

N-glikozilacija imunoglobulina G u likvoru i serumu u multiploj sklerozi

Turčić, Ana

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:125519>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-24**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ana Turčić

**N-GLIKOZILACIJA IMUNOGLOBULINA
G U LIKVORU I SERUMU U MULTIPLOJ
SKLEROZI**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ana Turčić

N-GLIKOZILACIJA IMUNOGLOBULINA G U LIKVORU I SERUMU U MULTIPLOJ SKLEROZI

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Doc. dr. sc. Ivan Gudelj

Prof. dr. sc. Dunja Rogić

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Ana Turčić

**N-GLYCOSYLATION OF
IMMUNOGLOBULIN G IN
CEREBROSPINAL FLUID AND SERUM
IN MULTIPLE SCLEROSIS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Assistant Professor Ivan Gudelj, PhD

Professor Dunja Rogić, PhD

Zagreb, 2024

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

Doktorski rad izrađen je pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivana Gudelja i prof. dr. sc. Dunje Rogić u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb i Laboratoriju za glikobiologiju tvrtke Genos d. o. o. za vještačenje i analize u suradnji s Klinikom za neurologiju Kliničkoga bolničkog centra Zagreb.

ZAHVALE

Kako je moja uloga „seat fillera“ na simpoziju nevezanom za medicinsku biokemiju rezultirala doktoratom djeluje gotovo sudbinski. Jedno od predavanja imao je, tada „samo“ doktor znanosti, Ivan Gudelj. Tema je bila promjene glikozilacije imunoglobulina u upali, ili na tom tragu. Stjecajem okolnosti, prof. dr. sc. Dunja Rogić me zadužila kao voditeljicu stručnih sastanaka Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku. Popunjavanje jedno do dva termina temama iz područja glikobiologije jednostavno se nije moglo propustiti. Zahvaljujem tako prvenstveno mentorima doc. dr. sc. Ivanu Gudelju i prof. dr. sc. Dunji Rogić koji su me gotovo nesvjesno doveli na ovaj put i usmjeravali prema cilju, a posebno na kontinuiranoj podršci, pristupačnosti i razumijevanju.

Doc. dr. sc. Željki Vogrinc upućujem posebnu zahvalu što me uvela u svijet „likvora“. Svojim vodstvom omogućila mi je razvoj u stručnom i znanstvenom smislu, a podrškom je stvorila okolinu u kojoj je zadovoljstvo raditi.

Zahvaljujem čitavoj ekipi, medicinskim sestrama i doktorima, Klinike za neurologiju Kliničkoga bolničkoga centra Zagreb, a posebno prof. dr. sc. Mariu Habeku i prim. dr. sc. Terezi Gabelić na pomoći u interpretaciji kliničkih podataka i susretljivosti.

Veliko hvala Barbari Radovani na pomoći u analizi glikana.

Mojim Likvorima. Posebno Leonardi i mr. Ljiljani, dobrim duhovima laboratorija. Za svakodnevne prijateljske riječi, životne mudrosti i smijeh iz dubine duše. Uvijek mi obojate sive dane, a ostale ukrasite šljokicama.

Zahvaljujem svojoj obitelji, a posebno mužu Ivanu koji je uvijek bio podrška i glas razuma u trenucima panike. Takvih je bilo poprilično.

Kako su rasli rezultati i kako su se gomilale riječi, rasla je i moja curica Lana. Njoj posvećujem ovaj rad.

SAŽETAK

Intratekalna oligoklonska ekspanzija plazma-stanica u multiploj sklerozi (MS) podržava ozljedu središnjega živčanog sustava (SŽS) i povezana je s aktivnom demijelinizacijom. Struktura N-glikana na konzerviranom asparaginu 297 u svakoj od CH2 domena Fc regije imunoglobulina G (IgG) izravno utječe na njegove efektorske funkcije. U upali se obrasci N-glikozilacije IgG-a mijenjaju i moduliraju proupalne ili protuupalne efektorske funkcije što se potencijalno odražava na status i aktivnost MS-a. Cilj istraživanja bio je analizirati N-glikozilaciju serumskoga i likvorskog IgG-a te ukupnih serumskih proteina u osoba s MS-om.

Presječna studija uključila je konsekutivne pacijente sa sumnjom na demijelinizacijsku bolest SŽS-a. Dijagnoza MS-a temeljena je na McDonaldovim kriterijima iz 2017. godine, a kontrolna skupina sastojala se od osoba kod kojih je dijagnoza MS-a isključena. Analiza fluorescentno obilježenih N-glikana izoliranih iz ukupnih proteina seruma, serumskoga i likvorskog IgG-a, provedena je tekućinskom kromatografijom ultravisoke učinkovitosti temeljenom na hidrofilnim interakcijama (HILIC-UPLC). N-glikani su uspoređeni s Expanded Disability Status Score (EDSS), znakovima aktivnosti bolesti na magnetskoj rezonanciji (MR), brojem relapsa i biljezima intratekalne upale (broj stanica, koncentracija IgG-a u likvoru i postotak intratekalne sinteze, oligoklonske trake, pozitivan indeks specifičnih antitijela na neki od virusa morbili, rubela, varicella zoster ili herpes simpleks virusa tipa 1 i 2 (MRZH reakcija)).

Razlike među skupinama pronađene su samo u N-glikomu IgG-a likvora. Osobe s MS-om imaju veći udio N-glikana s račvajućim N-acetilglukozaminom ($P = 2,63 \times 10^{-5}$) i monogalaktoziliranih N-glikana ($P = 1,49 \times 10^{-6}$) koji su povezani s prisutnosti oligoklonskih traka. Svojstva N-glikozilacije, specifično strukture monogalaktozilirane na $\alpha 6$ anteni: FA2[6]G1 ($r = 0,56$, $P < 0,001$) i FA2[6]BG1 ($r = 0,45$, $P = 0,001$), koreliraju samo s postotkom intratekalne sinteze IgG-a, ali ne i ukupnom koncentracijom IgG-a u likvoru. Navedena svojstva također su više zastupljena u MRZH pozitivnih osoba s MS-om. FA2[6]BG1 struktura je povišena u osoba s MS-om s većim opterećenjem lezijama na MR-u ($P = 0,0186$), ali N-glikozilacija IgG-a iz likvora nije promijenjena ovisno o prisutnosti aktivnih lezija, EDSS-u niti broju relapsa.

Promjene u N-glikozilaciji koje rezultiraju većom monogalaktozilacijom intratekalno sintetiziranih IgG-a najistaknutija su svojstva u MS-u te su povezana s radiološkom aktivnosti bolesti.

Ključne riječi: N-glikozilacija, multipla skleroza, autoimune bolesti, demijelinizacijske bolesti, imunoglobulin G, cerebrospinalna tekućina

EXTENDED SUMMARY

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating autoimmune disease of the central nervous system (CNS). Following the activation in the periphery, CNS-antigen recognizing pathogenic lymphocytes cross the blood-brain barrier (BBB) and infiltrate into the central nervous system (CNS). In MS, the interplay between immune cells in a proinflammatory milieu results in myelin destruction and the formation of CNS lesions which are the hallmark of the disease.

B-cells activate T-cells as antigen presenting cells, secrete cytokines for inter-cell signaling and differentiate into antibody producing plasma cells. Differentiation of B-cells into plasma cells leads to the synthesis of antibodies directed at different patient-specific antigens that can be detected as oligoclonal intrathecal synthesis in cerebrospinal fluid (CSF). Oligoclonal bands (OCB) are found in almost all people with MS (pwMS) and are included as one of the criteria for dissemination in time according to the 2017 McDonald criteria. OCBs remain present after acute perivascular inflammation and are a persistent finding due to the local intrathecal clonal expansion of antibody-producing plasma cells. Intrathecally produced antibodies are presumably involved in perpetuating CNS injury as immunoglobulin and complement depositions in MS lesions were found to be associated with active demyelination. Also, CSF antibodies isolated from pwMS were shown to be able to induce demyelination and axonal damage. OCBs suggest an active disease course as OCB-positive patients with the clinically isolated syndrome (CIS) are likely to later convert to clinically defined MS while MS patients without OCBs have a more favorable prognosis. Nevertheless, their number or specificity has not yet been connected to disease activity.

Genetic and environmental factors increase the risk of MS, and their epistatic interactions induce changes in the inflammatory response, partially due to the dysregulation of post-translation modifications such as N-glycosylation. Glycosylation of proteins is a process without a pre-set template during which carbohydrate structures are synthesized in a series of enzymatic reactions controlled by substrate availability, enzyme activity, and gene expression. Physical characteristics, biological function, and activity of most proteins depend on the linked glycan structure. N-glycan structure at the conserved asparagine 297 in each of the CH2 domains of the Fc region of immunoglobulin G (IgG) directly affects its effector functions, namely complement-dependent cytotoxicity (CDC), antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP). In inflammation, N-

glycosylation patterns of IgG are altered and modulate its pro- or anti-inflammatory effector functions. Changes in IgG N-glycans were seen in numerous systemic and organic autoimmune diseases, and proinflammatory N-glycosylation pattern is connected to disease progression and activity and severity of symptoms.

We hypothesize that there are differences in the individual inflammatory response and effector functions of OCBs which is reflected in disease status and activity. Given the association of N-glycosylation with different autoimmune diseases and the lack of studies exploring alterations of N-glycosylation of CSF-IgG in MS, N-glycosylation of total serum proteins was examined together with serum and CSF-derived IgG in patients in whom CNS demyelinating disease was suspected, and compared to those with established diagnosis of MS. Also, the association was investigated of N-glycosylation with standard laboratory biomarkers of intrathecal inflammation and MS activity and neurological status.

Materials and Methods

This cross-sectional study included patients from the Department of Neurology, University Hospital Centre Zagreb, who underwent diagnostic procedures for suspected CNS demyelinating disease. Based on the 2017 McDonald criteria for MS diagnosis, patients were categorized into pwMS group: relapsing-remitting MS (RRMS), primary progressive MS, and clinically isolated syndrome; and control group: other neurological and demyelinating diseases. The number of relapses, Expanded Disability Status Scale (EDSS), and the total number and the presence of gadolinium enhancing magnetic resonance imaging (MRI) lesions were extracted from the hospital information system. According to the MRI lesion load, the patients were classified as having <9 or ≥ 9 T2 hyperintense lesions, and lesions were considered active if at least one gadolinium enhancing lesion was detected.

CSF was collected by lumbar puncture into a tube without additive. A paired blood sample was collected into a tube with gel and clot activator. CSF cells were microscopically counted in Fuchs-Rosenthal chamber. Afterwards, CSF and blood were centrifuged (3500 rpm, 10 min). CSF supernatant and serum were aliquoted and stored at -80°C for glycan analysis. CSF was stored for glycan analysis if >1 mL was available for storage. The following laboratory analyses were performed: immunonephelometric measurement of the albumin and IgG concentrations, assessment of the percentage of intrathecal IgG synthesis and function of the blood-brain barrier (BBB), OCBs detection by isoelectric focusing and immunofixation of IgG with peroxidase-

labelled antisera in agarose gel, virus-specific antibody index (ASI) to measles, rubella, varicella zoster and herpes simplex 1/2 viruses (MRZH reaction), and chitotriosidase activity.

IgG from serum diluted 7-fold and undiluted CSF were isolated by affinity chromatography. Isolated IgG and serum samples were denatured by addition of sodium dodecyl sulphate (SDS) and incubation at 65°C. The N-glycans were released by addition of PNGase F (Promega, USA). The released serum N-glycans were labelled with 2-aminobenzamide (2-AB) while IgG N-glycans were labelled with procainamide hydrochloride (ProA). Subsequent purification of labelled N-glycans was identical for IgG and serum samples using hydrophilic interaction liquid chromatography-solid phase extraction. The labelled N-glycans were eluted with ultrapure water and stored at -20°C until analysis. Fluorescently labelled N-glycans were separated by ultra-high performance liquid chromatography based on hydrophilic interactions (HILIC-UPLC) on Waters Acquity UPLC instrument (Waters, USA). The N-glycan abundance in each peak was expressed as a percentage of the total integrated area. For IgG glycans, six derived traits were calculated in addition to the 24 directly measured glycan traits. For serum glycans, 16 derived traits were calculated in addition to the 39 directly measured glycan traits.

Results

In total, 308 participants were included (pwMS=190, controls=118). CSF was available for glycan analysis for 224 participants (pwMS=146, controls=78). Controls and pwMS did not differ according to sex ($P=0.615$), however, pwMS were younger compared to the controls (36 (range 17-74) vs 43 (range 17-75), respectively; $P<0.001$). Most pwMS had RRMS (87%), higher lesion load, more gadolinium enhancing lesions, more relapses, and higher markers of intrathecal inflammation compared to controls. Most pwMS (74%) had either no or minimal disability (EDSS < 2). No differences in individual N-glycan structures or derived N-glycan traits of total serum proteins and serum IgG N-glycome were found between pwMS and controls. However, differences between groups were observed in N-glycome of CSF-IgG, mainly revolving around the presence of bGlcNAc ($P=2.63E-05$) and monogalactosylation ($P=1.49E-06$). Specifically, the abundances of bisected glycan structures (FA2B, FA2[6]BG1 and A2BG2), as well as monogalactosylated structures (FA2[6]G1 and FA2[6]BG1) were significantly increased in pwMS.

Inflammatory-related changes in CSF-IgG glycans were present in individuals with CSF cell count higher than 5/ μ L. CSF-IgG glycans were more bisected ($P=0.018$) and less sialylated ($P=0.0005$), and digalactosylated ($P=5.92E-05$). Therefore, agalactosylated ($P=0.0023$) and

monogalactosylated ($P=0.0084$) structures were more abundant. However, in pwMS these differences were less evident. Only lower digalactosylation ($P=0.0102$) and sialylation ($P=0.0303$) and higher monogalactosylation ($P=0.0371$) were present in case of elevated CSF cell count. BBB of these patients was more often dysfunctional compared to pwMS with normal CSF count ($P=0.0395$). Mostly N-glycan structures containing core fucose and bGlcNAc (FA2B, FA2[6]BG1, FA2BG2) were higher in all individuals, but unchanged in pwMS related to CSF cell count.

CSF-IgG concentration poorly correlated with N-glycans. However, intrathecally synthesized IgGs were more monogalactosylated and strongly correlated with specific N-glycan structures. Intrathecal IgG synthesis was predominantly present in pwMS. Therefore, the significant correlations of FA2[6]G1 ($r=0.56$, $P<0.001$), FA2[6]BG1 ($r=0.45$, $P<0.001$), and FA2[3]G1 ($r=-0.49$, $P<0.001$), FA1 ($r=-0.41$, $P<0.001$) and FA2G2S2 ($r=-0.37$, $P<0.001$) with intrathecal IgG fraction was associated with MS. Participants with OCBs restricted to CSF had more monogalactosylated N-glycans (OCB type 2 $P=1.57E-5$, OCB type 3 $P=0.0477$) and N-glycans containing bGlcNAc (OCB type 2 $P=1.67E-5$, OCB type 3 $P=0.0103$) compared to OCB negative participants. Specifically, the abundances of N-glycan structures A2, FA2B, FA2[6]G1 and FA2[6]BG1 were significantly increased, while FA1, FA2[3]G1 and FA2G2S2 were decreased in participants with type 2 OCBs. CSF-IgG N-glycans in type 3 OCBs were less sialylated ($P=0.0192$) compared to normal CSF finding. The most sialylated N-glycans (A2G2S2, FA2G2S2, FA2BG2S2 and FA2BG2S1) were decreased particularly in participants with type 3 OCBs. Interestingly, we found that higher lesion load was related to the OCB type ($P=0.0157$) and was more frequent in type 3 OCBs.

PwMS with at least one positive ASI, i.e positive MRZH reaction, had higher lesion load ($P=0.0002$), but MRZH positivity was unrelated to the presence of gadolinium enhancing lesions on MRI, the number of relapses or EDSS ≥ 2 . We found that MRZH positive pwMS had more monogalactosylated N-glycans ($P=4.24E-06$), once more due to the increased abundance of FA2[6]G1 ($P=6.84E-07$) and FA2[6]BG1 ($P=0.0187$) structures. Also, the abundance of afucosylated structures (A2G2 and AG2S1) was decreased in MRZH positive pwMS, and hence fucosylated derived trait was elevated in these patients ($P=0.0409$). QChit was significantly higher in pwMS with active lesions ($P=0.0019$) but did not correlate with any individual N-glycan or glycosylation trait.

PwMS with higher lesion load had higher CSF-IgG monogalactosylated N-glycan FA2[6]BG1 (P=0.0186) which also happens to be an N-glycan structure that was most prominently different in pwMS compared to controls. Changes in other N-glycans and derived traits were not found in CSF or serum according to lesion load. Total proteins-, serum- and CSF-IgG N-glycosylation traits did not differ based on disability status as measured by the EDSS scale, the presence of gadolinium enhancing lesions or the number of relapses.

Discussion

The only differences in N-glycosylation in MS were detected in CSF, thus confirming that CNS-restricted inflammatory milieu affects N-glycan synthesis. Restricted inflammation of the CNS is reflected with more abundant bGlcNAc and monogalactosylated CSF-IgG N-glycosylation traits. Importantly, all monogalactosylated structures were more abundant in MS except FA2[3]G1 which is associated with higher risk for atherosclerotic cardiovascular diseases and cardiovascular events, all of which are more prevalent in pwMS. Lectin-binding studies have reported inconsistent findings regarding the changes in CSF-IgG glycosylation patterns. Results of the study on pwMS using mass spectrometry mostly correspond to the ones reported here, as higher IgG1 CSF fucosylation and bGlcNAc and lower galactosylation were found. Somewhat surprisingly, sialylation is unaffected in MS as opposed to other autoimmune diseases in which lower sialylation is clearly associated with disease activity, clinical course, and future relapses. Alternative N-glycosylation changes in MS are possibly related to the restriction of inflammation in the CNS compartment, different availability of substrates in CSF, or genetic variants associated with MS risk. We demonstrated that N-glycosylation of CSF-IgG is, regardless of diagnosis, significantly changed compared to serum-IgG, and in inflammation. N-glycosylation of CSF IgG is generally more proinflammatory oriented compared to serum (higher monogalactosylation and bGlcNAc and lower sialylation) and these differences become less pronounced with BBB dysfunction. Individual N-glycans or derived glycan traits do not correlate or correlate poorly with CSF-IgG concentration. We found higher CSF-IgG monogalactosylation and bGlcNAc structures in participants with OCBs, therefore the intrathecally synthesized IgG fraction specifically contributes to the alterations in the glycosylation pattern. These proinflammatory N-glycosylation traits are significant because positive OCBs are a medium-impact risk for developing clinically defined MS, attaining EDSS score ≥ 3 and conversion to secondary progressive MS. MRZH reaction in pwMS is associated with more monogalactosylated and fucosylated CSF-IgG N-glycans and clinically had higher lesion load.

Sialylation was in lower in specific MS subgroups: those with higher CSF cell count or in the case of type 3 OCBs. These patients also tend to have higher lesion load which poses a higher risk of future active disease. We have demonstrated that pwMS with high CSF cell count more frequently have dysfunctional BBB resulting in the higher influx of serum proteins into the CNS compartment, while, by definition, the type 3 OCB finding corresponds to the presence of the same IgG bands in CSF and serum and only some isolated in CSF. Therefore, lower sialylation in these subgroups could be somewhat related to the serum-borne IgG or underlying inflammatory drivers that regulate the expression of intracellular glycosyltransferases.

A higher lesion load is associated with higher monogalactosylation. PwMS with higher lesion load have a greater risk of future active disease, and monogalactosylated IgG antibodies might have a role in potentiating the proinflammatory effects. Other markers of MS disability and activity are unrelated to CSF-IgG N-glycosylation.

Unlike previously reported, we did not detect changes in serum total proteins and IgG N-glycans related to MS. Differences in findings between studies point to possible serum-detectable N-glycosylation traits that are either systemically different in progressive MS or change with disease progression as other studies primarily included pwMS with progressive phenotypes.

Conclusions

Monogalactosylation and bGlcNAc N-glycosylation traits of CSF-IgG are more abundant in MS while N-glycosylation of serum proteins is unaffected. Alternative N-glycosylation is present in MS as N-glycans monogalactosylated on the $\alpha 6$ antenna FA2[6]G1 and FA2[6]BG1 are specifically associated with intrathecal antibodies. This N-glycosylation profile seems to be connected to the disease activity as our study has shown that these changes are present in pwMS with higher lesion load.

Keywords: N-glycosylation, multiple sclerosis, autoimmune diseases, demyelinating diseases, immunoglobulin G, cerebrospinal fluid

SADRŽAJ

1. UVOD	3
1.1. Multipla skleroza	3
1.2. Patogeneza multiple skleroze	5
1.3. Uloga limfocita B u multiploj sklerozi	8
1.4. Uloga antitijela u multiploj sklerozi	11
1.5. N-glikozilacija	13
1.5.1. N-glikozilacija imunoglobulina G	16
1.6. Promjene N-glikozilacije u autoimunim bolestima	19
1.7. Likvorska dijagnostika u slučaju sumnje na demijelinizacijsku bolest SŽS-a	20
2. OBRAZLOŽENJE TEME I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	22
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	24
4. ISPITANICI I METODE	25
4.1. Laboratorijske pretrage	26
4.1.1. Citološka analiza likvora	26
4.1.2. Određivanje funkcije krvno-moždane barijere i intratekalne sinteze IgG-a	26
4.1.3. Određivanje oligoklonskih IgG traka	28
4.1.4. Analiza indeksa specifičnih antitijela na viruse	29
4.1.5. Aktivnost hitotriozidaze	29
4.2. Analiza glikana	30
4.2.1. Izolacija imunoglobulina G iz seruma i likvora	30
4.2.2. Deglikozilacija N-glikana IgG eluata	31
4.2.3. Deglikozilacija N-glikana ukupnih proteina seruma	31
4.2.4. Obilježavanje N-glikana IgG-a	31
4.2.5. Obilježavanje N-glikana proteina seruma	32
4.2.6. Analiza N-glikana HILIC-UPLC metodom	32

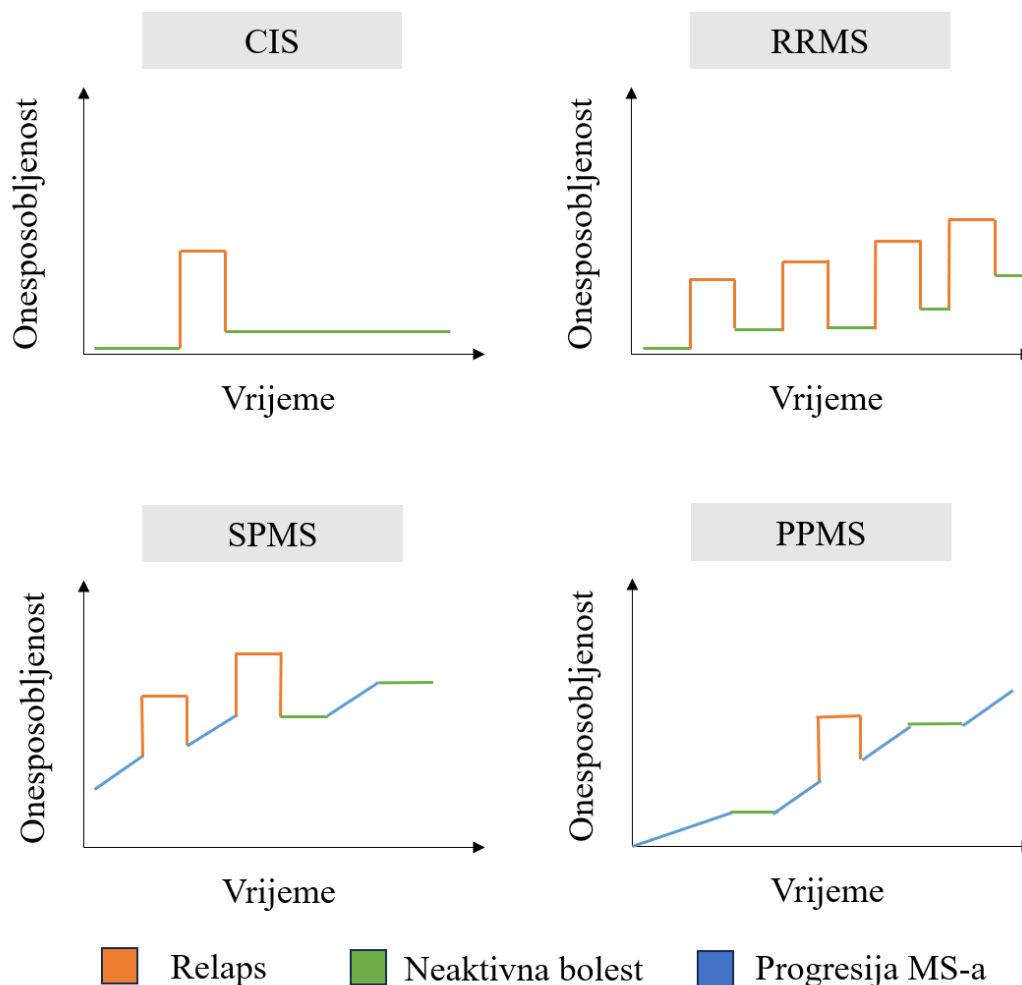
4.2.7. Izračun deriviranih svojstava	33
4.3. Statistička analiza	45
5. REZULTATI.....	47
5.1. Kliničke karakteristike ispitanika	47
5.2. Razlike u N-glikozilaciji IgG-a između osoba s MS-om i kontrolnih ispitanika	51
5.3. N-glikozilacija imunoglobulina G i biljezi intratekalne upale	55
5.3.1. Promjene N-glikozilacije IgG-a likvora u odnosu na ukupan broj stanica likvora. 55	
5.3.2. Povezanost N-glikozilacije u osoba s MS-om s koncentracijom IgG-a likvora i postotkom intratekalne sinteze IgG-a	59
5.3.3. Promjene sastava N-glikana ovisno o tipu oligoklonskih vrpca.....	62
5.3.4. Promjene sastava N-glikana ovisno o MRZH statusu osoba s multiplom sklerozom	68
5.3.5. Povezanost hitotriozidaze s N-glikozilacijom IgG-a	72
5.4. Potencijal primjene N-glikana u dijagnostici multiple skleroze.....	76
5.5. Neurološki status i aktivnost multiple skleroze	79
5.6. Razlike u N-glikozilaciji IgG-a izoliranog iz seruma i likvora ovisno o funkciji krvno-likvorske barijere	83
5.7. N-glikozilacija ukupnih serumskih proteina u osoba s MS-om u odnosu na kontrolne ispitanike.....	87
6. RASPRAVA	90
7. ZAKLJUČCI.....	96
8. POPIS LITERATURE	98
9. POPIS KRATICA	112
10. ŽIVOTOPIS I POPIS JAVNO OBJAVLJENIH RADOVA	114
11. PRILOG	117

1. UVOD

1.1. Multipla skleroza

Multipla skleroza (MS) je kronična autoimuna bolest središnjega živčanog sustava (SŽS) koju karakteriziraju demijelinizacija i neurodegeneracija. Patogenetski mehanizmi MS-a uključuju infiltraciju SŽS-a perifernim stanicama imunskog sustava i upalu SŽS-a. Upala rezultira ozljedom oligodendrocita i neurona te posljedično gubitkom mijelinske ovojnice i formiranjem lezija koje su obilježje bolesti. Promijenjena provodljivost neurona klinički se očituje kao monofazna epizoda, tj. neurološki deficit, sa simptomima koji odražavaju žarišni ili multifokalni upalni demijelinizacijski događaj u SŽS-u. Neurološki deficit razvija se akutno ili subakutno, u trajanju od najmanje 24 sata, s oporavkom ili bez oporavka i u odsutnosti vrućice ili infekcije, a posljedica je poremećaja u aksonskom prijenosu signala područja zahvaćenog upalom. Lokalizacija lezija ograničena je na perivaskularne prostore i okolnu bijelu tvar u specifičnim područjima SŽS-a. Kliničko očitovanje bolesti ovisi o raspoređenosti lezija unutar SŽS-a koje je vrlo raznoliko između osoba s MS-om. Tipični simptomi MS-a uključuju jednostrani optički neuritis, žarišne hemisferalne simptome, žarišne simptome oštećenja moždanog debla i malog mozga te nepotpuni transverzalni mijelitis. Očituju se kao motorni, senzorni, vizualni i autonomni simptomi te simptomi moždanog debla. Simptomi koji traju dulje od 24 sata karakteriziraju se kao akutno pogoršanje MS-a, tj. relaps (1).

Dijagnostički kriteriji MS-a uključuju kliničke, radiološke i laboratorijske biljege koji služe definiranju diseminacije bolesti u prostoru i vremenu (2). MS se klasificira u nekoliko kliničkih fenotipova. Prva epizoda neurološkog deficita kod osoba kojima prethodno nije dijagnosticirana MS definira se kao klinički izolirani sindrom (CIS). Većina osoba s MS-om ima relapsno-remitentni tijek bolesti (RRMS) koji je karakteriziran neurološkim relapsom nakon kojeg slijedi potpun ili djelomičan oporavak zahvaćene funkcije. Manje pojedinaca, otprilike 10 – 15 % osoba s MS-om (3), progresivno akumulira neurološku onesposobljenost bez relapsa koja se definira kao primarno-progresivni oblik MS-a (PPMS). Progresijom bolesti, RRMS se može razviti u sekundarno-progresivni fenotip (SPMS) s kontinuiranom neurodegeneracijom (Slika 1).



Slika 1. Fenotipovi multiple skleroze. CIS, klinički izolirani sindrom; RRMS, relapsno-remitentna multipla skleroza; PPMS, primarno-progresivna multipla skleroza; SPMS, sekundarno-progresivna multipla skleroza.

MS je vodeći uzrok netraumatske neurološke onesposobljenosti u mlađoj populaciji. Prevalencija bolesti na globalnoj razini raste, a procjenjuje se da čak 2,8 milijuna osoba živi s MS-om (35,9 : 100 000 stanovnika) (4). Hrvatska, štoviše, pripada zemljama s najvećom prevalencijom MS-a (143,8 : 100 000 stanovnika) (5). Postoje spolne razlike u prevalenciji MS-a; MS je dva do tri puta češća u žena nego u muškaraca (6). Žene imaju veću aktivnost bolesti, koja se klinički očituje kao 16 % veća stopa relapsa, nego muškarci. S druge strane, kod muškaraca je izraženija neurodegenerativna komponenta MS-a jer imaju bržu progresiju invalidnosti od žena. Razlika u aktivnosti bolesti između muškaraca i žena nestaje nakon dobi

od 50 godina, što se podudara s nastupom menopauze u žena, dok je spolna razlika u neurodegenerativnoj komponenti MS-a vidljiva nakon 45. godine života (3).

1.2. Patogeneza multiple skleroze

Obilježje MS-a jesu lezije SŽS-a koje nastaju zbog lokalizirane upale i demijelinizacije uz prisutnost različitih stupnjeva astroglioze, oštećenja oligodendrocita, gubitka aksona i remijelinizacije. Infiltracija SŽS-a perifernim imunskim stanicama posebno je izražena u relapsno-remitentnom fenotipu MS-a. Cilj je imunomodulacijske terapije smanjiti aktivnost i ulazak imunskih stanica u SŽS čime se uspješno smanjuje učestalost relapsa. Unatoč terapiji, kod većine osoba s MS-om prisutno je stalno nakupljanje neuroaksonskih oštećenja što rezultira trajnom neurološkom onesposobljenosti. Zbog navedenog se pretpostavlja da se u MS-su usporedno odvijaju procesi koji pokreću relapse i procesi koji uzrokuju kroničnu progresiju (7).

Genska predispozicija (8), spol (hormonski status) i okolišni čimbenici (vitamin D, virusne infekcije kao što je infekcija Epstein-Barr virusom (EBV), pretilost i pušenje) zajednički utječu na imunostne mehanizme koji vode razvoju MS-a. Najčešći geni povezani s MS-om jesu geni koji sudjeluju u imunskom odgovoru (npr. HLA geni koji prezentiraju antigene za CD8+ i CD4+ limfocite T, geni za interleukin 2 i 7 receptore itd.). Genska sastavnica ima bitan utjecaj na učestalost bolesti. Mutacija HLA-DRB1_1501 lokusa doprinosi čak 30-postotnom riziku od razvoja MS-a, a učestalost pojave bolesti unutar iste obitelji jest 20 %. U jednojajčanih blizanaca podudarnost obolijevanja od MS-a neočekivano je niža, oko 30 %, a u neoboljelih blizanaca nisu dokazane razlike u genomu, epigenomu i transkriptomu (9). Navedeno upućuje na to da okolišni čimbenici imaju izravan učinak na genski rizik te se geografska raširenost MS-a ne može protumačiti samo genskom sklonošću. Okolišni čimbenici koji su pokazali najveću povezanost s povećanim rizikom od MS-a jesu prethodna infekcija EBV-om, manjak vitamina D, pretilost i pušenje (10).

Procesi koji pokreću relapse u MS-u povezani su s mehanizmima: 1) kontakta s antigenom SŽS-a, 2) gubitka periferne tolerancije i imunostne reakcije na vlastite antigene, 3) prolazak kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) i 4) reaktivaciju u SŽS-u. Upalna reakcija tako započinje na periferiji, a infiltracijom u SŽS dolazi do proliferacije proupalnih limfocita.

U fiziološkim uvjetima SŽS se smatra imunostno privilegiranim okruženjem te samo ograničen broj limfocita može proći KMB (11). KMB je disfunkcionalna u ranim fazama MS-a što dovodi do lokalnog uključivanja patogenih limfocita T i B (7). Dokazane su promjene u ekspresiji

proupalnih citokina, kemokinskih receptora i integrina infiltrirajućih limfocita koji doprinose poremećaju funkcije KMB-a u MS-u (12). Dodatno, propusnost KMB-a u bijeloj tvari normalnog izgleda (engl. *normal appearing white matter*, NAWM) povezana je s većim brojem relapsa (13).

U MS-u su dokazane promjene u populacijama imunskih stanica u periferiji. Nalazimo proupalne cirkulirajuće pomagačke CD4⁺ i citotoksične CD8⁺ limfocite T i limfocite B, povećanu proporciju CD4⁺ folikularnih limfocita T s istodobnom disfunkcijom regulatornih limfocita T (14). Za aktivaciju limfocita T nužna je interakcija s limfocitima B koje, kao antigen-prezentirajuće stanice, proizvode kostimulacijske molekule nužne za aktivaciju limfocita T. Nakon antigene stimulacije, CD4⁺ limfociti T mogu se diferencirati u Th1, Th2 ili Th17 subpopulacije s jasno definiranim profilom citokinskog lučenja. U MS-u, proupalni CD4⁺ limfociti T većinom su Th1 i Th17 fenotipa, koji luče interleukine interferon γ (INF γ) i interleukin 17 (IL17), i s takvim proupalnim citokinskim profilom doprinose demijelinizaciji u SŽS-u (15). INF γ je najpotentniji aktivator makrofaga u staničnoj imunosti. IL17 poremećuje funkciju KMB-a i tako cirkulirajućim perifernim imunskim stanicama omogućava ulazak u SŽS. Također su povećani CD4⁺ limfociti T koji stvaraju GM-CSF, citokin koji potiče sazrijevanje i aktivaciju mijeloidnih stanica (monocita, dendritskih stanica), čime povećava njihovu sposobnost prezentiranja antigena i stvaranja citokina (16). Unutar populacije CD4⁺ limfocita T nalazimo folikularne pomagačke (Tfh) i regulatorne (Tfr) limfocite. Tfh limfociti su uključeni u formiranje germinalnog centra (GC) te aktivaciju, ekspanziju i diferencijaciju limfocita B u antigen-producirajuće stanice. Istodobno, Tfr limfociti reguliraju reakcije u GC-u i sudjeluju u signalima koji vode uklanjanju autoreaktivnih limfocita B. Regulatorni limfociti T sniženi su u CIS-u (17) i MS-u (18,19) što može doprinijeti gubitku periferne tolerancije i posljedično smanjenom uklanjanju neželjenih autoreaktivnih limfocita B te razvoju autoimune bolesti. Limfociti T pojavljuju se rano u nastanku lezije te se smatra da MS iniciraju autoreaktivni limfociti koji reagiraju protiv autoantigena SŽS-a (7). Dolazi do mobilizacije i Tfh limfocita u područja upale u SŽS-u gdje doprinose razvoju ektopičnih stuktura sličnih folikulima i tako podržavaju demijelinizaciju ovisnu o antitijelima (20).

CD8⁺ limfociti T brojniji su u lezijama i NAWM-u (21,22) osoba s MS-om u odnosu na CD4⁺ limfocite T (23). MHC molekule klase I nalaze se na površini svih stanica s jezgrom. Imaju funkciju prezentacije fragmenata peptida unutarstaničnih proteina CD8⁺ T-stanicama (14). To rezultira upalnim odgovorom protiv prezentiranog antigena. Osobe s MS-om istodobno imaju niže učestalosti CD8⁺ limfocita T u perifernoj krvi. Kako su infekcije EBV virusom normalno

pod kontrolom CD8+ citotoksičnih limfocita T, posljedica njihove smanjene učestalosti u cirkulaciji može biti smanjeni odgovor protiv EBV-a i razvoj MS-a (24). Osim uloge u obrani od virusa, CD8+ limfociti T uključeni su u autoreaktivnost i imunosnu aktivaciju u MS-u te mogu izravno oštetiti neurone (25).

Proces demijelinizacije potpomognut je aktivacijom mikroglije (rezidentnih makrofaga SŽS-a) i infiltracijom aktiviranih makrofaga u SŽS. Aktivirani makrofagi vežu se na strukture mijelinske ovojnice, razdvajaju mijelinski omotač i fagocitiraju ga. Nastaju makrofagi ispunjeni mijelinom koji se gomilaju u perivaskularnom prostoru i NAWM-u. Uloga astrocita je formiranje KMB-a, opskrba aksona hranjivim tvarima, održavanje homeostaze i stvaranje ožiljkastog tkiva nakon ozljede SŽS-a. U MS-u dolazi do aktivacije astrocita, njihove hipertrofije i izlučivanja citokina koji potiču ulazak perifernih cirkulirajućih upalnih stanica u SŽS. Astrociti stvaraju ožiljkaste promjene, vidljive kao kronične lezije neuroradiološkim tehnikama, koje onemogućuju remijelinizaciju zbog ograničenja pristupa oligodendrocitima i inhibicijom citokinima. Neadekvatna remijelinizacija u MS-u dodatno je posljedica smanjenja broja prethodnika oligodendrocita zbog ponovljenih epizoda demijelinizacije i poremećaja u diferencijaciji prooligodendrocita u funkcionalne stanice. Navedeni procesi u konačnici vode razvoju trajnoga neurološkog deficita zbog progresivnog oštećenja i gubitka aksona. U demijeliniziranom aksonu dolazi do preraspodjele natrijevih kanala iz Ranvijerovih čvorića duž cijelog aksona što uzrokuje povećane energetske potrebe koje nadmašuju kapacitete ATP-aza postojećih mitohondrija. Posljedično dolazi do izlaska natrija i ulaska kalcija u neuron niz koncentracijski gradijent što rezultira aksonskim oštećenjem. U akutnoj fazi upale makrofagi stvaraju dušikov monoksid i glutamat koji blokiraju stvaranje ATP-a te dolazi do degeneracije aksona (26). Neurodegeneracija u MS-u u konačnici je posljedica navedenih kaskadnih događaja koji rezultiraju oksidacijskim stresom, nedostatkom energije, ionskom neravnotežom i neuspješnom neuroprotekcijom i mehanizmima regeneracije.

Raščlanjivanje uloga imunosnog sustava u događajima koji pokreću razvoj multiple skleroze od onih koje pridonose progresiji bolesti stoga je komplicirano višestaničnom patofiziologijom infiltrirajućih stečenih i urođenih imunosnih stanica, kao i rezidentnih urođenih imunosnih stanica SŽS-a.

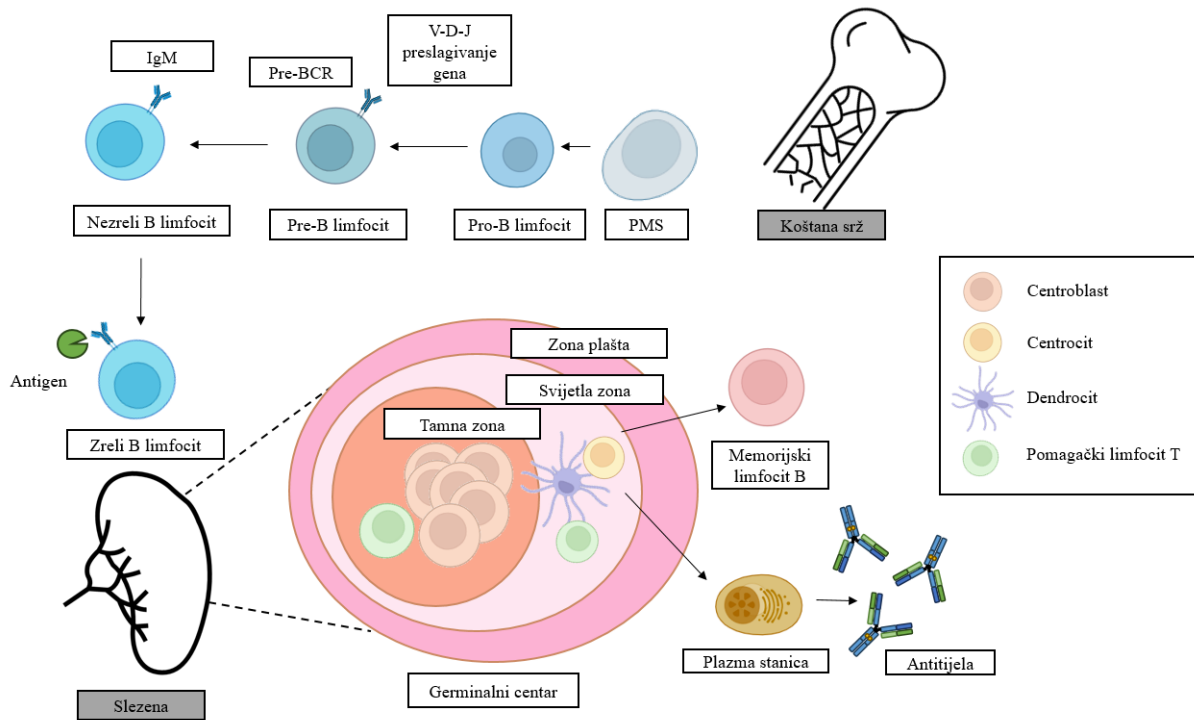
1.3. Uloga limfocita B u multiploj sklerozi

Klonalno povezani limfociti B dokazani su likvoru, meningama i parenhimu SŽS-a (27). Sekvenciranje sljedeće generacije omogućilo je karakterizaciju klonova limfocita B periferne cirkulacije i likvora osoba s MS-om. Rezultati tih studija pokazali su da aktivirani limfociti B mogu sazrijeti u cervikalnim limfnim čvorovima prije transmigracije u SŽS (28,29). Aktivna uloga B-stanica u imunopatogenezi MS-a trenutačno je interes brojnih istraživanja s obzirom na dokazanu kliničku učinkovitost terapija humaniziranim monoklonskim antitijelima koja prepoznaju specifične ciljne antigene (30).

Limfociti B razvijaju se u koštanoj srži iz pluripotentne krvotvorne matične stanice. Tijekom tog procesa prolaze preuredbu gena za antigenski receptor, tzv. V(D)J rekombinaciju i eksprimiraju receptor limfocita B (engl. *B-cell receptor*, BCR) koji se sastoji od dva laka i dva teška lanca. Pritom se nasumično prekrajaju jedan od 40 V, 23 D i 6 J gena s genima konstantne regije (CH) za teški lanac imunoglobulina, dok kod lakih lanaca dolazi do prekrajanja V i J gena s κ ili λ konstantnom regijom. Rezultat je repertoar jedinstvenih nezrelih limfocita B koje prepoznaju velik broj različitih antigena koji podliježu selekciji i uklanjanju u slučaju prepoznavanja vlastitog antigena. Nezreli limfociti B s ispravno složenim BCR-om migriraju u slezenu gdje sazrijevaju u naivne limfocite B, folikularne ili marginalne zone. Naivne stanice kontinuirano cirkuliraju kroz krv i limfni sustav te se primarno zadržavaju u folikularnoj zoni limfnih čvorova i slezene. Sekundarna diferencijacija i sazrijevanje limfocita B ovisna je o kontaktu s antigenom i CD4⁺ limfocitima T. Vežanjem antigena dolazi do aktivacije naivnih limfocita B koji internaliziraju antigen i aktiviraju pomagačke CD4⁺ limfocite T, specifične za isti antigen, prezentiranjem peptida antigena preko MHC-II kompleksa (engl. *major histocompatibility complex II*, MHC-II). Potpuna aktivacija naivnih limfocita B omogućena je kostimulacijskim signalom s pomoću citokina i površinskih liganda upravo aktiviranih, antigen-specifičnih CD4⁺ limfocita T. Dodatno, naivni limfocit B mogu se aktivirati preko receptora nalik na Toll (engl. *Toll-like receptors*, TLR) i receptora za komplement.

