N-glikozilacija plazmatskih proteina kao potencijalni biljeg za predviđanje točne terapijske doze varfarina

Ljubica, Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:163:497791

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Josip Ljubica

N-glikozilacija plazmatskih proteina kao potencijalni biljeg za predviđanje točne terapijske doze varfarina

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019

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

Zahvaljujem se mentoru, dr.sc. Tomi Keseru, na pruženoj pomoći, strpljenju i stručnom vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada. Hvala svim prijateljima koji su učinili studentske dane razdobljem kojeg ću se uvijek rado sjećati. Hvala i mojoj obitelji koja mi je uvijek bila bezuvjetna podrška. I na kraju hvala mojoj Danieli na strpljenju i ljubavi u svim trenucima kroz koje smo zajedno prošli za vrijeme studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Varfarin 1
1.1.1. Farmakodinamika i farmakokinetika 1
1.1.2. INR i doziranje 2
1.1.3. Polimorfizam gena VKORC1 i CYP2C9 4
1.2. Glikozilacija 6
1.3. Glikani 8
1.3.1. Tipovi N-vezanih glikana 11
1.4. Alfa-1 kiseli glikoprotein 12
1.4.1. Utjecaj glikozilacije alfa-1 kiselog glikoproteina na vezanje varfarina 12
1.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama 13
2. OBRAZLOŽENJE TEME 15
3. MATERIJALI I METODE 16
3.1. Materijali 16
3.2. Ispitanici 18
3.3. Izolacija N-glikana s plazmatskih glikoproteina 18
3.3.1. Deglikozilacija proteina plazme 18
3.3.2. Obilježavanje, pročišćavanje i eluacija N-glikana plazme 19
3.4. Kromatografska analiza N-glikozilacije 21
4. REZULTATI 22
4.1. Pouzdanost analize 23
4.2. Statistička obrada 24
5. RASPRAVA 29
6. ZAKLJUČAK 31

7. LITERATURA 32
8. SAŽETAK/SUMMARY 35
8.1. Sažetak 35
8.2. Summary 36
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. Varfarin

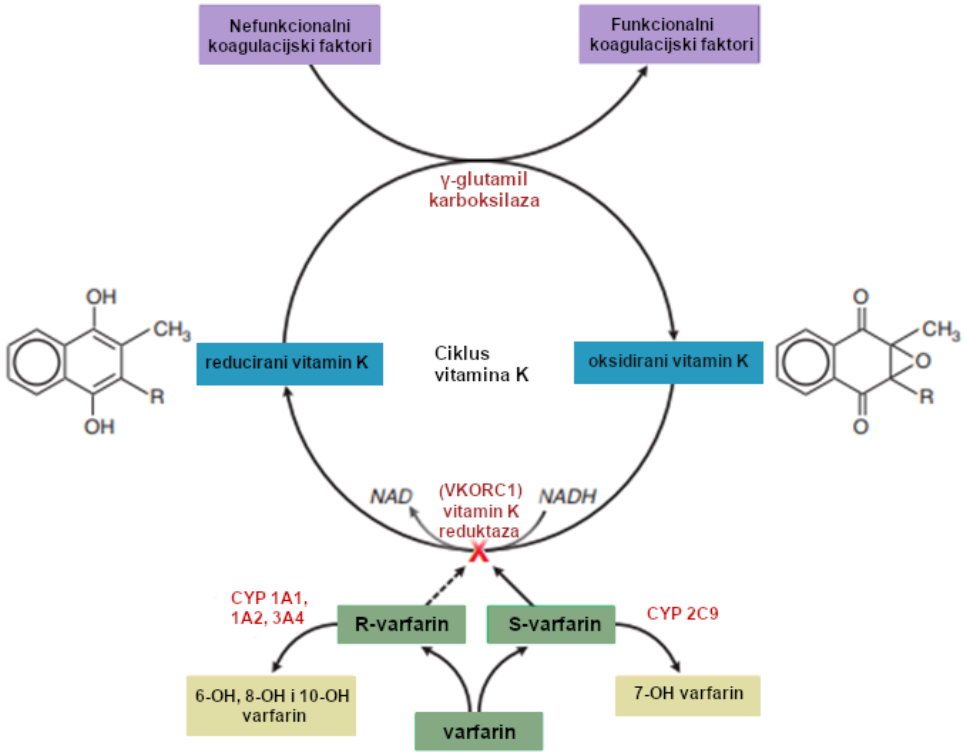
Varfarin je najstariji i najkorišteniji antikoagulacijski lijek. Povijest njegovog otkrića seže u 1920. godinu kada je masovni pomor stoke u SAD-u i Kanadi pripisan stočnoj hrani koja je sadržavala nedovoljno osušeni žuti kokotac (*Melilotus officinalis*) koji sadrži kumarin - spoj kojeg plijesni oksidacijom prevode u dikumarol, koji pokazuje antikoagulacijsko djelovanje zbog kojeg je kod stoke, koja se hranila tim sijenom, izazvano fatalno unutarnje krvarenje (Wardrop i Keeling, 2008). Po uzoru na dikumarol, 1948. godine je sintetiziran varfarin - kumarinski derivat molekulske formule $C_{19}H_{16}O_4$. Registriran je 1952. godine kao rodenticid (štakorski otrov), a potom ga je 1954. godine Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) odobrila za upotrebu kod ljudi. Varfarin se najčešće doživotno koristi za prevenciju sistemskih embolija u pacijenata s atrijskom fibrilacijom, bolešću srčanih zalistaka ili s umjetnim srčanim zaliscima. Koristi se također za terapiju i prevenciju duboke venske tromboze i plućne embolije te sekundarnu prevenciju tromboembolijskih komplikacija od kojih su najčešći moždani udar sistemska embolija nakon infarkta miokarda (http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Martefarin-3-mg-tablete/14513/).

1.1.1. Farmakodinamika i farmakokinetika

Varfarin uzrokuje depleciju aktivnog oblika vitamina K kompetitivnom inhibicijom enzima vitamin K epoksid reduktaza kompleks 1 (VKORC1) blokirajući pretvorbu oksidiranog oblika vitamina K u reducirani oblik vitamina K koji je esencijalni kofaktor u procesu aktivacije faktora koagulacije u jetri (Slika 1). Aktivacija faktora koagulacije ostvaruje se γ-karboksilacijom njihovih glutamatnih ostataka, a faktori kojima je nužna dostupnost vitamina K za aktivaciju su: protrombin, faktori II, VII, IX, X i u manjoj mjeri protein C i protein S. Varfarin na taj način uzrokuje stvaranje biološki inaktivnih koagulacijskih faktora.

Varfarin je racemična smjesa (S)-varfarina i (R)-varfarina pri čemu je S-varfarin 2-5 puta potentniji od (R)-enantiomera s obzirom na antikoagulacijski učinak. Lijek se potpuno i brzo apsorbira, a čak 98-99 % varfarina vezano je za proteine plazme zbog čega ima mali volumen raspodjele. Potpuni terapijski učinak varfarina ostvaruje se tek nakon 5–7 dana pa je zbog toga pri akutnoj tromboembolijskoj komplikaciji (plućna embolija ili duboka venska tromboza)

potrebno u tom periodu davati i parentaralni antikoagulans (Turpie i sur., 2002). Varfarin se gotovo potpuno eliminira metabolizmom u jetri do inaktivnih metabolita. (R)-varfarin se najviše metabolizira putem CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4 i karbonil reduktaze, dok je (S)-varfarin gotovo potpuno metaboliziran putem polimorfnog enzima CYP2C9 (http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Martefarin-3-mg-tablete/14513/).



Slika 1. Mehanizam djelovanja varfarina (prilagođeno prema: Brunton i sur., 2011)

1.1.2. INR i doziranje

Da bismo smanjili proces zgrušavanja na siguran i efikasan način potrebno je djelovanje varfarina provjeravati praćenjem laboratorijskih parametara koagulacije i postići koncentraciju lijeka koja će održavati proces zgrušavanja na ispravnoj razini. Biokemijska veličina koju koristimo kao mjeru za evaluiranje učinkovitosti varfarina naziva se protrombinsko vrijeme (PV). Ono je definirano kao vrijeme potrebno da dođe do zgrušavanja u plazmi, odnosno vrijeme potrebno da se uz dodatak tromboplastinskog reagensa protrombin pretvori u trombin. Međutim, terapijski raspon za oralnu antikoagulacijsku terapiju se ne definira protrombinskim vremenom, već vrijednostima međunarodnog normalizirajućeg omjera (eng. *The international normalised ratio*, INR) koji se računa pomoću sljedeće formule:

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

INR predstavlja omjer izmjerenog protrombinskog vremena pacijenta i srednje vrijednosti protrombinskog vremena referentne plazme (Katzung i sur., 2012). Omjer je potenciran faktorom ISI - međunarodnin indeksom senzitivnosti (eng. *The international sensitivity index*). Međunarodni indeks senzitivnosti je veličina koja opisuje osjetljivost tromboplastinskog reagensa, pri čemu je ISI za referentni reagens, s kojim se ostali reagensi uspoređuju, jednak 1.0. Zbog navedene varijabilonsti tromboplastina koji se koristi za mjerenje protrombinskog vremena INR podliježe standardizaciji. Ciljne vrijednosti INR-a variraju ovisno o indikaciji za koju je varfarin propisan. Preporučene vrijednosti INR-a za profilaksu i terapiju tromboembolijskih bolesti su između 2.0 i 3.0 dok pacijenti s umjetnim srčanim zaliscima imaju povećani rizik od tromboze pa je za njih preporučen raspon 2.5-3.5 (http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Martefarin-3-mg-tablete/14513/). Terapija varfarinom se najčešće započinje standardnom dozom od 5-10 miligrama na dan, a mjerenja vrijednosti INR-a provode se svaki dan sve dok se ne postigne stabilna ciljna razina, za što je obično potrebno 5 do 6 dana od početka liječenja (Katzung i sur., 2012; Eckhoff i sur., 2004). Ukoliko nakon uspostave ciljnih vrijednosti INR-a nema vidljivih simptoma odstupanja od terapijskog raspona, predlaže se mjerenje svakih 4 - 6 tjedana.

Stabilne doze za postizanje ciljanog INR-a mogu varirati između 1 i 20 mg varfarina po danu. Taj učestali proces prilagođavanja adekvatne doze može potrajati tjednima, a za to vrijeme pacijenti su izloženi povećanom riziku od krvarenja ili stvaranja ugruška (Johnson i sur., 2011).

S obzirom na navedenu problematiku, u današnje vrijeme liječnici sve češće propisuju nove oralne antiokoagulanse (dabigatran, rivaroksaban i apiksaban) jer oni ne zahtijevaju praćenje vrijednosti INR-a (Loo i sur., 2017). Ostale terapijske prednosti NOAK-a u odnosu na varfarin su: predvidljiva farmakokinetika, veći terapijski raspon, brži nastup djelovanja i manji broj interakcija s lijekovima i hranom. Ipak, u nekim situacijama je varfarin lijek izbora (Mekaj i sur., 2015). Najvažniji faktor zbog kojeg se varfarin i dalje učestalo propisuje u Hrvatskoj je njegova cijena. Budući da se NOAK-i nalaze na dopunskoj listi lijekova za većinu indikacija, potrebno je nadoplaćivanje od strane pacijenata, a to si neki pacijenti ne mogu priuštiti. S druge strane varfarin je na osnovnoj listi lijekova što znači da punu cijenu plaća HZZO (Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje).

1.1.3. Polimorfizam gena VKORC1 i CYP2C9

Budući da je velik dio populacije i dalje na terapiji varfarinom, razvijaju su se nove metode koje omogućuju brže i preciznije postizanje njegovih terapijskih koncentracija. CYP2C9 je enzim iz superporodice citokroma P450 koji je primarni metabolizator (S)-varfarina. Gen koji kodira CYP2C9 ima 30 poznatih alelnih varijanti od kojih su najznačanije *CYP2C9*1, CYP2C9*2 i CYP2C9*3.* Navedeni aleli se razlikuju zbog polimorfizma jednog nukleotida (SNP - *single nucleotide polymophism*). Osobe koje su homozigoti za *CYP2C9*1* alel imaju fenotip „normalnog metabolizatora". S druge strane, oni (vrijedi za ljude europskog porijekla) koji imaju alelne varijante *CYP2C9*2 i CYP2C9*3* pokazuju 30-40, odnosno 80-90 posto slabiji metabolizam (S)-varfarina. Pacijenti koji su naslijedili jednu ili dvije kopije *CYP2C9*2 ili CYP2C9*3* alela, u odnosu na one koji su homozigoti za *CYP2C9*1,* imaju znatno veći rizik od nuspojava povezanih s krvarenjem tijekom terapije varfarinom te zahtijevaju manju dozu za postizanje istog antikoagulacijskog učinka. Također, potrebno im je više vremena da postignu ciljne vrijednosti INR-a (Johnson i sur., 2011).

