

# Usporedba glikozilacije imunoglobulina G u bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom

---

Kljaković-Gašpić Batinjan, Marina

Doctoral thesis / Disertacija

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:497419>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marina Kljaković-Gašpić Batinjan**

**Usporedba glikozilacije  
imunoglobulina G u bolesnika s  
influencom i bolesnika s bakterijskom  
pneumonijom**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2024.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Marina Kljaković-Gašpić Batinjan**

**Usporedba glikozilacije  
imunoglobulina G u bolesnika s  
influencom i bolesnika s bakterijskom  
pneumonijom**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2024.

Disertacija je izrađena u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Rok Čivljak, dr. med.

Zahvaljujem se mentoru izv. profesoru Roku Čivljaku na podršci koju mi je pružio tijekom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se svim kolegama u Klinici za infektivne bolesti i kolegama u Laboratoriju za glikobiologiju tvrtke Genos d.o.o. koji su pridonijeli izradi ove disertacije.

Veliko hvala Karli, Marku, Igoru, a posebice Nikolini Pleić – bez tebe ne bih uspjela.

Najviše se zahvaljujem svojoj obitelji, a naročito suprugu Goranu, na ljubavi, strpljenu, razumijevanju i podršci koju su mi pružili tijekom izrade ove disertacije.

Ovu disertaciju posvećujem svojim sinovima Josipu i Borni.

## SADRŽAJ

<b>POPIS OZNAKA I KRATICA .....</b>	<b>I</b>
<b>1. UVOD I SVRHA RADA .....</b>	<b>1</b>
1.1. Akutne respiratorne infekcije.....	1
1.2. Influenca .....	2
1.3. Bakterijska pneumonija .....	5
1.4. Glikani i glikozilacija.....	9
1.5. Imunoglobulin G i glikozilacija imunoglobulina G .....	12
1.6. Glikozilacija imunoglobulina G u infektivnim bolestima .....	18
<b>2. HIPOTEZA .....</b>	<b>22</b>
<b>3. CILJEVI RADA .....</b>	<b>23</b>
<b>4. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>24</b>
4.1. Ispitanici .....	24
4.2. Plan prikupljanja podataka .....	27
4.3. Demografski, anamnestički i klinički podaci .....	28
4.4. Dijagnostička obrada.....	29
4.5. Procjena težine i ishoda bolesti.....	31
4.6. Postupak određivanja glikozilacijskog profila imunoglobulina G.....	35
4.7. Statističke metode .....	38
<b>5. REZULTATI.....</b>	<b>40</b>
5.1. Osnovna obilježja ispitanika.....	40
5.2. Usporedba kliničkih, radioloških i laboratorijskih obilježja bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom pri prijemu .....	45

<b>5.3. Rezultati analize N-glikana imunoglobulina G .....</b>	<b>54</b>
5.3.1. Rezultati analize N-glikana imunoglobulina G unutar ispitivanih skupina .....	56
5.3.2. Rezultati analize N-glikana imunoglobulina G između ispitivanih skupina .....	62
5.3.3. Procjena dijagnostičkog potencijala glikozilacijskog profila imunoglobulina G u razlikovanju virusne (influenca) od bakterijske (bakterijska pneumonija) infekcije .....	86
5.3.4. Rezultati analize N-glikana imunoglobulina G unutar skupine bolesnika s influencom prema težini bolesti pri prijemu.....	90
5.3.5. Procjena dijagnostičkog potencijala glikozilacijskog profila imunoglobulina G u razlikovanju stupnja težine bolesti u bolesnika s influencom pri prijemu.....	100
5.3.6. Rezultati analize N-glikana imunoglobulina G unutar skupine bolesnika s bakterijskom pneumonijom prema težini bolesti pri prijemu.....	103
5.3.7. Procjena dijagnostičkog potencijala glikozilacijskog profila imunoglobulina G u razlikovanju stupnja težine bolesti u bolesnika s bakterijskom pneumonijom pri prijemu.....	115
5.3.8. Prognostička vrijednost glikozilacije imunoglobulina G u predikciji ishoda liječenja .....	121
<b>6. RASPRAVA .....</b>	<b>123</b>
<b>7. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>136</b>
<b>8. KRATKI SADRŽAJ.....</b>	<b>138</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>139</b>
<b>10. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>140</b>
<b>11. KRATKA BIOGRAFIJA.....</b>	<b>172</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA

2-AB	2-aminobenzamid
ADCC	stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima (engl. <i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> )
ADCD	aktivacija komplementskog sustava ovisna o protutijelima (engl. <i>antibody-dependent complement deposition</i> )
ADCP	stanična fagocitoza ovisna o protutijelima (engl. <i>antibody-dependent cellular phagocytosis</i> )
ADCVI	o protutijelima ovisna stanična virusna inhibicija (engl. <i>antibody-dependent cellular viral inhibition</i> )
AGEs	završni proizvodi napredne glikacije (engl. <i>advanced glycation end products</i> )
ALP	alkalna fosfataza
ALT	alanin-aminotransferaza
ANOVA	analiza varijance (engl. <i>analysis of variance</i> )
APC	antigen predočna stanica (engl. <i>antigen presenting cell</i> )
APRIL	ligand koji inducira proliferaciju B stanica (engl. <i>a proliferation-inducing ligand</i> )
ARDS	akutni respiracijski distres sindrom (engl. <i>acute respiratory distress syndrome</i> )
Asn	asparagin
AST	aspartat-aminotransferaza
AUC	površina ispod ROC krivulje (engl. <i>area under ROC curve</i> )
B	N-glikani s račvajućim N-acetilglukozaminom
B4GalT1	enzim beta-1,4-galaktoziltransferaza 1
BAFF	čimbenik aktivacije stanica B (engl. <i>B-cell activating factor</i> )

BAL	bronhoalveolarni ispirak
BCR	B-stanični receptor (engl. <i>B-cell receptor</i> )
b-GlcNAc	račvajući N-acetilglukozamin (engl. <i>bisecting N-acetylglucosamine</i> )
CABP	bakterijska pneumonija iz opće populacije (engl. <i>community-acquired bacterial pneumonia</i> )
CAP	pneumonija iz opće populacije (engl. <i>community acquired pneumonia</i> )
CCL2	kemokin ligand 2 (engl. <i>C-C motif chemokine ligand 2</i> )
CD4 <sup>+</sup>	stanični diferencijacijski antigen 4 (engl. <i>cluster of differentiation 4</i> )
CD40	stanični diferencijacijski antigen 40 (engl. <i>cluster of differentiation 40</i> )
CDC	citotoksičnost ovisna o komplementu (engl. <i>complement-dependent cytotoxicity</i> )
CD40L	ligand za molekulu CD40 (engl. <i>cluster of differentiation 40 ligand</i> )
CK	kreatinin kinaza (engl. <i>creatinine kinase</i> )
CMV	citomegalovirus
COVID-19	koronavirusna bolest 2019. (engl. <i>coronavirus disease 2019</i> )
CpG ODN	CpG-slijed (engl. <i>CpG oligodeoxynucleotide</i> )
CR	receptor za komplement (engl. <i>complement receptor</i> )
CRP	C-reaktivni protein (engl. <i>C-reactive protein</i> )
CT	kompjutorizirana tomografija (engl. <i>computerized tomography scan</i> )
CURB-65	smetenost, uremija, respiratorna frekvencija, arterijski krvni tlak, dob $\geq 65$ godina (engl. <i>confusion, uremia, respiratory rate, blood pressure, age <math>\geq 65</math> year</i> )
DC	dendritična stanica (engl. <i>dendritic cell</i> )



DC-SIGN	lektinski receptor tipa C pridružen dendritičnim stanicama (engl. <i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i> )
DKS	diferencijalna krvna slika
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
ER	endoplazmatski retikulum
F	fukozilirani N-glikani (N-glikani sa sržnom fukozom)
Fab	ulomak koji veže antigen (engl. <i>fragment, antigen binding</i> )
Fc	ulomak koji kristalizira (engl. <i>fragment, crystallizable</i> )
FcR	receptor za ulomak Fc imunoglobulina (engl. <i>Fc receptor</i> )
FcγR	receptor za ulomak Fc imunoglobulina G (engl. <i>Fc gamma receptor</i> )
FDC	folikularna dendritična stanica (engl. <i>follicular dendritic cell</i> )
Fuc	fukoza
FUT8	enzim alfa-1,6-fukoziltransferaza, odnosno fukoziltransferaza 8
G0	agalaktozilirani N-glikani (N-glikani bez galaktoze)
G1	monogalaktozilirani N-glikani (N-glikani s jednom galaktozom)
G2	digalaktozilirani N-glikani (N-glikani s dvije galaktoze)
GA	Golgijev aparat (engl. <i>Golgi apparatus</i> )
Gal	galaktoza
GGT	gama-glutamiltransferaza
Glu	glukoza
GlcNAc	N-acetilgluktozamin
GP	kromatografski vrh (engl. <i>glycan peak</i> )
GU	jedinica glukoze (engl. <i>glucose unit</i> )
HA	hemaglutinin (engl. <i>hemagglutinin</i> )
HAI	test inhibicije hemaglutinacije (engl. <i>hemagglutination inhibition assay</i> )

HAP	bolnička pneumonija (engl. <i>hospital acquired pneumonia</i> )
HILIC	tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (engl. <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i> )
HIV	virus humane imunodeficijencije (engl. <i>human immunodeficiency virus</i> )
hIVIG	hiperimuni intravenski imunoglobulini (engl. <i>hyperimmune intravenous immunoglobulin</i> )
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
IFN	interferon (engl. <i>interferon</i> )
IFN- $\alpha$	interferon alfa
IFN- $\beta$	interferon beta
IFN- $\gamma$	interferon gama
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IL	interleukin (engl. <i>interleukin</i> )
IL-1 $\beta$	interleukin-1 $\beta$
IL-4	interleukin 4
IL-6	interleukin 6
IL-21	interleukin 21
INR	međunarodni normalizirani omjer (engl. <i>international normalized ratio</i> )
IQR	interkvartilni raspon (engl. <i>interquartile range</i> )
IVIG	intravenski imunoglobulini (engl. <i>intravenous immunoglobulins</i> ili skupni IgG, engl. <i>pooled IgG</i> )
JIL	Jedinica intenzivnog liječenja
KKS	kompletna krvna slika
KOPB	kronična opstruktivna bolest pluća
LDH	laktat dehidrogenaza

MAC	kompleks koji napada membranu (engl. <i>membrane attack complex</i> )
Man	manoza
MBL	lektin koji veže manozu (engl. <i>mannose-binding lectin</i> )
MHC	glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. <i>major histocompatibility complex</i> )
MHC-II	molekula glavnog sustava tkivne podudarnosti skupine II (engl. <i>major histocompatibility complex class II</i> )
MIP-1a	upalni protein makrofaga 1a (engl. <i>macrophage inflammatory protein – 1 alpha</i> )
MIP-1b	upalni protein makrofaga 1b (engl. <i>macrophage inflammatory protein – 1 beta</i> )
MMP-9	matriks metalopeptidaza 9 (engl. <i>matrix metalloproteinase 9</i> )
multipleks PCR	istodobna detekcija više uzročnika lančanom reakcijom polimerazom (engl. <i>multiplex polymerase chain reaction</i> )
NA	neuraminidaza (engl. <i>neuraminidase</i> )
NIV	neinvazivna mehanička ventilacija
NK stanice	prirodnoubilačke stanice (engl. <i>natural killer cells</i> )
NLRs	receptori slični proteinu koji sadržava domenu za oligomerizaciju nukleotida, odnosno receptori slični NOD-u (engl. <i>nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors</i> , odnosno <i>NOD-like receptors</i> )
MGAT3	enzim $\beta$ -D-manoza $\beta$ -1,4-N-acetilglukozaminil transferaza III (engl. <i>beta-1,4-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase</i> , poznat i kao GnT-III)
MIP-1a	upalni protein makrofaga 1-alfa (engl. <i>macrophage inflammatory protein – 1 alpha</i> )
MIP-1b	upalni protein makrofaga 1-beta (engl. <i>macrophage inflammatory protein – 1 beta</i> )
MS	masena spektrometrija (engl. <i>mass-spectrometry</i> )
OST	oligosaharil-transferaza

PAMP	molekularni obrasci patogenih mikroorganizama (engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i> )
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PCT	prokalcitonin (engl. <i>procalcitonin</i> )
PNGaza F	peptid-N-glikozidaza F
PSI/PORT	PSI/PORT sustav (PSI, engl. <i>Pneumonia Severity Index</i> odnosno PORT, engl. <i>Patient Outcome Research Team</i> )
PV	protrombinsko vrijeme
Q1	prvi kvartil
Q3	treći kvartil
RNK	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i> , RNA)
ROC analiza	analiza osjetljivosti (engl. <i>receiver operating characteristic analysis</i> )
RTG	rendgenska snimka
RT-PCR	lančana reakcija polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju (engl. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> )
S	sijalinizirani N-glikani (N-glikani sa sijalinskom kiselinom)
SARS-CoV-2	teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2 (engl. <i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i> )
SD	standardna devijacija
SDS	natrijev dodecil-sulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SE	sedimentacija eritrocita (engl. <i>erythrocyte sedimentation rate</i> , ESR)
Ser	aminokiselina serin
SPE	ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. <i>solid phase extraction</i> )
SpO <sub>2</sub>	postotak hemoglobina u perifernoj kapilarnoj krvi koji je zasićen kisikom (engl. <i>saturation of peripheral oxygen</i> )
ssRNA	jednolančana ribonukleinska kiselina (engl. <i>single stranded RNA</i> , ssRNA)

ST6Gal1	enzim beta-galaktozid-alfa-2,6-sijaliltransferaza 1
TCR	T-stanični receptor (engl. <i>T-cell receptor</i> )
Thr	aminokiselina treonin
TLRs	receptori čija građa sliči proteinu <i>Toll</i> , odnosno receptori nalik na <i>Toll</i> (engl. <i>Toll-like receptors</i> )
TNF- $\alpha$	čimbenik tumorske nekroze alfa (engl. <i>tumor necrosis factor alfa</i> )
UHPLC	tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> )

# 1. UVOD I SVRHA RADA

## 1.1. Akutne respiratorne infekcije

Akutne respiratorne infekcije, uključujući i influencu, najčešće su infektivne bolesti u općoj populaciji (1,2). Svaka odrasla osoba u prosjeku oboli 2 – 4 puta godišnje od nekog oblika infektivne bolesti dišnog sustava (3). Infektivne bolesti dišnog sustava ujedno su i najčešći razlog posjete ordinacijama obiteljske medicine i primarne zdravstvene zaštite, a na njihovo se liječenje potroši više od 40% ukupno propisanih antimikrobnih lijekova (4,5). Iako se većina infekcija dišnog sustava lako i uspješno liječi, influenza i pneumonija, kao i druge infekcije donjeg dišnog sustava nalaze se na visokom četvrtom mjestu vodećih uzroka smrti u svijetu s više od 2,7 milijuna smrtnih slučajeva tijekom 2013. godine (6).

U većine bolesnika dijagnoza bolesti postavlja se na osnovi kliničke slike (anamneza, klinički pregled) i radiološke potvrde, na temelju čega svrstavamo bolesnika u jedan od kliničkih entiteta odnosno sindroma. Kliničarima problem predstavlja to što se etiološka dijagnoza infekcija dišnog sustava teško postavlja, osobito pri prvom susretu s bolesnikom, pa se početno liječenje temelji na sindromskom pristupu i empirijskoj antimikrobnoj terapiji (7). No, za to je važno čim pouzdanije procijeniti radi li se o virusnoj infekciji, npr. influenci ili o bakterijskoj infekciji npr. bakterijskoj pneumoniji s obzirom na različiti terapijski pristup (8,9). Ponekad se radi i o miješanim polimikrobnim infekcijama kada je još teže procijeniti koji od patogena ima važniju ulogu u patogenezi bolesti te koji oblik liječenja primijeniti (10,11).

Usprkos brojnim trenutno dostupnim mikrobiološkim dijagnostičkim metodama, svaka od ovih metoda ima svoja ograničenja: hemokulture su rijetko pozitivne i jako podložne utjecaju prethodno primijenjene antibiotske terapije; kultura sputuma je nepouzdana; test na antigen iz urina ima dobru osjetljivost, ali je trenutno dostupan samo za *Streptococcus pneumoniae* i *Legionella pneumophila*; molekularne metode detekcije, npr. lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) pomažu u brzom dijagnostici virusnih i nekih atipičnih uzročnika, npr. *Mycoplasma pneumoniae*, ali zahtijevaju dodatnu evaluaciju u procjeni specifičnosti i osjetljivosti te nižu cijenu (8,12–20).

Laboratorijska obrada (hematološka, biokemijska) pomaže u procjeni intenziteta upalnog odgovora i težine bolesti, a dijelom i u procjeni etiologije bolesti (kliničko razlikovanje virusne od bakterijske infekcije) (8,21). U većini slučajeva, osobito ambulantne obrade bolesnika, ova obrada je dostatna za procjenu vrste i oblika liječenja (8,20,22).

Od upalnih biomarkera najveću praktičnu važnost u procjeni intenziteta upalnog odgovora, težine bolesti, a dijelom i etiologije, imaju C-reaktivni protein (engl. *C-reactive protein*, CRP) i prokalcitonin (engl. *procalcitonin*, PCT). Oni se koriste u razlikovanju bakterijskih od virusnih infekcija – razlikovanju bakterijske od virusne pneumonije i drugih bolesti pluća, razlikovanju bakterijemijske od nebakterijemijske pneumonije, postavljanju indikacije za primjenu antibiotika, te u donošenju odluke o prekidu antimikrobne terapije (21,23–25). No u slučaju težih oblika influence, poglavito kada se radi o bolesnicima s težim oblicima bolesti i komplikacijama, i ovi biomarkeri mogu biti povišeni (26). Stoga postoji potreba za translacijskim studijama kako bi se razvili novi protokoli liječenja ili novi biomarkeri s ciljem poboljšanja ishoda (27).

## 1.2. Influenca

Influenca, odnosno gripa, je akutna infektivna bolest dišnog sustava uzrokovana virusima influence (28). Česta je bolest dišnog sustava, a epidemije i pandemije povezane s gripom javljaju se diljem svijeta. Sama bolest i uzročnik dobro su proučeni, no usprkos medicinskom i ekonomskom napretku i dalje se povezuje s visokom stopom hospitalizacije, morbiditeta i mortaliteta (29–31). Svake godine u 5 – 20% ukupnog stanovništva svijeta pojavi se simptomatski oblik influence, a u oko 3 milijuna bolesnika godišnje prisutan je težak oblik bolesti te oko 300 do 500 tisuća slučajeva godišnje završava smrtnim ishodom (30–33).

Virusi influence pripadaju porodici *Orthomyxoviridae*. Strukturu virusne čestice karakterizira jednolančana ribonukleinska kiselina (RNK, engl. *ribonucleic acid*, RNA) obavijena lipidnom ovojnicom koja na svojoj površini sadrži važne glikoproteine – hemaglutinin (engl. *hemagglutinin*, HA) i neuraminidazu (engl. *neuraminidase*, NA) (34). HA i NA važni su glikoproteini u patogenezi infekcije virusom influence te sudjeluju u aktivaciji i ciljno su mjesto djelovanja humoralnog imunskog odgovora domaćina (35–38). HA se veže za sijalinsku kiselinu tj. sijalosaharidne receptore na stanici domaćina što olakšava vezanje i ulazak virusa u stanicu domaćina (35,36,39). S druge strane, NA omogućava oslobađanje viriona iz stanice domaćina tako što uklanja sijalinsku kiselinu s receptora na stanici domaćina i time omogućava daljnje širenje infekcije (40–42).

Klinički, influenza se najčešće manifestira općim simptomima, kao što su glavobolja, umor, malaksalost, mijalgija, vrućica, zimica i/ili tresavica, a nakon dan-dva javlju se i respiratorni simptomi – kašalj i grlobolja (29). Dominacija općih simptoma razlikuje influencu od drugih

virusnih infekcija gornjih dišnih puteva (29). Za postavljanje definitivne dijagnoze influence moramo uzeti u obzir kako kliničku sliku, ali i epidemiološke podatke te nalaze viroloških pretraga (29). U novije vrijeme koriste se testovi direktnog otkrivanja nukleinske kiseline virusa influence, kao što je lančana reakcija polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR) koja se uz kulturu virusa smatra zlatnim standardom laboratorijske potvrde influence (29,43,44).

Uz prepoznavanje i postavljanje ispravne dijagnoze influence, veliku važnost u pristupu bolesniku ima procjena težine bolesti (33). Spektar kliničke prezentacije influence je širok. Od samolimitirajuće bolesti gornjih dišnih puteva (rinosinitisa) do teške pneumonije (45,46). Pneumonija uzrokovana virusom influence tzv. primarna virusna pneumonija glavni je razlog hospitalizacije oboljelih od influence te je glavni razlog visoke smrtnosti (47–49).

Infekcija virusom influence započinje primarno na razini respiratornog epitela (28). Nakon što virus uđe u stanicu, bude prepoznat od strane endosomalnih receptora čija građa slični proteinu *Toll* tzv. receptori nalik na *Toll* (engl. *Toll-like receptors*, TLRs) (50,51). Prepoznavanje komponenti virusa odnosno molekularnih obrazaca patogenih mikroorganizama (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) kao što je primjerice jednolančana RNK (engl. *single stranded RNA*, ssRNA), od strane TLR, potiče aktivaciju signalnog puta koji rezultira ekspresijom genskih produkata koji kontroliraju odgovor urođene imunosti i dalje usmjeravaju razvoj antigen-specifičnog stečenog imunskog odgovora (50–52). TLR mehanizmi prepoznavanja virusa potaknut će stvaranje proupalnih citokina te interferona (IFN) tipa I tj. interferona alfa (IFN- $\alpha$ ) i interferona beta (IFN- $\beta$ ) čiji je najvažniji zadatak kočenje virusne replikacije, te imunostimulatorna aktivnost – primjerice aktivacija prirodno ubilačkih stanica (NK stanice, engl. *natural killer cells*, NK cells) (50–56).

Aktivacija dendritičnih stanica (engl. *dendritic cells*, DC), i to ponajprije plazmocitoidnih DC putem receptora TLR predstavlja kritičan korak u razvoju antigen-specifične stečene imunosti na viruse, čineći sponu između urođene i stečene imunosti (52,57). Nakon prepoznavanja dijelova virusa od strane endosomalnih TLR, dolazi do aktivacije i sazrijevanja stanica DC (56). Na površini DC povećava se izraženost molekula glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) i kostimulacijskih molekula te proizvodnja citokina – ponajprije čimbenika tumorske nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor alfa*, TNF- $\alpha$ ) i IFN- $\alpha$  tip I (56). Istovremeno DC prezentiraju dijelove proteina virusa na svojoj površini uz pomoć molekula MHC skupine II (engl. *major histocompatibility complex class II*, MHC-II) (56,58).



Tako predočene peptide prepoznaju naivni CD4<sup>+</sup> (stanični diferencijacijski antigen 4, engl. *cluster of differentiation 4*) pomagački limfociti T putem površinskog receptora, tzv. T-staničnog receptora (engl. *T cell receptor*, TCR), što rezultira njihovom aktivacijom i diferencijacijom (56,59,60). Aktivirane CD4<sup>+</sup> stanice T tada počinju izražavati ligand za molekulu CD40 (engl. *cluster of differentiation 40 ligand*, CD40L), luče interferon gama (IFN- $\gamma$ ), interleukin-4 (IL-4), interleukin-21 (IL-21) te ulaze u međudjelovanje s već aktiviranim limfocitima B (59,60). Naime, istovremeno limfociti B putem površinskog imunoglobulina na limfocitima B (B-stanični receptor, engl. *B cell receptor*, BCR) prepoznaju neprerađene antigene virusa, a potom peptide nastale razgradnjom bjelančevina virusa predočuju, također u sklopu molekula MHC-II, već aktiviranim pomagačkim stanicama T (59–62). Krajnji rezultat ovog međudjelovanja je diferencijacija limfocita B u plazma stanice koje luče antigen-specifična protutijela i prekapčanje razreda (engl. *class switch*) imunoglobulina iz imunoglobulina M (IgM) u imunoglobulin G (IgG) i imunoglobulin A (IgA) (59,62). Upravo najučinkovitija protutijela u neutralizaciji virusa su protutijela visokog afiniteta nastala u T-ovisnom odgovoru u zametnim središtima (60,62).

Tijekom virusne infekcije ponajprije dolazi do stvaranja IgG protutijela podrazreda IgG1 i IgG3, a IgG3 pojavljuje se prvi tijekom zaraze (63). Tijekom prirodne infekcije virusom influence, za virus-specifične plazma-stanice mogu se već otkriti 7 – 10 dana nakon nastupa simptoma (38,64–66). Jedan od bitnih mehanizama kojim stvorena protutijela sudjeluju u obrani od infekcije virusnom influence jest neutralizacija slobodnih infektivnih čestica (viriona) čime se sprječava daljnje širenje infekcije (64,67). S druge strane, u borbi protiv već virusom zaraženih stanica važnu ulogu ima stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima (engl. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) posredovana prirodnoubilačkim stanicama (NK stanice, engl. *natural killer cells*, NK cells) (38,66,68,69). Kao glavni izvršiooci ADCC *in vivo* tijekom infekcije virusom influence, uz monocite, limfocite i neutrofile, smatraju se NK stanice (38). Vezanjem specifičnih protutijela na antigen virusa koji je izložen na površini stanice domaćina, stanica biva obilježena. Stanice NK na svojoj površini imaju receptore za ulomak Fc (engl. *fragment crystallizable region*, Fc region) protutijela, tzv. Fc-receptore (engl. *Fc receptors*, FcR) putem kojih prepoznaju virusom zaražene i protutijelima obilježene stanice (70–73). Najbolje proučen FcR na ljudskim NK stanicama jest FcR za imunoglobulin G (engl. *Fc gamma receptor*, Fc $\gamma$ R) tip IIIa (Fc $\gamma$ RIIIa), čija je uloga u pokretanju ADCC dobro poznata (70–74) Vezanjem stanice NK preko Fc $\gamma$ RIIIa za ulomak Fc imunoglobulina G, koji je vezan za virusni antigen na površini zaražene stanice, dolazi do

aktivacije stanice NK koja pritom oslobađa citotoksične granule što dovodi do smrti virusom zaražene stanice (38,70,71,73). Istovremeno, NK stanice luče protuvirusne citokine – IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , te kemokine – MIP-1a (upalni protein makrofaga 1a, engl. *macrophage inflammatory protein – 1 alpha*) i MIP-1b (upalni protein makrofaga 1b, engl. *macrophage inflammatory protein – 1 beta*) stvarajući nepovoljne uvjete za umnožavanje virusa (75,76).

Važnost ADCC prepoznata je i u zaštiti te patogenezi infekcije virusom influence (38,66,77,78). No dok pojedine studije upućuju na zaštitni učinak protutijela koja trigeriraju ADCC, druge studije navode dvoznačne rezultate ili čak zaključuju suprotno tj. kako je moguće da ADCC pokrene pretjerani tj. patološki imunski odgovor i dovede do oštećenja zdravog tkiva (66,79–85).

### **1.3. Bakterijska pneumonija**

Bakterijska pneumonija je upala plućnog parenhima uzrokovana bakterijama (86,87). Makar i dalje ostaje kontroverzno pitanje da li je donji dio respiratornog trakta sterilan, ono što je sigurno je da invazija plućnog epitela i parenhima bakterijama, na razini alveola, dovodi do upale i posljedičnog oštećenja parenhima pluća što se klinički manifestira znakovima i simptomima upale pluća (10,88). Bakterijska pneumonija je značajan uzrok smrtnosti diljem svijeta, a prema podacima iz 2016. godine, u više od 50% smrtnih slučajeva infekcije donjeg dišnog sustava, uzročnik je bila bakterija (89).

Prema mjestu nastanka, pneumonije dijelimo na pneumonije iz opće populacije (engl. *community acquired pneumonia*, CAP) i bolničke pneumonije (engl. *hospital acquired pneumonia*, HAP) (10,87).

Pneumonija iz opće populacije je akutna upala tj. infekcija plućnog parenhima stečena izvan bolnice (87). Uzrokovana je mikroorganizmima u domicilnim uvjetima u imunokompetentnih pojedinaca. Bakterije su najčešći uzročnici pneumonije iz opće populacije, a najčešći uzročnik bakterijske pneumonije iz opće populacije (engl. *community-acquired bacterial pneumonia*, CABP) u svijetu je *Streptococcus pneumoniae* (17,20,90,91). Ostali uzročnici koji doprinose etiologiji bakterijske pneumonije su *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* itd. (20). Usprkos tomu što su danas dostupne mnogobrojne mikrobiološke pretrage, svaka od njih ima svoja ograničenja, stoga postavljanje etiološke dijagnoze CAP-a predstavlja složen i kritički procjenjivan proces (14,15). Metodama klasične mikrobiologije, uzročnik pneumonije ne uspije se dokazati u čak 30–70% bolesnika,

no uz istovremenu primjenu molekularnih dijagnostičkih metoda taj se postotak može značajno smanjiti (90,92–97).

Dijagnozu CAP-a postavlja se na temelju anamneze i kliničkog pregleda te laboratorijske obrade, a postavljenu radnu dijagnozu potrebno je potvrditi rendgenskom slikom pluća (8). Za dijagnozu pneumonije je karakterističan anamnestički podatak o novonastalom kašlju koji je praćen barem još jednim od sljedećih simptoma, odnosno znakova: povišena tjelesna temperatura, dispneja (zaduha) i/ili tahipneja (ubrzana frekvencija disanja), bol u prsištu te auskultacijski nalaz pluća karakteriziran krepitacijama (8,98).

U laboratorijskim nalazima vidi se značajan porast upalnih parametara (99). Laboratorijska obrada nam pomaže u procjeni intenziteta upalnog odgovora i težine bolesti, a dijelom i u procjeni etiologije (99–101). Preporuča se odrediti kompletnu krvnu sliku, razinu C-reaktivnog proteina, glukoze u krvi, elektrolita, ureje, kreatinina te aminotransferaza (8). Za bakterijsku pneumoniju karakterističan je nalaz leukocitoze s neutrofilijom, češće skretanje u lijevo, ubrzana sedimentacija eritrocita (SE, engl. *erythrocyte sedimentation rate*, ESR), izrazito povišen CRP i PCT te normalne vrijednosti aminotransferaza (99,101–103). Biomarkeri koji se najčešće koriste u kliničkoj praksi za dijagnostiku pneumonije iz opće populacije, razlikovanje bakterijemijske od nebakterijemijske pneumonije te dijelom procjenu težine i etiologije bolesti te za donošenje odluke o prekidu antimikrobne terapije su CRP te PCT (25,99). U tipičnoj bakterijskoj pneumoniji vrijednosti PCT-a i CRP-a su značajno više u odnosu na atipičnu bakterijsku pneumoniju i virusom uzrokovanu pneumoniju (99).

Klinička prezentacija CAP-a varira od blage pneumonije karakterizirane vrućicom i produktivnim kašljem do teške pneumonije karakterizirane respiratornim distresom i sepsom (20,91). Procjena težine bolesti i procjena stupnja ugroženosti bolesnika s CAP-om određuje se na temelju dobi, spola, rizičnih čimbenika te na temelju kliničke prezentacije pneumonije, a s ciljem donošenja odluke o adekvatnom načinu i mjestu liječenja - ambulantno ili u bolnici (bolnički odjel ili Jedinica intenzivnog liječenja [JIL]). Za procjenu težine bolesti i predikciju 30-dnevnog mortaliteta CAP-a najčešće se ravnopravno koriste slijedeća dva sustava za procjenu težine bolesti: PSI/PORT sustav (PSI, od engl. *Pneumonia Severity Index* odnosno PORT, od engl. *Patient Outcome Research Team*) i CURB-65 sustav (104–106). PSI/PORT sustav je sustav za procjenu težine i stupnja ugroženosti bolesnika koji se temelji na bodovanju dvadeset poznatih čimbenika rizika za CAP. Svaki čimbenik rizika vrijedi određeni broj bodova, te se na temelju ukupnog zbroja bodova bolesnici svrstavaju u jednu od pet rizičnih

skupina s preporukom o potrebi za hospitalizacijom (104). CURB-65 sustav također na temelju poznatih čimbenika rizika (smetenost, razina ureje, respiratorna frekvencija, arterijski krvni tlak, dob) procjenjuje potrebu za hospitalizacijom (106). No, važno je imati na umu, kako odluka o tome da li je potrebna ili ne hospitalizacija bolesnika, ipak mora biti donesena individualno, uzimajući u obzir kako dijagnostičke nejasnoće, komorbiditete, mogućnost uzimanja terapije na usta tako i organizaciju medicinske skrbi i socijalne uvjete bolesnika (8).

Imunosni odgovor domaćina ima najvažniju ulogu u patogenezi infekcije i ishodu. Ukoliko je ovaj sustav narušen, biti će olakšan prodor patogena u organizam domaćina, a o efikasnosti ovog sustava ovisit će i težina kliničke slike kao i ishod bolesti (107). Imunosni odgovor na bakterijsku infekciju donjeg respiratornog trakta obuhvaća i urođenu i stečenu imunost (10). Jednom kada se nađe u donjem respiratornom traktu, bakterija se mora vezati za receptore na respiratornom epitelu kako bi uspostavila infekciju. Bakterije pomoću molekula PAMP aktiviraju receptore TLR koji se nalaze na staničnim membranama i u endosomima stanica domaćina. Većina vrsta TLRs (TLR1 – 6, 9) može se naći na respiratornom epitelu i upravo putem ovih receptora epitel plućnog parenhima započinje signalnu kaskadu aktivacije odgovora urođene imunosti na prisutnost patogene bakterije (10). Tako ključnu ulogu u odgovoru domaćina na ekstracelularne (*Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) bakterije imaju TLR2 i TLR4, smješteni na staničnoj membrani, koji omogućavaju prepoznavanje peptidoglikana, lipoproteina i lipopolisaharida bakterija što rezultira oslobađanjem proupalnih citokina kao što su TNF- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) te interleukin-6 (IL-6) (10,108). Osim TLR, poznata je i uloga citoplazmatskih receptora koje nazivamo receptori slični NOD-u (receptori slični proteinu koji sadržava domenu za oligomerizaciju nukleotida, engl. *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors* odnosno *NOD-like receptors*, NLRs) u odgovoru respiratornog epitela na invaziju patogenim bakterijama (10). Tako primjerice aktivacija NOD2-receptora peptidoglikanom pneumokoka rezultira proizvodnjom kemokina CCL2 (kemokin ligand 2, engl. *C-C motif chemokine ligand 2*, CCL2), koji regrutira makrofage, neutrofile, stanice DC i druge stanice urođene imunosti na mjesto infekcije pojačavajući upalu (109,110).

Regrutirane DC i makrofagi mogu putem membranskog receptora kao što je receptor DC-SIGN (lektinski receptor tipa C pridružen dendritičnim stanicama, engl. *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*, DC-SIGN), vezati kapsularni polisaharid pneumokoka te fizički prenjeti antigen, u neprerađenom obliku u regionalne limfne čvorove odnosno do folikularnih dendritičnih stanica (engl. *follicular dendritic cell*, FDC) i B

limfocita djelujući kao spona između urođene i stečene imunosti (58,111–114). Naivni limfociti B mogu zatim, putem svojih površinskih imunoglobulinskih receptora BCR, prepoznati tako neprerađene antigene prezentirane od strane antigen predočnih stanica (engl. *antigen presenting cell*, APC) kao i antigene na površini mikroorganizma te topljive, slobodne antigene (nevezane za stanice) pristigle aferentnim limfnim žilama do regionalnih limfnih čvorova (58,61,114,115). Mnogi polisaharidi bakterijske stijenke su tipični antigeni neovisni o timusu, što znači da mogu potaknuti proliferaciju i diferencijaciju B stanica u plazma stanice neovisno o pomagačkim stanicama T (58,116). Također i urođeni i stečeni odgovor domaćina na infekciju sa *Streptococcus pneumoniae* ovisan je i o aktivaciji komplementskog sustava (117,118). Klasični put aktivacije komplementskog sustava, osim stečenim antigen-specifičnim protutijelima, može biti aktiviran prepoznavanjem antigena *Streptococcus pneumoniae* molekulom CRP-a, bjelančevinom C1q komplementa, receptorom DC-SIGN ili već prisutnim molekulama IgM (117). Također vezanjem ugljikohidrata na površini bakterije za lektin koji veže manozu (engl. *mannose-binding lectin*, MBL) i/ili za fikoline može doći do aktivacije komplementa lektinskim putem (119–121). Navedene bjelančevine komplementskog sustava se zatim vežu za receptore za komplement na limfocitima B i time dodatno pospješuju aktivaciju i diferencijaciju naivnih limfocita B prethodno već potaknutu vezanjem neprerađenog antigena za BCR (122–124). Na površini naivnih stanica B nalaze se i TLRs te je aktivacija stanica B, antigenima neovisnim o timusu, moguća i putem aktivacije TLRs molekularnim obrascima patogenih mikroorganizama (125). S druge strane bjelančevinski antigeni izvanstaničnih bakterija (antigeni ovisni o timusu), prezentirani u sklopu molekula MHC-II na membrani stanica DC aktiviraju CD4<sup>+</sup> pomagačke limfocite T (126). Limfociti T potom ulaze u međudjelovanje s, već antigenom aktiviranim, stanicama B koje također na svojoj površini u sklopu molekula MHC-II prezentiraju peptide prerađenog bjelančevinskog antigena patogena limfocitima T (62). Rezultat međudjelovanja aktiviranih limfocita T i B je diferencijacija stanica B u plazma stanice, lučenje antigen-specifičnih protutijela pojačanog afiniteta (engl. *affinity maturation*) za vezanje antigena i prekapčanje razreda imunoglobulina (62). Vidimo da je diferencijacija stanica B u plazma stanice posljedica sinergije brojnih signala koji potječu kako od receptora BCR, CD40, TLR te citokinskih receptora i receptora za komplement. Također, aktivacija i diferencijacija naivnih stanica B može biti modulirana i djelovanjem citokina BAFF (čimbenik aktivacije stanica B, engl. *B-cell activating factor*, BAFF) i APRIL (ligand koji inducira proliferaciju B stanica, engl. *a proliferation-inducing ligand*, APRIL) koje

luče stanice plućnog epitela (10). U ljudi dominantni razred protutijela kojeg potiče pneumokokni kapsularni polisaharid jest IgG2 (127).