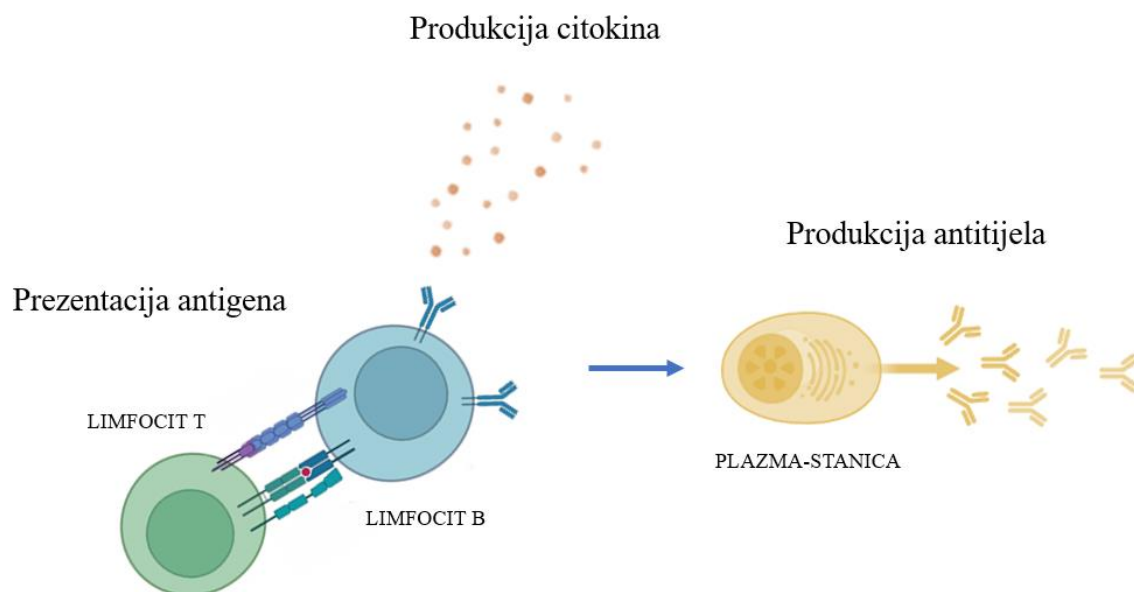
Aktivirani limfociti B mogu se diferencirati u kratkoživuće plazma-stanice ili ulaze u reakciju germinalnog centra u sekundarnom limfatičkom tkivu. Pritom uz pomoć CD4⁺ limfocita T dolazi do preinake BCR-a somatskom hipermutacijom genskog segmenta koji kodira varijabilnu regiju receptora koja veže antigen. Pozitivnom selekcijom izdvajaju se limfociti B jačeg afiniteta za antigen. Upravo limfociti B s receptorom jakog afiniteta za antigen prolaze proces zamjene klase i diferenciraju se u stanice koje izlučuju antitijela, tj. plazma-stanice, ili memorijske limfocite B (Slika 2). Memorijski limfociti B specifično aktiviraju CD4⁺ limfocite

T Th1 fenotipa koji pomažu aktivaciju citotoksičnih CD8+ limfocita T i u konačnici uništavaju zaraženu stanicu. Limfociti B u osoba s MS-om često ekspiriraju CXC kemokinski receptor 3 (CXCR3) te tako transmigriraju u SŽS (31). Razvojne faze limfocita B karakterizirane su površinskim biljezima. Biljeg CD20 ekspiriran je od pre-B limfocita u koštanoj srži te se gubi na krajnje diferenciranim stanicama plazmablasta i plazma-stanica (32).



Slika 2. Razvoj i diferencijacija limfocita B. PMS, pluripotentna krvotvorna matična stanica; BCR, receptor limfocita B.

U konačnici uloge limfocita B u imunom odgovoru dijelimo na ovisne i neovisne o antitijelima. Uloge neovisne o antitijelima jesu prezentacija antigena limfocitima T, ekspresija kostimulatornih molekula i lučenje proupalnih citokina što rezultira aktivacijom i propagacijom autoreaktivnih limfocita T (33). Promjene u proizvodnji citokina, kostimulaciji i prezentaciji antigena najvjerojatnije doprinose razvoju patogenih limfocita B i T sklonih ulasku u SŽS (34). Različite uloge limfocita B shematski su prikazane na slici 3.



Slika 3. Uloge limfocita B u imunskom odgovoru. Limfociti B prezentiraju antigen limfocitima T, luče proupalne citokine, a diferencijacijom u plazma-stanice stvaraju antitijela na specifičan antigen.

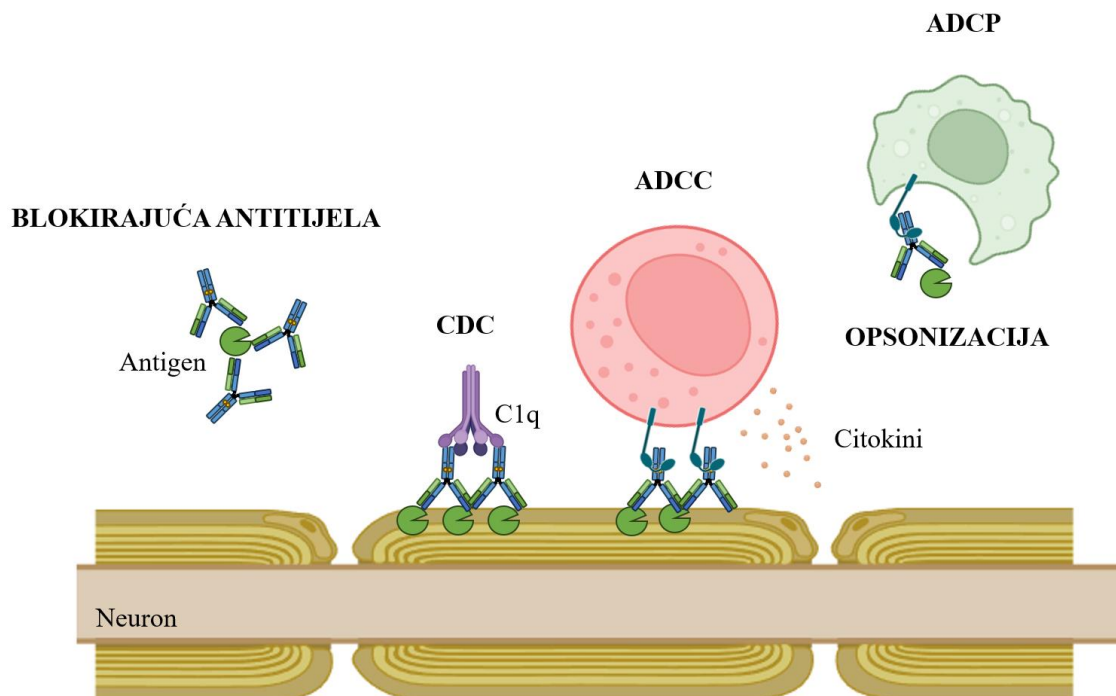
Procesom nasumičnih preuredbi gena za BCR stvara se velik udio autoreaktivnih nezrelih limfocita B koštane srži. Kako bi se spriječio neželjeni autoimuni odgovor, limfociti B prolaze različite točke provjere tolerancije na vlastite antigene. Mehanizmi centralne tolerancije u koštanoj srži i periferne tolerancije u sekundarnim limfnim organima normalno sprječavaju preživljavanje patogenih autoreaktivnih stanica (33). Točke provjere tolerancije na vlastite antigene prisutne su tijekom različitih faza normalnog razvoja imunskih stanica i različitim anatomskim mjestima. Klonalna delecija, anergija i uređivanje BCR-a mehanizmi su centralne i periferne tolerancije na vlastite antigene koji se aktiviraju pri vezanju BCR-a i vlastitog antigena visokog aviditeta u koštanoj srži, odnosno slezeni. Dodatne točke provjere periferne tolerancije jesu nedostatak kostimulacijskog signala CD4+ limfocita T antigen-aktiviranom naivnom limfocitu B ili limfocitu B koji sudjeluje u reakciji germinalnog centra. Nedostatak signala rezultat je eliminacije mehanizmima centralne tolerancije u timusu i periferne tolerancije autoreaktivnih limfocita T. U MS-u postoji poremećena funkcija mehanizama periferne tolerancije (35). Limfociti B koji prepoznaju vlastite antigene potencijalno izbjegnu mehanizme periferne tolerancije u slučaju kronične stimulacije limfocita T ili defekata u procesima signalizacije limfocita T. Infekcija B-limfotrofičnim EBV virusom povezana je s

patogenezom MS-a. U kroničnoj infekciji EBV-om dolazi do kontinuirane prezentacije antigena. Dodatno, utjecaj HLA i drugih rizičnih alela povezanih s imunskim odgovorom može rezultirati neadekvatnom reakcijom limfocita T i neučinkovitom kontrolom inficiranih stanica.

U meningama osoba s SPMS-om mogu se detektirati folikulu slične ektopične strukture bogate limfocitima B što upućuje na to da upala postaje ograničena na SŽS tijekom progresije bolesti. U osoba s PPMS-om i SPMS-om najčešće nema stvaranja novih lezija, već dolazi do ekspanzije postojećih što dodatno govori u prilog razvoju patogenetskog mehanizma unutar SŽS-a neovisnog o periferiji.

1.4. Uloga antitijela u multiploj sklerozi

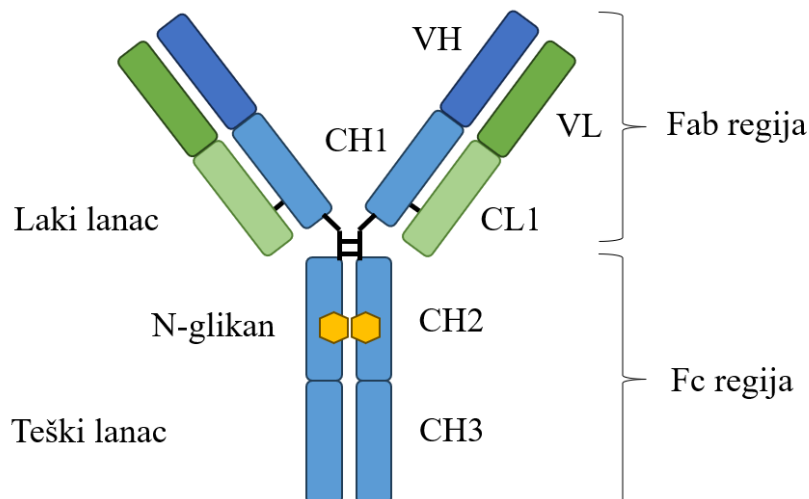
Imunoglobulini su antitijela koje izlučuju plazma-stanice i sudjeluju u brojnim procesima humoralne imunosti: a) neutralizacija antigena, b) aglutinacija, c) aktivacija klasičnog puta aktivacije komplementa (CDC), d) stanično posredovana citotoksičnost ovisna o antitijelima (ADCC), i e) stanično posredovana fagocitoza ovisna o antitijelima (ADCP) (Slika 4).



Slika 4. Imunoglobulini imaju brojne funkcije koje uključuju neutralizaciju antigena, aglutinaciju, aktivaciju klasičnog puta aktivacije komplementa (CDC), stanično posredovanu

citotoksičnost ovisnu o antitijelima (ADCC) i stanično posredovanu fagocitozu ovisnu o antitijelima (ADCP).

Imunoglobulin G (IgG) jedan je od najzastupljenijih proteina koji čini oko 10 – 20 % proteina plazme. Sastoji se od dva identična teška (γ) i dva laka (κ ili λ) polipeptidna lanca povezana disulfidnim vezama. Svaki lanac sastoji se od konstantne i varijabilne regije podijeljenih u domene. Fragment molekule s varijabilnom regijom i CH1/VL domenom veže antitijelo (Fab), dok kristabilni fragment molekule (Fc) veže različite receptore na površini imunskih stanica i C1q komponentu komplekta te tako određuje tip imunskog odgovora potaknut vezanjem antigena (Slika 5).



Slika 5. Shematska struktura imunoglobulina G. Sastoji se od dva identična teška i dva laka polipeptidna lanca povezana disulfidnim vezama. Svaki lanac sastoji se od konstantne (C) i varijabilne (V) regije. Konstantna regija podijeljena je u tri domene (CH1-3). Fragment molekule s varijabilnom regijom i CH1/VL domenom veže antitijelo (Fab), dok kristabilni fragment molekule (Fc) veže različite Fc receptore na površini imunskih stanica i C1q komponentu komplekta. U CH2 domeni na asparaginu na poziciji 297 oba teška lanca postoji vezno mjesto za N-glikan.

Stanice koje stvaraju antitijela povišene su u aktivnim lezijama u bijeloj tvari u MS-u što doprinosi pojačanoj intratekalnoj sintezi imunoglobulina G (36) te je u akutnim lezijama veća gustoća limfocita B u odnosu na kronične lezije (37). Intratekalna sinteza IgG-a, kao prisutnost oligoklonalnih traka IgG-a (OIGG), obilježje je MS-a. Jednom dokazani obrazac OIGG-a karakterističan je za pojedinu osobu i longitudinalno je perzistentan nalaz (38), neovisno o primijenjenoj imunomodulacijskoj terapiji (39), što govori o lokaliziranoj prisutnosti limfocita B u SŽS-u (40). Pozitivan nalaz OIGG-a prisutan je u čak 95 % osoba s MS-om (41) i povezan je s većom vjerojatnosti prelaska CIS-a u klinički definiranu MS (42), izraženijom intratekalnom upalom i jačom kortikalnom demijelinizacijom pri dijagnozi kao i jačom progresijom bolesti (43,44). Nedostatak specifičnog antigena u MS-u, kao i uspješnost terapije koja cilja razvojne oblike limfocita B koji ne stvaraju antitijela, zajedno upućuju na to da je intratekalni, višespecifični i oligoklonalni humoralni odgovor u MS-u posljedica nespecifične aktivacije limfocita B lokaliziranih u SŽS-u.

Prisutnost antitijela dokazana je na mijelinskoj ovojnici (45,46), oligodendrocitima i aksonima (37,47) u demijelinizacijskim lezijama. Imaju glavnu ulogu u razvoju novih lezija i povezana su s oštećenjem oligodendrocita i ozljedom aksona (37). Antitijela izolirana iz seruma osoba s MS-om potiču citotoksičnu reakciju potpomognutu stanicama na mijelin-bazični protein (48) i druge proteine cerebralnog tkiva (49). IgG antitijela izolirana iz plazme osoba s MS-om mogu aktivirati sustav komplementa i prouzročiti apoptozu neurona (50), a rekombinantna monoklonska antitijela IgG-a iz izoliranih plazmablasta likvora osoba s MS-om u prisutnosti ljudskog komplementa uzrokuju aktivaciju klasičnog puta komplementa i dovode do stanične smrti oligodendrocita i demijelinizacije na mišjem modelu (51). Antitijela usmjerena na antigene SŽS-a mogu aktivirati stanice izvan SŽS-a te tako potaknuti razvoj encefalitogeničnih limfocita T (52). Osim toga, serumska antitijela osoba s MS-om mogu poremetiti propusnost KMB-a (53). Iako je uloga OIGG-a u MS-u predmet rasprave, sve više dokaza podupire hipotezu da IgG-i pridonose patogenezi bolesti.

1.5. N-glikozilacija

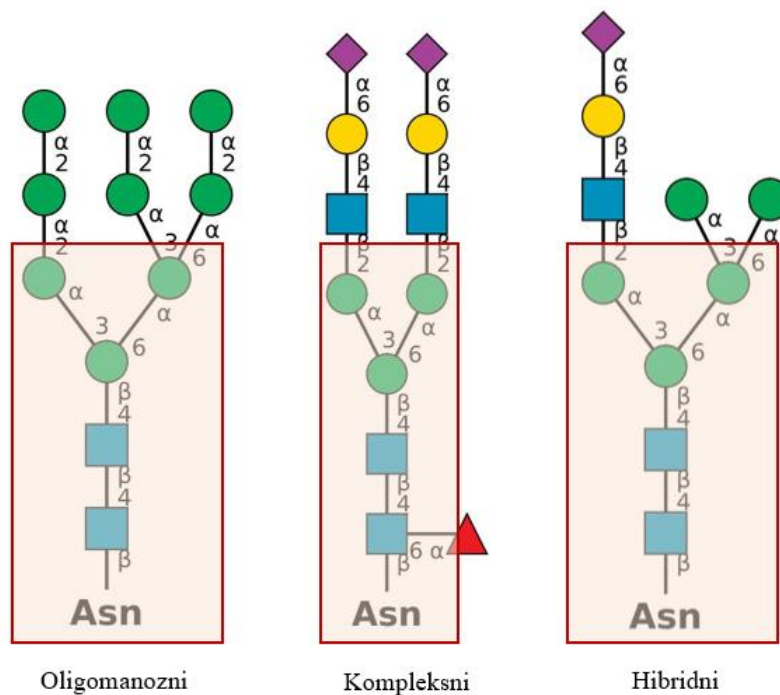
Glikozilacija je enzimima potpomognut proces pri kojem se složeni ugljikohidrati, glikani, vežu glikozidnom kovalentnom vezom na osnovicu proteina. Glikozilacija utječe na biološku funkciju i biofizička svojstva proteina kao što su stabilizacija strukture molekule, konformacija i poluzivot proteina (54). Većina je proteina plazme glikozilirana što utječe na njihovu topivost,

hidrofilnost i doprinosi negativnom naboju molekule čime se smanjuju neželjene međumolekularne interakcije i omogućava zaštita od proteolize. Proteini stanične membrane, kao što su receptori, adhezijske molekule i kanali, također su glikozilirani. Glikani također sudjeluju u međustaničnoj komunikaciji. Primjerice selektini, proteini na staničnoj površini, prepoznaju glikane na ligandima i potenciraju interakciju između stanica krvi i vaskularnih stanica u raznim fiziološkim i patološkim stanjima (54).

Za razliku od sinteze proteina, koja je kodirana deoksiribonukleinskom kiselinom (DNK), ne postoji predefiniran obrazac koji kodira sintezu složenih ugljikohidrata, već je taj proces kontroliran aktivnošću enzima endoplazmatskog retikula (ER) i Golgijeva aparata (GA) te dostupnosti supstrata. Glikoproteini mogu imati glikane vezane na dušikov ili kisikov atom aminokiselinskih ostataka te tako razlikujemo N-glikane i O-glikane. Predefinirana su samo potencijalna mjesta glikozilacije proteina jer se N-glikan može vezati samo na asparagin u Asn-X-Ser/Thr slijedu aminokiselina proteina, ako X nije aminokiselina prolin. O-galaktozilirani proteini imaju glikane vezane na kisikov atom hidroksilne skupine serina ili treonina (55).

Sinteza N-glikana u eukariota započinje na lipidnom nosaču dolikol-fosfatu u ER-u. Nakon sinteze oligosaharida koji može sadržavati do 14 monosaharidnih jedinica, N-glikani se prenose na Asn u Asn-X-Ser/Thr slijedu aminokiselina proteina (56). Pod utjecajem glikozidaza i glikoziltransferaza N-glikani se dodatno modificiraju u ER-u i GA-u. Ti su enzimi različito eksprimirani i imaju različitu aktivnost ovisno o fiziološkom statusu stanice. Supstrati za glikoziltransferaze jesu aktivirani nukleotidni šećeri. Stoga struktura konačnog N-glikana ovisi o ekspresiji gena koji sudjeluju u glikozilaciji unutar stanice, ali i o fiziološkom statusu stanice, što može utjecati na lokalizaciju i aktivnost glikozilacijskih enzima i prijenosnika nukleotidnih šećera (56).

Svi N-glikani dijele zajedničku sržnu strukturu, $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1$. Klasificiraju se u tri tipa ovisno o ugljikohidratima vezanim na sržnu strukturu: (1) oligomanozni, s manoznim ostacima vezanim na sržnu strukturu; (2) složeni, s antenarnim strukturama vezanim na *N*-acetilglukozilamin (GlcNAc) koji se nastavlja na sržnu strukturu; i (3) hibridni, s manoznim ostacima vezanim na $\text{Man}\alpha 1-6$ antenu sržne strukture i jednu antenu na GlcNAc-u vezanim na $\text{Man}\alpha 1-3$ (56) (Slika 6).

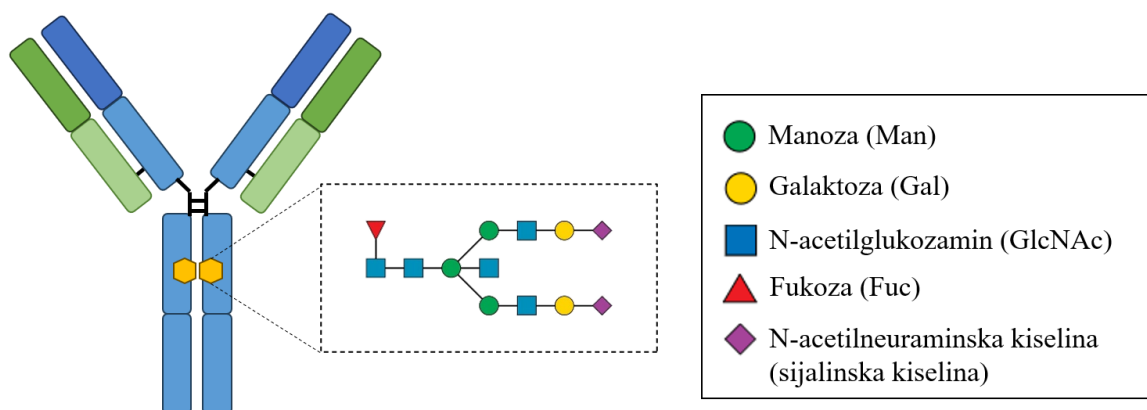


Slika 6. Tipovi N-glikana. N-glikane dijelimo na tri osnovna tipa: oligomanozni, složeni i hibridni tip. Svi tipovi dijele osnovnu sržnu strukturu Man3GlcNAc2Asn (izdvojena crveno). DrawGlycan aplikacija korištena je za crtanje glikanskih struktura (57). Asn, asparagin.

N-glikozilacija je objedinjujući molekularni mehanizam pri kojem se rizične genske varijante povezane s MS-om modificiraju okolišnim čimbenicima kao što su metabolički status i vitamin D (58). *MGAT1* VAVT-T haplotip (rs7726005, rs2070924, rs2070925), *IL2RA**T (rs2104286) i *IL7RA**C (rs6897932) smanjuju račvanje N-glikana i povezane su s MS-om. *IL2RA**T i *IL7RA**C smanjuju račvanje N-glikana smanjenjem ekspresije *MGAT1* mRNK, dok *MGAT1* VAVT-T haplotip povećava *MGAT1* mRNK ekspresiju, ali smanjuje račvanje N-glikana trošenjem UDP-GlcNAc-a što je zajednički supstrat s *MGAT5* (58,59). Također, varijante u genu za *MGAT5* povezane su s težim oblikom MS-a (60). Polimorfizmi transkripcijskog faktora *BACH2* koji sudjeluje kao promotor aktivacije limfocita B i sudjeluje u razvoju regulatornih limfocita T (61,62), prethodno povezan s MS-om (63,64), povezan je s proporcijom FA2[6]G1 glikana (65).

1.5.1. N-glikozilacija imunoglobulina G

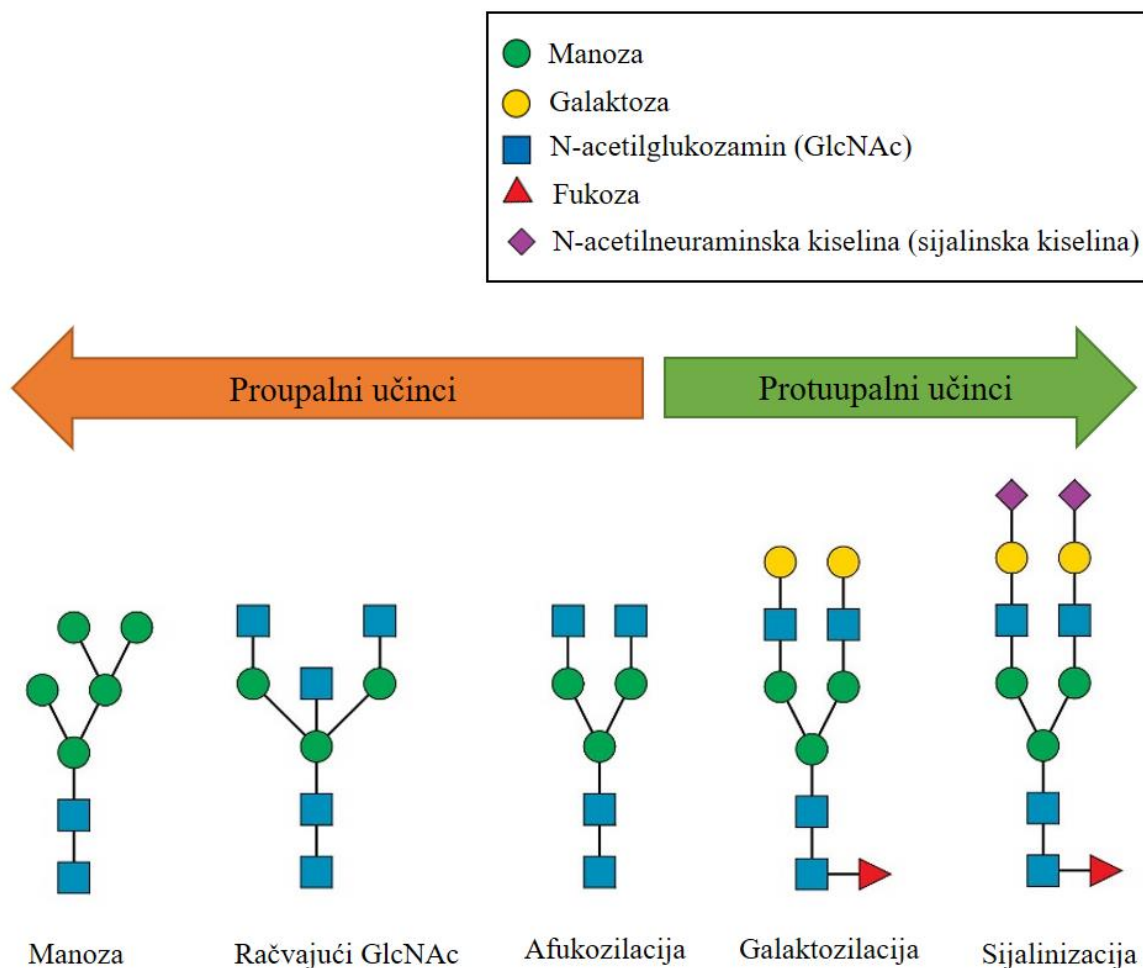
Biosinteza IgG N-glikana počinje u ER-u dodatkom prethodnika N-glikana na poziciji Asn297 u CH2 domeni konstante regije na oba teška lanca. Kako se proces N-glikozilacije premješta u GA, ta se struktura skraćuje djelovanjem glukozidaza i manozidaza. Nastavljaju se procesi dodavanja drugih šećera na formirane oligomanozne strukture: fukoze, galaktoze, sijalinske kiseline i GlcNAc-a (Slika 7). Ti procesi ovise o aktivnosti enzima: α -manozidaza, N-acetilglukozamiltransferaza (MGAT1, 2, 3, 4 i 5), fukoziltransferaze (FUT8), galaktozil- i sijaliltransferaza, kao i dostupnosti odgovarajućih supstrata (uridin-difosfat N-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc), uridin-difosfat galaktoze (UDP-Gal), gvanozin-difosfat-fukoze (GDP-Fuc), N-acetilneuraminske kiseline (Neu5Ac), N-glikolilneurominske kiseline i 2-keto-3-deoksi-D-galaktonična kiselina (Kdn)) (66). Promjene u metabolizmu nukleotida prethodno su dokazane u osoba s RRMS-om u odnosu na zdrave ispitanike (67).



Slika 7. Imunoglobulin G je galaktoziliran na poziciji Asn297 u CH2 domeni konstante regije na oba teška lanca. DrawGlycan aplikacija korištena je za crtanje glikanskih struktura (57).

Utjecajem citokina u upali dolazi do promjene obrasca N-glikozilacije zbog promjena u ekspresiji glikoziltransferaza u limfocitima B (68). Ovisno o sadržaju N-glikana modificiraju se višestruke efektorske uloge imunoglobulina potpomognute Fc krajem molekule. Sterički utjecaji između ugljikohidrata vezanih N-glikana i proteinske osnovice stabiliziraju Fc kraj molekule IgG-a i tako utječu na afinitet vezanja Fc receptora efektorskih stanica i C1q komponente komplementa. To znači da identična antitijela mogu prouzročiti različite učinke

ovisno o strukturi Fc vezanih N-glikana (Slika 8). Štoviše, uklanjanje N-glikana rezultira potpunim izostankom funkcije IgG-a. Hidroliza N-glikana s IgG-a smanjuje eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis što se objašnjava slabijom aktivacijom sustava komplementa (69). Mehanizmi povezani s aktivacijom limfocita B i diferencijacijom limfocita T također utječu na N-glikozilaciju IgG-a tijekom imunogenog odgovora (70).



Slika 8. Imunomodulacijski učinak deriviranih svojstava N-glikana. DrawGlycan aplikacija korištena je za crtanje glikanskih struktura (57).

1.5.1.1. Fukozilacija

Proces dodavanja sržne fukoze potpomognut je α 1,6-fukoziltransferazom (FUT8) koja prebacuje fukoze s GDP-L-fukoze. Fukoza vezana na prvi GlcNAc u osnovici N-glikana smanjuje afinitet IgG-a za sve receptore za Fc ulomak protutijela razreda γ (Fc γ R) koji se nalaze na efektorskim stanicama: makrofagima, monocitima, NK-stanicama i granulocitima. Smanjeni afinitet vezanja za Fc γ IIIaR posljedično znatno smanjuje ADCC (71), dok je utjecaj fukozilacije

na ADCP manje izražen (72,73). Afukozilirana IgG antitijela imaju 10 – 100 x veći afinitet za Fc γ R-e (74) što govori u prilog snažnom steričkom utjecaju sržne fukoze. Suprotno tomu, razina fukozilacije ne utječe na afinitet vezanja za Cq1 komponentu komplementa i posljedično aktivaciju CDC-a (71).

Sržna fukozilacija ima važnu ulogu u oblikovanju humoralne imunosti jer sudjeluje u pre-BCR sklapanju, prepoznavanju antigena i interakciji CD4+ limfocita T i limfocita B u procesu predočavanja antigena (75). CD4+ limfociti T iz likvora prepoznaju GDP-L-fukoza-sintetazu u HLA-DRB3* pozitivnih osoba s MS-om što može biti razlog manje dostupnosti prethodnika supstrata bitnih u procesu fukozilacije glikana (76).

1.5.1.2. Galaktozilacija

Fc-glikani mogu biti agalaktozilirani (G0), monogalaktozilirani (G1) ili digalaktozilirani (G2). Imunomodulacijski doprinos promjena u galaktozilaciji N-glikana teško je definirati odvojeno od doprinosa ostalih obrazaca glikozilacije jer agalaktozilacija i monogalaktozilacija istodobno podrazumijeva i nedostatak dviju, odnosno jedne, sijalinske kiseline. Galaktozilacija potiče aktivaciju CDC-a zbog pojačanog vezanja C1q komponente (77). Agalaktozilacija, s druge strane, omogućuje dostupnost manoze sržne strukture glikana što može aktivirati lektinski put aktivacije komplementa. Postoje proturječne studije o utjecaju galaktozilacije na afinitet za Fc γ R pa posljedično na ADCC i ADCP učinak. ADCC učinak povećan je u slučaju galaktozilacije afukoziliranih struktura (78). Galaktozilacija na α 1,6 anteni afukoziliranog N-glikana, a ne na α 1,3, povećava afinitet IgG-a za Fc γ RIIIa i taj je afinitet zapravo jednak digalaktoziliranoj strukturi (79,80). Nastale vodikove veze između Fc strukture i monogalaktoziliranog N-glikana na α 1,6 anteni rezultiraju rigidnijom strukturom i povećanim ADCC i CDC učinkom. U suprotnom, α 1,3 antena je fleksibilnija i dostupnija sijaliltransferazama što vodi smanjenom ADCC učinku (81). Visoko galaktozilirani N-glikani pojačavaju vezanje na inhibicijski Fc γ RIIb receptor što omogućuje zaustavljanje upale (82).

U konačnici se smatra da galaktozilacija modulira protuupalne procese jer je agalaktozilacija IgG-a dokazano povećana u osoba s autoimunim bolestima (83).

1.5.1.3. Račvajući N-acetilglukozamin

bGlcNAc je vezan β 1,4 vezom na sržni manozni ostatak i ne može se produljiti. Enzim koji dodaje bGlcNAc na sržnu strukturu glikana jest β 1,4-manozil-likoprotein 4- β -N-

acetilglukozaminiltransferaza (GlcNAc-T III, MGAT3), a važan supstrat o kojem ovisi biodostupnost bGlcNAc-a je UDP-GlcNAc (84). U serumu osoba s RRMS-om, a posebno u osoba s progresivnim oblicima MS-a, dokazane su snižene koncentracije GlcNAc-a i njegovih stereoizomera koji služe kao prethodnici supstrata UDP-GlcNAc-a (85). Također, koncentracija GlcNAc-a u serumu u osoba s MS-om obratno korelira s radiološkim znakovima demijelinizacije, a pokazano je da GlcNAc i granajući N-glikani potiču oligodendrogenezu (86). Samo manji udio (10 – 15 %) serumskih N-glikana sadrži bGlcNAc (87). Smatra se da bGlcNAc djeluje proupalno pojačavajući ADCC učinak tako što sterički inhibira dodatak sržne fukoze pod djelovanjem FUT8 (88).

1.5.1.4. Sijalinizacija

Utjecaj sijalinske kiseline na Fc posredovanu modulaciju imunskog odgovora povezan je s aktivacijom Fc γ R-a te vezanjem C1q komponente komplementa (89). Smanjeni afinitet sijaliniziranih IgG-a za Fc γ RIIIa na površini stanica urođenoga imunskog odgovora smanjuje ADCC i oslobađanje proupalnih citokina (90). Sijalinizacija pojačava vezanje za inhibicijski receptor Fc γ RIIb (91) što također doprinosi utišavanju upalnog odgovora. Također, limfociti T Th17 fenotipa stvaraju citokine koji smanjuju ekspresiju ST6GAL1 u plazmablastima i time podržavaju hiposijalinizaciju IgG-a (92). Dodatno postoje dokazi o lokaliziranim putovima sijalinizacije IgG-a u serumu, neovisnim o limfocitima B. Time su omogućene brze promjene u sijalinizaciji cirkulirajućih IgG-a tijekom upale čime se postiže brz imunomodulacijski učinak neovisan o *de novo* sintezi IgG-a (93).

1.6. Promjene N-glikozilacije u autoimunim bolestima

N-glikozilacija IgG-a u krvi promijenjena je u brojnim sistemskim i organskim autoimunim bolestima te je proupalni obrazac N-glikozilacije povezan s progresijom, aktivnosti bolesti ili jačinom očitovanja simptoma (94–99). Promjene u obrascu N-glikozilacije IgG-a u autoimunim bolestima imaju prediktivnu vrijednost jer su prisutne godinama prije razvoja reumatoidnog artritisa (100) i recidiva bolesti ANCA-pozitivnog vaskulitisa (101). Slične promjene N-glikozilacije IgG-a (manje sijalinizirani i galaktozilirani IgG glikani) dokazane su u krvi pacijenata s perifernim autoimunim neurološkim bolestima kao što su Lambert-Eatonov mijastenični sindrom i mijastenia gravis (102), Guillain-Barréov sindrom (103) i kronična upalna demijelinizirajuća polineuropatija (104). Primjerice, pacijenti s Guillain-Barréovim

sindromom imaju sniženu galaktozilaciju u odnosu na kontrolnu skupinu, a nakon liječenja teži oblik bolesti i dulji oporavak imali su bolesnici s nižom sijalinizacijom i galaktozilacijom serumskog IgG-a. Potencijalna terapijska svrha pokazana je u optičkom neuromijelitisu jer se deglikozilacijom autoantitijela na akvaporin 4 smanjuje njihov CDC i ADCC učinak *ex vivo* i *in vivo* na mišjem modelu (105).

1.7. Likvorska dijagnostika u slučaju sumnje na demijelinizacijsku bolest SŽS-a

Kako su promjene sastava likvora odraz upalnih zbivanja u SŽS-u, likvorska dijagnostika rutinski se provodi radi dokazivanja kriterija diseminacije bolesti u vremenu (2) te u slučaju atipičnog očitovanja i isključivanja zaraznih i drugih upalnih bolesti koje oponašaju MS (106).

Intratekalna upala i patogena intratekalna aktivacija plazma-stanica laboratorijski se dokazuje citološkom analizom likvora, kvantitativnom evaluacijom intratekalne sinteze imunoglobulina, detekcijom OIgG-a te antitijela specifičnih za neurotropne viruse, odnosno izračunom indeksa antitijela (ASI).

Normalno u likvoru nalazimo do pet stanica / μ L, limfocita i monocita u omjeru 2 : 1 ili 3 : 1 (107). U polovice osoba s MS-om broj stanica u likvoru povišen je do 50 stanica / μ L, pretežno mononukleara (108). Tipične promjene u MS-su jesu nalaz intratekalne sinteze imunoglobulina (109). Imunoglobulini u likvoru mogu biti povišeni zbog promijenjene propusnosti KMB-a, intratekalne sinteze imunoglobulina zbog upalnog procesa ili kombinacije dvaju navedenih mehanizama (110). Stoga se u likvoru kvantitativno mjere imunoglobulini i albumin, kao biljezi funkcije KMB-a, i uspoređuju s koncentracijama u serumu. Pritom treba imati umu kako su matematičke procjene intratekalne sinteze IgG-a manje osjetljive, tj. intratekalna sinteza pozitivna je u 60 % osoba s MS-om, u odnosu na kvalitativnu detekciju OIgG-a izoelektričnim fokusiranjem (109) koji su zbog visoke dijagnostičke osjetljivosti od čak 95 % (111) i prediktivne vrijednosti za konverziju CIS-a u MS (omjer vjerojatnosti 2,18 s 95-postotnim intervalom pouzdanosti (95 % CI) od 1,71 – 2,77) uključeni kao jedan od kriterija za postavljanje dijagnoze MS-a (2). Metodološki, detekcija OIgG-a ima nekoliko nedostataka jer zahtijeva visoko iskustvo stručnjaka koji interpretira rezultat, zatim vizualna detekcija vrpce i duže vrijeme provođenja analize (110). Također, pozitivan nalaz OIgG-a može se naći i u osoba s drugim neurološkim bolestima (111–113) te se stoga OIgG-i ne smatraju specifičnim biljgom MS-a.

U intratekalnu sintezu IgG-a kod osoba s MS-om uključena su antitijela na široki panel neurotropnih virusa, a najčešće antitijela na morbile (M), rubelu (R) i varicella zoster (V) viruse, što nazivamo MRZ reakcijom (114,115). Smatra se kako antitijela specifična za virus nisu izravno uključena u patogenezu MS-a, već su posljedica nespecifične aktivacije memorijskih limfocita B zbog intratekalne upale. Pozitivna MRZ reakcija specifičan je biljeg MS-a (specifičnost od 97,48 %, 95 % CI: 96 – 98,4 %) (116).

U procesu demijelinizacije i progresiji MS-a sudjeluju urođene imunosne stanice mikroglije kao rezidentni makrofagi SŽS-a i aktivirani makrofagi koji infiltriraju SŽS. Hitotriozidaza je biljeg aktivacije stanica mikroglije (117) i povezana je s kliničkim i/ili radiološkim biljezima aktivnosti MS-a: prediktivni je biljeg aktivnosti bolesti (118), korelira sa slobodnim lakim lancima neurofilamenata kao biljegom neurodegeneracije (119) i statusom relapsa (120).

2. OBRAZLOŽENJE TEME I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

MS je autoimuna demijelinizirajuća bolest SŽS-a koju karakteriziraju upala, demijelinizacija i degenerativne promjene. Glavno su obilježje bolesti brojne lezije koje su posljedica oštećenja mijelinske ovojnice neurona, što dovodi do znatne onesposobljenosti bolesnika. Karakteristično je heterogenoga kliničkog očitovanja, nepoznatog tijeka i neizvjesne prognoze. MS je višekomponentna bolest koja je rezultat međudjelovanja genskih, imunskih i okolišnih čimbenika. Limfociti B kao humoralna komponenta stečenoga imunskog sustava sudjeluju u patogenezi i održavanju lezija tijekom bolesti. Diferencijacijom limfocita B u plazma-stanice dolazi do sinteze antitijela usmjerenih na različite antigene neurona i oligodendrocita. Intratekalna oligoklonska ekspanzija plazma-stanica u MS-u podržava ozljedu SŽS-a i povezana je s aktivnom demijelinizacijom. Patogena intratekalna aktivacija plazma-stanica laboratorijski se dokazuje povišenim brojem stanica, intratekalnom sintezom IgG-a, nalazom OIGG-a te MRZ reakcijom. Oligoklonski IgG-i dokazani su kod većine osoba s MS-om i smatraju se obilježjem MS-a, ali nisu specifičan biljeg jer se mogu detektirati i u drugim neurološkim bolestima. Struktura N-glikana na konzerviranom asparaginu 297 u svakoj od CH2 domena Fc regije IgG-a izravno utječe na njegove efektorske funkcije. U upali se obrasci N-glikozilacije IgG-a mijenjaju i moduliraju proupalne ili protuupalne efektorske funkcije što se potencijalno odražava na status i aktivnost MS-a. Predloženo istraživanje uloge IgG-a u aktivaciji i modulaciji imunskog odgovora ovisno o obrascu N-glikozilacije važno je za razumijevanje patofizioloških mehanizama upale u MS-u. Utvrđivanje obrasca N-glikozilacije koji ovisi o stupnju osnovne bolesti omogućila bi pravodoban i individualiziran klinički pristup osobama s MS-om s ciljem smanjenja napredovanja bolesti i razvoja neurološke onesposobljenosti.

Hipoteza je ovog istraživanja da je N-glikozilacija IgG-a promijenjena u likvoru i serumu osoba s multiplom sklerozom.

Kako se promjene N-glikozilacije ispituju u odnosu na pacijente sa sumnjom na demijelinizacijsku bolest, a koji nisu zadovoljili kriterije za postavljanje dijagnoze MS-a, predloženo istraživanje neće precijeniti karakteristike dijagnostičke točnosti biljega.

Likvor je materijal koji najbolje odražava patofiziološke procese u SŽS-u te će istraživanje doprinijeti razumijevanju aktivacije i modulacije upalnog odgovora u MS-u. Za tu svrhu prvi će se put koristiti tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti koja omogućuje ukupnu analizu glikana, svih tipova imunoglobulina G, s vrlo visokom osjetljivošću. Dosad nema

studija o povezanosti obrasca N-glikozilacije s MRZ reakcijom kao biljekom najviše specifičnosti za MS i aktivnosti hitotriozidaze kao prognostičkim laboratorijskim biljekom. Time je potencijalni doprinos ovog istraživanja pronalazak novih biljega u likvoru i/ili serumu koji mogu pomoći u dijagnostici, klasifikaciji pacijenata, terapiji i predviđanju tijeka bolesti. Također, trenutačno ne postoje pouzdani dijagnostički biljezi MS-a u serumu unatoč kliničkoj potrebi za lakšim praćenjem pacijenata i nastojanju da se izbjegne punkcija likvora. Predloženo istraživanje prvo uspoređuje N-glikozilaciju IgG u likvoru i N-glikozilaciju ukupnih proteina seruma radi pronalaska biljega bolesti u krvi kako bi se potencijalno pacijente moglo poštediti punkcije likvora.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni je cilj ovog istraživanja utvrditi postoje li promjene u N-glikozilaciji IgG-a u likvoru i serumu osoba s MS-om.

