

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO – BIOKEMIJSKI FAKULTET

**Kevin Kovač**

**Pojedinci s povećanim rizikom za razvoj dijabetesa tipa 2 imaju razgranatije i manje  
sijalinizirane N-glikane na alfa-1-kiselom glikoproteinu**

Zagreb 2020.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod vodstvom dr.sc. Tome Kesera i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

## KRATICE

ACN	acetonitril
AGP	alfa-1 kiseli glikoprotein
Asn	asparagin
BMI	indeks tjelesne mase (eng. body mass index)
Cys	cistein
Dol	dolikol
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (eng. ethylenediaminetetraacetic acid)
EIC	kromatogram izoliranih iona (eng. extracted ion chromatogram)
ER	endoplazmatski retikulum
ESI	ionizacija elektroraspršenjem (eng. electrospray ionization)
FDR	eng. false discovery rate
Fuc	fukoza
GAG	glikozaminoglikan
Gal	galaktoza
GDP-Man	gvanozin difosfat manoza
Glc	glukoza
GlcNAc	N-acetilglukozamin
HbA1c	glikozilirani hemoglobin
HILIC-SPE	ekstrakcija na čvrstoj fazi uz kromatografiju temeljenoj na hidrofилnim interakcijama (eng. hydrophilic interaction chromatography based solid-phase extraction)
IL-1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6
JIL	jedinica intenzivnog liječenja
LC	tekućinska kromatografija (eng. liquid chromatography)
LPS	lipopolisaharid
Man	manoza
mRNA	prijenosna ribonukleinska kiselina (eng. messenger ribonucleic acid)
MS	masena spektrometrija

OGTT	oralni glukoza tolerans test
ORM	orosomukoid
OST	oligosaharil transferaza
PCR	lančana reakcija polimerazom (eng. polymerase chain reaction)
Pro	prolin
qTOF	kvadrupolni analizator vremena leta (eng. quadrupole time-of-flight)
Ser	serin
Sia	sijalinska kiselina
TCPK	tosil fenilalanil klorometil keton (eng. tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone)
TFA	trifluorooctena kiselina (eng. trifluoroacetic acid)
Thr	treonin
TNF	faktor tumorske nekroze (eng. tumor necrosis factor)
UDP-GlcNAc	uridin-difosfat-N-acetilglukozamin
UPLC	tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (eng. ultra performance liquid chromatography)

# SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. GLIKOZILACIJA	2
1.1.1. PROMJENE GLIKOZILACIJE U BOLESTI	3
1.2. STRUKTURA GLIKANA I NJIHOVA SINTEZA	3
1.2.1. O-VEZANI GLIKANI	4
1.2.2. N-VEZANI GLIKANI	4
1.2.2.1. Biosinteza N-glikana	5
1.2.2.2. Vrste N-glikana	6
1.3. DIJABETES TIP 2	7
1.3.1. PROMJENA GLIKOZILACIJE U BOLESTI I PROCJENI RIZIKA ZA RAZVOJ DIJABETESA TIP 2	9
1.4. ALFA-1 KISELI GLIKOPROTEIN	10
1.4.1. STRUKTURA I GENSKE VARIJANTE AGP-A	11
1.4.2. GLIKOZILACIJA AGP-A	12
1.4.3. BIOLOŠKE FUNKCIJE AGP-A	13
1.5. LC-ESI-MS	14
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	16
3. ISPITANICI I METODE	18
3.1. ISPITANICI	19
3.2. MATERIJALI I METODE	20
3.2.1. OBOGAĆIVANJE AGP-A IZ UZORAKA PLAZME	20
3.2.2. REDUKCIJA, ALKILACIJA I DIGESTIJA TRIPSINOM	21
3.2.3. HILIC-SPE OBOGAĆIVANJE GLIKOPEPTIDA	21
3.2.4. RP-LC-ESI-MS(/MS)	22
3.2.5. OBRADA PODATAKA	22
3.2.6. STATISTIČKA ANALIZA	23
4. REZULTATI	24
5. RASPRAVA	34
6. ZAKLJUČAK	37
7. ZAHVALA	39
8. LITERATURA	41
9. SAŽETAK	48
10. SUMMARY	51

## **1. UVOD**

## 1.1. Glikozilacija

Glikozilacija je proces posredovan posebnim enzimima zvanim glikoziltransferazama u kojem dolazi do kovalentnog vezanja ugljikohidrata, odnosno specifičnih šećera koji tvore ugljikohidratne lance (glikane), na polipeptide, lipide i druge organske molekule <sup>1</sup>. Iznimno je kompleksan kotranslacijski te posttranslacijski proces za kojeg se predviđa da se događa na više od pola ukupnih proteina, a posebno je značajan kod izvanstaničnih proteina te onih koji se nalaze na staničnoj površini. Fizikalna svojstva proteina poput topljivosti, stabilnosti i konformacije su uvelike uvjetovana njihovom glikozilacijom, a također ima značajan utjecaj na njihove biološke funkcije <sup>2</sup>. Mnogobrojni enzimi, transkripcijski faktori i drugi proteini kao i njihovo međudjelovanje važni su u formiranju glikana te za razliku od polipeptida na kojima se nalaze nisu direktno definirani slijedom nukleotida određenog gena. Proces glikozilacije pod utjecajem je genskih i okolišnih čimbenika što utječe na kompleksnost glikoma (ukupnost glikana u organizmu/tkivu/stanici ili na pojedinom proteinu). U odnosu na proteom ta kompleksnost je višestruka, ponajviše zbog: različitih vrsta šećera koji tvore glikane, različitih mogućnosti njihovog međusobnog povezivanja, stupnja grananja te varijacija u mogućim glikozilacijskim mjestima na proteinskom dijelu <sup>3</sup>.

Jedan od razloga zašto se glikanima pripisuju važne strukturne i modulacijske uloge je postojanje glikokaliksa, staničnog omotača sačinjenog upravo od glikana i glikokonjugata, koji prekriva eukariotske stanice te između ostalog ima ulogu barijere. Glikani mogu djelovati kao zaštita proteinima od raznih proteaza, a vezani na molekule matriksa imaju važnu funkciju u održavanju strukture tkiva. Također, važna je njihova uloga kod prepoznavanja od strane glikan-vezujućih proteina koji se dijele na intrinzične i ekstrinzične, odnosno na one koji prepoznaju glikane istog organizma te na one koji prepoznaju glikane stranog organizma <sup>4</sup>. Posebnu skupinu takvih proteina koji selektivno prepoznaju i vežu glikane putem domene koja prepoznaje ugljikohidrate zovemo lektinima <sup>5</sup>. Međusobnim vezanjem lektina i glikana posredovani su brojni procesi poput: stanične adhezije i migracije, prenošenje signala, vezanje patogena i prepoznavanja vlastitih stanica. Kao primjeri takvih interakcija mogu se navesti: proces oplodnje jajne stanice, interakcija porodice lektina zvane selektini s glikanima te njihova uloga u migraciji limfocita iz cirkulacije u upaljeno tkivo, kao i vezanje virusa influence putem hemaglutinina (vrsta lektina koji prepoznaje sialinsku kiselinu na glikanima stanice domaćina) <sup>2</sup>.

### **1.1.1. Promjene glikozilacije u bolesti**

Iako je naveden tek dio bioloških uloga glikana može se zaključiti kako glikozilacija ima relevantnu ulogu u fiziološkim i patofiziološkim staničnim procesima, a tome dodatno pridonosi činjenica kako genske pogreške u istoj dovode do teških bolesti koje se manifestiraju poremećajem mišićnih, neuroloških i razvojnih funkcija, a se nazivaju kongenitalnim poremećajima glikozilacije <sup>6</sup>. Zadnjih godina broj studija na temu glikozilacije je u velikoj mjeri porastao te se pokazalo kako dolazi do značajnih promjena u sastavu i omjeru glikana kod bolesti poput dijabetesa <sup>7</sup>, reumatoidnog artritisa <sup>8</sup>, upalne bolesti crijeva <sup>9</sup> i raka <sup>10</sup>. Nadalje, mnogi glikani su identificirani kao potencijalni biomarkeri u raznim bolestima te se pretpostavlja da uz interindividualne razlike u glikozilaciji, koje su primijećene u populacijskim studijama, imaju važnu ulogu u dijagnostici, terapiji te predviđanju rizika od samog nastanka bolesti <sup>2</sup>.

## **1.2. Struktura glikana i njihova sinteza**

Način vezanja glikana, broj glikanskih struktura i mjesto potencijalnih glikozilacijskih mjesta uvelike ovise o primarnoj strukturi proteina. Nastavno tome, glikane vezane na proteine dijelimo na one povezane N-glikozidnom ili O-glikozidnom vezom te dodatno postoji vrsta veze karakteristična za proteine stanične površine koji su putem glikozil-fosfatidil-inozitolnih sidra umetnuti u lipidni dvosloj membrane <sup>11</sup>. Također, pronađena je i C-glikozidna veza između ugljikodirata i triptofana na proteinu, ali se ona rjeđe pojavljuje <sup>12</sup>. Biosinteza N- i O-vezanih glikana odvija se kotranslacijski i posttranslacijski u endoplazmatskom retikulumu (ER) i Golgijevom aparatu koji uz transportne vezikule, lizosome i plazmatsku membranu tvori biosintetski sekretorni put. Glikozilacija se u pravilu odvija na proteinima koji prolaze kroz navedeni put, ali postoji iznimka kod nuklearnih i citosolnih proteina koji mogu na sebi imati jednu O-vezanu molekulu N-acetilglukoamina (GlcNAc) <sup>13</sup>.



### 1.2.1. O-vezani glikani

Opisano je nekoliko vrsta O-vezanih glikana koji su karakterizirani vezanjem prvog šećera na -OH skupinu serina, treonina ili hidroksilizina unutar polipeptida. Ovisno o šećeru koji je vezan na protein O-vezane glikane dijelimo na: mucine koji su ujedno najzastupljeniji oblik i na reducirajućem kraju imaju N-acetilgalaktozamin (GalNAc), glikozaminoglikane (GAG) koji svojim dugim lancima vezanim na proteine čine proteoglikane, dok ostali mogu biti O-vezani putem galaktoze (Gal), fukoze (Fuc), glukoze (Glc), manoze (Man) ili N-acetilglukozamina. Biosinteza O-vezanih glikana započinje u kasnom ER-u ili u Golgijevom aparatu nakon smatanja proteina i pojednostavljeno se može podijeliti u par faza. Nakon sinteze nukleotidnih šećera u citoplazmi, dolazi do njihovog prelaska u ER ili Golgijev aparat gdje se ti šećeri, uz pomoć specifičnih glikoziltransferaza, dodaju na protein <sup>13</sup>. Detaljniji opis biosinteze biti će pojašnjen na primjeru N-vezanih glikana.

Pronađene su mnoge važne uloge O-vezanih glikana, a neke od njih uključuju utjecaj na strukturu i stabilnost proteina te posrednu ulogu u prepoznavanju među proteinima i imunosti <sup>13</sup>. Već spomenuti mucini imaju ulogu u zaštiti od fizičkih i kemijskih čimbenika kao i zaštitnu ulogu od infekcije patogenima te se nalaze na površini epitela gastrointestinalnog, genitourinarnog i respiratornog trakta <sup>14</sup>. Nadalje, smatra se da imaju utjecaj kod prepoznavanja glikopeptida posredovanim glavnim kompleksom histokompatibilnosti <sup>15</sup>.

### 1.2.2. N-vezani glikani

Poznato je kako N-vezani glikani nastaju kovalentnim povezivanjem šećernih molekula N-glikozidnom vezom na aminokiselinu asparagin (Asn) unutar polipeptida. Međutim, nije svaki asparagin N-glikozilacijsko mjesto već je nužno da se zadovolji minimalna aminokiselinska sekvenca u kojoj nakon asparagina dolazi bilo koja aminokiselina osim prolina (Pro) te ista završava sa serinom (Ser) ili treoninom (Thr). Asn-X-Ser/Thr je slijed aminokiselina na čiji se asparagin većinom vežu N-glikani. Mogući su N-glikani i kod sekvence Asn-X-Cys, ali uz uvjet da je cistein (Cys) u reduciranom stanju. Iako je sekvenca Asn-X-Ser/Thr nužna, ona nije presudna u stvaranju N-glikana jer može doći do konformacijskih smetnji tijekom svijanja glikoproteina ili do smanjenja efikasnosti glikozilacije zbog prisutnosti kiselih aminokiselina (aspartat ili glutamat) na mjestu „X“. Uzimajući u obzir vrste šećera koji tvore N-glikozidnu vezu s asparaginom otkriveno je pet

različitih načina povezivanja N-glikana od kojih je najčešći onaj u kojem se N-acetilglukozamin povezuje N-glikozidnom vezom tvoreći GlcNAc $\beta$ 1-Asn<sup>16</sup>.

#### 1.2.2.1. Biosinteza N-glikana

Biosintetski put N-glikana načelno se događa u dvije faze te prolazi kroz dva stanična odjeljka, ER i Golgijev aparat. Prva faza jednaka je u svim eukariotskim stanicama, događa se u ER-u gdje se na lipidnom nosaču zvanom dolikol formira oligosaharidna struktura koja se uz pomoć tranferaza prenosi na Asn već spomenute sekvence polipeptida. Druga faza započinje u ER-u i nastavlja se u Golgijevom aparatu i okarakterizirana je obradom N-glikana uz pomoć glikozidaza i glikoziltransferaza. Za prenošenje šećera, glikoziltransferaze koriste aktivirane šećere koji mogu biti vezani na nukleotid ili dolikol<sup>16</sup>.

Dolikol (Dol) je dugolančani poliizoprenoidni lipid uronjen u membranu ER-a koji djeluje kao nosač oligosaharida te isti povezuje preko pirofosforilnog ostatka<sup>17</sup>. Na njega se prvo veže GlcNAc prenošen s UDP-GlcNAc te zajedno tvore Dol-P-P-GlcNAc. Nadalje, još jedna molekula GlcNAc se dodaje i uz nju pet molekula Man s GDP-Man pri čemu na citosolnoj strani ER-a nastaje Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol. Sljedeći korak zahtjeva aktivnost posebnog enzima zvanog flipaza koji nastalu strukturu prevodi u lumen ER-a. Konačna oligosaharidna struktura nastaje dodatkom još četiri Man i tri Glc, ali putem Dol-P-Man, odnosno Dol-P-Glc koji su nastali na citosolnoj strani i također su prebačeni kroz dvoslojnu membranu ER-a. Nastali prekursor N-glikana sadrži četrnaest šećernih jedinica i zapisuje se kao Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol<sup>16</sup>. Na važnost do sad navedenog puta biosinteze N-glikana ukazuje postojanje spektra bolesti zvanih kongenitalnim poremećajima glikozilacije tipa 1 koje nastaju mutacijama uključenih enzima (glikoziltransferaze i flipaza)<sup>18</sup>.

Oligosaharil transferaza (OST) enzim je kojemu su dvije podjedinice riboforini (transmembranski glikoproteini hrapavog ER-a koji vežu veliku podjedinicu ribosoma), što posljedično omogućuje lokalizaciju njegove treće podjedinice u blizini nastajućeg polipeptida koja na istome ujedno vrši transfernu reakciju oligosaharida Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> u cijelosti<sup>17</sup>. Nakon što je izvršen prijenos oligosaharida dolazi do bitnih procesa koji odlučuju o sudbini proteina ovisno o njegovom pravilnom smatanju. Ti procesi mogu se nazvati kontrola kvalitete ER-a te uključuju šaperone (proteini koji omogućuju pravilno smatanje drugih proteina) i razne enzime za doradu, a jedan od tih je dobro istražen put preko glikoproteina kalneksina i kalretikulina koji prepoznaju djelomično doradene oligosaharide i pomažu u pravilnom

smatanju proteina na kojima se oni nalaze <sup>19</sup>. Glukozidaze 1 i 2 uklanjaju dvije od tri glukoze s nastalog oligosaharida tvoreći  $\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}_2$  kojeg prepoznaju kalneksin i kalretikulin te pomažu glikoproteinu u pravilnom smatanju. Preostalu glukozu uklanja glukozidaza 2 i ukoliko je protein pravilno smotan ide u daljnu doradu. Onima koji nisu pravilno smotani poseban enzim iz lumena ER-a vraća glukozu na oligosaharidnu strukturu te se ponovo uz pomoć kalneksina i kalretikulina doraduju. Ukoliko se protein ne uspije pravilno smotati on se putem određenih procesa izbacuje u citosol gdje dolazi do ubikvitinacije te posljedično proteosomalne razgradnje <sup>18</sup>.

