

# N-glikozilacija imunoglobulina G u upalnim bolestima crijeva

---

Šimurina, Mirna

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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:163:189762>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-16**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Mirna Šimurina

# **N-GLIKOZILACIJA IMUNOGLOBULINA G U UPALNIM BOLESTIMA CRIJEVA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.





University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Mirna Šimurina

**N-GLYCOSYLATION OF IMMUNOGLOBULIN G IN  
INFLAMMATORY BOWEL DISEASE**

DOCTORAL DISSERTATION

Zagreb, 2018





Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Mirna Šimurina

# **N-GLIKOZILACIJA IMUNOGLOBULINA G U UPALNIM BOLESTIMA CRIJEVA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Dr. sc. Gordan Lauc, red. prof.

Zagreb, 2018.





University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Mirna Šimurina

# **N-GLYCOSYLATION OF IMMUNOGLOBULIN G IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Professor Gordan Lauc, PhD

Zagreb, 2018





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

*Rad je izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu projekta EU FP7-RegPot "Integra-Life" broj: 315997, a u okviru doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.*



## *Zahvala*

*Svome mentoru, prof. dr. sc. Gordanu Laucu, zahvaljujem na ukazanom povjerenju, mentorstvu i pruženoj prilici da budem dio ovog velikog znanstveno-istraživačkog projekta.*

*Svima sa Zavoda za biokemiju i molekularnu biologiju zahvaljujem na razumijevanju, strpljenju i pomoći pri eksperimentalnom radu.*

*Cijeloj ekipi iz Genosa, veliko hvala na savjetima i pomoći, prijateljstvu te ugodnom radnom okruženju.*

*Hvala dragoj Ireni što je Irena. Obogatila si moj život i naučila me puno.*

*Zahvaljujem svojim roditeljima, što su me naučili da vjerujem u sebe i budem hrabra te da se nikada ne predajem. Sestri Željki veliko hvala na marketinškim i nemarketinškim savjetima te pomoći.*

*Svome Domagoju, i kad dođe kraj svijeta i stane planeta...*

*Jakovu hvala što me svakodnevno uči životu. Ti si moja inspiracija!*

*Nikoli hvala što je dio mene. S tobom je svaki dan jedna velika pustolovina!*



## Sadržaj

|   |              |
|---|--------------|
| <b>SAŽETAK.....</b>   | <b>XVIII</b> |
| <b>SUMMARY.....</b>   | <b>XIX</b>   |
| <b>§ 1. UVOD.....</b>   | <b>1</b>     |
| <b>1.1. Upalna bolest crijeva .....</b>   | <b>1</b>     |
| 1.1.1. <i>Pojavnost, prevalencija i rasprostranjenost upalne bolesti crijeva.....</i>             | <i>1</i>     |
| 1.1.2. <i>Uzroci upalne bolesti crijeva .....</i>   | <i>3</i>     |
| 1.1.2.1. <i>Genska predispozicija za upalnu bolest crijeva .....</i>                              | <i>3</i>     |
| 1.1.2.2. <i>Okolišni čimbenici u upalnoj bolesti crijeva .....</i>                                | <i>6</i>     |
| 1.1.3. <i>Dijagnosticiranje i liječenje upalne bolesti crijeva .....</i>                          | <i>6</i>     |
| 1.1.4. <i>Ekonomski učinak upalne bolesti crijeva.....</i>  | <i>8</i>     |
| 1.1.5. <i>Crohnova bolest .....</i>   | <i>8</i>     |
| 1.1.5.1. <i>Patofiziologija Crohnove bolesti.....</i>   | <i>9</i>     |
| 1.1.6. <i>Ulcerozni kolitis .....</i>   | <i>11</i>    |
| 1.1.6.1. <i>Patofiziologija ulceroznog kolitisa.....</i>  | <i>11</i>    |
| 1.1.7. <i>Crijevna mikroflora i imunološki odgovor u upalnoj bolesti crijeva .....</i>            | <i>13</i>    |
| <b>1.2. Glikozilacija proteina .....</b>  | <b>15</b>    |
| 1.2.1. <i>Vrste glikozilacije proteina .....</i>  | <i>16</i>    |
| 1.2.2. <i>N-glikozilacija proteina .....</i>  | <i>17</i>    |
| 1.2.2.1. <i>Heterogenost N-glikana.....</i>   | <i>17</i>    |
| 1.2.2.2. <i>Struktura N-glikana .....</i>   | <i>18</i>    |
| <b>1.3. Analiza N- i O-glikozilacije proteina .....</b>   | <b>19</b>    |
| 1.3.1. <i>Vrste visokoprotodne analize N-glikozilacije proteina .....</i>                         | <i>21</i>    |
| 1.3.2. <i>Visokoprotodna analiza N-glikozilacije proteina spektrometrijom masa .....</i>          | <i>23</i>    |
| 1.3.3. <i>Visokoprotodna analiza glikopeptida metodom nanoLC-MS.....</i>                          | <i>23</i>    |
| <b>1.4. Imunoglobulin G .....</b>   | <b>24</b>    |
| 1.4.1. <i>N-glikozilacija imunoglobulina G .....</i>  | <i>25</i>    |
| 1.4.2. <i>Pleiotropija gena za N-glikozilaciju imunoglobulina G i upalnu bolest crijeva .....</i> | <i>27</i>    |
| 1.4.3. <i>N-glikozilacija imunoglobulina G u upalnoj bolesti crijeva .....</i>                    | <i>29</i>    |
| <b>1.5. Svrha i cilj.....</b>   | <b>30</b>    |
| <b>§ 2. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE .....</b>   | <b>31</b>    |
| <b>2.1. Ispitanici.....</b>   | <b>31</b>    |
| 2.1.1. <i>Uzorci krvne plazme.....</i>  | <i>33</i>    |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2.2. Materijali .....</b>   | <b>33</b> |
| 2.2.1. Standardne kemikalije .....   | 33        |
| 2.2.2. Enzimi .....  | 34        |
| 2.2.3. Pločice s 96 jažica.....  | 34        |
| 2.2.3.1. Afinitetne pločice .....  | 34        |
| 2.2.3.2. Filteri i filter pločice .....  | 34        |
| 2.2.3.3. Pločice za skupljanje i čuvanje uzoraka.....  | 35        |
| 2.2.4. Stacionarne faze.....   | 35        |
| 2.2.5. Kolone za nanoLC-MS analizu .....   | 35        |
| <b>2.3. Metode.....</b>  | <b>36</b> |
| 2.3.1. Izolacija imunoglobulina G iz uzoraka krvne plazme.....   | 36        |
| 2.3.1.1. Priprema uzoraka krvne plazme za izolaciju imunoglobulina G .....   | 37        |
| 2.3.1.2. Priprema protein G pločice za izolaciju imunoglobulina G iz uzoraka krvne plazme.....   | 37        |
| 2.3.1.3. Vežanje imunoglobulina G na protein G pločicu ispiranje.....  | 38        |
| 2.3.1.4. Eluiranje imunoglobulina G s protein G pločice .....  | 38        |
| 2.3.1.5. Regeneracija i čuvanje protein G pločice .....  | 38        |
| 2.3.1.6. Određivanje koncentracije izoliranog imunoglobulina G.....  | 38        |
| 2.3.2. Priprema glikopeptida imunoglobulina G izlaganjem djelovanju tripsina.....  | 39        |
| 2.3.3. Pročišćavanje glikopeptida imunoglobulina G obrnuto faznom ekstrakcijom na čvrstoj fazi.....  | 39        |
| 2.3.3.1. Priprema Chromabond C <sub>18</sub> zrnaca.....   | 39        |
| 2.3.3.2. Aktiviranje i uravnoteženje Chromabond C <sub>18</sub> zrnaca.....  | 40        |
| 2.3.3.3. Nanošenje glikopeptida imunoglobulina G na polipropilensku pločicu .....  | 40        |
| 2.3.3.4. Ispiranje glikopeptida imunoglobulina G.....  | 40        |
| 2.3.3.5. Eluiranje pročišćenih glikopeptida imunoglobulina G .....   | 41        |
| 2.3.4. Analiza potklasa glikopeptida imunoglobulina G metodom nanoLC-MS.....   | 41        |
| 2.3.4.1. Priprema uzoraka glikopeptida imunoglobulina G za analizu metodom nanoLC-MS .....   | 41        |
| 2.3.4.2. Metoda nanoLC-MS .....  | 41        |
| 2.3.5. Obrada podataka .....   | 45        |
| 2.3.6. Statistička analiza .....   | 51        |
| <b>§ 3. REZULTATI.....</b>   | <b>55</b> |
| <b>3.1. Razlike u Fc-glikozilaciji imunoglobulina G između pacijenata oboljelih od Crohnove bolesti, ulceroznog kolitisa i kontrolne skupine .....</b> | <b>55</b> |
| <b>3.2. Klasifikacija pacijenata oboljelih od Crohnove bolesti, ulceroznog kolitisa i kontrolne skupine .....</b>                                      | <b>66</b> |
| <b>3.3. Povezanost Fc-glikozilacije imunoglobulina G i kliničkih obilježja ulceroznog kolitisa .....</b>   | <b>69</b> |

|   |              |
|---|--------------|
| <b>3.4. Povezanost Fc-glikozilacije imunoglobulina G i kliničkih obilježja Crohnove bolesti .....</b> | <b>76</b>    |
| <b>3.5. Utjecaj lijekova.....</b>   | <b>90</b>    |
| <b>§ 4. RASPRAVA .....</b>  | <b>101</b>   |
| <b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>   | <b>105</b>   |
| <b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>  | <b>106</b>   |
| <b>§ 7. POPIS LITERATURE .....</b>  | <b>110</b>   |
| <b>§ 8. ŽIVOTOPIS .....</b>   | <b>XXI</b>   |
| <b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA .....</b>   | <b>XXIII</b> |
| <b>BASIC DOCUMENTATION CARD .....</b>   | <b>XXV</b>   |





## SAŽETAK

Uzrok upalne bolesti crijeva (eng. *inflammatory bowel disease*, IBD) nije još uvijek potpuno razjašnjen te je ponekad teško razlikovati najučestalije oblike, Crohnovu bolest (eng. *Crohn's disease*, CD) i ulcerozni kolitis (eng. *ulcerative colitis*, UC). Glikozilacija imunoglobulina G (IgG) povezuje se s CD-om i UC-om. Fc-glikozilacija IgG-a (fragment koji kristalizira, eng. *fragment crystallizable*, Fc) utječe na njegove efektorske funkcije. Analizirane su promjene u Fc-glikozilaciji IgG-a povezane s UC-om i CD-om kao i s kliničkim obilježjima ovih bolesti u različitim skupinama ispitanika te je ovo prva studija upalne bolesti crijeva u kojoj je analizirana glikozilacija IgG-a po potklasama.

U retrospektivnoj studiji prikupljeno je ukupno 2 357 uzoraka krvne plazme pacijenata oboljelih od UC-a (1056) i CD-a (874) te zdravih ispitanika (eng. *healthy controls*, HC, 427). Ovo je dosad najveće provedeno istraživanje glikozilacije IgG-a u IBD-u. Tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa (eng. *nano-liquid chromatography-mass spectrometry*, nanoLC-MS) analizirana je Fc-glikozilacija IgG-a po potklasama (glikopeptidi dobiveni djelovanjem tripsina). Ispitivana je povezanost između pojedinih skupina (UC vs HC, CD vs HC i UC vs CD) i glikopeptida te povezanost između kliničkih obilježja bolesti i glikopeptida.

Kod pacijenata oboljelih od CD-a i UC-a, zabilježena je niža razina galaktozilacije IgG-a u odnosu na kontrole. Fukozilacija IgG-a je bila povećana kod oboljelih od CD-a naspram HC-a, ali snižena kod oboljelih od UC-a naspram HC-a. Snižena galaktozilacija se povezuje s težim oblicima CD-a i UC-a, uključujući i potrebu za operacijom.

U retrospektivnoj analizi uzoraka krvne plazme pacijenata oboljelih od CD-a i UC-a, Fc-glikozilacija IgG-a je povezana s navedenim bolestima (u usporedbi s kontrolama) i njihovim kliničkim obilježjima. Rezultati ovoga istraživanja bi mogli, kroz bolju klasifikaciju pacijenata, pridonijeti razumijevanju mehanizama razvoja CD-a i UC-a te razvoju dijagnostike ili smjernica liječenja.

Ključne riječi: upalna bolest crijeva, Chronova bolest, ulcerozni kolitis, imunoglobulin G, Fc-glikozilacija, glikopeptidi, nanoLC-MS, klinička obilježja, galaktozilacija, fukozilacija, klasifikacija pacijenata.



## SUMMARY

The cause of inflammatory bowel disease (IBD) is still poorly understood and the most prominent forms Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are sometimes hard to distinguish. Glycosylation of immunoglobulin G (IgG) has been associated with CD and UC. IgG Fc-glycosylation affects IgG effector functions. The changes in IgG Fc-glycosylation associated with UC and CD, as well as with disease characteristics in different patient groups, were evaluated, and this is the first study of inflammatory bowel disease where subclass-specific IgG glycosylation was analyzed.

A total of 2 357 plasma samples were collected in retrospective cohort that contained samples from UC (1056) and CD patients (874) as well as healthy controls (HC, 427). So far, this is the largest study of IgG glycosylation in IBD. Subclass-specific IgG Fc-glycosylation (tryptic glycopeptides) was analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (nanoLC-MS). Associations between disease status (UC vs HC, CD vs HC, and UC vs CD) and glycopeptide traits and associations between clinical characteristics and glycopeptide traits, was performed.

Patients with CD or UC had lower levels of IgG galactosylation than controls. Fucosylation of IgG was increased in patients with CD vs controls but decreased in patients with UC vs controls. Decreased galactosylation associated with more severe CD or UC, including the need for surgery.

In a retrospective analysis of plasma samples from patients with CD or UC, we associated levels of IgG Fc-glycosylation with disease (compared to controls) and its clinical features. Through better patient classification, these findings could increase our understanding of mechanisms of CD and UC pathogenesis and be used to develop diagnostics or guide treatment.

Keywords: inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, immunoglobulin G, Fc-glycosylation, glycopeptides, nanoLC-MS, clinical characteristics, galactosylation, fucosylation, patient classification



## § 1. UVOD

### 1.1. Upalna bolest crijeva

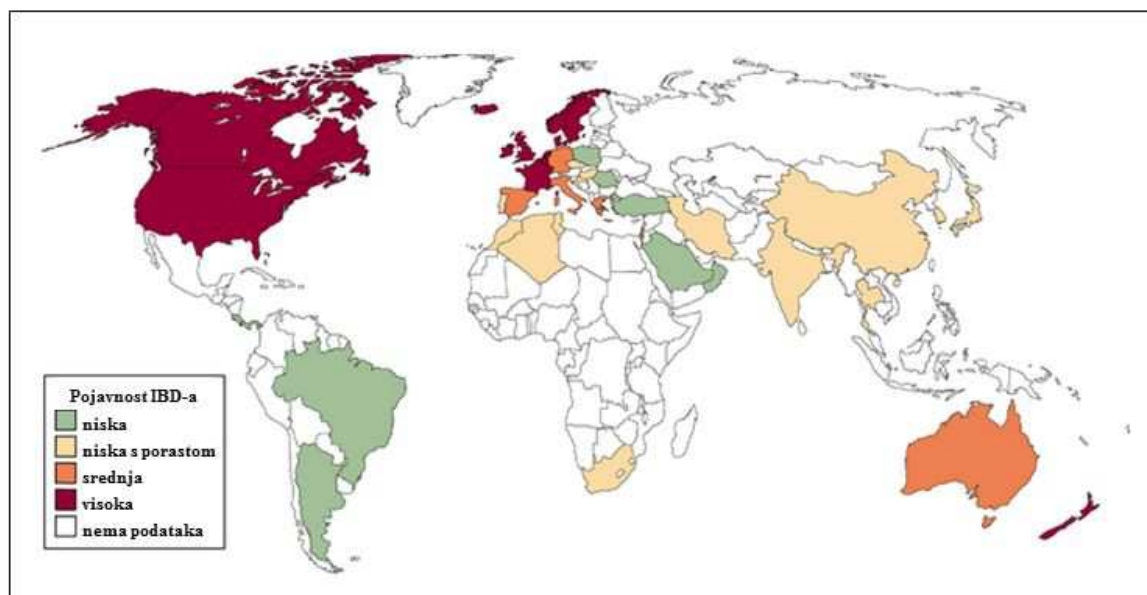
Upalna bolest crijeva (eng. *inflammatory bowel disease*, IBD) je skupina kroničnih, autoimunih bolesti probavnog sustava, najčešće tankog i debelog crijeva<sup>1</sup>. U podlozi ovih bolesti je složeni imunološki poremećaj nastao kao posljedica međudjelovanja genskih i okolišnih čimbenika<sup>2</sup>. Najzastupljenije su Crohnova bolest (eng. *Crohn's disease*, CD) i ulcerozni kolitis (eng. *ulcerative colitis*, UC) koje se razlikuju po mjestu nastanka te prirodi tijeka upalnog procesa<sup>3</sup>. Montreal klasifikacija UC-a temelji se na rasprostranjenosti bolesti i težini simptoma dok se kod CD-a temelji na starosti pacijenta pri postavljanju dijagnoze, lokaciji i ponašanju bolesti<sup>4</sup>. Kvaliteta života pacijenata s upalnim bolestima crijeva je znatno smanjena s obzirom na simptome bolesti (abdominalna bol, kronični proljev, crijevno krvarenje, gubitak težine, mučnina, povraćanje, anemija itd.)<sup>5</sup>, ali i nuspojave agresivnih lijekova te su takvi pacijenti doživotno na posebnom režimu prehrane. Liječenje IBD-a se sastoji od saniranja i kontrole simptoma posebnim režimom prehrane, kirurškim intervencijama te protuupalnim i imunosupresivnim lijekovima.

#### 1.1.1. Pojavnost, prevalencija i rasprostranjenost upalne bolesti crijeva

Upalna bolest crijeva se može dijagnosticirati u bilo kojoj životnoj dobi, a najčešće između 15. i 40. godine života, uz manje izraženu učestalost pojave bolesti između 50. i 80. godine života. Oko 2 % slučajeva IBD-a se pojavljuje kod djece mlađe od 10 godina, a 30 % bolesti se pojavljuje kod mladih ljudi u dobi između 10. i 19. godine života<sup>6</sup>. IBD je često dijagnosticiran kod više članova iste obitelji. Pojavnost IBD-a raste<sup>7</sup> i trenutno iznosi približno 1 na 200 osoba u razvijenim zemljama<sup>8</sup>. S obzirom na spol, Crohnova bolest nešto je češća u žena, dok se ulcerozni kolitis javlja podjednako u oba spola. Prosječno, u Europi i Sjevernoj Americi, od Crohnove bolesti boluje 3,2 pacijenta na 1000 osoba<sup>8</sup>, dok je prevalencija bolesti manja u Aziji i Africi<sup>9</sup>. CD je češća u razvijenim zemljama<sup>10</sup> s porastom broja oboljelih, posebno od 1970. godine<sup>10,11</sup>. Pojavnost ulceroznog kolitisa godišnje iznosi 1-20 slučajeva na 100 000 osoba, a prevalencija iznosi 8-246 slučajeva na 100 000 osoba<sup>12</sup> dok za CD godišnje, pojavnost iznosi 0-16 slučajeva na 100 000 osoba, a prevalencija iznosi 4-

214 slučajeva na 100 000 osoba<sup>6</sup>. Ukupna prevalencija IBD-a je 396 slučajeva na 100 000 stanovnika godišnje<sup>13</sup>, a samo u Europi ima 2,5-3 milijuna oboljelih<sup>11,14</sup>. Procjenjuje se da je u svijetu u 2010. godini upalna bolest crijeva prouzročila 34 000 smrti<sup>15</sup> s tim da je životni vijek kod Crohnove bolesti nešto kraći nego kod UC<sup>16</sup>. Također, procjenjuje se da je u Europi preko 2,5 milijuna IBD pacijenata s porastom prevalencije i u drugim populacijama<sup>8</sup>. Teško je odrediti točnu pojavnost upalne bolesti crijeva zbog: nepostojanja dijagnostičkog, zlatnog standarda<sup>6</sup>, nedosljednih prikaza slučajeva<sup>13</sup> te pogrešne klasifikacije<sup>17</sup>.

Upalna bolest crijeva se češće javlja u populacijama sjeverne i zapadne Europe te Sjeverne Amerike, posebno kod bijelaca i Židova dok su znatno rjeđe u Južnoj Americi, Aziji i Srednjem istoku (Slika 1.1.1)<sup>8</sup>.



**Slika 1.1.1** Pojavnost upalne bolesti crijeva u svijetu, godišnje na 100 000 stanovnika. Crvenom je označena visoka pojavnost (viša od 10 slučajeva), narančastom je označena srednja pojavnost (5-10 slučajeva), zelenom je označena niska pojavnost (manja od 4 slučaja), a žutom je označena niska pojavnost s kontinuiranim rastom. Za područja koja nisu obojana nisu dostupni podaci, prilagođeno iz Molodecky et al. 2012.<sup>8</sup>

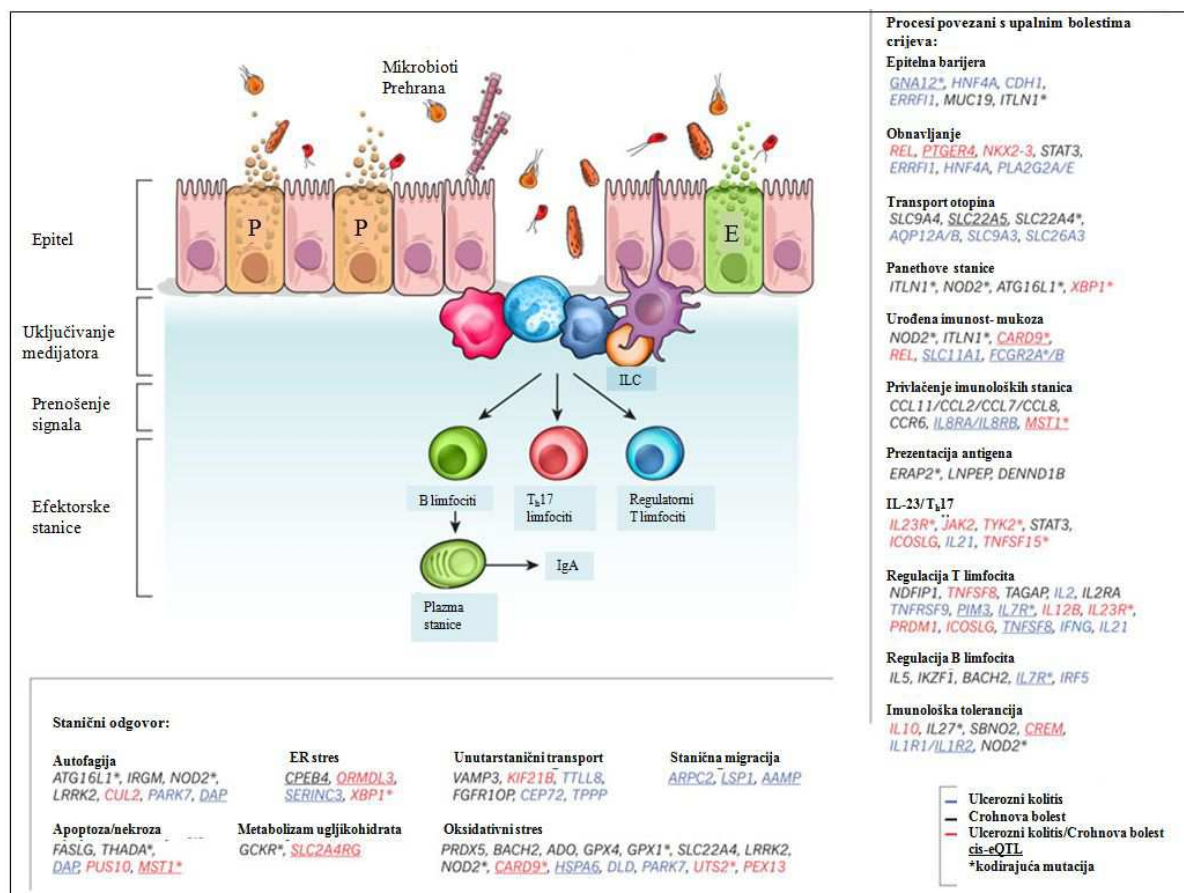
Geografska distribucija UC-a i CD-a je vrlo različita<sup>18</sup> uz najvišu incidenciju u Sjedinjenim Američkim državama (SAD), Kanadi, Ujedinjenom Kraljevstvu i Skandinaviji. Povećana pojavnost je zabilježena u sjevernim područjima u odnosu na južne dijelove Europe<sup>19</sup> i SAD-a<sup>20</sup>.

### 1.1.2. Uzroci upalne bolesti crijeva

#### 1.1.2.1. Genska predispozicija za upalnu bolest crijeva

Genske predispozicije za razvoj upalne bolesti crijeva su slabo razjašnjene te se čini da je riječ o utjecaju par stotina gena. U sklopu cijelogenomskih asocijacijskih studija (eng. *genome-wide association studies*, GWAS), potvrđena su 163 mjesta u genomu koja doprinose pojavi IBD-a te je time objašnjeno 8,2 % do 13,6 % slučajeva Crohnove bolesti i 4,1 % do 7,5 % slučajeva ulceroznog kolitisa<sup>21</sup>. Ta 163 mjesta povezuju se s oko 300 gena odgovornih za stvaranje citokina [interferon gama (IFNG- $\gamma$ ), interleukin-12 (IL-12), tumorski faktor nekroze alfa (eng. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- $\alpha$ ) i interleukin-10 (IL-10)], aktivaciju stanica imunološkog sustava [T i B limfocita te NK stanica (eng. *natural killer*, NK)] te za aktiviranje imunološkog odgovora na bakterijsku infekciju (KEGG, JAK i STAT signalni put) (Slika 1.1.2.1.)<sup>22</sup>. S Crohnovom bolesti povezuju se i mutacije *XBP1* gena, uključenog u signalni put odgovora endoplazmatskog retikuluma (ER) na gomilanje nesmotanih proteina<sup>23,24</sup>. Autofagija se izdvaja kao jedan od mehanizama u patogenezi IBD-a<sup>22</sup>, a mutacije u genu *ATG16L1* koji inducira autofagiju i time sprečava organizam da „napada“ invazivne bakterije, povezuju se s razvojem Crohnove bolesti<sup>25</sup>. Zabilježena je i pleiotropija IBD gena s genima za druge upalnim bolestima poput ankiloznog spondilitisa i psorijaze<sup>26</sup>.



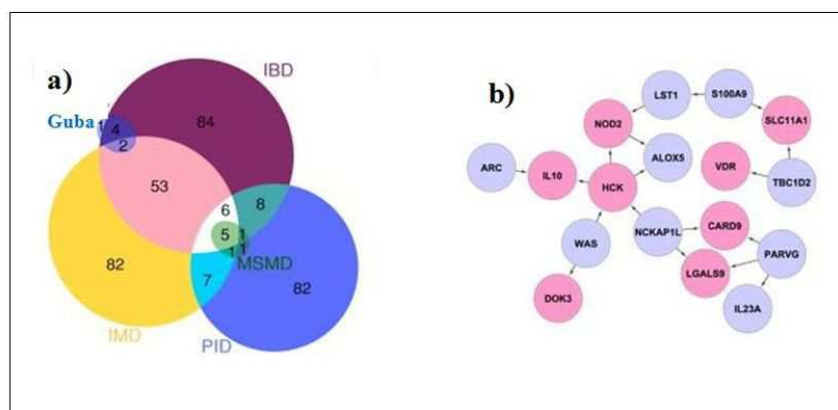


**Slika 1.1.2.1.1** Genske predispozicije za razvoj upalne bolesti crijeva. Geni povezani s razvojem ulceroznog kolitisa označeni zeleno, povezani s Crohnovom bolesti označeni plavo, a geni povezani s objema bolestima označeni crveno, geni s kodirajućom mutacijom cis-eQTL su označeni \*, u epitelu crijeva Panethove stanice su označene s P, a enterociti s E, limfoidne stanice urođenog imunološkog sustava označene su s ILC (eng. *innate lymphoid cells*), prilagođeno iz Khor et al. 2011.<sup>22</sup>

Geni povezani s pojavom IBD-a pokazuju pleiotropiju s genima povezanim s pojavom primarnih imunodeficiencija, (eng. *primary immunodeficiencies*, PID), kod kojih je disfunkcionalan imunološki sustav, što rezultira teškim infekcijama. Ovdje se ubrajaju geni povezani sa smanjenim brojem cirkulirajućih T limfocita (*ADA*, *CD40*, *TAP1/2*, *NBS1*, *BLM*, *DNMT3B*) te geni povezani s T<sub>H</sub>17 limfocitima (*STAT3*), B limfocitima (*SP110*) i regulatornim T limfocitima (*STAT5B*)<sup>27</sup>. Dio PID gena (*IL12B*, *IFNGR2*, *STAT1*, *IRF8*, *TYK2* i *STAT3*), povezan je s povećanim rizikom od razvoja mendelovske preosjetljivosti na mikobakterije (eng. *mendelian susceptibility to mycobacterial disease*, MSMD)<sup>27,28</sup>. Zabilježena je i pleiotropija gena povezanih s pojavom IBD-a s genima povezanim s pojavom kompleksnih infekcija mikobakterijama, npr. gube<sup>29</sup>. Mutacije *STAT3* gena<sup>30,31</sup> i

*CARD9* gena<sup>32</sup> koje uzrokuju PID s infekcijama kože stafilokokom i kandidom, također pokazuju pleiotropiju s genima povezanim s pojavom IBD-a.

Jedna takva potencijalno moguća genska mreža uključuje gene *NOD2*, *IL10* i *CARD9*, a ukazuje na interakciju domaćina s bakterijama<sup>21</sup>. Preko 30 mjesta u genomu povezuje se s Crohnovom bolesti, a 23 mjesta s ulceroznim kolitisom te je za većinu poznata biološka funkcija<sup>22</sup>. Jedna od prvih mutacija povezanih s Crohnovom bolesti je pomak okvira čitanja u *NOD2* genu (poznatim i pod nazivom *CARD15* gen)<sup>33</sup>, a nakon toga su otkrivene i točkaste mutacije istog gena<sup>34</sup>. Od osobite je važnosti gen *HCK* koji ima protuupalnu ulogu<sup>21</sup> (Slika 1.1.2.1.2). Gen *HCK* potiče ekspresiju gena *NOD2* i *IL10*. *IL10* je protuupalni citokin povezan s mendelovskim<sup>35</sup> i nemendelovskim IBD-om<sup>36</sup>. Gen *HCK* se povezuje i s protuupalnom aktivacijom monocita (M2 makrofaga)<sup>37</sup>.



**Slika 1.1.2.1.2** Geni povezani s razvojem upalnih bolesti crijeva. a) Pleiotropija IBD gena s genima povezanim s razvojem gube, imunodeficijencija (eng. *immune deficiency*, IMD), primarnih imunodeficijencija (PID). Unutar skupine PID, ističe se mendelovska preosjetljivost na mikobakterije (MSMD), b) Skupina gena oko gena *NOD2*. IBD geni su označeni ružičasto, plavom su označeni geni koji nisu povezani s IBD-om, strelice označavaju pretpostavljenu regulaciju ekspresije, prilagođeno iz Jostins et al. 2012.<sup>21</sup>

Iako uzroci upalnih bolesti crijeva još nisu poznati, genski čimbenici igraju određenu ulogu. Do 25 % osoba s tim bolestima ima i oboljele članove obitelji. Rizik nasljeđivanja je najveći ako boluje majka, a nakon toga brat ili sestra.

### 1.1.2.2. Okolišni čimbenici u upalnoj bolesti crijeva

Brojne su teorije o utjecaju prehrane, pušenja<sup>38</sup>, oralnih kontraceptiva<sup>39</sup>, perinatalnih infekcija, infekcija u djetinjstvu i atipičnih infekcija mikobakterijama<sup>21</sup> na razvoj upalnih bolesti crijeva, međutim, niti jedna nije u potpunosti dokazana<sup>40</sup>.

Različite bakterije i virusi bi mogli biti odgovorni za Crohnovu bolest ili ulcerozni kolitis. Virusne infekcije tijekom trudnoće mogu povećati rizik za razvoj upalne bolesti crijeva u djece.

Bakterijske gastrointestinalne infekcije povećavaju rizik od pojave IBD-a što upućuje da akutne infekcije mogu promijeniti crijevnu mikrofloru u pojedinaca s genskim predispozicijama te dovesti do kroničnog upalnog procesa<sup>41,42</sup>. Iako su se brojne bakterije navodile kao mogući uzročnici IBD-a, najnovija istraživanja govore u prilog da mikroorganizmi inače prisutni u crijevima, uzrokuju upalu<sup>43</sup>. Pretpostavlja se kako se bolest razvija kod osoba koje imaju gensku sklonost koja omogućuje virusu ili bakteriji iz crijevne mikroflore, da pokrene promijenjeni, upalni imunološki odgovor<sup>44</sup>.

Veća incidencija upalne bolesti crijeva je zabilježena kod osoba višeg socioekonomskog statusa<sup>17,45</sup>, iako je povezanost između određenih zanimanja i IBD pacijenata mala<sup>46</sup>. IBD je češći kod stanovnika gradova nego sela i pojavljuje se češće u razvijenim nego u manje razvijenim zemljama, što može upućivati na ulogu okoliša poput urbanizacije i zapadnjačkog stila života (prehrana, pušenje, izloženost suncu, zagađenje, industrijske kemikalije itd.) koji povećavaju rizik od razvoja IBD-a<sup>47</sup>. U razvijenim zemljama je smanjena izloženost crijevnim infekcijama tijekom djetinjstva zahvaljujući strogim higijenskim i sanitarnim uvjetima čime se ograničava sazrijevanje crijevnog imunološkog sustava što može dovesti do neprimjerenog odgovora imunološkog sustava pri izlaganju infektivnim mikroorganizmima kasnije u odrasloj dobi<sup>48</sup>.

### 1.1.3. Dijagnosticiranje i liječenje upalne bolesti crijeva

Ulcerozni kolitis i Crohnova bolest imaju mnogo zajedničkih simptoma, ali se i razlikuju u bitnim karakteristikama. Obje su kronične bolesti i simptomi se obično pojavljuju kod mladih odraslih osoba. Kod mnogih bolesnika, simptomi izbijaju (recidiv) nakon perioda bez simptoma (remisija), drugi pacijenti imaju stalne simptome, iako i kod njih može doći do remisije. Simptomi mogu biti blagi ili vrlo jaki pa bitno smanjuju kvalitetu života, a mogu se

razvijajati postupno ili naglo. Jačina simptoma i učestalost recidiva također variraju ovisno o godišnjem dobu, rizik je najveći zimi i u jesen, a najmanji ljeti. Najčešći simptom kod ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti je proljev uz moguću pojavu krvi u stolici, posebno kod ulceroznog kolitisa. Opstipacija se može razviti tijekom aktivne faze kako Chronove bolesti (zbog opstrukcije u tankom crijevu) tako i ulceroznog kolitisa (upaljeno zadnje crijevo šalje refleksni odgovor u debelo crijevo koji dovodi do zadržavanja stolice). Mogu se pojaviti grčevi zbog kontrakcije crijeva izazvane upalom, a jačina boli obično ovisi o jačini proljeva. Intenzivni bolovi u trbuhu mogu upućivati na ozbiljna stanja, kao što su apscesi ili perforacije crijevnih stijenki. Često su prisutni povišena temperatura, umor gubitak apetita, a ujedno bolesnik može i gubiti na težini. Kao odgovor na upalu mogu se javiti tenezmi (bolna potreba za pražnjenjem crijeva čak i kad je zadnje crijevo prazno). Neurološki ili psihijatrijski simptomi mogu biti rani znakovi Chronove bolesti kad su popraćeni gastrointestinalnim problemima. Za Crohnovu bolest je karakteristično da može zahvatiti bilo koji dio probavnog sustava od usne šupljine do anusa i izmjenjuju se područja zdravog tkiva crijeva i tkiva zahvaćenog upalom. Kod ulceroznog kolitisa upalni proces uvijek zahvaća rektum (završno crijevo) i širi se prema višim dijelovima debelog crijeva.

Kod postavljanja dijagnoze IBD-a, osnovni korak je kolonoskopija s biopsijom sluznice crijeva. Fekalni kalprotektin je povišen u upali (UC, CD, maligne bolesti i zarazne bolesti) dok je kod neupalnih stanja (sindroma iritabilnog crijeva) u referentnim granicama. Uspješnost liječenja se prati određivanjem fekalnog kalprotektina za vrijeme farmakoterapije IBD-a te nakon kirurškog zahvata<sup>49</sup>. U nalazima laboratorijskih pretraga krvi, koji su najčešće nespecifični, mogu se ustanoviti anemija (uslijed krvarenja ili loše apsorpcije i nedostatka vitamina B12 te folne kiseline), ubrzana sedimentacija, povišena vrijednost C-reaktivnog proteina (CRP), sniženi serumski proteini te snižene vrijednosti kalija, kalcija i magnezija<sup>3,50,51</sup>. Postojeće metode dijagnosticiranja, prognoziranja i monitoriranja IBD-a su često invazivne i/ili nedovoljno osjetljive<sup>52,53</sup> što ukazuje na potrebu za novim, minimalno invazivnim markerom.

Liječenje upalnih bolesti crijeva je individualno, odnosno, ovisi o stadiju, težini i komplikacijama bolesti te općem stanju bolesnika. Uključuje farmakoterapiju (kortikosteroidi, aminosalicilati, imunosupresori i antibiotici), kirurške zahvate, dijetoterapiju i psihoterapiju<sup>54</sup>. Relativno novi način liječenja IBD-a je fekalna bakterijoterapija (FBT). Fekalnom bakterijoterapijom apliciraju se fekalne bakterije (normalno prisutne u crijevima) putem sonde u tanko crijevo ili kolonoskopijom u debelo crijevo<sup>55</sup>. Poznato je nekoliko slučajeva

pacijenata koji su uz FBT ostali u remisiji do 13 g.<sup>56</sup>. Svakako jedan od najnovijih načina liječenja IBD-a je i terapija matičnim stanicama koštane srži koja je u počecima<sup>57</sup>. Istraživanja su pokazala kako parazitarna terapija ima dobre rezultate u preveniranju i kontroli UC-a<sup>58</sup>. Dobri rezultati u liječenju upalnih bolesti crijeva postignuti su s prebioticima i probioticima<sup>59,60</sup>.

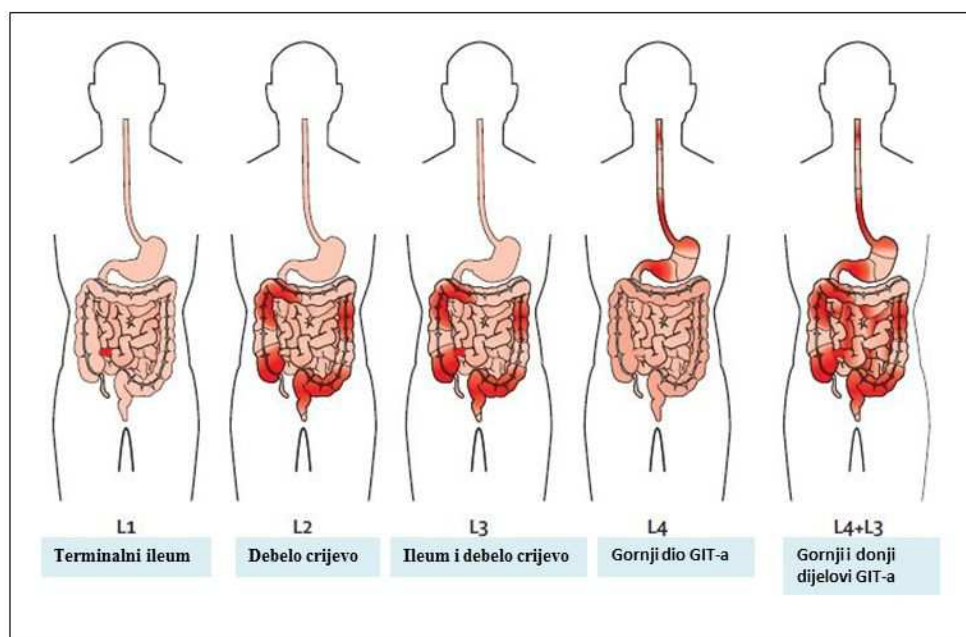
Kanabis se pokazao dobrim u olakšavanju boli i simptoma upalnih bolesti crijeva.<sup>61,62</sup>

#### *1.1.4. Ekonomski učinak upalne bolesti crijeva*

Pacijenti oboljeli od upalne bolesti crijeva zahtijevaju doživotnu zdravstvenu njegu, a većina će trebati farmakoterapiju i neki oblik kirurške operacije što zahtijeva znatna financijska sredstva<sup>20</sup>. Godišnji troškovi liječenja IBD-a za Europu iznose 4,6-5,2 milijardi eura<sup>14</sup> dok se za SAD procjenjuju na 11-28 milijardi američkih dolara<sup>63</sup>.

#### *1.1.5. Crohnova bolest*

Crohnova bolest je kronična, progresivna upalna bolest crijeva, nepoznatog uzroka, koja se može javiti u bilo kojem dijelu gastrointestinalnog trakta (GIT), od usne šupljine do anusa, a najčešće počinje u terminalnom ileumu te zahvaća cijelu stijenku crijeva (Slika 1.1.5)<sup>3,16,64</sup>. Montreal klasifikacija CD-a obuhvaća lokaciju (L1 terminalni ileum, L2 debelo crijevo, L3 ileum i debelo crijevo, L4 gornji dio GIT-a), ponašanje (B1 upalna, B2 sužavajuća i B3 perforirajuća CD) i trajanje bolesti te operaciju<sup>4</sup>.



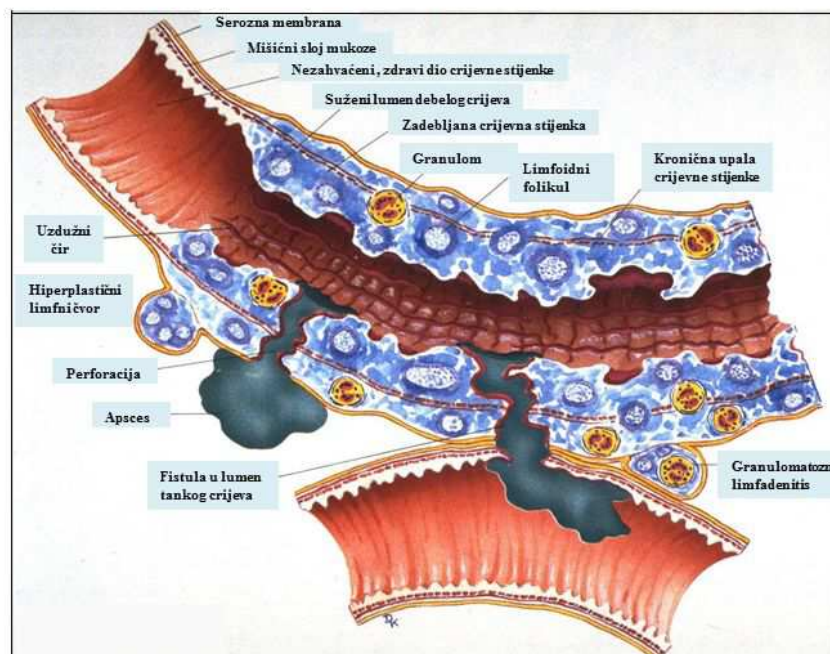
**Slika 1.1.5** Dijelovi gastrointestinalnog trakta najčešće zahvaćeni Crohnovom bolešću. Montreal L klasifikacija: L1 terminalni ileum, L2 debelo crijevo, L3 ileum i debelo crijevo, L4 gornji dio gastrointestinalnog trakta, L4+L3 gornji i donji dijelovi GIT-a, prilagođeno iz Baumgart & Sandborn. 2012.<sup>16</sup>

Pretpostavlja se kako kod pojedinaca s genskim predispozicijama, Crohnovu bolest uzrokuje kombinacija čimbenika okoliša, imunološkog sustava te razni mikroorganizmi<sup>65-67</sup>. Genske predispozicije za razvoj Crohnove bolesti uključuju 71 gen<sup>68</sup>. Jedan od mogućih mehanizama razvoja Crohnove bolesti je infekcija mikroorganizmima kao što su *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* (*E. coli*) i *Cytomegalovirus* koji aktiviraju imunološki odgovor prema dijelovima gastrointestinalnog trakta pri čemu nastaje kronična upala<sup>66,69</sup>. Iako u Crohnovoj bolesti točan imunološki mehanizam nije poznat, smatra se da razvoju bolesti pridonose imunodeficijencije<sup>69-71</sup>. Pušači imaju dva puta veći rizik od razvoja Crohnove bolesti od nepušača. Bolest se najčešće pojavljuje u dobi od 15. do 24. godine života<sup>16</sup>.

#### 1.1.5.1. Patofiziologija Crohnove bolesti

Kod Crohnove bolesti se izmjenjuju područja zdravog tkiva crijeva i segmenti tkiva upalno promijenjenog crijeva. Upalni proces postupno napreduje u dublje slojeve stijenke crijeva te ju potpuno zahvaća zbog čega dolazi do njezinog zadebljanja i stvaranja dubokih uzdužnih čireva uz moguće krvarenje. Ostale upalne komplikacije uključuju stvaranje fistula

(neprirodni kanal) između crijevnih vijuga i/ili crijeva i susjednih organa, apscesa (gnojem ispunjeni džepovi), perforacija (stvaranje otvora u stijenci crijeva) te striktura (suženja) crijeva (Slika 1.1.5.1)<sup>64,72</sup>.



Slika 1.1.5.1 Patološki proces u Crohnovoj bolesti, prilagođeno iz Rubin 1990.<sup>72</sup>

Najčešći simptomi i znakovi Crohnove bolesti su kronični proljev s ili bez znakova malapsorpcije, rane u usnoj šupljini, trbušna bol s grčevima, povišena tjelesna temperatura, gubitak apetita, gubljenje težine i umor, a ako zahvati i debelo crijevo, može se pojaviti krv u stolici koja ne mora biti vidljiva (okultno krvarenje). Kod oboljelih od Crohnove bolesti, nakon što bolest traje mnogo godina, povećava se rizik od nastanka raka debelog crijeva. U tijeku kliničkog pregleda palpacijom se kod bolesnika može osjetiti nakupina u donjem dijelu trbuha, uz prisutnu osjetljivost na dodir. Od simptoma i znakova izvan probavnog sustava mogu se pojaviti crvenilo očiju uslijed upale šarenice oka (iridociklitis), upala zglobova (artritis), kožni osip, žučni kamenci, recidivirajuće urinarne infekcije, problem s kožom, jetrom i štitnjačom<sup>73</sup>. Na Crohnovu bolest treba posumnjati i kada uz gastrointestinalne probleme postoje neurološki ili psihijatrijski simptomi<sup>72</sup>.

Patofiziološki proces u Crohnovoj bolesti uključuje poremećaje nespecifičnog i stečenog imunološkog odgovora na ionako smanjen broj komenzala crijevne mikroflore uslijed čega dolazi do upale. U CD-u dolazi do oštećenja i povećanja propusnosti intestinalne barijere, disfunkcije Panethovih stanica, oštećenja funkcije endoplazmatskog retikuluma (ER)



te se mijenja odgovor na nesmotane proteine uz autofagiju, kao i prepoznavanje intestinalnih antigena od strane dendritičkih stanica i makrofaga, a sve navedeno se ubraja u nespecifični imunološki odgovor. S druge strane stečena imunost obuhvaća neravnotežu regulatornih i efektorskih T limfocita, citokina te ekstrasvazaciju i zadržavanje leukocita u tkivima<sup>16</sup>.

#### *1.1.6. Ulcerozni kolitis*

Ulcerozni kolitis je kronična, upalna bolest debelog crijeva, nepoznate etiologije koju karakteriziraju brojne egzacerbacije i remisije. Upalni proces uvijek prvo zahvaća završni dio debelog crijeva (rektum) i širi se kontinuirano na ostale dijelove debelog crijeva, a zahvaća samo gornji, mukozni sloj crijevnog stijenke<sup>47</sup>. Pretpostavlja se kako je upalni proces u ulceroznom kolitisu posljedica međudjelovanja okolišnih i genskih čimbenika uslijed čega dolazi do imunološkog odgovora na crijevnu mikrofloru te upale debelog crijeva. Svrstava se u autoimunu skupinu bolest, a obilježava ga infiltracija T limfocita u debelom crijevu<sup>43</sup>. Montreal klasifikacija UC-a obuhvaća lokaciju (E1 završni dio, E2 lijeva strana, E3 cijelo debelo crijevo), trajanje bolesti i operaciju.<sup>4</sup>

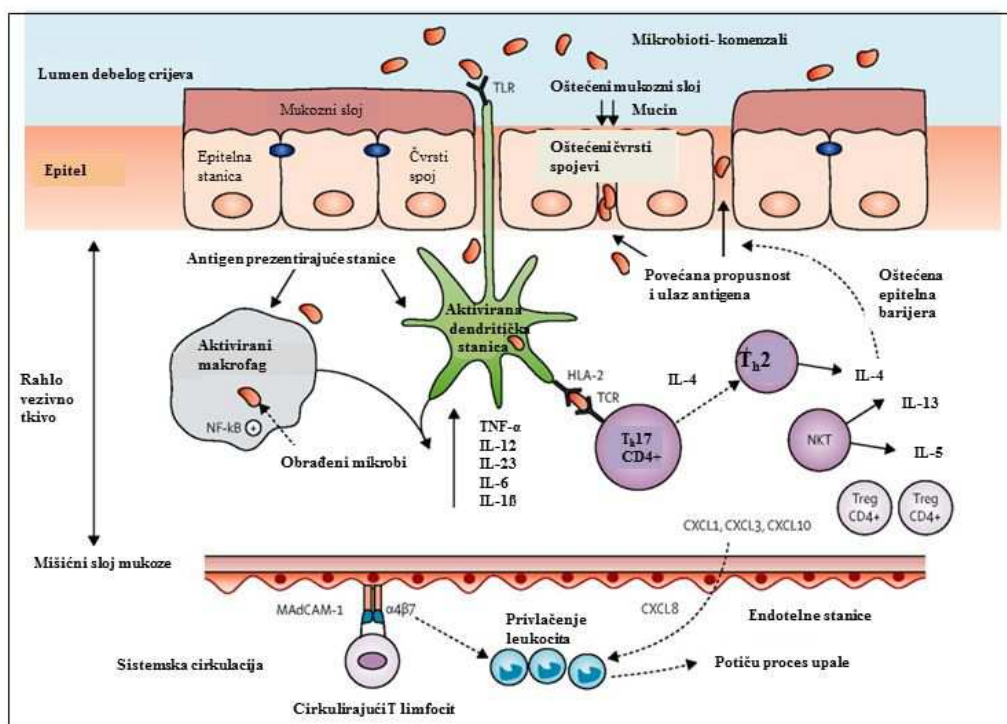
##### *1.1.6.1. Patofiziologija ulceroznog kolitisa*

Ova kronična bolest debelog crijeva je obilježena upalom sluznice debelog crijeva i nastankom brojnih čireva. Izgled sluznice ovisi o težini bolesti, a čirevi mogu biti minimalni, mjestimični ili jako prošireni. Javljuju se krvavoslužave proljevaste stolice, bol u trbuhu, povišena tjelesna temperatura i gubitak na težini. Klinička slika varira između bolesnika pa razlikujemo blagi, umjereno teški i teški oblik bolesti. Bolest može nastupiti naglo s teškom kliničkom slikom obilježenom žestokim proljevom uz prisutnost krvi i sluzi u stolici, grčevima u trbuhu uz stalni nagon za pražnjenjem crijeva, povišenom temperaturom, a može se razviti i upala cijele potrbušnice. Najozbiljnija i najteža komplikacija ulceroznog kolitisa je toksični kolitis, a obilježen je rastezanjem debelog crijeva i širenjem trbuha te gubitkom peristaltike crijeva uz zastoj crijevnog sadržaja. U ovom slučaju nužno je provesti bolničko liječenje. Opasnost od raka debelog crijeva povećana je kod bolesnika koji boluju od ulceroznog kolitisa dulje od 10 godina i kod zahvaćanja velike površine sluznice debelog crijeva<sup>74</sup>.



Pacijenati s UC imaju više bakterija koje reduciraju sulfat što znači da su u crijevima prisutne veće količine sumporovodika koji djeluje toksično na stanice endotela crijeva pa tako sumpor iz alkohola i crvenog mesa može dovesti do relapsa kod pacijenata u remisiji<sup>75</sup>. Mukozni sloj debelog crijeva čine epitelne i imunološke stanice rahlog vezivnog tkiva (lat. *lamina propria*). Beta oksidacijom, oksidira se N-butirat, kratkolanačana masna kiselina, u ugljični dioksid i ketonska tijela. N-butirat pomaže prolazak nutrijenata kroz epitelnu barijeru. Sumporovodik oštećuje laki lanac acetil koenzim A (acetyl-CoA) dehidrogenaze, enzima u procesu beta oksidacije te time onemogućava njeno djelovanje. Deficit N-butirata se može nadoknaditi klistirom, što se pokazalo korisnim kod pacijenata s UC-om<sup>76</sup>. Protektivni učinak pušenja kod UC-a<sup>77,78</sup> je rezultat reakcije cijanovodika iz cigareta sa sumporovodikom, u kojoj nastaje netoksični izotiocijanat čime je onemogućena sulfidna inhibicija puta beta oksidacije<sup>79</sup>.

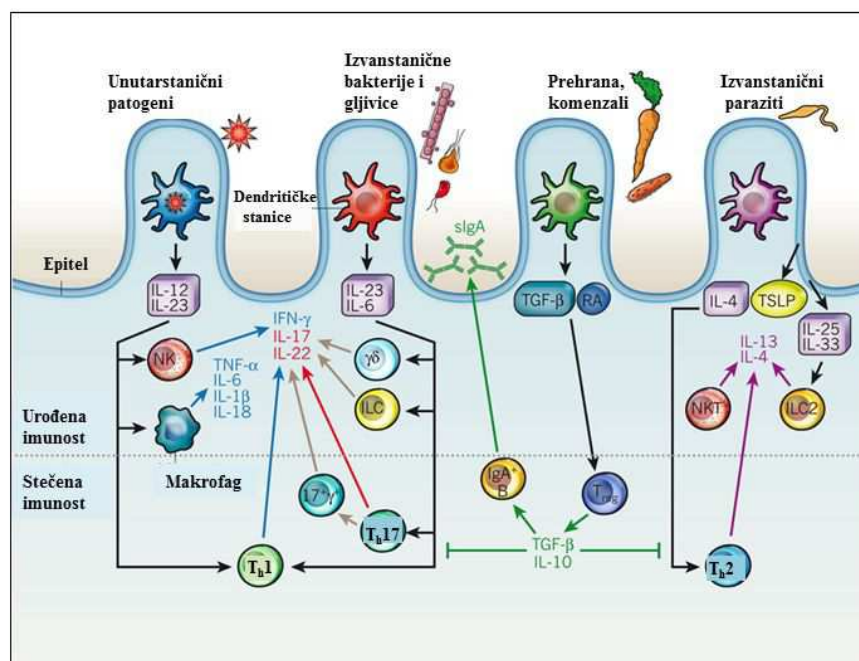
Patofiziološki proces u ulceroznom kolitisu uključuje epitelnu barijeru, komenzale mikroflore, aktivaciju imunološkog odgovora te ekstravazaciju leukocita (Slika 1.1.6.1). U UC-u dolazi do poremećaja u čvrstim spojevima (eng. *tight junctions*) između epitelnih stanica i mukoznog sloja koji ih prekriva čime je oštećena epitelna barijera, prva linija obrane crijevnog imunološkog sustava te je povećana njena propusnost za luminalne antigene. Dolazi do imunološkog odgovora na inače nepatogene crijevne komenzale preko interakcije s makrofagima i dendritičkim stanicama iz rahlog vezivnog tkiva koje prezentiraju antigene B i T limfocitima. U UC-u se javlja atipični T<sub>H</sub>2 odgovor, a NK T limfociti proizvode citokine interleukin-5 (IL-5) i interleukin-13 (IL-13) koji djeluje citotoksično na epitelne stanice. Ulazak leukocita iz sistemske cirkulacije u mukoza dodatno pojačava upalni odgovor<sup>80</sup>.



**Slika 1.1.6.1** Patofiziološki proces u ulceroznom kolitisu uključuje epitelnu barijeru, komenzale mikroflore, aktivaciju imunološkog odgovora te ekstravazaciju leukocita, prilagođeno iz Ordas et al. 2012.<sup>80</sup>

### 1.1.7. Crijevna mikroflora i imunološki odgovor

Istraživanja pokazuju kako promjene koje utječu na crijevnu mikrofloru pridonose razvoju upalnih bolesti crijeva<sup>55,81</sup>. Opće je prihvaćeno kako do IBD-a dovodi promijenjeni imunološki odgovor na crijevnu mikrofloru kod pojedinaca s genskom predispozicijom<sup>2</sup>. Povećanjem propusnosti intestinalne barijere, aktiviraju se urođeni i stečeni imunološki odgovori u kojima sudjeluju dendritičke stanice i makrofagi (Slika 1.1.7)<sup>82</sup> što uzrokuje patofiziološki proces u Crohnoj bolesti<sup>16</sup> i ulceroznom kolitisu<sup>80</sup>. Pretpostavlja se kako aktivirani makrofagi pojačano luče citokine što aktivira urođeni, nespecifični imuni odgovor te dovodi do upale inducirane kontaktom s mikroorganizmima crijevne mikroflore koji su prisutni u velikom broju<sup>66,83</sup>.