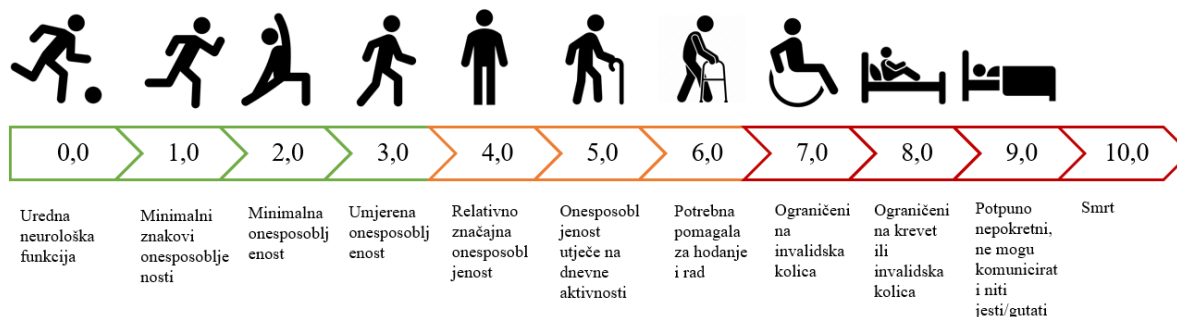
Dodatni ciljevi istraživanja jesu:

1. Ispitati povezanost obrasca N-glikozilacije IgG-a sa standardnim laboratorijskim biljezima upale.
2. Ispitati dijagnostičku točnost obrasca N-glikozilacije kao kriterija za postavljanje dijagnoze MS-a.
3. Ispitati povezanost obrasca N-glikozilacije IgG-a s kliničkim stanjem i aktivnosti bolesti osoba s MS-om mjereno EDSS ljestvicom
4. i brojem relapsa do trenutka lumbalne punkcije.
5. Ispitati postoje li promjene u N-glikozilaciji ukupnih proteina seruma osoba s MS-om.

4. ISPITANICI I METODE

Studija je ustrojena kao presječno istraživanje koje je uključilo pacijente sa sumnjom na demijelinizacijsku bolest SŽS-a iz Klinike za neurologiju Kliničkoga bolničkog centra Zagreb. U sklopu standardnih dijagnostičkih postupaka ispitanicima je prikupljen likvor dobiven lumbalnom punkcijom i izvađena krv za potrebe standardne laboratorijske dijagnostičke obrade. Temeljem McDonaldovih kriterija iz 2017. godine ispitanici su kategorizirani u skupinu osoba s MS-om: RRMS, PPMS i CIS te kontrolnu skupinu s ostalim neurološkim i demijelizirajućim bolestima.

Prikupljene su kliničke informacije o dijagnozi, broju relapsa, statusu onesposobljenosti bodovanom prema *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) ljestvici (Slika 9), broju lezija SŽS-a te prisutnosti gadolinij-imbibirajuće lezije na magnetskoj rezonanciji.



Slika 9. Status neurološke onesposobljenosti *Expanded Disability Status Scale* (EDSS).

Ovisno o opterećenju lezijama, ispitanici su razvrstani u skupinu s < 9 ili skupinu s ≥ 9 hiperintenzivnih lezija snimljenim u T2 ili FLAIR sekvencijama, koje su posljedica demijelinizacijskog oštećenja. Lezije se smatraju aktivnima ako je detektirana barem jedna hiperintenzivna lezija u T1 sekvenciji nakon primjene intravenskog kontrasta gadolinija, tzv. gadolinij-imbibirajuća lezija.

Istraživanje su odobrila etička povjerenstva Kliničkoga bolničkog centra Zagreb (broj odobrenja 8.1-19/280-3) i Povjerenstvo za etiku eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (broj odobrenja 251-62-03-21-44). Svi su ispitanici dali informirani pristanak za uključenje u studiju. U istraživanju su poštovana etička načela Helsinške deklaracije Svjetskoga medicinskog udruženja.

4.1. Laboratorijske pretrage

Likvor je dobiven lumbalnom punkcijom u aseptičkim uvjetima i prikupljen u sterilni spremnik bez aditiva. Uzorak krvi dobiven venepunkcijom prikupljen je u spremnik s gelom i aktivatorom zgrušavanja te je omogućeno potpuno zgrušavanje uzorka. Uzorci su dostavljeni u laboratorij unutar jednog sata od lumbalne punkcije. Uzorci likvora nakon citološke analize i krvi centrifugirani su 10 minuta pri 2000xg. Supernatanti likvora i serum alikvotirani su i pohranjeni pri -80 °C do analize glikana. Likvor je pohranjen za analizu glikana ako je > 1 mL bilo dostupno za pohranu.

4.1.1. Citološka analiza likvora

Broj leukocita (/μL) određen je mikroskopskim brojenjem stanica nativnog likvora u Fuchs-Rosenthalovoj komorici odmah po zaprimanju uzorka u laboratorij. Broj leukocita > 5 /μL smatra se povišenim brojem stanica u odrasloj populaciji.

4.1.2. Određivanje funkcije krvno-moždane barijere i intratekalne sinteze IgG-a

Albumin i IgG usporedno su u likvoru i serumu izmjereni imunonefelometrijskom metodom na analizatoru Atellica NEPH 630 (Siemens Healthineers, Njemačka). Izračunani su kvocijenti albumina (Alb) i IgG-a u likvoru i serumu:

$$Q_{Alb} (*10^{-3}) = \frac{[Alb \text{ u likvoru (mg/L)}]}{[Alb \text{ u serumu (g/L)}]}$$

$$Q_{IgG} (*10^{-3}) = \frac{[IgG \text{ u likvoru (mg/L)}]}{[IgG \text{ u serumu (g/L)}]}$$

Postotak intratekalne sinteze IgG-a izračunan je prema formuli:

$$LIM \text{ IgG} = \left(0,93 * \sqrt{Q_{Alb}^2} \right) - 1,7$$

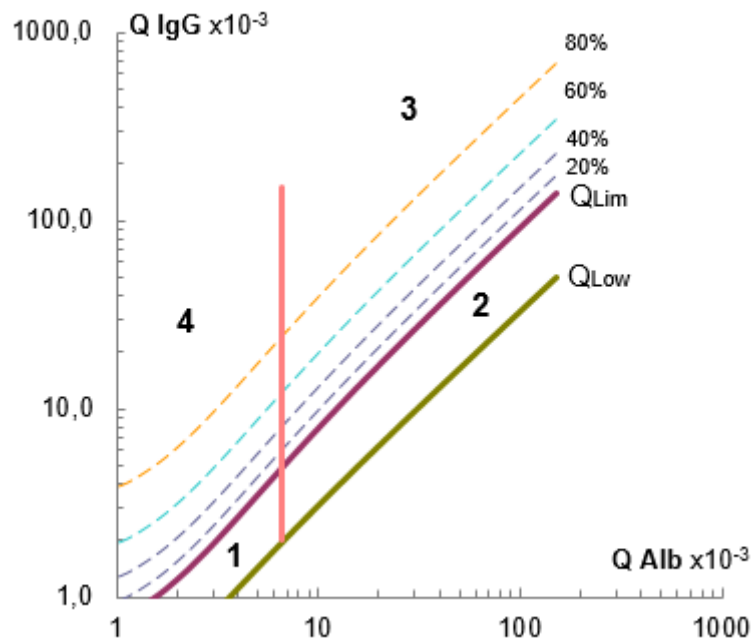
$$ITS \text{ IgG} (\%) = \left(1 - \frac{LIM \text{ IgG}}{Q_{IgG}} \right) * 100$$

Funkcija KMB-a procijenjena je primjenom računskog modela prema Reiberu: tip 1 – normalna funkcija barijere, tip 2 – disfunkcija KMB-a, tip 3 – disfunkcija KMB-a i intratekalna sinteza

IgG-a, tip 4 – normalna funkcija KMB-a uz intratekalnu sintezu IgG-a (Slika 10). Granična vrijednost QAlb-a ovisna je o godinama prema formuli:

$$QAlb_{\text{granična vrijednost}} (*10^{-3}) = 4 + \frac{\text{godine}}{15}$$

Ispitanici s tipom 1 i 4 kategorizirani su u skupinu s funkcionalnim KMB-om, a s tipom 2 i 3 u skupinu s disfunkcionalnim KMB-om.



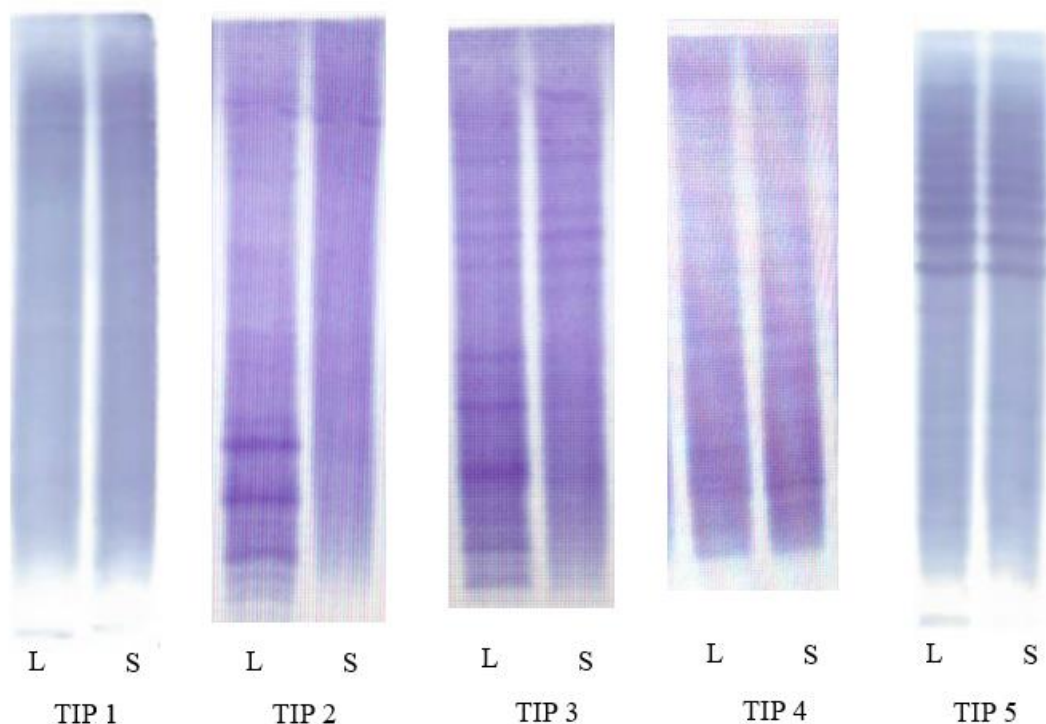
Slika 10. Procjena funkcije krvno-moždane barijere i intratekalne sinteze imunoglobulina G. Ljubičasta linija (QLim) označava gornju granicu QIgG iznad koje se pretpostavlja prisutnost intratekalne sinteze IgG-a, a zelena linija (QLow) označava donju granicu QIgG-a. Iscrtkane linije označavaju hiperbolične funkcije za postotak intratekalne sinteze IgG-a (20, 40, 60 i 80 %). Primijenjena granična vrijednost QAlb-a za evaluaciju funkcionalnosti barijere ovisi o starosti ispitanika, a na slici je prikazana granična vrijednost (crvena okomita linija) koja se primjenjuje za ispitanika starog 40 godina. Linije razdvajaju četiri tipa prema kojima se funkcija KMB-a i intratekalna sinteza IgG-a ovisno o vrijednostima QIgG-a i Qalb-a interpretiraju kao: tip 1 – normalna funkcija barijere, tip 2 – disfunkcija KMB-a, tip 3 – disfunkcija KMB-a i intratekalna sinteza IgG-a, tip 4 – normalna funkcija KMB-a uz intratekalnu sintezu IgG-a. Preuzeto i prilagođeno prema: Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood

cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. Clin Chim Acta. 1987;163:319-28. (121)

4.1.3. Određivanje oligoklonskih IgG traka

Oligoklonske IgG trake detektirane su poluautomatiziranom metodom izoelektričnog fokusiranja u agaroznom gelu u pH području od 3 do 9 (Hydrasys Focusing 2, Sebia, Francuska). Amfoterni proteini uzoraka likvora i seruma razrijeđenih na 20 mg/L IgG-a migriraju prema katodi ili anodi ovisno o skupnom naboju i zaustavljaju se u svojoj izoelektričnoj točki pI, tj. pH području u kojem je ukupni naboj jednak nuli zbog čega postaju elektroforetski nepokretni. Time se postiže visoka razlučivost metode. Slijedi imunofiksacija IgG-a u gelu korištenjem IgG-antiseruma obilježenog peroksidazom čime se u gelu stvaraju imunokompleksi. Nakon ispiranja nevezanih proteina nastali se kompleksi vizualiziraju TTF bojom koja je supstrat za enzim.

Trake su interpretirane prema konsenzusu kao: tip 1 – normalan nalaz, tip 2 – oligoklonske trake samo u likvoru, tip 3 – oligoklonske trake u likvoru, a neke i u serumu, tip 4 – identične trake u likvoru i serumu, i tip 5 – monoklonske trake u likvoru i serumu (Slika 11) (108). Ispitanici s tipovima 2 i 3 imaju pozitivne oligoklonske trake ako su prisutne barem dvije vrpce vidljive samo u likvoru.



Slika 11. Interpretacija oligoklonskih imunoglobulina G. TIP 1: Normalan nalaz; TIP 2: Oligoklonske IgG vrpce samo u likvoru; TIP 3: Oligoklonske IgG vrpce u likvoru, a neke i u serumu; TIP 4: Iduentične IgG vrpce u likvoru i serumu; TIP 5: Iduentične IgG vrpce u likvoru i serumu monoklonskog tipa. L, likvor; S, serum.

4.1.4. Analiza indeksa specifičnih antitijela na viruse

Ispitanicima s pozitivnim oligoklonskim trakama određeni su indeksi specifičnih antitijela (ASI) na morbile, rubelu, varicella zoster virus i herpes simpleks 1 i 2 viruse, poznata kao MRZH reakcija. Titar za virus specifičnih antitijela usporedno je u likvoru i serumu određen enzimskim imunotestom (ELISA) (Euroimmun, Njemačka). Izračunan je omjer titra u likvoru i serumu:

$$QIgG \text{ (virus specifični)} = \frac{c(\text{likvor}) * a}{c(\text{serum}) * b}$$

a = dilucijski faktor za likvor, b = dilucijski faktor za serum

Izračun za virus specifičnog ASI ovisno o prisutnosti intratekalne sinteze IgG-a jest sljedeći:

a) bez intratekalne sinteze IgG-a

$$ASI = \frac{QIgG \text{ (virus specifični)}}{QIgG}$$

b) u slučaju intratekalne sinteze IgG-a

$$ASI = \frac{QIgG \text{ (virus specifični)}}{LIM \text{ IgG}}$$

ASI > 1,5 smatra se pozitivnim nalazom te su posljedično ispitanici MRZH pozitivni ako imaju barem jedan pozitivan ASI na analizirane viruse.

4.1.5. Aktivnost hitotriozidaze

Količina od 5 µL uzoraka likvora i seruma inkubirana je sa 100 µL 22 µM supstrata 4-metilumbeliferil-β-N,N,N-triacetilhitotriozida u McIlvaineovu puferu tijekom 60 minuta pri 37 °C, pH 5,2. Reakcija je zaustavljena alkalizacijom dodatkom 300 µL 0,2 M glicinskog pufera (glicin-NaOH pH 10,4). Hidrolizirajuća aktivnost hitotriozidaze mjerena je stvaranjem fluorescentnoga umbeliferonskog produkta (Sigma Aldrich, SAD) na spektrofotometru

(Varian Cary Eclipse, Agilent, SAD). Ekscitacijske i emisijske valne duljine bile su 365 i 450 nm, slijedom.

Izračunan je kvocijent aktivnosti hitotriozidaze (QChit) u likvoru i serumu:

$$Q_{\text{Chit}} = \frac{\text{hitotriozidaza u likvoru } (\mu\text{mol/L/h})}{\text{hitotriozidaza u serumu } (\mu\text{mol/L/h})}$$

U slučaju niske aktivnosti hitotriozidaze u serumu ($< 10 \mu\text{mol/L/h}$) nije rađen izračun QChit uz pretpostavku da ispitak ima polimorfizam (DD homozigot) koji rezultira deficitarnom aktivnosti hitotriozidaze.

4.2. Analiza glikana

Prije pripreme uzoraka za analizu N-glikana randomizacijom su uzorcima seruma i likvora dodijeljene pozicije na pločici s 96 jažica. Na svakoj pločici randomizacijom su dodijeljene i pozicije standardu u šesteroplikatu i slijepoj probi. Uzorci seruma i likvora nakon otapanja prvo su vorteksirani, a serumi su dodatno centrifugirani tri minute pri 12 045xg.

4.2.1. Izolacija imunoglobulina G iz seruma i likvora

IgG je izoliran iz uzoraka seruma i likvora afinitetnom kromatografijom korištenjem monolitne Protein G pločice s 96 jažica (BIA Separations, Slovenija). Za izolaciju korišteno je 200 μL seruma koji su potom razrijeđeni 7x fosfatnim puferom (PBS), i 1-2 mL nerazrijeđenog likvora. Tako pripremljeni uzorci filtrirani su kroz filtarsku pločicu AcroPrep wwPTFE s veličinom pora od 0,45 μm (Pall Corporation, SAD). Filtrirani uzorci prebačeni su u pločicu s imobiliziranim proteinom G i odmah isprani PBS-om. Elucija IgG-a s pločice postignuta je dodatkom 100 mM formijata (Merck, Njemačka) uz trenutačnu neutralizaciju u 1 M amonij-bikarbonatu (Across Organics, SAD).

Alikvoti od 300 μL IgG eluata sušeni su preko noći i pohranjeni pri $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ do postupka deglikozilacije. Usporedno je alikvotirano po 10 μL uzoraka seruma koji su pohranjeni pri $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ do postupka deglikozilacije ukupnih serumskih proteina.

4.2.2. Deglikozilacija N-glikana IgG eluata

Deglikozilaciji je prethodila denaturacija IgG-a eluata koja je postignuta dodatkom 30 μL 1,33-postotnog natrijeva dodecil-sulfata (SDS) i inkubacijom pri 65 °C tijekom 10 minuta. Uzorci su zatim 30 minuta hlađeni na sobnu temperaturu. Višak SDS-a potom je neutraliziran dodatkom 10 μL 4-postotnog Igepal-CA630 (Sigma-Aldrich, SAD).

Deglikozilacija je provedena dodatkom enzima PNGaze F (Promega, SAD) (10 μL smjese 5x PBS-a i 0,12 μL PNGaze F) i inkubacijom pri 37 °C tijekom 18 sati.

4.2.3. Deglikozilacija N-glikana ukupnih proteina seruma

U prethodno alikvotiranim uzorcima seruma provedena je denaturacija proteina dodatkom 20 μL 2-postotnog SDS-a i inkubacijom pri 65 °C tijekom 10 minuta. Uzorci su zatim 30 minuta hlađeni na sobnu temperaturu. Višak SDS-a potom je neutraliziran dodatkom 10 μL 4-postotnog Igepal-CA630 (Sigma-Aldrich, SAD).

Deglikozilacija je provedena dodatkom enzima PNGaze F (Promega, SAD) (10 μL smjese 5x PBS-a i 0,12 μL PNGaze F) i inkubacijom pri 37 °C tijekom 18 sati.

4.2.4. Obilježavanje N-glikana IgG-a

N-glikani IgG-a izoliranog iz likvora i seruma obilježeni su prokainamid-hidrokloridom (ProA). Prvo je uzorku dodano 25 μL smjese prokainamida koja sadrži 4,32 mg of ProA (Sigma-Aldrich) otopljenog u utopini ledene octene kiseline (Honeywell, Charlotte, NC, SAD) i dimetil-sulfoksida (DMSO) (Sigma-Aldrich) (30 : 70), i inkubirano jedan sat pri 65 °C. Zatim je svakom uzorku dodano 25 μL reducirajućeg reagensa koji sadrži 4,48 mg 2-pikolin-borana (J&K Scientific, Peking, Kina) otopljenog u otopini ledene octene kiseline i DMSO (30 : 70) i inkubirano dodatnih 1,5 sati pri 65 °C. Uzorci su tada tijekom 30 minuta ohlađeni na sobnu temperaturu.

Pročišćavanje viška reagensa od obilježenih N-glikanskih struktura provedeno je ekstrakcijom na čvrstu fazu (engl. *solid phase extraction*, SPE). Za to je korištena AcroPrep wwPTFE pločica obujma 1 mL s veličinom pora od 0,2 μm (Pall). Svakom uzorku dodano je 700 μL hladnog 100-postotnog acetonitrila (ACN) (Panreac) te je nakon miješanja sav volumen prenesen na wwPTFE pločicu i inkubiran dvije minute kako bi se osiguralo vezanje N-glikana na čvrstu fazu. Višak reagensa ispran je 3x s 200 μL hladnoga 96-postotnog ACN-a. Obilježeni N-glikani

eluirani su ultračistom vodom (prikupljane tri frakcije po 90 μ L) i pohranjeni pri -20 $^{\circ}$ C do analize.

4.2.5. Obilježavanje N-glikana proteina seruma

N-glikani ukupnih proteina seruma obilježeni su 2-aminobenzamidom (2-AB). Uzorcima je dodano 25 μ L smjese 2-AB koja sadrži 0,48 mg 2-AB i 1,12 2-pikolin-borana otopljenih u 25 μ L octene kiseline i DMSO (30 : 70) (Sigma-Aldrich) te su inkubirani dva sata pri 65 $^{\circ}$ C. Uzorci su tada tijekom 30 minuta ohlađeni na sobnu temperaturu.

Daljnji postupak pročišćavanja obilježenih N-glikana ukupnih proteina seruma jednak je postupku za N-glikane IgG eluata iz likvora i seruma. Pročišćavanje viška reagensa od obilježenih N-glikanskih struktura provedeno je SPE-om. Za to je korištena AcroPrep wwPTFE pločica volumena 1 mL s veličinom pora od 0,2 μ m. Svakom uzorku dodano je 700 μ L hladnog 100-postotnog ACN-a te je nakon miješanja sav volumen prenesen na wwPTFE pločicu i inkubiran dvije minute kako bi se osiguralo vezanje N-glikana na čvrstu fazu. Višak reagensa ispran je 3x s 200 μ L hladnoga 96-postotnog ACN-a. Obilježeni N-glikani eluirani su ultračistom vodom (prikupljane tri frakcije po 90 μ L) i pohranjeni pri -20 $^{\circ}$ C do analize.

4.2.6. Analiza N-glikana HILIC-UPLC metodom

Fluorescentno obilježeni N-glikani razdvojeni su metodom visokoučinkovite tekućinske kromatografije temeljene na hidrofilnim interakcijama (engl. *hydrophilic interaction ultra performance liquid chromatography*, HILIC-UPLC) na uređaju Waters Acquity UPLC (Waters, SAD). Uzorci su ohlađeni na 10 $^{\circ}$ C prije injektiranja, dok je temperatura separacije bila 60 $^{\circ}$ C za N-glikane IgG-a likvora i seruma, a 25 $^{\circ}$ C za N-glikane ukupnih proteina seruma. Obilježeni N-glikani razdvojeni su na Waters Glycan Ethylene Bridged Hybrid (BEH) amidnoj kromatografskoj koloni. Kao otapalo A korišten je 100 mM amonij-format (pH 4,4), a ACN kao otapalo B. Za ProA obilježene N-glikane razdvajanje je provedeno s linearnim gradijentom od 25 – 35 % otapala A, protoka 0,40 mL/min tijekom 29 minuta. Ekscitacijske i emisijske valne duljine bile su 310 i 370 nm. Razdvajanje N-glikana obilježenih s 2-AB postignuto je separacijskom metodom u linearnom gradijentu 30 – 47 % otapala A, protoka 0,56 mL/min, tijekom 25 minuta. Ekscitacijske i emisijske valne duljine bile su 250 i 428 nm.

4.2.7. Izračun deriviranih svojstava

Nakon integracije dobivenih kromatograma količina N-glikana svakog vrška (engl. *peak*) izražena je kao postotak ukupne integrirane površine. Primjer kromatograma za N-glikane IgG-a prikazan je na slici 12. Za N-glikane IgG-a likvora i seruma kromatogram je podijeljen na 24 kromatografska vrška koji odgovaraju glikanskim strukturama opisanim u tablici 1.

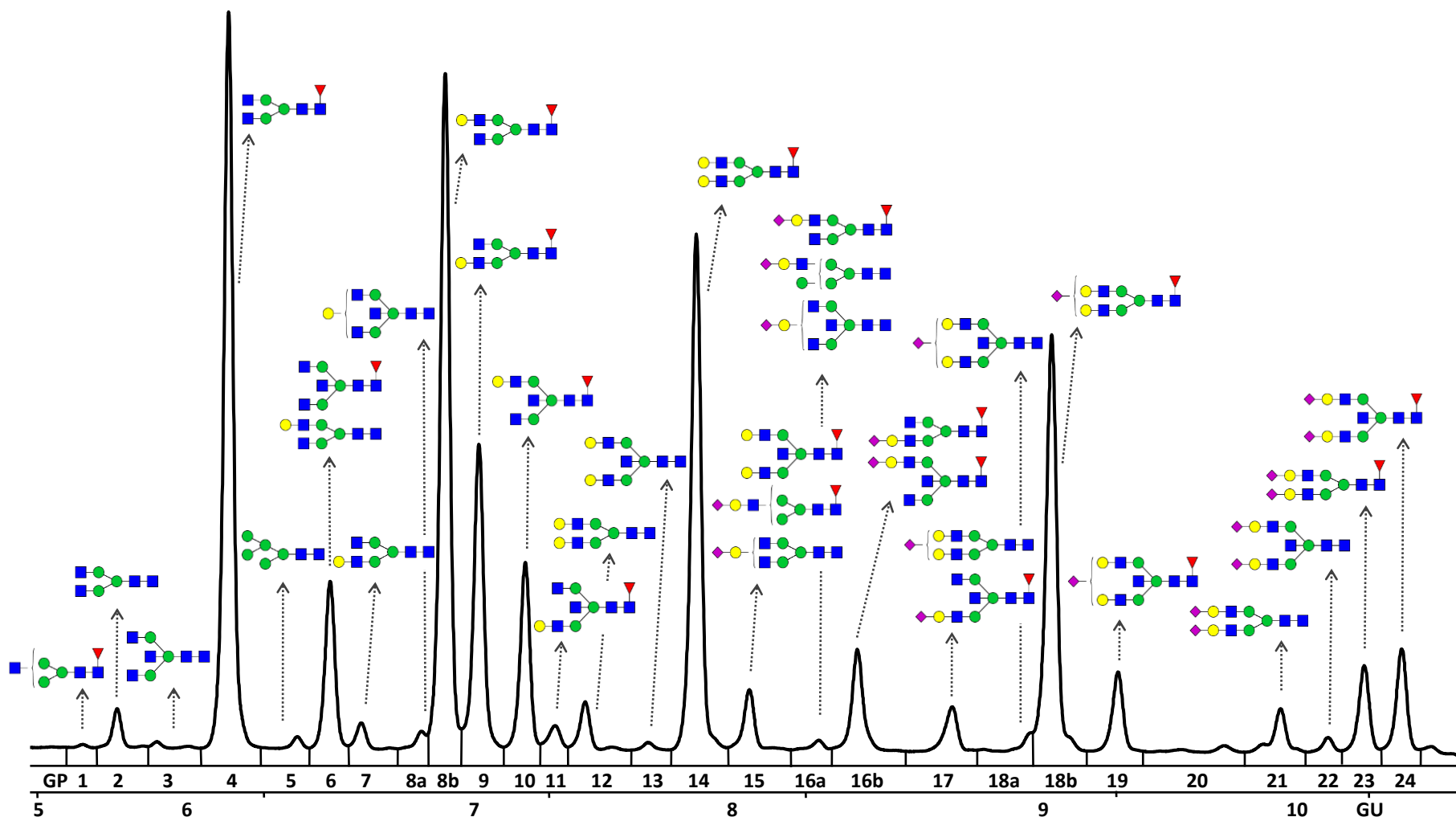
Tablica 1. N-glikanske strukture imunoglobulina G likvora i seruma.

Redoslijed elucije	Sažeta struktura	Detaljni opis strukture	Struktura
GP1	FA1	Sržno fukoziliran, monoantennarni	
GP2	A2	Biantennarni	
GP3	A2B	Biantennarni s račvajućim GlcNAc	
GP4	FA2	Sržno fukoziliran, biantennarni	
GP5	M5	Oligomanozni	
GP6	FA2B	Sržno fukoziliran, biantennarni s račvajućim GlcNAc	

GP7	A2G1	Monogalaktoziliran, biantenarni	
GP8	FA2[6]G1	Sržno fukozilirani i monogalaktoziliran α 1-6 ruci, biantenarni	
GP9	FA2[3]G1	Sržno fukozilirani i monogalaktoziliran α 1-3 ruci, biantenarni	
GP10	FA2[6]BG1	Sržno fukozilirani i monogalaktoziliran α 1-6 ruci, biantenarni s račvajučim GlcNAc-om	
GP11	FA2[3]BG1	Sržno fukozilirani i monogalaktoziliran na α 1-3 ruci, biantenarni s račvajučim GlcNAc-om	
GP12	A2G2	Digalaktoziliran, biantenarni	
GP13	A2BG2	Digalaktoziliran, biantenarni s račvajučim GlcNAc-om	
GP14	FA2G2	Sržno fukozilirani i digalaktoziliran, biantenarni	
GP15	FA2BG2	Sržno fukozilirani i digalaktoziliran, biantenarni s račvajučim GlcNAc-om	

GP16	FA2G1S1	Sržno fukoziliran, monosijaliziran i galaktoziliran, biantenaran	
GP17	A2G2S1	Monosijaliziran, digalaktoziliran i biantenaran	
GP18	FA2G2S1	Sržno fukoziliran, monosijaliziran, digalaktoziliran i biantenaran	
GP19	FA2BG2S1	Sržno fukoziliran, monosijaliziran, digalaktoziliran i biantenaran s račvajućim GlcNAc-om	
GP20	Struktura nije definirana		
GP21	A2G2S2	Disijaliniziran i digalaktoziliran, biantenaran	
GP22	A2BG2S2	Disijaliniziran i digalaktoziliran, biantenaran s račvajućim GlcNAc-om	
GP23	FA2G2S2	Sržno fukoziliran, disijaliniziran i digalaktoziliran, biantenaran	
GP24	FA2BG2S2	Sržno fukoziliran, disijaliniziran i digalaktoziliran, biantenaran s račvajućim GlcNAc-om	

DrawGlycan aplikacija korištena je za crtanje glikanskih struktura (57).



Slika 12. Primjer kromatograma za N-glikane IgG-a. Izdvajaju se 24 kromatografska vrška koji odgovaraju N-glikanskim strukturama opisanim u tablici 1. Preuzeto i prilagođeno iz: Gudelj I, Salo PP, Trbojević-Akmačić I, Albers M, Primorac D, Perola M, Lauc G. Low galactosylation of IgG associates with higher risk for future diagnosis of rheumatoid arthritis during 10 years of follow-up. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864:2034-39. (100)

Dodatno je izračunano šest deriviranih svojstava ovisno o prisutnosti specifičnih šećernih ostataka. Svojstvo agalaktozilacije (G0) karakterizirano je svim kompleksnim strukturama bez galaktoze, monogalaktozilacija (G1) uključuje sve kompleksne N-glikane galaktozilirane na jednoj anteni, dok su digalaktozilirani kompleksni N-glikani (G2) galaktozilirani na obje antene. Sve kompleksne strukture koje sadrže b-GlcNAc obuhvaćene su deriviranim svojstvom račvućeg GlcNAc-a (B), strukture koje sadrže fukozu deriviranim svojstvom fukozilacije (F), a strukture koje sadrže sijalinsku kiselinu u derivirano svojstvo sijalinizacije (S).

$$G0 = GP1 + GP2 + GP3 + GP4 + GP6$$

$$G1 = GP7 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11$$

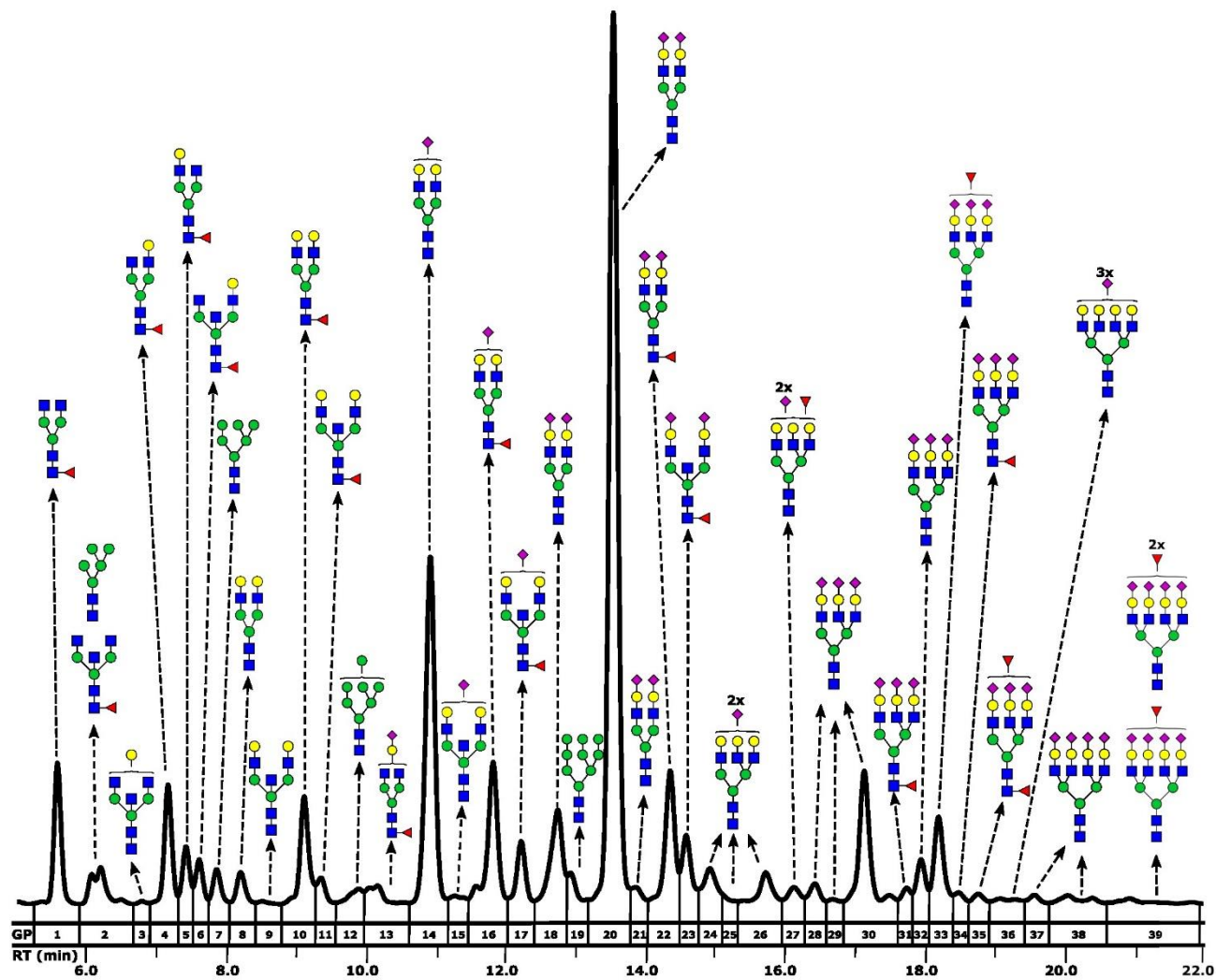
$$G2 = GP12 + GP13 + GP14 + GP15$$

$$B = GP3 + GP6 + GP10 + GP11 + GP13 + GP15 + GP19 + GP22 + GP24$$

$$F = GP1 + GP4 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP14 + GP15 + GP16 + GP18 \\ + GP19 + GP20 + GP23 + GP24$$

$$S = GP16 + GP17 + GP18 + GP19 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23 + GP24.$$

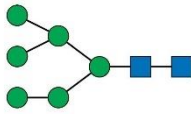
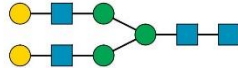
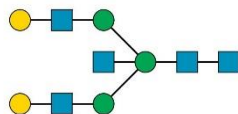
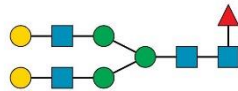
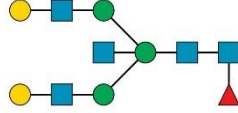
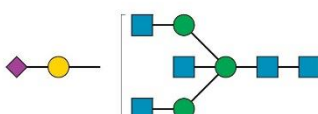
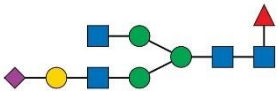
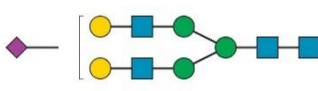
Za N-glikane izolirane s ukupnih serumskih proteina dobivena su 39 izdvojena kromatografska vrška koji odgovaraju glikanskim strukturama opisanim u tablici 2. Primjer kromatograma za N-glikane ukupnih proteina seruma prikazan je na slici 13.



Slika 13. Primjer kromatograma za N-glikane ukupnih proteina seruma. Izdvajaju se 39 kromatogramskih vršaka koji odgovaraju N-glikanskim strukturama opisanim u tablici 2.

Tablica 2. N-glikanske strukture ukupnih serumskih proteina.

Redoslijed elucije	Sažeta struktura	Detaljni opis strukture	Struktura
GP1	FA2	Sržno fukozilirani, biantenarni	
GP2	M5; FA2B	Oligomanozni; Sržno fukozilirani, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om	
GP3	A2BG1	Monogalaktozilirani, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om	
GP4	FA2[6]G1	Sržno fukozilirani, monogalaktozilirani na α 1-6 ruci, biantenarni	
GP5	FA2[3]G1	Sržno fukozilirani, monogalaktozilirani na α 1-3 ruci, biantenarni	
GP6	FA2[6]BG1	Sržno fukozilirani, monogalaktozilirani na α 1-6 ruci, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om	

GP7	M6	Oligomanozni	
GP8	A2G2	Digalaktozilirani, biantenarni	
GP9	A2BG2	Digalaktozilirani, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om	
GP10	FA2G2	Sržno fukozilirani, digalaktozilirani, biantenarni	
GP11	FA2BG2	Sržno fukozilirani, digalaktozilirani, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om	
GP12	A2BG1S1	Monosijalinizirani i monogalaktozilirani, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om	
GP13	FA2[3]G1S1	Sržno fukozilirani, monosijalinizirani i monogalaktozilirani na α 1-3 ruci, biantenarni	
GP14	A2G2S1	Monosijalinizirani, digalaktozilirani, biantenarni	

GP15	A2BG2S1	Monosijalinizirani, digalaktozilirani, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om	
GP16	FA2G2S1	Sržno fukozilirani, monosijalinizirani i monogalaktozilirani, biantenarni	
GP17	FA2BG2S1	Sržno fukozilirani, monosijalinizirani, digalaktozilirani, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om	
GP18	A2G2S2	Disijalinizirani, digalaktozilirani, biantenarni	
GP19	M9	Oligomanozni	
GP20	A2G2S2	Disijalinizirani, digalaktozilirani, biantenarni	
GP21	A2BG2S2	Disijalinizirani, digalaktozilirani, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om	
GP22	FA2G2S2	Sržno fukozilirani, disijalinizirani digalaktozilirani, biantenarni	

GP23	FA2BG2S2	Sržno fukozilirani, disijalinizirani digalaktozilirani, biantenarni s račvajućim GlcNAc-om	
GP24	A3G3S2	Disijalinizirani, trigalaktozilirani, triantenarni	
GP25	A3BG3S2	Disijalinizirani, trigalaktozilirani, triantenarni s račvajućim GlcNAc-om	
GP26	A3G3S2	Disijalinizirani, trigalaktozilirani, triantenarni	
GP27	A3G3S3	Trisijalinizirani, trigalaktozilirani, triantenarni	
GP28	A3G3S3	Trisijalinizirani, trigalaktozilirani, triantenarni	
GP29	FA3G3S3	Sržno fukozilirani, trisijalinizirani, trigalaktozilirani, triantenarni	

GP30	A3G3S3	Trisijalinizirani, trigalaktozilirani, triantenarni	
GP31	FA3G3S3	Sržno fukozilirani, trisijalinizirani, trigalaktozilirani, triantenarni	
GP32	A3F1G3S3	Antenarno fukozilirani, trisijalinizirani, trigalaktozilirani, triantenarni	
GP33	A4G4S3	Trisijalinizirani, tetragalaktozilirani, tetraantenarni	
GP34	A4G4S3	Trisijalinizirani, tetragalaktozilirani, tetraantenarni	
GP35	A4F1G3S3	Antenarno monofukozilirani, trisijalinizirani triganaktozilirani, tetraantenarni	

GP36	A4G4S4	Tetrasijalinizirani, tetragalaktozilirani, tetraantenarni	
GP37	A4G4S4	Tetrasijalinizirani, tetragalaktozilirani, tetraantenarni	
GP38	A4G4S4	Tetrasijalinizirani, tetragalaktozilirani, tetraantenarni	
GP39	A4F1G4S4; A4F2G4S4	Antenarno mono-/bi- fukozilirani, tetrasijalinizirani, tetragalaktozilirani, tetraantenarni	

DrawGlycan aplikacija korištena je za crtanje glikanskih struktura (57).

Dodatno je izračunano 16 deriviranih svojstava ovisno o prisutnosti specifičnih šećernih ostataka kako slijedi:

monoantenarni i biantenarni glikani (LB) = GP1 + GP2 + GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP13 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17 + GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23

triantenarni i tetraantenarni glikani (HB) = GP24 + GP25 + GP26 + GP27 + GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP33 + GP34 + GP35 + GP36 + GP37 + GP38 + GP39

agalaktozilacija (G0) = GP1 + GP2

monogalaktozilacija (G1) = GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP13

digalaktozilacija (G2) = GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17 + GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23

trigalaktozilacija (G3) = GP24 + GP25 + GP26 + GP27 + GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP33 + GP34 + GP35

tetragalaktozilacija (G4) = GP36 + GP37 + GP38 + GP39

neutralni glikani (S0) = GP1 + GP2 + GP3 + GP4 + GP5 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11

monosijalinizacija (S1) = GP13 + GP14 + GP15 + GP16 + GP17

disijalinizacija (S2) = GP18 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23 + GP24 + GP25 + GP26 + GP27

trisijalinizacija (S3) = GP28 + GP29 + GP30 + GP31 + GP32 + GP33 + GP34 + GP35 + GP36

tetrasijalinizacija (S4) = GP37 + GP38 + GP39

račvujući GlcNAc (B) = GP2 + GP3 + GP6 + GP9 + GP11 + GP15 + GP17 + GP23

antenarna fukozilacija (AF) = GP27 + GP33 + GP35 + GP39

sržna fukozilacija (CF) = GP1 + GP2 + GP4 + GP5 + GP6 + GP10 + GP11 + GP13 + GP16 + GP17 + GP22 + GP23 + GP31 + GP34 + GP35

visokomanozne strukture (HM) = GP7 + GP12 + GP19.

4.3. Statistička analiza

Kako bi se mjerenjima uklonile eksperimentalne varijacije, izvršena je normalizacija i korekcija serije na UHPLC podacima glikana. Kako bi mjerenja u uzorcima bila usporediva, izvršena je normalizacija prema ukupnoj površini. Prije korekcije serije, normalizirana mjerenja glikana bila su logaritamski transformirana zbog desne zakrivljenosti njihovih raspodjela i multiplikativne prirode učinaka serije. Korekcija serije provedena je na logaritmiranim vrijednostima mjerenja koristeći pyComBat (122).

Shapiro-Wilkov test korišten je za testiranje normalnosti raspodjele podataka. Ovisno o normalnosti podatci su predočeni sa srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom (SD) ili

medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR). Godine su prikazane medijanom i rasponom (minimum do maksimum). Kvalitativni podaci navedeni su u postotcima. Testiranja korelacija provedena su Pearsonovim testom. Razlike između kvantitativnih podataka ispitane su Mann-Whitneyjevim testom ili t-testom za nezavisne uzorke ovisno o normalnosti podataka. Razlike između kvalitativnih podataka ispitane su χ^2 ili Fisherovim egzaktnim testom.