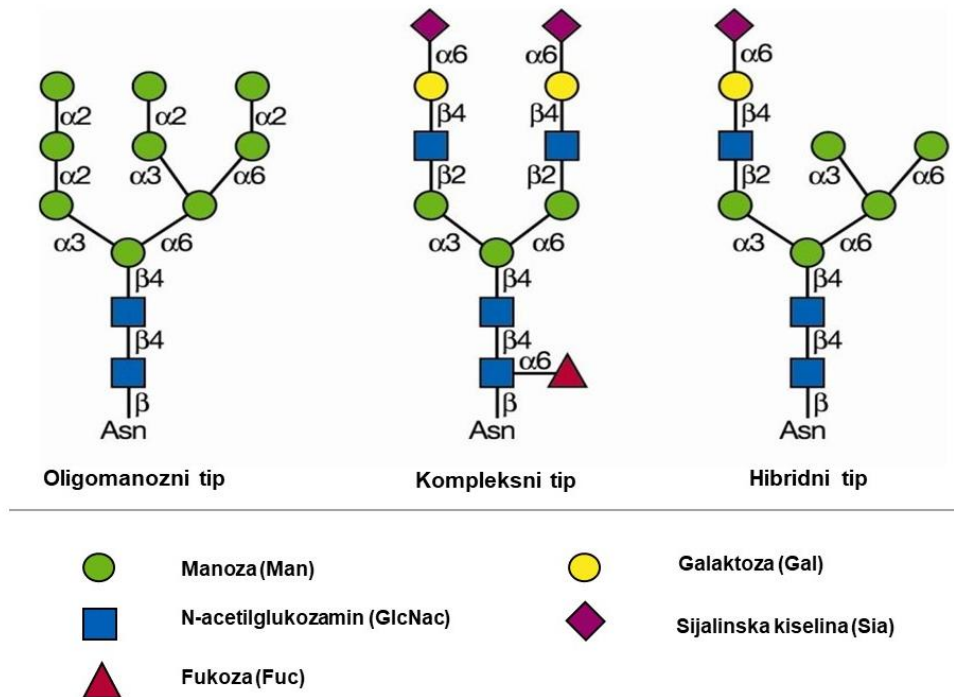
Prije samog prelaska iz ER-a u Golgijev aparat, oligosaharidna struktura na proteinu se doraduje manozidazom koja uklanja terminalnu manozu s centralne grane i time tvori  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ . U *cis*-Golgiju dolazi do daljnjeg uklanjanja manozu posredovano manozidazama te stvaranja  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  koji dalje prelazi u *medijalni*-Golgi gdje služi kao prekursor u nastanku kompleksnih i hibridnih oblika N-glikana. Također, moguće je da ne dođe do uklanjanja manozu u *cis*-Golgiju i da konačni protein sadrži oligomanozne N-glikane. Za nastanak kompleksnih i hibridnih oblika prvi korak u medijalnom-Golgiju je dodatak GlcNAc na  $\alpha$ 1-3Man prikladnom transferazom. Nadalje, manozidaze uklanjaju terminalne  $\alpha$ 1-3Man i  $\alpha$ 1-6Man te se dodatkom još jedne molekule GlcNAc na  $\alpha$ 1-6Man stvara se osnovna struktura svih bi-antenarnih kompleksnih N-glikana. Tri- i tetra-antenarni oblici dobivaju se dodavanjem dodatnih GlcNAc na  $\alpha$ 1-3Man i  $\alpha$ 1-6Man. Hibridni glikani nastaju ukoliko ne dođe do dodatnog uklanjanja manozu i zadržavaju strukturu  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  <sup>16</sup>.

Postoje dodatne reakcije koje pridonose velikoj raznovrsnosti zrelih N-glikana, a jedna od njih je dodavanje šećera na jezgru N-glikana poput fukozilacije GlcNAc koji je vezan za Asn proteina. Nadalje, moguće su elongacije grana dodavanjem Gal na GlcNAc i time stvarajući  $\text{Gal}\beta$ 1-4GlcNAc sekvence koje mogu tvoriti nizove. Također, bitno je napomenuti i dodavanje terminalnih šećera na grane N-glikana poput sijalinske kiseline (Sia), Fuc, Gal, GlcNAc te sulfata <sup>16</sup>.

#### 1.2.2.2. Vrste N-glikana

Sve vrste N-glikana imaju zajedničku jezgru na koju se dalje vežu različiti šećeri. Ona se sastoji od dvije molekule GlcNAc s jedne strane povezanih na Asn unutar proteina, dok s druge strane imaju vezane tri molekule Man te se zapisuje kao  $\text{Man}\alpha$ 1-3( $\text{Man}\alpha$ 1-6) $\text{Man}\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-Asn-X-Ser/Thr. Temeljna podjela je na oligomanozni, kompleksni

i hibridni tip. Kod oligomanoznog tipa na jezgri se nalaze samo manoze. Kompleksni tip je karakteriziran dodanim GlcNAc kojim se započinje stvaranje antena te svaka uz njega sadrži barem jednu Gal i najčešće završava sa Sia. Kod hibridnog tipa se na  $\text{Man}\alpha 1-6$  granu dodaju Man, dok se na  $\text{Man}\alpha 1-3$  tvore strukture kao u kompleksnom tipu (Slika 1).<sup>16</sup>



**Slika 1.** Osnovni tipovi N-glikana vezanih za Asn polipeptidnog lanca unutar Asn-X-Ser/Thr slijeda<sup>16</sup>.

### 1.3. Dijabetes tip 2

Dijabetes tip 2, ranije poznat kao dijabetes neovisan o inzulinu ili adultni oblik, odgovoran je za 90-95% svih slučajeva dijabetesa<sup>20</sup>. Kod tog tipa je značajno da dolazi do relativnog nedostatka inzulina uzrokovanim nepravilnim radom  $\beta$ -stanica gušterače kao i do rezistencije na inzulin u ostatku tijela<sup>21</sup>. O samoj ozbiljnosti bolesti, s epidemiološkog i farmakoekonomskog aspekta, govori činjenica kako od dijabetesa (svih oblika) boluje približno 463 milijuna odraslih osoba te njihovi zdravstveni troškovi čine 10% ukupnih globalnih zdravstvenih troškove. Bitno je napomenuti kako se smatra da 50% odraslih ljudi koji boluju od dijabetesa nemaju dijagnosticiranu bolest<sup>22</sup>. Nadalje, procijenjeno je da 374 milijuna odraslih ljudi ima poremećenu toleranciju glukoze<sup>22</sup>, stanje za koje je dokazano da

povećava rizik od kardiovaskularnih događaja te je povezano uz povećan rizik za razvoj dijabetesa tipa 2<sup>23</sup>.

Razvoj dijabetesa tipa 2 pod utjecajem je genskih i okolišnih faktora. Geni koji su u podlozi disfunkcije  $\beta$ -stanica gušterače u kombinaciji s genima koji utječu na adipoznost stvaraju određenu predispoziciju za razvoj dijabetesa tipa 2. Međutim, zbog naglog povećanja broja oboljelih zadnjih godina smatra se kako su okolišni čimbenici oni koji imaju presudnu ulogu. Čimbenici koji su najutjecajni u razvoju bolesti su oni povezani s urbanizacijom i utjecajem na životne navike, a uključuju smanjenu fizičku aktivnost i preveliki unos hrane koja je ujedno lošeg nutritivnog sastava. Također, razmatraju se i utjecaji drugih čimbenika poput: okoline *in utero*, okolišnih kemikalija te mikrobioma<sup>24</sup>.

Simptomi dijabetesa tipa 2 slični su dijabetesu tipa 1 i uključuju: pojačanu žeđ i suha usta (polidipsija), često uriniranje (poliurija), manjak energije, perifernu neuropatiju, zamućenje vida i druge. Temelj terapije je promjena životnih navika s naglaskom na zdravu prehranu i redovitu tjelesnu aktivnost, a ovisno o težini bolesti popraćena je oralnim antidijabeticima<sup>25</sup>. Važnost nefarmakoloških intervencija kod osoba s povećanim rizikom za razvoj dijabetesa tipa 2 dokazana je brojnim studijama u kojima su uvođenje zdravog plana prehrane te pojačana i redovita tjelesna aktivnost pokazale značajan utjecaj na sprječavanje ili odgodu razvoja bolesti<sup>26,27</sup>.

Poodmakli oblik bolesti u kojem stanje hiperglikemije nije regulirano neminovno vodi do mikrovaskularnih oštećenja i daljnjih komplikacija proporcionalnih razini i trajanju hiperglikemije<sup>28</sup>. Biokemijski mehanizmi dodatno aktivirani povišenom razinom glukoze su višestruki te se podjednako nalaze u pozadini mikro- i makrovaskularnih komplikacija<sup>29</sup>. Spomenuto narušavanje mikrovaskularne strukture razlog je korištenja prefiksa „dijabetička“ kod raznih patofizioloških stanja poput: nefropatije, neuropatije i retinopatije. Također, zajedno s nizom drugih rizičnih faktora, dijabetes tip 2 je u podlozi ubrzanih aterosklerotskih kardiovaskularnih bolesti, a dodatne mikro- i makrovaskularne komplikacije stvara hipertenzija koja se javlja s većom učestalosti kod dijabetičara.<sup>30</sup>

Metode koje se koriste u dijagnozi dijabetesa tipa 2 temelje se na mjerenju koncentracije glukoze u krvi te razlikujemo oralni glukoza tolerans test (OGTT- u kojem se razina glukoze mjeri 2 sata nakon unosa 75g glukoze) i test određivanja glukoze natašte. Nadalje, uveden je i HbA1c test kojim se određuje dugoročna hiperglikemija temeljena na životnom vijeku eritrocita od 120 dana, ali često pokazuje netočne rezultate uslijed hemolize, bolesti jetre i

bubrega, konzumacije alkohola i drugih faktora <sup>30</sup>. Unatoč činjenici da ne postoje konkretni dokazi koji bi potvrdili probiranje (eng. Screening) dijabetesa tipa 2 navedenim metodama efektivnim načinom suzbijanja njegove epidemije <sup>31</sup>, dovoljna je količina indirektnih dokaza koja opravdava oportunistički probir kod pojedinaca za koje se smatra da imaju povišen rizik za razvoj dijabetesa tipa 2 <sup>32</sup>. Daljnje probleme čine ograničenja samih probirnih testova u njihovoj prihvatljivosti (glukoza natašte), vremenskom trajanju (OGTT) te cijeni (HbA1c), ali i referentne vrijednosti koje su različito postavljene (Tablica 1) <sup>30</sup>. Stoga se provode mnoga istraživanja s ciljem pronalaska odgovarajućeg biomarkera koji bi omogućio pravovremenu dijagnozu kao i procjenu rizika od nastanka dijabetesa tipa 2 među pojedincima, što bi rezultiralo usmjeravanjem fokusa u borbi protiv te bolesti na njenu prevenciju.

**Tablica 1.** Dijagnostičke referentne vrijednosti <sup>30</sup>.

Parametar	Normalno*	Predijabetes	Dijabetes tip 2
HbA1c	<5,7% <sup>‡</sup>	5,7% - 6,4% <sup>‡</sup>	≥6,5%
	<6,0% <sup>§</sup>	6,0% - 6,4% <sup>§</sup>	
Glukoza natašte	<5,6 mmol/l <sup>‡</sup>	5,6-6,9 mmol/l <sup>‡</sup>	≥7.0 mmol/l
	<6,0 mmol/l <sup>§</sup>	6,0-6,9 mmol/l <sup>§</sup>	
OGTT	<7,8 mmol/l	7,8 – 11,0 mmol/l	≥11,1 mmol/l

OGTT, Oralni glukoza tolerans test; \*Normalni metabolizam glukoze;

<sup>‡</sup>Američka dijabetička asocijacija; <sup>§</sup>Svjetska zdravstvena organizacija.

### 1.3.1. Promjena glikozilacije u bolesti i procjeni rizika za razvoj dijabetesa tipa 2

Kao što je već prije spomenuto, mnoga patofiziološka stanja utječu na proces glikozilacije te na ukupan sastav glikana. Nastavno tome, provedene su studije koje su pratile promjenu u glikozilaciji proteina u dijabetesu tipa 2. Poznato je da dolazi do promjena u O-glikozilaciji proteina za koje se pretpostavlja da je odgovorna povećana koncentracija aktiviranog šećera UDP-GlcNAc nastala preko heksozaminskog biosintetskog puta u stanju hiperglikemije <sup>33</sup>. Za razliku od O-glikozilacije, promjene kod N-glikana u dijabetesu tipa 2 su manje istražene. Ipak, dokazane su značajne izmjene N-glikana serumskih proteina kod pacijenata koji boluju od dijabetesa tipa 2. Točnije, došlo je do značajnog smanjenja bi-antenarnih N-glikana s fukožiliranom jezgrom i jednom galaktozom na  $\alpha$ 1-6 grani <sup>7</sup>.

Prije je već naglašeno kako je važan čimbenik u borbi protiv dijabetesa tipa 2 prvenstveno njegova prevencija. Poznato je da kod teških bolesti poput: septičkog šoka,

akutnog koronarnog sindroma i akutnog zatajenja srca često dolazi do hiperglikemije. Upravo se kod pacijenata s navedenim bolestima koji su tijekom istih razvili hiperglikemiju, a da prije toga nisu pokazivali poremećaje u metabolizmu glukoze, dokazao povećani rizik za razvoj dijabetesa tipa 2<sup>34,35</sup>. Nadovezujući se na ova saznanja, ispitane su promjene u sastavu N-glikana serumskih proteina kod pacijenata koji su razvili hiperglikemiju tijekom teških bolesti te imaju povećan rizik za razvoj dijabetesa tipa 2. Rezultati su pokazali kako je došlo do povećanja grananja, galaktozilacije i sijalinizacije N- glikana serumskih proteina što povezuje povećanu kompleksnost plazmatskih N-glikana s većim rizikom za razvoj dijabetesa tipa 2 i slabijom regulacijom razine glukoze u krvi<sup>36</sup>.

#### **1.4. Alfa-1 kiseli glikoprotein**

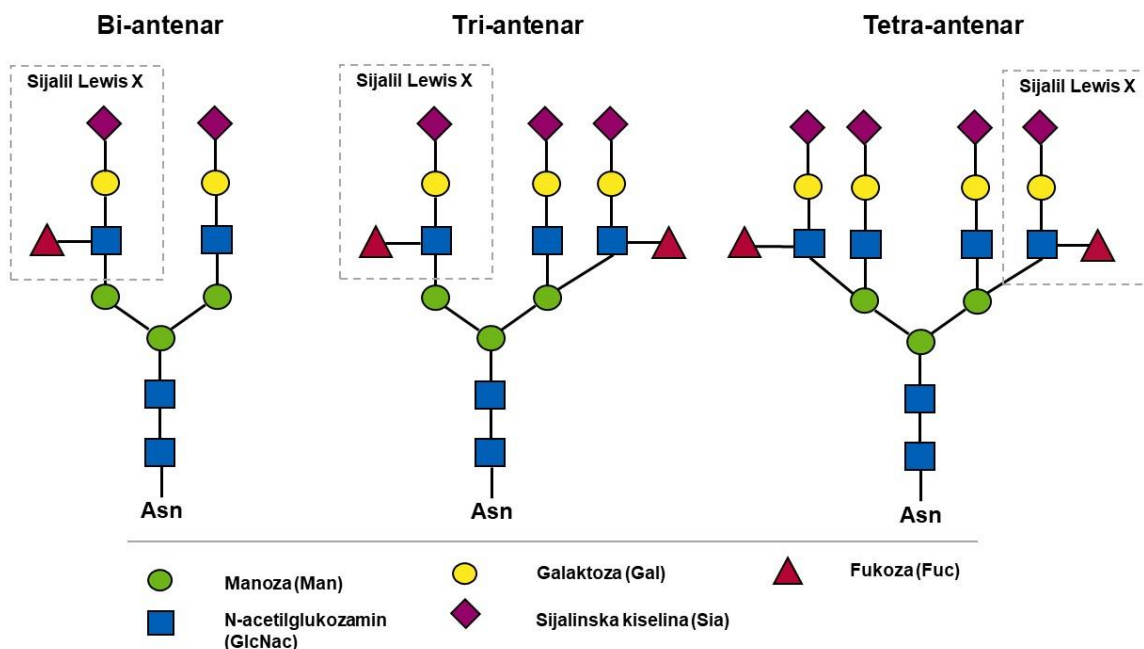
Alfa-1 kiseli glikoprotein (AGP), poznat kao i orosomukoid (ORM), plazmatski je protein neobičnih svojstava koji je prvi put je opisan 1950. godine<sup>37,38</sup>. AGP je protein kiselih svojstava ( $pK_a = 2,6$ ) i jako je dobro topljiv u vodi i drugim polarnim otapalima<sup>39</sup>. Njegova izoelektrična točka (pI) je između 2,8 i 3,8 pri fiziološkom pH od 7,4 te je protein koji sadrži visoki udio vezanih ugljikohidrata koji čine do 45% njegove ukupne mase<sup>40,41</sup>. Velik udio (oko 12%)<sup>42</sup> tih ugljikohidrata na proteinu čini sijalinska kiselina, što je razlog negativnog naboja AGP-a i posljedično utječe na prirodu reakcija koje AGP može imati s biološkim membranama<sup>40</sup>.

Primarno mjesto sinteze AGP-a je jetra od kuda se dalje izlučuje u sistemsku cirkulaciju, ali dokazano je da se sintetizira i u drugim organima poput srca, želuca i pluća, što dovodi do stabilnih koncentracija AGP-a u serumu koje iznose otprilike 0,1g/l kod čovjeka i 0,2g/l u štakora<sup>41</sup>. Koncentracija AGP-a, koji spada u serumske proteine akutne faze, može se višestruko povećati ovisno o mnogim faktorima. Neki od njih uključuju razne stresne podražaje: fizičke ozljede, upale, infekcije, trudnoću, ali i kronične bolesti poput reumatoidnog artritisa<sup>43-45</sup>. Kao primjer se može uzeti povećanje razine (10-200 puta) jetrene AGP mRNA i plazmatskog AGP- a kod miševa, štakora i zečeva unutar 24 sata od eksperimentalno izazvane infekcije<sup>41</sup>. Kod ljudi je povećanje umjerenije te iznosi ~2-6 puta<sup>40</sup>. Genska ekspresija AGP-a regulirana je interleukinom-1 (IL-1), interleukinom-6 (IL-6), faktorom tumorske nekroze (TNF) te glukokortikoidima<sup>46,47</sup>, što zajedno s činjenicom da se njegova razina povećava u ranije navedenim situacijama može sugerirati povezanost AGP-a s raznim imunomodulatornim

i protuupalnim procesima <sup>45</sup>. Također, prepoznat je kao jedan od potencijalnih biomarkera u procjeni rizika smrtnosti od svih uzroka uz albumin, lipoprotein vrlo niske gustoće i citrat <sup>48</sup>.