**Slika 1.1.7** Narušavanje intestinalne homeostaze aktivira imunološki odgovor, prilagođeno iz Maloy & Powrie, 2011.<sup>82</sup>

Određena istraživanja povezuju Crohnovu bolest i preveliko stvaranje citokina od strane pomoćničkih  $T_h1$  limfocita (eng. *helper*)<sup>84</sup> dok se u drugima naglašava uloga pomoćničkih  $T_h17$  limfocita koji štite organizam od bakterija i gljivica te proizvode interleukin-17 (IL-17), a odgovorni su za upalu i oštećenje tkiva u autoimunom odgovoru kao što je slučaj kod multiple skleroze (prije se smatralo kako je riječ o  $T_h1$  odgovoru), psorijaze, autoimunog uveitisa, reumatoidnog artritisa<sup>85-87</sup>. Interleukin-17A (IL-17A) i interleukin-17F (IL17-F) potiču aktivaciju i migraciju neutrofila. Primarna uloga  $T_h17$  limfocita je antimikrobna obrana na epitelno-mukoznim barijerama, a proizvode citokine poput interleukina-22 (IL-22) koji stimulira epitelne stanice na proizvodnju antimikrobnih proteina te interleukina-21 (IL-21). Nedostatak  $T_h17$  limfocita povećava mogućnost oportunističkih infekcija, a suvišak se povezuje s autoimunim odgovorom dok je značajno i njihovo antitumorsko djelovanje<sup>88-90</sup>.

Na crijevnu mikrofloru utječu okolišni čimbenici kao što su koncentrirane mliječne masnoće (uobičajen sastojak procesirane hrane i slatkiša), antibiotici i oralni pripravci željeza<sup>91</sup>.

Interakcije vlastitog imunološkog sustava u crijevima s mikroorganizmima na površini epitelnih stanica te onima iz lumena crijeva, doprinose razvoju upalnih bolesti crijeva<sup>35</sup>.

Mikroorganizmi iskorištavaju oštećeni mukozni sloj na epitelnim stanicama crijeva i nemogućnost otklanjanja bakterija sa crijevne stijenke koje zatim prodiru unutar same stijenke<sup>92</sup>. Različiti sojevi bakterija, nađeni u tkivu crijeva te različiti ishodi antibiotske terapije ukazuju na povezanost Crohnove bolesti i raznih patogena<sup>93,94</sup>. Određene studije povezuju *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) s upalnim bolestima crijeva<sup>95</sup>. Mutacije *NOD2* gena povezane su sa smanjenim uništavanjem MAP-a od strane makrofaga, oslabljenim nespecifičnim i stečenim imuno odgovorom na unutarstaničnu mikobakterijsku infekciju<sup>96</sup>. Makrofagi zaraženi vijabilnim MAP-om, povezuju se sa stvaranjem velikih količina TNF- $\alpha$ . MAP proizvode manin kojim štite sebe, ali i druge bakterije, od fagocitoze te dolazi do raznih sekundarnih infekcija<sup>97,98</sup>.

S Crohnom bolesti povezuju se i određeni sojevi *E. coli*<sup>99</sup> poput invazivnih sojeva koji adheriraju na crijevnu stijenku (eng. *adherent-invasive Escherichia coli*, AIEC)<sup>97,100,101</sup>. AIEC stvaraju snažni biofilm u usporedbi s neinvazivnim AIEC sojevima te se povezuju s visokim stupnjem adhezije i infiltracije neutrofila<sup>102,103</sup> i sprečavanjem autofagije u autolizosomima čime je onemogućeno unutarstanično uništavanje bakterija što izaziva upalu<sup>104</sup> u kojoj dolazi do množenja AIEC i disbioze mikroflore u ileumu bez obzira na genotip<sup>105</sup>. AIEC sojevi se intenzivno množe u makrofagima potičući sekreciju velikih količina TNF- $\alpha$ <sup>106</sup>.

Pronađena je povezanost između držanja hrane u hladnjacima i razvoja CD-a, a pretpostavlja se da trovanje hranom kontaminiranom bakterijama kao što su *Yersinia* i *Listeria*, doprinosi razvoju ove bolesti<sup>107</sup>. Unatoč svemu, odnos određenih bakterija i CD-a, ostaje i dalje nerazjašnjen<sup>108</sup>.

## 1.2. Glikozilacija proteina

Glikozilacija je najraznolikija kotranslacijska i posttranslacijska modifikacija proteina i gotovo svi proteini plazme su glikozilirani-glikoproteini<sup>109</sup> čime se mijenja njihova struktura i funkcija,<sup>110,111</sup> ali i stabilnost.<sup>112,113</sup> Većina membranskih i izvanstaničnih proteina je glikozilirana te su glikani uključeni u patofiziologiju gotovo svake bolesti.<sup>109,114</sup> Proteini imaju, najčešće kovalentno vezane glikane koji se sastoje od monosaharida vezanih glikozidnom vezom. Uloga glikanskih struktura je ključna za funkciju proteina, funkciju koagulacijskog sustava, ekstravazaciju leukocita, metastaziranje stanica raka, embrionalni

razvoj, stanično prepoznavanje, oplodnju, imunološke procese<sup>115</sup> i gotovo svaki proces u našem organizmu<sup>116</sup>. Mutacije u genima uključenima u modifikaciju glikanskih antena su česte i imaju fatalne posljedice<sup>117</sup>, a poznat je i čitav niz nasljednih poremećaja glikozilacije (eng. *congenital disorders of glycosylation*, CDG)<sup>118,119</sup>. U sintezu glikana je uključen velik broj enzima pa glikanske strukture nisu određene jednim genom već su zapisane u mreži velikog broja glikoziltransferaza, glikozidaza, transportera, transkripcijskih faktora itd. što rezultira složenim glikoproteomom.<sup>120</sup> Jedna od najpoznatijih uloga glikanskih struktura su antigeni krvnih grupa ABO.<sup>121</sup> Istraživanje glikozilacije proteina je važan dio rasvjetljavanja patogeneze IBD-a s obzirom kako je glikozilacija proteina promijenjena u raznim bolestima<sup>122–125</sup>, uključujući i IBD.<sup>126,127</sup>

### 1.2.1. Vrste glikozilacije proteina

Glikani mogu biti vezani na protein različitim načinima<sup>128</sup>:

#### 1) N-glikozilacija

Glikan se veže na dušikov atom asparagina u aminokiselinskom slijedu Asn-X-Ser/Thr pri čemu je na mjestu X bilo koja aminokiselina osim prolina. Glikan može biti vezan i na aspargin u slijedu Asn-X-Cys. Kod ljudi, glikan se najčešće veže na protein  $\beta$ -glikozidnom vezom preko *N*-acetilglukozamina (GlcNAc $\beta$ 1-Asn).

#### 2) O-glikozilacija

Glikan se veže na kisikov atom serina ili treonina u aminokiselinskom slijedu proteina, najčešće  $\alpha$ -glikozidnom vezom preko *N*-acetilgalaktozamina (GalNAc), a rjeđe  $\alpha$ -glikozidnom vezom preko fukoze ili manoze,  $\beta$ -glikozidnom vezom preko ksiloze te  $\alpha$ - i  $\beta$ -glikozidnom vezom preko GlcNAc-a, galkatoze ili glukoze.

#### 3) C-glikozilacija

Jedna manozna se veže na ugljikov atom prvog triptofana u aminokiselinskom slijedu W-X-X-W pri čemu je X bilo koja aminokiselina. Biosinteza i funkcija C-glikozilacije je još uvijek nerazjašnjena.

#### 4) P-glikozilacija

Glikan se veže na kisik fosfatne skupine fosfoserina.<sup>129</sup>

#### 5) GPI sidra

Glikanski dio povezuje C-kraj proteina s membranskim lipidima te tako usidruje protein u membranu.

## 6) Glikozaminoglikani

Na proteine se vezuju linearne ponavljajuće disaharidne jedinice (heksozamin i heksoza ili heksuronska kiselina) čime nastaju glikozaminoglikani.

Osnovni načini glikozilacije proteina su *N*- i *O*-glikozilacija, a moguće je da istovremeno na jednom proteinu budu zastupljene obe.

### 1.2.2. *N*-glikozilacija proteina

*N*-glikanske strukture su neophodne za razvoj eukariotskih organizama<sup>130</sup> i vezane su na mnoge membranske proteine kao i na one koji se izlučuju iz stanice. Dok se proteinski dio još sintetizira na ribosomima vezanima za ER i translocira kroz membranu ER-a, na luminalnoj strani membrane ER-a dolazi do prijenosa *N*-glikana na asparagin. Membranski glikoproteini ostaju usidreni u membranu ER-a, a njihovi *N*-glikani su vezani na domene proteina u lumenu ER-a. S druge strane glikoproteini koji nemaju transmembransku domenu, nakon kotranslacijskog vezanja *N*-glikana, transportiraju se u cijelosti u lumen ER-a.<sup>128</sup>

#### 1.2.2.1. Heterogenost *N*-glikana

*N*-glikozilacija ovisi o aminokiselinskom slijedu Asn-X-Ser/Thr u proteinu te konformaciji samog proteina, odnosno, pristupačnosti asparagina za vrijeme smatanja proteina. Učinkovitost *N*-glikozilacije ovisi i o aminokiselini X<sup>131</sup> te o okolnim aminokiselinama.<sup>132</sup> Glikoproteini pokazuju različite stupnjeve zastupljenosti glikozilacije što se označava pojmom makroheterogenost. Različite molekule istog glikoproteina mogu na jednom aminokiselinskom slijedu Asn-X-Ser/Thr imati vezane različite *N*-glikane. Ako glikoprotein posjeduje više aminokiselinskih slijedova Asn-X-Ser/Thr, različite molekule istog glikoproteina mogu imati vezane različite *N*-glikane na spomenutim aminokiselinskim slijedovima. Ova pojava je poznata pod nazivom mikroheterogenost glikana. Dakle, postoje glikoproteini s istim polipeptidnim lanacem, ali s različitim vezanim šećerima. Te varijante koje se razlikuju u broju i vrsti vezanih glikana nazivaju se glikoformama. Dakle, glikoforma je specifični oblik glikoproteina karakteriziran vezanim šećerima. Različite glikoforme istog proteina mogu imati različita funkcionalna, kinetička ili fizička svojstva, a tipovi glikana koje proizvodi stanica, tkivo ili čitav organizam mogu odražavati njegov trenutni fiziološki status. Raznolikost *N*-vezanih glikana određena je slijedom aminokiselina u proteinu<sup>133</sup>,

konformacijom proteina<sup>132</sup>, metabolizmom šećera vezanog za nukleotid, brzinom transporta glikoproteina kroz ER i Golgijev aparat (GA) te smještajem glikozil-transferaza u pododjeljcima GA<sup>134</sup>. Mnoge glikozil-transferaze i glikozidaze ovise o aktivnosti enzima u prethodnim koracima te razni enzimi kompetiraju za isti supstrat.<sup>128</sup>

#### 1.2.2.2. *Struktura N-glikana*

*N*-glikani su složene razgranate strukture definirane slijedom vezanih šećera, položajem glikozidne veze (1-2, 1-3, 1-4, 1-6), njenom anomernom konfiguracijom ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), brojem grana i položajem grananja. Zajednička struktura svih vrsta *N*-vezanih glikana je sržni dio koji se sastoji od tri manoze (Man) i dva *N*-acetilglukozamina (GlcNAc):  $\text{Man}(\alpha 1-6)[\text{Man}(\alpha 1-3)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn}$ .

Osnovne vrste *N*-vezanih glikana s obzirom na vrste šećera i način grananja (Slika 1.2.2.2)<sup>128</sup>.

##### 1. Oligomanozni

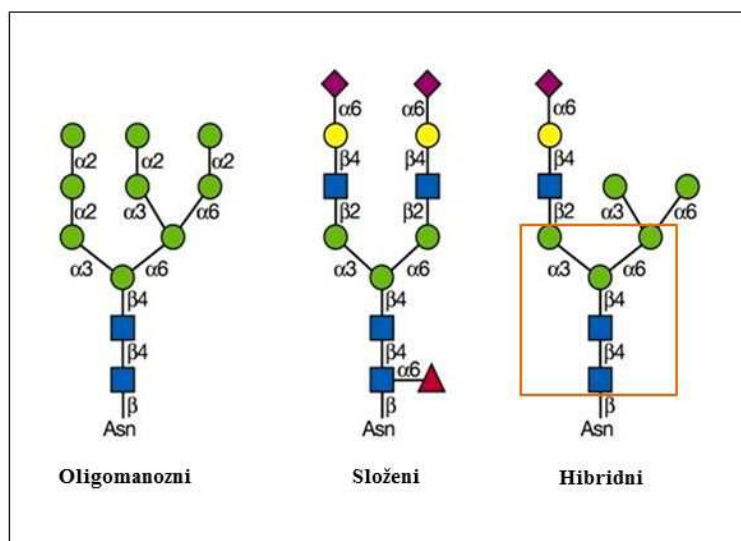
Na sržnu strukturu su vezane samo manoze.

##### 2. Složeni

Na sržnu strukturu su vezane strukture koje započinju vezanjem GlcNAc na svaku krajnju manozu, tzv. „antene“. Mogu imati vezanu galaktozu, fukozu i sijalinsku kiselinu.

##### 3. Hibridni

Imaju obilježja oligomanoznog i složenog tipa *N*-glikana. Na  $\text{Man}(\alpha 1-3)$  ruku sržne strukture, vezana je jedna ili dvije antene dok su na  $\text{Man}(\alpha 1-6)$  ruku sržne strukture, vezane samo manoze.



**Slika 1.2.2.2** Tri osnovne vrste *N*-vezanih glikana: oligomanozni, složeni i hibridni, od kojih svaki sadrži sržnu strukturu  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$  označenu narančastim pravokutnikom krajnje desno. Zeleni krug: manoz, plavi kvadrat: *N*-acetilglukozamin, ljubičasti romb: *N*-acetilneuraminska kiselina (sijalinska kiselina), žuti krug: galaktoza, crveni trokut: fukoza, prilagođeno iz Varki, 2009.<sup>128</sup>

Ovisno o pristupačnosti šećera što je uvjetovano konformacijom proteina na koji je vezan i samom domenom na kojoj se nalazi, različite vrste *N*-glikana mogu biti vezane na isti protein. Što je šećer pristupačniji, veća je vjerojatnost da će enzimi odcijepiti većinu manoz a te će se omogućiti vezanje dodatnih šećera na sržnu strukturu. S druge strane ako je vezani glikan manje pristupačan, veća je vjerojatnost da ostane u visokomanoznom obliku.

### 1.3. Analiza *N*- i *O*-glikozilacije proteina

Za razliku od oligonukleotida i proteina, glikanski lanci se ne sintetiziraju po predlošku, većinom su razgranati i nelinearni te podložni modifikacijama, stoga je i napredak u istraživanjima glikana tekao puno sporije u usporedbi s istraživanjima proteina i nukleinskih kiselina. Složenosti analize glikana doprinosi i njihova mikroheterogenost, nedostatak prirodnog kromofora te postojanje prirodnih izomera (položaj i veza), odnosno kemijska sličnost između pojedinačnih šećera koji grade glikanske strukture. Analiza glikozilacije se može provoditi različitim metodama poput: spektrometrije masa (eng. *mass spectrometry*, MS), nuklearne magnetske rezonancije (eng. *nuclear magnetic resonance*, NMR), tekućinske



kromatografije (eng. *liquid chromatography*, LC), izoelektričnog fokusiranja (eng. *isoelectric focusing*, IEF), kapilarne elektroforeze (eng. *capillary gel electrophoresis*, CGE), ometanja glikozilacije, digestije enzimima (endoglikozidaze i egzoglikozidaze), lektina, kemijskih modifikacija ili cijepanja, metaboličkog radioaktivnog označavanja, korištenja inhibitora i početnica glikozilacije, antitijela, kloniranja glikoziltransferaza i genetičke manipulacije glikozilacije u intaktnim stanicama i organizmima, usmjerene *in vitro* sinteze glikana uz kemijske i enzimске metode, stvaranja oligosaharidnih knjižnica i dr.<sup>135</sup>

Analiza glikozilacije proteina je prilično složen i zahtjevan proces prvenstveno zbog složenosti i raznovrsnosti glikana koji otežavaju izbor učinkovitih analitičkih metoda. Kako bi se dobile što točnije i preciznije informacije o prisutnim šećerima, od iznimne je važnosti pronaći metodu koja omogućuje istovremenu analizu nenabijenih (manje hidrofilnih) i nabijenih (izrazito hidrofilnih) glikana, a ujedno razgradnju složenih glikana svesti na najmanju moguću mjeru. Istovremena analiza *N*- i *O*-glikozilacije predstavlja veliki izazov upravo zbog znantnih razlika u kemijskim svojstvima i stabilnosti među pojedinim glikanskim strukturama pa je najčešće nepotpuna, nereproducibilna te izrazito složena i skupa zbog brojnih predanalitičkih koraka pripreme i pročišćavanja *N*- i *O*-glikana prije same analize. Za oslobađanje *O*-glikana s proteina, koriste se kemijski postupci kod kojih postoji mogućnost sporednih reakcija koje dovode do slabije učinkovitosti oslobađanja te slabe reproducibilnosti. Slabijoj reproducibilnosti i točnosti određivanja *O*-glikana u odnosu na *N*-glikane pridonosi i njihova manja kemijska stabilnost te postupno razgrađivanje, tzv. ljuštenje (eng. *peeling*).<sup>136-138</sup> S druge strane, *N*-glikane je moguće osloboditi s proteina inkubiranjem s enzimom peptid-*N*-glikozidazom F koji specifično cijepa vezu između *N*-vezanog sržnog GlcNAc-a i Asn u glikoproteinu pri čemu se Asn prevodi u aspartat (Asp) i nastaje 1-amino oligosaharid koji se zatim hidrolizira u amonijak i oligosaharid sa slobodnim reducirajućim krajem. Analiza *N*-glikozilacije najviše je zastupljena upravo zbog jednostavnije analize<sup>139</sup>. Kod metoda analiziranja glikopeptida, nije potrebno koristiti enzim za oslobađanje *N*-glikana.<sup>140</sup>

## 1.3.1. Vrste visokoprotočne analize N-glikozilacije proteina

Zbog kompleksnosti građe oligosaharida i nedostatka analitičkih metoda za otkrivanje njihove strukture, u početku su studije glikoma na velikom broju ispitanika bile nemoguće. Potreba za metodama analize glikozilacije na velikom broju uzoraka, tzv. visokoprotočne metode (eng. *high-throughput methods*), ukazala se kroz velike populacijske studije gdje se analizira glikozilacija proteina na velikom broju uzoraka pacijenata i zdravih ispitanika kontrolne skupine kako bi se ustanovila varijacija u glikozilaciji zdrave populacije i promjene kod bolesnih te kako bi se istražila uloga glikanskih struktura kao potencijalnih dijagnostičkih i prognostičkih markera. Visokoprotočne metode su točnije i robustnije u odnosu na metode za mali broj uzoraka.

U upotrebi je nekoliko metoda visokoprotočne analize N-glikozilacije<sup>141</sup>:

1. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti  
(eng. *ultra performance liquid chromatography*, UPLC)<sup>142,143</sup>
2. Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa  
(eng. *liquid chromatography mass spectrometry*, LC-MS)<sup>140</sup>
3. Spektrometrija masa s matricom potpomognutom ionizacijom laserskom desorpcijom  
(eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*, MALDI-MS)<sup>144</sup>
4. Kapilarna gel elektroforeza  
(eng. *capillary gel electrophoresis*, CGE)<sup>145,146</sup>

Navedene metode su uspoređene na primjeru analize glikozilacije imunoglobulina G (IgG) (Tablica 1.3.1).<sup>141</sup>

**Tablica 1.3.1** Pregled visokoprotočnih metoda analize glikana IgG-a, prilagođeno iz Huffman et al, 2014.<sup>141</sup>

|                                   | UPLC   | MALDI-MS   | LC-MS   | CGE   |
|-----------------------------------|--|--|---|---|
| <b>Protočnost</b>                 | Umjerena, približno 50 uzoraka po instrumentu u danu | Visoka, mjerenje uzorka u trajanju manje od minute | Umjerena, približno 100 uzoraka po instrumentu u danu | Visoka, korištenje do 96 kapilara omogućava mjerenje tisuća uzoraka |
| <b>Razlučivost</b>                | Visoka   | Vrlo visoka  | Vrlo visoka   | Visoka  |
| <b>Razdvajanje izomera</b>        | Dobro  | -  | Djelomično  | Vrlo dobro  |
| <b>Kvantifikacija</b>             | Vro dobra  | Umjerena   | Dobra   | Dobra   |
| <b>Potrebna razina stručnosti</b> | Umjerena   | Visoka   | Vrlo visoka   | Umjerena  |

| Učestalost upotrebe  | U širokoj upotrebi  | U širokoj upotrebi  | Umjereno korištena   | Rijetko korištena   |
|--|---|---|--|---|
| <b>Cijena opreme</b>   | 40 000 – 70 000 EUR   | 100 000 – 500 000 EUR   | 200 000 – 500 000 EUR  | 100 000 EUR (instrument s 4 kapilare)   |
| <b>Cijena po uzorku u visokoprotlačnom načinu rada</b>               | Prilično visoka cijena, uglavnom zbog manje protočnosti i cijene kemikalija                   | Niska cijena, uglavnom zbog visoke protočnosti po instrumentu   | Vrlo visoka cijena, uglavnom zbog skupe opreme i manje protočnosti po instrumentu  | Niska cijena, uglavnom zbog niske cijene analize i mogućnosti paralelne analize   |
| <b>Glavne prednosti u genetičkim i epidemiološkim istraživanjima</b> | Pouzdana kvantifikacija, robusnost  | Niska cijena i visoka protočnost, analiza mjesno specifične glikozilacije, osjetljivost, omogućava određivanje strukture fragmentacijom | Pouzdana kvantifikacija, osjetljivost, analiza mjesno specifične glikozilacije, omogućava određivanje strukture fragmentacijom             | Manje zahtjevana priprema uzoraka, niska cijena, velika robusnost i visoka protočnost, vrlo osjetljiva, pouzdana relativna kvantifikacija |
| <b>Glavni nedostaci u genetičkim i epidemiološkim istraživanjima</b> | Nemogućnost analize mjesno specifične glikozilacije, relativno niska protočnost i veća cijena | Manje pouzdana kvantifikacija, gubitak sijalinskih kiselina   | Relativno visoka cijena  | Nemogućnost analize mjesno specifične glikozilacije, mala baza podataka   |
| <b>Prednosti u analizi glikozilacije IgG-a</b>                       | Mogućnost razlikovanja glikozilacije na ruci 3 i 6, točna kvantifikacija sijalinizacije IgG-a | Mogućnost razlikovanja glikana na pojedinim potklasama IgG-a, analiza samo glikana s Fc* regije   | Mogućnost razlikovanja glikana na pojedinim potklasama IgG-a, analiza samo glikana s Fc* regije, točna kvantifikacija sijalinizacije IgG-a | Mogućnost razlikovanja glikozilacije na ruci 3 i 6, točna kvantifikacija sijalinizacije IgG-a   |

\* Fc–fragment IgG-a koji kristalizira, vidi Poglavlje 1.4.

### 1.3.2. Visokoprotočna analiza N-glikozilacije proteina spektrometrijom masa

Spektrometrija masa je jedna od osnovnih analitičkih metoda analize glikana i glikoproteina, a daje informacije o složenim glikoproteinskim strukturama poput slijeda aminokiselina u glikoproteinu, položaja disulfidnih mostova, N- i O-glikozilacijskim mjestima te glikanskoj strukturi<sup>147</sup>. Pri analizi MS-om, molekule ispitivanog uzorka se prevode u ione koji se razdvajaju prema omjeru mase i naboja (eng. *mass to charge ratio*, m/z). Ionizacija se provodi u izvoru iona te se ioni razdvajaju u analizatoru (pod utjecajem električnog ili magnetskog polja) na temelju omjera m/z pri čemu detektor snima količinu iona određenih m/z vrijednosti. Oslobođeni glikani se mogu analizirati u nativnom, reducirajućem obliku nakon obilježavanja reducirajućeg kraja ili nakon permetilacije.<sup>148</sup>

Pri analizi glikanskih struktura MS-om upotrebljavaju se dvije tehnike ionizacije molekula uzorka, matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI) i ionizacija elektroraspršenjem (eng. *electrospray ionization*, ESI).<sup>148-152</sup> Nedostatak MALDI ionizacijske tehnike je čest gubitak sijalinskih kiselina na glikanima što se može izbjeći zaštitom sijalinskih kiselina metilacijom karboksilnih ostataka ili permetilacijom čime ih se stabilizira.<sup>153,154</sup> Vrsta korištene matrice pri MALDI-MS analizi također utječe na stupanj desijalinizacije.<sup>144,155,156</sup> ESI tehnika ionizacije se kombinira s LC-MS analizom. Analiza glikopeptida se provodi kako bi se dobile informacije o mjestu vezanja glikana na proteinu te o peptidnom dijelu glikoproteina s obzirom da se analizom samih glikana oslobođenih s glikoproteina dobije samo informacija o glikanskoj strukturi. Tako se analizom glikopeptida IgG-a omogućava razlikovanje njegovih različitih potklasa na osnovu peptidnih dijelova i njihovih masa, pri čemu se najčešće koriste metode MALDI-MS i LC-MS.<sup>144,157-159</sup> Kod LC-MS metode, manja je mogućnost gubitka sijalinskih kiselina s visokosijaliniziranih glikopeptida nego što je to slučaj kod MALDI-MS metode, čija je prednost kraće vrijeme analize.

### 1.3.3. Visokoprotočna analiza glikopeptida metodom nanoLC-MS

Visokoprotočna analiza glikopeptida se često provodi metodom nanoLC-MS s obzirom da omogućava visoku razlučivost, pouzdanu kvantifikaciju, osjetljivost, analizu mjesno specifične glikozilacije te određivanje strukture fragmentacijom, unatoč relativno visokoj cijeni opreme i same analize, djelomičnom razdvajanju izomera i umjerenom brzini

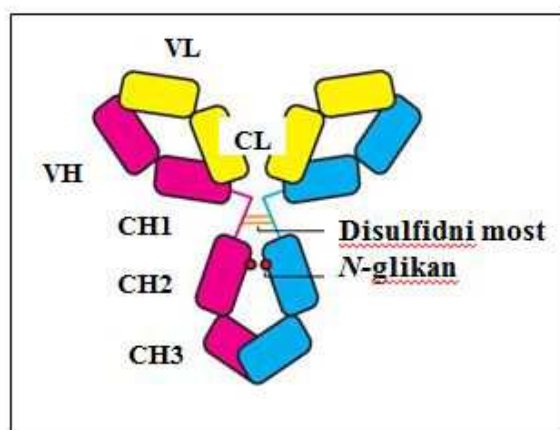
analize. Kod analize glikozilacije IgG-a, ova metoda pruža mogućnost analize glikana samo s kristalizirajućeg fragmenta (eng. *fragment crystallizable*, Fc), ali zato omogućava razlikovanje glikana u pojedinim potklasama IgG-a te točnu kvantifikaciju sijalinizacije IgG-a.

Analiza glikopeptida nanoLC-MS metodom obuhvaća slijedeće korake<sup>140</sup>:

1. Priprava glikopeptida djelovanjem enzima tripsina
2. Pročišćavanje glikopeptida obrnuto faznom ekstrakcijom na čvrstoj fazi
3. Analiza potklasa peptida koje se razdvajaju tekućinskom kromatografijom te glikopeptida koji se razdvajaju spektrometrijom masa

## 1.4. Imunoglobulin G

Imunoglobulini su skupina glikoproteina koji imaju ulogu antitijela te specifično prepoznaju različite antigene, a proizvode ih plazma stanice kao odgovor na izloženost antigenima (proteini, lipidi, polisaharidi i nukleinske kiseline). Imunoglobulini obavljaju različite funkcije poput: opsonizacije antigena i poticanja fagocitoze, neutralizacije antigena aktiviranjem stanične citotoksičnosti posredovane antitijelima (eng. *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC), aktivacije komplementa te sudjeluju u neonatalnoj imunosti. Građu IgG-a možemo promatrati kroz 2 teška (svaki 50-70 kDa) i 2 laka lanca (svaki oko 25 kDa) povezana disulfidnim vezama u obliku slova Y (Slika 1.4).<sup>160</sup> Disulfidne veze međusobno kovalentno povezuju dva teška lanca te lake lance s teškim lancima. Teški i laki lanci IgG-a, podijeljeni su u različite kategorije ovisno o funkciji. Konstantna regija teškog lanca (eng. *constant heavy*, CH) sastoji se od tri ili četiri tandemski poredane domene: CH1, CH2, CH3 (i CH4) dok varijabilnu regiju teškog lanca (eng. *variable heavy*, VH) predstavlja jedna domena.<sup>160</sup> Laki lanci se sastoji od dvije domene, konstantne (eng. *constant light*, CL) i varijabilne (eng. *variable light*, VL).<sup>160</sup> Struktura molekule omogućava imunoglobulinima veliku fleksibilnost što pogoduje vezivanju vrlo raznolikih antigenskih struktura i determinanti na različitim udaljenostima.<sup>161</sup> Na imunoglobulinu G razlikuju se dvije regije, varijabilna je odgovorna za prepoznavanje i vezanje antigena (eng. *fragment, antigen binding*, Fab) i regija koja kristalizira koja je odgovorna za vezanje na stanične receptore i komponente komplementa (Fc). Fab regiju čine laki lanci (CL i VL) te po dvije domene teških lanca (CH1 i VH) imunoglobulina G dok Fc regiju čine po dvije domene teških lanaca (CH2 i CH3).<sup>162</sup>

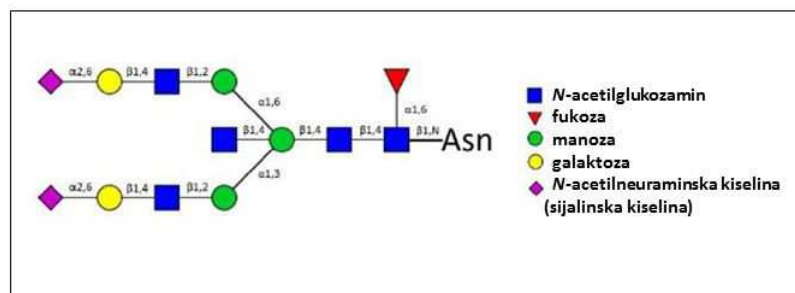


**Slika 1.4.** Struktura imunoglobulina G1. Teški lanci su prikazani ružičastom i plavom bojom, a sastoje se od varijabilne domene (VH) i tri konstantne regije (CH1-CH3). Laki lanci su prikazani žutom bojom, a sastoje se od jedne varijabilne domene (VL) i jedne konstantne domene (CL), prilagođeno iz Ahemd et al, 2014.<sup>160</sup>

Imunoglobulini se dijele u klase (A, D, E, G i M) i potklase na osnovu razlike u aminokiselinskom slijedu i strukturi konstantnih regija teških lanaca. Najzastupljenije antitijelo u serumu kod ljudi te glavno antitijelo imunološkog sustava u borbi protiv patogena (bakterije, virusi, gljivice) je IgG s četiri potklase: IgG1-IgG4. Antitijela iste klase i potklase imaju isti slijed aminokiselina u konstantnim regijama teških lanaca koji se razlikuje u odnosu na antitijela drugih klasa. Imunoglobulini su izrazito heterogena skupina glikoproteina zbog postojanja različitih klasa i potklasa teških i lakih lanaca koji se mogu kombinirati.<sup>161</sup> Kod ljudi postoje tri vrste staničnih receptora za IgG (eng. *Fc gamma receptors*, Fc $\gamma$ R) od kojih samo Fc $\gamma$ RI veže IgG dok Fc $\gamma$ R $\text{II}$  i Fc $\gamma$ R $\text{III}$  vežu kompleks IgG-a i antigena, a afinitet vezanja ovisi o potklasi IgG-a.<sup>163</sup>

#### 1.4.1. N-glikozilacija imunoglobulina G

Na Fc regiji nalazi se glavno mjesto N-glikozilacije s vezanim glikanima. Na visoko konzerviranom asparaginu 297, svake CH2 domene u Fc regiji, teški lanaci IgG-a nose po jedan kovalentno vezan N-glikan za koje se pretpostavlja da omogućuju vezanje antitijela na receptore Fc $\gamma$ R s obzirom da deglikozilirani IgG nema tu mogućnost.<sup>164</sup> Najsloženiji Fc N-glikan FA2BG2S2 je diantenarna (A2), digalaktozilirana (G2) i disijalinizirana (S2) struktura s računajućim N-acetilglukozaminom (GlcNAc) (B) i  $\alpha$ (1,6) fukozom (F) na sržnom GlcNAc-u (Slika 1.4.1).<sup>164,165</sup> U odnosu na ovu strukturu, ostalim glikanima IgG-a nedostaje jedna ili više jedinica šećera.



**Slika 1.4.1** Najsloženiji IgG Fc-glikan FA2BG2S2 je diantenarni (A2), digalaktozilirani (G2) i disijalinizirani (S2) glikan s račvujućim  $\beta(1,4)$  N-acetilglukozaminom (GlcNAc) (B) i  $\alpha(1,6)$  fukozom (F) na sržnom GlcNAc-u. Prikazane su veze i anomerne konfiguracije. Plavi kvadrat: N-acetilglukozamin, crveni trokut: fukoza, zeleni krug: manoz, žuti krug: galaktoza, ljubičasti romb: N-acetilneuraminska kiselina (sijalinska kiselina), prilagođeno iz Pezer et al, 2016.<sup>165</sup>

Fc-glikozilacija IgG-a je vrlo složena i pod utjecajem je mnogih genskih<sup>166</sup>, epigenetičkih<sup>167</sup> i okolišnih čimbenika<sup>168,169</sup> te je vrlo različita među pojedincima, ali stabilna kod jedne osobe u homeostatskim uvjetima<sup>170</sup> uz iznimku dobi koja jako utječe na IgG glikom pojedinca.<sup>171</sup> Manji broj molekula IgG-a (15-20 %) ima vezane N-glikane i u varijabilnim domenama lakih ili teških lanaca, odnosno u Fab regiji<sup>172,173</sup> što nastaje somatskim hipermutacijama gdje zbog točkastih mutacija nastaju imunoglobulini s povećanim afinitetom za antigen.<sup>174</sup> Sastav glikana Fab i Fc regije je različit pa je tako stupanj sijalinizacije, zastupljenost glikana s račvujućim GlcNAc-om te fleksibilnost samih glikana, veća u Fab regiji.<sup>175,176</sup> Vezani Fc N-glikani su važni za strukturnu stabilnost i efektorske funkcije IgG-a i definiraju hoće li IgG antitijela imati proupalno ili protuupalno djelovanje.<sup>177</sup> Postoje brojni primjeri o povezanosti glikozilacije Fc regije s djelovanjem i funkcijom ovih antitijela.<sup>178</sup> Sijalinizacija mišjeg IgG-a određuje njegovo protuupalno djelovanje<sup>176,179,180</sup> dok prisutnost sržne fukoze smanjuje IgG-om posredovanu staničnu citotoksičnost ovisnu o antitijelima, ADCC<sup>168,181–183</sup> i aktivira komplement<sup>184</sup>. Utjecaj galaktozilacije na funkciju IgG-a nije potpuno razjašnjen s obzirom kako je povezana s protuupalnim<sup>185</sup>, ali i proupalnim djelovanjem<sup>186,187</sup>. Sastav IgG N-glikana Fc regije utječe na vezanje IgG-a na Fc $\gamma$ R-e niskog i visokog afiniteta.<sup>188,189</sup> Iako je točan mehanizam još uvijek nerazjašnjen<sup>190</sup>, nedvojben je snažan utjecaj IgG glikana na njegova imunosupresivna svojstva o čemu svjedoči i djelovanje glikana na terapijske, intravenski administrirane imunoglobuline (eng. *intravenously*

*administered immunoglobulins*, IVIG).<sup>191</sup> Razumijevanje funkcionalnog značaja promjena glikozilacije u bolesti je dodatno otežano efektima potklasa IgG-a što je pokazano u različitim modelima.<sup>192</sup> Nedavne studije su ukazale na brojne uloge IgG-a u upali na sistemskoj razini<sup>193</sup> te na njegovu promijenjenu glikozilaciju u raznim bolestima<sup>194–198</sup> uključujući IBD<sup>126,127,185</sup>.

#### 1.4.2. Pleiotropija gena za N-glikozilaciju imunoglobulina G i upalnu bolest crijeva

U sklopu GWAS istraživanja, identificirana je pleiotropija gena za glikozilaciju IgG-a i gena koji se povezuju s razvojem i progresijom IBD-a<sup>21,68,166</sup>. Navedena istraživanja nisu otkrila mehanizme iza spomenutih promjena kao ni njihovu kliničku važnost.

Geni za N-glikozilaciju humanog IgG-a pokazuju pleiotropiju s genima povezanim s upalnim bolestima crijeva (Slika 1.4.2). Radi se o genima *BACH2*<sup>\*</sup>, *IKZF1*<sup>†</sup>, *IL6ST*<sup>‡</sup>, *LAMB1*<sup>§</sup> i *MGAT3*<sup>\*\*166</sup>.

1. *BACH2*<sup>\*</sup> sudjeluje u transkripcijskoj aktivaciji B limfocita, modificira citotoksične učinke antitumorskih lijekova i regulira ekspresiju interleukina-2 (IL-2) u CD4<sup>+</sup> T limfocitima iz krvi pupčane vrpce<sup>199</sup>, a povezan je i s Crohnovom bolesti<sup>68</sup>. Kod N-glikozilacije IgG-a povezuje se s fukoziliranom, monogalaktoziliranom glikoformom s dvije antene.

2. *IKZF1*<sup>†</sup> se povezuje s regulacijom diferencijacije limfocita<sup>200,201</sup> i s Crohnovom bolesti<sup>202</sup>. Kod N-glikozilacije IgG-a, smanjuje fukozilaciju glikana bez vezanih galaktoza i bez računajućeg GlcNAc-a.

3. *IL6ST*<sup>‡</sup> se povezuje s galaktozilacijom IgG-a, točnije s postotkom agal- i digalaktoziliranih struktura u ukupnim neutralnim glikanima.

---

*BACH2* - kodira protein, regulator transkripcije kod B limfocita, može biti supresor ili promotor

(<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BACH2>)

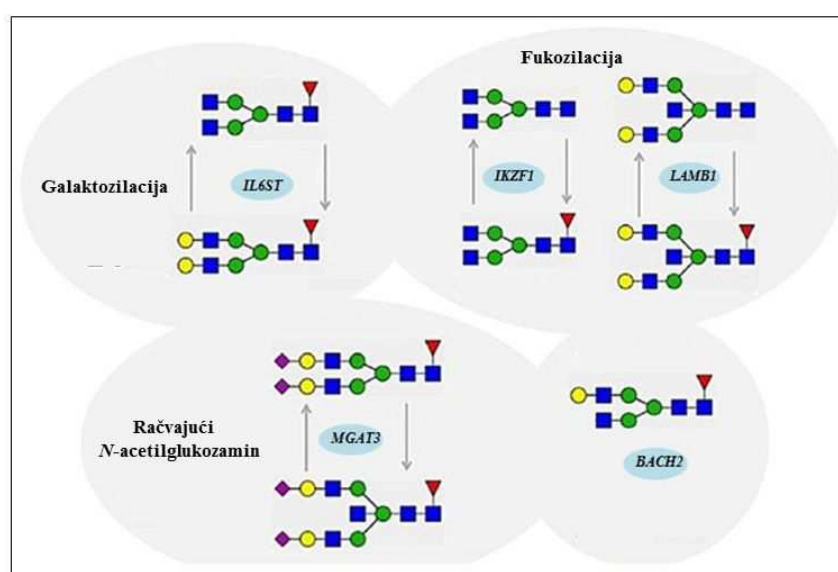
<sup>†</sup>*IKZF1* - kodira protein Ikaros, regulator transkripcije iz porodice DNA-vezujućih proteina koji sudjeluje u remodeliranju kromatina, (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IKZF1>)

<sup>‡</sup>*IL6ST* – kodira protein koji sudjeluje u kompleksu citokina i receptora, a ima ulogu u provođenju signala (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL6ST>)



4. *LAMB1*<sup>§</sup> kodira podjedinicu proteina laminina koji utječe na vezanje, migraciju i organizaciju stanica u tkiva tijekom embrionalnog razvoja preko interakcije s drugim komponentama izvanstaničnog matriksa. Također, ovaj gen se povezuje i s ulceroznim kolitisom pri čemu promjene integriteta intestinalne, epitelne barijere mogu pridonijeti patogenezi bolesti.<sup>203–207</sup> Kod *N*-glikozilacije IgG-a *LAMB1* se povezuje s fukozilacijom digalaktosiliranih struktura s račvujućim GlcNAc-om.

5. *MGAT3*<sup>\*\*</sup> se povezuje s Crohnovom bolesti<sup>68</sup> i s račvujućim GlcNAc-om u fukoziliranim, disijaliniziranim strukturama *N*-glikana IgG-a.



**Slika 1.4.2** Geni glikozilacije IgG-a pokazuju pleiotropiju s genima povezanim s upalnim bolestima crijeva. Zeleni krug: manoz, plavi kvadrat: *N*-acetilglukozamin, ljubičasti romb: *N*-acetilneuraminska kiselina (sijalinska kiselina), žuti krug: galaktoza, crveni trokut: fukoza, prilagođeno iz Lauc et al, 2013.<sup>166</sup>

<sup>§</sup>*LAMB1*- kodira laminin beta 1 podjedinicu glikoproteina izvanstaničnog matriksa laminina koji je jedna od glavnih nekolagenskih komponenata bazalnih membrane,

(<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LAMB1>)

<sup>\*\*</sup>*MGAT3*- kodira GlcNAc-transferazu III, enzim koji dodaje račvujući GlcNAc

(<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MGAT3>)

### 1.4.3. N-glikozilacija imunoglobulina G u upalnoj bolesti crijeva

Postojeće metode za dijagnozu, prognozu i praćenje upalne bolesti crijeva su često invazivne i/ili nedovoljno osjetljive<sup>53,193</sup> te bi mjerenje glikozilacije proteina u plazmi moglo biti potencijalan, manje invazivan biomarker koji bi pridonio klasifikaciji pacijenata te preciznosti liječenja. Imunoglobulin G ima značajnu ulogu u patofiziologiji autoimunih, a pretpostavlja se time i upalnih bolesti crijeva u kojima se stvaraju antitijela na antigene i tkiva vlastitog organizma pri čemu dolazi do snažnog odgovora imunološkog sustava uzrokujući oštećenja tkiva s patološkim procesima.<sup>208</sup> IgG antitijela se povezuju s kroničnom upalom i destrukcijom zdravog tkiva vlastitog organizma preko križnog povezivanja receptora FcγR na efektorским stanicama urođenog imunološkog sustava. Gubitak glikana s IgG-a dovodi do proupalne aktivnosti, sugerirajući da *in vivo* modeliranje glikozilacije antitijela može biti strategija za borbu protiv autoimunih bolesti.<sup>209</sup> Potklasa i glikozilacija IgG-a utječu na patogenost autoantitijela u autoimunim bolestima.<sup>210</sup>

Istraživanja ukazuju na povezanost Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa s promjenama koncentracije pojedinih potklasa IgG-a koje koreliraju s fazama ovih bolesti, ali nažalost ne i s vrstom bolesti (Crohnova bolest ili ulcerozni kolitis). Postoje i algoritmi za diferenciranje Crohnove bolesti od ulceroznog kolitisa koji uz IgG uključuju i razna druga antitijela, ali ni jedan nije dovoljno učinkovit kako bi ušao u kliničku primjenu.<sup>211</sup> Neka od dosadašnjih istraživanja N-glikozilacije imunoglobulina G u upalnim bolestima crijeva ukazuju na smanjenu galaktozilaciju kod pacijenata koji boluju od ovih bolesti.<sup>126,127</sup> U istraživanju glikozilacije ukupnih serumskih proteina kod pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa, također je potvrđena smanjena galaktozilacija, ali i veća zastupljenost razgranatih, sijaliniziranih glikana u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika<sup>212</sup> što ukazuje na proupalno djelovanje sijalinskih kiselina.<sup>176,180</sup> Najnovija istraživanja N-glikozilacije IgG-a u IBD-u, metodom UPLC-a na razini svih glikana<sup>185</sup>, ne pokazuju razlike u glikozilaciji između potklasa kao ni Fc-/Fab- lokaciju. Poznato je kako se Fc- i Fab- glikozilacije IgG-a značajno razlikuju te kako se tijekom bolesti može povezati s Fc-glikozilacijom.<sup>213</sup> Navedena istraživanja N-glikozilacije IgG-a u IBD-u ukazuju na manju zastupljenost galaktoziliranih i monosijaliniziranih glikoformi te veću zastupljenost glikoformi s računajućim GlcNAc-om kod pacijenata koji boluju od Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa u odnosu na zdrave ispitanike.<sup>185</sup>

## 1.5. Svrha i cilj

Poznato je kako je *N*-glikozilacija imunoglobulina G promijenjena u upalnoj bolesti crijeva no dosad nije provedena analiza glikozilacije Fc-fragmenta po potklasama. Cilj ove doktorske disertacije je analizirati *N*-glikozilaciju Fc-fragmenta imunoglobulina G po potklasama, metodom tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa, kod pacijenata oboljelih od Crohnove bolesti, ulceroznog kolitisa te u kontrolnoj skupini (eng. *healthy controls*, HC) kako bi se ispitala povezanost *N*-glikozilacije s kliničkim obilježjima upalne bolesti crijeva.

Svrha rada je utvrditi povezanost između glikozilacijskih promjena IgG-a i pojedinih skupina ispitanika (CD/UC/HC) kako bi se ispitala potencijalna uloga glikozilacijskih struktura i obilježja u svrstavanju pacijenata u skupinu oboljelih od CD-a ili UC-a. Trenutne metode klasifikacije su vrlo invazivne i nedovoljno osjetljive što ostavlja prostor za novi, minimalno invazivan biomarker, povećane osjetljivosti. Ispitivanjem povezanosti *N*-glikozilacije Fc-fragmenta IgG-a po potklasama s kliničkim obilježjima upalnih bolesti crijeva što bi moglo pridonijeti razumijevanju mehanizama ovih bolesti kao i praćenju samih pacijenata.

## § 2. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE

### 2.1. Ispitanici

Istraživanje je odobrilo Povjerenstvo za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a skupljanje uzoraka odobrilo je Etičko povjerenstvo bolnice Azienda Ospedaliero Universitarii Careggi, Firenca, Italija. Doktorski rad je izrađen u sklopu projekta EU FP7-RegPot „Integra-Life“ broj: 315997. Uzorci su prikupljeni u sveučilišnoj bolnici Careggi, u okviru cijelogenomske asocijacijske studije na pacijentima oboljelima od Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa (tal. *Studio di associazione sull'intero genoma nei pazienti con Morbo di Crohn e colite ulcerosa*). Uzorci su prikupljeni na više lokacija u Italiji: Padova, Milano, Firenca, Rim i San Giovanni Rotondo u sklopu mreže „Talijanska grupa za IBD“ (eng. *Italian Group for IBD, IG-IBD*) počevši s 2001., a prvi puta su opisani u 2005.<sup>214</sup> Svake godine provođeno je longitudinalno praćenje pacijenata.<sup>215–221</sup> U istraživanje su bile uključene dvije skupine pacijenata s upalnim bolestima crijeva (Crohnova bolest i ulcerozni kolitis) te kontrolna skupina sa zdravim ispitanicima, a svi su potpisali informirani pristanak. Ukupno je sudjelovalo 2 357 ispitanika (N=2 357), od toga je bilo 874 oboljelih od Crohnove bolesti (N=874) i 1056 oboljelih od ulceroznog (N=1056), dok je kontrolna grupa imala 427 ispitanika (N=427). Ispitanici su svrstani u skupine na temelju povijesti bolesti te ostalih precizno definiranih kriterija i uputa te je fenotip definiran temeljem Montreal klasifikacije.<sup>4</sup> Svi ispitanici su ispunili posebne upitnike. Na temelju podataka iz povijesti bolesti iz upitnika, izrađena je tablica s podacima o ispitanicima koja uključuje podatke o dijagnozi, dobi, spolu i kliničkim obilježjima bolesti prema ranije opisanim kriterijima kliničara<sup>222–224</sup> (Tablica 2.1)<sup>225</sup>.

**Tablica 2.1** Raspodjela ispitanika prema dijagnozi, dobi, spolu i kliničkim obilježjima bolesti, prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

|   | HC <sup>a</sup>  | UC               | CD               |
|---|------------------|------------------|------------------|
| <b>Broj ispitanika</b>                                | 427              | 1056             | 874              |
| <b>Starost (med/IQR)</b>                              | 44,0 (35,0–56,0) | 41,0 (31,0–52,0) | 35,5 (27,0–46,0) |
| <b>Spol (Ž) (N/%)</b>                                 | 145 (34,0 %)     | 423 (40,1 %)     | 368 (42,1 %)     |
| <b>Trajanje bolesti (med/IQR)<sup>b</sup></b>         |                  | 6,0 (2,0–13,0)   | 5,0 (1,0–11,0)   |
| <b>Lokacija bolesti (CD) (N/%)<sup>c</sup></b>        |                  |                  |                  |
| Terminalni ileum i gornji dio GIT-a (L1±L4)           | -                | -                | 327 (38,7 %)     |
| Debelo crijevo i gornji dio GIT-a (L2±L4)             | -                | -                | 161 (19,1 %)     |
| Ileum, debelo crijevo i gornji dijelovi GIT-a (L3±L4) | -                | -                | 343 (40,6 %)     |
| Gornji dio GIT-a (L4)                                 | -                | -                | 13 (1,5 %)       |
| <b>Ponašanje bolesti (CD) (N/%)</b>                   |                  |                  |                  |
| Upalna (B1)   | -                | -                | 504 (58,3 %)     |
| Sužavajuća (B2)                                       | -                | -                | 237 (27,4 %)     |
| Perforirajuća (B3)                                    | -                | -                | 124 (14,3 %)     |
| <b>Lokacija bolesti (UC) (N/%)</b>                    |                  |                  |                  |
| Završni dio debelog crijeva (E1)                      | -                | 115 (11,0 %)     | -                |
| Lijeva strana debelog crijeva (E2)                    | -                | 489 (47,0 %)     | -                |
| Cijelo debelo crijevo (E3)                            | -                | 437 (42,0 %)     | -                |
| <b>Lijek (N/%)</b>                                    |                  |                  |                  |
| Mesalazin   | -                | 320 (32,5 %)     | 179 (22,7 %)     |
| Prednizolon   | -                | 360 (36,6 %)     | 229 (29,0 %)     |
| Tiopurini (AZA/6MP)                                   | -                | 213 (21,6 %)     | 174 (22,1 %)     |
| Anti-TNF  | -                | 90 (9,1 %)       | 207 (26,2 %)     |
| <b>Operacija (N/%)</b>                                |                  |                  |                  |
|   | -                | 81 (8,1 %)       | 327 (37,8 %)     |

<sup>a</sup> Zdrave kontrole (eng. *healthy controls*, HC), ulcerozni kolitis (eng. *ulcerative colitis*, UC), Chronova bolest (eng. *Crohn's disease*, CD), <sup>b</sup> Trajanje bolesti u godinama, <sup>c</sup> Lokacija i ponašanje bolesti opisane prema Montreal klasifikaciji, med medijan, IQR interkvartilni raspon (eng. *interquartile range*)

### 2.1.1. Uzorci krvne plazme

Za potrebe ovog istraživanja korišteni su alikvoti krvne plazme uzoraka ispitanika primarno skupljenih za cijelogenomsku asocijacijsku studiju na pacijentima oboljelima od CD-a i UC-a. Uzorci krvi su uzeti uz antikoagulans  $K_3EDTA$  (etilendiamintetraoctena kiselina). Alikvoti od 100  $\mu$ l krvne plazme, skladišteni na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , poslani su iz Italije u pločicama od 96 jažica te su bili pohranjeni na istoj temperaturi do početka same analize.

## 2.2. Materijali

### 2.2.1. Standardne kemikalije

ACN, acetonitril, HPLC razred (*Scharlau*)

ACN, acetonitril, LC-MS razred (*Sigma-Aldrich*)

amonijev bikarbonat,  $NH_4HCO_3$  (*Acros Organics- Thermo Fischer Scientific*)

natrijev hidrogenfosfat,  $Na_2HPO_4$  (*Acros Organics- Thermo Fischer Scientific*)

etanol (*Carlo Erba*)

formijatna kiselina,  $HCOOH$  (*Merck*)

izopropanol,  $(CH_3)_2CHOH$  (*Sigma-Aldrich*)

kalijev dihidrogenfosfat,  $KH_2PO_4$  (*Sigma-Aldrich*)

kalijev klorid,  $KCl$  (*EMD Milipore*)

kloridna kiselina,  $HCl$  (*Kemika*)

natrijev hidroksid,  $NaOH$  (*Kemika*)

natrijev klorid,  $NaCl$  (*Carlo Erba*)

octena kiselina,  $CH_3COOH$  (*Merck*)

propionska kiselina,  $CH_3CH_2COOH$  (*Sigma-Aldrich*)

TFA, trifluorooctena kiselina, HPLC razred (*Fluka*)

TFA, trifluorooctena kiselina, LC-MS razred (*Sigma-Aldrich*)

Tris, tris(hidroksimetil)aminometan (*Acros Organics- Thermo Fischer Scientific*)

Ultračista voda, 18 MΩ cm pri 25 °C (*Purite Fusion 40* sustav za pročišćavanje vode, *Purite Ltd.*).

### 2.2.2. Enzimi

TPCK tripsin (*Worthington Biochemical Corporation*)

### 2.2.3. Pločice s 96 jažica

#### 2.2.3.1. Afinitetne pločice

Protein G pločica (*BIA Separations*)

Protein G pločica s 96 jažica je razvijena za izolaciju IgG-a iz krvne plazme ili seruma u sklopu projekta High Glycan, Metode za visokoprotlačnu analizu glikozilacije proteina (EU FP7 projekt broj: 278535). Volumen stacionarne faze u svakoj jažici protein G pločice je 200 μL, a kapacitet vezanja IgG-a je oko 0,8 mg po jažici. Upotrebljava se za izolaciju IgG-a iz krvne plazme.

#### 2.2.3.2. Filteri i filter pločice

- 0,45 μm *GHP AcroPrep (Pall)*

*GHP AcroPrep* filter pločica s 96 jažica volumena 1 mL i hidrofilnom polipropilenskom membranom veličine pora 0,45 μm, upotrebljava se za filtriranje uzoraka plazme prije izolacije IgG-a.

- *OF1100 (Orochem Technologies Inc.)*

*OF1100* polipropilenska filter pločica s 96 jažica volumena 0,7 ml i polietilenskim otvorima od 10  $\mu\text{m}$ , upotrebljava se za obrnuto-fazno izoljavanje i pročišćavanje glikopeptida IgG-a.

- *0,2  $\mu\text{m}$  Supor PES Nalgene (Thermo Fischer Scientific)*

*Supor PES Nalgene* filter s polietersulfonskom membranom veličine pora 0,2  $\mu\text{m}$ , upotrebljava se za filtriranje svih pufera.

#### 2.2.3.3. Pločice za skupljanje i čuvanje uzoraka

- *ABgene PCR pločica (Thermo Fischer Scientific)*

*ABgene PCR* pločica pločica s 96 jažica volumena 0,2 ml, upotrebljava se za pripremu glikopeptida IgG-a djelovanjem tripsina te za skupljanje pročišćenih glikopeptida IgG-a.

- Pločica za skupljanje uzoraka (*Waters*)

Pločica za skupljanje uzoraka s 96 jažica volumena 2 ml, upotrebljava se za randomizaciju uzoraka, skupljanje uzoraka nakon filtracije i eluiranja IgG-a.

#### 2.2.4. Stacionarne faze

##### *Chromabond<sup>®</sup> C<sub>18</sub>ec (Machery-Nagel)*

*Chromabond<sup>®</sup> C<sub>18</sub>ec* ima srednju veličinu čestica 45  $\mu\text{m}$ , a upotrebljava se kao stacionarna faza u obrnuto-faznom izoljavanju i pročišćavanju glikopeptida IgG-a.

#### 2.2.5. Kolone za nanoLC-MS analizu

- *PepMap 100 C8 (Thermo Fischer Scientific)*

*PepMap 100 C8* je kolona za pročišćavanje glikopeptida IgG-a, duljine 5 mm i unutarnjeg promjera 300  $\mu\text{m}$  te veličine čestica 5  $\mu\text{m}$ . Na silika gel su vezani C8 lanci na



koje se vežu glikopeptidi IgG-a dok različite nečistoće koje mogu biti prisutne u uzorku prolaze bez vezanja (obrnuto fazna ekstrakcija).

- *C18 nano-LC HALO fused core particles (Advanced materials technology)*

*C18 nano-LC HALO fused core particles* je kolona za razdvajanje glikopeptida IgG-a, duljine 150 mm i unutarnjeg promjera 100 µm te veličine čestica 2,7 µm.