Analize povezanosti za glikomska mjerenja provedene su korištenjem regresijskog modela s dobi, spolom, pušačkim statusom i upotrebom hormonske terapije uključenim kao dodatne kovarijate. Stopa lažnih otkrića kontrolirana je Benjamini-Hochbergovim postupkom. Dijagnostičke značajke N-glikanskih mjerenja ispitane su ROC krivuljom (engl. *receiver operating curve analysis*) nakon provedene multivarijantne logističke regresije koristeći mjerenja pojedinačnih glikanskih struktura i deriviranih svojstava. Prikazana su mjere dijagnostičkih značajki testa uz 95-postotne intervale pouzdanosti (engl. *95 % confidence interval, 95 % CI*).

Za statističku analizu kliničkih i laboratorijskih podataka korišteni su statistički programi MedCalc Statistical Software verzije 20.215 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgija) i GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, SAD) te programski jezik Python (verzija 3.9.1) i Jupyter Notebooks (123) za glikomska mjerenja.

5. REZULTATI

5.1. Kliničke karakteristike ispitanika

Ukupno je u studiju uključeno 308 ispitanika sa sumnjom na demijelinizacijsku bolest SŽS-a. Nakon standardne dijagnostičke obrade, kod 190 (61 %) ispitanika zadovoljeni su McDonaldovi kriteriji diseminacije bolesti u vremenu i prostoru za dijagnozu MS-a, dok je kod preostalih 118 (39 %) dijagnoza MS-a isključena te su svrstani u kontrolnu skupinu. Likvor je bio dostupan za analizu glikana kod 224 ispitanika (146 osoba s MS-om i 78 kontrola).

Osobe s MS-om i kontrolni ispitanici nisu se razlikovali prema spolu ($P = 0,615$). Osobe s MS-om u prosjeku su bile mlađe, 36 godina (17 – 74 godina), u odnosu na kontrolne ispitanike, 43 godine (17 – 75 godina) ($P < 0,001$).

Većina osoba s MS-om imale su relapsno-remitentni oblik MS-a ($N = 165$, 87 %). Kod samo 11 (5,8 %) osoba s MS-om postavljena je dijagnoza PPMS-a, dok je pri prvoj neurološkoj obradi 14 (7,4 %) ispitanika imalo CIS. U kontrolnoj skupini 57 (48 %) ispitanika imalo je drugu demijelinizacijsku bolest, a 61 (52 %) drugu neurološku bolest (tablica 3.).

Tablica 3. Demografski podaci osoba s MS-om i kontrolnih ispitanika

	Osobe s multiplom sklerozom (N = 190)	Kontrole (N = 118)	P
Spol, broj žena (%)	128 (67 %)	83 (70 %)	0,615
Starost, medijan (min – max)	36 (17– 74)	43 (17 – 75)	< 0,001
Dijagnoza, N (%)	RRMS = 165 (87 %) PPMS = 11 (6 %) CIS = 14 (7 %)	ODB = 57 (48 %) ONB = 61 (52 %)	np

Podebljano označene P vrijednosti statistički su važne ($P < 0,05$). RRMS, relapsno-remitentna multipla skleroza; PPMS, primarno-progresivna multipla skleroza, CIS, klinički izolirani sindrom; ODB, ostale demijelinizirajuće bolesti; ONB, ostale neurološke bolesti; np, nije primjenjivo. (124)

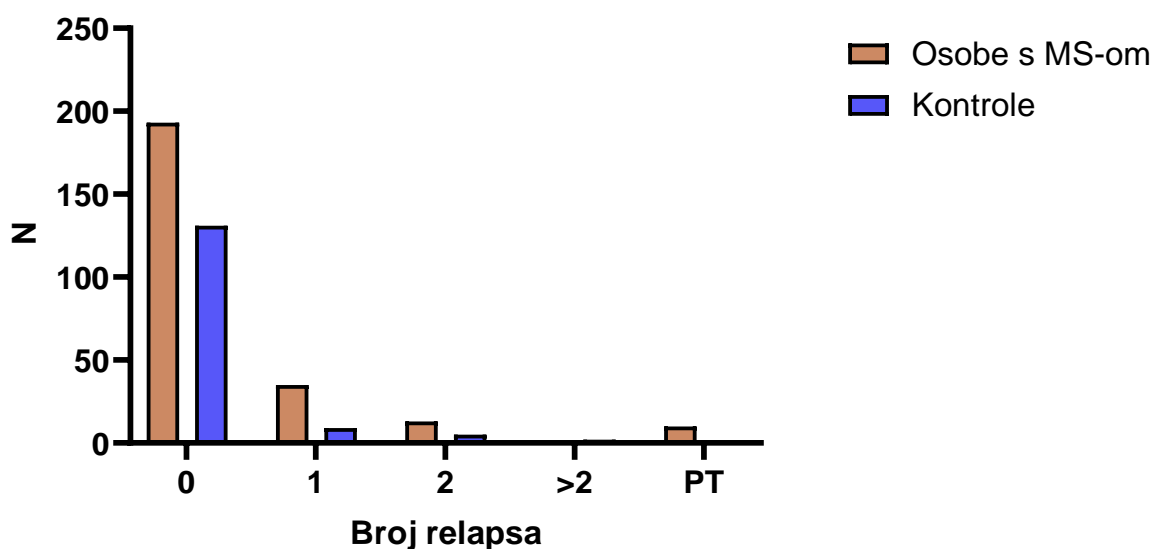
Očekivano, osobe s MS-om imale su neuroradiološki više aktivnu bolest u smislu većeg opterećenja lezijama ($P < 0,001$) i više gadolinij-imbibirajućih lezija ($P = 0,004$) (Tablica 4).

Tablica 4. Nalazi neuroradiološke obrade ispitanika.

	Osobe s multiplom sklerozom	Kontrole	P
MR lezije, broj ispitanika s ≥ 9 T2/FLAIR lezija (%)	124 (65 %)	34 (29 %)	< 0,001
Gadolinij-imbibirajuće lezije, n/ukupan broj ispitanika s primijenjenim kontrastom (%)	85/167 (51 %)	12/110 (11 %)	0,004

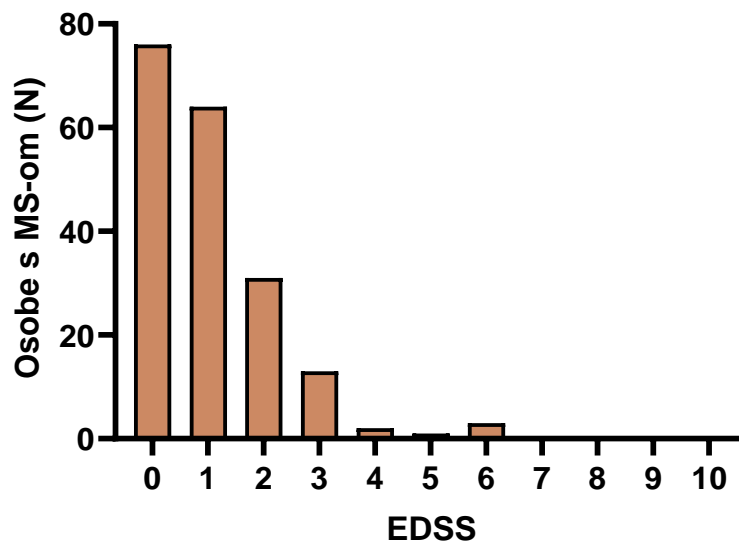
Podobljano označene P vrijednosti statistički su važne ($P < 0,05$). MR, magnetska rezonancija. (124)

Prema anamnestičkim podacima osobe s MS-om češće su prije nastanka neurološkog deficita zbog kojeg se provodila diferencijalno-dijagnostička obrada imale najmanje jednu epizodu bolesti koja se može definirati kao relaps ili sporu progresiju bolesti u odnosu na kontrole ($P < 0,0001$) (slika 14.).



Slika 14. Anamnestički broj epizoda bolesti koja se može definirati kao relaps ili spora progresija bolesti (PT) prije nastanka neurološkog deficita zbog kojeg se provodila diferencijalno-dijagnostička obrada. MS, multipla skleroza.

Medijan EDSS-a svih osoba s MS-om bio je 1 (IQR 0 – 2). Većina osoba s MS-om (74 %) nije imala neurološku onesposobljenost ili je imala minimalne znakove onesposobljenosti (EDSS < 2), 16 % imalo je minimalnu onesposobljenost (EDSS = 2), 7,8 % umjerenu onesposobljenost (EDSS = 3), dok je 3,1 % preostalih osoba s MS-om imalo relativno znatnu onesposobljenost do stanja u kojima su im bila potrebna pomagala za hodanje i rad (EDSS od 4 do 6) (slika 15.).



Slika 15. Raspodjela neurološke onesposobljenosti osoba s multiplom sklerozom mjerena *Expanded Disability Status Score* (EDSS) ljestvicom.

Osobe s MS-om imale su znatno više vrijednosti biljega intratekalne upale, ali se QAlb ($P = 0,767$) kao ni funkcija KMB-a ($P = 0,118$) nisu razlikovali u odnosu na kontrole (tablica 5.).

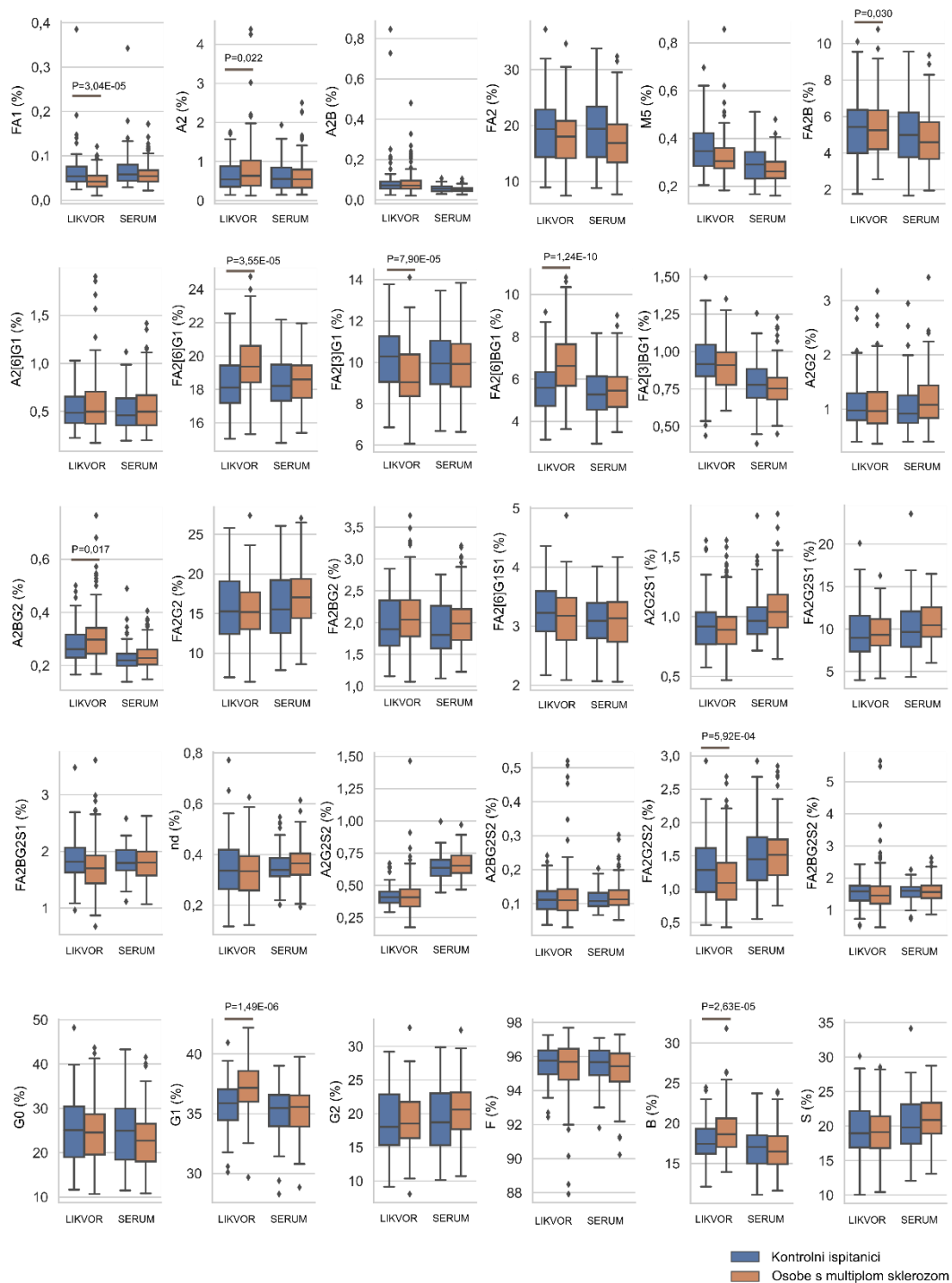
Tablica 5. Rezultati neurobiokemijske obrade ispitanika.

	Osobe s multiplom sklerozom	Kontrole	P
Broj stanica u likvoru, / μ L, medijan (IQR)	4 (2 – 7)	2 (1 – 3)	< 0,001
Albumin – kvocijent L/S, medijan (IQR)	5,3 (4,4 – 6,7)	5,3 (4,1 – 6,8)	0,767
IgG – kvocijent L/S, medijan (IQR)	3,9 (2,9 – 5,6)	2,5 (1,9 – 3,3)	< 0,001
Intratekalna sinteza IgG, %, medijan (IQR)	0 (0 – 32)	0 (0 – 0)	< 0,001
Hitotriozidaza – kvocijent L/S, medijan (IQR)	0,19 (0,1 – 0,37)	0,09 (0,06 – 0,14)	< 0,001
Funkcija KMB-a, broj ispitanika s disfunkcionalnim KMB-om (%)	60 (32)	27 (23)	0,118
Tip oligoklonskih IgG vrpci, n (%)			
1	11 (6)	90 (76)	
2	152 (80)	14 (12)	
3	25 (13)	5 (4)	
4	2 (1)	8 (7)	
5	0 (0)	1 (0)	
Pozitivan nalaz OIgG-a, n (%)	177 (93)	19 (16)	< 0,0001
Pozitivna MRZH reakcija (n, ukupan broj)	90/177	np	np

Podebljano označene P vrijednosti statistički su važne ($P < 0,05$). IgG, imunoglobulin G; IQR, interkvartilni raspon; KMB, krvno-moždana barijera; OIgG, oligoklonske IgG vrpce; MRZH reakcija, indeks specifičnih antitijela na morbile, rubelu, varicella zoster i herpes simpleks viruse tipa 1 i 2; np, nije primjenjivo. (124)

5.2. Razlike u N-glikozilaciji IgG-a između osoba s MS-om i kontrolnih ispitanika

Intratekalne promjene N-glikozilacije IgG-a izoliranog iz likvora u odnosu na sadržaj pojedinih N-glikana IgG-a iz seruma prikazane su na slici 16.



Slika 16. Intratekalne promjene N-glikozilacije IgG-a likvora u odnosu na sadržaj pojedinih N-glikana IgG-a iz seruma. Prikazane su statistički važne P vrijednosti ($P < 0,05$). Stopa lažnih otkrića kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom metodom.

Razlike u N-glikanskim strukturama i deriviranim svojstvima N-glikana serumskog IgG-a (tablica 6.) između osoba s MS-om i kontrolnih ispitanika samo su nominalne. U MS-u su povišene afukozilirane i digalaktozilirane strukture (A2BG2, A2G2S1, A2G2S2), fukozilirane strukture s bGlcNAc-om (FA2[6]BG1, FA2BG2) i afukozilirana monogalaktozilirana biantenarna struktura (A2G1). Ukupno su IgG-i seruma manje fukozilirani ($P = 0,023$). P-vrijednost nije statistički važna nakon korekcije prema Benjamini-Hochbergovoj metodi.

Tablica 6. Razlike između N-glikana serumskog imunoglobulina G i deriviranih svojstava u osoba s multiplom sklerozom u odnosu na kontrolne ispitanike.

N-glikan	Struktura	Učinak	P	P*
GP1	FA1	-0,0401	0,3894	0,5657
GP2	A2	0,0786	0,2073	0,4595
GP3	A2B	-0,0241	0,3486	0,5657
GP4	FA2	-0,0367	0,2188	0,4595
GP5	M5	-0,0282	0,1930	0,4595
GP6	FA2B	0,0250	0,4149	0,5657
GP7	A2G1	0,0940	0,0427	0,2012
GP8	FA2[6]G1	-0,0038	0,6980	0,7333
GP9	FA2[3]G1	-0,0138	0,3962	0,5657
GP10	FA2[6]BG1	0,0441	0,0359	0,2012
GP11	FA2[3]BG1	0,0257	0,2298	0,4595
GP12	A2G2	0,0981	0,0537	0,2012
GP13	A2BG2	0,0565	0,0151	0,2012
GP14	FA2G2	0,0297	0,1886	0,4595

GP15	FA2BG2	0,0478	0,0346	0,2012
GP16	FA2G1S1	-0,0087	0,6241	0,7201
GP17	A2G2S1	0,0468	0,0493	0,2012
GP18	FA2G2S1	0,0226	0,3843	0,5657
GP19	FA2BG2S1	-0,0087	0,6537	0,7263
GP20	Struktura nije definirana	0,0224	0,3175	0,5657
GP21	A2G2S2	0,0384	0,0308	0,2012
GP22	A2BG2S2	0,0297	0,3815	0,5657
GP23	FA2G2S2	-0,0200	0,5411	0,6764
GP24	FA2BG2S2	-0,0076	0,7585	0,7585
Derivirano svojstvo		Učinak	P	P*
G0		-0,0196	0,4782	0,6237
G1		0,0025	0,7088	0,7333
G2		0,0364	0,0917	0,3055
F		-0,0035	0,0236	0,2012
B		0,0246	0,1155	0,3464
S		0,0092	0,6054	0,7201

Podobljano označene P vrijednosti statistički su važne ($P < 0.05$). *Stopa lažnih otkrića kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom metodom.

Međutim, znatne razlike između skupina postoje u N-glikomu IgG-a iz likvora. Znatno različita svojstva jesu veća prisutnost bGlcNAc ($P = 2,63 \times 10^{-5}$) i monogalaktoziliranih N-glikana ($P = 1,49 \times 10^{-6}$). Specifične strukture koje sadrže bGlcNAc, a koje su povišene u osoba s MS-om jesu FA2B, FA2[6]BG1 i A2BG2, kao i monogalaktozilirane strukture FA2[6]G1 i FA2[6]BG1. N-glikanska struktura A2 također je povišena, dok su fukožilirane strukture FA1, FA2G2S2 i FA2[3]G1 snižene u osoba s MS-om (Tablica 7).

Tablica 7. Razlike između N-glikana i deriviranih svojstava imunoglobulina G iz likvora osoba s multiplom sklerozom u odnosu na kontrolne ispitanike.

N-glikan	Struktura	Učinak	P	P*
GP1	FA1	-0,2821	4,05 x 10⁻⁶	3,04 x 10⁻⁵
GP2	A2	0,2274	0,0066	0,0219
GP3	A2B	-0,0120	0,8691	0,8990
GP4	FA2	-0,0038	0,9140	0,9140
GP5	M5	-0,0701	0,0298	0,0762
GP6	FA2B	0,0972	0,0101	0,0303
GP7	A2G1	0,1057	0,0669	0,1434
GP8	FA2[6]G1	0,0608	5,92 x 10⁻⁶	3,55 x 10⁻⁵
GP9	FA2[3]G1	-0,0944	1,58 x 10⁻⁵	7,90 x 10⁻⁵
GP10	FA2[6]BG1	0,2067	4,14 x 10⁻¹²	1,24 x 10⁻¹⁰
GP11	FA2[3]BG1	0,0092	0,7157	0,7669
GP12	A2G2	-0,0226	0,7076	0,7669
GP13	A2BG2	0,1070	0,0046	0,0172
GP14	FA2G2	-0,0509	0,0834	0,1668
GP15	FA2BG2	0,0349	0,2101	0,3001
GP16	FA2G1S1	-0,0303	0,1561	0,2602
GP17	A2G2S1	-0,0268	0,4189	0,5027
GP18	FA2G2S1	-0,0428	0,1995	0,2993
GP19	FA2BG2S1	-0,0737	0,0330	0,0762
GP20	Struktura nije definirana	-0,0628	0,1427	0,2518
GP21	A2G2S2	-0,0202	0,5828	0,6725
GP22	A2BG2S2	0,0628	0,3327	0,4492

GP23	FA2G2S2	-0,1897	0,0001	0,0006
GP24	FA2BG2S2	-0,0455	0,3444	0,4492
Derivirano svojstvo		Učinak	P	P*
G0		0,0275	0,4056	0,5027
G1		0,0442	9,95 x 10⁻⁸	1,49 x 10⁻⁶
G2		-0,0367	0,1875	0,2960
F		-0,0034	0,1105	0,2073
B		0,0940	2,63 x 10⁻⁶	2,63 x 10⁻⁵
S		-0,0529	0,0330	0,0762

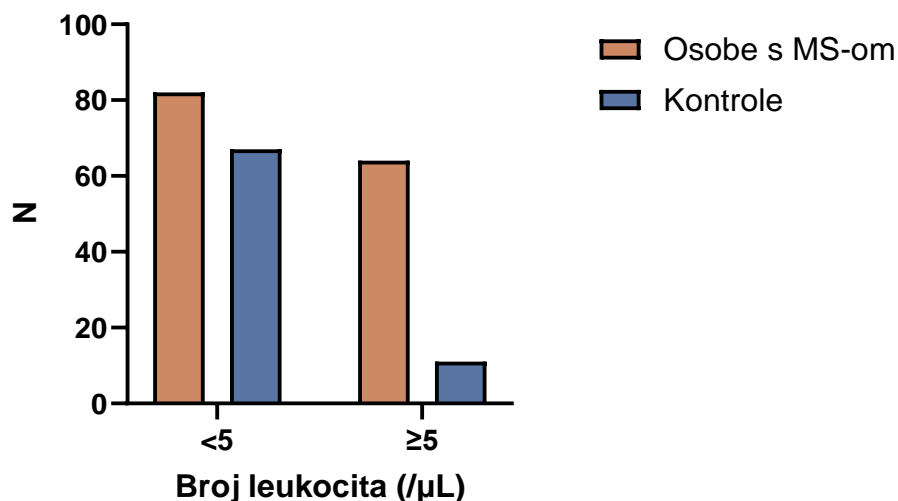
Podebljano označene P vrijednosti statistički su važne ($P < 0,05$). *Stopa lažnih otkrića kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom metodom. (124)

5.3. N-glikozilacija imunoglobulina G i biljezi intratekalne upale

Kako prethodno nisu dokazane razlike u N-glikozilaciji IgG-a seruma između osoba s MS-om i kontrolnih ispitanika, ispitana je povezanost N-glikozilacije likvorskog IgG-a s biljezima intratekalne upale.

5.3.1. Promjene N-glikozilacije IgG-a likvora u odnosu na ukupan broj stanica likvora

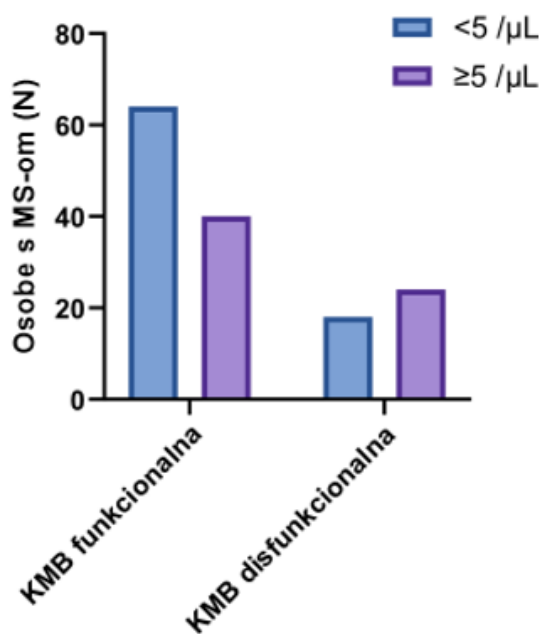
Osobe s MS-om češće imaju povišeni broj leukocita u likvoru ($P < 0,001$) (Slika 17).



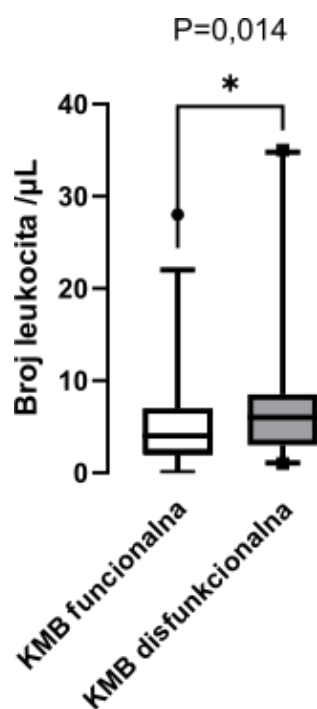
Slika 17. Učestalost povišenog broja leukocita u likvoru kod osoba s multiplom sklerozom (MS) i kontrolnih ispitanika. N, broj ispitanika.

Dodatno je KMB češće disfunkcionalna kod osoba s MS-om s povišenim brojem stanica u odnosu na osobe s MS-om s normalnim brojem stanica ($P = 0,0395$), a broj leukocita u likvoru osoba s MS-om viši je u slučaju disfunkcije KMB-a ($P = 0,014$) (Slika 18).

A)



B)



Slika 18. Osobe s MS-om s disfunkcionalnom krvno-moždanom barijerom (KMB) češće imaju povišene leukocite u likvoru ($P = 0,0395$) (A). Broj leukocita u likvoru osoba s MS-om viši je u slučaju disfunkcije KMB-a ($P = 0,014$) (B).

Dokazane su promjene N-glikana IgG-a iz likvora kod ispitanika s povišenim brojem leukocita u likvoru ($> 5/\mu\text{L}$) povezane s moduliranjem proupalnih efektorskih funkcija IgG-a. N-glikani IgG-a iz likvora ispitanika s povišenim brojem leukocita sadrže više bGlcNAc-a ($P = 0,0180$), a manje su sijalinizirani ($P = 5,4 \times 10^{-4}$) i digalaktozilirani ($P = 5,92 \times 10^{-5}$). Posljedično prevladavaju agalaktozilirane ($P = 0,0023$) i monogalaktozilirane ($P = 0,0084$) strukture. Međutim, u osoba s MS-om razlike u N-glikanima likvorskog IgG-a ovisno o broju stanica nisu toliko izražene. Samo niža digalaktozilacija ($P = 0,0102$) i sijalinizacija ($P = 0,0303$) te viša monogalaktozilacija ($P = 0,0371$) prisutna je u slučaju povišenog broja stanica kod osoba s MS-om. N-glikanske strukture sa sržnom fukozom i bGlcNAc-om (FA2B, FA2[6]BG1) bile su povišene, a digalaktozilirane i monosijalinizirane strukture (A2G2S1 i FA2BG2S1) bile su snižene kod svih ispitanika s povišenim brojem stanica u likvoru. Kod osoba s MS-om promjene u navedenim strukturama nisu bile ovisne o broju stanica u likvoru (Tablica 8).

Tablica 8. Razlike u N-glikanima IgG-a likvora ovisno o broju stanica u likvoru.

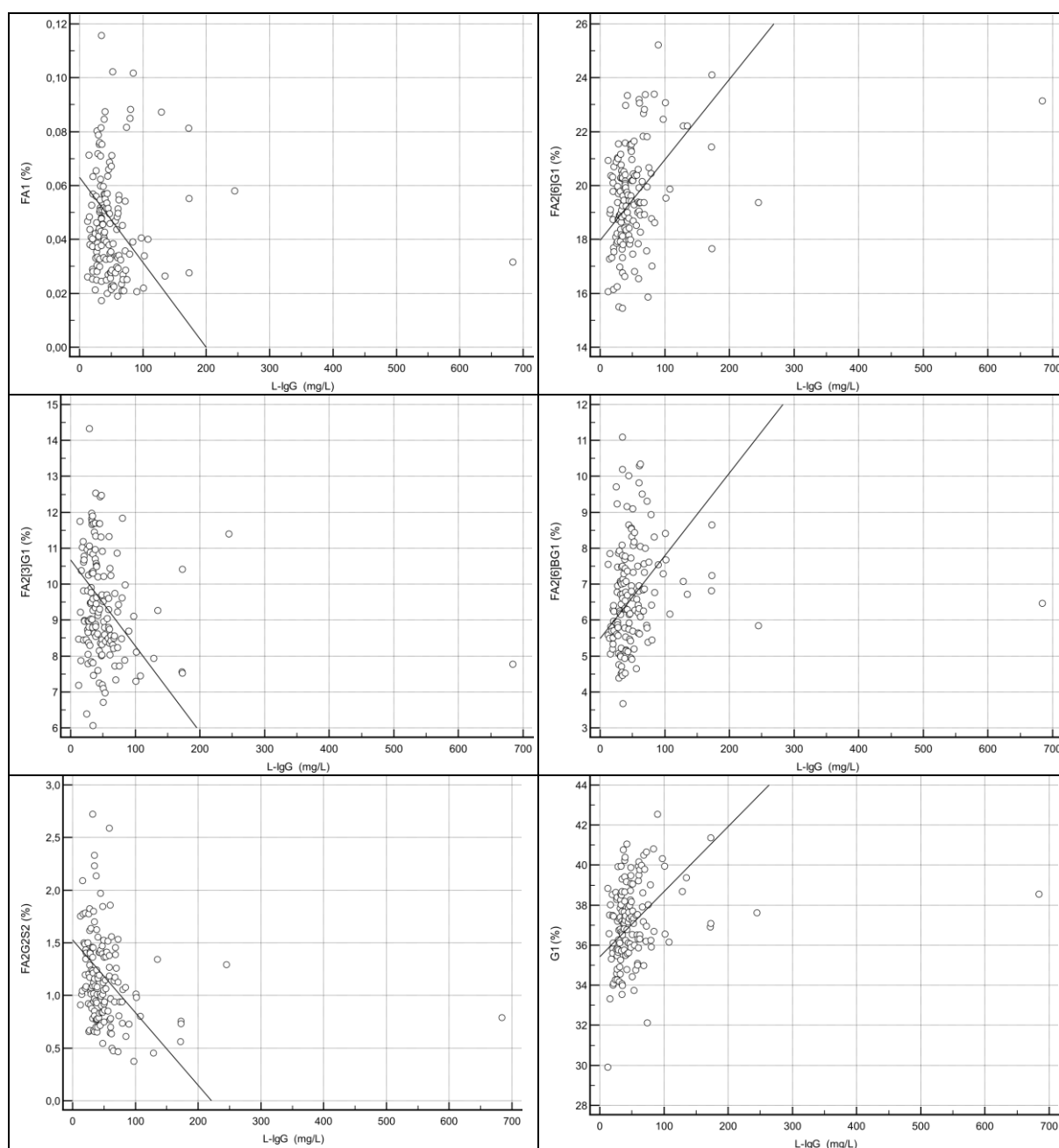
		Svi ispitanici			Osobe s MS-om		
	Struktura	Učinak	P	P*	Učinak	P	P*
GP1	FA1	-0,0813	0,2118	0,3026	-0,0507	0,5031	0,5589
GP2	A2	0,0346	0,6954	0,7451	-0,0373	0,7411	0,7666
GP3	A2B	0,0814	0,2844	0,3677	0,0526	0,5474	0,5865
GP4	FA2	0,1231	0,0007	0,0025	0,1115	0,0112	0,0371
GP5	M5	0,0385	0,2521	0,3438	0,0366	0,3512	0,4391
GP6	FA2B	0,1013	0,0095	0,0180	0,0470	0,3151	0,4110
GP7	A2G1	-0,0591	0,3274	0,3929	-0,1234	0,1084	0,1807
GP8	FA2[6]G1	0,0431	0,0024	0,0071	0,0545	0,0010	0,0102

GP9	FA2[3]G1	-0,0633	0,0061	0,0141	-0,0667	0,0133	0,0371
GP10	FA2[6]BG1	0,1156	0,0004	0,0019	0,0761	0,0314	0,0629
GP11	FA2[3]BG1	-0,0069	0,7968	0,8243	-0,0346	0,2570	0,3505
GP12	A2G2	-0,1851	0,0027	0,0072	-0,1987	0,0093	0,0371
GP13	A2BG2	-0,0233	0,5582	0,6202	-0,0674	0,1640	0,2558
GP14	FA2G2	-0,1406	2,30x10⁻⁶	5,92x10⁻⁵	-0,1176	0,0010	0,0102
GP15	FA2BG2	-0,0584	0,0433	0,0683	-0,0725	0,0382	0,0717
GP16	FA2G1S1	-0,0234	0,2942	0,3677	-0,0182	0,4987	0,5589
GP17	A2G2S1	-0,0805	0,0186	0,0329	-0,0940	0,0288	0,0617
GP18	FA2G2S1	-0,1238	0,0003	0,0017	-0,0948	0,0159	0,0398
GP19	FA2BG2S1	-0,0807	0,0233	0,0389	-0,0819	0,0711	0,1255
GP20	Struktura nije definirana	-0,1410	0,0015	0,0049	-0,1499	0,0050	0,0300
GP21	A2G2S2	-0,1029	0,0070	0,0149	-0,1275	0,0128	0,0371
GP22	A2BG2S2	0,0108	0,8723	0,8723	0,0045	0,9591	0,9591
GP23	FA2G2S2	-0,2296	7,90x10⁻⁶	7,90x10⁻⁵	-0,1772	0,0043	0,0299
GP24	FA2BG2S2	-0,0801	0,1018	0,1527	-0,0735	0,2507	0,3505
Derivirano svojstvo		Učinak	P	P*	Učinak	P	P*
G0		0,1163	0,0005	0,0023	0,0920	0,0235	0,0542
G1		0,0258	0,0034	0,0084	0,0239	0,0136	0,0371
G2		-0,1301	3,95x10⁻⁶	5,92x10⁻⁵	-0,1143	0,0008	0,0102
F		0,0020	0,3664	0,4227	0,0040	0,1705	0,2558
B		0,0551	0,0096	0,0180	0,0220	0,3768	0,4522
S		-0,1006	7,20x10⁻⁵	0,0005	-0,0845	0,0061	0,0303

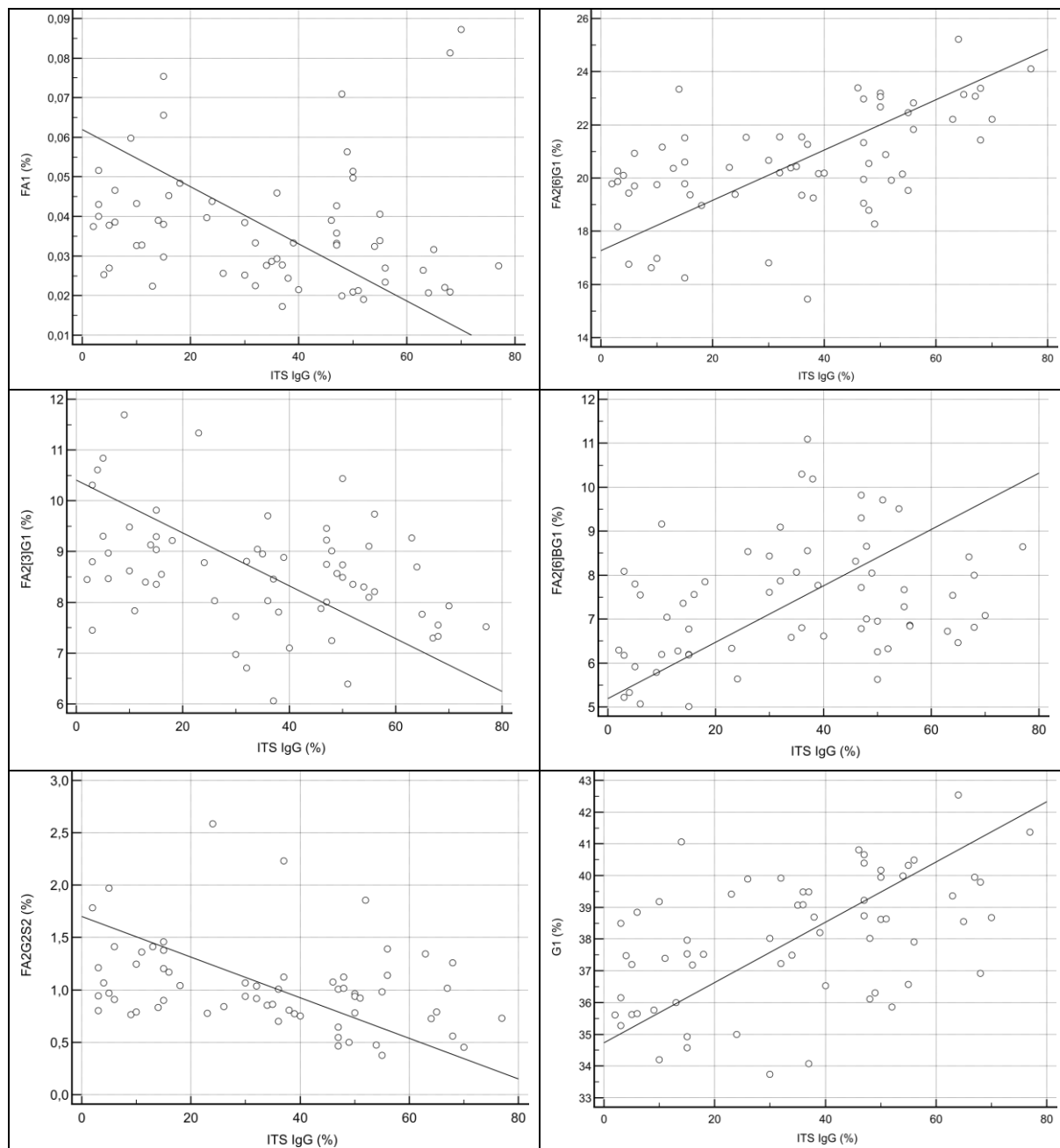
Podobljano označene P vrijednosti statistički su važne ($P < 0,05$). *Stopa lažnih otkrića kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom metodom.

5.3.2. Povezanost N-glikozilacije u osoba s MS-om s koncentracijom IgG-a likvora i postotkom intratekalne sinteze IgG-a

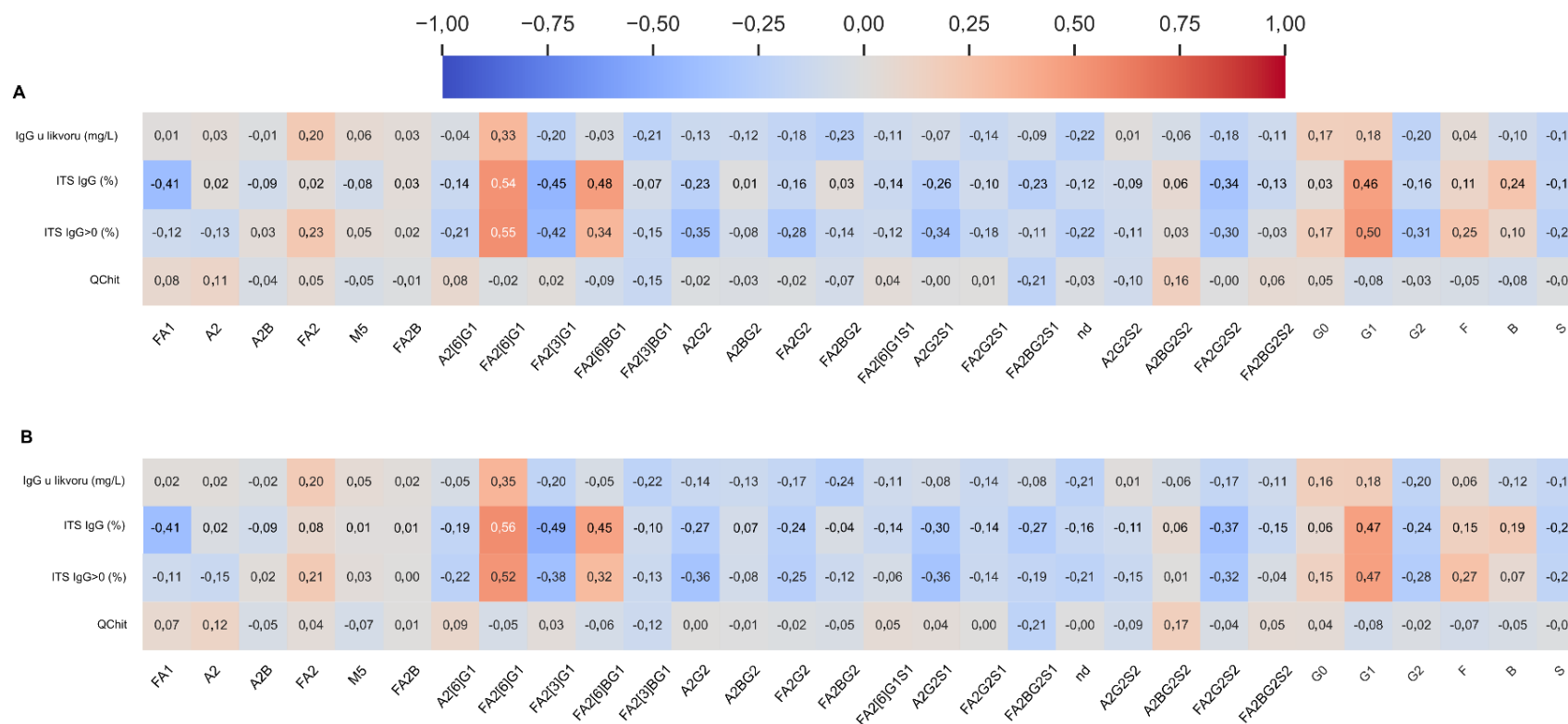
Koncentracija IgG-a u likvoru slabo je korelirala s vrijednostima N-glikana. Međutim, postotak intratekalno sintetiziranih IgG-a jako je korelirao s monogalaktoziliranim strukturama. Pokazane su znatne korelacije između glikanskih struktura FA2[6]G1 ($r = 0,54$, $P < 0,001$), FA2[6]BG1 ($r = 0,48$, $P < 0,001$), FA2[3]G1 ($r = -0,45$, $P < 0,001$), FA1 ($r = -0,41$, $P < 0,001$) i FA2G2S2 ($r = -0,34$, $P < 0,001$) i postotka intratekalne sinteze IgG-a (Slike 19 – 21).



Slika 19. Dijagrami raspšenosti izdvojenih N-glikana i monogalaktoziliranoga deriviranog svojstva (G1) osoba s MS-om u likvoru ovisno o koncentraciji IgG-a likvora (L-IgG).



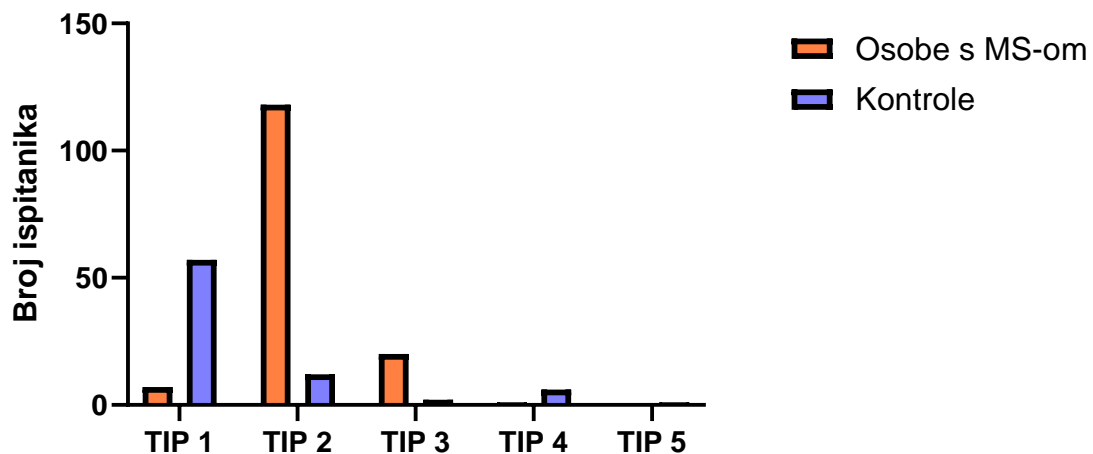
Slika 20. Dijagrami raspšenosti izdvojenih N-glikana i monogalaktoziliranoga deriviranog svojstva (G1) u likvoru osoba s MS-om koji su imali s intratekalnu sintezu IgG-a (ITS IgG).



Slika 21. Korelacije biljega intratekalne upale s N-glikanskim strukturama i deriviranim svojstvima u svim ispitanicima (A) i u osoba s MS-om (B). Vrijednosti u karti jesu koeficijenti korelacije dobiveni Pearsonovim testom. ITS IgG, intratekalna sinteza IgG-a; QChit, kvocijent aktivnosti hitotriozidaze u likvoru i serumu; nd, nije definirano.