### 1.4.1. Struktura i genske varijante AGP-a

Humani AGP je glikoprotein molekulske mase od 41-43 kDa kojeg čini jedan polipeptidni lanac od 183 aminokiseline povezane dvjema disulfidnim vezama te mu udio vezanih ugljikohidrata čini oko 45% ukupne mase <sup>41</sup>. Proteinski dio sadrži pet glikozilacijskih mjesta (Asn-15, -38, -54, -75, -85) od kojih svako mjesto može eksprimirati bilo koji oblik N-vezanih glikana različitog stupnja grananja (bi-, tri- i tetra-antenari) (Slika 2) <sup>45</sup>.



**Slika 2.** Primjeri di-, tri-, i tetra-antenarnih N-vezanih glikana humanog AGP-a. Isprekidanim linijama su označeni sijalil Lewis antigeni <sup>45</sup>.

Na kromosomu 9 nalaze se 3 gena (AGP-A, AGP-B i AGP-B') koji kodiraju ukupni humani AGP <sup>41</sup>. AGP-A kodira zastupljeniji oblik serumskog AGP-a (ORM1) dok AGP-B i AGP-B' (identični su i vjerojatno nastali nedavnom duplikacijom na kromosomu) kodiraju manje zastupljeni oblik AGP-a (ORM2) koji se od ORM1 razlikuje u 22 aminokiseline u primarnoj strukturi. <sup>49,50</sup>. Gen za ORM1 je polimorfan i kodira 3 genske varijante: F1, F2 i S koje se međusobno razlikuju do 5 aminokiselina te se one obično zajednički označavaju kao varijante F\*S, dok geni za ORM2 kodiraju gensku varijantu A (Tablica 2) <sup>45</sup>. Plazmatske



koncentracije navedenih genskih varijanti AGP-a se razlikuju te se kod zdravih pojedinaca F\*S naprema A odnosi u omjeru ~ 2-3:1 <sup>51</sup>. Već je spomenuto kako se ukupna koncentracija AGP-a povećava tijekom patofizioloških stanja. Druge studije pokazale su kako se mijenja i omjer genskih varijanti samog AGP-a u takvim stanjima <sup>51</sup>. Kod pacijenata oboljelih od karcinoma pokazalo se da je uz povećanje ukupne koncentracije AGP-a značajno porastao i omjer F\*S varijanti u odnosu na A i kako su F\*S varijante zaslužne za svojstva AGP-a vezana uz reakcije akutne faze<sup>52</sup>. Nisu uočene razlike u ukupnoj koncentraciji AGP-a između muškaraca i žena niti razlike u relativnim omjerima F\*S i A genskih varijanti <sup>53</sup>. Međutim, uočena je razlika u strukturi između navedenih varijanti, točnije između veznih mjesta na proteinskom dijelu. Unutar veznih mjesta obiju varijanti su jednaka dva reznja, dok je kod F\*S varijanti vezno mjesto šire te se unutar njega nalazi i dodatni treći reznj za kojeg se pretpostavlja da je važan faktor kod razlike u selektivnosti vezanja različitih liganda između navedenih varijanti <sup>54-56</sup>.

**Tablica 2.** Genske varijante humanog AGP-a <sup>49</sup>.

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

\*Nomenklatura za gene i proteine se u literaturi koristi naizmjenično

### 1.4.2. Glikozilacija AGP-a

Za veliku raznolikost ovog glikoproteina, uz već navedene genske varijante i pet glikozilacijskih mjesta na proteinskom dijelu, možda su i najviše zaslužni N- vezani glikanski lanci koji se dodatno razlikuju po stupnju grananja te po svojim terminalnim šećerima <sup>41</sup>. Spomenute varijacije N-glikana na AGP-u su njegove glikoforme te ih je najmanje 20 otkriveno <sup>57</sup>, a neke studije pokazuju i do 80 različitih glikoformi <sup>58</sup>. Sijalinska kiselina jedan je od češćih terminalnih šećera, značajna je za karakteristična svojstva koja AGP pokazuje te je uvijek vezana na galaktozne ostatke  $\alpha$ 2-3 ili  $\alpha$ 2-6 vezom. Neki od glikana mogu imate vezanu

terminalnu fukožu  $\alpha$ 1-3 vezom i pri tome tvoriti takozvani sijalil Lewis X antigen<sup>44,45</sup>. Jedna od karakteristika AGP-a je da je njegova glikozilacijska heterogenost pod utjecajem raznih bolesti te je dokazano da kod pacijenata s akutnim upalnim procesima dolazi do porasta bi-antenarnih struktura kao i onih koji su  $\alpha$ 1-3 fukozilirani<sup>59</sup>. Promjene u sastavu vezanih terminalnih šećera te relativnog omjera N-vezanih glikana s različitim stupnjem grananja pokazane su i kod kroničnih bolesti poput reumatoidnog artritisa, nekih vrsta raka te dijabetesa<sup>60-63</sup>. Nije poznato utječu li promjene u glikozilaciji tijekom patofizioloških procesa na biološke funkcije AGP-a, ali pretpostavlja se kako su važne prilikom protuupalnih procesa u kojima on sudjeluje te kod zaštite samog proteina od stresnih podražaja<sup>45</sup>.

### 1.4.3. Biološke funkcije AGP-a

Smatra se da AGP ima važne biološke funkcije te je dokazano kako djeluje kao molekula s imunomodulatornim i protuupalnim svojstvima, ali njegova fiziološka uloga nije do kraja razjašnjena<sup>41</sup>. Pripadajući pozitivnim proteinima akutne faze njegova se koncentracija značajno povećava u takvim reakcijama te uzimajući u obzir njegova svojstva može se pretpostaviti da AGP sudjeluje u vezanju egzogenih i endogenih upalnih medijatora. Dokazano je da zajedno s bakterijskim lipopolisaharidom (LPS) tvori kompleks AGP-LPS koji neutralizira toksični efekt LPS-a te pospješuje njegovu eliminaciju<sup>64</sup>. Pokazuje protektivnu ulogu u letalnom šoku izazvanim TNF-om kod miševa koja se prepisuje AGP-ovoj aktivnosti u inhibiciji agregacije trombocita<sup>65</sup>. Zanimljivo je kako heterogenost glikoformi ima utjecaj na jačinu učinka, točnije pokazano je kako desijalinizirani oblici imaju jači učinak u inhibiciji agregacije trombocita<sup>66</sup>. Dokazani su i drugi protektivni učinci AGP-a *in vivo* poput protektivnog učinka kod infekcija parazitom *P. falciparum* te bakterijom *K. pneumoniae*, kao i protektivni učinci kod inflamatornog hepatitisa, hipovolemičkog šoka, edematoznog pankreatitisa i drugih patofizioloških stanja<sup>42</sup>.

Iznimno važna ulogu AGP-u daje njegova, fizikalno-kemijskim svojstvima uvjetovana, sposobnost vezanja, pretežito, ali ne ekskluzivno, bazičnih lijekova te uz albumin predstavlja najvažniji serumski transportni protein koji veže lijekove i ima utjecaj na njihovu bioraspoloživost. Osim djelovanja kao transportni protein egzogenih molekula, bitan je i kod transporta endogenih molekula steroidne i kateholaminske strukture. Vezanje liganda na AGP pod utjecajem je mnogih faktora kao što je koncentracija AGP-a, koncentracija liganda, pH te prisutnost drugih liganada ili proteina koji mogu utjecati na vezanje. Dodatno, važnu značajku

imaju i već navedene genske varijante s različitim afinitetima vezanja za određene ligande kao i razna fiziološka i patofiziološka stanja u kojima dolazi do promjena u heterogenosti glikoformi <sup>67</sup>.

## 1.5. LC-ESI-MS

Za istinsko shvaćanje bioloških uloga glikoproteina potrebne su napredne tehnike koje omogućuju precizno određivanje razlika u strukturi koje oni posjeduju te saznanje o čimbenicima zaslužnima za toliku raznolikost. Tehnika koja se pokazala među najboljima u davanju strukturnih informacija o glikoproteinima je masena spektrometrija (MS) <sup>68</sup>. Masena spektrometrija analitička je tehnika pomoću koje možemo saznati informacije o strukturi, ali i o molekularnoj masi te koncentraciji spomenutog analita. Pojednostavljeno, svaki se maseni spektrometar sastoji od četiri dijela: ulaza za uzorak, ionizacijskog izvora, analizatora masa te ionskog detektora. Nakon što se uneseni analit ionizira jednom od ionizacijskih tehnika, ovisno o tehnici dolazi do različite pojavnosti fragmentacije i količine ionizacije, dobiveni se ioni prevode u analizator masa gdje se razdvajaju na temelju njihovog omjera mase i naboja ( $m/z$ ). Ionski detektor ih očitava i prevodi u električni signal koji se grafički prikazuje kao maseni spektar na kojemu je prikazana relativna jačina signala u odnosu na  $m/z$  komponenti početnog analita <sup>69,70</sup>.

Veliki napredak u analizi bioloških molekula napravljen je otkrićem tehnike elektroraspršenjem (ESI, eng. electrospray ionization) koja je opisana kao „meka“ tehnika jer prilikom ionizacije generalno ne dolazi do fragmentacije analita <sup>71</sup>. Nadalje, važnost ovome otkriću doprinosi i činjenica da je izvor ionizacije putem tehnike elektroraspršenja omogućio uparivanje MS-a na uređaje za tekućinsku kromatografiju (LC, eng. liquid chromatography) pri čemu je nastala iznimno snažna analitička tehnika (LC-ESI-MS) sposobna za analizu kompleksnih bioloških uzoraka <sup>72</sup>.

Kod LC-ESI-MS-a nakon razdvajanja uzorka u prigodnom otapalu pomoću tekućinske kromatografije, on se relativno niskom brzinom protoka unosi u maseni spektrometar kroz tanku čeličnu kapilaru. Vrh kapilare je pod visokim naponom (2–6 kV) što stvara jako električno polje koje dovodi do raspršenja uzorka u aerosol ioniziranih kapljica. Protok inertnog plinovitog dušika ( $N_2$ ) uz kapilaru osigurava bolje raspršenje te pomaže u prenošenju

ioniziranih kapljica prema analizatoru masa. Također, dolazi do smanjenja kapljica zbog isparavanja otapala, a za uklanjanje ostatka otapala od ioniziranog analita zaslužna je grijana kapilara (100-300 °C) koja služi za sakupljanje raspršenog analita i njegovog prevođenja u analizator masa koji je pod visokim vakuumom <sup>73</sup>.

Razlikujemo više vrsta analizatora masa ovisno o principima koje koriste za separaciju iona. Jedan od njih je kvadrupolni analizator koji je sastavljen od četiri šipki pod naponom koje stvaraju oscilirajuće električno polje unutar kojeg se ioni analita razdvajaju na temelju njihovog  $m/z$  i na temelju stabilnosti njihove putanje. Kada govorimo o tandemskejoj masenoj spektrometriji, unutar istog instrumenta mogu se nalaziti više analizatora u sekvenci. Primjerice, kod trostrukog kvadrupola imamo dva kvadrupola međusobno odijeljena kolizijskom ćelijom čime se u prvom kvadrupolu na temelju  $m/z$  odabiru određeni analiti koji se u kolizijskoj ćeliji, punjenoj najčešće inertnim plinom, dodatno fragmentiraju te potom analiziraju u trećem kvadrupolu. Nadalje, analizatori kojima se separacijska metoda temelji na brzini prethodno ubrzanih iona nazivaju se analizatori vremena leta ili TOF analizatori (eng. Time of flight). Ioni dobiveni na ionizacijskom izvoru ubrzavaju se djelovanjem homogenog električnog polja prema specijalnoj cijevi (eng. Flight tube) u kojoj ne djeluje električno polje te se razdvajaju na temelju razlike u brzini prije detekcije na drugom kraju cijevi. Svi ioni dobivaju jednaku kinetičku energiju te se sukladno njihovim brzinama vrši karakterizacija njihovih masa i naboja. Razvojem tehnologija omogućene su razne kombinacije tandemskih analizatora, a jedna od takvih je i kvadrupolni analizator vremena leta (qTOF). Iona analita koji se detektiraju u određenom trenutku najčešće ima malo te je za dobivanje kvalitetnog signala potrebno korištenje amplifikatora. Kao što ima više vrsta ionizacijskih izvora i analizatora masa, tako razlikujemo i vrste detektora koji ovise o dizajnu instrumenta <sup>74</sup>.

## **2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA**

Epidemija dijabetesa, uzrokovana pretežito urbanim načinom života i lošim životnim navikama, hara svjetskom populacijom te se ulažu ogromni naponi u iznalaženje načina da negativne posljedice koje ona nosi sa sobom, kako zdravstvene tako i ekonomske, budu svedene na najmanju moguću mjeru. Epidemiološki podaci koji predviđaju kako 50% odraslih pojedinaca koji boluju od dijabetesa zapravo nemaju dijagnosticiranu bolest te iznimno veliki broj ljudi s poremećajem u toleranciji glukoze <sup>22</sup>, stanjem koje često vodi u razvoj dijabetesa tipa 2, ukazuju na to kako bi pravovremena dijagnoza te razvoj novih stratifikacijskih metoda, kojima bi mogli prepoznati pojedince s visokim rizikom za nastanak bolesti, mogli biti vrlo korisni u borbi protiv epidemije dijabetesa.

Na temelju studija koje su dokazale da je razvoj hiperglikemije u akutnoj bolesti značajni pokazatelj povećanog rizika naknadnog razvoja dijabetesa tipa 2 <sup>34,35</sup> provedena su daljnja istraživanja koja su u fokus interesa stavila sastav plazmatskih N-glikana u takvom stanju. Studijom na populaciji koja je razvila stanje hiperglikemije tijekom akutne bolesti pokazano je kako je povećana razgranatost N-glikana plazmatskih proteina povezana s povećanim rizikom za nastanak dijabetesa tipa 2 <sup>36</sup>. Međutim, kako ukupni plazmatski N-glikom sadrži različite glikane koji potječu od različitih glikoproteina, konačni zaključak o pravom razlogu i značenju promjene razgranatosti je izostao.

Alfa-1-kiseli glikoprotein plazmatski je glikoprotein koji sadrži visoko razgranate N-glikane zbog čega se pretpostavlja da su izmjene u njegovoj glikozilaciji zaslužne za prethodno dokazane promjene ukupnog plazmatskog N-glikoma te je izabran kao glikoprotein od interesa tijekom ovog istraživanja. Specifični ciljevi ovoga rada su određivanje povezanosti različitih glikoformi AGP-a kod pacijenata koji su prebolili tešku akutnu bolest s povećanim rizikom za razvoj dijabetesa tipa 2. Zbog iznimne heterogenosti N-glikana humanog AGP-a koja je posljedica 5 različitih glikozilacijskih mjesta od kojih sva mogu vezati glikane različite razgranatosti i stupnja sijalinizacije ili fukozilacije <sup>41,45</sup> za analizu uzoraka korištena je reverzno-fazna LC-MS metoda kojom su dobivene informacije svojstvene svakom glikozilacijskom mjestu.

### **3. ISPITANICI I METODE**

### 3.1. Ispitanici

Ispitanici koji su uključeni u ovu studiju primljeni su u jedinicu intenzivnog liječenja (JIL) Kliničkog bolničkog centra Zagreb (KBC Zagreb) tijekom 6 mjeseci od veljače do srpnja 2013. godine. Ispitani pojedinci jednaki su onima korištenim u analizi ukupnog N-glikoma plazmatskih proteina koja je prethodila ovoj studiji<sup>36</sup>. Uključni kriterij definiran je uzimanjem u obzir zaprimljenih pacijenata u JIL-u starijih od 18 godina bez povijesti poremećaja metabolizma glukoze koji su živi otpušteni iz KBC-a. Isključni kriteriji su bili: dijagnoza dijabetesa ili drugih poremećaja metabolizma glukoze prije ili tijekom hospitalizacije, žene u trudnoći i one kojima je u povijesti bolesti zabilježen gestacijski dijabetes, uzimanje glukokortikoidne terapije tijekom ili 3 mjeseca prije zaprimanja u JIL. Za dokazivanje već postojećeg dijabetesa na svim sudionicima izvršen je oralni glukoza tolerans test (OGTT) te je izmjerena razina HbA1c. Nadalje, za potvrdu dijabetesa ili drugih poremećaja u metabolizmu glukoze koristili su se kriteriji Američke dijabetičke asocijacije. Uključni i isključni kriteriji potvrđeni su na kontrolnom pregledu 6-8 tjedana nakon otpuštanja iz KBC-a dogovorenom s pacijentima koji su potpisali informirani pristanak. Potpisivanje informiranog pristanka provedeno je prilikom otpuštanja iz KBC-a. Pojedinci za koje se sumnjalo da i dalje pokazuju znakove upalnih procesa ponovno su testirani nakon 2 tjedna. Za utvrđivanje upalnih procesa ispitanicima je napravljena kompletna krvna slika te je izmjerena koncentracija C-reaktivnog proteina. Za utvrđivanje N-glikozilacije AGP-a, svakom sudioniku uzet je uzorak krvi natašte u standardizirane epruvete s antikoagulansima (EDTA i citrat), a potom je odvojena krvna plazma koja je spremljena na - 20°C do analize. U studiji je sveukupno sudjelovalo 108 sudionika kojima su dodatno zabilježeni podaci o visini, kilaži, BMI-u i obiteljskoj anamnezi vezanoj uz dijabetes te su sažeto prikazani u Tablici 3.