## 2.3. Metode

### 2.3.1. Izolacija imunoglobulina G iz uzoraka krvne plazme

Imunoglobulin G je izoliran iz krvne plazme afinitetnom kromatografijom upotrebom protein G pločice s 96 jažica (*Bia Separations*) uz upotrebu vakuum uređaja za pločice (eng. *vacuum manifold*) (*Pall*) uz vakuum pumpu (*Pall Life Sciences*).<sup>168</sup> Unutar svake jažice je monolitska stacionarna faza na koju je vezan protein G dobiven iz *Streptococcus aureus*. Ova afinitetna pločica se upotrebljava za brzo i visoko učinkovito pročišćavanje IgG-a. Protein G veže Fc regiju IgG-a bez vezanja Fab podjedinice istog antitijela. Prednost Protein G pločice pred protein A pločicom za izolaciju IgG-a je širi raspon vezanja poliklonskih antitijela, adsorpcija pri većem rasponu pH te mogućnost vezanja svih potklasa (Protein A pločica ne veže potklasu IgG3). Svi koraci izolacije IgG-a odvijali su se upotrebom vakuum uređaja za pločice uz vakuum pumpu pri podtlaku od oko 380 mm Hg, osim nanošenja uzoraka plazme i eluiranja IgG-a pri čemu je podtlak iznosio oko 200 mm Hg. Cijeli postupak se odvijao na sobnoj temperaturi. Sve korištene otopine su prije upotrebe filtrirane kroz 0,2 µm *Supor PES Nalgene* filtere (*Thermo Fischer Scientific*).

Pri izolaciji IgG-a na protein G pločici, koriste se slijedeći puferi:

- pufer za vezanje IgG-a na pločicu- 1 x koncentrirani PBS (eng. *phosphate buffered saline*): 137 mM NaCl, 2,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 9,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,2 mM KCl, pH prilagođen na 7,4 dodatkom NaOH
- eluacijski pufer- 0,1 M formijatna kiselina pH 2,5

- neutralizacijski pufer- 10 x koncentrirani PBS pH 6,6
- pufer za neutralizaciju eluiranog IgG-a- 1 M amonijev bikarbonat
- pufer za čuvanje protein G pločice: 20 % etanol (v/v), 20 mM Tris, 0,1 mM NaCl, pH prilagođen na 7,4 dodatkom HCl

### 2.3.1.1. Priprema uzoraka krvne plazme za izolaciju imunoglobulina G

Svi uzorci plazme su nakon odmrzavanja, najprije centrifugirani (1620 g, 10 minuta) (centrifuga 5804, rotor A-4-44, *Eppendorf*), a potom randomizirani na pločicama za skupljanje uzoraka s 96 jažica, volumena 2 ml (Waters) tako da su na svakoj pločici zastupljeni uzorci pacijenata oboljelih od CD-a, UC-a te kontrole (Slika 2.3.1.1). Na svaku pločicu, osim po 70  $\mu$ L plazme ispitanika, stavljeno je i po četiri alikvota plazma standarda (50  $\mu$ L), a na položaj G12 negativna kontrola (eng. *blank*). Plazma standard je pripremljen unutar laboratorija spajanjem krvnih plazmi više davatelja (eng. *plasma pool*), a služi kao pozitivna kontrola). Svaka pločica je imala i nekoliko uzoraka u duplikatu.

| PL2 | 1         | 2           | 3          | 4         | 5          | 6           | 7         | 8          | 9         | 10        | 11          | 12        |
|-----|-----------|-------------|------------|-----------|------------|-------------|-----------|------------|-----------|-----------|-------------|-----------|
| A   | UC443PD   | CON555SGR   | CD164NA_6  | CON593SGR | CON239SGR  | CD3903FI    | stand_2_3 | CD3934FI   | UC102PD   | stand_2_2 | CD2856SGR_D | UC3755SGR |
| B   | UC63PD    | CD1907SGR   | CD2940PD   | UC3771SGR | UC3729SGR  | UC3594PD    | UC2572PD  | CON273SGR  | CD1832SGR | UC2450PD  | CD393HM     | CD3921FI  |
| C   | CON562SGR | UC2865SGR   | CD308PD_1  | UC344PD   | CD3422PD   | CD3220SGR   | CD2764SGR | CON533SGR  | UC2404AN  | CD366HM   | CD2867SGR   | UC3572SGR |
| D   | CD2939PD  | UC61PD      | UC3657SGR  | CON618SGR | UC2988PD-D | CON624SGR   | UC2261SGR | UC3739SGR  | CD451PD   | UC2864SGR | CON280SGR   | CD97HM    |
| E   | CD3864PD  | CD2722SGR   | CON254SGR  | CD231SGR  | CON223SGR  | UC2486PD    | CON540SGR | UC949SGR-D | UC2453PD  | CD352HM   | UC3720SGR   | UC2539PD  |
| F   | UC2763SGR | CD2930PD    | stand_2_4  | UC2467PD  | CON542SGR  | CD368HM     | CD512PD_5 | UC2591PD   | CD3398PD  | UC3970SGR | stand_2_1   | CD347HM   |
| G   | UC4094SGR | UC36PD      | UC3743SGR  | UC3761SGR | CD692PD    | UC420PD     | UC230SGR  | UC16PD     | UC85PD    | CD2728SGR | UC2567PD    | blank_2   |
| H   | CD685SGR  | UC3515SGR-D | UC165SGR-D | CD351HM   | UC339PD    | UC1097SGR-D | CD2247SGR | CD2344SGR  | CON240SGR | CON305SGR | CON304SGR   | CON595SGR |

**Slika 2.3.1.1** Prikaz rasporeda uzoraka na pločici prilikom izolacije imunoglobulina G. Uz uzorke ispitanika, na pločici su i četiri plazma standarda na unaprijed određenim položajima- STAND, te negativna kontrola- BLANK na položaju G12.

Uzorci plazme su razrijeđeni 8 x, 1 x koncentriranim puferom PBS, pH 7,4, a nakon toga su filtrirani kroz *GHP AcroPrep* 0,45  $\mu$ m filter pločice s 96 jažica, volumena 1 ml (*Pall*) pri maksimalnom podtlaku. Uzorci su skupljeni u pločice s 96 jažica, volumena 2 ml.

### 2.3.1.2. Priprema protein G pločice za izolaciju imunoglobulina G iz uzoraka krvne plazme

Prije izolacije IgG-a iz uzoraka plazme, bilo je potrebno ukloniti pufer za čuvanje protein G pločice: 20 % etanol (v/v), 20 mM Tris, 0,1 mM NaCl, pH prilagođen na 7,4

dodatkom HCl te pripremiti protein G pločicu za izolaciju ispiranjem s 2 ml ultra čiste vode (18 MΩcm pri 25 °C), zatim s 2 ml 1 x koncentriranog pufera PBS pH 7,4, a nakon toga s 1 ml 0,1 M formijatne kiseline pH 2,5 kako bi se uklonio IgG koji je eventualno zaostao. Nakon toga protein G pločica se uravnotežuje ispiranjem s 2 ml 10 x koncentriranog pufera PBS pH 6,6 nakon čega slijedi ispiranje s 4 ml 1x koncentriranog pufera PBS pH 7,4. Nakon svakog ispiranja, primijeni se vakuum filtracija pri podtlaku od oko 380 mm Hg.

#### 2.3.1.3. *Vežanje imunoglobulina G na protein G pločicu i ispiranje*

Razrijeđeni i filtrirani uzorci krvne plazme se prenesu na prethodno pripremljenu protein G pločicu. Protein G pločica s vezanim IgG-om se ispiri tri puta s po 2 ml 1 x koncentriranog pufera PBS pH 7,41 uz optimalne uvjete vakuuma filtracije pri podtlaku oko 200 mm Hg pri čemu se uklanjaju nevezani protein dok IgG ostaje vezan.

#### 2.3.1.4. *Eluiranje imunoglobulina G s protein G pločice*

Protein G pločica s vezanim IgG-om se stavi iznad pločice s 96 jažica, volumena 2 ml te se zatim ispere s 1 ml 0,1 M formijatne kiseline pH 2,5 uz vakuum filtraciju pri podtlaku oko 200 mm Hg čime se eluira vezani IgG. U svaku jažicu s eluiranim IgG-om se doda po 170 µl neutralizacijskog pufera 1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> kako bi se pH prilagodio na 7.

#### 2.3.1.5. *Regeneracija i čuvanje protein G pločice*

Nakon eluiranja IgG-a, protein G pločicu je potrebno isprati s 2 ml 0,1 M formijatne kiseline pH 2,5 kako bi se uklonio eventualno zaostali IgG. Potom se pločica ispiri s 2 ml 10 x koncentriranog pufera PBS pH 6,6 te s 4 ml 1 x koncentriranog pufera PBS pH 7,4. Zadnje ispiranje protein G pločice je s 1 ml pufera za čuvanje protein G pločice. Nakon svakog ispiranja, primijeni se vakuum filtracija pri podtlaku od oko 380 mm Hg. Protein G pločica se čuva u 1 ml pufera za čuvanje pri +4 °C, do iduće upotrebe.

#### 2.3.1.6. *Određivanje koncentracije izoliranog imunoglobulina G*

Nakon izolacije iz krvne plazme, koncentracija IgG-a u svakom eluatu je određena na spektrofotometru *NanoDrop 8000 (Thermo Fischer Scientific)* mjerenjem apsorbancije pri

280 nm nakon čega su pločice s izoliranim IgG-om, spremljene su na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do daljnje upotrebe.

### 2.3.2. Priprema glikopeptida imunoglobulina G izlaganjem djelovanju tripsina

Glikopeptidi IgG-a se pripremaju izlaganjem IgG-a djelovanju TPCK tripsina (*Worthington Biochemical Corporation*) koji se priprema otapanjem 1 mg liofiliziranog tripsina u 5 ml 20 mM octene kiseline (Merck). Alikvoti od 100  $\mu\text{l}$  ovako priređene otopine, koncentracije 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  pohranjuju se na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do daljnje upotrebe.

Iz prethodno odmrznutih pločica s izoliranim imunoglobulinima G, prosječne koncentracije IgG-a po uzorku 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , alikvotirano je po 40  $\mu\text{l}$  u *ABgene PCR* pločicu s 96 jažica. Tripsin se priređuje neposredno prije dodavanja uzorcima s izoliranim IgG-om, tako da se za jednu *ABgene PCR* pločicu s uzorcima, odmrzne jedan prethodno pripremljen alikvot od 100  $\mu\text{l}$  koncentracije 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  te se razrijedi s 1 ml ultra čiste vode (18 M $\Omega\text{cm}$  pri  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ohlađene na  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . U svaku jažicu *ABgene PCR* pločice s 40  $\mu\text{l}$  eluiranog IgG-a, dodano je po 10  $\mu\text{l}$  ovako pripremljene otopine tripsina, uz miješanje. Nasumično je provjeren pH nekih jažica uz univerzalni indikator papir pH 0-14 (*LLG, Lab Logistics Group*) s obzirom da je uvjet za optimalno djelovanje tripsina  $\text{pH} \geq 6$ . *ABgene PCR* pločica se zatvori termalnom folijom (*Porvair Filtration Group Inc.*) te inkubira preko noći na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3.3. Pročišćavanje glikopeptida imunoglobulina G obrnuto faznom ekstrakcijom na čvrstoj fazi

Glikopeptidi IgG-a, dobiveni djelovanjem tripsina, pročišćeni su obrnuto faznom ekstrakcijom na čvrstoj fazi, kako bi se uklonili ostaci soli. Čvrsta faza u ovom pročišćavanju je hidrofobni materijal *Chromabond<sup>®</sup> C<sub>18</sub>ec* (*Machery-Nagel*) srednje veličine čestica 45  $\mu\text{m}$  u kojem su na zrnca adsorbirani C<sub>18</sub> lanci. S obzirom da je čvrsta faza hidrofobna, na nju se vežu peptidni dijelovi glikopeptida IgG-a dok se soli ispiru.

#### 2.3.3.1. Priprema *Chromabond C<sub>18</sub>* zrnaca

Za pročišćavanje jednog uzorka IgG-a potrebno je 100  $\mu\text{l}$  suspenzije 50 mg/ml *Chromabond<sup>®</sup> C<sub>18</sub>ec* zrnaca u otopini 80 % acetonitrila (v/v) (ACN), HPLC razred (*Scharlau*) i 0,1 % trifluoroctene kiseline (v/v) (TFA), HPLC razred (*Fluka*). Iz navedenoga proizlazi da

je za jednu pločicu (96 uzoraka) potrebno 0,5 g *Chromabond*<sup>®</sup> *C<sub>18</sub>ec* zrnaca priređenih u 10 ml otopine 80 % ACN-a (v/v) i 0,1 % TFA (v/v). U svaku jažicu *OF1100* polipropilenske filter pločice s 96 jažica i polietilenskim otvorima od 10 μm (*Orochem Technologies Inc.*) nanosi se po 100 μl gore navedene otopine.

#### 2.3.3.2. Aktiviranje i uravnoteženje *Chromabond C<sub>18</sub> zrnaca*

*Chromabond*<sup>®</sup> *C<sub>18</sub>ec* zrnca se aktiviraju otopinom 80 % ACN-a (v/v) i 0,1 % TFA (v/v), na način da se u svaku jažicu polipropilenske filter pločice doda po 200 μl navedene otopine te se primjeni vakuum filtracija uz podtlak od oko 25 mm Hg. Postupak se ponavlja tri puta. *Chromabond*<sup>®</sup> *C<sub>18</sub>ec* zrnca se uravnotežuju u uvjetima vezanja glikopeptida IgG-a, dodavanjem u svaku jažicu polipropilenske filter pločice po 200 μl otopine 0,1 % TFA (v/v), HPLC razred (*Fluka*) te primjenu vakuum filtracije uz podtlak od oko 25 mm Hg. Postupak se ponavlja tri puta.

#### 2.3.3.3. Nanošenje glikopeptida imunoglobulina G na polipropilensku pločicu

Prije nanošenja uzoraka glikopeptida IgG-a na polipropilensku pločicu s *Chromabond*<sup>®</sup> *C<sub>18</sub>ec* zrcima, potrebno je razrijediti uzorke 10 x s otopinom 0,1 % TFA (v/v), dodavanjem 450 μl navedene otopine u svaku jažicu *ABgene PCR* pločice s glikopeptidima IgG-a. Razrijeđeni uzorci glikopeptida IgG-a, ukupnog volumena 500 μl, prenesu se na polipropilensku pločicu s *Chromabond*<sup>®</sup> *C<sub>18</sub>ec* zrcima te se nakon inkubacije od dvije minute, primjeni vakuum filtracija uz podtlak od oko 25 mm Hg.

#### 2.3.3.4. Ispiranje glikopeptida imunoglobulina G

Uzorci glikopeptida IgG-a se ispiru se na polipropilenskoj pločici s 200 μl otopine 0,1 % TFA (v/v) te primjenu vakuum filtracije uz podtlak od oko 25 mm Hg. Postupak se ponovi tri puta, a na kraju se polipropilenska pločica kratko centrifugira (15-105 g, 15 sekundi) (centrifuga 5804, rotor A-4-44, *Eppendorf*) kako bi se uklonila sva zaostala otopina 0,1 % TFA (v/v).

### 2.3.3.5. Eluiranje pročišćenih glikopeptida imunoglobulina G

Polipropilenska pločica s glikopeptidima IgG-a vezanima na *Chromabond*<sup>®</sup> *C<sub>18</sub>ec*, stavi se na *ABgene PCR* pločicu te se u svaku jažicu polipropilenske pločice doda po 120 µl otopine 20 % ACN-a (v/v), HPLC razred (*Scharlau*) i 0,1 % TFA (v/v), HPLC razred (*Fluka*) nakon čega slijedi inkubacija tijekom dvije minute. Glikopeptidi IgG-a se eluiraju s polipropilenske pločice u *ABgene PCR* pločicu, centrifugiranjem (15-105 g, 5 minuta) (centrifuga 5804, rotor A-4-44, *Eppendorf*) te se odmah stavljaju na sušenje u vakuum centrifugu (vakuum koncentrator *Savant SC210A* sa hlađenom stupicom za paru *Savant RVT400* i vakuum pumpom *OF400*, *Thermo Fischer Scientific*) s obzirom da TFA pogoduje desijalinizaciji glikana. Kada su uzorci suhi, pločica se zatvori termalnom folijom te pohrani na -20 °C do daljne analize.

### 2.3.4. Analiza potklasa glikopeptida imunoglobulina G metodom nanoLC-MS

#### 2.3.4.1. Priprema uzoraka glikopeptida imunoglobulina G za analizu metodom nanoLC-MS

Neposredno prije mjerenja, suhim, pročišćenim glikopeptidima IgG-a, doda se po 20 µl ultra čiste vode (18 MΩcm pri 25 °C) u svaku jažicu *ABgene PCR* pločice uz miješanje, nakon čega se pločica zatvori termalnom folijom i spremna je za nanoLC-MS analizu.

#### 2.3.4.2. Metoda nanoLC-MS

Analiza uzoraka u ovom istraživanju, provedena je metodom tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (nanoLC-MS).<sup>140,226</sup> Analizirane su potklase IgG-a koje se razdvajaju tekućinskom kromatografijom na instrumentu *nanoACQUITY UPLC* (*Waters*) i glikopeptidi IgG-a koji se razdvajaju spektrometrijom masa na instrumentu *Compact Q-TOF-MS* (microTOF-Q) (*Bruker Daltonics*) iz čega proizlazi puni naziv metode nanoLC-ESI-MS-QTOF-MS.

Otapala za nanoLC-MS analizu:

- otapalo A: 0,1 % TFA(v/v), LC-MS razred (*Sigma-Aldrich*),
- otapalo B: 80 % ACN (v/v), LC-MS razred (*Sigma-Aldrich*), 0,1 % TFA (v/v), LC-MS razred (*Sigma-Aldrich*)

- otapalo za ispiranje kromatografskog sustava (eng. *seal wash*): 10 % ACN (v/v), HPLC razred (*Scharlau*)
- otapalo za smanjivanje negativnog djelovanja TFA na ionizaciju (eng. *sheath liquid*): 50 % izopropanol (v/v) (*Sigma-Aldrich*), 20 % propionska kiselina (*Sigma-Aldrich*), 30 % voda (v/v)

Sva otapala su pripremljena s ultra čistom vodom (18 MΩcm pri 25 °C).

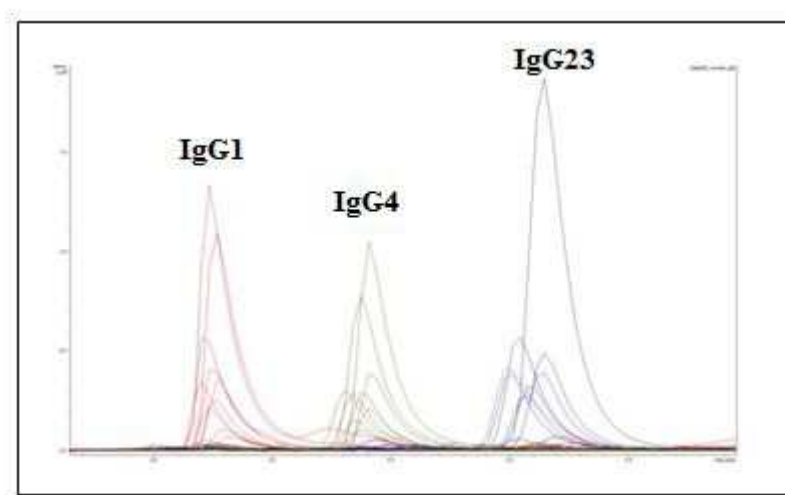
Osim samih otapala pri nanoLC-MS analizi, u instrumentu se nalaze:

- otopina za ispiranje kolone za razdvajanje glikopeptida: 95 % ACN (v/v), LC-MS razred (*Sigma-Aldrich*)
- ultra čista voda (18 MΩcm pri 25 °C) koja služi kao negativna kontrola za LC-MS instrument
- standard glikopeptida IgG-a pripremljen unutar laboratorija iz krvne plazme više donora, a koji služi kao pozitivna kontrola za LC-MS instrument

Instrument *nanoACQUITY UPLC*<sup>227</sup> sastoji se od dva modula za upravljanje otapalima; binarni (eng. *binary solvent manager*) i pomoćni (eng. *auxillary solvent manager*), modula za upravljanje uzorcima (eng. *sample manager*), a koristi detektor *Q-TOF-MS* instrumenta. Binarni modul za upravljanje otapalima sadrži visokotlačnu pumpu koja stvara gradijent otapala A i B (0-95 % B) te održava stalan protok kroz sustav. Pomoćni modul za upravljanje otapalima sadrži visokotlačnu pumpu koja pumpa uzorak do kolone koja služi za uklanjanje nečistoća iz uzorka (eng. *trap*) i analitičke kolone, a koristi se i za ESI ionizaciju kod analize spektrometrijom masa. Modul za upravljanje uzorcima u kojem je temperatura 10 °C injektira uzorke s pločice na kolonu *PepMap 100 C8* (*Thermo Fischer Scientific*) duljine 5 mm i unutarnjeg promjera 300 μm te veličine čestica 5 μm. U navedenoj koloni za pročišćavanje glikopeptida, na silika gel su vezani C8 lanci na koje se vežu glikopeptidi IgG-a dok različite nečistoće koje mogu biti prisutne u uzorku prolaze bez vezanja (obrnuto fazna ekstrakcija). Uravnotežavanje i vezanje analita na *trap* kolonu se odvija pri protoku otapala A od 40 μl/min tijekom jedne minute. Zatim se analiti iz uzorka razdvajaju na analitičkoj koloni *C18 nano-LC HALO fused core particles* (*Advanced materials technology*) duljine 150 mm i unutarnjeg promjera 100 μm te veličine čestica 2,7 μm koja je na temperaturi od 30 °C, a uravnotežena je tijekom dvije minute pri protoku 100% otapala A od 1 μl/min što su i početni uvjeti za tekućinsku kromatografiju. Od 0-0,5 minute gradijent otapala se mijenja od 0-12 % otapala B,

a od 0,5-4 minute iznosi 12 % otapala B te od 4-5 minute iznosi 17 % otapala B. Glikopeptidi IgG-a se razdvajaju po potklasama u gradijentu otapala B 12-17 %. Od 5-5,5 minute gradijent je raste do 95% otapala B te toliko iznosi 5,5-9,5 min čime je kolona isprana od svih vezanih IgG glikopeptida. Nakon ispiranja analitičke kolone, vraćeni su početni uvjeti 100 % otapala A pri protoku 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  tijekom 2 minute čime je kolona spremna za idući uzorak dok se *trap* kolona nakon svakog uzorka ispiru s 20  $\mu\text{l}$  95 % ACN-a (v/v). Volumen injekcije za uzorke je 9  $\mu\text{l}$ , a za pozitivnu i negativnu kontrolu je 1  $\mu\text{l}$ .

Tekućinskom kromatografijom, glikopeptidi IgG-a se razdvajaju po potklasama u: IgG1, IgG4 i IgG23 (Slika 2.3.4.2.1). Fc-glikopeptidi potklase IgG2 i 3 imaju jednake peptidne dijelove kod pripadnika bijele rase pa se ne mogu razlikovati ovom analitičkom metodom.<sup>144,228</sup>



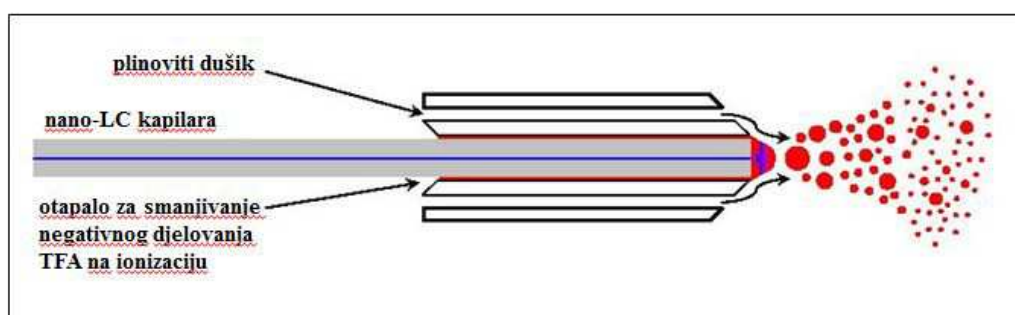
**Slika 2.3.4.2.1** Prikaz razdvajanja IgG glikopeptida po potklasama: IgG1, IgG4 i IgG23, preuzeto s nanoLC-MS instrumenta tijekom analize u ovom istraživanju.

Kao što je već navedeno, *nanoACQUITY UPLC* je povezan s instrumentom *Compact Q-TOF-MS* te se glikopeptidi IgG-a nakon analize tekućinskom kromatografijom, analiziraju spektrometrijom masa. Glavni dijelovi *Compact Q-TOF-MS* instrumenta su: modul za ionizaciju uzorka (raspršivač s kapilarnom i komora za raspršivanje uzorka), lijevci (eng. *funnel*) i heksapol (eng. *hexapole*), kvadropol (eng. *quadrupole*, Q), kolizijska ćelija (eng. *collision cell*) te spektrometar (eng. *time of flight*, TOF).<sup>229</sup>

Glikopeptidi IgG-a koji se nakon LC analize nalaze u 12-19 % otapala B, ioniziraju se ionizacijom elektroraspršenjem pri čemu se raspršivačem (eng. *nebulizer*) (*Agilent Technologies*) uzorak raspršuje u sitne kapljice u protoku otapala za smanjivanje negativnog djelovanja TFA na ionizaciju te se tako dobivene ionizirane kapljice uzorka suše plinovitim



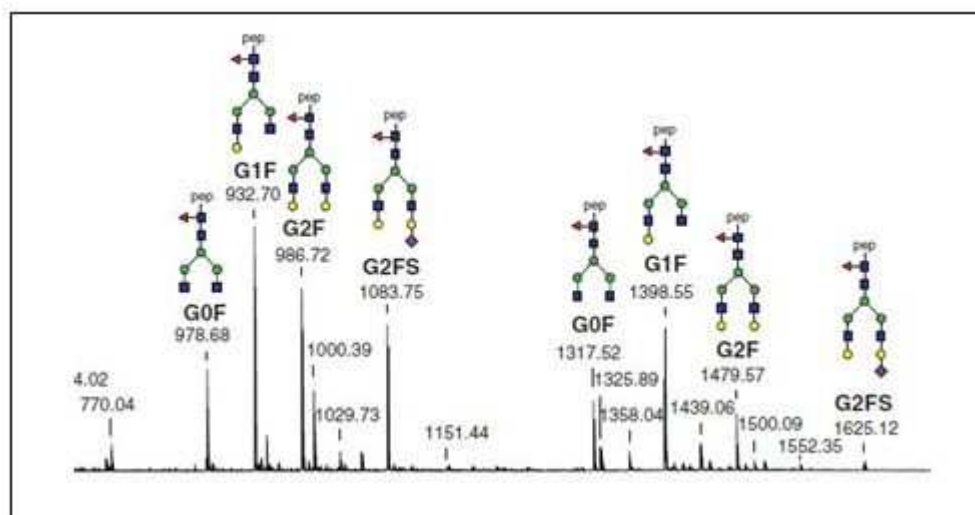
dušikom protoka 4 L/min pod tlakom od 0,4 bara (Slika 2.3.4.2.2)<sup>140</sup> te tako glikopeptidi IgG-a pod utjecajem elektrostatskog polja (razlike potencijala) postaju dvostruko i trostruko pozitivno nabijeni. Kako bi se smanjio negativni učinak TFA na sparivanje iona u plinovitoj fazi, uzorak se dodaje nanoLC kapilaram od fuzionirane silike vanjskog promjera 375  $\mu\text{m}$  i unutarnjeg promjera 20  $\mu\text{m}$  (*Molex Polymicro Technologies*) koja se nalazi u otapalu za smanjivanje negativnog djelovanja TFA na ionizaciju (eng. *sheath liquid*): 50 % izopropanol (v/v), 20 % propionska kiselina (v/v) u vodi pri protoku od 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ , a dodaje se pumpom pomoćnog modula. TFA utječe na sparivanje iona u plinovitom stanju te negativno djeluje na ionizaciju uzorka, što se znatno smanjuje raspršivanjem u otapalu za smanjivanje negativnog djelovanja TFA na ionizaciju.



**Slika 2.3.4.2.2** Shematski prikaz ESI raspršivača. NanoLC kapilara s uzorkom je unutar cijevi s protokom otapala za smanjivanje negativnog djelovanja TFA na ionizaciju, koja je unutar cijevi s protokom dušika za sušenje uzorka, prilagođeno iz Selman et al, 2012.<sup>140</sup>

Uloga lijevaka i heksapola je odvajanje ioniziranog analita od otapala za smanjivanje negativnog djelovanja TFA na ionizaciju i plina za sušenje uzorka te usmjeravanje ovih iona sa što manjim gubicima, prema kvadropolu. Dodatno, u heksapolu se grupiraju ioni analita, odnosno, smanjuje se njihova raspršenost. Kvadropol može služiti kao svojevrsni filter masa kako bi se izdvojili ioni određenih (raspona) masa ili u ovom slučaju, služi za usmjeravanje iona prema detektoru. Ionizirani glikopeptidi IgG-a putuju pod utjecajem razlike potencijala. U kolizijskoj ćeliji se fragmentiraju ioni, međutim, u ovom istraživanju nije se koristila ova mogućnost. TOF se sastoji od ortogonalnog akceleratora, reflektora i detektora. Ortogonalni akcelerator usmjerava ione analita prema reflektoru, reflektor ujednačava ione s obzirom na razlike u kinetičkoj energiji, a detektor prevodi zabilježeni signal iona u električni signal koji se prenosi na računalo. Vrijeme dolaska iona analita do detektora (TOF) ovisi o omjeru mase naboja,  $m/z$ . Spektar masa je sniman od 600-1900  $m/z$  s prosječno 2 snimka na frekvenciji od

0,5 Hz uz energiju kvadropola i kolizijske ćelije od 4 eV. Primjer dijela snimljenog spektra masa jednog uzorka prikazan je na slici 2.3.4.2.3. Vrijeme analize po uzorku bilo je 15 minuta. Za rad na sustavu LC-MS korišten je program *HyStar software version 3.2*. Sve analize su provedene pri vanjskoj temperaturi od 24 °C.



**Slika 2.3.4.2.3** Prikaz dijela snimljenog spektra masa jednog uzorka., preuzeto s nanoLC-MS instrumenta tijekom analize u ovom istraživanju.

### 2.3.5. Obrada podataka



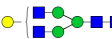




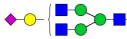




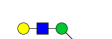


Rezultati nanoLC-MS analize su ekstrahirani i obrađeni programom *LacyTools v0.0.5.0*.<sup>230</sup> Prije ekstrakcije podataka, snimljeni spektri su poravnati na temelju točne mase i retencijskog vremena tri najzastupljenije glikoforme svake od pojedinih potklasa IgG-a: G0F, G1F and G2F (Tablica 2.3.5.1)<sup>225</sup> svih spektara. Pri poravnanju, kod retencijskog vremena korišten je raspon od  $\pm 40$  s, a kod mase  $\pm 0.1$  Th. Pikovi izmjerenih glikopeptida su korišteni za poravnanje samo kada im je odnos signal/šum (eng. *signal to noise*, S/N) bio iznad 9, uz minimalno 7 glikopeptida po uzorku. Uz navedene kriterije, kod većine uzoraka, glikopeptidi s istim peptidnim dijelom imali su jednako retencijsko vrijeme. U konačnici su dobivene tri grupe glikopeptida: jedna za IgG1, druga za IgG4 i treća za kombinaciju IgG2 i IgG3.

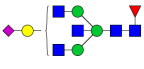
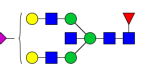

**Tablica 2.3.5.1** NanoLC-MS poravnanje. Signali glikopeptida upotrebljeni za poravnanje LC-MS kromatograma. Navedeni su glikopeptidi s teorijskim omjerom m/z za trostruko nabijene glikopeptide te vrijeme retencije (VR) u sekundama. Najmanje 7 glikopeptida je korišteno po uzorku uz odnos S/N > 9., prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

| Glikopeptid | Teorijski m/z (3+) | VR (s) |
|-------------|--------------------|--------|
| IgG1 G0F    | 878,6868098        | 245    |
| IgG1 G1F    | 932,7044176        | 242    |
| IgG1 G2F    | 986,7220254        | 243    |
| IgG23 G0F   | 868,0235334        | 434    |
| IgG23 G1F   | 922,0411412        | 429    |
| IgG23 G2F   | 976,058749         | 423    |
| IgG4 G0F    | 873,3551716        | 345    |
| IgG4 G1F    | 927,3727794        | 339    |
| IgG4 G2F    | 981,3903872        | 330    |

Nakon poravnanja, za svaku grupu glikopeptida (IgG1, IgG23 i IgG4), zbrojeni su svi spektri uz vremenski raspon od 30 s po pojedinoj grupi glikopeptida. Sume spektara za sve grupe su kalibrirane na temelju G0F, G1F, G2F, G2FN i G2FS te S/N > 9 za barem 5 glikopeptida po pojedinoj grupi. Raspon od 0,3 Da je korišten za kalibraciju. Kod ekstrakcije, uzeta je podudarnost od barem 99 % između inicijalnog analita i njegovog izotopa (dvostruko i trostruko nabijeni) prema manualnoj anotaciji sumiranih spektara po biološkoj grupi (UC, CD, HC). Anotacija je provedena prema točno određenoj masi u MS-u i literaturi.<sup>143,231</sup> Iz daljnje analize su isključeni spektri uzoraka sa S/N > 9 koji nisu u 85 %. Uzorci uključeni u daljnju anлізу imali su S/N > 9 (po biološkoj grupi), njihov izotopski uzorak u prosjeku nije odudarao više od 25 % od teoretskog, a standardna pogreška mase je iznosila između 10 i 10 ppm. Ekstrahirano je 16 IgG1, 16 IgG23 i 11 IgG4 glikoformi u ukupno 2 318 IgG1, 2 241 IgG23 and 2 169 IgG4 spektara (Tablica 2.3.5.2).<sup>225</sup>


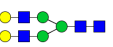

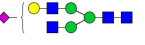





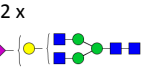
**Tablica 2.3.5.2** Pregled detektiranih glikoformi. Teorijska m/z trostruko nabijenih glikopeptida je prikazana u slučaju kada je ta struktura detektirana. Legenda, veze i anomerne konfiguracije su u skladu s onima na slici 1.4.1 za sve glikoforme. Plavi kvadrat: *N*-acetilglukozamin, crveni trokut: fukoza, zeleni krug: manoz, žuti krug: galaktoza, ljubičasti romb: *N*-acetilneuraminska kiselina (sijalinska kiselina), prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

| Skrraćeno ime glikana | Struktura   | [M+3H] <sup>3+</sup> kod ekstrakcije |          |          |
|-----------------------|---|--------------------------------------|----------|----------|
|                       |   | IgG1                                 | IgG23    | IgG4     |
| G0                    |    |                                      | 819,334  |          |
| G0F                   |    | 878,683                              | 868,02   | 873,351  |
| G1                    |    | 884,015                              | 873,351  |          |
| G1F                   |    | 932,7                                | 922,037  | 927,369  |
| G2                    |   | 938,032                              | 927,369  |          |
| G0FN                  |  | 946,376                              | 935,713  | 941,044  |
| G1N                   |  | 951,708                              |          |          |
| G1S                   |  | 981,046                              |          |          |
| G2F                   |  | 986,718                              | 976,055  | 981,386  |
| G1FN                  |  | 1000,394                             | 989,73   | 995,062  |
| G1FS                  |  | 1029,732                             | 1019,069 | 1024,401 |
| G2S                   |  | 1035,064                             | 1024,401 |          |
| G2FN                  |  | 1054,411                             | 1043,748 | 1049,08  |
| Hibrid                |  | 1070,074                             | 1059,411 |          |
| G2FS                  |  | 1083,75                              | 1073,087 | 1078,418 |











|       |   |          |          |          |
|-------|---|----------|----------|----------|
| G1FNS |  | 1097,425 | 1086,762 | 1092,094 |
| G2FNS |  |          | 1140,78  | 1146,111 |
| G2FS2 |  | 1180,782 | 1170,118 | 1175,45  |

Za svaku IgG izoformu, koristeći 16 direktno mjerenih glikopeptidnih struktura za IgG1 i IgG23 te 11 direktno mjerenih glikopeptidnih struktura za IgG4, izračunato je 18 deriviranih svojstava za IgG1, 16 za IgG23 i 12 za IgG4 (Tablica 2.3.5.3 i Tablica 2.3.5.4).<sup>225</sup>


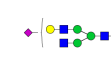
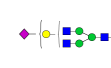
**Tablica 2.3.5.3** Derivirana svojstva Fc-glikana IgG-a. Individualne glikoforme su grupirane na temelju ranije opisanih glikozilacijskih svojstava glikopetida humanog IgG-a<sup>232</sup>, zasebno za IgG1, IgG23 i IgG4. Kod IgG4, sve glikoforme su fukozilirane. Legenda, veze i anomerne konfiguracije su u skladu s onima na slici 1.4.1 za sve glikoforme. Plavi kvadrat: *N*-acetilglukozamin, crveni trokut: fukoza, zeleni krug: manoz, žuti krug: galaktoza, ljubičasti romb: *N*-acetilneuraminska kiselina (sijalinska kiselina), prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

| Derivirano svojstvo | Struktura  | Opis  |
|---------------------|--|---|
| agal                |             | Udio agalaktoziliranih glikana  |
| digal               |             | Udio digalaktoziliranih glikana   |
| monogal             |             | Udio monogalaktoziliranih glikana   |
| sial                | 0 - 2 x<br> | Udio sijaliniziranih glikana  |
| A2B                 | 0 - 2 x<br> | Udio struktura s računajućim <i>N</i> -acetilglukozaminom na dianternim glikanima                       |
| A2F                 | 0 - 2 x<br> | Udio struktura s fukozom na dianternim glikanima  |
| A2FB                | 0 - 2 x<br> | Udio struktura s računajućim <i>N</i> -acetilglukozaminom na fukoziliranim dianternim glikanima na IgG4 |
| A2G                 |             | Galaktozilacija po anteni dianternih glikana  |
| A2S                 | 0 - 2 x<br> | Sijalinizacija po anteni dianternih glikana   |
| A2GS                | 0 - 2 x<br> | Sijalinizacija po galaktozi dianternih glikana  |

**Tablica 2.3.5.4** Izračun deriviranih svojstava po pojedinim potklasama IgG-a. Individualne glikoforme su grupirane na temelju ranije opisanih glikozilacijskih svojstava glikopeptida humanog IgG-a<sup>232</sup>. Legenda, veze i anomerne konfiguracije su u skladu s onima na slici 1.4.1 za sve glikoforme. Plavi kvadrat: *N*-acetilglukozamin, crveni trokut: fukoza, zeleni krug: manoza, žuti krug: galaktoza, ljubičasti romb: *N*-acetilneuraminska kiselina (sijalinska kiselina). Skraćena imena glikana su navedena u tablici 2.3.5.2, prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

| Derivirano svojstvo | Struktura   | Opis  | Izračun   |
|---------------------|---|---|---|
| IgG1_agal           |    | Udio agalaktoziliranih glikana na IgG1  | $IgG1\_G0F + IgG1\_G0FN$  |
| IgG1_digal          |    | Udio digalaktoziliranih glikana na IgG1   | $IgG1\_G2 + IgG1\_G2F + IgG1\_G2S + IgG1\_G2FN + IgG1\_G2FS + IgG1\_G2FNS + IgG1\_G2FS2$  |
| IgG1_monogal        |    | Udio monogalaktoziliranih glikana na IgG1   | $IgG1\_G1 + IgG1\_G1F + IgG1\_G1N + IgG1\_G1S + IgG1\_G1FN + IgG1\_G1FS$  |
| IgG1_sial           |  | Udio sijaliniziranih glikana na IgG1  | $IgG1\_G1S + IgG1\_G1FS + IgG1\_G2S + IgG1\_G2FS + IgG1\_G2FNS + IgG1\_G2FS2$   |
| IgG1_A2B            |  | Udio struktura s računajućim <i>N</i> -acetilglukozaminom na diantenarnim glikanima na IgG1 | $(IgG1\_G0FN + IgG1\_G1N + IgG1\_G1FN + IgG1\_G2FN + IgG1\_G2FNS) / (IgG1\_G0F + IgG1\_G1 + IgG1\_G1F + IgG1\_G2 + IgG1\_G0FN + IgG1\_G1N + IgG1\_G1S + IgG1\_G2F + IgG1\_G1FN + IgG1\_G1FS + IgG1\_G2S + IgG1\_G2FN + IgG1\_G2FS + IgG1\_G2FNS + IgG1\_G2FS2)$   |
| IgG1_A2F            |  | Udio struktura s fukozom na diantenarnim glikanima na IgG1                                  | $(IgG1\_G0F + IgG1\_G1F + IgG1\_G0FN + IgG1\_G2F + IgG1\_G1FN + IgG1\_G1FS + IgG1\_G2FN + IgG1\_G2FS + IgG1\_G2FNS + IgG1\_G2FS2) / (IgG1\_G0F + IgG1\_G1 + IgG1\_G1F + IgG1\_G2 + IgG1\_G0FN + IgG1\_G1N + IgG1\_G1S + IgG1\_G2F + IgG1\_G1FN + IgG1\_G1FS + IgG1\_G2S + IgG1\_G2FN + IgG1\_G2FS + IgG1\_G2FNS + IgG1\_G2FS2)$   |
| IgG1_A2G            |  | Galaktozilacija po anteni diantenarnih glikana na IgG1                                      | $(1/2 \times (IgG1\_G1 + IgG1\_G1F + IgG1\_G1N + IgG1\_G1S + IgG1\_G1FN + IgG1\_G1FS) + (IgG1\_G2 + IgG1\_G2F + IgG1\_G2S + IgG1\_G2FN + IgG1\_G2FS + IgG1\_G2FNS + IgG1\_G2FS2)) / (IgG1\_G0F + IgG1\_G1 + IgG1\_G1F + IgG1\_G2 + IgG1\_G0FN + IgG1\_G1N + IgG1\_G1S + IgG1\_G2F + IgG1\_G1FN + IgG1\_G1FS + IgG1\_G2S + IgG1\_G2FN + IgG1\_G2FS + IgG1\_G2FNS + IgG1\_G2FS2)$ |
| IgG1_A2S            |  | Sijalinizacija po anteni diantenarnih glikana na IgG1                                       | $(1/2 \times (IgG1\_G1S + IgG1\_G1FS + IgG1\_G2S + IgG1\_G2FS + IgG1\_G2FNS) + (IgG1\_G2FS2)) / (IgG1\_G0F + IgG1\_G1 + IgG1\_G1F + IgG1\_G2 + IgG1\_G0FN + IgG1\_G1N + IgG1\_G1S + IgG1\_G2F + IgG1\_G1FN + IgG1\_G1FS + IgG1\_G2S + IgG1\_G2FN + IgG1\_G2FS + IgG1\_G2FNS + IgG1\_G2FS2)$   |
| IgG1_A2GS           |  | Sijalinizacija po galaktozi diantenarnih glikana na IgG1                                    | $IgG1\_A2S / IgG1\_A2G$   |
| IgG23_agal          |  | Udio agalaktoziliranih glikana na IgG23   | $IgG23\_G0 + IgG23\_G0F + IgG23\_G0FN$  |

|               |             |   |   |
|---------------|-------------|---|---|
| IgG23_digal   |             | Udio digalaktoziliranih glikana na IgG23  | $IgG23\_G2 + IgG23\_G2F + IgG23\_G2S + IgG23\_G2FN + IgG23\_G2FS + IgG23\_G2FNS + IgG23\_G2FS2$   |
| IgG23_monogal |             | Udio monogalaktoziliranih glikana na IgG23  | $IgG23\_G1 + IgG23\_G1F + IgG23\_G1FN + IgG23\_G1FS + IgG23\_G1FNS$   |
| IgG23_sial    | 0 – 2 x<br> | Udio sijaliniziranih glikana na IgG23   | $IgG23\_G1FS + IgG23\_G2S + IgG23\_G2FS + IgG23\_G1FNS + IgG23\_G2FNS + IgG23\_G2FS2$   |
| IgG23_A2B     | 0 – 2 x<br> | Udio struktura s računjućim N-acetilglukozaminom na diantenarnim glikanima na IgG23             | $(IgG23\_G0FN + IgG23\_G1FN + IgG23\_G2FN + IgG23\_G1FNS + IgG23\_G2FNS) / (IgG23\_G0 + IgG23\_G0F + IgG23\_G1 + IgG23\_G1F + IgG23\_G2 + IgG23\_G0FN + IgG23\_G2F + IgG23\_G1FN + IgG23\_G1FS + IgG23 + IgG23\_G2FN + IgG23\_G2FS + IgG23\_G1FNS + IgG23\_G2FNS + IgG23\_G2FS2)$   |
| IgG23_A2F     | 0 – 2 x<br> | Udio struktura s fukozom na diantenarnim glikanima na IgG23                                     | $(IgG23\_G0F + IgG23\_G1F + IgG23\_G0FN + IgG23\_G2F + IgG23\_G1FN + IgG23\_G1FS + IgG23\_G2FN + IgG23\_G2FS + IgG23\_G1FNS + IgG23\_G2FNS + IgG23\_G2FS2) / (IgG23\_G0 + IgG23\_G0F + IgG23\_G1 + IgG23\_G1F + IgG23\_G2 + IgG23\_G0FN + IgG23\_G2F + IgG23\_G1FN + IgG23\_G1FS + IgG23\_G2S + IgG23\_G2FN + IgG23\_G2FS + IgG23\_G1FNS + IgG23\_G2FNS + IgG23\_G2FS2)$                          |
| IgG23_A2G     |             | Galaktozilacija po anteni diantenarnih glikana na IgG23   | $(1/2 \times (IgG23\_G1 + IgG23\_G1F + IgG23\_G1FN + IgG23\_G1FS + IgG23\_G1FNS) + (IgG23\_G2 + IgG23\_G2F + IgG23\_G2S + IgG23\_G2FN + IgG23\_G2FS + IgG23\_G2FNS + IgG23\_G2FS2)) / (IgG23\_G0 + IgG23\_G0F + IgG23\_G1 + IgG23\_G1F + IgG23\_G2 + IgG23\_G0FN + IgG23\_G2F + IgG23\_G1FN + IgG23\_G1FS + IgG23\_G2S + IgG23\_G2FN + IgG23\_G2FS + IgG23\_G1FNS + IgG23\_G2FNS + IgG23\_G2FS2)$ |
| IgG23_A2S     | 0 – 2 x<br> | Sijalinizacija po anteni diantenarnih glikana na IgG23  | $(1/2 \times (IgG23\_G1FS + IgG23\_G2S + IgG23\_G2FS + IgG23\_G1FNS + IgG23\_G2FNS) + (IgG23\_G2FS2)) / (IgG23\_G0 + IgG23\_G0F + IgG23\_G1 + IgG23\_G1F + IgG23\_G2 + IgG23\_G0FN + IgG23\_G2F + IgG23\_G1FN + IgG23\_G1FS + IgG23\_G2S + IgG23\_G2FN + IgG23\_G2FS + IgG23\_G1FNS + IgG23\_G2FNS + IgG23\_G2FS2)$   |
| IgG23_A2GS    | 0 – 2 x<br> | Sijalinizacija po galaktozi diantenarnih glikana na IgG23                                       | $IgG23\_A2S / IgG23\_A2G$   |
| IgG4_agal     |             | Udio agalaktoziliranih glikana na IgG4  | $IgG4\_G0F + IgG4\_G0FN$  |
| IgG4_digal    |             | Udio digalaktoziliranih glikana na IgG4   | $IgG4\_G2F + IgG4\_G2FN + IgG4\_G2FS + IgG4\_G2FNS + IgG4\_G2FS2$   |
| IgG4_monogal  |             | Udio monogalaktoziliranih glikana na IgG4   | $IgG4\_G1F + IgG4\_G1FS + IgG4\_G1FN + IgG4\_G1FNS$   |
| IgG4_sial     | 0 – 2 x<br> | Udio sijaliniziranih glikana na IgG4  | $IgG4\_G1FS + IgG4\_G2FS + IgG4\_G1FNS + IgG4\_G2FNS + IgG4\_G2FS2$   |
| IgG4_A2FB     | 0 – 2 x<br> | Udio struktura s računjućim N-acetilglukozaminom na fukoiziranim diantenarnim glikanima na IgG4 | $(IgG4\_G0FN + IgG4\_G1FN + IgG4\_G2FN + IgG4\_G1FNS + IgG4\_G2FNS) / (IgG4\_G0F + IgG4\_G1F + IgG4\_G2F + IgG4\_G1FS + IgG4\_G0FN + IgG4\_G1FN + IgG4\_G2FN + IgG4\_G2FS + IgG4\_G1FNS + IgG4\_G2FNS + IgG4\_G2FS2)$   |

|            |  |  |   |
|------------|--|--|---|
| IgG4_A2FG  |             | Galaktozilacija po anteni fukoziliranih diantenarnih glikana na IgG4   | $(1/2 \times (\text{IgG4\_G1F} + \text{IgG4\_G1FS} + \text{IgG4\_G1FN} + \text{IgG4\_G1FNS}) + (\text{IgG4\_G2F} + \text{IgG4\_G2FN} + \text{IgG4\_G2FS} + \text{IgG4\_G2FNS} + \text{IgG4\_G2FS2})) / (\text{IgG4\_G0F} + \text{IgG4\_G1F} + \text{IgG4\_G2F} + \text{IgG4\_G1FS} + \text{IgG4\_G0FN} + \text{IgG4\_G1FN} + \text{IgG4\_G2FN} + \text{IgG4\_G2FS} + \text{IgG4\_G1FNS} + \text{IgG4\_G2FNS} + \text{IgG4\_G2FS2})$ |
| IgG4_A2FS  | 0 – 2 x<br> | Sijalinizacija po anteni fukoziliranih diantenarnih glikana na IgG4    | $(1/2 \times (\text{IgG4\_G1FS} + \text{IgG4\_G2FS} + \text{IgG4\_G1FNS} + \text{IgG4\_G2FNS}) + (\text{IgG4\_G2FS2})) / (\text{IgG4\_G0F} + \text{IgG4\_G1F} + \text{IgG4\_G2F} + \text{IgG4\_G1FS} + \text{IgG4\_G0FN} + \text{IgG4\_G1FN} + \text{IgG4\_G2FN} + \text{IgG4\_G2FS} + \text{IgG4\_G1FNS} + \text{IgG4\_G2FNS} + \text{IgG4\_G2FS2})$   |
| IgG4_A2FGS | 0 – 2 x<br> | Sijalinizacija po galaktozi fukoziliranih diantenarnih glikana na IgG4 | IgG4_A2S / IgG4_A2G   |

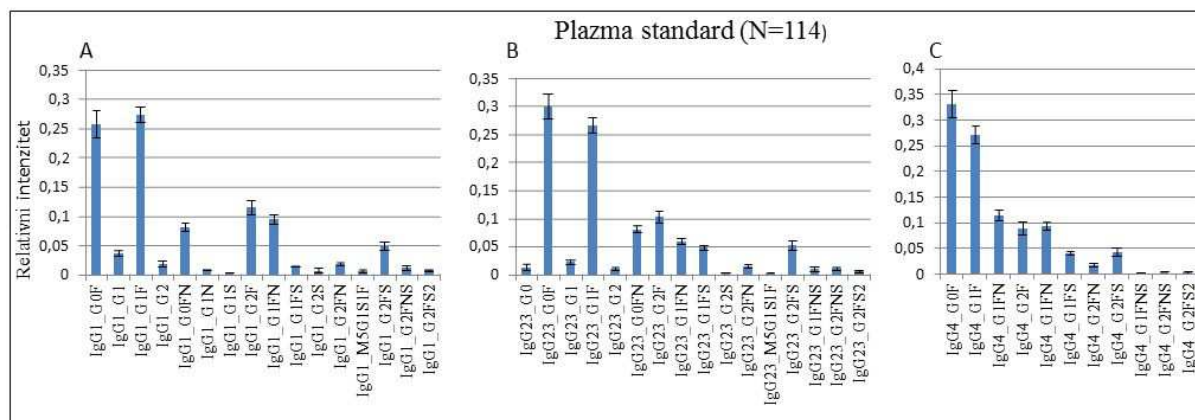
Derivirana svojstva daju informacije o glikozilaciji poput galaktozilacije, fukozilacije, sijalinizacije i računajućeg GlcNAc-a, a predstavljaju udio agalaktoziliranih (agal), monogalaktoziliranih (monogal), digalaktoziliranih (dikal) i sijaliniziranih (sial) struktura u ukupnim IgG1, IgG23 i IgG4 glikopeptidima te udio fukoziliranih (A2F) struktura, struktura s računajućim GlcNAc-om (A2B), udio sijalinizacije (A2S) i galaktozilacije (A2G) po anteni diantenarnih glikana kao i udio sijalinizacije po galaktozi diantenarnih glikana ukupnih IgG1 i IgG23 glikopeptida (Tablica 2.3.5.3 i Tablica 2.3.5.4). Derivirano svojstvo A2F nije izračunato za IgG4 jer su kod IgG4 detektirane samo fukozilirane glikoforme. Umjesto A2B, za IgG4 je izračunat udio struktura s računajućim GlcNAc-om na fukoziliranim diantenarnim glikanima (A2FB).

### 2.3.6. Statistička analiza

Prije statističke analize podataka programskim jezikom R (verzija 3.0.1, Beč, Austrija), za svaku pojedinačnu glikoformu, provedena je normalizacija ukupne površine ispod krivulje specifične za IgG potklasu. Normalizirani direktno mjereni glikopeptidi i derivirana svojstva su log-transformirani zbog zakrivljenosti njihovih distribucija u desno i efekta serije (eng. *batch*) koji se umnaža, a predstavlja tehnički uvjetovanu varijaciju kod manipulacije uzorcima i analize, u našem slučaju to je položaj uzorka na pojedinoj pločici. Korekcija efekta serije je provedena na log-transformiranim direktno mjerenim glikopeptidima i deriviranim svojstvima ComBat metodom.<sup>233</sup> Iz daljnje analize su bila isključena mjerenja s devijacijom > 5 SD u odnosu na srednju vrijednost. Visoka ponovljivost glikozilacijskih profila pozitivnih kontrola tijekom mjerenja, govori u prilog kvalitete podataka. Nakon korekcije efekta serije, pozitivna kontrola- plazma standard (N=114) pokazala je medijan relativnih standardnih devijacija od 13,2 % za sve IgG1 glikoforme, 15,8 % za IgG23 glikoforme i 13,4 % za IgG4 glikoforme



(Slika 2.3.6).<sup>225</sup> Prije daljnje analize, izmjereni glikani su standardizirani na srednju vrijednost nula i standardnu devijaciju (SD) 1. Procijenjeni omjeri izgleda (eng. *odds ratio*, OR) različitih glikana su usporedivi zbog upotrebe standardiziranih varijabli koje imaju standardiziranu varijancu te OR uvijek odgovaraju promjeni jedne SD.



