	0,993
GP18	0,018 (-0,04, 0,076)	0,5416	0,82
<b>GP19</b>	<b>0,075 (0,036, 0,114)</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,004</b>
GP20	-0,004 (-0,044, 0,035)	0,8265	0,941
GP21	-0,008 (-0,052, 0,035)	0,7088	0,898
GP22	0,046 (-0,015, 0,107)	0,136	0,379
GP23	0,043 (-0,048, 0,135)	0,352	0,669
GP24	0,021 (-0,056, 0,097)	0,5896	0,82
GP25	-0,003 (-0,055, 0,049)	0,8981	0,984
GP26	-0,031 (-0,088, 0,026)	0,2863	0,583
GP27	-0,102 (-0,209, 0,005)	0,0616	0,322
GP28	0,039 (-0,047, 0,125)	0,3712	0,674
GP29	0,077 (-0,002, 0,155)	0,0567	0,322
GP30	0,021 (-0,054, 0,096)	0,5731	0,82
GP31	0,001 (-0,087, 0,089)	0,9816	0,993
GP32	-0,067 (-0,141, 0,006)	0,0734	0,322
GP33	-0,08 (-0,185, 0,026)	0,1391	0,379
GP34	-0,041 (-0,104, 0,021)	0,1937	0,46
GP35	-0,092 (-0,193, 0,008)	0,072	0,322
GP36	-0,044 (-0,1, 0,011)	0,1192	0,379
GP37	0,013 (-0,075, 0,1)	0,7727	0,937
GP38	-0,021 (-0,081, 0,039)	0,4911	0,8
GP39	-0,103 (-0,201, -0,004)	0,0413	0,322
LB	0,006 (-0,004, 0,016)	0,2152	0,486
HB	-0,03 (-0,074, 0,014)	0,1766	0,438

G0	-0,099 (-0,223, 0,024)	0,113	0,379
G1	-0,042 (-0,152, 0,068)	0,4551	0,763
G2	0,016 (-0,001, 0,033)	0,0723	0,322
G3	-0,028 (-0,074, 0,017)	0,2215	0,486
G4	-0,047 (-0,106, 0,012)	0,1182	0,379
S0	-0,046 (-0,139, 0,046)	0,3261	0,641
S1	0,021 (0, 0,042)	0,0482	0,322
S2	0,005 (-0,027, 0,036)	0,7711	0,937
S3	-0,028 (-0,074, 0,018)	0,2337	0,493
S4	-0,047 (-0,11, 0,015)	0,1376	0,379
B	-0,018 (-0,079, 0,043)	0,5622	0,82
M	-0,008 (-0,042, 0,025)	0,6344	0,841
CF	-0,002 (-0,061, 0,058)	0,9515	0,993
AF	-0,088 (-0,189, 0,013)	0,0881	0,359

\*  $\beta$ -koeficijent predstavlja prirodni logaritam relativne promjene u vrijednosti *N*-glikana između dvije skupine korigiran na dob i spol.

# P-vrijednost je prilagođena koristeći Li-Ji metodu korekcije

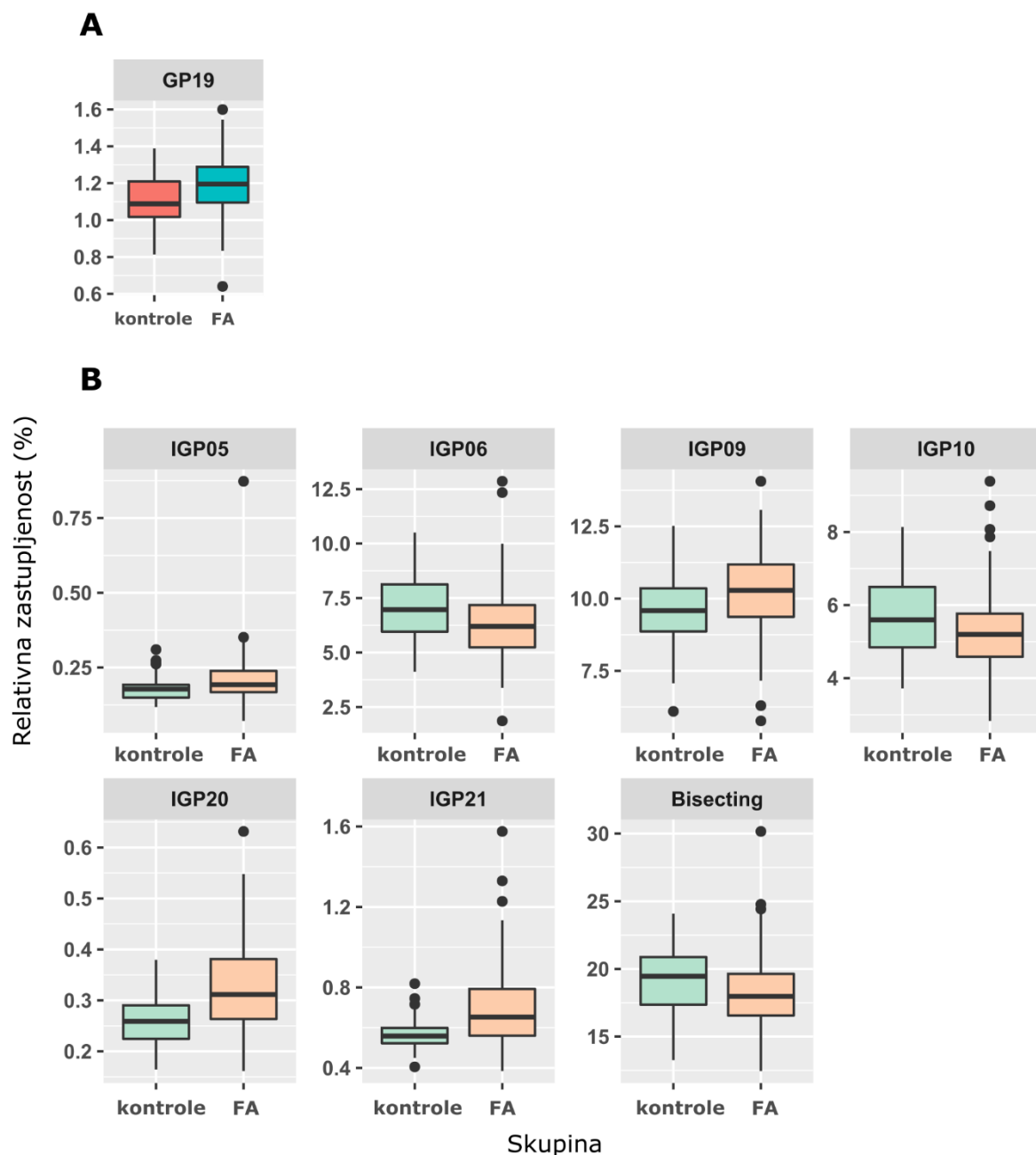


**Tablica 10.** Povezanost izravno mjenjenih i deriviranih glikanskih svojstava IgG s fibrilacijom atrijske fibrilacije. Statistički značajne promjene su podebljane.

Glikan	$\beta$ -koeficijent (95% CI)*	P-vrijednost	Prilagođena P-vrijednost#
IGP01	-0,007 (-0,108, 0,094)	0,8877	0,917
IGP02	-0,132 (-0,303, 0,039)	0,1294	0,313
IGP03	0,01 (-0,056, 0,076)	0,7689	0,824
IGP04	-0,039 (-0,105, 0,027)	0,2445	0,426
<b>IGP05</b>	<b>0,123 (0,042, 0,204)</b>	<b>0,003</b>	<b>0,021</b>
<b>IGP06</b>	<b>-0,093 (-0,167, -0,019)</b>	<b>0,0134</b>	<b>0,05</b>
IGP07	-0,094 (-0,233, 0,045)	0,1833	0,351
IGP08	0,009 (-0,017, 0,034)	0,4948	0,66
<b>IGP09</b>	<b>0,065 (0,02, 0,109)</b>	<b>0,0048</b>	<b>0,028</b>
<b>IGP10</b>	<b>-0,083 (-0,143, -0,024)</b>	<b>0,0062</b>	<b>0,029</b>
IGP11	-0,029 (-0,087, 0,029)	0,322	0,495
IGP12	-0,1 (-0,245, 0,046)	0,1774	0,351
IGP13	0,009 (-0,054, 0,072)	0,7715	0,824
IGP14	0,051 (-0,018, 0,119)	0,1447	0,315
IGP15	-0,02 (-0,079, 0,04)	0,52	0,66
IGP16	0,029 (-0,021, 0,08)	0,2498	0,426
IGP17	0,049 (-0,015, 0,114)	0,1337	0,313
IGP18	0,021 (-0,046, 0,089)	0,5338	0,66
IGP19	0,001 (-0,072, 0,074)	0,976	0,976
<b>IGP20</b>	<b>0,221 (0,149, 0,294)</b>	<b><math>8 \times 10^{-9}</math></b>	<b><math>1 \times 10^{-7}</math></b>
<b>IGP21</b>	<b>0,166 (0,095, 0,237)</b>	<b><math>6 \times 10^{-6}</math></b>	<b><math>6 \times 10^{-5}</math></b>
IGP22	-0,031 (-0,129, 0,066)	0,5289	0,66
IGP23	0,098 (0,004, 0,192)	0,0418	0,14
IGP24	0,014 (-0,061, 0,088)	0,7174	0,822
G0	-0,05 (-0,111, 0,01)	0,1003	0,303
G1	0,009 (-0,01, 0,027)	0,3543	0,52
G2	0,035 (-0,029, 0,098)	0,2854	0,462
S	0,036 (-0,011, 0,083)	0,1275	0,313
<b>B</b>	<b>-0,055 (-0,096, -0,014)</b>	<b>0,0083</b>	<b>0,035</b>
CF	-0,001 (-0,006, 0,003)	0,5689	0,677

\*  $\beta$ -koeficijent predstavlja prirodni logaritam relativne promjene u vrijednosti N-glikana između dvije skupine korigiran na dob i spol.

# P-vrijednost je prilagođena koristeći Li-Ji metodu korekcije



**Slika 8.** Kutijasti dijagrami (engl. *box plot*) koji prikazuju značajne razlike u *N*-glikomu ukupnih plazmatskih proteina (A) odnosno IgG-a (B) između osoba oboljelih od fibrilacije atrijske i zdravih kontrola. Horizontalna linija unutar kutija predstavlja medijan, gornji i donji rub kutije omeđuju interkvartilni raspon (IQR). Linije su produžene do medijana najviše do  $1,5 \times \text{IQR}$  dok su točkama predstavljena mjerenja koja od medijana odstupaju za više od  $1,5 \times \text{IQR}$ . Preuzeto i prilagođeno iz (130).

### 3.3. Povezanost *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a s recidivom fibrilacije atrijske nakon kateterske ablacije

Ispitane su razlike u *N*-glikozilaciji ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a između pacijenata koji su doživjeli recidiv fibrilacije atrijske unutar 6 mjeseci od zahvata i onih koji nisu. Budući da smo htjeli ispitati prediktivnu moć glikana uspoređivali smo *N*-glikome pacijenata iz vremenske točke neposredno prije zahvata. Uz model korigiran na dob i spol, također smo konstruirali i model koji je uključio i prisutnost dijabetesa i hipertenzije kao kovarijate zbog poznatog utjecaja navedenih stanja na *N*-glikom ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a. Dodatak navedenih kovarijata imao je minimalan utjecaj na rezultate primijećene u prvom modelu. Rezultati regresije za oba modela dani su u Tablici 11. *N*-glikom ukupnih plazmatskih proteina pokazao je četiri direktno mjenjenih *N*-glikana i jedno derivirano svojstvo koji su značajno povećani kod pacijenata koji su doživjeli recidiv fibrilacije atrijske u odnosu na one koji nisu. Sljedeće glikanske strukture su bile značajno povećane kod osoba koje su doživjele recidiv fibrilacije atrijske unutar šest mjeseci: GP2 (Man5, FA2B) ( $\beta$ -koeficijent 0,117, *p*-vrijednost 0,034), GP7 (Man6) ( $\beta$ -koeficijent 0,094, *p*-vrijednost 0,037), GP9 (A2BG2) ( $\beta$ -koeficijent 0,123, *p*-vrijednost 0,034), GP15 (A2BG2S1) ( $\beta$ -koeficijent 0,12, *p*-vrijednost 0,024) i ukupne oligomanozne strukture ( $\beta$ -koeficijent 0,069, *p*-vrijednost 0,012. Nominalno značajan porast pokazali su GP6 (FA2[6]BG1) i ukupne strukture s računajućim GlcNAc-om, ali je asocijacija bila ispod praga značajnosti nakon korekcije za višestruka mjerenja s korigiranim *p*-vrijednostima od 0,06 i 0,07. Nismo pronašli značajne asocijacije s IgG *N*-glikanima i recidivom fibrilacije atrijske nakon 6 mjeseci. Statistički značajne promjene prikazane su na Slici 9 dok su rezultati regresije za sve glikane i oba modela prikazani u Tablici 11.