Studija je osmišljena u suglasnosti s Helsinškom deklaracijom te su svi sudionici studije potpisali informirani pristanak. Također, studija je odobrena od strane bolničkog etičkog povjerenstva.



**Tablica 3.** Deskriptivna statistika demografskih podataka pacijenata uključenih u studiju.

	Hiperglikemija tijekom akutne bolesti	Bez hiperglikemije tijekom akutne bolesti
Broj pacijenata (N)	59	49
Dob (godina)	58 (25 - 79)	54 (18 - 75)
Ženski spol (N,%)	18 (30,5%)	14 (28,6%)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,2 ± 4,1	23,1 ± 3,9
Obiteljska anamneza dijabetesa (N,%)	19 (32,2%)	8 (16,3%)

## 3.2. Materijali i metode

### 3.2.1. Obogaćivanje AGP-a iz uzoraka plazme

Koristeći dio postupka metode za izolaciju AGP-a, iz uzoraka humane plazme, AGP je obogaćen precipitacijom „seromukoidne“ frakcije <sup>75</sup>. Iz svakog uzorka plazme, uzetih iz populacije ispitanika opisanih ranije, 50µl je prebačeno u jažice PCR pločice u formatu s 96 jažica (Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD). U svakoj jažici plazma je pomiješana s 1,2M perkloratom (Merck, Darmstadt, Germany) 1:1 (v:v) rezultirajući koncentracijom perklorata od 0,6M koja se pokazala optimalnom u dobivanju AGP-a s minimalnom kontaminacijom drugim proteinima <sup>75</sup>. Potom su uzorci centrifugirani 20 minuta na 1200g pri temperaturi od 5°C (Jouan CT, Thermo Scientific). Koristeći interno izrađene 3D isprintane adaptore supernatant je prebačen u novu PCR pločicu centrifugiranjem na 15g tijekom 30 sekundi. Supernatantu u novoj PCR pločici je dodana 1/10 (≈70µL) volumena 2% fosfotungstične kiseline (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, SAD) u 2N HCl (VWR International, Radnor, PA, SAD) te je sve centrifugirano 20 minuta na 1200g pri 5°C. Nakon centrifugiranja, supernatant je odbačen u praznu PCR pločicu koristeći već spomenute 3D adaptore centrifugiranjem na 15g tijekom 30 sekundi čime se dobila „seromukoidna“ frakcija s obogaćenim AGP-om u preostalom precipitatu. Završni korak zahtijeva dobivanje bistre otopine dodavanjem ≈40 µL of 0,1N NaOH (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, SAD) u preostali precipitat.

### **3.2.2. Redukcija, alkilacija i digestija tripsinom**

Solubiliziranim precipitatima dodano je po 5 $\mu$ L 1,5% RapiGest SF surfaktanta (Waters, Milford, MA, SAD) koji je pripremljen s 30mM amonijevim bikarbonatom (Acros Organics, Geel, Belgija) te je uslijedila inkubacija od 5 minuta u peći na 60°C. Potom je uzorcima dodano po 5 $\mu$ L 60mM ditionitriola (DTT) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, SAD) koji djeluje kao reducirajuće sredstvo te su se uzorci vratili na inkubaciju od 30 minuta na 60°C. Kao sredstvo za alkilaciju, nakon što su se uzorci ohladili na sobnu temperaturu, dodano je 5 $\mu$ L 160mM jodoacetamida (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, SAD) te su uzorci stavljeni na tresilicu tijekom inkubacije u mraku od 30 minuta. Djelovanje viška jodoacetamida poništeno je dodavanjem 1 $\mu$ L 200mM DTT-a, a nakon toga se za postizanje pH vrijednosti potrebne za digestiju tripsinom dodalo 1 $\mu$ L 2M amonijeva bikarbonata. Nadalje, proces tripsinizacije započet je dodavanjem 4 $\mu$ L 0,4 $\mu$ g/ $\mu$ L TPCCK-tretiranog tripsina (Promega, Madison, WI, SAD) koji je pripremljen s 50mM octenom kiselinom (Promega, Madison, WI, SAD) te su uzorci stavljeni na inkubaciju preko noći na 37°C. Sljedeći dan dodano je 2 $\mu$ L 1N HCl i uzorci su stavljeni na inkubaciju od 45 minuta na 37°C kako bi se razgradio ostatak surfaktanta RapiGest SF te kako ne bi kasnije smetao tijekom masene spektrometrije.

### **3.2.3. HILIC-SPE obogaćivanje glikopeptida**

Na polipropilenskoj filter pločici s 96 jažica (Orochem, Naperville, IL, SAD) glikopeptidi su obogaćeni koristeći se ekstrakcijom na čvrstoj fazi uz kromatografiju temeljenoj na hidrofilnim interakcijama (eng. Hydrophilic interaction chromatography based solid-phase extraction, HILIC-SPE). Pripremljena je 50mg/mL suspenzija Chromabond® HILIC kuglica (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) s 0,1% trifluorooctenom kiselinom (TFA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, SAD) te je u svaku jažicu dodano 0,1mL pripremljene suspenzije. Filter pločica, ispod koje se nalazi pločica za otpad, postavljena je iznad vakuumske pumpe (Millipore Corporation, Billerica, MA, SAD) te se uz primjenu vakuuma uklanjalo otapalo. Sve jažice su prvotno kondicionirane ispiranjem dva puta s 250  $\mu$ L 0,1% TFA nakon čega su stavljeni u početne uvjete ispiranjem dva puta s 250 $\mu$ L 90% acetonitrilom (ACN) (VWR International, Radnor, PA, SAD) + 0,1% TFA. Nadalje, uzorci u kojima se nalaze glikopeptidi razrijeđeni su sa 450 $\mu$ L ACN + 0,1% TFA i takvi prebačeni u jažice pločice iznad vakuumske pumpe. Dodatno, uzorci su ispirani dva puta s 250 $\mu$ L ACN + 0,1% TFA. U završnom koraku obogaćeni glikopeptidi eluirani su u PCR pločicu, postavljenu umjesto pločice za otpad, s 200

$\mu\text{l}$  0,1% TFA. Potom je dobivenom eluatu uklonjen ostatak otapala u SpeedVac vakuumskom koncentratu (Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD) te je skladišten na  $-20^{\circ}\text{C}$  do analize.

### **3.2.4. RP-LC-ESI-MS(/MS)**

Za separaciju AGP glikopeptida dobivenih tripsinizacijom korišten je nanoACQUITY UPLC sustav (Waters, Milford, MA, SAD) spregnut s Compact masenim spektrometrom (Bruker Daltonics, Bremen, Njemačka) koristeći ionski izvor CaptiveSpray nanoBooster (Bruker Daltonics, Bremen, Njemačka). Povećanje ionizacije glikopeptida postignuto je dodavanjem ACN-a u struju dušika. Uzorcima je dodano  $30\mu\text{L}$  ultračiste vode i prije unošenja u Acclaim PepMap100 C8 ( $5\text{ mm}\times 300\mu\text{m}$  i.d.) pretkolonu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), na kojoj su ispirani 3 minute s 0,1% TFA (Otapalo A) protokom od  $40\mu\text{L}/\text{min}$ , glikopeptidi su razrijeđeni 10 puta. Koristeći Halo C18 nano-LC kolonu ( $150\text{ mm}\times 75\mu\text{m}$  i.d.) s  $2.7\mu\text{m}$  HALO česticama fuzionirane jezgre (Advanced Materials Technology, Wilmington, DE, SAD) glikopeptidi AGP-a su razdvojeni na temelju razlika u peptidnoj osnovi. Gradijentno eluiranje se vršilo ukupno 16,5 minuta s brzinom protoka od  $1\mu\text{L}/\text{min}$  na temperaturi kolone koja je iznosila  $30^{\circ}\text{C}$ . Tijekom prvih 5 minuta se udio 80% ACN (Otapalo B) povećao s 0% do 20%, a tijekom preostalih 11.5 minuta s 20% do 50%.

Svakom analitu snimljen je fragmentacijski spektar za glikanski i peptidni dio <sup>76</sup>. NanoACQUITY UPLC sustavom se upravljalo HyStar softverom, verzija 4.2 (Bruker Daltonics, Bremen, Njemačka). Uzimajući raspon masa od  $m/z$  100 do  $m/z$  4000 maseni spektri su snimani frekvencijom od 0,5 Hz. Kolizijska ćelija je bila ispunjena argonom te su kolizijska i ionska energija postavljene na 4 eV. Pomoću softvera GlycoWorkbench <sup>77</sup> i GlycoMod <sup>78</sup> određeni su sastav i struktura glikana.

### **3.2.5. Obrada podataka**

Za automatsku relativnu kvantifikaciju podataka dobivenih MS-om korišten je LaCyTools (verzija 1.0.11.0.1 b.9). Prije ekstrakcije podataka datoteke korištene u obradi prebačene su u mzXML oblik MSConvert alatom (ProteoWizard verzija 3). Kromatogrami su usklađeni uzimajući u obzir pet najsnažnijih glikopeptidnih signala, dok je na trostruko i četverostruko nabijenim ionima izvršena integracija vršaka tako da sadrže najmanje 90% teorijske izotopne distribucije. Omjer signala i šuma (veći od 9) integriranog signala, devijacija

od teorijske izotopne distribucije (manja od 25%) i točnost mase (između -35 i 35ppm) služili su kao kontrola kvalitete u dokazivanju prisutnosti glikopeptida kod određenog signala. Kako bi se izbjegla varijacija u jačini signala između uzoraka te omogućila njihova međusobna usporedba zbrojeni izvučeni signali za trostruko i četverostruko nabijene ione su normalizirani prema ukupnoj integriranoj površini po glikozilacijskom mjestu.

### **3.2.6. Statistička analiza**

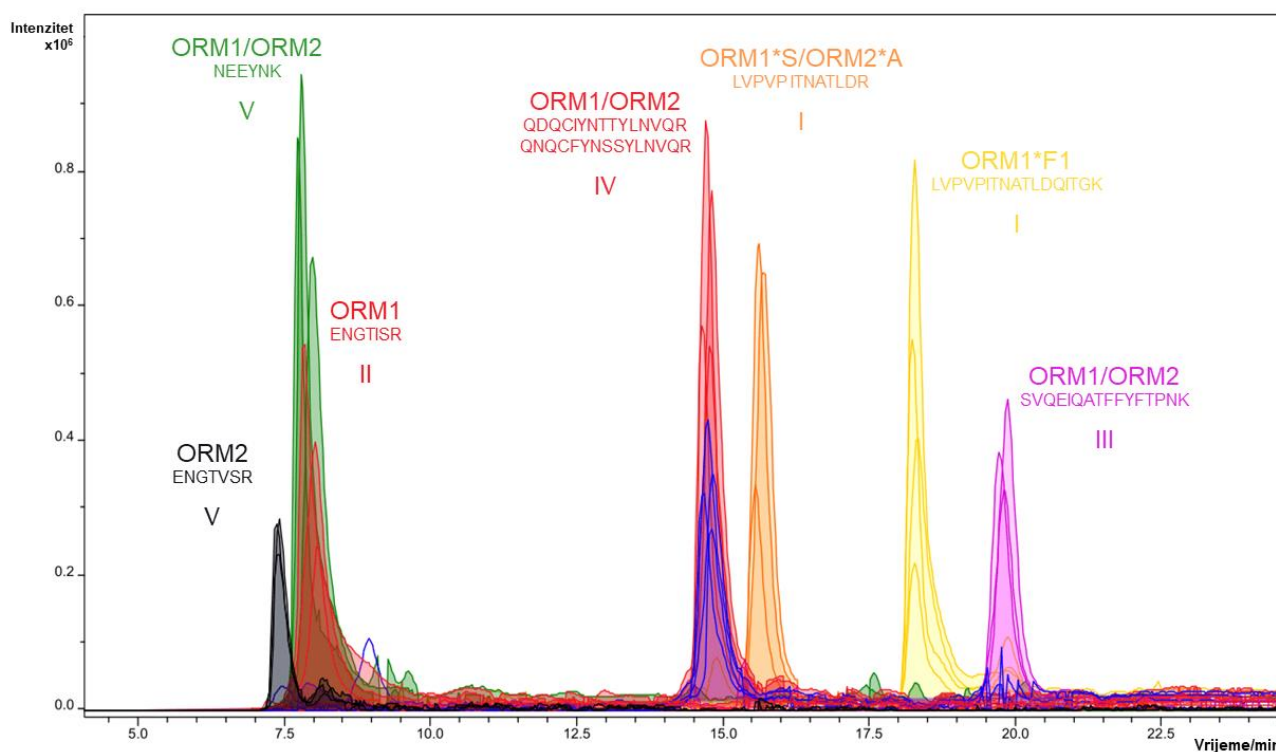
Tehničke razlike u pripremi i analizi uzoraka iz različitih serija koje nisu povezane s biološkim varijacijama mogu biti primijećene tijekom eksperimenta te dovesti do promjena u dobivenim rezultatima, a korekcijom šaržnog učinka svedene su na najmanju moguću mjeru. Korekcija je izvršena korištenjem ComBat metode u „sva“ programskom paketu programskog jezika R, a prije toga su mjerenja logaritamski transformirana. Kao serijska kovarijanca je modeliran redni broj pločice s uzorcima koji je ujedno predstavljao izvor tehničkih razlika u pripremi i analizi. Potom se u cilju dobivanja što preciznijih rezultata procijenjeni šaržni učinak oduzeo od vrijednosti logaritamski transformiranih mjerenja.

Korištenjem logističke regresije u kojoj su zasebno za svako derivirano svojstvo glikana kao dodatne kovarijance uključeni dob i spol, analizirana je poveznica između hiperglikemije i deriviranih svojstva glikopeptida AGP-a. Pomoću R programskog paketa „GenABEL“ varijable glikanskih svojstava su transformirane u standardnu normalnu distribuciju čime one uvijek imaju jednaku standardiziranu varijancu te se omjeri izgleda mogu uspoređivati između različitih glikanskih svojstava. Promjena od jedne standardne devijacije za svaku varijablu odgovara procijenjenoj veličini efekta. Od procedura za kontrolu pogrešaka do kojih dolazi pri višestrukome testiranju korištena je Benjamini-Hochberg-ova FDR (eng. False discovery rate) metoda.

Analiza i vizualizacija podataka izvršena je u programskom jeziku R (verzija 3.5.1.)

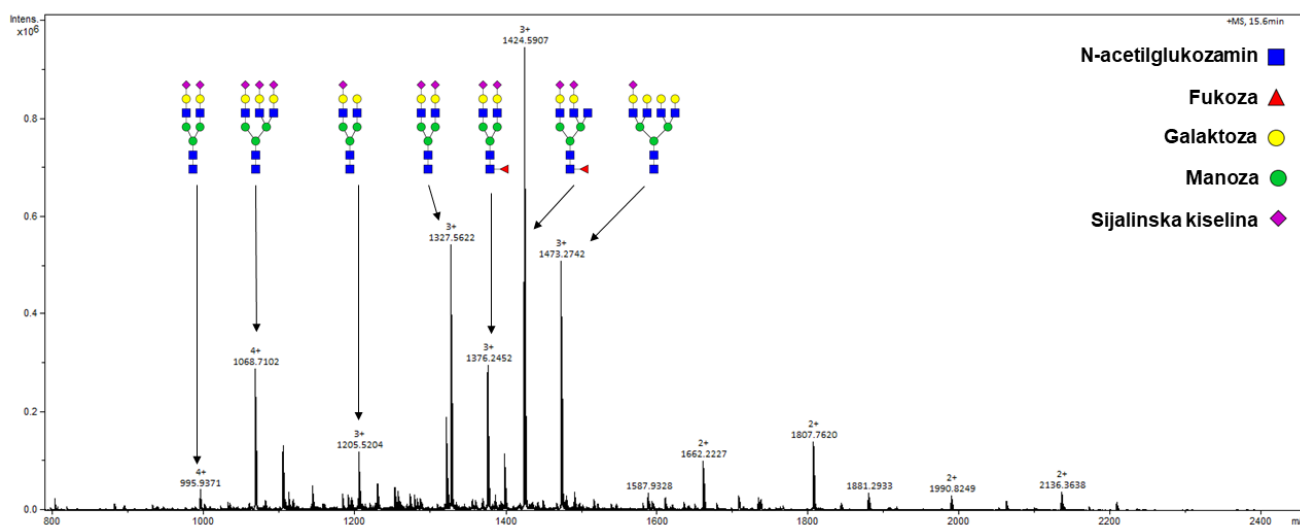
## **4. REZULTATI**

Uzorci ispitanika obrađeni su na način kojim su dobiveni obogaćeni glikopeptidi AGP-a koji su potom analizirani reverzno-faznom LC-MS metodom, što je ranije detaljnije pojašnjeno. Time se htio vidjeti sastav glikana svakog pojedinačnog glikozilacijskog mjesta AGP-a i međusobno usporediti N-glikanski profil AGP-a kod pacijenata kod kojih je zabilježena hiperglikemija tijekom akutne bolesti s onima kod kojih to nije bio slučaj. Uzimajući u obzir veći broj glikozilacijskih mjesta na AGP-u te više genskih varijanti koje se eksprimiraju u ljudi, analizom uzoraka dobivena je velika količina podataka u kojoj su promatrane različite glikanske strukture s ukupno 7 različitih glikozilacijskih mjesta. Tripsinizacijom uzoraka dobiveni su manji peptidni sljedovi, a oni koji su obuhvaćali glikozilacijsko mjesto i time sadržavali glikane dodatno su obogaćeni koristeći se ekstrakcijom na čvrstoj fazi uz kromatografiju temeljenoj na hidrofilnim interakcijama. Takvi glikopeptidi su razdvojeni na reverzno-faznom nanoUPLC sustavu spregnutim s ESI-qTOF masenim spektrometrom na temelju razlike u peptidnim okosnicama i rezultati analize su prikazani na Slici 3.