**Slika 2.3.6** Ponovljivost metode. Relativne zastupljenosti ekstrahiranih IgG1 (A), IgG23 (B) i IgG4 (C) glikoformi u plazma standardu (N=114). Prikazane prosječne relativne zastupljenosti i standardne devijacije svih tehničkih replikata pokazuju visoku ponovljivost tijekom mjerenja, prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

Linearnim regresijskim modelom (ANCOVA), procijenjen je utjecaj efekata dobi i spola na izmjerene glikopeptide u kontrolnoj skupini (Tablica 2.3.6).<sup>225</sup>

**Tablica 2.3.6** Utjecaj dobi i spola na mjerenja glikopeptida. Prikazan je utjecaj dobi i spola na glikanska svojstva glikopeptida IgG-a: agalaktozilaciju (agal), monogalaktozilaciju (monogal), digalaktozilaciju (digoal) i sijalinizaciju (sial) u kontrolnoj skupini, dobiven linearnim regresijskim modelima (ANCOVA). P vrijednosti su prilagođene na višestruko testiranje uz  $\alpha=5\%$  (prilagođena P vrijednost). Statistički značajne vrijednosti su prikazane masno otisnute, prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

| Derivirano svojstvo | Obilježje | $\beta$ | Stupnjevi slobode | Standardna pogreška | P vrijednost | prilagođena P vrijednost |
|---------------------|-----------|---------|-------------------|---------------------|--------------|--------------------------|
| IgG1_agal           | Dob       | 0,038   | 424               | 0,003               | 2,88E-13     | <b>1,73E-12</b>          |
| IgG1_digoal         | Dob       | - 0,037 | 424               | 0,003               | 1,68E-12     | <b>6,30E-12</b>          |
| IgG1_monogal        | Dob       | 0,028   | 424               | 0,003               | 1,28E+00     | 1,54E+00                 |
| IgG1_sial           | Dob       | - 0,030 | 424               | 0,003               | 6,25E-04     | <b>9,38E-04</b>          |
| IgG23_agal          | Dob       | 0,039   | 405               | 0,003               | 2,49E-14     | <b>2,98E-13</b>          |
| IgG23_digoal        | Dob       | - 0,038 | 405               | 0,003               | 2,10E-12     | <b>6,30E-12</b>          |

|               |      |         |     |       |          |                 |
|---------------|------|---------|-----|-------|----------|-----------------|
| IgG23_monogal | Dob  | - 0,033 | 405 | 0,003 | 3,14E-05 | <b>5,39E-05</b> |
| IgG23_sial    | Dob  | - 0,025 | 405 | 0,004 | 3,56E+02 | 3,56E+02        |
| IgG4_agal     | Dob  | 0,038   | 388 | 0,003 | 3,12E-11 | <b>7,49E-12</b> |
| IgG4_digal    | Dob  | - 0,038 | 388 | 0,003 | 6,22E-11 | <b>1,24E-12</b> |
| IgG4_monogal  | Dob  | - 0,032 | 388 | 0,004 | 8,69E-04 | <b>1,16E-03</b> |
| IgG4_sial     | Dob  | - 0,029 | 388 | 0,004 | 4,90E+00 | 5,35E+00        |
| IgG1_agal     | Spol | 0,202   | 424 | 0,089 | 2,35E-02 | <b>4,03E-02</b> |
| IgG1_digal    | Spol | - 0,371 | 424 | 0,089 | 3,30E+09 | <b>2,82E-04</b> |
| IgG1_monogal  | Spol | 0,163   | 424 | 0,095 | 8,70E-02 | 1,04E-01        |
| IgG1_sial     | Spol | - 0,316 | 424 | 0,093 | 7,15E-04 | <b>2,86E-03</b> |
| IgG23_agal    | Spol | 0,242   | 405 | 0,090 | 7,28E-03 | <b>1,53E-02</b> |
| IgG23_digal   | Spol | - 0,370 | 405 | 0,090 | 4,70E+07 | <b>2,82E-04</b> |
| IgG23_monogal | Spol | 0,008   | 405 | 0,095 | 9,37E-01 | 9,37E-01        |
| IgG23_sial    | Spol | - 0,325 | 405 | 0,099 | 9,90E-04 | <b>2,97E-03</b> |
| IgG4_agal     | Spol | 0,039   | 388 | 0,093 | 6,71E-01 | 7,32E-01        |
| IgG4_digal    | Spol | - 0,248 | 388 | 0,093 | 7,66E-03 | <b>1,53E-02</b> |
| IgG4_monogal  | Spol | 0,204   | 388 | 0,097 | 3,48E-02 | 5,22E-02        |
| IgG4_sial     | Spol | - 0,176 | 388 | 0,099 | 7,60E-02 | 1,01E-01        |

Povezanost između pojedinih skupina (UC i HC, CD i HC te UC i CD) i glikana te povezanost unutar skupine, između kliničkih obilježja bolesti i glikana su ispitane logističkim regresijskim modelom uz dob i spol kao dodatne kovarijate. Kod ulceroznog kolitisa od kliničkih obilježja prema Montreal klasifikaciji analizirane su: lokacija, trajanje bolesti i operacija. S obzirom kako lokacija UC-a govori i o progresiji same bolesti, promatrali smo razlike između E1 (završni dio debelog crijeva) i E2 (lijeva strana debelog crijeva) naspram E3 (cijelo debelo crijevo). U CD-u analizirane su prema Montreal klasifikaciji: lokacija, ponašanje, trajanje bolesti i operacija. Kod ponašanja, u CD-u je promatrana B2 (sužavajuća) i B3 (perforirajuća) naspram B1 (upalna). Lokacija CD-a je analizirana kroz razlike između L1 (terminalni ileum) naspram L2 (debelo crijevo) i L1 naspram L3 (ileum i debelo crijevo). Granična vrijednost od 5 godina nakon postavljanja dijagnoze je uzeta kako bi se UC i CD

pacijenti svrstali u dvije grupe na kojima je analizirano trajanje bolesti. U analizi utjecaja lijekova kod CD-a i UC-a, pacijenti tretirani steroidima (treći po jakosti) uspoređivani su s pacijentima samo na mesalazinu (četvrti po jakosti) te su pacijenti tretirani anti-TNF-om (prvi po jakosti) uspoređivani s onima na azatioprinu i 6-merkaptopurinu (AZA/6MP, drugi po jakosti). Vjerojatnost lažnog odbacivanja (eng. *false discovery rate*, FDR) je kontrolirana Benjamini-Hochberg metodom uz  $\alpha=0,05$ . Sve  $P$  vrijednosti su prilagođene na višestruko testiranje.

Za predviđanje statusa bolesti upotrebljen je logistički (elastična mreža) regresijski model (R paket „glmnet“<sup>234</sup>). Klasifikacija je napravljena s direktno mjerenim glikopeptidima kao prediktorima. Prije same analize, parametri regulacije elastične mreže ( $\alpha$  i  $\lambda$ ) su namješteni na 200 UC i 200 CD uzoraka te su se u daljnjoj klasifikaciji koristili ( $\alpha=0$ ,  $\lambda=0,0001$ ). Napravljena su tri modela: UC naspram HC, CD naspram HC i UC naspram CD uz dob, spol i izmjerene glikopeptide kao prediktore. Klasifikacija nije provedena na svim uzorcima već na dijelu koji je imao podudarne uzorke pod dobi i spolu. Kako bi procijenili prediktivne modele na temelju pojedinačnih glikoformi, korišteno je 10 postupaka unakrsne validacije (eng. *cross validation*) koji su spojeni u jedan na temelju kojeg je procijenjen svaki model prema površini ispod krivulje (eng. *area under curve*, AUC).

## § 3. REZULTATI

Metodom nanoLC-MS analizirane su IgG Fc-glikoforme po potklasama na 2 357 uzoraka (N=1 056 UC, N=874 CD i N=427 HC). Detaljne informacije o IBD pacijentima i zdravim kontrolama navedene su u Tablici 2.1.

### 3.1. Razlike u Fc-glikozilaciji imunoglobulina G između pacijenata oboljelih od Crohnove bolesti, ulceroznog kolitisa i kontrolne skupine

Logističkom regresijom između skupina: UC i HC, CD i HC te UC i CD ispitanika, zabilježene su statistički značajne razlike kod većeg broja glikanskih svojstava (Tablica 3.1.1, Slika 3.1.1 s detaljnijim prikazom u Tablicama 3.1.2-3.1.4)<sup>225</sup>.

**Tablica 3.1.1** Povezanost deriviranih IgG Fc-glikozilacijskih svojstava i IBD-a, prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

| Derivirano svojstvo <sup>a</sup> | Opis   | HC vs. UC <sup>b</sup>   |                    | HC vs. CD             |                    | UC vs. CD             |                    |
|----------------------------------|--|--------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
|                                  |  | OR (95% CI) <sup>c</sup> | pril. P vrijednost | OR (95% CI)           | pril. P vrijednost | OR (95% CI)           | pril. P vrijednost |
| <b>IgG1</b>                      |  |                          |                    |                       |                    |                       |                    |
| <b>IgG1_agal</b>                 | Udio agalaktoziliranih glikana   | 1,29<br>(1,13 - 1,47)    | <b>8,9E-05</b>     | 1,69<br>(1,46 - 1,96) | <b>2,2E-13</b>     | 1,23<br>(1,11 - 1,36) | <b>3,9E-05</b>     |
| <b>IgG1_digal</b>                | Udio digalaktoziliranih glikana  | 0,88<br>(0,77 - 1,00)    | 5,7E-02            | 0,61<br>(0,52 - 0,70) | <b>2,7E-12</b>     | 0,71<br>(0,64 - 0,79) | <b>8,0E-11</b>     |
| <b>IgG1_monogal</b>              | Udio monogalaktoziliranih glikana  | 0,69<br>(0,61 - 0,79)    | <b>5,4E-09</b>     | 0,69<br>(0,61 - 0,79) | <b>4,3E-08</b>     | 1,06<br>(0,97 - 1,17) | 2,0E-01            |
| <b>IgG1_sial</b>                 | Udio sijaliniziranih glikana   | 1,05<br>(0,93 - 1,20)    | 4,1E-01            | 0,81<br>(0,70 - 0,92) | <b>1,4E-03</b>     | 0,78<br>(0,71 - 0,87) | <b>1,5E-06</b>     |
| <b>IgG1_A2B</b>                  | Udio struktura s računjućim <i>N</i> -acetilglukozaminom na diantenarnim glikanima | 0,69<br>(0,61 - 0,78)    | <b>3,5E-09</b>     | 0,91<br>(0,79 - 1,03) | 1,4E-01            | 1,22<br>(1,11 - 1,35) | <b>7,8E-05</b>     |
| <b>IgG1_A2F</b>                  | Udio struktura s fukozom na diantenarnim glikanima                                 | 0,93<br>(0,82 - 1,04)    | 2,1E-01            | 1,27<br>(1,12 - 1,44) | <b>2,2E-04</b>     | 1,36<br>(1,23 - 1,51) | <b>6,0E-10</b>     |

|                      |   |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
|----------------------|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>IgG1_A2G</b>      | Galaktozilacija po anteni dantenarnih glikana   | 0,81<br>(0,71 - 0,92) | <b><u>1,5E-03</u></b> | 0,59<br>(0,51 - 0,69) | <b><u>3,2E-13</u></b> | 0,77<br>(0,69 - 0,85) | <b><u>2,5E-07</u></b> |
| <b>IgG1_A2S</b>      | Sijalinizacija po anteni dantenarnih glikana  | 1,04<br>(0,92 - 1,18) | 5,1E-01               | 0,78<br>(0,68 - 0,90) | <b><u>3,2E-04</u></b> | 0,77<br>(0,70 - 0,85) | <b><u>3,7E-07</u></b> |
| <b>IgG1_A2GS</b>     | Sijalinizacija po galaktozi dantenarnih glikana   | 1,33<br>(1,18 - 1,51) | <b><u>3,6E-06</u></b> | 1,15<br>(1,01 - 1,30) | <b><u>3,1E-02</u></b> | 0,85<br>(0,77 - 0,94) | <b><u>1,1E-03</u></b> |
| <b>IgG23</b>         |   |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| <b>IgG23_agal</b>    | Udio agalaktoziliranih glikana  | 1,30<br>(1,14 - 1,50) | <b><u>1,3E-04</u></b> | 2,76<br>(2,31 - 3,29) | <b><u>1,7E-37</u></b> | 2,11<br>(1,87 - 2,37) | <b><u>1,2E-40</u></b> |
| <b>IgG23_digal</b>   | Udio digalaktoziliranih glikana   | 0,82<br>(0,71 - 0,94) | <b><u>3,7E-03</u></b> | 0,41<br>(0,35 - 0,48) | <b><u>2,2E-31</u></b> | 0,49<br>(0,43 - 0,55) | <b><u>1,0E-36</u></b> |
| <b>IgG23_monogal</b> | Udio monogalaktoziliranih glikana   | 0,77<br>(0,67 - 0,87) | <b><u>4,1E-05</u></b> | 0,39<br>(0,32 - 0,46) | <b><u>8,5E-34</u></b> | 0,54<br>(0,48 - 0,60) | <b><u>8,2E-32</u></b> |
| <b>IgG23_sial</b>    | Udio sijaliniziranih glikana  | 0,87<br>(0,76 - 0,99) | <b><u>2,9E-02</u></b> | 0,53<br>(0,46 - 0,61) | <b><u>6,8E-20</u></b> | 0,58<br>(0,52 - 0,64) | <b><u>1,0E-24</u></b> |
| <b>IgG23_A2B</b>     | Udio struktura s računjućim <i>N</i> -acetilglukozaminom na dantenarnim glikanima               | 0,62<br>(0,55 - 0,71) | <b><u>3,2E-13</u></b> | 0,91<br>(0,80 - 1,05) | 1,9E-01               | 1,34<br>(1,21 - 1,48) | <b><u>8,2E-09</u></b> |
| <b>IgG23_A2F</b>     | Udio struktura s fukozom na dantenarnim glikanima   | 0,72<br>(0,63 - 0,82) | <b><u>3,2E-07</u></b> | 1,12<br>(0,99 - 1,27) | 7,5E-02               | 1,57<br>(1,41 - 1,74) | <b><u>1,6E-18</u></b> |
| <b>IgG23_A2G</b>     | Galaktozilacija po anteni dantenarnih glikana   | 0,79<br>(0,68 - 0,90) | <b><u>5,3E-04</u></b> | 0,38<br>(0,32 - 0,45) | <b><u>1,9E-35</u></b> | 0,47<br>(0,42 - 0,53) | <b><u>4,1E-40</u></b> |
| <b>IgG23_A2S</b>     | Sijalinizacija po anteni dantenarnih glikana  | 0,86<br>(0,76 - 0,98) | <b><u>2,3E-02</u></b> | 0,52<br>(0,45 - 0,60) | <b><u>5,7E-21</u></b> | 0,57<br>(0,51 - 0,64) | <b><u>2,4E-25</u></b> |
| <b>IgG23_A2GS</b>    | Sijalinizacija po galaktozi dantenarnih glikana   | 1,02<br>(0,90 - 1,14) | 8,0E-01               | 1,19<br>(1,05 - 1,35) | <b><u>7,6E-03</u></b> | 1,11<br>(1,01 - 1,22) | <b><u>2,9E-02</u></b> |
| <b>IgG4</b>          |   |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| <b>IgG4_agal</b>     | Udio agalaktoziliranih glikana  | 1,30<br>(1,13 - 1,48) | <b><u>1,2E-04</u></b> | 2,16<br>(1,84 - 2,54) | <b><u>2,3E-24</u></b> | 1,62<br>(1,46 - 1,80) | <b><u>3,7E-20</u></b> |
| <b>IgG4_digal</b>    | Udio digalaktoziliranih glikana   | 0,89<br>(0,78 - 1,01) | 7,9E-02               | 0,53<br>(0,46 - 0,61) | <b><u>2,8E-18</u></b> | 0,60<br>(0,53 - 0,67) | <b><u>1,4E-21</u></b> |
| <b>IgG4_monogal</b>  | Udio monogalaktoziliranih glikana   | 0,69<br>(0,60 - 0,79) | <b><u>2,0E-08</u></b> | 0,45<br>(0,38 - 0,53) | <b><u>7,9E-26</u></b> | 0,68<br>(0,62 - 0,76) | <b><u>6,9E-14</u></b> |
| <b>IgG4_sial</b>     | Udio sijaliniziranih glikana  | 1,01<br>(0,89 - 1,14) | 9,2E-01               | 0,68<br>(0,59 - 0,78) | <b><u>2,2E-08</u></b> | 0,66<br>(0,60 - 0,74) | <b><u>3,0E-15</u></b> |
| <b>IgG4_A2FB</b>     | Udio struktura s računjućim <i>N</i> -acetilglukozaminom na fukoziliranim dantenarnim glikanima | 0,79<br>(0,70 - 0,90) | <b><u>3,5E-04</u></b> | 0,84<br>(0,73 - 0,96) | <b><u>1,1E-02</u></b> | 0,97<br>(0,88 - 1,08) | 5,9E-01               |
| <b>IgG4_A2FG</b>     | Galaktozilacija po anteni fukoziliranih dantenarnih glikana                                     | 0,81<br>(0,71 - 0,92) | <b><u>1,5E-03</u></b> | 0,48<br>(0,41 - 0,57) | <b><u>2,2E-22</u></b> | 0,61<br>(0,55 - 0,68) | <b><u>5,4E-21</u></b> |

|            |  |                       |                |                       |                |                       |                |
|------------|--|-----------------------|----------------|-----------------------|----------------|-----------------------|----------------|
| IgG4_A2FS  | Sijalinizacija po anteni fukoziliranih diantenarnih glikana    | 1,03<br>(0,90 - 1,17) | 6,8E-01        | 0,70<br>(0,61 - 0,80) | <b>1,3E-07</b> | 0,67<br>(0,60 - 0,74) | <b>8,5E-15</b> |
| IgG4_A2FGS | Sijalinizacija po galaktozi fukozoliranih diantenarnih glikana | 1,38<br>(1,21 - 1,57) | <b>8,5E-07</b> | 1,39<br>(1,22 - 1,60) | <b>7,2E-07</b> | 1,00<br>(0,90 - 1,10) | 9,3E-01        |

<sup>a</sup> Derivirana glikozilacijska svojstva su izračunata kao što je opisano u tablici 2.3.5.4

<sup>b</sup> Analiza razlika između HC-a i UC-a (HC=0, UC=1), HC-a i CD-a (HC=0, CD=1) te između UC-a i CD-a (UC=0, CD=1) provedena je logističkom regresijom uz dob i spol kao kovarijate.

<sup>c</sup> Prikazani su omjeri izgleda (OR) uz interval pouzdanosti (eng. *confidence interval*, CI) od 95 %

<sup>d</sup> Prilagođene, statistički značajne P vrijednosti (pril. P vrijednost) nakon korekcije na višestruko testiranje otisnute su masno ( $\alpha=5\%$ )

**Tablica 3.1.2** Povezanost deriviranih IgG Fc-glikozilacijskih svojstava i UC-a. Analiza razlika između HC-a i UC-a (HC=0, UC=1) provedena je logističkom regresijom uz dob i spol kao kovarijate. Prikazani su omjeri izgleda (OR) uz interval pouzdanosti (CI) od 95 %, P vrijednosti te prilagođene P vrijednosti (pril. P vrijednost) nakon korekcije na višestruko testiranje ( $\alpha=5\%$ ). Prilagođene, statistički značajne P vrijednosti otisnute su masno. Derivirana glikozilacijska svojstva su izračunata kao što je opisano u tablici 2.3.5.4., prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

| Derivirano svojstvo | OR   | 95% CI        | P vrijednost | pril. P vrijednost |
|---------------------|------|---------------|--------------|--------------------|
| IgG1_A2B            | 0,69 | (0,61 - 0,78) | 3,47E-09     | <b>4,78E-08</b>    |
| IgG1_A2F            | 0,93 | (0,82 - 1,04) | 2,12E-01     | 2,76E-01           |
| IgG1_A2G            | 0,81 | (0,71 - 0,92) | 1,45E-03     | <b>2,95E-03</b>    |
| IgG1_A2GS           | 1,33 | (1,18 - 1,51) | 3,58E-06     | <b>1,37E-05</b>    |
| IgG1_A2S            | 1,04 | (0,92 - 1,18) | 5,09E-01     | 5,95E-01           |
| IgG1_agal           | 1,29 | (1,13 - 1,47) | 8,85E-05     | <b>2,55E-04</b>    |
| IgG1_digal          | 0,88 | (0,77 - 1,00) | 5,71E-02     | 7,88E-02           |
| IgG1_monogal        | 0,69 | (0,61 - 0,79) | 5,42E-09     | <b>5,34E-08</b>    |
| IgG1_sial           | 1,05 | (0,93 - 1,20) | 4,12E-01     | 4,99E-01           |
| IgG23_A2B           | 0,62 | (0,55 - 0,71) | 3,25E-13     | <b>7,47E-12</b>    |
| IgG23_A2F           | 0,72 | (0,63 - 0,82) | 3,22E-07     | <b>1,71E-06</b>    |
| IgG23_A2G           | 0,79 | (0,68 - 0,90) | 5,30E-04     | <b>1,14E-03</b>    |
| IgG23_A2GS          | 1,02 | (0,90 - 1,14) | 8,03E-01     | 8,57E-01           |
| IgG23_A2S           | 0,86 | (0,76 - 0,98) | 2,31E-02     | <b>3,55E-02</b>    |
| IgG23_agal          | 1,3  | (1,14 - 1,50) | 1,29E-04     | <b>3,43E-04</b>    |
| IgG23_digal         | 0,82 | (0,71 - 0,94) | 3,69E-03     | <b>6,88E-03</b>    |
| IgG23_monogal       | 0,77 | (0,67 - 0,87) | 4,15E-05     | <b>1,43E-04</b>    |
| IgG23_sial          | 0,87 | (0,76 - 0,99) | 2,89E-02     | <b>4,34E-02</b>    |
| IgG4_A2FB           | 0,79 | (0,70 - 0,90) | 3,48E-04     | <b>8,01E-04</b>    |
| IgG4_A2FG           | 0,81 | (0,71 - 0,92) | 1,54E-03     | <b>3,04E-03</b>    |
| IgG4_A2FGS          | 1,38 | (1,21 - 1,57) | 8,54E-07     | <b>3,47E-06</b>    |

|              |      |               |          |                 |
|--------------|------|---------------|----------|-----------------|
| IgG4_A2FS    | 1,03 | (0,90 - 1,17) | 6,84E-01 | 7,74E-01        |
| IgG4_agal    | 1,3  | (1,13 - 1,48) | 1,15E-04 | <b>3,19E-04</b> |
| IgG4_digal   | 0,89 | (0,78 - 1,01) | 7,91E-02 | 1,05E-01        |
| IgG4_monogal | 0,69 | (0,60 - 0,79) | 2,04E-08 | <b>1,56E-07</b> |
| IgG4_sial    | 1,01 | (0,89 - 1,14) | 9,22E-01 | 9,23E-01        |

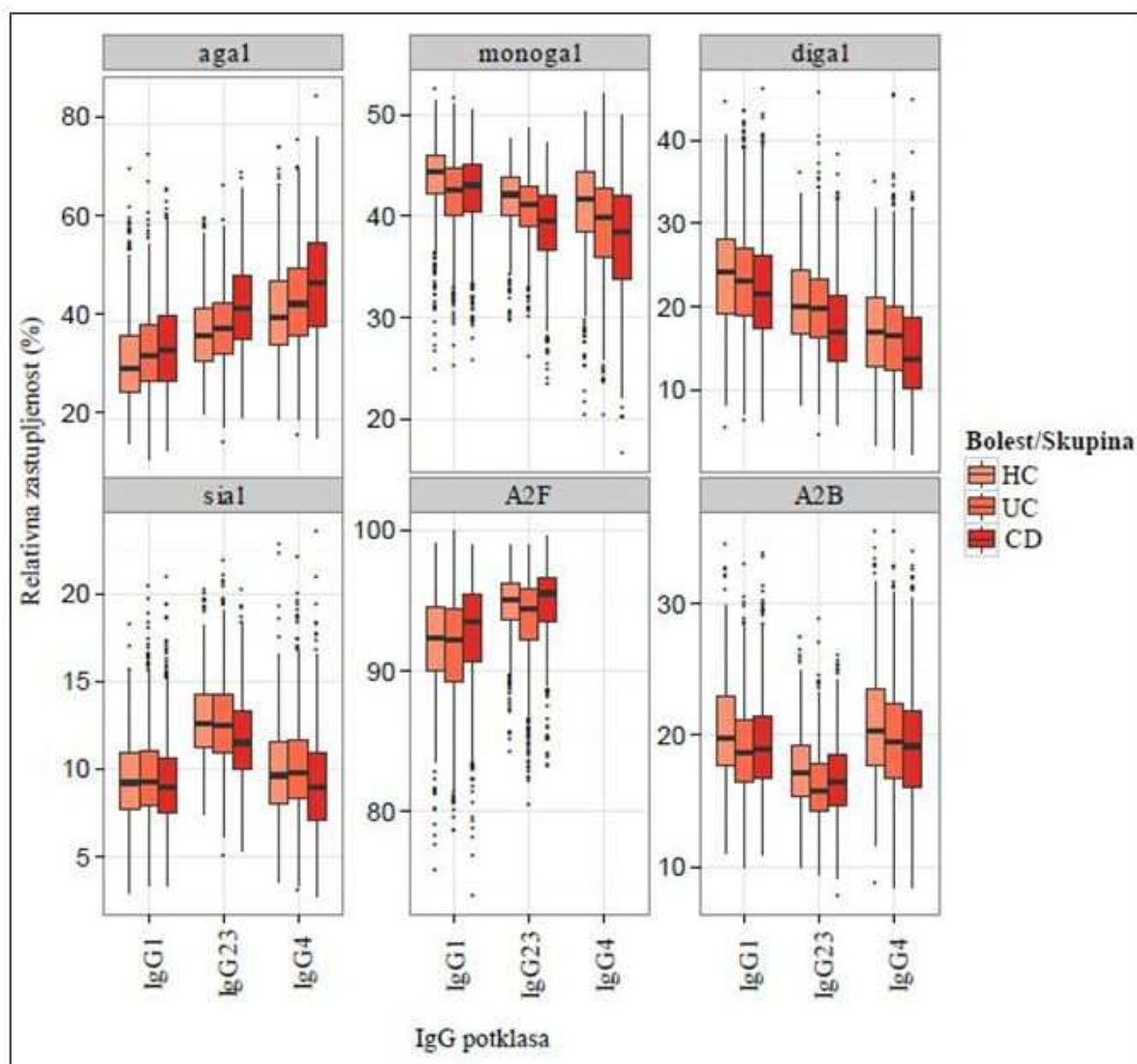
**Tablica 3.1.3** Povezanost deriviranih IgG Fc-glikozilacijskih svojstava i CD-a. Analiza razlika između HC-a i CD-a (HC=0, CD=1) provedena je logističkom regresijom uz dob i spol kao kovarijate. Prikazani su omjeri izgleda (OR) uz interval pouzdanosti (CI) od 95 %, P vrijednosti te prilagođene P vrijednosti (pril. P vrijednost) nakon korekcije na višestruko testiranje ( $\alpha=5\%$ ). Prilagođene, statistički značajne P vrijednosti otisnute su masno. Derivirana glikozilacijska svojstva su izračunata kao što je opisano u tablici 2.3.5.4, prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

| Derivirano svojstvo | OR   | 95% CI        | P vrijednost | pril. P vrijednost |
|---------------------|------|---------------|--------------|--------------------|
| IgG1_A2B            | 0,91 | (0,79 - 1,03) | 1,42E-01     | 1,47E-01           |
| IgG1_A2F            | 1,27 | (1,12 - 1,44) | 2,16E-04     | <b>3,55E-04</b>    |
| IgG1_A2G            | 0,59 | (0,51 - 0,69) | 3,15E-13     | <b>7,77E-13</b>    |
| IgG1_A2GS           | 1,15 | (1,01 - 1,30) | 3,14E-02     | <b>3,55E-02</b>    |
| IgG1_A2S            | 0,78 | (0,68 - 0,90) | 3,20E-04     | <b>4,69E-04</b>    |
| IgG1_agal           | 1,69 | (1,46 - 1,96) | 2,23E-13     | <b>5,70E-13</b>    |
| IgG1_digal          | 0,61 | (0,52 - 0,70) | 2,71E-12     | <b>6,45E-12</b>    |
| IgG1_monogal        | 0,69 | (0,61 - 0,79) | 4,29E-08     | <b>8,70E-08</b>    |
| IgG1_sial           | 0,81 | (0,70 - 0,92) | 1,42E-03     | <b>1,89E-03</b>    |
| IgG23_A2B           | 0,91 | (0,80 - 1,05) | 1,89E-01     | 1,92E-01           |
| IgG23_A2F           | 1,12 | (0,99 - 1,27) | 7,51E-02     | 7,97E-02           |
| IgG23_A2G           | 0,38 | (0,32 - 0,45) | 1,90E-35     | <b>4,37E-34</b>    |
| IgG23_A2GS          | 1,19 | (1,05 - 1,35) | 7,58E-03     | <b>9,51E-03</b>    |
| IgG23_A2S           | 0,52 | (0,45 - 0,60) | 5,68E-21     | <b>2,61E-20</b>    |
| IgG23_agal          | 2,76 | (2,31 - 3,29) | 1,71E-37     | <b>5,90E-36</b>    |
| IgG23_digal         | 0,41 | (0,35 - 0,48) | 2,17E-31     | <b>2,99E-30</b>    |
| IgG23_monogal       | 0,39 | (0,32 - 0,46) | 8,46E-34     | <b>1,46E-32</b>    |
| IgG23_sial          | 0,53 | (0,46 - 0,61) | 6,85E-20     | <b>2,95E-19</b>    |
| IgG4_A2FB           | 0,84 | (0,73 - 0,96) | 1,12E-02     | <b>1,35E-02</b>    |
| IgG4_A2FG           | 0,48 | (0,41 - 0,57) | 2,19E-22     | <b>1,26E-21</b>    |
| IgG4_A2FGS          | 1,39 | (1,22 - 1,60) | 7,23E-07     | <b>1,31E-06</b>    |
| IgG4_A2FS           | 0,7  | (0,61 - 0,80) | 1,33E-07     | <b>2,62E-07</b>    |
| IgG4_agal           | 2,16 | (1,84 - 2,54) | 2,32E-24     | <b>1,60E-23</b>    |
| IgG4_digal          | 0,53 | (0,46 - 0,61) | 2,83E-18     | <b>1,03E-17</b>    |
| IgG4_monogal        | 0,45 | (0,38 - 0,53) | 7,90E-26     | <b>6,06E-25</b>    |
| IgG4_sial           | 0,68 | (0,59 - 0,78) | 2,25E-08     | <b>4,70E-08</b>    |

**Tablica 3.1.4** Razlike u deriviranim IgG Fc-glikozilacijskim svojstavima između UC-a i CD-a. Analiza razlika između UC-a i CD-a (UC=0, CD=1) provedena je logističkom regresijom uz dob i spol kao kovarijate. Prikazani su omjeri izgleda (OR) uz interval pouzdanosti (CI) od 95 %, P vrijednosti te prilagođene P vrijednosti (pril. P vrijednost) nakon korekcije na višestruko testiranje ( $\alpha=5\%$ ). Prilagođene, statistički značajne P vrijednosti otisnute su masno. Derivirana glikozilacijska svojstva su izračunata kao što je opisano u tablici 2.3.5.4., prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

| Derivirano svojstvo  | OR   | 95% CI        | P vrijednost | pril. P vrijednost |
|----------------------|------|---------------|--------------|--------------------|
| <b>IgG1_A2B</b>      | 1,22 | (1,11 - 1,35) | 7,85E-05     | <b>9,68E-05</b>    |
| <b>IgG1_A2F</b>      | 1,36 | (1,23 - 1,51) | 6,01E-10     | <b>1,22E-09</b>    |
| <b>IgG1_A2G</b>      | 0,77 | (0,69 - 0,85) | 2,54E-07     | <b>4,28E-07</b>    |
| <b>IgG1_A2GS</b>     | 0,85 | (0,77 - 0,94) | 1,11E-03     | <b>1,32E-03</b>    |
| <b>IgG1_A2S</b>      | 0,77 | (0,70 - 0,85) | 3,68E-07     | <b>6,05E-07</b>    |
| <b>IgG1_agal</b>     | 1,23 | (1,11 - 1,36) | 3,94E-05     | <b>5,13E-05</b>    |
| <b>IgG1_digal</b>    | 0,71 | (0,64 - 0,79) | 8,01E-11     | <b>1,67E-10</b>    |
| <b>IgG1_monogal</b>  | 1,06 | (0,97 - 1,17) | 2,00E-01     | 2,06E-01           |
| <b>IgG1_sial</b>     | 0,78 | (0,71 - 0,87) | 1,47E-06     | <b>2,20E-06</b>    |
| <b>IgG23_A2B</b>     | 1,34 | (1,21 - 1,48) | 8,19E-09     | <b>1,57E-08</b>    |
| <b>IgG23_A2F</b>     | 1,57 | (1,41 - 1,74) | 1,60E-18     | <b>6,14E-18</b>    |
| <b>IgG23_A2G</b>     | 0,47 | (0,42 - 0,53) | 4,07E-40     | <b>1,40E-38</b>    |
| <b>IgG23_A2GS</b>    | 1,11 | (1,01 - 1,22) | 2,94E-02     | <b>3,28E-02</b>    |
| <b>IgG23_A2S</b>     | 0,57 | (0,51 - 0,64) | 2,41E-25     | <b>1,85E-24</b>    |
| <b>IgG23_agal</b>    | 2,11 | (1,87 - 2,37) | 1,18E-40     | <b>8,14E-39</b>    |
| <b>IgG23_digal</b>   | 0,49 | (0,43 - 0,55) | 9,96E-37     | <b>2,29E-35</b>    |
| <b>IgG23_monogal</b> | 0,54 | (0,48 - 0,60) | 8,23E-32     | <b>1,14E-30</b>    |
| <b>IgG23_sial</b>    | 0,58 | (0,52 - 0,64) | 1,05E-24     | <b>7,21E-24</b>    |
| <b>IgG4_A2FB</b>     | 0,97 | (0,88 - 1,08) | 5,94E-01     | 6,02E-01           |
| <b>IgG4_A2FG</b>     | 0,61 | (0,55 - 0,68) | 5,36E-21     | <b>2,85E-20</b>    |
| <b>IgG4_A2FGS</b>    | 1    | (0,90 - 1,10) | 9,30E-01     | 9,30E-01           |
| <b>IgG4_A2FS</b>     | 0,67 | (0,60 - 0,74) | 8,54E-15     | <b>2,68E-14</b>    |
| <b>IgG4_agal</b>     | 1,62 | (1,46 - 1,80) | 3,65E-20     | <b>1,68E-19</b>    |
| <b>IgG4_digal</b>    | 0,6  | (0,53 - 0,67) | 1,38E-21     | <b>7,92E-21</b>    |
| <b>IgG4_monogal</b>  | 0,68 | (0,62 - 0,76) | 6,92E-14     | <b>1,91E-13</b>    |
| <b>IgG4_sial</b>     | 0,66 | (0,60 - 0,74) | 3,02E-15     | <b>9,93E-15</b>    |





**Slika 3.1.1** Razlike u deriviranim IgG Fc-glikozilacijskim svojstvima između HC-a, UC-a i CD-a po potklasama. Prikazani su dijagrami pravokutnika (eng. *box*) pri čemu svaki predstavlja interkvartilni raspon (eng. *interquartile range*, IQR) od 25.-75. percentila, linije unutar pravokutnika koje predstavljaju medijan te linije koje određuju granice pravokutnika (eng. *whiskers*), a predstavljaju najnižu i najvišu vrijednost unutar pravokutnika  $\pm 1.5 \times$  IQR. Derivirana glikozilacijska svojstva: agalaktozilacija (agal, udio agalaktoziliranih glikana), monogalaktozilacija (monogal, udio monogalaktoziliranih glikana), digalaktozilacija (digal, udio digalaktoziliranih glikana), sijalinizacija (sial, udio sijaliniziranih glikana), A2F (udio struktura s fukozom na dianenarnim glikanima), A2B (udio struktura s račvajućim *N*-acetilglukozaminom na dianenarnim glikanima) i A2FB za IgG4 (udio struktura s račvajućim *N*-acetilglukozaminom na fukoziliranim dianenarnim IgG4 glikanima) navedena su u tablicama 2.3.5.3-2.3.5.4., a njihove glikoforme u tablici 2.3.5.2. Analiza razlika u glikozilacijskim svojstvima između UC-a i HC-a, CD-a i HC-a te UC-a i CD-a, provedena je logističkim regresijskim modelom uz dob i spol kao dodatne kovarijate (tablice 3.1.1-3.1.4), prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

Kod CD-a i UC-a naspram HC-a, dolazi do porasta agalaktoziliranih te pada monogalaktoziliranih i digalaktoziliranih IgG glikopeptida (nije značajno za IgG1 i IgG4 kod

UC-a). Sve su IgG potklase imale nižu galaktozilaciju (A2G) kod CD-a naspram UC-a. S CD-om je povezana i smanjena sijalinizacija. Sijalinizacija po galaktozi diantenarnih glikana (A2GS) se povećala ili se nije promijenila kod bolesti (Tablice 3.1.1-3.1.3). Zabilježena je povezanost fukoziliranih IgG glikopeptida (A2F) s određenim potklasama i bolestima. Porast A2F-a se povezuje s CD-om kod IgG1 dok se pad A2F-a povezuje s UC-om kod IgG23, a u usporedbi CD-a naspram UC-a, IgG1 i IgG23 A2F raste kod CD-a. Kod CD-a i UC-a, A2FB IgG4 pada u usporedbi sa zdravim kontrolama (Tablice 3.1.1-3.1.3). A2B je bio niži kod UC-a naspram HC-a, u svim potklasama dok su IgG1 i IgG23 A2B bili viši kod CD-a naspram UC-a. Rezultati za individualne IgG glikoforme su prikazani u Tablicama 3.1.5-3.1.7, i na Slici 3.1.2.<sup>225</sup>

**Tablica 3.1.5** Povezanost IgG Fc-glikana i UC-a. Razlike između HC-a i UC-a (HC=0, UC=1), analizirane su logističkom regresijom uz dob i spol kao dodatne kovarijate. Prikazani su omjeri izgleda (OR) uz interval pouzdanosti (CI) od 95 %, P vrijednosti te prilagođene P vrijednosti (pril. P vrijednost) nakon korekcije na višestruko testiranje ( $\alpha=5\%$ ). Prilagođene, statistički značajne P vrijednosti otisnute su masno. Skraćena imena glikana opisana su u tablici 2.3.5.2., prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

| Glikan       | OR   | 95% CI        | P vrijednost | pril. P vrijednost |
|--------------|------|---------------|--------------|--------------------|
| IgG1_G0      | NA   | (NA - NA)     | NA           | NA                 |
| IgG1_G0F     | 1,47 | (1,28 - 1,68) | 4,55E-09     | <b>5,24E-08</b>    |
| IgG1_G0FN    | 0,85 | (0,75 - 0,96) | 8,67E-03     | <b>1,46E-02</b>    |
| IgG1_G1      | 1,04 | (0,92 - 1,17) | 5,35E-01     | 6,15E-01           |
| IgG1_G1F     | 0,76 | (0,67 - 0,86) | 8,80E-06     | <b>3,20E-05</b>    |
| IgG1_G1FN    | 0,68 | (0,60 - 0,77) | 2,03E-10     | <b>3,50E-09</b>    |
| IgG1_G1FS    | 1,08 | (0,96 - 1,21) | 2,19E-01     | 2,80E-01           |
| IgG1_G1N     | 1,02 | (0,91 - 1,15) | 7,33E-01     | 8,02E-01           |
| IgG1_G1S     | 1,17 | (1,04 - 1,32) | 6,98E-03     | <b>1,20E-02</b>    |
| IgG1_G2      | 1,12 | (0,99 - 1,27) | 7,46E-02     | 1,01E-01           |
| IgG1_G2F     | 0,79 | (0,69 - 0,90) | 3,11E-04     | <b>7,41E-04</b>    |
| IgG1_G2FN    | 0,73 | (0,64 - 0,82) | 2,53E-07     | <b>1,45E-06</b>    |
| IgG1_G2FNS   | 0,99 | (0,88 - 1,11) | 8,08E-01     | 8,57E-01           |
| IgG1_G2FS    | 1,01 | (0,89 - 1,15) | 8,87E-01     | 9,14E-01           |
| IgG1_G2FS2   | 0,98 | (0,87 - 1,11) | 7,25E-01     | 8,02E-01           |
| IgG1_G2S     | 1,19 | (1,05 - 1,36) | 5,68E-03     | <b>1,01E-02</b>    |
| IgG1_M5G1S1F | 1,04 | (0,93 - 1,17) | 4,98E-01     | 5,92E-01           |
| IgG23_G0     | 1,42 | (1,24 - 1,63) | 9,62E-08     | <b>6,03E-07</b>    |
| IgG23_G0F    | 1,4  | (1,23 - 1,61) | 5,96E-07     | <b>2,57E-06</b>    |
| IgG23_G0FN   | 0,78 | (0,69 - 0,89) | 2,36E-04     | <b>5,81E-04</b>    |
| IgG23_G1     | 1,46 | (1,27 - 1,67) | 1,05E-08     | <b>9,02E-08</b>    |

|               |      |               |          |                 |
|---------------|------|---------------|----------|-----------------|
| IgG23_G1F     | 0,84 | (0,74 - 0,95) | 4,70E-03 | <b>8,54E-03</b> |
| IgG23_G1FN    | 0,59 | (0,52 - 0,67) | 6,28E-17 | <b>4,33E-15</b> |
| IgG23_G1FNS   | 1,16 | (1,02 - 1,31) | 2,24E-02 | <b>3,55E-02</b> |
| IgG23_G1FS    | 0,78 | (0,69 - 0,88) | 4,78E-05 | <b>1,57E-04</b> |
| IgG23_G2      | 1,18 | (1,04 - 1,34) | 9,43E-03 | <b>1,55E-02</b> |
| IgG23_G2F     | 0,76 | (0,66 - 0,87) | 5,99E-05 | <b>1,80E-04</b> |
| IgG23_G2FN    | 0,61 | (0,53 - 0,70) | 6,59E-14 | <b>2,27E-12</b> |
| IgG23_G2FNS   | 0,87 | (0,77 - 0,98) | 2,27E-02 | <b>3,55E-02</b> |
| IgG23_G2FS    | 0,88 | (0,77 - 1,00) | 5,49E-02 | 7,73E-02        |
| IgG23_G2FS2   | 0,88 | (0,78 - 1,00) | 5,39E-02 | 7,73E-02        |
| IgG23_G2S     | 1,24 | (1,09 - 1,42) | 9,49E-04 | <b>1,99E-03</b> |
| IgG23_M5G1S1F | 1,28 | (1,12 - 1,46) | 1,61E-04 | <b>4,11E-04</b> |
| IgG4_G0F      | 1,45 | (1,26 - 1,66) | 4,35E-08 | <b>3,00E-07</b> |
| IgG4_G0FN     | 0,93 | (0,82 - 1,05) | 2,55E-01 | 3,21E-01        |
| IgG4_G1F      | 0,76 | (0,67 - 0,87) | 5,64E-05 | <b>1,77E-04</b> |
| IgG4_G1FN     | 0,73 | (0,64 - 0,82) | 4,44E-07 | <b>2,19E-06</b> |
| IgG4_G1FNS    | 0,74 | (0,65 - 0,83) | 5,93E-07 | <b>2,57E-06</b> |
| IgG4_G1FS     | 0,99 | (0,88 - 1,12) | 9,23E-01 | 9,23E-01        |
| IgG4_G2F      | 0,82 | (0,72 - 0,94) | 3,52E-03 | <b>6,74E-03</b> |
| IgG4_G2FN     | 0,8  | (0,70 - 0,90) | 3,88E-04 | <b>8,63E-04</b> |
| IgG4_G2FNS    | 0,95 | (0,84 - 1,07) | 4,10E-01 | 4,99E-01        |
| IgG4_G2FS     | 1,01 | (0,89 - 1,16) | 8,27E-01 | 8,64E-01        |
| IgG4_G2FS2    | 1,14 | (1,00 - 1,29) | 4,75E-02 | 6,98E-02        |

**Tablica 3.1.6** Povezanost IgG Fc-glikana i CD-a. Razlike između HC-a i CD-a (HC=0, CD=1), analizirane su logističkom regresijom uz dob i spol kao dodatne kovarijate. Prikazani su omjeri izgleda (OR) uz interval pouzdanosti (CI) od 95 %, P vrijednosti te prilagođene P vrijednosti (pril. P vrijednost) nakon korekcije na višestruko testiranje ( $\alpha=5\%$ ). Prilagođene, statistički značajne P vrijednosti otisnute su masno. Skraćena imena glikana opisana su u tablici 2.3.5.2., prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

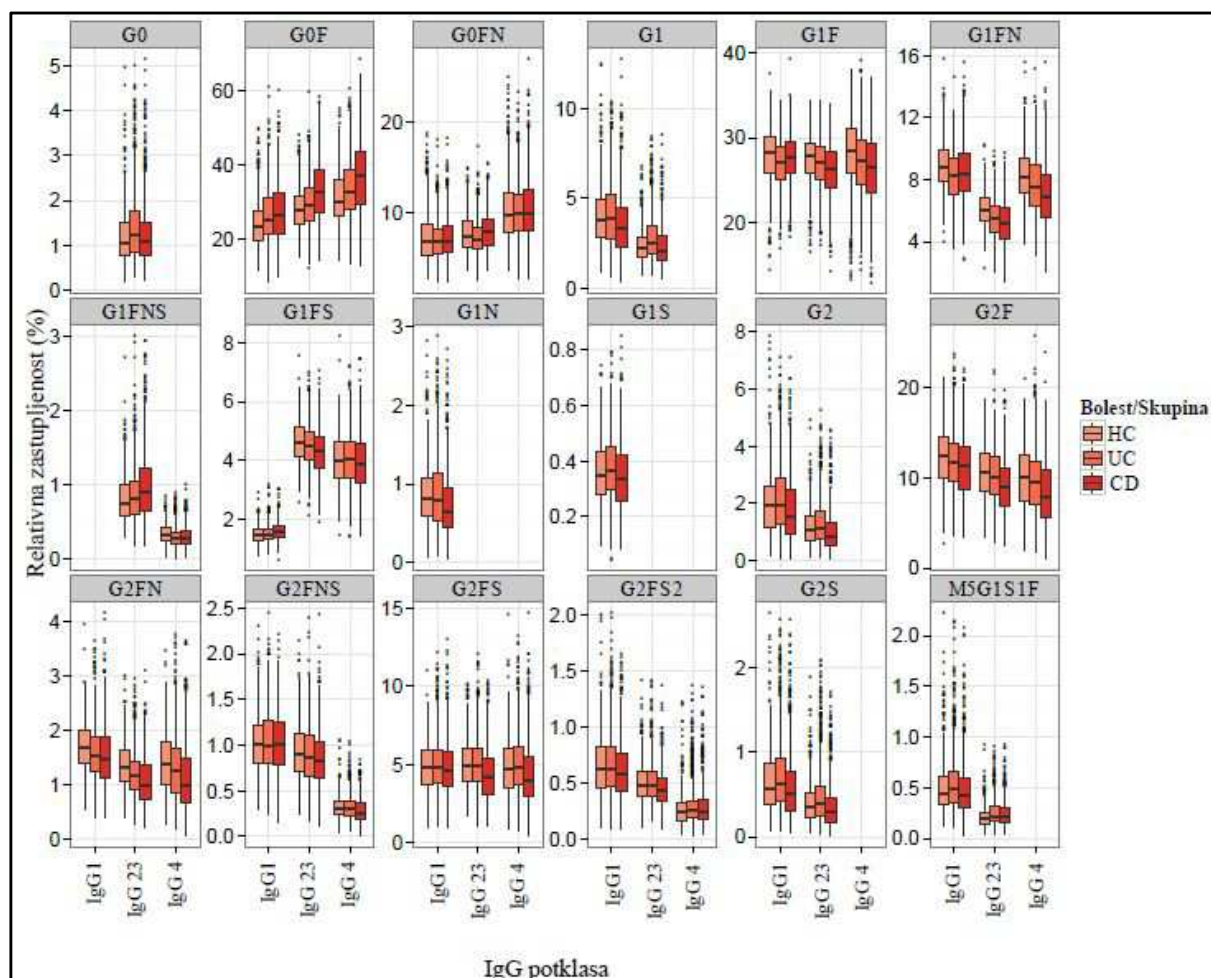
| Glikan    | OR   | 95% CI        | P vrijednost | pril. P vrijednost |
|-----------|------|---------------|--------------|--------------------|
| IgG1_G0   | NA   | (NA - NA)     | NA           | NA                 |
| IgG1_G0F  | 1,86 | (1,60 - 2,17) | 1,43E-17     | <b>4,94E-17</b>    |
| IgG1_G0FN | 1,14 | (1,00 - 1,31) | 5,47E-02     | 5,90E-02           |
| IgG1_G1   | 0,8  | (0,70 - 0,90) | 2,86E-04     | <b>4,40E-04</b>    |
| IgG1_G1F  | 0,78 | (0,68 - 0,89) | 2,76E-04     | <b>4,40E-04</b>    |
| IgG1_G1FN | 0,87 | (0,77 - 0,99) | 3,50E-02     | <b>3,90E-02</b>    |
| IgG1_G1FS | 1,41 | (1,23 - 1,61) | 2,01E-07     | <b>3,86E-07</b>    |
| IgG1_G1N  | 0,82 | (0,72 - 0,93) | 1,56E-03     | <b>2,03E-03</b>    |
| IgG1_G1S  | 0,86 | (0,76 - 0,97) | 1,75E-02     | <b>2,04E-02</b>    |
| IgG1_G2   | 0,79 | (0,69 - 0,90) | 2,90E-04     | <b>4,40E-04</b>    |
| IgG1_G2F  | 0,56 | (0,48 - 0,65) | 1,56E-15     | <b>4,68E-15</b>    |

|               |      |               |          |                 |
|---------------|------|---------------|----------|-----------------|
| IgG1_G2FN     | 0,66 | (0,57 - 0,75) | 3,61E-10 | <b>8,31E-10</b> |
| IgG1_G2FNS    | 0,88 | (0,78 - 1,00) | 4,64E-02 | 5,08E-02        |
| IgG1_G2FS     | 0,78 | (0,68 - 0,89) | 2,93E-04 | <b>4,40E-04</b> |
| IgG1_G2FS2    | 0,71 | (0,63 - 0,81) | 3,88E-07 | <b>7,23E-07</b> |
| IgG1_G2S      | 0,84 | (0,74 - 0,96) | 8,34E-03 | <b>1,03E-02</b> |
| IgG1_M5G1S1F  | 0,81 | (0,72 - 0,92) | 7,19E-04 | <b>1,01E-03</b> |
| IgG23_G0      | 1,17 | (1,03 - 1,34) | 1,40E-02 | <b>1,66E-02</b> |
| IgG23_G0F     | 2,86 | (2,39 - 3,42) | 3,67E-39 | <b>2,53E-37</b> |
| IgG23_G0FN    | 1,51 | (1,30 - 1,74) | 1,15E-08 | <b>2,48E-08</b> |
| IgG23_G1      | 0,91 | (0,81 - 1,03) | 1,42E-01 | 1,47E-01        |
| IgG23_G1F     | 0,53 | (0,46 - 0,62) | 7,36E-19 | <b>2,99E-18</b> |
| IgG23_G1FN    | 0,51 | (0,44 - 0,59) | 1,84E-21 | <b>9,77E-21</b> |
| IgG23_G1FNS   | 1,76 | (1,51 - 2,05) | 9,19E-15 | <b>2,54E-14</b> |
| IgG23_G1FS    | 0,57 | (0,50 - 0,66) | 7,02E-17 | <b>2,20E-16</b> |
| IgG23_G2      | 0,76 | (0,67 - 0,86) | 1,26E-05 | <b>2,11E-05</b> |
| IgG23_G2F     | 0,42 | (0,35 - 0,49) | 1,52E-30 | <b>1,55E-29</b> |
| IgG23_G2FN    | 0,43 | (0,37 - 0,50) | 1,57E-30 | <b>1,55E-29</b> |
| IgG23_G2FNS   | 0,74 | (0,65 - 0,84) | 2,89E-06 | <b>5,12E-06</b> |
| IgG23_G2FS    | 0,51 | (0,44 - 0,59) | 3,63E-21 | <b>1,79E-20</b> |
| IgG23_G2FS2   | 0,61 | (0,53 - 0,70) | 1,01E-13 | <b>2,68E-13</b> |
| IgG23_G2S     | 0,84 | (0,74 - 0,95) | 6,70E-03 | <b>8,56E-03</b> |
| IgG23_M5G1S1F | 1,17 | (1,02 - 1,33) | 2,29E-02 | <b>2,63E-02</b> |
| IgG4_G0F      | 2,46 | (2,07 - 2,92) | 1,88E-30 | <b>1,62E-29</b> |
| IgG4_G0FN     | 1,26 | (1,09 - 1,44) | 1,23E-03 | <b>1,70E-03</b> |
| IgG4_G1F      | 0,52 | (0,45 - 0,61) | 8,43E-19 | <b>3,23E-18</b> |
| IgG4_G1FN     | 0,56 | (0,49 - 0,66) | 3,32E-15 | <b>9,55E-15</b> |
| IgG4_G1FNS    | 0,79 | (0,70 - 0,90) | 3,49E-04 | <b>5,01E-04</b> |
| IgG4_G1FS     | 0,81 | (0,71 - 0,92) | 1,37E-03 | <b>1,85E-03</b> |
| IgG4_G2F      | 0,49 | (0,42 - 0,57) | 1,15E-22 | <b>7,23E-22</b> |
| IgG4_G2FN     | 0,55 | (0,47 - 0,63) | 3,35E-17 | <b>1,10E-16</b> |
| IgG4_G2FNS    | 0,75 | (0,65 - 0,85) | 1,14E-05 | <b>1,96E-05</b> |
| IgG4_G2FS     | 0,65 | (0,57 - 0,75) | 9,50E-10 | <b>2,11E-09</b> |
| IgG4_G2FS2    | 1,06 | (0,93 - 1,21) | 3,78E-01 | 3,78E-01        |

**Tablica 3.1.7** Razlike u IgG Fc-glikanima između UC-a i CD-a. Razlike između UC-a i CD-a (UC=0, CD=1), analizirane su logističkom regresijom uz dob i spol kao dodatne kovarijate. Prikazani su omjeri izgleda (OR) uz interval pouzdanosti (CI) od 95 %, P vrijednosti te prilagođene P vrijednosti (pril. P vrijednost) nakon korekcije na višestruko testiranje ( $\alpha=5\%$ ). Prilagođene, statistički značajne P vrijednosti otisnute su masno. Skraćena imena glikana opisana su u tablici 2.3.5.2, prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

| Glikan        | OR   | 95% CI        | P vrijednost | pril. P vrijednost |
|---------------|------|---------------|--------------|--------------------|
| IgG1_G0       | NA   | (NA - NA)     | NA           | NA                 |
| IgG1_G0F      | 1,19 | (1,08 - 1,32) | 4,28E-04     | <b>5,18E-04</b>    |
| IgG1_G0FN     | 1,27 | (1,14 - 1,40) | 4,40E-06     | <b>6,32E-06</b>    |
| IgG1_G1       | 0,77 | (0,69 - 0,85) | 9,46E-08     | <b>1,65E-07</b>    |
| IgG1_G1F      | 1,15 | (1,04 - 1,27) | 4,99E-03     | <b>5,73E-03</b>    |
| IgG1_G1FN     | 1,23 | (1,11 - 1,35) | 3,92E-05     | <b>5,13E-05</b>    |
| IgG1_G1FS     | 1,27 | (1,16 - 1,40) | 4,42E-07     | <b>6,98E-07</b>    |
| IgG1_G1N      | 0,79 | (0,71 - 0,87) | 3,65E-06     | <b>5,36E-06</b>    |
| IgG1_G1S      | 0,75 | (0,69 - 0,83) | 5,53E-09     | <b>1,09E-08</b>    |
| IgG1_G2       | 0,7  | (0,64 - 0,78) | 4,21E-12     | <b>1,00E-11</b>    |
| IgG1_G2F      | 0,74 | (0,67 - 0,83) | 1,70E-08     | <b>3,10E-08</b>    |
| IgG1_G2FN     | 0,89 | (0,81 - 0,99) | 2,61E-02     | <b>2,95E-02</b>    |
| IgG1_G2FNS    | 0,93 | (0,85 - 1,02) | 1,32E-01     | 1,42E-01           |
| IgG1_G2FS     | 0,79 | (0,71 - 0,88) | 4,88E-06     | <b>6,87E-06</b>    |
| IgG1_G2FS2    | 0,75 | (0,67 - 0,83) | 9,20E-09     | <b>1,72E-08</b>    |
| IgG1_G2S      | 0,71 | (0,64 - 0,79) | 3,59E-11     | <b>7,98E-11</b>    |
| IgG1_M5G1S1F  | 0,78 | (0,70 - 0,86) | 4,45E-07     | <b>6,98E-07</b>    |
| IgG23_G0      | 0,82 | (0,74 - 0,91) | 7,85E-05     | <b>9,68E-05</b>    |
| IgG23_G0F     | 1,99 | (1,78 - 2,24) | 1,34E-36     | <b>2,30E-35</b>    |
| IgG23_G0FN    | 1,87 | (1,67 - 2,09) | 2,53E-30     | <b>2,91E-29</b>    |
| IgG23_G1      | 0,63 | (0,56 - 0,70) | 8,03E-20     | <b>3,46E-19</b>    |
| IgG23_G1F     | 0,68 | (0,62 - 0,76) | 3,72E-14     | <b>1,07E-13</b>    |
| IgG23_G1FN    | 0,81 | (0,73 - 0,89) | 2,45E-05     | <b>3,32E-05</b>    |
| IgG23_G1FNS   | 1,47 | (1,33 - 1,63) | 9,70E-15     | <b>2,91E-14</b>    |
| IgG23_G1FS    | 0,72 | (0,65 - 0,79) | 2,46E-11     | <b>5,65E-11</b>    |
| IgG23_G2      | 0,63 | (0,56 - 0,70) | 2,67E-19     | <b>1,08E-18</b>    |
| IgG23_G2F     | 0,54 | (0,48 - 0,61) | 9,37E-28     | <b>9,23E-27</b>    |
| IgG23_G2FN    | 0,67 | (0,60 - 0,75) | 1,37E-13     | <b>3,49E-13</b>    |
| IgG23_G2FNS   | 0,86 | (0,78 - 0,95) | 1,69E-03     | <b>1,98E-03</b>    |
| IgG23_G2FS    | 0,55 | (0,50 - 0,62) | 6,09E-27     | <b>5,25E-26</b>    |
| IgG23_G2FS2   | 0,68 | (0,61 - 0,75) | 8,45E-14     | <b>2,24E-13</b>    |
| IgG23_G2S     | 0,66 | (0,59 - 0,74) | 1,38E-15     | <b>4,75E-15</b>    |
| IgG23_M5G1S1F | 0,9  | (0,82 - 0,99) | 3,26E-02     | <b>3,57E-02</b>    |
| IgG4_G0F      | 1,63 | (1,47 - 1,81) | 7,49E-21     | <b>3,69E-20</b>    |
| IgG4_G0FN     | 1,26 | (1,13 - 1,39) | 1,03E-05     | <b>1,42E-05</b>    |
| IgG4_G1F      | 0,72 | (0,65 - 0,79) | 7,97E-11     | <b>1,67E-10</b>    |

|                   |      |               |          |                 |
|-------------------|------|---------------|----------|-----------------|
| <b>IgG4_G1FN</b>  | 0,76 | (0,68 - 0,84) | 9,58E-08 | <b>1,65E-07</b> |
| <b>IgG4_G1FNS</b> | 1,07 | (0,97 - 1,17) | 1,99E-01 | 2,06E-01        |
| <b>IgG4_G1FS</b>  | 0,82 | (0,74 - 0,90) | 5,28E-05 | <b>6,75E-05</b> |
| <b>IgG4_G2F</b>   | 0,6  | (0,53 - 0,67) | 6,83E-22 | <b>4,28E-21</b> |
| <b>IgG4_G2FN</b>  | 0,68 | (0,61 - 0,75) | 2,23E-13 | <b>5,50E-13</b> |
| <b>IgG4_G2FNS</b> | 0,77 | (0,69 - 0,85) | 5,29E-07 | <b>8,11E-07</b> |
| <b>IgG4_G2FS</b>  | 0,63 | (0,56 - 0,70) | 2,30E-18 | <b>8,36E-18</b> |
| <b>IgG4_G2FS2</b> | 0,93 | (0,85 - 1,03) | 1,69E-01 | 1,79E-01        |