**Tablica 11.** Razlike u *N*-glikozilaciji ukupnih plazmatskih proteina između pacijenata koji su doživjeli recidiv fibrilacije atrijske unutar 6 mjeseci nakon zahvata kateterske ablacije. Statistički značajne razlike su podebljane. Model 1 sadržavao je dob i spol kao kovarijate, dok je model 2 sadržavao dob, spol, prisutnost dijabetesa i prisutnost hipertenzije kao kovarijate. P1 predstavlja nekorigiranu p-vrijednost dok P2 predstavlja korigiranu p-vrijednost

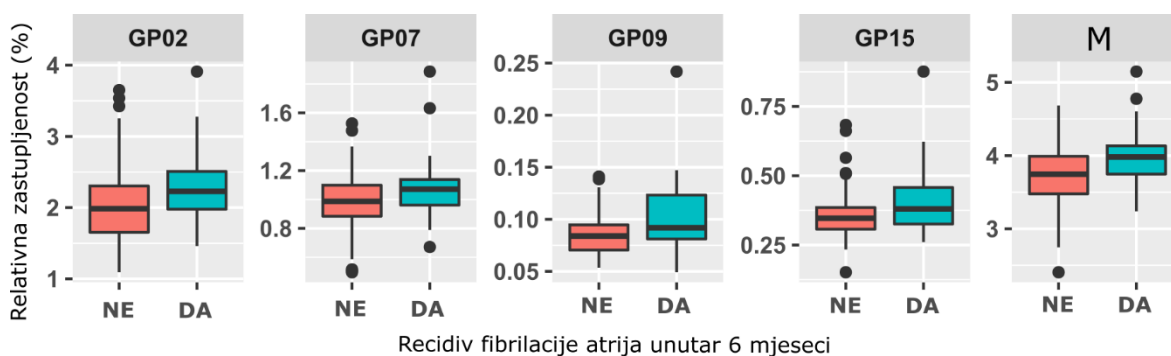
Glikan	$\beta$ -koeficijent (95% CI)* -			$\beta$ -koeficijent (95% CI)* -		
	Model 1	P1	P2#	Model 2	P1	P2#
GP01	0,117 (-0,049, 0,284)	0,165	0,495	0,117 (-0,049, 0,282)	0,1661	0,39
<b>GP02</b>	<b>0,117 (0,038, 0,196)</b>	<b>0,0041</b>	<b>0,041</b>	<b>0,115 (0,036, 0,194)</b>	<b>0,0047</b>	<b>0,039</b>
GP03	0,174 (0,028, 0,32)	0,0198	0,113	0,174 (0,03, 0,318)	0,018	0,093
GP04	0,086 (-0,06, 0,232)	0,2465	0,509	0,096 (-0,047, 0,239)	0,1872	0,39
GP05	0,094 (-0,079, 0,266)	0,2862	0,51	0,104 (-0,066, 0,273)	0,2282	0,438
GP06 <sup>†</sup>	0,131 (0,033, 0,228)	0,0091	0,065	0,135 (0,039, 0,232)	0,0065	0,046
<b>GP07</b>	<b>0,094 (0,028, 0,159)</b>	<b>0,0053</b>	<b>0,043</b>	<b>0,096 (0,031, 0,162)</b>	<b>0,0039</b>	<b>0,037</b>
GP08	0,054 (0,005, 0,104)	0,0328	0,156	0,056 (0,005, 0,106)	0,03	0,142
<b>GP09</b>	<b>0,123 (0,039, 0,207)</b>	<b>0,0043</b>	<b>0,041</b>	<b>0,127 (0,044, 0,21)</b>	<b>0,003</b>	<b>0,035</b>
GP10	0,045 (-0,064, 0,154)	0,421	0,614	0,057 (-0,048, 0,161)	0,2882	0,456
GP11	0,098 (-0,004, 0,201)	0,0602	0,264	0,106 (0,005, 0,207)	0,0403	0,177
GP12	0,042 (-0,007, 0,091)	0,0915	0,373	0,041 (-0,008, 0,09)	0,0996	0,379
GP13	0,073 (-0,046, 0,191)	0,2272	0,509	0,079 (-0,039, 0,197)	0,1855	0,39
GP14	0,017 (-0,026, 0,06)	0,4306	0,614	0,017 (-0,026, 0,06)	0,4357	0,608
<b>GP15</b>	<b>0,12 (0,046, 0,195)</b>	<b>0,0017</b>	<b>0,025</b>	<b>0,121 (0,047, 0,196)</b>	<b>0,0016</b>	<b>0,023</b>
GP16	0,024 (-0,036, 0,085)	0,4263	0,614	0,03 (-0,03, 0,09)	0,3298	0,495
GP17	0,088 (-0,019, 0,195)	0,1077	0,403	0,094 (-0,014, 0,201)	0,0866	0,353
GP18	-0,029 (-0,096, 0,038)	0,393	0,614	-0,026 (-0,093, 0,041)	0,4465	0,608
GP19	0,024 (-0,02, 0,068)	0,2774	0,51	0,025 (-0,019, 0,069)	0,2682	0,456
GP20	-0,032 (-0,08, 0,016)	0,1894	0,501	-0,035 (-0,082, 0,012)	0,1453	0,39
GP21	-0,013 (-0,063, 0,037)	0,6181	0,705	-0,014 (-0,064, 0,036)	0,5854	0,668
GP22	-0,041 (-0,113, 0,03)	0,2548	0,509	-0,043 (-0,114, 0,029)	0,2384	0,438
GP23	0,061 (-0,044, 0,166)	0,2536	0,509	0,061 (-0,045, 0,167)	0,2574	0,456
GP24	0,025 (-0,058, 0,108)	0,5463	0,677	0,023 (-0,06, 0,107)	0,5821	0,668
GP25	-0,017 (-0,076, 0,043)	0,5755	0,677	-0,021 (-0,08, 0,038)	0,4858	0,629
GP26	0,002 (-0,062, 0,065)	0,9579	0,958	-0,006 (-0,068, 0,055)	0,8397	0,855
GP27	-0,04 (-0,16, 0,08)	0,5105	0,677	-0,04 (-0,161, 0,081)	0,5144	0,645
GP28	-0,003 (-0,096, 0,089)	0,941	0,958	-0,007 (-0,1, 0,086)	0,8843	0,884
GP29	-0,068 (-0,153, 0,016)	0,113	0,403	-0,068 (-0,153, 0,018)	0,1185	0,389
GP30	-0,013 (-0,094, 0,069)	0,7579	0,785	-0,017 (-0,099, 0,064)	0,6753	0,7
GP31	-0,04 (-0,135, 0,055)	0,405	0,614	-0,049 (-0,142, 0,045)	0,3041	0,469
GP32	-0,019 (-0,101, 0,063)	0,6464	0,722	-0,032 (-0,109, 0,046)	0,422	0,608
GP33	-0,043 (-0,161, 0,074)	0,4676	0,635	-0,045 (-0,163, 0,074)	0,4586	0,608
GP34	-0,036 (-0,104, 0,032)	0,2963	0,512	-0,045 (-0,11, 0,02)	0,1726	0,39
GP35	-0,063 (-0,174, 0,048)	0,2653	0,509	-0,067 (-0,179, 0,044)	0,2325	0,438
GP36	0,017 (-0,044, 0,079)	0,5796	0,677	0,014 (-0,048, 0,075)	0,6665	0,7
GP37	-0,027 (-0,118, 0,065)	0,568	0,677	-0,025 (-0,116, 0,066)	0,5861	0,668

GP38	-0,013 (-0,078, 0,052)	0,6957	0,734	-0,014 (-0,079, 0,05)	0,6623	0,7
GP39	-0,022 (-0,131, 0,087)	0,6923	0,734	-0,023 (-0,133, 0,086)	0,6743	0,7
LB	0,006 (-0,004, 0,017)	0,2103	0,509	0,007 (-0,003, 0,017)	0,1559	0,39
HB	-0,023 (-0,072, 0,026)	0,3627	0,608	-0,027 (-0,076, 0,022)	0,276	0,456
G0	0,113 (-0,031, 0,256)	0,1224	0,41	0,112 (-0,031, 0,254)	0,1241	0,389
G1	0,091 (-0,041, 0,222)	0,1744	0,497	0,099 (-0,029, 0,228)	0,1297	0,389
G2	-0,006 (-0,025, 0,014)	0,5816	0,677	-0,006 (-0,025, 0,014)	0,5732	0,668
G3	-0,023 (-0,074, 0,029)	0,3833	0,614	-0,027 (-0,078, 0,023)	0,2882	0,456
G4	-0,014 (-0,078, 0,051)	0,6811	0,734	-0,015 (-0,08, 0,05)	0,6512	0,7
S0	0,079 (-0,031, 0,189)	0,1566	0,495	0,085 (-0,023, 0,193)	0,1227	0,389
S1	0,027 (0,004, 0,051)	0,023	0,119	0,029 (0,006, 0,053)	0,0149	0,085
S2	-0,025 (-0,062, 0,013)	0,1932	0,501	-0,027 (-0,064, 0,01)	0,1475	0,39
S3	-0,029 (-0,081, 0,023)	0,2681	0,509	-0,034 (-0,085, 0,017)	0,191	0,39
S4	-0,022 (-0,091, 0,047)	0,5345	0,677	-0,022 (-0,091, 0,046)	0,5204	0,645
B <sup>†</sup>	0,09 (0,02, 0,159)	0,0114	0,073	0,092 (0,023, 0,162)	0,0096	0,061
<b>M</b>	<b>0,069 (0,03, 0,107)</b>	<b>0,0006</b>	<b>0,012</b>	<b>0,069 (0,03, 0,108)</b>	<b>0,0006</b>	<b>0,011</b>
CF	0,042 (-0,028, 0,112)	0,235	0,509	0,046 (-0,023, 0,116)	0,1918	0,39
AF	-0,042 (-0,154, 0,07)	0,46	0,635	-0,043 (-0,156, 0,07)	0,4494	0,608

\*  $\beta$ -koeficijent predstavlja prirodni logaritam relativne promjene u vrijednosti *N*-glikana između dvije skupine korigiran na dob i spol.

# P-vrijednost je prilagođena koristeći Li-Ji metodu korekcije

† Nominalno značajni



**Slika 9.** Kutijasti dijagrami (engl. *box plot*) koji prikazuju značajne razlike u *N*-glikomu ukupnih plazmatskih proteina između osoba koje su doživjele recidiv fibrilacije atrijske unutar šest mjeseci od zahvata. Horizontalna linija unutar kutija predstavlja medijan, gornji i donji rub kutije omeđuju interkvartilni raspon (IQR). Linije su produžene do medijana najviše do 1,5xIQR dok su točkama predstavljena mjerenja koja od medijana odstupaju za više od 1,5xIQR. Preuzeto i prilagođeno iz (130).