Humoralna imunost ima važnu ulogu u obrani organizma od bakterijske pneumonije (128). Naime, imunosni odgovor domaćina na *Streptococcus pneumoniae*, kao i na druge izvanstanične bakterije, ponajprije je ovisan o fagocitozi polimorfonuklearnim leukocitima i alveolarnim makrofagima, što znači da je jednako tako ovisan o opsonizaciji izvanstanične bakterije molekulama protutijela (ponajprije molekulama IgG) i bjelančevinama komplementskog sustava (117,129–131). Protutijela i bjelančevine komplementskog sustava pomažu neutralizirati bakteriju i ujedno je označavaju kako bi ju mogle uništiti druge stanice imunskog sustava (117,132–134). Tijekom infekcije izvanstaničnim bakterijama, specifični IgG veže se za bakteriju te može aktivirati komplement klasičnim putem i na taj način započeti proces opsonizacije (135). Rezultat aktivacije komplementskog sustava je nastajanje ulomaka C3b i iC3b koji se kovalentno vežu na površinu bakterije *Streptococcus pneumoniae*, što zajedno s vezanim molekulama IgG usmjerava eliminaciju bakterije fagocitima (makrofagima i neutrofilima) (117,133–135). Naime fagociti na svojoj površini imaju receptore za ulomak Fc imunoglobulina G (FcγR) kao i receptore za ulomke C3b, iC3b i C3d komplementa (receptor za komplement, engl. *complement receptor*, CR) (133,134,136). Tako aktivirani fagociti proždiru i uništavaju bakteriju te pritom oslobađaju proupalne citokine – TNF-α, IL-1β, IL-6, i MMP-9 (matriks metalopeptidaza 9, engl. *matrix metalloproteinase 9*, MMP-9) što potiče daljnji dolazak leukocita na mjesto zaraze i pojačava postojeću upalu (137). Zanimljivo je za istaknuti kako bakterija *Streptococcus pneumoniae* nije podložna razaranju membranskim kompleksom koji napada membranu (engl. *membrane attack complex*, MAC), nastalim aktivacijom komplementa (138).

Osim važne uloge koju ima imunosni odgovor u obrani domaćina od patogena, treba također imati na umu da ponekad humoralni imunosni odgovor može imati i štetne posljedice, dovodeći do pretjerane upale i oštećenja tkiva, što se može vidjeti na primjeru pojedinih slučajeva teške bakterijske pneumonije (139).

#### **1.4. Glikani i glikozilacija**

Stoljećima su ljudi vjerovali da su šećeri (saharidi) važni samo kao izvor energije. Napretkom u mnogim znanstvenim disciplinama otkrivene su nove funkcije šećera u ljudskom organizmu. Tako danas znamo da osim što molekule šećera služe kao izvor energije, također one su

neophodan dio brojnih molekula u ljudskom organizmu, kao što su nukleinske kiseline, enzimi i njihovi kofaktori te drugih važnih molekula (140).

Sve stanice i brojne makromolekule u prirodi sadrže široku lepezu kovalentno vezanih-šećernih lanaca (oligosaharida) koji se jednim imenom nazivaju glikani (140,141). Uz nukleinske kiseline, proteine i lipide, glikani su jedna od četiri esencijalne biološke makromolekule, a posljednjih godina sve se veća pažnja posvećuje upravo glikanima (140,142). Glikani sudjeluju u različitim fiziološkim i patološkim procesima, međumolekularnim i međustaničnim interakcijama, utječu na stanični ciklus, staničnu diferencijaciju i apoptozu, interakciju domaćina i patogena te upalne procese (140,143–145). Važnost glikana i važnost pravilnog odvijanja procesa glikozilacije moguće je prepoznati i kroz prizmu nasljednih poremećaja glikozilacije (140,146).

Glikani se sastoje od monosaharidnih jedinica međusobno povezanih glikozidnom vezom ( $\alpha$ - ili  $\beta$ -vezom) a mogu imati linearnu ili razgranatu strukturu (140). Strukturna varijabilnost glikana je velika te se procjenjuje da postoji preko 5000 različitih glikanskih oblika (147). Svaka monosaharidna jedinica može teorijski biti vezana  $\alpha$ - ili  $\beta$ -vezom na bilo koju od nekoliko pozicija na drugoj monosaharidnoj jedinici u lancu ili na drugi tip molekule. Stoga dok kombinacijom tri nukleotida ili tri aminokiseline može nastati svega šest različitih trimera, kombiniranjem tri različite heksoze može teorijski nastati od 1056 do 27 648 jedinstvenih trisaharida. Ova razlika u potencijalnoj kompleksnosti postaje još izraženija kako broj monosaharida otkrivenih u prirodnim glikanima postaje veći (trenutno se broji u stotinama). Na sreću, biološke makromolekule koje se prirodno pojavljuju u danoj vrsti teže sadržavati relativno samo nekoliko tipova monosaharidnih jedinica i to u ograničenom broju kombinacija (140).

Kovalentnim vezanjem jedne ili više monosaharidnih ili oligosaharidnih jedinica s neugljikohidratnim dijelom (ponajprije lipidima i proteinima) nastaju glikokonjugati (148,149). S obzirom na vrstu neugljikohidratnog dijela razlikujemo nekoliko tipova glikokonjugata: glikani vezani na lipide (glikolipidi, lipopolisaharidi), glikani vezani na aminokiseline (peptidoglikani), glikani vezani na proteine (glikoproteini, glikopeptidi), te glikani vezani na druge male molekule (glikozidi) (140,148–151).

Glikoproteini su primjer glikokonjugata kod kojih je jedan ili više glikana kovalentno vezano za polipeptidnu osnovu (150). Oni mogu biti prisutni unutar jezgre, unutar citoplazme, biti vezani na membranu stanice ili pak biti izlučeni u okolinu stanice (140). Također, glikoproteini

su bitni za međustanično prepoznavanje, signalizaciju i međudjelovanje te su nužni za pravilno funkcioniranje kako brojnih makromolekula, tako i pojedinih stanica i čitavog organizma u cjelini (140,152). Glikani vezani na proteine prije svega značajno utječu na samu strukturu glikoproteina, odnosno na njegovo pravilno smatanje a time i na funkciju samog glikoproteina (153,154).

Glikozilacija označava proces vezanja glikana na proteine (140). Potrebno je razlikovati pojam glikacije od pojma glikozilacije. Glikacija označava proces ne-enzimatskog vezanja šećera na proteine ili lipide (odnosno ne-enzimatska reakcija slobodnih reducirajućih šećera sa slobodnim amino skupinama proteina, DNA i lipida) rezultirajući nastankom završnih proizvoda napredne glikacije (engl. *advanced glycation end products*, AGEs), a odgovorna je za mnoge mikro- i makrovaskularne komplikacije šećerne bolesti te je uključena i u neke druge bolesti i sam proces starenja (155). S druge strane glikozilacija označava složen biokemijski proces vezanja glikana na proteine koji uključuje brojne specifične enzime, a nužan je za normalno funkcioniranje organizma (140). Smatra se da je 50-70% ljudskih proteina glikozilirano što glikozilaciju čini jednom od najčešćih posttranslacijskih modifikacija (156).

Postoji više načina na koje se glikani mogu vezati na proteine, a najčešći način vezanja glikana na proteine je ili preko amidnog dušikovog atoma na bočnom lancu asparagina (Asn) (N-glikozilacija tj. N-vezani glikani) ili preko kisikovog atoma na bočnom lancu serina (Ser) ili treonina (Thr) (O-glikozilacija tj. O-vezani glikani) (140,156). Međutim da bi vezanje glikana za Asn bilo moguće, nije dovoljna samo prisutnost aminokiseline Asn, već se ista mora nalaziti u točno definiranom slijedu aminokiselina: asparagin-X-serin ili asparagin-X-treonin (gdje X predstavlja bilo koju aminokiselinu osim prolina). No s druge strane, prisutnost navedenog definiranog slijeda aminokiselina ne znači nužno i prisutnost glikana (140,156). Navedeni O- i N-vezani glikani u čovjeka nastaju kombinacijom nekih od devet monosaharidnih jedinica (157).

Kod eukariota svi N-vezani glikani se vežu na Asn preko monosaharida N-acetilglukozamina (GlcNAc), te svi imaju jednak sržni dio strukture koji se sastoji od tri manoze (Man) i dva GlcNAc (158). Na sržnu strukturu se zatim mogu vezati ostali monosaharidi, a ovisno o vrsti vezanih monosaharida i načinu grananja, dijelimo N-glikane na:

- kompleksne tj. složene glikane (sržna struktura ima jednu ili više “antena” koje započinju vezanjem GlcNAc-a na jednu od krajnjih manozna sržne strukture),
- oligomanozne (na sržnu strukturu se dalje vežu samo manoze),



- hibridne glikane (koji su strukturom kombinacija kompleksnih i oligomanoznih glikana) (140).

Proteini svoj put nastanka započinju na ribosomima, a zatim se translociraju u lumen endoplazmatskog retikuluma (ER), kroz koji se probijaju do Golgijevog aparata (GA), da bi se konačno iz trans-Golgijeve mreže distribuirali na različita ciljna odredišta (u, na i izvan stanice). Vezanje N-glikana za Asn proteina započinje na luminalnoj strani membrane ER-a za vrijeme dok se proteinski dio još sintetizira na ribosomima i prenosi kroz membranu ER-a. Ovaj N-vezani glikan se dalje modificira unutar ER i GA djelovanjem specifičnih glikozidaza i glikoziltransferaza. Kompleks ER i GA je jedinstven za eukariotske stanice a sadrži brojne enzime uključene u proces glikozilacije (140,159).

Za razliku od sinteze proteina ili sinteze DNA koji se odvijaju prema točno određenom kalupu za sintezu, glikozilacija se ne odvija prema strogo definiranom kalupu već ovisi o zastupljenosti i količini potrebnih enzima i šećernih prekursora (141,157,160). No svejedno glikani vezani na proteine nastaju kao rezultat složenih i strogo reguliranih biokemijskih procesa koji uključuju brojne specifične enzime. U regulaciji glikozilacije sudjeluju takozvani „glikoenzimi“ (enzimi vezani za glikozilaciju). U ljudi je dosada pronađeno oko 500 glikoenzima, od čega 209 glikoziltransferaza, 76 glikozidaza, 114 enzima uključenih u metabolizam i transport monosaharida, 54 enzima vezana uz sulfataciju i 31 enzim uključen u regulaciju biosinteze glikolipida i N-glikozilfosfatidil inozitol sidra (157). Budući da ekspresija ovih enzima ovisi o fiziološkom stanju stanice tj. pod utjecajem je brojnih signala koje stanica prima iz svoje okoline, tako i sastav glikana glikoproteina koje stanica sintetizira ovisi o fiziološkom stanju stanice u kojoj taj glikoprotein nastaje. Upravo zbog toga se tijekom bolesti sastav glikana stanice može izmijeniti.

### **1.5. Imunoglobulin G i glikozilacija imunoglobulina G**

Imunoglobulin G je jedan od najzastupljenijih proteina odnosno glikoproteina u plazmi čovjek te je ujedno i primjer proteina čija je funkcija regulirana glikozilacijom (161,162). Također, najzastupljeniji je razred protutijela u plazmi čovjeka, te igra važnu ulogu u obrani domaćina od patogena (163–165). Prisutan je u serumu zdravih osoba u koncentraciji između 6 do 15 g/L te mu životni poluvijek iznosi 21 dan (63,166). Sintetizira se u plazma stanicama, te je važan dio stečenog odnosno humoralnog imunološkog odgovora (167).

Molekula imunoglobulina G sastoji se od dva ulomka: ulomka Fab (engl. *fragment, antigen-binding*, Fab) i ulomka Fc (engl. *fragment, crystallizable*, Fc) (63). Ulomak Fab je odgovoran za prepoznavanje i vezanje antigena različitih patogena, osobito virusa i bakterija, dok ulomak Fc ima izvršnu funkciju što znači da određuje kako će imunski sustav, nakon vezanja ulomka Fab za antigen, odgovoriti na prisutnost patogena. Upravo vezanjem ulomka Fc imunoglobulina G sa specifičnim molekulama komplementskog sustava i Fc-receptorima na površini stanica urođene imunosti, imunoglobulin G ostvaruje svoju izvršnu funkciju, te određuju daljnji tijek imunskog odgovora na prisutnog patogena, čineći sponu između antigen-specifične stečene imunosti i snažne izvršne funkcije urođene imunosti (38,70,73,74,84,162,168,169).

Nakon vezanja ulomka Fab imunoglobulina G za antigen, aktivacija komplementskog sustava započinje vezanjem ulomka Fc imunoglobulina G za komponentu C1q komplementa (169–171). Navedeno rezultira odlaganjem komponente C3b komplementa na površinu patogena ili inficirane stanice, što omogućava fagocitozu, vezanjem ulomka C3b za vlastite receptore na površini fagocita (neutrofila i makrofaga) (172,173). Vrhunac aktivacije komplementskog sustava predstavlja tvorba MAC što dovodi do smrti stanice (170,172). S druge pak strane, nakon vezanja ulomka Fab imunoglobulina G za antigen, ulomak Fc se može vezati kako za receptor za ulomak Fc imunoglobulina G (engl. *Fc gamma receptor*, Fc $\gamma$ R) na fagocitima – što omogućava fagocitozu patogena (stanična fagocitoza ovisna o protutijelima, engl. *antibody-dependent cellular phagocytosis*, ADCP), tako i za Fc $\gamma$ R na NK stanicama (ponajprije Fc $\gamma$ RIIIA) – što aktivira ADCC i dovodi do smrti zaražene stanice (63,70,84,174,175).

Do sada su opisana dva tipa receptora za ulomak Fc imunoglobulina G. Fc-receptori tipa I dio su superporodice imunoglobulina i dijele se u tri glavne skupine – Fc $\gamma$ -receptori skupine I, II i III, dok su Fc-receptori tipa II članovi porodice lektinskih tip C receptora i obuhvaćaju receptor DC-SIGN i CD23 (74,154,176–179). Fc $\gamma$ -receptori skupine I i II ponajprije su prisutni na fagocitima, dok su Fc $\gamma$ -receptori skupine III prisutni na NK stanicama (Fc $\gamma$ RIIIA) i neutrofilima (Fc $\gamma$ RIIIB) (74,177,179–182). Vezanje za sve Fc $\gamma$ -receptore rezultira aktivacijom stanice, osim u slučaju Fc $\gamma$ RIIB koji je inhibitorni tip receptora važan u okviru prijenosa inhibitornog signala limfocitima B tj. fenomena povratne sprege protutijelima što smanjuje stvaranje protutijela i prigušuje upalu (74,179,183). Također aktivacija DC-SIGN i CD23 receptora dovodi do protuupalnog i imunosupresivnog odgovora (154,178,184).

Ovisno o afinitetu IgG za različite aktivacijske ili inhibitorne Fc-receptore te komponentne komplementskog sustava, IgG može potaknuti proupalni ili protuupalni imunski odgovor

(70,74,178,179,184,185). Sam afinitet određen je strukturom ulomka Fc, koja je pak određena podrazredom IgG protutijela i sastavom N-glikana ulomka Fc (186,187). Naime u području ulomka Fc, na izuzetno evolucijski konzerviranom mjestu – asparaginu-297 (Asn-297), svakog teškog lanca, nalazi se kovalentno vezan N-glikan koji je kako strukturno važan za stabilnost i poluživot protutijela, tako i za moduliranje mnogih izvršnih funkcija imunoglobulina G (63,153,187–189). Promjene u glikozilaciji Fc-vezanih N-glikana mogu izmijeniti kvaternu konformaciju ulomka Fc i tako utjecati kako na vezanje ulomka Fc za Fc-receptore na površini stanica urođene imunosti tako i na interakciju ulomka Fc sa sastavnicama komplementskog sustava (153,154,189–194). Primjerice, IgG protutijela s identičnom proteinskom sekvencom, ukoliko im se ukloni samo jedna molekula fukoze s N-glikana ulomka Fc, mogu postati i do pedeset puta učinkovitija u pokretanju ADCC i protuvirusnoj aktivnosti i to upravo zbog pojačanog afiniteta za Fc $\gamma$ RIIIA (195–199). Suprotno tome, dodavanje sijalinske kiseline N-glikanu ulomka Fc smanjuje afinitet za Fc $\gamma$ RI i dramatično mijenja fiziološku ulogu imunoglobulina G koji od proupalnog postaje protuupalno protutijelo (185,200,201). Naposljetku, poznato je da ukoliko se uklone N-vezani glikani ulomka Fc, molekula IgG se neće moći vezati ili će se pak otežano vezati za Fc-receptore i komponente komplementskog sustava (191,202–205).

Naime, tijekom svog nastanak u stanicama B, ulomak Fc molekule IgG se posttranslacijski modificira dodavanjem N-glikana na specifične asparaginske ostatke (Asn-297) na teškom lancu protutijela (187). Na svakoj molekuli IgG nalazi se po jedno vezno mjesto za N-glikan na Asn-297 svakog teškog lanca (187). Prekursor N-glikana se prvo kotranslacijski dodaje ulomku Fc rastućeg polipeptidnog lanca IgG u endoplazmatskom retikulumu (ER) stanica B koje izlučuju protutijela (plazmablasti ili plazma stanice) (140). Jednom kada molekula IgG prijeđe iz ER u GA, ovaj N-vezani prekursorski glikan se dalje modificira djelovanjem specifičnih glikozidaza i glikoziltransferaza u visoko organiziranom slijedu reakcija, koje skraćuju i produžujuć glikan kako bi se formirala klasična sržna struktura N-glikana s dvije tzv. antene (140). Sržna struktura N-glikana sastoji se od dvije uzastopne molekule N-acetilglukozamina (GlcNAc), na koje se veže jedna molekula manoze, a nakon koje slijede dvije tzv. manozne antene, a na svaku manoznu antenu je potom vezana jedna molekula GlcNAc (140,206,207). Ova sržna struktura N-glikana se zatim dalje modificira djelovanjem četiriju glikoziltransferaza. Enzim alfa-1,6-fukoziltransferaza (fukoziltransferaza 8, FUT8) može dodati fukozu sržnom glikanu unutar medijalnog odjeljka GA – proces koji nazivamo fukozilacija (140,208). Zatim, unutar trans odjeljka GA, beta-1,4-galaktoziltransferaza 1

(B4GalT1) može dodati jednu ili dvije molekule galaktoze na molekulu GlcNAc svake od manoznih antena (proces zvan galaktozilacija), dok enzim beta-galaktozid-alfa-2,6-sijaliltransferaza 1 (ST6Gal1) može dodati po jednu molekulu sijalinske kiseline na svaku prisutnu molekulu galaktoze (proces zvan sijalinizacija) (140,206). I naposljetku, enzim  $\beta$ -D-manoza  $\beta$ -1,4-N-acetilglukozaminil transferaza III (engl. *beta-1,4-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase*, MGAT3) može dodati račvajući GlcNAc (engl. *bisecting N-acetylglucosamine*, b-GlcNAc) na manozne ostatke sržne strukture (140,206,209). Navedeni glikani IgG u području ulomka Fc su uvijek N-vezani glikani, tipično kompleksnog tj. složenog tipa te čine mrežu nekovalentnih interakcija s proteinskom površinom ulomka Fc (140,187,194,210). Iako postoje potencijalna prostorna ograničenja, koja mogu ograničiti obilje određenih glikoformi, varijacije u fukozilaciji, galaktozilaciji, bisekciji i sijalinizaciji N-vezanog glikana pokazale su da se može stvoriti više od 30 različitih N-glikanskih struktura (187,207). Dakle, iako se naziva još i konstantna domena, vidimo da ulomak Fc IgG posjeduje visoku razinu heterogenosti, pružajući imunološkom sustavu priliku da ciljano podesi strukturu ulomka Fc kako bi postigao preciznu kontrolu nad aktivnošću protutijela tijekom imunog odgovora.

Većina N-glikana IgG nalazi se vezana za Asn-297 u području ulomka Fc, no 15-20% molekula poliklonalnog IgG također sadrži N-glikane u području ulomka Fab koja mogu modulirati vezanje protutijela za antigen (211–213).

U zdravih odraslih osoba agalaktozilirani N-glikani imunoglobulina G (G0) čine oko 35%, monogalaktozilirani (G1) također oko 35%, a digalaktozilirani (G2) oko 15% N-glikoma imunoglobulina G (214). Galaktozilacija imunoglobulina G jedna je od najproučavanijih karakteristika glikozilacije imunoglobulina G. Otkriće smanjene galaktozilacije ukupnog imunoglobulina G u bolesnika s reumatoidnim artritisom prije gotovo tri desetljeća, rezultiralo je brojnim studijama koje su proučavale ulogu galaktozilacije imunoglobulina G u različitim upalnim bolestima (215,216). Tako je u brojnim bolestima kojima je zajednička karakteristika podležeća upala, zabilježen pomak ravnoteže prema pretežno agalaktoziliranim N-glikanima (217–219). S druge pak strane, smatra se da galaktozilirani imunoglobulin G ima protuupalnu aktivnost. Zanimljiv primjer toga je reumatoidni artritis, bolest koja često odlazi u remisiju tijekom trudnoće, što korelira s porastom galaktozilacije u trudnoći, dok nakon poroda ponovno dolazi do pomaka ravnoteže prema agalaktoziliranim glikanima (220,221). Zanimljivo je da je na razini pojedinca udio galaktoziliranih struktura relativno stabilan tijekom perioda od nekoliko godina, dok su na razini populacije zabilježene značajne razlike među pojedincima

(214,222,223). Također na razinu galaktozilacije utječe i spol te je udio galaktoziliranih N-glikana imunoglobulina G veći u mladim ženama, a s porastom dobi, i u muškaraca i žena, zabilježeno je polagano ali značajno povećanje udjela agalaktoziliranih N-glikana imunoglobulina G (207,224,225). Za razliku od polagane promjene galaktozilacije s dobi, tijekom epizode akutne upale razina galaktozilacije može se brzo i značajno promijeniti (222).

Prema rezultatima dosadašnjih studija, udio sijaliniziranih struktura u IgG glikomu normalnog ljudskog seruma iznosi oko 15-20% (226,227). Udio sijaliniziranih glikanskih struktura značajno se smanjuje s porastom dobi, a opisane su i promjene vezane uz spol i trudnoću (220,227). Uz fukozilaciju, sijalinizacija je biološki najvažnija modifikacija IgG glikoma. Dodavanje sijalinske kiseline ulomku Fc imunoglobulina G mijenja izvršni odgovor IgG-a iz proupalnog u protuupalni (178,185,201). Mehanizam kojim prisutnost sijalinske kiseline djeluje na izvršnu funkciju imunoglobulina G uključuje promjenu konformacije ulomka Fc imunoglobulina G odnosno zatvaranje veznog mjesta za tip I Fc-receptora i otvaranje skrivenog veznog mjesta za tip II Fc-receptora tj. za C-tip lektinskih receptora DC-SIGN i CD23 (154,178,200,228). Navedeno rezultira i pojačanim izražajem inhibitornog FcγRIIb na površini upalnih stanica i protuupalnom aktivnošću (176,184). Upravo se protuupalna aktivnost visokih doza intravenskih imunoglobulina (IVIg, engl. *intravenous immunoglobulins* ili skupni IgG, engl. *pooled IgG*) pripisuje prisutnosti sijalinske kiseline na ulomku Fc i pojačanoj aktivnosti Fc-receptora tipa II (178,184,185). S druge pak strane, sijalinizacija imunoglobulina G nema utjecaja na pokretanje ADCC (195,229).

Više od 90% imunoglobulina G u serumu zdravih osoba u području Fc-regije sadrži sržnu fukoze (214). Istraživanja monoklonskih protutijela pokazala su da prisutnost odnosno odsutnost sržne fukoze u području ulomka Fc imunoglobulina G ima snažan utjecaj na afinitet vezanja ulomka Fc za FcγRIIIA izražen na NK stanicama (195,196,199,230). Potpuno uklanjanje fukoze s N-glikana ulomka Fc imunoglobulina G povećava afinitet Fc-regije FcγRIIIA čak pedeset puta, što rezultira snažnom aktivacijom NK stanica, pokretanjem ADCC i smrću ciljane stanice (195,196,199). Ovo saznanje primjenjeno je i u proizvodnji terapijskih protutijela kako bi se poboljšala klinička učinkovitost terapije monoklonskim protutijelima (198,231). Isto tako, pokazalo se da afukozilirana protutijela imaju povećani afinitet vezanja i za FcγRIIIB, koji je značajno izražen na površini neutrofila te na taj način pospješuju fagocitozu posredovanu neutrofilima (232,233).

U zdravih odraslih osoba, približno 10-15% ukupnog cirkulirajućeg IgG-a sadrži račvajući N-acetilglukozamin (b-GlcNAc), a s dobi taj udio se povećava (207,211,214). Istraživanja monoklonskih protutijela pokazala su da dodavanje račvajućeg GlcNAc sržnom glikanu pospješuje ADCC (povećanim afinitetom vezanja za FcγRIIIA), iako u manjem stupnju nego nedostatak sržne fukoze (195,234,235). Međutim ako MGAT3 (odnosno GnT-III) – glikoziltransferaza koja veže račvajući GlcNAc za N-glikane imunoglobulina G, veže b-GlcNAc rano u procesu glikozilacije tada vezanje sržne fukoze može biti inhibirano (190,209,236). Stoga vezanje b-GlcNAc vjerojatno utječe na izvršnu funkciju protutijela indirektno, inhibiranjem vezanja sržne fukoze.

Do sada se pokazalo kako na sastav N-glikana imunoglobulina G utječu kako genetska predispozicija tako i okolišni čimbenici (160,237,238). Naime na razini pojedinca, u uvjetima homeostaze, sastav N-glikoma IgG je izuzetno stabilan tijekom dužeg vremenskog perioda, no ipak s porastom dobi se udio pojedinih N-glikana postepeno mijenja te na udio pojedinih N-glikana utječe i hormonski status (npr. spol, trudnoća, hormonske manipulacije) (207,213,222,227,239–241). No sastav N-glikoma IgG može se brzo izmijeniti u slučaju poremećaja homeostaze organizma, te su značajne promjene u sastavu N-glikoma IgG opisane u sklopu brojnih patoloških stanja (214,222). Do sada se malo zna o čimbenicima koji direktno tijekom aktivacije i diferencijacije B stanica utječu na sastav Fab i Fc-vezanih ugljikohidrata izlučenog IgG (159,238). Jedna je od hipoteza je da je glikozilacija kontrolirana dostupnošću i aktivnošću pojedinih glikoziltransferaza u B stanicama (242–244). Pokazalo se da na ekspresiju glikoziltransferaza mogu utjecati epigenetski čimbenici odnosno dob, trudnoća, hormonski status, citokini, prisutnost bakterijske DNA, itd. (210,238,239,245,246) Tako je istraživanje Wang i sur. (238) pokazalo kako okolišni čimbenici - retinoična kiselina (prirodni derivat vitamina A, primjer prehrambenog metabolita), zatim čimbenici koji stimuliraju urođenu imunost (CpG slijed [engl. *CpG oligodeoxynucleotide*, CpG ODN] iz bakterijske DNA, ligand za TLR9), te molekule koje luče stanice stečene imunosti (interleukin-21 podrijetlom iz limfocita T) mogu modulirati sastav N-glikoma izlučenog imunoglobulina G bez da utječu na sastav N-glikoma ostalih glikoproteina stanice. No sveukupno, do sada su istraživanja ekspresije glikoziltransferaza u B stanicama relativno ograničena s obzirom da B stanice čine mali postotak perifernih krvnih stanica (oko 2%) u ljudi (247). Iako je poznato više čimbenika koji utječu na biološku aktivnost stanica B, ne znači da svi oni utječu i na glikozilaciju imunoglobulina G proizvedenog i izlučenog od strane stanica B (238). Stoga usprkos brojnim

teorijama što sve utječe na glikozilaciju IgG unutar stanica B, nisu još uvijek u potpunosti poznati svi mehanizmi modulacije glikozilacije IgG (159).

## **1.6. Glikozilacija imunoglobulina G u infektivnim bolestima**

Predmet zanimanja ovog doktorskog rada su promjene glikozilacije imunoglobulina G u dvije različite infektivne bolesti tj. usporedba N-glikoma imunoglobulina G između bolesnika s influencom (kao primjer unutarstaničnog patogena) i bolesnika s bakterijskom pneumonijom (kao primjer izvanstaničnog patogena).

Iako je do sada istraživanje glikozilacije imunoglobulina G bilo ponajprije bazirano na istraživanjima autoimunih bolesti, monoklonskih protutijela i onkoloških bolesti te su mnoge spoznaje o utjecaju glikozilacije na funkciju IgG protutijela zasnovane na navedenom, makar još uvijek malobrojna, sve je više istraživanja glikozilacije imunoglobulina G u sklopu virusnih i bakterijskih oboljenja koja ukazuju na značajne promjene glikozilacije imunoglobulina G u sklopu infektivnih bolesti (215,217,218,231,248–259). Istraživanja infektivnih bolesti su pokazala kako, u sklopu infekcije, aktivirani imunosni i upalni odgovor može precizno kontrolirati glikozilaciju imunoglobulina G i tako usmjeriti izvršni imunosni odgovor (252–259).

Dok rezultati pojedinih istraživanja u infektivnim bolestima ukazuju na preklapajući obrazac glikozilacije imunoglobulina G među različitim patogenima kao i neinfektivnim bolestima, s druge strane pojedina istraživanja ukazuju i na specifičnosti N-glikozilacije imunoglobulina G ovisno o patogenu. Tako je opaženo da obrazac glikozilacije IgG koji je do sada bio dosljedno opažan u sklopu autoimunih bolesti, a karakteriziran je visokim udjelom agalaktoziliranih i asijaliniziranih N-glikana, karakterizira i kronične infektivne bolesti (219,252,254,255,260). Navedeno je opaženo u kroničnoj infekciji virusom hepatitisa B, tuberkulozi i infekciji virusom humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*, HIV) (219,252,254,255). Ono što je moguća podloga navedenog opažanja, a zajedničko je autoimunim bolestima i kroničnim infektivnim bolestima, je jaka i dugotrajna upala, sugerirajući na moguću ulogu agalaktoziliranog i asijaliniziranog profila IgG kao humornog markera upale (160,261). No s druge pak strane, Parekh i sur. (219) su pokazali kako smanjenje udjela galaktoziliranih N-glikana nije samo posljedica akutne ili kronične upale, te je i više drugih istraživanja ukazalo i na specifičnosti u glikozilacijskom profilu imunoglobulina G u ovisnosti o specifičnom patogenu (262). S obzirom da je, u infektivnim bolestima moguća izolacija i analiza za

patogena-specifičnih protutijela, navedeno pruža mogućnost ciljane analize glikozilacije patogen-specifičnih protutijela i njezinog utjecaja na izvršne mehanizme urođene imunosti. Tako se, istraživanjima na patogen-specifičnim protutijelima izoliranim od iste osobe, pokazalo kako za HIV-specifična IgG protutijela imaju značajno različit N-glikozilacijski profil nego za influencu-specifična protutijela inducirana cijepljenjem, dokazujući da glikozilacija može biti usmjerena ovisno o patogenu odnosno aktiviranom signalnom putu, kako bi se uspješno eliminiralo ciljanog patogena (263). Navedene razlike u glikozilaciji su dovedene u korelaciju s različitim izvršnim mehanizmima urođene imunosti – s ADCC, ADCP, aktivacijom komplementskog sustava ovisno o protutijelima (engl. *antibody dependent complement deposition*, ADCD), o protutijelima ovisnom staničnom virusnom inhibicijom (engl. *antibody dependent cellular viral inhibition*, ADCVI), itd., potvrđujući da je mala vjerojatnost da je moguće univerzalnim promjenama glikozilacije postići kontrolu nad brojnim različitim patogenima s obzirom da različiti patogeni zahtijevaju i različite izvršne puteve imunskog sustava da bi se postigla kontrola nad infekcijom (263,264). Navedene različitosti u glikozilaciji IgG stoga ne čude i vjerojatno su posljedica različitosti u patogenezi pojedinih infekcija, sijelu infekcije (unutarstanični u odnosu na izvanstanične patogene), obrambenim mehanizmima patogena, itd., šaljući različite signale nezrelim limfocitima B (264). S obzirom na navedeno cilj ovog doktorskog rada je ispitati različitosti u glikozilaciji imunoglobulina G između dvije u potpunosti različite infektivne bolesti (virusna u odnosu na bakterijsku infekciju, odnosno unutarstanični patogen u odnosu na izvanstaničnog patogena), kako bi se unaprijedilo razumijevanje promjena glikozilacije IgG tijekom prirodne infekcije, kako u ovisnosti o patogenu, tako i u ovisnosti o težini kliničke slike.

Osim što se glikozilacija pokazala kao marker bolesti, pokazala se i kao prognostički čimbenik (145,174,256,257,265–268). Postoje dokazi da opažene promjene u glikozilaciji imunoglobulina G mogu biti povezane s težinom kliničke slike infektivne bolesti odnosno kontrolom infekcije, što ne iznenađuje s obzirom da je velikim dijelom za odgovarajući imunski odgovor potrebna ravnoteža u aktivnosti aktivacijskih i inhibicijskih Fc-receptora kao i aktivacija odgovarajućih izvršnih mehanizama urođene imunosti (174,252,253,256,257,266,267). Tako je do sada u sklopu kronične hepatitis B infekcije, tuberkuloze, HIV infekcije, infekcije virusom denge i u sklopu infekcije virusom SARS-CoV-2 (teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2, engl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2) pokazano da pojedini profili IgG Fc-glikozilacije koreliraju s težinom bolesti, imajući potencijalnu dijagnostičku i prognostičku vrijednost



(174,252,253,256,257,266,267). S obzirom da do sada, prema našim saznanjima, nije istraživani prognostički potencijal glikozilacije imunoglobulina G u sklopu prirodne influenza infekcije kao niti u sklopu ponajprije izvanstanične bakterijske infekcije u ljudi, jedan od ciljeva našeg istraživanja je ispitati dijagnostički i prognostički potencijal glikozilacije IgG u bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom.

Promjene glikozilacije imunoglobulina G u sklopu influence, do sada su prema našim saznanjima, opisane u ljudi samo nakon cijepljenja protiv influence (176,269). Naime, virus influence spada u skupinu virusa s ovojnicom, a dosadašnja istraživanja su pokazala kako imunosni odgovori na različite viruse s ovojnicom, ali ne i na viruse bez ovojnice, imaju jednu zajedničku karakteristiku – a to je afukozilacija antigen-specifičnog imunoglobulina G (174,253,256,270). Međutim, isto to nije se konzistentno pokazalo nakon cjepljenja, naglašavajući kako je za nastanak afukoziliranog imunoglobulina G potreban membranski kontekst (174,176,269,271). Stoga je jasno da se samo na temelju promjena glikozilacije imunoglobulina G opaženih nakon cijepljenja ne može u potpunosti donositi zaključke o promjenama glikozilacije imunoglobulina G tijekom prirodne infekcije odnosno u kliničkim uvjetima, potvrđujući važnost istraživanja glikozilacije u različitim okolnostima. S druge pak strane, s obzirom da je humoralni imunosni odgovor osnova zaštitne cjevivom inducirane imunosti, dobro su poznata nastojanja da se cjevivima pokuša oponašati osobine zaštine humoralne imunosti u sklopu prirodne infekcije (67). Također, dobro je poznata sposobnost protutijela da preveniraju influenza infekciju neutralizacijom patogena za što je odgovoran ulomak Fab protutijela (67,163,272). Učinkovitost dosadašnjih cjeviva protiv influence ponajprije se mjeri inhibicijom hemaglutinacije (HAI, engl. *hemagglutination inhibition assay*) tj. zasniva na neutralizacijskoj funkciji protutijela (67,176,273–275). No to što pojedina protutijela mogu vezati i neutralizirati antigen samo je jedan od mehanizama kojim protutijela mogu djelovati, te inhibicija hemaglutinacije u potpunosti zanemaruje ulomkom Fc posredovanu izvršnu funkciju protutijela (273). Rezultati dosadašnjih istraživanja su pokazali da glikozilacija IgG protutijela domaćina može biti modificirana cijepljenjem te se pokazalo kako su promjene u glikozilaciji antigen-specifičnih protutijela inducirane cijepljenjem neovisne o početnim razlikama među pojedincima u glikozilaciji imunoglobulina G (176,263,269,271). Stoga je jedan od mogućih doprinosa našeg rada otkrivanje karakteristika zaštitnog humoralnog imunosnog odgovora u sklopu prirodne infekcije i u ovisnosti o težini kliničke slike što može pomoći u prenošenju navedenih saznanja u svrhu razvoja učinkovitije i sigurnije imunizacije. Intrigira pomisao da bi mogli cijepljenjem ciljano usmjeriti glikozilaciju

protutijela i poboljšati efikasnost ali i sigurnost cjepiva, no treba također imati na umu kako u ljudi još uvijek nije u potpunosti jasno niti kako adjuvansi, docjepne booster doze cjepiva i različiti putevi primjene cjepiva utječu na glikozilaciju protutijela.

Također, s obzirom na povećanu rezistenciju na antibiotike, mogućnost da se laboratorijskim modifikacijama Fc-glikana fino podesi terapijska svojstva monoklonskih protutijela i saznanje kako Fc-glikozilacija ima važno mjesto u kontroli infekcije, za patogen-specifičnim usmjeravanjem imunosnog odgovora, zanimljivo postaje i proučavanje terapijskog potencijala glikozilacije protutijela u borbi protiv infektivnih bolesti, šireći na taj način područje primjene monoklonskih protutijela izvan samo područja liječenja tumora i autoimunih bolesti (231,262). Stoga je identificiranje različitih glikozilacijskih profila IgG, tijekom prirodne infekcije različitim patogenima, preduvjet za oblikovanje terapijskih protutijela koja pokreću optimalne izvršne imunosne mehanizme za eliminaciju pojedinog patogena.

S obzirom na povezanost glikozilacije s jačinom upale i ishodom tj. težinom bolesti, nije zanemariva niti uloga glikozilacije IgG kao potencijalnog dijagnostičkog i prognostičkog biljega, stvarajući temelje za uvođenje profila glikozilacije imunoglobulina G u rutinsku primjenu kao dijagnostičkog i/ili prognostičkog biomarkera, što može potencijalno omogućiti personalizirani pristup dijagnostici i liječenju bolesti, te će na taj način poboljšati uspješnost liječenja.

## **2. HIPOTEZA**

Glikozilacija imunoglobulina G u bolesnika s influencom razlikuje se od glikozilacije imunoglobulina G u bolesnika s bakterijskom pneumonijom.

### **3. CILJEVI RADA**

**Opći cilj** ovog istraživanja bio je usporediti glikozilacijski profil imunoglobulina G iz seruma bolesnika s influencom s glikozilacijskim profilom imunoglobulina G iz seruma bolesnika s bakterijskom pneumonijom.

**Specifični ciljevi** ovog istraživanja bili su:

1. utvrditi može li određivanje glikozilacijskog profila imunoglobulina G poslužiti kao dijagnostički biomarker u razlikovanju virusne (influenca) od bakterijske infekcije (bakterijske pneumonije),
2. utvrditi dinamiku glikozilacijskog profila imunoglobulina G tijekom bolesti s ciljem određivanja prognostičke vrijednosti glikozilacije imunoglobulina G u predikciji težine bolesti i ishoda liječenja u bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ispitanici

Ovim istraživanjem bili su obuhvaćeni odrasli bolesnici (dobi  $\geq 18$  godina), oba spola, hospitalizirani u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu zbog akutne infekcije dišnog sustava. Ispitanici su bili podijeljeni u sljedeće skupine:

**Skupina 1.** Bolesnici s etiološki dokazanom influencom,

**Skupina 2.** Bolesnici s bakterijskom pneumonijom.

Također, u istraživanje su bili uključeni i zdravi ispitanici – oba spola, dobi  $\geq 18$  godina, bez kliničkih znakova/simptoma i laboratorijskih pokazatelja infektivne bolesti, koji su činili **kontrolnu skupinu (skupina 3)**.