Uz *CYP2C9,* u farmakogenomski test ulazi i gen *VKORC1* koji kodira protein vitamin K-epoksid reduktazu kompleks 1 - enzim kojeg inhibira varfarin. Najučestaliji polimorfizam *VKORC1* gena je mutacija gvanina u adenin na lokusu 1639 (1639G>A). Polimorfizam se događa u promotorskoj regiji gena *VKORC1* te se zbog toga mijenja vezno mjesto transkripcijskog faktora. Posljedično dolazi do slabije ekspresije proteina, odnosno smanjene sinteze enzima VKORC1. Ovaj se polimorfizam također povezuje s povećanom osjetljivošću na varfarin i stoga su u tom slučaju potrebne manje doze održavanja terapijskih koncentracija. Dakle, pacijenti koji imaju barem jednu kopiju „A" alela na 1639 lokusu zahtjevaju manju inicijalnu dozu u usporedbi s pacijentima koji su homozigoti za „G" (Dean, 2012).

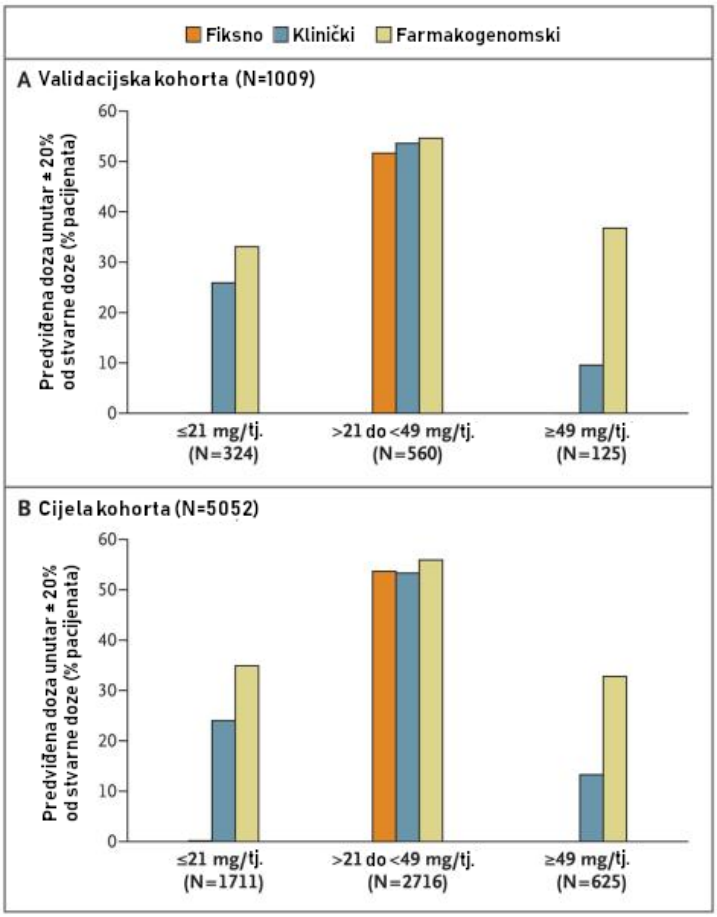
2010. godine Američka agencija za hranu i lijekove dodala je u sažetak opisa svojstava lijeka (Tablica 1) preporuku o inicijalnom doziranju varfarina za pacijente s određenim genotipskim kombinacijama, navodeći kako one mogu biti korisne u određivanju optimalne doze za liječenje (Johnson i sur., 2011).

VKORC1 1639G>A	CYP2C9*1/ *1	CYP2C9*1/ *2	CYP2C9*1/ *3	CYP2C9*2/ *2	CYP2C9*2/ *3	CYP2C9*3/ *3
GG	5-7	5-7	3-4	3-4	3-4	0,5-2
GA	5-7	5-7	3-4	3-4	0,5-2	0,5-2
AA	3-4	3-4	0,5-2	0,5-2	0,5-2	0,5-2

Tablica 1. Preporučene dnevne doze varfarina u miligramima za postizanje terapijskog INR-a za pacijente s određenim polimorfizmima enzima CYP2C9 i VKORC1 (prilagođeno prema: Johnson i sur., 2011)

2018. godine provedena je meta analiza 18 randomiziranih kontroliranih studija koje su uspoređivale učinkovitost i sigurnost farmakogenomski vođene terapije i konvencionalne strategije doziranja varfarina. Ukupno 2626 genotipiziranih pacijenata (63,3 ± 5,8 godina starosti; 46% muškarci) i 2604 pacijenata koji su bili na konvencionalnom režimu doziranja (64,7 ± 6,1 godina; 46% muškarci) praćeni su tijekom 64 dana. Uspoređujući s konvencionalnin načinom doziranja varfarina, doziranje temeljeno na genotipizaciji je značajno skratilo vrijeme postizanja stabilnog INR-a. Doziranje kojem je prethodilo testiranje na genski polimorfizam je povećalo vrijeme provedeno u terapijskom rasponu i smanjilo pojavu prekomjernog antikoagulacijskog učinka, a time i glavnu nuspojavu - krvarenje. Među dvjema grupama nije pronađena nikakva razlika u mortalitetu i tromboemboličkim događajima (Tse i sur., 2018).

Najveća diskrepancija predviđene i potrebne terapijske doze varfarina očituje se kod pacijenata koji zahtijevaju jako male ili jako velike doze (Slika 2). Klein i suradnici su proveli prospektivno kohortno istraživanje na uzorku od 5052 pacijenta sa stabilnim vrijednostima INR-a koji su bili podjeljeni u dvije kohorte. U validacijskoj kohorti, farmakogenomski algoritam je u odnosu na klinički točno predvidio dozu većem postotku pacijenata koji su tjedno trošili manje od 21 mg varfarina (49.4% naprama 33.3%, $P<0.001$). U skupini pacijenata koji su trošili između 21 i 49 mg varfarina tjedno, predviđanje doze je bilo skoro jednako točno. U skupini pacijenata koji su trošili više od 49 mg tjedno farmakogenomski algoritam predviđanja je u odnosu na klinički točno predvidio doze većem broju pacijanata (24.8% naprama 7.2%, $P<0.001$). Vidljivo je da farmakogenomski testovi značajno poboljšavaju predviđanje doze za pacijente koji zahtijevaju jako velike i jako male doze varfarina (Klein i sur., 2009).



Slika 2. Usporedba triju pristupa predviđanja inicijalne doze varfarina (prilagođeno prema: Klein i sur., 2009)

1.2. Glikozilacija

Glikozilacija je kompleksan, enzimski, kotranslacijski i posttranslacijski proces vezanja jednog ili više složenih ugljikohidratnih lanaca (glikana) na proteine, lipide ili druge organske molekule. Ona se događa u svim domenama života od arhebakterija i eubakterija do eukariota (Spiro, 2002). Glikani, zajedno s polipeptidnom okosnicom, doprinose strukturnoj i funkcionalnoj raznolikosti proteina; oni utječu na fizikalna svojstva proteina kao što su: topljivost, stabilnost i konformacija. Nasuprot polipeptidima, koji su definirani sekvencom nukleotida odgovarajućeg gena, glikani su određeni kompleksnom dinamičkom interakcijom tisuća enzima i njihovih supstrata, transkripcijskih faktora, ionskih kanala i brojnih okolišnih čimbenika. Zbog velikog opsega u varijacijama vrsta ugljikohidrata, među-šećernih povezivanja (anomerna konfiguracija, mjesto grananja) zajedno s višestrukim potencijalnim mjestima glikozilacije na proteinu, kompleksnost glikoma nadilazi kompleksnost genoma za

nekoliko redova veličine (Krištić i Lauc, 2017). Mnogi glikani plazmatskih glikoproteina su identificirani kao potencijalni markeri za karcinom te bi se mogli koristiti u dijagnostičke i terapijske svrhe. Nadalje, populacijske studije ukazuju na velike interindividualne razlike u varijabilnosti glikozilacije proteina, a te se razlike povezuju s predispozicijama za razvoj bolesti, prognozom bolesti i odgovorom na terapiju. Promjenjena glikozilacija je zabilježena u mnogim bolestima uključujući rak, dijabetes, autoimune, upalne, infektivne i neurodegenerativne bolesti. Zbog kemijske i biološke kompleksnosti glikana, znanstvena spoznaja o njima zaostaje za znanjem o genima i proteinima. Upravo zato se interes za istraživanjem u području glikomike rapidno povećava (Krištić i Lauc, 2017).

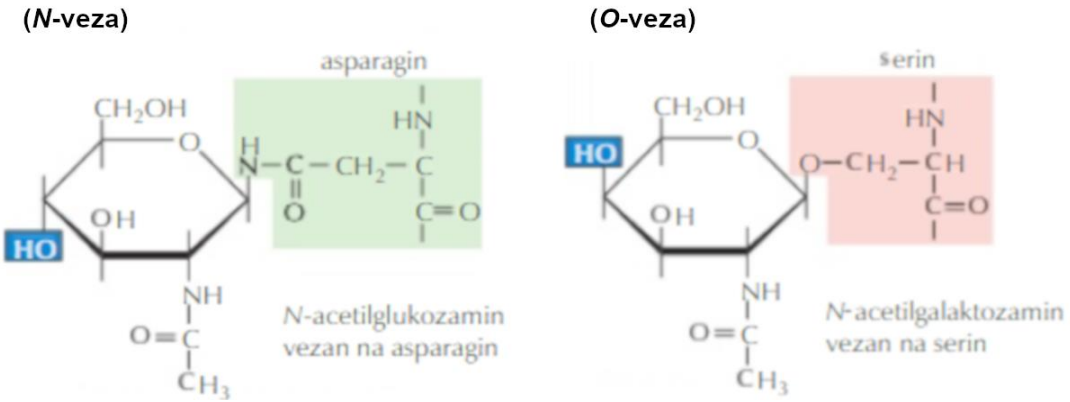
Glikozilirani proteini se uglavnom izlučuju van stanice ili su smješteni na staničnoj površini. Osim što služe kao mjesta prepoznavanja u međustaničnim reakcijama, važna uloga ugljikohidratnih lanaca je smatanje proteina u endoplazmatskom retikulumu i njihovo usmjeravanje u odgovarajuće stanične odjeljke (Cooper i Hausman, 2010). Jedna od osnovnih uloga glikozilacije u smatanju i sortiranju proteina jest obilježavanje nepravilno i nepotpuno smotanih proteina prilikom procesiranja glikana u endoplazmatskom retikulumu. Obilježeni proteini se vežu za kalneksin i kalretikulin - glikoproteine koji potpomažu pravilno smatanje novosintetiziranih glikoproteina u endoplazmatskom retikulumu (Lamriben i sur., 2016). Za međustanično prepoznavanje ključni su glikan-vezujući proteini - proteini stanične membrane koji specifično prepoznaju površinske glikane s drugih stanica. Najpoznatija skupina takvih glikoproteina su lektini, a prepoznavanje glikana lektinima temelji se na specifičnim interakcijama koje se ostvaruju domenom koja veže ugljikohidrate. Ovakve glikan - lektin interakcije su važne za mnoge biološke procese, uključujući staničnu adheziju (spajanje spermija i jajne stanice) i migraciju stanica (prijenos L-selektina u upaljeno tkivo), vezanje patogena (hemaglutinin - glikoprotein ovojnice virusa influence koji prepoznaje sijalinsku kiselinu na stanicama domaćina), kao i razlikovanje naših od stranih stanica (Krištić i Lauc, 2017).

1.3. Glikani

Vezanje glikana na proteine odvija se posttranslacijski ili kotranslacijski u endoplazmatskom retikulumu ili Golgijevom tijelu. Pritom su glikani na protein vezani N- ili O-glikozidnom vezom (Slika 3).

N-vezani glikani nastaju stvaranjem N-glikozidne veze između kisikovog atoma N-acetilglukozamina i asparaginskog (Asn) amidnog dušika u proteinu. Asparagin na koji se veže glikan je dio aminokiselinskog slijeda Asn-X-Ser ili Asn-X-Thr, pri čemu X može biti bilo koja od aminokiselina, osim prolina. Prisutnost aminokiselinske sekvence Asn-X-Ser/Thr je nužan, ali ne i dovoljan uvjet za prijenos N-glikana zbog konformacijskih ili drugih ograničenja prilikom smatanja proteina, Također, ako aminokiselina X posjeduje kiselu skupinu (aspartat ili glutamat) afinitet za glikozilaciju na tom mjestu je smanjen.