5.3.3. Promjene sastava N-glikana ovisno o tipu oligoklonskih vrpca

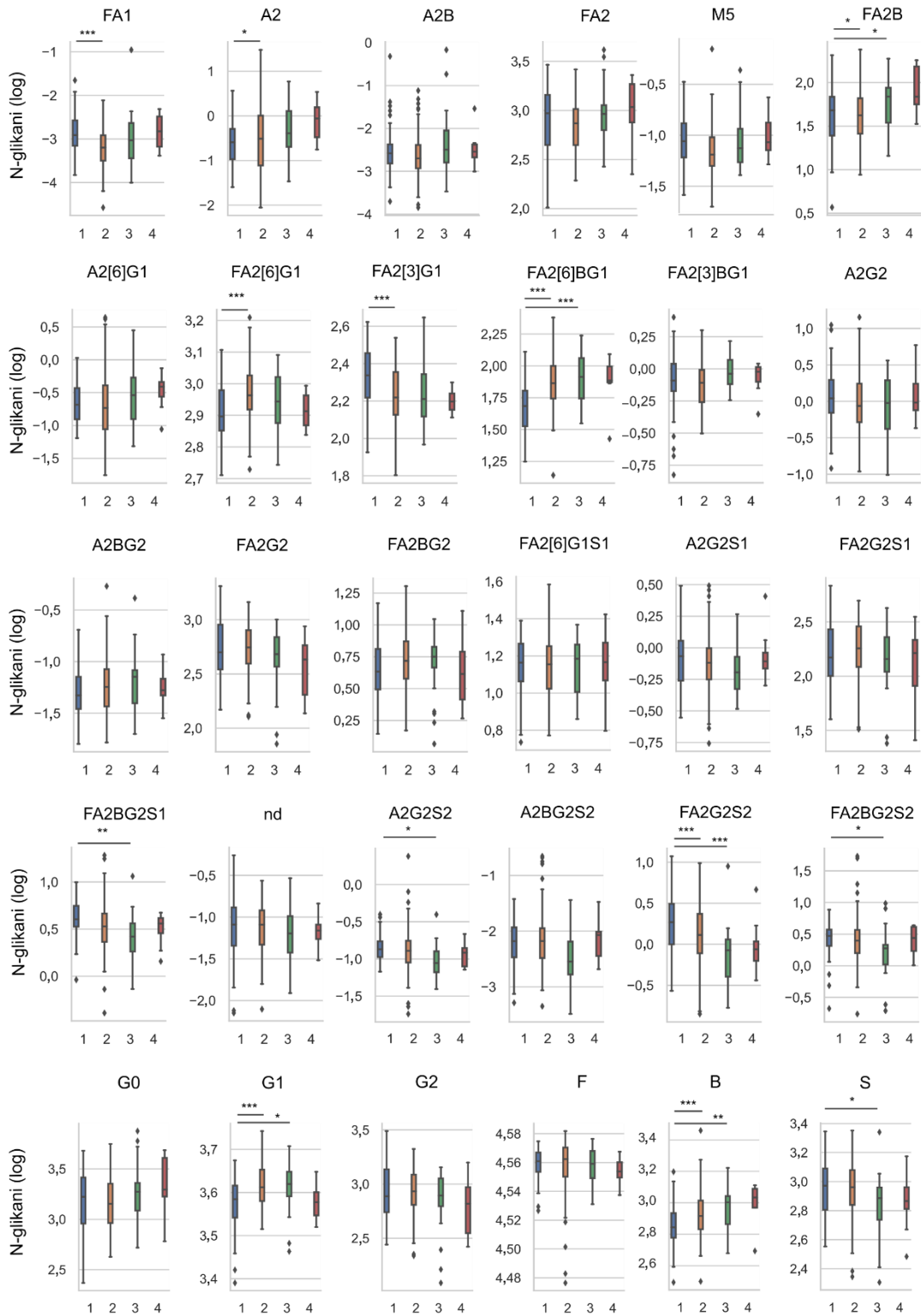
Većina ispitanika (N = 152, 68 %) imala je pozitivan nalaz OIGG-a. Kontrolni ispitanici većinom su imali normalan nalaz (N = 57, 73 %) (Slika 22), dok su osobe s MS-om većinom imale pozitivne OIGG-e (N = 138, 94 %). Iz navedenog, dijagnostička osjetljivost OIGG-a za MS iznosila je 94,52 % (95 % CI: 89,49 – 97,60), a specifičnost 73,08 % (95% CI: 61,84 – 82,50).



Slika 22. Broj osoba s MS-om i kontrolnih ispitanika ovisno o tipu oligoklonskih imunoglobulina G. Tip 1 – normalan nalaz, tip 2 – oligoklonske trake prisutne samo u likvoru, tip 3 – oligoklonske trake prisutne u likvoru, a neke i u serumu, tip 4 – iste oligoklonske trake prisutne u likvoru i serumu (nema intratekalne sinteze), tip 5 – monoklonske trake u likvoru i serumu (nema intratekalne sinteze).

Ispitanici s pozitivnim OIGG-ima imaju veći sadržaj monogalaktoziliranih N-glikana (tip 2 $P = 1,57 \times 10^{-5}$, tip 3 $P = 0,0477$) i N-glikana s bGlcNAc-om (tip 2 $P = 1,67 \times 10^{-5}$, tip 3 $P = 0,0103$) u odnosu na ispitanike bez OIGG-a.

Specifično, sadržaj N-glikanskih struktura A2, FA2B, FA2[6]G1 i FA2[6]BG1 bio je znatno povišen, dok su FA1, FA2[3]G1 i FA2G2S2 strukture bile znatno snižene u ispitanika s tipom 2 OIGG-a. N-glikani IgG-a likvora u ispitanika s tipom 3 OIGG-a bili su manje sijalinizirani ($P = 0,0192$) u usporedbi s ispitanicima s normalnim nalazom. N-glikanske strukture s najvećim sadržajem sijalinskih kiselina (A2G2S2, FA2G2S2, FA2BG2S2 and FA2BG2S1) bile su osobito snižene u ispitanicima s tipom 3 OIGG-a (tablica 9., slika 23.).



Slika 23. Razlike u sadržaju N-glikana ovisno o tipu oligoklonskih traka. Statistički važne razlike prikazane su horizontalnom punom linijom uz naznačenu razinu statističke važnosti: *P

< 0,05, **P ≤ 0,01 i ***P ≤ 0,001. Stopa lažnih otkrića kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom metodom. Tipovi 2, 3 i 4 uspoređivani su s normalnim nalazom (tip 1): tip 1 – normalan nalaz, tip 2 – oligoklonske vrpce prisutne samo u likvoru, tip 3 – oligoklonske vrpce prisutne u likvoru, a neke i u serumu, tip 4 – iste vrpce prisutne u likvoru i serumu (nema intratekalne sinteze).

Tablica 9. Razlike u likvorskim N-glikanima imunoglobulina G i deriviranim svojstvima ovisno o tipu oligoklonskih IgG-a

Glikan	Razlika u odnosu na	Učinak	P	P*
GP1	1-2	-0,2689	9,23 x 10⁻⁵	0,0009
	1-3	-0,0965	0,3583	0,5559
	1-4	-0,0860	0,5911	0,7993
GP2	1-2	0,2402	0,0098	0,0488
	1-3	0,3008	0,0367	0,1109
	1-4	0,2810	0,1992	0,3586
GP3	1-2	-0,0413	0,6059	0,7993
	1-3	0,2565	0,0400	0,1109
	1-4	0,0459	0,8088	0,9210
GP4	1-2	0,0148	0,7096	0,8810
	1-3	0,0862	0,1620	0,3169
	1-4	0,0192	0,8375	0,9305
GP5	1-2	-0,0597	0,0973	0,2246
	1-3	0,0197	0,7244	0,8810
	1-4	0,0034	0,9683	0,9982
GP6	1-2	0,1318	0,0015	0,0111
	1-3	0,1850	0,0040	0,0257
	1-4	0,1827	0,0609	0,1611
GP7	1-2	0,0633	0,3232	0,5183
	1-3	0,1203	0,2270	0,3929

	1-4	0,1104	0,4668	0,6661
GP8	1-2	0,0620	3,31 x 10⁻⁵	0,0004
	1-3	0,0297	0,1923	0,3533
	1-4	0,0137	0,6934	0,8789
GP9	1-2	-0,1082	8,35 x 10⁻⁶	0,0001
	1-3	-0,0880	0,0177	0,0694
	1-4	-0,1351	0,0169	0,0691
GP10	1-2	0,2409	1,69 x 10⁻¹³	1,52 x 10⁻¹¹
	1-3	0,2311	2,25 x 10⁻⁶	5,07 x 10⁻⁵
	1-4	0,1749	0,0166	0,0691
GP11	1-2	0,0193	0,4929	0,6825
	1-3	0,0759	0,0833	0,1972
	1-4	0,0002	0,9982	0,9982
GP12	1-2	-0,1041	0,1171	0,2570
	1-3	-0,1546	0,1341	0,2753
	1-4	0,0569	0,7169	0,8810
GP13	1-2	0,0733	0,0824	0,1972
	1-3	0,0973	0,1373	0,2753
	1-4	0,0167	0,8666	0,9397
GP14	1-2	-0,0820	0,0117	0,0528
	1-3	-0,1161	0,0215	0,0774
	1-4	-0,0749	0,3283	0,5183
GP15	1-2	0,0239	0,4433	0,6586
	1-3	0,0087	0,8573	0,9397
	1-4	0,0235	0,7505	0,9006
GP16	1-2	-0,0059	0,8037	0,9210
	1-3	-0,0188	0,6128	0,7993
	1-4	0,0008	0,9888	0,9982

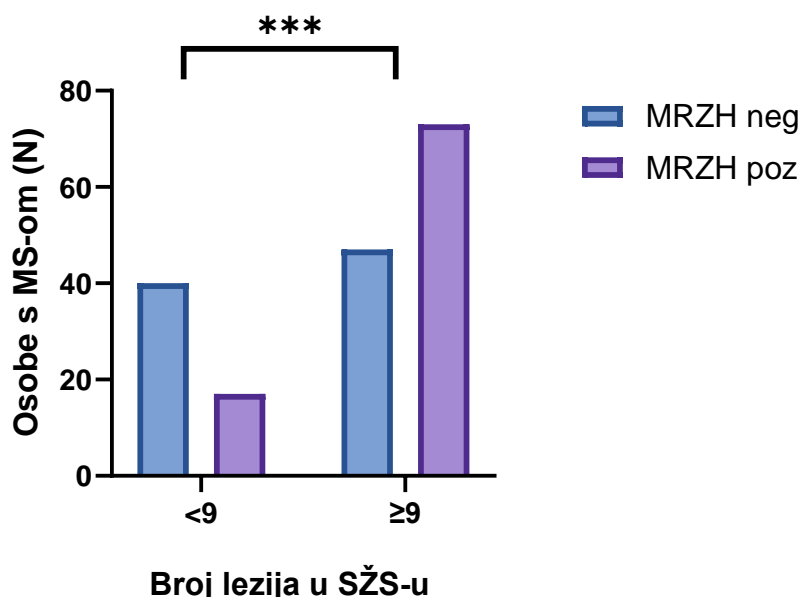
GP17	1-2	-0,0584	0,1103	0,2482
	1-3	-0,1315	0,0211	0,0774
	1-4	0,0043	0,9607	0,9982
GP18	1-2	-0,0448	0,2199	0,3881
	1-3	-0,1005	0,0769	0,1927
	1-4	-0,0259	0,7641	0,9049
GP19	1-2	-0,0969	0,0109	0,0514
	1-3	-0,1933	0,0011	0,0102
	1-4	-0,0961	0,2833	0,4727
GP20	1-2	-0,0648	0,1731	0,3289
	1-3	-0,1309	0,0771	0,1927
	1-4	0,0004	0,9970	0,9982
GP21	1-2	-0,0343	0,3963	0,6046
	1-3	-0,1736	0,0061	0,0344
	1-4	-0,0686	0,4737	0,6661
GP22	1-2	0,0761	0,2836	0,4727
	1-3	-0,2318	0,0361	0,1109
	1-4	0,0395	0,8140	0,9210
GP23	1-2	-0,2303	2,06 x 10⁻⁵	0,0003
	1-3	-0,3838	5,23 x 10⁻⁶	9,42 x 10⁻⁵
	1-4	-0,1876	0,1356	0,2753
GP24	1-2	-0,0785	0,1376	0,2753
	1-3	-0,2271	0,0060	0,0344
	1-4	-0,0052	0,9669	0,9982
G0	1-2	0,0496	0,1754	0,3289
	1-3	0,1180	0,0387	0,1109
	1-4	0,0623	0,4722	0,6661
G1	1-2	0,0460	3,50 x 10⁻⁷	1,57 x 10⁻⁵

	1-3	0,0358	0,0090	0,0477
	1-4	-0,0018	0,9325	0,9982
G2	1-2	-0,0669	0,0305	0,1056
	1-3	-0,1014	0,0347	0,1109
	1-4	-0,0555	0,4464	0,6586
F	1-2	-0,0025	0,2908	0,4759
	1-3	-0,0008	0,8186	0,9210
	1-4	-0,0027	0,6292	0,8090
B	1-2	0,1102	5,58 x 10⁻⁷	1,67 x 10⁻⁵
	1-3	0,1084	0,0013	0,0103
	1-4	0,1056	0,0380	0,1109
S	1-2	-0,0554	0,0407	0,1109
	1-3	-0,1265	0,0028	0,0192
	1-4	-0,0327	0,6077	0,7993

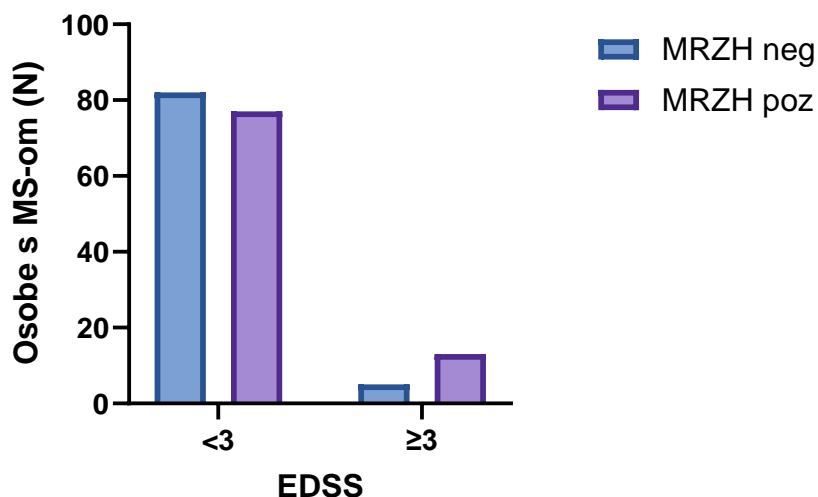
Podobljano označene P vrijednosti statistički su važne ($P < 0,05$). *Stopa lažnih otkrića kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom metodom. Interpretacija oligoklonskih imunoglobulina G. TIP 1: Normalan nalaz; TIP 2: Oligoklonske IgG vrpce samo u likvoru; TIP 3: Oligoklonske IgG vrpce u likvoru, a neke i u serumu; TIP 4: Identične IgG vrpce u likvoru i serumu.

5.3.4. Promjene sastava N-glikana ovisno o MRZH statusu osoba s multiplom sklerozom

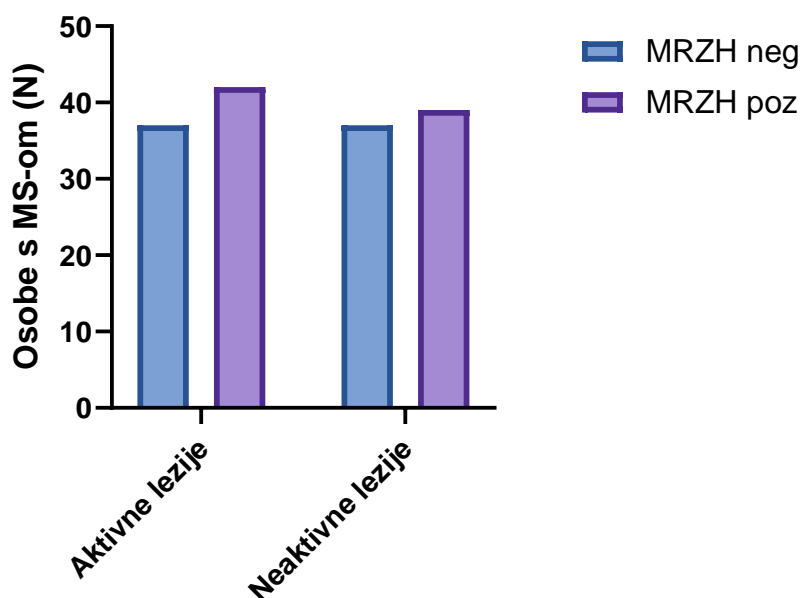
Dijagnostička osjetljivost MRZH reakcije, definiranom kao barem jedan pozitivan ASI na neurotropne viruse, za dijagnozu MS-a u ukupnoj kohorti ispitanika iznosila je 50,85 % (95 % CI: 43,24 – 58,43), a dijagnostička specifičnost 55,00 % (95 % CI: 31,53 – 76,94). Osobe s MS-om s pozitivnom MRZH reakcijom imale su veće opterećenje SŽS-a lezijama ($P = 0,0002$; slika 24.), ali MRZH pozitivnost nije bila povezana s umjerenom ili znatnom onesposobljenosti ($EDSS \geq 3$) ($P = 0,0802$, slika 25.), prisutnosti gadolinij-imbibirajućih lezija ($P = 0,823$; slika 26.) ili brojem relapsa ($P = 0,704$; slika 27.).



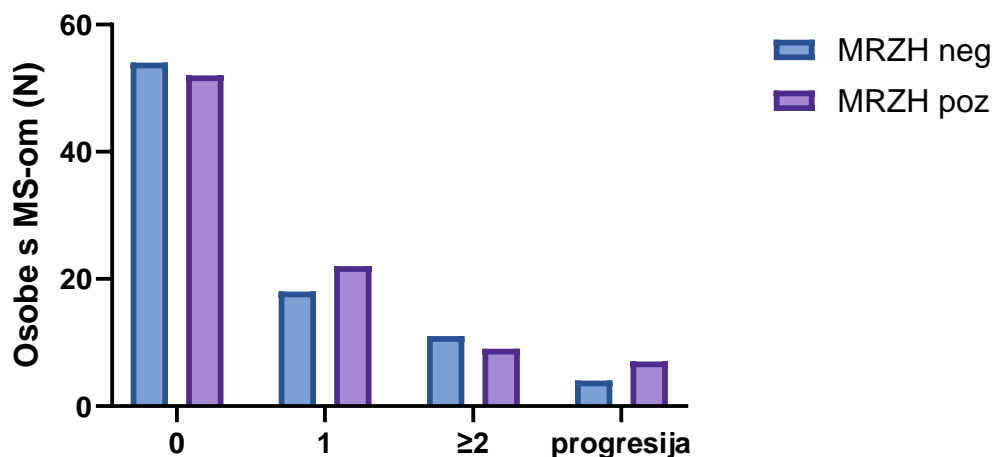
Slika 24. Broj lezija središnjega živčanog sustava (SŽS) u odnosu na pozitivnost MRZH reakcije u osoba s multiplom sklerozom. MRZH reakcija, definirana kao barem jedan pozitivan virus-specifični indeks antitijela na neurotropne viruse morbile, rubelu, varicella zoster ili herpes simpleks 1 i 2. *** $P < 0,001$



Slika 25. Neurološka onesposobljenost mjerena *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) ljestvicom u odnosu na pozitivnost MRZH reakcije u osoba s multiplom sklerozom. MRZH reakcija, definirana kao barem jedan pozitivan virus-specifični indeks antitijela na neurotropne viruse morbile, rubelu, varicella zoster ili herpes simpleks 1 i 2.



Slika 26. Prisutnost aktivnih (gadolinij-imbibirajućih) lezija u odnosu na pozitivnost MRZH reakcije u osoba s multiplom sklerozom. MRZH reakcija, definirana kao barem jedan pozitivan virus-specifični indeks antitijela na neurotropne viruse morbile, rubelu, varicella zoster ili herpes simpleks 1 i 2.



Slika 27. Broj relapsa koji su prethodili lumbalnoj punkciji u odnosu na pozitivnost MRZH reakcije u osoba s multiplom sklerozom. MRZH reakcija, definirana kao barem jedan pozitivan virus-specifični indeks antitijela na neurotropne viruse morbile, rubelu, varicella zoster ili herpes simpleks 1 i 2.

Ispitano je postoje li razlike u N-glikanima IgG-a izoliranog iz likvora kod MRZH pozitivnih osoba s MS-om u odnosu na ispitanike s negativnom MRZH reakcijom. Sadržaj monogalaktoziliranih N-glikana u osoba MS-om s pozitivnom MRZH reakcijom jest povećan ($P = 4,24 \times 10^{-6}$), a razlici najviše doprinose monogalaktozilirane glikanske strukture FA2[6]G1 ($P = 6,84 \times 10^{-7}$) i FA2[6]BG1 ($P = 0,0187$). Također, sadržaj afukoziliranih N-glikana snižen je (A2G2 i AG2S1) u MRZH pozitivnim osobama s MS-om te je stoga derivirano svojstvo fukozilacije povećano u tih ispitanika ($P = 0,0409$) (tablica 10.).

Tablica 10. Razlike u N-glikanima imunoglobulina G likvora u MRZH negativnih i pozitivnih osoba s multiplom sklerozom.

N-glikan	Struktura	Učinak	P	P*
GP1	FA1	-0,1067	0,1559	0,3118
GP2	A2	-0,0999	0,3742	0,5863
GP3	A2B	-0,0242	0,7810	0,8597
GP4	FA2	0,0142	0,7397	0,8597

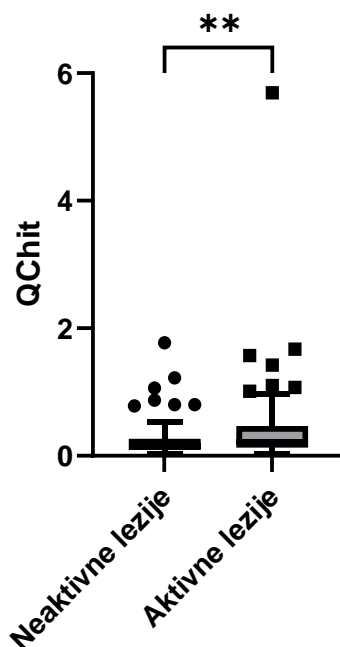
GP5	M5	0,0099	0,8024	0,8597
GP6	FA2B	-0,0748	0,0952	0,2041
GP7	A2G1	-0,1911	0,0128	0,0550
GP8	FA2[6]G1	0,0870	2,28 x 10⁻⁸	6,84 x 10⁻⁷
GP9	FA2[3]G1	-0,0559	0,0361	0,1083
GP10	FA2[6]BG1	0,1004	0,0025	0,0187
GP11	FA2[3]BG1	-0,0231	0,4495	0,5863
GP12	A2G2	-0,2199	0,0036	0,0218
GP13	A2BG2	-0,0385	0,4304	0,5863
GP14	FA2G2	-0,0337	0,3395	0,5863
GP15	FA2BG2	-0,0067	0,8462	0,8753
GP16	FA2G1S1	-0,0219	0,4063	0,5863
GP17	A2G2S1	-0,1366	0,0010	0,0101
GP18	FA2G2S1	-0,0241	0,5279	0,6598
GP19	FA2BG2S1	-0,0869	0,0531	0,1449
GP20	Struktura nije definirana	-0,0415	0,4373	0,5863
GP21	A2G2S2	-0,1162	0,0237	0,0788
GP22	A2BG2S2	-0,0687	0,4358	0,5863
GP23	FA2G2S2	-0,1428	0,0155	0,0579
GP24	FA2BG2S2	-0,1120	0,0794	0,1835
Derivirano svojstvo		Učinak	P	P*
G0		-0,0115	0,7711	0,8597
G1		0,0444	2,83 x 10⁻⁷	4,24 x 10⁻⁶
G2		-0,0443	0,1876	0,3518
F		0,0076	0,0082	0,0409

B	-0,0002	0,9923	0,9923
S	-0,0523	0,0795	0,1835

Podobljano označene P vrijednosti statistički su važne ($P < 0,05$). *Stopa lažnih otkrića kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom metodom. MRZH reakcija, definirana kao barem jedan pozitivan virus-specifični indeks antitijela na neurotropne viruse morbile, rubelu, varicella zoster ili herpes simpleks 1 i 2.

5.3.5. Povezanost hitotriozidaze s N-glikozilacijom IgG-a

Osamnaest (5,8 %) ispitanika u ukupnoj kohorti, odnosno 12 (5,7 %) ispitanika u kohorti s analiziranim likvorom imalo je nisku aktivnost hitotriozidaze u serumu te im posljedično nije izračunan kvocijent u likvoru i serumu. Kvocijent hitotriozidaze znatno je viši u svih osoba s MS-om s gadolinij-imbibirajućim lezijama (medijan QChit = 0,22; IQR = 0,13 – 0,47) u odnosu na osobe s neaktivnim lezijama (medijan QChit = 0,15; IQR = 0,09 – 0,27), ($P = 0,0019$) (slika 28.).



Slika 28. Kvocijent hitotriozidate u likvoru i serumu (QChit) osoba s MS-om u ovisnosti o prisutnosti gadolinij-imbibirajućih lezija. ** $P = 0,0019$.

Međutim, pojedinačne N-glikanske strukture niti deriviranim svojstvima IgG-a izoliranog iz likvora (tablica 11.) i seruma (tablica 12.) ne razlikuju se u ovisnosti o kvocijentu hitotriozidaze. Također, QChit nije u korelaciji sa sadržajem N-glikanskih struktura u likvoru (slika 21.).

Tablica 11. Razlike između N-glikana imunoglobulina G i deriviranih svojstava izoliranog iz likvora u osoba s multiplom sklerozom ovisno o kvocijentu hitotriozidaze

N-glikan	Struktura	Učinak	P	P*
GP1	FA1	-0,0644	0,3076	0,6152
GP2	A2	0,1049	0,2166	0,5691
GP3	A2B	-0,0287	0,6953	0,8691
GP4	FA2	0,0230	0,5211	0,7816
GP5	M5	-0,0372	0,2548	0,5691
GP6	FA2B	0,0255	0,5061	0,7816
GP7	A2G1	0,0289	0,6204	0,8460
GP8	FA2[6]G1	0,0259	0,0605	0,3025
GP9	FA2[3]G1	-0,0304	0,1765	0,5691
GP10	FA2[6]BG1	0,0717	0,0231	0,2309
GP11	FA2[3]BG1	-0,0045	0,8617	0,8764
GP12	A2G2	-0,0359	0,5530	0,7901
GP13	A2BG2	0,0491	0,2005	0,5691
GP14	FA2G2	-0,0347	0,2423	0,5691
GP15	FA2BG2	-0,0077	0,7844	0,8764
GP16	FA2G1S1	-0,0089	0,6819	0,8691
GP17	A2G2S1	-0,0092	0,7837	0,8764
GP18	FA2G2S1	-0,0324	0,3363	0,6306
GP19	FA2BG2S1	-0,1038	0,0028	0,0830

GP20	Struktura nije definirana	-0,0075	0,8632	0,8764
GP21	A2G2S2	-0,0073	0,8451	0,8764
GP22	A2BG2S2	0,0960	0,1412	0,5294
GP23	FA2G2S2	-0,1292	0,0107	0,1607
GP24	FA2BG2S2	-0,1038	0,0317	0,2379
Derivirano svojstvo		Učinak	P	P*
G0		0,0254	0,4457	0,7429
G1		0,0165	0,0554	0,3025
G2		-0,0313	0,2656	0,5691
F		-0,0003	0,8764	0,8764
B		0,0164	0,4283	0,7429
S		-0,0405	0,1063	0,4556

*Stopa lažnih otkrića kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom metodom.

Tablica 12. Razlike između N-glikana imunoglobulina G i deriviranih svojstava izoliranog iz seruma u osoba s multiplom sklerozom ovisno o kvocijentu hitotriozidaze

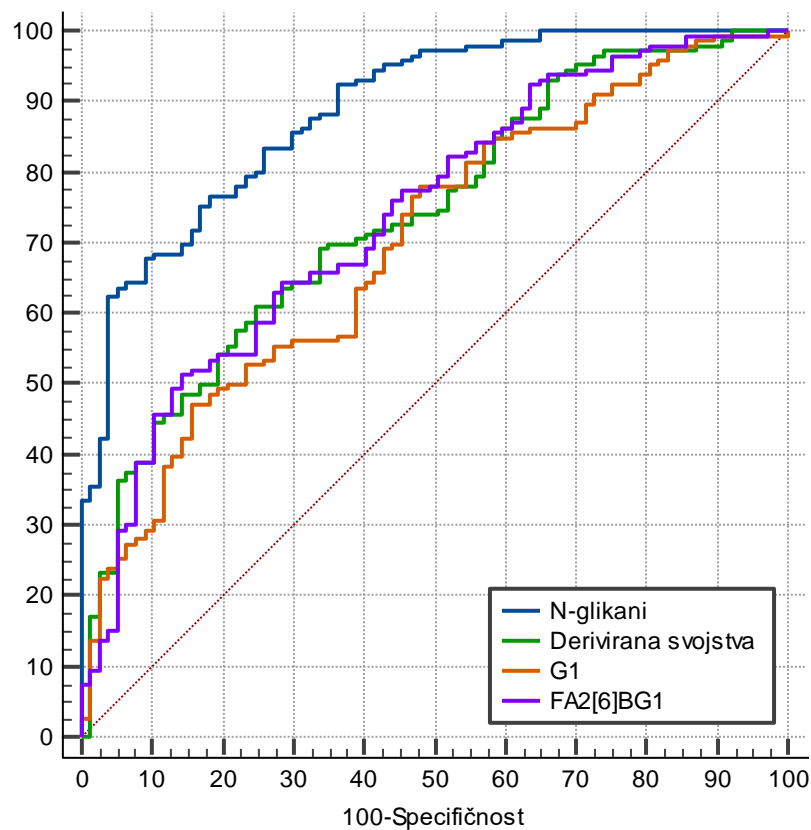
N-glikan	Struktura	Učinak	P	P*
GP1	FA1	0,03805	0,44135	0,78720
GP2	A2	0,03606	0,58607	0,78720
GP3	A2B	-0,01226	0,65323	0,78720
GP4	FA2	-0,01297	0,68224	0,78720
GP5	M5	-0,01546	0,50234	0,78720
GP6	FA2B	0,01871	0,56478	0,78720
GP7	A2G1	0,06507	0,18695	0,78720
GP8	FA2[6]G1	-0,00575	0,57725	0,78720

GP9	FA2[3]G1	-0,03060	0,07640	0,74825
GP10	FA2[6]BG1	0,02300	0,30377	0,78720
GP11	FA2[3]BG1	-0,01580	0,48700	0,78720
GP12	A2G2	0,08585	0,11185	0,74825
GP13	A2BG2	0,03800	0,12471	0,74825
GP14	FA2G2	0,00289	0,90429	0,94163
GP15	FA2BG2	0,01274	0,59674	0,78720
GP16	FA2G1S1	-0,01275	0,49687	0,78720
GP17	A2G2S1	0,04576	0,07016	0,74825
GP18	FA2G2S1	0,01315	0,63417	0,78720
GP19	FA2BG2S1	-0,03473	0,09089	0,74825
GP20	Struktura nije definirana	0,00032	0,98927	0,98927
GP21	A2G2S2	0,02142	0,25781	0,78720
GP22	A2BG2S2	0,03526	0,32735	0,78720
GP23	FA2G2S2	-0,02419	0,48592	0,78720
GP24	FA2BG2S2	-0,02849	0,27544	0,78720
Derivirano svojstvo		Učinak	P	P*
G0		-0,0047	0,8735	0,9416
G1		-0,0081	0,2587	0,7872
G2		0,0095	0,6797	0,7872
F		-0,0024	0,1527	0,7636
B		0,0086	0,6031	0,7872
S		0,0021	0,9102	0,9416

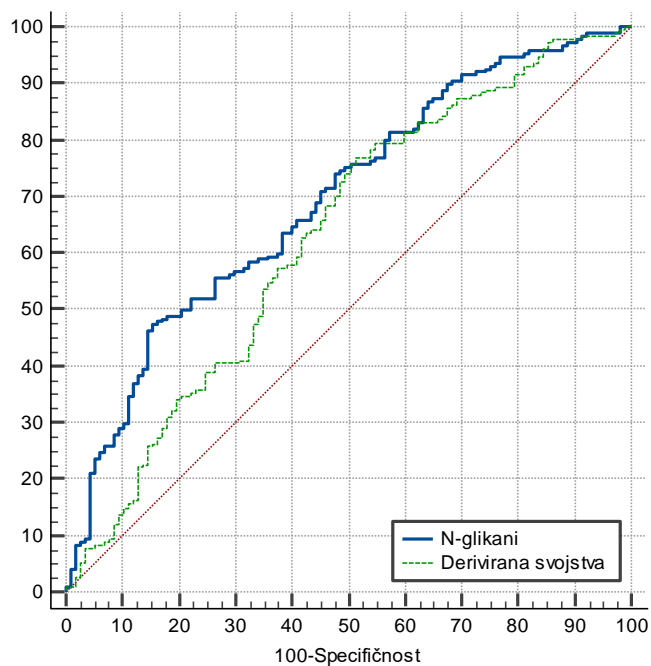
*Stopa lažnih otkrića kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom metodom.

5.4. Potencijal primjene N-glikana u dijagnostici multiple skleroze

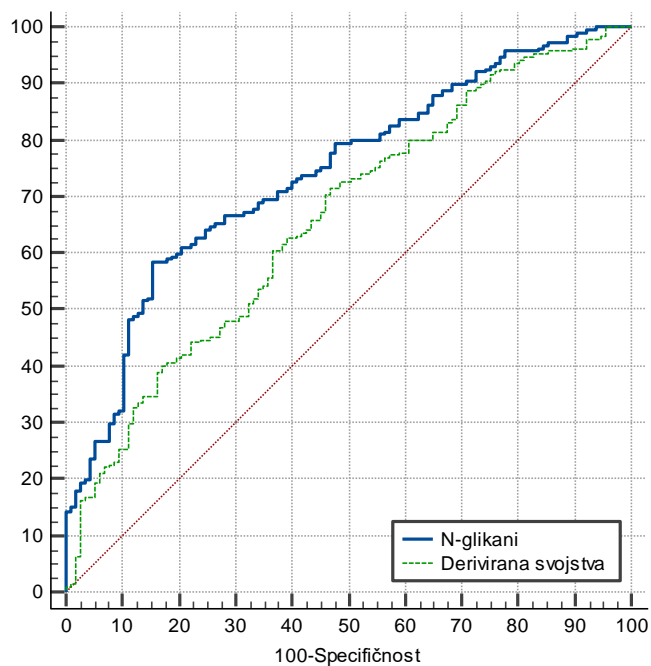
Ispitane su karakteristike N-glikana IgG-a izoliranog iz likvora i seruma te ukupnih proteina seruma za dijagnozu MS-a. Vrijednosti svih N-glikanskih struktura likvorskog IgG-a dobivene logističkom regresijom najbolje razlučuju osobe s MS-om od kontrolnih ispitanika (AUC = 0,887, 95 % CI: 0,838 – 0,926), s optimalnom osjetljivošću od 67,8 % (95 % CI: 59,6 – 75,3) i visokom specifičnošću od 90,9 % (95 % CI: 82,2 – 96,3). Dijagnostičke karakteristike svih deriviranih svojstava, samo monogalaktoziliranih struktura ili FA2[6]BG1 N-glikana inferiorne su dijagnostičkim karakteristikama svih N-glikanskih struktura (slika 29., tablica 13.). N-glikani IgG-a seruma i ukupnih proteina seruma nisu pokazali zadovoljavajuće dijagnostičke karakteristike (slike 30. i 31., tablica 13.).



Slika 29. Usporedba ROC krivulja pojedinačnih N-glikanskih struktura (N-glikani), deriviranih svojstava, monogalaktoziliranih struktura (G1) i strukture FA2[6]BG1 IgG-a izoliranog iz likvora za dijagnozu multiple skleroze.



Slika 30. Usporedba ROC krivulja pojedinačnih N-glikanskih struktura (N-glikani) i deriviranih svojstava IgG-a izoliranog iz seruma za dijagnozu multiple skleroze.



Slika 31. Usporedba ROC krivulja pojedinačnih N-glikanskih struktura (N-glikani) i deriviranih svojstava ukupnih proteina seruma za dijagnozu multiple skleroze.

Tablica 13. Dijagnostičke karakteristike N-glikana IgG-a likvora i seruma te ukupnih proteina seruma za dijagnozu MS-a

IgG (likvor)	AUC	95 % CI	Granična vrijednost	Osjetljivost	95 % CI	Specifičnost	95 % CI
N-glikani	0,887	0,838 – 0,926	0,778	67,81	59,6 – 75,3	90,91	82,2 – 96,3
Derivirana svojstva	0,737	0,674 – 0,793	0,680	60,96	52,5 – 68,9	75,32	64,2 – 84,4
G1	0,699	0,634 – 0,758	0,728	47,26	38,9 – 55,7	84,42	74,4 – 91,7
FA2[6]BG1	0,738	0,675 – 0,795	0,738	51,37	43,0 – 59,7	85,71	75,9 – 92,6
IgG (serum)	AUC	95 % CI	Granična vrijednost	Osjetljivost	95 % CI	Specifičnost	95 % CI
N-glikani	0,693	0,639 – 0,745	0,701	47,37	40,1 – 54,7	84,62	76,8 – 90,6
Derivirana svojstva	0,629	0,572 – 0,683	0,606	76,84	70,2 – 82,6	48,72	39,4 – 58,1
Ukupni proteini (serum)	AUC	95 % CI	Granična vrijednost	Osjetljivost	95 % CI	Specifičnost	95 % CI
N-glikani	0,742	0,689 – 0,790	0,686	58,42	51,1 – 65,5	84,62	76,8 – 90,6
Derivirana svojstva	0,659	0,603 – 0,712	0,592	71,58	64,6 – 77,9	52,99	43,5 – 62,3

AUC, *area under curve*, površina ispod krivulje; 95 % CI, 95-postotni interval pouzdanosti.

5.5. Neurološki status i aktivnost multiple skleroze

Ispitana je povezanost N-glikana i glikozilacijskih svojstava s neurološkim statusom i radiološkom aktivnosti multiple skleroze. Osobe s MS-om s većim opterećenjem lezijama (≥ 9 T2/FLAIR lezija SŽS-a) imale su više monogalaktoziliranih FA2[6]BG1 ($P = 0,0186$) IgG-a izoliranog iz likvora (tablica 14.). N-glikani IgG-a izoliranog iz likvora osoba s MS-om i kontrolnih ispitanika ujedno se najviše razlikuju u navedenoj strukturi. Nisu dokazane promjene u N-glikana ukupnih serumskih proteina i deriviranih svojstava glikana IgG-a izoliranog iz seruma ovisno o opterećenosti SŽS-a lezijama.

Tablica 14. Razlike između N-glikana likvorskog imunoglobulina G i deriviranih svojstava u osoba s multiplom sklerozom ovisno o opterećenju središnjega živčanog sustava lezijama.

N-glikan	Struktura	Učinak	P	P*
GP1	FA1	-0,1067	0,0727	0,3134
GP2	A2	-0,0699	0,3843	0,8238
GP3	A2B	-0,0896	0,1732	0,4723
GP4	FA2	-0,0246	0,4685	0,8238
GP5	M5	-0,0500	0,1047	0,3874
GP6	FA2B	0,0004	0,9905	0,9993
GP7	A2G1	-0,0406	0,4628	0,8238
GP8	FA2[6]G1	0,0198	0,1312	0,3936
GP9	FA2[3]G1	-0,0467	0,0261	0,3134
GP10	FA2[6]BG1	0,1010	0,0006	0,0186
GP11	FA2[3]BG1	0,0007	0,9767	0,9993
GP12	A2G2	-0,0119	0,8369	0,9418
GP13	A2BG2	0,0234	0,5161	0,8238
GP14	FA2G2	$2,42 \times 10^{+11}$	0,9993	0,9993
GP15	FA2BG2	0,0528	0,0453	0,3134

GP16	FA2G1S1	-0,0049	0,8056	0,9418
GP17	A2G2S1	-0,0120	0,7063	0,9213
GP18	FA2G2S1	0,0202	0,5217	0,8238
GP19	FA2BG2S1	-0,0403	0,2239	0,5597
GP20	Struktura nije definirana	-0,0223	0,5864	0,8796
GP21	A2G2S2	-0,0161	0,6471	0,9077
GP22	A2BG2S2	0,0268	0,6657	0,9077
GP23	FA2G2S2	-0,0919	0,0561	0,3134
GP24	FA2BG2S2	-0,0824	0,0731	0,3134
Derivirano svojstvo		Učinak	P	P*
G0		-0,0215	0,4949	0,8238
G1		0,0147	0,0715	0,3134
G2		0,0051	0,8476	0,9418
F		0,0015	0,4663	0,8238
B		0,0307	0,1162	0,3874
S		-0,0067	0,7775	0,9418

*Stopa lažnih otkrića kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom metodom.

N-glikozilacija ukupnih serumskih proteina te IgG-a izoliranog iz likvora i seruma nije se razlikovala ovisno o EDSS-u (tablica 15.), aktivnosti lezija ($P > 0,05$) niti broju relapsa ($P > 0,05$).

Tablica 15. Razlike između N-glikana likvorskog imunoglobulina G i deriviranih svojstava u osoba s multiplom sklerozom ovisno EDSS-u pri dijagnozi (< 2 i ≥ 2).

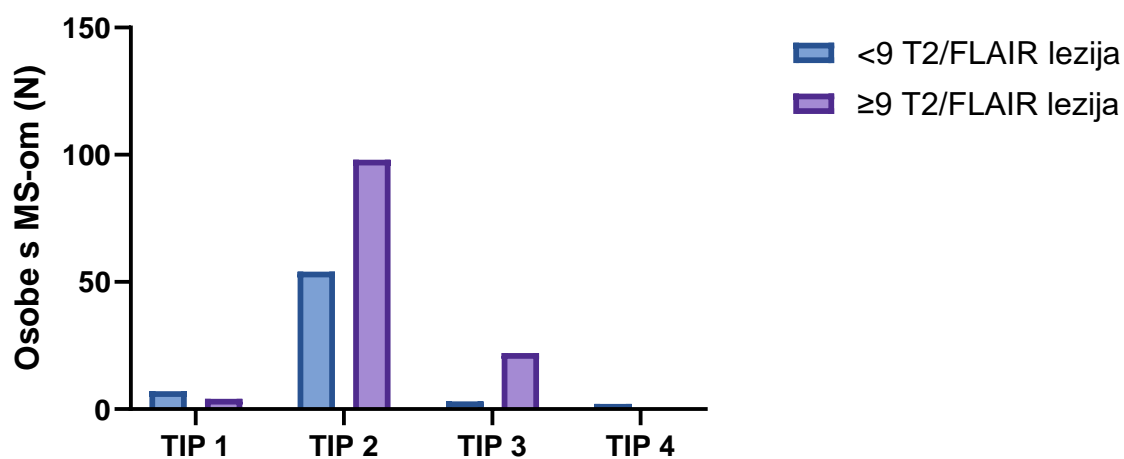
N-glikan	Struktura	Učinak	P	P*
-----------------	------------------	---------------	----------	-----------

GP1	FA1	0,1298	0,4880	0,9004
GP2	A2	-0,2054	0,4620	0,9004
GP3	A2B	-0,2782	0,1972	0,8232
GP4	FA2	0,0459	0,6650	0,9004
GP5	M5	0,0435	0,6555	0,9004
GP6	FA2B	-0,0947	0,3965	0,9004
GP7	A2G1	-0,1987	0,3018	0,8232
GP8	FA2[6]G1	0,0105	0,7975	0,9570
GP9	FA2[3]G1	0,0003	0,9962	0,9962
GP10	FA2[6]BG1	-0,0374	0,6556	0,9004
GP11	FA2[3]BG1	-0,1467	0,0511	0,8232
GP12	A2G2	-0,1242	0,5144	0,9004
GP13	A2BG2	-0,1606	0,1839	0,8232
GP14	FA2G2	0,0300	0,7324	0,9155
GP15	FA2BG2	-0,0442	0,6068	0,9004
GP16	FA2G1S1	-0,0747	0,2524	0,8232
GP17	A2G2S1	-0,0690	0,5117	0,9004
GP18	FA2G2S1	-0,0089	0,9250	0,9962
GP19	FA2BG2S1	-0,1391	0,2144	0,8232
GP20	Struktura nije definirana	-0,2331	0,0771	0,8232
GP21	A2G2S2	-0,1811	0,1575	0,8232
GP22	A2BG2S2	0,0126	0,9542	0,9962
GP23	FA2G2S2	-0,0645	0,6628	0,9004
GP24	FA2BG2S2	-0,1729	0,2770	0,8232
Derivirano svojstvo		Učinak	P	P*

G0	-0,0013	0,9897	0,9962
G1	-0,0090	0,6903	0,9004
G2	0,0065	0,9377	0,9962
F	0,0075	0,2960	0,8232
B	-0,0824	0,1683	0,8232
S	-0,0615	0,4080	0,9004

*Stopa lažnih otkrića kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom metodom.