#### Uključni kriteriji za skupinu 1:

- bolesnici hospitalizirani zbog akutne febrilne bolesti s/bez respiratornih simptoma u trajanju od  $\leq 7$  dana,
- etiološki potvrđena influenza s ili bez primarne influenza pneumonije: pozitivan nalaz brisa ždrijela ili nazofarinksa na virus influence upotrebom lančane reakcije polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju (single RT-PCR, engl. *single reverse transcription polymerase chain reaction*) i/ili istodobnom detekcijom više virusnih uzročnika lančanom reakcijom polimerazom (multipleks PCR, od engl. *multiplex polymerase chain reaction*).

#### Isključni kriteriji za skupinu 1:

- akutna febrilna bolest s ili bez respiratornih simptoma u trajanju od  $> 7$  dana,
- bolesnici s akutnom febrilnom bolešću s ili bez respiratornih simptoma koji klinički imponiraju kao influenza, ali bez etiološkog dokaza influence,
- bolesnici s dokazanom influencom, ali i bakteriološki potvrđenom bakterijskom komplikacijom,
- bolesnici s etiološki dokazanom drugom infekcijom dišnog sustava,
- bolesnici s dokazanom ili predmnijevanom bakterijskom infekcijom drugog organskog sustava.

### Uključni kriteriji za skupinu 2:

- bolesnici hospitalizirani zbog akutne febrilne bolesti sa simptomima donjeg dišnog sustava u trajanju od  $\leq 7$  dana,
- radiološki potvrđena pneumonija (novonastali pneumonični infiltrat na rendgenskoj snimci (RTG) srca i pluća i/ili kompjutoriziranoj tomografiji (engl. *computerized tomography scan*, CT prsišta) bez alternativne dijagnoze.

### Isključni kriteriji za skupinu 2:

- akutna febrilna bolest sa simptomima donjeg dišnog sustava u trajanju od  $> 7$  dana,
- hospitalizacija zbog kliničke sumnje na pneumoniju, ali bez radiološki potvrđene pneumonije (bez novonastalog pneumoničnog infiltrata na RTG/CT snimci pluća),
- bolesnici s drugom infekcijom dišnog sustava.

### Zajednički isključni kriteriji za skupinu 1, skupinu 2 i skupinu 3:

- dob  $< 18$  godina,
- ispitanik nije potpisao informirani pristanak,
- osobe poremećene svijesti i one koje u trenutku pristupanja istraživanju zbog bilo kojeg razloga ne mogu potpisati informirani pristanak,
- ispitanik je uključen u neku drugu intervencijsku kliničku studiju,
- infekcija povezana sa zdravstvenom skrbi (nastup akutne febrilne bolesti više od 48 sati od prijema u bolnicu i/ili hospitalizacija unutar posljednjih 28 dana od dana prijema u bolnicu),
- imunokompromitirani bolesnici (maligna bolest, kemoterapija, transplantacija solidnih organa i matičnih stanica, asplenija, autoimuna bolest, imunosupresijski lijekovi),
- bolesnici liječeni transfuzijom eritrocita, intravenskim imunoglobulinima ili drugim krvnim derivatima,
- zaraza virusom humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*, HIV),
- trudnoća,
- tuberkuloza,
- dvojna infekcija (influenca s bakterijskom pneumonijom ili nekom drugom bakterijskom komplikacijom, ili dvojna virusna infekcija),
- pneumonije kod kojih su dokazani atipični uzročnici, gljive i/ili drugi virusi kao uzročnik bolesti.

Svi ispitanici su dali svoj informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju prije uključivanja u istraživanje. Istraživanje je provedeno prema pravilima Helsinške deklaracije te prema propisima i uz suglasnost Etičkog povjerenstva Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci seruma za analizu glikozilacije imunoglobulina G prikupljeni su u sklopu Europskog projekta pod nazivom „Centar kompetencija u molekularnoj dijagnostici” (Br. KK.01.2.2.03.0006).

## 4.2. Plan prikupljanja podataka

U Tablici 1, je prikazan plan prikupljanja podataka i uzoraka za sve ispitanike uključene u istraživanje.

**Tablica 1.** Plan prikupljanja podataka i uzoraka za sve bolesnike uključene u istraživanje

Dan bolesti	1 – 7	8 – 14	15 – 21	29 – 35
Dan od prijema u bolnicu	0*	7 (± 2)	14 (± 2)	28 (± 2)
Informirani pristanak	X			
Opći podatci	X			
Anamnestički podatci	X	X	X	X
Vitalni znakovi	X	X	X	X
Kompletni klinički pregled	X			
Kontrolni klinički pregled		X	X	X
Radiološka obrada (RTG/CT) <sup>a</sup>	X	X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>
<b>Laboratorijska obrada</b>				
- Kompletni biokemijski i hematološki probir <sup>c</sup>	X			X
- Skraćeni biokemijski i hematološki probir <sup>d</sup>		X	X	
<b>Mikrobiološka obrada</b>				
- Obrisak ždrijela (bakteriološka kultura)	X			
- Obrisak nazofarinksa (bakteriološka kultura)	X			
- Obrisak nazofarinksa (RT-PCR na virus influence)	X			
- Obrisak nazofarinksa (multipleks PCR na respiratorne uzročnike)	X			
- Iskašljaj/BAL/aspirat traheje (bakteriološka kultura)	X			
- Hemokulture (2 seta, aerobna i anaerobna)	X			
- Imunokromatografski test na antigen legionele i pneumokoka u urinu	X			
- Serološki testovi na uzročnike pneumonije (mikoplazma, legionela, klamidija, koksijela)	X			X
<b>Određivanje glikozilacijskog profila imunoglobulina G</b>	X	X		X
<b>Procjena težine bolesti</b>	X	X	X	X
<b>Procjena kliničkog odgovora na liječenje i ishoda bolesti</b>		X	X	X

<sup>a</sup>Radiološka obrada (RTG/CT), odnosi se na rendgen srca i pluća i/ili kompjutoriziranu tomografiju prsišta; <sup>b</sup>Radiološka obrada (RTG/CT) ponavljati će se ukoliko je klinički indicirana; <sup>c</sup>Kompletni biokemijski i hematološki probir obuhvaća: sedimentaciju eritrocita (SE), C-reaktivni protein (CRP), kompletnu krvnu sliku (KKS), diferencijalnu krvnu sliku (DKS), fibrinogen, glukozu (Glu), ureju, kreatinin, elektrolite (natrij, kalij, kloridi, magnezij, anorganski fosfati, kalcij), bilirubin, aspartat-aminotransferazu (AST), alanin-aminotransferazu (ALT), gama-glutamilttransferazu (GGT), alkalnu fosfatazu (ALP), kreatinin kinazu (CK), laktat dehidrogenazu (LDH), ukupne proteine, razinu albumina, elektroforezu serumskih proteina, laktat, protombinsko vrijeme (PV), međunarodni normalizirani omjer (INR), pregledni urin; <sup>d</sup>Skraćeni biokemijski i hematološki probir obuhvaća: SE, CRP, KKS, DKS, fibrinogen, bilirubin, AST, ALT, GGT, ALP, CK, LDH, ukupne proteine, razinu albumina, elektroforezu serumskih proteina, pregledni urin; RT-PCR, lančana reakcija polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*); multipleks PCR, istodobna detekcija više uzročnika lančanom reakcijom polimerazom; BAL, bronhoalveolarni ispirak.



### 4.3. Demografski, anamnestički i klinički podaci

U sklopu ovog istraživanja prikupljeni su brojni demografski, anamnestički i klinički podaci čime su detaljno opisane ispitivane skupine.

Svi demografski, anamnestički, klinički, laboratorijski i drugi podatci o ispitanicima prikupljeni su u za ovu studiju formiranu bazu podataka. U svrhu zaštite identiteta, bolesnicima su dodijeljene alfanumeričke oznake pod kojima su se vodili u bazi podataka. Sama baza je bila dostupna na uvid isključivo doktorandu i mentoru ovog istraživanja.

Od demografskih podataka u bazu podataka uneseni su inicijali, spol, datum rođenja i vrsta smještaja bolesnika.

Od anamnestičkih podataka prikupljeni su:

- podaci o akutnoj respiratornoj infekciji – dan početka bolesti, podaci o pojavnosti i trajanju vrućice (u danima), podaci o drugim općim simptomima akutne infektivne bolesti (prisutnost glavobolje, slabosti, bolova u mišićima, gubitak teka, itd.), podaci o vrsti i trajanju (u danima) specifičnih/respiratornih simptoma,
- epidemiološki podaci,
- podaci o komorbiditetima s posebnim naglaskom na kronične plućne bolesti, kronične kardiovaskularne bolesti, kronične bolesti bubrega, kronične bolesti jetara, kronične metaboličke i endokrine bolesti, kronične neurološke bolesti, cerebrovaskularne bolesti te kronične upalne/degenerativne reumatske bolesti,
- podaci o vitalnim funkcijama bolesnika,
- podaci vezani uz moguću zloupotrebu droga te podaci o konzumiranju alkohola i uživanju duhanskih proizvoda,
- između ostaloga, bilježeno je da li je bolesnik primio cjepivo protiv pneumokoka i/ili protiv influence i ako je primio, u kojem razdoblju je primio navedeno/-a cjepiva.

Od kliničkih podataka pri prijemu bilježeni su vitalni parametri (arterijski krvni tlak, srčana frekvencija, respiratorna frekvencija, tjelesna temperatura, zasićenost krvi kisikom mjerena pulsnom oksimetrijom), stanje svijesti i drugi podaci dobiveni kliničkim pregledom.

#### 4.4. Dijagnostička obrada

Svim bolesnicima je tijekom hospitalizacije provedena ekstenzivna dijagnostička evaluacija koja je uključivala:

- laboratorijsku obradu,
- mikrobiološku obradu,
- i radiološku obradu.

U skladu s ciljevima istraživanja, svim bolesnicima je pri prijemu određena kompletna krvna slika (KKS), diferencijalna krvna slika (DKS), sedimentacija eritrocita (SE), C-reaktivni protein (CRP), prokalcitonin (PCT), fibrinogen te serumska koncentracija glukoze, kreatinina, ureje, kalija i natrija.

Također pri prijemu je određena i posebna biokemija, koja je uključivala određivanje bilirubina, alanin-aminotransferaze (ALT), aspartat-aminotransferaze (AST), gama-glutamilttransferaze (GGT), alkalne fosfataze (ALP), laktat dehidrogenaze (LDH), kreatinin kinaze (CK), protrombinskog vremena (PV), međunarodnog normaliziranog omjera (INR) te elektroforezu serumskih proteina i sediment urina.

Bolesnicima s bakterijskom pneumonijom je pri prijemu određen i acidobazni status kao i bolesnicima s influencom koji su pokazivali znakove respiratorne insuficijencije.

Kontrolni nalazi uključivali su: KKS, DKS, SE, CRP, fibrinogen, bilirubin, AST, ALT, GGT, ALP, CK, LDH, ukupne proteine, razinu albumina, elektroforezu serumskih proteina te pregled sedimenta urina.

Spomenuti laboratorijski nalazi su određeni iz uzoraka krvi, dobivenih iz periferne (najčešće brahijalne) vene. Svi laboratorijski nalazi su pohranjeni u elektronsku i papirnatu dokumentaciju bolesnika (odakle su i prikupljeni za potrebe ovog istraživanja). Nalazi su izrađeni u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu.

U obje skupine ispitanika mikrobiološka obrada pri prijemu obuhvaćala je:

- obrisak ždrijela bakteriološki,
- obrisak nazofarinksa bakteriološki,
- obrisak nazofarinksa
  - testiran na virus influence lančanom reakcijom polimerazom uz prethodnu reverznu transkripciju (engl. *single reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR),
  - testiran na više virusnih uzročnika upotrebom multipleks PCR (istodobna detekcija više uzročnika lančanom reakcijom polimerazom, engl. *multiplex polymerase chain reaction*, multiplex PCR) eseja, Seeplex® RV15 OneStep ACE Detection kit (V1.1) (Seegene Inc., Seoul, Koreja), kojim se otkrivaju:
    - virus influence A i B,
    - humani respiratorni sincicijski virus A i B,
    - humani adenovirus,
    - humani metapneumovirus,
    - humani koronavirusi 229E/NL63 i OC43,
    - humani virus parainfluence 1/2/3/4,
    - humani rinovirus A/B/C,
    - humani enterovirus,
    - humani bokavirus,
- bakteriološku analizu ili iskašljaja ili bronhoalveolarnog ispirka (BAL) ili aspirata traheje,
- uzimanje hemokultura,
- imunokromatografski test na antigen legionele u urinu (BinaxNOW Legionella, Abbott Diagnostics Scarborough, Inc. Scarborough, Maine, USA),
- imunokromatografski test za određivanje polisaharida zida kapsule pneumokoka u urinu (BIOSYNEX S.pneumoniae, Strasbourgh, Francuska),
- serološke pretrage na uzročnike pneumonije.

Svim bolesnicima pri prijemu u bolnicu učinjena je RTG snimka srca i pluća, a ovisno o kliničkoj indikaciji pojedinim bolesnicima je učinjen je i CT snimak prsišta.

Dobiveni rezultati radiološke obrade kategorizirani su na sljedeći način:

- ima ili nema pneumoniju,
- intersticijski ili alveolarni ili miješani tip pneumonije,
- unilateralna ili bilateralna ili multifokalna pneumonija,
- ima ili nema izljeva.

Također svim je bolesnicima učinjena i kontrolna RTG snimka srca i pluća.

#### 4.5. Procjena težine i ishoda bolesti

U ovisnosti o kliničkoj slici pri prijemu, odnosno prisutnosti ili odsutnosti upale pluća na rendgenskoj snimci pluća, bolesnici s influencom podijeljeni su u sljedeće dvije skupine po težini bolesti:

- **influenca bez pneumonije** – ispitanik sa simptomima nekomplikirane infekcije dišnog sustava koji može imati vrućicu, opću slabost, glavobolju, mialgije, hunjavicu, grlobolju i/ili kašalj, u bolesnika nisu prisutni znakovi dehidracije, sepse ili otežanog disanja, te na RTG snimci pluća nema znakova upale pluća,
- **influenca s pneumonijom** – ispitanik s težim simptomima bolesti i znakovima upale pluća na RTG snimci pluća.

Na temelju ove podjele izvršena je daljnja analiza N-glikana imunoglobulina G unutar navedene dvije skupine ispitanika s influencom prema težini bolesti pri prijemu u bolnicu.

Također, neposredno pri prijemu u bolnicu i ispitanicima s bakterijskom pneumonijom određen je stupanj težine bolesti. U procjeni težine bakterijske pneumonije koristili smo se, za bakterijsku pneumoniju validiranim, CURB-65 i PSI/PORT (engl. *Pneumonia Severity Index / Patient Outcome Research Team*) sustavima za procjenu težine bolesti (104,106).

Sustav CURB-65 u svojoj procjeni težine bolesti koristi pet čimbenika rizika, te je jednostavan za primjenu (106). Naziv je kratica, sastavljena od početnih slova slijedećih engleskih pojmova:

- **Confusion:** konfuzija (novonastala psihička promijenjenost – smetenost, dezorijentiranost u vremenu, prostoru ili prema osobama),
- **Urea:** ureja ( $> 7$  mmol/L),
- **Respiratory rate:** respiratorna frekvencija ( $\geq 30$ /min),

- **Blood pressure:** arterijski krvni tlak (sistolički < 90 mmHg ili dijastolički ≤ 60 mmHg),
- **65:** ≥ 65 godina.

Svaki čimbenik rizika nosi jedan bod, odnosno maksimalni mogući CURB-65 zbroj iznosi 5. Za zbroj bodova 0 – 1 procjenjena stopa smrtnosti iznosi 1,5 %, za zbroj bodova 2 procjenjena stopa smrtnosti iznosi 19,2 %, a za zbroj bodova 3 – 5 procjenjena stopa smrtnosti iznosi 22,0 % (106).

S druge strane, PSI/PORT sustav za procjenu težine bolesti i stupnja ugroženosti bolesnika temelji se na bodovanju 20 poznatih čimbenika rizika za CAP (Tablica 2) (104). Svaki čimbenik rizika vrijedi određeni broj bodova, te se na temelju ukupnog zbroja bodova bolesnici svrstavaju u jednu od pet rizičnih skupina – skupina I, II, III, IV ili V (Tablica 2 i Tablica 3):

**Tablica 2. Procjena težine pneumonije prema PSI/PORT (engl. Pneumonia Severity Index / Patient Outcome Research Team) bodovnom sustavu (104)**

	Rizični čimbenici	Broj bodova
<b>Demografska obilježja</b>		
	Muški spol	Broj godina
	Ženski spol	Broj godina - 10
	Smještaj u domu	+10
<b>Komorbiditeti †</b>		
	Zloćudna aktivna bolest	+30
	Kronična bolest jetara	+20
	Kongestivno zatajenje srca	+10
	Cerebrovaskularna bolest	+10
	Bubrežna bolest	+10
<b>Klinički znakovi</b>		
	Dezorijentiranost ‡	+20
	Ubrzano disanje (≥30/min)	+20
	Hipotenzija (sistolički arterijski tlak <90 mmHg)	+20
	Temperatura (<35 °C ili ≥ 40 °C)	+15
	Tahikardija (≥ 125 / min)	+10
<b>Laboratorijski pokazatelji</b>		
	Arterijski pH < 7,35	+30
	Ureja > 11,0 mmol/L	+20
	Natrij < 130 mmol/L	+20
	Glukoza ≥ 14,0 mmol/L	+10
	Hematokrit < 30%	+10
	Parcijalni tlak kisika arterijske krvi < 60 mmHg §	+10
	Pleuralni izljev	+10

\*Ukupni zbroj bodova za danog bolesnika dobiva se zbrajanjem dobi bolesnika izražene u godinama (dob minus 10 za žene) i odgovarajućih bodova za svako primjenjivo obilježje.

†Zloćudna aktivna bolest definirana je kao bilo koji karcinom, osim karcinoma bazalnih ili skvamoznih stanica kože, koji je aktivan u vrijeme prijema ili dijagnosticiran unutar jedne godine od prijema u bolnicu zbog pneumonije. Kronična bolest jetara definira se kao klinička ili histološka dijagnoza ciroze ili drugog oblika kronične bolesti jetara, kao na primjer kronični aktivni hepatitis. Kongestivno zatajenje srca definira se kao sistolička ili dijastolička disfunkcija srčane klijetke dokumentirana anamnezom, fizičkim pregledom i radiografijom prsnog koša, ehokardiogramom ili lijevim ventrikulogramom. Cerebrovaskularna bolest je definirana kao klinička dijagnoza moždanog udara ili prolaznog ishemijskog napada dokumentirana magnetskom rezonancijom ili kompjutoriziranom tomografijom. Bolest bubrega definirana je kao prisutnost kronične bolesti bubrega u anamnezi ili nalazom patološke koncentracije ureje i kreatinina u krvi u medicinskoj dokumentaciji.

‡ Dezorijentiranost je definirana kao dezorijentiranost u odnosu na osobu, mjesto ili vrijeme i pod uvjetom da navedeno nije poznato od ranije odnosno da se ne radi o stanja stuporu ili kome.

§U Pneumonia PORT kohortnoj studiji, nalaz zasićenosti krvi kisikom manje od 90 % na pulsnoj oksimetriji ili potreba za intubacijom prije prijema u bolnicu smatrali su se patološkim nalazom.

\*Preuređeno prema Fine MJ i sur. (104)

**Tablica 3. Interpretacija PSI/PORT (engl. Pneumonia Severity Index / Patient Outcome Research Team) bodovnog sustava (104)**

Zbroj bodova	Bodovna skupina †	Stupanj rizika‡
Bez komorbiditeta, kliničkih znakova ili laboratorijskih pokazatelja prema PSI/PORT bodovnom sustavu	<b>I</b>	nizak
≤ 70	<b>II</b>	nizak
71 – 90	<b>III</b>	nizak
91 – 130	<b>IV</b>	umjeren
> 130	<b>V</b>	visok

† Pripadnost skupini I određena je odsutnošću svih rizičnih čimbenika navedenih u PSI/PORT bodovnom sustavu (vidi Tablicu 2).

Pripadnost skupini II, III, IV i V određena je prema ukupnom zbroju bodova koji je dobiven prema PSI/PORT bodovnom sustavu prikazanom u Tablici 2.

‡Stupanj rizika od smrtnog ishoda ili drugog nepovoljnog ishoda.

\*Preuređeno prema Fine MJ i sur. (104)

Na temelju rezultata PSI/PORT bodovnog sustava bolesnici s bakterijskom pneumonijom podijeljeni su u sljedeće tri skupine po težini bolesti pri prijemu u bolnicu:

- blaga bakterijska pneumonija (PSI/PORT bodovna skupina I i II),
- srednje teška bakterijska pneumonija (PSI/PORT bodovna skupina III),
- teška bakterijska pneumonija (PSI/PORT bodovna skupina IV i V).

Na temelju ove podijele izvršena je daljnja analiza N-glikana imunoglobulina G unutar navedene tri skupine ispitanika s bakterijskom pneumonijom prema težini bolesti pri prijemu u bolnicu.

Svi bolesnici su praćeni u razdoblju do 28 ( $\pm$  2) dana od prijema u bolnicu, osim u slučaju smrtnog ishoda ako je nastupio ranije.

Za vrijeme hospitalizacije pratila se potreba za nadomjesnom terapijom kisikom, prijemom u Jedinicu intenzivnog liječenja (JIL), provođenjem neinvazivne mehaničke ventilacije (NIV), odnosno potreba za intubacijom i invazivnom mehaničkom ventilacijom te hemodinamska nestabilnost i potreba za primjenom vazoaktivnih lijekova.

Iako su prikupljeni brojni podaci tijekom cjelokupnog vremena praćenja bolesnika, predmetom ovog istraživanja su bili isključivo sljedeći ishodi:

- trajanje hospitalizacije (u danima),
- pojava komplikacija (npr. akutni respiracijski distress sindrom (ARDS, engl. *acute respiratory distress syndrome*), pneumotoraks, pleuralni izljev, pleuralni empijem, meningitis/encefalitis, cerebrovaskularni incidenti, kongestivno srčano zatajenje i sl.),
- prijem u JIL,
- status na kraju ispitivanog razdoblja (28. dan):
  - živ, otpušten kući (u prethodno mjesto stanovanja);
  - živ, premješten u ustanovu za kronično zbrinjavanje (domovi);
  - živ, premješten u drugu bolnicu;
  - živ, još uvijek hospitaliziran 28. dana od prijema;
  - preminuo (datum smrti).

#### 4.6. Postupak određivanja glikozilacijskog profila imunoglobulina G

U tri vremenske točke (prvog, sedmog i dvadesetosmog dana od prijema u bolnicu) uziman je uzorak venske krvi bolesnika u količini od 6 ml. Uzorak krvi uzorkovan je u spremnik s podtlakom koji sadrži etilendiamintetraoctenu kiselinu (EDTA), kelirajući antikoagulans. Prikupljanje uzorka krvi vršilo se metodom „podveza + sustav za vađenje krvi s leptirićem”. Postupak odvajanja plazme provodio se istog dana kada i uzorkovanje krvi. Prije provođenja postupka centrifugiranja, uzorci krvi pohranjivani su u uspravnom položaju na sobnoj temperaturi kroz sat vremena, a potom su bili centrifugirani centrifugalnom silom od 1620 g (gravitacijsko ubrzanje) kroz deset minuta. Prvi alikvot plazme volumena 1 ml prebacio bi se u centrifugalnu mikroeprevetu zapremnine 2 ml i još jednom bi se centrifugirao centrifugalnom silom od 2700 g kroz deset minuta. Uzorci plazme potom su prebacivani u mikroeprevete za smrzavanje i odmah pohranjivani na -20 °C do trenutka izvođenja analize (Privitak, Prilog 3).

Imunoglobulini G su izolirani pomoću Protein G ploče s 96 jažica (BIA Separations, Slovenija) iz uzoraka plazme. Izolirani IgG su denaturirani dodatkom natrijevog dodecil sulfata (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) (Invitrogen, SAD) i inkubacijom na 65 °C. Višak SDS je neutraliziran s Igepal-CA630 (Sigma-Aldrich, SAD). N-glikani su oslobođeni nakon dodavanja enzima peptid-N-glikozidaze F (PNGaza F) (Promega, SAD) fosfatnom puferu (engl. *phosphate buffered saline*, PBS). Oslobođeni N-glikani obilježeni su fluorescentnom bojom 2-aminobenzamidom (2-AB). Slobodna boja i redukcijski agens uklonjeni su iz uzoraka pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE). N-glikani su eluirani ultračistom vodom i pohranjeni na -20 °C do upotrebe.

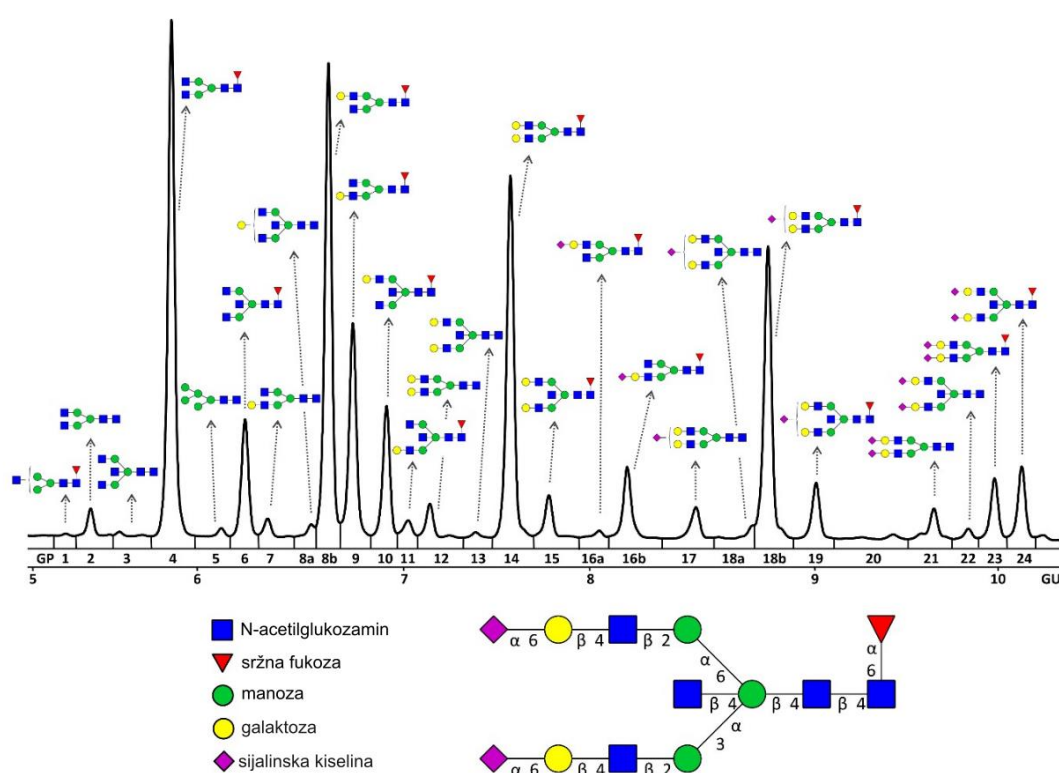
Fluorescentno obilježeni N-glikani razdvojeni su pomoću tekućinske kromatografije temeljene na hidrofilnim interakcijama (engl. *Hydrophilic interaction liquid chromatography*, HILIC) na ACQUITY UPLC (tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti, engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) instrumentu (Waters, SAD) koji se sastoji od kvartarnog upravitelja otapala, upravitelja uzorka i fluorescencijskog detektora s valnim duljinama ekscitacije 250 nm i emisije 428 nm. Instrument je bio pod kontrolom Empower 3 (build 3471) softvera (Waters, SAD).

Fluorescentno obilježeni N-glikani su odvojeni na BEH Glycan (Waters, SAD) kromatografskoj koloni, 100 × 2,1 mm id, 1,7 μm BEH čestica, s 100 mM amonijevog formata, pH 4,4, kao otapalom A i acetonitril kao otapalom B. Metoda odvajanja koristila je linearni gradijent 25 – 38% otapala A pri brzini protoka od 0,40 ml/min u analitičkom ciklusu od 27



minuta. Uzorci su održavani na 10 °C prije injekcije, a temperatura odvajanja bila je 60 °C. Prethodno opisani postupak izolacije molekula imunoglobulina G i određivanje sastava N-glikana imunoglobulina G provedeni su u Laboratoriju za glikobiologiju tvrtke Genos d.o.o.

Obrada podataka provedena je metodom automatske obrade s tradicionalnim integracijskim algoritmom, nakon čega je svaki kromatogram ručno korigiran kako bi se zadržali isti intervali integracije za sve uzorke. Svi kromatogrami su razdvojeni na isti način u 24 kromatografska vrha (engl. *glycan peak*, GP) kao što je prethodno objavljeno (Slika 1) (207). Količina glikana u svakom kromatografskom vrhu izražena je kao postotak (%) ukupne integrirane površine.



**Slika 1.** Reprezentativni kromatogram 2-aminobenzamidom (2-AB) obilježenih N-vezanih glikana oslobođenih s molekula imunoglobulina G koje su izolirane iz ljudskog seruma. N-glikani imunoglobulina G razdvojeni su u 24 kromatografska pika (GP1 do GP24) metodom tekućinske kromatografije temeljene na hidrofilnim interakcijama – tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (HILIC-UHPLC, od engl. *Hydrophilic interaction liquid chromatography – Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*). Prikazane su glavne glikanske strukture koje odgovaraju svakom kromatografskom vrhu. Struktura glikana i njihov prosječan udio u svakom kromatografskom vrhu određeni su spektrometrijom masa. Kromatografski vrhovi su numerirani jednako kao i u ostatku rada (kromatografski vrhovi obilježeni kao “a” i “b” spojeni su u jedan kromatografski vrh). GU, glukoze jedinice; GP, kromatografski vrh (engl. *glycan peak*).

Normalizacija i grupna korekcija provedeni su na UPLC glikanskim podacima kako bi se uklonile eksperimentalne varijacije iz mjerenja. Kako bi mjerenja na uzorcima bila usporediva, izvršena je normalizacija prema ukupnoj površini gdje je površina vrha svake od 24 glikanske strukture podijeljena s ukupnom površinom odgovarajućeg kromatograma. Prije grupne korekcije, normalizirana mjerenja glikana su logaritamski transformirana zbog desne nagnutosti njihovih distribucija i multiplikativne prirode učinaka grupe. Grupna korekcija provedena je na log-transformiranim mjerenjima korištenjem ComBat metode unutar programskog jezika R (R paket „sva“) (276), pri čemu je tehnički izvor varijacije (koji je uzorak analiziran na kojoj pločici) modeliran kao grupna kovarijata. Kako bi se mjerenja ispravila za eksperimentalni šum, procijenjeni učinci grupe oduzeti su od logaritamskih transformiranih mjerenja.

Uz 24 izravno izmjerene glikanske strukture, **6 izvedenih parametara** izračunato je iz izravno izmjerenih glikana prema formulama prikazanim u Tablici 4. Za svaki izvedeni parametar dobiveni zbroj kromatografskih vrhova podijeljen je zbrojem svih kromatografskih vrhova (GP) i izražen u postotku (%). Ovi izvedeni parametri predstavljaju udio strukturno sličnih glikanskih struktura koje dijele zajednički biosintetski put. Statistička analiza provedena je samo na ovih šest izvedenih parametara.

**Tablica 4.** Šest izvedenih parametara glikozilacije imunoglobulina G

Izvedeni parametar	Opis	Formula
<b>G0</b>	Udio <i>N</i> -glikana bez galaktoze u ukupnim <i>N</i> -glikanima imunoglobulina G	$(GP1 + GP2 + GP4 + GP6) / GP_u$
<b>G1</b>	Udio <i>N</i> -glikana s jednom galaktozom u ukupnim <i>N</i> -glikanima imunoglobulina G	$(GP7 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11) / GP_u$
<b>G2</b>	Udio <i>N</i> -glikana s dvije galaktoze u ukupnim <i>N</i> -glikanima imunoglobulina G	$(GP12 + GP13 + GP14 + GP15) / GP_u$
<b>B</b>	Udio <i>N</i> -glikana koje sadrže računajući GlcNac u ukupnim <i>N</i> -glikanima imunoglobulina G	$(GP3 + GP6 + GP10 + GP11 + GP13 + GP15 + GP19 + GP22 + GP24) / GP_u$
<b>F</b>	Udio <i>N</i> -glikana sa sržnom fukozom u ukupnim <i>N</i> -glikanima imunoglobulina G	$(GP1 + GP4 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP14 + GP15 + GP16 + GP18 + GP19 + GP23 + GP24) / GP_u$
<b>S</b>	Udio <i>N</i> -glikana sa sijalinskom kiselinom u ukupnim <i>N</i> -glikanima imunoglobulina G	$(GP16 + GP17 + GP18 + GP19 + GP20 + GP21 + GP22 + GP23 + GP24) / GP_u$

GP, kromatografski vrh; GP<sub>u</sub>, ukupni glikani (ukupne glikane čine kromatografski vrhovi GP1 do GP24), GlcNac, *N*-acetilglukozamin.

#### 4.7. Statističke metode

Korištenjem metodologije koju predlaže Cohen (277), a uvažavajući rezultate istraživanja koje navode Selman, Lu i Lauc (257,269,278), izračunala se potrebna veličina uzorka. Uz razinu značajnosti od 0,05 i statističku snagu od 0,80, minimalan broj ispitanika iznosi 50 po skupini.

Deskriptivna statistika ispitivanih N-glikozilacijskih parametara imunoglobulina G u tri ispitivane skupine i u tri vremenske točke (mjerenja) prikazana je kao medijan (interkvartilni raspon, engl. *interquartile range*, IQR) uz minimalnu i maksimalnu vrijednost.

U prvom dijelu studije provedena je longitudinalna analiza uzoraka pacijenata kroz razdoblje promatranja implementacijom linearnog mješovitog modela u kojem je mjerenje glikana bilo zavisna varijabla, vrijeme je modelirano kao fiksni učinak, dok su pojedinačni ispitanici uključeni u model kao nasumični odsječak, a dob i spol uključeni kao dodatne kovarijate. Analize su prvo provedene za svaku kohortu posebno, a zatim kombinirane korištenjem pristupa meta-analize slučajnih učinaka („meta“ R paketa). Prije analize, sve varijable glikana transformirane su u standardnu normalnu distribuciju (srednja vrijednost = 0, sd = 1) inverznom transformacijom rangova u normalnost (R paket "GenABEL", funkcija *rntransform*). Korištenje rangiranih transformiranih varijabli u analizama čini procijenjene učinke različitih glikana u različitim kohortama usporedivim jer transformirane varijable glikana imaju istu standardiziranu varijancu. Stopa lažno pozitivnih rezultata kontrolirana je Benjamini-Hochbergovom procedurom (funkcija *p.adjust (method = "BH")*). Podaci su analizirani i vizualizirani korištenjem R programskog jezika (verzija 4.0.2) (276).

Nakon što su kretanja izvedenih glikozilacijskih parametara ispitana unutar svake skupine zasebno, formalno smo testirali razlike u njihovim kretanjima između skupina također koristeći linearni mješoviti model. Za svaki od šest izvedenih glikozilacijskih parametara konstruirali smo zaseban linearni mješoviti model s interakcijom vremena uzorkovanja i skupine. Interakcijom ispituje se ima li pripadnost određenoj skupini utjecaj na kretanje glikozilacijskog parametra kroz vrijeme. Koeficijenti linearnog mješovitog modela nam ilustriraju u kojoj se mjeri promjene u glikozilacijskim parametarima razlikuju između ispitivanih skupina. Uz formalno testiranje efekta interakcije, linearnim mješovitim modelom također smo testirali i glavne efekte skupine i vremena uzorkovanja.

Dodatno smo procijenili dijagnostički potencijal glikozilacijskog profila imunoglobulina G u razlikovanju virusne (influenca) od bakterijske (bakterijska pneumonija) infekcije koristeći

ROC analizu (analiza osjetljivosti, engl. *receiver operating characteristic analysis*, ROC analysis).

U drugom dijelu studije smo također, primijenjujući linearni mješoviti model, ispitali kretanje glikozilacijskih parametara između skupina koje su bile definirane prema težini bolesti pri prijemu, posebno za influencu i posebno za bakterijsku pneumoniju.

Naposljetku smo istražili prognostički potencijal glikozilacijskog profila imunoglobulina G u predikciji duljine boravka u bolnici koristeći model linearne regresije. Za svaki od 6 izvedenih glikozilacijskih parametara konstruirali smo model linearne regresije u kojem je zavisna varijabla bila duljina boravka, a nezavisne varijable su bile glikozilacijski parametar uz zbunjujuće faktore spola i dobi. Razina značajnosti je postavljena na 0.05. Linearni mješoviti modeli su modelirani koristeći programski jezik R (276).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Osnovna obilježja ispitanika

Analiza sastava N-glikoma imunoglobulina G provedena je na ukupno 519 uzoraka plazme sakupljenih u više vremenskih točaka na uzorku od ukupno 195 ispitanika uključenih u istraživanje.

Ukupan broj ispitanika čine:

- 64 bolesnika s influencom – bolesnici hospitalizirani zbog akutne febrilne bolesti s/bez respiratornih simptoma u trajanju od  $\leq 7$  dana i s laboratorijski potvrđenom infekcijom influenza virusom uključivani su u istraživanje tijekom tri uzastopne zimske sezone (sezona 2017./2018., 2018./2019. i 2019./2020);
- 75 bolesnika s bakterijskom pneumonijom – navedenu skupinu čine bolesnici s radiološki potvrđenom pneumonijom (novonastali pneumonični infiltrat na RTG srca i pluća i/ili CT prsišta) bez alternativne dijagnoze koji su bili hospitalizirani zbog akutne febrilne bolesti sa simptomima donjeg dišnog sustava u trajanju od  $\leq 7$  dana. Ispitanici su uključivani u istraživanje tijekom tri uzastopne zimske sezone (sezona 2017./2018., 2018./2019. i 2019./2020);
- 56 zdravih ispitanika kao kontrolna skupina – kontrolna skupina obuhvatila je 56 dobrovoljaca s područja grada Zagreba i Zagrebačke županije u vremenskom razdoblju od lipnja 2018. godine do veljače 2020. godine koji su bili bez kliničkih znakova/simptoma i laboratorijskih pokazatelja infektivne bolesti. Uzorci za izolaciju imunoglobulina G su također sakupljeni u tri vremenske točke – prvog, sedmog i dvadesetmog dana od uključanja u istraživanje.