**Slika 3.** Kromatogram izoliranih iona (eng. Extracted ion chromatogram, EIC) nekoliko najzastupljenijih glikana za svako glikozilacijsko mjesto i gensku varijantu koje vidimo. Uz pikove koji odgovaraju određenom vremenu zadržavanja u istoj boji je označeno od koje genske varijante potječu analizirani glikani tog glikozilacijskog mjesta te peptidni slijed na kojem se nalaze. Rimskim brojevima označena su glikozilacijska mjesta. Genske varijante AGP-a su objašnjene ranije u tekstu te su sažeto prikazane u Tablici 2.

Nadalje, kako bi se odredili glikani koji se nalaze na pojedinom glikozilacijskom mjestu analizirani su maseni spektri za svako od njih. Na Slici 4 je prikazan maseni spektar prvog glikozilacijskog mjesta AGP-a genske varijante ORM1\*F1 sa zabilježenim glikanskim strukturama za najintenzivnije signale. Točna struktura N-glikana koja odgovara dobivenim signalima razaznala se uspoređivanjem dobivenih m/z vrijednosti s m/z vrijednostima teoretskih N-glikana pretraživanih za svako glikozilacijsko mjesto koje su, uz formulu koja odgovara sastavu tih glikana i vremenom zadržavanja na koloni, prikazane u Tablici 4.



**Slika 4.** Spektar prvog glikozilacijskog mjesta ORM1\*F1 genske varijante snimljen ESI-qTOF masenim spektrometrom. Uz najintenzivnije signale su označene strukture N-glikana koje se po dobivenoj m/z vrijednosti poklapaju s teoretskom vrijednosti pretraživanih N-glikana za određeno glikozilacijsko mjesto vidljivih u Tablici 4.

**Tablica 4.** Teoretski sastavi N-glikana koji su pretraživani za svako glikozilacijsko mjesto.

Sastav glikana	masa	m/z 3+	m/z 4+	t <sub>r</sub> /s	Sastav glikana	masa	m/z 3+	m/z 4+	t <sub>r</sub> /s
VORMIIN4H5S1	2675,0438	892,6885	669,7682	461	IVORMIN6H7S1F1	4704,8887	1569,3035	1177,2295	889
VORMIIN4H5S2	2966,1392	989,7204	742,5421	461	IVORMIN6H7S2F1	4995,9842	1666,3353	1250,0033	889
VORMIIN4H5S2F1	3112,1971	1038,4063	779,0566	461	IVORMIN6H7S3F1	5287,0796	1763,3671	1322,7772	889
VORMIIN5H5S1	2878,1232	960,3817	720,5381	461	IVORMIN6H7S4F1	5578,1750	1860,3989	1395,5510	889
VORMIIN5H5S2	3169,2186	1057,4135	793,3119	461	IVORMIN6H7S2F2	5142,0421	1715,0213	1286,5178	889
VORMIIN5H5S2F1	3315,2765	1106,0994	829,8264	461	IVORMIN6H7S3F2	5433,1375	1812,0531	1359,2916	889
VORMIIN5H6S1	3040,1760	1014,3993	761,0513	461	IVORMIN6H7S4F2	5724,2329	1909,0849	1432,0655	889
VORMIIN5H6S2	3331,2714	1111,4311	833,8251	461	IVORMIN7H8S2	5215,0584	1739,3601	1304,7719	889
VORMIIN5H6S3	3622,3668	1208,4629	906,5990	461	IVORMIN7H8S3	5506,1539	1836,3919	1377,5457	889
VORMIIN5H6S1F1	3186,2339	1063,0852	797,5658	461	IVORMIN7H8S4	5797,2493	1933,4237	1450,3196	889
VORMIIN5H6S2F1	3477,3293	1160,1171	870,3396	461	IVORMIN7H8S2F1	5361,1164	1788,0461	1341,2864	889
VORMIIN5H6S3F1	3768,4248	1257,1489	943,1135	461	IVORMIN7H8S3F1	5652,2118	1885,0779	1414,0602	889
VORMIIN5H6S3F2	3914,4827	1305,8348	979,6279	461	IVORMIN7H8S4F1	5943,3072	1982,1097	1486,8341	889
VORMIIN6H7S1	3405,3082	1136,1100	852,3343	461	IVORMIN8H9S3	5871,2861	1958,1026	1468,8288	889
VORMIIN6H7S2	3696,4036	1233,1418	925,1082	461	IVORMIN8H9S4	6162,3815	2055,1344	1541,6026	889
VORMIIN6H7S3	3987,4990	1330,1736	997,8820	461	IVORMIN8H9S4F1	6308,4394	2103,8204	1578,1171	889
VORMIIN6H7S4	4278,5945	1427,2054	1070,6559	461	IORMISORMIIAN4H5S1	3321,4856	1108,1691	831,3787	949
VORMIIN6H7S1F1	3551,3661	1184,7960	888,8488	461	IORMISORMIIAN4H5S2	3612,5810	1205,2009	904,1525	949
VORMIIN6H7S2F1	3842,4615	1281,8278	961,6227	461	IORMISORMIIAN4H5S2F1	3758,6389	1253,8869	940,6670	949
VORMIIN6H7S3F1	4133,5569	1378,8596	1034,3965	461	IORMISORMIIAN5H5S1	3524,5650	1175,8623	882,1485	949
VORMIIN6H7S4F1	4424,6524	1475,8914	1107,1704	461	IORMISORMIIAN5H5S2	3815,6604	1272,8941	954,9224	949
VORMIIN6H7S2F2	3988,5194	1330,5138	998,1371	461	IORMISORMIIAN5H5S2F1	3961,7183	1321,5800	991,4368	949
VORMIIN6H7S3F2	4279,6149	1427,5456	1070,9110	461	IORMISORMIIAN5H6S1	3686,6178	1229,8799	922,6617	949
VORMIIN6H7S4F2	4570,7103	1524,5774	1143,6848	461	IORMISORMIIAN5H6S2	3977,7132	1326,9117	995,4356	949
VORMIIN7H8S2	4061,5358	1354,8525	1016,3912	461	IORMISORMIIAN5H6S3	4268,8086	1423,9435	1068,2094	949
VORMIIN7H8S3	4352,6312	1451,8844	1089,1651	461	IORMISORMIIAN5H6S1F1	3832,6757	1278,5658	959,1762	949
VORMIIN7H8S4	4643,7267	1548,9162	1161,9389	461	IORMISORMIIAN5H6S2F1	4123,7711	1375,5976	1031,9501	949
VORMIIN7H8S2F1	4207,5937	1403,5385	1052,9057	461	IORMISORMIIAN5H6S3F1	4414,8665	1472,6295	1104,7239	949
VORMIIN7H8S3F1	4498,6891	1500,5703	1125,6796	461	IORMISORMIIAN5H6S3F2	4560,9244	1521,3154	1141,2384	949
VORMIIN7H8S4F1	4789,7846	1597,6021	1198,4534	461	IORMISORMIIAN6H7S1	4051,7500	1351,5906	1013,9448	949
VORMIIN8H9S3	4717,7634	1573,5951	1180,4481	461	IORMISORMIIAN6H7S2	4342,8454	1448,6224	1086,7186	949
VORMIIN8H9S4	5008,8588	1670,6269	1253,2220	461	IORMISORMIIAN6H7S3	4633,9408	1545,6542	1159,4925	949
VORMIIN8H9S4F1	5154,9168	1719,3129	1289,7365	461	IORMISORMIIAN6H7S4	4925,0362	1642,6860	1232,2663	949
VORMIN4H5S1	2689,0595	897,3604	673,2721	494	IORMISORMIIAN6H7S1F1	4197,8079	1400,2766	1050,4592	949
VORMIN4H5S2	2980,1549	994,3922	746,0460	494	IORMISORMIIAN6H7S2F1	4488,9033	1497,3084	1123,2331	949
VORMIN4H5S2F1	3126,2128	1043,0782	782,5605	494	IORMISORMIIAN6H7S3F1	4779,9987	1594,3402	1196,0070	949
VORMIN5H5S1	2892,1388	965,0536	724,0420	494	IORMISORMIIAN6H7S4F1	5071,0941	1691,3720	1268,7808	949
VORMIN5H5S2	3183,2343	1062,0854	796,8158	494	IORMISORMIIAN6H7S2F2	4634,9612	1545,9943	1159,7476	949
VORMIN5H5S2F1	3329,2922	1110,7713	833,3303	494	IORMISORMIIAN6H7S3F2	4926,0566	1643,0262	1232,5214	949
VORMIN5H6S1	3054,1917	1019,0712	764,5552	494	IORMISORMIIAN6H7S4F2	5217,1521	1740,0580	1305,2953	949
VORMIN5H6S2	3345,2871	1116,1030	837,3290	494	IORMISORMIIAN7H8S2	4707,9776	1570,3331	1178,0017	949
VORMIN5H6S3	3636,3825	1213,1348	910,1029	494	IORMISORMIIAN7H8S3	4999,0730	1667,3649	1250,7755	949
VORMIN5H6S1F1	3200,2496	1067,7571	801,0697	494	IORMISORMIIAN7H8S4	5290,1684	1764,3968	1323,5494	949
VORMIN5H6S2F1	3491,3450	1164,7889	873,8435	494	IORMISORMIIAN7H8S2F1	4854,0355	1619,0191	1214,5162	949
VORMIN5H6S3F1	3782,4404	1261,8207	946,6174	494	IORMISORMIIAN7H8S3F1	5145,1309	1716,0509	1287,2900	949
VORMIN5H6S3F2	3928,4983	1310,5067	983,1319	494	IORMISORMIIAN7H8S4F1	5436,2263	1813,0827	1360,0639	949
VORMIN6H7S1	3419,3239	1140,7819	855,8382	494	IORMISORMIIAN8H9S3	5364,2052	1789,0757	1342,0586	949
VORMIN6H7S2	3710,4193	1237,8137	928,6121	494	IORMISORMIIAN8H9S4	5655,3006	1886,1075	1414,8324	949
VORMIN6H7S3	4001,5147	1334,8455	1001,3859	494	IORMISORMIIAN8H9S4F1	5801,3585	1934,7935	1451,3469	949
VORMIN6H7S4	4292,6101	1431,8773	1074,1598	494	IORMIFN4H5S1	3692,6912	1231,9044	924,1801	1113
VORMIN6H7S1F1	3565,3818	1189,4679	892,3527	494	IORMIFN4H5S2	3983,7867	1328,9362	996,9539	1113
VORMIN6H7S2F1	3856,4772	1286,4997	965,1266	494	IORMIFN4H5S2F1	4129,8446	1377,6221	1033,4684	1113
VORMIN6H7S3F1	4147,5726	1383,5315	1037,9004	494	IORMIFN5H5S1	3895,7706	1299,5975	974,9499	1113
VORMIN6H7S4F1	4438,6680	1480,5633	1110,6743	494	IORMIFN5H5S2	4186,8660	1396,6293	1047,7238	1113
VORMIN6H7S2F2	4002,5351	1335,1856	1001,6410	494	IORMIFN5H5S2F1	4332,9239	1445,3153	1084,2383	1113
VORMIN6H7S3F2	4293,6305	1432,2174	1074,4149	494	IORMIFN5H6S1	4057,8234	1353,6151	1015,4631	1113
VORMIN6H7S4F2	4584,7259	1529,2492	1147,1888	494	IORMIFN5H6S2	4348,9188	1450,6469	1088,2370	1113
VORMIN7H8S2	4075,5515	1359,5244	1019,8951	494	IORMIFN5H6S3	4640,0143	1547,6787	1161,0108	1113
VORMIN7H8S3	4366,6469	1456,5562	1092,6690	494	IORMIFN5H6S1F1	4203,8813	1402,3011	1051,9776	1113
VORMIN7H8S4	4657,7423	1553,5880	1165,4428	494	IORMIFN5H6S2F1	4494,9768	1499,3329	1124,7515	1113
VORMIN7H8S2F1	4221,6094	1408,2104	1056,4096	494	IORMIFN5H6S3F1	4786,0722	1596,3647	1197,5253	1113
VORMIN7H8S3F1	4512,7048	1505,2422	1129,1835	494	IORMIFN5H6S3F2	4932,1301	1645,0506	1234,0398	1113
VORMIN7H8S4F1	4803,8002	1602,2740	1201,9573	494	IORMIFN6H7S1	4422,9556	1475,3258	1106,7462	1113
VORMIN8H9S3	4731,7791	1578,2670	1183,9520	494	IORMIFN6H7S2	4714,0510	1572,3576	1179,5200	1113
VORMIN8H9S4	5022,8745	1675,2988	1256,7259	494	IORMIFN6H7S3	5005,1465	1669,3894	1252,2939	1113
VORMIN8H9S4F1	5168,9324	1723,9847	1293,2404	494	IORMIFN6H7S4	5296,2419	1766,4212	1325,0677	1113
IORMN4H5S1	2709,0169	904,0129	678,2615	495	IORMIFN6H7S1F1	4569,0135	1524,0118	1143,2607	1113
IORMN4H5S2	3000,1123	1001,0447	751,0354	495	IORMIFN6H7S2F1	4860,1090	1621,0436	1216,0345	1113
IORMN4H5S2F1	3146,1703	1049,7307	787,5498	495	IORMIFN6H7S3F1	5151,2044	1718,0754	1288,8084	1113
IORMN5H5S1	2912,0963	971,7060	729,0313	495	IORMIFN6H7S4F1	5442,2998	1815,1072	1361,5822	1113
IORMN5H5S2	3203,1917	1068,7378	801,8052	495	IORMIFN6H7S2F2	5006,1669	1669,7296	1252,5490	1113
IORMN5H5S2F1	3349,2496	1117,4238	838,3197	495	IORMIFN6H7S3F2	5297,2623	1766,7614	1325,3228	1113
IORMN5H6S1	3074,1491	1025,7236	769,5446	495	IORMIFN6H7S4F2	5588,3577	1863,7932	1398,0967	1113
IORMN5H6S2	3365,2445	1122,7555	842,3184	495	IORMIFN7H8S2	5079,1832	1694,0684	1270,8031	1113
IORMN5H6S3	3656,3400	1219,7873	915,0923	495	IORMIFN7H8S3	5370,2787	1791,1002	1343,5769	1113
IORMN5H6S1F1	3220,2070	1074,4096	806,0590	495	IORMIFN7H8S4	5661,3741	1888,1320	1416,3508	1113