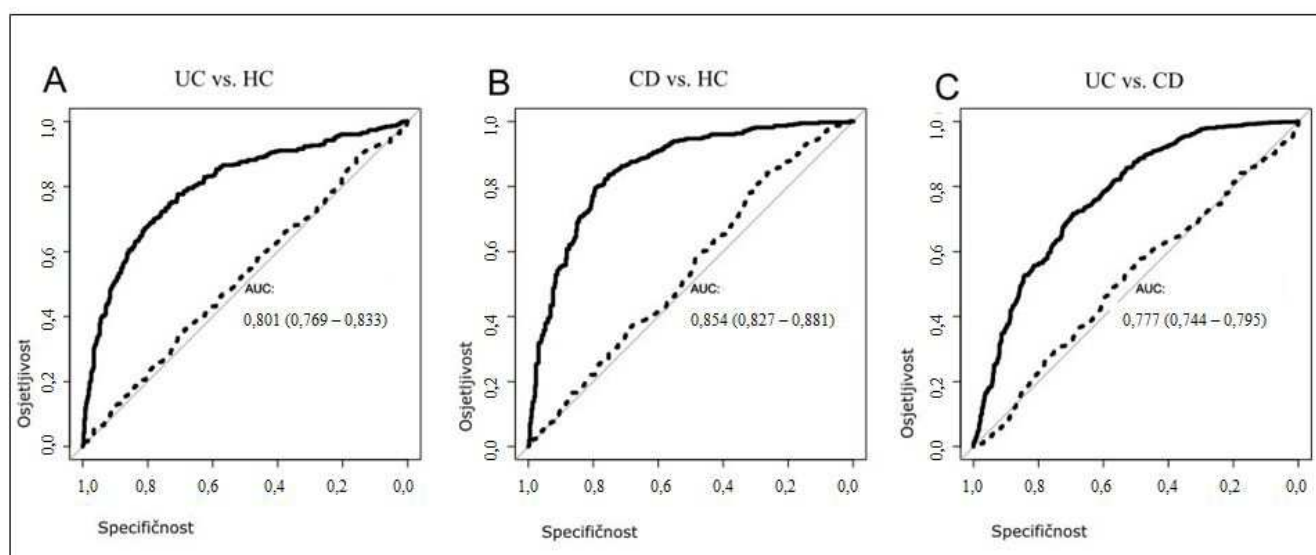


**Slika 3.1.2** Razlike u zastupljenosti pojedinačnih IgG Fc-glikoformi u CD-u, UC-u i HC-u. Razlike u zastupljenosti pojedinačnih IgG Fc-glikoformi po svim potklasama IgG-a (s lijeva na desno IgG1, IgG23, IgG4) prikazane su kao postotci ukupnih Fc-glikana IgG-a po potklasi. Prikazani su dijagrami pravokutnika (eng. *box*) pri čemu svaki predstavlja interkvartilni raspon (eng. *interquartile range*, IQR) od 25.-75. percentila, linije unutar pravokutnika koje predstavljaju medijan te linije koje određuju granice pravokutnika (eng. *whiskers*), a predstavljaju najnižu i najvišu vrijednost unutar pravokutnika  $\pm 1.5 \times$  IQR. Analiza je provedena logističkim regresijskim modelom uz dob i spol kao dodatne kovarijate (tablice 3.1.5-3.1.7), prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>



### 3.2. Klasifikacija pacijenata oboljelih od Crohnove bolesti, ulceroznog kolitisa i kontrolne skupine

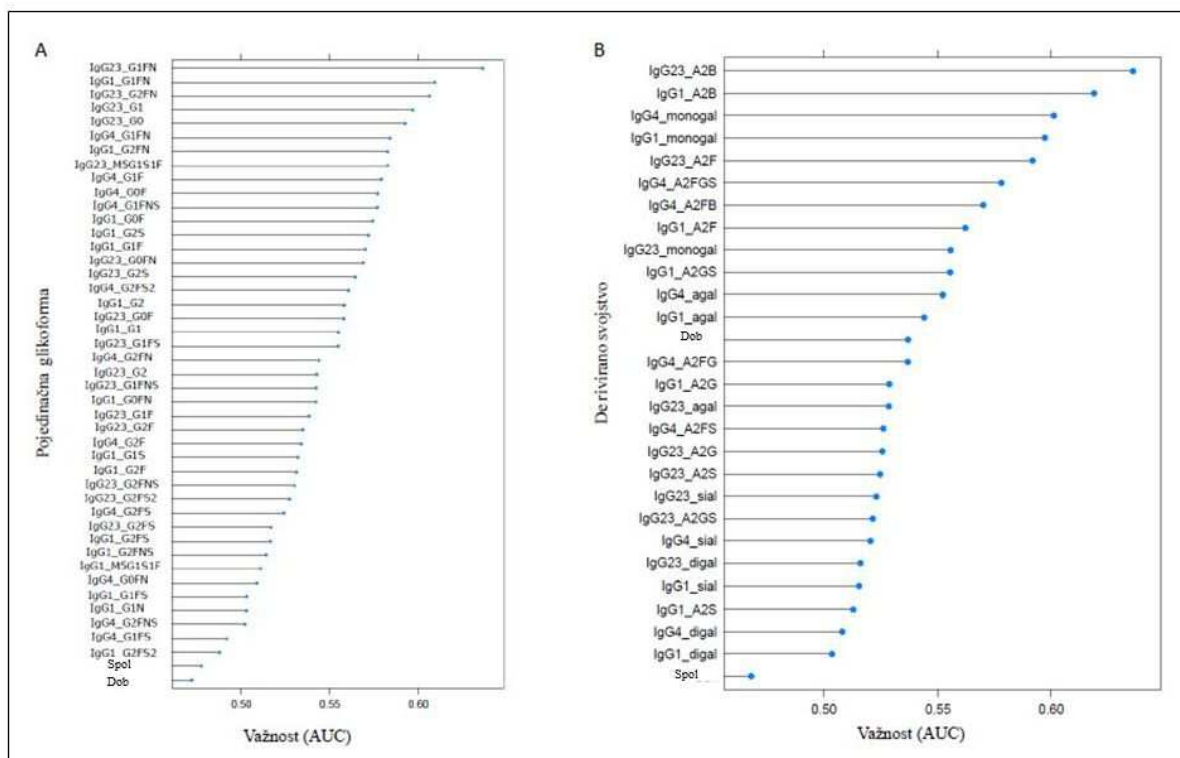
Na temelju snažne povezanosti različitih deriviranih glikozilacijskih svojstava između UC-a i CD-a, procijenjena je diskriminatorsna snaga pojedinačnih glikoformi po potklasi IgG-a u klasificiranju UC-a i HC-a, CD-a i HC-a i UC-a i CD-a. Za navedenu analizu, korišten je logistički regresijski model, a snaga diskriminacije procijenjena je uz 10 postupaka unakrsne validacije. ROC (eng. *receiver operating characteristic curve*) krivulje pokazuju vrlo dobru diskriminatorsnu snagu pojedinačnih glikoformi u klasificiranju UC-a i HC-a (AUC=0,801) (Slika 3.2.1 A) te CD-i i HC-a (AUC=0,854) (Slika 3.2.1 B) te dobru diskriminatorsnu snagu pojedinačnih glikoformi u klasificiranju UC-a i CD-i (AUC=0,770) (Slika 3.2.1 C).<sup>225</sup>



**Slika 3.2.1** Diskriminatorsna snaga pojedinačnih glikoformi po potklasi IgG-a prikazana ROC krivuljama. Klasifikacija UC-a i HC-a (A), CD-a i HC-a (B) te UC-a i CD-a (C) provedena je logističkim regresijskim modelom (elastična mreža). Dok modeli temeljeni samo na dobi i spolu nisu pokazali diskriminatorsnu snagu (točkasta linija), ona je povećana dodatkom pojedinačnih glikoformi (puna linija), prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

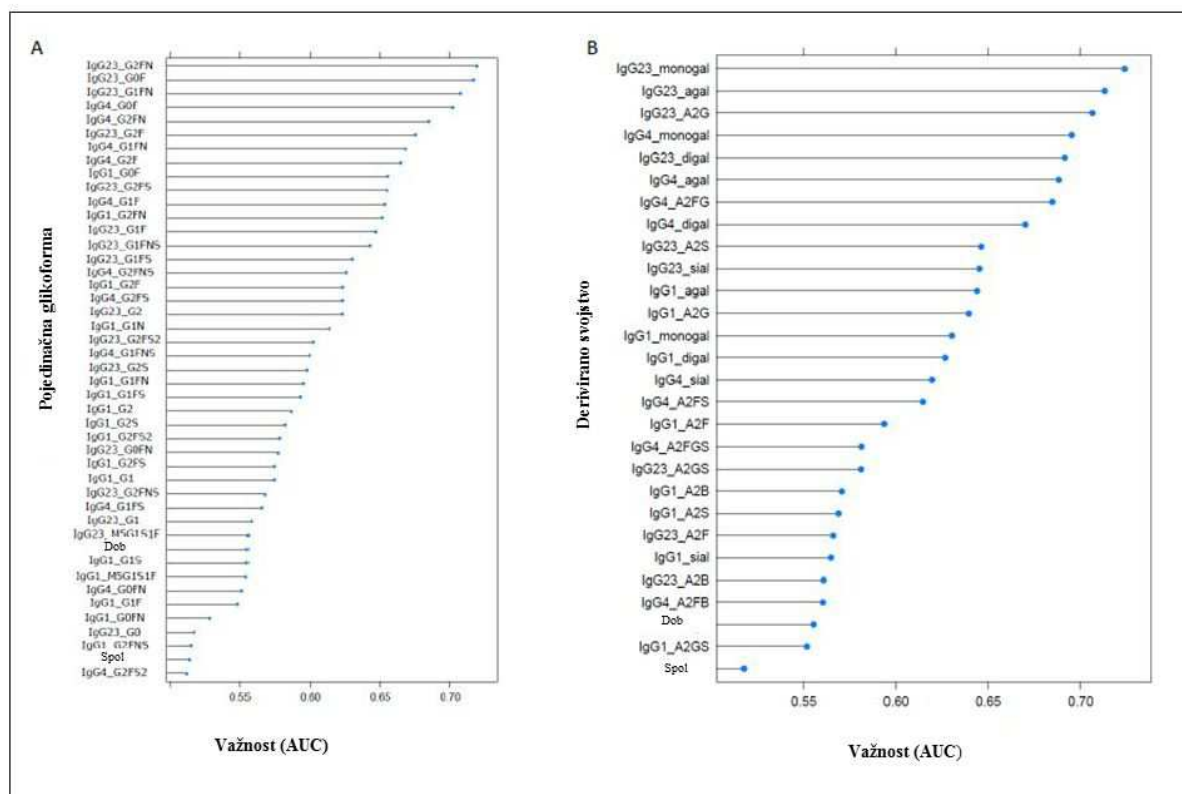
Pojedinačnim ROC analizama po glikoformi i potklasi izdvojene su najvažnije glikoforme u ovim modelima npr. struktura G1 na IgG23 je u 5 najvažnijih kod klasificiranja UC-a i HC-a (Slika 3.2.2 A), struktura G0F na IgG23 i IgG4 je u 5 najvažnijih kod klasificiranja CD-i i HC-a (Slika 3.2.3 A) te G0F, G0FN, G2 i G2F na IgG23 koje su u 5

najvažnijih kod klasificiranja CD-i i UC-a (Slika 3.2.4 A).<sup>225</sup> Navedeno je potvrđeno i analizom s deriviranim svojstvima (Slike 3.2.2-3.2.4 B).<sup>225</sup>

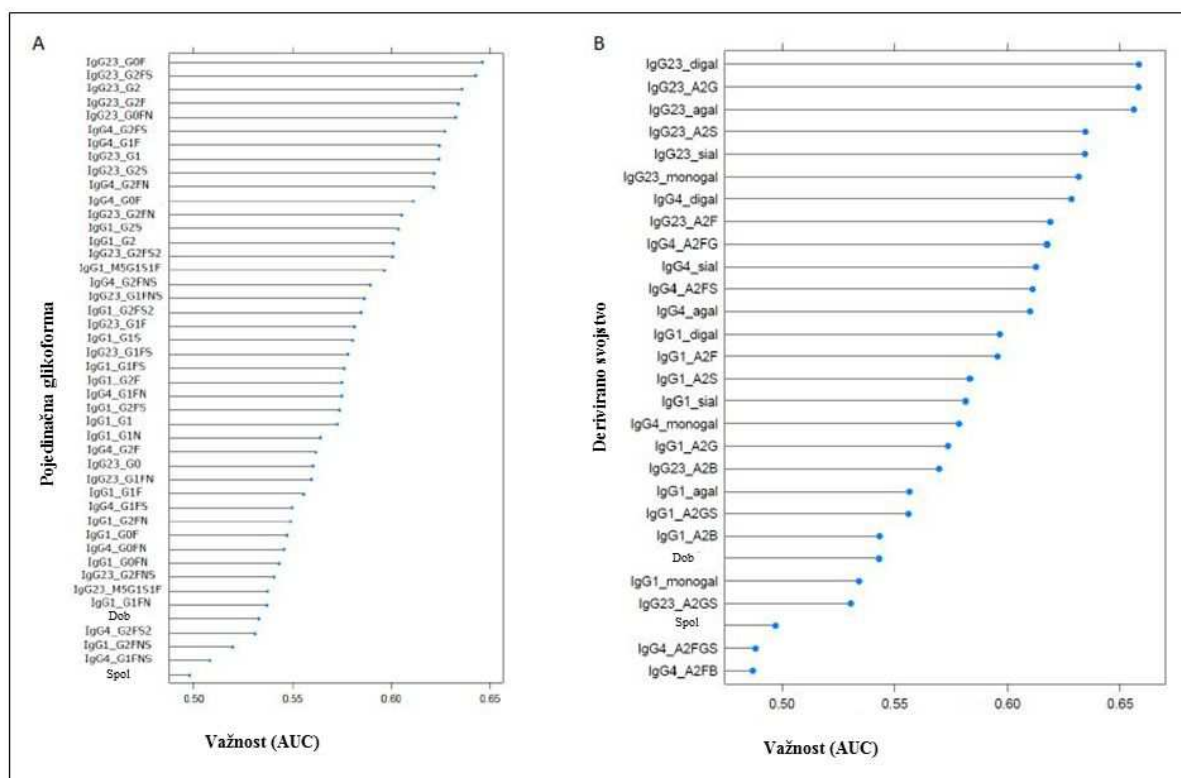


**Slika 3.2.2** Najvažnije glikoforme u klasificiranju UC-a i HC-a. Važnost odražava površinu ispod krivulje (AUC) na temelju (A) pojedinačne glikoforme ili (B) deriviranog svojstva, prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>





**Slika 3.2.3** Najvažnije glikoforme u klasificiranju CD-a i HC-a. Važnost odražava površinu ispod krivulje (AUC) na temelju (A) pojedinačne glikoforme ili (B) deriviranog svojstva, prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>



**Slika 3.2.4** Najvažnije glikoforme u klasificiranju UC-a i CD-a. Važnost odražava površinu ispod krivulje (AUC) na temelju (A) pojedinačne glikoforme ili (B) deriviranog svojstva, prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

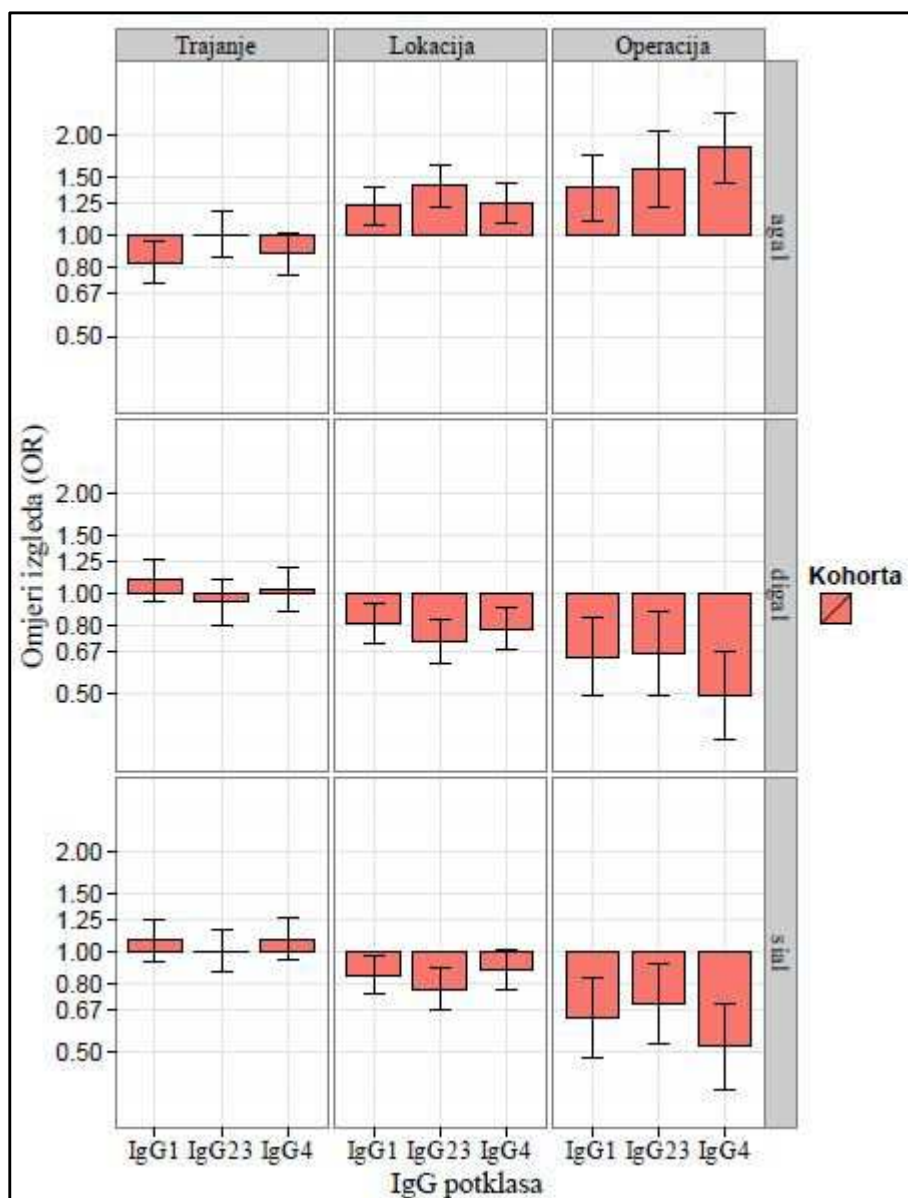
### 3.3. Povezanost Fc-glikozilacije imunoglobulina G i kliničkih obilježja ulceroznog kolitisa

Statistički značajne razlike su zabilježene u kliničkim obilježjima za veći broj deriviranih glikozilacijskih svojstava kod pacijenata oboljelih od UC-a (Tablica 3.3.1, Slika 3.3.1)<sup>225</sup>. S operacijom i UC-om koji zahvaća cijelo debelo crijevo (E3), povezuje se porast agalaktoziliranih i pad digalaktoziliranig IgG glikopeptida. Operacija se povezuje sa smanjenom sijalinizacijom u svim IgG potklasama u UC-u. Agalaktozilirani IgG1 glikopeptidi padaju, a monogalaktozilirani IgG1 glikopeptidi rastu s trajanjem UC-a (Tablica 3.3.1, Slika 3.3.1).<sup>225</sup>

**Tablica 3.3.1** Povezanost deriviranih IgG Fc-glikozilacijskih svojstava i kliničkih obilježja UC-a (trajanje, progresija i operacija). Povezanost deriviranih IgG Fc-glikozilacijskih svojstava i kliničkih obilježja UC-a (trajanje bolesti: <5 godina=0, >5 godina=1, progresija bolesti: E1 (završni dio debelog crijeva) + E2 (lijeva strana debelog crijeva)=0, E3 (cijelo debelo crijevo)=1 te operacija: ne=0, da=1) analizirana je logističkom regresijom uz dob i spol kao kovarijate. Prikazani su omjeri izgleda (OR) uz interval pouzdanosti (CI) od 95 %, P vrijednosti te prilagođene P vrijednosti (pril. P vrijednost) nakon korekcije na višestruko testiranje ( $\alpha=5\%$ ). Prilagođene, statistički značajne P vrijednosti otisnute su masno. Derivirana glikozilacijska svojstva izračunata su kao što je opisano u tablici 2.3.5.4, prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

| Derivirano svojstvo | Kliničko obilježje | OR   | 95% CI        | P vrijednost | pril. P vrijednost |
|---------------------|--------------------|------|---------------|--------------|--------------------|
| IgG1_A2B            | lokacija           | 1,1  | (0,96 - 1,25) | 1,61E-01     | 2,64E-01           |
| IgG1_A2F            | lokacija           | 0,94 | (0,83 - 1,07) | 3,44E-01     | 4,78E-01           |
| IgG1_A2G            | lokacija           | 0,81 | (0,71 - 0,93) | 2,62E-03     | <b>1,08E-02</b>    |
| IgG1_A2GS           | lokacija           | 0,96 | (0,84 - 1,09) | 5,28E-01     | 6,50E-01           |
| IgG1_A2S            | lokacija           | 0,84 | (0,73 - 0,96) | 9,53E-03     | <b>2,63E-02</b>    |
| IgG1_agal           | lokacija           | 1,23 | (1,08 - 1,41) | 2,09E-03     | <b>8,91E-03</b>    |
| IgG1_digal          | lokacija           | 0,82 | (0,71 - 0,94) | 4,89E-03     | <b>1,63E-02</b>    |
| IgG1_monogal        | lokacija           | 0,87 | (0,77 - 0,99) | 3,48E-02     | 8,09E-02           |
| IgG1_sial           | lokacija           | 0,86 | (0,75 - 0,98) | 2,36E-02     | 5,97E-02           |
| IgG23_A2B           | lokacija           | 1,03 | (0,91 - 1,18) | 6,13E-01     | 7,27E-01           |
| IgG23_A2F           | lokacija           | 0,89 | (0,79 - 1,02) | 8,56E-02     | 1,55E-01           |
| IgG23_A2G           | lokacija           | 0,71 | (0,61 - 0,83) | 7,80E-06     | <b>1,47E-04</b>    |
| IgG23_A2GS          | lokacija           | 0,97 | (0,85 - 1,10) | 6,11E-01     | 7,27E-01           |
| IgG23_A2S           | lokacija           | 0,76 | (0,66 - 0,88) | 1,46E-04     | <b>1,38E-03</b>    |
| IgG23_agal          | lokacija           | 1,41 | (1,22 - 1,64) | 3,35E-06     | <b>1,10E-04</b>    |
| IgG23_digal         | lokacija           | 0,72 | (0,62 - 0,84) | 1,45E-05     | <b>2,18E-04</b>    |
| IgG23_monogal       | lokacija           | 0,77 | (0,67 - 0,88) | 1,60E-04     | <b>1,38E-03</b>    |
| IgG23_sial          | lokacija           | 0,77 | (0,67 - 0,89) | 4,15E-04     | <b>2,88E-03</b>    |
| IgG4_A2FB           | lokacija           | 1,1  | (0,96 - 1,26) | 1,75E-01     | 2,78E-01           |
| IgG4_A2FG           | lokacija           | 0,78 | (0,68 - 0,90) | 5,65E-04     | <b>3,44E-03</b>    |
| IgG4_A2FGS          | lokacija           | 1,08 | (0,94 - 1,23) | 2,73E-01     | 3,98E-01           |
| IgG4_A2FS           | lokacija           | 0,87 | (0,76 - 1,00) | 5,46E-02     | 1,08E-01           |
| IgG4_agal           | lokacija           | 1,26 | (1,10 - 1,45) | 9,31E-04     | <b>4,82E-03</b>    |
| IgG4_digal          | lokacija           | 0,79 | (0,68 - 0,91) | 1,03E-03     | <b>4,94E-03</b>    |
| IgG4_monogal        | lokacija           | 0,82 | (0,72 - 0,94) | 4,35E-03     | <b>1,55E-02</b>    |
| IgG4_sial           | lokacija           | 0,88 | (0,77 - 1,02) | 7,88E-02     | 1,47E-01           |
| IgG1_A2B            | trajanje           | 1,1  | (0,96 - 1,26) | 1,81E-01     | 2,86E-01           |
| IgG1_A2F            | trajanje           | 1    | (0,88 - 1,15) | 9,56E-01     | 9,65E-01           |
| IgG1_A2G            | trajanje           | 1,17 | (1,01 - 1,36) | 3,13E-02     | 7,37E-02           |
| IgG1_A2GS           | trajanje           | 0,97 | (0,85 - 1,11) | 6,53E-01     | 7,56E-01           |
| IgG1_A2S            | trajanje           | 1,09 | (0,94 - 1,26) | 2,47E-01     | 3,67E-01           |
| IgG1_agal           | trajanje           | 0,83 | (0,72 - 0,96) | 1,18E-02     | <b>3,18E-02</b>    |
| IgG1_digal          | trajanje           | 1,1  | (0,95 - 1,28) | 2,18E-01     | 3,35E-01           |

|               |           |      |               |          |                 |
|---------------|-----------|------|---------------|----------|-----------------|
| IgG1_monogal  | trajanje  | 1,32 | (1,15 - 1,52) | 5,60E-05 | <b>6,82E-04</b> |
| IgG1_sial     | trajanje  | 1,09 | (0,94 - 1,25) | 2,64E-01 | 3,87E-01        |
| IgG23_A2B     | trajanje  | 1,16 | (1,01 - 1,34) | 4,13E-02 | 9,30E-02        |
| IgG23_A2F     | trajanje  | 1,19 | (1,04 - 1,36) | 1,27E-02 | <b>3,38E-02</b> |
| IgG23_A2G     | trajanje  | 0,98 | (0,83 - 1,14) | 7,59E-01 | 8,35E-01        |
| IgG23_A2GS    | trajanje  | 1,03 | (0,90 - 1,18) | 6,65E-01 | 7,60E-01        |
| IgG23_A2S     | trajanje  | 1,01 | (0,87 - 1,17) | 9,09E-01 | 9,44E-01        |
| IgG23_agal    | trajanje  | 1,01 | (0,87 - 1,18) | 8,89E-01 | 9,44E-01        |
| IgG23_digal   | trajanje  | 0,94 | (0,81 - 1,11) | 4,80E-01 | 6,17E-01        |
| IgG23_monogal | trajanje  | 1,04 | (0,90 - 1,20) | 6,08E-01 | 7,27E-01        |
| IgG23_sial    | trajanje  | 1,01 | (0,87 - 1,17) | 9,18E-01 | 9,45E-01        |
| IgG4_A2FB     | trajanje  | 0,98 | (0,85 - 1,13) | 7,75E-01 | 8,49E-01        |
| IgG4_A2FG     | trajanje  | 1,09 | (0,94 - 1,27) | 2,38E-01 | 3,57E-01        |
| IgG4_A2FGS    | trajanje  | 1,01 | (0,87 - 1,16) | 9,34E-01 | 9,53E-01        |
| IgG4_A2FS     | trajanje  | 1,1  | (0,95 - 1,27) | 2,14E-01 | 3,31E-01        |
| IgG4_agal     | trajanje  | 0,88 | (0,76 - 1,02) | 1,01E-01 | 1,78E-01        |
| IgG4_digal    | trajanje  | 1,04 | (0,89 - 1,21) | 6,33E-01 | 7,45E-01        |
| IgG4_monogal  | trajanje  | 1,18 | (1,03 - 1,37) | 1,95E-02 | 5,12E-02        |
| IgG4_sial     | trajanje  | 1,09 | (0,94 - 1,26) | 2,32E-01 | 3,51E-01        |
| IgG1_A2B      | operacija | 1,51 | (1,20 - 1,92) | 5,41E-04 | <b>3,40E-03</b> |
| IgG1_A2F      | operacija | 1,1  | (0,87 - 1,41) | 4,22E-01 | 5,56E-01        |
| IgG1_A2G      | operacija | 0,69 | (0,54 - 0,89) | 3,66E-03 | <b>1,40E-02</b> |
| IgG1_A2GS     | operacija | 0,72 | (0,56 - 0,93) | 9,34E-03 | <b>2,63E-02</b> |
| IgG1_A2S      | operacija | 0,64 | (0,48 - 0,84) | 8,87E-04 | <b>4,82E-03</b> |
| IgG1_agal     | operacija | 1,39 | (1,10 - 1,75) | 5,86E-03 | <b>1,81E-02</b> |
| IgG1_digal    | operacija | 0,65 | (0,49 - 0,85) | 1,18E-03 | <b>5,56E-03</b> |
| IgG1_monogal  | operacija | 0,91 | (0,72 - 1,14) | 4,18E-01 | 5,56E-01        |
| IgG1_sial     | operacija | 0,64 | (0,49 - 0,84) | 9,84E-04 | <b>4,85E-03</b> |
| IgG23_A2B     | operacija | 1,24 | (0,98 - 1,58) | 7,51E-02 | 1,43E-01        |
| IgG23_A2F     | operacija | 1,37 | (1,03 - 1,81) | 2,06E-02 | 5,34E-02        |
| IgG23_A2G     | operacija | 0,64 | (0,49 - 0,85) | 1,49E-03 | <b>6,86E-03</b> |
| IgG23_A2GS    | operacija | 0,93 | (0,73 - 1,17) | 5,23E-01 | 6,48E-01        |
| IgG23_A2S     | operacija | 0,69 | (0,52 - 0,91) | 6,76E-03 | <b>2,06E-02</b> |
| IgG23_agal    | operacija | 1,59 | (1,23 - 2,06) | 4,82E-04 | <b>3,22E-03</b> |
| IgG23_digal   | operacija | 0,66 | (0,50 - 0,89) | 4,61E-03 | <b>1,59E-02</b> |
| IgG23_monogal | operacija | 0,68 | (0,54 - 0,85) | 9,09E-04 | <b>4,82E-03</b> |
| IgG23_sial    | operacija | 0,7  | (0,53 - 0,92) | 8,75E-03 | <b>2,51E-02</b> |
| IgG4_A2FB     | operacija | 1,41 | (1,11 - 1,80) | 5,61E-03 | <b>1,76E-02</b> |
| IgG4_A2FG     | operacija | 0,52 | (0,40 - 0,68) | 7,66E-07 | <b>7,01E-05</b> |
| IgG4_A2FGS    | operacija | 0,88 | (0,68 - 1,13) | 2,98E-01 | 4,26E-01        |
| IgG4_A2FS     | operacija | 0,52 | (0,39 - 0,70) | 4,32E-06 | <b>1,10E-04</b> |
| IgG4_agal     | operacija | 1,83 | (1,43 - 2,35) | 1,36E-06 | <b>7,01E-05</b> |
| IgG4_digal    | operacija | 0,5  | (0,37 - 0,67) | 1,72E-06 | <b>7,11E-05</b> |
| IgG4_monogal  | operacija | 0,61 | (0,48 - 0,76) | 2,17E-05 | <b>2,99E-04</b> |
| IgG4_sial     | operacija | 0,52 | (0,39 - 0,70) | 4,77E-06 | <b>1,10E-04</b> |



**Slika 3.3.1** Povezanost deriviranih IgG Fc-glikozilacijskih svojstava i kliničkih obilježja UC-a (trajanje, progresija i operacija). Za sve potklase IgG-a, prikazani su omjeri izgleda (OR) za povezanost deriviranih glikozilacijskih svojstava i kliničkih obilježja UC-a (trajanje bolesti: <5 godina=0, >5 godina=1, progresija bolesti: E1 (završni dio debelog crijeva) + E2 (lijeva strana debelog crijeva)=0, E3 (cijelo debelo crijevo)=1 te operacija: ne=0, da=1). Stupci (eng. bar) prikazuju pozitivne/negativne OR-ove. Derivirana glikozilacijska svojstva: agalaktozilacija (agal, udio agalaktoziliranih glkana), digalaktozilacija (dikal, udio digalaktoziliranih glkana) i sijalinizacija (sial, udio sijaliniziranih glkana) opisana su u tablicama 2.3.5.3–2.3.5.4, a njihove glikoforme u tablici 3.1.1. Analiza povezanosti deriviranih glikozilacijskih svojstava i kliničkih obilježja UC-a provedena je logističkom regresijom uz dob i spol kao dodatne kovarijate. Statistički značajni rezultati označeni su zvjezdicom (\*) (tablica 3.3.1), prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

Rezultati za pojedinačne IgG glikoforme su prikazani u tablici 3.3.2.<sup>225</sup>

**Tablica 3.3.2** Povezanost IgG Fc-glikana i klinčkih obilježja UC-a (trajanje, progresija i operacija). Povezanost IgG Fc-glikana i klinčkih obilježja UC-a (trajanje bolesti: <5 godina=0, >5 godina=1, progresija bolesti: E1 (završni dio debelog crijeva) + E2 (lijeva strana debelog crijeva)=0, E3 (cijelo debelo crijevo)=1 te operacija: ne=0, da=1) analizirana je logističkom regresijom uz dob i spol kao kovarijate. Prikazani su omjeri izgleda (OR) uz interval pouzdanosti (CI) od 95 %, P vrijednosti te prilagođene P vrijednosti (pril. P vrijednost) nakon korekcije na višestruko testiranje ( $\alpha=5\%$ ). Prilagođene, statistički značajne P vrijednosti otisnute su masno. Skraćena imena glikana opisana su u tablici 2.3.5.2, prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

| Glikan        | Kliničko obilježje | OR   | 95% CI        | P vrijednost | pril. P vrijednost |
|---------------|--------------------|------|---------------|--------------|--------------------|
| IgG1_G0       | lokacija           | NA   | (NA - NA)     | NA           | NA                 |
| IgG1_G0F      | lokacija           | 1,21 | (1,06 - 1,38) | 4,72E-03     | <b>1,60E-02</b>    |
| IgG1_G0FN     | lokacija           | 1,22 | (1,07 - 1,40) | 3,83E-03     | <b>1,41E-02</b>    |
| IgG1_G1       | lokacija           | 1,09 | (0,96 - 1,24) | 1,88E-01     | 2,94E-01           |
| IgG1_G1F      | lokacija           | 0,77 | (0,68 - 0,88) | 7,16E-05     | <b>8,23E-04</b>    |
| IgG1_G1FN     | lokacija           | 1    | (0,88 - 1,13) | 9,72E-01     | 9,77E-01           |
| IgG1_G1FS     | lokacija           | 0,99 | (0,87 - 1,13) | 9,04E-01     | 9,44E-01           |
| IgG1_G1N      | lokacija           | 1,1  | (0,96 - 1,25) | 1,63E-01     | 2,66E-01           |
| IgG1_G1S      | lokacija           | 1,07 | (0,94 - 1,21) | 2,91E-01     | 4,22E-01           |
| IgG1_G2       | lokacija           | 1,03 | (0,90 - 1,17) | 6,94E-01     | 7,68E-01           |
| IgG1_G2F      | lokacija           | 0,79 | (0,68 - 0,90) | 6,99E-04     | <b>4,14E-03</b>    |
| IgG1_G2FN     | lokacija           | 0,89 | (0,78 - 1,01) | 7,77E-02     | 1,46E-01           |
| IgG1_G2FNS    | lokacija           | 0,85 | (0,74 - 0,96) | 9,54E-03     | <b>2,63E-02</b>    |
| IgG1_G2FS     | lokacija           | 0,82 | (0,72 - 0,95) | 5,59E-03     | <b>1,76E-02</b>    |
| IgG1_G2FS2    | lokacija           | 0,82 | (0,72 - 0,94) | 3,79E-03     | <b>1,41E-02</b>    |
| IgG1_G2S      | lokacija           | 1,03 | (0,91 - 1,18) | 6,15E-01     | 7,27E-01           |
| IgG1_M5G1S1F  | lokacija           | 0,89 | (0,78 - 1,01) | 6,62E-02     | 1,28E-01           |
| IgG23_G0      | lokacija           | 1,21 | (1,06 - 1,38) | 4,56E-03     | <b>1,59E-02</b>    |
| IgG23_G0F     | lokacija           | 1,32 | (1,14 - 1,52) | 1,28E-04     | <b>1,26E-03</b>    |
| IgG23_G0FN    | lokacija           | 1,29 | (1,11 - 1,49) | 5,01E-04     | <b>3,24E-03</b>    |
| IgG23_G1      | lokacija           | 1,12 | (0,99 - 1,28) | 7,31E-02     | 1,40E-01           |
| IgG23_G1F     | lokacija           | 0,79 | (0,69 - 0,90) | 4,17E-04     | <b>2,88E-03</b>    |
| IgG23_G1FN    | lokacija           | 0,9  | (0,79 - 1,03) | 1,36E-01     | 2,28E-01           |
| IgG23_G1FNS   | lokacija           | 1,02 | (0,89 - 1,16) | 8,16E-01     | 8,84E-01           |
| IgG23_G1FS    | lokacija           | 0,86 | (0,76 - 0,98) | 2,58E-02     | 6,33E-02           |
| IgG23_G2      | lokacija           | 1,05 | (0,92 - 1,19) | 4,97E-01     | 6,23E-01           |
| IgG23_G2F     | lokacija           | 0,72 | (0,62 - 0,84) | 1,47E-05     | <b>2,18E-04</b>    |
| IgG23_G2FN    | lokacija           | 0,81 | (0,70 - 0,93) | 2,66E-03     | <b>1,08E-02</b>    |
| IgG23_G2FNS   | lokacija           | 0,77 | (0,67 - 0,88) | 7,65E-05     | <b>8,33E-04</b>    |
| IgG23_G2FS    | lokacija           | 0,78 | (0,68 - 0,91) | 8,21E-04     | <b>4,59E-03</b>    |
| IgG23_G2FS2   | lokacija           | 0,72 | (0,62 - 0,83) | 4,18E-06     | <b>1,10E-04</b>    |
| IgG23_G2S     | lokacija           | 1,05 | (0,92 - 1,19) | 4,90E-01     | 6,22E-01           |
| IgG23_M5G1S1F | lokacija           | 1,09 | (0,96 - 1,25) | 1,70E-01     | 2,73E-01           |
| IgG4_G0F      | lokacija           | 1,26 | (1,10 - 1,45) | 7,66E-04     | <b>4,41E-03</b>    |

|               |          |      |               |          |                 |
|---------------|----------|------|---------------|----------|-----------------|
| IgG4_G0FN     | lokacija | 1,15 | (1,00 - 1,31) | 4,97E-02 | 1,04E-01        |
| IgG4_G1F      | lokacija | 0,78 | (0,68 - 0,89) | 2,91E-04 | <b>2,31E-03</b> |
| IgG4_G1FN     | lokacija | 0,97 | (0,85 - 1,11) | 6,93E-01 | 7,68E-01        |
| IgG4_G1FNS    | lokacija | 1,05 | (0,92 - 1,19) | 4,85E-01 | 6,20E-01        |
| IgG4_G1FS     | lokacija | 0,96 | (0,84 - 1,09) | 5,19E-01 | 6,48E-01        |
| IgG4_G2F      | lokacija | 0,75 | (0,65 - 0,87) | 8,54E-05 | <b>8,84E-04</b> |
| IgG4_G2FN     | lokacija | 0,87 | (0,76 - 1,00) | 5,44E-02 | 1,08E-01        |
| IgG4_G2FNS    | lokacija | 0,99 | (0,87 - 1,14) | 9,12E-01 | 9,44E-01        |
| IgG4_G2FS     | lokacija | 0,85 | (0,74 - 0,98) | 2,80E-02 | 6,66E-02        |
| IgG4_G2FS2    | lokacija | 0,9  | (0,79 - 1,03) | 1,26E-01 | 2,15E-01        |
| IgG1_G0       | trajanje | NA   | (NA - NA)     | NA       | NA              |
| IgG1_G0F      | trajanje | 0,83 | (0,72 - 0,95) | 8,60E-03 | <b>2,51E-02</b> |
| IgG1_G0FN     | trajanje | 0,92 | (0,80 - 1,06) | 2,55E-01 | 3,77E-01        |
| IgG1_G1       | trajanje | 0,97 | (0,85 - 1,11) | 6,89E-01 | 7,68E-01        |
| IgG1_G1F      | trajanje | 1,3  | (1,13 - 1,50) | 1,60E-04 | <b>1,38E-03</b> |
| IgG1_G1FN     | trajanje | 1,24 | (1,08 - 1,42) | 2,11E-03 | <b>8,91E-03</b> |
| IgG1_G1FS     | trajanje | 1,05 | (0,92 - 1,20) | 4,40E-01 | 5,73E-01        |
| IgG1_G1N      | trajanje | 1,06 | (0,93 - 1,21) | 3,98E-01 | 5,36E-01        |
| IgG1_G1S      | trajanje | 1,04 | (0,91 - 1,19) | 5,59E-01 | 6,81E-01        |
| IgG1_G2       | trajanje | 1    | (0,87 - 1,15) | 9,91E-01 | 9,91E-01        |
| IgG1_G2F      | trajanje | 1,11 | (0,96 - 1,29) | 1,65E-01 | 2,67E-01        |
| IgG1_G2FN     | trajanje | 1,12 | (0,97 - 1,29) | 1,07E-01 | 1,86E-01        |
| IgG1_G2FNS    | trajanje | 1,15 | (1,00 - 1,31) | 4,83E-02 | 1,04E-01        |
| IgG1_G2FS     | trajanje | 1,07 | (0,92 - 1,24) | 3,78E-01 | 5,18E-01        |
| IgG1_G2FS2    | trajanje | 1,14 | (0,99 - 1,32) | 6,15E-02 | 1,20E-01        |
| IgG1_G2S      | trajanje | 1,03 | (0,90 - 1,18) | 6,83E-01 | 7,68E-01        |
| IgG1_M5G1S1F  | trajanje | 0,9  | (0,79 - 1,03) | 1,37E-01 | 2,28E-01        |
| IgG23_G0      | trajanje | 0,87 | (0,76 - 1,00) | 5,00E-02 | 1,04E-01        |
| IgG23_G0F     | trajanje | 1    | (0,87 - 1,17) | 9,53E-01 | 9,65E-01        |
| IgG23_G0FN    | trajanje | 1,16 | (1,00 - 1,36) | 5,16E-02 | 1,05E-01        |
| IgG23_G1      | trajanje | 0,82 | (0,71 - 0,94) | 4,06E-03 | <b>1,48E-02</b> |
| IgG23_G1F     | trajanje | 1,13 | (0,98 - 1,30) | 8,97E-02 | 1,61E-01        |
| IgG23_G1FN    | trajanje | 1,12 | (0,97 - 1,30) | 1,06E-01 | 1,86E-01        |
| IgG23_G1FNS   | trajanje | 1,03 | (0,90 - 1,19) | 6,41E-01 | 7,50E-01        |
| IgG23_G1FS    | trajanje | 1,03 | (0,90 - 1,18) | 6,81E-01 | 7,68E-01        |
| IgG23_G2      | trajanje | 0,89 | (0,77 - 1,02) | 9,72E-02 | 1,73E-01        |
| IgG23_G2F     | trajanje | 1,01 | (0,86 - 1,18) | 9,05E-01 | 9,44E-01        |
| IgG23_G2FN    | trajanje | 1,06 | (0,91 - 1,23) | 4,60E-01 | 5,95E-01        |
| IgG23_G2FNS   | trajanje | 1,08 | (0,94 - 1,24) | 2,98E-01 | 4,26E-01        |
| IgG23_G2FS    | trajanje | 1,01 | (0,87 - 1,18) | 8,71E-01 | 9,34E-01        |
| IgG23_G2FS2   | trajanje | 1,07 | (0,92 - 1,23) | 3,95E-01 | 5,35E-01        |
| IgG23_G2S     | trajanje | 0,9  | (0,79 - 1,04) | 1,56E-01 | 2,58E-01        |
| IgG23_M5G1S1F | trajanje | 0,77 | (0,67 - 0,89) | 2,75E-04 | <b>2,28E-03</b> |
| IgG4_G0F      | trajanje | 0,89 | (0,77 - 1,03) | 1,22E-01 | 2,10E-01        |
| IgG4_G0FN     | trajanje | 0,94 | (0,82 - 1,09) | 4,22E-01 | 5,56E-01        |

|               |           |      |               |          |                 |
|---------------|-----------|------|---------------|----------|-----------------|
| IgG4_G1F      | trajanje  | 1,16 | (1,00 - 1,34) | 4,46E-02 | 9,92E-02        |
| IgG4_G1FN     | trajanje  | 1,04 | (0,91 - 1,20) | 5,55E-01 | 6,79E-01        |
| IgG4_G1FNS    | trajanje  | 1,01 | (0,88 - 1,16) | 9,08E-01 | 9,44E-01        |
| IgG4_G1FS     | trajanje  | 1,15 | (1,00 - 1,33) | 4,56E-02 | 9,93E-02        |
| IgG4_G2F      | trajanje  | 1,01 | (0,87 - 1,18) | 8,48E-01 | 9,14E-01        |
| IgG4_G2FN     | trajanje  | 0,99 | (0,86 - 1,14) | 8,78E-01 | 9,36E-01        |
| IgG4_G2FNS    | trajanje  | 1,07 | (0,93 - 1,24) | 3,44E-01 | 4,78E-01        |
| IgG4_G2FS     | trajanje  | 1,02 | (0,88 - 1,18) | 7,98E-01 | 8,69E-01        |
| IgG4_G2FS2    | trajanje  | 1,03 | (0,90 - 1,19) | 6,51E-01 | 7,56E-01        |
| IgG1_G0       | operacija | NA   | (NA - NA)     | NA       | NA              |
| IgG1_G0F      | operacija | 1,26 | (1,00 - 1,59) | 5,05E-02 | 1,04E-01        |
| IgG1_G0FN     | operacija | 1,62 | (1,30 - 2,02) | 2,84E-05 | <b>3,67E-04</b> |
| IgG1_G1       | operacija | 0,93 | (0,73 - 1,19) | 5,69E-01 | 6,89E-01        |
| IgG1_G1F      | operacija | 0,76 | (0,60 - 0,97) | 2,56E-02 | 6,33E-02        |
| IgG1_G1FN     | operacija | 1,28 | (1,01 - 1,62) | 3,67E-02 | 8,43E-02        |
| IgG1_G1FS     | operacija | 0,9  | (0,71 - 1,14) | 3,80E-01 | 5,18E-01        |
| IgG1_G1N      | operacija | 1,05 | (0,84 - 1,33) | 6,63E-01 | 7,60E-01        |
| IgG1_G1S      | operacija | 0,86 | (0,68 - 1,10) | 2,25E-01 | 3,43E-01        |
| IgG1_G2       | operacija | 0,78 | (0,60 - 1,01) | 5,06E-02 | 1,04E-01        |
| IgG1_G2F      | operacija | 0,64 | (0,49 - 0,84) | 9,67E-04 | <b>4,85E-03</b> |
| IgG1_G2FN     | operacija | 0,89 | (0,70 - 1,14) | 3,50E-01 | 4,83E-01        |
| IgG1_G2FNS    | operacija | 0,78 | (0,61 - 1,00) | 4,98E-02 | 1,04E-01        |
| IgG1_G2FS     | operacija | 0,67 | (0,50 - 0,88) | 3,08E-03 | <b>1,23E-02</b> |
| IgG1_G2FS2    | operacija | 0,74 | (0,56 - 0,98) | 2,65E-02 | 6,37E-02        |
| IgG1_G2S      | operacija | 0,77 | (0,59 - 1,01) | 4,53E-02 | 9,93E-02        |
| IgG1_M5G1S1F  | operacija | 0,89 | (0,69 - 1,14) | 3,34E-01 | 4,74E-01        |
| IgG23_G0      | operacija | 0,99 | (0,78 - 1,26) | 9,31E-01 | 9,53E-01        |
| IgG23_G0F     | operacija | 1,42 | (1,11 - 1,82) | 5,62E-03 | <b>1,76E-02</b> |
| IgG23_G0FN    | operacija | 1,56 | (1,23 - 1,97) | 3,59E-04 | <b>2,66E-03</b> |
| IgG23_G1      | operacija | 0,8  | (0,61 - 1,04) | 8,10E-02 | 1,48E-01        |
| IgG23_G1F     | operacija | 0,73 | (0,58 - 0,92) | 8,72E-03 | <b>2,51E-02</b> |
| IgG23_G1FN    | operacija | 0,95 | (0,75 - 1,21) | 6,71E-01 | 7,63E-01        |
| IgG23_G1FNS   | operacija | 1,12 | (0,89 - 1,39) | 3,36E-01 | 4,74E-01        |
| IgG23_G1FS    | operacija | 0,71 | (0,55 - 0,90) | 5,10E-03 | <b>1,68E-02</b> |
| IgG23_G2      | operacija | 0,63 | (0,46 - 0,87) | 1,68E-03 | <b>7,40E-03</b> |
| IgG23_G2F     | operacija | 0,68 | (0,51 - 0,90) | 6,92E-03 | <b>2,08E-02</b> |
| IgG23_G2FN    | operacija | 0,81 | (0,62 - 1,07) | 1,28E-01 | 2,18E-01        |
| IgG23_G2FNS   | operacija | 0,77 | (0,59 - 0,99) | 3,71E-02 | 8,43E-02        |
| IgG23_G2FS    | operacija | 0,7  | (0,53 - 0,93) | 1,18E-02 | <b>3,18E-02</b> |
| IgG23_G2FS2   | operacija | 0,76 | (0,57 - 1,01) | 5,21E-02 | 1,05E-01        |
| IgG23_G2S     | operacija | 0,78 | (0,58 - 1,05) | 7,93E-02 | 1,47E-01        |
| IgG23_M5G1S1F | operacija | 0,92 | (0,71 - 1,18) | 4,93E-01 | 6,22E-01        |
| IgG4_G0F      | operacija | 1,55 | (1,22 - 1,96) | 3,31E-04 | <b>2,54E-03</b> |
| IgG4_G0FN     | operacija | 1,79 | (1,42 - 2,25) | 8,31E-07 | <b>7,01E-05</b> |
| IgG4_G1F      | operacija | 0,57 | (0,45 - 0,73) | 8,62E-06 | <b>1,49E-04</b> |



|                   |                  |      |               |          |                 |
|-------------------|------------------|------|---------------|----------|-----------------|
| <b>IgG4_G1FN</b>  | <b>operacija</b> | 0,91 | (0,71 - 1,16) | 4,38E-01 | 5,73E-01        |
| <b>IgG4_G1FNS</b> | <b>operacija</b> | 0,85 | (0,66 - 1,09) | 1,96E-01 | 3,06E-01        |
| <b>IgG4_G1FS</b>  | <b>operacija</b> | 0,69 | (0,53 - 0,88) | 3,17E-03 | <b>1,24E-02</b> |
| <b>IgG4_G2F</b>   | <b>operacija</b> | 0,49 | (0,37 - 0,67) | 1,28E-06 | <b>7,01E-05</b> |
| <b>IgG4_G2FN</b>  | <b>operacija</b> | 0,65 | (0,49 - 0,86) | 1,53E-03 | <b>6,88E-03</b> |
| <b>IgG4_G2FNS</b> | <b>operacija</b> | 0,73 | (0,55 - 0,97) | 2,24E-02 | 5,73E-02        |
| <b>IgG4_G2FS</b>  | <b>operacija</b> | 0,51 | (0,37 - 0,70) | 7,53E-06 | <b>1,47E-04</b> |
| <b>IgG4_G2FS2</b> | <b>operacija</b> | 0,72 | (0,52 - 0,99) | 2,60E-02 | 6,33E-02        |

### 3.4. Povezanost Fc-glikozilacije imunoglobulina G i kliničkih obilježja Crohnove bolesti

Statistički značajne razlike su zabilježene u kliničkim obilježjima za veći broj deriviranih glikozilacijskih svojstava kod pacijenata oboljelih od CD-a (Tablica 3.4.1, Slika 3.4.1).<sup>225</sup> Kod operacije, IgG23 agalaktozilacija je porasla, a IgG23 digalaktozilacija je pala kod CD pacijenata. IgG23 sijalinizacija je također niža u CD-u. Teži oblik bolesti (Monteral B2+B3 naspram B1) se povezuje s porastom IgG23 agalaktozilacije i padom IgG23 digalaktozilacije (Tablica 3.4.1, Slika 3.4.1).<sup>225</sup>

**Tablica 3.4.1** Povezanost deriviranih IgG Fc-glikozilacijskih svojstava i kliničkih obilježja CD-a (trajanje, lokacija, ponašanje i operacija). Povezanost deriviranih glikozilacijskih svojstava i kliničkih obilježja CD-a (trajanje bolesti: <5 godina=0, >5 godina=1, lokacija bolesti: L1 (terminalni ileum)=0, L2 (debelo crijevo)=1 ili L1=0, L3 (ileum i debelo crijevo)=0 ili L2=0, L3=1, ponašanje bolesti: B1 (upalna CD)=0, B2 (sužavajuća CD) + B3 (perforirajuća CD)=1 te operacija: ne=0, da=1) analizirana je logističkom regresijom uz dob i spol kao kovarijate. Prikazani su omjeri izgleda (OR) uz interval pouzdanosti (CI) od 95 %, P vrijednosti te prilagođene P vrijednosti (pril. P vrijednost) nakon korekcije na višestruko testiranje ( $\alpha=5\%$ ). Prilagođene, statistički značajne P vrijednosti otisnute su masno. Derivirana glikozilacijska svojstva izračunata su kao što je opisano u tablici 2.3.5.4, prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

| Derivirano svojstvo | Kliničko obilježje | OR   | 95% CI        | P vrijednost | pril. P vrijednost |
|---------------------|--------------------|------|---------------|--------------|--------------------|
| <b>IgG1_A2B</b>     | <b>ponašanje</b>   | 1,14 | (0,98 - 1,33) | 8,51E-02     | 2,65E-01           |
| <b>IgG1_A2F</b>     | <b>ponašanje</b>   | 0,97 | (0,84 - 1,13) | 7,24E-01     | 8,35E-01           |
| <b>IgG1_A2G</b>     | <b>ponašanje</b>   | 0,84 | (0,72 - 0,98) | 2,39E-02     | 1,26E-01           |
| <b>IgG1_A2GS</b>    | <b>ponašanje</b>   | 0,82 | (0,70 - 0,95) | 6,65E-03     | 5,83E-02           |
| <b>IgG1_A2S</b>     | <b>ponašanje</b>   | 0,81 | (0,69 - 0,94) | 6,10E-03     | 5,83E-02           |
| <b>IgG1_agal</b>    | <b>ponašanje</b>   | 1,17 | (1,00 - 1,36) | 4,40E-02     | 1,82E-01           |
| <b>IgG1_digal</b>   | <b>ponašanje</b>   | 0,81 | (0,69 - 0,95) | 9,12E-03     | 6,62E-02           |
| <b>IgG1_monogal</b> | <b>ponašanje</b>   | 0,99 | (0,85 - 1,14) | 8,62E-01     | 9,17E-01           |
| <b>IgG1_sial</b>    | <b>ponašanje</b>   | 0,81 | (0,69 - 0,95) | 6,85E-03     | 5,83E-02           |