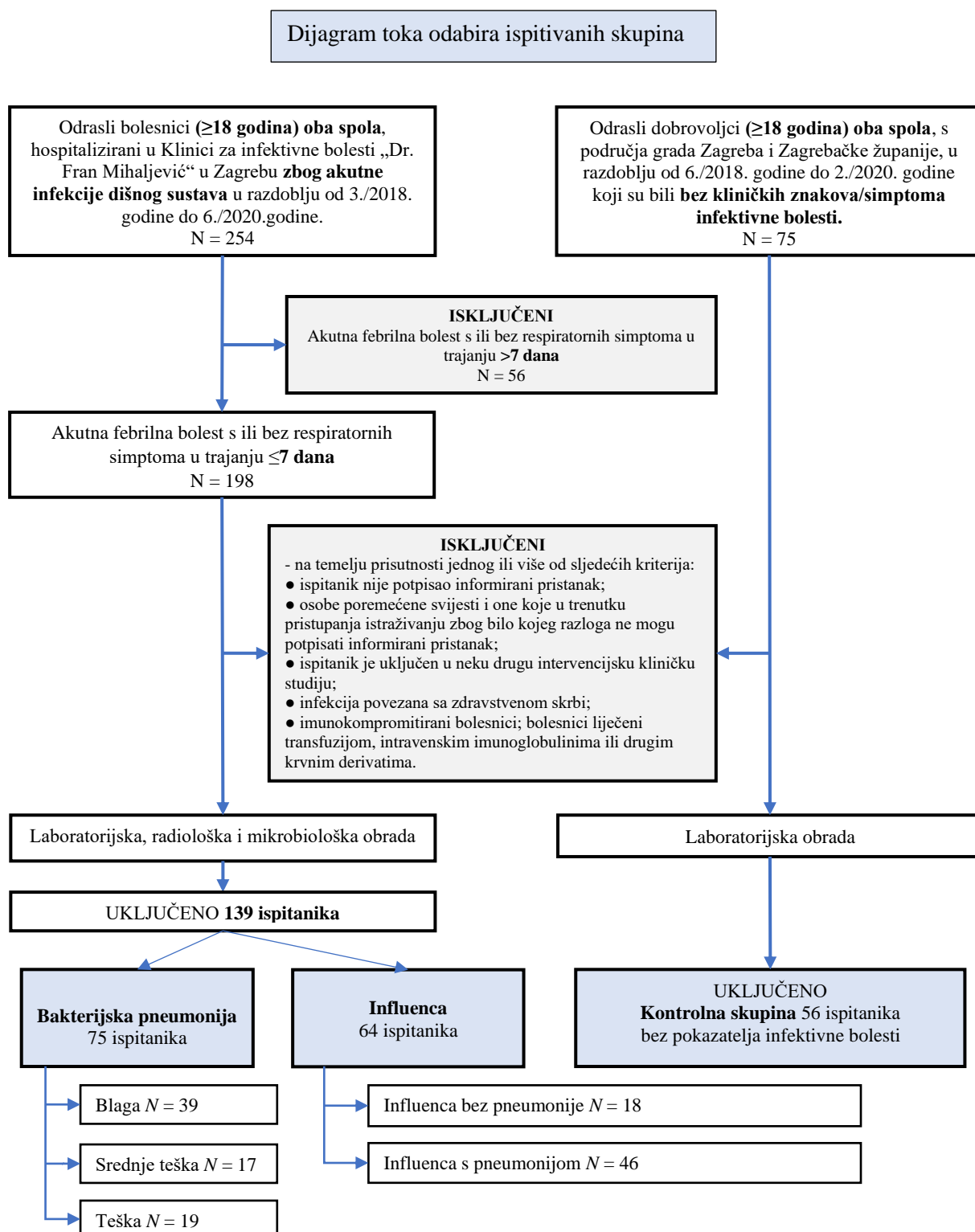
Detaljan raspored uključivanja ispitanika u istraživanje prikazan je u Tablici 5.

**Tablica 5.** Broj uključenih ispitanika po sezoni i osnovna obilježja ispitivanih skupina

Skupina	Sezona 2018			Sezona 2019			Sezona 2020		
	Bakterijska pneumonija (n = 22)	Influenca (n = 13)	Kontrola (n = 35)	Bakterijska pneumonija (n = 35)	Influenca (n = 38)	Kontrola (n = 0)	Bakterijska pneumonija (n = 18)	Influenca (n = 13)	Kontrola (n = 21)
Muškarci, n, (%)	15 (68)	11 (85)	12 (34)	20 (57)	29 (76)	–	16 (89)	8 (62)	4 (19)
Dob (godine), medijan (IQR)	57 (38 – 70)	55 (51 – 69)	39 (32 – 51)	60 (45 – 67)	56 (49 – 66)	–	56 (46 – 70)	41 (34 – 61)	77 (45 – 82)

IQR, interkvartilni raspon.

Odabir i podijela ispitanika prikazani su na Slici 2.



*Slika 2. Dijagram toka odabira ispitivanih skupina.*

Demografska obilježja, učestalost komorbiditeta i laboratorijski nalazi pri prijemu unutar triju ispitivanih skupina – influenza, bakterijska pneumonija i kontrolna skupina, prikazani su u Tablici 6. Za izdvojiti je da se tri skupine nisu značajno razlikovale prema dobi bolesnika. Uočljiva je razlika u upalnim vrijednostima između skupine bolesnika s influencom i skupine bolesnika s bakterijskom pneumonijom u odnosu na kontrolnu skupinu. Laboratorijske vrijednosti leukocita, neutrofila, limfocita, CRP-a i sedimentacije eritrocita (SE) bile su najviše u bolesnika s bakterijskom pneumonijom, a najniže u kontrolnih ispitanika.

Tablica 6. Osnovna obilježja ispitivanih skupina

	Influenca (n = 64) I	Bakterijska pneumonija (n = 75) II	Kontrola (n = 56) III	p-vrijednost	Post-hoc test (Tukey)	
					Usporedba	p-vrijednost
<b>Dob / godine</b>	56 (45 – 66)	56 (43 – 69)	46 (33 – 69)	0,133 <sup>a</sup>	-	-
Dob ≥ 65 godina, n (%)	21 (32,80)	29 (38,70)	15 (26,80)	-	-	-
Najmlađa dob / godine	25	20	22	-	-	-
Najstarija dob / godine	97	87	97	-	-	-
<b>Muškarci, n (%)</b>	48 (75)	51 (68)	16 (28,60)	<b>&lt;0,001<sup>b</sup></b>	-	-
<b>Pušenje, n (%)</b>				<b>&lt;0,001<sup>b</sup></b>	-	-
- pušač	18 (29)	31 (41,90)	3 (5,70)	-	-	-
- bivši	5 (8,10)	11 (14,90)	0 (0)	-	-	-
- nepušač	39 (62,90)	32 (43,20)	50 (94,30)	-	-	-
<b>Alkohol, n (%)</b>	3 (4,80)	4 (5,40)	1 (1,80)	0,565 <sup>b</sup>	-	-
<b>Komorbiditeti, n (%)</b>						
Cerebrovaskularna bolest	2 (3,20)	7 (9,30)	0 (0)	<b>0,035<sup>b</sup></b>	-	-
Kardiovaskularna bolest	19 (29,70)	32 (42,70)	13 (23,20)	0,052 <sup>b</sup>	-	-
Kronična bolest pluća	7 (11,10)	5 (6,70)	2 (3,80)	0,307 <sup>b</sup>	-	-
KOPB	5 (7,90)	5 (6,70)	0 (0,00)	0,125 <sup>b</sup>	-	-
Astma	3 (4,80)	1 (1,30)	1 (1,90)	0,409 <sup>b</sup>	-	-
Kronična bolest bubrega	4 (6,50)	3 (4)	1 (1,90)	0,465 <sup>b</sup>	-	-
Kronična bolest jetara	7 (10,90)	1 (1,30)	1 (1,90)	<b>0,013<sup>b</sup></b>	-	-
Degenerativno- reumatske bolesti	1 (1,60)	6 (8)	5 (8,90)	0,172 <sup>b</sup>	-	-
Šećerna bolest	11 (17,70)	9 (12)	2 (3,80)	0,065 <sup>b</sup>	-	-



Tablica 6. (nastavak)

	Influenca (n = 64) I	Bakterijska pneumonija (n = 75) II	Kontrola (n = 56) III	p-vrijednost	Post-hoc test (Tukey)	
					Usporedba	p-vrijednost
<b>Laboratorijski nalazi pri prijemu:</b>						
Leukociti, [10 <sup>9</sup> ]/L	7,95 (5,83 – 10,70)	15,50 (11,50 – 19,70)	6,30 (5,43 – 7,25)	<0,001 <sup>a</sup>	I - II	<0,001
					I - III	0,034
					II - III	<0,001
Neutrofili, [10 <sup>9</sup> ]/L	6 (3,70 – 7,65)	13,20 (9,80 – 17,60)	3,50 (3,10 – 4,25)	<0,001 <sup>a</sup>	I - II	<0,001
					I - III	0,002
					II - III	<0,001
Limfociti, [10 <sup>9</sup> ]/L	1 (0,70 – 1,50)	1 (0,80 – 1,50)	1,90 (1,45 – 2,20)	<0,001 <sup>a</sup>	I - II	0,989
					I - III	<0,001
					II - III	<0,001
CRP, mg/L	66 (25,25 – 147,53)	276,40 (190,80 – 402,70)	1,35 (0,60 – 3,45)	<0,001 <sup>a</sup>	I - II	<0,001
					I - III	<0,001
					II - III	<0,001
SE, mm/h	23 (16– 54,50)	70 (60 – 71,50)	8 (4 – 14)	<0,001 <sup>a</sup>	I - II	<0,001
					I - III	<0,001
					II - III	<0,001

KOPB, kronična opstruktivna bolest pluća; CRP, C-reaktivni protein; SE, sedimentacija eritrocita.

Kategorijske varijable prikazane su kao frekvencija uz relativnu frekvenciju (%), a numeričke varijable kao medijan uz donji i gornji kvartil. <sup>a</sup>p-vrijednost ANOVA testa. <sup>b</sup>p-vrijednost  $\chi^2$ -kvadrat testa.

## 5.2. Usporedba kliničkih, radioloških i laboratorijskih obilježja bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom pri prijemu

Deskriptivna statistika kliničkih i radioloških obilježja bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom pri prijemu prikazana je u Tablici 7. Opći simptomi većinom su bili podjednako izraženi u obje skupine. Bolesnici s bakterijskom pneumonijom imali su značajno veći broj zabilježenih tresavica ( $p = 0,012$ ), dok su bolesnici s influencom imali značajno veći udio općeg algičkog sindroma ( $p = 0,043$ ). Od specifičnih simptoma, razlika između bakterijske i virusne infekcije pronađena je u učestalosti hunjavice ( $p = 0,002$ ) i grlobolje ( $p < 0,001$ ) koje su bile češće u bolesnika s influencom. S druge strane, bol u prsima je bila učestalija u bolesnika s bakterijskom pneumonijom ( $p = 0,014$ ). Bolesnici s bakterijskom pneumonijom su imali značajno nižu respiratornu frekvenciju ( $p = 0,032$ ) i značajno višu pojavnost srčane frekvencije  $\geq 125$  otkucaja/minuti ( $p = 0,045$ ) u odnosu na bolesnike s influencom. Naposljetku, bolesnici s bakterijskom pneumonijom imali su značajno veću pojavnost pneumonije (radiološki) ( $p < 0,001$ ) i pleuralnog izljeva ( $p = 0,011$ ).

**Tablica 7.** Klinička i radiološka obilježja bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom pri prijemu

	Influenca ( $n = 64$ )	Bakterijska pneumonija ( $n = 75$ )	$p$ -vrijednost
<b>Kliničke karakteristike</b>			
<b>Opći simptomi:</b>			
Vrućica, $n$ , %	61 (98,40)	75 (100)	0,453 <sup>a</sup>
Maksimalna temperatura (°C), srednja vrijednost ( $\pm$ SD)	39,37 ( $\pm$ 0,67)	39,41 ( $\pm$ 0,78)	0,782 <sup>b</sup>
Zimica, $n$ , %	37 (69,80)	51 (73,90)	0,382 <sup>a</sup>
Tresavica, $n$ , %	29 (51,80)	51 (72,90)	<b>0,012<sup>a</sup></b>
Umor, $n$ , %	31 (58,50)	39 (54,20)	0,383 <sup>a</sup>
Opći algički sindrom, $n$ , %	32 (52,50)	28 (37,80)	0,063 <sup>a</sup>
Glavobolja, $n$ , %	22 (41,50)	34 (51,50)	0,184 <sup>a</sup>
Gubitak teka, $n$ , %	21 (35,00)	32 (42,70)	0,233 <sup>a</sup>
Proljev, $n$ , %	9 (14,80)	17 (22,70)	0,172 <sup>a</sup>
Povraćanje, $n$ , %	9 (14,80)	17 (22,70)	0,172 <sup>a</sup>
<b>Specifični simptomi:</b>			
Hunjavica, $n$ , %	34 (55,70)	22 (29,30)	<b>0,002<sup>a</sup></b>
Grlobolja, $n$ , %	22 (36,10)	7 (9,60)	<b>&lt;0,001<sup>a</sup></b>
Kašalj, $n$ , %	61 (98,40)	69 (94,50)	0,238 <sup>a</sup>
- produktivan, $n$ , %	14 (22,95)	26 (37,68)	0,084 <sup>a</sup>
Dispneja, $n$ , %	25 (40,30)	26 (34,70)	0,307 <sup>a</sup>
Hemoptiza, $n$ , %	3 (4,80)	7 (9,30)	0,252 <sup>a</sup>
Bol u prsima, $n$ , %	19 (31,10)	38 (51,40)	<b>0,014<sup>a</sup></b>

Tablica 7. (nastavak)

	Influenca (n = 64)	Bakterijska pneumonija (n = 75)	p-vrijednost
<b>Klinički znakovi:</b>			
Dezorijentiranost, n, %	1 (1,60)	4 (5,30)	0,248 <sup>a</sup>
Respiratorna frekvencija, medijan (Q1 – Q3)	20 (18 – 22,5)	18 (16 – 22)	<b>0,032<sup>b</sup></b>
Respiratorna frekvencija ≥ 30 puta/min, n, %	4 (6,50)	3 (4)	0,395 <sup>a</sup>
Srčana frekvencija otkucaja/minuti, medijan (Q1 – Q3)	97 (80 – 108,50)	98 (86 – 112)	0,423 <sup>b</sup>
Srčana frekvencija ≥ 125 otkucaja/minuti, n, %	0 (0)	5 (6,80)	<b>0,045<sup>a</sup></b>
Sistolički arterijski tlak, srednja vrijednost (±SD)	120 (±16,79)	115,39 (±17,88)	0,125 <sup>b</sup>
Sistolički arterijski tlak ≤ 90 mmHg, n, %	5 (8,10)	9 (12)	0,321 <sup>a</sup>
Dijastolički arterijski tlak, srednja vrijednost (±SD)	70,89 (±10,42)	70 (±10,78)	0,627 <sup>b</sup>
Dijastolički arterijski tlak ≤ 60 mmHg, n, %	22 (34,90)	24 (32)	0,427 <sup>a</sup>
SpO <sub>2</sub> , %, medijan (Q1 – Q3)	95 (90,75 – 96)	96 (93 – 97)	0,061 <sup>b</sup>
SpO <sub>2</sub> ≤ 93%, n, %	24 (37,50)	20 (26,70)	0,118 <sup>a</sup>
<b>Radiološke karakteristike (n, %)</b>			
Pneumonija, n, %	46 (71,90)	75 (100)	<b>&lt;0,001<sup>a</sup></b>
- intersticijska	24 (37,50)	2 (2,70)	<b>&lt;0,001<sup>a</sup></b>
- alveolarna	9 (14,10)	67 (89,30)	<b>&lt;0,001<sup>a</sup></b>
- miješani tip	13 (20,31)	5 (6,70)	<b>0,017<sup>a</sup></b>
- unilateralna: monofokalna	8 (12,50)	37 (49,33)	<b>&lt;0,001<sup>a</sup></b>
multifokalna	9 (14,06)	16 (21,33)	0,187 <sup>a</sup>
- bilateralna	29 (45,30)	19 (25,33)	<b>0,011<sup>a</sup></b>
Pleuralni izljev, n, %	14 (21,90)	35 (46,70)	<b>0,002<sup>a</sup></b>

Q1, prvi kvartil; Q3, treći kvartil, SD, standardna devijacija; SpO<sub>2</sub>, postotak hemoglobina u perifernoj kapilarnoj krvi koji je zasićen kisikom (engl. *saturation of peripheral oxygen*, SpO<sub>2</sub>).

Kategorijske varijable prikazane su kao frekvencija uz relativnu frekvenciju (%), a numeričke varijable kao srednja vrijednost uz standardnu devijaciju ili kao medijan uz donji i gornji kvartil. <sup>a</sup>p-vrijednost  $\chi^2$ -kvadrat testa. <sup>b</sup>p-vrijednost t-testa.

Osnovna laboratorijska obilježja bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom prikazana su u Tablici 8. Dvije skupine bolesnika pokazale su razliku u značajnom broju laboratorijskih parametara. Uočljiva je statistički značajna razlika u hemoglobinu ( $p = 0,026$ ), hematokritu ( $p = 0,047$ ), trombocitima ( $p = 0,005$ ), leukocitima ( $p < 0,001$ ), neutrofilnim granulocitima ( $p < 0,001$ ), monocitima ( $p = 0,039$ ), sedimentaciji ( $p < 0,001$ ), CRP-u ( $p < 0,001$ ), prokalcitoninu ( $p < 0,001$ ), fibrinogenu ( $p < 0,001$ ), ureji ( $p < 0,001$ ), kreatininu ( $p = 0,005$ ), ukupnom bilirubinu ( $p = 0,001$ ), ALP-u ( $p = 0,005$ ) i LDH ( $p = 0,008$ ). Nadalje, relativni udio neutrofilnih granulocita ( $p < 0,001$ ), limfocita ( $p < 0,001$ ) i monocita ( $p < 0,001$ ) značajno se razlikovao između dvije skupine bolesnika.

**Tablica 8.** Usporedba laboratorijskih nalaza pri prijemu između bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom

	Influenza (n = 64)	Bakterijska pneumonija (n = 75)	p-vrijednost
Eritrociti, [10 <sup>12</sup> ]/L	4,65 (4,40 – 5,12)	4,59 (4,25 – 4,91)	0,072
Hemoglobin, g/L	141 (130,25 – 153)	138 (126 – 145)	<b>0,026</b>
Hematokrit, L/L	0,43 (0,39 – 0,46)	0,41 (0,38 – 0,44)	<b>0,047</b>
Trombociti, [10 <sup>9</sup> ]/L	175,50 (127 – 214,50)	202 (170 – 249,00)	<b>0,005</b>
Leukociti, [10 <sup>9</sup> ]/L	7,95 (5,83 – 10,70)	15,50 (11,50 – 19,70)	<b>&lt;0,001</b>
Neutrofilni granulociti, [10 <sup>9</sup> ]/L	6,00 (3,70 – 7,65)	13,20 (9,80 – 17,60)	<b>&lt;0,001</b>
Limfociti, [10 <sup>9</sup> ]/L	1 (0,70 – 1,50)	1 (0,80 – 1,50)	0,883
Monociti, [10 <sup>9</sup> ]/L	0,70 (0,40 – 1)	0,90 (0,60 – 1,20)	<b>0,039</b>
Eozinofilni granulociti, [10 <sup>9</sup> ]/L	0 (0 – 0,10)	0 (0 – 0,10)	0,390
Bazofilni granulociti, [10 <sup>9</sup> ]/L	0 (0 – 0,10)	0 (0 – 0,10)	0,100
Neutrofilni granulociti, rel %	75,40 (65,70 – 81,53)	86,90 (82,70 – 90,20)	<b>&lt;0,001</b>
Limfociti, rel %	14,90 (9,73 – 21,13)	6,70 (4,90 – 10,40)	<b>&lt;0,001</b>
Monociti, rel %	9,55 (6,53 – 11,90)	6 (3,60 – 8)	<b>&lt;0,001</b>
Eozinofilni granulociti, rel %	0,25 (0,10 – 0,68)	0,20 (0,10 – 0,40)	0,071
Bazofilni granulociti, rel %	0,40 (0,20 – 0,68)	0,30 (0,10 – 0,50)	0,073
SE, mm/sat	23,00 (16,00 – 54,50)	70,00 (60,00 – 71,50)	<b>&lt;0,001</b>
CRP, mg/L	59 (27,5 – 142,2)	276 (210,9 – 413,2)	<b>&lt;0,001</b>
PCT, µg/L	0,15 (0,07 – 0,45)	1,65 (0,43 – 6,21)	<b>&lt;0,001</b>
Fibrinogen, g/L	5,05 (4,43 – 5,88)	8,30 (6,40 – 9,90)	<b>&lt;0,001</b>
Ureja, mmol/L	5,30 (4,20 – 6,55)	6,10 (5,10 – 9,10)	<b>&lt;0,001</b>
Ureja, > 7 mmol/L, n (%)	10 (0,16)	30 (0,40)	<b>0,002*</b>
Kreatinin, µmol/L	85 (74,25 – 102,75)	95 (79 – 120)	<b>0,005</b>
Glukoza, mmol/L	6,50 (5,80 – 7,43)	6,65 (5,80 – 7,90)	0,893
Glukoza > 14 mmol/L, n (%)	2 (0,03)	3 (0,04)	0,783*
Ukupni bilirubin, µmol/L	12,50 (9 – 17)	14 (11 – 23)	<b>0,001</b>
AST, U/L	29 (20 – 41,75)	26 (19 – 37)	0,611
ALT, U/L	26 (17 – 44)	24 (17 – 47)	0,639
GGT, U/L	33 (18 – 75)	33 (22 – 76)	0,768
ALP, U/L	68 (56,25 – 77)	24 (17 – 47)	<b>0,005</b>
CK, U/L	155 (74 – 287)	100 (47 – 197)	0,140
LDH, U/L	204 (170,25 – 288,50)	180 (154 – 223)	<b>0,008</b>
IgG, g/L	9,30 (7,95 – 10,85)	9,10 (7,50 – 10,75)	0,372

ALP, alkalna fosfataza; ALT, alanin-aminotransferaza; AST, aspartat-aminotransferaza; CRP, C-reaktivni protein; CK, kreatinin kinaza; PCT, prokalcitonin; GGT, gama-glutamilttransferaza; IgG, imunoglobulin G; LDH, laktat-dehidrogenaza; SE, sedimentacija eritrocita. Kategorijske varijable prikazane su kao frekvencija uz relativnu frekvenciju (%), a numeričke varijable kao medijan uz donji i gornji kvartil. Treći stupac predstavlja p-vrijednost t-testa za usporedbu populacijskih očekivanja. \*p-vrijednost  $\chi^2$ -testa.

Učestalosti komplikacija i ishoda bolesti u bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom prikazani su Tablici 9. Uočljiva je statistički značajna razlika u učestalosti bakterijemije/sepsa ( $p < 0,001$ ) i trajanju hospitalizacije ( $p < 0,001$ ). Bakterijemija/sepsa je bila znatno učestalija kod bolesnika s bakterijskom pneumonijom koji su također imali značajno dulje trajanje hospitalizacije u odnosu na bolesnike s influencom.

**Tablica 9.** Usporedba učestalosti komplikacija i ishoda bolesti u bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom

	Influenca (n = 64)	Bakterijska pneumonija (n = 75)	p-vrijednost
Akutna respiratorna insuficijencija, n, %:	30 (46,90)	26 (34,70)	0,099 <sup>a</sup>
- suplementacija kisikom putem nosnog katetera ili maske, n, %	30 (46,90)	26 (34,70)	0,099 <sup>a</sup>
- NIV, n, %	2 (3,10)	1 (1,30)	0,440 <sup>b</sup>
- intubacija i mehanička ventilacija, n, %	1 (1,60)	1 (1,30)	0,711 <sup>b</sup>
ARDS, n, %	2 (3,10)	0 (0)	0,210 <sup>b</sup>
Pneumotoraks, n, %	0 (0)	0 (0)	-
Pleuralni empijem, n, %	0 (0)	1 (1,30)	0,540 <sup>b</sup>
Prijem u JIL, n, %	2 (3,1)	2 (2,70)	0,628 <sup>b</sup>
Kongestivno srčano zatajenje, n, %	6 (9,40)	6 (8)	0,503 <sup>b</sup>
Hemodinamska nestabilnost s potrebom za primjenom vazoaktivnih lijekova, n, %	1 (1,60)	2 (2,70)	0,560 <sup>b</sup>
Bakterijemija/sepsa, n, %	0 (0)	24 (32)	<b>&lt;0,001<sup>b</sup></b>
Sistemska upotreba kortikosteroida, n, %	1 (1,60)	1 (1,30)	0,711 <sup>b</sup>
Trajanje hospitalizacije (dani)	9 (7 – 10)	11 (9 – 13)	<b>&lt;0,001<sup>c</sup></b>
Unutarbolnička smrtnost, n, %	0 (0)	2 (2,70)	0,289 <sup>b</sup>

ARDS, akutni respiratorni distres sindrom, NIV, neinvazivna ventilacija; Q1, prvi kvartil; Q3, treći kvartil, SD, standardna devijacija. Kategorijske varijable prikazane su kao frekvencija uz relativnu frekvenciju (%), a numeričke varijable kao srednja vrijednost uz standardnu devijaciju ili kao medijan uz donji i gornji kvartil. <sup>a</sup>p-vrijednost  $\chi^2$ -kvadrat testa. <sup>b</sup>p-vrijednost Fisherovog egzaktnog testa. <sup>c</sup>p-vrijednost t-testa.

S obzirom na težinu bolesti pri prijemu (na temelju radiološki isključene ili potvrđene pneumonije), skupina bolesnika s influencom ( $n = 64$ ), podijeljena je u sljedeće dvije skupine:

- **ispitanici s influencom bez pneumonije** ( $n = 18$ ),
- **ispitanici s influencom i s pneumonijom** ( $n = 46$ ).

Osnovna, laboratorijska i radiološka obilježja navedenih podskupina influence po težini bolesti prikazana su u Tablici 10. Za izdvojiti je da se navedene podskupine bolesnika nisu statistički značajno razlikovale prema dobi ( $p = 0,672$ ). Blaga klinička slika manifestirala se nižom razinom gotovo svih ispitivanih laboratorijskih parametara. Bolesnici s blagim stupnjem bolesti imali su statistički značajno niže razine SE ( $p < 0,001$ ), CRP-a ( $p < 0,001$ ) i fibrinogena ( $p < 0,001$ ) u odnosu na bolesnike s teškim stupnjem bolesti. Procalcitonin ( $p = 0,004$ ), leukociti ( $p = 0,026$ ) i relativni udio neutrofila ( $p = 0,030$ ) bili su značajno niži u bolesnika s blagim stupnjem bolesti u odnosu na bolesnike s teškim stupnjem bolesti. Naposljetku, razine LDH bile su statistički značajno niže u bolesnika s blagim u odnosu na teški stupanj bolesti. Uočljiva je statistički značajna razlika u učestalosti akutne respiratorne insuficijencije ( $p < 0,001$ ) i suplementacije kisikom putem nosnog katetera ili maske ( $p < 0,001$ ), koje su se pojavljivale isključivo kod bolesnika s influencom s pneumonijom. Trajanje hospitalizacije je također bilo značajno dulje kod bolesnika s influencom i s pneumonijom ( $p < 0,001$ ).

**Tablica 10.** Osnovna i laboratorijska obilježja te komplikacije i ishod bolesti u bolesnika s influencom: bolesnici su podijeljeni obzirom na težinu bolesti pri prijemu na blagu (influenca bez pneumonije) i tešku influencu (influenca s pneumonijom)

	Influenca bez pneumonije (I)	Influenca s pneumonijom (II)	$p$ – vrijednost
<b>Osnovna obilježja:</b>			
Broj ispitanika	18 (28,10)	46 (71,90)	<0,001†
Dob, godine	54 (47 – 66)	56 (41 – 66)	0,672
Spol, muškarci	12 (66,70)	36 (78,30)	0,352‡
<b>Laboratorijska obilježja:</b>			
SE, mm/h	16 (9,50 – 20)	40 (20 – 60)	<0,001*
CRP, mg/L	26 (11,30 – 46,38)	104,15 (50,93 – 197,08)	<0,001*
PCT, µg/L	0,09 (0,05 – 0,19)	0,20 (0,09 – 0,69)	0,004*
Fibrinogen, g/L	4,40 (4,13 – 4,93)	5,40 (4,70 – 6,65)	<0,001*
Leukociti, [ $10^9$ ]/L	6,85 (4,73 – 7,93)	8,85 (6,20 – 11,30)	0,026
Neutrofili, [ $10^9$ ]/L	5,10 (3,55 – 6,00)	6,50 (4,85 – 8,55)	0,055
Limfociti, [ $10^9$ ]/L	1 (0,80 – 1,45)	1 (0,70 – 1,58)	0,906
Neutrofili, rel %	71 (58,30 – 76,05)	76,50 (66,70 – 82,40)	0,030
Limfociti, rel %	17,20 (12,25 – 29,73)	13,90 (8,80 – 20,10)	0,052
Trombociti, [ $10^9$ ]/L	179 (137,75 – 217)	172,50 (126,50 – 216,75)	0,446

Tablica 10. (nastavak)

	Influenca bez pneumonije (I)	Influenca s pneumonijom (II)	<i>p</i> -vrijednost
Ureja, mmol/L	4,75 (4,10 – 5,80)	5,35 (4,20 – 6,60)	0,442
Kreatinin, $\mu$ mol/L	93 (75 – 100,50)	84 (74 – 103,25)	0,942
AST, U/L	23 (19 – 35,50)	31 (20 – 43,25)	0,197
ALT, U/L	19 (13 – 42,75)	27 (18 – 46)	0,211
GGT, U/L	27,50 (12,50 – 82,25)	33 (21,50 – 75)	0,469
ALP, U/L	67,50 (53,25 – 77,25)	69 (55,75 – 77)	0,159
CK, U/L	109,50 (73,25 – 251,50)	179,50 (73,25 – 363,75)	0,499
LDH, U/L	172,50 (156,25 – 217,50)	217 (180,25 – 335,75)	<b>0,002*</b>
<b>Komplikacije i ishod</b>			
Akutna respiratorna insuficijencija, <i>n</i> , %:	0 (0)	30 (65,20)	<b>&lt;0,001</b>
- suplementacija kisikom putem nosnog katetera ili maske, <i>n</i> , %	0 (0)	30 (65,30)	<b>&lt;0,001</b>
- NIV, <i>n</i> , %	0 (0)	2 (4,30)	0,513
- intubacija i mehanička ventilacija, <i>n</i> , %	0 (0)	1 (2,20)	0,719
ARDS, <i>n</i> , %	0 (0)	2 (4,30)	0,513
Pneumotoraks	0 (0)	0 (0)	-
Pleuralni empijem	0 (0)	0 (0)	-
Prijem u JIL, <i>n</i> (%)	0 (0)	2 (4,30)	0,513
Kongestivno srčano zatajenje, <i>n</i> , %	0 (0)	6 (13)	0,125
Hemodinamska nestabilnost s potrebom za primjenom vazoaktivnih lijekova, <i>n</i> , %	0 (0)	1 (2,20)	0,719
Bakterijemija/sepsa, <i>n</i> , %	0 (0)	0 (0)	-
Sistemska upotreba kortikosteroida, <i>n</i> , %	0 (0)	1 (2,20)	0,719
Trajanje hospitalizacije (dani)	6,50 (5,25 – 7,75)	9 (8 – 10)	<b>&lt;0,001</b>
Unutarbolnička smrtnost	0 (0)	0 (0)	-

ALP, alkalna fosfataza; ALT, alanin-aminotransferaza; ARDS, akutni respiratorni distres sindrom, AST, aspartat-aminotransferaza; CK, kreatinin kinaza; CRP, C-reaktivni protein; GGT, gama-glutamilttransferaza; JIL, jedinica intenzivnog liječenja; LDH, laktat-dehidrogenaza; NIV, neinvazivna mehanička ventilacija; PCT, prokalcitonin, SE, sedimentacija eritrocita.

Kategorijske varijable prikazane su kao frekvencija uz relativnu frekvenciju (%), a numeričke varijable kao medijan uz donji i gornji kvartil. *P*-vrijednost predstavlja *p*-vrijednost *t*-testa, osim ako posebnim znakom nije naznačeno drugačije.

\*korigirani *t*-test sa Satterthwaiteovom aproksimacijom stupnjeva slobode, † $\chi^2$ -kvadrat test jednog uzorka, ‡  $\chi^2$ -kvadrat test dva uzorka.

U skupini ispitanika s bakterijskom pneumonijom, neposredno pri prijemu u bolnicu određen je stupanj težine bolesti uz pomoć CURB-65 i PSI/PORT bodovnog sustava (vidi poglavlje Materijali i metode) (Tablica 11) (104,106).

**Tablica 11. Analiza težine bolesti pri prijemu u bolesnika s bakterijskom pneumonijom**

<b>Svi bolesnici N = 75</b>	
<b>Stupanj težine bakterijske pneumonije</b>	
<b>CURB-65 (bodovi)</b>	Broj ispitanika (postotak)
0	25 (33,33)
1	23 (30,70)
2	21 (28,00)
3	1 (1,33)
4	3 (4,00)
5	2 (2,27)
<b>Pneumonia Severity Index (bodovi), medijan, IQR (Min-Max)</b>	69 (54-91) (20 – 168)
<b>Pneumonia Severity Index (klasa)</b>	
I	22 (29,30)
II	17 (22,70)
III	17 (22,70)
IV	14 (18,70)
V	5 (6,70)

CURB-65, smetenost, ureja >7 mmol/l; respiratorna frekvencija  $\geq 30$  udaha/min; nizak arterijski krvni tlak (sistolčki <90 mmHg ili dijastolički  $\leq 60$  mmHg); i dob  $\geq 65$  godina; IQR interkvartilni raspon.

Kategorijske varijable prikazane su kao frekvencija uz relativnu frekvenciju (%), a numeričke varijable kao medijan uz donji i gornji kvartil te minimum i maksimum.

Na temelju rezultata PSI/PORT bodovnog sustava pri prijemu, bolesnici s bakterijskom pneumonijom podijeljeni su u sljedeće tri skupine po težini bolesti:

- **blaga bakterijska pneumonija** – PSI/PORT bodovna klasa I i II ( $n = 39$ ),
- **srednje teška bakterijska pneumonija** – PSI/PORT bodovna klasa III ( $n = 17$ ),
- **teška bakterijska pneumonija** – PSI/PORT bodovna klasa IV i V ( $n = 19$ ).

Osnovna, laboratorijska i radiološka obilježja ispitanika s blagom, srednje teškom i teškom bakterijskom pneumonijom prikazana su u Tablici 12. Za izdvojiti je da su bolesnici s blagom bakterijskom pneumonijom bili statistički značajno mlađi od bolesnika sa srednje teškom i teškom bakterijskom pneumonijom ( $p < 0,001$ ). Navedene tri skupine nisu se razlikovale po spolu. Jedine statistički značajne razlike u laboratorijskim parametrima između tri skupine po težini bolesti zabilježene su za ureju i kreatinin. Učestalosti komplikacija, tijeka i ishoda bolesti u bolesnika s blagom, srednje teškom i teškom bakterijskom pneumonijom također su prikazane u Tablici 12. Uočljiva je statistički značajna razlika u učestalosti prijema u JIL ( $p = 0,048$ ), kongestivnog srčanog zatajenja ( $p = 0,017$ ), primjene vazoaktivnih lijekova ( $p = 0,048$ ), unutarbolničke smrtnosti ( $p = 0,048$ ) i trajanju hospitalizacije ( $p = 0,001$ ). Bolesnici s teškom bakterijskom pneumonijom imali su značajno veći broj prijema u JIL, kongestivnog srčanog zatajenja, primjene vazoaktivnih lijekova, unutarbolničke smrti i značajno dulje trajanje hospitalizacije u odnosu na bolesnike s blagom i srednje teškom bakterijskom pneumonijom.