**Tablica 4.** (nastavak).

IIORMN5H6S2F1	3511,3025	1171,4414	878,8329	495	IORMIFN7H8S2F1	5225,2411	1742,7543	1307,3176	1113
IIORMN5H6S3F1	3802,3979	1268,4732	951,6067	495	IORMIFN7H8S3F1	5516,3366	1839,7861	1380,0914	1113
IIORMN5H6S3F2	3948,4558	1317,1592	988,1212	495	IORMIFN7H8S4F1	5807,4320	1936,8179	1452,8653	1113
IIORMN6H7S1	3439,2813	1147,4344	860,8276	495	IORMIFN8H9S3	5735,4109	1912,8109	1434,8600	1113
IIORMN6H7S2	3730,3767	1244,4662	933,6015	495	IORMIFN8H9S4	6026,5063	2009,8427	1507,6338	1113
IIORMN6H7S3	4021,4722	1341,4980	1006,3753	495	IORMIFN8H9S4F1	6172,5642	2058,5287	1544,1483	1113
IIORMN6H7S4	4312,5676	1438,5298	1079,1492	495	IIIORMN4H5S1	3832,6235	1278,5485	959,1632	1195
IIORMN6H7S1F1	3585,3392	1196,1204	897,3421	495	IIIORMN4H5S2	4123,7190	1375,5803	1031,9370	1195
IIORMN6H7S2F1	3876,4346	1293,1522	970,1159	495	IIIORMN4H5S2F1	4269,7769	1424,2662	1068,4515	1195
IIORMN6H7S3F1	4167,5301	1390,1840	1042,8898	495	IIIORMN5H5S1	4035,7029	1346,2416	1009,9330	1195
IIORMN6H7S4F1	4458,6255	1487,2158	1115,6636	495	IIIORMN5H5S2	4326,7983	1443,2734	1082,7069	1195
IIORMN6H7S2F2	4022,4926	1341,8381	1006,6304	495	IIIORMN5H5S2F1	4472,8562	1491,9594	1119,2213	1195
IIORMN6H7S3F2	4313,5880	1438,8699	1079,4043	495	IIIORMN5H6S1	4197,7557	1400,2592	1050,4462	1195
IIORMN6H7S4F2	4604,6834	1535,9017	1152,1781	495	IIIORMN5H6S2	4488,8512	1497,2910	1123,2201	1195
IIORMN7H8S2	4095,5089	1366,1769	1024,8845	495	IIIORMN5H6S3	4779,9466	1594,3228	1195,9939	1195
IIORMN7H8S3	4386,6044	1463,2087	1097,6584	495	IIIORMN5H6S1F1	4343,8137	1448,9452	1086,9607	1195
IIORMN7H8S4	4677,6998	1560,2405	1170,4322	495	IIIORMN5H6S2F1	4634,9091	1545,9770	1159,7345	1195
IIORMN7H8S2F1	4241,5668	1414,8629	1061,3990	495	IIIORMN5H6S3F1	4926,0045	1643,0088	1232,5084	1195
IIORMN7H8S3F1	4532,6623	1511,8947	1134,1728	495	IIIORMN5H6S3F2	5072,0624	1691,6947	1269,0229	1195
IIORMN7H8S4F1	4823,7577	1608,9265	1206,9467	495	IIIORMN6H7S1	4562,8879	1521,9699	1141,7293	1195
IIORMN8H9S3	4751,7365	1584,9195	1188,9414	495	IIIORMN6H7S2	4853,9834	1619,0017	1214,5031	1195
IIORMN8H9S4	5042,8320	1681,9513	1261,7153	495	IIIORMN6H7S3	5145,0788	1716,0335	1287,2770	1195
IIORMN8H9S4F1	5188,8899	1730,6372	1298,2297	495	IIIORMN6H7S4	5436,1742	1813,0653	1360,0508	1195
IVORMIN4H5S1	3828,5664	1277,1961	958,1489	889	IIIORMN6H7S1F1	4708,9458	1570,6559	1178,2437	1195
IVORMIN4H5S2	4119,6619	1374,2279	1030,9227	889	IIIORMN6H7S2F1	5000,0413	1667,6877	1251,0176	1195
IVORMIN4H5S2F1	4265,7198	1422,9139	1067,4372	889	IIIORMN6H7S3F1	5291,1367	1764,7195	1323,7914	1195
IVORMIN5H5S1	4031,6458	1344,8892	1008,9187	889	IIIORMN6H7S4F1	5582,2321	1861,7513	1396,5653	1195
IVORMIN5H5S2	4322,7412	1441,9210	1081,6926	889	IIIORMN6H7S2F2	5146,0992	1716,3737	1287,5321	1195
IVORMIN5H5S2F1	4468,7991	1490,6070	1118,2071	889	IIIORMN6H7S3F2	5437,1946	1813,4055	1360,3059	1195
IVORMIN5H6S1	4193,6986	1398,9068	1049,4319	889	IIIORMN6H7S4F2	5728,2900	1910,4373	1433,0798	1195
IVORMIN5H6S2	4484,7941	1495,9386	1122,2058	889	IIIORMN7H8S2	5219,1156	1740,7125	1305,7862	1195
IVORMIN5H6S3	4775,8895	1592,9704	1194,9796	889	IIIORMN7H8S3	5510,2110	1837,7443	1378,5600	1195
IVORMIN5H6S1F1	4339,7565	1447,5928	1085,9464	889	IIIORMN7H8S4	5801,3064	1934,7761	1451,3339	1195
IVORMIN5H6S2F1	4630,8520	1544,6246	1158,7203	889	IIIORMN7H8S2F1	5365,1735	1789,3984	1342,3006	1195
IVORMIN5H6S3F1	4921,9474	1641,6564	1231,4941	889	IIIORMN7H8S3F1	5656,2689	1886,4302	1415,0745	1195
IVORMIN5H6S3F2	5068,0053	1690,3424	1268,0086	889	IIIORMN7H8S4F1	5947,3643	1983,4620	1487,8483	1195
IVORMIN6H7S1	4558,8308	1520,6176	1140,7150	889	IIIORMN8H9S3	5875,3432	1959,4550	1469,8431	1195
IVORMIN6H7S2	4849,9263	1617,6494	1213,4888	889	IIIORMN8H9S4	6166,4386	2056,4868	1542,6169	1195
IVORMIN6H7S3	5141,0217	1714,6812	1286,2627	889	IIIORMN8H9S4F1	6312,4965	2105,1728	1579,1314	1195
IVORMIN6H7S4	5432,1171	1811,7130	1359,0365	889					

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

Zbog velike količine dobivenih podataka, kako bi se pojednostavila njihova interpretacija i bolje shvatio značaj istih, glikopeptidi unutar svakog od sedam glikozilacijskih mjesta grupirani su prema strukturnim karakteristikama čime se dobilo ukupno 50 deriviranih svojstava. Glavna svojstva prema kojima su glikopeptidi grupirani su: prisutnost fukoze, razgranatost i broj vezanih sijalinskih kiselina, pri čemu se broj sijalinskih kiselina označio kao omjer sijalinske kiseline po galaktozi jer se najčešće sijalinska kiselina upravo veže na grane koje sadrže galaktozu. Svih 50 dobivenih deriviranih svojstava te glikopeptidi koji čine svako od njih prikazani su u Tablici 5.

**Tablica 5.** Promatrana derivirana svojstva i formule kojima se dobivaju iz direktno izmjerenih glikopeptidnih struktura.

Derivirano svojstvo	Formula
IIIORM_ant2	IIIORM1N4H5S2
IIIORM_ant3	IIIORM1N5H6S2+ IIIORM1N5H6S3+ IIIORM1N5H6S3F1
IIIORM_ant4	IIIORM1N6H7S2+ IIIORM1N6H7S3+ IIIORM1N6H7S4+ IIIORM1N6H7S3F1
IIIORM_F1	IIIORM1N5H6S3F1+ IIIORM1N6H7S3F1
IIIORM_S1/G1	IIIORM1N4H5S2+ IIIORM1N5H6S3+ IIIORM1N5H6S3F1+ IIIORM1N6H7S4
IIIORM_S1/G2	IIIORM1N6H7S2
IIIORM_S2/G3	IIIORM1N5H6S2
IIIORM_S3/G4	IIIORM1N6H7S3+ IIIORM1N6H7S3F1
IIORM_ant2	IIORM1N4H5S1+ IIORM1N4H5S2
IIORM_ant3	IIORM1N5H6S2+ IIORM1N5H6S3+ IIORM1N5H6S3F1
IIORM_F1	IIORM1N5H6S3F1
IIORM_S1/G1	IIORM1N4H5S2+ IIORM1N5H6S3+ IIORM1N5H6S3F1
IIORM_S1/G2	IIORM1N4H5S1
IIORM_S2G3	IIORM1N5H6S2
IORMIF_ant2	IORMIF1N4H5S1+ IORMIF1N4H5S2
IORMIF_ant3	IORMIF1N5H6S2+ IORMIF1N5H6S3+ IORMIF1N5H6S2F1+ IORMIF1N5H6S3F1
IORMIF_F1	IORMIF1N5H6S2F1+ IORMIF1N5H6S3F1
IORMIF_S1/G1	IORMIF1N4H5S2+ IORMIF1N5H6S3+ IORMIF1N5H6S3F1
IORMIF_S1/G2	IORMIF1N4H5S1
IORMIF_S2/G3	IORMIF1N5H6S2+ IORMIF1N5H6S2F1
IORMISORMIIA_ant2	IORMISORMIIA1N4H5S1+ IORMISORMIIA1N4H5S2
IORMISORMIIA_ant3	IORMISORMIIA1N5H6S2+ IORMISORMIIA1N5H6S3+ IORMISORMIIA1N5H6S2F1+ IORMISORMIIA1N5H6S3F1
IORMISORMIIA_F1	IORMISORMIIA1N5H6S2F1+ IORMISORMIIA1N5H6S3F1
IORMISORMIIA_S1/G1	IORMISORMIIA1N4H5S2+ IORMISORMIIA1N5H6S3+ IORMISORMIIA1N5H6S3F1
IORMISORMIIA_S1/G2	IORMISORMIIA1N4H5S1
IORMISORMIIA_S2/G3	IORMISORMIIA1N5H6S2+ IORMISORMIIA1N5H6S2F1
IVORMI_ant2	IVORMI1N4H5S2
IVORMI_ant3	IVORMI1N5H6S2+ IVORMI1N5H6S3+ IVORMI1N5H6S2F1+ IVORMI1N5H6S3F1
IVORMI_ant4	IVORMI1N6H7S1+ IVORMI1N6H7S2+ IVORMI1N6H7S3+ IVORMI1N6H7S4+ IVORMI1N6H7S2F1+ IVORMI1N6H7S3F1+ IVORMI1N6H7S4F1+ IVORMI1N7H8S3+ IVORMI1N7H8S4
IVORMI_F1	IVORMI1N5H6S2F1+ IVORMI1N5H6S3F1+ IVORMI1N6H7S2F1+ IVORMI1N6H7S3F1+ IVORMI1N6H7S4F1
IVORMI_S1/G1	IVORMI1N4H5S2+ IVORMI1N5H6S3+ IVORMI1N5H6S3F1+ IVORMI1N6H7S4+ IVORMI1N6H7S4F1+ IVORMI1N7H8S4
IVORMI_S1/G2	IVORMI1N6H7S2+ IVORMI1N6H7S2F1
IVORMI_S1/G4	IVORMI1N6H7S1
IVORMI_S2/G3	IVORMI1N5H6S2+ IVORMI1N5H6S2F1

**Tablica 5.** (nastavak)

IVORMI_S3/G4	IVORMI1N6H7S3+ IVORMI1N6H7S3F1+ IVORMI1N7H8S3
VORMI_ant3	VORMI1N5H6S2+ VORMI1N5H6S3+ VORMI1N5H6S3F1
VORMI_ant4	VORMI1N6H7S3+ VORMI1N6H7S4+ VORMI1N6H7S2F1+ VORMI1N6H7S3F1+ VORMI1N6H7S4F1+ VORMI1N7H8S3+ VORMI1N7H8S4
VORMI_F1	VORMI1N5H6S3F1+ VORMI1N6H7S2F1+ VORMI1N6H7S3F1+ VORMI1N6H7S4F1
VORMI_S1/G1	VORMI1N5H6S3+ VORMI1N5H6S3F1+ VORMI1N6H7S4+ VORMI1N6H7S4F1+ VORMI1N7H8S4
VORMI_S1/G2	VORMI1N6H7S2F1
VORMI_S2/G3	VORMI1N5H6S2
VORMI_S3/G4	VORMI1N6H7S3+ VORMI1N6H7S3F1+ VORMI1N7H8S3
VORMII_ant2	VORMII1N4H5S2
VORMII_ant3	VORMII1N5H6S2+ VORMII1N5H6S3+ VORMII1N5H6S2F1+ VORMII1N5H6S3F1
VORMII_ant4	VORMII1N6H7S2+ VORMII1N6H7S3+ VORMII1N6H7S4+ VORMII1N6H7S2F1+ VORMII1N6H7S3F1+ VORMII1N6H7S4F1+ VORMII1N7H8S3+ VORMII1N7H8S4
VORMII_F1	VORMII1N5H6S2F1+ VORMII1N5H6S3F1+ VORMII1N6H7S2F1+ VORMII1N6H7S3F1+ VORMII1N6H7S4F1
VORMII_S1/G1	VORMII1N4H5S2+ VORMII1N5H6S3+ VORMII1N5H6S3F1+ VORMII1N6H7S4+ VORMII1N6H7S4F1+ VORMII1N7H8S4
VORMII_S1/G2	VORMII1N6H7S2+ VORMII1N6H7S2F1
VORMII_S2/G3	VORMII1N5H6S2+ VORMII1N5H6S2F1
VORMII_S3/G4	VORMII1N6H7S3+ VORMII1N6H7S3F1+ VORMII1N7H8S3

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

Razlike između N-glikoma AGP-a pacijenata analizirane su logističkom regresijskom analizom za 50 deriviranih svojstava. Rezultati analize pokazali su značajnu promjenu 5 promatranih deriviranih svojstava kod pacijenata koji su razvili hiperglikemiju tijekom akutne bolesti u odnosu na pacijente kod kojih to nije bio slučaj i koji su služili kao kontrolna skupina. Smanjenje potpuno sijaliniziranih glikana (S1/G1 -0.833, p = 0.0428) kao i povećanje glikana s prisutnom polovicom svih potencijalnih sijalinskih kiselina (S1/G2 0.691, p = 0.0428) uočeno je kod glikozilacijskog mjesta IIIORM. Također, primijećene su značajne promjene kod glikozilacijskog mjesta IIORM kod kojeg je došlo do ukupnog povećanja grananja vidljivog u smanjenju bi-antenarnih glikanskih struktura (ant2 -0.720, p = 0.0428) i povećanju tri-antenarnih struktura (ant3 0.720, p = 0.0428). Kod IVORMI glikozilacijskog mjesta je pokazano smanjenje sijalinizacije povećanjem glikana kod kojih je prisutna samo jedna četvrtina svih potencijalnih sijalinskih kiselina (S1/G4 0.715, p = 0.0428). Konačno, zanimljivo je za napomenuti, iako promjena nije statistički značajna, da i ostala derivirana svojstva koja uzimaju u obzir razgranatost ukazuju na tendenciju za povećanjem iste (Tablica 6 , Slika 5).

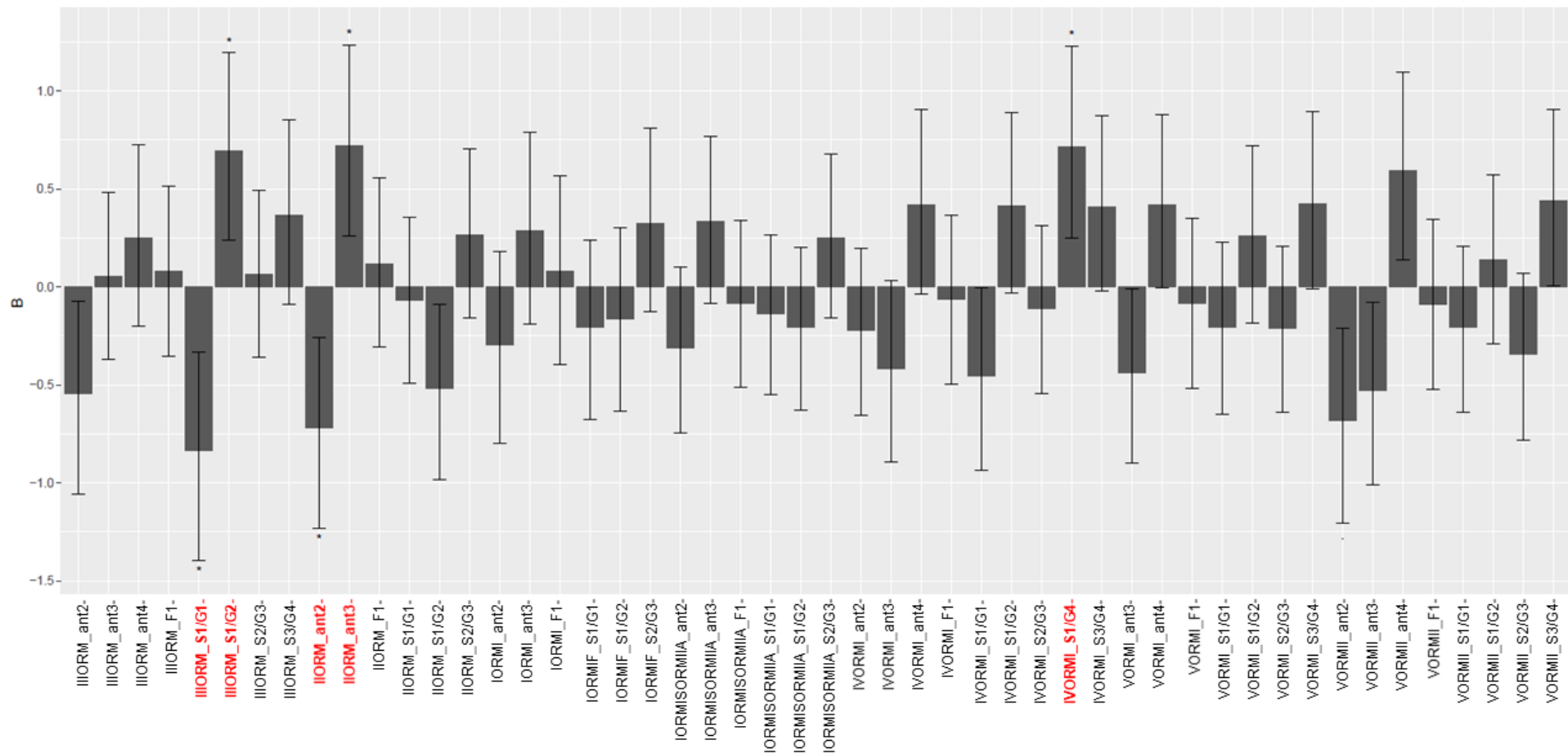
**Tablica 6.** Razlika u deriviranim svojstvima N-glikana AGP-a kod pacijenata koji su razvili hiperglikemiju tijekom akutne bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu.