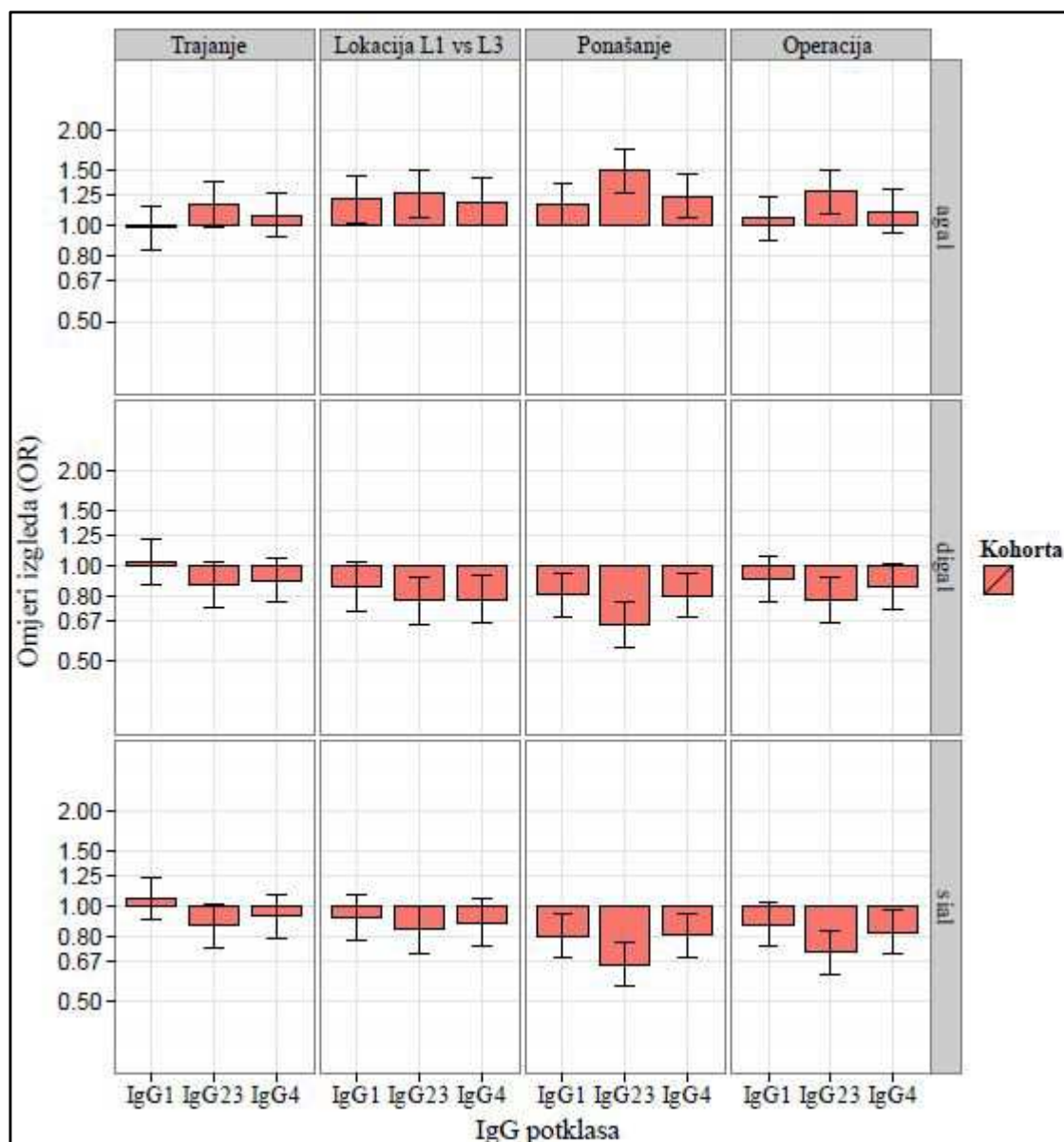
|               |                    |      |               |          |                 |
|---------------|--------------------|------|---------------|----------|-----------------|
| IgG23_A2B     | ponašanje          | 1,24 | (1,07 - 1,45) | 4,92E-03 | 5,36E-02        |
| IgG23_A2F     | ponašanje          | 1,15 | (0,99 - 1,33) | 6,53E-02 | 2,29E-01        |
| IgG23_A2G     | ponašanje          | 0,66 | (0,56 - 0,78) | 2,37E-07 | <b>2,48E-05</b> |
| IgG23_A2GS    | ponašanje          | 0,92 | (0,80 - 1,06) | 2,52E-01 | 4,96E-01        |
| IgG23_A2S     | ponašanje          | 0,66 | (0,56 - 0,77) | 1,32E-07 | <b>2,48E-05</b> |
| IgG23_agal    | ponašanje          | 1,5  | (1,28 - 1,76) | 4,28E-07 | <b>2,48E-05</b> |
| IgG23_digal   | ponašanje          | 0,66 | (0,56 - 0,77) | 2,63E-07 | <b>2,48E-05</b> |
| IgG23_monogal | ponašanje          | 0,73 | (0,63 - 0,85) | 4,64E-05 | <b>1,36E-03</b> |
| IgG23_sial    | ponašanje          | 0,66 | (0,56 - 0,77) | 9,10E-08 | <b>2,48E-05</b> |
| IgG4_A2FB     | ponašanje          | 1,1  | (0,94 - 1,29) | 2,32E-01 | 4,75E-01        |
| IgG4_A2FG     | ponašanje          | 0,81 | (0,69 - 0,94) | 6,84E-03 | 5,83E-02        |
| IgG4_A2FGS    | ponašanje          | 0,98 | (0,85 - 1,14) | 8,28E-01 | 9,01E-01        |
| IgG4_A2FS     | ponašanje          | 0,82 | (0,70 - 0,96) | 1,12E-02 | 7,27E-02        |
| IgG4_agal     | ponašanje          | 1,24 | (1,06 - 1,45) | 5,52E-03 | 5,63E-02        |
| IgG4_digal    | ponašanje          | 0,81 | (0,69 - 0,95) | 7,28E-03 | 5,98E-02        |
| IgG4_monogal  | ponašanje          | 0,81 | (0,70 - 0,94) | 5,38E-03 | 5,63E-02        |
| IgG4_sial     | ponašanje          | 0,81 | (0,69 - 0,95) | 7,62E-03 | 6,01E-02        |
| IgG1_A2B      | lokacija<br>L1vsL2 | 0,86 | (0,69 - 1,07) | 1,68E-01 | 3,94E-01        |
| IgG1_A2F      | lokacija<br>L1vsL2 | 1,11 | (0,90 - 1,37) | 3,11E-01 | 5,43E-01        |
| IgG1_A2G      | lokacija<br>L1vsL2 | 0,87 | (0,71 - 1,08) | 2,10E-01 | 4,45E-01        |
| IgG1_A2GS     | lokacija<br>L1vsL2 | 0,96 | (0,79 - 1,17) | 6,99E-01 | 8,32E-01        |
| IgG1_A2S      | lokacija<br>L1vsL2 | 0,87 | (0,70 - 1,08) | 1,93E-01 | 4,21E-01        |
| IgG1_agal     | lokacija<br>L1vsL2 | 1,17 | (0,95 - 1,44) | 1,50E-01 | 3,65E-01        |
| IgG1_digal    | lokacija<br>L1vsL2 | 0,91 | (0,73 - 1,12) | 3,67E-01 | 5,79E-01        |
| IgG1_monogal  | lokacija<br>L1vsL2 | 0,8  | (0,66 - 0,98) | 2,86E-02 | 1,36E-01        |
| IgG1_sial     | lokacija<br>L1vsL2 | 0,89 | (0,72 - 1,09) | 2,56E-01 | 4,98E-01        |
| IgG23_A2B     | lokacija<br>L1vsL2 | 0,76 | (0,61 - 0,94) | 1,02E-02 | 6,99E-02        |
| IgG23_A2F     | lokacija<br>L1vsL2 | 0,99 | (0,81 - 1,21) | 9,32E-01 | 9,57E-01        |
| IgG23_A2G     | lokacija<br>L1vsL2 | 0,9  | (0,73 - 1,12) | 3,55E-01 | 5,69E-01        |
| IgG23_A2GS    | lokacija<br>L1vsL2 | 1,07 | (0,88 - 1,31) | 4,88E-01 | 6,71E-01        |
| IgG23_A2S     | lokacija<br>L1vsL2 | 0,95 | (0,77 - 1,17) | 6,29E-01 | 7,78E-01        |
| IgG23_agal    | lokacija<br>L1vsL2 | 1,12 | (0,90 - 1,39) | 3,21E-01 | 5,46E-01        |
| IgG23_digal   | lokacija<br>L1vsL2 | 0,91 | (0,73 - 1,14) | 4,19E-01 | 6,26E-01        |
| IgG23_monogal | lokacija<br>L1vsL2 | 0,88 | (0,71 - 1,08) | 2,12E-01 | 4,49E-01        |
| IgG23_sial    | lokacija<br>L1vsL2 | 0,97 | (0,78 - 1,19) | 7,56E-01 | 8,55E-01        |

|               |                    |      |               |          |          |
|---------------|--------------------|------|---------------|----------|----------|
| IgG4_A2FB     | lokacija<br>L1vsL2 | 0,76 | (0,60 - 0,96) | 1,72E-02 | 9,92E-02 |
| IgG4_A2FG     | lokacija<br>L1vsL2 | 0,93 | (0,75 - 1,15) | 5,17E-01 | 6,98E-01 |
| IgG4_A2FGS    | lokacija<br>L1vsL2 | 1,02 | (0,83 - 1,25) | 8,59E-01 | 9,16E-01 |
| IgG4_A2FS     | lokacija<br>L1vsL2 | 0,97 | (0,78 - 1,19) | 7,43E-01 | 8,50E-01 |
| IgG4_agal     | lokacija<br>L1vsL2 | 1,05 | (0,85 - 1,30) | 6,53E-01 | 7,95E-01 |
| IgG4_digal    | lokacija<br>L1vsL2 | 0,9  | (0,72 - 1,11) | 3,22E-01 | 5,46E-01 |
| IgG4_monogal  | lokacija<br>L1vsL2 | 1,03 | (0,84 - 1,27) | 7,78E-01 | 8,73E-01 |
| IgG4_sial     | lokacija<br>L1vsL2 | 0,96 | (0,78 - 1,19) | 7,16E-01 | 8,35E-01 |
| IgG1_A2B      | lokacija<br>L1vsL3 | 0,95 | (0,80 - 1,13) | 5,59E-01 | 7,19E-01 |
| IgG1_A2F      | lokacija<br>L1vsL3 | 1,15 | (0,98 - 1,36) | 8,63E-02 | 2,65E-01 |
| IgG1_A2G      | lokacija<br>L1vsL3 | 0,83 | (0,70 - 0,99) | 3,68E-02 | 1,64E-01 |
| IgG1_A2GS     | lokacija<br>L1vsL3 | 1,04 | (0,88 - 1,22) | 6,33E-01 | 7,78E-01 |
| IgG1_A2S      | lokacija<br>L1vsL3 | 0,91 | (0,77 - 1,08) | 2,81E-01 | 5,18E-01 |
| IgG1_agal     | lokacija<br>L1vsL3 | 1,22 | (1,02 - 1,44) | 2,41E-02 | 1,26E-01 |
| IgG1_digal    | lokacija<br>L1vsL3 | 0,86 | (0,72 - 1,03) | 9,70E-02 | 2,85E-01 |
| IgG1_monogal  | lokacija<br>L1vsL3 | 0,81 | (0,69 - 0,96) | 1,25E-02 | 7,97E-02 |
| IgG1_sial     | lokacija<br>L1vsL3 | 0,92 | (0,78 - 1,10) | 3,64E-01 | 5,78E-01 |
| IgG23_A2B     | lokacija<br>L1vsL3 | 0,92 | (0,78 - 1,10) | 3,65E-01 | 5,78E-01 |
| IgG23_A2F     | lokacija<br>L1vsL3 | 1,09 | (0,93 - 1,28) | 2,72E-01 | 5,12E-01 |
| IgG23_A2G     | lokacija<br>L1vsL3 | 0,79 | (0,66 - 0,94) | 6,73E-03 | 5,83E-02 |
| IgG23_A2GS    | lokacija<br>L1vsL3 | 1,06 | (0,90 - 1,24) | 4,88E-01 | 6,71E-01 |
| IgG23_A2S     | lokacija<br>L1vsL3 | 0,84 | (0,71 - 0,99) | 4,21E-02 | 1,78E-01 |
| IgG23_agal    | lokacija<br>L1vsL3 | 1,26 | (1,06 - 1,50) | 7,69E-03 | 6,01E-02 |
| IgG23_digal   | lokacija<br>L1vsL3 | 0,78 | (0,65 - 0,93) | 4,85E-03 | 5,36E-02 |
| IgG23_monogal | lokacija<br>L1vsL3 | 0,86 | (0,73 - 1,01) | 7,03E-02 | 2,38E-01 |
| IgG23_sial    | lokacija<br>L1vsL3 | 0,85 | (0,71 - 1,00) | 4,99E-02 | 1,95E-01 |
| IgG4_A2FB     | lokacija<br>L1vsL3 | 0,97 | (0,81 - 1,16) | 7,26E-01 | 8,35E-01 |
| IgG4_A2FG     | lokacija<br>L1vsL3 | 0,82 | (0,69 - 0,98) | 2,62E-02 | 1,31E-01 |
| IgG4_A2FGS    | lokacija<br>L1vsL3 | 1,13 | (0,96 - 1,33) | 1,26E-01 | 3,22E-01 |

|               |                    |      |               |          |          |
|---------------|--------------------|------|---------------|----------|----------|
| IgG4_A2FS     | lokacija<br>L1vsL3 | 0,91 | (0,77 - 1,08) | 2,89E-01 | 5,27E-01 |
| IgG4_agal     | lokacija<br>L1vsL3 | 1,19 | (1,00 - 1,41) | 4,26E-02 | 1,78E-01 |
| IgG4_digal    | lokacija<br>L1vsL3 | 0,79 | (0,66 - 0,94) | 6,27E-03 | 5,83E-02 |
| IgG4_monogal  | lokacija<br>L1vsL3 | 0,91 | (0,77 - 1,07) | 2,48E-01 | 4,93E-01 |
| IgG4_sial     | lokacija<br>L1vsL3 | 0,89 | (0,75 - 1,05) | 1,74E-01 | 4,03E-01 |
| IgG1_A2B      | lokacija<br>L2vsL3 | 1,09 | (0,88 - 1,34) | 4,32E-01 | 6,36E-01 |
| IgG1_A2F      | Losction<br>L2vsL3 | 1,01 | (0,82 - 1,23) | 9,59E-01 | 9,73E-01 |
| IgG1_A2G      | lokacija<br>L2vsL3 | 0,99 | (0,80 - 1,23) | 9,12E-01 | 9,39E-01 |
| IgG1_A2GS     | lokacija<br>L2vsL3 | 1,09 | (0,89 - 1,33) | 4,15E-01 | 6,26E-01 |
| IgG1_A2S      | lokacija<br>L2vsL3 | 1,07 | (0,86 - 1,32) | 5,43E-01 | 7,08E-01 |
| IgG1_agal     | lokacija<br>L2vsL3 | 1    | (0,81 - 1,24) | 9,78E-01 | 9,87E-01 |
| IgG1_digal    | lokacija<br>L2vsL3 | 0,98 | (0,79 - 1,22) | 8,48E-01 | 9,07E-01 |
| IgG1_monogal  | lokacija<br>L2vsL3 | 1,06 | (0,87 - 1,30) | 5,56E-01 | 7,17E-01 |
| IgG1_sial     | lokacija<br>L2vsL3 | 1,07 | (0,87 - 1,32) | 5,38E-01 | 7,08E-01 |
| IgG23_A2B     | lokacija<br>L2vsL3 | 1,17 | (0,95 - 1,45) | 1,32E-01 | 3,31E-01 |
| IgG23_A2F     | lokacija<br>L2vsL3 | 1,06 | (0,87 - 1,28) | 5,87E-01 | 7,43E-01 |
| IgG23_A2G     | lokacija<br>L2vsL3 | 0,9  | (0,72 - 1,12) | 3,38E-01 | 5,58E-01 |
| IgG23_A2GS    | lokacija<br>L2vsL3 | 0,95 | (0,77 - 1,16) | 5,84E-01 | 7,42E-01 |
| IgG23_A2S     | lokacija<br>L2vsL3 | 0,89 | (0,72 - 1,10) | 2,72E-01 | 5,12E-01 |
| IgG23_agal    | lokacija<br>L2vsL3 | 1,1  | (0,89 - 1,37) | 3,77E-01 | 5,90E-01 |
| IgG23_digal   | lokacija<br>L2vsL3 | 0,88 | (0,71 - 1,09) | 2,41E-01 | 4,88E-01 |
| IgG23_monogal | lokacija<br>L2vsL3 | 1    | (0,81 - 1,24) | 9,89E-01 | 9,89E-01 |
| IgG23_sial    | lokacija<br>L2vsL3 | 0,88 | (0,71 - 1,09) | 2,35E-01 | 4,79E-01 |
| IgG4_A2FB     | lokacija<br>L2vsL3 | 1,23 | (0,99 - 1,54) | 6,10E-02 | 2,21E-01 |
| IgG4_A2FG     | lokacija<br>L2vsL3 | 0,9  | (0,73 - 1,12) | 3,37E-01 | 5,58E-01 |
| IgG4_A2FGS    | lokacija<br>L2vsL3 | 1,11 | (0,90 - 1,36) | 3,17E-01 | 5,46E-01 |
| IgG4_A2FS     | lokacija<br>L2vsL3 | 0,96 | (0,78 - 1,18) | 7,19E-01 | 8,35E-01 |
| IgG4_agal     | lokacija<br>L2vsL3 | 1,11 | (0,89 - 1,38) | 3,40E-01 | 5,59E-01 |
| IgG4_digal    | lokacija<br>L2vsL3 | 0,88 | (0,71 - 1,09) | 2,42E-01 | 4,88E-01 |

|               |                    |      |               |          |                 |
|---------------|--------------------|------|---------------|----------|-----------------|
| IgG4_monogal  | lokacija<br>L2vsL3 | 0,92 | (0,74 - 1,13) | 4,16E-01 | 6,26E-01        |
| IgG4_sial     | lokacija<br>L2vsL3 | 0,94 | (0,77 - 1,16) | 5,92E-01 | 7,45E-01        |
| IgG1_A2B      | trajanje           | 1,21 | (1,03 - 1,42) | 1,83E-02 | 1,02E-01        |
| IgG1_A2F      | trajanje           | 1,04 | (0,89 - 1,21) | 6,33E-01 | 7,78E-01        |
| IgG1_A2G      | trajanje           | 1,02 | (0,87 - 1,20) | 7,90E-01 | 8,79E-01        |
| IgG1_A2GS     | trajanje           | 1,08 | (0,93 - 1,25) | 3,17E-01 | 5,46E-01        |
| IgG1_A2S      | trajanje           | 1,07 | (0,91 - 1,25) | 4,18E-01 | 6,26E-01        |
| IgG1_agal     | trajanje           | 0,99 | (0,84 - 1,16) | 8,68E-01 | 9,19E-01        |
| IgG1_digal    | trajanje           | 1,03 | (0,88 - 1,21) | 6,86E-01 | 8,25E-01        |
| IgG1_monogal  | trajanje           | 1    | (0,86 - 1,17) | 9,79E-01 | 9,87E-01        |
| IgG1_sial     | trajanje           | 1,06 | (0,91 - 1,24) | 4,68E-01 | 6,59E-01        |
| IgG23_A2B     | trajanje           | 1,3  | (1,11 - 1,52) | 1,11E-03 | <b>2,00E-02</b> |
| IgG23_A2F     | trajanje           | 1,1  | (0,95 - 1,28) | 1,99E-01 | 4,28E-01        |
| IgG23_A2G     | trajanje           | 0,86 | (0,73 - 1,00) | 5,52E-02 | 2,10E-01        |
| IgG23_A2GS    | trajanje           | 1,03 | (0,88 - 1,20) | 7,28E-01 | 8,35E-01        |
| IgG23_A2S     | trajanje           | 0,88 | (0,75 - 1,03) | 1,06E-01 | 2,99E-01        |
| IgG23_agal    | trajanje           | 1,17 | (1,00 - 1,37) | 5,26E-02 | 2,04E-01        |
| IgG23_digal   | trajanje           | 0,87 | (0,74 - 1,03) | 9,84E-02 | 2,85E-01        |
| IgG23_monogal | trajanje           | 0,86 | (0,74 - 1,00) | 5,61E-02 | 2,11E-01        |
| IgG23_sial    | trajanje           | 0,87 | (0,74 - 1,02) | 7,90E-02 | 2,52E-01        |
| IgG4_A2FB     | trajanje           | 1,1  | (0,93 - 1,29) | 2,81E-01 | 5,18E-01        |
| IgG4_A2FG     | trajanje           | 0,92 | (0,78 - 1,08) | 3,03E-01 | 5,36E-01        |
| IgG4_A2FGS    | trajanje           | 1,02 | (0,88 - 1,19) | 8,07E-01 | 8,91E-01        |
| IgG4_A2FS     | trajanje           | 0,95 | (0,81 - 1,11) | 5,41E-01 | 7,08E-01        |
| IgG4_agal     | trajanje           | 1,08 | (0,92 - 1,27) | 3,34E-01 | 5,58E-01        |
| IgG4_digal    | trajanje           | 0,9  | (0,77 - 1,06) | 2,17E-01 | 4,54E-01        |
| IgG4_monogal  | trajanje           | 0,93 | (0,80 - 1,09) | 3,71E-01 | 5,82E-01        |
| IgG4_sial     | trajanje           | 0,93 | (0,80 - 1,09) | 3,85E-01 | 5,96E-01        |
| IgG1_A2B      | operacija          | 1,31 | (1,12 - 1,53) | 7,60E-04 | <b>1,43E-02</b> |
| IgG1_A2F      | operacija          | 0,92 | (0,79 - 1,07) | 2,68E-01 | 5,12E-01        |
| IgG1_A2G      | operacija          | 0,93 | (0,80 - 1,09) | 3,92E-01 | 6,02E-01        |
| IgG1_A2GS     | operacija          | 0,85 | (0,73 - 0,99) | 3,23E-02 | 1,49E-01        |
| IgG1_A2S      | operacija          | 0,88 | (0,75 - 1,03) | 1,18E-01 | 3,10E-01        |
| IgG1_agal     | operacija          | 1,06 | (0,90 - 1,24) | 4,87E-01 | 6,71E-01        |
| IgG1_digal    | operacija          | 0,91 | (0,77 - 1,07) | 2,54E-01 | 4,98E-01        |
| IgG1_monogal  | operacija          | 1,05 | (0,90 - 1,22) | 5,34E-01 | 7,08E-01        |
| IgG1_sial     | operacija          | 0,88 | (0,75 - 1,03) | 1,07E-01 | 2,99E-01        |
| IgG23_A2B     | operacija          | 1,4  | (1,19 - 1,64) | 2,46E-05 | <b>9,26E-04</b> |
| IgG23_A2F     | operacija          | 1,09 | (0,94 - 1,27) | 2,44E-01 | 4,89E-01        |
| IgG23_A2G     | operacija          | 0,78 | (0,66 - 0,91) | 1,87E-03 | <b>2,98E-02</b> |
| IgG23_A2GS    | operacija          | 0,85 | (0,73 - 0,98) | 2,89E-02 | 1,36E-01        |
| IgG23_A2S     | operacija          | 0,72 | (0,61 - 0,85) | 5,34E-05 | <b>1,38E-03</b> |
| IgG23_agal    | operacija          | 1,29 | (1,10 - 1,51) | 1,83E-03 | <b>2,98E-02</b> |
| IgG23_digal   | operacija          | 0,78 | (0,66 - 0,92) | 2,64E-03 | <b>3,60E-02</b> |

|                      |                  |      |               |          |                 |
|----------------------|------------------|------|---------------|----------|-----------------|
| <b>IgG23_monogal</b> | <b>operacija</b> | 0,82 | (0,70 - 0,95) | 9,65E-03 | 6,89E-02        |
| <b>IgG23_sial</b>    | <b>operacija</b> | 0,72 | (0,61 - 0,84) | 3,38E-05 | <b>1,17E-03</b> |
| <b>IgG4_A2FB</b>     | <b>operacija</b> | 1,3  | (1,10 - 1,53) | 2,02E-03 | <b>2,98E-02</b> |
| <b>IgG4_A2FG</b>     | <b>operacija</b> | 0,89 | (0,76 - 1,04) | 1,52E-01 | 3,66E-01        |
| <b>IgG4_A2FGS</b>    | <b>operacija</b> | 0,86 | (0,74 - 1,00) | 4,71E-02 | 1,88E-01        |
| <b>IgG4_A2FS</b>     | <b>operacija</b> | 0,84 | (0,71 - 0,98) | 2,60E-02 | 1,31E-01        |
| <b>IgG4_agal</b>     | <b>operacija</b> | 1,11 | (0,95 - 1,30) | 1,85E-01 | 4,17E-01        |
| <b>IgG4_digal</b>    | <b>operacija</b> | 0,87 | (0,74 - 1,02) | 8,46E-02 | 2,65E-01        |
| <b>IgG4_monogal</b>  | <b>operacija</b> | 0,92 | (0,79 - 1,07) | 2,74E-01 | 5,12E-01        |
| <b>IgG4_sial</b>     | <b>operacija</b> | 0,83 | (0,71 - 0,98) | 2,22E-02 | 1,20E-01        |



**Slika 3.4.1** Povezanost deriviranih IgG Fc-glikozilacijskih svojstava i kliničkih obilježja CD-a (trajanje, lokacija, ponašanje i operacija). Za sve potklase IgG-a, prikazani su omjeri izgleda (OR) za povezanost deriviranih glikozilacijskih svojstava i kliničkih obilježja CD-a (trajanje bolesti: <5 godina=0, >5 godina=1, lokacija bolesti: L1 (terminalni ileum)=0, L3 (ileum i debelo crijevo)=1, ponašanje bolesti: B1 (upalna CD)=0, B2 (sužavajuća CD) + B3 (perforirajuća CD)=1 te operacija: ne=0, da=1). Stupci (eng. *bar*) prikazuju pozitivne/negativne OR-ove. Derivirana glikozilacijska svojstva: agalaktozilacija (agal, udio agalaktoziliranih glkana), digalaktozilacija (digal, udio digalaktoziliranih glkana) i sijalinizacija (sial, udio sijaliniziranih glkana) opisana su u tablicama 2.3.5.3–2.3.5.4, a njihove glikoforme u tablici 3.1.1. Analiza povezanosti deriviranih glikozilacijskih svojstava i kliničkih obilježja CD-a provedena je logističkom regresijom uz dob i spol kao dodatne kovarijate. Statistički značajni rezultati označeni su zvjezdicom (\*) (tablica 3.3.2), prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

Rezultati za pojedinačne IgG glikoforme su prikazani u Tablici 3.4.2.<sup>225</sup>

**Tablica 3.4.2** Povezanost IgG Fc-glikana i kliničkih obilježja CD-a (trajanje, lokacija, ponašanje i operacija). Povezanost IgG Fc-glikana i kliničkih obilježja CD-a (trajanje bolesti: <5 godina=0, >5 godina=1, lokacija bolesti: L1 (terminalni ileum)=0, L2 (debelo crijevo)=1 ili L1=0, L3 (ileum i debelo crijevo)=0 ili L2=0, L3=1, ponašanje bolesti: B1 (upalna CD)=0, B2 (sužavajuća CD) + B3 (perforirajuća CD)=1 te operacija: ne=0, da=1) analizirana je logističkom regresijom uz dob i spol kao kovarijate. Prikazani su omjeri izgleda (OR) uz interval pouzdanosti (CI) od 95 %, P vrijednosti te prilagođene P vrijednosti (pril. P vrijednost) nakon korekcije na višestruko testiranje ( $\alpha=5\%$ ). Prilagođene, statistički značajne P vrijednosti otisnute su masno. Skraćena imena glikana opisana su u tablici 2.3.5.2, prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

| Glikan        | Kliničko obilježje | OR   | 95% CI        | P vrijednost | pril. P vrijednost |
|---------------|--------------------|------|---------------|--------------|--------------------|
| IgG1_G0       | ponašanje          | NA   | (NA - NA)     | NA           | NA                 |
| IgG1_G0F      | ponašanje          | 1,15 | (0,99 - 1,34) | 7,43E-02     | 2,45E-01           |
| IgG1_G0FN     | ponašanje          | 1,15 | (0,98 - 1,34) | 7,93E-02     | 2,52E-01           |
| IgG1_G1       | ponašanje          | 1,07 | (0,93 - 1,24) | 3,34E-01     | 5,58E-01           |
| IgG1_G1F      | ponašanje          | 0,87 | (0,75 - 1,01) | 6,83E-02     | 2,36E-01           |
| IgG1_G1FN     | ponašanje          | 1,11 | (0,95 - 1,28) | 1,82E-01     | 4,11E-01           |
| IgG1_G1FS     | ponašanje          | 0,97 | (0,84 - 1,12) | 6,87E-01     | 8,25E-01           |
| IgG1_G1N      | ponašanje          | 1,07 | (0,93 - 1,24) | 3,36E-01     | 5,58E-01           |
| IgG1_G1S      | ponašanje          | 0,89 | (0,77 - 1,03) | 1,10E-01     | 3,01E-01           |
| IgG1_G2       | ponašanje          | 0,94 | (0,81 - 1,09) | 4,44E-01     | 6,42E-01           |
| IgG1_G2F      | ponašanje          | 0,79 | (0,67 - 0,92) | 2,70E-03     | <b>3,60E-02</b>    |
| IgG1_G2FN     | ponašanje          | 0,93 | (0,80 - 1,08) | 3,51E-01     | 5,69E-01           |
| IgG1_G2FNS    | ponašanje          | 0,97 | (0,85 - 1,12) | 7,23E-01     | 8,35E-01           |
| IgG1_G2FS     | ponašanje          | 0,81 | (0,69 - 0,95) | 9,08E-03     | 6,62E-02           |
| IgG1_G2FS2    | ponašanje          | 0,82 | (0,70 - 0,96) | 1,02E-02     | 6,99E-02           |
| IgG1_G2S      | ponašanje          | 0,92 | (0,79 - 1,07) | 2,74E-01     | 5,12E-01           |
| IgG1_M5G1S1F  | ponašanje          | 0,82 | (0,70 - 0,95) | 8,76E-03     | 6,59E-02           |
| IgG23_G0      | ponašanje          | 1,03 | (0,89 - 1,19) | 6,75E-01     | 8,18E-01           |
| IgG23_G0F     | ponašanje          | 1,41 | (1,20 - 1,65) | 1,32E-05     | <b>5,48E-04</b>    |
| IgG23_G0FN    | ponašanje          | 1,46 | (1,24 - 1,71) | 1,82E-06     | <b>8,38E-05</b>    |
| IgG23_G1      | ponašanje          | 0,89 | (0,77 - 1,03) | 1,11E-01     | 3,02E-01           |
| IgG23_G1F     | ponašanje          | 0,75 | (0,65 - 0,88) | 1,99E-04     | <b>4,35E-03</b>    |
| IgG23_G1FN    | ponašanje          | 0,94 | (0,81 - 1,10) | 4,58E-01     | 6,54E-01           |
| IgG23_G1FNS   | ponašanje          | 1,14 | (0,99 - 1,32) | 7,12E-02     | 2,38E-01           |
| IgG23_G1FS    | ponašanje          | 0,74 | (0,64 - 0,86) | 4,93E-05     | <b>1,36E-03</b>    |
| IgG23_G2      | ponašanje          | 0,81 | (0,70 - 0,94) | 5,60E-03     | 5,63E-02           |
| IgG23_G2F     | ponašanje          | 0,66 | (0,56 - 0,78) | 4,80E-07     | <b>2,48E-05</b>    |
| IgG23_G2FN    | ponašanje          | 0,82 | (0,70 - 0,97) | 1,61E-02     | 9,63E-02           |
| IgG23_G2FNS   | ponašanje          | 0,92 | (0,79 - 1,06) | 2,31E-01     | 4,75E-01           |
| IgG23_G2FS    | ponašanje          | 0,66 | (0,56 - 0,78) | 3,54E-07     | <b>2,48E-05</b>    |
| IgG23_G2FS2   | ponašanje          | 0,74 | (0,63 - 0,87) | 1,25E-04     | <b>2,87E-03</b>    |
| IgG23_G2S     | ponašanje          | 0,84 | (0,72 - 0,98) | 2,23E-02     | 1,20E-01           |
| IgG23_M5G1S1F | ponašanje          | 0,83 | (0,71 - 0,97) | 1,63E-02     | 9,63E-02           |



|              |                    |      |               |          |                 |
|--------------|--------------------|------|---------------|----------|-----------------|
| IgG4_G0F     | ponašanje          | 1,22 | (1,05 - 1,42) | 1,03E-02 | 6,99E-02        |
| IgG4_G0FN    | ponašanje          | 1,16 | (1,00 - 1,36) | 5,64E-02 | 2,11E-01        |
| IgG4_G1F     | ponašanje          | 0,79 | (0,68 - 0,92) | 1,96E-03 | <b>2,98E-02</b> |
| IgG4_G1FN    | ponašanje          | 0,96 | (0,82 - 1,12) | 5,77E-01 | 7,35E-01        |
| IgG4_G1FNS   | ponašanje          | 1,1  | (0,95 - 1,27) | 2,17E-01 | 4,54E-01        |
| IgG4_G1FS    | ponašanje          | 0,84 | (0,72 - 0,97) | 1,91E-02 | 1,05E-01        |
| IgG4_G2F     | ponašanje          | 0,8  | (0,69 - 0,94) | 5,71E-03 | 5,63E-02        |
| IgG4_G2FN    | ponašanje          | 0,91 | (0,78 - 1,06) | 2,24E-01 | 4,66E-01        |
| IgG4_G2FNS   | ponašanje          | 0,97 | (0,83 - 1,13) | 6,91E-01 | 8,26E-01        |
| IgG4_G2FS    | ponašanje          | 0,8  | (0,68 - 0,93) | 4,32E-03 | 5,23E-02        |
| IgG4_G2FS2   | ponašanje          | 0,98 | (0,85 - 1,14) | 8,36E-01 | 9,02E-01        |
| IgG1_G0      | lokacija<br>L1vsL2 | NA   | (NA - NA)     | NA       | NA              |
| IgG1_G0F     | lokacija<br>L1vsL2 | 1,19 | (0,97 - 1,47) | 9,50E-02 | 2,83E-01        |
| IgG1_G0FN    | lokacija<br>L1vsL2 | 1,02 | (0,83 - 1,27) | 8,35E-01 | 9,02E-01        |
| IgG1_G1      | lokacija<br>L1vsL2 | 0,92 | (0,75 - 1,13) | 4,22E-01 | 6,27E-01        |
| IgG1_G1F     | lokacija<br>L1vsL2 | 0,93 | (0,76 - 1,15) | 5,17E-01 | 6,98E-01        |
| IgG1_G1FN    | lokacija<br>L1vsL2 | 0,82 | (0,66 - 1,01) | 5,49E-02 | 2,10E-01        |
| IgG1_G1FS    | lokacija<br>L1vsL2 | 1,02 | (0,84 - 1,25) | 8,38E-01 | 9,02E-01        |
| IgG1_G1N     | lokacija<br>L1vsL2 | 0,87 | (0,70 - 1,08) | 1,89E-01 | 4,18E-01        |
| IgG1_G1S     | lokacija<br>L1vsL2 | 0,85 | (0,69 - 1,05) | 1,17E-01 | 3,10E-01        |
| IgG1_G2      | lokacija<br>L1vsL2 | 0,98 | (0,80 - 1,21) | 8,81E-01 | 9,24E-01        |
| IgG1_G2F     | lokacija<br>L1vsL2 | 0,94 | (0,76 - 1,17) | 5,92E-01 | 7,45E-01        |
| IgG1_G2FN    | lokacija<br>L1vsL2 | 0,85 | (0,69 - 1,05) | 1,32E-01 | 3,31E-01        |
| IgG1_G2FNS   | lokacija<br>L1vsL2 | 0,88 | (0,72 - 1,08) | 2,26E-01 | 4,68E-01        |
| IgG1_G2FS    | lokacija<br>L1vsL2 | 0,86 | (0,69 - 1,06) | 1,62E-01 | 3,82E-01        |
| IgG1_G2FS2   | lokacija<br>L1vsL2 | 0,9  | (0,73 - 1,11) | 3,22E-01 | 5,46E-01        |
| IgG1_G2S     | lokacija<br>L1vsL2 | 1    | (0,82 - 1,23) | 9,85E-01 | 9,89E-01        |
| IgG1_M5G1S1F | lokacija<br>L1vsL2 | 1,05 | (0,86 - 1,28) | 6,56E-01 | 7,96E-01        |
| IgG23_G0     | lokacija<br>L1vsL2 | 1,02 | (0,83 - 1,24) | 8,84E-01 | 9,24E-01        |
| IgG23_G0F    | lokacija<br>L1vsL2 | 1,18 | (0,95 - 1,47) | 1,24E-01 | 3,19E-01        |
| IgG23_G0FN   | lokacija<br>L1vsL2 | 0,84 | (0,67 - 1,04) | 1,12E-01 | 3,02E-01        |
| IgG23_G1     | lokacija<br>L1vsL2 | 0,99 | (0,81 - 1,21) | 9,02E-01 | 9,35E-01        |
| IgG23_G1F    | lokacija<br>L1vsL2 | 0,96 | (0,78 - 1,18) | 7,03E-01 | 8,34E-01        |

|               |                    |      |               |          |                 |
|---------------|--------------------|------|---------------|----------|-----------------|
| IgG23_G1FN    | lokacija<br>L1vsL2 | 0,73 | (0,58 - 0,91) | 4,57E-03 | 5,26E-02        |
| IgG23_G1FNS   | lokacija<br>L1vsL2 | 1,12 | (0,92 - 1,38) | 2,55E-01 | 4,98E-01        |
| IgG23_G1FS    | lokacija<br>L1vsL2 | 0,92 | (0,75 - 1,13) | 4,45E-01 | 6,42E-01        |
| IgG23_G2      | lokacija<br>L1vsL2 | 0,97 | (0,79 - 1,19) | 7,93E-01 | 8,79E-01        |
| IgG23_G2F     | lokacija<br>L1vsL2 | 0,95 | (0,76 - 1,18) | 6,23E-01 | 7,77E-01        |
| IgG23_G2FN    | lokacija<br>L1vsL2 | 0,81 | (0,64 - 1,01) | 5,84E-02 | 2,16E-01        |
| IgG23_G2FNS   | lokacija<br>L1vsL2 | 0,92 | (0,75 - 1,13) | 4,18E-01 | 6,26E-01        |
| IgG23_G2FS    | lokacija<br>L1vsL2 | 0,93 | (0,75 - 1,16) | 5,33E-01 | 7,08E-01        |
| IgG23_G2FS2   | lokacija<br>L1vsL2 | 0,84 | (0,67 - 1,04) | 9,76E-02 | 2,85E-01        |
| IgG23_G2S     | lokacija<br>L1vsL2 | 1,01 | (0,82 - 1,23) | 9,44E-01 | 9,65E-01        |
| IgG23_M5G1S1F | lokacija<br>L1vsL2 | 1,38 | (1,13 - 1,69) | 1,60E-03 | <b>2,76E-02</b> |
| IgG4_G0F      | lokacija<br>L1vsL2 | 1,13 | (0,92 - 1,40) | 2,51E-01 | 4,96E-01        |
| IgG4_G0FN     | lokacija<br>L1vsL2 | 0,85 | (0,68 - 1,06) | 1,46E-01 | 3,59E-01        |
| IgG4_G1F      | lokacija<br>L1vsL2 | 1,12 | (0,91 - 1,39) | 2,83E-01 | 5,18E-01        |
| IgG4_G1FN     | lokacija<br>L1vsL2 | 0,82 | (0,66 - 1,02) | 7,13E-02 | 2,38E-01        |
| IgG4_G1FNS    | lokacija<br>L1vsL2 | 0,79 | (0,64 - 0,98) | 2,66E-02 | 1,31E-01        |
| IgG4_G1FS     | lokacija<br>L1vsL2 | 1,08 | (0,88 - 1,33) | 4,34E-01 | 6,37E-01        |
| IgG4_G2F      | lokacija<br>L1vsL2 | 0,9  | (0,72 - 1,12) | 3,28E-01 | 5,54E-01        |
| IgG4_G2FN     | lokacija<br>L1vsL2 | 0,83 | (0,66 - 1,03) | 8,60E-02 | 2,65E-01        |
| IgG4_G2FNS    | lokacija<br>L1vsL2 | 0,94 | (0,76 - 1,16) | 5,56E-01 | 7,17E-01        |
| IgG4_G2FS     | lokacija<br>L1vsL2 | 0,93 | (0,75 - 1,15) | 5,07E-01 | 6,90E-01        |
| IgG4_G2FS2    | lokacija<br>L1vsL2 | 0,97 | (0,79 - 1,20) | 7,94E-01 | 8,79E-01        |
| IgG1_G0       | lokacija<br>L1vsL3 | NA   | (NA - NA)     | NA       | NA              |
| IgG1_G0F      | lokacija<br>L1vsL3 | 1,2  | (1,01 - 1,42) | 3,79E-02 | 1,67E-01        |
| IgG1_G0FN     | lokacija<br>L1vsL3 | 1,17 | (0,98 - 1,40) | 8,80E-02 | 2,68E-01        |
| IgG1_G1       | lokacija<br>L1vsL3 | 0,87 | (0,74 - 1,03) | 1,05E-01 | 2,99E-01        |
| IgG1_G1F      | lokacija<br>L1vsL3 | 0,92 | (0,78 - 1,09) | 3,52E-01 | 5,69E-01        |
| IgG1_G1FN     | lokacija<br>L1vsL3 | 0,86 | (0,73 - 1,02) | 8,08E-02 | 2,55E-01        |
| IgG1_G1FS     | lokacija<br>L1vsL3 | 1,17 | (1,00 - 1,38) | 4,93E-02 | 1,95E-01        |

|               |                 |      |               |          |                 |
|---------------|-----------------|------|---------------|----------|-----------------|
| IgG1_G1N      | lokacija L1vsL3 | 0,87 | (0,74 - 1,03) | 1,10E-01 | 3,01E-01        |
| IgG1_G1S      | lokacija L1vsL3 | 0,86 | (0,73 - 1,01) | 6,26E-02 | 2,23E-01        |
| IgG1_G2       | lokacija L1vsL3 | 0,9  | (0,76 - 1,06) | 1,87E-01 | 4,18E-01        |
| IgG1_G2F      | lokacija L1vsL3 | 0,86 | (0,72 - 1,02) | 9,00E-02 | 2,70E-01        |
| IgG1_G2FN     | lokacija L1vsL3 | 0,81 | (0,69 - 0,96) | 1,67E-02 | 9,76E-02        |
| IgG1_G2FNS    | lokacija L1vsL3 | 0,92 | (0,79 - 1,08) | 3,15E-01 | 5,46E-01        |
| IgG1_G2FS     | lokacija L1vsL3 | 0,96 | (0,81 - 1,14) | 6,47E-01 | 7,90E-01        |
| IgG1_G2FS2    | lokacija L1vsL3 | 0,91 | (0,77 - 1,08) | 2,98E-01 | 5,31E-01        |
| IgG1_G2S      | lokacija L1vsL3 | 0,94 | (0,80 - 1,11) | 4,75E-01 | 6,65E-01        |
| IgG1_M5G1S1F  | lokacija L1vsL3 | 1,03 | (0,88 - 1,21) | 7,09E-01 | 8,35E-01        |
| IgG23_G0      | lokacija L1vsL3 | 1,01 | (0,86 - 1,18) | 9,51E-01 | 9,70E-01        |
| IgG23_G0F     | lokacija L1vsL3 | 1,26 | (1,06 - 1,50) | 7,37E-03 | 5,98E-02        |
| IgG23_G0FN    | lokacija L1vsL3 | 1,1  | (0,92 - 1,31) | 2,93E-01 | 5,28E-01        |
| IgG23_G1      | lokacija L1vsL3 | 0,93 | (0,79 - 1,08) | 3,36E-01 | 5,58E-01        |
| IgG23_G1F     | lokacija L1vsL3 | 0,92 | (0,78 - 1,09) | 3,53E-01 | 5,69E-01        |
| IgG23_G1FN    | lokacija L1vsL3 | 0,79 | (0,66 - 0,94) | 6,90E-03 | 5,83E-02        |
| IgG23_G1FNS   | lokacija L1vsL3 | 1,13 | (0,96 - 1,32) | 1,44E-01 | 3,58E-01        |
| IgG23_G1FS    | lokacija L1vsL3 | 0,94 | (0,80 - 1,10) | 4,15E-01 | 6,26E-01        |
| IgG23_G2      | lokacija L1vsL3 | 0,86 | (0,73 - 1,01) | 6,31E-02 | 2,23E-01        |
| IgG23_G2F     | lokacija L1vsL3 | 0,8  | (0,67 - 0,95) | 1,11E-02 | 7,27E-02        |
| IgG23_G2FN    | lokacija L1vsL3 | 0,73 | (0,61 - 0,87) | 4,39E-04 | <b>9,09E-03</b> |
| IgG23_G2FNS   | lokacija L1vsL3 | 0,95 | (0,81 - 1,12) | 5,44E-01 | 7,08E-01        |
| IgG23_G2FS    | lokacija L1vsL3 | 0,81 | (0,68 - 0,97) | 1,75E-02 | 9,94E-02        |
| IgG23_G2FS2   | lokacija L1vsL3 | 0,85 | (0,72 - 1,01) | 6,16E-02 | 2,22E-01        |
| IgG23_G2S     | lokacija L1vsL3 | 0,89 | (0,76 - 1,05) | 1,54E-01 | 3,66E-01        |
| IgG23_M5G1S1F | lokacija L1vsL3 | 1,23 | (1,04 - 1,46) | 1,48E-02 | 9,30E-02        |
| IgG4_G0F      | lokacija L1vsL3 | 1,19 | (1,00 - 1,41) | 4,49E-02 | 1,84E-01        |
| IgG4_G0FN     | lokacija L1vsL3 | 1,1  | (0,93 - 1,31) | 2,72E-01 | 5,12E-01        |
| IgG4_G1F      | lokacija L1vsL3 | 0,93 | (0,78 - 1,09) | 3,68E-01 | 5,79E-01        |
|               |                 |      |               |          |                 |

|              |                 |      |               |          |                 |
|--------------|-----------------|------|---------------|----------|-----------------|
| IgG4_G1FN    | lokacija L1vsL3 | 0,87 | (0,73 - 1,03) | 1,09E-01 | 3,01E-01        |
| IgG4_G1FNS   | lokacija L1vsL3 | 0,92 | (0,78 - 1,08) | 3,20E-01 | 5,46E-01        |
| IgG4_G1FS    | lokacija L1vsL3 | 1,02 | (0,87 - 1,20) | 8,16E-01 | 8,98E-01        |
| IgG4_G2F     | lokacija L1vsL3 | 0,77 | (0,65 - 0,92) | 3,44E-03 | <b>4,32E-02</b> |
| IgG4_G2FN    | lokacija L1vsL3 | 0,76 | (0,64 - 0,91) | 2,53E-03 | <b>3,60E-02</b> |
| IgG4_G2FNS   | lokacija L1vsL3 | 0,96 | (0,81 - 1,14) | 6,36E-01 | 7,79E-01        |
| IgG4_G2FS    | lokacija L1vsL3 | 0,83 | (0,70 - 0,98) | 2,83E-02 | 1,36E-01        |
| IgG4_G2FS2   | lokacija L1vsL3 | 1,05 | (0,89 - 1,23) | 5,54E-01 | 7,17E-01        |
| IgG1_G0      | lokacija L2vsL3 | NA   | (NA - NA)     | NA       | NA              |
| IgG1_G0F     | lokacija L2vsL3 | 0,97 | (0,78 - 1,19) | 7,48E-01 | 8,50E-01        |
| IgG1_G0FN    | lokacija L2vsL3 | 1,09 | (0,88 - 1,36) | 4,20E-01 | 6,26E-01        |
| IgG1_G1      | lokacija L2vsL3 | 0,98 | (0,80 - 1,20) | 8,18E-01 | 8,98E-01        |
| IgG1_G1F     | lokacija L2vsL3 | 1,01 | (0,82 - 1,25) | 9,03E-01 | 9,35E-01        |
| IgG1_G1FN    | lokacija L2vsL3 | 1,07 | (0,87 - 1,32) | 4,95E-01 | 6,79E-01        |
| IgG1_G1FS    | lokacija L2vsL3 | 1,14 | (0,93 - 1,40) | 1,89E-01 | 4,18E-01        |
| IgG1_G1N     | lokacija L2vsL3 | 1,02 | (0,83 - 1,26) | 8,22E-01 | 9,00E-01        |
| IgG1_G1S     | lokacija L2vsL3 | 1,04 | (0,85 - 1,27) | 6,77E-01 | 8,18E-01        |
| IgG1_G2      | lokacija L2vsL3 | 0,94 | (0,77 - 1,15) | 5,65E-01 | 7,22E-01        |
| IgG1_G2F     | lokacija L2vsL3 | 0,93 | (0,75 - 1,16) | 5,31E-01 | 7,08E-01        |
| IgG1_G2FN    | lokacija L2vsL3 | 0,99 | (0,80 - 1,22) | 9,01E-01 | 9,35E-01        |
| IgG1_G2FNS   | lokacija L2vsL3 | 1,04 | (0,85 - 1,27) | 7,08E-01 | 8,35E-01        |
| IgG1_G2FS    | lokacija L2vsL3 | 1,13 | (0,91 - 1,40) | 2,66E-01 | 5,12E-01        |
| IgG1_G2FS2   | lokacija L2vsL3 | 1,02 | (0,83 - 1,25) | 8,76E-01 | 9,20E-01        |
| IgG1_G2S     | lokacija L2vsL3 | 0,97 | (0,79 - 1,19) | 7,46E-01 | 8,50E-01        |
| IgG1_M5G1S1F | lokacija L2vsL3 | 1    | (0,82 - 1,21) | 9,62E-01 | 9,74E-01        |
| IgG23_G0     | lokacija L2vsL3 | 1,01 | (0,82 - 1,23) | 9,57E-01 | 9,73E-01        |
| IgG23_G0F    | lokacija L2vsL3 | 1,04 | (0,84 - 1,29) | 7,11E-01 | 8,35E-01        |
| IgG23_G0FN   | lokacija L2vsL3 | 1,25 | (1,01 - 1,56) | 4,03E-02 | 1,76E-01        |
| IgG23_G1     | lokacija L2vsL3 | 0,97 | (0,80 - 1,18) | 7,70E-01 | 8,69E-01        |
|              |                 |      |               |          |                 |

|               |                    |      |               |          |          |
|---------------|--------------------|------|---------------|----------|----------|
| IgG23_G1F     | lokacija<br>L2vsL3 | 0,98 | (0,80 - 1,21) | 8,68E-01 | 9,19E-01 |
| IgG23_G1FN    | lokacija<br>L2vsL3 | 1,09 | (0,88 - 1,36) | 4,29E-01 | 6,34E-01 |
| IgG23_G1FNS   | lokacija<br>L2vsL3 | 0,94 | (0,76 - 1,15) | 5,23E-01 | 7,03E-01 |
| IgG23_G1FS    | lokacija<br>L2vsL3 | 1,02 | (0,83 - 1,25) | 8,29E-01 | 9,01E-01 |
| IgG23_G2      | lokacija<br>L2vsL3 | 0,93 | (0,76 - 1,12) | 4,37E-01 | 6,38E-01 |
| IgG23_G2F     | lokacija<br>L2vsL3 | 0,87 | (0,70 - 1,08) | 1,93E-01 | 4,21E-01 |
| IgG23_G2FN    | lokacija<br>L2vsL3 | 0,92 | (0,74 - 1,15) | 4,66E-01 | 6,59E-01 |
| IgG23_G2FNS   | lokacija<br>L2vsL3 | 0,98 | (0,81 - 1,20) | 8,72E-01 | 9,20E-01 |
| IgG23_G2FS    | lokacija<br>L2vsL3 | 0,89 | (0,72 - 1,11) | 3,01E-01 | 5,36E-01 |
| IgG23_G2FS2   | lokacija<br>L2vsL3 | 0,99 | (0,81 - 1,21) | 9,10E-01 | 9,39E-01 |
| IgG23_G2S     | lokacija<br>L2vsL3 | 0,92 | (0,75 - 1,12) | 3,86E-01 | 5,96E-01 |
| IgG23_M5G1S1F | lokacija<br>L2vsL3 | 0,87 | (0,71 - 1,06) | 1,62E-01 | 3,82E-01 |
| IgG4_G0F      | lokacija<br>L2vsL3 | 1,03 | (0,83 - 1,28) | 7,82E-01 | 8,76E-01 |
| IgG4_G0FN     | lokacija<br>L2vsL3 | 1,27 | (1,02 - 1,59) | 3,24E-02 | 1,49E-01 |
| IgG4_G1F      | lokacija<br>L2vsL3 | 0,87 | (0,70 - 1,07) | 1,80E-01 | 4,10E-01 |
| IgG4_G1FN     | lokacija<br>L2vsL3 | 1,08 | (0,86 - 1,35) | 4,99E-01 | 6,82E-01 |
| IgG4_G1FNS    | lokacija<br>L2vsL3 | 1,12 | (0,91 - 1,38) | 2,90E-01 | 5,27E-01 |
| IgG4_G1FS     | lokacija<br>L2vsL3 | 0,98 | (0,80 - 1,20) | 8,47E-01 | 9,07E-01 |
| IgG4_G2F      | lokacija<br>L2vsL3 | 0,87 | (0,70 - 1,08) | 2,03E-01 | 4,36E-01 |
| IgG4_G2FN     | lokacija<br>L2vsL3 | 0,93 | (0,75 - 1,15) | 4,87E-01 | 6,71E-01 |
| IgG4_G2FNS    | lokacija<br>L2vsL3 | 1,04 | (0,84 - 1,29) | 7,19E-01 | 8,35E-01 |
| IgG4_G2FS     | lokacija<br>L2vsL3 | 0,9  | (0,73 - 1,11) | 3,46E-01 | 5,67E-01 |
| IgG4_G2FS2    | lokacija<br>L2vsL3 | 1,08 | (0,88 - 1,34) | 4,44E-01 | 6,42E-01 |
| IgG1_G0       | trajanje           | NA   | (NA - NA)     | NA       | NA       |
| IgG1_G0F      | trajanje           | 0,94 | (0,80 - 1,10) | 4,55E-01 | 6,54E-01 |
| IgG1_G0FN     | trajanje           | 1,14 | (0,97 - 1,34) | 1,14E-01 | 3,02E-01 |
| IgG1_G1       | trajanje           | 0,94 | (0,81 - 1,09) | 4,20E-01 | 6,26E-01 |
| IgG1_G1F      | trajanje           | 0,92 | (0,79 - 1,07) | 2,81E-01 | 5,18E-01 |
| IgG1_G1FN     | trajanje           | 1,17 | (1,00 - 1,37) | 4,67E-02 | 1,88E-01 |
| IgG1_G1FS     | trajanje           | 1,06 | (0,91 - 1,22) | 4,58E-01 | 6,54E-01 |
| IgG1_G1N      | trajanje           | 1,05 | (0,90 - 1,22) | 5,14E-01 | 6,98E-01 |
| IgG1_G1S      | trajanje           | 1,05 | (0,90 - 1,22) | 5,26E-01 | 7,05E-01 |
| IgG1_G2       | trajanje           | 0,94 | (0,81 - 1,10) | 4,37E-01 | 6,38E-01 |

|               |           |      |               |          |                 |
|---------------|-----------|------|---------------|----------|-----------------|
| IgG1_G2F      | trajanje  | 1,02 | (0,87 - 1,20) | 7,85E-01 | 8,76E-01        |
| IgG1_G2FN     | trajanje  | 1,11 | (0,95 - 1,29) | 1,97E-01 | 4,27E-01        |
| IgG1_G2FNS    | trajanje  | 1,06 | (0,91 - 1,22) | 4,73E-01 | 6,64E-01        |
| IgG1_G2FS     | trajanje  | 1,08 | (0,92 - 1,26) | 3,63E-01 | 5,78E-01        |
| IgG1_G2FS2    | trajanje  | 1,11 | (0,95 - 1,30) | 1,71E-01 | 3,98E-01        |
| IgG1_G2S      | trajanje  | 0,97 | (0,84 - 1,13) | 7,18E-01 | 8,35E-01        |
| IgG1_M5G1S1F  | trajanje  | 0,93 | (0,80 - 1,07) | 3,08E-01 | 5,43E-01        |
| IgG23_G0      | trajanje  | 0,99 | (0,85 - 1,15) | 8,73E-01 | 9,20E-01        |
| IgG23_G0F     | trajanje  | 1,09 | (0,93 - 1,28) | 2,69E-01 | 5,12E-01        |
| IgG23_G0FN    | trajanje  | 1,37 | (1,16 - 1,61) | 1,24E-04 | <b>2,87E-03</b> |
| IgG23_G1      | trajanje  | 0,87 | (0,75 - 1,01) | 6,72E-02 | 2,34E-01        |
| IgG23_G1F     | trajanje  | 0,87 | (0,75 - 1,02) | 7,88E-02 | 2,52E-01        |
| IgG23_G1FN    | trajanje  | 1,04 | (0,89 - 1,22) | 6,33E-01 | 7,78E-01        |
| IgG23_G1FNS   | trajanje  | 1,17 | (1,00 - 1,36) | 4,20E-02 | 1,78E-01        |
| IgG23_G1FS    | trajanje  | 0,84 | (0,72 - 0,98) | 2,46E-02 | 1,27E-01        |
| IgG23_G2      | trajanje  | 0,89 | (0,76 - 1,03) | 1,21E-01 | 3,14E-01        |
| IgG23_G2F     | trajanje  | 0,88 | (0,75 - 1,03) | 1,12E-01 | 3,02E-01        |
| IgG23_G2FN    | trajanje  | 0,94 | (0,80 - 1,11) | 4,65E-01 | 6,59E-01        |
| IgG23_G2FNS   | trajanje  | 1,13 | (0,98 - 1,31) | 9,75E-02 | 2,85E-01        |
| IgG23_G2FS    | trajanje  | 0,86 | (0,73 - 1,01) | 5,90E-02 | 2,16E-01        |
| IgG23_G2FS2   | trajanje  | 1,06 | (0,91 - 1,23) | 4,64E-01 | 6,59E-01        |
| IgG23_G2S     | trajanje  | 0,83 | (0,71 - 0,97) | 1,61E-02 | 9,63E-02        |
| IgG23_M5G1S1F | trajanje  | 0,85 | (0,73 - 1,00) | 4,21E-02 | 1,78E-01        |
| IgG4_G0F      | trajanje  | 1,04 | (0,89 - 1,22) | 6,31E-01 | 7,78E-01        |
| IgG4_G0FN     | trajanje  | 1,14 | (0,97 - 1,35) | 1,02E-01 | 2,94E-01        |
| IgG4_G1F      | trajanje  | 0,92 | (0,78 - 1,07) | 2,75E-01 | 5,12E-01        |
| IgG4_G1FN     | trajanje  | 1    | (0,85 - 1,17) | 9,89E-01 | 9,89E-01        |
| IgG4_G1FNS    | trajanje  | 0,96 | (0,82 - 1,11) | 5,62E-01 | 7,20E-01        |
| IgG4_G1FS     | trajanje  | 0,95 | (0,82 - 1,11) | 5,39E-01 | 7,08E-01        |
| IgG4_G2F      | trajanje  | 0,9  | (0,77 - 1,06) | 2,06E-01 | 4,39E-01        |
| IgG4_G2FN     | trajanje  | 0,92 | (0,78 - 1,08) | 2,97E-01 | 5,31E-01        |
| IgG4_G2FNS    | trajanje  | 1,03 | (0,88 - 1,20) | 7,27E-01 | 8,35E-01        |
| IgG4_G2FS     | trajanje  | 0,89 | (0,76 - 1,04) | 1,53E-01 | 3,66E-01        |
| IgG4_G2FS2    | trajanje  | 1,09 | (0,93 - 1,26) | 2,93E-01 | 5,28E-01        |
| IgG1_G0       | operacija | NA   | (NA - NA)     | NA       | NA              |
| IgG1_G0F      | operacija | 1,01 | (0,86 - 1,18) | 9,43E-01 | 9,65E-01        |
| IgG1_G0FN     | operacija | 1,19 | (1,02 - 1,40) | 2,72E-02 | 1,33E-01        |
| IgG1_G1       | operacija | 1,11 | (0,95 - 1,28) | 1,79E-01 | 4,10E-01        |
| IgG1_G1F      | operacija | 0,85 | (0,73 - 0,99) | 3,40E-02 | 1,53E-01        |
| IgG1_G1FN     | operacija | 1,26 | (1,08 - 1,47) | 3,29E-03 | <b>4,25E-02</b> |
| IgG1_G1FS     | operacija | 0,93 | (0,80 - 1,07) | 3,10E-01 | 5,43E-01        |
| IgG1_G1N      | operacija | 1,2  | (1,03 - 1,40) | 1,57E-02 | 9,63E-02        |
| IgG1_G1S      | operacija | 0,98 | (0,84 - 1,13) | 7,53E-01 | 8,55E-01        |
| IgG1_G2       | operacija | 1,01 | (0,87 - 1,17) | 9,04E-01 | 9,35E-01        |
| IgG1_G2F      | operacija | 0,88 | (0,75 - 1,04) | 1,35E-01 | 3,36E-01        |

|               |           |      |               |          |                 |
|---------------|-----------|------|---------------|----------|-----------------|
| IgG1_G2FN     | operacija | 1,07 | (0,92 - 1,25) | 3,83E-01 | 5,96E-01        |
| IgG1_G2FNS    | operacija | 0,96 | (0,82 - 1,11) | 5,39E-01 | 7,08E-01        |
| IgG1_G2FS     | operacija | 0,9  | (0,77 - 1,06) | 1,93E-01 | 4,21E-01        |
| IgG1_G2FS2    | operacija | 0,89 | (0,76 - 1,04) | 1,50E-01 | 3,65E-01        |
| IgG1_G2S      | operacija | 0,97 | (0,83 - 1,13) | 6,94E-01 | 8,29E-01        |
| IgG1_M5G1S1F  | operacija | 0,93 | (0,80 - 1,08) | 3,55E-01 | 5,69E-01        |
| IgG23_G0      | operacija | 1,09 | (0,94 - 1,26) | 2,45E-01 | 4,89E-01        |
| IgG23_G0F     | operacija | 1,18 | (1,01 - 1,39) | 3,41E-02 | 1,53E-01        |
| IgG23_G0FN    | operacija | 1,51 | (1,28 - 1,77) | 3,87E-07 | <b>2,48E-05</b> |
| IgG23_G1      | operacija | 0,89 | (0,77 - 1,04) | 1,32E-01 | 3,31E-01        |
| IgG23_G1F     | operacija | 0,81 | (0,70 - 0,95) | 8,04E-03 | 6,16E-02        |
| IgG23_G1FN    | operacija | 1,12 | (0,96 - 1,31) | 1,53E-01 | 3,66E-01        |
| IgG23_G1FNS   | operacija | 1,11 | (0,95 - 1,28) | 1,79E-01 | 4,10E-01        |
| IgG23_G1FS    | operacija | 0,73 | (0,62 - 0,85) | 3,83E-05 | <b>1,22E-03</b> |
| IgG23_G2      | operacija | 0,88 | (0,76 - 1,03) | 1,06E-01 | 2,99E-01        |
| IgG23_G2F     | operacija | 0,79 | (0,67 - 0,93) | 4,42E-03 | 5,23E-02        |
| IgG23_G2FN    | operacija | 0,98 | (0,84 - 1,15) | 8,24E-01 | 9,00E-01        |
| IgG23_G2FNS   | operacija | 0,96 | (0,83 - 1,12) | 6,23E-01 | 7,77E-01        |
| IgG23_G2FS    | operacija | 0,75 | (0,64 - 0,89) | 5,50E-04 | <b>1,08E-02</b> |
| IgG23_G2FS2   | operacija | 0,87 | (0,75 - 1,02) | 7,45E-02 | 2,45E-01        |
| IgG23_G2S     | operacija | 0,88 | (0,75 - 1,02) | 8,90E-02 | 2,69E-01        |
| IgG23_M5G1S1F | operacija | 0,88 | (0,76 - 1,03) | 1,13E-01 | 3,02E-01        |
| IgG4_G0F      | operacija | 1,06 | (0,90 - 1,24) | 4,79E-01 | 6,67E-01        |
| IgG4_G0FN     | operacija | 1,23 | (1,05 - 1,45) | 1,12E-02 | 7,27E-02        |
| IgG4_G1F      | operacija | 0,87 | (0,74 - 1,01) | 6,94E-02 | 2,37E-01        |
| IgG4_G1FN     | operacija | 1,18 | (1,00 - 1,39) | 4,53E-02 | 1,84E-01        |
| IgG4_G1FNS    | operacija | 1,07 | (0,92 - 1,24) | 3,92E-01 | 6,02E-01        |
| IgG4_G1FS     | operacija | 0,84 | (0,72 - 0,98) | 2,49E-02 | 1,27E-01        |
| IgG4_G2F      | operacija | 0,88 | (0,75 - 1,03) | 1,21E-01 | 3,14E-01        |
| IgG4_G2FN     | operacija | 1,04 | (0,89 - 1,22) | 6,14E-01 | 7,70E-01        |
| IgG4_G2FNS    | operacija | 0,98 | (0,83 - 1,14) | 7,74E-01 | 8,71E-01        |
| IgG4_G2FS     | operacija | 0,86 | (0,73 - 1,02) | 7,65E-02 | 2,49E-01        |
| IgG4_G2FS2    | operacija | 1,02 | (0,87 - 1,18) | 8,35E-01 | 9,02E-01        |