**Tablica 12.** Osnovna, laboratorijska i radiološka obilježja te komplikacije i ishod bolesti u bolesnika s blagom, srednje teškom i teškom bakterijskom pneumonijom

	Blaga bakterijska pneumonija (I)	Srednje teška bakterijska pneumonija (II)	Teška bakterijska pneumonija (III)	p-vrijednost	Post-hoc test (Tukey)	
<b>Osnovna obilježja</b>						
Broj ispitanika	39 (52,00)	17 (22,70)	19 (25,30)	<b>0,003†</b>	-	-
Dob, godine	44 (35 – 55)	65 (59 – 70)	76 (67 – 81)	<b>&lt;0,001</b>	I - II	<b>&lt;0,001</b>
					I - III	<b>&lt;0,001</b>
					II - III	0,08
Spol, muškarci	25 (64,10)	11 (64,70)	15 (78,90)	0,496	-	-
<b>Laboratorijski nalazi pri prijemu:</b>					<b>Usporedba</b>	<b>p-vrijednost</b>
SE, mm/h	69 (60 – 71,50)	70 (60 – 72)	68 (59 – 72)	0,910	-	-
CRP, mg/L	270,80 (178,60 – 386,40)	353,40 (235,25 – 430,10)	279,10 (177,80 – 402,40)	0,473	-	-
PCT, µg/L	0,76 (0,20 – 2,49)	3,16 (0,49 – 8,25)	4,79 (0,69 – 12,94)	0,058*	-	-
Fibrinogen, g/L	8,80 (6,35 – 9,85)	9,00 (6,98 – 10)	7,95 (6,40 – 10,10)	0,918	-	-
Leukociti, [10 <sup>9</sup> ]/L	16,10 (11,30 – 19,70)	16,20 (12,25 – 21,65)	14,90 (8,40 – 19)	0,443	-	-
Neutrofili, [10 <sup>9</sup> ]/L	13,20 (9,50 – 17,60)	14,30 (10,55 – 18,85)	12,30 (6,30 – 16,40)	0,465	-	-
Limfociti, [10 <sup>9</sup> ]/L	1,20 (0,80 – 1,50)	1,00 (0,60 – 1,70)	0,90 (0,70 – 1,30)	0,727	-	-
Neutrofili, rel %	86,90 (79,30 – 90,80)	88,80 (84,25 – 90,50)	85,90 (82,70 – 89,90)	0,490	-	-
Limfociti, rel %	7,10 (4,00 – 10,40)	6,30 (5,00 – 9,30)	6,50 (5,20 – 10,90)	0,588	-	-
Trombociti, [10 <sup>9</sup> ]/L	208 (178 – 249)	200 (174 – 256)	183 (161 – 239)	0,446	-	-
Ureja, mmol/L	5,30 (4,40 – 6,40)	6,10 (5,20 – 7,90)	12,00 (9,10 – 13,60)	<b>&lt;0,001*</b>	I - II	0,735
					I - III	<b>&lt;0,001</b>
					II - III	<b>&lt;0,001</b>
Kreatinin, µmol/L	90 (75 – 101)	90 (76,50 – 103)	128 (103 – 176)	<b>&lt;0,001*</b>	I - II	0,993
					I - III	<b>&lt;0,001</b>
					II - III	<b>0,001</b>
AST, U/L	29 (22 – 34)	23 (18,50 – 35)	23 (19 – 46)	0,288*	-	-
ALT, U/L	25 (19 – 48)	19 (13 – 37,50)	23 (13 – 41)	0,586	-	-
GGT, U/L	43 (27 – 84)	21 (14,50 – 59,50)	29 (23 – 44)	0,302	-	-
ALP, U/L	83 (64 – 114)	69 (62 – 92,50)	74 (56 – 96)	0,413	-	-
CK, U/L	112,50 (46,50 – 217,50)	61,00 (34,50 – 149,00)	117,00 (68,00 – 302,00)	0,670	-	-
LDH, U/L	180 (159 – 228)	173 (149 – 214,50)	203 (154 – 258)	0,452*	-	-

Tablica 12. (nastavak)

	Blaga bakterijska pneumonija (I)	Srednje teška bakterijska pneumonija (II)	Teška bakterijska pneumonija (III)	<i>p</i> -vrijednost	<i>Post-hoc</i> test (Tukey)	
<b>Radiološka obilježja pneumonije:</b>						
- intersticijska	0 (0)	1 (5,90)	1 (5,60)	0,318‡	-	-
- alveolarna	35 (89,70)	15 (88,20)	17 (94,40)	0,797‡	-	-
- miješani tip	4 (10,30)	1 (5,90)	0 (0)	0,353‡	-	-
- unilateralna	30 (76,90)	10 (58,80)	13 (68,40)	0,380‡	-	-
- bilateralna	8 (20,50)	6 (35,30)	5 (26,30)	0,501‡	-	-
Pleuralni izljev, <i>n</i> (%)	17 (43,60)	9 (52,90)	9 (47,40)	0,810‡	-	-
<b>Tijek i ishod bolesti</b>						
Akutna respiracijska insuficijencija, <i>n</i> (%)	9 (23,10)	9 (52,90)	8 (42,10)	0,071‡	-	-
- suplementacijsa kisika putem nosnog katetera ili maske, <i>n</i> (%)	9 (23,10)	9 (52,90)	8 (42,10)	0,071‡	-	-
- NIV, <i>n</i> (%)	0 (0)	0 (0)	1 (5,30)	0,225‡	-	-
- mehanička ventilacija, <i>n</i> (%)	0 (0)	0 (0)	1 (5,30)	0,225‡	-	-
ARDS, <i>n</i> (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-	-	-
Pneumotoraks, <i>n</i> (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-	-	-
Pleuralni empijem, <i>n</i> (%)	0 (0)	1 (5,90)	0 (0)	0,177‡	-	-
Prijem u JIL, <i>n</i> (%)	0 (0)	0 (0)	2 (10,50)	<b>0,048‡</b>	-	-
Kongestivno srčano zatajenje, <i>n</i> (%)	0 (0)	2 (11,80)	4 (21,10)	<b>0,017‡</b>	-	-
Primjena vazoaktivnih lijekova, <i>n</i> (%)	0 (0)	0 (0)	2 (10,50)	<b>0,048‡</b>	-	-
Bakterijemija/sepsa, <i>n</i> (%)	11 (28,20)	6 (35,30)	7 (36,80)	0,760‡	-	-
Sistemska primjena kortikosteroida, <i>n</i> (%)	1 (2,60)	0 (0)	0 (0)	0,626‡	-	-
Trajanje hospitalizacije (dani)	10 (8 – 11)	11 (8 – 14,50)	13 (11 – 16)	<b>0,001</b>	I - II I - III II - III	0,119 <b>&lt;0,001</b> 0,262
Unutarbolnička smrtnost, <i>n</i> (%)	0 (0)	0 (0)	2 (2,70)	<b>0,048‡</b>	-	-

ALP, alkalna fosfataza; ALT, alanin-aminotransferaza; ARDS, akutni respiratorni distres sindrom; AST, aspartat-aminotransferaza; CK, kreatinin kinaza; CRP, C-reaktivni protein; GGT, gama-glutamiltransferaza; JIL, jedinica intenzivnog liječenja; LDH, laktat-dehidrogenaza; NIV, neinvazivna mehanička ventilacija; PCT, prokalcitonin, SE, sedimentacija eritrocita; JIL, jedinica intenzivnog liječenja.

Kategorijske varijable prikazane su kao frekvencija uz relativnu frekvenciju, a numeričke varijable kao medijan uz donji i gornji kvartil. *P*-vrijednost predstavlja *p*-vrijednost ANOVA testa, osim ako posebnim znakom nije naznačeno drugačije. \*Welch korigirana ANOVA, †  $\chi^2$ -kvadrat test jednog uzorka, ‡  $\chi^2$ -kvadrat test dva uzorka.

### 5.3. Rezultati analize N-glikana imunoglobulina G

Oslobođeni IgG N-vezani glikani 64 bolesnika s influencom, 75 bolesnika s bakterijskom pneumonijom i 56 zdravih kontrola fluorescentno su obilježeni i analizirani HILIC-UHPLC metodom, dok su dobiveni kromatogrami integrirani u 24 kromatografska vrha koja su uglavnom sadržavala pojedinačne N-glikanske strukture (vidi poglavlje Materijali i metode, Slika 1) (207).

Iz dobivena 24 kromatografska vrha izračunato je šest izvedenih glikanskih parametara kako bi se prikazalo udio strukturno sličnih glikanskih struktura koje dijele zajednički biosintetski put:

- G0 – agalaktozilirani N-glikani (N-glikani bez galaktoze),
- G1 – monogalaktozilirani N-glikani (N-glikani s jednom galaktozom),
- G2 – digalaktozilirani N-glikani (N-glikani s dvije galaktoze),
- S – sijalinizirani N-glikani (N-glikani sa sijalinskom kiselinom),
- F – fukozilirani N-glikani (N-glikani sa sržnom fukozom),
- B – N-glikani s račvajućim N-acetilglukozaminom (GlcNAc).

Izračun i opis izvedenih glikozilacijskih parametara dani su poglavlju Materijali i metode. Navedene vrijednosti izvedenih glikozilacijskih parametara izražene su kao relativni udio u ukupnom N-glikomu imunoglobulina G.

Deskriptivna statistika šest ispitivanih N-glikozilacijskih parametara imunoglobulina G u tri ispitivane skupine u tri vremenske točke (mjerjenja) prikazana je u Tablici 13. Proširena deskriptivna tablica s mjerama raspršenja za sve 24 pojedinačne glikanske strukture dana je u Pravitku, Tablica 1.

Statistička analiza provedena je samo na ovih šest izvedenih glikozilacijskih parametara.

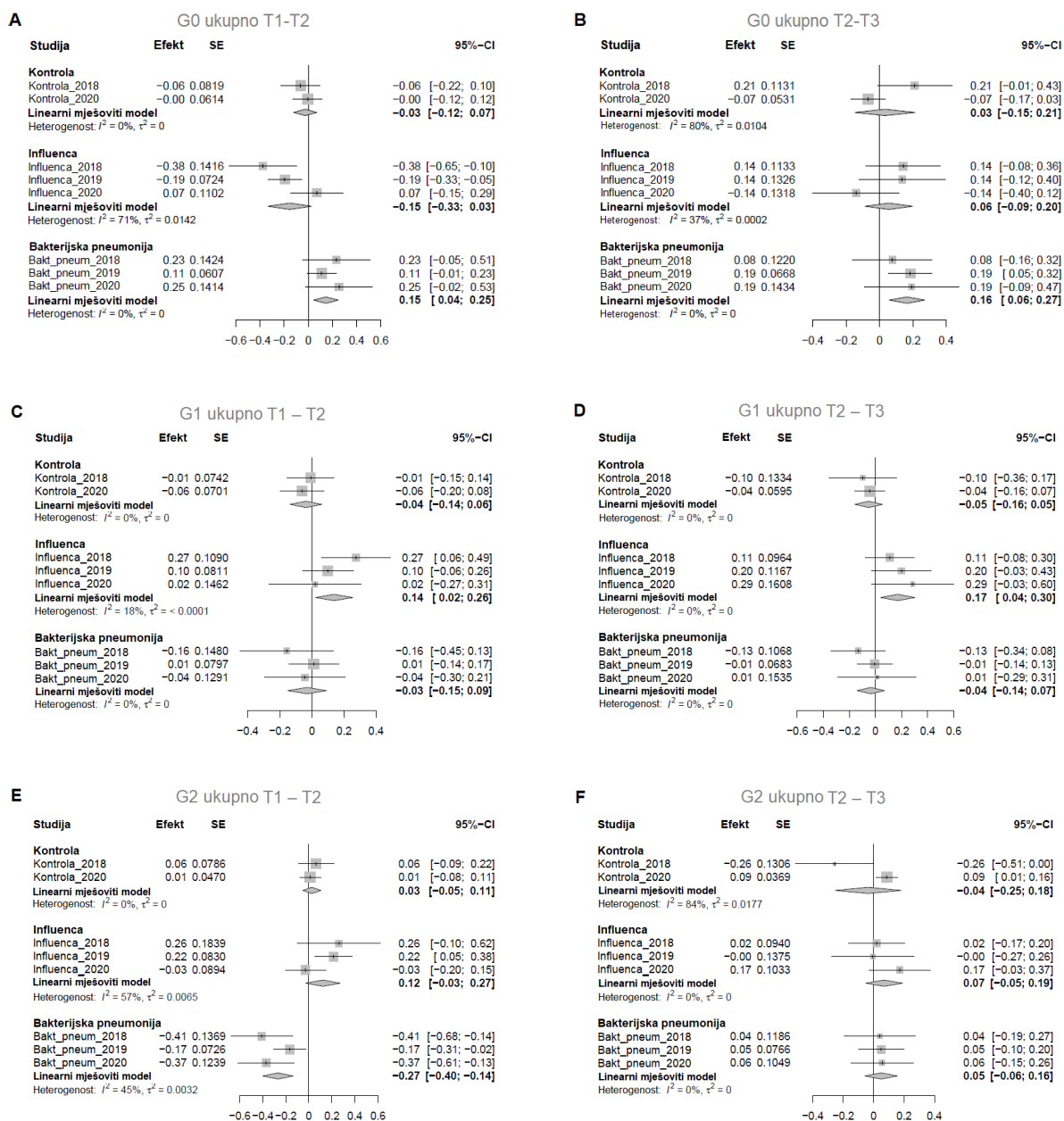
**Tablica 13.** Deskriptivna statistika šest ispitivanih izvedenih N-glikozilacijskih parametara imunoglobulina G u tri vremenske točke (mjerjenja) – u skupini bakterijska pneumonija ( $n = 75$ ), influenza ( $n = 64$ ) i kontrolnoj skupini ( $n = 56$ )

Izvedeni parametar	T	Bakterijska pneumonija		Influenca		Kontrolna skupina	
		medijan (IQR)	Min – Max	medijan (IQR)	Min – Max	medijan (IQR)	Min – Max
<b>G0</b>	T1	36,20 (10,79)	15,67 – 68,87	33,27 (10,29)	19,53 – 59,14	36,00 (12,13)	17,75 – 52,85
	T2	36,21 (13,53)	16,27 – 60,13	31,57 (9,45)	19,40 – 49,64	34,03 (12,20)	16,20 – 53,85
	T3	37,44 (13,90)	15,54 – 63,89	33,14 (9,45)	15,51 – 50,36	36,87 (13,63)	17,31 – 49,48
<b>G1</b>	T1	35,25 (3,51)	23,40 – 45,47	34,74 (3,45)	28,08 – 42,90	39,17 (6,76)	27,05 – 46,06
	T2	35,36 (4,02)	24,48 – 46,00	35,00 (3,71)	27,45 – 43,76	38,47 (6,89)	26,75 – 45,08
	T3	35,54 (4,51)	23,18 – 43,65	35,45 (3,70)	30,34 – 43,55	35,06 (6,11)	26,77 – 42,75
<b>G2</b>	T1	12,13 (5,23)	3,26 – 23,37	13,74 (5,18)	5,17 – 22,30	13,48 (5,45)	6,30 – 24,18
	T2	11,78 (6,15)	4,54 – 23,91	14,29 (4,87)	6,87 – 23,05	14,01 (7,31)	6,72 – 26,33
	T3	11,59 (5,13)	4,32 – 24,47	14,08 (5,10)	7,59 – 28,81	12,25 (7,86)	6,75 – 22,59
<b>S</b>	T1	17,22 (9,50)	4,47 – 27,22	17,82 (6,28)	5,41 – 25,66	11,75 (6,65)	5,56 – 27,59
	T2	16,92 (8,76)	5,06 – 25,91	18,14 (5,58)	7,06 – 26,96	13,03 (6,74)	5,37 – 26,71
	T3	15,42 (7,92)	5,35 – 26,15	17,01 (6,93)	6,86 – 24,48	16,07 (10,86)	6,50 – 26,18
<b>F</b>	T1	96,19 (2,35)	90,73 – 98,98	96 (1,69)	88,80 – 99,18	98,36 (2,14)	92,99 – 99,17
	T2	96,39 (2,75)	92,42 – 99,01	95,65 (2,04)	89,65 – 98,82	98,28 (2,98)	92,78 – 99,20
	T3	96,93 (2,40)	92,67 – 99,13	96,24 (2,15)	93,24 – 99,17	96,06 (3,12)	92,95 – 98,86
<b>B</b>	T1	17,25 (4,38)	10,15 – 27,02	17,94 (4,86)	11,15 – 26,42	16,63 (4,15)	9,99 – 26,47
	T2	14,98 (4,55)	8,99 – 25,08	16,65 (4,38)	10,63 – 25,00	16,85 (4,55)	10,16 – 27,24
	T3	15,99 (3,67)	10,52 – 26,26	16,85 (3,71)	12,30 – 25,35	18,30 (6,33)	13,49 – 26,91

B, N-glikani koji sadrže računajući GlcNac; F, N-glikani sa sržnom fukozom; G0, agalaktozilirani N-glikani; G1, N-glikani s jednom galaktozom; G2, N-glikani s dvije galaktoze; IQR, interkvartilni raspon; Min – Max, minimalna i maksimalna vrijednost; S, sijalinizirani N-glikani; T, vrijeme; T1, prvo mjerjenje; T2, drugo mjerjenje; T3, treće mjerjenje; Navedene vrijednosti izvedenih glikozilacijskih parametara izražene su kao relativni udio u ukupnom N-glikomu imunoglobulina G.

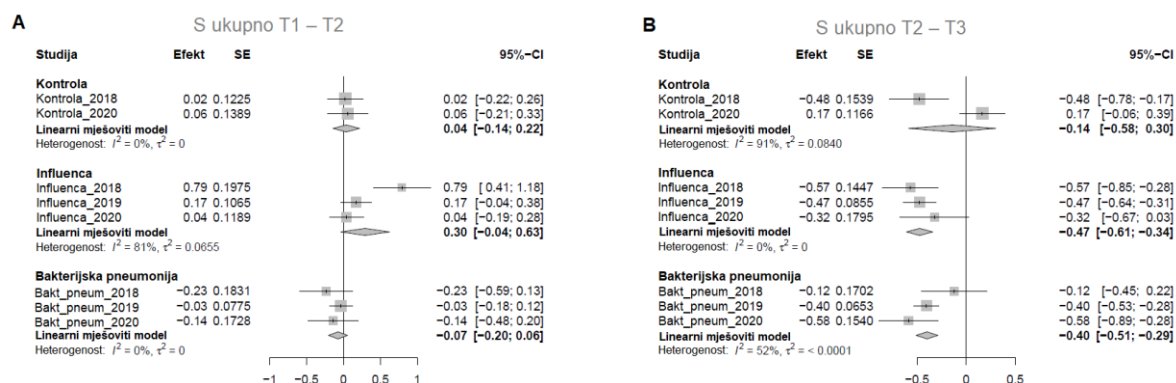
### **5.3.1. Rezultati analize N-glikana imunoglobulina G unutar ispitivanih skupina**

Derivirani parametri koji predstavljaju razinu galaktozilacije su G0 (svi glikani bez galaktoze), G1 (svi glikani s jednom galaktozom) i G2 (svi glikani s dvije galaktoze). Najznačnije promjene galaktozilacije bile su zapažene u bolesnika s bakterijskom pneumonijom; između prve (nulti dan hospitalizacije) i druge (sedam do deset dana nakon hospitalizacije) vremenske točke zapaženo je statistički značajno smanjenje udjela G2 praćeno povećanjem udjela G0 (Tablica 14). Udio G0 je nastavio rasti između druge i treće vremenske točke (mjesec dana nakon hospitalizacije), dok za G2 nismo zabilježili nikakve promjene u navedenom periodu. Zanimljivo je da je galaktozilacija ostala relativno stabilna u grupi bolesnika s influencom (jedino je porast G1 između 2. i 3. vremenske točke ostao statistički značajan nakon korekcije za višestruko testiranje) (Tablica 14, Slika 3).



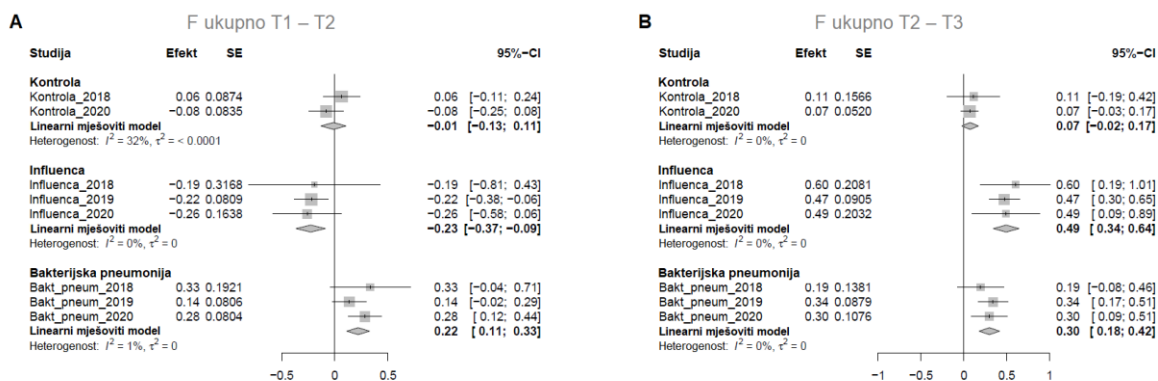
**Slika 3.** Grafikon raspona pouzdanosti za meta-analize procijenjenih efekata vremena na kretanje ukupnih razina A) G0 (svi glikani bez galaktoze) između prvog i drugog mjerenja, B) G0 između drugog i trećeg mjerenja, C) G1 (svi glikani s jednom galaktozom) između prvog i drugog mjerenja, D) G1 između drugog i trećeg mjerenja, E) G2 (glikani s dvije galaktoze) između prvog i drugog mjerenja te F) G2 između drugog i trećeg mjerenja unutar kontrolne skupine, skupine influence te skupine bakterijske pneumonije. Meta-analize su provedene primjenom modela slučajnog učinka (od engl. random-effects model). Središte kvadrata predstavlja točkovnu procjenu efekta vremena dok pridružena horizontalna linija predstavlja 95%-tni interval pouzdanosti za točkovnu procjenu efekta. Veličina kvadrata proporcionalna je pridruženoj težini koju navedena komponenta poprima u izračunu ukupnog (od engl. pooled) efekta. Središte romba predstavlja rezultirajući ukupni efekt meta-analize, dok širina romba predstavlja 95%-tni interval pouzdanosti za točkovnu procjenu ukupnog efekta. Statistički značajni procijenjeni efekti vremena su linije koje ne sijeku okomitu liniju u nula. SE, standardna pogreška (od engl. standard error); 95% CI, 95%-tni interval pouzdanosti (od engl. confidence interval).

Opsežne i statistički visoko značajne promjene u dodavanju terminalne sijalične kiseline N-glikanima IgG-a opažene su između 2. i 3. vremenske točke u obje grupe bolesnika i promjene su bile u istom smjeru – udio sijaliniziranih glikanskih struktura se smanjio neovisno o uzroku bolesti (Tablica 14, Slika 4). Postotak sijalinizacije se također povećao između prve i druge vremenske točke u bolesnika s influencom u sve tri analizirane sezone, ali ova promjena nije dosegla statističku značajnost (Tablica 14, Slika 4).



**Slika 4.** Grafikon raspona pouzdanosti za meta-analize procijenjenih efekata vremena na kretanje ukupnih razina sijaliniziranih glikanskih struktura (S) između A) prvog i drugog mjerenja (T1-T2) te B) drugog i trećeg mjerenja (T2-T3) unutar kontrolne skupine, skupine influenze te skupine bakterijske pneumonije. Meta-analize su provedene primjenom modela slučajnog učinka (od engl. random-effects model). Središte kvadrata predstavlja točkovnu procjenu efekta vremena na kretanje ukupnih razina S, dok pridružena horizontalna linija predstavlja 95%-tni interval pouzdanosti za točkovnu procjenu efekta. Veličina kvadrata proporcionalna je pridruženoj težini koju navedena komponenta poprima u izračunu ukupnog (od engl. pooled) efekta. Središte romba predstavlja rezultirajući ukupni efekt meta-analize, dok širina romba predstavlja 95%-tni interval pouzdanosti za točkovnu procjenu ukupnog efekta. Statistički značajni procijenjeni efekti vremena su linije koje ne sijeku okomitu liniju u nula. SE, standardna pogreška (od engl. standard error); 95% CI, 95%-tni interval pouzdanosti (od engl. confidence interval).

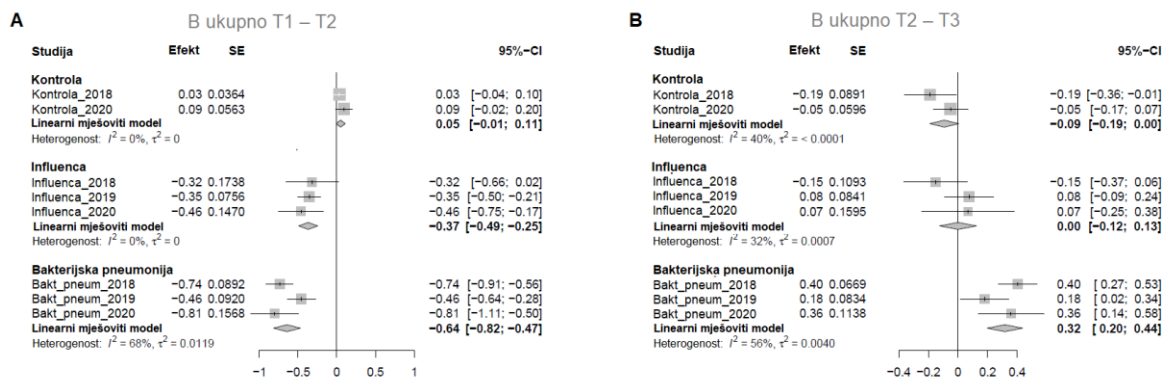
Prisutnost sržne fukoze mijenjala se značajno između svih vremenskih točaka. Između prve i druge vremenske točke smjer promjena je bio suprotan za skupinu influenze i skupinu bakterijske pneumonije. Količina fukoze se smanjila u bolesnika s influencom dok se povećala u bolesnika s bakterijskom pneumonijom (Tablica 14, Slika 5). Međutim, između druge i treće vremenske točke udio sržne fukoze se povećao u svih bolesnika bez obzira na tip bolesti (Tablica 14, Slika 5).



**Slika 5.** Grafikon raspona pouzdanosti za meta-analize procijenjenih efekata vremena na kretanje ukupnih razina glikanskih struktura sa sržnom fukozom (F) između A) prvog i drugog mjerenja (T1-T2) te B) drugog i trećeg mjerenja (T2-T3) unutar kontrolne skupine, skupine influence te skupine bakterijske pneumonije. Meta-analize su provedene primjenom modela slučajnog učinka (od engl. random-effects model). Središte kvadrata predstavlja točkovnu procjenu efekta vremena na kretanje ukupnih razina S, dok pridružena horizontalna linija predstavlja 95%-tni interval pouzdanosti za točkovnu procjenu efekta. Veličina kvadrata proporcionalna je pridruženoj težini koju navedena komponenta poprima u izračunu ukupnog (od engl. pooled) efekta. Središte romba predstavlja rezultirajući ukupni efekt meta-analize, dok širina romba predstavlja 95%-tni interval pouzdanosti za točkovnu procjenu ukupnog efekta. Statistički značajni procijenjeni efekti vremena su linije koje ne sijeku okomitu liniju u nula. SE, standardna pogreška (od engl. standard error); 95% CI, 95%-tni interval pouzdanosti (od engl. confidence interval).

Suprotno fukozilaciji, prisutnost račvajućeg GlcNAc se značajno smanjila u obje grupe bolesnika između prve i druge vremenske točke. Nadalje, između druge i treće vremenske točke došlo je do statistički značajnog povećanja udjela račvajućeg GlcNAc u bolesnika s bakterijskom pneumonijom dok je udio račvajućeg GlcNAc ostao nepromijenjen tijekom ovog perioda u skupini bolesnika s influencom (Tablica 14, Slika 6).





**Slika 6.** Grafikon raspona pouzdanosti za meta-analize procijenjenih efekata vremena na kretanje ukupnih razina glikanskih struktura s računjućim N-acetilglukozaminom (B) između A) prvog i drugog mjerenja (T1-T2) te B) drugog i trećeg mjerenja (T2-T3) unutar kontrolne skupine, skupine influence te skupine bakterijske pneumonije.

Meta-analize su provedene primjenom modela slučajnog učinka (od engl. random-effects model). Središte kvadrata predstavlja točkovnu procjenu efekta vremena na kretanje ukupnih razina S, dok pridružena horizontalna linija predstavlja 95%-tni interval pouzdanosti za točkovnu procjenu efekta. Veličina kvadrata proporcionalna je pridruženoj težini koju navedena komponenta poprima u izračunu ukupnog (od engl. pooled) efekta. Središte romba predstavlja rezultirajući ukupni efekt meta-analize, dok širina romba predstavlja 95%-tni interval pouzdanosti za točkovnu procjenu ukupnog efekta. Statistički značajni procijenjeni efekti vremena su linije koje ne sijeku okomitu liniju u nula. SE, standardna pogreška (od engl. standard error); 95% CI, 95%-tni interval pouzdanosti (od engl. confidence interval).

Nismo zabilježili bilo kakve značajne promjene u sastavu N-glikana imunoglobulina G zdravih kontrola (Tablica 14, Slika 3, Slika 4, Slika 5, Slika 6).

Cjeloviti rezultati analize šest izvedenih parametara glikozilacije imunoglobulina G unutar tri ispitivane skupine dani su u Tablici 14, dok su rezultati analize za sve 24 pojedinačne glikanske strukture unutar svake ispitivane skupine dani u Privitku.

**Tablica 14.** Promjene izvedenih parametara glikozilacije imunoglobulina G između tri vremenske točke (mjerenja) unutar ispitivanih skupina

Izvedeni parametar	Skupina	Vremensko razdoblje	Efekt (razlika)	Standardna pogreška	p-vrijednost	Prilagodena p-vrijednost*	Značajnost
<b>G0</b>	Influenca	T1 – T2	-0,153	0,092	0,095	0,201	NS
<b>G0</b>	Influenca	T2 – T3	0,056	0,073	0,445	0,640	NS
<b>G1</b>	Influenca	T1 – T2	0,139	0,060	0,020	0,050	NS
<b>G1</b>	Influenca	T2 – T3	0,171	0,068	0,011	0,031	p<0,05
<b>G2</b>	Influenca	T1 – T2	0,122	0,077	0,112	0,212	NS
<b>G2</b>	Influenca	T2 – T3	0,070	0,062	0,263	0,449	NS
<b>S</b>	Influenca	T1 – T2	0,295	0,169	0,080	0,180	NS
<b>S</b>	Influenca	T2 – T3	-0,472	0,068	0,000	0,000	p<0,01
<b>F</b>	Influenca	T1 – T2	-0,227	0,071	0,001	0,005	p<0,01
<b>F</b>	Influenca	T2 – T3	0,493	0,077	0,000	0,000	p<0,01
<b>B</b>	Influenca	T1 – T2	-0,369	0,063	0,000	0,000	p<0,01
<b>B</b>	Influenca	T2 – T3	0,001	0,064	0,993	0,993	NS
<b>G0</b>	Bakt pneum	T1 – T2	0,146	0,052	0,005	0,015	p<0,05
<b>G0</b>	Bakt pneum	T2 – T3	0,165	0,054	0,002	0,008	p<0,01
<b>G1</b>	Bakt pneum	T1 – T2	-0,030	0,062	0,628	0,729	NS
<b>G1</b>	Bakt pneum	T2 – T3	-0,036	0,054	0,504	0,658	NS
<b>G2</b>	Bakt pneum	T1 – T2	-0,268	0,068	0,000	0,000	p<0,01
<b>G2</b>	Bakt pneum	T2 – T3	0,050	0,055	0,365	0,548	NS
<b>S</b>	Bakt pneum	T1 – T2	-0,072	0,066	0,274	0,449	NS
<b>S</b>	Bakt pneum	T2 – T3	-0,397	0,057	0,000	0,000	p<0,01
<b>F</b>	Bakt pneum	T1 – T2	0,220	0,055	0,000	0,000	p<0,01
<b>F</b>	Bakt pneum	T2 – T3	0,297	0,061	0,000	0,000	p<0,01
<b>B</b>	Bakt pneum	T1 – T2	-0,643	0,088	0,000	0,000	p<0,01
<b>B</b>	Bakt pneum	T2 – T3	0,318	0,061	0,000	0,000	p<0,01
<b>G0</b>	Kontrola	T1 – T2	-0,026	0,050	0,604	0,724	NS
<b>G0</b>	Kontrola	T2 – T3	0,033	0,092	0,722	0,788	NS
<b>G1</b>	Kontrola	T1 – T2	-0,037	0,051	0,472	0,654	NS
<b>G1</b>	Kontrola	T2 – T3	-0,052	0,054	0,338	0,529	NS
<b>G2</b>	Kontrola	T1 – T2	0,026	0,040	0,512	0,658	NS
<b>G2</b>	Kontrola	T2 – T3	-0,035	0,111	0,750	0,794	NS
<b>S</b>	Kontrola	T1 – T2	0,040	0,092	0,662	0,744	NS
<b>S</b>	Kontrola	T2 – T3	-0,140	0,226	0,537	0,667	NS
<b>F</b>	Kontrola	T1 – T2	-0,013	0,060	0,833	0,857	NS
<b>F</b>	Kontrola	T2 – T3	0,072	0,049	0,143	0,257	NS
<b>B</b>	Kontrola	T1 – T2	0,050	0,031	0,103	0,206	NS
<b>B</b>	Kontrola	T2 – T3	-0,093	0,050	0,062	0,148	NS

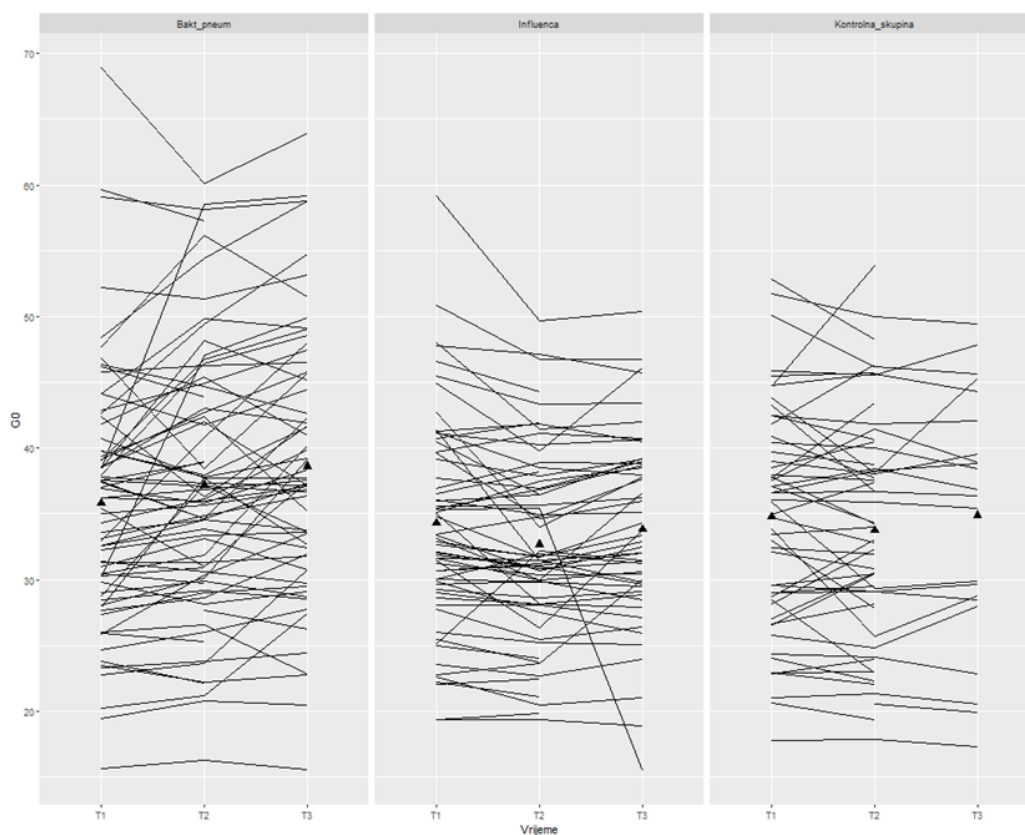
B, N-glikani koji sadrže račvajući N-acetilgluktozamin; F, N-glikani sa sržnom fukozom; G0, agalaktozilirani N-glikani; G1, N-glikani s jednom galaktozom; G2, N-glikani s dvije galaktoze; NS, nije značajno; S, sijalinizirani N-glikani;

\*, prilagodba za višestruko testiranje pomoću Benjamini-Hochbergovog postupka.

### 5.3.2. Rezultati analize N-glikana imunoglobulina G između ispitivanih skupina

Budući da je ukupan broj ispitanika u tri skupine bio nejednak i budući da je svaka od skupina promatrana u tri vremenske točke, statističku analizu razlika u kretanju udjela izvedenih glikozilacijskih parametara između skupina proveli smo koristeći linearni mješoviti model. Ovom metodom, za razliku od analize varijance (engl. *analysis of variance*, ANOVA) pristupa, ne isključujemo ispitanike kojima nedostaje jedno ili više mjerenja te na taj način povećavamo snagu studije. Nadalje, s obzirom da je skupina kategorijska varijabla s tri razine, a linearni model prihvaća samo jednu razinu kao referentnu, bilo je potrebno provesti dva linearna mješovita modela kako bismo dobili sve tri usporedbe među skupinama – jedan model sa skupinom bakterijske pneumonije kao referentnom, te drugi model sa skupinom influence kao referentnom skupinom.

Na Slici 7, mogu se vidjeti individualne promjene u udjelu agalaktoziliranih N-glikana (G0) IgG-a za svakog ispitanika unutar skupine bakterijske pneumonije, influence i unutar kontrolne skupine. Skupina bakterijska pneumonija ima vidljivo najviše prosječne udjele G0.



**Slika 7.** Promjene udjela agalaktoziliranih N-glikana (G0) imunoglobulina G kroz tri vremenske točke (mjerenja) u skupini bakterijske pneumonije, influence i u kontrolnoj skupini. Linije povezuju vrijednosti udjela G0 za svakog

pojedinačnog ispitanika kroz tri vremenske točke. Ispunjeni trokuti označavaju srednje vrijednosti udjela G0 pri prijemu (T1), sedmi dan (T2) te dvadeset i osmi dan (T3) od prijema u bolnicu u sve tri ispitivane skupine.

Rezultati linearnog mješovitog modela za G0 pokazali su kako je glavni efekt skupine statistički značajan ( $p = 0,013$ , Tablica 15), što bi značilo da su se početna mjerenja udjela G0 za pojedine skupine u vremenu T1 značajno razlikovala. Skupina bakterijske pneumonije imala je više udjele G0 u odnosu na skupinu influence u vremenu T1 (Slika 8).

**Tablica 15.** Tablica analize varijance vrste III za prediktore iz linearnog mješovitog modela za agalaktozilirane N-glikane (G0) imunoglobulina G koristeći Satterthwaiteovu metodu

	Suma kvadrata	Srednji kvadrati	Stupnjevi slobode	F-statistika	p-vrijednost
Vrijeme	24,67	12,33	2	1,660	0,19
Skupina	65,54	32,77	2	4,410	<b>0,013</b>
Spol	15,47	15,47	1	2,083	0,151
Godine	814,09	814,09	1	109,562	$< 2,2 \times 10^{-16}$
Sezona	362,59	181,30	2	24,400	$3,83 \times 10^{-10}$
Vrijeme:Skupina	276,98	69,24	4	9,319	$3,90 \times 10^{-7}$

Satterthwaiteova metoda aproksimira broj stupnjeva slobode.

Unutar skupine bakterijska pneumonija, pokazan je statistički značajan porast u udjelu G0 u drugom ( $\beta_{T2} = 1,590$ ,  $p = 0,0006$ ) i trećem mjerenju ( $\beta_{T3} = 2,923$ ,  $p = 3,12 \times 10^{-9}$ ) u odnosu na prvo mjerenje (Tablica 16).

**Tablica 16.** Rezultati mješovitog linearnog modela (engl. linear mixed model) kojim se ispitala razlika u udjelu agalaktoziliranih N-glikana imunoglobulina G (G0) između različitih skupina i vremena uzorkovanja te interakcija vremena i skupine

	Zavisna varijabla: G0 ( $\beta$ , SE)	p-vrijednost
Odsječak na osi y	25,079 (1,822)	$< 2 \times 10^{-16}$
Vrijeme T2	1,590 (0,456)	<b>0,0006</b>
Vrijeme T3	2,923 (0,479)	$3,12 \times 10^{-9}$
Skupina Influenca	-1,740 (1,413)	0,862
Skupina Kontrolna skupina	-1,319 (1,398)	0,220
Spol: Ženski	-1,512 (1,048)	0,151
Godine	0,287 (0,027)	$< 2 \times 10^{-16}$
Sezona 2019	-7,879 (1,277)	$4,15 \times 10^{-9}$
Sezona 2020	-7,105(1,229)	$3,06 \times 10^{-8}$
Vrijeme T2: Skupina Influenca	-2,967 (0,669)	$1,26 \times 10^{-5}$
Vrijeme T3: Skupina Influenca	-3,838 (0,715)	$1,51 \times 10^{-7}$
Vrijeme T2: Skupina Kontrolna skupina	-1,990 (0,697)	<b>0,005</b>
Vrijeme T3: Skupina Kontrolna skupina	-3,322 (0,887)	<b>0,0002</b>

$\beta$ , procjena regresijskog parametra; SE, standardna pogreška. Odsječak na osi y predstavlja prosječnu vrijednost udjela G0 za referentne vrijednosti kategorijskih prediktora: skupinu bakterijske pneumonije (referentna), vrijeme T1 (referentno), muški spol (referentno) i sezonu 2018 (referentna).