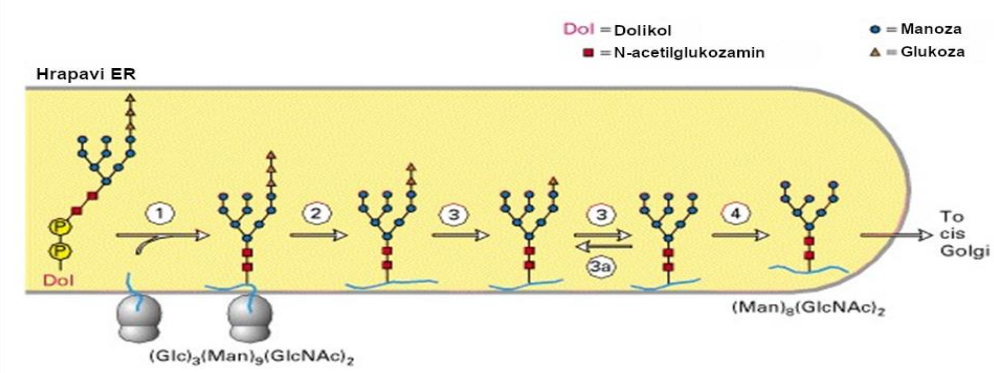
O-vezani glikani vežu se O-glikozidnom vezom najčešće na kisikov atom serina ili treonina preko N-acetilgalaktozamina ili mnogo rjeđe preko N-acetilglukozamina, manoze ili fukoze. Nasuprot N-glikozilaciji, ponavljajući obrazac za adiciju N-acetilgalaktozamina na proteine nije pronađen, iako neki predviđajući algoritmi postoje (Brockhausen i sur., 2009). O-vezani glikani su kratki - najčešće sadržavaju 1-4 šećerna ostatka, dok tipični N-vezani glikani imaju nekoliko grana, koje najčešće završavaju negativno nabijenom sijalinskom kiselinom (Lodish i sur., 2000).



Slika 3. Prikaz N-vezanih i O-vezanih glikana (Cooper i Hausman, 2010)

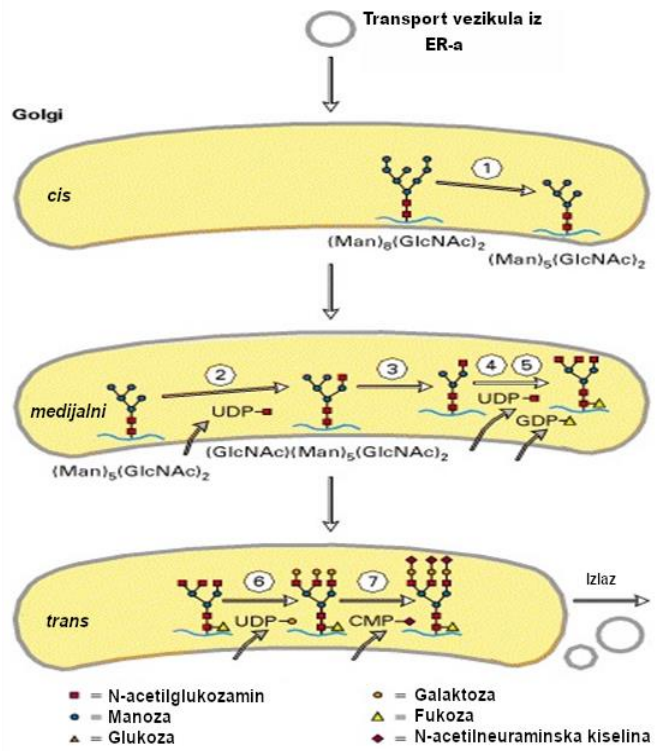
Biosinteza svih N-vezanih glikana započinje u hrapavom endoplazmatskom retikulumu dodavanjem velikog polisaharidnom prekursora koji je vezan pirofosfatnim ostatkom za dolikol - dugolančani poliizoprenoidni lipid, koji je čvrsto ugrađen u membranu endoplazmatskog

retikuluma i služi kao nosač oligosaharida. Taj oligosaharid se stvara na membrani endoplazmatskog retikuluma u nizu reakcija kataliziranih enzimima koji se nalaze na citosolnoj i luminalnoj strani membrane hrapavog endoplazmatskog retikuluma, a kompleks dolikol pirofosfata s oligosaharida je okrenut prema lumenu endoplazmatskog retikuluma. Struktura ovog oligosaharidnog prekursora je ista u biljaka, životinja, jednostaničnih eukariota; sastoji se od triju glukoznih ostataka, devet manoznih ostataka i dva N-acetilglukozamina - $Glc_3Man_9(GlcNAc)_2$. Oligosaharid $Glc_3Man_9(GlcNAc)_2$ se prenosi s dolikolnog nosača na asparaginski ostatak rastućeg proteina uz katalitičko djelovanje enzima oligosaharid transferaze (Lodish i sur., 2000). U trima odvojenim reakcijama, odmah nakon prijenosa oligosaharida na nascentni polipeptid, sva tri glukozna i jedan manozni ostatak se uklanjaju trima različitim enzimima (Slika 4). Tri glukozna ostatka, koji se zadnji dodaju u sintezi $(Glc)_3(Man)_9(GlcNAc)2$ najvjerojatnije služe kao signal da je oligosaharid dovršen i spreman za transfer na protein. U lumenu endoplazmatskog retikuluma nalaze se i glukoziltransferaze koje vraćaju po jedan glukozni ostatak na preostali oligosaharid. Ovaj enzim ne glukozilira nativne, već nepravilno smotane glikoproteine. Endoplazmatski retikulum također sadržava dva povezana lektina - membranski vezani kalneksin i luminalni kalretikulin, koji se selektivno vežu na reglukozilirane gilkoproteine i sprječavaju smatanje obližnjih aminokiselinskih slijedova. Ponekad se proteini spontano disociraju s kalneksina ili kalretikulina te se zatim deglukoziliraju. Ako se nakon toga uspiju pravilno smotati oni nastavljaju svoj put prema Golgijevom kompleksu. Tako kalneksin i kalretikulin sprječavaju prerano smatanje segmenata novonastalog proteina, a nepravilno smotane proteine zadržavaju u endoplazmatskom retikulumu. Takvim proteinima, koji se ne mogu pravilno smotati, uklanjaju se i manozni ostaci te se šalju natrag u citosol na ubikvitiniranje i degradaciju u proteasomu (Cooper i Hausman, 2010).



Slika 4. Reakcije kojima se modificiraju N-vezani glikani u endoplazmatskom retikulumu (prilagođeno prema: Lodish i sur., 2000)

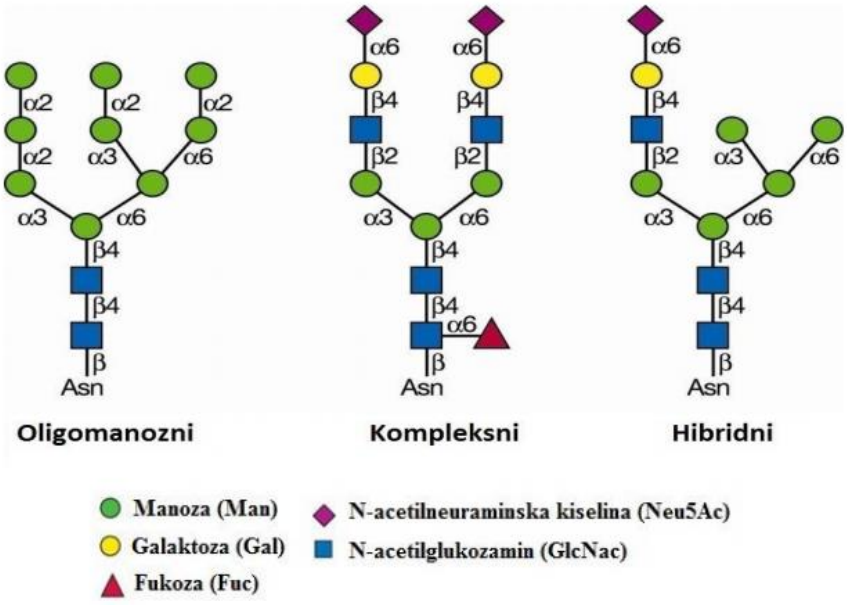
Novonastali proteini koji prolaze kroz N-glikozilaciju u endoplazmatskom retikulumu ulaze u Golgijev kompleks sadržavajući jedan ili više $Man_8(GlcNAc)_2$ oligosaharidnih lanaca. Golgijev kompleks sadrži tri različita dijela - cis, medijalne i trans cisterne od kojih svaka sadrži set različitih enzima za modifikaciju sekretornih i membraniskih proteina. Nakon uklanjanja triju manoznih ostataka (Slika 5) u cis-Golgiju (reakcija 1), protein odlazi u medijalni-Golgi, gdje se u reakciju dodaje UDP-N-acetilglukozamin (reakcija 2). Zatim se uklanjaju dva manozna ostatka (reakcija 3.) te dodaju još dva UDP-N-acetilglukozamina (reakcija 4) i GDP-fukoza (reakcija 5). Procesuiranje se završava u trans-Golgiju katalitičkim dodavanjem triju UDP-galaktoza (reakcija 6) te vezanjem po jedne CMP-N-acetilneuraminske kiseline na svaki galaktozni ostatak (reakcija 7). Varijacije u strukturi N-vezanih glikana se događaju kao rezultat razlika u procesuiranju glikana u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom kompleksu. U nekim slučajevima se reakcija 1 ili reakcija 2 neće dogoditi zbog steričke nedostupnosti N-vezanog oligosaharida u odnosu na enzime koji kataliziraju ove reakcije. Posljedično se daljnje modifikacije glikana neće odviti budući da supstrat sljedećeg enzima ne nastaje. Tako nastali glikoproteini sadrže manozom bogati oligosaharid, umjesto kompleksnog oligosaharida koji bi nastao u reakcijskom putu na slici 6.



Slika 5. Reakcije kojima se modificiraju N-glikani u Golgijevom tijelu (prilagođeno prema: Lodish i sur., 2000)

1.3.1. Tipovi N-vezanih glikana

N-vezani glikani egzistiraju u raznim oblicima, ali ih generalno možemo podijeliti u tri kategorije ovisno o vrsti šećernih jedinica od kojih su građeni. Sve tri skupine imaju zajedničku srž na koju se vežu drugi šećeri, a sastoji se od dvaju N-acetilglukozamina, koji su povezani β1-glikozidnom vezom na amidni dušik asparagina u proteinu i na njih vezane tri manoze. Tri osnovna tipa N-vezanih glikana su: oligomanozni, kompleksni i hibridni (Stanley i sur., 2009, Slika 6) Oligomanozni tip sadrži isključivo manoze vezane na osnovnu glikansku strukturu. Kompleksni tipovi sadrže antene sastavljene od N-acetilglukozamina, galaktoze i N-acetilneuraminske kiseline. Hibridni tipovi su kombinacije prethodnijh dvaju: na jednoj grani se na manozu dodaju još dvije manoze, a na drugoj grani N-acetilglukozamin, galaktoza i N-acetilneuraminska kiselina.



Slika 6. Tipovi N-glikana (prilagođeno prema: Stanley i sur., 2009)

1.4. Alfa-1 kiseli glikoprotein

Alfa-1 kiseli glikoprotein je plazmatski protein molekulske mase 41-43 kDa. Jedan je od glavnih proteina akutne faze u ljudi, štakora, miševa i drugih vrsta, a serumska koncetracija mu se višestruko poveća u stanjima infekcije ili upale. Sačinjava ga polipeptidni lanac koji se sastoji od 183 aminokiseline povezane dvjema disulfidnim vezama. Sintetizira se u hepatocitima, a njegova je genska ekspresija kontrolirana citokinma, od kojih su najvažniji: interleukin 1v, faktor tumorske nekroze, interleukin 6 i s njime povezani interleukini. Ugljikohidratni dio čini 45% molekulske mase ovog glikoproteina, a čine ga visoko sijalizirani, kompleksni N-vezani glikani. Glikanski dio alfa kiselog glikoproteina je podrobno istražen budući da je on jedan od rijetkih serumskih glikoproteina koji uz diantenarne, triantenarne posjeduje i tetraantenarne N-vezane glikane. Svako od 5 potencijalnih glikozilacijskih mjesta alfa-1 kiselog glikoproteina (Asn-15, -38, -54, -75, -85) može na sebi imati vezan bilo koji od prikazanih kompleksnih N-glikana (Fournier i sur., 2000).