Veće neuroradiološko opterećenje lezijama povezano je s tipom OIgG-a ($P = 0,0157$). Osobe s tipom 3 OIgG-a češće su imale veće opterećenje lezijama (slika 32.).



Slika 32. Učestalost većeg opterećenja središnjega živčanog sustava lezijama (≥ 9 T2/FLAIR lezija) ovisno o tipu oligoklonalnih IgG-a.

5.6. Razlike u N-glikozilaciji IgG-a izoliranog iz seruma i likvora ovisno o funkciji krvno-likvorske barijere

IgG-i izolirani iz likvora i seruma različito su bili N-glikozilirani (tablica 16.). Stoga je ispitan potencijalni utjecaj KMB-a na razlike u N-glikozilaciji IgG-a iz likvora i seruma. U ispitanika s očuvanom funkcijom KMB-a postojale su znatne razlike u N-glikanima IgG-a: likvorski IgG-i bili su više monogalaktozilirani ($P = 1,14 \times 10^{-9}$), sadržavali su više bGlcNAc-a ($P = 6,39 \times 10^{-7}$), ali su bili manje sijalinizirani ($P = 0,0004$) u usporedbi s N-glikanima serumskog IgG-a. S disfunkcijom KMB-a, razlike N-glikana likvorskoga i serumskog IgG-a bile su manje izražene, a više nije bila prisutna razlika u nekim fukoziliranim glikanskim strukturama, specifično FA2[6]G1, FA2G2, FA2[6]G1S1 i FA2G2S1 (tablica 17.).

Tablica 16. Razlike između N-glikana IgG-a izoliranog iz seruma u odnosu na likvor svih ispitanika.

N-glikan	Struktura	Učinak	P	P*
GP1	FA1	0,2055	$3,14 \times 10^{-6}$	$8,57 \times 10^{-6}$
GP2	A2	-0,1172	0,0518	0,0676
GP3	A2B	-0,3900	$1,22 \times 10^{-21}$	$1,22 \times 10^{-22}$
GP4	FA2	-0,0280	0,3208	0,3318
GP5	M5	-0,1886	$1,64 \times 10^{-16}$	$9,81 \times 10^{-16}$
GP6	FA2B	-0,1095	0,0003	0,0007
GP7	A2G1	-0,0520	0,1860	0,2067
GP8	FA2[6]G1	-0,0309	0,0002	0,0005
GP9	FA2[3]G1	0,0345	0,0155	0,0245
GP10	FA2[6]BG1	-0,1504	$7,65 \times 10^{-14}$	$3,28 \times 10^{-13}$
GP11	FA2[3]BG1	-0,1788	$1,76 \times 10^{-21}$	$1,32 \times 10^{-20}$
GP12	A2G2	0,0442	0,2744	0,2940
GP13	A2BG2	-0,2263	$4,64 \times 10^{-22}$	$6,96 \times 10^{-21}$

GP14	FA2G2	0,0738	0,0019	0,003
GP15	FA2BG2	-0,0375	0,0712	0,0854
GP16	FA2G1S1	-0,0311	0,0260	0,0355
GP17	A2G2S1	0,1279	1,19 x 10⁻⁹	3,57 x 10⁻⁹
GP18	FA2G2S1	0,0915	0,0005	0,0009
GP19	FA2BG2S1	0,0437	0,0250	0,0355
GP20	Struktura nije definirana	0,0969	0,0001	0,0003
GP21	A2G2S2	0,4665	7,07 x 10⁻⁸⁰	2,12 x 10⁻⁷⁸
GP22	A2BG2S2	0,0532	0,1388	0,1601
GP23	FA2G2S2	0,2486	5,23 x 10⁻¹⁴	2,61 x 10⁻¹³
GP24	FA2BG2S2	0,0625	0,0181	0,0272
Derivirano svojstvo		Učinak	P	P*
G0		-0,0499	0,0668	0,0834
G1		-0,0390	3,29 x 10⁻¹²	1,23 x 10⁻¹²
G2		0,0559	0,0122	0,0203
F		-0,0011	0,4074	0,4074
B		-0,0966	1,74 x 10⁻¹¹	5,81 x 10⁻¹¹
S		0,0823	4,74 x 10⁻⁶	1,19 x 10⁻⁵

Podobljano označene P vrijednosti statistički su važne ($P < 0,05$). *Stopa lažnih otkrića kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom metodom.

Table 17. Razlike u IgG N-glikanima izoliranog iz likvora i seruma u ispitanicima s očuvanom i disfunkcionalnom krvno-moždanom barijerom (KMB).

	Struktura	Očuvana funkcija KMB-a			Disfunkcija KMB-a		
		Učinak	P	P*	Učinak	P	P*
GP1	FA1	0,2175	3,42x10 ⁻⁵	9,32 x 10 ⁻⁵	0,1748	0,0299	0,0691
GP2	A2	-0,1147	0,1097	0,1371	-0,1233	0,26932	0,3513
GP3	A2B	-0,4113	7,21 x10 ⁻¹⁷	7,21 x 10 ⁻¹⁷	-0,3358	2,17 x 10 ⁻⁵	0,0002
GP4	FA2	-0,0228	0,4946	0,4946	-0,0413	0,4334	0,5001
GP5	M5	-0,2029	1,67 x10 ⁻¹³	1,00 x10 ⁻¹²	-0,1522	0,0002	0,0009
GP6	FA2B	-0,1005	0,0059	0,01109	-0,1325	0,0171	0,04275
GP7	A2G1	-0,0492	0,2905	0,3113	-0,0591	0,4255	0,5006
GP8	FA2[6]G1	-0,0355	0,0004	0,0010	-0,0195	0,1856	0,2753
GP9	FA2[3]G1	0,0346	0,0424	0,0637	0,0345	0,1815	0,2753
GP10	FA2[6]BG1	-0,1529	4,70x10 ⁻¹⁰	1,76 x10 ⁻⁹	-0,1442	3,35x10 ⁻⁵	0,0002
GP11	FA2[3]BG1	-0,1871	1,38x10 ⁻¹⁷	1,03 x10 ⁻¹⁶	-0,1576	1,72x10 ⁻⁵	0,0002
GP12	A2G2	0,0535	0,2662	0,2957	0,0207	0,7827	0,7827
GP13	A2BG2	-0,2384	6,90 x10 ⁻¹⁸	7,21 x10 ⁻¹⁷	-0,1957	1,01 x10 ⁻⁵	0,0001
GP14	FA2G2	0,0745	0,0075	0,0133	0,0723	0,1137	0,2006
GP15	FA2BG2	-0,0392	0,1022	0,1333	-0,0329	0,4227	0,5001

GP1 6	FA2G1S1	-0,0367	0,0260	0,0433	-0,0169	0,5207	0,5572
GP1 7	A2G2S1	0,1351	$4,37 \times 10^{-8}$	$1,31 \times 10^{-7}$	0,1096	0,0067	0,0199
GP1 8	FA2G2S1	0,0883	0,0032	0,0064	0,0995	0,0612	0,1224
GP1 9	FA2BG2S1	0,0412	0,0777	0,1110	0,0502	0,1559	0,2599
GP2 0	Struktura nije definirana	0,0997	0,0011	0,0024	0,0896	0,0502	0,1076
GP2 1	A2G2S2	0,4543	$1,10 \times 10^{-53}$	$3,30 \times 10^{-52}$	0,4974	$3,25 \times 10^{-28}$	$9,75 \times 10^{-27}$
GP2 2	A2BG2S2	0,0557	0,1996	0,2303	0,0468	0,4641	0,5156
GP2 3	FA2G2S2	0,2432	$2,66 \times 10^{-10}$	$1,14 \times 10^{-9}$	0,2624	$4,61 \times 10^{-5}$	0,0002
GP2 4	FA2BG2S2	0,0554	0,0861	0,1174	0,0806	0,0727	0,1363
Derivirano svojstvo		Učinak	P	P*	Učinak	P	P*
G0		-0,0440	0,1712	0,20638	-0,0649	0,2019	0,2753
G1		-0,0428	$2,54 \times 10^{-10}$	$1,14 \times 10^{-9}$	-0,0296	0,0031	0,0104
G2		0,0564	0,0317	0,0501	0,0548	0,1964	0,2753
F		-0,0012	0,4445	0,4599	-0,0009	0,7338	0,7591
B		-0,0965	$1,92 \times 10^{-8}$	$6,39 \times 10^{-8}$	-0,0967	0,0002	0,0009
S		0,0782	0,0001	0,0004	0,0927	0,0113	0,0308

Podebljano označene P vrijednosti statistički su važne ($P < 0,05$). *Stopa lažnih otkrića kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom metodom.

5.7. N-glikozilacija ukupnih serumskih proteina u osoba s MS-om u odnosu na kontrolne ispitanike

Nominalno su jedino strukture A2G2S2 i FA3G3S3 bile promijenjene u osoba s MS-om u odnosu na kontrolne ispitanike. Međutim, korekcijom stope lažnih otkrića promjene nisu ostale statistički važne (tablica 19.).

Tablica 19. Razlike između N-glikana ukupnih serumskih proteina i deriviranih svojstava u osoba s multiplom sklerozom u odnosu na kontrolne ispitanike.

N-glikan	Struktura	Učinak	P	P*
GP1	FA2	-0,0274	0,5074	0,9536
GP2	M5; FA2B	0,0159	0,5326	0,9536
GP3	A2BG1	0,0614	0,1161	0,9536
GP4	FA2[6]G1	-0,0117	0,6727	0,9536
GP5	FA2[3]G1	-0,0206	0,5211	0,9536
GP6	FA2[6]BG1	0,0264	0,3473	0,9536
GP7	M6	-0,0077	0,6889	0,9536
GP8	A2G2	0,0029	0,8642	0,9798
GP9	A2BG2	0,0191	0,4218	0,9536
GP10	FA2G2	0,0028	0,9194	0,9798
GP11	FA2BG2	0,0093	0,7485	0,9536
GP12	A2[3]BG1S1	-0,0282	0,0845	0,9536
GP13	FA2[3]G1S1	-0,0109	0,7316	0,9536
GP14	A2G2S1	-0,0041	0,7355	0,9536

GP15	A2BG2S1	0,0105	0,6108	0,9536
GP16	FA2G2S1	-0,0075	0,7007	0,9536
GP17	FA2BG2S1	-0,0005	0,9890	0,9890
GP18	A2G2S2	0,0092	0,6339	0,9536
GP19	M9	-0,0154	0,3015	0,9536
GP20	A2G2S2	0,0251	0,0285	0,9536
GP21	A2BG2S2	0,0150	0,3426	0,9536
GP22	FA2G2S2	-0,0268	0,2226	0,9536
GP23	FA2BG2S2	-0,0126	0,7103	0,9536
GP24	A3G3S2	-0,0313	0,2887	0,9536
GP25	A3BG3S2	-0,0039	0,8066	0,9536
GP26	A3G3S2	-0,0249	0,2603	0,9536
GP27	A3G3S3	0,0471	0,2417	0,9536
GP28	A3G3S3	-0,0391	0,1685	0,9536
GP29	FA3G3S3	-0,0070	0,7672	0,9536
GP30	A3G3S3	-0,0151	0,5989	0,9536
GP31	FA3G3S3	-0,0720	0,0352	0,9536
GP32	A3F1G3S3	0,0138	0,6475	0,9536
GP33	A4G4S3	0,0493	0,2099	0,9536
GP34	A4G4S3	-0,0428	0,0651	0,9536
GP35	A4F1G3S3	0,0011	0,9754	0,9890
GP36	A4G4S4	-0,0074	0,7374	0,9536
GP37	A4G4S4	-0,0250	0,4933	0,9536

GP38	A4G4S4	-0,0022	0,9293	0,9798
GP39	A4F1G4S4; A4F2G4S4	0,0343	0,3552	0,9536
Derivirano svojstvo		Učinak	P	P*
	LB	0,0025	0,5496	0,9536
	HB	-0,0042	0,8149	0,9536
	S0	-0,0090	0,6797	0,9536
	S1	-0,0054	0,5199	0,9536
	S2	0,0105	0,1842	0,9536
	S3	-0,0014	0,9442	0,9798
	S4	0,0037	0,8872	0,9798
	G0	-0,0137	0,6839	0,9536
	G1	-0,0071	0,7826	0,9536
	G2	0,0063	0,2185	0,9536
	G3	-0,0053	0,7712	0,9536
	G4	0,0019	0,9363	0,9798
	HM	-0,0169	0,1131	0,9536
	B	0,0064	0,7820	0,9536
	CF	-0,0130	0,4524	0,9536
	AF	0,0425	0,2495	0,9536

Podobljano označene P vrijednosti statistički su važne ($P < 0,05$). *Stopa lažnih otkrića kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom metodom.

6. RASPRAVA

U ovoj studiji istraživani su N-glikani ukupnih serumskih proteina te N-glikani IgG-a izoliranog iz likvora i seruma u osoba s MS-om u trenutku postavljanja dijagnoze. Analiza glikana osoba s MS-om uspoređena je u odnosu na kontrolne ispitanike kod kojih je jednakim dijagnostičkim postupkom MS isključena.

Osobe s MS-om većinom su bile žene (67 %) što odgovara udjelu evidentiranom u Atlasu MS-a iz 2020. godine, MS međunarodne federacije (125), i prema studiji prevalencije MS-a u Hrvatskoj (126), prema kojima je u Hrvatskoj udio žena s MS-om 71 %, a 69 % u Europi. Također, u trenutku dijagnostičke obrade, osobe s MS-om bile su većinom mlađe dobi (medijan 36 godina) što je u skladu s podacima za europsku populaciju (34 godine). MS je bila RRMS fenotipa kod 87 % osoba s MS-om što odgovara podacima na europskoj populaciji (88 % RRMS-a) (125). Većina osoba nije imala ili je imala minimalnu neurološku onesposobljenost što je u skladu s prosječnim baznim EDSS-om u kliničkim studijama (127,128) i činjenicom da većina osoba s MS-om nisu imali relaps prije nastanka neurološkog deficita radi kojeg se provodila diferencijalno-dijagnostička obrada. Time smo potvrdili kako klinički i demografski podaci osoba s MS-om u ovoj studiji odgovaraju onima u općoj populaciji.

U MS-u su dokazane razlike samo u N-glikozilaciji IgG-a izoliranog iz likvora što je u skladu s prethodnim istraživanjima N-glikozilacije različitim metodama (129,130). Upalno okruženje ograničeno unutar SŽS-a utječe na sintezu N-glikana i reflektirano je višim sadržajem bGlcNAc-a i monogalaktozilacijom likvorskog IgG-a. Važno je za istaknuti kako su sve monogalaktozilirane strukture bile više u MS-u u odnosu na kontrolne ispitanike osim fukoziliranoga, monogalaktoziliranog glikana na α 1-3 anteni, FA2[3]G1. Smanjenje udjela navedene strukture u glikomu IgG-a prethodno je povezano s većim rizikom od dijabetesa tipa 2 (131) i aterosklerotskih kardiovaskularnih bolesti i neželjenim kardiovaskularnim događajima (132), koji su ujedno i učestaliji u osoba s MS-om (133).

Studije s lektinima kao metodama detekcije N-glikana pokazale su nedosljedne rezultate u detektiranim promjenama u glikozilaciji IgG-a izoliranog iz likvora. Decker i sur. pokazali su smanjenu galaktozilaciju (130) kod osoba s MS-om u odnosu na kontrolne skupine koju su činili zdravi ispitanici bez upalnih i autoimunih bolesti. Galaktozilacija likvorskog IgG-a u osoba s MS-om dodatno je uspoređivana i s bolesnicima s virusnim meningitisom te je također potvrđena niža galaktozilacija u MS-u. Kennedy i sur. nisu dokazali promjene u N-glikozilaciji IgG-a izoliranog iz likvora u odnosu na kontrolne ispitanike s upalnim bolestima i optičkim

neuritisom, ali su pokazali višu galaktozilaciju i sijalinizaciju IgG-a iz seruma u MS-u u odnosu na kontrolne ispitanike bez upalne komponente (134). Kontrolnu skupinu ispitanika u našoj studiji činili su ispitanici s ostalim demijelinizacijskim i neurološkim bolestima koji imaju upalnu komponentu. Nedosljedni rezultati navedenih studija vjerojatno su posljedica nespecifičnog vezanja glikana za lektine. Lektini su proteini koji s povećanim afinitetom vežu određene glikanske strukture, međutim to vezanje nije 100 % specifično. Navedenim testovima ne dobivamo informaciju o točnim glikanskim strukturama koje su promijenjene, već samo generalnu sliku promjena što naglašava potrebu analize N-glikozilacije osjetljivijim i specifičnijim metodama.

Rezultati studije od Wuhlera i sur., koji su rabili masenu spektrometriju kao metodu detekcije N-glikana izoliranih s IgG-a tipa 1, u većoj mjeri odgovaraju rezultatima ove studije. Dokazana je niža afukozilacija i galaktozilacija te povišen sadržaj bGlcNAc-a likvorskog IgG-a tipa 1 u MS-u u odnosu na zdrave kontrole i ispitanike bez upale (129). Osobe s MS-om u našoj studiji imale su povišen sadržaj bGlcNAc-a i monogalaktoziliranih N-glikanskih struktura IgG-a izoliranog iz likvora. Promjene u fukozilaciji nisu dokazane moguće zbog kontrolnih ispitanika koji nisu bili zdravi te su imali upalnu komponentu u patogenezi osnovne bolesti, znatno većeg broja ispitanika i analize svih tipova IgG-a u našoj studiji. Neočekivano, promjene u sijalinizaciji IgG-a nisu detektirane u MS-u u odnosu na druge sistemske i neurološke autoimune bolesti kod kojih je dokazana jasna povezanost sijalinizacije s aktivnosti bolesti, kliničkim tijekom i budućim relapsima bolesti (101,103).

Povišenu monogalaktozilaciju IgG-a iz likvora, uz istodobno sniženu digalaktozilaciju i sijalinizaciju imale su osobe s MS-om s povišenim brojem stanica u likvoru. Intratekalna sinteza IgG-a, a ne ukupna koncentracija likvorskog IgG-a, korelira s monogalaktoziliranim N-glikanima. Prethodno je dokazana povezanost afukozilacije (129) i agalaktozilacije (130) s brojem stanica, afukozilacije (129) s intratekalnom sintezom IgG-a te agalaktozilacije (130) s pozitivnim OIgG-ima. Povišena monogalaktozilacija i povišen sadržaj struktura s bGlcNAc-om pokazani su u našoj kohorti ispitanika s pozitivnim OIgG-ima, dok je u tipu tri OIgG-a sijalinizacija snižena. Ti proupalni obrasci N-glikozilacije važni su s obzirom na to da su pozitivni OIgG-i čimbenik srednjeg rizika za razvoj klinički definirane MS, postizanje umjerene neurološke onesposobljenosti (≥ 3) prema EDSS ljestvici (135) i konverziji u sekundarno progresivnu MS (135,136). U slučaju pozitivne MRZH reakcije povišene su monogalaktozilacija i fukozilacija. Intratekalno sintetizirana frakcija IgG-a specifično doprinosi promjenama u obrascu N-glikozilacije. Slijedom navedenog, detektirane promjene u

galaktozilaciji nisu samo posljedica upale, već su povezane s patogenezom MS-a. Alternativne promjene N-glikozilacije u MS-u moguće su povezane s ograničenjem upale u SŽS-u (68), različitom dostupnosti supstrata u likvoru ili genskim varijantama povezanim s rizikom razvoja MS-a (59,137).

MRZH reakcija u osoba s MS-om povezana je s više monogalaktoziliranim i fukoziliranim N-glikanima likvorskog IgG-a. Klinički, ti ispitanici imaju veće radiološko opterećenje lezijama SŽS-a. Manji udio afukoziliranih struktura, koje su detektirane u MRZH pozitivnim osobama s MS-om, tipično se smatra protuupalnim obrascem N-glikozilacije. Stoga taj obrazac N-glikozilacije ne korelira s kliničkom prezentacijom. Moguće da u MRZH negativnih osoba s MS-om, IgG-i s afukoziliranim N-glikanskim strukturama, koji nisu usmjereni protiv SŽS specifičnih antigena, zasite Fc receptore na imunskim stanicama i moduliraju imunski odgovor inhibicijom ADCC-a sličnim mehanizmom kao i intravenozna terapija imunoglobulinima (138). Taj se zaštitni učinak smanjuje u MRZH pozitivnosti kada je afinitet za Fc receptore smanjen. Monogalaktozilacija dodatno znatno pojačava proupalne efektorske funkcije IgG-a u MS-u (139).

Nije dokazana povezanost hitotriozidaze, kao biljega aktivnosti makrofaga i mikroglije, s pojedinačnim N-glikanskim strukturama ili deriviranim svojstvima (140). Efektorske funkcije mikroglije i makrofaga u SŽS-u vjerojatno nisu primarno regulirane ADCC-om, već signalima ostalih stanica, primjerice aktiviranim CD4⁺ limfocitima T, Th1 fenotipa, koji luče citokine koji aktiviraju fagocite i potiču mehanizam ADCC-a (141).

Različite tercijarne strukture stvaraju se ovisno o prisutnosti određenog ugljikohidrata na u pojedinoj N-glikanskoj strukturi što rezultira promjenom afiniteta za Fc receptore, unatoč tomu što N-glikan sadrži derivirano svojstvo koje se smatra proupalnim ili antiupalnim. Na primjer, povećani sadržaj N-glikanskih struktura monogalaktoziliranih na α 1-6 anteni najviše doprinosi povećanoj monogalaktozilaciji IgG-a likvora. Navedeno derivirano svojstvo najviše je povezano s intratekalnom upalom u MS-u. Ti izomeri imaju veći potencijal aktivacije efektorskih funkcija ovisnih o Fc-u (79,142). Sumarno, FA2[6]G1 i FA2[6]BG1 strukture znatno koreliraju s postotkom intratekalne sinteze IgG-a, više su u ispitanika s pozitivnim OIgG-ima i u MRZH pozitivnim osobama s MS-om. FA2[6]G1 struktura također je povišena u osoba s MS-om s povišenim stanicama u likvoru. Suprotno tomu, također monogalaktozilirani N-glikani, ali na α 1-3 anteni, znatno su sniženi ili nepromijenjeni u navedenim skupinama ispitanika.

Većina osoba s MS-om, njih 65 %, imale su veće opterećenje SŽS-a na MR-u što je znatno više od prethodno objavljenih podataka neuroradioloških kliničkih studija (143). Polovica osoba s MS-om imala je gadolinij-imbibirajuće lezije. Udio osoba s aktivnim lezijama razlikuje se ovisno o studiji i iznosi 8 – 72 % (144–146). Gadolinij-imbibirajuće lezije povezane su sa sekundarnom progresijom MS-a, fizičkom onesposobljenosti i kognitivnim poremećajima 15 godina nakon dijagnoze MS-a (147). Osobe s većim opterećenjem lezijama pri dijagnozi imaju nešto veći rizik od veće onesposobljenosti (EDSS \geq 6) nakon 20 godina praćenja (143), a u osoba s CIS-om predviđa se razvoj klinički definiranog MS-a te navedeni rizik korelira s neurološkom onesposobljenosti nakon pet godina praćenja (148). Veće neuroradiološko opterećenje lezijama povezano je s većim sadržajem sržno fukoziliranoga i monogalaktoziliranog (na α 1-6 anteni) biantenarnog glikana likvorskog IgG-a s bGlcNAc-om, FA2[6]BG1. Osobe s MS-om s većim opterećenjem lezijama imaju veći rizik od aktivnog oblika bolesti, a monogalaktozilirani IgG-i mogu imati ulogu u poticanju proupalnih učinaka. Niti neurološka onesposobljenost, broj relapsa niti aktivnost lezija u MS-u nisu povezani s N-glikozilacijom likvorskog IgG-a. Povezanost EDSS-a i duljine trajanja bolesti također prethodno nije asocirana s N-glikozilacijom (129), dok je agalaktozilacija znatno korelirala s progresijom onesposobljenosti definiranom kao promjena EDSS-a u godini dana (130).

Pozitivan nalaz IgG-a ima visoku dijagnostičku osjetljivost za MS u našoj kohorti, a koja je usporediva s literaturnim podacima (41). Međutim, zbog niže dijagnostičke specifičnosti OIGG-a potrebni su biljezi koji će omogućiti bolju razdiobu MS-a od ostalih bolesti koje se mogu očitovati kao MS. Pokazana je zadovoljavajuća dijagnostička specifičnost N-glikoma IgG-a izoliranog iz likvora od 90,9 % koja je usporediva s literaturnim podacima za pozitivnu MRZ reakciju u neselektiranim populacijama ispitanika (116). Važno je istaknuti kako je dijagnostička specifičnost MRZH reakcije od 55 % u našoj kohorti znatno niža od očekivane i kao takva ne doprinosi diferencijalno-dijagnostičkoj obradi pacijenata. Posljedica je selektivnog pristupa provođenju analize samo u osoba s pozitivnim OIGG-om. Analiza N-glikoma likvorskog IgG-a pri dijagnostičkoj punkciji jest biljeg visoke specifičnosti koji doprinosi diferencijalno-dijagnostičkoj obradi ispitanika, tj. isključivanju MS-a kod osoba s drugim bolestima koje se mogu očitovati kao MS.

Pokazali smo kako je N-glikozilacija likvorskog IgG-a znatno različita u likvoru u odnosu na serumski IgG, neovisno o dijagnozi, što potvrđuju i ostale studije (129,134). Obrazac N-glikozilacije likvorskog IgG-a općenito je više proupalni jer su IgG-i više agalaktozilirani, monogalaktozilirani i sadrže više bGlcNAc-a, a manje digalaktozilirani i sijalinizirani u odnosu

na serumski. Navedene razlike postaju manje izražene ili nisu više statistički važne u disfunkciji KMB-a. U disfunkciji KMB-a dolazi do većeg prolaska serumskih proteina u prostor SŽS-a kao i lokalnog uključivanja patogenih limfocita T i B (7), a propusnost KMB-a u NAWM-u povezana je s većim brojem relapsa (13).

Kao što je prethodno navedeno, sijalinizacija u MS-u nije promijenjena u odnosu na kontrolne ispitanike. Međutim, sijalinizacija je niža u pojedinim subpopulacijama osoba s MS-om: onih s povišenim brojem stanica u likvoru i tipom 3 OIgG-a. Te skupine osoba s MS-om također imaju veće opterećenje SŽS-a lezijama što se smatra većim rizikom za aktivni tijek bolesti (149). Pokazali smo kako osobe s MS-om s povišenim brojem stanica u likvoru češće imaju disfunkcionalnu KMB što rezultira većim prolaskom serumskim proteina u prostor SŽS-a, dok tip 3 OIgG-a podrazumijeva postojanje istih vrpca u likvoru i serumu. Stoga niža sijalinizacija likvorskog IgG-a u tih ispitanika može biti djelomično posljedica doprinosa N-glikozilacije serumskog IgG-a ili utjecaja temeljnih pokretača upale na periferiji koji reguliraju ekspresiju unutarstaničnih glikoziltransferaza (68) što se odražava i na sadržaj sijalinskih kiselina.

Nismo detektirali promjene serumskih N-glikana ukupnih proteina i IgG-a u MS-u, što je suprotno najopsežnijoj dosad objavljenoj studiji N-glikozilacije plazmatskog IgG-a i ukupnih proteina plazme (150). U navedenom istraživanju, sržna fukozilacija i visokomanozne strukture IgG-a najviše su promijenjene u MS-u, dok su u plazmatskim proteinima opisane promjene u antenarnoj fukozilaciji, trisijaliniziranim i tetrasijaliniziranim te trigalaktosiliranim i tetragalaktosiliranim N-glikanima. Snižena sržna fukozilacija IgG-a u MS-u bila je nominalno važna i u našem istraživanju što potencijalno upozorava na prisutnost istih promjena N-glikoma IgG-a. Razlike u rezultatima mogu se objasniti različitim prevalencijama fenotipova MS-a uključenih ispitanika. Studija je uključila osobe s MS-om s otočja Orkney i Shetland, većina ispitanika imali su progresivni fenotip MS-a (62 %) te su uspoređivani sa zdravom kontrolnom skupinom. Ti ispitanici mogu imati bitne genske i epigenske čimbenike koji utječu na glikozilaciju (151). Ispitanici u našoj studiji uključeni su u trenutku postavljanja dijagnoze i većinom su imali RRMS fenotip, što odgovara učestalosti RRMS fenotipa pri dijagnozi. Sve navedeno može objasniti zašto ostale razlike nisu replicirane.

Druga je studija pokazala sniženu koncentraciju GlcNAc-a u osoba s progresivnim fenotipom MS-a (85). Nadopuna GlcNAc-om na mišjem modelu potiče oligodendrogenezu i ima neuroprotektivan učinak kao posljedicu većeg sadržaja granajućih N-glikana (152). Neuroprotektivan učinak nadopune GlcNAc-om pokazan je i *in vivo*. Suplementacija osoba s MS-om na imunomodulacijskoj terapiji rezultirala je promjenama grananja N-glikana limfocita

T i B, smanjenom koncentracijom proupalnih citokina (IFN γ , IL-17 i IL-6) kao i biomarkera neurodegeneracije (slobodni laki lanci neurofilamenata) te poboljšanjem neurološke onesposobljenosti mjerene EDSS-om kod 30 % ispitanika (86). Konačan učinak nadopune GlcNAc-om stoga je imunomodulirajući i neuroprotektivan. Međutim, mi nismo detektirali promjene u višeantennarnih N-glikana ukupnih proteina seruma osim nominalno povišene biantenarne strukture A2G2S2 i snižene triantenarne strukture FA3G3S3 kod osoba s MS-om. Naši rezultati dosljedni su rezultatima Ip i sur. koji nisu dokazali promjene N-glikana specifičnih serumskih proteina u RRMS-u (153). Na ukupnim proteinima seruma struktura A2G2S2 najzastupljenija je s relativnom abundancijom od 50 %. Najveći doprinos A2G2S2 strukturi doprinose proteini alfa-1-antitripsin, hemopeksin, transferin i cink-alfa-2-glikoprotein (154). Navedeni su proteini reaktanti akutne faze čija se koncentracija u serumu mijenja u upali u pozitivnom ili negativnom smjeru (155). U studijama proteoma osoba s MS-om prethodno je pokazano kako su alfa-1-antitripsin i cink-alfa-2-glikoprotein povećano eksprimirani u osoba s MS-om u relapsu, a hemopeksin oksidacijski promijenjen (156,157). Potencijalno su nominalne razlike u sadržaju N-glikana posljedica promjene ekspresije proteina u akutnoj fazi MS-a te kao takvi mogući biljezi aktivnosti bolesti. Međutim, dosadašnje studije nisu povezale sistemsku upalu s intratekalnom upalom niti težinom bolesti u MS-u (158).

Razlike u rezultatima studija koje su uključivale ispitanike s relapsno-remitentnim, odnosno progresivnim fenotipom MS-a potencijalno upozoravaju na to da su promjene N-glikozilacije seruma ili sistemski promijenjene u progresivnoj MS ili se mijenjaju s progresijom MS-a te su potencijalno biljeg progresije. Nove i aktivne žarišne upalne lezije u bijelom tkivu karakteriziraju relapsno-remitentni fenotip MS-a, dok je difuzna aksonska ozljeda normalno-izgledajuće bijele tvari, formacija ektopičnih struktura sličnih folikulima (159) i očuvanost selektivnosti KMB-a svojstvena progresivnoj MS. Navedene razlike upućuju na to da neurodegeneracija zbog anatomski izdvojenoga upalnog procesa prevladava u progresivnim oblicima bolesti. Progresijom MS-a u serumu detektiraju se biljezi neurodegeneracije kao što su laki lanci neurofilamenata (160), što u slučaju promijenjene N-glikozilacije proteina SŽS-a može utjecati na sadržaj N-glikana u periferiji. Trenutačno nedostaju klinički kriteriji za definiciju progresije RRMS-a u SPMS (161) te je pronalazak biljega koji govore u prilog progresiji bolesti važan za donošenje pravodobne odluke o adekvatnom terapijskom postupku u budućnosti.

7. ZAKLJUČCI

U ovom istraživanju analizirani su N-glikani ukupnih serumskih proteina te N-glikani IgG-a izoliranog iz likvora i seruma u osoba s MS-om u trenutku postavljanja dijagnoze. Dokazane su razlike samo u N-glikozilaciji IgG-a izoliranog iz likvora u osoba MS-om u odnosu na kontrolnu skupinu s ostalim demijelinizacijskim i neurološkim bolestima čime se djelomično potvrđuje hipoteza ovog rada. Hipoteza o postojanju razlika u N-glikozilaciji serumskih IgG-a nije potvrđena. Rezultati provedene analize upućuju na ostvarene glavne i specifične ciljeve ovoga istraživanja sa sljedećim zaključcima:

- Monogalaktozilacija i sadržaj bGlcNAc struktura likvorskog IgG-a povišeni su u MS-u.
- Povećani sadržaj N-glikanskih struktura monogalaktoziliranih na α 1-6 anteni najviše doprinosi povećanoj monogalaktozilaciji IgG-a likvora. Ti izomeri imaju veći potencijal aktivacije efektorskih funkcija ovisnih o Fc-u.
- N-glikom IgG-a izoliranog iz likvora nije povezan s ukupnom koncentracijom IgG-a u likvoru.
- Svojestvo monogalaktozilacije specifično je povezano s intratekalno sintetiziranim IgG-om.
- Osobe s pozitivnim OIgG-ima imaju više monogalaktozilirane N-glikane i viši sadržaj struktura s bGlcNAc-om.
- N-glikani likvorskog IgG-a nisu povezani s kvocijentom hitotriozidaze.
- MRZH pozitivne osobe s MS-om imaju više monogalaktozilirane i fukozilirane N-glikane likvorskog IgG-a.
- FA2[6]BG1 struktura znatno je viša u u osoba s MS-om s većim opterećenjem SŽS-a lezijama. Osobe s MS-om s većim opterećenjem lezijama imaju veći rizik od aktivnog oblika bolesti, a monogalaktozilirani IgG-i mogu imati ulogu u poticanju proupalnih učinaka.
- N-glikani nisu povezani s neurološkom onesposobljenosti, aktivnosti lezija i brojem relapsa u MS-u.
- N-glikom likvorskog IgG-a je specifičan diferencijalno-dijagnostički biljeg koji se može koristiti u razlučivanju ostalih bolesti i stanja koje se mogu očitovati kao MS.
- Pozitivan nalaz OIgG-a jest laboratorijski biljeg najveće dijagnostičke osjetljivosti za MS koji se ne može zamijeniti analizom N-glikozilacije likvorskoga i serumskog IgG-a.

- N-glikozilacija serumskih proteina i serumskog IgG-a u MS-u nepromijenjena je u trenutku diferencijalno-dijagnostičke obrade te stoga izbjegavanje dijagnostičke lumbalne punkcije nije opravdano.
- N-glikozilacija IgG-a likvora razlikuje se od N-glikozilacije IgG-a izoliranog iz seruma.
- U disfunkciji KMB-a razlike u N-glikozilaciji likvorskoga i serumskog IgG-a manje su izražene.

8. POPIS LITERATURE

1. Freiha J, Riachi N, Chalah MA, Zoghaib R, Ayache SS, Ahdab R. Paroxysmal symptoms in multiple sclerosis—a review of the literature. *J Clin Med*. 2020;9:3100.
2. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17:162-73.
3. Magyari M, Koch-Henriksen N. Quantitative effect of sex on disease activity and disability accumulation in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2022;93:716–22.
4. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler*. 2020;26:1816-21.
5. Benjak T, Štefančić V, Draušnik Ž, Cerovecki I, Roginić D, Habek M, et al. Prevalence of multiple sclerosis in Croatia: Data from national and non-governmental organization registries. *Croat Med J*. 2018;59:65–70.
6. Harbo HF, Gold R, Tintora M. Sex and gender issues in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord*. 2013;6:237–48.
7. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2015;15:545–58.
8. Tizaoui K. Multiple sclerosis genetics: Results from meta-analyses of candidate-gene association studies. *Cytokine*. 2018;106:154-64.
9. Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GPA, Bulman D, Hashimoto L, Party DW, et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol*. 1993;33:281-5.
10. Alfredsson L, Olsson T. Lifestyle and environmental factors in multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019;9:a028944.
11. Hickey WF. Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin Immunol*. 1999;11:125-37.
12. Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S, et al. Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:44.
13. Cramer SP, Simonsen HJ, Varatharaj A, Galea I, Frederiksen JL, Larsson HBW. Permeability of the blood–brain barrier predicts no evidence of disease activity at 2 years

- after natalizumab or fingolimod treatment in relapsing–remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2018;83:902–14.
14. Jones AP, Kermode AG, Lucas RM, Carroll WM, Nolan D, Hart PH. Circulating immune cells in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2017;187:193-203.
 15. Waisman A, Hauptmann J, Regen T. The role of IL-17 in CNS diseases. *Acta Neuropathol*. 2015;129:625–37.
 16. Rasouli J, Ciric B, Imitola J, Gonnella P, Hwang D, Mahajan K, et al. Expression of GM-CSF in T Cells Is Increased in Multiple Sclerosis and Suppressed by IFN- β Therapy. *J Immunol*. 2015;194:5085-93.
 17. Posová H, Horáková D, Čapek V, Uher T, Hrušková Z, Havrdová E. Peripheral blood lymphocytes immunophenotyping predicts disease activity in clinically isolated syndrome patients. *BMC Neurol*. 2017;17:145.
 18. Li YF, Zhang SX, Ma XW, Xue YL, Gao C, Li XY, et al. The proportion of peripheral regulatory T cells in patients with Multiple Sclerosis: A meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord*. 2019;28:75-80.
 19. Dhaeze T, Peelen E, Hombrouck A, Peeters L, Van Wijmeersch B, Lemkens N, et al. Circulating Follicular Regulatory T Cells Are Defective in Multiple Sclerosis. *J Immunol*. 2015;195:832-40.
 20. Ma CS, Deenick EK. Human T follicular helper (Tfh) cells and disease. *Immunol Cell Biol*. 2014;92:64-71.
 21. Booss J, Esiri MM, Tourtellotte WW, Mason DY. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 1983;62(1):219–32.
 22. Hauser SL, Bhan AK, Gilles F, Kemp M, Kerr C, Weiner HL. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*. 1986;19:578–87.
 23. Lassmann H. Pathogenic mechanisms associated with different clinical courses of multiple sclerosis. *Front Immunol*. 2019;9:3116.
 24. Pender MP, Csurhes PA, Pfluger CMM, Burrows SR. Deficiency of CD8⁺ effector memory T cells is an early and persistent feature of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2014;20:1825-32.
 25. Huseby ES, Huseby PG, Shah S, Smith R, Stadinski BD. Pathogenic CD8T cells in multiple sclerosis and its experimental models. *Front Immunol*. 2012;3:64.

26. Lazibat I, Majdak MR, Županić S. Multiple sclerosis: New aspects of immunopathogenesis. *Acta Clin Croat.* 2018;57:352-61.
27. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain.* 2009;132:1175–89.
28. Palanichamy A, Apeltsin L, Kuo TC, Sirota M, Wang S, Pitts SJ, et al. Immunoglobulin class-switched B cells form an active immune axis between CNS and periphery in multiple sclerosis. *Sci Transl Med.* 2014;6:248ra106.
29. Stern JNH, Yaari G, Vander Heiden JA, Church G, Donahue WF, Hintzen RQ, et al. B cells populating the multiple sclerosis brain mature in the draining cervical lymph nodes. *Sci Transl Med.* 2014;6:248ra107.
30. Roach CA, Cross AH. Anti-CD20 B Cell Treatment for Relapsing Multiple Sclerosis. *Front Neurol.* 2021;11:595547.
31. van Langelaar J, Rijvers L, Janssen M, Wierenga-Wolf AF, Melief MJ, Siepman TA, et al. Induction of brain-infiltrating T-bet–expressing B cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2019;86:264–78.
32. Pavlasova G, Mraz M. The regulation and function of CD20: An “enigma” of B-cell biology and targeted therapy *Haematologica.* 2020;105:1494-506.
33. Bonasia CG, Abdulahad WH, Rutgers A, Heeringa P, Bos NA. B cell activation and escape of tolerance checkpoints: Recent insights from studying autoreactive B cells. *Cells.* 2021;10:1190.
34. Jelcic I, Al Nimer F, Wang J, Lentsch V, Planas R, Jelcic I, et al. Memory B Cells Activate Brain-Homing, Autoreactive CD4+ T Cells in Multiple Sclerosis. *Cell.* 2018;175:85-100.e23.
35. Kinnunen T, Chamberlain N, Morbach H, Cantaert T, Lynch M, Preston-Hurlburt P, et al. Specific peripheral B cell tolerance defects in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2013;123:2737-41.
36. Bogers L, Engelenburg HJ, Janssen M, Unger PPA, Melief MJ, Wierenga-Wolf AF, et al. Selective emergence of antibody-secreting cells in the multiple sclerosis brain. *EBioMedicine.* 2023;89:104465.
37. Muñoz U, Sebal C, Escudero E, Esiri M, Tzartos J, Sloan C, et al. Main Role of Antibodies in Demyelination and Axonal Damage in Multiple Sclerosis. *Cell Mol Neurobiol.* 2022;42:1809–27.

38. Yu X, Graner M, Kennedy PGE, Liu Y. The Role of Antibodies in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Front Neurol.* 2020;11:533388.
39. Süße M, Konen FF, Schwenkenbecher P, Budde K, Nauck M, Grothe M, et al. Decreased Intrathecal Concentrations of Free Light Chains Kappa in Multiple Sclerosis Patients Taking Very High Effective Disease-Modifying Treatment. *Diagnostics (Basel)*;12:720.
40. Greenfield AL, Dandekar R, Ramesh A, Eggers EL, Wu H, Laurent S, et al. Longitudinally persistent cerebrospinal fluid B-cells resist treatment in multiple sclerosis. *CI Insight.* 2019 Mar;4:e126599.
41. Jarius S, Haas J, Paul F, Wildemann B. Myelinoclastic diffuse sclerosis (Schilder's disease) is immunologically distinct from multiple sclerosis: results from retrospective analysis of 92 lumbar punctures. *J Neuroinflammation.* 2019;16:51.
42. Heussinger N, Kontopantelis E, Gburek-Augustat J, Jenke A, Vollrath G, Korinthenberg R, et al. Oligoclonal bands predict multiple sclerosis in children with optic neuritis. *Ann Neurol.* 2015;77:1076–82.
43. Farina G, Magliozzi R, Pitteri M, Reynolds R, Rossi S, Gajofatto A, et al. Increased cortical lesion load and intrathecal inflammation is associated with oligoclonal bands in multiple sclerosis patients: A combined CSF and MRI study. *J Neuroinflammation.* 2017;14:40.
44. Joseph FG, Hirst CL, Pickersgill TP, Ben-Shlomo Y, Robertson NP, Scolding NJ. CSF oligoclonal band status informs prognosis in multiple sclerosis: a case control study of 100 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009;80:292-6.
45. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.* 2000;47:707–17.
46. Storch MK, Piddlesden S, Haltia M, Iivanainen M, Morgan P, Lassmann H. Multiple sclerosis: In situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann Neurol.* 1998;43:465–71.
47. Sádaba MC, Tzartos J, Paño C, García-Villanueva M, Álvarez-Cermeño JC, Villar LM, et al. Axonal and oligodendrocyte-localized IgM and IgG deposits in MS lesions. *J Neuroimmunol.* 2012;247:86–94.
48. Frick E, Stickl H. Antibody-dependent lymphocyte cytotoxicity against basic protein of myelin in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 1980;46:187–97.
49. Frick E, Stickl H. Specificity of antibody-dependent lymphocyte cytotoxicity against cerebral tissue constituents in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 1982;65:30–7.