Vrijeme i skupina predstavljaju fiksne efekte (engl. fixed effect), dok su ispitanici uključeni u model kao nasumični efekt (engl. random effect). Spol, dob i sezona uzorkovanja dodani su u model kao kovarijate kako bi se kontroliralo na njihov utjecaj.

Kod influence, udio G0 bio je niži u drugom ( $\beta_{T2} = -1,377, p = 0,005$ ) i trećem mjerenju ( $\beta_{T3} = -0,915, p = 0,085$ ) u odnosu na prvo mjerenje, iako je samo drugo mjerenje bilo statistički značajno niže (Tablica 17).

**Tablica 17.** Rezultati mješovitog linearnog modela (engl. linear mixed model) kojim se ispitala razlika u udjelu agalaktoziliranih N-glikana imunoglobulina G (G0) između različitih skupina i vremena uzorkovanja te interakcija vremena i skupine

	Zavisna varijabla: G0 ( $\beta$ , SE)	p-vrijednost
Odsječak na osi y	24,873 (1,850)	$< 2 \times 10^{-16}$
Vrijeme T2	-1,377 (0,489)	<b>0,005</b>
Vrijeme T3	-0,915 (0,530)	0,085
Skupina Bakterijska pneumonija	0,206 (1,188)	0,862
Skupina Kontrolna skupina	-1,534 (1,533)	0,318
Spol: Ženski	-1,512 (1,048)	0,151
Godine	0,287 (0,027)	$< 2 \times 10^{-16}$
Sezona 2019	-7,879 (1,277)	<b><math>4,15 \times 10^{-9}</math></b>
Sezona 2020	-7,105 (1,229)	<b><math>3,06 \times 10^{-8}</math></b>
Vrijeme T2: Skupina Bakterijska pneumonija	2,967 (0,669)	<b><math>1,26 \times 10^{-5}</math></b>
Vrijeme T3: Skupina Bakterijska pneumonija	3,838 (0,715)	<b><math>1,51 \times 10^{-7}</math></b>
Vrijeme T2: Skupina Kontrolna skupina	0,978 (0,719)	0,175
Vrijeme T3: Skupina Kontrolna skupina	0,516 (0,916)	0,573

$\beta$ , procjena regresijskog parametra; SE, standardna pogreška. Odsječak na osi y predstavlja prosječnu vrijednost udjela G0 za referentne vrijednosti kategorijskih prediktora: skupinu influence (referentna), vrijeme T1 (referentno), muški spol (referentno) i sezonu 2018 (referentna).

Vrijeme i skupina predstavljaju fiksne efekte (engl. fixed effect), dok su ispitanici uključeni u model kao nasumični efekt (engl. random effect). Spol, dob i sezona uzorkovanja dodani su u model kao kovarijate kako bi se kontroliralo na njihov utjecaj.

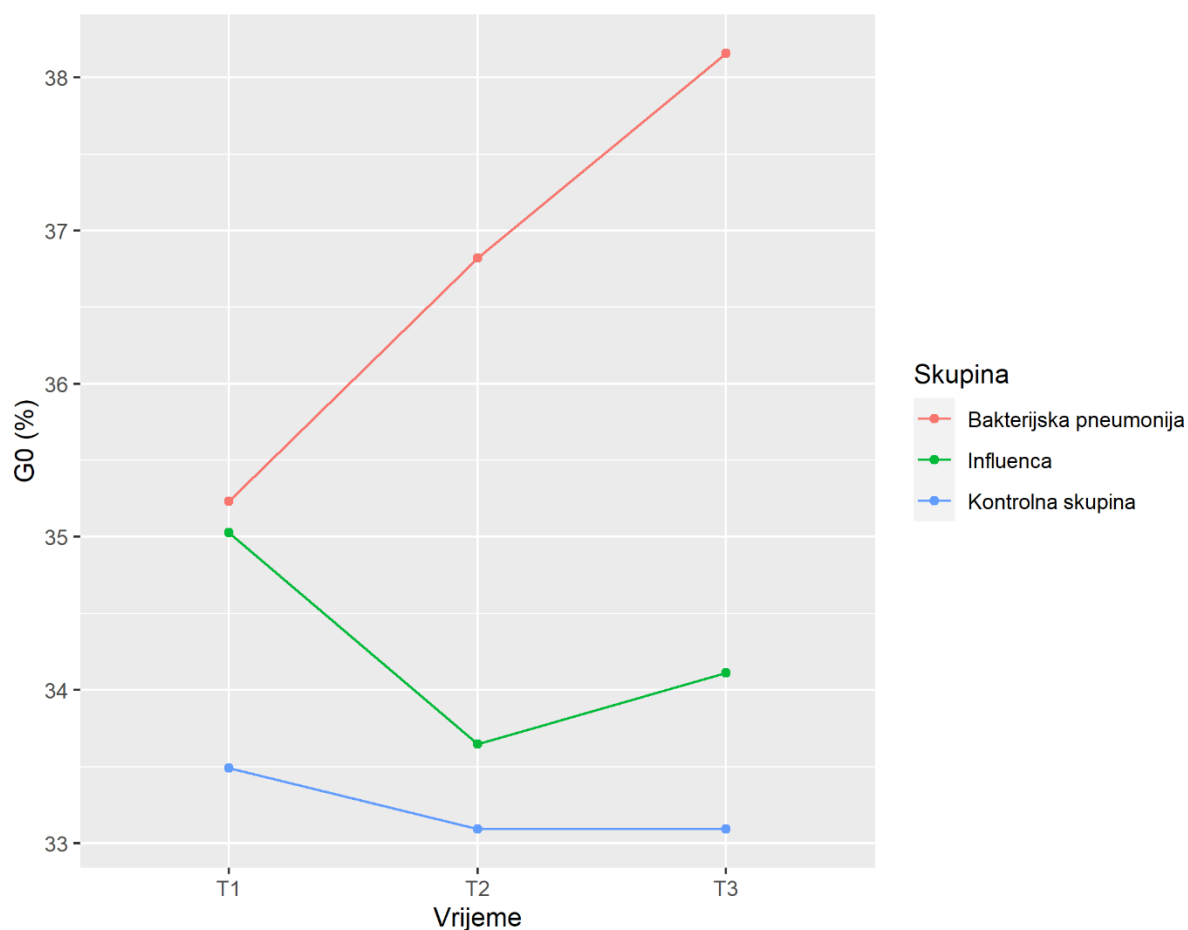
Ovaj suprotan smjer kretanja udjela G0 između skupine bakterijske pneumonije i influence u skladu je s rezultatima linearnih mješovitih modela unutar svake pojedine skupine, navedenih u poglavlju 5.3.1.

Kako bismo formalno testirali razlike u kretanju udjela G0 između ispitivanih skupina, u linearni mješoviti model uključili smo interakciju vremena i skupine. Interakcija između vremena uzorkovanja i skupine pokazala se statistički značajnom ( $p = 3,90 \times 10^{-7}$ , Tablica 15). Pripadnost određenoj skupini imala je značajan utjecaj na kretanje udjela G0 kod ispitanika.

Iz koeficijenata linearnog mješovitog modela (Tablica 16, Tablica 17) možemo zaključiti da je promjena u udjelu G0 između vremena T1 i T2 bila značajno manja u skupini influence u odnosu na skupinu bakterijske pneumonije ( $p = 1,26 \times 10^{-5}$ ). Također, promjena u udjelu G0 između vremena T1 i T3 bila je značajno manja u skupini influence u odnosu na skupinu bakterijske pneumonije ( $p = 1,51 \times 10^{-7}$ ). U odnosu na kontrolnu skupinu, jedino je skupina

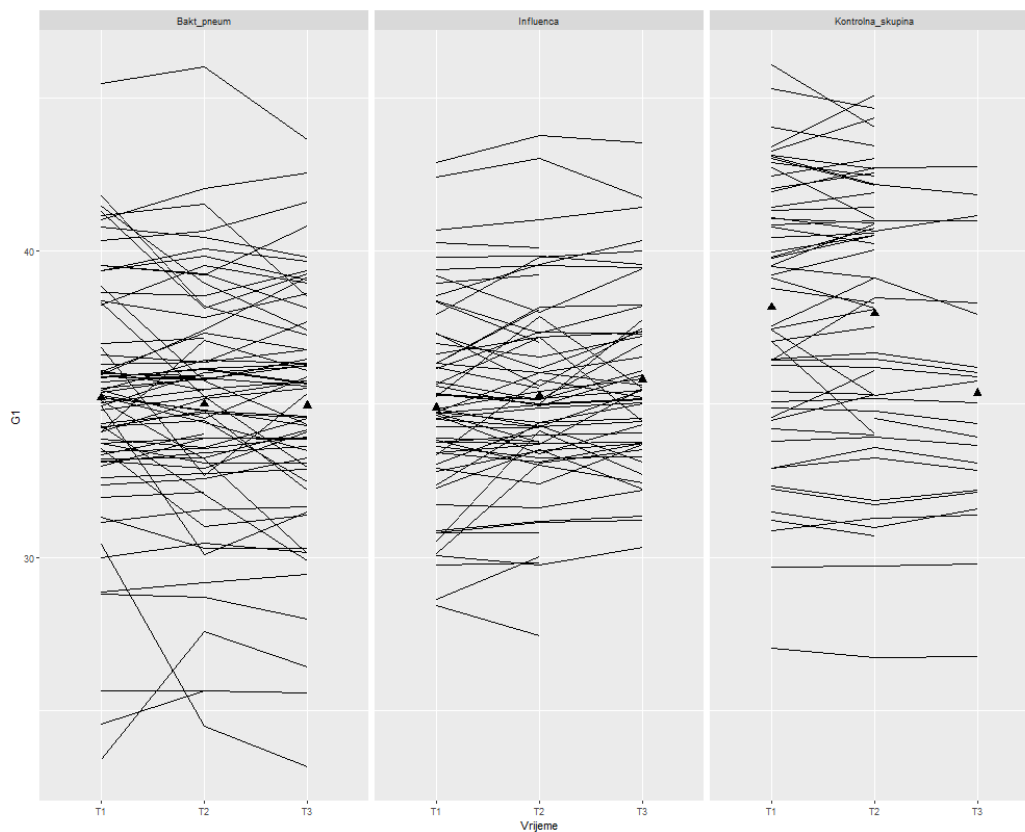
bakterijske pneumonije imala statistički značajno različitu promjenu u udjelu G0 između vremena T1 i T2 ( $p = 0,005$ ) i vremena T1 i T3 ( $p = 0,0002$ , Tablica 16).

Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima linearnih mješovitih modela unutar svake pojedine skupine, navedenih u poglavlju 5.3.1., gdje su najveće razlike u udjelu G0 između triju vremenskih točaka također nađene u skupini bakterijske pneumonije. Visoka značajnost razlike u promjeni udjela G0 iz vremena T1 u T2 između skupine bakterijske pneumonije i influence ima potencijalan dijagnostički značaj. Kod bakterijske pneumonije je primjetan rast udjela G0 između točke T1 i T2, dok je u isto vrijeme kod influence primjetan pad udjela G0 (Slika 8). Ova značajna razlika u smjeru kretanja, koja je ujedno kontrolirana na utjecaj dobi i spola, potencijalno može služiti kao dijagnostički kriterij kod određivanja vrste bolesti.



**Slika 8.** Interakcijski graf prilagođenih prosjeka udjela agalaktoziliranih N-glikana imunoglobulina G (G0) dobivenih na temelju linearnog mješovitog modela. T1 – pri prijemu, T2 – sedmi, T3 – dvadeset i osmi dan od prijema u bolnicu.

Na Slici 9, mogu se vidjeti individualne promjene u udjelu monogalaktoziliranih N-glikana (G1) imunoglobulina G za svakog ispitanika unutar skupine bakterijske pneumonije, influence i kontrolne skupine.



**Slika 9.** Promjene udjela N-glikana s jednom galaktozom (G1) imunoglobulina G kroz tri vremenske točke (mjerjenja) u skupini bakterijske pneumonije, influence i u kontrolnoj skupini. Linije povezuju vrijednosti udjela G1 za svakog pojedinačnog ispitanika kroz tri vremenske točke. Ispunjeni trokuti označavaju srednje vrijednosti udjela G1 pri prijemu (T1), sedmi dan (T2) te dvadeset i osmi dan (T3) od prijema u bolnicu u sve tri ispitivane skupine.

Rezultati linearnog mješovitog modela za G1 pokazali su kako glavni efekt skupine nije statistički značajan ( $p = 0.168$ , Tablica 18), što bi značilo da se početna mjerenja G1 za pojedine skupine u vremenu T1 nisu značajno razlikovala.

**Tablica 18.** Tablica analize varijance vrste III za prediktore iz linearnog mješovitog modela za monogalaktozilirane N-glikane imunoglobulina G (G1) koristeći Satterthwaiteovu metodu

	Suma kvadrata	Srednji kvadrati	Stupnjevi slobode	F-statistika	p-vrijednost
Vrijeme	0,004	0,002	2	0,003	0,99
Skupina	2,98	1,49	2	1,801	0,168
Spol	0,33	0,33	1	0,404	0,526
Godine	31,32	31,32	1	37,842	<b>4,55 x 10<sup>-9</sup></b>
Sezona	102,35	51,17	2	61,84	<b>&lt; 2,2 x 10<sup>-16</sup></b>
Vrijeme:Skupina	16,06	4,01	4	4,850	<b>0,0008</b>

Satterthwaiteova metoda aproksimira broj stupnjeva slobode.

Unutar skupine bakterijske pneumonije, pokazan je statistički značajan pad u udjelu G1 u trećem mjerenju ( $\beta_{T3} = -0,465$ ,  $p = 0,004$ ) u odnosu na prvo mjerenje (Tablica 19).

**Tablica 19.** Rezultati mješovitog linearnog modela (engl. linear mixed model) kojim se ispitala razlika u udjelu monogalaktoziliranih N-glikana (G1) imunoglobulina G između različitih skupina i vremena uzorkovanja te interakcija vremena i skupine

	Zavisna varijabla: G1 ( $\beta$ , SE)	p-vrijednost
Odsječak na osi y	42,37 (0,74)	<b>&lt; 2 x 10<sup>-16</sup></b>
Vrijeme T2	-0,260 (0,152)	0,090
Vrijeme T3	-0,465 (0,160)	<b>0,004</b>
Skupina Influenca	-0,020 (0,474)	0,967
Skupina Kontrolna skupina	0,787 (0,566)	0,166
Spol: Ženski	0,270 (0,425)	0,526
Godine	-0,068 (0,011)	<b>4,55 x 10<sup>-10</sup></b>
Sezona 2019	-4,573 (0,518)	<b>7,83 x 10<sup>-16</sup></b>
Sezona 2020	-5,035 (0,498)	<b>&lt; 2 x 10<sup>-16</sup></b>
Vrijeme T2: Skupina Influenca	0,540 (0,223)	<b>0,016</b>
Vrijeme T3: Skupina Influenca	1,043 (0,239)	<b>1,71 x 10<sup>-5</sup></b>
Vrijeme T2: Kontrolna skupina	0,258 (0,233)	0,268
Vrijeme T3: Kontrolna skupina	0,372 (0,297)	0,211

$\beta$ , procjena regresijskog parametra; SE, standardna pogreška. Odsječak na osi y predstavlja prosječnu vrijednost udjela G1 za referentne vrijednosti kategorijskih prediktora: skupinu bakterijske pneumonije (referentna), vrijeme T1 (referentno), muški spol (referentno) i sezonu 2018 (referentna).

Vrijeme i skupina predstavljaju fiksne efekte (engl. fixed effect), dok su ispitanici uključeni u model kao nasumični efekt (engl. random effect). Spol, dob i sezona uzorkovanja dodani su u model kao kovarijate kako bi se kontroliralo na njihov utjecaj.

Kod influence, udio G1 bio je statistički značajno viši u trećem mjerenju ( $\beta_{T3} = 0,578$ ,  $p = 0,001$ ) u odnosu na prvo mjerenje (Tablica 20).



**Tablica 20.** Rezultati mješovitog linearnog modela (engl. linear mixed model) kojim se ispitala razlika u udjelu monogalaktoziliranih N-glikana imunoglobulina G (G1) između različitih skupina i vremena uzorkovanja te interakcija vremena i skupine

	Zavisna varijabla: G1 ( $\beta$ , SE)	p-vrijednost
Odsječak na osi y	42,349 (0,747)	$< 2 \times 10^{-16}$
Vrijeme T2	0,280 (0,163)	0,087
Vrijeme T3	0,578 (0,177)	<b>0,001</b>
Skupina Bakterijska pneumonija	0,020 (0,474)	0,967
Skupina Kontrolna skupina	0,806 (0,615)	0,191
Spol: Ženski	0,270 (0,425)	0,526
Godine	-0,068 (0,011)	<b><math>4,55 \times 10^{-10}</math></b>
Sezona 2019	-4,573 (0,518)	<b><math>7,83 \times 10^{-16}</math></b>
Sezona 2020	-5,035 (0,498)	$< 2 \times 10^{-16}$
Vrijeme T2: Skupina Bakterijska pneumonija	-0,540 (0,223)	<b>0,016</b>
Vrijeme T3: Skupina Bakterijska pneumonija	-1,043 (0,239)	<b><math>1,71 \times 10^{-5}</math></b>
Vrijeme T2: Skupina Kontrolna skupina	-0,282 (0,240)	0,241
Vrijeme T3: Skupina Kontrolna skupina	-0,671 (0,306)	<b>0,029</b>

$\beta$ , procjena regresijskog parametra; SE, standardna pogreška.

Odsječak na osi y predstavlja prosječnu vrijednost udjela G1 za referentne vrijednosti kategorijskih prediktorâ: skupinu influence (referentna), vrijeme T1 (referentno), muški spol (referentno) i sezonu 2018 (referentna).

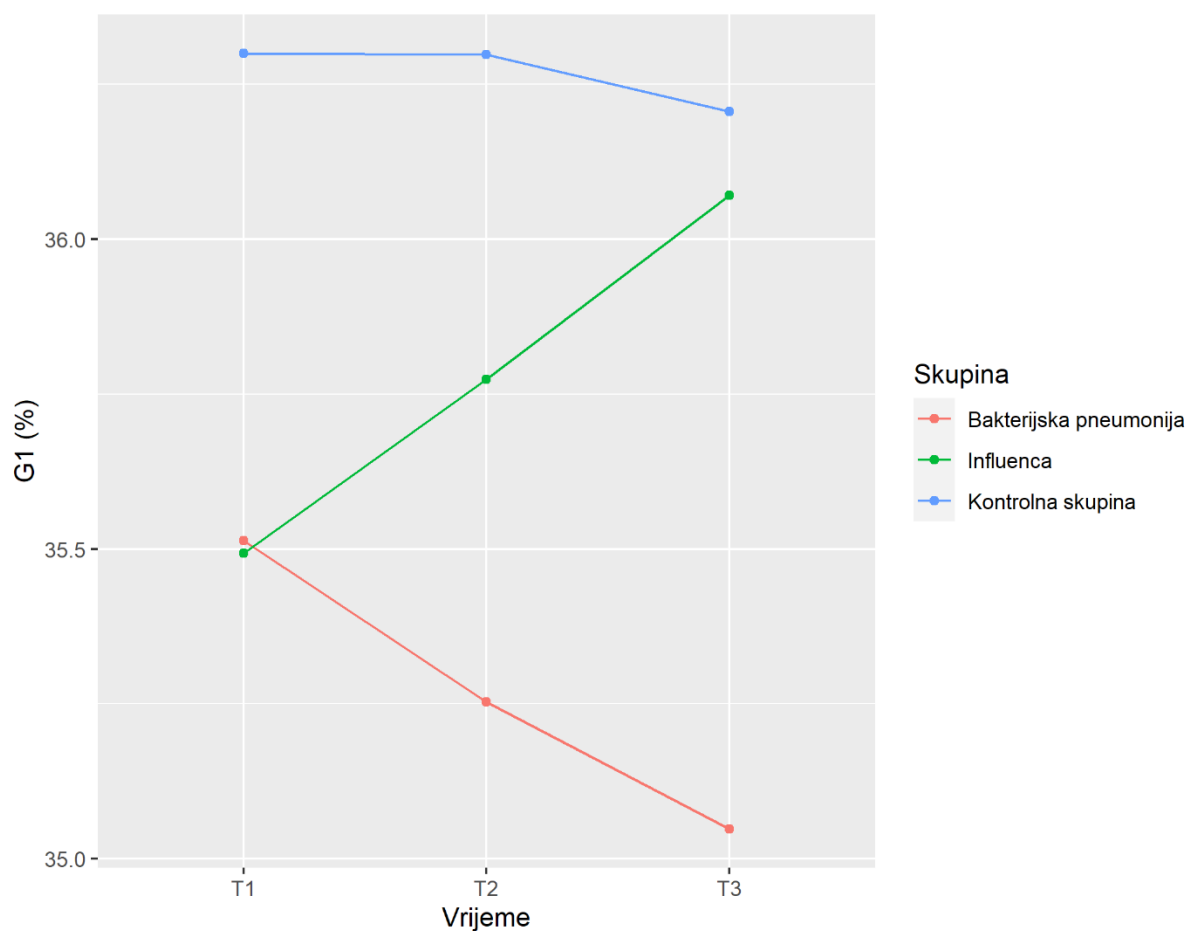
Vrijeme i skupina predstavljaju fiksne efekte (engl. fixed effect), dok su ispitanici uključeni u model kao nasumični efekt (engl. random effect). Spol, dob i sezona uzorkovanja dodani su u model kao kovarijate kako bi se kontroliralo na njihov utjecaj.

Ovaj suprotan smjer kretanja udjela G1 između skupine bakterijske pneumonije i influence u skladu je s rezultatima linearnih mješovitih modela unutar svake pojedine skupine, navedenih u poglavlju 5.3.1.

Kako bismo formalno testirali razlike u kretanju udjela G1 između ispitivanih skupina, u linearni mješoviti model smo uključili interakciju vremena i skupine. Interakcija između vremena uzorkovanja i skupine pokazala se statistički značajnom ( $p = 0,0008$ , Tablica 18). Pripadnost određenoj skupini imala je značajan utjecaj na kretanje udjela G1 kod ispitanika.

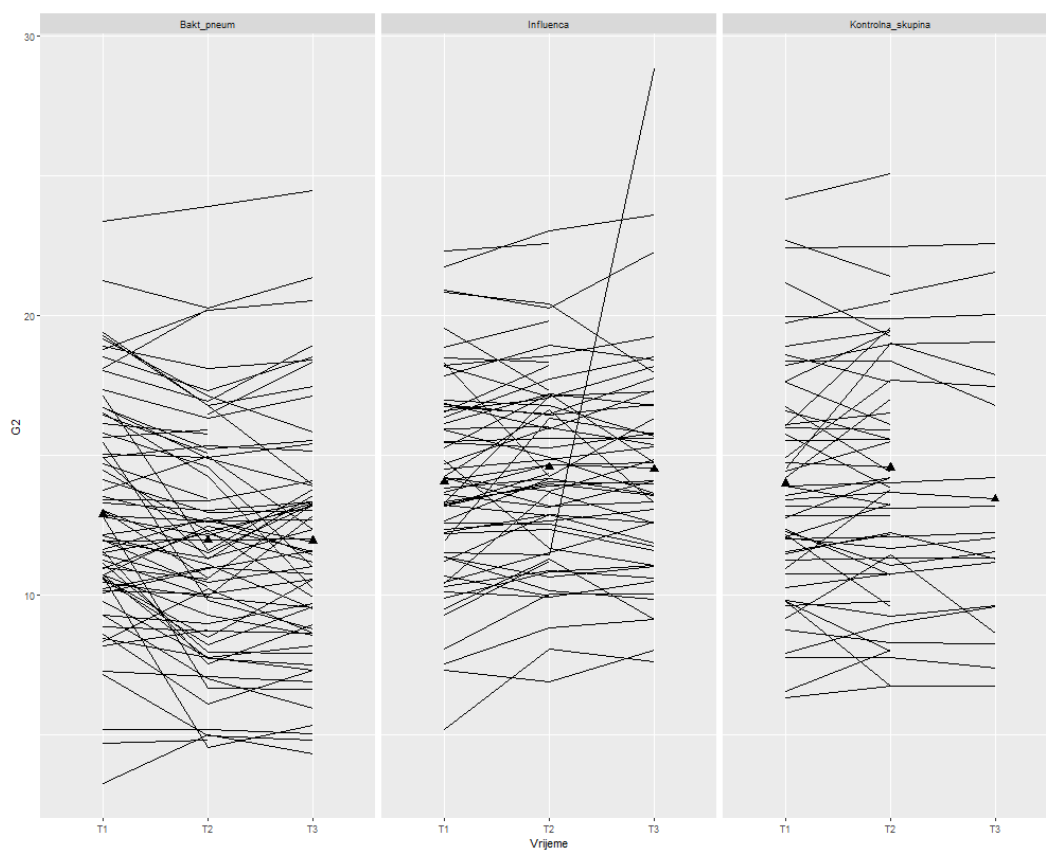
Iz koeficijenata linearnog mješovitog modela (Tablica 19, Tablica 20) i Slike 10 možemo zaključiti da je promjena u udjelu G1 između vremena T1 i T2 bila značajno različita u skupini influence u odnosu na skupinu bakterijske pneumonije ( $p = 0,016$ ). Također, promjena u udjelu G1 između vremena T1 i T3 bila je značajno različita u skupini influence u odnosu na skupinu bakterijske pneumonije ( $p = 1,71 \times 10^{-5}$ , Tablica 19, Tablica 20). Jedina statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu nađena je kod promjene G1 između vremena T1 i T3 kod influence ( $p = 0,029$ , Tablica 20). Kretanje udjela G1 u kontrolnoj skupini nije bilo statistički značajno različito u odnosu na skupinu bakterijske pneumonije (Tablica 19). Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima linearnih mješovitih modela unutar svake pojedine skupine, navedenih u poglavlju 5.3.1., gdje su najznačajnije razlike u udjelu G1 između vremenskih točaka također nađene u skupini influence. Značajna razlika u promjeni udjela G1

iz vremena T1 u T2 između skupine bakterijske pneumonije i influence ima potencijalan dijagnostički značaj. Kod bakterijske pneumonije je primjetan pad udjela G1 između točke T1 i T2 (Tablica 19, Slika 10), dok je u isto vrijeme kod influence primjetan rast udjela G1 (Tablica 20, Slika 10). Ova značajna razlika u smjeru kretanja, koja je ujedno kontrolirana na utjecaj dobi i spola, potencijalno može služiti kao dijagnostički kriterij kod određivanja vrste bolesti.



**Slika 10.** Interakcijski graf prilagođenih prosjeka udjela mogalaktoziliranih N-glikana (G1) imunoglobulina G dobivenih na temelju linearnog mješovitog modela. T1 – pri prijemu, T2 – sedmi, T3 – dvadeset i osmi dan od prijema u bolnicu.

Na Slici 11, mogu se vidjeti individualne promjene u udjelu digalaktoziliranih N-glikana (G2) imunoglobulina G za svakog ispitanika unutar skupine bakterijske pneumonije, influence i kontrolne skupine.



**Slika 11.** Promjene u udjelu digalaktoziliranih N-glikana imunoglobulina G (G2) kroz tri vremenske točke (mjerjenja) u skupini bakterijske pneumonije, influence i u kontrolnoj skupini. Linije povezuju vrijednosti udjela G2 za svakog pojedinačnog ispitanika kroz tri vremenske točke. Ispunjeni trokuti označavaju srednje vrijednosti udjela G2 pri prijemu (T1), sedmi dan (T2) te dvadeset i osmi dan (T3) od prijema u bolnicu u sve tri ispitivane skupine.

Rezultati linearnog mješovitog modela za G2 pokazali su kako je glavni efekt skupine statistički značajan ( $p = 0,0002$ , Tablica 21), što bi značilo da su se početna mjerjenja G2 za pojedine skupine u vremenu T1 značajno razlikovala. Skupina influence imala je više udjele G2 u odnosu na skupinu bakterijske pneumonije u vremenu T1 (Slika 12).

**Tablica 21.** Tablica analize varijance vrste III za prediktore iz linearnog mješovitog modela za digalaktozilirane N-glikane imunoglobulina G (G2) koristeći Satterthwaiteovu metodu

	Suma kvadrata	Srednji kvadrati	Stupnjevi slobode	F-statistika	p-vrijednost
<b>Vrijeme</b>	1,52	0,76	2	0,430	0,651
<b>Skupina</b>	30,71	15,36	2	8,678	<b>0,0002</b>
<b>Spol</b>	3,54	3,54	1	1,998	0,159
<b>Godine</b>	219,16	219,16	1	123,85	$< 2,2 \times 10^{-16}$
<b>Sezona</b>	62,25	34,63	2	19,568	$1,94 \times 10^{-8}$
<b>Vrijeme:Skupina</b>	62,53	15,63	4	8,835	$8,90 \times 10^{-7}$

Satterthwaiteova metoda aproksimira broj stupnjeva slobode.

Unutar skupine bakterijske pneumonije, pokazan je statistički značajan pad u udjelu G2 u drugom ( $\beta_{T2} = -1,051, p = 3,52 \times 10^{-6}$ ) i trećem mjerenju ( $\beta_{T3} = -1,021, p = 1,72 \times 10^{-5}$ ) u odnosu na prvo mjerenje (Tablica 22).

**Tablica 22.** Rezultati mješovitog linearnog modela (engl. linear mixed model) kojim se ispitala razlika u udjelu digalaktoziliranih N-glikana imunoglobulina G (G2) između različitih skupina i vremena uzorkovanja te interakcija vremena i skupine

	Zavisna varijabla: G2 ( $\beta$ , SE)	<i>p</i> -vrijednost
Odsječak na osi y	18,51 (0,837)	$< 2 \times 10^{-16}$
Vrijeme T2	-1,051 (0,223)	$3,52 \times 10^{-6}$
Vrijeme T3	-1,021 (0,234)	$1,72 \times 10^{-5}$
Skupina Influenca	0,570 (0,548)	0,300
Skupina Kontrolna skupina	1,385 (0,652)	0,035
Spol: Ženski	0,679 (0,481)	0,159
Godine	-0,140 (0,013)	$< 2 \times 10^{-16}$
Sezona 2019	3,345 (0,585)	$4,38 \times 10^{-8}$
Sezona 2020	2,777 (0,564)	$1,85 \times 10^{-6}$
Vrijeme T2: Skupina Influenca	1,503 (0,326)	$5,91 \times 10^{-6}$
Vrijeme T3: Skupina Influenca	1,755 (0,349)	$8,05 \times 10^{-7}$
Vrijeme T2: Skupina Kontrolna skupina	1,268 (0,340)	<b>0,0002</b>
Vrijeme T3: Skupina Kontrolna skupina	1,175 (0,433)	<b>0,007</b>

$\beta$ , procjena regresijskog parametra; SE, standardna pogreška. Odsječak na osi y predstavlja prosječnu vrijednost udjela G2 za referentne vrijednosti kategorijskih prediktora: skupinu bakterijske pneumonije (referentna), vrijeme T1 (referentno), muški spol (referentno) i sezonu 2018 (referentna).

Vrijeme i skupina predstavljaju fiksne efekte (engl. fixed effect), dok su ispitanici uključeni u model kao nasumični efekt (engl. random effect). Spol, dob i sezona uzorkovanja dodani su u model kao kovarijate kako bi se kontroliralo na njihov utjecaj.

Kod influence, udio G2 bio je statistički značajno viši u trećem mjerenju ( $\beta_{T3} = 0,734, p = 0,005$ ) u odnosu na prvo mjerenje (Tablica 23).

**Tablica 23.** Rezultati mješovitog linearnog modela (engl. linear mixed model) kojim se ispitala razlika u udjelu digalaktosiliranih N-glikana imunoglobulina G (G2) između različitih skupina i vremena uzorkovanja te interakcija vremena i skupine

	Zavisna varijabla: G2 ( $\beta$ , SE)	p-vrijednost
Odsječak na osi y	19,082 (0,850)	$< 2 \times 10^{-16}$
Vrijeme T2	0,453 (0,239)	0,059
Vrijeme T3	0,734 (0,259)	<b>0,005</b>
Skupina Bakterijska pneumonija	-0,570 (0,548)	0,300
Skupina Kontrolna skupina	0,815 (0,706)	0,250
Spol: Ženski	0,679 (0,481)	0,159
Godine	-0,140 (0,013)	$< 2 \times 10^{-16}$
Sezona 2019	3,345 (0,585)	<b><math>4,38 \times 10^{-8}</math></b>
Sezona 2020	2,777 (0,564)	<b><math>1,85 \times 10^{-6}</math></b>
Vrijeme T2: Skupina Bakterijska pneumonija	-1,503 (0,326)	<b><math>5,91 \times 10^{-6}</math></b>
Vrijeme T3: Skupina Bakterijska pneumonija	-1,755 (0,349)	<b><math>8,05 \times 10^{-7}</math></b>
Vrijeme T2: Skupina Kontrolna skupina	-0,235 (0,351)	0,502
Vrijeme T3: Skupina Kontrolna skupina	-0,580 (0,447)	0,195

$\beta$ , procjena regresijskog parametra; SE, standardna pogreška. Odsječak na osi y predstavlja prosječnu vrijednost udjela G2 za referentne vrijednosti kategorijskih prediktora: skupinu influence (referentna), vrijeme T1 (referentno), muški spol (referentno) i sezonu 2018 (referentna).

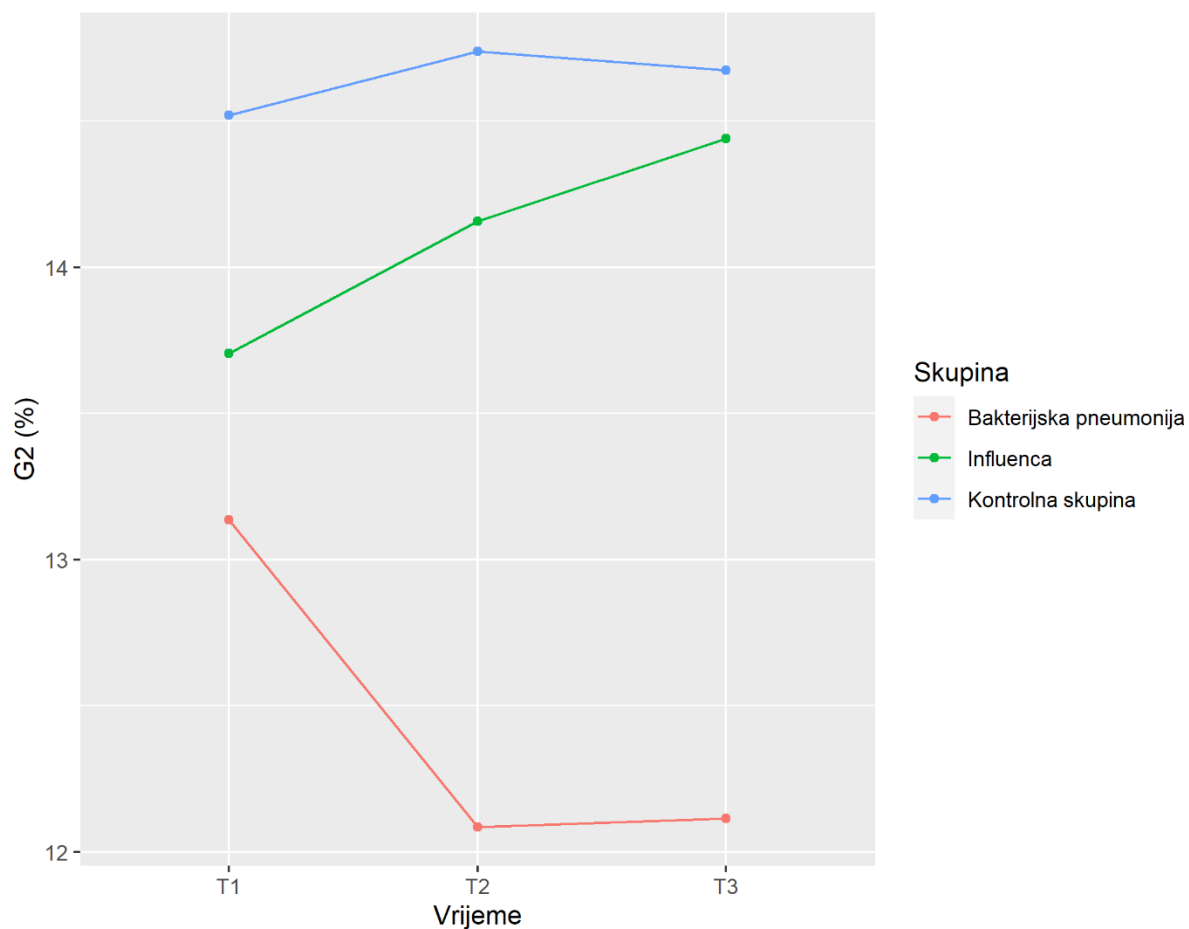
Vrijeme i skupina predstavljaju fiksne efekte (engl. fixed effect), dok su ispitanici uključeni u model kao nasumični efekt (engl. random effect). Spol, dob i sezona uzorkovanja dodani su u model kao kovarijate kako bi se kontroliralo na njihov utjecaj.

Ovaj suprotan smjer kretanja udjela G2 između skupine bakterijske pneumonije i influence u skladu je s rezultatima linearnih mješovitih modela unutar svake pojedine skupine, navedenih u poglavlju 5.3.1.

Kako bismo formalno testirali razlike u kretanju udjela G2 između ispitivanih skupina, u linearni mješoviti model smo uključili interakciju vremena i skupine. Interakcija između vremena uzorkovanja i skupine pokazala se statistički značajnom ( $p = 8,90 \times 10^{-7}$ , Tablica 21). Pripadnost određenoj skupini imala je značajan utjecaj na kretanje udjela G2 kod ispitanika.