### 3.4. Promjene u *N*-glikozilaciji ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a nakon zahvata kateterske ablacije

Promjene u *N*-glikomima pacijenata uslijed zahvata kateterske ablacije ispitane su uspoređujući glikome 106 pacijenata za koje su prikupljeni uzorci plazme prije zahvata i šest mjeseci nakon zahvata. Nisu primijećene statistički značajne promjene u *N*-glikomu plazme dok su u *N*-glikomu IgG-a pronađene statistički značajne asocijacije za četiri izravno mjerena *N*-glikana. IGP5 ( $\beta$ -koeficijent -0,108, p-vrijednost 0,002), IGP17 (A2G2S1) ( $\beta$ -koeficijent -0,086, p-vrijednost 0,018), IGP20 ( $\beta$ -koeficijent -0,19, p-vrijednost  $2 \times 10^{-8}$ ) i IGP21 ( $\beta$ -koeficijent -0,172, p-vrijednost  $2 \times 10^{-8}$ ) su pokazali niže vrijednosti nakon zahvata kateterske ablacije. Statistički parametri regresije za IgG *N*-glikane prikazani su u Tablici 12, dok su statistički značajne razlike prikazane na Slici 10.

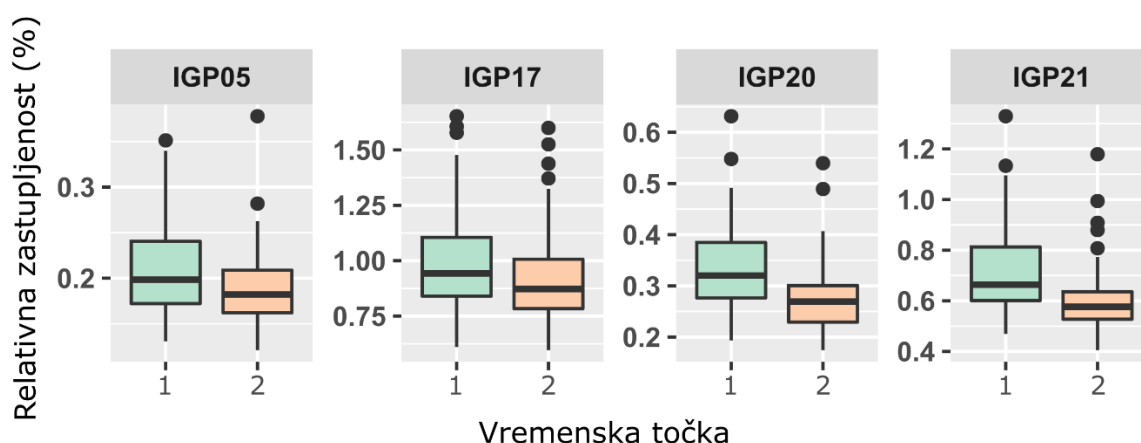
**Tablica 12.** Promjene IgG *N*-glikana šest mjeseci nakon zahvata kateterske ablacije. Statistički značajne asocijacije su podebljane.

Glikan	$\beta$ -koeficijent (95% CI)*	P-vrijednost	Prilagođena P-vrijednost#
IGP01	-0,017 (-0,101, 0,067)	0,6881	0,979
IGP02	-0,008 (-0,172, 0,156)	0,9237	0,979
IGP03	-0,036 (-0,093, 0,021)	0,213	0,717
IGP04	0,004 (-0,05, 0,058)	0,8751	0,979
<b>IGP05</b>	<b>-0,108 (-0,166, -0,05)</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,002</b>
IGP06	0,01 (-0,056, 0,075)	0,7726	0,979
IGP07	-0,013 (-0,15, 0,124)	0,8557	0,979
IGP08	0,006 (-0,016, 0,028)	0,5796	0,979
IGP09	-0,005 (-0,043, 0,033)	0,7949	0,979
IGP10	0,013 (-0,041, 0,067)	0,6262	0,979
IGP11	-0,016 (-0,068, 0,036)	0,5358	0,979
IGP12	-0,014 (-0,153, 0,124)	0,8362	0,979
IGP13	-0,006 (-0,06, 0,048)	0,8324	0,979
IGP14	0,001 (-0,058, 0,06)	0,9681	0,979
IGP15	-0,01 (-0,061, 0,04)	0,6823	0,979
IGP16	-0,003 (-0,045, 0,038)	0,8693	0,979
<b>IGP17</b>	<b>-0,086 (-0,143, -0,029)</b>	<b>0,0031</b>	<b>0,018</b>
IGP18	-0,001 (-0,062, 0,059)	0,9642	0,979
IGP19	-0,029 (-0,088, 0,03)	0,3319	0,913
<b>IGP20</b>	<b>-0,19 (-0,249, -0,13)</b>	<b><math>2 \times 10^{-9}</math></b>	<b><math>2 \times 10^{-8}</math></b>
<b>IGP21</b>	<b>-0,172 (-0,227, -0,118)</b>	<b><math>2 \times 10^{-9}</math></b>	<b><math>2 \times 10^{-8}</math></b>
IGP22	-0,075 (-0,165, 0,015)	0,1024	0,501
IGP23	-0,025 (-0,11, 0,06)	0,5657	0,979
IGP24	-0,037 (-0,096, 0,023)	0,2235	0,717
G0	0,005 (-0,044, 0,053)	0,851	0,979

G1	0,004 (-0,011, 0,018)	0,632	0,979
G2	-0,001 (-0,056, 0,055)	0,9795	0,979
S	-0,024 (-0,064, 0,016)	0,2378	0,717
B	-0,001 (-0,039, 0,037)	0,9694	0,979
CF	0,003 (-0,002, 0,008)	0,1893	0,717

\*  $\beta$ -koeficijent predstavlja prirodni logaritam relativne promjene u vrijednosti *N*-glikana između dvije skupine korigiran na dob i spol.

# P-vrijednost je prilagođena koristeći Li-Ji metodu korekcije



**Slika 10.** Kutijasti dijagrami (engl. *box plot*) koji prikazuju značajne razlike u *N*-glikomu IgG-a između prvog mjerenja *N*-glikoma neposredno prije zahvata i drugog mjerenja, 6 mjeseci nakon zahvata. Horizontalna linija unutar kutija predstavlja medijan, gornji i donji rub kutije omeđuju interkvartilni raspon (IQR). Linije su produžene do medijana najviše do 1,5xIQR dok su točkama predstavljena mjerenja koja od medijana odstupaju za više od 1,5xIQR. Preuzeto i prilagođeno iz (130).

### 3.5. Povezanost *N*-glikozilacije ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a s $\text{CHA}_2\text{DS}_2\text{-VASc}$ procjenom rizika

Za sve pacijente s fibrilacijom atriya izračunata je vrijednost  $\text{CHA}_2\text{DS}_2\text{-VASc}$  procjene rizika od moždanog udara. Nisu pronađene značajne asocijacije s *N*-glikomom ukupnih plazmatskih proteina. IgG *N*-glikom pokazao je značajnu povezanost s  $\text{CHA}_2\text{DS}_2\text{-VASc}$  procjenom rizika na šest izravno mjerenih glikanskih svojstava te četiri derivirana svojstva. Od izravno mjerenih IgG *N*-glikana, IGP4 (FA2) i IGP6 (FA2B) pokazali su rastući linearni trend, dok su IGP8 (FA2[6]G1), IGP14 (FA2G2), IGP18 (FA2G2S1) i IGP23 (FA2G2S2) pokazali suprotan trend. Kod deriviranih svojstava računajući GlcNAc i agalagtozilacija su pokazale rastući linearni

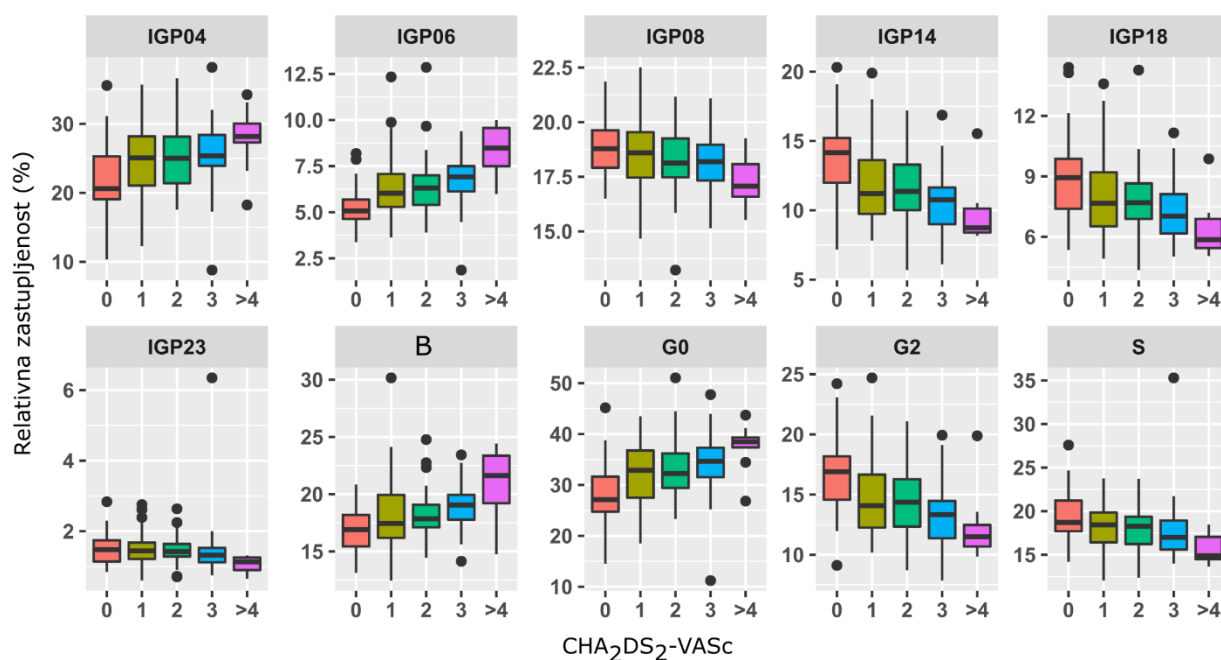
trend, dok su digalaktolizacija i sijalinizacija pokazale suprotan trend. Rezultati linearne regresije prikazani su u Tablici 13. dok su značajne asocijacije prikazane grafički na Slici 11.

**Tablica 13.** Povezanost IgG N-glikana s CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc procjenom rizika korigirana na dob i spol. Statistički značajne asocijacije su podebljane.

Glikan	Linearni $\beta$ -koeficijent (95% CI)	P-vrijednost	Prilagođena P-vrijednost <sup>#</sup>
IGP01	-0,022 (-0,235, 0,191)	0,8382	0,696
IGP02	0,254 (-0,101, 0,61)	0,1597	0,17
IGP03	0,036 (-0,098, 0,17)	0,5959	0,696
<b>IGP04</b>	<b>0,179 (0,04, 0,319)</b>	<b>0,0118</b>	<b>0,044</b>
IGP05	-0,095 (-0,263, 0,074)	0,2678	0,243
<b>IGP06</b>	<b>0,355 (0,201, 0,508)</b>	<b>1x10<sup>-5</sup></b>	<b>1x10<sup>-4</sup></b>
IGP07	0,044 (-0,254, 0,342)	0,7715	0,797
<b>IGP08</b>	<b>-0,067 (-0,119, -0,015)</b>	<b>0,0123</b>	<b>0,034</b>
IGP09	-0,079 (-0,17, 0,012)	0,0873	0,168
IGP10	0,141 (0,019, 0,263)	0,0242	0,062
IGP11	0,102 (-0,019, 0,222)	0,0976	0,174
IGP12	-0,055 (-0,369, 0,26)	0,7325	0,783
IGP13	-0,041 (-0,174, 0,091)	0,5377	0,617
<b>IGP14</b>	<b>-0,213 (-0,352, -0,074)</b>	<b>0,0028</b>	<b>0,014</b>
IGP15	-0,052 (-0,177, 0,072)	0,4073	0,504
IGP16	-0,047 (-0,155, 0,062)	0,396	0,504
IGP17	-0,076 (-0,216, 0,065)	0,2879	0,387
<b>IGP18</b>	<b>-0,186 (-0,323, -0,048)</b>	<b>0,0086</b>	<b>0,029</b>
IGP19	-0,136 (-0,286, 0,013)	0,0735	0,161
IGP20	-0,171 (-0,326, -0,017)	0,0302	0,071
IGP21	-0,121 (-0,277, 0,035)	0,1262	0,205
IGP22	-0,126 (-0,327, 0,076)	0,2195	0,323
<b>IGP23</b>	<b>-0,275 (-0,475, -0,076)</b>	<b>0,007</b>	<b>0,027</b>
IGP24	-0,129 (-0,275, 0,018)	0,0852	0,168
<b>G0</b>	<b>0,214 (0,087, 0,341)</b>	<b>0,0011</b>	<b>0,011</b>
G1	-0,031 (-0,069, 0,006)	0,1016	0,174
<b>G2</b>	<b>-0,184 (-0,315, -0,053)</b>	<b>0,006</b>	<b>0,026</b>
<b>S</b>	<b>-0,152 (-0,248, -0,055)</b>	<b>0,0023</b>	<b>0,013</b>
<b>B</b>	<b>0,132 (0,049, 0,215)</b>	<b>0,0019</b>	<b>0,013</b>
CF	0,004 (-0,006, 0,014)	0,4579	0,545

<sup>#</sup> P-vrijednost je prilagođena koristeći Li-Ji metodu korekcije





**Slika 11.** Kutijasti dijagrami (engl. *box plot*) koji prikazuju značajne linearne asocijacije *N*-glikoma IgG-a i vrijednosti CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc procjene rizika. Horizontalna linija unutar kutija predstavlja medijan, gornji i donji rub kutije omeđuju interkvartilni raspon (IQR). Linije su produžene do medijana najviše do 1,5xIQR dok su točkama predstavljena mjerenja koja od medijana odstupaju za više od 1,5xIQR. Preuzeto i prilagođeno iz (130).