50. Zhou W, Graner M, Paucek P, Beseler C, Boisen M, Bubak A, et al. Multiple sclerosis plasma IgG aggregates induce complement-dependent neuronal apoptosis. *Cell Death Dis.* 2023;14:254.
51. Liu Y, Given KS, Harlow DE, Matschulat AM, Macklin WB, Bennett JL, et al. Myelin-specific multiple sclerosis antibodies cause complement-dependent oligodendrocyte loss and demyelination. *Acta Neuropathol Commun.* 2017;5:25.
52. Kinzel S, Lehmann-Horn K, Torke S, Häusler D, Winkler A, Stadelmann C, et al. Myelin-reactive antibodies initiate T cell-mediated CNS autoimmune disease by opsonization of endogenous antigen. *Acta Neuropathol.* 2016;132:43–58.
53. Shimizu F, Tasaki A, Sano Y, Ju M, Nishihara H, Oishi M, et al. Sera from remitting and secondary progressive multiple sclerosis patients disrupt the blood-brain barrier. *PLoS One* 2014;9:e92872.
54. Gagneux P, Hennet T, Varki A. Biological Functions of Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 7. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579984/>
55. Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15:346–66.
56. Stanley P, Moremen KW, Lewis NE, et al. N-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 9. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579964/>
57. Cheng K, Zhou Y, Neelamegham S. DrawGlycan-SNFG: a robust tool to render glycans and glycopeptides with fragmentation information. *Glycobiology.* 2017;27:200–5.
58. Mkhikian H, Grigorian A, Li CF, Chen HL, Newton B, Zhou RW, et al. Genetics and the environment converge to dysregulate N-glycosylation in multiple sclerosis. *Nat Commun.* 2011;2:334.
59. Grigorian A, Mkhikian H, Li CF, Newton BL, Zhou RW, Demetriou M. Pathogenesis of multiple sclerosis via environmental and genetic dysregulation of N-glycosylation. *Semin Immunopathol.* 2012;34:415-24.
60. Brynedal B, Wojcik J, Esposito F, Debailleul V, Yaouanq J, Martinelli-Boneschi F, et al. MGAT5 alters the severity of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2010;220:120–4.

61. Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, Cotsapas C, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2013;45:1353–60.
62. Roychoudhuri R, Hirahara K, Mousavi K, Clever D, Klebanoff CA, Bonelli M, et al. BACH2 represses effector programs to stabilize Treg-mediated immune homeostasis. *Nature.* 2013;498:506–10.
63. Hauser SL. The Charcot Lecture | Beating MS: A story of B cells, with twists and turns. *Mult Scler.* 2015;21:8-21.
64. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature.* 2011;476:214–9.
65. Lauc G, Huffman JE, Pučić M, Zgaga L, Adamczyk B, Mužinić A, et al. Loci Associated with N-Glycosylation of Human Immunoglobulin G Show Pleiotropy with Autoimmune Diseases and Haematological Cancers. *PLoS Genet.* 2013;9:e1003225.
66. Freeze HH, Boyce M, Zachara NE, et al. Glycosylation Precursors. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 5. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579932/>
67. Bhargava P, Fitzgerald KC, Venkata SLV, Smith MD, Kornberg MD, Mowry EM, et al. Dimethyl fumarate treatment induces lipid metabolism alterations that are linked to immunological changes. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019;6:33–45.
68. Cao Y, Song Z, Guo Z, Zhao X, Gong Y, Zhao K, et al. Cytokines in the Immune Microenvironment Change the Glycosylation of IgG by Regulating Intracellular Glycosyltransferases. *Front Immunol.* 2022;12:724379
69. Benkhoucha M, Molnarfi N, Santiago-Raber ML, Weber MS, Merkler D, Collin M, et al. IgG glycan hydrolysis by EndoS inhibits experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation.* 2012;9:209.
70. Wahl A, van den Akker E, Klaric L, Štambuk J, Benedetti E, Plomp R, et al. Genome-wide association study on immunoglobulin G glycosylation patterns. *Front Immunol.* 2018;9:277.
71. Golay J, Andrea AE, Cattaneo I. Role of Fc Core Fucosylation in the Effector Function of IgG1 Antibodies. *Front Immunol.* 2022;13:929895.

72. Herter S, Birk MC, Klein C, Gerdes C, Umana P, Bacac M. Glycoengineering of Therapeutic Antibodies Enhances Monocyte/Macrophage-Mediated Phagocytosis and Cytotoxicity. *J Immunol*. 2014;192:2252-60.
73. Kwiatkowski A, Co C, Kameoka S, Zhang A, Coughlin J, Cameron T, et al. Assessment of the role of afucosylated glycoforms on the in vitro antibody-dependent phagocytosis activity of an antibody to A β aggregates. *MAbs*. 2020;12:1803645.
74. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc γ RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem*. 2002;277:26733-40.
75. Sun Y, Li X, Wang T, Li W. Core Fucosylation Regulates the Function of Pre-BCR, BCR and IgG in Humoral Immunity. *Front Immunol*. 2022 Mar 25;13:844427.
76. Planas R, Santos R, Tomas-Ojer P, Cruciani C, Lutterotti A, Faigle W, et al. GDP-l-fucose synthase is a CD4⁺ T cell-specific autoantigen in DRB3*02:02 patients with multiple sclerosis. *Sci Transl Med*. 2018;10:eaat4301.
77. Wang Q, Wang T, Zhang R, Yang S, McFarland KS, Chung CY, et al. The interplay of protein engineering and glycoengineering to fine-tune antibody glycosylation and its impact on effector functions. *Biotechnol Bioeng*. 2022;119:102–17.
78. Zhang Q, Joubert MK, Polozova A, De Guzman R, Lakamsani K, Kinderman F, et al. Glycan engineering reveals interrelated effects of terminal galactose and core fucose on antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Biotechnol Prog*. 2020;36:e3045.
79. Aoyama M, Hashii N, Tsukimura W, Osumi K, Harazono A, Tada M, et al. Effects of terminal galactose residues in mannose α 1-6 arm of Fc-glycan on the effector functions of therapeutic monoclonal antibodies. *MAbs*. 2019;11:826–36.
80. Hatfield G, Tepliakova L, Gingras G, Stalker A, Li X, Aubin Y, et al. Specific location of galactosylation in an afucosylated antiviral monoclonal antibody affects its Fc γ RIIIA binding affinity. *Front Immunol*. 2022;13:972168.
81. Mastrangeli R, Satwekar A, Bierau H. Innovative Metrics for Reporting and Comparing the Glycan Structural Profile in Biotherapeutics. *Molecules*. 2023;28:3304.
82. Karsten CM, Pandey MK, Figge J, Kilchenstein R, Taylor PR, Rosas M, et al. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of Fc γ RIIB and dectin-1. *Nat Med*. 2012;18:1401–6.
83. Martin K, Talukder R, Hay FC, Axford JS. Characterization of changes in IgG associated oligosaccharide profiles in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing

- spondylitis using fluorophore linked carbohydrate electrophoresis. *J Rheumatol*. 2001;28:1531-6.
84. Scheper AF, Schofield J, Bohara R, Ritter T, Pandit A. Understanding glycosylation: Regulation through the metabolic flux of precursor pathways. *Biotechnol Adv*. 2023;67:108184.
 85. Brandt AU, Sy M, Bellmann-Strobl J, Newton BL, Pawling J, Zimmermann HG, et al. Association of a Marker of N-Acetylglucosamine with Progressive Multiple Sclerosis and Neurodegeneration. *JAMA Neurol*. 2021;78:842–52.
 86. Sy M, Newton BL, Pawling J, Hayama KL, Cordon A, Yu Z, et al. N-acetylglucosamine inhibits inflammation and neurodegeneration markers in multiple sclerosis: a mechanistic trial. *J Neuroinflammation*. 2023;20:209.
 87. van de Bovenkamp FS, Hafkenscheid L, Rispens T, Rombouts Y. The Emerging Importance of IgG Fab Glycosylation in Immunity. *The Journal of Immunology*. 2016;196:1435–41.
 88. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem*. 2003;278:3466-73.
 89. Quast I, Keller CW, Maurer MA, Giddens JP, Tackenberg B, Wang LX, et al. Sialylation of IgG Fc domain impairs complement-dependent cytotoxicity. *J Clin Invest*. 2015;125(11):4160–70.
 90. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch J V. Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science*. 2006;313:670-3.
 91. Beneduce C, Nguyen S, Washburn N, Schaeck J, Meccariello R, Holte K, et al. Inhibitory Fc-Gamma IIb Receptor Signaling Induced by Multivalent IgG-Fc Is Dependent on Sialylation. *Cells*. 2023;12:2130.
 92. Pfeifle R, Rothe T, Ipseiz N, Scherer HU, Culemann S, Harre U, et al. Regulation of autoantibody activity by the IL-23–TH17 axis determines the onset of autoimmune disease. *Nat Immunol*. 2017;18:104–13.
 93. Jones MB, Oswald DM, Joshi S, Whiteheart SW, Orlando R, Cobb BA. B-cell-independent sialylation of IgG. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:7207–12.
 94. Gudelj I, Lauc G, Pezer M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell Immunol*. 2018;333:65–79.

95. Kronimus Y, Dodel R, Galuska SP, Neumann S. IgG Fc N-glycosylation: Alterations in neurologic diseases and potential therapeutic target? *J Autoimmun.* 2019;96:14-23.
96. Šimurina M, de Haan N, Vučković F, Kennedy NA, Štambuk J, Falck D, et al. Glycosylation of Immunoglobulin G Associates With Clinical Features of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology.* 2018;154:1320-33.e10.
97. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, et al. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature.* 1985;316:452-7.
98. Tomana M, Schrohenloher RE, Reveille JD, Arnett FC, Koopman WJ. Abnormal galactosylation of serum IgG in patients with systemic lupus erythematosus and members of families with high frequency of autoimmune diseases. *Rheumatol Int.* 1992;12:191-4.
99. Espy C, Morelle W, Kavian N, Grange P, Goulvestre C, Viallon V, et al. Sialylation levels of anti-proteinase 3 antibodies are associated with the activity of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's). *Arthritis Rheum.* 2011;63:2105-15.
100. Gudelj I, Salo PP, Trbojević-Akmačić I, Albers M, Primorac D, Perola M, et al. Low galactosylation of IgG associates with higher risk for future diagnosis of rheumatoid arthritis during 10 years of follow-up. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864:2034-9.
101. Kemna MJ, Plomp R, van Paassen P, Koeleman CAM, Jansen BC, Damoiseaux JGMC, et al. Galactosylation and Sialylation Levels of IgG Predict Relapse in Patients With PR3-ANCA Associated Vasculitis. *EBioMedicine.* 2017;17:108-18.
102. Selman MHJ, Niks EH, Titulaer MJ, Verschuuren JJGM, Wuhrer M, Deelder AM. IgG Fc N-Glycosylation Changes in Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome and Myasthenia Gravis. *J Proteome Res.* 2011;10:143-52.
103. Fokkink WJR, Selman MHJ, Dortland JR, Durmuş B, Kuitwaard K, Huizinga R, et al. IgG Fc N-glycosylation in guillain-barré syndrome treated with immunoglobulins. *J Proteome Res.* 2014;13:1722-30.
104. Wong AHY, Fukami Y, Sudo M, Kokubun N, Hamada S, Yuki N. Sialylated IgG-Fc: a novel biomarker of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2016;87:275-9.
105. Tradtrantip L, Ratelade J, Zhang H, Verkman AS. Enzymatic deglycosylation converts pathogenic neuromyelitis optica anti-aquaporin-4 immunoglobulin G into therapeutic antibody. *Ann Neurol.* 2013;7:77-85.

106. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001;50:121–7.
107. Wick M, Gross CC, Isenmann S, Strik H. *Liquorzytologie. Nervenarzt*. 2016;87:1276–81.
108. Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, Fredrikson S, Gallo P, Grimaldi LM, Grønning M, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57:897-902.
109. Deisenhammer F, Zetterberg H, Fitzner B, Zettl UK. The Cerebrospinal Fluid in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2019;10:726.
110. Lo Sasso B, Agnello L, Bivona G, Bellia C, Ciaccio M. Cerebrospinal fluid analysis in multiple sclerosis diagnosis: An update. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55:245.
111. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended Standard of Cerebrospinal Fluid Analysis in the Diagnosis of Multiple Sclerosis A Consensus Statement. *Arch Neurol*. 2005;62:865-70.
112. Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84:909-14.
113. Arrambide G, Tintore M, Espejo C, Auger C, Castillo M, Río J, et al. The value of oligoclonal bands in the multiple sclerosis diagnostic criteria. *Brain*. 2018;141:1075–84.
114. Reiber H, Ungefehr S, Jacobi C. The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 1998;4:111-7.
115. Jarius S, Eichhorn P, Jacobi C, Wildemann B, Wick M, Voltz R. The intrathecal, polyspecific antiviral immune response: Specific for MS or a general marker of CNS autoimmunity? *J Neurol Sci*. 2009;280:98–100.
116. Jarius S, Eichhorn P, Franciotta D, Petereit HF, Akman-Demir G, Wick M, et al. The MRZ reaction as a highly specific marker of multiple sclerosis: re-evaluation and structured review of the literature. *J Neurol*. 2017 Mar 1;264(3):453–66.
117. van Eijk M, van Roomen CPAA, Renkema GH, Bussink AP, Andrews L, Blommaert EFC, et al. Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int Immunol*. 2005;17:1505–12.

118. Sotgiu S, Barone R, Arru G, Fois ML, Pugliatti M, Sanna A, et al. Intrathecal chitotriosidase and the outcome of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2006;12:551-7.
119. Oldoni E, Smets I, Mallants K, Vandeborgh M, Van Horebeek L, Poesen K, et al. CHIT1 at Diagnosis Reflects Long-Term Multiple Sclerosis Disease Activity. *Ann Neurol.* 2020;87:633–45.
120. Novakova L, Axelsson M, Khademi M, Zetterberg H, Blennow K, Malmeström C, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers as a measure of disease activity and treatment efficacy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurochem.* 2017;141:296–304.
121. Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta.* 1987;163:319-28.
122. Behdenna A, Colange M, Haziza J, Gema A, Appé G, Azencott CA, Nordor A. pyComBat, a Python tool for batch effects correction in high-throughput molecular data using empirical Bayes methods. *BMC Bioinformatics.* 2023;24:459.
123. Kluyver T, Ragan-Kelley B, Pérez F, Granger B, Bussonnier M, Frederic J, et al. Jupyter Notebooks – a publishing format for reproducible computational workflows. In: Loizides F, Schmidt B, eds. *Positioning and Power in Academic Publishing: Players, Agents and Agendas.* IOS Press. 2016:87-90.
124. Turčić A, Radovani B, Vogrinc Ž, Habek M, Rogić D, Gabelić T, et al. Higher MRI lesion load in multiple sclerosis is related to the N-glycosylation changes of cerebrospinal fluid immunoglobulin G. *Mult Scler Relat Disord.* 2023;79:104921.
125. MS International Federation. Atlas of MS. Preuzeto s: <https://www.atlasofms.org/map/croatia/epidemiology/number-of-people-with-ms> (pristupljeno: 18. siječnja 2024.)
126. Benjak T, Štefančić V, Draušnik Ž, Cerovecki I, Roginić D, Habek M, et al. Prevalence of multiple sclerosis in Croatia: Data from national and non-governmental organization registries. *Croat Med J.* 2018;59:65–70.
127. Bašić Kes V, Jelena Jurašić M, Zavoreo I, Lisak M, Soldo Butković S, Titlić M, et al. Osvremenjene smjernice za farmakološko liječenje oboljelih od multiple skleroze Hrvatskog društva za neurovaskularne poremećaje Hrvatskog liječničkog zbora i Hrvatskog društva za neuroimunologiju i neurogenetiku. *Acta Med Croatica.* 2018;72:431-45.

128. Brownlee WJ, Altmann DR, Prados F, Miszkiel KA, Eshaghi A, Gandini Wheeler-Kingshott CAM, et al. Early imaging predictors of long-term outcomes in relapse-onset multiple sclerosis. *Brain*. 2019;142:2276–87.
129. Wuhrer M, Selman MHJ, McDonnell LA, Kümpfel T, Derfuss T, Khademi M, et al. Pro-inflammatory pattern of IgG1 Fc glycosylation in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J Neuroinflammation*. 2015;12:235.
130. Decker Y, Schomburg R, Németh E, Vitkin A, Fousse M, Liu Y, et al. Abnormal galactosylation of immunoglobulin G in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2016;22:1794-803.
131. Lemmers RFH, Vilaj M, Urda D, Agakov F, Šimurina M, Klaric L, et al. IgG glycan patterns are associated with type 2 diabetes in independent European populations. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2017;1861:2240-9.
132. Birukov A, Plavcsa B, Eichelmann F, Kuxhaus O, Hoshi RA, Rudman N, et al. Immunoglobulin G N-Glycosylation Signatures in Incident Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease. *Diabetes Care*. 2022;45:2729–36.
133. Yang F, Hu T, He K, Ying J, Cui H. Multiple Sclerosis and the Risk of Cardiovascular Diseases: A Mendelian Randomization Study. *Front Immunol*. 2022;13:861885.
134. Kennedy PGE, Graner M, Pointon T, Li X, Tanimoto K, Dennison K, et al. Aberrant Immunoglobulin G Glycosylation in Multiple Sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2022;17:218-27
135. Tintore M, Rovira À, Ríó J, Otero-Romero S, Arrambide G, Tur C, et al. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain*. 2015;138:1863–74.
136. Karrenbauer VD, Bedri SK, Hillert J, Manouchehrinia A. Cerebrospinal fluid oligoclonal immunoglobulin gamma bands and long-term disability progression in multiple sclerosis: a retrospective cohort study. *Sci Rep*. 2021;11:14987.
137. Goris A, Pauwels I, Gustavsen MW, van Son B, Hilven K, Bos SD, et al. Genetic variants are major determinants of CSF antibody levels in multiple sclerosis. *Brain*. 2015;138:632–43.
138. Mimura Y, Mimura-Kimura Y, Saldova R, Rudd PM, Jefferis R. Enhanced Immunomodulatory Effect of Intravenous Immunoglobulin by Fc Galactosylation and Nonfucosylation. *Front Immunol*. 2022 Jan 28;13:818382.

139. Iida S, Kuni-Kamochi R, Mori K, Misaka H, Inoue M, Okazaki A, et al. Two mechanisms of the enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) efficacy of non-fucosylated therapeutic antibodies in human blood. *BMC Cancer*. 2009;9:58
140. Geladaris A, Häusler D, Weber MS. Microglia: The Missing Link to Decipher and Therapeutically Control MS Progression? *Int J Mol Sci*. 2021;22:3461.
141. Čulo F, Batinić D. Stanice, tkiva i organi imunskog sustava. U: Andreis I i sur. *Imunologija*, 7. izdanje. Medicinska naklada, Zagreb, 2010:18–57.
142. Hatfield G, Tepliakova L, Gingras G, Stalker A, Li X, Aubin Y, et al. Specific location of galactosylation in an afucosylated antiviral monoclonal antibody affects its FcγRIIIA binding affinity. *Front Immunol*. 2022;13:972168.
143. Fisniku LK, Brex PA, Altmann DR, Miszkiel KA, Benton CE, Lanyon R, et al. Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain*. 2008;131:808–17.
144. Wang C, Barnett MH, Yiannikas C, Barton J, Parratt J, You Y, et al. Lesion activity and chronic demyelination are the major determinants of brain atrophy in MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2019;6:e593.
145. Minneboo A, Uitdehaag BMJ, Jongen P, Vrenken H, Knol DL, van Walderveen MAA, et al. Association between MRI parameters and the MS severity scale: a 12 year follow-up study. *Mult Scler*. 2009;15:632-7.
146. Absinta M, Sati P, Masuzzo F, Nair G, Sethi V, Kolb H, et al. Association of Chronic Active Multiple Sclerosis Lesions With Disability In Vivo. *JAMA Neurol*. 2019;76:1474–83.
147. Brownlee WJ, Altmann DR, Prados F, Miszkiel KA, Eshaghi A, Gandini Wheeler-Kingshott CAM, et al. Early imaging predictors of long-term outcomes in relapse-onset multiple sclerosis. *Brain*. 2019;142:2276–87.
148. Tintoré M, Rovira A, Río J, Nos C, Grivé E, Téllez N, et al. Baseline MRI predicts future attacks and disability in clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2006;67:968–72.
149. Habek M, Adamec I, Barun B, Bašić Kes V, Bogojc Raspopović A, Duka Glavor K, et al. Treatment of relapsing multiple sclerosis - recommendations of the Croatian Neurological Society. *Croat Med J*. 2022;63:379-88.
150. Cvetko A, Kifer D, Gornik O, Klarić L, Visser E, Lauc G, et al. Glycosylation alterations in multiple sclerosis show increased proinflammatory potential. *Biomedicines*. 2020;8:1–14.

151. Štambuk J, Nakić N, Vučković F, Pučić-Baković M, Razdorov G, Trbojević-Akmačić I, et al. Global variability of the human IgG glycome. *Aging (Albany NY)*. 2020;12:15222-59.
152. Sy M, Brandt AU, Lee SU, Newton BL, Pawling J, Golzar A, et al. N-acetylglucosamine drives myelination by triggering oligodendrocyte precursor cell differentiation. *J Biol Chem*. 2020;295:17413-24.
153. Ip PP, Li Q, Lin WH, Chang CC, Fann CSJ, Chen HY, et al. Analysis of site-specific glycan profiles of serum proteins in patients with multiple sclerosis or neuromyelitis optica spectrum disorder - A pilot study. *Glycobiology*. 2021;31:1230–8.
154. Clerc F, Reiding KR, Jansen BC, Kammeijer GSM, Bondt A, Wuhrer M. Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconj J*. 2016;33:309–43.
155. Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci*. 2011 Jan;3(1):118-27.
156. Fiorini A, Koudriavtseva T, Bucaj E, Coccia R, Foppoli C, Giorgi A, et al. Involvement of oxidative stress in occurrence of relapses in multiple sclerosis: the spectrum of oxidatively modified serum proteins detected by proteomics and redox proteomics analysis. *PLoS One*. 2013;8:e65184.
157. Amin B, Maurer A, Voelter W, Melms A, Kalbacher H. New potential serum biomarkers in multiple sclerosis identified by proteomic strategies. *Curr Med Chem*. 2014;21:1544-56.
158. Milstein JL, Barbour CR, Jackson K, Kosa P, Bielekova B. Intrathecal, Not Systemic Inflammation Is Correlated With Multiple Sclerosis Severity, Especially in Progressive Multiple Sclerosis. *Front Neurol*. 2019;10:1232.
159. Iwanowski P, Losy J. Immunological differences between classical phenotypes of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2015;349:10-4.
160. Kölliker Frers RA, Otero-Losada M, Kobiec T, Udovin LD, Aon Bertolino ML, Herrera MI, et al. Multidimensional overview of neurofilament light chain contribution to comprehensively understanding multiple sclerosis. *Front Immunol*. 2022;13:912005.
161. Meca-Lallana JE, Casanova B, Rodríguez-Antigüedad A, Eichau S, Izquierdo G, Durán C, et al. Consensus on early detection of disease progression in patients with multiple sclerosis. *Front Neurol*. 2022;13:931014.

9. POPIS KRATICA

2-AB: 2-aminobenzamid

ADCC: stanicama posredovana citotoksičnost ovisna o antitijelima

ADCP: stanicama posredovana fagocitoza ovisna o antitijelima

Alb: albumin

ATP: adenzin-trifosfat

BCR: receptor B-stanica

bGlcNAc: račvajući N-acetilglukozamin

CDC: komplementom posredovana citotoksičnost

CIS: klinički izolirani sindrom

DMSO: dimetilsulfoksid

DNK: deoksiribonukleinska kiselina

EBV: Epstein Barrov virus

EDSS: Expanded Disability Status Scale

ER: endoplazmatski retikul

Fab: fragment molekule imunoglobulina koji veže antigen

Fc: kristabilni fragment molekule imunoglobulina

FLAIR: *fluid-attenuated inversion recovery* sekvenca magnetske rezonancije

G0: agalaktozilacija

G1: monogalaktozilacija

G2: digalaktozilacija

GA: Golgijev aparat

HILIC-UPLC: tekućinska kromatografija ultravisoke učinkovitosti temeljena na hidrofilnim interakcijama

HLA: sustav glavnih antigena tkivne snošljivosti u ljudi

IgG: imunoglobulin G

IL-17: interleukin 17

INF γ : interferon γ

KMB: krvno-moždana barijera

Man: manoza

MHC-II: major histocompatibility complex-II

MRZH reakcija: pozitivna virus-specifična antitijela na barem jedan od neurotropnih virusa morbili, rubela, varicella zoster i herpes simpleks 1 i 2 viruse

MS: multipla skleroza

NAWM: bijela tvar normalnog izgleda

OIgG: oligoklonalni imunoglobulini G

PBS: fosfatom puferirana otopina

PPMS: primarno-progresivna multipla skleroza

ProA: prokainamid-hidroklorid

QChit: kvocijent hitotriozidaze u likvoru i serumu

RRMS: relapsno-remitentna multipla skleroza

SDS: natrijev dodecilsulfat

SPMS: sekundarno-progresivna multipla skleroza

SŽS: središnji živčani sustav

TLR: receptor nalik na Toll

10. ŽIVOTOPIS I POPIS JAVNO OBJAVLJENIH RADOVA

Ana Turčić rođena je 19. lipnja 1988. godine u Zagrebu gdje je pohađala osnovnu školu i II. gimnaziju. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Medicinska biokemija, upisala je 2007. godine. Diplomirala je 2012. godine stekavši zvanje magistra medicinske biokemije. Nakon pripravničkog staža, 2014. godine zaposlila se u Odjelu za citogenetiku hematoonkoloških bolesnika i FISH dijagnostiku u Klinici za pedijatriju Kliničkoga bolničkog centra Zagreb gdje je radila do 2015. godine. Specijalističko usavršavanje odradila je u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb, a specijalistički ispit položila je 2019. godine stekavši zvanje specijalista medicinske biokemije i laboratorijske medicine. Od 2019. godine radi u Odjelu za opću biokemiju i analitiku cerebrospinalne tekućine. Od 2018. godine asistent je u Katedri za kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Zdravstvenog veleučilišta u Zagrebu.

Aktivni je član Hrvatske komore medicinskih biokemičara (HKMB) i Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku dijagnostiku (HDMBLM). Od 2015. godine urednik je za znanstveno-istraživačku čestitost časopisa *Biochemia Medica*. Od 2023. godine voditelj je Radne grupe za likvorsku dijagnostiku HDMBLM-a.

Aktivno je sudjelovala na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova. Autor je i suautor 12 znanstvenih članaka objavljenih u časopisima indeksiranim u bazi *Web of Science Core Collection*, dva članka u časopisima indeksiranim u ostalim bazama te četiri poglavlja u udžbenicima i priručnicima. Autor je i suautor brojnih posterskih sažetaka.

Radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u *Web of Science Core Collection*:

1. Cigula Kurajica V, Vogrinc Ž, **Turčić A**, Galić S. Determination of cystatin C reference interval for children in Croatia. *Biochem Med (Zagreb)*. 2024;34:010702.
2. **Turčić A**, Štajduhar A, Vogrinc Ž, Zaninović L, Rogić D. Machine learning to optimize cerebrospinal fluid dilution for analysis of MRZH reaction. *Clin Chem Lab Med*. 2023 Oct 4. doi: 10.1515/cclm-2023-1013. [Epub ahead of print]
3. **Turčić A**, Radovani B, Vogrinc Ž, Habek M, Rogić D, Gabelić T, Zaninović L, Lauc G, Gudelj I. Higher MRI lesion load in multiple sclerosis is related to the N-glycosylation changes of cerebrospinal fluid immunoglobulin G. *Mult Scler Relat Disord*. 2023;79:104921.

4. Rade A, Đuras A, Kocijan I, Banković Radovanović P, **Turčić A**. Simple thrombin-based method for eliminating fibrinogen interference in serum protein electrophoresis of haemodialysed patients. *Biochem Med (Zagreb)*. 2020;30:020705.
5. **Mlinaric A**, Vogrinc Z, Drensek Z. Effect of sample processing and time delay on cell count and chemistry tests in cerebrospinal fluid collected from drainage systems. *Biochem Med (Zagreb)* 2018;28:030705.
6. **Mlinaric A**, Horvat M, Supak Smolcic V. Dealing with the positive publication bias: why you should really publish your negative results. *Biochem Med (Zagreb)* 2017;27:030201.
7. Rako I, **Mlinaric A**, Dozelencic M, Fressl Juros G, Rogic D. Effect of different pre-analytical conditions on plasma lactate concentration. *Biochem Med (Zagreb)*. 2018;28:020701.
8. **Mlinaric A**, Milos M, Herak Coen D, Fucek M, Rimac V, Zadro R, Rogic D. Autovalidation and automation of the postanalytical phase of routine hematology and coagulation analyses in a university hospital laboratory. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56:454-62.
9. Horvat M, **Mlinaric A**, Omazic J, Supak Smolcic V. An analysis of medical laboratory technology journals' instructions for authors. *Sci Eng Ethics*. 2016;22:1095-106.
10. Supak Smolcic V, **Mlinaric A**, Antoncic D, Horvat M, Omazic J, Simundic AM. ICMJE authorship criteria are not met in a substantial proportion of manuscripts submitted to *Biochemia Medica*. *Biochem Med (Zagreb)* 2015;25(3):324-34.

Revijalni radovi objavljeni u časopisima indeksiranima u Web of Science Core Collection:

1. **Mlinarić A**, Horvat M, Šupak Smolčić V. Dealing with the positive publication bias: Why you should really publish your negative results. *Biochem Med (Zagreb)*. 2017 Oct 15;27(3):030201.
2. Borovecki A, **Mlinaric A**, Horvat M, Supak Smolcic V. Informed consent and ethics committee approval in laboratory medicine. *Biochem Med (Zagreb)* 2018;28(3):030201.

Izvorni radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u ostalim bazama:

1. **Mlinarić A**, Fressl Juroš G, Rogić D. Massive RBC fragmentation masks severe thrombocytopenia in both impedance and optical platelet count measurements – a case report of a neonate on ECMO support. *SIGNA VITAE* 2016;12(1):128-130.

Pregledni radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u ostalim bazama:

1. Vogrinc Ž, **Mlinaric A**. Biljezi traumatske ozljede mozga. Zbornik sveučilišta *Libertas*. 2019;4;155-66.

11. PRILOG

Doktorskoj disertaciji prilaže se izvorni znanstveni rad objavljen u časopisu zastupljenom u bazi *Web of Science Core Collection*:

Turčić A, Radovani B, Vogrinc Ž, Habek M, Rogić D, Gabelić T, Zaninović L, Lauc G, Gudelj I. Higher MRI lesion load in multiple sclerosis is related to the N-glycosylation changes of cerebrospinal fluid immunoglobulin G. *Mult Scler Relat Disord.* 2023;79:104921.



Contents lists available at ScienceDirect

Multiple Sclerosis and Related Disorders

journal homepage: www.elsevier.com/locate/msard

Higher MRI lesion load in multiple sclerosis is related to the N-glycosylation changes of cerebrospinal fluid immunoglobulin G

Ana Turčić^a, Barbara Radovani^b, Željka Vogrinc^{a,c}, Mario Habek^{d,e}, Dunja Rogić^{a,c}, Tereza Gabelić^{d,e}, Ljiljana Zaninović^a, Gordan Lauc^{c,f}, Ivan Gudelj^{b,f,*}^a Department of Laboratory Diagnostics, University Hospital Centre Zagreb, Zagreb, Croatia^b Department of Biotechnology, University of Rijeka, Rijeka, Croatia^c Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia^d Department of Neurology, University of Zagreb School of Medicine, Zagreb, Croatia^e Referral Center for Autonomic Nervous System Disorders, Department of Neurology, University Hospital Centre Zagreb, Zagreb, Croatia^f Genos Glycoscience Research Laboratory, Zagreb, Croatia

ARTICLE INFO

Keywords:

N-glycosylation
Multiple sclerosis
Autoimmune diseases
Demyelinating diseases
Immunoglobulin G

ABSTRACT

Background: Intrathecal clonal expansion of antibody-producing plasma cells in multiple sclerosis (MS) perpetuates central nervous system injury and is associated with active demyelination. Immunoglobulin G (IgG) effector functions are modulated by linked N-glycan structures. The aim of the study was to detect potential differences in N-glycosylation of IgG in serum and cerebrospinal fluid (CSF) and total sera proteins between people with MS and those in whom the diagnosis of MS was excluded. Furthermore, we investigated the association with standard laboratory biomarkers of intrathecal inflammation as well as clinical and neuroradiological disease activity.

Methods: This cross-sectional study included patients with suspected demyelinating disease. MS diagnosis was based on the 2017 McDonald criteria and controls were patients with excluded MS diagnosis. N-glycans were compared with Expanded Disability Status Scale (EDSS), magnetic resonance imaging (MRI) markers of disease activity and biomarkers of intrathecal inflammation (cell count, CSF-IgG concentration, percentage of intrathecal IgG, oligoclonal bands (OCB), virus-specific antibody index (MRZH reaction)).

Results: Differences between groups were observed only in the CSF-IgG N-glycome. In MS, the presence of bisecting N-acetylglucosamine (Padj=2.63E-05) and monogalactosylation (Padj=1.49E-06) were more abundant and associated with positive OCBs. N-glycans monogalactosylated at the α6 arm FA2[6]G1 ($r = 0.56$) and FA2[6]BG1 ($r = 0.45$) correlated with percentage of intrathecal IgG, but not total CSF-IgG. This trait was also more abundant in MRZH positive people with MS who had higher MRI lesion load ($P = 0.018$) but unrelated to active lesions or EDSS.

Conclusions: More abundant monogalactosylation of intrathecally synthesized IgG is the most prominent trait in MS and is associated with higher MRI lesion load.

1. Introduction

The interplay between immune cells in a proinflammatory milieu in multiple sclerosis (MS) results in myelin destruction and the formation

of central nervous system (CNS) lesions (van Langelaar et al. 2020). B-cells activate T-cells as antigen presenting cells, secrete cytokines for inter-cell signaling and differentiate into antibody-secreting plasma cells which can be detected as oligoclonal intrathecal synthesis in

List of Abbreviations: ADCC, antibody-dependent cellular phagocytosis; BBB, blood-brain barrier; bGlcNAc, bisecting N-acetylglucosamine; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; EDSS, Expanded Disability Status Scale; HILIC-UPLC, ultra-high performance liquid chromatography based on hydrophilic interactions; IgG, immunoglobulin G; MRI, magnetic resonance imaging; MRZH, at least one positive antibody specific index to either measles, rubella, varicella zoster or herpes simplex 1/2 virus; OCB, oligoclonal bands; PPMS, primary progressive multiple sclerosis; pwMS, people with multiple sclerosis; RRMS, relapse remitting multiple sclerosis; SDS, sodium dodecyl sulfate.

* Corresponding author at: Department of Biotechnology, University of Rijeka, Radmile Matejčić 2, HR 51000, Rijeka, Croatia.

E-mail address: ivan.gudelj@uniri.hr (I. Gudelj).

<https://doi.org/10.1016/j.msard.2023.104921>

Received 28 June 2023; Received in revised form 18 July 2023; Accepted 28 July 2023

Available online 29 July 2023

2211-0348/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

cerebrospinal fluid (CSF) (Brändle et al., 2016). Oligoclonal bands (OCB) are found in almost all people with MS (pwMS) (Thompson et al., 2018) and are a persistent finding due to the local intrathecal clonal expansion, even when patients are on highly efficient disease-modifying therapy (Stübe et al., 2022). These antibodies are presumably involved in perpetuating CNS injury and associated with active demyelination (Breij et al., 2008). Also, CSF antibodies isolated from pwMS were shown to be able to induce demyelination and axonal damage in an *ex-vivo* model (Blauth et al., 2015). OCBs suggest an active disease course as OCB-positive patients with the clinically isolated syndrome (CIS) are likely to later convert to clinically defined MS (Tintore et al., 2015) while MS patients without OCBs have a more favorable prognosis (Karrenbauer et al., 2021).

Genetic and environmental factors increase the risk of MS, and their epistatic interactions induce changes in the inflammatory response, partially due to the dysregulation of post-translation modifications such as N-glycosylation (Grigorian et al., 2012). Glycosylation is a process without a pre-set template during which carbohydrate structures are synthesized in a series of enzymatic reactions controlled by substrate availability, enzyme activity, and gene expression. Physical characteristics and biological function of most proteins depend on the linked glycan structure (Ohtsubo and Marth 2006). N-glycan structure at the conserved asparagine 297 in each of the CH2 domains of the Fc region of immunoglobulin G (IgG) directly affects its effector functions: complement-dependent cytotoxicity, antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and antibody-dependent cellular phagocytosis (Dekkers et al., 2017; Gudelj et al., 2018). N-glycosylation patterns of IgG, specifically the core fucose, bisecting N-acetylglucosamine (bGlcNAc), galactosylation and sialylation, are altered in inflammation and modulate pro- or anti-inflammatory effector functions by changing the affinity to Fc receptors (Gudelj et al., 2018). Changes in IgG N-glycans were seen in systemic and organic autoimmune diseases, and proinflammatory N-glycosylation pattern is connected to disease activity, progression and severity of symptoms (Ercan et al., 2010; Kemna et al., 2017; Fokkink et al., 2014).

Given the association of N-glycosylation with different autoimmune diseases and the lack of studies exploring alterations of N-glycosylation of CSF-IgG in MS, we examined N-glycosylation of total serum proteins together with serum and CSF-derived IgG on patients in whom CNS demyelinating disease was suspected and compared it to those with established diagnosis of MS. Also, we investigated the association of N-glycosylation with standard laboratory biomarkers of intrathecal inflammation and MS activity and neurological status.

2. Materials and methods

This cross-sectional study included patients from the Department of Neurology, University Hospital Center Zagreb, who underwent diagnostic procedures for suspected CNS demyelinating disease. Based on the 2017 McDonald criteria for MS diagnosis (Thompson et al., 2018), patients were categorized into pwMS group: relapse remitting MS (RRMS), primary progressive MS (PPMS), and CIS; and control group: other neurological and demyelinating diseases. The number of relapses, Expanded Disability Status Scale (EDSS), and the total number and the presence of gadolinium-enhancing magnetic resonance imaging (MRI) lesions were collected. According to the MRI lesion load, the patients were classified as having <9 or ≥9 T2 or FLAIR CNS lesions, and lesions were considered active if at least one gadolinium-enhancing lesion was detected. The study was approved by the institution's Ethical Committee (approval number 8.1-19/280-3). All participants have given their informed consent to be included in the study.

2.1. Laboratory analysis

CSF was collected by lumbar puncture into a tube without additive. A paired blood sample was collected into a tube with gel and clot activator.

CSF cells were microscopically counted in Fuchs-Rosenthal chamber. Afterwards, CSF and blood were centrifuged (3500 rpm, 10 min). CSF supernatant and serum were aliquoted and stored at -80 °C for glycan analysis. CSF was stored for glycan analysis if >1 mL was available for storage.

Albumin and IgG concentrations were determined by nephelometry (Atellica NEPH 630, Siemens Healthineers, Germany). CSF/serum quotients (QAlb, QIgG) were calculated, and the percentage of intrathecal IgG synthesis and function of the blood-brain barrier (BBB) was assessed (Reiber 1994). OCBs were detected by isoelectric focusing and immunofixation of IgG with peroxidase-labelled antisera in agarose gel (Sebia, France). The bands were interpreted according to the consensus (Hospital et al., 1994). Type 2 and 3 were considered as having positive OCBs if at least two distinct bands were visualized only in CSF.

Virus-specific antibody index (ASI) to morbilli, rubella, varicella zoster and herpes simplex 1/2 viruses (MRZH reaction) were determined in OCB positive patients (Euroimmun, Germany). ASI was considered positive if >1.5 and consequently patients were classified as MRZH positive if they had at least one positive ASI.

The chitotriosidase activity was measured in CSF and serum by the formation of fluorescent product of 4-methylumbelliferyl-β-N,N,N-triacetylchitotrioside (Sigma Aldrich, USA) after incubation of 5 μL of the sample with 100 μL of the 22 μM substrate in a McIlvaine buffered solution (60 min, 37 °C, pH 5.2). The reaction was stopped with 300 μL of 0.2 M glycine-NaOH buffer (pH 10.4). CSF/serum chitotriosidase quotient (QChit) was calculated. The patients with the chitotriosidase activity <10 μmol/L/h were assumed to be chitotriosidase deficient and QChit was not calculated.

2.2. Isolation of IgG from serum and CSF

Serum and CSF IgG were isolated by affinity chromatography as described previously (Pucić et al., 2011). Serum samples diluted 7-fold with phosphate buffered saline (PBS) and 1–2 mL of undiluted CSF were filtered through an AcroPrep wvPTFE 0.45 μL filter plate (Pall Corporation, USA). Samples were then transferred to a monolithic 96-well Protein G plate (BIA Separations, Slovenia) and washed with PBS. IgG was eluted from the Protein G plate with 100 mM formic acid (Merck, Germany) and immediately neutralized in 1 M ammonium bicarbonate (Across Organics, USA). Eluates were dried overnight and stored at -20 °C until the deglycosylation procedure.

2.3. Deglycosylation and labeling of N-glycans from IgG and total serum proteins

Isolated IgG and serum samples were denatured by addition of sodium dodecyl sulfate (SDS) and incubation at 65 °C. The excess of SDS was neutralized with Igepal-CA630 (Sigma-Aldrich, USA), and the N-glycans were released by addition of PNGase F (Promega, USA). The released serum N-glycans were labelled with 2-aminobenzamide (2-AB) as described in Pavić et al. (2018), while IgG N-glycans were labelled with procainamide hydrochloride (ProA). Firstly, 25 μL of procainamide mixture containing 4.32 mg of ProA (Sigma-Aldrich) in glacial acetic acid (Honeywell, Charlotte, NC, USA)/dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich) (30:70) was added per sample, followed by incubation at 65 °C for 1 h. Then, 25 μL of a reducing agent solution consisting of 4.48 mg of 2-picoline borane (J&K Scientific, Beijing, China) in glacial acetic acid/dimethyl sulfoxide (30:70) was added per sample and incubated for another 1.5 h at 65 °C. The samples were cooled to a room temperature for 30 min. Subsequent purification of labelled N-glycans was identical for IgG and serum samples. Excess reagents were removed using hydrophilic interaction liquid chromatography-solid phase extraction with an ACROPREPADV 1 mL 0.2 μm wvPTFE plate (Pall) as the stationary phase. The labelled N-glycans were eluted with ultrapure water and stored at -20 °C until analysis.

2.4. N-glycan analysis by HILIC-UPLC

Fluorescently labelled N-glycans were separated by ultra-high performance liquid chromatography based on hydrophilic interactions (HILIC-UPLC) on Waters Acquity UPLC instrument (Waters, USA). Samples were kept at 10 °C before injection, and the separation temperature was 60 °C for IgG and 25 °C for serum N-glycans. Labelled N-glycans were separated on a Waters Glycan Ethylene Bridged Hybrid amide chromatography column with 100 mM ammonium formate, pH 4.4, as solvent A, and acetonitrile as solvent B. For ProA-labelled IgG N-glycans, separation was performed with a linear gradient of 25–38% solvent A at a flow rate of 0.40 ml/min in a 29-minute analytical run. Excitation and emission wavelengths were set at 310 and 370 nm, respectively. In the case of 2-AB labelled serum N-glycans, the separation method used a linear gradient of 30–47% solvent A at a flow rate of 0.56 ml/min in a 25-minute analytical run. The excitation and emission wavelengths were set to 250 and 428 nm, respectively. The N-glycan abundance in each peak was expressed as a percentage of the total integrated area. For IgG glycans, six derived traits were calculated in addition to the 24 directly measured glycan traits. For plasma glycans, 16 derived traits were calculated in addition to the 39 directly measured glycan traits. Detailed glycan structures and derived traits calculation for IgG and total serum proteins are available in the Table S1 and Table S2 of the Supplementary Material, respectively.

2.5. Statistical analysis

The Shapiro-Wilks test was used to test the normality of data distribution. Depending on the normality of distribution, the data were presented with mean and standard deviation (SD) or median and interquartile range (IQR). Qualitative data were presented as percentages. The correlation testing was performed using the Spearman rank test. The differences between quantitative data were tested with either Mann-Whitney or independent samples *t*-test for non-normally and normally distributed data, respectively. Differences between qualitative data were tested with Chi-square or Fisher's exact test.