### 3.5. Utjecaj lijekova

Kod UC pacijenata zabilježen je porast agalaktozilacije te pad monogalaktoziliranih i digalaktoziliranih glikoformi s upotrebom steroida u usporedbi s mesalazinom (Tablica 3.4.1-3.4.2)<sup>225</sup>. Isto nije opaženo i kod CD pacijenta (Tablica 3.4.3-3.4.4).<sup>225</sup>

**Tablica 3.4.1** Povezanost deriviranih IgG Fc-glikozilacijskih svojstava i upotrebe lijekova u UC-u. Povezanost deriviranih IgG Fc-glikozilacijskih svojstava i upotrebe lijekova (AZA/6MP=0, anti-TNF=1 te bez kortikosteroida uz mesalazin=0, kortikosteroidi=1), kod UC pacijenata, analizirana je logističkom regresijom uz dob i spol kao kovarijate. Prikazani su omjeri izgleda (OR) uz interval pouzdanosti (CI) od 95 %, P vrijednosti te prilagođene P vrijednosti (pril. P vrijednost) nakon korekcije na višestruko testiranje ( $\alpha=5\%$ ). Prilagođene, statistički značajne P vrijednosti otisnute su masno. Derivirana glikozilacijska svojstva izračunata su kao što je opisano u tablici 2.3.5.4, prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

| Derivirano svojstvo | Kliničko svojstvo    | OR   | 95% CI        | P vrijednost | pril. P vrijednost |
|---------------------|----------------------|------|---------------|--------------|--------------------|
| IgG1_A2B            | anti-TNF vs. AZA/6MP | 1,10 | (0,85 - 1,41) | 4,71E-01     | 7,58E-01           |
| IgG1_A2F            | anti-TNF vs. AZA/6MP | 0,97 | (0,75 - 1,26) | 8,38E-01     | 9,86E-01           |
| IgG1_A2G            | anti-TNF vs. AZA/6MP | 0,98 | (0,76 - 1,28) | 9,05E-01     | 9,86E-01           |
| IgG1_A2GS           | anti-TNF vs. AZA/6MP | 1,17 | (0,90 - 1,51) | 2,35E-01     | 4,51E-01           |
| IgG1_A2S            | anti-TNF vs. AZA/6MP | 1,08 | (0,84 - 1,41) | 5,39E-01     | 8,19E-01           |
| IgG1_agal           | anti-TNF vs. AZA/6MP | 1,06 | (0,82 - 1,37) | 6,43E-01     | 9,24E-01           |
| IgG1_digal          | anti-TNF vs. AZA/6MP | 1,04 | (0,80 - 1,36) | 7,66E-01     | 9,86E-01           |
| IgG1_monogal        | anti-TNF vs. AZA/6MP | 0,84 | (0,65 - 1,08) | 1,63E-01     | 3,68E-01           |
| IgG1_sial           | anti-TNF vs. AZA/6MP | 1,11 | (0,86 - 1,44) | 4,12E-01     | 6,94E-01           |
| IgG23_A2B           | anti-TNF vs. AZA/6MP | 0,99 | (0,76 - 1,28) | 9,29E-01     | 9,86E-01           |
| IgG23_A2F           | anti-TNF vs. AZA/6MP | 0,98 | (0,75 - 1,27) | 8,70E-01     | 9,86E-01           |
| IgG23_A2G           | anti-TNF vs. AZA/6MP | 0,98 | (0,74 - 1,30) | 9,07E-01     | 9,86E-01           |
| IgG23_A2GS          | anti-TNF vs. AZA/6MP | 0,99 | (0,76 - 1,29) | 9,48E-01     | 9,86E-01           |
| IgG23_A2S           | anti-TNF vs. AZA/6MP | 0,97 | (0,74 - 1,28) | 8,46E-01     | 9,86E-01           |
| IgG23_agal          | anti-TNF vs. AZA/6MP | 1,05 | (0,79 - 1,39) | 7,40E-01     | 9,74E-01           |
| IgG23_digal         | anti-TNF vs. AZA/6MP | 1,00 | (0,76 - 1,33) | 9,87E-01     | 9,87E-01           |
| IgG23_monogal       | anti-TNF vs. AZA/6MP | 0,88 | (0,68 - 1,15) | 3,60E-01     | 6,36E-01           |
| IgG23_sial          | anti-TNF vs. AZA/6MP | 0,99 | (0,75 - 1,30) | 9,19E-01     | 9,86E-01           |
| IgG4_A2FB           | anti-TNF vs. AZA/6MP | 1,27 | (0,97 - 1,67) | 8,09E-02     | 2,07E-01           |
| IgG4_A2FG           | anti-TNF vs. AZA/6MP | 0,99 | (0,76 - 1,30) | 9,67E-01     | 9,86E-01           |
| IgG4_A2FGS          | anti-TNF vs. AZA/6MP | 1,26 | (0,97 - 1,64) | 7,71E-02     | 2,01E-01           |



|               |                      |      |               |          |                 |
|---------------|----------------------|------|---------------|----------|-----------------|
| IgG4_A2FS     | anti-TNF vs. AZA/6MP | 1,08 | (0,83 - 1,41) | 5,62E-01 | 8,43E-01        |
| IgG4_agal     | anti-TNF vs. AZA/6MP | 1,07 | (0,82 - 1,39) | 6,36E-01 | 9,24E-01        |
| IgG4_digal    | anti-TNF vs. AZA/6MP | 1,10 | (0,84 - 1,43) | 4,76E-01 | 7,58E-01        |
| IgG4_monogal  | anti-TNF vs. AZA/6MP | 0,81 | (0,62 - 1,05) | 1,12E-01 | 2,72E-01        |
| IgG4_sial     | anti-TNF vs. AZA/6MP | 1,11 | (0,85 - 1,44) | 4,53E-01 | 7,45E-01        |
| IgG1_A2B      | Kortikosteroidi      | 0,82 | (0,70 - 0,97) | 2,16E-02 | 8,30E-02        |
| IgG1_A2F      | Kortikosteroidi      | 1,09 | (0,94 - 1,28) | 2,64E-01 | 4,95E-01        |
| IgG1_A2G      | Kortikosteroidi      | 0,69 | (0,58 - 0,83) | 3,40E-05 | <b>5,28E-04</b> |
| IgG1_A2GS     | Kortikosteroidi      | 1,00 | (0,85 - 1,17) | 9,54E-01 | 9,86E-01        |
| IgG1_A2S      | Kortikosteroidi      | 0,77 | (0,64 - 0,91) | 2,33E-03 | <b>1,24E-02</b> |
| IgG1_agal     | Kortikosteroidi      | 1,44 | (1,21 - 1,71) | 2,75E-05 | <b>5,28E-04</b> |
| IgG1_digal    | Kortikosteroidi      | 0,71 | (0,60 - 0,86) | 1,91E-04 | <b>1,55E-03</b> |
| IgG1_monogal  | Kortikosteroidi      | 0,75 | (0,64 - 0,88) | 3,20E-04 | <b>2,30E-03</b> |
| IgG1_sial     | Kortikosteroidi      | 0,77 | (0,65 - 0,92) | 3,29E-03 | <b>1,56E-02</b> |
| IgG23_A2B     | Kortikosteroidi      | 0,81 | (0,68 - 0,95) | 1,17E-02 | <b>4,81E-02</b> |
| IgG23_A2F     | Kortikosteroidi      | 0,97 | (0,83 - 1,13) | 6,89E-01 | 9,52E-01        |
| IgG23_A2G     | Kortikosteroidi      | 0,71 | (0,59 - 0,87) | 4,57E-04 | <b>2,87E-03</b> |
| IgG23_A2GS    | Kortikosteroidi      | 1,18 | (1,01 - 1,38) | 4,02E-02 | 1,29E-01        |
| IgG23_A2S     | Kortikosteroidi      | 0,86 | (0,72 - 1,03) | 1,03E-01 | 2,54E-01        |
| IgG23_agal    | Kortikosteroidi      | 1,44 | (1,19 - 1,74) | 1,23E-04 | <b>1,31E-03</b> |
| IgG23_digal   | Kortikosteroidi      | 0,75 | (0,62 - 0,91) | 3,11E-03 | <b>1,53E-02</b> |
| IgG23_monogal | Kortikosteroidi      | 0,70 | (0,59 - 0,84) | 4,15E-05 | <b>5,61E-04</b> |
| IgG23_sial    | Kortikosteroidi      | 0,87 | (0,73 - 1,04) | 1,34E-01 | 3,15E-01        |
| IgG4_A2FB     | Kortikosteroidi      | 0,83 | (0,70 - 0,98) | 2,62E-02 | 9,53E-02        |
| IgG4_A2FG     | Kortikosteroidi      | 0,72 | (0,61 - 0,87) | 3,34E-04 | <b>2,30E-03</b> |
| IgG4_A2FGS    | Kortikosteroidi      | 1,24 | (1,05 - 1,46) | 1,02E-02 | <b>4,40E-02</b> |
| IgG4_A2FS     | Kortikosteroidi      | 0,90 | (0,76 - 1,07) | 2,18E-01 | 4,35E-01        |
| IgG4_agal     | Kortikosteroidi      | 1,40 | (1,17 - 1,67) | 1,73E-04 | <b>1,54E-03</b> |
| IgG4_digal    | Kortikosteroidi      | 0,76 | (0,64 - 0,91) | 2,78E-03 | <b>1,42E-02</b> |
| IgG4_monogal  | Kortikosteroidi      | 0,72 | (0,61 - 0,85) | 1,19E-04 | <b>1,31E-03</b> |
| IgG4_sial     | Kortikosteroidi      | 0,89 | (0,75 - 1,05) | 1,61E-01 | 3,68E-01        |

**Tablica 3.4.2** Povezanost IgG Fc-glikana i upotrebe lijekova u UC-u. Povezanost IgG Fc-glikana i upotrebe lijekova (AZA/6MP=0, anti-TNF=1 te bez kortikosteroida uz mesalazin=0, kortikosteroidi=1), kod CD pacijenata, analizirana je logističkom regresijom uz dob i spol kao kovarijate. Prikazani su omjeri izgleda (OR) uz interval pouzdanosti (CI) od 95 %, P vrijednosti te prilagođene P vrijednosti (pril. P vrijednost) nakon korekcije na višestruko testiranje ( $\alpha=5\%$ ). Prilagođene, statistički značajne P vrijednosti otisnute su masno. Skraćena imena glikana opisana su u tablici 2.3.5.2, prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

| Glikan       | Kliničko svojstvo   | OR   | 95% CI        | P vrijednost | pril. P vrijednost |
|--------------|---------------------|------|---------------|--------------|--------------------|
| IgG1_G0      | antiTNF vs. AZA/6MP | NA   | (NA - NA)     | NA           | NA                 |
| IgG1_G0F     | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,04 | (0,80 - 1,34) | 7,90E-01     | 9,86E-01           |
| IgG1_G0FN    | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,17 | (0,91 - 1,50) | 2,27E-01     | 4,41E-01           |
| IgG1_G1      | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,00 | (0,76 - 1,30) | 9,72E-01     | 9,86E-01           |
| IgG1_G1F     | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,75 | (0,58 - 0,97) | 2,85E-02     | 9,88E-02           |
| IgG1_G1FN    | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,01 | (0,78 - 1,30) | 9,65E-01     | 9,86E-01           |
| IgG1_G1FS    | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,02 | (0,79 - 1,32) | 8,55E-01     | 9,86E-01           |
| IgG1_G1N     | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,97 | (0,74 - 1,27) | 8,46E-01     | 9,86E-01           |
| IgG1_G1S     | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,09 | (0,85 - 1,41) | 4,83E-01     | 7,58E-01           |
| IgG1_G2      | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,98 | (0,76 - 1,28) | 9,07E-01     | 9,86E-01           |
| IgG1_G2F     | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,98 | (0,75 - 1,29) | 9,09E-01     | 9,86E-01           |
| IgG1_G2FN    | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,11 | (0,85 - 1,45) | 4,28E-01     | 7,11E-01           |
| IgG1_G2FNS   | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,74 | (0,56 - 0,96) | 2,26E-02     | 8,44E-02           |
| IgG1_G2FS    | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,20 | (0,92 - 1,56) | 1,75E-01     | 3,75E-01           |
| IgG1_G2FS2   | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,94 | (0,72 - 1,22) | 6,20E-01     | 9,10E-01           |
| IgG1_G2S     | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,10 | (0,85 - 1,42) | 4,84E-01     | 7,58E-01           |
| IgG1_M5G1S1F | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,99 | (0,77 - 1,28) | 9,44E-01     | 9,86E-01           |
| IgG23_G0     | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,02 | (0,78 - 1,34) | 8,71E-01     | 9,86E-01           |
| IgG23_G0F    | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,01 | (0,77 - 1,33) | 9,25E-01     | 9,86E-01           |
| IgG23_G0FN   | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,03 | (0,80 - 1,33) | 8,20E-01     | 9,86E-01           |
| IgG23_G1     | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,05 | (0,81 - 1,35) | 7,20E-01     | 9,74E-01           |
| IgG23_G1F    | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,86 | (0,66 - 1,12) | 2,66E-01     | 4,95E-01           |

|               |                     |      |               |          |                 |
|---------------|---------------------|------|---------------|----------|-----------------|
| IgG23_G1FN    | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,03 | (0,79 - 1,36) | 8,13E-01 | 9,86E-01        |
| IgG23_G1FNS   | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,76 | (0,57 - 1,02) | 5,64E-02 | 1,66E-01        |
| IgG23_G1FS    | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,99 | (0,77 - 1,29) | 9,59E-01 | 9,86E-01        |
| IgG23_G2      | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,89 | (0,68 - 1,16) | 3,89E-01 | 6,65E-01        |
| IgG23_G2F     | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,97 | (0,73 - 1,30) | 8,60E-01 | 9,86E-01        |
| IgG23_G2FN    | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,04 | (0,78 - 1,38) | 7,90E-01 | 9,86E-01        |
| IgG23_G2FNS   | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,78 | (0,60 - 1,03) | 7,67E-02 | 2,01E-01        |
| IgG23_G2FS    | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,09 | (0,83 - 1,44) | 5,40E-01 | 8,19E-01        |
| IgG23_G2FS2   | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,83 | (0,63 - 1,09) | 1,79E-01 | 3,75E-01        |
| IgG23_G2S     | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,93 | (0,71 - 1,22) | 5,97E-01 | 8,86E-01        |
| IgG23_M5G1S1F | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,32 | (1,03 - 1,70) | 2,86E-02 | 9,88E-02        |
| IgG4_G0F      | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,00 | (0,76 - 1,30) | 9,79E-01 | 9,86E-01        |
| IgG4_G0FN     | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,29 | (1,00 - 1,68) | 5,04E-02 | 1,51E-01        |
| IgG4_G1F      | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,73 | (0,56 - 0,96) | 2,11E-02 | 8,30E-02        |
| IgG4_G1FN     | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,05 | (0,80 - 1,38) | 7,34E-01 | 9,74E-01        |
| IgG4_G1FNS    | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,14 | (0,88 - 1,48) | 3,34E-01 | 5,98E-01        |
| IgG4_G1FS     | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,99 | (0,76 - 1,29) | 9,39E-01 | 9,86E-01        |
| IgG4_G2F      | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,99 | (0,75 - 1,29) | 9,21E-01 | 9,86E-01        |
| IgG4_G2FN     | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,20 | (0,92 - 1,57) | 1,75E-01 | 3,75E-01        |
| IgG4_G2FNS    | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,86 | (0,65 - 1,13) | 2,70E-01 | 4,97E-01        |
| IgG4_G2FS     | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,19 | (0,91 - 1,55) | 2,08E-01 | 4,23E-01        |
| IgG4_G2FS2    | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,89 | (0,67 - 1,18) | 3,90E-01 | 6,65E-01        |
| IgG1_G0F      | Kortikosteroidi     | 1,49 | (1,25 - 1,76) | 2,80E-06 | <b>1,29E-04</b> |
| IgG1_G0FN     | Kortikosteroidi     | 1,09 | (0,92 - 1,30) | 3,12E-01 | 5,66E-01        |
| IgG1_G1       | Kortikosteroidi     | 0,97 | (0,83 - 1,13) | 6,90E-01 | 9,52E-01        |
| IgG1_G1F      | Kortikosteroidi     | 0,85 | (0,73 - 1,00) | 4,55E-02 | 1,39E-01        |
| IgG1_G1FN     | Kortikosteroidi     | 0,75 | (0,64 - 0,89) | 5,57E-04 | <b>3,34E-03</b> |
| IgG1_G1FS     | Kortikosteroidi     | 1,16 | (0,99 - 1,35) | 6,60E-02 | 1,86E-01        |
| IgG1_G1N      | Kortikosteroidi     | 0,86 | (0,74 - 1,01) | 6,97E-02 | 1,90E-01        |
| IgG1_G1S      | Kortikosteroidi     | 0,93 | (0,80 - 1,09) | 3,65E-01 | 6,37E-01        |
| IgG1_G2       | Kortikosteroidi     | 0,86 | (0,73 - 1,01) | 6,20E-02 | 1,78E-01        |
| IgG1_G2F      | Kortikosteroidi     | 0,72 | (0,60 - 0,86) | 2,20E-04 | <b>1,69E-03</b> |
| IgG1_G2FN     | Kortikosteroidi     | 0,69 | (0,59 - 0,82) | 1,34E-05 | <b>3,69E-04</b> |

|               |                 |      |               |          |                 |
|---------------|-----------------|------|---------------|----------|-----------------|
| IgG1_G2FNS    | Kortikosteroidi | 0,85 | (0,73 - 1,00) | 4,22E-02 | 1,32E-01        |
| IgG1_G2FS     | Kortikosteroidi | 0,83 | (0,70 - 0,99) | 3,24E-02 | 1,06E-01        |
| IgG1_G2FS2    | Kortikosteroidi | 0,76 | (0,65 - 0,90) | 1,52E-03 | <b>8,76E-03</b> |
| IgG1_G2S      | Kortikosteroidi | 0,87 | (0,74 - 1,02) | 8,54E-02 | 2,14E-01        |
| IgG1_M5G1S1F  | Kortikosteroidi | 1,19 | (1,01 - 1,40) | 3,15E-02 | 1,06E-01        |
| IgG23_G0      | Kortikosteroidi | 1,16 | (0,99 - 1,36) | 7,02E-02 | 1,90E-01        |
| IgG23_G0F     | Kortikosteroidi | 1,45 | (1,21 - 1,75) | 4,47E-05 | <b>5,61E-04</b> |
| IgG23_G0FN    | Kortikosteroidi | 1,02 | (0,85 - 1,23) | 8,04E-01 | 9,86E-01        |
| IgG23_G1      | Kortikosteroidi | 1,04 | (0,89 - 1,21) | 6,51E-01 | 9,27E-01        |
| IgG23_G1F     | Kortikosteroidi | 0,77 | (0,65 - 0,91) | 2,03E-03 | <b>1,12E-02</b> |
| IgG23_G1FN    | Kortikosteroidi | 0,68 | (0,58 - 0,81) | 6,63E-06 | <b>2,29E-04</b> |
| IgG23_G1FNS   | Kortikosteroidi | 1,02 | (0,87 - 1,20) | 8,18E-01 | 9,86E-01        |
| IgG23_G1FS    | Kortikosteroidi | 0,97 | (0,83 - 1,14) | 7,33E-01 | 9,74E-01        |
| IgG23_G2      | Kortikosteroidi | 0,99 | (0,84 - 1,16) | 8,77E-01 | 9,86E-01        |
| IgG23_G2F     | Kortikosteroidi | 0,70 | (0,58 - 0,85) | 1,79E-04 | <b>1,54E-03</b> |
| IgG23_G2FN    | Kortikosteroidi | 0,65 | (0,54 - 0,77) | 1,23E-06 | <b>8,48E-05</b> |
| IgG23_G2FNS   | Kortikosteroidi | 0,80 | (0,68 - 0,94) | 5,83E-03 | <b>2,60E-02</b> |
| IgG23_G2FS    | Kortikosteroidi | 0,89 | (0,75 - 1,07) | 2,05E-01 | 4,21E-01        |
| IgG23_G2FS2   | Kortikosteroidi | 0,80 | (0,68 - 0,96) | 1,19E-02 | <b>4,81E-02</b> |
| IgG23_G2S     | Kortikosteroidi | 0,97 | (0,83 - 1,14) | 7,41E-01 | 9,74E-01        |
| IgG23_M5G1S1F | Kortikosteroidi | 1,74 | (1,44 - 2,11) | 8,41E-10 | <b>1,16E-07</b> |
| IgG4_G0F      | Kortikosteroidi | 1,44 | (1,21 - 1,71) | 2,91E-05 | <b>5,28E-04</b> |
| IgG4_G0FN     | Kortikosteroidi | 1,06 | (0,89 - 1,25) | 5,24E-01 | 8,13E-01        |
| IgG4_G1F      | Kortikosteroidi | 0,78 | (0,65 - 0,92) | 3,42E-03 | <b>1,57E-02</b> |
| IgG4_G1FN     | Kortikosteroidi | 0,73 | (0,61 - 0,86) | 1,40E-04 | <b>1,38E-03</b> |
| IgG4_G1FNS    | Kortikosteroidi | 0,90 | (0,76 - 1,05) | 1,78E-01 | 3,75E-01        |
| IgG4_G1FS     | Kortikosteroidi | 0,97 | (0,82 - 1,13) | 6,79E-01 | 9,52E-01        |
| IgG4_G2F      | Kortikosteroidi | 0,72 | (0,60 - 0,87) | 4,24E-04 | <b>2,78E-03</b> |
| IgG4_G2FN     | Kortikosteroidi | 0,70 | (0,59 - 0,83) | 3,44E-05 | <b>5,28E-04</b> |
| IgG4_G2FNS    | Kortikosteroidi | 0,88 | (0,74 - 1,04) | 1,19E-01 | 2,82E-01        |
| IgG4_G2FS     | Kortikosteroidi | 0,89 | (0,75 - 1,06) | 1,79E-01 | 3,75E-01        |
| IgG4_G2FS2    | Kortikosteroidi | 0,91 | (0,77 - 1,06) | 2,27E-01 | 4,41E-01        |

**Tablica 3.4.3** Povezanost deriviranih IgG Fc-glikozilacijskih svojstava i upotrebe lijekova u CD-u. Povezanost deriviranih IgG Fc-glikozilacijskih svojstava i upotrebe lijekova (AZA/6MP=0, anti-TNF=1 te bez kortikosteroida uz mesalazin=0, kortikosteroidi=1), kod CD pacijenata, analizirana je logističkom regresijom uz dob i spol kao kovarijate. Prikazani su omjeri izgleda (OR) uz interval pouzdanosti (CI) od 95 %, P vrijednosti te prilagođene P vrijednosti (pril. P vrijednost) nakon korekcije na višestruko testiranje ( $\alpha=5$  %). Prilagođene, statistički značajne P vrijednosti otisnute su masno. Derivirana glikozilacijska svojstva izračunata su kao što je opisano u tablici 2.3.5.4, prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

| Derivirano svojstvo | Kliničko svojstvo   | OR   | 95% CI        | P vrijednost | pril. P vrijednost |
|---------------------|---------------------|------|---------------|--------------|--------------------|
| IgG1_A2B            | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,95 | (0,75 - 1,19) | 6,35E-01     | 7,51E-01           |
| IgG1_A2F            | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,14 | (0,91 - 1,42) | 2,52E-01     | 4,53E-01           |
| IgG1_A2G            | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,73 | (0,58 - 0,92) | 6,35E-03     | 1,04E-01           |
| IgG1_A2GS           | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,00 | (0,80 - 1,25) | 9,94E-01     | 9,96E-01           |
| IgG1_A2S            | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,82 | (0,65 - 1,02) | 7,42E-02     | 2,69E-01           |
| IgG1_agal           | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,37 | (1,09 - 1,73) | 6,75E-03     | 1,04E-01           |
| IgG1_digal          | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,74 | (0,59 - 0,93) | 9,82E-03     | 1,13E-01           |
| IgG1_monogal        | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,78 | (0,62 - 0,98) | 2,70E-02     | 2,25E-01           |
| IgG1_sial           | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,83 | (0,66 - 1,03) | 9,33E-02     | 2,78E-01           |
| IgG23_A2B           | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,94 | (0,75 - 1,18) | 6,16E-01     | 7,42E-01           |
| IgG23_A2F           | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,13 | (0,91 - 1,39) | 2,63E-01     | 4,66E-01           |
| IgG23_A2G           | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,79 | (0,63 - 0,99) | 3,70E-02     | 2,32E-01           |
| IgG23_A2GS          | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,17 | (0,95 - 1,46) | 1,42E-01     | 3,20E-01           |
| IgG23_A2S           | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,89 | (0,71 - 1,11) | 2,95E-01     | 5,10E-01           |
| IgG23_agal          | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,29 | (1,03 - 1,62) | 2,58E-02     | 2,25E-01           |
| IgG23_digal         | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,79 | (0,63 - 1,00) | 4,53E-02     | 2,32E-01           |
| IgG23_monogal       | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,80 | (0,64 - 1,00) | 4,55E-02     | 2,32E-01           |
| IgG23_sial          | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,89 | (0,71 - 1,11) | 3,14E-01     | 5,18E-01           |
| IgG4_A2FB           | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,93 | (0,73 - 1,19) | 5,65E-01     | 7,15E-01           |
| IgG4_A2FG           | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,87 | (0,69 - 1,10) | 2,40E-01     | 4,48E-01           |
| IgG4_A2FGS          | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,00 | (0,81 - 1,24) | 9,96E-01     | 9,96E-01           |
| IgG4_A2FS           | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,90 | (0,72 - 1,12) | 3,34E-01     | 5,27E-01           |
|                     |                     |      |               |              |                    |

|                      |                            |      |               |          |          |
|----------------------|----------------------------|------|---------------|----------|----------|
| <b>IgG4_agal</b>     | <b>antiTNF vs. AZA/6MP</b> | 1,15 | (0,91 - 1,44) | 2,31E-01 | 4,40E-01 |
| <b>IgG4_digal</b>    | <b>antiTNF vs. AZA/6MP</b> | 0,86 | (0,68 - 1,08) | 1,86E-01 | 3,83E-01 |
| <b>IgG4_monogal</b>  | <b>antiTNF vs. AZA/6MP</b> | 0,87 | (0,70 - 1,09) | 2,28E-01 | 4,40E-01 |
| <b>IgG4_sial</b>     | <b>antiTNF vs. AZA/6MP</b> | 0,90 | (0,72 - 1,12) | 3,38E-01 | 5,27E-01 |
| <b>IgG1_A2B</b>      | <b>Kortikosteroidi</b>     | 0,77 | (0,61 - 0,96) | 1,80E-02 | 1,91E-01 |
| <b>IgG1_A2F</b>      | <b>Kortikosteroidi</b>     | 1,02 | (0,83 - 1,26) | 8,53E-01 | 9,27E-01 |
| <b>IgG1_A2G</b>      | <b>Kortikosteroidi</b>     | 0,81 | (0,65 - 1,01) | 6,20E-02 | 2,56E-01 |
| <b>IgG1_A2GS</b>     | <b>Kortikosteroidi</b>     | 0,88 | (0,72 - 1,08) | 2,33E-01 | 4,40E-01 |
| <b>IgG1_A2S</b>      | <b>Kortikosteroidi</b>     | 0,80 | (0,64 - 1,00) | 4,41E-02 | 2,32E-01 |
| <b>IgG1_agal</b>     | <b>Kortikosteroidi</b>     | 1,21 | (0,97 - 1,50) | 8,98E-02 | 2,78E-01 |
| <b>IgG1_digal</b>    | <b>Kortikosteroidi</b>     | 0,80 | (0,64 - 1,00) | 5,06E-02 | 2,32E-01 |
| <b>IgG1_monogal</b>  | <b>Kortikosteroidi</b>     | 0,92 | (0,74 - 1,13) | 4,00E-01 | 5,81E-01 |
| <b>IgG1_sial</b>     | <b>Kortikosteroidi</b>     | 0,82 | (0,66 - 1,02) | 6,86E-02 | 2,56E-01 |
| <b>IgG23_A2B</b>     | <b>Kortikosteroidi</b>     | 0,95 | (0,76 - 1,18) | 6,18E-01 | 7,42E-01 |
| <b>IgG23_A2F</b>     | <b>Kortikosteroidi</b>     | 1,09 | (0,89 - 1,35) | 3,95E-01 | 5,80E-01 |
| <b>IgG23_A2G</b>     | <b>Kortikosteroidi</b>     | 0,94 | (0,75 - 1,18) | 5,96E-01 | 7,33E-01 |
| <b>IgG23_A2GS</b>    | <b>Kortikosteroidi</b>     | 1,19 | (0,96 - 1,47) | 1,02E-01 | 2,78E-01 |
| <b>IgG23_A2S</b>     | <b>Kortikosteroidi</b>     | 1,07 | (0,86 - 1,34) | 5,50E-01 | 7,03E-01 |
| <b>IgG23_agal</b>    | <b>Kortikosteroidi</b>     | 1,08 | (0,86 - 1,36) | 4,98E-01 | 6,61E-01 |
| <b>IgG23_digal</b>   | <b>Kortikosteroidi</b>     | 0,95 | (0,75 - 1,19) | 6,39E-01 | 7,51E-01 |
| <b>IgG23_monogal</b> | <b>Kortikosteroidi</b>     | 0,92 | (0,74 - 1,15) | 4,71E-01 | 6,50E-01 |
| <b>IgG23_sial</b>    | <b>Kortikosteroidi</b>     | 1,08 | (0,86 - 1,35) | 4,98E-01 | 6,61E-01 |
| <b>IgG4_A2FB</b>     | <b>Kortikosteroidi</b>     | 0,82 | (0,65 - 1,03) | 8,66E-02 | 2,78E-01 |
| <b>IgG4_A2FG</b>     | <b>Kortikosteroidi</b>     | 0,80 | (0,64 - 1,00) | 5,21E-02 | 2,32E-01 |
| <b>IgG4_A2FGS</b>    | <b>Kortikosteroidi</b>     | 0,92 | (0,75 - 1,13) | 4,25E-01 | 6,11E-01 |
| <b>IgG4_A2FS</b>     | <b>Kortikosteroidi</b>     | 0,82 | (0,66 - 1,02) | 6,61E-02 | 2,56E-01 |
| <b>IgG4_agal</b>     | <b>Kortikosteroidi</b>     | 1,18 | (0,95 - 1,47) | 1,35E-01 | 3,10E-01 |
| <b>IgG4_digal</b>    | <b>Kortikosteroidi</b>     | 0,78 | (0,63 - 0,98) | 3,09E-02 | 2,25E-01 |
| <b>IgG4_monogal</b>  | <b>Kortikosteroidi</b>     | 0,90 | (0,73 - 1,12) | 3,39E-01 | 5,27E-01 |
| <b>IgG4_sial</b>     | <b>Kortikosteroidi</b>     | 0,82 | (0,66 - 1,02) | 6,80E-02 | 2,56E-01 |

**Tablica 3.4.4** Povezanost IgG Fc-glikana i upotrebe lijekova u CD-u. Povezanost IgG Fc-glikana i upotrebe lijekova (AZA/6MP=0, anti-TNF=1 te bez kortikosteroida uz mesalazin=0, kortikosteroidi=1), kod CD pacijenata, analizirana je logističkom regresijom uz dob i spol kao kovarijate. Prikazani su omjeri izgleda (OR) uz interval pouzdanosti (CI) od 95 %, P vrijednosti te prilagođene P vrijednosti (pril. P vrijednost) nakon korekcije na višestruko testiranje ( $\alpha=5\%$ ). Prilagođene, statistički značajne P vrijednosti otisnute su masno. Skraćena imena glikana opisana su u tablici 2.3.5.2, prilagođeno iz Šimurina et al, 2018.<sup>225</sup>

| Glikan       | Kliničko svojstvo   | OR   | 95% CI        | P vrijednost | pril. P vrijednost |
|--------------|---------------------|------|---------------|--------------|--------------------|
| IgG1_G0      | antiTNF vs. AZA/6MP | NA   | NA            | NA           | NA                 |
| IgG1_G0F     | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,38 | (1,09 - 1,74) | 5,97E-03     | 1,04E-01           |
| IgG1_G0FN    | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,21 | (0,96 - 1,53) | 1,01E-01     | 2,78E-01           |
| IgG1_G1      | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,93 | (0,75 - 1,16) | 5,34E-01     | 6,95E-01           |
| IgG1_G1F     | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,82 | (0,65 - 1,03) | 8,07E-02     | 2,78E-01           |
| IgG1_G1FN    | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,82 | (0,65 - 1,03) | 9,05E-02     | 2,78E-01           |
| IgG1_G1FS    | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,20 | (0,96 - 1,50) | 9,88E-02     | 2,78E-01           |
| IgG1_G1N     | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,89 | (0,71 - 1,12) | 3,22E-01     | 5,23E-01           |
| IgG1_G1S     | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,85 | (0,68 - 1,05) | 1,26E-01     | 3,00E-01           |
| IgG1_G2      | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,84 | (0,67 - 1,05) | 1,22E-01     | 3,00E-01           |
| IgG1_G2F     | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,74 | (0,59 - 0,93) | 9,74E-03     | 1,13E-01           |
| IgG1_G2FN    | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,71 | (0,56 - 0,90) | 4,00E-03     | 1,04E-01           |
| IgG1_G2FNS   | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,89 | (0,72 - 1,11) | 3,02E-01     | 5,15E-01           |
| IgG1_G2FS    | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,84 | (0,67 - 1,05) | 1,24E-01     | 3,00E-01           |
| IgG1_G2FS2   | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,83 | (0,66 - 1,03) | 9,23E-02     | 2,78E-01           |
| IgG1_G2S     | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,86 | (0,69 - 1,06) | 1,59E-01     | 3,48E-01           |
| IgG1_M5G1S1F | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,01 | (0,82 - 1,26) | 8,96E-01     | 9,59E-01           |
| IgG23_G0     | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,02 | (0,83 - 1,27) | 8,22E-01     | 9,19E-01           |
| IgG23_G0F    | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,30 | (1,04 - 1,63) | 2,07E-02     | 2,04E-01           |
| IgG23_G0FN   | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,05 | (0,84 - 1,32) | 6,42E-01     | 7,51E-01           |
| IgG23_G1     | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,88 | (0,71 - 1,08) | 2,15E-01     | 4,23E-01           |
| IgG23_G1F    | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,85 | (0,68 - 1,05) | 1,30E-01     | 3,03E-01           |
| IgG23_G1FN   | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,79 | (0,62 - 1,00) | 4,58E-02     | 2,32E-01           |
|              |                     |      |               |              |                    |

|               |                     |      |               |          |                 |
|---------------|---------------------|------|---------------|----------|-----------------|
| IgG23_G1FNS   | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,20 | (0,97 - 1,49) | 8,52E-02 | 2,78E-01        |
| IgG23_G1FS    | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,97 | (0,79 - 1,21) | 8,14E-01 | 9,19E-01        |
| IgG23_G2      | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,81 | (0,65 - 1,00) | 4,90E-02 | 2,32E-01        |
| IgG23_G2F     | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,83 | (0,66 - 1,04) | 1,03E-01 | 2,78E-01        |
| IgG23_G2FN    | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,79 | (0,62 - 1,00) | 4,63E-02 | 2,32E-01        |
| IgG23_G2FNS   | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,01 | (0,82 - 1,25) | 9,22E-01 | 9,78E-01        |
| IgG23_G2FS    | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,84 | (0,67 - 1,05) | 1,26E-01 | 3,00E-01        |
| IgG23_G2FS2   | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,93 | (0,75 - 1,15) | 4,91E-01 | 6,61E-01        |
| IgG23_G2S     | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,80 | (0,65 - 0,99) | 4,05E-02 | 2,32E-01        |
| IgG23_M5G1S1F | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,09 | (0,88 - 1,35) | 4,38E-01 | 6,17E-01        |
| IgG4_G0F      | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,18 | (0,94 - 1,48) | 1,46E-01 | 3,25E-01        |
| IgG4_G0FN     | antiTNF vs. AZA/6MP | 1,02 | (0,81 - 1,30) | 8,39E-01 | 9,19E-01        |
| IgG4_G1F      | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,91 | (0,72 - 1,14) | 3,93E-01 | 5,80E-01        |
| IgG4_G1FN     | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,87 | (0,69 - 1,10) | 2,53E-01 | 4,53E-01        |
| IgG4_G1FNS    | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,94 | (0,76 - 1,17) | 5,97E-01 | 7,33E-01        |
| IgG4_G1FS     | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,93 | (0,74 - 1,15) | 4,98E-01 | 6,61E-01        |
| IgG4_G2F      | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,86 | (0,69 - 1,08) | 1,95E-01 | 3,95E-01        |
| IgG4_G2FN     | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,80 | (0,63 - 1,01) | 5,99E-02 | 2,56E-01        |
| IgG4_G2FNS    | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,87 | (0,69 - 1,10) | 2,45E-01 | 4,51E-01        |
| IgG4_G2FS     | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,90 | (0,72 - 1,13) | 3,51E-01 | 5,38E-01        |
| IgG4_G2FS2    | antiTNF vs. AZA/6MP | 0,90 | (0,72 - 1,12) | 3,40E-01 | 5,27E-01        |
| IgG1_G0F      | Kortikosteroidi     | 1,27 | (1,02 - 1,58) | 3,10E-02 | 2,25E-01        |
| IgG1_G0FN     | Kortikosteroidi     | 1,00 | (0,80 - 1,25) | 9,76E-01 | 9,96E-01        |
| IgG1_G1       | Kortikosteroidi     | 1,06 | (0,86 - 1,30) | 6,00E-01 | 7,33E-01        |
| IgG1_G1F      | Kortikosteroidi     | 1,09 | (0,88 - 1,34) | 4,32E-01 | 6,14E-01        |
| IgG1_G1FN     | Kortikosteroidi     | 0,73 | (0,59 - 0,91) | 4,77E-03 | 1,04E-01        |
| IgG1_G1FS     | Kortikosteroidi     | 1,18 | (0,96 - 1,44) | 1,19E-01 | 3,00E-01        |
| IgG1_G1N      | Kortikosteroidi     | 0,89 | (0,72 - 1,10) | 2,96E-01 | 5,10E-01        |
| IgG1_G1S      | Kortikosteroidi     | 0,74 | (0,60 - 0,92) | 4,81E-03 | 1,04E-01        |
| IgG1_G2       | Kortikosteroidi     | 1,01 | (0,81 - 1,25) | 9,48E-01 | 9,96E-01        |
| IgG1_G2F      | Kortikosteroidi     | 0,84 | (0,67 - 1,05) | 1,13E-01 | 3,00E-01        |
| IgG1_G2FN     | Kortikosteroidi     | 0,67 | (0,54 - 0,84) | 3,15E-04 | <b>4,34E-02</b> |
| IgG1_G2FNS    | Kortikosteroidi     | 0,76 | (0,62 - 0,93) | 7,92E-03 | 1,09E-01        |
| IgG1_G2FS     | Kortikosteroidi     | 0,83 | (0,67 - 1,04) | 1,01E-01 | 2,78E-01        |



|                      |                        |      |               |          |          |
|----------------------|------------------------|------|---------------|----------|----------|
| <b>IgG1_G2FS2</b>    | <b>Kortikosteroidi</b> | 0,81 | (0,65 - 1,00) | 4,86E-02 | 2,32E-01 |
| <b>IgG1_G2S</b>      | <b>Kortikosteroidi</b> | 0,99 | (0,80 - 1,23) | 9,57E-01 | 9,96E-01 |
| <b>IgG1_M5G1S1F</b>  | <b>Kortikosteroidi</b> | 0,91 | (0,74 - 1,12) | 3,65E-01 | 5,53E-01 |
| <b>IgG23_G0</b>      | <b>Kortikosteroidi</b> | 0,90 | (0,73 - 1,11) | 3,10E-01 | 5,18E-01 |
| <b>IgG23_G0F</b>     | <b>Kortikosteroidi</b> | 1,11 | (0,89 - 1,38) | 3,71E-01 | 5,56E-01 |
| <b>IgG23_G0FN</b>    | <b>Kortikosteroidi</b> | 0,98 | (0,78 - 1,22) | 8,31E-01 | 9,19E-01 |
| <b>IgG23_G1</b>      | <b>Kortikosteroidi</b> | 0,87 | (0,70 - 1,07) | 1,80E-01 | 3,75E-01 |
| <b>IgG23_G1F</b>     | <b>Kortikosteroidi</b> | 1,00 | (0,81 - 1,24) | 9,96E-01 | 9,96E-01 |
| <b>IgG23_G1FN</b>    | <b>Kortikosteroidi</b> | 0,86 | (0,69 - 1,07) | 1,69E-01 | 3,61E-01 |
| <b>IgG23_G1FNS</b>   | <b>Kortikosteroidi</b> | 1,15 | (0,93 - 1,43) | 2,00E-01 | 3,99E-01 |
| <b>IgG23_G1FS</b>    | <b>Kortikosteroidi</b> | 1,07 | (0,86 - 1,32) | 5,37E-01 | 6,95E-01 |
| <b>IgG23_G2</b>      | <b>Kortikosteroidi</b> | 0,93 | (0,75 - 1,14) | 4,71E-01 | 6,50E-01 |
| <b>IgG23_G2F</b>     | <b>Kortikosteroidi</b> | 0,96 | (0,76 - 1,20) | 6,97E-01 | 8,08E-01 |
| <b>IgG23_G2FN</b>    | <b>Kortikosteroidi</b> | 0,85 | (0,68 - 1,07) | 1,70E-01 | 3,61E-01 |
| <b>IgG23_G2FNS</b>   | <b>Kortikosteroidi</b> | 1,02 | (0,83 - 1,26) | 8,38E-01 | 9,19E-01 |
| <b>IgG23_G2FS</b>    | <b>Kortikosteroidi</b> | 0,93 | (0,74 - 1,17) | 5,39E-01 | 6,95E-01 |
| <b>IgG23_G2FS2</b>   | <b>Kortikosteroidi</b> | 1,03 | (0,83 - 1,28) | 7,73E-01 | 8,81E-01 |
| <b>IgG23_G2S</b>     | <b>Kortikosteroidi</b> | 0,97 | (0,78 - 1,19) | 7,45E-01 | 8,57E-01 |
| <b>IgG23_M5G1S1F</b> | <b>Kortikosteroidi</b> | 1,21 | (0,97 - 1,52) | 8,77E-02 | 2,78E-01 |
| <b>IgG4_G0F</b>      | <b>Kortikosteroidi</b> | 1,28 | (1,02 - 1,59) | 2,87E-02 | 2,25E-01 |
| <b>IgG4_G0FN</b>     | <b>Kortikosteroidi</b> | 0,98 | (0,79 - 1,22) | 8,63E-01 | 9,31E-01 |
| <b>IgG4_G1F</b>      | <b>Kortikosteroidi</b> | 1,00 | (0,81 - 1,24) | 9,86E-01 | 9,96E-01 |
| <b>IgG4_G1FN</b>     | <b>Kortikosteroidi</b> | 0,79 | (0,63 - 0,99) | 4,22E-02 | 2,32E-01 |
| <b>IgG4_G1FNS</b>    | <b>Kortikosteroidi</b> | 0,94 | (0,76 - 1,16) | 5,75E-01 | 7,21E-01 |
| <b>IgG4_G1FS</b>     | <b>Kortikosteroidi</b> | 0,90 | (0,73 - 1,11) | 3,15E-01 | 5,18E-01 |
| <b>IgG4_G2F</b>      | <b>Kortikosteroidi</b> | 0,81 | (0,65 - 1,02) | 6,68E-02 | 2,56E-01 |
| <b>IgG4_G2FN</b>     | <b>Kortikosteroidi</b> | 0,73 | (0,58 - 0,92) | 6,55E-03 | 1,04E-01 |
| <b>IgG4_G2FNS</b>    | <b>Kortikosteroidi</b> | 0,73 | (0,59 - 0,91) | 4,71E-03 | 1,04E-01 |
| <b>IgG4_G2FS</b>     | <b>Kortikosteroidi</b> | 0,84 | (0,68 - 1,05) | 1,21E-01 | 3,00E-01 |
| <b>IgG4_G2FS2</b>    | <b>Kortikosteroidi</b> | 1,00 | (0,81 - 1,23) | 9,64E-01 | 9,96E-01 |

## § 4. RASPRAVA

Promijenjena glikozilacija u IBD-u zabilježena je u različitim modelima.<sup>235,236</sup> IgG Fc-glikozilacija ima važnu ulogu u velikom broju upalnih procesa<sup>237</sup> uključujući i IBD<sup>185</sup>. U ovom istraživanju, po prvi puta, kod IBD pacijenata analizirana je IgG Fc-glikozilacija po potklasama, visoko protočnom nanoLC-MS metodom.<sup>140</sup> Dosada, IgG glikom u IBD-u je analiziran samo na razini oslobođenih glikana<sup>143</sup> pa podaci o glikozilaciji po potklasama nisu bili poznati. Također, nije se promatrala odvojeno Fc- i Fab-glikozilacija što je dodatno otežavalo interpretaciju rezultata. S obzirom kako je već poznato da su promjene glikozilacije IgG-a specifične za potklase<sup>192</sup>, bilo je važno to pobliže istražiti u IBD-u.

Osim fukozilacije, sve promjene u Fc-glikozilaciji IgG-a specifične za potklase, idu u istim smjerovima kod UC-a i CD-i u odnosu na HC. Povezanosti između galaktozilacije i sijalinizacije s bolesti su jače izražene kod CD-a nego kod UC-a. Općenito, Fc-galaktozilacija IgG-a je snižena kod IBD pacijenata u odnosu na HC. Snižena IgG galaktozilacija u IBD-u je zabilježena na razini ukupnog *N*-glikoma IgG-a<sup>185</sup>, a ovo istraživanje je pokazalo kako to nije specifično za potklase već se podjednako događa u svima (Slika 3.1)<sup>225</sup>. Smanjena Fc-galaktozilacija IgG-a je zabilježena u različitim upalnim bolestima.<sup>185</sup> S obzirom kako se IgG galaktozilacija smanjuje s dobi<sup>167</sup>, spomenute promjene su najvjerojatnije povezane s upalom općenito i nisu specifične za IBD. S druge strane, smanjena galaktozilacija antigen specifičnih antitijela u reumatoidnom artritisu prethodi pojavi bolesti<sup>238,239</sup> što govori u prilog tome da se razlike u IgG galaktozilaciji među pojedincima mogu povezati s predisponirajućim faktorima za razvoj upalnih bolesti, uključujući i IBD<sup>240</sup>. Nedavno je otkriveno kako 5 (*IKZF1*, *LAMB1*, *MGAT3*, *IL6ST*, and *BACH2*) od 16 genskih lokusa povezanih s glikozilacijom IgG-a, a otkrivenih GWAS-om, pokazuju pleiotropiju s genskim lokusima povezanima s IBD-om što upućuje na ulogu glikozilacije IgG-a u razvoju i tijeku IBD-a.<sup>21,68,166</sup> Navedeni genski lokusi povezuju se s galaktozilacijom IgG-a (*IL6ST* se povezuje s postotkom agal- i digalaktoziliranih struktura u ukupnim neutralnim glikanima), fukozilacijom (*IKZF1* se povezuje s postotkom fukozilacije agalaktoziliranih struktura bez račvajućeg GlcNAc-a, *LAMB1* se povezuje s postotkom fukozilacije digalaktoziliranih struktura s račvajućim GlcNAc-om) i dodavanjem račvajućeg GlcNAc-a (*MGAT3* kodira enzim koji dodaje

račvajući GlcNAc na Fc-glikan IgG-a), svojstvima koji se značajno mijenjaju u IBD-u što je i zabilježeno u ovom istraživanju.

Osim galaktozilacije, u IBD-u je snižena i sijalinizacija što je ranije zabilježeno za CD, ali ne i za UC.<sup>185</sup> U ovom istraživanju, efekt sijalinizacije je manje izražen u odnosu na galaktozilaciju te nije zabilježen u svim potklasama. Najvjerojatnije je pad sijalinizacije posljedica smanjenja galaktozilacije s obzirom da je prisutnost galaktoze nužna za dodavanje sijalinske kiseline na glikan. U prilog navedenome govori i činjenica kako se sijalinizacija po galaktozi (A2GS) nije razlikovala ili je porasla u CD-u i UC-u u odnosu na HC. Dok je kod miševa smanjena sijalinizacija povezana s proupalnom aktivnošću IgG-a<sup>179</sup>, kod ljudi galaktozilacija puno snažnije utječe na pro- i antiupalno djelovanje IgG-a u odnosu na sijalinizaciju.<sup>187,241,242</sup>

S obzirom na povezanost više glikozilacijskih svojstava s IBD-om, postavljena je hipoteza o potencijalnoj ulozi Fc-glikozilacije IgG-a u klasifikaciji IBD pacijenata i kontrolne skupine. Kako su s IBD-om povezana različita derivirana glikozilacijska svojstva, načinjeni su prediktivni modeli na temelju pojedinačnih glikoformi po potklasi IgG-a kako bi se procijenila diskriminatorna snaga Fc-glikozilacije IgG-a u klasificiranju UC-a i HC-a, CD-a i HC-a te UC-a i CD-a. Modeli su pokazali veću diskriminatornu snagu u odnosu na prethodno objavljena istraživanja temeljena na pojedinačnim glikoformama<sup>185</sup>, najvjerojatnije zbog većeg broja uključenih glikoformi te analize specifične za potklase. Tako npr. IgG23 i IgG4 glikoforme pokazuju najveće promjene u zastupljenosti između HC-a i IBD-a. S druge strane, u krvnoj plazmi, IgG23 i IgG4 glikoforme su manje zastupljene u odnosu na IgG1<sup>243</sup> čime su njihove glikoforme najvjerojatnije lažno snižene pri analizi na razini ukupnih oslobođenih glikana. Rezultati ovoga istraživanja upućuju na potencijalnu kliničku primjenu glikana kao minimalno invazivnih, dijagnostičkih markera. Potrebne su dodatne studije koje bi potvrdile ova otkrića te istražila mogućnost kombiniranja s drugim minimalno invazivnim, prognostičkim markerima.<sup>244-246</sup> U prethodnim studijama opisane su serologija, transkriptomika i genetika povezane s IBD-om. Posebno bi trebalo usporediti značaj Fc-glikozilacije IgG-a kao markera naspram IBD serologije koja mjeri antitijela na floru komezala (npr. ASCA, anti-CBIR1, ANCA itd.)<sup>245,247-249</sup> i to prospektivnom, longitudinalnom studijom koja bi dala informacije o promjenama s težinom i progresijom bolesti kroz vrijeme. Kod zdravih pojedinaca glikom IgG-a je stabilan tijekom vremena, ali je pod utjecajem životnog stila i okolišnih čimbenika.<sup>250</sup> U IBD-u, glikozilacija IgG-a se mijenja s aktivnošću bolesti.