Biološke uloge AGP-a nisu u potpunosti poznate, ali je poznato da ima razne imunomodulatorne efekte i veliku sposobnost vezanja mnogih bazičnih i neutralnih lipofilnih tvari i lijekova zbog visokog udjela sijalinske kiseline koja nosi negativan naboj, kao i zbog visoke glikanske razgranatosti (Gornik i Lauc, 2008). Uz humani serumski albumin, alfa-1 kiseli glikoprotein je najvažniji protein plazme koji veže lijekove, smanjujući njihovu bioraspoloživost. U pravilu vrijedi da su lijekovi s kiselim skupinama uglavnom vezani na albumin, no u stanjima bolesti, ukoliko je koncentracija AGP-a povišena ili koncentracija albumina snižena, vezanje tih lijekova na AGP će značajno doprinijeti ukupnom vezanju lijeka na proteine plazme (Urien i sur., 1986).

1.4.1. Utjecaj glikozilacije alfa-1 kiselog glikoproteina na vezanje varfarina

Zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava alfa kiseli glikoprotein uglavnom veže bazične i neutralne tvari egzogenog i endogenog porijekla. Od lijekova može vezati tamoksifen, propranolol i heparin (Fournier i sur., 2000). Međutim, u in vitro uvjetima ustanovljeno je da u stanjima kad je koncentracija alfa-1 kiselog glikoproteina povišena, tada on veže i neke lijekove koji se u normalnim uvjetima vežu za albumin, a posebno one koji se vežu na tzv. Sudlowljevo vezno mjesto 1, na koje se veže varfarin i slične molekule s heterocikličkim prstenovima i delokaliziranim negativnim nabojem (Abou-Zied, 2015, Urien i sur., 1986).

Moguća *in vivo* uloga AGP-a u ukupnom vezanju kiselih lijekova nije u potpunosti ispitana. S obzirom na to da je njegova koncentracija u stanju homeostaze daleko manja u odnosu na albumin, njegov efekt na ukupno vezanje lijeka je upitan (Urien i sur., 1986). Velike varijacije u vezanju bazičnih lijekova na AGP događaju se zbog nekih fizioloških ili patofizioloških stanja u kojima se mijenja razina plazmatske koncentracije alfa kiselog glikoproteina. Ta činjenica ima implikaciju u terapijskom praćenju nekih bazičnih lijekova uske terapijske širine (Fournier i sur., 2000). Budući da je AGP visoko glikoziliran protein, postavlja se pitanje može li N-glikozilacija AGP-a utjecati na njegovo vezanje lijekova te može li se koristiti kao biljeg za pomoć u njihovom doziranju.

1.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama

Od svih tipova tekućinskih kromatografija obrnuto fazna kromatografija je pokazala najširi spektar upotrebe. U obrunuto faznoj kromatografiji stacionarnu fazu čine ugljikovodični lanci različitih duljina koji su vezani na silika gel, dok je mobilna faza polarno otapalo. Iako obrnuto fazna kromatografija ima najširu upotrebu, njen glavni nedostatak je nemogućnost vezanja jako polarnih i hidrofilnih analita. Normalno fazna kromatografija premda svojom polarnom stacionarnom fazom zadržava hidrofilne analite također ne pokazuje prednosti u odnosu na reverzno faznu kromatografiju jer se koriste nepolarna otapala koja su često skupa, toksična i nekompatibilna za dobro otapanje polarnih analita (Dejaegher i sur., 2008). Zbog povećanja složenosti uzoraka za analizu i povećane potrebe za analizom polarnih tvari koje se ne mogu razdvojiti materijalima korištenim u obrnuto faznoj kromatografiji, posljednjih godina dolazi do povećanog interesa za kromatografiju temeljenu na hidrolifnim interakcijama (Boersema i sur., 2008). Tako je i u ovom radu razdvajanje N-glikana provedeno visoko osjetljivom tekućinskom kromatografijom vrlo visoke djelotvornosti koja se temelji na hidrofilnim interakcijama. Stacionarna faza koja se koristi u HILIC kromatografiji je silikagel na koji su kemijski vezane polarne, najčešće amidne i diolne skupine. Mobilna faza u HILIC kromatografiji je polarna, ali manje polarna od mobilne faze u obrnuto faznoj. Sastoji se od smjese organskog otapala koje se miješa s vodom, najčešće acetonitrila u volumnom omjeru 70:30 s vodom. U mobilnu fazu se uobičajeno dodaje amonij acetat ili formijat koji služe kao puferi za kontrolu pH-a i ionske jakosti mobilne faze. HILIC kromatografija također omogućava razdvajanje nabijenih supstanci, poput ionske kromatografije. Iz svega navedenog

vidimo da HILIC kromatografija kombinira metode triju podtipova tekućinske kromatografije: normalno fazne, obrnuto fazne i ionske kromatografije (Buszewski i Noga, 2012). Pretpostavljeni mehanizam razdjeljenja je taj da se analiti raspoređuju između dva sloja mobilne faze - jednog sloja bogatog acetonitrilom i drugog, vodenog sloja, adsorbiranog na hidrofilnoj stacionarnoj fazi. Što je analit hidrofilniji to je ravnoteža više pomaknuta prema imobiliziranom vodenom sloju na stacionarnoj fazi i time se on više zadržava na koloni. Kako se gradijentno povećava koncentracija vode u mobilnoj fazi tako se smanjuje zadržavanje analita i oni se eluiraju s kolone (Buszewski i Noga, 2012).

HILIC kromatografija se pokazala kao pravi odabir za separaciju nenabijenih hidrofilnih i ambifilnih tvari koje su previše polarne da bi se zadržale na stacionarnoj fazi reverzno fazne kromatografije i tvari koje su nedovoljno nabijene da bi se razdvojile ionsko izmjenjivačkom kromatografijom. Glikani su upravo takav tip molekule, stoga je ova metoda razdvajanja adekvatna. Detekcija glikana može se provesti masenim spektrometrom, elektromkemijskim ili fluorescencijskim detektorom. Budući da glikani nemaju kromofore niti skupine koje fluoresciraju, reduktivnom aminacijom se glikani označuju fluorescentnim reagensom. Najčešće se koriste: 2-aminobenzojeva kiselina (2-AA), 2-aminopiridin (2-AP), 2,6-diaminopiridin (DAP), 2-aminonaftalen trisulfonska kiselina (ANTS) i 2-aminobenzamid (2-AB) koji je korišten u ovom radu (Adua i sur., 2017).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nova istraživanja u području glikobiologije potvrdila su da promjene glikanskog profila, uslijed fizioloških, patofizioloških promjena i okolišnih čimbenika pokazuju značajan dijagnostički potencijal (Higai i sur., 2003). S druge strane, utjecaj glikanskog profila na interakciju lijeka i proteina plazme, koja je važna za doziranje lijeka, manje je istražen.

Varfarin, kao lijek uske terapijske širine, zahtijeva razumijevanje svih parametara koji diktiraju njegovo doziranje. Značajan utjecaj polimorfizama gena za CYP 2C9 i VKORC1 enzime na doziranje ovog lijeka je ranije prepoznat. Zbog jasno utemeljene korelacije polimorfizma i doziranja, rezultati genotipizacije uključuju se u procjenu inicijalne doze varfarina kako bi se smanjio rizik od nuspojava lijeka, skratilo vrijeme do postizanja terapijskih vrijednosti parametara koagulacije i postigla stabilnost doze i učinka. No, čak ni genski polimorfizmi, zajedno s kliničkim parametrima nisu uspjeli u potpunosti opisati interindividualnu varijaciju u doziranju varfarina, posebice kod pacijenata koji zahtijevaju jako veliku ili jako malu dozu.

Utjecaj N-glikozilacije plazmatskih proteina na vezanje lijekova nije dovoljno razjašnjen. Cilj ovog rada je ispitati utjecaj glikana proteina plazme na afinitet vezanja varfarina, odnosno utjecaj glikana na doziranje varfarina. Dokazano je *in vitro* da visoki stupanj razgranjenosti N-glikana i antenarna fukozilacija smanjuju afinitet vezanja varfarina za alfa-1 kiseli glikoprotein zbog stvaranja steričkog zaklona na mjesto vezanja, što rezultira većom slobodnom koncentracijom varfarina (Wu i sur., 2018). Ovom hipotezom je započeta izrada ovog rada.

Zbog jednostavnije izrade, eksperiment je započet unatoč nedostacima određivanja glikanskog profila iz plazme bez prethodne izolacije AGP-a. Budući da većina razgranatih, visokosijaliniziranih glikana u ukupnom N-glikomu plazme potječe upravo od AGP-a. Ispitan je *in vivo* efekt glikolizacije AGP-a na doziranje varfarina, koristeći N-glikozilaciju ukupnih proteina plazme kao neizravni biljeg za N-glikozilaciju AGP-a

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Tablica 2. Anorganske kemikalije

Kemikalija	Proizvođač
Dinatrij hidrogenfosfat (Na_2HPO4)	Sigma-Aldrich
Kalij dihidrogenfosfat (KH_2PO4)	Sigma-Aldrich
Kalij-klorid (KCl)	Sigma-Aldrich
Klorovodična kiselina (HCl)	Kemika
Natrij klorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Natrijev hidroksid (NaOH)	Sigma-Aldrich

Tablica 3. Organske kemikalije

Kemikalija	Proizvođač
Acetonitril (ACN)	Fluka
2-aminobenzamid (2AB)	Sigma-Aldrich
2-pikolin boran (2PB)	Sigma-Aldrich
Etanol (C_2H_5OH)	Sigma Aldrich
Ledena octena kiselina (CH_3COOH)	Merck
Amonij formijat ($HCOO\ NH_4$)	Sigma-Aldrich
TFA (trifluoroacetatna kiselina)	Sigma Aldrich
DMSO (dimetilsulfoksid)	Fluka
SDS (natrij-dodecil sulfat) detergent	Sigma
NP-40 Igepal CA630 (oktil-fenoksi-polietoksi-etanol) detergent	Sigma

Tablica 4. Biološki materijali (enzimi)

Enizm	Proizvođač
PNGazaF (peptid-N-glikozidaza)	Prozyme

Tablica 5. Otopine i puferi

Pufer	Priprema
5xPBS	Za 200 ml pufera: 8,00 g NaCl, 1,38 g Na2HPO4, 0,29 g KH2PO4, 0,19 g KCl, sve otopiti u 200 ml ultračiste vode (miliQ) (nakon miješanja otopinu filtrirati i podesiti pH s NaOH)
2% SDS	2 g SDS-a (Na-dodecil sulfata) otopiti u 100 ml vode
30% octena kiselina u DMSO	Za 10 ml otopine: u 3 ml octene kiseline doda se 7 ml dimetilsulfoksida (DMSO)
96% acetonitril	Za 250 ml otopine: dodaje se 240 ml ACN-a i 10 ml H2O, voda se dodaje zbog hidrofilnosti kolone u daljnjoj analizi glikana (HILIC)
otopina za označavanje N-glikana	Za 1 uzorak: u 25 µl 30% octene kiseline u DMSO dodaje se 0,48 mg 2 aminobenzamida i 1,12 mg 2-pikolin borana

Tablica 6. Laboratorijska oprema i pribor

Oprema i pribor	Proizvođač
Pločice za sakupljanje uzoraka, polipropilen, 1 ml zapremnine, za 96 uzoraka	Waters
Pločice za pročišćavanje glikana	Orochem
AcroPrep 96 GHP 0.2 µm filter pločica od 1 ml	Pall
PCR pločice	Frame Star
PCR epruvete u traci („PCR strip tubes“)	Kiagen
Mikropipete (obične i multikanalne uz nastavke)	Ranin
Vacuum manifold – vakumska pumpa	Pall Corporation
Tresilica	IKA - Schüttler MTS 4
Bio Vortex V1	Biosan
Micro Sealer (uređaj za zavarivanje pločica folijom)	Porvair Sciences
Centrifuga	Centifuge 5804 Eppendorf
Vaga	Metller Toledo
Waters Acquity UPLC kromatograf	Waters, Milford
NanoAcquity UPLC analizator	Waters, Milford

3.2. Ispitanici

Ovaj rad obuhvaća 58 ispitanika u dobi od 42 do 96 godina koji su na terapiji varfarinom (Tablica 7). Uzorci su zaprimljeni iz Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ s odijela kardiologije, a zajedno s uzorcima dostavljeni su i podaci o pacijentima. Krv je uzeta na antikoagulans, a zatim je centrifugiranjem odvojena plazma koja je bila smrznuta i skladištena na -20°C do trenutka analize.

Tablica 7. Statistički opis pacijenata čije smo krvne plazme analizirali

Broj ispitanika	58
Udio muškog spola / %	53,4
Udio ženskog spola / %	46,55
INR - medijan (min-max)	1,95 (1,3 - 5,4)
Dob - medijan (min-max)	76,5 (42 - 96)
Dnevna doza / mg - medijan (min-max)	5 (0 - 10)

3.3. Izolacija N-glikana s plazmatskih glikoproteina

3.3.1. Deglikozilacija proteina plazme

Deglikozilacija proteina plazme je nužan korak koji nam omogućuje analizu profila glikozilacije plazmatskih proteina, a ona se ostvaruje pomoću enzima PNGaze F koji specifično kida glikozidnu vezu N-glikana i proteina.