## 4. RASPRAVA

#### 4.1. N-glikozilacija ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a pacijenata s fibrilacijom atrijske u odnosu na zdrave kontrole

*N*-glikom ukupnih plazmatskih proteina, kao i *N*-glikom IgG-a pokazao je statistički značajne razlike kod pacijenata s fibrilacijom atrijske u usporedbi s zdravim kontrolama. Dok su promjene u *N*-glikozilaciji plazmatskih proteina bile suptilnije, kod IgG-a primijećene su opsežnije promjene što ukazuje na to da IgG nosi veću količinu informacija za razlikovanje zdravih osoba od osoba koje boluju od fibrilacije atrijske.

U *N*-glikomu ukupnih plazmatskih proteina promjene su bile ograničene na jednu oligomanoznu glikansku strukturu, Man9, koja je bila zastupljenija u ukupnom glikomu pacijenata s fibrilacijom atrijske nego u zdravim kontrolama. Istraživanje koje su proveli Cvetko i sur. pronašlo je da je Man9 povećan kod inzulinske rezistencije i šećerne bolesti tipa 2 u odnosu na zdravu populaciju (34). To može biti zbog zajedničkih patofizioloških mehanizama fibrilacije atrijske i dijabetesa budući da je dijabetes poznati faktor rizika za razvoj fibrilacije atrijske (131). Man9 je oligomanozni glikan i smatra se da se u plazmi nalazi dominantno na apolipoproteinu B-100 (ApoB-100) (24). Oligomanozne strukture, uključujući Man9, su također pronađene na *N*-glikanima Fab regije IgG-a te na C3 komponenti komplementa, koja sadrži isključivo oligomanozne glikane (47). Prisutnost povećanih razina oligomanoznih glikana na vaskularnom endotelu je također povezano s upalnim odgovorom i smatra se da je uključeno u usmjeravanje leukocita na mjesto upale (132). Zbog relativne kvantifikacije *N*-glikana ukupnih plazmatskih proteina, nije moguće razlikovati dolazi li do promjene u zastupljenosti pojedinog glikana zbog promjena u sveukupnom procesu *N*-glikozilacije ili zbog promjene u zastupljenosti pojedinog proteina u plazmi koji nosi glikan od interesa. Istraživanje o promjeni koncentracije ApoB u fibrilaciji atrijske pronašlo je da su pacijenti s fibrilacijom atrijske imali ukupno niže vrijednosti ApoB u odnosu na kontrole što bi upućivalo na promjene *N*-glikozilacije, a ne na promjene razine proteina u plazmi (133). Primijećena razlika u zastupljenosti Man9 također može potjecati i s C3 komponente komplementa zbog upalnih promjena koje mogu karakterizirati fibrilaciju atrijske. Daljnja istraživanja, orijentirana na specifične spomenute proteine, potrebna su kako bi se razjasnilo podrijetlo promjene opisane u ovom istraživanju.

Opsežnije promjene primijećene su u *N*-glikomu IgG-a. Pronađena je povećana zastupljenost Man5, FA2[3]G1 i A2G2S2 glikanskih struktura te smanjena zastupljenost FA2B, FA2[6]BG1 glikanskih struktura te deriviranog svojstva računajućeg GlcNAc-a kod pacijenata s fibrilacijom atrijske u odnosu na zdrave kontrole. Promjene u navedenim strukturama su prethodno pronađene

u studijama glikozilacije IgG-a u različitim patofiziološkim stanjima poput dijabetesa i hipertenzije, za koje je poznato da doprinose patologiji fibrilacije atriya premda se neke od asocijacija razlikuju od promjena koje su prethodno opisane. U navedenim stanjima opisan je porast Man5 i A2G2S2 kao što je pronađeno i u ovom istraživanju, premda su u navedenim studijama otkrivena povezanost i s drugi glikanima (134,135). Promjena koja je bila jedinstvena za fibrilaciju atriya je smanjenje zastupljenosti struktura s račvajućim GlcNAc-om, koja potječe velikim dijelom od smanjenja zastupljenosti FA2B i FA2[6]BG1. Povećanje zastupljenosti struktura s račvajućim GlcNAc-om je često opisano u istraživanjima koje su promatrala promjene *N*-glikozilacije IgG-a u upali, dijabetesu, kardiovaskularnoj bolesti i hipertenziji, što su sve stanja povezana s fibrilacijom atriya (68,134,135). Nadalje, povišene razine račvajućeg GlcNAc-a su povezane proupalnim promjenama IgG-a zbog pojačanog vezanja za FcγRIII receptore i posljedično povećanje u staničnoj citotoksičnosti ovisnoj o protutijelima (engl. antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC) (136). Promjene FA2[3]G1 su također u suprotnom smjeru od onih opisanih u dijabetesu i kardiovaskularnoj bolesti (68,69,135). Gledajući *N*-glikom IgG-a ukupno, proupalni IgG profil kojeg karakteriziraju smanjenje galaktozilacije i sijalilnizacije nije opažen u fibrilaciji atriya. Primijećene promjene su najbližnje promjenama u šećernoj bolesti tipa 1 (ŠBT1) koje su opisane u istraživanju koje su proveli Rudman i sur. gdje je također pronađena povećana zastupljenost Man5, IGP20 i A2G2S2 uz već spomenutu razliku u promjeni zastupljenosti glikana s račvajućim GlcNAc-om (135). Smatramo da se ove sličnosti s dijabetesom, koje su također primijećene i u plazmi, ne mogu pripisati samo većoj prevalenciji dijabetesa u grupi s fibrilacijom atriya u odnosu na kontrolnu skupinu. Sama stopa dijabetesa u skupini s fibrilacijom atriya bila je 8% i usporediva je s prevalencijom dijabetesa u općoj hrvatskoj populaciji te je stoga za očekivati i usporediva sa stopom u kontrolnoj skupini (137).

#### 4.2. *N*-glikozilacija ukupnih plazmatskih proteina kao prediktor recidiva fibrilacije atriya nakon kateterske ablacije

Nekoliko *N*-glikanskih struktura ukupnih plazmatskih proteina su bile zastupljenije kod pacijenata koji su doživjele recidiv fibrilacije atriya unutar šest mjeseci od zahvata kateterske ablacije. Značajno različite *N*-glikanske strukture uključuju FA2B, Man5, Man6, A2BG2, A2BG2S1 te ukupne oligomanozne strukture. Uz navedene statistički značajne strukture, ukupne strukture s račvajućim GlcNAc-om te FA2[6]BG1 su također bile povišene te su bile nominalno statistički značajne, no asocijacija je bila iznad praga značajnosti nakon korekcije za višestruka mjerenja što može biti zbog nedovoljne statističke snage studije. Povećanje u

plazmatskim strukturama s račvujućim GlcNAc-om i oligomanoznim strukturama primijećeno je u prethodno spomenutoj studiji koja je uspoređivala *N*-glikom plazme kod djece s ŠBT1 u odnosu na zdravu braću i sestre, gdje je pronađen porast istih struktura, FA2B, Man5 i Man6 (135). Kako bi otklonili mogućnost da promjena dolazi zbog povećane zastupljenosti dijabetesa u skupini koja je doživjela recidiv fibrilacije atrijske, konstruirali smo novi model, koji je dodatno korigiran na prisutnost dijabetesa i hipertenzije. Hipertenzija je uključena, budući da je također poznato da promjene u *N*-glikozilacij imaju asocijaciju s hipertenzijom. Asocijacije su ostale značajne čak i nakon korekcije na prisutnost navedenih stanja kao što se može vidjeti iz tablice 11. Povećanje zastupljenosti struktura s račvujućim GlcNAc-om u *N*-glikomu plazme povezano je s pro-upalnim glikanskim profilom. Također, kako je prethodno navedeno, oligomanozni glikani su implicirani kod dijabetesa te osim toga i prisutni na C3 komponenti komplementa te porast navedenih glikana može biti i zbog porasta razine ovog proteina, što može sugerirati pro-upalno stanje koje predodređuje pacijente za lošije kliničke ishode. Osim C3 komponente komplementa Man5 i Man6 u *N*-glikomu ukupnih plazmatskih proteina najčešće potječu s imunoglobulina M (IgM), a Man5 manjim dijelom s IgG-a dok FA2B u dolazi gotovo isključivo s IgG-a (24). Budući da analizom IgG *N*-glikoma nisu utvrđene promjene u glikozilaciji IgG-a porast navedenih struktura (Man5, FA2B) u *N*-glikomu plazme može biti usljed porasta koncentracije samog IgG-a u plazmi. Spomenuti proteini su važan dio imunskog sustava te promjene u navedenim *N*-glikanima plazme mogu upućivati ili na promjenu razine navedenih proteina ili na promjenu same glikozilacije. To je u skladu s prethodnim literaturnim saznanjima koja su istraživala CRP i ostale upalne biljege kao prediktore recidiva fibrilacije atrijske nakon kateterske ablacije i pronašle pozitivne asocijacije (138). Važno je za primijetiti kako smo isključili pacijente s akutnom upalom ili povišenim hsCRP-om, a ipak primijetili promjene koje su konzistentne s upalnim stanjem, točnije povećanje glikana s račvujućim GlcNAc-om. Ovo može upućivati na to da su *N*-glikani ukupnih plazmatskih proteina relativno osjetljivi biljezi upale i rekurencije fibrilacije atrijske.

#### 4.3. Promjene *N*-glikoma IgG-a uslijed zahvata kateterske ablacije

Promjene u koje smo primijetili šest mjeseci nakon kateterske ablacije bile su značajne samo u IgG *N*-glikomu. Ove promjene sastojale su se od smanjenja zastupljenosti Man5, A2G2S1, IGP20 i A2G2S2. Zanimljivo je da smo u našem istraživanju primijetili povećanu zastupljenost navedenih glikana u skupini s fibrilacijom atrijske u odnosu na zdrave kontrole. Budući da je riječ o korelacijskoj studiji, nije jasno jesu li ove promjene uzrokovane fibrilacijom atrijske ili prethode razvoju iste no ovo opažanje može indicirati pomak *N*-glikoma prema „zdravom“ profilu što bi

značilo da do tih promjena dolazi uslijed progresije same bolesti. Unatoč tome razina promjene bila je slična kod pacijenata koji su doživjeli recidiv i onih koji nisu, što ne bi očekivali ako je zaista riječ o promjenama uzrokovanim fibrilacijom atrija. To može biti zbog toga što su čak i pacijenti koji su doživjeli recidiv unutar šest mjeseci od zahvata imali određeni period bez prisutnosti bolesti, te smanjenu frekvenciju samih epizoda što se odrazilo u glikomu IgG-a. Kako bi se donio definitivni zaključak, potrebna je replikacija opaženih promjena na većem broju uzoraka.