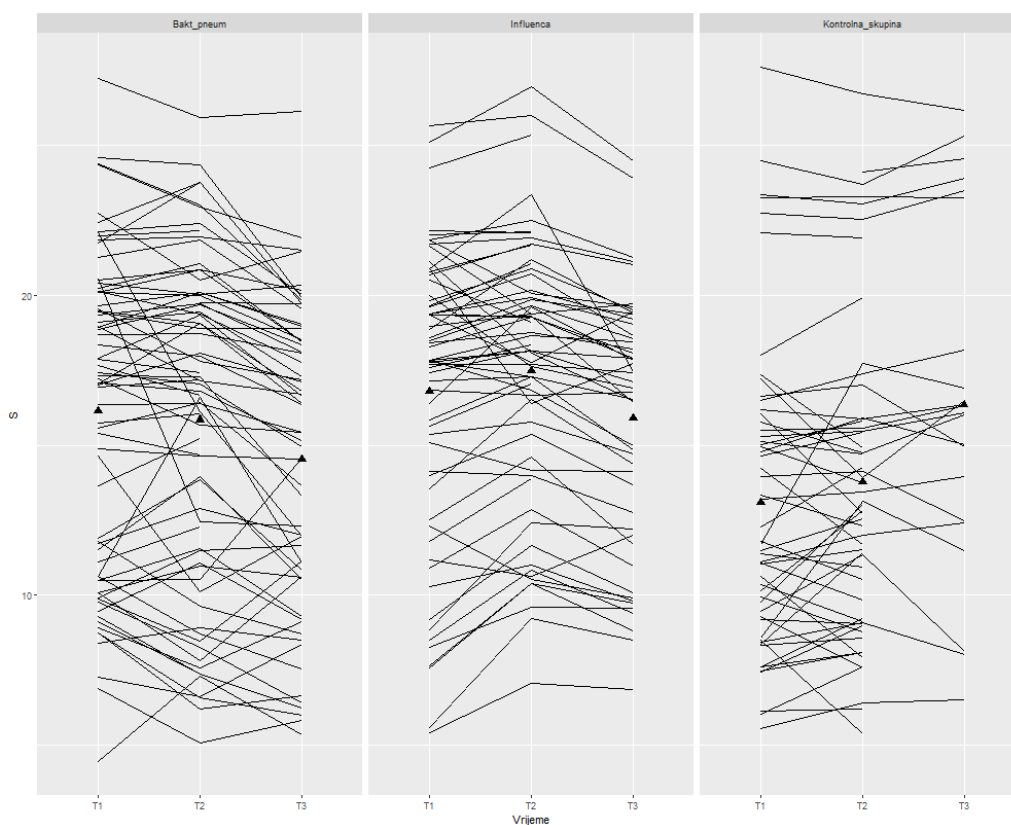
Iz koeficijenata linearnog mješovitog modela (Tablica 22, Tablica 23) i Slike 12 možemo zaključiti da je promjena u udjelu G2 između vremena T1 i T2 bila značajno različita u skupini influence u odnosu na skupinu bakterijske pneumonije ( $p = 5,91 \times 10^{-6}$ ). Također, promjena u udjelu G2 između vremena T1 i T3 bila je značajno različita u skupini influence u odnosu na skupinu bakterijske pneumonije ( $p = 8,05 \times 10^{-7}$ , Tablica 22, Tablica 23). U odnosu na kontrolnu skupinu, jedino je skupina bakterijske pneumonije imala statistički značajno različitu promjenu u udjelu G2 između vremena T1 i T2 ( $p = 0,0002$ ) te T1 i T3 ( $p = 0,007$ , Tablica 22). Visoka značajnost razlike u promjeni udjela G2 iz vremena T1 u T2 između skupine bakterijske pneumonije i influence ima potencijalan dijagnostički značaj. Kod bakterijske pneumonije je primjetan pad udjela G2 između točke T1 i T2 (Tablica 22, Slika 12), dok je u isto vrijeme kod influence primjetan rast udjela G2 (Tablica 23, Slika 12). Ova značajna razlika u smjeru

kretanja, koja je ujedno kontrolirana na utjecaj dobi i spola, potencijalno može služiti kao dijagnostički kriterij kod određivanja vrste bolesti.



**Slika 12.** Interakcijski graf prilagođenih prosjeka udjela digalaktoziliranih N-glikana (G2) imunoglobulina G dobivenih na temelju linearnog mješovitog modela. T1 – pri prijemu, T2 – sedmi, T3 – dvadeset i osmi dan od prijema u bolnicu.

Na Slici 13, mogu se vidjeti individualne promjene u udjelu N-glikana sa sijalinskom kiselinom (S) imunoglobulina G za svakog ispitanika unutar skupine bakterijske pneumonije, influence i kontrolne skupine.



**Slika 13.** Promjene udjela N-glikana sa sijalinskom kiselinom (S) imunoglobulina G kroz tri vremenske točke (mjerjenja) u skupini bakterijske pneumonije, influence i u kontrolnoj skupini. Linije povezuju vrijednosti S za svakog pojedinačnog ispitanika kroz tri vremenske točke. Ispunjeni trokuti označavaju srednje vrijednosti udjela S pri prijemu (T1), sedmi dan (T2) te dvadeset i osmi dan (T3) od prijema u bolnicu u sve tri ispitivane skupine.

Rezultati linearnog mješovitog modela za S pokazali su kako glavni efekt skupine nije statistički značajan ( $p = 0,746$ , Tablica 24), što bi značilo da se početna mjerenja S za pojedine skupine u vremenu T1 nisu značajno razlikovala.

**Tablica 24.** Tablica analize varijance vrste III za prediktore iz linearnog mješovitog modela za sijalinizirane N-glikane imunoglobulina G (S) koristeći Satterthwaiteovu metodu

	Suma kvadrata	Srednji kvadrati	Stupnjevi slobode	F-statistika	p-vrijednost
<b>Vrijeme</b>	29,81	14,91	2	10,016	<b><math>6,03 \times 10^{-5}</math></b>
<b>Skupina</b>	0,87	0,44	2	0,293	0,746
<b>Spol</b>	2,58	2,58	1	1,731	0,190
<b>Godine</b>	74,79	74,79	1	50,258	<b><math>2,67 \times 10^{-11}</math></b>
<b>Sezona</b>	676,89	338,45	2	227,42	<b><math>&lt;2,2 \times 10^{-16}</math></b>
<b>Vrijeme:Skupina</b>	40,93	10,23	4	6,876	<b><math>2,54 \times 10^{-5}</math></b>

Satterthwaiteova metoda aproksimira broj stupnjeva slobode.

Unutar skupine bakterijske pneumonije, pokazan je statistički značajan pad u udjelu S u trećem mjerenju ( $\beta_{T3} = -1,429$ ,  $p = 1,16 \times 10^{-10}$ ) u odnosu na prvo mjerenje (Tablica 25).

**Tablica 25.** Rezultati mješovitog linearnog modela (engl. linear mixed model) kojim se ispitala razlika u udjelu sijaliniziranih N-glikana imunoglobulina G (S) između različitih skupina i vremena uzorkovanja te interakcija vremena i skupine

	Zavisna varijabla: S ( $\beta$ , SE)	p-vrijednost
Odsječak na osi y	14,039 (0.738)	$< 2 \times 10^{-16}$
Vrijeme T2	-0,279 (0.204)	0,173
Vrijeme T3	-1,429 (0.214)	<b><math>1,16 \times 10^{-10}</math></b>
Skupina Influenca	-0,344 (0.485)	0,479
Skupina Kontrolna skupina	-0,441 (0.576)	0,444
Spol: Ženski	0,557 (0.423)	0,190
Godine	-0,079 (0.011)	<b><math>2,67 \times 10^{-11}</math></b>
Sezona 2019	9,104 (0.516)	$< 2 \times 10^{-16}$
Sezona 2020	9,352 (0.497)	$< 2 \times 10^{-16}$
Vrijeme T2: Skupina Influenca	0,924 (0.299)	<b>0,002</b>
Vrijeme T3: Skupina Influenca	1,025 (0.320)	<b>0,001</b>
Vrijeme T2: Skupina Kontrolna skupina	0,476 (0.312)	0,127
Vrijeme T3: Skupina Kontrolna skupina	1,769 (0.397)	<b><math>1,13 \times 10^{-5}</math></b>

$\beta$ , procjena regresijskog parametra; SE, standardna pogreška. Odsječak na osi y predstavlja prosječnu vrijednost udjela S za referentne vrijednosti kategorijskih prediktora: skupinu bakterijske pneumonije (referentna), vrijeme T1 (referentno), muški spol (referentno) i sezonu 2018 (referentna).

Vrijeme i skupina predstavljaju fiksne efekte (engl. fixed effect), dok su ispitanici uključeni u model kao nasumični efekt (engl. random effect). Spol, dob i sezona uzorkovanja dodani su u model kao kovarijate kako bi se kontroliralo na njihov utjecaj.

Kod influence, udio S je u drugom mjerenju bio statistički značajno viši ( $\beta_{T2} = 0,645$ ,  $p = 0,003$ ) u odnosu na prvo mjerenje (Tablica 26).



**Tablica 26.** Rezultati mješovitog linearnog modela (engl. linear mixed model) kojim se ispitala razlika u udjelu sijaliniziranih N-glikana imunoglobulina G (S) između različitih skupina i vremena uzorkovanja te interakcija vremena i skupine

	Zavisna varijabla: S ( $\beta$ , SE)	p-vrijednost
Odsječak na osi y	13,695 (0.749)	$< 2 \times 10^{-16}$
Vrijeme T2	0,645 (0.219)	<b>0,003</b>
Vrijeme T3	-0,405 (0.237)	0,090
Skupina Bakterijska pneumonija	0,344 (0.485)	0,479
Skupina Kontrolna skupina	-0,097 (0.624)	0,876
Spol: Ženski	0,557 (0.423)	0,190
Godine	-0,079 (0.011)	<b><math>2,67 \times 10^{-11}</math></b>
Sezona 2019	9,104 (0.516)	$< 2 \times 10^{-16}$
Sezona 2020	9,352 (0.497)	$< 2 \times 10^{-16}$
Vrijeme T2: Skupina Bakterijska pneumonija	-0,924 (0.299)	<b>0,002</b>
Vrijeme T3: Skupina Bakterijska pneumonija	-1,025 (0.320)	<b>0,001</b>
Vrijeme T2: Skupina Kontrolna skupina	-0,477 (0.321)	0,165
Vrijeme T3: Skupina Kontrolna skupina	0,745 (0.409)	0,070

$\beta$ , procjena regresijskog parametra; SE, standardna pogreška. Odsječak na osi y predstavlja prosječnu vrijednost udjela S za referentne vrijednosti kategorijskih prediktora: skupinu influence (referentna), vrijeme T1 (referentno), muški spol (referentno) i sezonu 2018 (referentna).

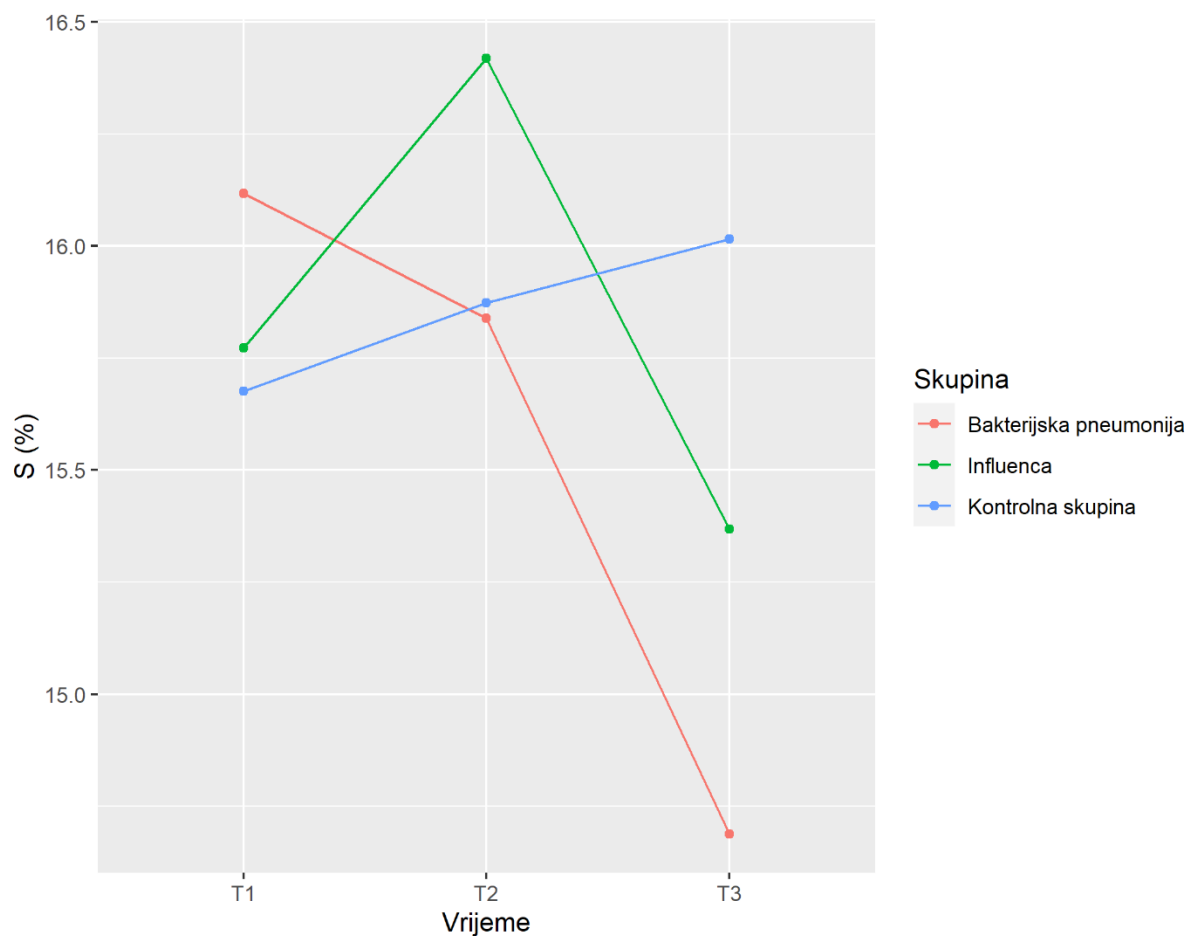
Vrijeme i skupina predstavljaju fiksne efekte (engl. fixed effect), dok su ispitanici uključeni u model kao nasumični efekt (engl. random effect). Spol, dob i sezona uzorkovanja dodani su u model kao kovarijate kako bi se kontroliralo na njihov utjecaj.

Ovakav smjer kretanja u skladu je s rezultatima linearnih mješovitih modela unutar svake pojedine skupine, navedenih u poglavlju 5.3.1.

Kako bismo formalno testirali razlike u kretanju udjela S između ispitivanih skupina, u linearni mješoviti model smo uključili interakciju vremena i skupine. Interakcija između vremena uzorkovanja i skupine pokazala se statistički značajnom ( $p = 2,54 \times 10^{-5}$ , Tablica 24). Pripadnost određenoj skupini imala je značajan utjecaj na kretanje udjela S kod ispitanika.

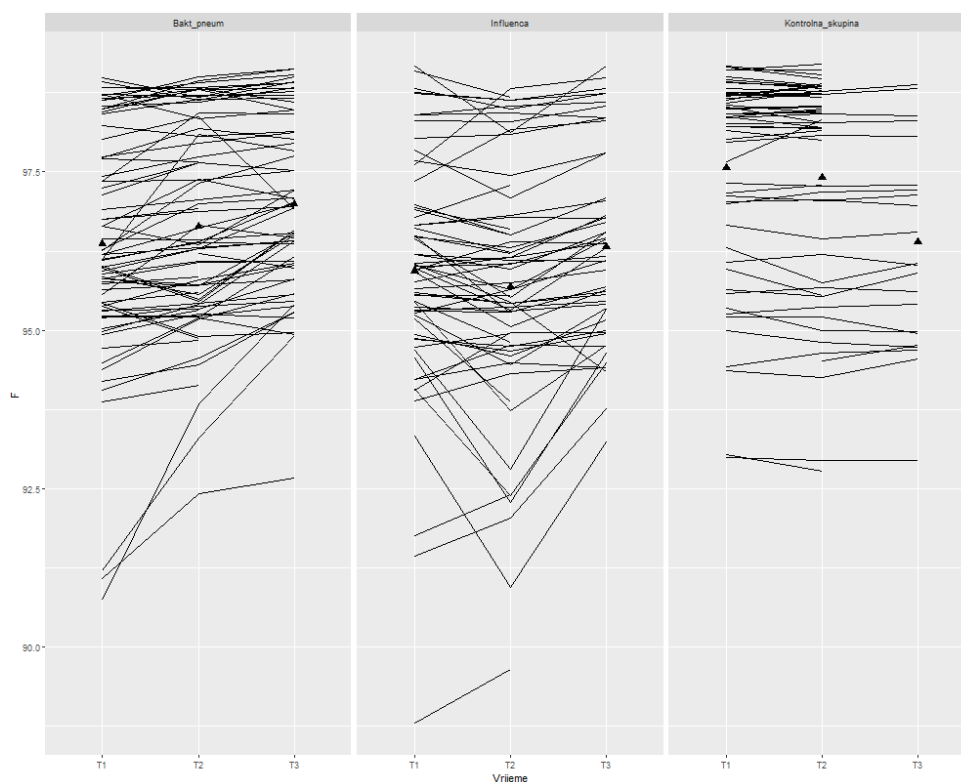
Iz koeficijenata linearnog mješovitog modela (Tablica 25, Tablica 26) i Slike 14 možemo zaključiti da je promjena u udjelu S između vremena T1 i T2 bila značajno različita u skupini influence u odnosu na skupinu bakterijske pneumonije ( $p = 0.002$ ). Naposljetku, promjena u udjelu S između vremena T1 i T3 bila je značajno veća u skupini bakterijske pneumonije u odnosu na skupinu influence ( $p = 0.001$ , Tablica 25, Tablica 26). U odnosu na kontrolnu skupinu, jedino je skupina bakterijske pneumonije imala statistički značajno različitu promjenu u udjelu S između vremena T1 i T3 ( $p = 1.13 \times 10^{-5}$ , Tablica 25). Značajna razlika u promjeni udjela S iz vremena T1 u T2 između skupine bakterijske pneumonije i influence ima potencijalan dijagnostički značaj. Kod bakterijske pneumonije je primjetan pad udjela S između točke T1 i T2, dok je u isto vrijeme kod influence primjetan rast udjela S (Tablica 25, Tablica

26, Slika 14). Ova značajna razlika u smjeru kretanja, koja je ujedno kontrolirana na utjecaj dobi i spola, potencijalno može služiti kao dijagnostički kriterij kod određivanja vrste bolesti.



**Slika 14.** Interakcijski graf prilagođenih prosjeka udjela sijaliniziranih N-glikana imunoglobulina G (S) dobivenih na temelju linearnog mješovitog modela. T1 – pri prijemu, T2 – sedmi, T3 – dvadeset i osmi dan od prijema u bolnicu.

Na Slici 15, mogu se vidjeti individualne promjene u udjelu N-glikana sa sržnom fukozom (F) imunoglobulina G za svakog ispitanika unutar skupine bakterijske pneumonije, influence i kontrolne skupine.



**Slika 15.** Promjene udjela N-glikana sa sržnom fukozom (F) imunoglobulina G kroz tri vremenske točke (mjerjenja) u skupini bakterijske pneumonije, influence i u kontrolnoj skupini. Linije povezuju vrijednosti udjela F za svakog pojedinačnog ispitanika kroz tri vremenske točke. Ispunjeni trokuti označavaju srednje vrijednosti udjela F pri prijemu (T1), sedmi dan (T2) te dvadeset i osmi dan (T3) od prijema u bolnicu u sve tri ispitivane skupine.

Rezultati linearnog mješovitog modela za F pokazali su kako glavni efekt skupine nije statistički značajan ( $p = 0.091$ , Tablica 27), što bi značilo da se početna mjerenja F za pojedine skupine u vremenu T1 nisu značajno razlikovala.

**Tablica 27.** Tablica analize varijance vrste III za prediktore iz linearnog mješovitog modela za N-glikane sa sržnom fukozom (F) imunoglobulina G koristeći Satterthwaiteovu metodu

	Suma kvadrata	Srednji kvadrati	Stupnjevi slobode	F-statistika	p-vrijednost
<b>Vrijeme</b>	5,240	2,620	2	15,851	<b><math>2,74 \times 10^{-7}</math></b>
<b>Skupina</b>	0,803	0,402	2	2,430	0,091
<b>Spol</b>	0,460	0,460	1	2,781	0,097
<b>Godine</b>	0,049	0,049	1	0,296	0,587
<b>Sezona</b>	46,428	23,214	2	140,439	<b><math>&lt;2,2 \times 10^{-16}</math></b>
<b>Vrijeme:Skupina</b>	6,701	1,675	4	10,135	<b><math>9,84 \times 10^{-8}</math></b>

Satterthwaiteova metoda aproksimira broj stupnjeva slobode.

Unutar skupine bakterijske pneumonije, pokazan je statistički značajan porast u udjelu F u drugom ( $\beta_{T2} = 0,296$ ,  $p = 1,90 \times 10^{-5}$ ) i trećem mjerenju ( $\beta_{T3} = 0,548$ ,  $p = 2,36 \times 10^{-13}$ ) u odnosu na prvo mjerenje (Tablica 28).

**Tablica 28.** Rezultati mješovitog linearnog modela (engl. linear mixed model) kojim se ispitala razlika u udjelu fukoziliranih N-glikana imunoglobulina G (F) imunoglobulina G između različitih skupina i vremena uzorkovanja te interakcija vremena i skupine

	Zavisna varijabla: F ( $\beta$ , SE)	p-vrijednost
Odsječak na osi y	98,200 (0,295)	$< 2 \times 10^{-16}$
Vrijeme T2	0,296 (0,068)	$1,90 \times 10^{-5}$
Vrijeme T3	0,548 (0,072)	$2,36 \times 10^{-13}$
Skupina Influenca	-0,101 (0,191)	0,597
Skupina Kontrolna skupina	-0,014 (0,228)	0,950
Spol: Ženski	0,283 (0,170)	0,097
Godine	0,002 (0,004)	0,587
Sezona 2019	-3,024 (0,207)	$< 2 \times 10^{-16}$
Sezona 2020	-2,816 (0,199)	$< 2 \times 10^{-16}$
Vrijeme T2: Skupina Influenca	-0,538 (0,100)	$1,38 \times 10^{-7}$
Vrijeme T3: Skupina Influenca	-0,290 (0,107)	<b>0,007</b>
Vrijeme T2: Skupina Kontrolna skupina	-0,321 (0,104)	<b>0,002</b>
Vrijeme T3: Skupina Kontrolna skupina	-0,548 (0,132)	$4,57 \times 10^{-5}$

$\beta$ , procjena regresijskog parametra; SE, standardna pogreška. Odsječak na osi y predstavlja prosječnu vrijednost udjela F za referentne vrijednosti kategorijskih prediktora: skupinu bakterijske pneumonije (referentna), vrijeme T1 (referentno), muški spol (referentno) i sezonu 2018 (referentna).

Vrijeme i skupina predstavljaju fiksne efekte (engl. fixed effect), dok su ispitanici uključeni u model kao nasumični efekt (engl. random effect). Spol, dob i sezona uzorkovanja dodani su u model kao kovarijate kako bi se kontroliralo na njihov utjecaj.

Kod influence, udio F je u drugom mjerenju bio značajno niži ( $\beta_{T2} = -0,242, p = 0,001$ ), dok je u trećem mjerenju bio značajno viši ( $\beta_{T3} = 0,257, p = 0,001$ ) u odnosu na prvo mjerenje (Tablica 29).

**Tablica 29.** Rezultati mješovitog linearnog modela (engl. linear mixed model) kojim se ispitala razlika u udjelu fukoziliranih N-glikana imunoglobulina G (F) između različitih skupina i vremena uzorkovanja te interakcija vremena i skupine

	Zavisna varijabla: F ( $\beta$ , SE)	p-vrijednost
Odsječak na osi y	98,100 (0,300)	$< 2 \times 10^{-16}$
Vrijeme T2	-0,242 (0,073)	<b>0,001</b>
Vrijeme T3	0,257 (0,079)	<b>0,001</b>
Skupina Bakterijska pneumonija	0,101 (0,191)	0,597
Skupina Kontrolna skupina	0,087 (0,247)	0,725
Spol: Ženski	0,283 (0,170)	0,097
Godine	0,002 (0,004)	0,587
Sezona 2019	-3,024 (0,207)	$< 2 \times 10^{-16}$
Sezona 2020	-2,816 (0,199)	$< 2 \times 10^{-16}$
Vrijeme T2: Skupina Bakterijska pneumonija	0,538 (0,100)	$1,38 \times 10^{-7}$
Vrijeme T3: Skupina Bakterijska pneumonija	0,290 (0,107)	<b>0,007</b>
Vrijeme T2: Skupina Kontrolna skupina	0,217 (0,107)	<b>0,044</b>
Vrijeme T3: Skupina Kontrolna skupina	-0,257 (0,137)	0,061

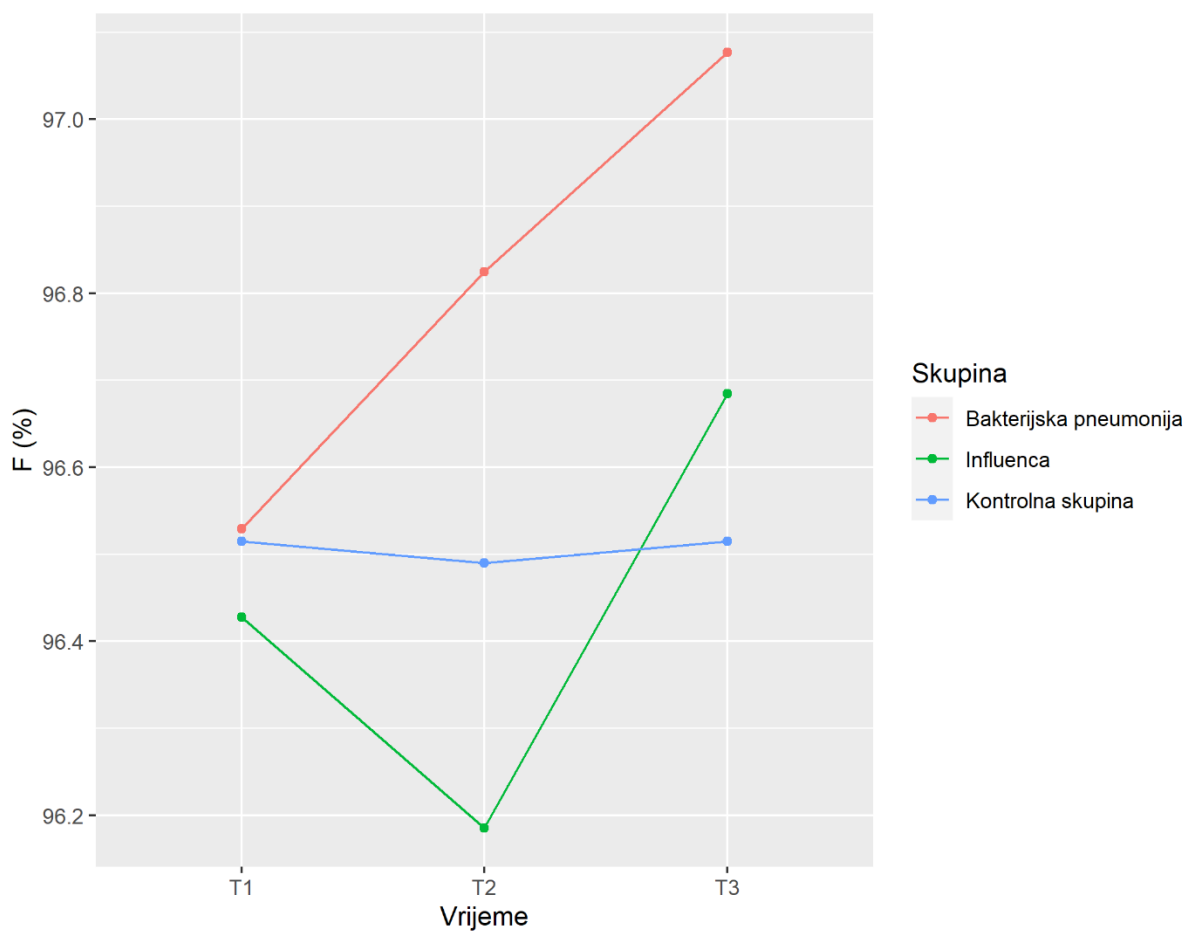
$\beta$ , procjena regresijskog parametra; SE, standardna pogreška. Odsječak na osi y predstavlja prosječnu vrijednost udjela F za referentne vrijednosti kategorijskih prediktora: skupinu influence (referentna), vrijeme T1 (referentno), muški spol (referentno) i sezonu 2018 (referentna).

Vrijeme i skupina predstavljaju fiksne efekte (engl. fixed effect), dok su ispitanici uključeni u model kao nasumični efekt (engl. random effect). Spol, dob i sezona uzorkovanja dodani su u model kao kovarijate kako bi se kontroliralo na njihov utjecaj.

Ovakav smjer kretanja u skladu je s rezultatima linearnih mješovitih modela unutar svake pojedine skupine, navedenih u poglavlju 5.3.1.

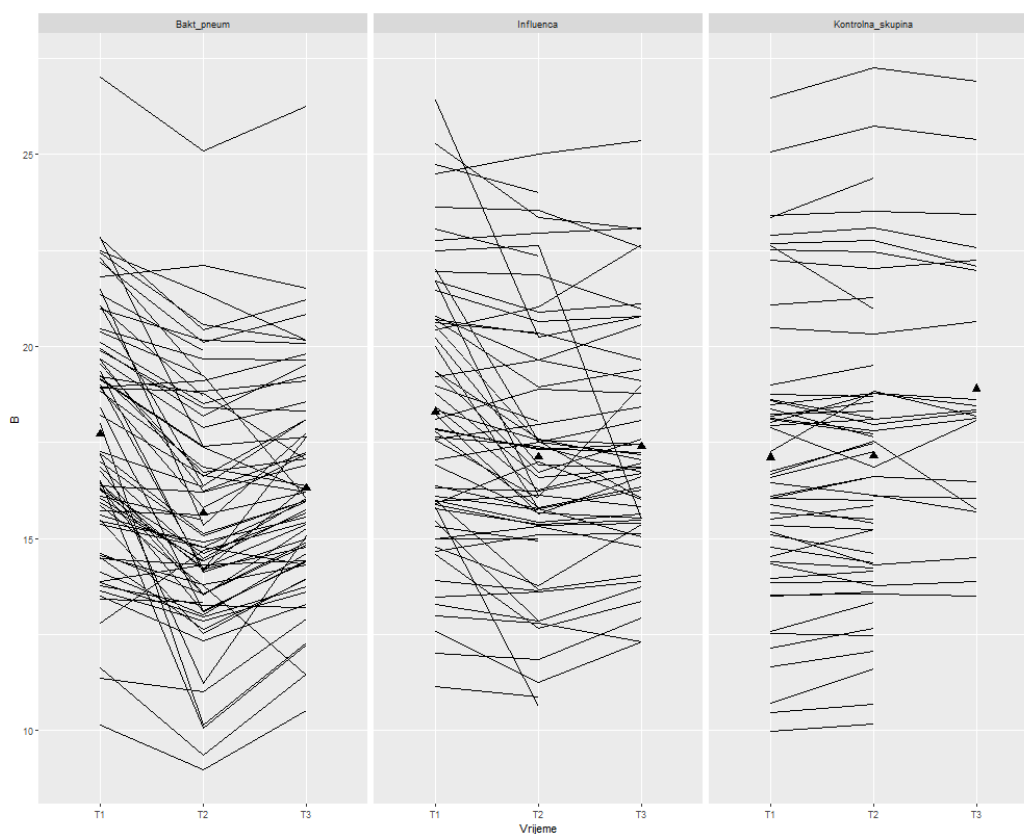
Kako bismo formalno testirali razlike u kretanju udjela F između ispitivanih skupina, u linearni mješoviti model smo uključili interakciju vremena i skupine. Interakcija između vremena uzorkovanja i skupine pokazala se statistički značajnom ( $p = 9,84 \times 10^{-8}$ , Tablica 27). Pripadnost određenoj skupini imala je značajan utjecaj na kretanje udjela F kod ispitanika. Skupina bakterijske pneumonije imala je najveće promjene u udjelu F između triju vremenskih točaka.

Iz koeficijenata linearnog mješovitog modela (Tablica 28, Tablica 29) i Slike 16 možemo zaključiti da je promjena u udjelu F između vremena T1 i T2 bila značajno različita u skupini influence u odnosu na skupinu bakterijske pneumonije ( $p = 1,38 \times 10^{-7}$ ). Također, promjena u udjelu F između vremena T1 i T3 bila je značajno različita u skupini influence u odnosu na skupinu bakterijske pneumonije ( $p = 0,007$ ). Kontrolna skupina je imala statistički značajno manje promjene u razini F između vremena T1 i T2 te vremena T1 i T3 u odnosu i na skupinu bakterijske pneumonije i na skupinu influence (Tablica 28, Tablica 29). Visoka značajnost razlike u promjeni udjela F iz vremena T1 u T2 između skupine bakterijske pneumonije i influence ima potencijalan dijagnostički značaj. Kod bakterijske pneumonije je primjetan rast udjela F između točke T1 i T2, dok je u isto vrijeme kod influence primjetan pad udjela F (Tablica 28, Tablica 29, Slika 16). Ova značajna razlika u smjeru kretanja, koja je ujedno kontrolirana na utjecaj dobi i spola, potencijalno može služiti kao dijagnostički kriterij kod određivanja vrste bolesti.



**Slika 16.** Interakcijski graf prilagođenih prosjeka udjela fukožiliranih N-glikana imunoglobulina G (F) dobivenih na temelju linearnog mješovitog modela. T1 – pri prijemu, T2 – sedmi, T3 – dvadeset i osmi dan od prijema u bolnicu.

Na Slici 17, mogu se vidjeti individualne promjene u udjelu N-glikana s račvajućim N-acetilglukozaminom (B) imunoglobulina G za svakog ispitanika unutar skupine bakterijske pneumonije, influence i kontrolne skupine.



**Slika 17.** Promjene u udjelu N-glikana imunoglobulina G s račvajućim N-acetilglukozaminom (B) kroz tri vremenske točke (mjerjenja) u skupini bakterijske pneumonije, influence i u kontrolnoj skupini. Linije povezuju vrijednosti udjela B za svakog pojedinačnog ispitanika kroz tri vremenske točke. Ispunjeni trokuti označavaju srednje vrijednosti udjela B pri prijemu (T1), sedmi dan (T2) te dvadeset i osmi dan (T3) od prijema u bolnicu u sve tri ispitivane skupine.

Rezultati linearnog mješovitog modela za B pokazali su kako je glavni efekt skupine granično statistički značajan ( $p = 0,048$ , Tablica 30), što bi značilo da su se početna mjerenja B za pojedine skupine u vremenu T1 značajno razlikovala. Skupina influence imala je najviše udjele B, dok je skupina bakterijske pneumonije imala najniže udjele B u vremenu T1 (Slika 18).

**Tablica 30.** Tablica analize varijance vrste III za prediktore iz linearnog mješovitog modela za N-glikane s račvajućim N-acetilglukozaminom (B) imunoglobulina G koristeći Satterthwaiteovu metodu

	Suma kvadrata	Srednji kvadrati	Stupnjevi slobode	F-statistika	p-vrijednost
<b>Vrijeme</b>	96,628	48,314	2	50,157	$< 2,2 \times 10^{-16}$
<b>Skupina</b>	5,950	2,975	2	3,089	<b>0,048</b>
<b>Spol</b>	2,122	2,122	1	12,03	<b>0,139</b>
<b>Godine</b>	48,714	48,714	1	50,572	$2,36 \times 10^{-11}$
<b>Sezona</b>	8,963	4,482	2	4,652	<b>0,011</b>
<b>Vrijeme:Skupina</b>	68,408	17,102	4	17,754	$3,60 \times 10^{-13}$

Satterthwaiteova metoda aproksimira broj stupnjeva slobode.

Unutar skupine bakterijske pneumonije, pokazan je statistički značajan pad u udjelu B u drugom ( $\beta_{T2} = -1,983$ ,  $p = < 2 \times 10^{-16}$ ) i trećem mjerenju ( $\beta_{T3} = -1,231$ ,  $p = 6,94 \times 10^{-12}$ ) u odnosu na prvo mjerenje (Tablica 31).

**Tablica 31.** Rezultati mješovitog linearnog modela (engl. linear mixed model) kojim se ispitala razlika u udjelu N-glikana s računajućim N-acetilglukozaminom (B) imunoglobulina G između različitih skupina i vremena uzorkovanja te interakcija vremena i skupine

	Zavisna varijabla: B ( $\beta$ , SE)	p-vrijednost
Odsječak na osi y	11,677 (0,784)	$< 2 \times 10^{-16}$
Vrijeme T2	-1,983 (0,164)	$< 2 \times 10^{-16}$
Vrijeme T3	-1,231 (0,173)	<b>6,94 x 10<sup>-12</sup></b>
Skupina Influenca	0,583 (0,506)	0,250
Skupina Kontrolna skupina	0,129 (0,603)	0,831
Spol: Ženski	0,672 (0,452)	0,139
Godine	0,084 (0,012)	<b>2,36 x 10<sup>-11</sup></b>
Sezona 2019	1,587 (0,552)	<b>0,004</b>
Sezona 2020	1,190 (0,531)	<b>0,026</b>
Vrijeme T2: Skupina Influenca	0,892 (0,241)	<b>0,0003</b>
Vrijeme T3: Skupina Influenca	0,170 (0,258)	0,509
Vrijeme T2: Skupina Kontrolna skupina	2,074 (0,251)	<b>3,87 x 10<sup>-15</sup></b>
Vrijeme T3: Skupina Kontrolna skupina	1,219 (0,320)	<b>0,0002</b>

$\beta$ , procjena regresijskog parametra; SE, standardna pogreška. Odsječak na osi y predstavlja prosječnu vrijednost udjela B za referentne vrijednosti kategorijskih prediktora: skupinu bakterijske pneumonije (referentna), vrijeme T1 (referentno), muški spol (referentno) i sezonu 2018 (referentna).

Vrijeme i skupina predstavljaju fiksne efekte (engl. fixed effect), dok su ispitivani uključeni u model kao nasumični efekt (engl. random effect). Spol, dob i sezona uzorkovanja dodani su u model kao kovarijate kako bi se kontroliralo na njihov utjecaj.

Kod influence, udio B bio je također statistički značajno niži u drugom ( $\beta_{T2} = -1,091$ ,  $p = 1,84 \times 10^{-9}$ ) i u trećem mjerenju ( $\beta_{T3} = -1,061$ ,  $p = 5,97 \times 10^{-8}$ ) u odnosu na prvo mjerenje (Tablica 32).