- Priprema

Smrznuti uzorci se nakon odmrzavanja centrifugiraju 10 minuta na 3000 okretaja/min (Centrifuga 5804, Eppendorf). Uzorci, standardi i slijepe probe se nasumično raspoređuju na pločicu za uzorke, kako bi se smanjio utjecaj vanjskih čimbenika na mjerenje. Kao standard su korištene plazme zdravih osoba (nisu na terapiji varfarinom) koje su nasumično nanesene u 5 jažica, a za slijepu probu korištena je ultra čista voda (miliQ). Za analizu glikana plazme iz uzorka je uzet volumen od 10 μl i nasumično pipetiran u jažice (Tablica 8).

Tablica 8. Pozicije na mikrotitarskoj pločici s incijjalima pacijenata

varfarin	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	8022 RD	7008 UH	8037 CF	8119 DI	9122 MB	8080 AM	9119 BJ	7007 VZ	8086 MT
B	8078 PM	7021 KZ	7018 MD	8020 TV	8057 KB	7009 LP	standard 5	8054 RV	8040 ŠS
C	8091 CI	standard 1	9115 ZZ	7007 NI	7057 SH	8147 DG	7032 PSI	9073 CI	9086 SI
D	8140 ŠM	8157 SZ	9058 KB	standard 2	7016 FM	7042 PD	7046 RL	8089 VV	slijepa proba 2
E	7005 DMN	8003 GS	7030 OA	9121 UA	8079 UA	7032 JL	8082 ML	9120 HV	standard 4
F	8126 RR	7055 SM	8160 MM	7054 AM	slijepa proba 1	7031 MM	standard 3	7029 JD	slijepa proba 3
G	7023 BN	9112 KB	8038 DF	9117 MD	7028 HB	9065 CC	8039 ZJ	8034 SS	slijepa proba 4
H	7010 BD	2006 HV	7017 PM	8054 MN	8049 SM	8127 PS	9100 MD	8090 MM	slijepa proba 5

- Denaturacija

U svaku se jažicu na pločici s uzorcima dodaje 20 µL 2%-tnog SDS-a koristeći nastavke za pipete od 250 µL te se uzorci promiješaju uvlačenjem u nastavak pipete. Pločice se zatim dobro zatvore adhezivnom folijom i stave na inkubiranje na 65°C kroz 10 minuta. Poslije inkubacije pločice se moraju 30 minuta hladiti na sobnoj temperaturi te se u svaku jažicu dodaje 10 µL 4%-tnog Igepala. Potom se pločice ostave na njihaljci (IKA® - Schüttler MTS 4) 15 minuta.

- Deglikozilacija

Neposredno prije dodavanja enzima PNGaze F u mikrotitarsku pločicu s uzorcima, potrebno je pripremiti enzimsku smjesu za deglikozilaciju. Pripravljena je u epruveti od 2mL dodatkom 10 µl 5xPBS-a i 0,12µl enzima za svaki uzorak. Kako bi se izbjegle greške pri pipetiranju, dodaje se dodatnih 30 µl 5xPBS-a za svaku pločicu. U svaki se uzorak doda 10 µl enzimske smjese i resuspendira uvlačenjem u nastavak pipete. Pločice se zatim dobro zatvore adhezivnom folijom i inkubiraju 18h na 37°C.

3.3.2. Obilježavanje, pročišćavanje i eluacija N-glikana plazme

Nakon deglikozilacije uzoraka potrebno je glikane očistiti od ostatka proteina, obilježiti ih reagensom koji će omogućiti detekciju na fluorescencijskom kromatografskom detektoru i pripremiti za analizu. Označavanje se provodi reakcijom reduktivne aminacije u kiselim

uvjetima s 2-aminobeznamidom (fluorescentnom bojom) i 2-pikolinboranom (reducirajućim agensom) uz DMSO.

- Obilježavanje N-glikana plazme

U otopinu za obilježavanje dodaje se 25 µl 30% octene kiseline u DMSO, 0,48 mg 2-aminobenzamida i 1,12 mg 2-pikolinborana (neposredno mora biti ugrijan na sobnu temperaturu) po uzorku. Prilikom dodavanja potrebno je krute sastojke dobro otopiti miješanjem i vorteksiranjem otopine. Priprava otopine i samo obilježavanje obavlja se u digestoru. U svaki se uzorak dodaje 25 µl otopine za obilježavanje i promiješa polaganim resuspendiranjem uzorka. Pločica se zatvori adhezivnom folijom i ostavi na njihaljci kroz 10 minuta, nakon čega slijedi inkubacija na 65°C kroz 2 sata. Poslije inkubacije uzorci se ostave 30 minuta da se ohlade na sobnu temperaturu kako bi bili spremni za nanošenje na GHP filter pločicu.

- Pretpriprema GHP pločice

Za vezanje glikana koristi se GHP pločica za 96 uzoraka s hidrofililnom polipropilenskom membranom veličine pora 0,2 µm (AcroPrep GHP 0,2 µm filter pločica od 1 ml). Pretpriprema se sastoji od ispiranja pločice sa: 70% etanolom (200 µl), ultračistom vodom (200 µl) i naposljetku svježe pripremljenim 96% ACN-om (4°C, 200 µl). Svaki od dodanih reagensa se po redu uklanja pomoću vakuumske pumpe (Vacuum manifold, Pall Corporation), pri čemu treba paziti da tlak pumpe nije veći od 5mmHg kako ne bi oštetio membranu GHP pločice. Nakon prekondicioniranja uzorci se postavljaju na GHP pločicu.

- Nanošenje i pročišćavanje obilježenih N-glikana na GHP ploči

U svaku jažicu se dodaje 700 µL hladnog 100% ACN-a uz promjenu nastavka pipete za svaki uzorak kako bi se izbjegla kroskontaminacija. Potom se uzorci iz svake jažćice promiješaju uvlačenjem u nastavak pipete te se koristeći isti nastavak pažljivo prenese ukupan volumen uzorka (oko 800 µL) u jažicu GHP pločice. GHP pločica se inkubira 2 minute, a zatim se vakuumira u otpad pritom pazeći da tlak vakuumske pumpe ne prijeđe 5mmHg. Zatim započinje proces pročišćavanja glikana. Potom se pipetira 200 µL hladnog 96% ACN-a u svaku jažicu te vakuumira u otpad. Zadnji korak se ponavlja još tri puta nakon čega se GHP pločica stavi na vrh stalka dvo-mililitarske pločice i pipetira se 200 µL hladnog 96% ACN-a u svaku jažicu te se GHP pločica centrifugira 5 minuta na 1000 rpm.

- Eluiranje označenih N-glikana

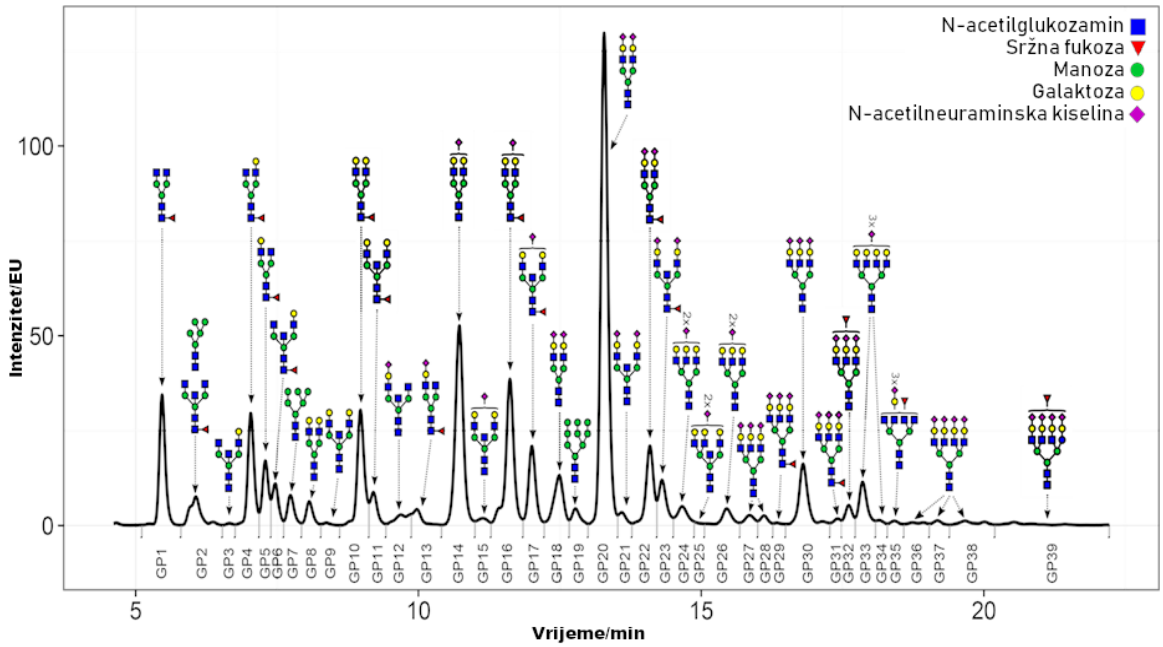
GHP pločica se stavi na vrh čiste ABgene PCR pločice. U svaki uzorak se dodaje 90 µL ultra čiste vode koristeći 300 µL nastavke za pipete i stavi se na njihaljku 15 minuta. Zatim se GHP pločica centrifugira 5 minuta na 1000 rpm kako bi se sakupila prva frakcija eluata u PCR pločicu. Ponovi se postupak dodavanja ultra čiste vode i stavljanja na tresilicu te centrifugiranja i sakuplja se druga frakcija eluata u PCR pločicu. Na kraju se provjerava ukupan volumen eluata (180 µL). PCR pločica zatim se zatvori PCR poklopcem i pohrani u zamrzivač.

3.4. Kromatografska analiza N-glikozilacije

N-glikani plazme, obilježeni fluorescencijskim reagensom 2-aminobenzamidom, analiziraju se HILIC-UPLC kromatografskom metodom na Waters Acquity UPLC analizatoru (Milford, MA, SAD). Analizator se sastoji od pumpe koja propušta mobilnu fazu, kolone, automatskog injektora za uzorak i fluorescentnog detektora (s valnom duljinom od 330 nm za ekscitaciju i 420 za emisiju). Acquity UPLC BEH Glycan kolona ima dimenzije 150 x 2,1 mm i punjena je česticama veličine 1,7 µm. Glikani su nošeni mobilnom fazom, koju čine 100 mM amonij formijat (otapalo A, pH 4,40) i acetonitril (otapalo B). Acetonitril s linearnim gradijentom od 70 – 52 % i brzinom protoka od 0,561 ml/min postiže najbolje uvjete razdvajanja glikana tijekom 25 minuta trajanja razdvajanja na koloni pri temperaturi kolone od 25°C. Kolona se ispire s amonij formijatom (otapalo A) i rekondicionira na početne uvjete (30% otapalo A i 70% otapalo B) tijekom 26-32 minute. Optimiziranje uvjeta postavlja se i regulira pomoću Empower programa (Waters), iz kojeg se ekstrahiraju rezultati analiza. Rezultati se također obrađuju u programu Empower, u kojem se ručno integriraju površine ispod kromatografa, nakon čega slijedi statistička obrada podataka u Excellu (verzija 1808, Microsoft office) i programu R (verzija 3.3.3, https://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/3.3.3/).

4. REZULTATI

Nakon deglikozilacije N-glikani obilježeni su s fluorescirajućim reagensom 2-aminobenzamidom i razdvojeni visokotlačnom tekućinskom kromatografijom temeljenoj na hidrofilnim interakcijama (HILIC UPLC). Kromatogrami su podijeljeni u 39 kromatografskih vršaka (GP1-GP39), kao što se vidi na slici 7. pri čemu čemu je svakom vršku pridružen određeni glikan. Redoslijed izlaza s kolone odgovara pretpostavljenom mehanizmu razdiobe - prve su eluirale manje i hidrofobnije molekule, dok polarnije, nabijene i veće molekule eluiraju zadnje. Posljednja 4 kromatografska vrška (GP36-GP39) predstavljaju iznimno nabijene glikane bogate sijalinskom kiselinom, koje navjerojatnije većinom potječu od AGP-a.



Slika 7. Prikaz kromatograma dobivenih glikanskih skupina nakon razdvajanja N-glikana HILIC-UPLC metodom

Osim uzoraka ispitanika, u analizu su uključeni standardi - uzorci plazme zdravih ljudi koji nisu na terapiji varfarinom. Oni su nasumično raspoređeni u nekoliko jažica kako bi se ispitao utjecaj vanjskih čimbenika tijekom pohrane i analize uzoraka. Na ploči s uzorcima je zbog ispitivanja kroskontaminacije u prethodnim koracima dodana i ultračista voda (miliQ) kao slijepa proba.