Osim između IBD pacijenata i HC-a, razlike u Fc-glikozilaciji IgG-a su ispitivane i između UC-a i CD-a. Trenutno, pouzdana klasifikacija navedenih dviju najučestalijih oblika IBD-a je moguća jedino kolonoskopijom (invazivan postupak povezan s povećanim rizikom perforacije crijeva) ili radiološki (često se teško podnosi i postoji izloženost zračenju).<sup>251</sup> Postojeće metode, temeljene na serologiji, poput antitijela na specifične antigene mikroba, još uvijek nemaju željenu osjetljivost i specifičnost.<sup>248</sup> Uz to, mehanizmi koji dovode do razvoja ovih bolesti su još nerazjašnjeni.<sup>252</sup> Kao što je prethodno opisano, IgG galaktozilacija u IBD-u je niža u odnosu na HC uz jače izražen efekt kod CD-a nego kod UC-a što može upućivati na jači imunološki odgovor<sup>177</sup> te posljedično veća oštećenja i teži tijek bolesti u CD-u nego u UC-u. Fukozilacija je snižena u UC-u, a povišena u CD-u što može upućivati na različite mehanizme razvoja bolesti. Nedostatak fukoze na IgG Fc-glikanu pospješuje Fc vezanje na FcγRIII te se time pojačava ADCC.<sup>253</sup> Osim snižene fukozilacije, na pojačanu ADCC aktivnost antitijela u *in vitro* modelima utječe i povišena galaktozilacija. U UC-u u odnosu na CD kombinacija snižene fukozilacije i povećane galaktozilacije, može dovesti do pojačane ADCC aktivnosti.<sup>186</sup> Račvajući GlcNAc je jače zastupljen kod CD-a u odnosu na UC što je u skladu s prijašnjim istraživanjima koja su pokazala porast računjućeg GlcNAc-a u CD-u u odnosu na HC, što nije potvrđeno i za UC.<sup>185</sup> Iako računjuć GlcNAc ima velik utjecaj na strukturu glikana, njegov utjecaj na funkciju antitijela je prilično nepoznat.<sup>143</sup> S druge strane gen *MGAT3* koji kodira za enzim koji dodaje GlcNAc na IgG Fc-glikan, nedavno je povezan s IBD-om.<sup>68</sup> Uz to, razne studije su pokazale kako veća zastupljenosti GlcNAc-a pospješuje vezanje antitijela na FcγRIII te se povezuje s pojačanim ADCC-om.<sup>254,255</sup>

IBD pacijenti imaju sniženu galaktozilaciju i sijalinizaciju IgG-a, a time i niže protuupalno djelovanje.<sup>177,256,257</sup> S obzirom na ranije spomenuta svojstva glikoma IgG-a, njegovo prouupalno djelovanje u IBD-u može utjecati na pojavu bolesti. Iako, nije potpuno jasno jesu li promjene glikozilacije IgG-a kod IBD pacijenata, uzrok ili posljedica bolesti. Potencijalna uloga Fc-glikozilacije IgG-a u razvoju i tijeku IBD-a je po prvi puta potvrđena kroz promjene u kliničkim podfenotipovima UC-a i CD-a. Kod UC-a i CD-a porast agalaktoziliranih glikoformi s rasprostranjenošću, težinom i komplikacijama bolesti te operacijom, upućuje da kada bolest zahvaća veću površinu crijeva (E3 u UC-u ili L3 u CD-u) te je teža i kompliciranija (operacija), IgG ima manje protuupalno djelovanje.<sup>257</sup> S druge strane, s duljim trajanjem UC-a, zabilježen je pad agalaktozilacije što nije slučaj i kod CD-a, a može biti povezano s različitim ponašanjem bolesti jer je poznato kako se kod UC-a aktivnost bolesti može smanjiti tijekom vremena, što nije slučaj i kod CD-a.<sup>258</sup>

IBD pacijenti na kortikosteroidima su uspoređivani s pacijentima bez kortikosteroidne terapije koji su bili samo na mesalazinu te su pacijenti na anti-TNF terapiji uspoređivani s onima na AZA/6MP lijekovima.<sup>259,260</sup> S upotrebom kortikosteroida dolazi do porasta agalaktoziliranih struktura. Steroidi naspram mesalazina i anti-TNF naspram AZA/6MP bi se mogli razmatrati kao surogat markeri za težinu bolesti. Navedeno odgovara rezultatima ovoga istraživanja u kojem se smanjenje Fc-galaktozilacije IgG-a povezuje s težim oblicima bolesti. Unatoč protuupalnom djelovanju kortikosteroida<sup>261</sup>, opažene promjene nisu rezultat same terapije već su vjerojatnije povezane s težinom i komplikacijama bolesti.

Jedno od ograničenja ove studije je izostanak stratifikacije ispitanika prema utjecaju kirurškog liječenja, farmakoterapije ili njihove kombinacije što može uzrokovati raspršenje rezultata. Daljnja istraživanja bi se trebala provesti s točno definiranim i stratificiranim skupinama unutar upalne bolesti crijeva kao i praćenjem na individualnoj razini u kontekstu određenog terapijskog protokola.

## § 5. ZAKLJUČAK

U ovome istraživanju potvrđeni su već objavljeni rezultati o smanjenoj galaktozilaciji u CD-u i UC-u u odnosu na HC, a dodatno je zabilježena povezanost smanjene galaktozilacije s težinom i progresijom bolesti što ukazuje na potencijalnu ulogu Fc-glikozilacije IgG-a kao dijagnostičkog i/ili prognostičkog markera. Fukozilacija, galaktozilacija i prisutnost račvajućeg GlcNAc-a razlikuju se između UC i CD pacijenata. Pojedinačne glikoforme su pokazale vrlo dobru snagu diskriminacije pri razlikovanju UC-a i CD-a od kontrolne skupine te dobru snagu diskriminacije pri razlikovanju UC-a od CD-a što upućuje na različite mehanizme ovih bolesti. Zabilježene razlike u Fc-glikanima IgG-a mogu utjecati na razvoj i ponašanje IBD-a jer o njima ovisi vezanje IgG-a na nisko- i visokoafinitetne Fc $\gamma$ R receptore.<sup>188,189</sup> Nadalje, kod pojedinaca, razlike u glikozilaciji IgG-a mogu utjecati na učinkovitost terapijskih monoklonalnih antitijela, koja se natječu s cirkulirajućim IgG-om za aktiviranje efektorskih funkcija.<sup>262</sup> Promjene u Fc-glikozilaciji IgG-a, zabilježene u ovoj studiji, pružaju smjernice budućim, prospektivnim studijama bi trebale rasvijetliti longitudinalni odnos između promjena u Fc-glikanima IgG-a i razvoja i progresije bolesti kao i njihovu ulogu u predviđanju odgovora na terapiju. Klinički značaj glikanskih markera bi došao do izražaja aplikacijom u već postojećim, brojnim laboratorijima za masenu spektrometriju i kapilarnu elektroforezu koji pružaju mogućnost analize glikana.<sup>263,264</sup>

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

6MP 6-merkaptopurin

A2 diantenarne strukture

A2B diantenarne strukture s račvajućim  $\beta(1,4)$  *N*-acetilglukozaminom

A2F diantenarne fukozilirane strukture

A2FB IgG4 diantenarne strukture s račvajućim  $\beta(1,4)$  *N*-acetilglukozaminom

Acetil-CoA acetil koenzim A

ADCC stanična citotoksičnost ovisna o antitijelima (eng. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*)

Agal agalaktoziliran (bez galaktoze)

AIEC invazivni sojevi *Escherichia coli* koji adheriraju na crijevnu stijenku (eng. *adherent-invasive Escherichia coli*.)

anti-TNF- $\alpha$  antitijelo na faktor tumorske nekroze alfa (eng. *inhibitor of tumor necrosis factor alpha*)

Asn asparagin

Asp aspartat

AUC površina ispod krivulje (eng. *area under the curve*)

AZA azatioprin

B račvajući  $\beta(1,4)$  *N*-acetilglukozamin

B1 upalna Crohnova bolest

B2 sužavajuća Crohnova bolest

B3 perforirajuća Crohnova bolest

CD Crohnova bolest

CDG nasljedni poremećaji glikozilacije (eng. *congenital disorders of glycosylation*)

CGE kapilarna gel elektroforeza (eng. *capillary gel electrophoresis*)

CI intervali pouzdanosti (eng. *confidence intervals*)

CRP C reaktivni protein

Cys cistein

Digal digalaktoziliran

E1 ulcerozni kolitis koji zahvaća završni dio debelog crijeva

E2 ulcerozni kolitis koji zahvaća lijevu stranu debelog crijeva

E3 ulcerozni kolitis koji zahvaća cijelo debelo crijeva

*E. coli* *Escherichia coli*

ER endoplazmatski retikulum

ESI ionizacija elektroraspršenjem (eng. *electrospray ionization*)

F  $\alpha(1,6)$ fukoza ▲

Fab fragment koji veže antigen (eng. *fragment, antigen-binding fragment*)

FBT fekalna bakterijoterapija

Fc fragment koji kristalizira (eng. *fragment crystallizable*)

Fc $\gamma$ RIII Fc-gamma receptor III (eng. *Fc gamma receptors*)

FDR vjerojatnost lažnog odbacivanja (eng. *false discovery rate*)

G galaktoza ●

G2 digalaktoziliran

GIT gastrointestinalni trakt

GlcNAc  $\beta(1,4)$  *N*-acetilglukozamin ■

GWAS cijelogenomske asocijacijske studije (eng. *genome-wide association studies*)

HC zdrave kontrole (eng. *healthy controls*)

HPLC tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high-performance liquid chromatography*)

IBD upalna bolest crijeva (eng. *inflammatory bowel disease*)

IEF izoelektrično fokusiranje

IFNG- $\gamma$  interferon gama

IgG imunoglobulin G

IgG1-4 potklase 1-4 imunoglobulina G

IG-IBD Talijanska grupa za upalnu bolest crijeva (eng. *Italian Group for IBD*)

IL 2/5/10/12/13/17/21/22 interleukin 2/5/10/12/13/17/21/22

ILC limfoidne stanice urođenog imunološkog sustava (eng. *innate lymphoid cells*)

IMD imunodeficijencije (eng. *immune deficiency*)

IQR interkvartilni raspon (eng. *interquartile range*)

IVIG intravenski administrirani imunoglobulini (eng. *intravenously administered immunoglobulins*)

K<sub>3</sub>EDTA etilendiamintetraoctena kiselina



L1 Crohnova bolest koja zahvaća terminalni ileum

L2 Crohnova bolest koja zahvaća debelo crijevo

L3 Crohnova bolest koja zahvaća ileum i debelo crijevo

L4 Crohnova bolest koja zahvaća gornji dio gastrointestinalnog trakta

LC tekućinska kromatografija (eng. *liquid chromatography*)

LC-MS tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (eng. *liquid chromatography coupled to mass spectrometry*)

M, Man manoza ●

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

MAP (lat. *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*)

med medijan

Mono monogalaktoziliran

mRNA glasnička RNA (eng. *messenger RNA*)

MS masena spektrometrija (eng. *mass spectrometry*)

MSMD mendelovska preosjetljivost na mikobakterije (eng. *mendelian susceptibility to mycobacterial disease*)

m/z omjer mase i naboja (eng. *mass to charge ratio*)

nanoLC-MS tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (eng. *nano-liquid chromatography-mass spectrometry*)

NK stanice (eng. *natural killer*)

NMR nuklearna magnetska rezonancija (eng. *nuclear magnetic resonance*)

Q kvadropol (eng. *quadrupole*)

OR omjer izgleda (eng. *odds ratio*)

PBS fosfatni pufer (eng. *phosphate buffered saline*)

PID primarne imunodeficiencije (eng. *primary immunodeficiencies*)

ROC krivulja (eng. *receiver operating characteristic curve*)

S *N*-acetilneuraminska kiselina (sijalinska kiselina) ◆

S2 disijaliniziran

SAD Sjedinjene Američke Države

SD standardna devijacija

Ser serin

Sial sijaliniziran

Thr treonin

TNF- $\alpha$  faktor tumorske nekroze alfa (eng. *tumor necrosis factor alpha*)

TOF spektrometar koji mjeri vrijeme dolaska analita do detektora (eng. *time of flight*)

Tris tris(hidroksimetil)aminometan

UC ulcerozni kolitis

UPLC tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (eng. *ultra-performance liquid chromatography*)

W triptofan

## § 7. POPIS LITERATURE

1. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007;369:1627–40.
2. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;448:427–34.
3. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 2007;369:1641–57.
4. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, et al. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;55:749–53.
5. Stein J, Hartmann F, Dignass AU. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in patients with IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:599–610.
6. Loftus E V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126:1504–17.
7. Burisch J, Pedersen N, Čuković-Čavka S, et al. East-West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCO-EpiCom inception cohort. *Gut* 2014;63:588–597.
8. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012;142:46–54.e42; quiz e30.
9. Prideaux L, Kamm MA, Cruz PP De, et al. Inflammatory bowel disease in Asia: a systematic review. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27:1266–80.
10. Hovde Ø, Moum BA. Epidemiology and clinical course of Crohn's disease: results from observational studies. *World J Gastroenterol* 2012;18:1723–31.
11. Burisch J, Munkholm P. Inflammatory bowel disease epidemiology. *Curr Opin Gastroenterol* 2013;29:357–62.
12. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2011;365:1713–25.
13. Lakatos P-L. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World J Gastroenterol* 2006;12:6102–8.
14. Burisch J, Jess T, Martinato M, et al. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J Crohns Colitis* 2013;7:322–37.
15. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012;380:2095–128.
16. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet* 2012;380:1590–605.
17. Bernstein CN, Kraut A, Blanchard JF, et al. The relationship between inflammatory bowel disease and socioeconomic variables. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2117–25.
18. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002;347:417–29.
19. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the

- European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690–7.
20. Sonnenberg A, McCarty DJ, Jacobsen SJ. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology* 1991;100:143–9.
  21. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012;491:119–24.
  22. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2011;474:307–17.
  23. Borobio E, Arín A, Valcayo A, et al. [Isotretinoin and ulcerous colitis]. *An Sist Sanit Navar* 2004;27:241–3.
  24. Clevers H. Inflammatory bowel disease, stress, and the endoplasmic reticulum. *N Engl J Med* 2009;360:726–7.
  25. Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, et al. A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology* 2007;132:1665–71.
  26. Cho JH, Gregersen PK. Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *N Engl J Med* 2011;365:1612–23.
  27. Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, et al. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1161–78.
  28. Patel SY, Doffinger R, Barcenas-Morales G, et al. Genetically determined susceptibility to mycobacterial infection. *J Clin Pathol* 2008;61:1006–12.
  29. Zhang F, Liu H, Chen S, et al. Identification of two new loci at IL23R and RAB32 that influence susceptibility to leprosy. *Nat Genet* 2011;43:1247–51.
  30. Holland SM, DeLeo FR, Elloumi HZ, et al. STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *N Engl J Med* 2007;357:1608–19.
  31. Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, et al. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature* 2007;448:1058–62.
  32. Glocker E-O, Hennigs A, Nabavi M, et al. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *N Engl J Med* 2009;361:1727–35.
  33. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603–6.
  34. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:867–74.
  35. Glocker E-O, Frede N, Perro M, et al. Infant colitis--it's in the genes. *Lancet* 2010;376:1272.
  36. Franke A, Balschun T, Karlsen TH, et al. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* 2008;40:1319–23.
  37. Bhattacharjee A, Pal S, Feldman GM, et al. Hck is a key regulator of gene expression in alternatively activated human monocytes. *J Biol Chem* 2011;286:36709–23.
  38. Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:481–96

39. Lesko SM, Kaufman DW, Rosenberg L, et al. Evidence for an increased risk of Crohn's disease in oral contraceptive users. *Gastroenterology* 1985;89:1046–9.
40. Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management, Expert Consult Premium Edition - Enhanced Online Features, Opseg 1*. 2010.
41. García Rodríguez LA, Ruigómez A, Panés J. Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2006;130:1588–94.
42. Porter CK, Tribble DR, Aliaga PA, et al. Infectious gastroenteritis and risk of developing inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2008;135:781–6.
43. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2009;361:2066–78.
44. Coskun M. Intestinal epithelium in inflammatory bowel disease. *Front Med* 2014;1:24.
45. Sonnenberg A. Disability from inflammatory bowel disease among employees in West Germany. *Gut* 1989;30:367–70.
46. Li X, Sundquist J, Sundquist K. Educational level and occupation as risk factors for inflammatory bowel diseases: A nationwide study based on hospitalizations in Sweden. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:608–15.
47. Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12 Suppl 1:S3-9.
48. López-Serrano P, Pérez-Calle JL, Pérez-Fernández MT, et al. Environmental risk factors in inflammatory bowel diseases. Investigating the hygiene hypothesis: a Spanish case-control study. *Scand J Gastroenterol* 2010;45:1464–71.
49. Padoan A, D'Inca R, Scapellato ML, et al. Improving IBD diagnosis and monitoring by understanding preanalytical, analytical and biological fecal calprotectin variability. *Clin Chem Lab Med* 2018;0.
50. Wang G-F, Ren J-A, Liu S, et al. Clinical characteristics of non-perianal fistulating Crohn's disease in China: a single-center experience of 184 cases. *Chin Med J (Engl)* 2012;125:2405–10.
51. Thomas S, Baumgart DC. Targeting leukocyte migration and adhesion in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammopharmacology* 2012;20:1–18.
52. Lichtenstein GR, McGovern DPB. Using Markers in IBD to Predict Disease and Treatment Outcomes: Rationale and a Review of Current Status. *Am J Gastroenterol Suppl* 2016;3:17–26.
53. Panes J, Jairath V, Levesque BG. Advances in Use of Endoscopy, Radiology, and Biomarkers to Monitor Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 2017;152:362–373.e3.
54. Ohkusa T, Sato N. Antibacterial and antimycobacterial treatment for inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:340–51.
55. Borody TJ, Warren EF, Leis SM, et al. Bacteriotherapy using fecal flora: toying with human motions. *J Clin Gastroenterol* 2004;38:475–83.
56. Borody TJ, Warren EF, Leis S, et al. Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy. *J Clin Gastroenterol* 2003;37:42–7.
57. Almeida-Porada G, Soland M, Boura J, et al. Regenerative medicine: prospects for the

treatment of inflammatory bowel disease. *Regen Med* 2013;8:631–44.

58. Summers RW, Elliott DE, Urban JF, et al. Trichuris suis therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2005;128:825–32.
59. Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A, et al. Synbiotic therapy (Bifidobacterium longum/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* 2005;54:242–9.
60. Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004;53:1617–23.
61. Wright K, Rooney N, Feeney M, et al. Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing. *Gastroenterology* 2005;129:437–53.
62. Schicho R, Storr M. IBD: Patients with IBD find symptom relief in the Cannabis field. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;11:142–3.
63. Crohn's and Colitis Foundation of America. The Facts about Inflammatory Bowel Diseases. Available at: <http://www.crohnscolitisfoundation.org/assets/pdfs/updatedibdfactbook.pdf>.
64. Hanauer SB, Sandborn W. Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol* 2001;96:635–43.
65. Cho JH, Brant SR. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011;140:1704–12.
66. Dessein R, Chamaillard M, Danese S. Innate immunity in Crohn's disease: the reverse side of the medal. *J Clin Gastroenterol* 2008;42 Suppl 3:S144-7.
67. Stefanelli T, Malesci A, Repici A, et al. New insights into inflammatory bowel disease pathophysiology: paving the way for novel therapeutic targets. *Curr Drug Targets* 2008;9:413–8.
68. Franke A, McGovern DPB, Barrett JC, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 2010;42:1118–25.
69. Marks DJB, Rahman FZ, Sewell GW, et al. Crohn's disease: an immune deficiency state. *Clin Rev Allergy Immunol* 2010;38:20–31.
70. Lalande J-D, Behr MA. Mycobacteria in Crohn's disease: how innate immune deficiency may result in chronic inflammation. *Expert Rev Clin Immunol* 2010;6:633–41.
71. Yamamoto-Furusho J-K, Korzenik J-R. Crohn's disease: innate immunodeficiency? *World J Gastroenterol* 2006;12:6751–5.
72. Rubin E. *Essentials of Rubin's pathology*. 5th ed. (Rubin E, Reisner HM, eds.). Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins; 1990.
73. Liu S, Ren J, Zhao Y, et al. Nonthyroidal illness syndrome: is it far away from Crohn's disease? *J Clin Gastroenterol* 2013;47:153–9.
74. Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1371–85.
75. Roediger WE, Moore J, Babidge W. Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of

ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1997;42:1571–9.

76. Scheppach W, Sommer H, Kirchner T, et al. Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1992;103:51–6.
77. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, et al. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 2006;81:1462–71.
78. Beaugerie L, Massot N, Carbonnel F, et al. Impact of cessation of smoking on the course of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2113–6.
79. Levine J, Ellis CJ, Furne JK, et al. Fecal hydrogen sulfide production in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1998;93:83–7.
80. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, et al. Ulcerative colitis. *Lancet* 2012;380:1606–19.
81. Mukhopadhyay I, Hansen R, El-Omar EM, et al. IBD-what role do Proteobacteria play? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9:219–30.
82. Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 2011;474:298–306.
83. Marks DJB, Harbord MWN, MacAllister R, et al. Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation. *Lancet* 2006;367:668–78.
84. Cobrin GM, Abreu MT. Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease. *Immunol Rev* 2005;206:277–95.
85. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007;13:139–45.
86. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123–32.
87. Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 2007;19:281–6.
88. Wu S, Rhee K-J, Albesiano E, et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med* 2009;15:1016–22.
89. Muranski P, Boni A, Antony PA, et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* 2008;112:362–73.
90. Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, et al. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* 2009;31:787–98.
91. Kotanko P, Carter M, Levin NW. Intestinal bacterial microflora--a potential source of chronic inflammation in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:2057–60.
92. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006;3:390–407.
93. Dogan B, Scherl E, Bosworth B, et al. Multidrug resistance is common in *Escherichia coli* associated with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:141–50.
94. Campbell J, Borody TJ, Leis S. The many faces of Crohn's Disease: Latest concepts in etiology. 2012;2012:107–115.
95. Naser SA, Collins MT. Debate on the lack of evidence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:1123.

96. Glubb DM, Geary RB, Barclay ML, et al. NOD2 and ATG16L1 polymorphisms affect monocyte responses in Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2011;17:2829–37.
97. Clancy R, Ren Z, Turton J, et al. Molecular evidence for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) in Crohn's disease correlates with enhanced TNF- $\alpha$  secretion. *Dig Liver Dis* 2007;39:445–51.
98. Nakase H, Tamaki H, Matsuura M, et al. Involvement of *mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in TNF- $\alpha$  production from macrophage: possible link between MAP and immune response in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:E140-2.
99. Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, et al. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J* 2007;1:403–18.
100. Sasaki M, Sitaraman S V, Babbin BA, et al. Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab Invest* 2007;87:1042–54.
101. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;127:412–21.
102. Nickerson KP, McDonald C. Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* adhesion is enhanced by exposure to the ubiquitous dietary polysaccharide maltodextrin. *PLoS One* 2012;7:e52132.
103. Martinez-Medina M, Naves P, Blanco J, et al. Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC). *BMC Microbiol* 2009;9:202.
104. Chargui A, Cesaro A, Mimouna S, et al. Subversion of autophagy in adherent invasive *Escherichia coli*-infected neutrophils induces inflammation and cell death. *PLoS One* 2012;7:e51727.
105. Craven M, Egan CE, Dowd SE, et al. Inflammation drives dysbiosis and bacterial invasion in murine models of ileal Crohn's disease. *PLoS One* 2012;7:e41594.
106. Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive *Escherichia coli* and Crohn's disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:16–20.
107. Forbes A, Kalantzis T. Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Int J Colorectal Dis* 2006;21:399–401.
108. Gui GP, Thomas PR, Tizard ML, et al. Two-year-outcomes analysis of Crohn's disease treated with rifabutin and macrolide antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:393–400.
109. Walt D, Aoki-Kinoshita KF, Bendiak B et al. *Transforming Glycoscience: A Roadmap for the Future*. Washington Nac Acad Press 2012.
110. Opdenakker G, Rudd PM, Ponting CP, et al. Concepts and principles of glycobiology. *FASEB J* 1993;7:1330–7.
111. Skropeta D. The effect of individual N-glycans on enzyme activity. *Bioorg Med Chem* 2009;17:2645–53.
112. Raju TS, Scallon BJ. Glycosylation in the Fc domain of IgG increases resistance to proteolytic cleavage by papain. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341:797–803.



113. Russell D, Oldham NJ, Davis BG. Site-selective chemical protein glycosylation protects from autolysis and proteolytic degradation. *Carbohydr Res* 2009;344:1508–14.
114. Krištić J, Lauc G. Ubiquitous Importance of Protein Glycosylation. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. Vol 1503.; 2017:1–12.
115. Marth JD, Grewal PK. Mammalian glycosylation in immunity. *Nat Rev Immunol* 2008;8:874–87.
116. Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 1993;3:97–130.
117. Jaeken J, Matthijs G. Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007;8:261–78.
118. Hennet T. Diseases of glycosylation beyond classical congenital disorders of glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:1306–17.
119. Scott K, Gadowski T, Kozicz T, et al. Congenital disorders of glycosylation: new defects and still counting. *J Inherit Metab Dis* 2014;37:609–17.
120. Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 2006;126:855–67.
121. Yamamoto F, Clausen H, White T, et al. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 1990;345:229–233.
122. Vučković F, Krištić J, Gudelj I, et al. Systemic lupus erythematosus associates with the decreased immunosuppressive potential of the IgG glycome. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)* 2015.
123. Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers* 2008;25:267–78.
124. Häuselmann I, Borsig L. Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis. *Front Oncol* 2014;4:28.
125. Vučković F, Theodoratou E, Thaçi K, et al. IgG Glycome in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2016;22:3078–86.
126. Dubé R, Rook GA, Steele J, et al. Agalactosyl IgG in inflammatory bowel disease: correlation with C-reactive protein. *Gut* 1990;31:431–4.
127. Shinzaki S, Iijima H, Nakagawa T, et al. IgG oligosaccharide alterations are a novel diagnostic marker for disease activity and the clinical course of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2008;103:1173–81.
128. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW EM. *Essentials of Glycobiology*. 2nd editio. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
129. Haynes PA. Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation? *Glycobiology* 1998;8:1–5.
130. Marek KW, Vijay IK, Marth JD. A recessive deletion in the GlcNAc-1-phosphotransferase gene results in peri-implantation embryonic lethality. *Glycobiology* 1999;9:1263–71.
131. Shakin-Eshleman SH, Spitalnik SL, Kasturi L. The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation

efficiency. *J Biol Chem* 1996;271:6363–6.

132. Bause E. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem J* 1983;209:331–6.
133. Mellquist JL, Kasturi L, Spitalnik SL, et al. The Amino Acid Following an Asn-X-Ser/Thr Sequon Is an Important Determinant of N-Linked Core Glycosylation Efficiency. *Biochemistry* 1998;37:6833–6837.
134. JONES J, KRAG S, BETENBAUGH M. Controlling -linked glycan site occupancy. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2005;1726:121–137.
135. Rakus JF, Mahal LK. New Technologies for Glycomic Analysis: Toward a Systematic Understanding of the Glycome. *Annu Rev Anal Chem* 2011;4:367–392.
136. Kozak RP, Royle L, Gardner RA, et al. Suppression of peeling during the release of O-glycans by hydrazinolysis. *Anal Biochem* 2012;423:119–128.
137. Zauner G, Kozak RP, Gardner RA, et al. Protein O-glycosylation analysis. *Biol Chem* 2012;393:687–708.
138. Kozak RP, Royle L, Gardner RA, et al. Improved nonreductive O-glycan release by hydrazinolysis with ethylenediaminetetraacetic acid addition. *Anal Biochem* 2014;453:29–37.
139. Wang T, Cai ZP, Gu XQ, et al. Discovery and characterization of a novel extremely acidic bacterial N-glycanase with combined advantages of PNGase F and A. *Biosci Rep* 2014;34:673–684.
140. Selman MHJ, Derks RJE, Bondt A, et al. Fc specific IgG glycosylation profiling by robust nano-reverse phase HPLC-MS using a sheath-flow ESI sprayer interface. *J Proteomics* 2012;75:1318–29.
141. Huffman JE, Pui-Bakovi M, Klari L, et al. Comparative Performance of Four Methods for High-throughput Glycosylation Analysis of Immunoglobulin G in Genetic and Epidemiological Research. *Mol Cell Proteomics* 2014;13:1598–1610.
142. Royle L, Campbell MP, Radcliffe CM, et al. HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. *Anal Biochem* 2008;376:1–12.
143. Pučić M, Knezević A, Vidic J, et al. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol Cell Proteomics* 2011;10:M111.010090.
144. Selman MHJ, McDonnell LA, Palmblad M, et al. Immunoglobulin G glycopeptide profiling by matrix-assisted laser desorption ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal Chem* 2010;82:1073–81.
145. Schwarzer J, Rapp E, Reichl U. N-glycan analysis by CGE-LIF: Profiling influenza A virus hemagglutinin N-glycosylation during vaccine production. *Electrophoresis* 2008;29:4203–4214.
146. Ruhaak LR, Hennig R, Huhn C, et al. Optimized workflow for preparation of APTS-labeled N-glycans allowing high-throughput analysis of human plasma glycomes using 48-channel multiplexed CGE-LIF. *J Proteome Res* 2010;9:6655–64.
147. Huhn C, Selman MHJ, Ruhaak LR, et al. IgG glycosylation analysis. *Proteomics* 2009;9:882–913.
148. Wuhrer M, Deelder A, Hokke C. Protein glycosylation analysis by liquid

chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2005;825:124–133.

149. Wuhrer M, Koeleman CAM, Deelder AM, et al. Normal-phase nanoscale liquid chromatography-mass spectrometry of underivatized oligosaccharides at low-femtomole sensitivity. *Anal Chem* 2004;76:833–8.
150. Maslen S, Sadowski P, Adam A, et al. Differentiation of isomeric N-glycan structures by normal-phase liquid chromatography-MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2006;78:8491–8.
151. Clarke A, Harmon B, DeFelippis MR. Analysis of 3-(acetylamino)-6-aminoacridine-derivatized oligosaccharides from recombinant monoclonal antibodies by liquid chromatography–mass spectrometry. *Anal Biochem* 2009;390:209–211.
152. Wuhrer M, Boer AR de, Deelder AM. Structural glycomics using hydrophilic interaction chromatography (HILIC) with mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2009;28:192–206.
153. Kang P, Mechref Y, Novotny M V. High-throughput solid-phase permethylation of glycans prior to mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008;22:721–734.
154. Mechref Y, Kang P, Novotny M V. *Solid-phase permethylation for glycomic analysis*. (Packer NH, Karlsson NG, eds.). Totowa, NJ: Humana Press; 2009.
155. Harvey DJ. Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: an update for 2009–2010. *Mass Spectrom Rev* 34:268–422.
156. Selman MHJ, Hoffmann M, Zauner G, et al. MALDI-TOF-MS analysis of sialylated glycans and glycopeptides using 4-chloro- $\alpha$ -cyanocinnamic acid matrix. *Proteomics* 2012;12:1337–1348.
157. Wuhrer M, Stam JC, Geijn FE van de, et al. Glycosylation profiling of immunoglobulin G (IgG) subclasses from human serum. *Proteomics* 2007;7:4070–4081.
158. Stadlmann J, Pabst M, Kolarich D, et al. Analysis of immunoglobulin glycosylation by LC-ESI-MS of glycopeptides and oligosaccharides. *Proteomics* 2008;8:2858–71.
159. Stadlmann J, Weber A, Pabst M, et al. A close look at human IgG sialylation and subclass distribution after lectin fractionation. *Proteomics* 2009;9:4143–4153.
160. Ahmed AA, Giddens J, Pincetic A, et al. Structural Characterization of Anti-Inflammatory Immunoglobulin G Fc Proteins. *J Mol Biol* 2014;426:3166–3179.
161. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2007.
162. Anthony RM, Wermeling F, Ravetch J V. Novel roles for the IgG Fc glycan. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1253:170–80.
163. Ravetch J V, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2001;19:275–90.
164. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, et al. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 2007;25:21–50.
165. Pezer M, Stambuk J, Perica M, et al. Effects of allergic diseases and age on the composition of serum IgG glycome in children. *Sci Rep* 2016;6:33198.
166. Lauc G, Huffman JE, Pučić M, et al. Loci associated with N-glycosylation of human immunoglobulin G show pleiotropy with autoimmune diseases and haematological cancers. *PLoS Genet* 2013;9:e1003225.

167. Menni C, Keser T, Mangino M, et al. Glycosylation of immunoglobulin g: role of genetic and epigenetic influences. *PLoS One* 2013;8:e82558.
168. Baković MP, Selman MHJ, Hoffmann M, et al. High-throughput IgG Fc N-glycosylation profiling by mass spectrometry of glycopeptides. *J Proteome Res* 2013;12:821–31.
169. Wahl A, Kasela S, Carnero-Montoro E, et al. IgG glycosylation and DNA methylation are interconnected with smoking. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2018;1862:637–648.
170. Novokmet M, Lukić E, Vučković F, et al. Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation. *Sci Rep* 2014;4:4347.
171. Krištić J, Vuckovic F, Menni C, et al. Glycans Are a Novel Biomarker of Chronological and Biological Ages. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2013;69:779–89.
172. Jefferis R. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol Prog* 2005;21:11–6.
173. Zhu D, Ottensmeier CH, Du M-Q, et al. Incidence of potential glycosylation sites in immunoglobulin variable regions distinguishes between subsets of Burkitt's lymphoma and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Br J Haematol* 2003;120:217–22.
174. Teng G, Papavasiliou FN. Immunoglobulin Somatic Hypermutation. *Annu Rev Genet* 2007;41:107–120.
175. Anumula KR. Quantitative glycan profiling of normal human plasma derived immunoglobulin and its fragments Fab and Fc. *J Immunol Methods* 2012;382:167–76.
176. Böhm S, Schwab I, Lux A, et al. The role of sialic acid as a modulator of the anti-inflammatory activity of IgG. *Semin Immunopathol* 2012;34:443–53.
177. Karsten CM, Pandey MK, Figge J, et al. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nat Med* 2012;18:1401–6.
178. Kobata A. The N-Linked sugar chains of human immunoglobulin G: Their unique pattern, and their functional roles. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2008;1780:472–478.
179. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch J V. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 2006;313:670–3.
180. Anthony RM, Ravetch J V. A Novel Role for the IgG Fc Glycan: The Anti-inflammatory Activity of Sialylated IgG Fcs. *J Clin Immunol* 2010;30:9–14.
181. Scanlan CN, Burton DR, Dwek RA. Making autoantibodies safe. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:4081–2.
182. Ferrara C, Grau S, Jager C, et al. Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between Fc RIII and antibodies lacking core fucose. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108:12669–12674.
183. Masuda K, Kubota T, Kaneko E, et al. Enhanced binding affinity for FcγRIIIa of fucose-negative antibody is sufficient to induce maximal antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Mol Immunol* 2007;44:3122–31.
184. Gasdaska JR, Sherwood S, Regan JT, et al. An afucosylated anti-CD20 monoclonal antibody with greater antibody-dependent cellular cytotoxicity and B-cell depletion and lower complement-dependent cytotoxicity than rituximab. *Mol Immunol* 2012;50:134–

- 41.
185. Trbojević Akmačić I, Ventham NT, Theodoratou E, et al. Inflammatory Bowel Disease Associates with Proinflammatory Potential of the Immunoglobulin G Glycome. *Inflamm Bowel Dis* 2015;21:1.
186. Thomann M, Reckermann K, Reusch D, et al. Fc-galactosylation modulates antibody-dependent cellular cytotoxicity of therapeutic antibodies. *Mol Immunol* 2016;73:69–75.
187. Thomann M, Schlothauer T, Dashivets T, et al. In vitro glycoengineering of IgG1 and its effect on Fc receptor binding and ADCC activity. Chammas R, ed. *PLoS One* 2015;10:e0134949.
188. Subedi GP, Barb AW. The Structural Role of Antibody N-Glycosylation in Receptor Interactions. *Structure* 2015;23:1573–83.
189. Subedi GP, Barb AW. The immunoglobulin G1 N-glycan composition affects binding to each low affinity Fc  $\gamma$  receptor. *MAbs* 2016;8:1512–1524.
190. Schwab I, Lux A, Nimmerjahn F. Pathways Responsible for Human Autoantibody and Therapeutic Intravenous IgG Activity in Humanized Mice. *Cell Rep* 2015;13:610–20.
191. Washburn N, Schwab I, Ortiz D, et al. Controlled tetra-Fc sialylation of IVIg results in a drug candidate with consistent enhanced anti-inflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:E1297-306.
192. Kao D, Danzer H, Collin M, et al. A Monosaccharide Residue Is Sufficient to Maintain Mouse and Human IgG Subclass Activity and Directs IgG Effector Functions to Cellular Fc Receptors. *Cell Rep* 2015;13:2376–85.
193. Schwab I, Nimmerjahn F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nat Rev Immunol* 2013;13:176–89.
194. Lauc G, Pezer M, Rudan I, et al. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochim Biophys Acta* 2016;1860:1574–82.
195. Lemmers RFH, Vilaj M, Urda D, et al. IgG glycan patterns are associated with type 2 diabetes in independent European populations. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2017;1861:2240–2249.
196. Russell AC, Šimurina M, Garcia MT, et al. The N-glycosylation of immunoglobulin G as a novel biomarker of Parkinson's disease. *Glycobiology* 2017;27:501–510.
197. Freidin MB, Keser T, Gudelj I, et al. The Association between Low Back Pain and Composition of IgG Glycome. *Sci Rep* 2016;6.
198. Barrios C, Zierer J, Gudelj I, et al. Glycosylation Profile of IgG in Moderate Kidney Dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2016;27:933–941.
199. Kamio T, Toki T, Kanezaki R, et al. B-cell-specific transcription factor BACH2 modifies the cytotoxic effects of anticancer drugs. *Blood* 2003;102:3317–22.
200. Sellars M, Reina-San-Martin B, Kastner P, et al. Ikaros controls isotype selection during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 2009;206:1073–87.
201. Klug CA, Morrison SJ, Masek M, et al. Hematopoietic stem cells and lymphoid progenitors express different Ikaros isoforms, and Ikaros is localized to heterochromatin in immature lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:657–62.
202. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 2008;40:955–62.

203. Asano K, Matsushita T, Umeno J, et al. A genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for ulcerative colitis in the Japanese population. *Nat Genet* 2009;41:1325–9.
204. Barrett JC, Lee JC, Lees CW, et al. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet* 2009;41:1330–4.
205. Silverberg MS, Cho JH, Rioux JD, et al. Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nat Genet* 2009;41:216–20.
206. McGovern DPB, Gardet A, Törkvist L, et al. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat Genet* 2010;42:332–7.
207. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* 2011;43:246–52.
208. Davidson A, Mackay IR, Rosen FS, et al. Autoimmune Diseases. *N Engl J Med* 2001;345:340–350.
209. Albert H, Collin M, Dudziak D, et al. In vivo enzymatic modulation of IgG glycosylation inhibits autoimmune disease in an IgG subclass-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105:15005–15009.
210. Baudino L, Azeredo da Silveira S, Nakata M, et al. Molecular and cellular basis for pathogenicity of autoantibodies: lessons from murine monoclonal autoantibodies. *Springer Semin Immunopathol* 2006;28:175–84.
211. Gouni-Berthold I, Baumeister B, Berthold HK, et al. Immunoglobulins and IgG subclasses in patients with inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 1999;46:1720–3.
212. Miyahara K, Nouse K, Saito S, et al. Serum glycan markers for evaluation of disease activity and prediction of clinical course in patients with ulcerative colitis. *PLoS One* 2013;8:e74861.
213. Bondt A, Wuhrer M, Kuijper TM, et al. Fab glycosylation of immunoglobulin G does not associate with improvement of rheumatoid arthritis during pregnancy. *Arthritis Res Ther* 2016;18:274.
214. Annese V, Lombardi G, Perri F, et al. Variants of CARD15 are associated with an aggressive clinical course of Crohn's disease--an IG-IBD study. *Am J Gastroenterol* 2005;100:84–92.
215. Latiano A, Palmieri O, Valvano RM, et al. Contribution of IBD5 locus to clinical features of IBD patients. *Am J Gastroenterol* 2006;101:318–25.
216. Latiano A, Palmieri O, Valvano MR, et al. Evaluating the role of the genetic variations of PTPN22, NFKB1, and FcGR3A genes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1212–9.
217. Latiano A, Palmieri O, Cucchiara S, et al. Polymorphism of the IRGM gene might predispose to fistulizing behavior in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2009;104:110–6.
218. Latiano A, Palmieri O, Corritore G, et al. Variants at the 3p21 locus influence susceptibility and phenotype both in adults and early-onset patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1108–17.

219. Palmieri O, Latiano A, Scimeca D, et al. IL23R, ATG16L1, IRGM, OCTN1, and OCTN2 mRNA expression in inflamed and noninflamed mucosa of IBD patients. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:1832–3.
220. Latiano A, Palmieri O, Latiano T, et al. Investigation of multiple susceptibility loci for inflammatory bowel disease in an Italian cohort of patients. Niess J-H, ed. *PLoS One* 2011;6:e22688.
221. Latiano A, Palmieri O, Pastorelli L, et al. Associations between genetic polymorphisms in IL-33, IL1R1 and risk for inflammatory bowel disease. Chamaillard M, ed. *PLoS One* 2013;8:e62144.
222. Dubinsky MC, Kugathasan S, Kwon S, et al. Multidimensional Prognostic Risk Assessment Identifies Association Between IL12B Variation and Surgery in Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:1662–1670.
223. Cleynen I, Boucher G, Jostins L, et al. Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *Lancet* 2016;387:156–167.
224. Haritunians T, Taylor KD, Targan SR, et al. Genetic predictors of medically refractory ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1830–40.
225. Šimurina M, Haan N de, Vučković F, et al. Glycosylation of Immunoglobulin G Associates With Clinical Features of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 2018.
226. Falck D, Jansen BC, Haan N de, et al. High-Throughput Analysis of IgG Fc Glycopeptides by LC-MS. *Methods Mol Biol* 2017;1503:31–47.
227. Waters. ACQUITY UPLC System Quick Start Guide. Manual 2010:514. Available at: <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500082503re.pdf> [Accessed September 27, 2017].
228. Balbín M, Grubb A, Lange GG de, et al. DNA sequences specific for Caucasian G3m(b) and (g) allotypes: allotyping at the genomic level. *Immunogenetics* 1994;39:187–93.
229. Bruker-Daltonics. micrOTOF-Q II: Cutting Edge Performance with Sub-ppm Confidence. 2008:12. Available at: <http://www.bdal.com/library/literature-room/detail-view/article/brochure-microtof-q-ii-837/108.html> [Accessed September 27, 2017].
230. Jansen BC, Falck D, Haan N de, et al. LaCyTools: A Targeted Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Data Processing Package for Relative Quantitation of Glycopeptides. *J Proteome Res* 2016;15:2198–210.
231. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, et al. The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 2007;25:21–50.
232. Haan N de, Reiding KR, Driessen G, et al. Changes in Healthy Human IgG Fc-Glycosylation after Birth and during Early Childhood. *J Proteome Res* 2016;15:1853–1861.
233. Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics* 2007;8:118–27.
234. Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. *J Stat Softw* 2010;33:1–22.

235. Dias AM, Dourado J, Lago P, et al. Dysregulation of T cell receptor N-glycosylation: a molecular mechanism involved in ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 2014;23:2416–2427.
236. Shinzaki S, Iijima H, Fujii H, et al. Altered oligosaccharide structures reduce colitis induction in mice defective in  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase. *Gastroenterology* 2012;142:1172–82.
237. Anthony RM, Wermeling F, Ravetch J V. Novel roles for the IgG Fc glycan. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1253:170–180.
238. Ercan A, Cui J, Chatterton DEW, et al. Aberrant IgG galactosylation precedes disease onset, correlates with disease activity, and is prevalent in autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:2239–48.
239. Rombouts Y, Ewing E, Stadt LA van de, et al. Anti-citrullinated protein antibodies acquire a pro-inflammatory Fc glycosylation phenotype prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2015;74:234–241.
240. Ito K, Furukawa J, Yamada K, et al. Lack of galactosylation enhances the pathogenic activity of IgG1 but Not IgG2a anti-erythrocyte autoantibodies. *J Immunol* 2014;192:581–8.
241. Bondt A, Selman MHJ, Deelder AM, et al. Association between Galactosylation of Immunoglobulin G and Improvement of Rheumatoid Arthritis during Pregnancy Is Independent of Sialylation. *J Proteome Res* 2013;12:4522–4531.
242. Kemna MJ, Plomp R, Paassen P van, et al. Galactosylation and Sialylation Levels of IgG Predict Relapse in Patients With PR3-ANCA Associated Vasculitis. *EBioMedicine* 2017;17:108–118.
243. Shakib F, Stanworth DR. Human IgG subclasses in health and disease (A review) Part II. *Ric Clin Lab* 1980;10:561–580.
244. Lee JC, Biasci D, Roberts R, et al. Genome-wide association study identifies distinct genetic contributions to prognosis and susceptibility in Crohn's disease. *Nat Genet* 2017;49:262–268.
245. Dubinsky MC, Lin Y-C, Dutridge D, et al. Serum immune responses predict rapid disease progression among children with Crohn's disease: immune responses predict disease progression. *Am J Gastroenterol* 2006;101:360–7.
246. Marigorta UM, Denson LA, Hyams JS, et al. Transcriptional risk scores link GWAS to eQTLs and predict complications in Crohn's disease. *Nat Genet* 2017;49:1517–1521.
247. Dubinsky MC, Kugathasan S, Kwon S, et al. Multidimensional prognostic risk assessment identifies association between IL12B variation and surgery in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:1662–70.
248. Siegel CA, Horton H, Siegel LS, et al. A validated web-based tool to display individualised Crohn's disease predicted outcomes based on clinical, serologic and genetic variables. *Aliment Pharmacol Ther* 2016;43:262–271.
249. Yoon SM, Haritunians T, Chhina S, et al. Colonic Phenotypes Are Associated with Poorer Response to Anti-TNF Therapies in Patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2017;23:1382–1393.
250. Gornik O, Wagner J, Pucić M, et al. Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology* 2009;19:1547–53.



251. Soubières AA, Poullis A. Emerging Biomarkers for the Diagnosis and Monitoring of Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2016;22:2016–22.
252. Bennike T, Birkelund S, Stensballe A, et al. Biomarkers in inflammatory bowel diseases: current status and proteomics identification strategies. *World J Gastroenterol* 2014;20:3231–44.
253. Shields RL, Lai J, Keck R, et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ3 and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 2002;277:26733–40.
254. Zou G, Ochiai H, Huang W, et al. Chemoenzymatic synthesis and Fcγ receptor binding of homogeneous glycoforms of antibody Fc domain. Presence of a bisecting sugar moiety enhances the affinity of Fc to Fcγ3a receptor. *J Am Chem Soc* 2011;133:18975–91.
255. Ferrara C, Brünker P, Suter T, et al. Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous beta1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi alpha-mannosidase II. *Biotechnol Bioeng* 2006;93:851–61.
256. Kaneko Y, Nimmerjahn F RJ. Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science* (80- ) 2006;313:670–673.
257. Gornik O, Pavić T, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins - implications on evolution and disease. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:1318–26.
258. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, et al. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;140:1785–94.
259. D’Haens GR, Panaccione R, Higgins PDR, et al. The London Position Statement of the World Congress of Gastroenterology on Biological Therapy for IBD with the European Crohn’s and Colitis Organization: when to start, when to stop, which drug to choose, and how to predict response? *Am J Gastroenterol* 2011;106:199–212; quiz 213.
260. Mowat C, Cole A, Windsor A, et al. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2011;60:571–607.
261. Liu D, Ahmet A, Ward L, et al. A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2013;9:30.
262. Fiebiger BM, Maamary J, Pincetic A, et al. Protection in antibody- and T cell-mediated autoimmune diseases by antiinflammatory IgG Fcs requires type II FcRs. *Proc Natl Acad Sci* 2015;112:E2385–E2394.
263. Jannetto PJ, Fitzgerald RL. Effective Use of Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory. *Clin Chem* 2016;62:92–8.
264. Vanderschaeghe D, Szekrényes A, Wenz C, et al. High-Throughput Profiling of the Serum N-Glycome on Capillary Electrophoresis Microfluidics Systems: Toward Clinical Implementation of GlycoHepatoTest. *Anal Chem* 2010;82:7408–7415.

## § 8. ŽIVOTOPIS

Mirna Šimurina je rođena 12. veljače 1984. godine u Slavanskom Brodu, gdje je završila opću gimnaziju. Diplomski studij medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2002. godine. U periodu od ožujka do lipnja 2007. godine sudjelovala je u sklopu programa CEEPUS, u istraživačkom projektu na Medicinskom fakultetu u Varšavi na temu praćenja razine arginina i enzima arginaze kod pacijenata s akutnim pankreatitisom i tumorom pankreasa. Znanstveni rad je predstavljen na kongresu studenata 2008. godine u Berlinu te je i nagrađen. Diplomski studij je završila 2008. godine izradom završnog rada na temu „Određivanje profila DNA iz vrlo oskudnih tragova biološkog materijala“ pod vodstvom dr. sc. Karmele Barišić, red. prof. Eksperimentalni dio je odrađen u Centru za kriminalistička vještačenja „Ivan Vučetić“. U periodu od travnja 2008. godine do svibnja 2009. godine odrađivala je pripravnički staž za mag. medicinske biokemije u OB „dr. Josip Benčević“ u Slavanskom Brodu nakon čega je do srpnja 2012. godine radila u tvrtci Abbott d.o.o. kao stručni suradnik za laboratorijsku dijagnostiku. Neposredno nakon toga, u Poliklinici Zagreb, vodila je medicinsko-biokemijski laboratorij do srpnja 2013. godine. Iste godine upisala je poslijediplomski doktorski studij iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija, na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U periodu od srpnja 2013. godine do lipnja 2016. godine, radila je kao istraživač na znanstvenom projektu „IntegraLife“. Član je Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu te Hrvatske komore medicinskih biokemičara.

### **Sudjelovanja na stručnim skupovima:**

1. 23. međunarodni simpozij o glikokonjugatima „Glyco 23“, Split, 2015. godina.  
Poster: „Immunoglobulin G and total plasma protein *N*-glycosylation in Parkinson's disease“
2. EMBO radionica „Glycobiology and glycochemistry: Application to human health and disease“, Lisabon, Portugal, 2014. godina.
3. simpozij „Nanotechnology in pharmacy and medicine“, Zagreb, 2013. godina.

**Objavljeni znanstveni radovi:**

1. **Šimurina M**, Haan N de, Vučković F, et al. Glycosylation of Immunoglobulin G Associates With Clinical Features of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 2018;154(5):1320-1333.
2. Wahl A, Kasela S, Carnero-Montoro E, van Iterson M, Štambuk J, Sharma S, van den Akker E, Klaric L, Benedetti E, Razdorov G, Trbojević-Akmačić I, Vučković F, Ugrina I, Beekman M, Deelen J, van Heemst D, Heijmans BT, B I O S Consortium, Wuhler M, Plomp R, Keser T, **Šimurina M** et al. IgG glycosylation and DNA methylation are interconnected with smoking. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2018;1862:637–648.
3. Lemmers RFH, Vilaj M, Urda D, Agakov F, **Šimurina M** et al. IgG glycan patterns are associated with type 2 diabetes in independent European populations. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2017;1861:2240–2249.
4. Russell AC, **Šimurina M**, Garcia MT, et al. The N-glycosylation of immunoglobulin G as a novel biomarker of Parkinson's disease. *Glycobiology* 2017;27:501–510.
5. Freidin MB, Keser T, Gudelj I, Štambuk J, Vučenović D, Allegri M, Pavić T, **Šimurina M** et al. The Association between Low Back Pain and Composition of IgG Glycome. *Sci Rep* 2016;6.
6. Barrios C, Zierer J, Gudelj I, Štambuk J, Ugrina I, Rodríguez E, Soler MJ, Pavić T, **Šimurina M** et al. Glycosylation Profile of IgG in Moderate Kidney Dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2016;27:933–941.
7. Klasić M, Markulin D, Vojta A, Samaržija I, Biruš I, Dobrinić P, Ventham NT, Trbojević-Akmačić I, **Šimurina M** et al. Promoter methylation of the *MGAT3* and *BACH2* genes correlates with the composition of the immunoglobulin G glycome in inflammatory bowel disease. *Clin Epigenetics* 2018;10:75.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

**N-GLIKOZILACIJA IMUNOGLOBULINA G U UPALNIM BOLESTIMA CRIJEVA****Mirna Šimurina****SAŽETAK**

Uzrok upalne bolesti crijeva (eng. *inflammatory bowel disease*, IBD) nije još uvijek potpuno razjašnjen te je ponekad teško razlikovati najučestalije oblike, Crohnovu bolest (eng. *Crohn's disease*, CD) i ulcerozni kolitis (eng. *ulcerative colitis*, UC). Glikozilacija imunoglobulina G (IgG) povezuje se s CD-om i UC-om. Fc-glikozilacija IgG-a (fragment koji kristalizira, eng. *fragment crystallizable*, Fc) utječe na njegove efektorske funkcije. Analizirane su promjene u Fc-glikozilaciji IgG-a povezane s UC-om i CD-om kao i s kliničkim obilježjima ovih bolesti u različitim skupinama ispitanika te je ovo prva studija upalne bolesti crijeva u kojoj je analizirana glikozilacija IgG-a po potklasama. U retrospektivnoj studiji prikupljeno je ukupno 2 357 uzoraka krvne plazme pacijenata oboljelih od UC-a (1056) i CD-a (874) te zdravih ispitanika (eng. *healthy controls*, HC, 427). Ovo je dosad najveće provedeno istraživanje glikozilacije IgG-a u IBD-u. Tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa (eng. *nano-liquid chromatography-mass spectrometry*, nanoLC-MS) analizirana je Fc-glikozilacija IgG-a po potklasama (glikopeptidi dobiveni djelovanjem tripsina). Ispitivana je povezanost između pojedinih skupina (UC vs HC, CD vs HC i UC vs CD) i glikopeptida te povezanost između kliničkih obilježja bolesti i glikopeptida. Kod pacijenata oboljelih od CD-a i UC-a, zabilježena je niža razina galaktozilacije IgG-a u odnosu na kontrole. Fukozilacija IgG-a je bila povećana kod oboljelih od CD-a naspram HC-a, ali snižena kod oboljelih od UC-a naspram HC-a. Snižena galaktozilacija se povezuje s težim oblicima CD-a i UC-a, uključujući i potrebu za operacijom. U retrospektivnoj analizi uzoraka krvne plazme pacijenata oboljelih od CD-a i UC-a, IgG Fc-glikozilacija je povezana s navedenim bolestima (u usporedbi s kontrolama) i njihovim kliničkim obilježjima. Rezultati ovoga istraživanja bi mogli, kroz bolju klasifikaciju pacijenata, pridonijeti boljem razumijevanju mehanizama razvoja CD-a i UC-a te razvoju dijagnostike ili smjernica liječenja.

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

Rad sadrži: 124 + XXV stranica, 24 slike, 22 tablice i 267 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: upalna bolest crijeva, Chronova bolest, ulcerozni kolitis, imunoglobulin G, Fc-glikozilacija, glikopeptidi, nanoLC-MS, klinička obilježja, galaktozilacija, fukozilacija, klasifikacija pacijenata.

Mentor: Dr. sc. Gordan Lauc, red. prof.

Ocjenjivači: Dr. sc. Sanja Dabelić, izv. prof

Dr. sc. Neven Ljubičić, red. prof.

Dr. sc. Mario Cindrić, viši znanstv. sur.

Rad prihvaćen: 4. srpnja 2018.



**BASIC DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral dissertation

**N-GLYCOSYLATION OF IMMUNOGLOBULIN G IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE****Mirna Šimurina****SUMMARY**

The cause of inflammatory bowel disease (IBD) is still poorly understood and the most prominent forms Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are sometimes hard to distinguish. Glycosylation of immunoglobulin G (IgG) has been associated with CD and UC. IgG Fc-glycosylation affects IgG effector functions. The changes in IgG Fc-glycosylation associated with UC and CD, as well as with disease characteristics in different patient groups, were evaluated, and this is the first study of inflammatory bowel disease where subclass-specific IgG glycosylation was analyzed. A total of 2 357 plasma samples were collected in retrospective cohort that contained samples from UC (1056) and CD patients (874) as well as healthy controls (HC, 427). So far, this is the largest study of IgG glycosylation in IBD. Subclass-specific IgG Fc-glycosylation (tryptic glycopeptides) was analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (nanoLC-MS). Associations between disease status (UC vs HC, CD vs HC, and UC vs CD) and glycopeptide traits and associations between clinical characteristics and glycopeptide traits, was performed. Patients with CD or UC had lower levels of IgG galactosylation than controls. Fucosylation of IgG was increased in patients with CD vs controls but decreased in patients with UC vs controls. Decreased galactosylation associated with more severe CD or UC, including the need for surgery. In a retrospective analysis of plasma samples from patients with CD or UC, we associated levels of IgG Fc-glycosylation with disease (compared to controls) and its clinical features. Through better patient classification, these findings could increase our understanding of mechanisms of CD and UC pathogenesis and be used to develop diagnostics or guide treatment.

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

Thesis includes: 124 + XXV pages, 24 figures, 22 tables and 267 references. Original is in Croatian language.

Keywords: inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, immunoglobulin G, Fc-glycosylation, glycopeptides, nanoLC-MS, clinical characteristics, galactosylation, fucosylation, patient classification

Supervisor: Prof. Gordan Lauc, PhD

Ocjenjivači: Prof. Sanja Dabelić, PhD

Prof. Neven Ljubičić, PhD

Senior research associate, Mario Cindrić, PhD

Doctoral dissertation accepted: July 4, 2018