4.4. Povezanost N-glikoma IgG-a s CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc procjenom rizika od moždanog udara

CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc je procjena rizika koja se izračunava na temelju prisutnosti nekoliko kliničkih faktora rizika za moždani udar koji uključuju kongestivno zatajenje srca, hipertenziju, dob, dijabetes, prethodni moždani udar ili tromboemboliju, vaskularne bolesti poput aortalnog plaka ili infarkta miokarda te ženski spol. Promjene u N-glikozilaciji su opisane u većini ovih stanja te stoga nije iznenađujuće da IgG N-glikozilacija u ovoj studiji pokazuje opsežne asocijacije s CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc procjenom rizika. Naši podaci pokazuju da je prisutan zbrajajući učinak prisutnosti različitog broja faktora rizika na IgG N-glikom. Veću CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc vrijednost zbog prisutnost više faktora rizika prati porast udjela agalaktoziranih i asijaliniziranih glikanskih struktura te struktura s račvajućim GlcNAc-om. FA2 i FA2B pokazuju rastući linearni trend, kakav je opisan primjerice u studiji koja je istraživala povezanost glikozilacije IgG-a s ASCVD procjenom rizika od kardiovaskularnih događaja. Također u istoj studiji pronađena je povezanost navedenih glikana s aterosklerozom (67). Ostale strukture koje su pokazale statistički značajne asocijacije su imale padajući linearni trend i spadaju u skupinu ili sijaliniziranih struktura ili struktura s račvajućim GlcNAcom, a uključuju FA2[6]G1, FA2G2, FA2G2S1 i FA2G2S2. Smatra se da sijalinizacija IgG-a igra ključnu ulogu u promjeni IgG-a iz proupalnog u protuupalni oblik modulacijom vezanja IgG-a za aktivirajuće Fc receptore. Prethodna istraživanja pronašla su da sijalinizirane glikoforme mišjeg IgG-a imaju smanjeni afinitet za aktivirajuće FcγRIII i FcγRIV receptore (59). Budući da je terminalna galaktoza potrebna za adiciju sijalinske kiseline na glikan, smanjena galaktozilacija rezultira i smanjenom sijalinizacijom. Smanjena galaktozilacija sama po sebi je odgovorna za povećano vezanje za lektin koji veže manozu (engl. mannose binding lectin, MBL) zbog veće steričke dostupnosti manoznih jedinica u srži glikanske strukture. MBL je ključni protein u aktivaciji komplementa lektinskim putem. U istraživanjima glikozilacije IgG-a u reumatoidnom artritisu pokazalo se da agalaktozilacija IgG-a dovodi do aktivacije komplementa manoznim putem (139). Povećana

galatkozilacija IgG-a također potiče kooperativno signaliziranje Fc $\gamma$ RIIIb s dektinon-1 te tako suprimira proupalno signaliziranje C5aR i CXCR2 putova (140).

Premda su neke od promjena u *N*-glikozilacijskim uzorcima fibrilacije atrijske zajedničke s drugim bolestima povezanim s fibrilacijom atrijske, primjerice dijabetesom, fibrilacija atrijske u globalu pokazuje jedinstveni *N*-glikanski potpis u kojem smanjenje zastupljenosti struktura s račvajućim GlcNAc-om i porast FA2[3]G1 pokazuju odmak od promjena primijećenih u aterosklerotskim kardiovaskularnim bolestima ili dijabetesu. To otvara prostor za potencijalno korištenje IgG *N*-glikana kao alata za rano otkrivanje fibrilacije atrijske, temeljeno na *N*-glikanskim biljezima, no studije na većim populacijama su potrebne kako bi se taj potencijal dodatno ispitaio. Razlike u *N*-glikomu ukupnih plazmatskih proteina povezane s recidivom fibrilacije atrijske nakon zahvata kateterske ablacije su primijećene i mogu predstavljati povećanje u određenim upalnim proteinima poput C3 komplemente komplementa ili prisutnost upalnog odgovora općenito. Smatramo da je ovo prvi korak u istraživanju potencijala glikana, možda u kombinaciji s drugim biljezima, kao prediktora recidiva fibrilacije atrijske nakon kateterske ablacije. Budući da je ovo relativno mala studija, saznanja iz ove studije trebaju biti replicirana u većim kohortnim istraživanjima kako bi se mogao sagraditi prediktivni glikanski model. Naposljetku, povezanost IgG *N*-glikoma s CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc procjenom rizika od moždanog udara možda nije iznenađujuća, ali još jednom potvrđuje opsežne promjene IgG *N*-glikozilacije u različitim bolestima s podležućom upalnom patologijom.

## 5. ZAKLJUČCI



Ovim istraživanjem su po prvi puta istražene promjene u *N*-glikozilaciji ukupnih plazmatskih proteina i IgG-a u fibrilaciji atrijske te su dodatno istražene promjene uslijed zahvata kateterske ablacije i ispitan diskriminativni potencijal *N*-glikana u predikciji recidiva fibrilacije atrijske nakon kateterske ablacije.

Razlike u *N*-glikozilaciji između pacijenata s fibrilacijom atrijske i kardiološki zdravih kontrola primijećene su u *N*-glikomu ukupnih plazmatskih proteina kao i u *N*-glikomu IgG-a. Promjene su opsežnije na glikanima IgG-a. Analizirajući glikane ukupnih plazmatskih proteina pronađena je povećana zastupljenost oligomanozne strukture Man9 kod pacijenata oboljelih od fibrilacije atrijske u odnosu na zdrave kontrole. U IgG *N*-glikomu kod pacijenata s fibrilacijom atrijske pronađena je manja zastupljenost glikanskih struktura s računajućim GlcNAc-om FA2B i FA2[6]BG1 te povećana zastupljenost Man5, FA2[3]G1 i A2G2S2 te IGP20. Smanjenje struktura s računajućim GlcNAc-om odstupa od promjena u stanjima povezanim s fibrilacijom atrijske te stoga kao jedinstvena promjena ima potencijal biti dijagnostički biljeg za što bi bila potrebna replikacija ovdje navedenih rezultata na većem broju uzoraka kako bi se omogućilo konstruiranje diskriminativnog modela.

Osobe koje su doživjele recidiv fibrilacije atrijske unutar šest mjeseci od zahvata kateterske ablacije pokazale su promijene u *N*-glikomu ukupnih plazmatskih proteina dok promjene nisu zamijećene u *N*-glikomu IgG-a. Promjene obuhvaćaju povećanu zastupljenost nekoliko prvenstveno oligomanoznih struktura i struktura s računajućim GlcNAc-om kod osoba koje su doživjele recidiv. Glikanske strukture ukupnih plazmatskih proteina za koje je utvrđena statistički značajna razlika uključuju: Man5, Man6, FA2B, A2BG2 i A2BG2S1.

Uspoređujući pred- i post-operativne *N*-glikome pacijenata podvrgnutih zahvatu kateterske ablacije pronađene su promjene u *N*-glikomu IgG-a dok nijedna statistički značajna promjena nije utvrđena u *N*-glikomu ukupnih plazmatskih proteina. Strukture koje su pokazale smanjenje uslijed zahvata kateterske ablacije su Man5, A2G2S1, A2G2S2 te IGP20 čija točna struktura nije utvrđena. Razlike na Man5, A2G2S2 i IGP20 su prethodno utvrđene između zdravih kontrola i pacijenata s fibrilacijom atrijske, te smanjenje navedenih struktura nakon zahvata

ukazuje na promjene u smjeru IgG *N*-glikoma zdravih kontrola. Navedene promjene primijećene su neovisno o recidivu fibrilacije atrijske unutar šest mjeseci od zahvata.

*N*-glikani IgG-a pokazali su opsežnu korelaciju s  $\text{CHA}_2\text{DS}_2\text{-VASc}$  procjenom rizika od moždanog udara dok korelacija nije ustanovljena s *N*-glikomom ukupnih plazmatskih proteina. Statistički značajan rastući linearni trend zabilježen je za FA2, FA2B, agalaktozilaciju i udio struktura s računjućim GlcNAc-om dok je padajući linearni trend utvrđen za FA2[6]G1, FA2G2, FA2G2S1, FA2G2S2, digalaktozilaciju i sijalinizaciju. Promjene su konzistentne s prethodnim saznanjima o promjenama glikozilacije IgG-a u stanjima poput dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti, upalnih stanja i starenja gdje je poznato da proupalni IgG profil karakterizira smanjenje galaktozilacije i sijalinizacije. Pokazan je aditivni efekt faktora rizika koji sačinjavaju  $\text{CHA}_2\text{DS}_2\text{-VASc}$  gdje se s porastom  $\text{CHA}_2\text{DS}_2\text{-VASc}$  vrijednosti *N*-glikanski profil IgG-a pomiče sve više prema proupalnom fenotipu.

## 6. POPIS LITERATURE

1. Krištić J, Lauc G. Ubiquitous Importance of Protein Glycosylation. *Methods Mol Biol.* 2017.;1503:1–12.
2. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta.* 06. prosinac 1999.;1473(1):4–8.
3. Roth J. Protein N-glycosylation along the secretory pathway: relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions. *Chem Rev.* veljača 2002.;102(2):285–303.
4. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, i ostali, urednici. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 4th izd. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022 [citirano 10. studeni 2023.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579918/>
5. Cummings RD. The repertoire of glycan determinants in the human glycome. *Mol Biosyst.* 16. rujan 2009.;5(10):1087–104.
6. Lauc G, Rudan I, Campbell H, Rudd PM. Complex genetic regulation of protein glycosylation. *Mol Biosyst.* veljača 2010.;6(2):329–35.
7. Furmanek A, Hofsteenge J. Protein C-mannosylation: facts and questions. *Acta Biochim Pol.* 2000.;47(3):781–9.
8. Haynes PA. Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation? *Glycobiology.* siječanj 1998.;8(1):1–5.
9. Nairn AV, York WS, Harris K, Hall EM, Pierce JM, Moremen KW. Regulation of glycan structures in animal tissues: transcript profiling of glycan-related genes. *J Biol Chem.* 20. lipanj 2008.;283(25):17298–313.
10. Lauc G, Zoldoš V. Protein glycosylation--an evolutionary crossroad between genes and environment. *Mol Biosyst.* prosinac 2010.;6(12):2373–9.
11. Schjoldager KT, Narimatsu Y, Joshi HJ, Clausen H. Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* prosinac 2020.;21(12):729–49.
12. Knezevic A, Gornik O, Polasek O, Pucic M, Redzic I, Novokmet M, i ostali. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology.* kolovoz 2010.;20(8):959–69.
13. Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology.* travanj 1993.;3(2):97–130.
14. Mitra N, Sinha S, Ramya TNC, Surolia A. N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends Biochem Sci.* ožujak 2006.;31(3):156–63.
15. Lee HS, Qi Y, Im W. Effects of N-glycosylation on protein conformation and dynamics: Protein Data Bank analysis and molecular dynamics simulation study. *Sci Rep.* 09. ožujak 2015.;5(1):8926.