4.1. Pouzdanost analize

Računajući srednju vrijednost relativne površine kromatografskih vršaka standarnih otopina i pripadjući RSD, odnosno koeficijent varijacije, ispitana je preciznost metode (Tablica 9). Kriterij prihvatljivosti za preciznost metode ovisi o tipu analize. Za biološke uzorke traženo je relativno standardno odstupanje manje od 10-15%.

Tablica 9. Koeficijent varijacije standarda za svaku glikansku skupinu

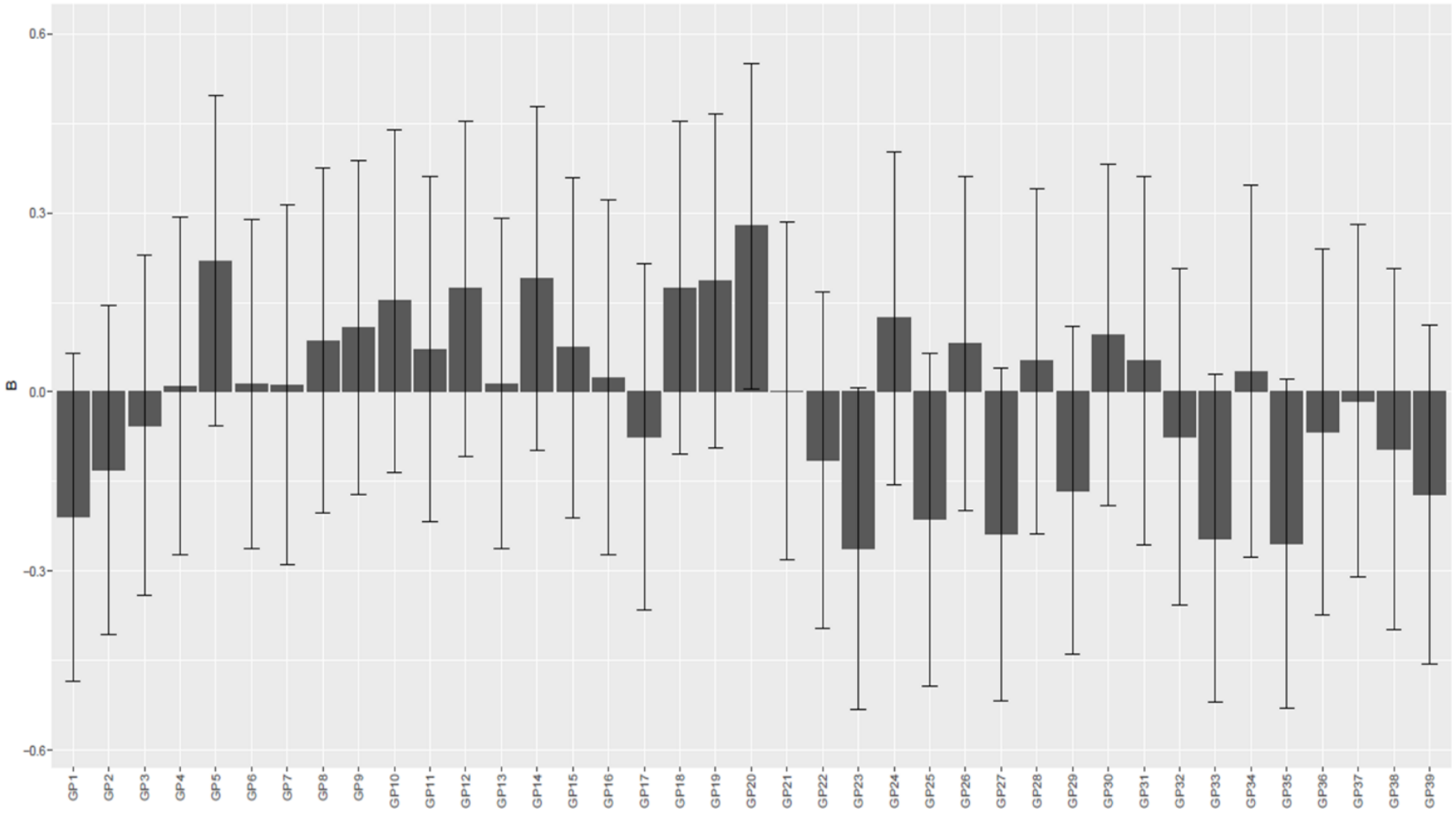
Glikan	**Srednja vrijednost**	**Koeficijent varijacije**	**Glikan**	**Srednja vrijednost**	**Koeficijent varijacije**
GP1	6,4	6,1%	GP21	0,5	3,5%
GP2	1,8	5,7%	GP22	3,2	3,5%
GP3	0,1	9,8%	GP23	1,7	3,4%
GP4	5,9	4,5%	GP24	2,2	4,1%
GP5	3,1	5,5%	GP25	0,1	19,1%
GP6	1,4	4,1%	GP26	1,8	3,9%
GP7	1,1	6,6%	GP27	0,9	3,2%
GP8	1,7	6,6%	GP28	0,7	3,6%
GP9	0,1	6,4%	GP29	0,2	17,1%
GP10	5,0	2,9%	GP30	4,8	3,1%
GP11	1,0	6,4%	GP31	0,4	6,6%
GP12	1,1	3,1%	GP32	1,1	3,5%
GP13	0,9	5,3%	GP33	2,0	3,5%
GP14	13,4	3,5%	GP34	0,3	7,1%
GP15	0,4	7,2%	GP35	0,2	4,9%
GP16	6,0	2,7%	GP36	0,4	5,9%
GP17	2,1	4,5%	GP37	0,4	2,9%
GP18	3,3	2,5%	GP38	0,6	5,2%
GP19	1,0	5,4%	GP39	0,4	10,8%
GP20	22,3	3,5%	**PROSJEK**		**5,6%**

S obzirom na to da je izračunato relativno standardno odstupanje 5,6% zaključujemo da kromatografija pokazuje zadovoljavajuću preciznost.

4.2. Statistička obrada

Nakon kromatografske analize manulano su integrirane površine ispod vršaka kromatograma za svaki uzorak uz pomoć računalnog programa Empower. Metodom linearne regresije u računalnom programu R (verzija 3.3.3) procijenjen je efekt i statistička značajnost povezanosti površine pika svakog glikana, normaliziranog na ukupnu površinu s potrebnom dozom varfarina. Pritom smo koristili opći linearni model prilagođen po dobi i spolu (Slika 8).

Nakon statističke obrade površina, dobivene su odgovarajuće p-vrijednosti za sve glikane (Tablica 10). P-vrijednost je veličina koji govori o statističkoj značajnost rezultata mjerenja, a to je u našem slučaju je izračunata povezanost glikanskog profila i doze varfarina. Značajnom razlikom smatraju se samo oni rezultati kojima je p-vrijednost niža od granične p-vrijednosti ($p < 0,05$).



Slika 8. Veličina efekta (B) povezanosti između pojedinog glikana i doze varfarina s pripadajućim intervalima pouzdanosti (95%)

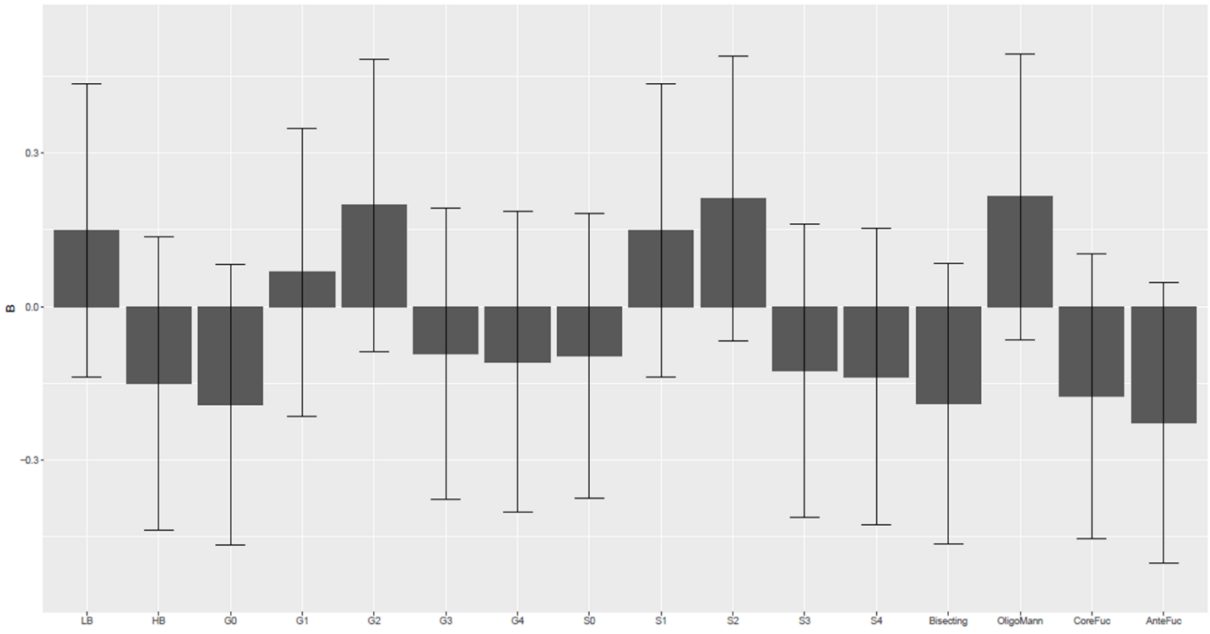
Tablica 10. P vrijednosti za svaku glikansku strukturu

Glikanska struktura	p-vrijednost	p-vrijednost korigirana na višestruko testiranje	Glikanska struktura	p-vrijednost	p-vrijednost korigirana na višestruko testiranje
GP1	0,131	0,616	GP21	0,990	0,990
GP2	0,134	0,705	GP22	0,419	0,767
GP3	0,697	0,852	GP23	0,056	0,616
GP4	0,943	0,960	GP24	0,375	0,732
GP5	0,116	0,616	GP25	0,128	0,616
GP6	0,920	0,960	GP26	0,561	0,810
GP7	0,936	0,960	GP27	0,093	0,616
GP8	0,554	0,810	GP28	0,721	0,859
GP9	0,441	0,783	GP29	0,235	0,616
GP10	0,291	0,661	GP30	0,506	0,802
GP11	0,623	0,810	GP31	0,734	0,859
GP12	0,222	0,616	GP32	0,596	0,810
GP13	0,920	0,960	GP33	0,080	0,616
GP14	0,191	0,616	GP34	0,826	0,946
GP15	0,605	0,810	GP35	0,070	0,616
GP16	0,873	0,960	GP36	0,665	0,831
GP17	0,606	0,810	GP37	0,918	0,960
GP18	0,216	0,616	GP38	0,525	0,802
GP19	0,189	0,616	GP39	0,229	0,616
GP20	0,046	0,616			

Iz tablice 10. vidi se da su p-vrijednosti iznad statistički značajne granične vrijednosti ($p<0,05$) za sve glikane, osim za GP20 koji je jedini postigao inicijalnu važnost. Iako p-vrijednost za GP20 iznosi oko 0.046, ona i dalje nije statistički značajna nakon korigiranja na višestruko testiranje. Osim direktno izmjerenih glikana, u softverskom programu R je izračunata i veličina efekta povezanosti 16 deriviranih glikozilacijskih svojstava s dozom varfarina (Slika 9). Derivirana svojstva su izračunata iz direktno mjerenih glikana, kako bi se pojednostavio prikaz rezultata (Tablica 11). Zbrojeni su svi glikani s nekom od zajedničkih karakteristika. Izračunata derivirana glikozilacijska svojstva su: grananje, galaktozilacija, antenarna i sržna fukozilacija, sijalinizacija i račvajući N-acetilglukozamin.