To remove experimental variation from the measurements, normalization and batch correction were performed on the UHPLC glycan data. To make measurements across samples comparable, normalization by total area was performed. Prior to batch correction, normalized glycan measurements were log-transformed due to right-skewness of their distributions and the multiplicative nature of batch effects. Batch correction was performed on log-transformed measurements using pyComBat (Behdenna et al., 2023).

Association analyses for glycomic measurements were performed using a regression model with age, gender, smoking status and the use of hormonal therapy included as additional covariates. The false discovery rate was controlled using Benjamini-Hochberg procedure. The statistical analysis of clinical and laboratory data was performed in MedCalc Statistical Software version 20.215 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium) and Python programming language (version 3.9.1) and Jupyter Notebooks (Kluyver et al., 2016) for glycomic measurements.

3. Results

In total, 308 participants were included (pwMS=190, controls=118). CSF was available for glycan analysis for 224 participants (pwMS=146, controls=78). Controls and pwMS did not differ according to sex ($P = 0.615$), however, pwMS were younger compared to the controls (36 (range 17–74) vs 43 (range 17–75), respectively; $P < 0.001$). Most pwMS had RRMS (87%), higher lesion load, more gadolinium enhancing lesions, more relapses, and higher markers of intrathecal inflammation compared to controls. Most pwMS (74%) had either no or minimal disability (EDSS<2). The subjects' clinical and laboratory characteristics are listed in the Table 1.

Table 1

Demographic and laboratory data of people with MS and controls.

	pwMS (N = 190)	Controls (N = 118)	P
Sex, n of females (%)	128 (67)	83 (70)	0.615
Age, median (min-max)	36 (17–74)	43 (17–75)	<0.001
Diagnosis	165 RRMS 11 PPMS 14 CIS	57 ODD 61 OND	na
EDSS, n (%)		na	na
	0 76 (40)		
	1 64 (34)		
	2 31 (16)		
	≥3 19 (10)		
MRI lesions, n of patients with ≥9 T2/FLAIR lesions (%)	124 (65)	34 (29)	<0.001
Gadolinium enhancing lesions (n/total patients with applied contrast)	85/167	12/110	0.004
Reported relapses prior to LP, n (%)			
	0 113 (59)	101 (86)	
	1 45 (24)	9 (8)	
	2 13 (7)	5 (4)	
	>2 8 (4)	2 (2)	
Progressive type	11 (5)	0 (0)	
Cell number, /μL, median (IQR)	4 (2–7)	2 (1–3)	<0.001
Albumin - quotient, median (IQR)	5.3 (4.4–6.7)	5.3 (4.1–6.8)	0.767
IgG - quotient, median (IQR)	3.9 (2.9–5.6)	2.5 (1.9–3.3)	<0.001
IF-IgG, %	0 (0–32)	0 (0–0)	<0.001
Chitotriosidase - quotient, median (IQR)	0.19 (0.1–0.37)	0.09 (0.06–0.14)	<0.001
BBB function, n of participants with dysfunctional BBB (%)	60 (32)	27 (23)	0.118
OCB type			
	1 11 (6)	90 (76)	
	2 152 (80)	14 (12)	
	3 25 (13)	5 (4)	
	4 2 (1)	8 (7)	
	5 0 (0)	1 (0)	
OCB positive, n (%)	177 (93)	19 (16)	<0.0001
MRZH reaction positive (n, total number)	90/177	na	na

Values in bold are statistically significant ($P < 0.05$).

ASI, specific antibody index; CSF, cerebrospinal fluid; BBB, blood-brain barrier; EDSS, Expanded Disability Status Scale score; IgG, immunoglobulin G; IF-IgG, percentage of intrathecal IgG synthesis; LP, lumbar puncture; MRZH reaction, at least one positive antibody specific index to either measles, rubella, varicella zoster or herpes simplex 1/2 virus; na, not applicable; OCB, oligoclonal bands; ODD, other demyelinating diseases; OND, other neurological diseases.

3.1. Differences in N-glycosylation between people with MS and controls

No differences in individual N-glycan structures or derived N-glycan traits of total serum proteins and serum IgG N-glycome were found between pwMS and controls (Table S3, Table S4). However, differences between groups were observed in N-glycome of CSF-IgG, mainly revolving around the presence of bGlcNAc (Padj=2.63E-05) and monogalactosylation (Padj=1.49E-06). Specifically, the abundances of bisected glycan structures (FA2B, FA2[6]BG1 and A2BG2), as well as monogalactosylated structures (FA2[6]G1 and FA2[6]BG1) were significantly increased in pwMS. The bare N-glycan structure A2 was also found to be increased, while decreased were fucosylated FA1, FA2G2S2 and FA2[3]G1 structures (Table 2).

The intrathecally confined N-glycosylation changes unique to CSF-IgG in relation to respective abundances of serum-IgG N-glycans are shown in Fig. 1.

3.2. N-glycans and intrathecal inflammation

As N-glycosylation of serum total proteins and serum originated IgG was shown not to differ between controls and pwMS, we tested if CSF-IgG N-glycans and N-glycan traits were generally associated with

Table 2

Differences in CSF-IgG N-glycans and derived glycan traits in people with MS compared to controls.

Glycan	Effect	P-value	P-adjusted*
GP1	-0.28207	4.05E-06	3.04E-05
GP2	0.227441	0.006563	0.021876
GP3	-0.01197	0.869079	0.899047
GP4	-0.00384	0.913989	0.913989
GP5	-0.07012	0.029753	0.076224
GP6	0.097169	0.010084	0.030252
GP7	0.105695	0.066932	0.143427
GP8	0.060829	5.92E-06	3.55E-05
GP9	-0.09439	1.58E-05	7.90E-05
GP10	0.206719	4.14E-12	1.24E-10
GP11	0.009248	0.715733	0.766857
GP12	-0.02255	0.707609	0.766857
GP13	0.106993	0.004591	0.017215
GP14	-0.05086	0.083383	0.166765
GP15	0.034928	0.210076	0.300109
GP16	-0.03034	0.156115	0.260191
GP17	-0.02679	0.41889	0.502668
GP18	-0.04283	0.199519	0.299278
GP19	-0.07371	0.03303	0.076224
GP20	-0.06279	0.14268	0.251788
GP21	-0.0202	0.582837	0.672504
GP22	0.062768	0.332734	0.449177
GP23	-0.18966	0.000138	0.000592
GP24	-0.04551	0.344369	0.449177
G0	0.027479	0.405593	0.502668
G1	0.044218	9.95E-08	1.49E-06
G2	-0.03672	0.187488	0.296034
F	-0.00336	0.110537	0.207256
B	0.094031	2.63E-06	2.63E-06
S	-0.05289	0.033006	0.076224

CSF-IgG, cerebrospinal fluid immunoglobulin G; MS, multiple sclerosis.

* False discovery rate was controlled using Benjamini–Hochberg method. The values in bold are statistically significant ($P < 0.05$).

biomarkers of intrathecal inflammation and whether the relation of N-glycosylation and intrathecal inflammation is somewhat different in MS.

3.2.1. N-glycosylation changes with CSF cell count

Inflammatory-related changes in CSF-IgG glycans were present in individuals with CSF cell count higher than $5/\mu\text{L}$. More precisely, CSF-IgG glycans were more bisected (Padj=0.01802) and less sialylated (Padj=0.00054), and digalactosylated (Padj=5.92E-05). Therefore, agalactosylated (Padj=0.00228) and monogalactosylated (Padj=0.00844) structures were more abundant. However, in pwMS these differences were more (Table S5). Only lower digalactosylation (Padj=0.024) and sialylation (Padj=0.03031) and higher monogalactosylation (Padj=0.03712) were present in case of elevated CSF cell count. The BBB of these patients was more often dysfunctional compared to pwMS with normal CSF count ($P = 0.0067$). Mostly N-glycan structures containing core fucose and bGlcNAc (FA2B, FA2[6]BG1) were higher in all individuals, but unchanged in pwMS related to CSF cell count. Other changes in individual N-glycans in pwMS were the same as in all participants (Table S5).

3.2.2. Correlations of N-glycosylation traits in pwMS with intrathecally synthesized IgG fraction and total CSF IgG concentration

CSF-IgG concentration poorly correlated with N-glycans. However, intrathecally synthesized IgGs were more monogalactosylated and strongly correlated with specific N-glycan structures (Figure S1A). In our study, intrathecal IgG synthesis was predominantly present in pwMS (Table 1). Therefore, the significant correlations of FA2[6]G1 ($r = 0.54$, $P < 0.001$), FA2[6]BG1 ($r = 0.48$, $P < 0.001$), and FA2[3]G1 ($r = -0.45$, $P < 0.001$), FA1 ($r = -0.41$, $P < 0.001$) and FA2G2S2 ($r = -0.34$, $P < 0.001$) with intrathecal IgG fraction was associated with MS (Figure S1B).

3.2.3. OCB types differ in N-glycan abundances

Participants with OCBs restricted to CSF had more monogalactosylated N-glycans (OCB type 2 Padj=1.57E-5, OCB type 3 Padj=0.04769) and N-glycans containing bGlcNAc (OCB type 2 Padj=1.67E-5, OCB type 3 Padj=0.01026) compared to OCB negative participants. Specifically, the abundances of N-glycan structures A2, FA2B, FA2[6]G1 and FA2[6]BG1 were significantly increased, while FA1, FA2[3]G1 and FA2G2S2 were decreased in participants with type 2 OCBs. CSF-IgG N-glycans in type 3 OCBs were less sialylated (Padj=0.01921) compared to normal CSF finding. The most sialylated N-glycans (A2G2S2, FA2G2S2, FA2BG2S2 and FA2BG2S1) were decreased particularly in participants with type 3 OCBs (Fig. 2, Table S6). Interestingly, we found that higher lesion load was related to the OCB type ($P = 0.0157$) and was more frequent in type 3 OCBs.

3.2.4. Correlation of monogalactosylated and fucosylated N-glycans with MRZH positive pwMS

PwMS with at least one positive ASI, i.e. positive MRZH reaction, had higher lesion load ($P = 0.0001$, Fig. 3A), but MRZH positivity was unrelated to the presence of gadolinium enhancing lesions on MRI or number of relapses. However, MRZH positivity to at least two viruses was more frequent in patients with EDSS > 3 ($P = 0.0297$). MRZH positivity in pwMS was correlated with monogalactosylated N-glycans ($r = 0.42$, $P < 0.001$), mostly with core fucosylated monogalactosylated biantennary glycan structure FA2[6]G1 ($r = 0.46$, $P < 0.001$). Therefore, we were interested to see whether CSF-IgG of MRZH positive pwMS were differently glycosylated compared to MRZH negative pwMS. We found that MRZH positive pwMS had more monogalactosylated N-glycans (Padj=4.24E-06), once more due to the increased abundance of FA2[6]G1 (Padj=6.84E-07) and FA2[6]BG1 (Padj=0.01868) structures. Also, the abundance of afucosylated structures (A2G2 and AG2S1) were decreased in MRZH positive pwMS, and hence fucosylated derived trait was elevated in these patients (Padj=0.04093) (Fig. 3B and C, Table S7).

3.2.5. Chitotriosidase is not associated with N-glycosylation

QCht was significantly higher in pwMS with active lesions ($P = 0.0019$) but did not correlate with any individual N-glycan or glycosylation trait (Figure S1).

3.3. Disease activity and neurological status

We further tested whether certain N-glycans and glycosylation traits were associated with MS status and radiological activity. PwMS with higher lesion load had higher CSF-IgG monogalactosylated N-glycan FA2[6]BG1 (Padj=0.01856), which also happens to be an N-glycan structure that was most prominently different in pwMS compared to controls. Changes in other N-glycans and derived traits were not found in CSF or serum according to lesion load.

Total proteins-, serum- and CSF-IgG N-glycosylation traits did not differ based on disability status as measured by the EDSS scale, the presence of gadolinium enhancing lesions or the number of relapses.

4. Discussion

We investigated total serum proteins, serum- and CSF-IgG N-glycans in pwMS at the time of diagnosis and compared them to the control subjects in whom MS was excluded. We did not detect changes in serum total proteins and IgG N-glycans related to MS, unlike (Cvetko et al., 2020). Although, we did find that core fucose was changed in the same direction with nominal significance, suggesting that the same type of changes in the IgG N-glycome were present. The aforementioned study included pwMS from the Orkney and Shetland Isles with mostly progressive forms which were compared to healthy controls. These patients could have significant genetic and epigenetic factors influencing glycosylation (Stambuk et al., 2020) all of which could explain why other differences were not replicated as the participants in our study

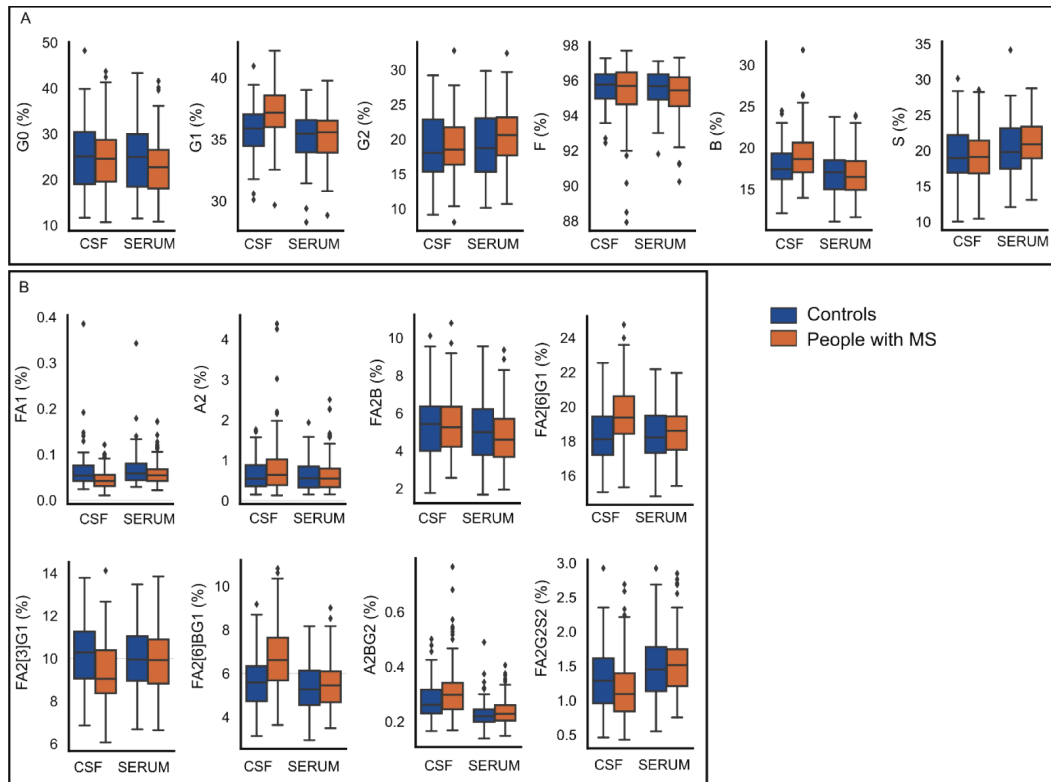


Fig. 1. N-glycosylation of CSF-IgG in relation to respective abundances of serum-IgG N-glycans. A) Monogalactosylation and bisecting GlcNAc derived N-glycosylation traits are more abundant in CSF-IgG of pwMS compared to controls. B) Shown are individual CSF-IgG N-glycan structures which are significantly different in pwMS compared to controls. CSF, cerebrospinal fluid; MS, multiple sclerosis; G0, agalactosylation; G1, monogalactosylation; G2, digalactosylation; B, bisecting N-acetylglucosamine; F, fucosylation; S, sialylation. The N-glycan abundances are represented with boxplots: boxes in the boxplot represent interquartile range (IQR) and the inside line is the median. The whiskers of the boxplot extend 1.5 times the IQR from both percentiles ($Q1 - 1.5 * IQR$ or $Q3 + 1.5 * IQR$). Outliers are plotted individually and represented with black dots.

were recruited at diagnosis and mostly had RRMS. Another study demonstrated that people with progressive MS forms have lower plasma N-acetylglucosamine (Brandt et al., 2021), but we did not detect any changes related to lower abundance of serum bGlcNAc. Also, Ip et al. did not detect N-glycan changes of site-specific serum proteins in RRMS (Ip et al., 2021). Nevertheless, differences in findings between studies could provide an insight to serum-detectable N-glycosylation traits that are either systemically different in progressive MS or change with disease progression.

The only differences in N-glycosylation in MS were detected in CSF, as reported previously (Wuhrer et al., 2015; Decker et al., 2016). Restricted inflammation of the CNS is reflected with more abundant bGlcNAc and monogalactosylated CSF-IgG N-glycosylation traits. Importantly, all monogalactosylated structures were more abundant in MS except FA2[3]G1 which is associated with higher risk for atherosclerotic cardiovascular diseases and cardiovascular events (Menni et al., 2018), all of which are more prevalent in pwMS (Yang et al., 2022).

Lectin-binding studies reported inconsistent findings regarding the changes in CSF-IgG glycosylation patterns (Decker et al., 2016; Kennedy et al., 2022). Results of the study by Wuhrer et al. mostly correspond to the ones reported here, as higher IgG1 CSF fucosylation and bGlcNAc and lower galactosylation were found (Wuhrer et al., 2015). Somewhat surprisingly, sialylation is unaffected in MS as opposed to other autoimmune diseases in which lower sialylation is clearly associated with disease activity and clinical course (Kemna et al., 2017; Fokkink et al.,

2014). Alternative N-glycosylation changes in MS are possibly related to the restriction of inflammation in the CNS compartment (Cao et al., 2022), different availability of substrates in CSF, or genetic variants associated with MS risk (Goris et al., 2015; Grigorian et al., 2012). Since several graphs show considerable overlap of points, the changes are more subtle than dramatic.

We found higher CSF-IgG monogalactosylation and bGlcNAc structures in participants with OCBs. These proinflammatory N-glycosylation traits are significant because positive OCBs are a medium-impact risk for developing clinically defined MS, attaining EDSS score ≥ 3 (Tintore et al., 2015) and conversion to secondary progressive MS (Karrenbauer et al., 2021; Tintore et al., 2015).

In pwMS significant correlation of monogalactosylated N-glycans is present only with intrathecally synthesized IgG fraction. Fucosylation (Wuhrer et al., 2015) and galactosylation (Decker et al., 2016) changes were previously shown to be associated with CSF cell count and markers of IgG intrathecal synthesis, therefore the intrathecally synthesized IgG fraction specifically contributes to the alterations in the glycosylation pattern.

As discussed above, sialylation in MS is not changed compared to the controls. However, sialylation was in fact lower in specific MS subgroups: those with higher CSF cell count or in the case of type 3 OCBs. These patients also tend to have higher lesion load which poses a higher risk of future active disease (Habek et al., 2022). We have demonstrated that pwMS with high CSF cell count more frequently have dysfunctional BBB resulting in the higher influx of serum proteins into the CNS

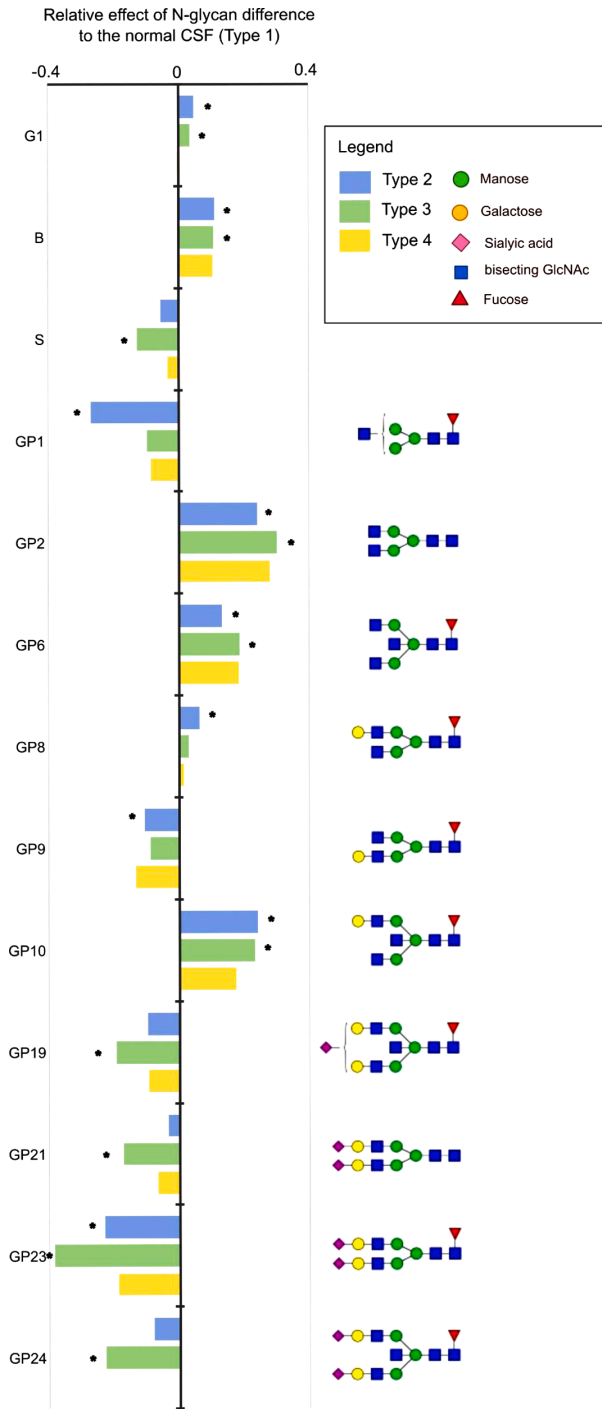


Fig. 2. Relative effect change in N-glycan difference in OCB positive CSF compared to the normal CSF.

Positive OCBs (type 2 and 3) and type 4 CSF findings were compared to the normal CSF. G1, B and S derived traits are affected in positive OCBs. Sialylated N-glycan structures are less abundant in type 3 OCBs. Agalactosylated and N-glycan structures monogalactosylated on the $\alpha 6$ arm are more abundant in positive OCBs.

Asterisk (*) marks statistically significant difference ($P < 0.05$) controlled for the false discovery rate using the Benjamini–Hochberg method. G1, monogalactosylation; B, bisecting N-acetylglucosamine; S, sialylation; OCBs, oligoclonal bands.

compartment, while the type 3 OCB finding corresponds to the presence of the same IgG bands in CSF and serum and only some isolated in CSF. Therefore, lower sialylation in these subgroups could be somewhat related to the serum-borne IgG or underlying inflammatory drivers that regulate the expression of intracellular glycosyltransferases (Cao et al., 2022).

MRZH reaction in pwMS is associated with more monogalactosylated and fucosylated CSF-IgG N-glycans. Clinically they have higher lesion load, and in cases of double ASI positivity are more likely to have higher disability. Therefore, a typically anti-inflammatory trait of lower abundance of afucosylated N-glycans does not correlate with clinical presentation. Possibly, in MRZH negative pwMS, afucosylated IgGs that

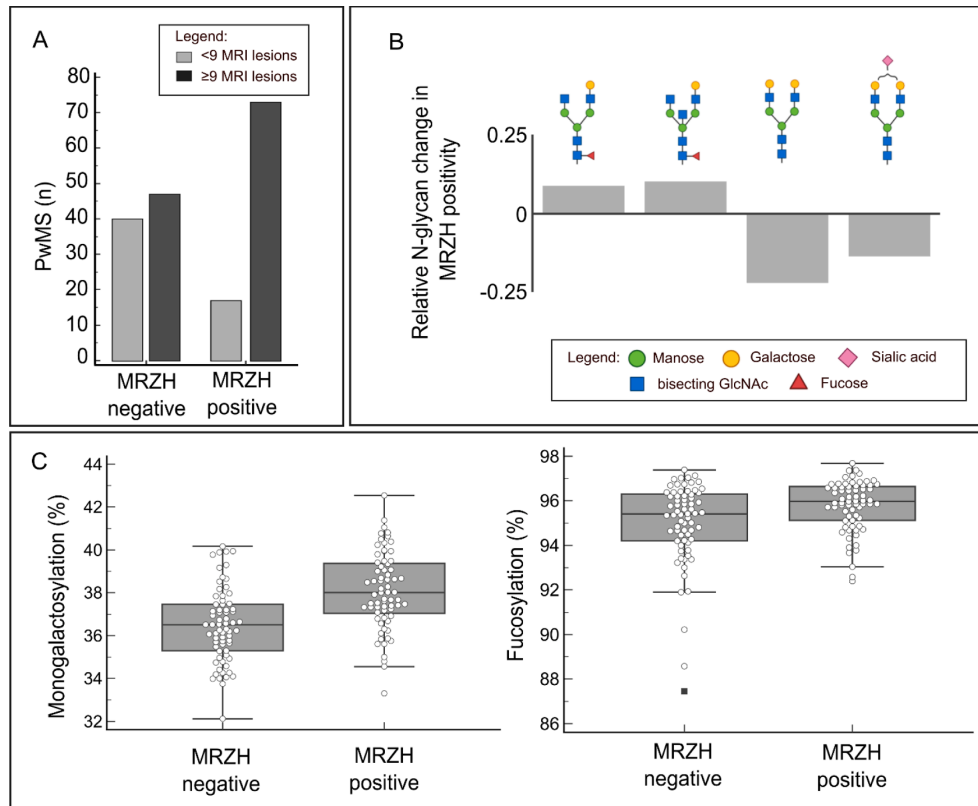


Fig. 3. N-glycosylation changes of CSF immunoglobulin G in MRZH positive people with MS. A) MRZH positive people pwMS more frequently have higher lesion load. B) The graph depicts the relative effect change of individual N-glycans that are related to MRZH positivity in pwMS. C) Monogalactosylation and fucosylation are higher in MRZH positive pwMS. The N-glycan abundances are represented with boxplots: boxes in the boxplot represent interquartile range (IQR) and the inside line is the median. The whiskers of the boxplot extend 1.5 times the IQR from both percentiles ($Q1 - 1.5 * IQR$ or $Q3 + 1.5 * IQR$). Outliers outside the boxplot whiskers are plotted individually.

CSF, cerebrospinal fluid; pwMS, people with multiple sclerosis; MRZH reaction, at least one positive antibody specific index to either measles, rubella, varicella zoster or herpes simplex 1/2 viruses.

do not target CNS antigens saturate Fc receptors on immune cells and modulate immune response by inhibiting ADCC in a similar mechanism to that of the intravenous immunoglobulin therapy (Mimura et al., 2022). This protective effect is attenuated when glycoforms which most prominently influence the affinity to these receptors are reduced, like in MRZH positivity. Additionally, monogalactosylation highly reinforces the proinflammatory antibody effector functions in MS. Previously, no differences in galactosylation of IgG were found in patients suffering from viral meningitis compared to the controls (Decker et al., 2016). Therefore, the observed changes in CSF- IgG galactosylation in MS seem to be disease related and not only associated with inflammation. However, further work is required to see if there are similar or perhaps more dramatic changes in the N-glycosylation traits in viral diseases, like herpes simplex/zoster encephalitis or subacute sclerosing panencephalitis.

A higher lesion load is associated with higher monogalactosylation. PwMS with higher lesion load have a greater risk of future active disease and monogalactosylated IgG antibodies might have a role in potentiating the proinflammatory effects. Other markers of MS disability and activity are unrelated to CSF-IgG N-glycosylation.

Different tertiary structures are formed depending on the presence of particular carbohydrates in individual N-glycans resulting in the altered affinity to Fc receptors even though N-glycan contains a trait generally considered as pro- or anti-inflammatory. For instance, an increased

abundance of N-glycan structures monogalactosylated at the $\alpha 6$ antenna are the ones that contribute mostly to the increased monogalactosylated CSF-IgG derived traits involved in intrathecal inflammation in MS. These isomers have much greater potential for activating Fc effector functions (Hatfield et al., 2022; Aoyama et al., 2019). To summarize our findings, FA2[6]G1 and FA2[6]BG1 in pwMS are highly correlated with IgG intrathecal fraction, more abundant in participants with positive OCB and MRZH positive pwMS, and FA2[6]G1 is also more abundant in pwMS with high CSF cell count. On contrary, also monogalactosylated N-glycans, however on the $\alpha 3$ antenna, are significantly reduced or unchanged in these cases.

5. Conclusion

Monogalactosylation and bGlcNAc N-glycosylation traits of CSF-IgG are more abundant in MS while N-glycosylation of serum proteins is unaffected. Alternative N-glycosylation is present in MS as N-glycans monogalactosylated on the $\alpha 6$ antenna FA2[6]G1 and FA2[6]BG1 are specifically associated with intrathecal antibodies. This N-glycosylation profile seems to be connected to the disease activity as our study has shown that these changes are present in pwMS with higher lesion load.

CRediT authorship contribution statement

Ana Turčić: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Visualization, Writing – original draft. **Barbara Radovani:** Formal analysis, Methodology, Writing – original draft. **Željka Vogrinc:** Conceptualization, Formal analysis, Methodology, Project administration, Writing – review & editing. **Mario Habek:** Methodology, Writing – review & editing. **Dunja Rogić:** Methodology, Project administration, Resources, Writing – review & editing. **Tereza Gabelić:** Methodology, Writing – review & editing. **Ljiljana Zaninović:** . **Gordan Lauc:** Project administration, Resources, Writing – review & editing. **Ivan Gudelj:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Methodology, Resources, Supervision, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

M.H. participated as a clinical investigator and/or received consultation and/or speaker fees from: Biogen, Sanofi Genzyme, Merck, Bayer, Novartis, Pliva/Teva, Roche, Alvogen, Actelion, Alexion Pharmaceuticals, TG Pharmaceuticals. T.G. participated as a clinical investigator and/or received consultation and/or speaker fees from: Biogen, Sanofi Genzyme, Merck, Bayer, Novartis, Pliva/Teva, Roche, Alvogen, Actelion, Alexion Pharmaceuticals, TG Pharmaceuticals. G.L. declares that he is the founder and owner of Genos Glycoscience Ltd., which offers commercial service of glycomic analysis and has several patents in this field. I.G. is an employee of Genos Glycoscience Ltd. The other authors declare that there is no conflict of interest.

Data availability

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Funding

This work was supported by the European Structural and Investment Funds Grant for the Croatian National Centre of Competence in Molecular Diagnostics [grant number KK.01.2.2.03.0006] and Croatian National Centre of Research Excellence in Personalized Healthcare Grant [grant number KK.01.1.1.01.0010]. Funding bodies had no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

Acknowledgements

Not applicable.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:[10.1016/j.msard.2023.104921](https://doi.org/10.1016/j.msard.2023.104921).

References

- Aoyama, M., Hashii, N., Tsukimura, W., et al., 2019. Effects of terminal galactose residues in mannose α 1-6 arm of Fc-glycan on the effector functions of therapeutic monoclonal antibodies. *MAbs* 11, 826–836.
- Behdenna A., Haziza J., Azencott C.A., et al. pyComBat, a Python tool for batch effects correction in high-throughput molecular data using empirical Bayes methods. Available from: <https://www.gnu.org/licenses/gpl-3.0.en.html> (accessed 6 March 2023).
- Blauth, K., Soltys, J., Matschulat, A., Reiter, C.R., et al., 2015. Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid cause demyelination of spinal cord explants. *Acta Neuropathol.* 130, 765–781.
- Brändle, S.M., Obermeier, B., Senel, M., et al., 2016. Distinct oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis recognize ubiquitous self-proteins. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 113, 7864–7869.

- Brandt, A.U., Sy, M., Bellmann-Strobl, J., Newton, B.L., et al., 2021. Association of a marker of N-Acetylglucosamine with progressive multiple sclerosis and neurodegeneration. *JAMA Neurol.* 78, 842–852.
- Breijl, E.C.W., Brink, B.P., Veerhuis, R., et al., 2008. Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 63, 16–25.
- Cao, Y., Song, Z., Guo, Z., et al., 2022. Cytokines in the Immune Microenvironment Change the Glycosylation of IgG by Regulating Intracellular Glycosyltransferases. *Front. Immunol.* 12, 724379.
- Cvetko, A., Kifer, D., Gornik, O., et al., 2020. Glycosylation alterations in multiple sclerosis show increased proinflammatory potential. *Biomedicines* 8, 1–14.
- Decker, Y., Schomburg, R., Németh, E., et al., 2016. Abnormal galactosylation of immunoglobulin G in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Mult. Scler.* 22, 1794–1803.
- Dekkers, G., Treffers, L., Plomp, R., et al., 2017. Decoding the human immunoglobulin G-glycan repertoire reveals a spectrum of Fc-receptor- and complement-mediated-effector activities. *Front. Immunol.* 8, 877.
- Ercan, A., Cui, J., Chatterton, D.E.W., et al., 2010. Aberrant IgG galactosylation precedes disease onset, correlates with disease activity, and is prevalent in autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 62, 2239–2248.
- Fokkink, W.J.R., Selman, M.H.J., Dortland, J.R., et al., 2014. IgG Fc N-glycosylation in Guillain-Barré syndrome treated with immunoglobulins. *J. Proteome Res.* 13, 1722–1730.
- Goris, A., Pauwels, I., Gustavsen, M.W., et al., 2015. Genetic variants are major determinants of CSF antibody levels in multiple sclerosis. *Brain* 138, 632–643.
- Grigorian, A., Mkhikian, H., Li, C.F., et al., 2012. Pathogenesis of multiple sclerosis via environmental and genetic dysregulation of N-glycosylation. *Semin. Immunopathol.* 34, 415–424.
- Gudelj, I., Lauc, G., Pezer, M., 2018. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell. Immunol.* 333, 65–79.
- Habek, M., Adamec, I., Barun, B., et al., 2022. Treatment of relapsing multiple sclerosis - recommendations of the Croatian neurological society. *Croat. Med. J.* 63, 379–388.
- Hatfield, G., Tepliakova, L., Gingras, G., et al., 2022. Specific location of galactosylation in an afucosylated antiviral monoclonal antibody affects its Fc γ RIIIA binding affinity. *Front. Immunol.* 13, 972168.
- Hospital, S., Andersson Hospital Ramon Cajal, S.M., Alvarez-Cermenlo, S.J., et al., 1994. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 57, 897–902.
- Ip, P.P., Li, Q., Lin, W.H., et al., 2021. Analysis of site-specific glycan profiles of serum proteins in patients with multiple sclerosis or neuromyelitis optica spectrum disorder - A pilot study. *Glycobiology* 31, 1230–1238.
- Karrenbauer, V.D., Bedri, S.K., Hillert, J., et al., 2021. Cerebrospinal fluid oligoclonal immunoglobulin gamma bands and long-term disability progression in multiple sclerosis: a retrospective cohort study. *Sci. Rep.* 11, 14987.
- Kemma, M.J., Plomp, R., van Paassen, P., et al., 2017. Galactosylation and sialylation levels of IgG predict relapse in patients with PR3-ANCA associated vasculitis. *EBioMedicine* 17, 108–118.
- Kennedy, P.G.E., Graner, M., Pinton, T., et al., 2022. Aberrant immunoglobulin G glycosylation in multiple sclerosis. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 17, 218–227.
- Kluyver, T., Ragan-Kelley, B., Pérez, F., et al., 2016. Jupyter Notebooks—A publishing format for reproducible computational workflows. In: Positioning and Power in Academic Publishing: Players, Agents and Agendas - Proceedings of the 20th International Conference on Electronic Publishing, ELPUB. 2016. IOS Press BV, pp. 87–90.
- Menni, C., Gudelj, I., Macdonald-Dunlop, E., et al., 2018. Glycosylation profile of immunoglobulin G is cross-sectionally associated with cardiovascular disease risk score and subclinical atherosclerosis in two independent cohorts. *Circ. Res.* 122, 1555–1564.
- Mimura, Y., Mimura-Kimura, Y., Saldova, R., et al., 2022. Enhanced immunomodulatory effect of intravenous immunoglobulin by Fc galactosylation and nonfucosylation. *Front. Immunol.* 13, 818382.
- Ohtsubo, K., Marth, J.D., 2006. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126, 855–867.
- Pavić, T., Dilber, D., Kifer, D., et al., 2018. N-glycosylation patterns of plasma proteins and immunoglobulin G in chronic obstructive pulmonary disease. *J. Transl. Med.* 16, 323.
- Pučić, M., Knežević, A., Vidić, J., et al., 2011. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M111.010090.
- Reiber, H., 1994. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF) — A concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J. Neurol. Sci.* 122, 189–203.
- Štambuk, J., Nakić, N., Vučković, F., et al., 2020. Global variability of the human IgG glycome. *Aging (Albany NY)* 12, 15222–15259.
- Stiße, M., Konen, F.F., Schwenkenbecher, P., et al., 2022. Decreased intrathecal concentrations of free light chains kappa in multiple sclerosis patients taking very high effective disease-modifying treatment. *Diagnostics (Basel)* 12, 720.
- Thompson, A.J., Banwell, B.L., Barkhof, F., et al., 2018. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 17, 162–173.
- Tintore, M., Rovira, A., Río, J., et al., 2015. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain* 138, 1863–1874.

van Langelaar, J., Rijvers, L., Smolders, J., et al., 2020. B and T cells driving multiple sclerosis: identity, mechanisms and potential triggers. *Front. Immunol.* 11, 760.
Wuhrer, M., Selman, M.H.J., McDonnell, L.A., et al., 2015. Pro-inflammatory pattern of IgG1 Fc glycosylation in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J. Neuroinflammation* 12, 235.

Yang, F., Hu, T., He, K., et al., 2022. Multiple sclerosis and the risk of cardiovascular diseases: a Mendelian randomization study. *Front. Immunol.* 13, 861885.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

N-GLIKOZILACIJA IMUNOGLOBULINA G U LIKVORU I SERUMU U MULTIPLOJ SKLEROZI

Ana Turčić

SAŽETAK

Intratekalna oligoklonska ekspanzija plazma-stanica u multiploj sklerozi (MS) podržava ozljedu središnjega živčanog sustava (SŽS) i povezana je s aktivnom demijelinizacijom. Struktura N-glikana na konzerviranom asparaginu 297 u svakoj od CH2 domena Fc regije imunoglobulina G (IgG) izravno utječe na njegove efektorske funkcije. U upali se obrasci N-glikozilacije IgG-a mijenjaju i moduliraju proupalne ili protuupalne efektorske funkcije što se potencijalno odražava na status i aktivnost MS-a. Cilj istraživanja bio je analizirati N-glikozilaciju serumskoga i likvorskog IgG-a te ukupnih serumskih proteina u osoba s MS-om.

Presječna studija uključila je konsekutivne pacijente sa sumnjom na demijelinizacijsku bolest SŽS-a. Dijagnoza MS-a temeljena je na McDonaldovim kriterijima iz 2017. godine, a kontrolna skupina sastojala se od osoba kod kojih je dijagnoza MS-a isključena. Analiza fluorescentno obilježenih N-glikana izoliranih iz ukupnih proteina seruma, serumskoga i likvorskog IgG-a, provedena je tekućinskom kromatografijom ultravisoke učinkovitosti temeljenom na hidrofilnim interakcijama (HILIC-UPLC). N-glikani su uspoređeni s Expanded Disability Status Score (EDSS), znakovima aktivnosti bolesti na magnetskoj rezonanciji (MR), brojem relapsa i biljezima intratekalne upale (broj stanica, koncentracija IgG-a u likvoru i postotak intratekalne sinteze, oligoklonske trake, pozitivan indeks specifičnih antitijela na neki od virusa morbili, rubela, varicella zoster ili herpes simpleks virusa tipa 1 i 2 (MRZH reakcija)).

Razlike među skupinama pronađene su samo u N-glikomu IgG-a likvora. Osobe s MS-om imaju veći udio N-glikana s računjućim N-acetilglukozaminom ($P = 2,63 \times 10^{-5}$) i monogalaktoziliranih N-glikana ($P = 1,49 \times 10^{-6}$) koji su povezani s prisutnosti oligoklonskih traka. Svojstva N-glikozilacije, specifično strukture monogalaktozilirane na $\alpha 6$ anteni: FA2[6]G1 ($r = 0,56$, $P < 0,001$) i FA2[6]BG1 ($r = 0,45$, $P = 0,001$), koreliraju samo s postotkom intratekalne sinteze IgG-a, ali ne i ukupnom koncentracijom IgG-a u likvoru. Navedena svojstva također su više zastupljena u MRZH pozitivnih osoba s MS-om. FA2[6]BG1 struktura je povišena u osoba s MS-om s većim opterećenjem lezijama na MR-u ($P = 0,0186$), ali N-glikozilacija IgG-a iz likvora nije promijenjena ovisno o prisutnosti aktivnih lezija, EDSS-u niti broju relapsa.

Promjene u N-glikozilaciji koje rezultiraju većom monogalaktozilacijom intratekalno sintetiziranih IgG-a najistaknutija su svojstva u MS-u te su povezana s radiološkom aktivnosti bolesti.

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

Rad sadrži: 117 stranica, 32 grafička prikaza, 19 tablica i 161 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: N-glikozilacija, multipla skleroza, autoimune bolesti, demijelinizacijske bolesti, imunoglobulin G, cerebrospinalna tekućina

Mentori: Dr. sc. Ivan Gudelj, docent
Dr. sc. Dunja Rogić, redoviti profesor

Ocjenjivači: Dr. sc. Olga Gornik Kljaić, redoviti profesor
Dr. sc. Mario Habek, izvanredni profesor
Dr. sc. Željka Vogrinc, docent

Rad prihvaćen: 24. travnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Doctoral dissertation

N-GLYCOSYLATION OF IMMUNOGLOBULIN G IN CEREBROSPINAL FLUID AND SERUM IN MULTIPLE SCLEROSIS

Ana Turčić

SUMMARY

The intrathecal oligoclonal expansion of plasma cells in multiple sclerosis (MS) supports central nervous system (CNS) injury and is associated with active demyelination. The structure of the N-glycan at the conserved asparagine 297 in each of the CH2 domains of the Fc region of immunoglobulin G (IgG) directly affects its effector functions. In inflammation, IgG N-glycosylation patterns change and modulate pro-inflammatory or anti-inflammatory effector functions, potentially reflecting MS status and activity. The aim of the research was to analyse N-glycosylation of serum and cerebrospinal fluid (CSF) IgG and total serum proteins in people with MS. A cross-sectional study included consecutive patients with suspected demyelinating disease of the CNS. The diagnosis of MS was based on the 2017 McDonald criteria, and the control group consisted of people in whom the diagnosis of MS was excluded. The analysis of fluorescently labelled N-glycans isolated from total serum proteins, serum and CSF IgG was performed by ultrahigh performance liquid chromatography based on hydrophilic interactions (HILIC-UPLC). N-glycans were compared with Expanded Disability Status Score (EDSS), signs of disease activity on magnetic resonance imaging (MRI), number of relapses and markers of intrathecal inflammation (cell count, IgG concentration in the CSF and percentage of intrathecal synthesis, oligoclonal bands, positive index specific antibodies to either measles, rubella, varicella zoster or herpes simplex viruses type 1 and 2 (MRZH reaction)).

The differences between groups were found only in the N-glycome of CSF IgG. People with MS had a higher proportion of N-glycans with bisecting N-acetylglucosamine ($P = 2.63 \times 10^{-5}$) and monogalactosylated N-glycans ($P = 1.49 \times 10^{-6}$) which were associated with the presence of oligoclonal bands. The N-glycosylation properties, specifically structures monogalactosylated at the $\alpha 6$ antenna: FA2[6]G1 ($r = 0.56$, $P < 0.001$) and FA2[6]BG1 ($r = 0.45$, $P = 0.001$), correlated only with the percentage intrathecal synthesis of IgG, but not with the total concentration of IgG in the CSF. These structures were also more prevalent in MRZH positive people with MS. The FA2[6]BG1 structure was elevated in MS subjects with higher MRI lesion load ($P = 0.0186$), but CSF IgG N-glycosylation was not altered depending on the presence of active lesions, EDSS nor the number of relapses. Changes in N-glycosylation resulting in higher monogalactosylation of intrathecally synthesized IgGs are the most prominent features in MS and are associated with the radiological activity of the disease.

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

Thesis includes: 117 pages, 32 figures, 19 tables and 161 references. The original is in Croatian language.

Keywords: N-glycosylation, multiple sclerosis, autoimmune diseases, demyelinating diseases, immunoglobulin G, cerebrospinal fluid

Mentors: Assistant Professor Ivan Gudelj, PhD
Full Professor Dunja Rogić, PhD

Reviewers: Full Professor Olga Gornik Kljaić, PhD
Associate Professor Mario Habek, PhD
Assistant Professor Željka Vogrinc, PhD

The thesis was accepted: 24th April 2024