16. Stanley P, Moremen KW, Lewis NE, Taniguchi N, Aebi M. N-Glycans. U: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, i ostali, urednici. Essentials of Glycobiology [Internet]. 4th izd. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022 [citirano 01. studeni 2022.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579964/>
17. Sethi MK, Fanayan S. Mass Spectrometry-Based N-Glycomics of Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. prosinac 2015.;16(12):29278–304.
18. Harada Y, Ohkawa Y, Kizuka Y, Taniguchi N. Oligosaccharyltransferase: A Gatekeeper of Health and Tumor Progression. *International Journal of Molecular Sciences*. siječanj 2019.;20(23):6074.
19. Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. srpanj 2012.;13(7):448–62.
20. Suzuki T, Cummings RD, Aebi M, Parodi A. Glycans in Glycoprotein Quality Control. U: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, i ostali, urednici. Essentials of Glycobiology [Internet]. 4th izd. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022 [citirano 01. studeni 2023.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579973/>
21. Nagae M, Yamaguchi Y, Taniguchi N, Kizuka Y. 3D Structure and Function of Glycosyltransferases Involved in N-glycan Maturation. *International Journal of Molecular Sciences*. siječanj 2020.;21(2):437.
22. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. studeni 2002.;1(11):845–67.
23. Peters T. The Albumin Molecule: Its Structure and Chemical Properties. U: Peters T, urednik. All About Albumin [Internet]. San Diego: Academic Press; 1995 [citirano 11. studeni 2023.]. str. 9–II. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125521109500040>
24. Clerc F, Reiding KR, Jansen BC, Kammeijer GSM, Bondt A, Wuhrer M. Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconj J*. lipanj 2016.;33(3):309–43.
25. Royle L, Campbell MP, Radcliffe CM, White DM, Harvey DJ, Abrahams JL, i ostali. HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. *Anal Biochem*. 01. svibanj 2008.;376(1):1–12.
26. Gornik O, Wagner J, Pucić M, Knezević A, Redzic I, Lauc G. Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology*. prosinac 2009.;19(12):1547–53.
27. Dall’Olio F, Vanhooren V, Chen CC, Slagboom PE, Wuhrer M, Franceschi C. N-glycomic biomarkers of biological aging and longevity: a link with inflammaging. *Ageing Res Rev*. ožujak 2013.;12(2):685–98.
28. Pučić M, Knežević A, Vidič J, Adamczyk B, Novokmet M, Polašek O, i ostali. High Throughput Isolation and Glycosylation Analysis of IgG—Variability and Heritability of the IgG Glycome in Three Isolated Human Populations. *Mol Cell Proteomics*. listopad 2011.;10(10):M111.010090.

29. Knezević A, Polasek O, Gornik O, Rudan I, Campbell H, Hayward C, i ostali. Variability, heritability and environmental determinants of human plasma N-glycome. *J Proteome Res.* veljača 2009.;8(2):694–701.
30. Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol.* lipanj 2019.;15(6):346–66.
31. Novokmet M, Lukić E, Vučković F, Đurić Ž, Keser T, Rajšl K, i ostali. Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation. *Sci Rep.* 11. ožujak 2014.;4:4347.
32. Dashti H, Pabon Porras MA, Mora S. Glycosylation and Cardiovascular Diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2021.;1325:307–19.
33. Štambuk T, Gornik O. Protein Glycosylation in Diabetes. *Adv Exp Med Biol.* 2021.;1325:285–305.
34. Cvetko A, Mangino M, Tijardović M, Kifer D, Falchi M, Keser T, i ostali. Plasma N-glycome shows continuous deterioration as the diagnosis of insulin resistance approaches. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 09. rujan 2021.;9(1):e002263.
35. Keser T, Gornik I, Vučković F, Selak N, Pavić T, Lukić E, i ostali. Increased plasma N-glycome complexity is associated with higher risk of type 2 diabetes. *Diabetologia.* prosinac 2017.;60(12):2352–60.
36. Nemčić M, Tijardović M, Rudman N, Bulum T, Tomić M, Plavša B, i ostali. N-glycosylation of serum proteins in adult type 1 diabetes mellitus exposes further changes compared to children at the disease onset. *Clin Chim Acta.* 15. ožujak 2023.;543:117298.
37. Juszcak A, Pavić T, Vučković F, Bennett AJ, Shah N, Pape Medvidović E, i ostali. Plasma Fucosylated Glycans and C-Reactive Protein as Biomarkers of HNF1A-MODY in Young Adult-Onset Nonautoimmune Diabetes. *Diabetes Care.* 19. studeni 2018.;42(1):17–26.
38. Pavić T, Juszcak A, Pape Medvidović E, Burrows C, Škerija M, Bennett AJ, i ostali. Maturity onset diabetes of the young due to HNF1A variants in Croatia. *Biochem Med (Zagreb).* 15. lipanj 2018.;28(2):020703.
39. Vajaria BN, Patel PS. Glycosylation: a hallmark of cancer? *Glycoconj J.* travanj 2017.;34(2):147–56.
40. Saldova R, Asadi Shehni A, Haakensen VD, Steinfeld I, Hilliard M, Kifer I, i ostali. Association of N-glycosylation with breast carcinoma and systemic features using high-resolution quantitative UPLC. *J Proteome Res.* 02. svibanj 2014.;13(5):2314–27.
41. Doherty M, Theodoratou E, Walsh I, Adamczyk B, Stöckmann H, Agakov F, i ostali. Plasma N-glycans in colorectal cancer risk. *Sci Rep.* 05. lipanj 2018.;8(1):8655.
42. Zhang Z, Wuhrer M, Holst S. Serum sialylation changes in cancer. *Glycoconj J.* 2018.;35(2):139–60.
43. Adamczyk B, Tharmalingam T, Rudd PM. Glycans as cancer biomarkers. *Biochim Biophys Acta.* rujan 2012.;1820(9):1347–53.

44. Pucić M, Knezević A, Vidic J, Adamczyk B, Novokmet M, Polasek O, i ostali. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol Cell Proteomics*. listopad 2011.;10(10):M111.010090.
45. Quaranta A, Sroka-Bartnicka A, Tengstrand E, Thorsén G. N-Glycan profile analysis of transferrin using a microfluidic compact disc and MALDI-MS. *Anal Bioanal Chem*. 2016.;408:4765–76.
46. Zhu J, Wu J, Yin H, Marrero J, Lubman DM. Mass Spectrometric N-Glycan Analysis of Haptoglobin from Patient Serum Samples Using a 96-Well Plate Format. *J Proteome Res*. 06. studeni 2015.;14(11):4932–9.
47. Šoić D, Keser T, Štambuk J, Kifer D, Pociot F, Lauc G, i ostali. High-Throughput Human Complement C3 N-Glycoprofiling Identifies Markers of Early Onset Type 1 Diabetes Mellitus in Children. *Mol Cell Proteomics*. 27. kolovoz 2022.;21(10):100407.
48. Keser T, Tijardović M, Gornik I, Lukić E, Lauc G, Gornik O, i ostali. High-Throughput and Site-Specific N-Glycosylation Analysis of Human Alpha-1-Acid Glycoprotein Offers a Great Potential for New Biomarker Discovery. *Mol Cell Proteomics*. 2021.;20:100044.
49. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2014. [citirano 11. studeni 2023.];5. Dostupno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00520>
50. Schur PH. IgG subclasses. A historical perspective. *Monogr Allergy*. 1988.;23:1–11.
51. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol*. 2007.;25:21–50.
52. Zhu D, McCarthy H, Ottensmeier CH, Johnson P, Hamblin TJ, Stevenson FK. Acquisition of potential N-glycosylation sites in the immunoglobulin variable region by somatic mutation is a distinctive feature of follicular lymphoma. *Blood*. 01. travanj 2002.;99(7):2562–8.
53. Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. The distribution and functions of immunoglobulin isotypes. U: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease 5th edition* [Internet]. Garland Science; 2001 [citirano 11. studeni 2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27162/>
54. Ernst LK, Metes D, Herberman RB, Morel PA. Allelic polymorphisms in the FcγRIIC gene can influence its function on normal human natural killer cells. *J Mol Med*. 01. travanj 2002.;80(4):248–57.
55. Quast I, Peschke B, Lünemann JD. Regulation of antibody effector functions through IgG Fc N-glycosylation. *Cell Mol Life Sci*. ožujak 2017.;74(5):837–47.
56. Fridman WH. Fc receptors and immunoglobulin binding factors. *The FASEB Journal*. 1991.;5(12):2684–90.

57. Nose M, Wigzell H. Biological significance of carbohydrate chains on monoclonal antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. studeni 1983.;80(21):6632–6.
58. Shields RL, Lai J, Keck R, O’Connell LY, Hong K, Meng YG, i ostali. Lack of Fucose on Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding to Human Fc $\gamma$ RIII and Antibody-dependent Cellular Toxicity \*. *Journal of Biological Chemistry*. 26. srpanj 2002.;277(30):26733–40.
59. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*. 04. kolovoz 2006.;313(5787):670–3.
60. Quast I, Keller CW, Maurer MA, Giddens JP, Tackenberg B, Wang LX, i ostali. Sialylation of IgG Fc domain impairs complement-dependent cytotoxicity. *J Clin Invest*. 02. studeni 2015.;125(11):4160–70.
61. Wright A, Tao M h., Kabat E a., Morrison S l. Antibody variable region glycosylation: position effects on antigen binding and carbohydrate structure. *The EMBO Journal*. listopad 1991.;10(10):2717–23.
62. Maverakis E, Kim K, Shimoda M, Gershwin ME, Patel F, Wilken R, i ostali. Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A critical review. *Journal of Autoimmunity*. 01. veljača 2015.;57:1–13.
63. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, i ostali. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature*. 01. kolovoz 1985.;316(6027):452–7.
64. Vučković F, Krišić J, Gudelj I, Teruel M, Keser T, Pezer M, i ostali. Association of systemic lupus erythematosus with decreased immunosuppressive potential of the IgG glycome. *Arthritis Rheumatol*. studeni 2015.;67(11):2978–89.
65. Cvetko A, Kifer D, Gornik O, Klarić L, Visser E, Lauc G, i ostali. Glycosylation Alterations in Multiple Sclerosis Show Increased Proinflammatory Potential. *Biomedicines*. 13. listopad 2020.;8(10):410.
66. Gudelj I, Lauc G, Pezer M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cellular Immunology*. 01. studeni 2018.;333:65–79.
67. Menni C, Gudelj I, Macdonald-Dunlop E, Mangino M, Zierer J, Bešić E, i ostali. Glycosylation Profile of Immunoglobulin G Is Cross-Sectionally Associated With Cardiovascular Disease Risk Score and Subclinical Atherosclerosis in Two Independent Cohorts. *Circ Res*. 25. svibanj 2018.;122(11):1555–64.
68. Birukov A, Plavša B, Eichelmann F, Kuxhaus O, Hoshi RA, Rudman N, i ostali. Immunoglobulin G N-Glycosylation Signatures in Incident Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease. *Diabetes Care*. Rujan 2022.;dc220833.
69. Lemmers RFH, Vilaj M, Urda D, Agakov F, Šimurina M, Klaric L, i ostali. IgG glycan patterns are associated with type 2 diabetes in independent European populations. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. rujun 2017.;1861(9):2240–9.



70. Lebrilla CB, Liu J, Widmalm G, Prestegard JH. Oligosaccharides and Polysaccharides. U: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, i ostali, urednici. Essentials of Glycobiology [Internet]. 4th izd. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022 [citirano 08. studeni 2023.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579972/>
71. Haslam SM, Freedberg DI, Mulloy B, Dell A, Stanley P, Prestegard JH. Structural Analysis of Glycans. U: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, i ostali, urednici. Essentials of Glycobiology [Internet]. 4th izd. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022 [citirano 08. studeni 2023.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579945/>
72. Mariño K, Bones J, Kattla JJ, Rudd PM. A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nat Chem Biol.* listopad 2010.;6(10):713–23.
73. Trbojević-Akmačić I, Lageveen-Kammeijer GSM, Heijs B, Petrović T, Deriš H, Wuhrer M, i ostali. High-Throughput Glycomic Methods. *Chem Rev.* 26. listopad 2022.;122(20):15865–913.
74. Glycoprofile Analysis of an Intact Glycoprotein As Inferred by NMR Spectroscopy | ACS Central Science [Internet]. [citirano 13. studeni 2023.]. Dostupno na: <https://pubs-acsc-org.ezproxy.nsk.hr/doi/10.1021/acscentsci.9b00540>
75. Quaranta A, Spasova M, Passarini E, Karlsson I, Ndreu L, Thorsén G, i ostali. N - Glycosylation profiling of intact target proteins by high-resolution mass spectrometry (MS) and glycan analysis using ion mobility-MS/MS. *Analyst.* 2020.;145(5):1737–48.
76. Desaire H. Glycopeptide Analysis, Recent Developments and Applications. *Mol Cell Proteomics.* travanj 2013.;12(4):893–901.
77. Tarentino AL, Gómez CM, Plummer TH. Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochemistry.* 13. kolovoz 1985.;24(17):4665–71.
78. Tretter V, Altmann F, März L. Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1----3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. *Eur J Biochem.* 01. kolovoz 1991.;199(3):647–52.
79. Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM. Detailed structural analysis of N-glycans released from glycoproteins in SDS-PAGE gel bands using HPLC combined with exoglycosidase array digestions. *Methods Mol Biol.* 2006.;347:125–43.
80. Akmačić IT, Ugrina I, Štambuk J, Gudelj I, Vučković F, Lauc G, i ostali. High-throughput glycomics: optimization of sample preparation. *Biochemistry (Mosc).* srpanj 2015.;80(7):934–42.
81. Ruhaak LR, Zauner G, Huhn C, Bruggink C, Deelder AM, Wuhrer M. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal Bioanal Chem.* 2010.;397(8):3457–81.
82. Keser T, Pavić T, Lauc G, Gornik O. Comparison of 2-Aminobenzamide, Procainamide and RapiFluor-MS as Derivatizing Agents for High-Throughput HILIC-UPLC-FLR-MS N-glycan Analysis. *Front Chem.* 26. srpanj 2018.;6:324.