Tablica 11. Računanje deriviranih glikozilacijskih svojstava iz direktno mjerenih glikana

Derivirano svojstvo	**Formula**
nisko grananje	GP1+GP2+GP3+GP4+GP5+GP6+GP7+GP8+GP9+GP10+GP11+GP12+ GP13+GP14+GP15+GP16+GP17+GP18+GP19+GP20+GP21+GP22+GP23
visoko grananje	GP24+GP25+GP26+GP27+GP28+GP29+GP30+GP31+GP32+GP33+GP34 +GP35+GP36+GP37+GP38+GP39
agalaktozilacija	GP1+GP2+GP7+GP19
monogalaktozilacija	GP3+GP4+GP5+GP6+GP13
digalaktozilacija	GP8+GP9+GP10+GP11+GP12+GP14+GP15+GP16+GP17+GP18+GP20+ GP21+GP22+GP23
trigalaktozilacija	GP24+GP25+GP26+GP27+GP28+GP29+GP30+GP31+GP32+GP33+GP34 +GP35
tetragalaktozilacija	GP36+GP37+GP38+GP39
asijalinizirani	GP1+GP2+GP3+GP4+GP5+GP6+GP7+GP8+GP9+GP10+GP11+GP19
monosijalinizirani	GP12+GP13+GP14+GP15+GP16+GP17
disijalinizirani	GP18+GP20+GP21+GP22+GP23+GP24+GP25+GP26+GP27
trisijalinizirani	GP28+GP29+GP30+GP31+GP32+GP33+GP34+GP35+GP36
račvajući GlcNac	GP2+GP3+GP6+GP9+GP11+GP12+GP15+GP17+GP21+GP23+GP25
oligomanozni	GP2+GP7+GP19
tetrasijalinizirani	GP37+GP38+GP39
sržna fukozilacija	GP1+GP2+GP4+GP5+GP6+GP10+GP11+GP13+GP16+GP17+GP22+ GP23+GP31+GP34+GP35
antenarna fukozilacija	GP27+GP33+GP35+GP39



Slika 9. Veličina efekta (B) povezanosti između pojedinog deriviranog glikanskog svojstva i doze varfarina s pripadajućim intervalima pouzdanosti (95%)

P-vrijednosti za svako biološki značajno derivirano obilježje glikanskih struktura iznad je statistički značajne granice od $p<0,05$, kako je vidljivo prikazanim rezultatima (Tablica 12). Dakle, derivirana svojstva također ne posjeduju statistički značajnu povezanost s dozom varfarina jer p-vrijednost niti jednog od svojstava nije manja od granične p-vrijednosti.

Tablica 12. P-vrijednosti za odgovarajuća obilježja glikanskih struktura

Derivirano svojstvo	**p-vrijednost**	**p-vrijednost korigirana na višestruko testiranje**
Antenarna fukozilacija	0,104	0,616
Račvajući N-acetilglukozamin	0,171	0,616
Sržna fukozilacija	0,212	0,616
Agalaktozilacija	0,168	0,616
Monogalaktozilacija	0,633	0,810
Digalaktozilacija	0,170	0,616
Trigalaktozilacija	0,519	0,802
Tetragalaktozilacija	0,464	0,797
Visoko grananje	0,300	0,661
Nisko grananje	0,300	0,661
Oligomanozilacija	0,130	0,616
Asijalinizacija	0,491	0,802
Monosijalinizacija	0,300	0,661
Disijalinizacija	0,133	0,616
Trisijalinizacija	0,386	0,732
Tetrasijalinizacija	0,346	0,705

5. RASPRAVA

Varfarin je trenutno najpropisivaniji antikoagulantni lijek i među najčešće propisivanim lijekovima uopće. Procjenjuje se da 2 milijuna stanovnika SAD-a godišnje započne terapiju varfarinom, gdje spada među 20 najpropisivanijih lijekova (Schelleman i sur., 2011). Unatoč nedostacima, široku primjenu zadržao je zahvaljujući svojoj dugogodišnjoj i provjerenoj djelotvornosti te zbog nepristupačne cijene novih oralnih antikoagulansa. Ipak zbog njegove potrebe za terapijskim praćenjem i čestih nuspojava sve više se zamjenjuje propisivanjem novih oralnih antikoagulansa (Loo i sur., 2017). Varfarin se u Hrvatskoj uglavnom dozira tradicionalnim kliničkim pristupom; inicijalna doza se propisuje referiranjem na prethodno mjerenje INR-a ili na populacijski prosjek (3-5mg/dan). Međutim, stabilne doze za postizanje ciljanog INR-a (2-3) mogu varirati između 1 i 20 mg varfarina po danu. Taj učestali proces postizanja adekvatne doze može potrajati tjednima, a za to vrijeme pacijenti su izloženi povećanom riziku od krvarenja ili stvaranja ugruška, ovisno o tome je li pacijent hiperdoziran ili hipodoziran (Johnson i sur., 2011). Jedna od metoda koja pomaže u bržem uspostavljanju terapijskih koncentracija lijeka i smanjenju mogućih nuspojava je farmakogenomsko testiranje na polimorfizam CYP2C9 i VKORC1 enzima. Iako je CYP2C9/VKORC1 genotipiziranje pouzdano kada se izvodi u kvalificiranim laboratorijima, farmakogenomska testiranja nikako ne mogu zamijenti obavezno praćenje INR-a, već samo pomažu bržem i preciznijem postizanju terapijske koncentracije lijeka (Schelleman i sur., 2011). Iako mnoga istraživanja tvrde kako gentotipizacija navedenih polimorfizama doprinosi sigurnijem liječenju varfarinom, meta analiza provedena na 9 kliničkih ispitivanja tvrdi da vrijeme u kojem su pacijenti bili u indiciranom rasponu INR-a, incidencija supraterapijskih INR-ova i pojava velikih epizoda krvarenja i tromboembolijskih komplikacija nisu zabilježili signifikantno smanjenje u skupinama koje su bile farmakogenomski testirane u odnosu na one koje su bili vođeni tradicionalnim kliničkim pristupom. Dakle, čini se da farmakogenomski vođena terapija neće u skoroj budućnosti postati standard u kliničkoj praksi za terapiju varfarinom (Stergiopoulos i Brown, 2014).

Budući da postoji velika populacija koja je na terapiji varfarinom, razvijaju se metode za procjenu idealnog doziranja. Farmakogenomski testovi na polimorfizam CYP2C9 i VKOR1C enzima već su pronašli svoje mjesto u kliničkoj praksi, no glikozilacija plazmatskih proteina kao metoda predviđanja idealnog doziranja i dalje postoji samo kao ideja. Nedavno znanstveno

istraživanje na tu temu (Wu i sur., 2018) tvrdi da postoji povezanost glikozilacijskog profila AGP-a i afiniteta vezanja varfarina za AGP *in vitro*. U tom radu je dokazano da visoki stupanj razgranatosti N-glikana i antenarna fukozilacija smanjuju afinitet vezanja varfarina za AGP što rezultira većom slobodnom koncentracijom varfarina. Razmatrajući prethodno spomenuti rad, postojala je mogućnost da u ovom istraživanju potvrdimo da određeni glikani utječu na vezanje varfarina na proteine plazme i time omogućuju bolju procjenu adekvatne doze za pacijente.

Početna ideja ovog rada bila je izolirati i analizirati N-glikane plazmatskih proteina ispitanika koji su na kroničnoj terapiji varfarinom. Glikani su otpušteni s proteina plazme djelovanjem enzima PNGaze F te analizirani HILIC-UPLC kromatografijom. Kromatogrami su zatim integrirani pomoću računalnog programa Empower. Koristeći regresijsku analizu u programu R, prilagođenu po dobi i spolu, dobivene su vrijednosti efekata povezanosti doze varfarina i glikana zajedno s njihovim p-vrijednostima koje predstavljaju parametar statističke značajnosti. Osim direktno izmjerenih glikana, analiza je obuhvatila neka od najvažnijih deriviranih glikanskih svojstava kao što su: grananje, fukozilacija, račvajući N-acetilglukozamin, galaktozilacija i sijalinizacija. Analiziranjem rezultata nije pronađen niti jedan određeni glikan, kao ni derivirano svojstvo glikana koje pokazuje statistički značajnu povezanost s doziranjem varfarina. Glikan GP20 je jedini pokazao inicijalnu značajnost, no nakon korigiranja p-vrijednosti na višestruko testiranje i on je izgubio statistički značaj.

Eksperiment je ciljano započet izostavljanjem izolacije alfa-1 kiselog glikoproteina, koji je potencijalni prediktor ispravne doze varfarina. Budući da je udio alfa kiselog glikoproteina daleko manji u odnosu na imunoglobuline i ostale glikozilirane proteine plazme (Clerc i sur., 2018), efekt njegovih glikana na dozu varfarina vjerojatno nije moguće uočiti zbog velikog „pozadinskog šuma'' glikana ostalih proteina plazme (na ukupni plazmatski glikanski profil utječe i količina pojedinog glikoproteina a ne samo varijacija njegove glikozilacije). Postojanje minimalne povezanosti glikana GP20 s dozom varfarina ukazuje da bi potencijalno izoliranje alfa-1 kiselog glikoproteina iz uzoraka plazme te naknadna deglikozilacija isključivo njegovih glikana omogućila potvrdu hipoteze koji su znanstveni radovi potvrdili *in vitro* (Wu i sur., 2018). Budući da za sada ne postoj protokol za visokoprotočnu izolaciju i analizu glikozilacije alfa-1 kiselog proteina, ova metoda još uvijek ne može zaživjeti u praksi, ali ostaje kao jedna od metoda koja ima potencijal za razvoj.

6. ZAKLJUČAK

Glikozilacija ima brojne važne uloge u stanicama među kojima su stanična signalizacija, razvrstavanje i ispravno smatanje proteina, regulacija njihovog životnog vijeka, kao i određivanje njihove biološke aktivnosti (Krištić i Lauc, 2017). Posljednjih je godina također prepoznata njihova važnost u međudjelovanju lijeka i proteina na koji se lijek veže, a jedan od lijekova koji se izrazito veže na proteine plazme je varfarin. Brzo i precizno postizanje terapijske koncentracije varfarina predstavlja svojevrsan izazov. To je od velike važnosti za uspješno liječenje jer se u suprotnom manifestiraju nuspojave hiperdoziranja ili nema potrebnog antikoagulacijskog djelovanja. Jedna od korisnih metoda za utvrđivanje početne doze liječenja je farmakogenomsko testiranje na polimorfizam CYP2C9 i VKORC1 enzima. Zbog određenih nedostataka te metode, kao cilj ovog rada ispitan je potencijalno novi način prilagođavanja doze za antikoagulacijsko liječenje varfarinom, a ideja je dobivena iz znanstvenog rada koji je potvrdio *in vitro* povezanost određenih glikanskih svojstava sa smanjenim afinitetom vezanja varfarina za alfa-1 kiseli glikoprotein (Wu i sur., 2018). Iz dobivenih rezultata zaključuje se da:

1) Nijedan glikan i nijedno derivirano glikansko svojstvo ukupnih plazmatskih proteina ne pokazuje statistički značajnu povezanost s točnom terapijskom dozom varfarina. Zbog velike koncentracije glikana koji ne potječu od alfa-1 kiselog glikoproteina, odnosno zbog malog udjela AGP-a među plazmatskim proteinima nije bilo moguće potvrditi postavljenu hipotezu.
2) Postoji mogućnost da se prethodnom izolacijom alfa-1 kiselog glikoproteina dobiju očekivani rezultati i potvrdi povezanost glikanskih svojstava i afiniteta vezanja varfarina za AGP *in vivo*.

7. LITERATURA

Abou-Zied OK. Understanding the physical and chemical nature of the warfarin drug binding site in human serum albumin: experimental and theoretical studies. *Curr Pharm Des*, 2015, 21, 1800–1816.

Adua E, Russell A, Roberts P, Wang Y, Song M, Wang W. Innovation Analysis on Postgenomic Biomarkers: Glycomics for Chronic Diseases. *Omi A J Integr Biol*, 2017, 21, 183–196.

Boersema PJ, Mohammed S, Heck AJR. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 391, 151–159.

Brockhausen I, Schachter H, Stanley P. O-GalNAc Glycans, Essentials of Glycobiology. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2009, 1725, 128-135.

Brunton L, Chabner B, Knollman B. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York, McGraw-Hill, 2011, str. 861.

Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)--a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 402, 231–247.

Clerc F, Novokmet M, Dotz V, Reiding KR, de Haan N, Kammeijer GSM, Dalebout H, Bladergroen MR, Vukovic F, Rapp E, Satsangi J, Nimmo ER, Ventham NT, Drummond H, Kalla R, Adams AT, O'Leary K, Boyapati R, Wilson DC, Merrick V, Campbell H, Theodoratou E, Rudan I, Kennedy NA, Fernandes DL, Spencer DIR, Gardner RA, Shubhakar A, Urbanowicz PA, Trbojević-Akmačić I, Krištić J, Štambuk J, Pučić-Baković M, Vilaj M, Pezer M, Razdorov G, Šimurina M, Gornik O, Biscaglia G, Palmieri O, Bossa F, D'incà R, Danese S, Kohn A, Pemberton IK, Kolarich D, Zoldos V, Aulchenko Y, Pierik M, Jonkers D, van den Heuvel T, Targan SR, Barron G, Manetti N, Latiano A, McGovern DPB, Annese V, Lauc G, Wuhrer M. Plasma N-Glycan Signatures Are Associated With Features of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 2018, 155, 829–843.

Cooper GM, Hausman RE. Stanica - Molekularni pristup. Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 335–336.