Derivirano svojstvo	B	Interval pouzdanosti (95%)		Značajnost	
		Donji	Gornji	p	p-korigirano*
IIIORM_ant2	-0.54543	-10.589	-0.07434	0.028627	0.143137
IIIORM_ant3	0.054407	-0.36725	0.480653	0.799092	0.799092
IIIORM_ant4	0.247038	-0.20152	0.72408	0.29008	0.483467
IIIORM_F1	0.077417	-0.35359	0.513999	0.724358	0.785585
<b>IIORM_S1/G1</b>	<b>-0.83352</b>	<b>-139.782</b>	<b>-0.33376</b>	<b>0.001931</b>	<b>0.042796</b>
<b>IIORM_S1/G2</b>	<b>0.691229</b>	<b>0.241222</b>	<b>1.198.397</b>	<b>0.00428</b>	<b>0.042796</b>
IIIORM_S2/G3	0.063971	-0.36064	0.49397	0.766569	0.785585
IIIORM_S3/G4	0.367697	-0.08901	0.853898	0.123023	0.280412
<b>IIORM_ant2</b>	<b>-0.72045</b>	<b>-123.454</b>	<b>-0.25831</b>	<b>0.003511</b>	<b>0.042796</b>
<b>IIORM_ant3</b>	<b>0.720535</b>	<b>0.258272</b>	<b>1.234.576</b>	<b>0.003513</b>	<b>0.042796</b>
IIORM_F1	0.118735	-0.30702	0.554403	0.58586	0.732325
IIORM_S1/G1	-0.06583	-0.48934	0.352612	0.757332	0.785585
IIORM_S1/G2	-0.51787	-0.98195	-0.08831	0.022084	0.138024
IIORM_S2/G3	0.264159	-0.15898	0.706597	0.227694	0.43771
IORMIF_ant2	-0.29349	-0.79711	0.182546	0.233635	0.43771
IORMIF_ant3	0.285203	-0.19048	0.787619	0.246318	0.439853
IORMIF_F1	0.081321	-0.39571	0.566183	0.73765	0.785585
IORMIF_S1/G1	-0.20782	-0.67495	0.236164	0.365925	0.50823
IORMIF_S1/G2	-0.1614	-0.63466	0.299501	0.493636	0.664819
IORMIF_S2/G3	0.325337	-0.12419	0.811289	0.167821	0.349626
IORMISORMIIA_ant2	-0.31099	-0.74634	0.102176	0.147058	0.319691

**Tablica 6.** (nastavak).

IORMISORMIIA_ant3	0.331799	-0.08268	0.769304	0.123381	0.280412
IORMISORMIIA_F1	-0.08578	-0.51527	0.338759	0.691203	0.785585
IORMISORMIIA_S1/G1	-0.13739	-0.54961	0.26622	0.505263	0.664819
IORMISORMIIA_S1/G2	-0.20659	-0.62659	0.200323	0.323278	0.486684
IORMISORMIIA_S2/G3	0.250994	-0.1587	0.680112	0.236363	0.43771
IVORMI_ant2	-0.22129	-0.65637	0.196908	0.304558	0.486684
IVORMI_ant3	-0.41516	-0.89493	0.033103	0.077173	0.206113
IVORMI_ant4	0.418165	-0.03438	0.904583	0.078323	0.206113
IVORMI_F1	-0.06361	-0.49543	0.364449	0.769873	0.785585
IVORMI_S1/G1	-0.4569	-0.93819	-0.00314	0.053635	0.206113
IVORMI_S1/G2	0.415244	-0.03188	0.888647	0.074519	0.206113
IVORMI_S2/G3	-0.11071	-0.54261	0.313691	0.608749	0.742377
<b>IVORMI_S1/G4</b>	<b>0.714634</b>	<b>0.248089</b>	<b>1.229.486</b>	<b>0.004032</b>	<b>0.042796</b>
IVORMI_S3G/4	0.4098	-0.02172	0.875854	0.070725	0.206113
VORMI_ant3	-0.43645	-0.89941	-0.00866	0.052715	0.206113
VORMI_ant4	0.420681	-0.00379	0.878281	0.059264	0.206113
VORMI_F1	-0.08201	-0.5176	0.348568	0.708141	0.785585
VORMI_S1/G1	-0.20461	-0.65163	0.228606	0.358126	0.50823
VORMI_S1/G2	0.259696	-0.18529	0.720977	0.257817	0.444511
VORMI_S2/G3	-0.20949	-0.64122	0.206929	0.328778	0.486684
VORMI_S3/G4	0.426281	-0.00876	0.894982	0.062068	0.206113
VORMII_ant2	-0.68368	-120.342	-0.21246	0.006376	0.05313
VORMII_ant3	-0.52731	-101.152	-0.07859	0.025513	0.141737
VORMII_ant4	0.594183	0.136185	1.094.082	0.01421	0.1015
VORMII_F1	-0.0874	-0.5228	0.343032	0.690049	0.785585
VORMII_S1/G1	-0.2079	-0.63821	0.207284	0.330945	0.486684
VORMII_S1/G2	0.137622	-0.28979	0.572982	0.528292	0.677297
VORMII_S2/G3	-0.34539	-0.78342	0.068434	0.109003	0.272508
VORMII_S3/G4	0.437563	0.006188	0.905981	0.054364	0.206113

Razlike su prikazane kao efekt procijenjen logističkom regresijskom analizom (prirodni logaritam omjera izgleda) - B; \* p vrijednost je korigirana na višestruko testiranje sukladno Benjamini-Hochberg-ovoj metodi; ORM, kratica za orosomukoid i drugi naziv za alfa-1 kiseli glikoprotein; rimski brojevi (I,II,III,IV,V) ispred ORM označavaju glikozilacijsko mjesto; rimski brojevi (I,II) i slova (S,A) nakon ORM odnose se na gensku varijantu; oznake u nastavku odnose se na zajednička svojstva glikana: ant2 - bi-antenari, ant3, tri-antenari; ant4, tetra-antenari; F1, fukozilirani glikani; Sx/Gy, omjer prisutnih sijalinskih kiselina i galaktoza



**Slika 5.** Razlika u deriviranim svojstvima N-glikana AGP-a kod pacijenata koji su razvili hiperglikemiju tijekom akutne bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu. Razlike su prikazane stupčastim dijagramom u kojem visina stupa odgovara efektu procijenjenom logističkom regresijskom analizom (prirodni logaritam omjera izgleda) - B i trakama pogreške koje predstavljaju 95% interval pouzdanosti procijenjenog efekta; ORM, kratica za orosomukoid i drugi naziv za alfa-1 kiseli glikoprotein; rimski brojevi (I,II,III,IV,V) ispred ORM označavaju glikozilacijsko mjesto; rimski brojevi (I,II) i slova (S,A) nakon ORM odnose se na gensku varijantu; oznake u nastavku odnose se na zajednička svojstva glikana: ant2 - bi-antenari, ant3, tri-antenari; ant4, tetra-antenari; F1, fukozilirani glikani; Sx/Gy, omjer prisutnih sijalinskih kiselina i galaktoza

## **5. RASPRAVA**

Ovim istraživanjem fokus je stavljen na alfa-1 kiseli glikoprotein (AGP) i na veliku heterogenost njegovih glikoformi koja potječe od činjenice da AGP sadrži 5 različitih glikozilacijskih mjesta od kojih svako može vezati N-glikane različite kompleksnosti te različitih genskih varijanti koje se eksprimiraju kod ljudi <sup>45,49</sup>. Točnije, promatralo se se promjene tih glikana tijekom patofiziološkog stanja, u ovom slučaju kod pacijenata koji su razvili hiperglikemiju nakon zaprimanja u jedinicu intenzivne njege zbog akutne bolesti, za što je dokazano da je pokazatelj povećanog rizika za razvoj dijabetesa tipa 2 <sup>34,35</sup>. Studijom koja je prethodila i koja je rađena na istoj populaciji pokazano je kako je veća kompleksnost i razgranatost ukupnih plazmatskih N-glikana povezana s povećanim rizikom od razvoja dijabetesa tipa 2 <sup>36</sup>. Međutim, zaključak o točnom razlogu te promjene je bilo teško donijeti jer N-glikani ukupne plazme potječu od različitih glikoproteina i samim time na njih, osim sastava glikana, utječe relativna prisutnost tih glikoproteina.

Promjene uočene na N-glikomu AGP-a, preciznije povećana razgranatost N-glikana je većeg razmjera od one primijećene kod ukupnih plazmatskih proteina što sugerira da su barem dijelom te promjene izazvane onima na AGP-u. S druge strane, promjena vezana uz smanjenje sijalinizacije određenih glikoformi AGP-a nije primijećena kod analize N-glikana ukupnih plazmatskih proteina. Štoviše, smanjenje sijalinizacije AGP-a predstavlja promjenu u N-glikozilaciji koja, prema pretraženoj literaturi, do sada još nije opisana u nijednom patofiziološkom stanju. Dodatne studije su potrebne kako bi se potvrdilo da je smanjenje sijalinizacije N-glikana AGP-a specifično za ljude koji imaju povećani rizik za razvoj dijabetesa tipa 2. Međutim, povećana razgranatost N-glikana AGP-a nije jedinstvena pojava kod ljudi s povećanim rizikom razvoja dijabetesa tipa 2, već je primijećena i kod drugih kroničnih upalnih bolesti <sup>60-62</sup>. Ranije je navedeno kako bi se promjene u glikozilaciji AGP-a mogle odraziti na povećanu kompleksnost N-glikoma ukupnih plazmatskih proteina, čemu dodatno u prilog idu rezultati studija u kojima je tijekom kroničkih upalnih bolesti došlo do povećanja razgranatih N-glikana u glikomu ukupnih plazmatskih proteina <sup>79</sup>. Nadalje, kronična upala je, uz ostale faktore poput disfunkcije  $\beta$ -stanica i rezistencije na inzulin, u pozadini patofizioloških promjena koje progresivno narušavaju normalnu kontrolu glukoze u krvi te vode do mikro- i makrovaskularnih komplikacija kod bolesnika s dijabetesom tipa 2 <sup>30</sup>. Uzimajući sve u obzir, promjene koje su primijećene kod AGP-a, konkretno, povećanje razgranatih N-glikana daje naslutiti početak kronične upale, što bi, ukoliko se dokaže daljnjim studijama, uvelike pridonijelo prognostičkoj vrijednosti metode kod otkrivanja pojedinaca s povećanim rizikom za razvoj dijabetesa tipa 2.



Koliki je potencijalni značaj promjena u glikozilaciji AGP-a vidljiv je iz činjenice da glikani koji su vezani za proteinski dio čine 45% njegove ukupne mase. Također, veliki udio tih ugljikohidrata čini sijalinska kiselina, što rezultira negativnim nabojem ovog glikoproteina te posljedično modulira njegove interakcije s drugim ligandima <sup>40</sup>. Može se zaključiti kako glikozilacija AGP-a ima važnu ulogu u njegovoj biološkoj funkciji, ali i kod raznih patofizioloških stanja. U dosadašnjim studijama nisu pronađene značajne poveznice između promjena u glikozilaciji AGP-a i dijabetesa tipa 2 <sup>80</sup>, ali studije provedene na pretilim miševima sugeriraju načine kojima AGP posreduje u razvoju dijabetesa tipa 2 i metaboličkog sindroma <sup>81,82</sup>. Pokazano je kako pod utjecajem proupalnih i metaboličkih signala, poput inzulina, povišene razine glukoze i slobodnih masnih kiselina, dolazi do povećanja razine AGP-a u adipoznom tkivu kako bi zaštitio od pretjerane upale i metaboličke disfunkcije <sup>82</sup>. Nadalje, u studijama provedenim na ljudima, također su pronađene poveznice između povećane razine AGP-a i pretilih pacijenata te onih s nekontroliranom hiperglikemijom <sup>83,84</sup>. Takva saznanja dovode do zaključka kako bi AGP mogao imati važnu ulogu kod odgovora na metaboličke disfunkcije koje mogu voditi do razvoja dijabetesa tipa 2.

Iz dobivenih rezultata je također vidljivo kako promjene u glikozilaciji nisu u jednakoj mjeri izražene na svim promatranim glikozilacijskim mjestima i genskim varijantama, što ukazuje na važnosti korištene metode koja daje informacije svojstvene svakom glikozilacijskom mjestu. Takve informacije, uz konkretne rezultate koji su pokazali značajno povećanje razgranatosti i smanjenje sijalinizacije na određenim glikozilacijskim mjestima, su od znatne važnosti u određivanju uloge AGP-a kod razvoja dijabetesa tipa 2 te sugeriraju N-glikom AGP-a kao potencijalni biomarker u sprječavanju te bolesti, premda to mora biti potvrđeno na prospektivnim studijama.

## **6. ZAKLJUČAK**

Viskoprotlačnom LC-MS metodom koja pruža specifične informacije o glikozilaciji svakog glikozilacijskog mjesta analizirana je N-glikozilacija AGP-a kod pacijenata koji su razvili hiperglikemiju tijekom akutne bolesti (dokazani faktor povećanog rizika za razvoj dijabetesa tipa 2) te kontrola koje nisu razvili hiperglikemiju tijekom akutne bolesti. Pojedinci s povećanim rizikom za razvoj dijabetesa tipa 2 pokazali su povećano grananje N-glikana na drugom glikozilacijskom mjestu AGP-a te smanjenu sijalinizaciju N-glikana na trećem glikozilacijskom mjestu obje forme i četvrtom glikozilacijskom mjestu forme ORM1. Povećana razgranatost N-glikana AGP-a je većeg razmjera od one koja je u prijašnjim istraživanjima primijećena kod N-glikana ukupnih plazmatskih proteina, što upućuje na to da su promjene u plazmatskom N-glikomu barem dijelom izazvane onima na AGP-u. S druge strane, smanjenje sijalinizacije AGP-a predstavlja promjenu u N-glikozilaciji koja, prema pretraženoj literaturi, do sada još nije opisana u nijednom patofiziološkom stanju te bi mogla biti specifični pokazatelj predispozicije za razvoj dijabetesa tipa 2. Iako su potrebne daljnje prospektivne studije kojima bi se to potvrdilo, profiliranje sastava N-glikana AGP-a moglo bi se pokazati kao dobra stratifikacijska metoda kojom bi se prepoznali pojedinci s povećanim rizikom za razvoj dijabetesa tipa 2.

## **7. ZAHVALA**

*Zahvaljujem se dr.sc. Tomi Keseru na ukazanom povjerenju i mogućnosti izrade ovog znanstavenog rada, iskrenoj i neupitnoj podršci, mentorstvu te savjetima pri pisanju.*

*Zahvaljujem se i Marku Tijardoviću, mag. med. biochem. na ugodnom društvu u laboratoriju te svim savjetima, podršci i pomoći.*

*Također zahvaljujem dr.sc. Mislavu Novokmetu na pomoći prilikom izrade ovog rada.*

*Želim se zahvaliti i svojoj obitelji na pruženom razumijevanju, podršci i ljubavi tijekom pisanja ovog rada te svim prijateljima koji su bili tu kada je bilo najteže, a posebno onima koji će se prepoznati pod nazivom „Sile nečiste“.*

## **8. LITERATURA**

1. Varki, A. *et al.* Glossary. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. (Cold Spring Harbor, 2017).
2. Krištić, J. & Lauc, G. Ubiquitous importance of protein glycosylation. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1503 1–12 (Humana Press Inc., 2017).
3. Lauc, G., Pezer, M., Rudan, I. & Campbell, H. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1860**, 1574–1582 (2016).
4. Varki, A. & Gagneux, P. Chapter 7 Biological Functions of Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. (Cold Spring Harbor, 2017).
5. Ajit, V., Etzler, M. E., Cummings, R. D. & Esko, J. D. Chapter 26 Discovery and Classification of Glycan-Binding Proteins. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. (Cold Spring Harbor, 2009).
6. Reily, C., Stewart, T. J., Renfrow, M. B. & Novak, J. Glycosylation in health and disease. *Nature Reviews Nephrology.* **15** 346–366 (2019).
7. Testa, R. *et al.* N-Glycomic Changes in Serum Proteins in Type 2 Diabetes Mellitus Correlate with Complications and with Metabolic Syndrome Parameters. *PLoS One* **10**, e0119983 (2015).
8. Raghav, S. K. *et al.* Altered expression and glycosylation of plasma proteins in rheumatoid arthritis. *Glycoconj. J.* **23**, 167–173 (2006).
9. Trbojevic Akmacic, I. *et al.* Inflammatory bowel disease associates with proinflammatory potential of the immunoglobulin G glycome. *Inflamm. Bowel Dis.* **21**, 1237–1247 (2015).
10. Hakomori, S. *et al.* Aberrant Glycosylation In Tumors And Tumor-Associated Carbohydrate Antigens. *Adv. Cancer Res.* **52**, 257–331 (1989).
11. Dwek, R. A. Glycobiology: Toward understanding the function of sugars. *Chem. Rev.* **96**, 683–720 (1996).
12. Hofsteenge, J. *et al.* New Type of Linkage between a Carbohydrate and a Protein: C-Glycosylation of a Specific Tryptophan Residue in Human RNase Us. *Biochemistry* **33**, 13524–13530 (1994).
13. Wopereis, S., Lefeber, D. J., Morava, E. & Wevers, R. A. Mechanisms in Protein O-Glycan Biosynthesis and Clinical and Molecular Aspects of Protein O-Glycan Biosynthesis Defects: A Review. *Clin. Chem.* **52**, 574–600 (2006).
14. Brockhausen, I. & Stanley, P. Chapter 10 O-GalNAc Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. (Cold Spring Harbor, 2017).
15. Van Den Steen, P., Rudd, P. M., Dwek, R. A. & Opdenakker, G. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **33** 151–208 (1998).
16. Stanley, P., Taniguchi, N., & Aebi, M. Chapter 9 N-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. (Cold Spring Harbor, 2017)

17. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., et al. Section 17.7 Protein Glycosylation in the ER and Golgi Complex. In: *Molecular Cell Biology*. 4th edition (W. H. Freeman, 2000).
18. Bieberich, E. Synthesis, Processing, and Function of N-glycans in N-glycoproteins. in *Advances in neurobiology* vol.9 47–70 (NIH Public Access, 2014).
19. Cooper GM, H. R. Stanica - Molekularni pristup.. 398–402 (Medicinska naklada, 2010).
20. Association, A. D. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetesd 2019. *Diabetes Care* **42**, S13–S28 (2019).
21. Chatterjee, S., Khunti, K. & Davies, M. J. Type 2 diabetes. *Lancet* **389**, 2239–2251 (2017).
22. IDF Diabetes Atlas 9th edition 2019. <https://www.diabetesatlas.org/en/>. (Pristupljeno: 14.3.2020.)
23. Petersen, J. L. & McGuire, D. K. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose - A review of diagnosis, clinical implications and management. *Diabetes and Vascular Disease Research* **2** 9–15 (2005).
24. Kahn, S. E., Cooper, M. E. & Del Prato, S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: Perspectives on the past, present, and future. *Lancet* **383** 1068–1083 (2014).
25. International Diabetes Federation - Type 2 diabetes. <https://idf.org/aboutdiabetes/type-2-diabetes.html>. (Pristupljeno: 14.3.2020.)
26. Lindström, J. *et al.* The Finnish Diabetes Prevention Study (DPS): Lifestyle intervention and 3-year results on diet and physical activity. *Diabetes Care* **26**, 3230–3236 (2003).
27. Knowler, W. C. *et al.* Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N. Engl. J. Med.* **346**, 393–403 (2002).
28. Holman, R. R., Paul, S. K., Bethel, M. A., Matthews, D. R. & Neil, H. A. W. 10-Year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1577–1589 (2008).
29. Brownlee, M. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. in *Diabetes* **54** 1615–1625 (2005).
30. DeFronzo, R. A. *et al.* Type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, 1–22 (2015).
31. Barry, E. *et al.* Efficacy and effectiveness of screen and treat policies in prevention of type 2 diabetes: Systematic review and meta-analysis of screening tests and interventions. *BMJ* **356**, (2017).
32. Screening for Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **27**, s11–s14 (2004).
33. Chatham, J. C., Nöt, L. G., Fülöp, N. & Marchase, R. B. Hexosamine biosynthesis and protein O-glycosilation. *Shock* **29**, 431–440 (2008).
34. Gornik, I., Vujaklija, A., Lukić, E., Madžarac, G. & Gašparović, V. Hyperglycaemia in critical illness is a risk factor for later development of type II diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* **47**, 29–33 (2010).