83. Hanić M, Lauc G, Trbojević-Akmačić I. N-Glycan Analysis by Ultra-Performance Liquid Chromatography and Capillary Gel Electrophoresis with Fluorescent Labeling. *Curr Protoc Protein Sci.* rujan 2019.;97(1):e95.
84. Royle L, Dwek RA, Rudd PM. Determining the structure of oligosaccharides N- and O-linked to glycoproteins. *Curr Protoc Protein Sci.* ožujak 2006.;Chapter 12:12.6.1-12.6.45.
85. Huffman JE, Pučić-Baković M, Klarić L, Hennig R, Selman MHJ, Vučković F, i ostali. Comparative Performance of Four Methods for High-throughput Glycosylation Analysis of Immunoglobulin G in Genetic and Epidemiological Research. *Mol Cell Proteomics.* lipanj 2014.;13(6):1598–610.
86. Krijthe BP, Kunst A, Benjamin EJ, Lip GYH, Franco OH, Hofman A, i ostali. Projections on the number of individuals with atrial fibrillation in the European Union, from 2000 to 2060. *Eur Heart J.* 14. rujan 2013.;34(35):2746–51.
87. Go AS, Hylek EM, Phillips KA, Chang Y, Henault LE, Selby JV, i ostali. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA.* 09. svibanj 2001.;285(18):2370–5.
88. Dilaveris PE, Kennedy HL. Silent atrial fibrillation: epidemiology, diagnosis, and clinical impact. *Clin Cardiol.* 08. ožujak 2017.;40(6):413–8.
89. Turakhia MP, Shafrin J, Bognar K, Trocio J, Abdulsattar Y, Wiederkehr D, i ostali. Estimated prevalence of undiagnosed atrial fibrillation in the United States. *PLoS One.* 12. travanj 2018.;13(4):e0195088.
90. Mou L, Norby FL, Chen LY, O'Neal WT, Lewis TT, Loehr LR, i ostali. Lifetime Risk of Atrial Fibrillation by Race and Socioeconomic Status: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* srpanj 2018.;11(7):e006350.
91. Markides V, Schilling RJ. Atrial fibrillation: classification, pathophysiology, mechanisms and drug treatment. *Heart.* 01. kolovoz 2003.;89(8):939–43.
92. Steinberg JS, O'Connell H, Li S, Ziegler PD. Thirty-Second Gold Standard Definition of Atrial Fibrillation and Its Relationship With Subsequent Arrhythmia Patterns: Analysis of a Large Prospective Device Database. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* srpanj 2018.;11(7):e006274.
93. Wang YC, Xu X, Hajra A, Apple S, Kharawala A, Duarte G, i ostali. Current Advancement in Diagnosing Atrial Fibrillation by Utilizing Wearable Devices and Artificial Intelligence: A Review Study. *Diagnostics (Basel).* 11. ožujak 2022.;12(3):689.
94. Hindricks G, Potpara T, Dagres N, Arbelo E, Bax JJ, Blomström-Lundqvist C, i ostali. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. *European Heart Journal.* 01. veljača 2021.;42(5):373–498.

95. Fuster V, Rydén LE, Asinger RW, Cannom DS, Crijns HJ, Frye RL, i ostali. ACC/AHA/ESC Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation: Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines and Policy Conferences (Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation) Developed in Collaboration With the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation*. 23. listopad 2001.;104(17):2118–50.
96. Benjamin EJ, Levy D, Vaziri SM, D’Agostino RB, Belanger AJ, Wolf PA. Independent Risk Factors for Atrial Fibrillation in a Population-Based Cohort: The Framingham Heart Study. *JAMA*. 16. ožujak 1994.;271(11):840–4.
97. Lau DH, Nattel S, Kalman JM, Sanders P. Modifiable Risk Factors and Atrial Fibrillation. *Circulation*. 08. kolovoz 2017.;136(6):583–96.
98. Hendriks JM, Gallagher C, Middeldorp ME, Lau DH, Sanders P. Risk factor management and atrial fibrillation. *EP Europace*. 01. travanj 2021.;23(Supplement 2):ii52–60.
99. Heijman J, Luermans JGLM, Linz D, van Gelder IC, Crijns HJGM. Risk Factors for Atrial Fibrillation Progression. *Card Electrophysiol Clin*. ožujak 2021.;13(1):201–9.
100. Kottkamp H, Schreiber D. The Substrate in “Early Persistent” Atrial Fibrillation: Arrhythmia Induced, Risk Factor Induced, or From a Specific Fibrotic Atrial Cardiomyopathy? *JACC: Clinical Electrophysiology*. travanj 2016.;2(2):140–2.
101. Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, i ostali. Spontaneous Initiation of Atrial Fibrillation by Ectopic Beats Originating in the Pulmonary Veins. *N Engl J Med*. 03. rujan 1998.;339(10):659–66.
102. Nguyen TP, Qu Z, Weiss JN. Cardiac Fibrosis and Arrhythmogenesis: The Road to Repair is Paved with Perils. *J Mol Cell Cardiol*. svibanj 2014.;0:83–91.
103. Harada M, Nattel S. Implications of Inflammation and Fibrosis in Atrial Fibrillation Pathophysiology. *Cardiac Electrophysiology Clinics*. 01. ožujak 2021.;13(1):25–35.
104. Nattel S. Molecular and Cellular Mechanisms of Atrial Fibrosis in Atrial Fibrillation. *JACC: Clinical Electrophysiology*. 01. svibanj 2017.;3(5):425–35.
105. Thanassoulis G, Massaro JM, O’Donnell CJ, Hoffmann U, Levy D, Ellinor PT, i ostali. Pericardial fat is associated with prevalent atrial fibrillation: the Framingham Heart Study. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. kolovoz 2010.;3(4):345–50.
106. Batal O, Schoenhagen P, Shao M, Ayyad AE, Van Wagoner DR, Halliburton SS, i ostali. Left atrial epicardial adiposity and atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. lipanj 2010.;3(3):230–6.
107. Shin SY, Yong HS, Lim HE, Na JO, Choi CU, Choi JI, i ostali. Total and interatrial epicardial adipose tissues are independently associated with left atrial remodeling in patients with atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. lipanj 2011.;22(6):647–55.
108. Tsao HM, Hu WC, Wu MH, Tai CT, Lin YJ, Chang SL, i ostali. Quantitative analysis of quantity and distribution of epicardial adipose tissue surrounding the left atrium in patients

- with atrial fibrillation and effect of recurrence after ablation. *Am J Cardiol.* 15. svibanj 2011.;107(10):1498–503.
109. Nagashima K, Okumura Y, Watanabe I, Nakai T, Ohkubo K, Kofune T, i ostali. Association between epicardial adipose tissue volumes on 3-dimensional reconstructed CT images and recurrence of atrial fibrillation after catheter ablation. *Circ J.* 2011.;75(11):2559–65.
110. Iacobellis G, Corradi D, Sharma AM. Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* listopad 2005.;2(10):536–43.
111. Venticlef N, Guglielmi V, Balse E, Gaborit B, Cotillard A, Atassi F, i ostali. Human epicardial adipose tissue induces fibrosis of the atrial myocardium through the secretion of adipo-fibrokinases. *Eur Heart J.* 01. travanj 2015.;36(13):795–805a.
112. Mahajan R, Brooks AG, Finnie JW, Manavis J, Grover S, Selvanayagam JB, i ostali. Epicardial fatty infiltration of atrial musculature creates the substrate for atrial fibrillation in obesity. *Heart Rhythm.* 2012.;9:S124.
113. Aviles RJ, Martin DO, Apperson-Hansen C, Houghtaling PL, Rautaharju P, Kronmal RA, i ostali. Inflammation as a risk factor for atrial fibrillation. *Circulation.* 16. prosinac 2003.;108(24):3006–10.
114. Vizzardi E, Curnis A, Latini MG, Salghetti F, Rocco E, Lupi L, i ostali. Risk factors for atrial fibrillation recurrence: a literature review. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* ožujak 2014.;15(3):235–53.
115. Oikonomou E, Zografos T, Papamikroulis GA, Siasos G, Vogiatzi G, Theofilis P, i ostali. Biomarkers in Atrial Fibrillation and Heart Failure. *Curr Med Chem.* 2019.;26(5):873–87.
116. Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Omland T, i ostali. Plasma Natriuretic Peptide Levels and the Risk of Cardiovascular Events and Death. *N Engl J Med.* 12. veljača 2004.;350(7):655–63.
117. Buist TJ, Zipes DP, Elvan A. Atrial fibrillation ablation strategies and technologies: past, present, and future. *Clin Res Cardiol.* lipanj 2021.;110(6):775–88.
118. Haines DE. The biophysics of radiofrequency catheter ablation in the heart: the importance of temperature monitoring. *Pacing Clin Electrophysiol.* ožujak 1993.;16(3 Pt 2):586–91.
119. De Ponti R. Cryothermal energy ablation of cardiac arrhythmias 2005: state of the art. *Indian Pacing Electrophysiol J.* 01. siječanj 2005.;5(1):12–24.
120. Gupta A, Perera T, Ganesan A, Sullivan T, Lau DH, Roberts-Thomson KC, i ostali. Complications of Catheter Ablation of Atrial Fibrillation. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology.* prosinac 2013.;6(6):1082–8.
121. Parameswaran R, Al-Kaisey AM, Kalman JM. Catheter ablation for atrial fibrillation: current indications and evolving technologies. *Nat Rev Cardiol.* ožujak 2021.;18(3):210–25.