Dean L. Warfarin Therapy and VKORC1 and CYP Genotype. U: Pratt V, McLeod H, Rubinstein W, Dean L, Kattman B, Malheiro A, urednici, Bethesda, Medical Genetics Summaries, 2012, 202-213.

Dejaegher B, Mangelings D, Vander Heyden Y. Method development for HILIC assays. *J Sep Sci*, 2008, 31, 1438–1448.

Eckhoff CD, DiDomenico RJ, Shapiro NL. Initiating Warfarin Therapy: 5 mg versus 10 mg. *Ann Pharmacother*, 2004, 38, 2115–2121.

Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. Alpha-1 acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol*, 2000, 1482, 157–171.

Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers*, 2008, 25, 267–278.

Higai K, Azuma Y, Aoki Y, Matsumoto K. Altered glycosylation of alpha1-acid glycoprotein in patients with inflammation and diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*, 2003, 329, 117–125.

Johnson JA, Gong L, Whirl-Carrillo M, Gage BF, Scott SA, Stein CM, Anderson JL, Kimmel SE, Lee MTM, Pirmohamed M, Wadelius M, Klein TE, Altman RB. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for CYP2C9 and VKORC1 genotypes and warfarin dosing. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, 90, 625–629.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Basic & Clinical Pharmacology. New York, McGraw-Hill, 2012, str. 608–611.

Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE, Lee M-TM, Limdi NA, Page D, Roden DM, Wagner MJ, Caldwell MD, Johnson JA. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med*, 2009, 360, 753–764.

Krištić J., Lauc G. Ubiquitous Importance of Protein Glycosylation. U: High-Throughput Glycomics and Glycoproteomics. Lauc G., Wuhrer M., urednici, New York, Humana Press, 2017, str. 1-8.

Lamriben L, Graham JB, Adams BM, Hebert DN. N-Glycan-based ER Molecular Chaperone and Protein Quality Control System: The Calnexin Binding Cycle. *Traffic*, 2016, 17, 308–326.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Protein Glycosylation in the ER and Golgi Complex.New York, W. H. Freeman, 2000, str. 701–742.

Loo SY, Dell'Aniello S, Huiart L, Renoux C. Trends in the prescription of novel oral anticoagulants in UK primary care. *Br J Clin Pharmacol*, 2017, 83, 2096–2106.

Mekaj YH, Mekaj AY, Duci SB, Miftari EI. New oral anticoagulants: their advantages and

disadvantages compared with vitamin K antagonists in the prevention and treatment of patients with thromboembolic events. *Ther Clin Risk Manag*, 2015, 11, 967–977.

Sažetak opisa svojstava lijeka - Martefarin 3 mg, 2019., http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Martefarin-3-mg-tablete/14513/, pristupljeno 21. 5. 2019.

Schelleman H, Brensinger CM, Bilker WB, Hennessy S. Antidepressant-Warfarin Interaction and Associated Gastrointestinal Bleeding Risk in a Case-Control Study. *PLoS One*, 2011, 1-2

Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 2002, 12, 43-56.

Stanley P, Schachter H, Taniguchi N. N-Glycans, Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009, str. 163.

Stergiopoulos K, Brown DL. Genotype-Guided vs Clinical Dosing of Warfarin and Its Analogues. *JAMA Intern Med*, 2014, 174, 1330-1338.

Tse G, Gong M, Li G, Wong SH, Wu WKK, Wong WT, Roever L, Lee APW, Lip GYH, Wong MCS, Liu T. Genotype-guided warfarin dosing *vs*. conventional dosing strategies: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Br J Clin Pharmacol*, 2018, 84, 1868–1882.

Turpie AGG, Chin BSP, Lip GYH. ABC of antithrombotic therapy: Venous thromboembolism: treatment strategies. *BMJ*, 2002, 325, 948–950.

Urien S, Albengres E, Pinquier JL, Tillement JP. Role of alpha-1 acid glycoprotein, albumin, and nonesterified fatty acids in serum binding of apazone and warfarin. *Clin Pharmacol Ther*, 1986, 39, 683–689.

Wardrop D, Keeling D. The story of the discovery of heparin and warfarin. *Br J Haematol*, 2008, 141, 757–763.

Wu D, Struwe WB, Harvey DJ, Ferguson MAJ, Robinson C V. N-glycan microheterogeneity regulates interactions of plasma proteins. *Proc Natl Acad Sci*, 2018, 115, 8763–8768.

8. SAŽETAK/SUMMARY

8.1. Sažetak

Varfarin je najstariji i najpropisivaniji oralni antikoagulans. Zbog svoje uske terapijske širine i velikih interindividualnih varijabilnosti zahtijeva praćenje INR-a. Uspostavljanjem adekvatne inicijalne doze varfarina smanjuje se rizik od nuspojava lijeka i skraćuje vrijeme do postizanja optimalne koncentracije. Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) stoga predlaže provođenje farmakogenomskog testiranja na polimorfizam alela CYP2C9 i VKORC1 kod uvođenja varfarina u terapiju. Ta metoda, kombinirana s kliničkim parametrima, ipak ne uspijeva dovoljno dobro predvidjeti stabilnu terapijsku dozu varfarina za sve pacijente.

Uloga glikozilacije proteina plazme u farmakokinetici lijekova nije dovoljno raszjašnjena. Za alfa-1 kiseli glikoprotein, koji je jedan od glavnih glikoproteina plazme za vezanje lijekova, in vitro je dokazano da visoki stupanj grananja N-glikana i antenarna fukozilacija smanjuju njegov afinitet vezanja varfarina. Stoga je cilj ovog rada bilo ispitati može li N-glikom ukupnih plazmatskih proteina (koji sadrži i glikane alfa-1 kiselog glikoproteina) predvidjeti potrebnu inicijalnu dozu varfarina.

Nakon izoliranja iz uzoraka krvnih plazmi i obilježavanja fluorescentnom bojom (2-aminobenzamid), N-glikani su razdvojeni visokotlačnom tekućinskom kromatografijom temeljenoj na hidrofilnim interakcijama. Dobiveni kromatografski vršci su ručno integrirani i normalizirani na ukupnu površinu. Pomoću općeg linearnog modela, prilagođenog po dobi i spolu, napravljena je regresijska analiza u programu R (verzija 3.3.3). Rezultati pokazuju da nijedan glikan, kao niti jedno derivirano svojstvo glikana ne pokazuje statistički značajnu povezanost s potrebnom terapijskom dozom varfarina, no postoje naznake da bi povezanost mogla biti uočena smanjenjem šuma glikana ostalih plazmatskih glikoproteina prethodnom izolacijom alfa-1kiselog glikoproteina i analizom samo njegove N-glikozilacije.

8.2. Summary

Warfarin is the oldest and the most widely prescribed oral anticoagulant. Due to its narrow therapeutic range and wide interpatient variability, INR monitoring is required. Establishing the proper initial warfarin dose, adverse effects are minimized and time to achieve optimal drug concentration is shortened. That is why FDA has proposed pharmacogenomic testing of *CYP2C9* and *VKORC1* alleles for guiding the initial dose of warfarin. Combined with clinical algorithms, pharmacogenomic testing is still not able to estimate stable therapeutic dose for all patients.

The role of plasma protein glycosylation in pharmacokinetics is yet to be elucidated. Alpha-1 acid glycoprotein, which is one of the most common drug binding proteins, has shown *in vitro* reduced warfarin-binding-affinity due to increased N-glycans' antennae branching and antennary fucosylation. Therefore, the goal of this thesis was to examine if total plasma protein N-glycome (which also include alpha-1 glycoprotein's N-glycans) can predict required initial dose of warfarin.

After isolation from plasma samples and labeling with flourescent dye (2-aminobenzamide), N-glycans were separated by hydrophilic interaction liquid chromatography. Later, chromatographic peaks were manually integrated and normalized to total peak area. Using general linear model, adjusted by age and sex, regression analysis in R software (version 3.3.3) has been performed. Results show that there is not any glycan nor derived glycan feature showing statistically significant association with required warfarine dose, but there is some indication that the associations could be found by reducing other plasma protein N-glycans' background noise by alpha-1 acid glyoprotein isolation prior to N-glycome analysis.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

N-glikozilacija plazmatskih proteina kao potencijalni biljeg za predviđanje točne terapijske doze varfarina

Josip Ljubica

SAŽETAK

Varfarin je najstariji i najpropisivaniji oralni antikoagulans. Zbog svoje uske terapijske širine i velikih interindividualnih varijabilnosti zahtijeva praćenje INR-a. Uspostavljanjem adekvatne inicijalne doze varfarina smanjuje se rizik od nuspojava lijeka i skraćuje vrijeme do postizanja optimalne koncentracije. Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) stoga predlaže provođenje farmakogenomskog testiranja na polimorfizam alela CYP2C9 i VKORC1 kod uvođenja varfarina u terapiju. Ta metoda, kombinirana s kliničkim parametrima, ipak ne uspijeva dovoljno dobro predvidjeti stabilnu terapijsku dozu varfarina za sve pacijente.

Uloga glikozilacije proteina plazme u farmakokinetici lijekova nije dovoljno raszjašnjena. Za alfa-1 kiseli glikoprotein, koji je jedan od glavnih glikoproteina plazme za vezanje lijekova, in vitro je dokazano da visoki stupanj grananja N-glikana i antenarna fukozilacija smanjuju njegov afinitet vezanja varfarina. Stoga je cilj ovog rada bilo ispitati može li N-glikom ukupnih plazmatskih proteina (koji sadrži i glikane alfa-1 kiselog glikoproteina) predvidjeti potrebnu inicijalnu dozu varfarina.

Nakon izoliranja iz uzoraka krvnih plazmi i obilježavanja fluorescentnom bojom (2-aminobenzamid), N-glikani su razdvojeni visokotlačnom tekućinskom kromatografijom temeljenoj na hidrofilnim interakcijama. Dobiveni kromatografski vršci su ručno integrirani i normalizirani na ukupnu površinu. Pomoću općeg linearnog modela, prilagođenog po dobi i spolu, napravljena je regresijska analiza u programu R (verzija 3.3.3). Rezultati pokazuju da nijedan glikan, kao niti jedno derivirano svojstvo glikana ne pokazuje statistički značajnu povezanost s potrebnom terapijskom dozom varfarina, no postoje naznake da bi povezanost mogla biti uočena smanjenjem šuma glikana ostalih plazmatskih glikoproteina prethodnom izolacijom alfa-1kiselog glikoproteina i analizom samo njegove N-glikozilacije.

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

Rad sadrži: 36 stranica, 9 grafičkih prikaza, 12 tablica i 32 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: varfarin, alfa-1 kiseli glikoprotein, N-glikozilacija, predviđanje doze

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Toma Keser**, *viši asistent - poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Ana Mornar Turk, redovita *profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Tamara Pavić, *znanstvena suradnica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of biochemistry and molecular biology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Plasma protein N-glycosylation as a potential marker for prediction of required therapeutic warfarin dose

Josip Ljubica

SUMMARY

Warfarin is the oldest and the most widely prescribed oral anticoagulant. Due to its narrow therapeutic range and wide interpatient variability, INR monitoring is required. Establishing the proper initial warfarin dose, adverse effects are minimized and time to achieve optimal drug concentration is shortened. That is why FDA has proposed pharmacogenomic testing of *CYP2C9* and *VKORC1* alleles for guiding the initial dose of warfarin. Combined with clinical algorithms, pharmacogenomic testing is still not able to estimate stable therapeutic dose for all patients.

The role of plasma protein glycosylation in pharmacokinetics is yet to be elucidated. Alpha-1 acid glycoprotein, which is one of the most common drug binding proteins, has shown *in vitro* reduced warfarin-binding-affinity due to increased N-glycans' antennae branching and antennary fucosylation. Therefore, the goal of this thesis was to examine if total plasma protein N-glycome (which also include alpha-1 glycoprotein's N-glycans) can predict required initial dose of warfarin.

After isolation from plasma samples and labeling with flourescent dye (2-aminobenzamide), N-glycans were separated by hydrophilic interaction liquid chromatography. Later, chromatographic peaks were manually integrated and normalized to total peak area. Using general linear model, adjusted by age and sex, regression analysis in R software (version 3.3.3) has been performed. Results show that there is not any glycan nor derived glycan feature showing statistically significant association with required warfarine dose, but there is some indication that the associations could be found by reducing other plasma protein N-glycans' background noise by alpha-1 acid glyoprotein isolation prior to N-glycome analysis.

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

Thesis includes: 36 pages, 9 figures, 12 tables and 32 references. Original is in Croatian language.

Keywords: warfarin, alpha-1 acid glycoprotein, N-glycosylation, dose prediction

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

Reviewers: **Toma Keser**, **Ph.D.** *Senior Teaching Assistant - Postdoctoral Fellow,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana Mornar Turk, Ph.D. *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Tamara Pavić, **Ph.D.** *Research Fellow,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2019