35. Gornik, I., Vujaklija, A., Lukić, E., Madžarac, G. & Gašparovič, V. Hyperglycemia in sepsis is a risk factor for development of type II diabetes. *J. Crit. Care* **25**, 263–269 (2010).
36. Keser, T. *et al.* Increased plasma N-glycome complexity is associated with higher risk of type 2 diabetes. *Diabetologia* **60**, 2352–2360 (2017).
37. Schmid, K. Preparation and properties of an acid glycoprotein prepared from human plasma. *Journal of the American Chemical Society* **72** 2816 (1950).
38. Weimer, H. E., Mehl, J. W. & Winzler, R. J. Studies on the mucoproteins of human plasma. V. Isolation and characterization of a homogeneous mucoprotein. *J. Biol. Chem.* **185**, 561–8 (1950).
39. Schmid, K. Human plasma alpha 1-acid glycoprotein--biochemical properties, the amino acid sequence and the structure of the carbohydrate moiety, variants and polymorphism. *Progress in clinical and biological research* **300** 7–22 (1989).
40. Bteich, M. An overview of albumin and alpha-1-acid glycoprotein main characteristics: highlighting the roles of amino acids in binding kinetics and molecular interactions. *Heliyon* **5** e02879 (2019).
41. Fournier, T., Medjoubi-N, N. & Porquet, D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1482** 157-171 (2000)
42. Hocheplied, T., Berger, F. G., Baumann, H. & Libert, C.  $\alpha$ 1-acid glycoprotein: An acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine and Growth Factor Reviews* **14** 25–34 (2003).
43. Turner, G. A. N-glycosylation of serum proteins in disease and its investigation using lectins. *Clin. Chim. Acta.* **208**, 149–71 (1992).
44. Gornik, O. & Lauc, G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis. Markers* **25**, 267–278 (2008).
45. Taguchi, K., Nishi, K., Giam Chuang, V. T., Maruyama, T. & Otagiri, M. Molecular Aspects of Human Alpha-1 Acid Glycoprotein — Structure and Function. In *Acute Phase Proteins* (InTech, 2013)
46. Baumann, H., Morella, K. K., Jahreis, G. P. & Marinković, S. Distinct regulation of the interleukin-1 and interleukin-6 response elements of the rat haptoglobin gene in rat and human hepatoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5967–5976 (1990).
47. Kulkarni, A. B., Reinke, R. & Feigelson, P. Acute phase mediators and Glucocorticoids elevate  $\alpha$ 1-acid glycoprotein gene transcription. *J. Biol. Chem.* **260**, 15386–15389 (1985).
48. Fischer, K. *et al.* Biomarker Profiling by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for the Prediction of All-Cause Mortality: An Observational Study of 17,345 Persons. *PLoS Med.* **11**, (2014).
49. Smith, S. A. & Waters, N. J. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations for Drugs Binding to Alpha-1-Acid Glycoprotein. *Pharmaceutical Research* **36** 1–19 (2019).
50. Dente, L., Pizza, M. G., Metspalu, A. & Cortese, R. Structure and expression of the

- genes coding for human alpha 1-acid glycoprotein. *EMBO J.* **6**, 2289–2296 (1987).
51. Eap, C. B. & Baumann, P. The genetic polymorphism of human alpha 1-acid glycoprotein. *Prog. Clin. Biol. Res.* **300**, 111–25 (1989).
  52. Budai, L. *et al.* Investigation of genetic variants of  $\alpha$ -1 acid glycoprotein by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **393**, 991–998 (2009).
  53. Duché, J. C., Hervé, F. & Tillement, J. P. Study of the expression of the genetic variants of human alpha1-acid glycoprotein in healthy subjects using isoelectric focusing and immunoblotting. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **715**, 103–9 (1998).
  54. Nishi, K. *et al.* Structural insights into differences in drug-binding selectivity between two forms of human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein genetic variants, the A and F1\*S forms. *J. Biol. Chem.* **286**, 14427–14434 (2011).
  55. Schönfeld, D. L., Ravelli, R. B. G., Mueller, U. & Skerra, A. The 1.8-Å Crystal Structure of  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein (Orosomuroid) Solved by UV RIP Reveals the Broad Drug-Binding Activity of This Human Plasma Lipocalin. *J. Mol. Biol.* **384**, 393–405 (2008).
  56. Herve, F., Gomas, E., Duche, J. & Tillement, J. Evidence for differences in the binding of drugs to the two main genetic variants of human alpha 1-acid glycoprotein. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **36**, 241–249 (1993).
  57. Kremmer, T. *et al.* Liquid chromatographic and mass spectrometric analysis of human serum acid alpha-1-glycoprotein. *Biomed. Chromatogr.* **18**, 323–329 (2004).
  58. Imre, T. *et al.* Glycosylation site analysis of human alpha-1-acid glycoprotein (AGP) by capillary liquid chromatography - Electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **40**, 1472–1483 (2005).
  59. Higai, K., Aoki, Y., Azuma, Y. & Matsumoto, K. Glycosylation of site-specific glycans of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1725**, 128–135 (2005).
  60. Elliott, M. A. *et al.* Investigation into the concanavalin A reactivity, fucosylation and oligosaccharide microheterogeneity of alpha 1-acid glycoprotein expressed in the sera of patients with rheumatoid arthritis. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **688**, 229–37 (1997).
  61. Hashimoto, S. *et al.* A1-Acid Glycoprotein Fucosylation As a Marker of Carcinoma Progression and Prognosis. *Cancer* **101**, 2825–2836 (2004).
  62. Ceciliani, F. & Pocacqua, V. The Acute Phase Protein  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein: A Model for Altered Glycosylation During Diseases. *Curr. Protein Pept. Sci.* **8**, 91–108 (2007).
  63. Poland, D. C. W. *et al.* Increased  $\alpha$ 3-fucosylation of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein in Type I diabetic patients is related to vascular function. *Glycoconj. J.* **18**, 261–268 (2001).
  64. Moore, D. F., Rosenfeld, M. R., Gribbon, P. M., Winlove, C. P. & Tsai, C. M. Alpha-1-acid (AAG, orosomuroid) glycoprotein: interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis. *Inflammation* **21**, 69–82 (1997).

65. Libert, C., Brouckaert, P. & Fiers, W. Protection by  $\alpha$ 1-acid glycoprotein against tumor necrosis factor-induced lethality. *J. Exp. Med.* **180**, 1571–1575 (1994).
66. Costello, M., Fiedel, B. A. & Gewurz, H. Inhibition of platelet aggregation by native and desialised alpha-1 acid glycoprotein [13]. *Nature* **281** 677–678 (1979).
67. Israili, Z. H. & Dayton, P. G. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug Metabolism Reviews* **33** 161–235 (2001).
68. Harvey, D. J. Identification of protein-bound carbohydrates by mass spectrometry. *Proteomics* **1**, 311–28 (2001).
69. Siuzdak, G. An introduction to mass spectrometry ionization: An excerpt from The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology, 2nd ed.; MCC Press: San Diego, 2005. *J. Assoc. Lab. Autom.* **9**, 50–63 (2004).
70. Ho, C. S. *et al.* Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin. Biochem. Rev.* **24**, 3–12 (2003).
71. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246** 64–71 (1989).
72. Pitt, J. J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin. Biochem. Rev.* **30**, 19–34 (2009).
73. Banerjee, S. & Mazumdar, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int. J. Anal. Chem.* **2012**, 40 (2012).
74. Hoffmann Edmond de, S. V. Mass Spectrometry: principles and applications, 3rd Edition - Edmond de Hoffmann, Vincent Stroobant. (John Wiley & Sons, 2007).
75. Hellerstein, M. K., Sasak, V., Ordovas, J. & Munro, H. N. Isolation of alpha 1-acid glycoprotein from human plasma using high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **146**, 366–371 (1985).
76. Hinneburg, H. *et al.* The Art of Destruction: Optimizing Collision Energies in Quadrupole-Time of Flight (Q-TOF) Instruments for Glycopeptide-Based Glycoproteomics. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **27**, 507–519 (2016).
77. Ceroni, A. *et al.* GlycoWorkbench: A tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J. Proteome Res.* **7**, 1650–1659 (2008).
78. Cooper, C. A., Gasteiger, E. & Packer, N. H. GlycoMod--a software tool for determining glycosylation compositions from mass spectrometric data. *Proteomics* **1**, 340–9 (2001).
79. Miyahara, K. *et al.* Serum Glycan Markers for Evaluation of Disease Activity and Prediction of Clinical Course in Patients with Ulcerative Colitis. *PLoS One* **8**, e74861 (2013).
80. Higai, K., Azuma, Y., Aoki, Y. & Matsumoto, K. Altered glycosylation of alpha1-acid glycoprotein in patients with inflammation and diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta.* **329**, 117–25 (2003).
81. Sun, Y. *et al.* The acute-phase protein orosomuroid regulates food intake and energy homeostasis via leptin receptor signaling pathway. *Diabetes* **65**, 1630–1641 (2016).

82. Lee, Y. S. *et al.* Adipocytokine orosomuroid integrates inflammatory and metabolic signals to preserve energy homeostasis by resolving immoderate inflammation. *J. Biol. Chem.* **285**, 22174–22185 (2010).
83. Akbay, E. *et al.* The relationship between levels of alpha1-acid glycoprotein and metabolic parameters of diabetes mellitus. *Diabetes. Nutr. Metab.* **17**, 331–5 (2004).
84. Alquoqa, R. S., Kasabri, V., Naffa, R., Akour, A. & Bustanji, Y. Cross-sectional correlates of myeloperoxidase and alpha-1-acid glycoprotein with adiposity, atherogenic and hematological indices in metabolic syndrome patients with or without diabetes. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* **9**, 283–291 (2018).

## **9. SAŽETAK**

**Kevin Kovač**

**Pojedinci s povećanim rizikom za razvoj dijabetesa tipa 2 imaju razgranatije i manje sijalinizirane N-glikane na alfa-1-kiselom glikoproteinu**

Glikozilacija je iznimno kompleksan kotranslacijski te posttranslacijski proces za kojeg se pretpostavlja da se događa na više od pola ukupnih proteina u čovjeku, a jedan njih je alfa-1 kiseli glikoprotein (AGP). AGP je plazmatski protein akutne faze neobičnih svojstava za kojeg se smatra da ima važnu ulogu u imunomodulatorim i protuupalnim procesima, no njegova biološka uloga nije do kraja definirana. Sadrži pet glikozilacijskih mjesta od kojih sva mogu vezati N-glikane različite kompleksnosti koji posljedično čine oko 45% ukupne mase glikoproteina. Dokazano je kako sastav N-glikana AGP-a ovisi o patofiziološkim procesima te su određene promjene u glikozilaciji vezane uz određene bolesti što ga čini potencijalnim dijagnostičkim i prognostičkim biljekom.

Prijašnja su istraživanja pokazala kako je razvoj hiperglikemije tijekom teške akutne bolesti faktor značajno povećanog rizika za razvoj dijabetesa tipa 2 te da dolazi do povećanja kompleksnosti N-glikoma ukupnih plazmatskih proteina kod pacijenata koji su razvili hiperglikemiju u teškoj akutnoj bolesti. S obzirom na to da se smatra kako većina razgranatih N-glikana ukupnih plazmatskih proteina potječe s AGP-a, u ovom su se istraživanju detaljno promatrala promjene u njegovoj glikozilaciji tijekom akutne bolesti. U populaciji sačinjenoj od ukupno 108 pacijenata zaprimljenih u jedinicu intenzivnog liječenja zbog akutne bolesti bilo je 59 slučajeva razvijene hiperglikemije iz čijih se uzoraka plazme određivao N-glikom AGP-a te se uspoređivao sa 49 slučajeva koji su ostali normoglikemični i služili kao kontrolna skupina. AGP je obogaćen iz krvne plazme pacijenata precipitacijom kiselinama te je proteolitički razgrađen tripsinom. Glikopeptidi AGP-a su obogaćeni ekstrakcijom na čvrstoj fazi te su analizirani reverzno-faznom LC-MS metodom. Analiza je pokazala da pojedinci s povišenim rizikom za razvoj dijabetesa tipa 2 imaju razgranatije i manje sijalinizirane N-glikane na alfa-1 kiselom glikoproteinu. Točnije, od kod ukupno sedam promatranih glikozilacijskih mjesta, povećanje grananja N-glikana bilo je značajno kod drugog glikozilacijskog mjesta AGP-a, dok je smanjena sijalinizacija N-glikana bila izražena na trećem glikozilacijskom mjestu AGP-a te četvrtom glikozilacijskom mjestu prve proteinske forme AGP-a (ORM1).

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da bi karakterizacija N-glikoma AGP-a mogla pomoći u otkrivanju pojedinaca koji su pod povećanim rizikom za razvoj dijabetesa tipa 2, ali prvotno ovi rezultati trebaju biti potvrđeni na longitudinalnim prospektivnim studijama s većim brojem uzoraka.

**Ključne riječi:** N-glikozilacija, alfa-1 kiseli glikoprotein, dijabetes tip 2, LC-MS

## **10. SUMMARY**



**Kevin Kovač**

**Individuals at increased risk of type 2 diabetes development have increased branching and lower sialylation of alpha-1-acid glycoprotein N-glycans**

Glycosylation is an exceptionally complex co- and post-transcriptional process for which it is assumed that occurs on more than half of total proteins in humans, one of them being alpha-1 acid glycoprotein (AGP). AGP is an acute phase plasma protein with peculiar characteristics that is considered to have important roles in immunomodulatory and anti-inflammatory processes, despite its precise biological role not being fully defined. It contains five glycosylation sites all of which are capable of binding N-glycans of different complexity that consequently contribute to approximately 45% of the glycoproteins total mass. It was shown that the AGP N-glycan profile is dependent on pathophysiological processes and with the fact that it is believed that some of the changes are disease-specific gives it the potential of a diagnostic and prognostic marker.

Previous studies showed that the development of hyperglycaemia during critical illness serves as a factor for significantly increased risk of developing type 2 diabetes and that there is an increase in complexity of the total plasma protein N-glycome in patients that reported hyperglycaemia during critical illness. Considering that it is believed that the majority of highly branched N-glycans of the total plasma proteins originate from AGP, this research engaged in its glycosylation changes during an acute illness. In a population of total 108 patients that were hospitalized in the intensive care unit due to a critical illness there were 59 reported cases of hyperglycaemia development whose plasma samples were then used to profile the AGP N-glycome and were compared to the 49 normoglycaemic control cases. AGP was enriched from the patients' plasma samples by precipitation using acids and afterwards proteolytically cleaved by trypsin. The AGP glycopeptides were further enriched with solid phase extraction and analysed using a reverse-phased LC-MS method. The analyses showed that individuals at increased risk of type 2 diabetes development have increased branching and lower sialylation of alpha-1-acid glycoprotein N-glycans. More precisely, of the total seven glycosylation sites searched, a significant increase in N-glycan branching was reported on AGP's second glycosylation site, whereas lower sialylation of N-glycans was reported on AGP's third glycosylation site and fourth glycosylation site of the AGP form 1 (ORM1).

The results of this research indicate that AGP N-glycome characterization could be used in distinguishing individuals who are at increased risk of type 2 diabetes development, albeit it is required these results are confirmed on prospective longitudinal studies with a larger number of samples.

**Key words:** N-glycosylation, alpha-1 acid glycoprotein, type 2 diabetes, LC-MS