122. Calkins H, Hindricks G, Cappato R, Kim YH, Saad EB, Aguinaga L, i ostali. 2017 HRS/EHRA/ECAS/APHRS/SOLAECE expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 15. svibanj 2017.;14(10):275–444.
123. Ganesan AN, Shipp NJ, Brooks AG, Kuklik P, Lau DH, Lim HS, i ostali. Long-term outcomes of catheter ablation of atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis. *J Am Heart Assoc*. 18. ožujak 2013.;2(2):e004549.
124. Sultan A, Lüker J, Andresen D, Kuck KH, Hoffmann E, Brachmann J, i ostali. Predictors of Atrial Fibrillation Recurrence after Catheter Ablation: Data from the German Ablation Registry. *Sci Rep*. 30. studeni 2017.;7:16678.
125. Boyalla V, Harling L, Snell A, Kralj-Hans I, Barradas-Pires A, Haldar S, i ostali. Biomarkers as predictors of recurrence of atrial fibrillation post ablation: an updated and expanded systematic review and meta-analysis. *Clin Res Cardiol*. 2022.;111(6):680–91.
126. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics*. 15. ožujak 2012.;28(6):882–3.
127. Lip GYH, Nieuwlaat R, Pisters R, Lane DA, Crijns HJGM. Refining clinical risk stratification for predicting stroke and thromboembolism in atrial fibrillation using a novel risk factor-based approach: the euro heart survey on atrial fibrillation. *Chest*. veljača 2010.;137(2):263–72.
128. Li J, Ji L. Adjusting multiple testing in multilocus analyses using the eigenvalues of a correlation matrix. *Heredity*. rujan 2005.;95(3):221–7.
129. Nossan JS, Šesto I, Štambuk K, Šipić T, Bernat R, Gudelj I, i ostali. Is the extent of left atrial fibrosis associated with body mass index in patients undergoing pulmonary vein isolation for atrial fibrillation? *Kardiol Pol*. 2021.;79(5):531–8.
130. Plavša B, Szavits-Nossan J, Blivajs A, Rapčan B, Radovani B, Šesto I, i ostali. The N-Glycosylation of Total Plasma Proteins and IgG in Atrial Fibrillation. *Biomolecules*. 28. ožujak 2023.;13(4):605.
131. Huxley RR, Alonso A, Lopez FL, Filion KB, Agarwal SK, Loehr LR, i ostali. Type 2 diabetes, glucose homeostasis and incident atrial fibrillation: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Heart*. siječanj 2012.;98(2):133–8.
132. Scott DW, Patel RP. Endothelial heterogeneity and adhesion molecules N-glycosylation: Implications in leukocyte trafficking in inflammation. *Glycobiology*. 01. lipanj 2013.;23(6):622–33.
133. Zhong X, Jiao H, Zhao D, Teng J. Association between serum apolipoprotein B and atrial fibrillation: a case–control study. *Sci Rep*. 10. lipanj 2022.;12:9597.
134. Kifer D, Louca P, Cvetko A, Deriš H, Cindrić A, Grallert H, i ostali. N-glycosylation of immunoglobulin G predicts incident hypertension. *J Hypertens*. 01. prosinac 2021.;39(12):2527–33.

135. Rudman N, Kifer D, Kaur S, Simunović V, Cvetko A, Pociot F, i ostali. Children at onset of type 1 diabetes show altered N-glycosylation of plasma proteins and IgG. *Diabetologia*. 2022.;65(8):1315–27.
136. Davies J, Jiang L, Pan LZ, LaBarre MJ, Anderson D, Reff M. Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC $\gamma$ RIII. *Biotechnology and Bioengineering*. 2001.;74(4):288–94.
137. Poljičanin T, Metelko Ž. Epidemiology of diabetes mellitus in Croatia and worldwide. *Medix : specijalizirani medicinski dvomjesečnik*. 2009.;80–81:82–8.
138. Liu T, Li G, Li L, Korantzopoulos P. Association between C-reactive protein and recurrence of atrial fibrillation after successful electrical cardioversion: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 17. travanj 2007.;49(15):1642–8.
139. Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM, Fischer PB, Dwek RA, Sim RB. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat Med*. ožujak 1995.;1(3):237–43.
140. Karsten CM, Pandey MK, Figge J, Kilchenstein R, Taylor PR, Rosas M, i ostali. Galactosylated IgG1 links Fc $\gamma$ RIIB and Dectin-1 to block complement-mediated inflammation. *Nat Med*. rujana 2012.;18(9):1401–6.

## ŽIVOTOPIS

Branimir Plavša rođen je 20. listopada 1995. godine u Splitu. Gimnaziju završava u Sinju, a 2014. godine upisuje studij Farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagreb. Tijekom studija istaknuo se kao odličan student, te je više puta dobivao dekanovu nagradu za odličan uspjeh, uključujući i nagradu za najbolji uspjeh u generaciji. Diplomirao je *magna cum laude* 2019. godine.

Od prosinca 2019. godine zaposlen je kao doktorand istraživač na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta gdje sudjeluje u istraživačkom radu kao i u izvedbi nastave iz više kolegija diplomskog studija Farmacije. Iste godine upisuje i poslijediplomski doktorski studij Farmaceutske znanosti na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu.

U sklopu svog istraživačkog rada objavio je tri znanstvena rada te održao nekoliko posterskih priopćenja na domaćim kongresima.

### Znanstveni radovi (CC):

**Plavša B**, Szavits-Nossan J, Blivajs A, Rapčan B, Radovani B, Šesto I, et al. The N-Glycosylation of Total Plasma Proteins and IgG in Atrial Fibrillation. *Biomolecules*. 2023 Mar 28;13(4):605. doi: 10.3390/biom13040605.

Nemčić M, Tijardović M, Rudman N, Bulum T, Tomić M, **Plavša B**, et al. N-glycosylation of serum proteins in adult type 1 diabetes mellitus exposes further changes compared to children at the disease onset. *Clin Chim Acta*. 2023 Mar 15;543:117298. doi: 10.1016/j.cca.2023.117298.

Birukov A, **Plavša B**, Eichelmann F, Kuxhaus O, Hoshi RA, Rudman N, Štambuk T, et al. Immunoglobulin G N-Glycosylation Signatures in Incident Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease. *Diabetes Care*. 2022 Nov 1;45(11):2729-2736. doi: 10.2337/dc22-0833.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Doktorski rad

### **N-GLIKOZILACIJA UKUPNIH PLAZMATSKIH PROTEINA I IMUNOGLOBULINA G U FIBRILACIJI ATRIIJA**

**Branimir Plavša**

#### **SAŽETAK**

Fibrilacija atrijska je bolest kompleksne patofiziologije čiji razvoj i perzistencija nisu uzrokovani samo nepravilnim električnim signaliziranjem u srcu nego i razvojem promjena u srčanom mišiću koje rezultiraju supstratom podložnim za nastanak i progresiju bolesti. Promjene poput razvoja intersticijske fibroze i akumulacije epikardijalnog adipoznog tkiva su uzrokovane lokalnim upalnim odgovorom te također potiču nastanak istog. *N*-glikani ukupnih plazmatskih proteina i imunoglobulina G su dokazani biljezi različitih bolesti, pogotovo onih u kojima je izražena upalna ili metabolička komponenta kao što su dijabetes, hipertenzija i kardiovaskularne bolesti. Sva navedena stanja su čimbenici rizika za fibrilaciju atrijsku te su stoga potencijalno povezani s razvojem i progresijom bolesti. Važna uloga *N*-glikozilacije proteina plazme, a posebno imunoglobulina G (IgG) u upalnom odgovoru, kao i spomenuta povezanost s čimbenicima rizika, motiviraju istraživanje *N*-glikozilacije ukupnih plazmatskih proteina i izoliranog IgG-a u fibrilaciji atrijskoj. Kako bi ispitali potencijalne promjene, analizirali smo *N*-glikome IgG-a i ukupnih plazmatskih proteina 172 pacijenta s fibrilacijom atrijskom i usporedili ih s *N*-glikomima 54 kardiološki zdravih kontrola. Pacijenti su također bili podvrgnuti zahvatu kateterske ablacije te su uzorci prikupljeni u dvije vremenske točke, neposredno prije zahvata i nakon šest mjeseci, tijekom kojih su pacijenti praćeni za recidiv fibrilacije atrijske. Analiza *N*-glikozilacije provedena je koristeći visoko-prototičnu metodu temeljenu na tekućinskoj kromatografiji ultra-visoke učinkovitosti. Jedan oligomanozni glikan iz *N*-glikoma ukupnih plazmatskih proteina te šest glikana IgG-a pokazali su statistički značajne promjene između zdravih kontrola i osoba oboljelih od fibrilacije atrijske. Promjene su bile izraženije u IgG-u, te su promjene vezane uz smanjenje razine struktura s računajućim *N*-acetilglukozaminom bile specifične za fibrilaciju atrijsku. Uz to, četiri glikana u *N*-glikomu plazme, pretežito oligomanozne strukture, pokazale su značajne razlike između podskupine pacijenata koja je doživjela recidiv fibrilacije atrijske nakon zahvata te one za koje je odsustvo fibrilacije atrijske bilo stabilno unutar vremena ove studije. IgG *N*-glikom je također opsežno korelirao s  $CHA_2DS_2-VASc$  procjenom rizika od moždanog udara, gdje je opažen pomak IgG glikoma prema porupalnom fenotipu kako se  $CHA_2DS_2-VASc$  vrijednost povećava. Ovo je prvo istraživanje koje je usporedilo *N*-glikome proteina plazme i izoliranog IgG-a pacijenata s fibrilacijom atrijskom s zdravim kontrolom te ovdje opisani rezultati daju temelj za daljnje glikomske studije fibrilacije atrijske.

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

Rad sadrži: 90 stranica, 11 grafičkih prikaza, 13 tablica i 140 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *N*-glikozilacija, *N*-glikani, Fibrilacija atrijska, *N*-glikani imunoglobulina G, *N*-glikani ukupnih plazmatskih proteina, UPLC

Mentor: **Dr. sc. Gordan Lauc**, redoviti profesor u trajnom zvanju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Ocjenjivači: **Dr. sc. Toma Keser**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Ivan Gudelj**, docent Sveučilišta u Rijeci Odjela za Biotehnologiju  
**Dr. sc. Edvard Galić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog Fakulteta

Rad prihvaćen: 17. siječnja 2024.



## Basic documentation card

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

Doctoral thesis

# **N-GLYCOSYLATION OF TOTAL PLASMA PROTEINS AND IMMUNOGLOBULIN G IN ATRIAL FIBRILLATION**

**Branimir Plavša**

## **SUMMARY**

Atrial fibrillation is a disease with a complex pathophysiology whose onset and persistence are caused not only by irregular electric signalling, but also the development of changes in the heart muscle itself which form the substrate that is susceptible to disease progression. Changes such as interstitial fibrosis and the accumulation of epicardial adipose tissue are caused by a local inflammatory response and also support further inflammation. *N*-glycans of total plasma proteins and immunoglobulin G (IgG) have been shown to be biomarkers for many diseases, especially those with pronounced inflammatory or metabolic components such as diabetes, hypertension and cardiovascular diseases. These conditions are also risk factors for atrial fibrillation and are therefore potentially connected to the development and progression of the atrial fibrillation. Important role of plasma protein *N*-glycosylation and IgG specifically in the inflammatory response, as well as the aforementioned association with atrial fibrillation risk factors warrant the study of *N*-glycosylation of total plasma proteins and IgG in atrial fibrillation. To assess potential changes in *N*-glycosylation we analysed IgG and total plasma protein *N*-glycomes of 172 patients with atrial fibrillation and compared them to the glycomes of 54 healthy controls. Patients also underwent catheter ablation and samples were collected in two timepoints, first immediately before the procedure, and the second after the six-month follow-up during which time the patients were monitored for recurrence of atrial fibrillation. *N*-glycosylation analysis was performed using a high-throughput ultra-high performance liquid chromatography method. One oligomannose plasma *N*-glycan and six IgG *N*-glycans showed statistically significant differences between patient and control groups. Changes were more extensive in IgG and the changes specific to atrial fibrillation were the decreased levels of bisecting structures. Also, four plasma *N*-glycans, mainly oligomannose structures were associated with recurrence of atrial fibrillation during the six-month period. IgG *N*-glycome also extensively correlated with the CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc risk score for stroke wherein an increase in risk score was followed by a greater shift towards the proinflammatory IgG glycan profile. This was the first study that compared patients with atrial fibrillation and healthy controls and the findings provide a basis for further glycomic studies of atrial fibrillation.

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

Thesis contains: 90 pages, 11 figures, 13 tables and 140 references. The original was written in Croatian.

Keywords: *N*-glycosylation, *N*-glycans, Atrial fibrillation, Immunoglobulin G *N*-glycans, Total plasma protein *N*-glycans, UPLC

Mentor: **Gordan Lauc, PhD**, *Full professor with tenure, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Reviewers: **Toma Keser, PhD**, *Assistant professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*  
**Ivan Gudelj, PhD**, *Assistant professor, University of Rijeka, Department of Biotechnology*  
**Edvard Galić, PhD**, *Associate professor, University of Zagreb Faculty of Medicine*

Thesis was accepted: January 17<sup>th</sup>, 2024.