**Tablica 32.** Rezultati mješovitog linearnog modela (engl. linear mixed model) kojim se ispitala razlika u udjelu N-glikana s računjućim N-acetilglukozaminom (B) imunoglobulina G između različitih skupina i vremena uzorkovanja te interakcija vremena i skupine

	Zavisna varijabla: B ( $\beta$ , SE)	p-vrijednost
Odsječak na osi y	12,260 (0,796)	$< 2 \times 10^{-16}$
Vrijeme T2	-1,091 (0,176)	$1,84 \times 10^{-9}$
Vrijeme T3	-1,061 (0,191)	$5,97 \times 10^{-8}$
Skupina Bakterijska pneumonija	-0,583 (0,506)	0,250
Skupina Kontrolna skupina	-0,453 (0,655)	0,490
Spol: Ženski	0,672 (0,452)	0,139
Godine	0,084 (0,012)	$2,36 \times 10^{-11}$
Sezona 2019	1,587 (0,552)	<b>0,004</b>
Sezona 2020	1,190 (0,531)	<b>0,026</b>
Vrijeme T2: Skupina Bakterijska pneumonija	-0,892 (0,241)	<b>0,0003</b>
Vrijeme T3: Skupina Bakterijska pneumonija	-0,170 (0,258)	0,509
Vrijeme T2: Skupina Kontrolna skupina	1,182 (0,259)	$7,14 \times 10^{-6}$
Vrijeme T3: Skupina Kontrolna skupina	1,049 (0,330)	<b>0,002</b>

$\beta$ , procjena regresijskog parametra; SE, standardna pogreška. Odsječak na osi y predstavlja prosječnu vrijednost udjela B za referentne vrijednosti kategorijskih prediktora: skupinu influence (referentna), vrijeme T1 (referentno), muški spol (referentno) i sezonu 2018 (referentna).

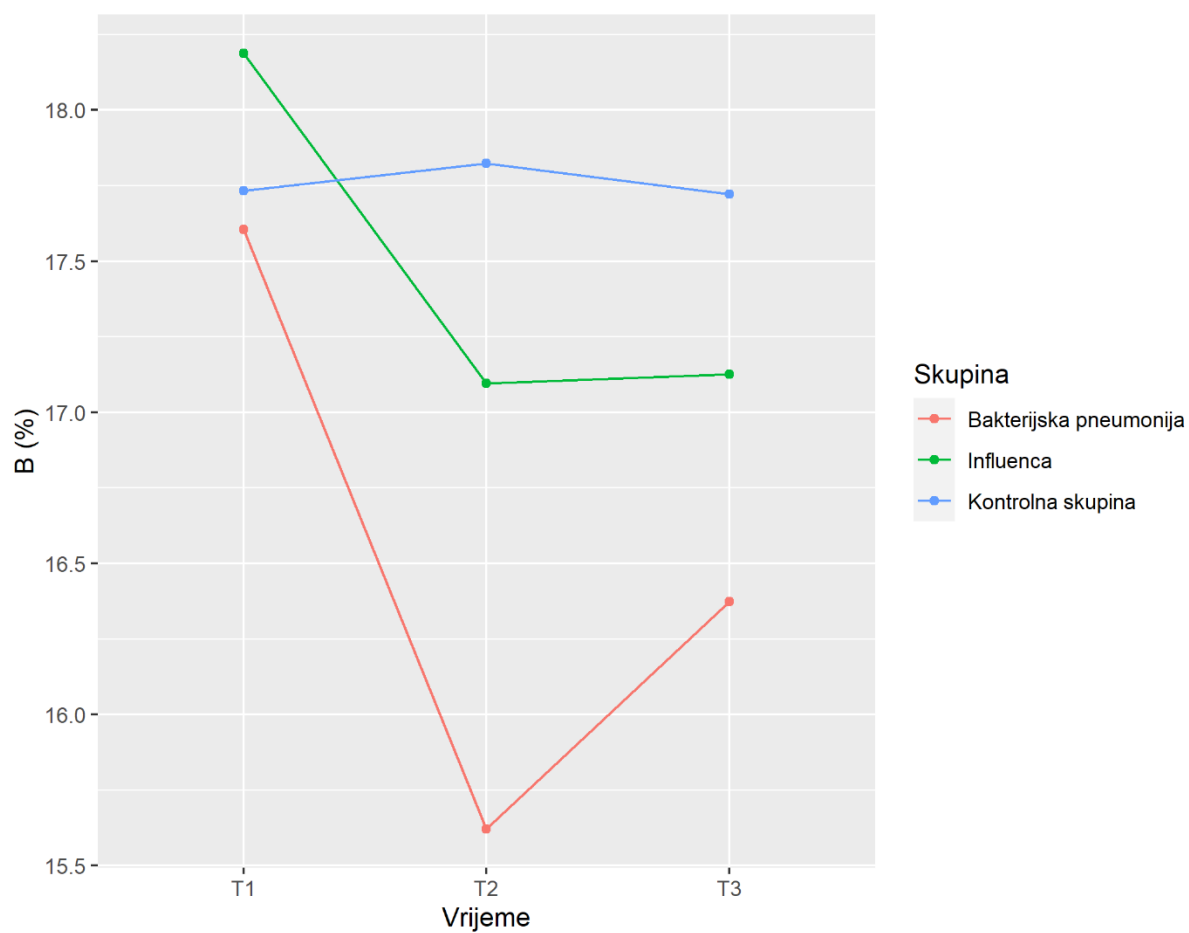
Vrijeme i skupina predstavljaju fiksne efekte (engl. fixed effect), dok su ispitanici uključeni u model kao nasumični efekt (engl. random effect). Spol, dob i sezona uzorkovanja dodani su u model kao kovarijate kako bi se kontroliralo na njihov utjecaj.

Istosmjerno kretanje udjela B između skupine bakterijske pneumonije i influence u skladu je s rezultatima linearnih mješovitih modela unutar svake pojedine skupine, navedenih u poglavlju 5.3.1.

Kako bismo formalno testirali razlike u kretanju udjela B između ispitivanih skupina, u linearni mješoviti model smo uključili interakciju vremena i skupine. Interakcija između vremena uzorkovanja i skupine pokazala se statistički značajnom ( $p = 3,60 \times 10^{-13}$ , Tablica 30). Pripadnost određenoj skupini imala je značajan utjecaj na kretanje udjela B kod ispitanika.

Iz koeficijenata linearnog mješovitog modela (Tablica 31, Tablica 32) i Slike 18 možemo zaključiti da je promjena u udjelu B između vremena T1 i T2 bila značajno manja u skupini influence u odnosu na skupinu bakterijske pneumonije ( $p = 0,0003$ ), dok između vremena T1 i T3 ta razlika nije bila statistički značajna. Kontrolna skupina je imala statistički značajno manje promjene u udjelu B između vremena T1 i T2 i vremena T1 i T3 u odnosu i na skupinu bakterijske pneumonije i na skupinu influence (Tablica 31, Tablica 32). Iako je apsolutna vrijednost razlike u promjeni udjela B iz vremena T1 u T2 između skupine bakterijske pneumonije i influence značajna ( $p = 0,0003$ , Tablica 31, Tablica 32), u obje skupine promjena udjela B ima isti smjer kretanja. No dok je kod bakterijske pneumonije primjetan znatan pad

udjela B između točke T1 i T2, u isto vrijeme je kod influence također primjetan pad udjela B ali manjeg intenziteta (Slika 18).



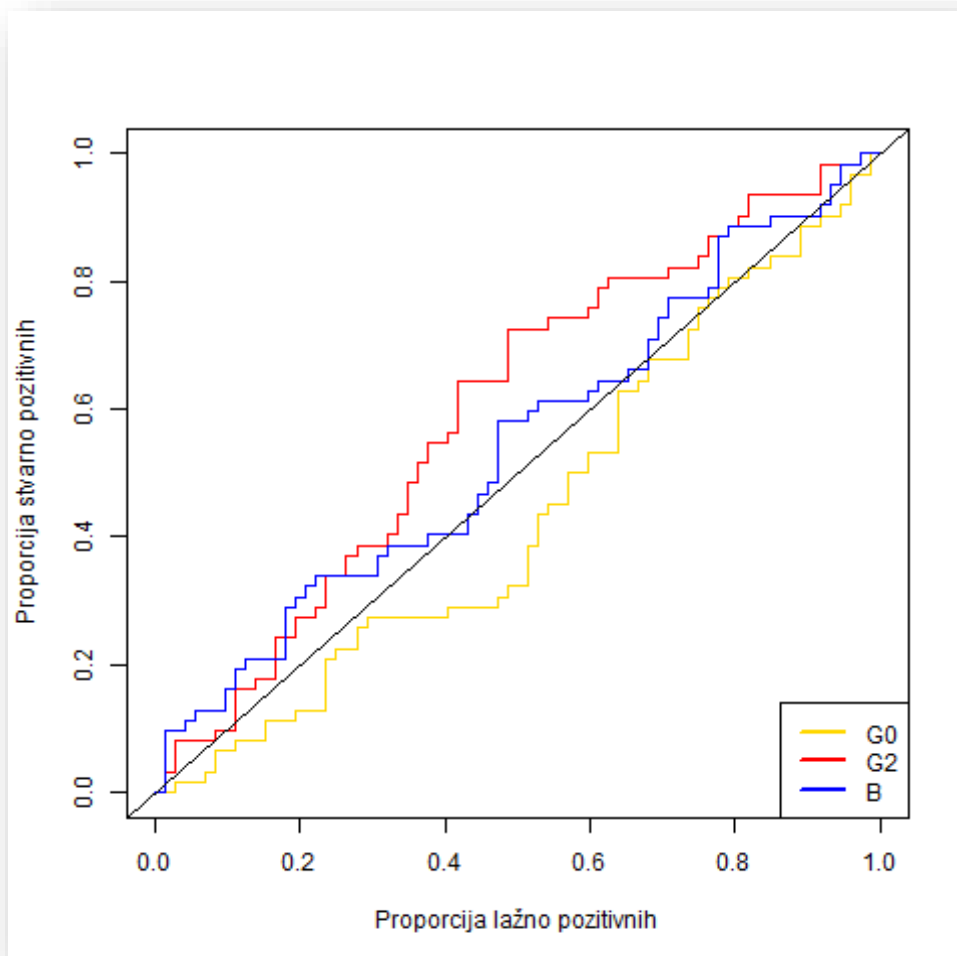
**Slika 18.** Interakcijski graf prilagođenih prosjeka udjela N-glikana s računjućim N-acetilglukozaminom (B) imunoglobulina G dobivenih na temelju linearnog mješovitog modela. T1 – pri prijemu, T2 – sedmi, T3 – dvadeset i osmi dan od prijema u bolnicu.

### **5.3.3. Procjena dijagnostičkog potencijala glikozilacijskog profila imunoglobulina G u razlikovanju virusne (influenca) od bakterijske (bakterijska pneumonija) infekcije**

Kako bismo procijenili dijagnostički potencijal glikozilacijskog profila imunoglobulina G u razlikovanju virusne (influenca) od bakterijske (bakterijska pneumonija) infekcije, proveli smo ROC analizu. ROC analizom ispitali smo valjanost dijagnostičkog testa kojeg smo konstruirali na dva načina:

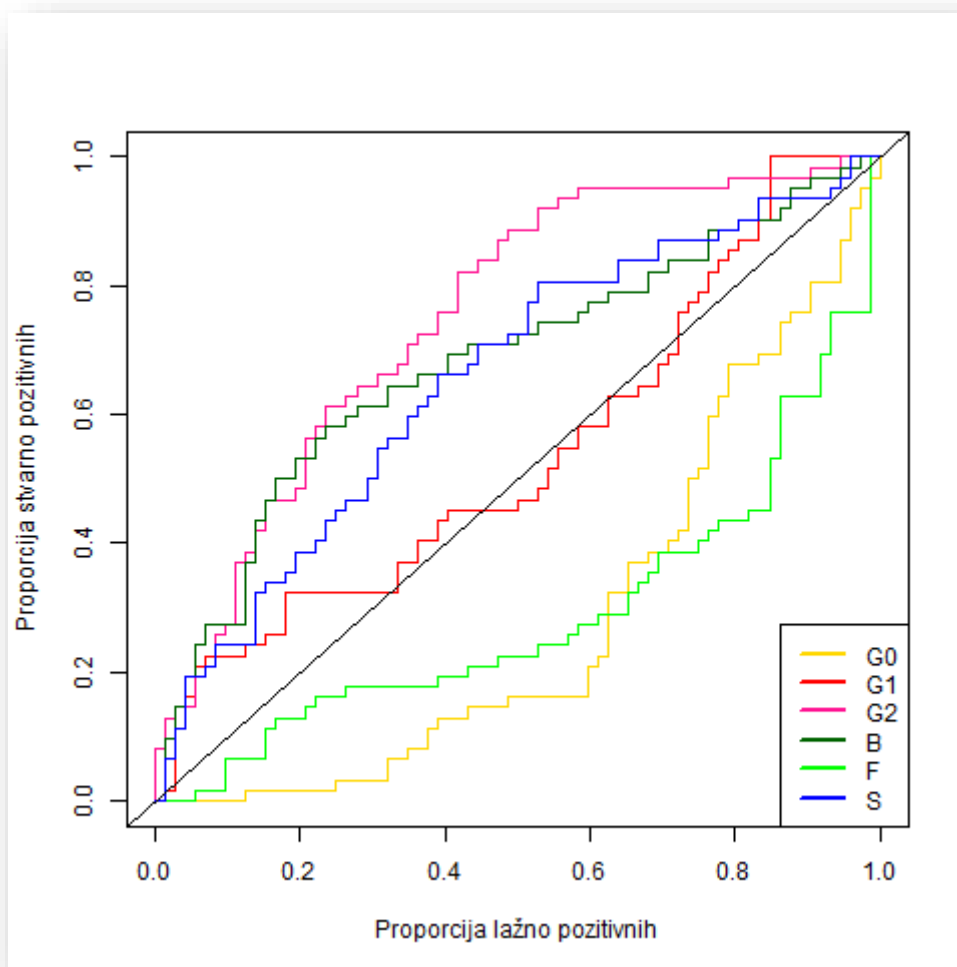
- 1.) za dijagnostičke biomarkere izabrani su glikozilacijski parametri koji su se statistički značajno razlikovali u prvom mjerenju (T1) između bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom.
- 2.) za dijagnostičke biomarkere izabrani su glikozilacijski parametri čije se kretanje od prvog do drugog mjerenja (T1 – T2) statistički značajno razlikovalo između bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom.

Na Slici 19, može se vidjeti usporedni prikaz ROC krivulja triju dijagnostičkih testova utemeljenih na prvom mjerenju (T1) za G0, G1 i B. Površina ispod ROC krivulje (engl. *area under ROC curve*, AUC) iznosila je 44,29% za G0, 59,81% za G2 te 54,39% za B. Dijagnostički test za razlikovanje virusne od bakterijske infekcije temeljen na prvom mjerenju (T1) G2 pokazao se kao najtočniji.



**Slika 19.** Usporedni prikaz ROC krivulja dijagnostičkih testova utemeljenih na prvom mjeranju (T1) za agalaktozilirane (G0), digalaktozilirane N-glikane (G2) i N-glikane s računajućim N-acetilglukozaminom (B) imunoglobulina G. Crna dijagonalna linija predstavlja dijagnostički test s točnošću od 50% (nasumično klasificiranje). Prikazane ROC krivulje opisuju promjene u osjetljivosti i specifičnosti za navedene dijagnostičke testove s kontinuiranim biomarkerima (mjerenjima).

Slika 20, predstavlja usporedni prikaz ROC krivulja šest dijagnostičkih testova utemeljenih na razlici između drugog i prvog mjeranja G0, G1, G2, B, F i S N-glikana. AUC je iznosila 44,29% za G0, 59,81% za G2 te 54,39% za B.



**Slika 20.** Usporedni prikaz ROC krivulja dijagnostičkih testova za agalaktozilirane (G0), monogalaktozilirane (G1), digalaktozilirane N-glikane (G2), N-glikane s račvajućim N-acetilglukozaminom (B), fukozilirane (F) i sijalinizirane (S) N-glikane imunoglobulina G. Crna dijagonalna linija predstavlja dijagnostički test s točnošću od 50% (nasumično klasificiranje). Prikazane ROC krivulje opisuju promjene u osjetljivosti i specifičnosti za navedene dijagnostičke testove s kontinuiranim biomarkerima (mjerenjima).

Najveću dijagnostičku točnost ( $AUC = 75\%$ ) u razlikovanju virusne (influenca) od bakterijske (bakterijska pneumonija) infekcije postigao je dijagnostički test s biomarkerom definiranim kao razlikom između drugog i prvog mjerenja ( $T_2 - T_1$ ) za G2. Slijedi ga dijagnostički test s biomarkerom definiranim kao razlikom između drugog i prvog mjerenja ( $T_2 - T_1$ ) za B. Ostali izvedeni parametri glikozilacije nisu postigli zadovoljavajuću razinu dijagnostičke točnosti (Tablica 33).

**Tablica 33.** Točnost dijagnostičkih testova za razlikovanje virusne od bakterijske infekcije upotrebom izabranih glikozilacijskih parametara

Biomarker	Dijagnostički test	
	AUC (%)	Kategorija točnosti testa
<b>Prvo mjerenje (T1):</b>		
G0	44,29	Beskoristan
G2	59,81	Nedostatan
B	54,39	Nedostatan
<b>Razlika između drugog i prvog mjerenja (T2 - T1):</b>		
G0	28,38	Beskoristan
G1	54,08	Nedostatan
G2	75	<b>Dobar</b>
B	68,03	<b>Granično dobar</b>
F	29,05	Beskoristan
S	29,05	Beskorisno

AUC, površina ispod ROC krivulje, engl. *area under ROC curve*.

### 5.3.4. Rezultati analize N-glikana imunoglobulina G unutar skupine bolesnika s influencom prema težini bolesti pri prijemu

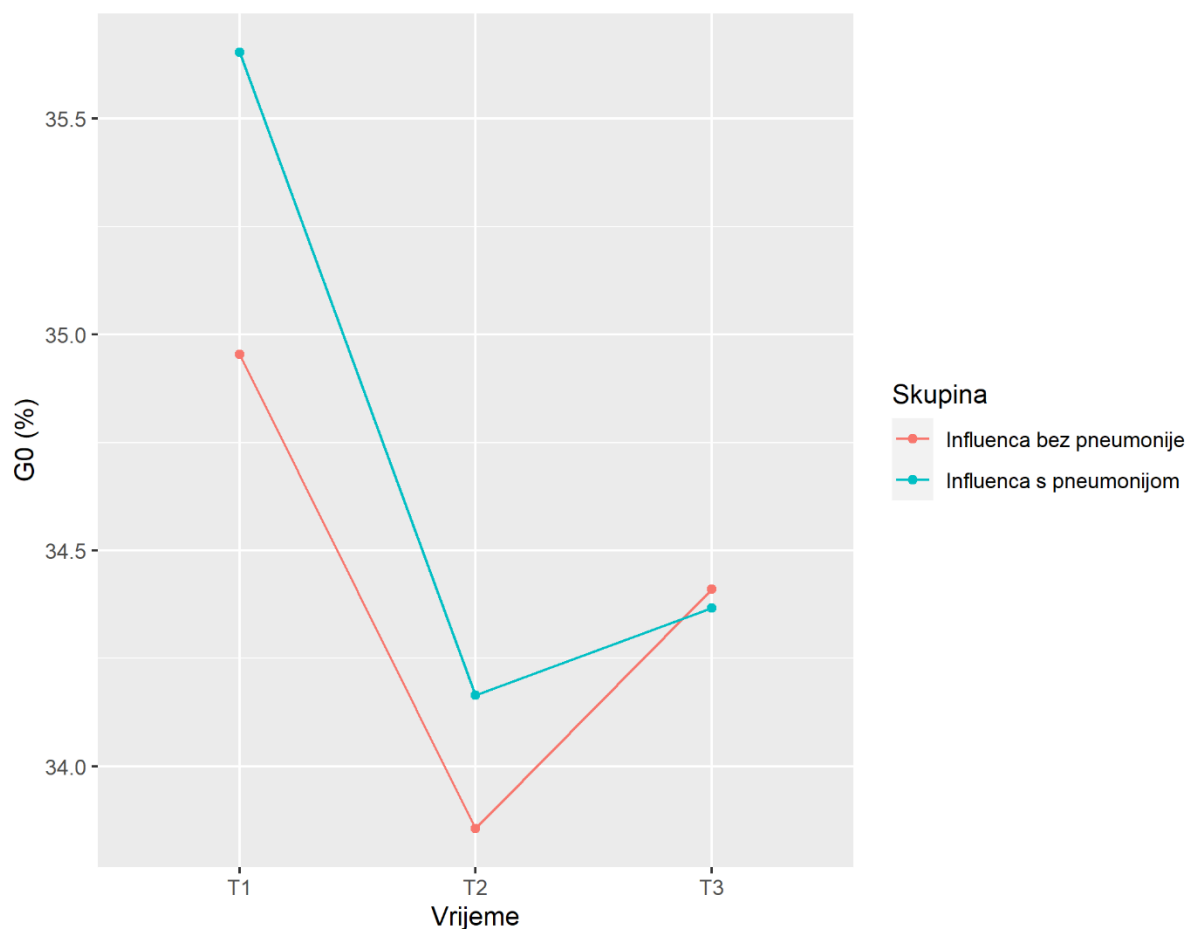
Rezultati linearnog mješovitog modela za agalaktozilirane N-glikane imunoglobulina G (G0) pokazali su kako glavni efekt skupine nije statistički značajan ( $p = 0,820$ , Tablica 34), što bi značilo da se početni udjeli G0 za pojedine skupine po težini u vremenu T1 nisu značajno razlikovali.

**Tablica 34.** Tablica analize varijance vrste III za prediktore iz linearnog mješovitog modela za agalaktozilirane N-glikane (G0) imunoglobulina G koristeći Satterthwaiteovu metodu

	Suma kvadrata	Srednji kvadrati	Stupnjevi slobode	F-statistika	p-vrijednost
Vrijeme	43,52	21,76	2	2,570	0,082
Skupina po težini	0,44	0,44	1	0,052	0,820
Spol	34,23	34,23	1	4,043	<b>0,046</b>
Godine	405,06	405,06	1	47,846	<b>4,05 x 10<sup>-10</sup></b>
Sezona	113,46	56,73	2	6,701	<b>0,002</b>
Vrijeme:Skupina po težini	3,07	1,54	2	0,182	0,834

Satterthwaiteova metoda aproksimira broj stupnjeva slobode.

Kako bismo formalno testirali razlike u kretanju udjela G0 između ispitivanih skupina, u linearni mješoviti model uključili smo interakciju vremena i skupine po težini. Interakcija između vremena uzorkovanja i težine bolesti nije se pokazala statistički značajnom ( $p = 0,834$ , Tablica 34, Slika 21). Težina bolesti nije imala značajan utjecaj na kretanje udjela G0 kod ispitanika.



**Slika 21.** Interakcijski graf prilagođenih prosjeka udjela agalaktoziliranih N-glikana imunoglobulina G (G0) dobivenih na temelju linearnog mješovitog modela. T1 – pri prijemu, T2 – sedmi, T3 – dvadeset i osmi dan od prijema u bolnicu.

Rezultati linearnog mješovitog modela za monogalaktozilirane N-glikane imunoglobulina G (G1) pokazali su kako glavni efekt skupine nije statistički značajan ( $p = 0,809$ , Tablica 35), što bi značilo da su se početni udjeli G1 za pojedine skupine po težini bolesti u vremenu T1 nisu značajno razlikovali.

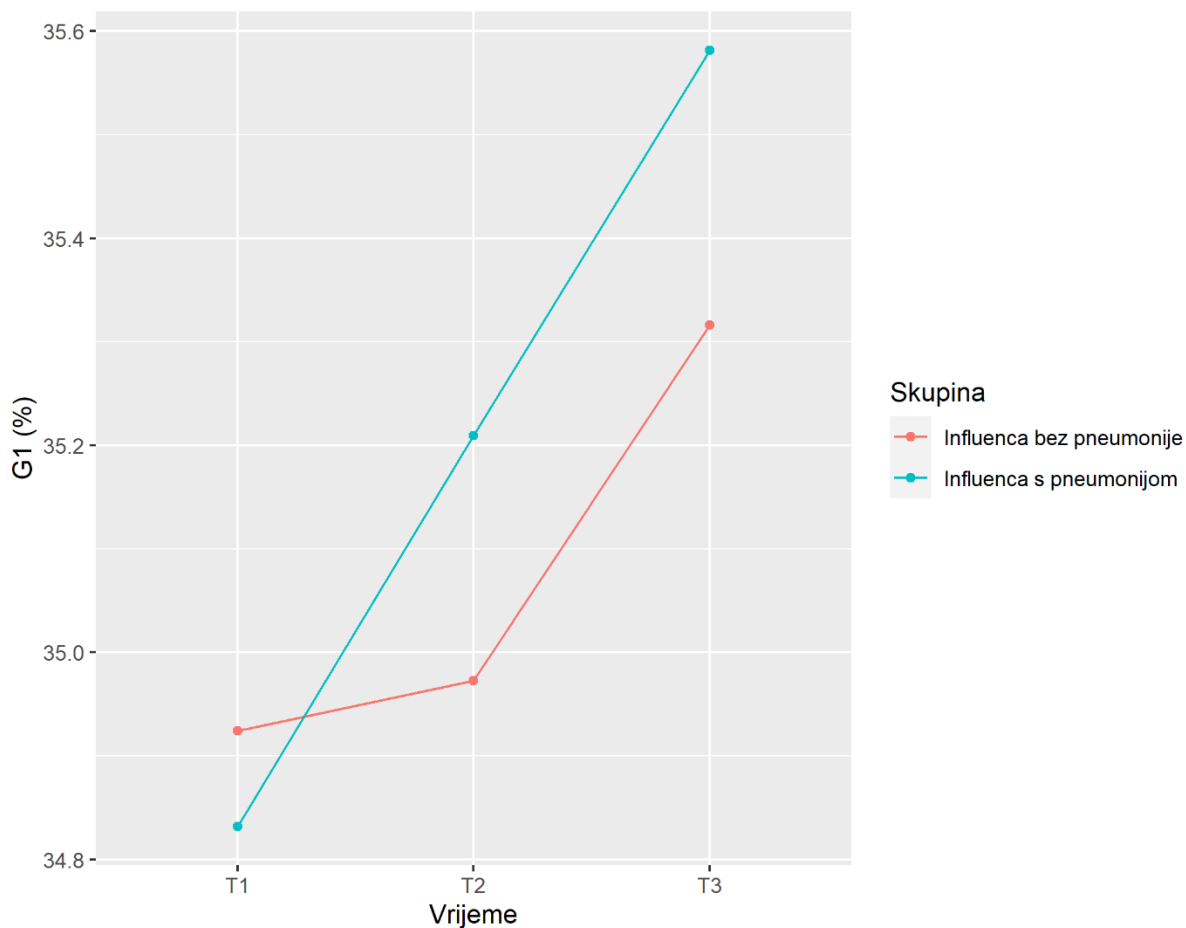
**Tablica 35.** Tablica analize varijance vrste III za prediktore iz linearnog mješovitog modela za monogalaktozilirane N-glikane imunoglobulina G (G1) koristeći Satterthwaiteovu metodu

	Suma kvadrata	Srednji kvadrati	Stupnjevi slobode	F-statistika	p-vrijednost
<b>Vrijeme</b>	7,22	3,61	2	2,771	0,067
<b>Skupina po težini</b>	0,08	0,08	1	0,059	0,809
<b>Spol</b>	17,85	17,85	1	13,711	$3 \times 10^{-4}$
<b>Godine</b>	22,72	22,72	1	17,444	$6,06 \times 10^{-5}$
<b>Sezona</b>	170,74	85,37	2	65,557	$< 2,2 \times 10^{-16}$
<b>Vrijeme:Skupina po težini</b>	0,94	0,47	2	0,360	0,699

Satterthwaiteova metoda aproksimira broj stupnjeva slobode.



Kako bismo formalno testirali razlike u kretanju udjela G1 između ispitivanih skupina, u linearni mješoviti model uključili smo interakciju vremena i skupine po težini. Interakcija između vremena uzorkovanja i težine bolesti nije se pokazala statistički značajnom ( $p = 0,699$ , Tablica 35, Slika 22). Težina bolesti nije imala značajan utjecaj na kretanje udjela G1 kod ispitanika.



**Slika 22.** Interakcijski graf prilagođenih prosjeka udjela monogalaktoziliranih N-glikana imunoglobulina G (G1) dobivenih na temelju linearnog mješovitog modela. T1 – pri prijemu, T2 – sedmi, T3 – dvadeset i osmi dan od prijema u bolnicu.

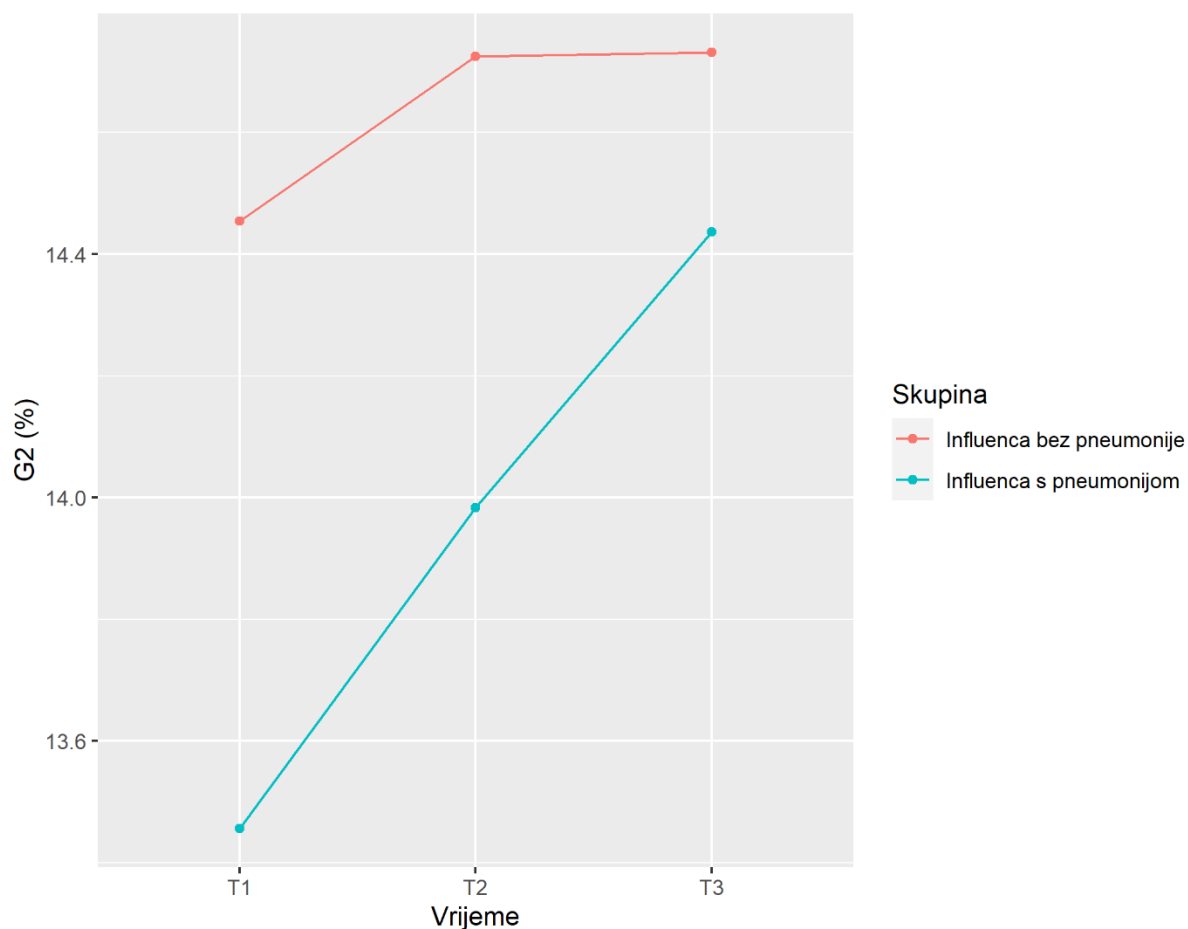
Rezultati linearnog mješovitog modela za digalaktozilirane N-glikane imunoglobulina G (G2) pokazali su kako je glavni efekt skupine nije statistički značajan ( $p = 0,347$ , Tablica 36), što bi značilo da su se početni udjeli G2 za pojedine skupine po težini u vremenu T1 nisu značajno razlikovali.

**Tablica 36.** Tablica analize varijance vrste III za prediktore iz linearnog mješovitog modela za digalaktozilirane N-glikane imunoglobulin G (G2) koristeći Satterthwaiteovu metodu

	Suma kvadrata	Srednji kvadrati	Stupnjevi slobode	F-statistika	p-vrijednost
Vrijeme	9,22	4,61	2	1,545	0,218
Skupina po težini	2,67	2,67	1	0,894	0,347
Spol	0,28	0,28	1	0,095	0,758
Godine	120,50	120,50	1	40,390	<b>8,6 x 10<sup>-9</sup></b>
Sezona	23,46	11,73	2	3,932	<b>0,022</b>
Vrijeme:Skupina po težini	2,76	1,38	2	0,462	0,631

Satterthwaiteova metoda aproksimira broj stupnjeva slobode.

Kako bismo formalno testirali razlike u kretanju udjela G2 između ispitivanih skupina, u linearni mješoviti model uključili smo interakciju vremena i skupine po težini. Interakcija između vremena uzorkovanja i težine bolesti nije se pokazala statistički značajnom ( $p = 0,631$ , Tablica 36, Slika 23). Težina bolesti nije imala značajan utjecaj na kretanje udjela G2 kod ispitanika.



**Slika 23.** Interakcijski graf prilagođenih prosjeka udjela digalaktoziliranih N-glikana imunoglobulina G (G2) dobivenih na temelju linearnog mješovitog modela. T1 – pri prijemu, T2 – sedmi, T3 – dvadeset i osmi dan od prijema u bolnicu.

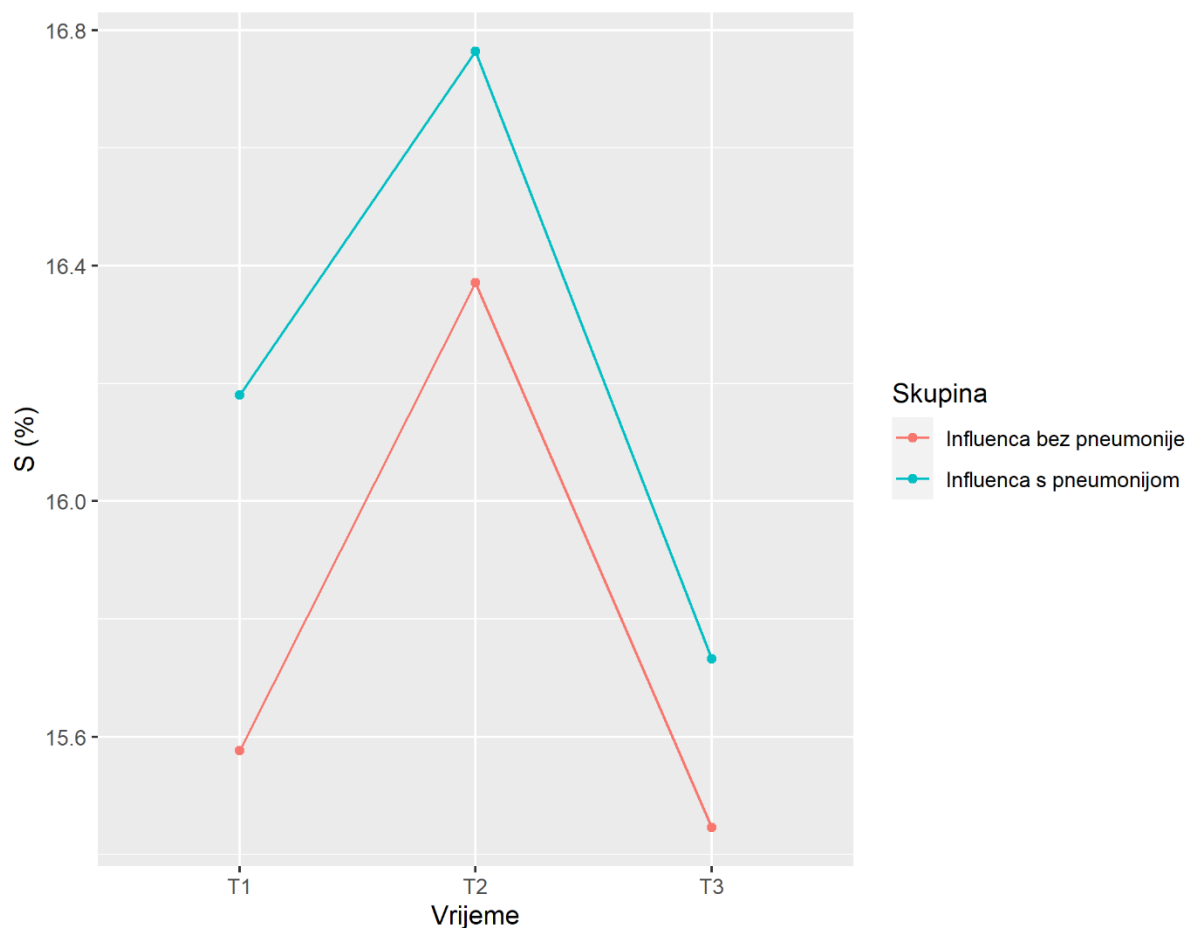
Rezultati linearnog mješovitog modela za sijalinizirane N-glikane imunoglobulina G (S) pokazali su kako glavni efekt skupine nije statistički značajan ( $p = 0,455$ , Tablica 37), što bi značilo da su se početni udjeli S za pojedine skupine po težini u vremenu T1 nisu značajno razlikovali.

**Tablica 37.** Tablica analize varijance vrste III za prediktore iz linearnog mješovitog modela za sijalinizirane N-glikane imunoglobulina G (S) koristeći Satterthwaiteovu metodu

	Suma kvadrata	Srednji kvadrati	Stupnjevi slobode	F-statistika	p-vrijednost
<b>Vrijeme</b>	23,04	11,52	2	8,145	<b><math>5,2 \times 10^{-4}</math></b>
<b>Skupina po težini</b>	0,79	0,80	1	0,561	0,455
<b>Spol</b>	0,01	0,01	1	0,004	0,949
<b>Godine</b>	28,90	28,90	1	20,431	<b><math>1,64 \times 10^{-5}</math></b>
<b>Sezona</b>	387,91	193,95	2	137,123	<b><math>&lt; 2,2 \times 10^{-16}</math></b>
<b>Vrijeme:Skupina po težini</b>	0,59	0,30	2	0,210	0,811

Satterthwaiteova metoda aproksimira broj stupnjeva slobode.

Kako bismo formalno testirali razlike u kretanju udjela S između ispitivanih skupina, u linearni mješoviti model uključili smo interakciju vremena i skupine po težini. Interakcija između vremena uzorkovanja i težine bolesti nije se pokazala statistički značajnom ( $p = 0,811$ , Tablica 37, Slika 24). Težina bolesti nije imala značajan utjecaj na kretanje udjela S kod ispitanika.



**Slika 24.** Interakcijski graf prilagođenih prosjeka udjela sijaliniziranih N-glikana imunoglobulina G (S) dobivenih na temelju linearnog mješovitog modela. T1 – pri prijemu, T2 – sedmi, T3 – dvadeset i osmi dan od prijema u bolnicu.

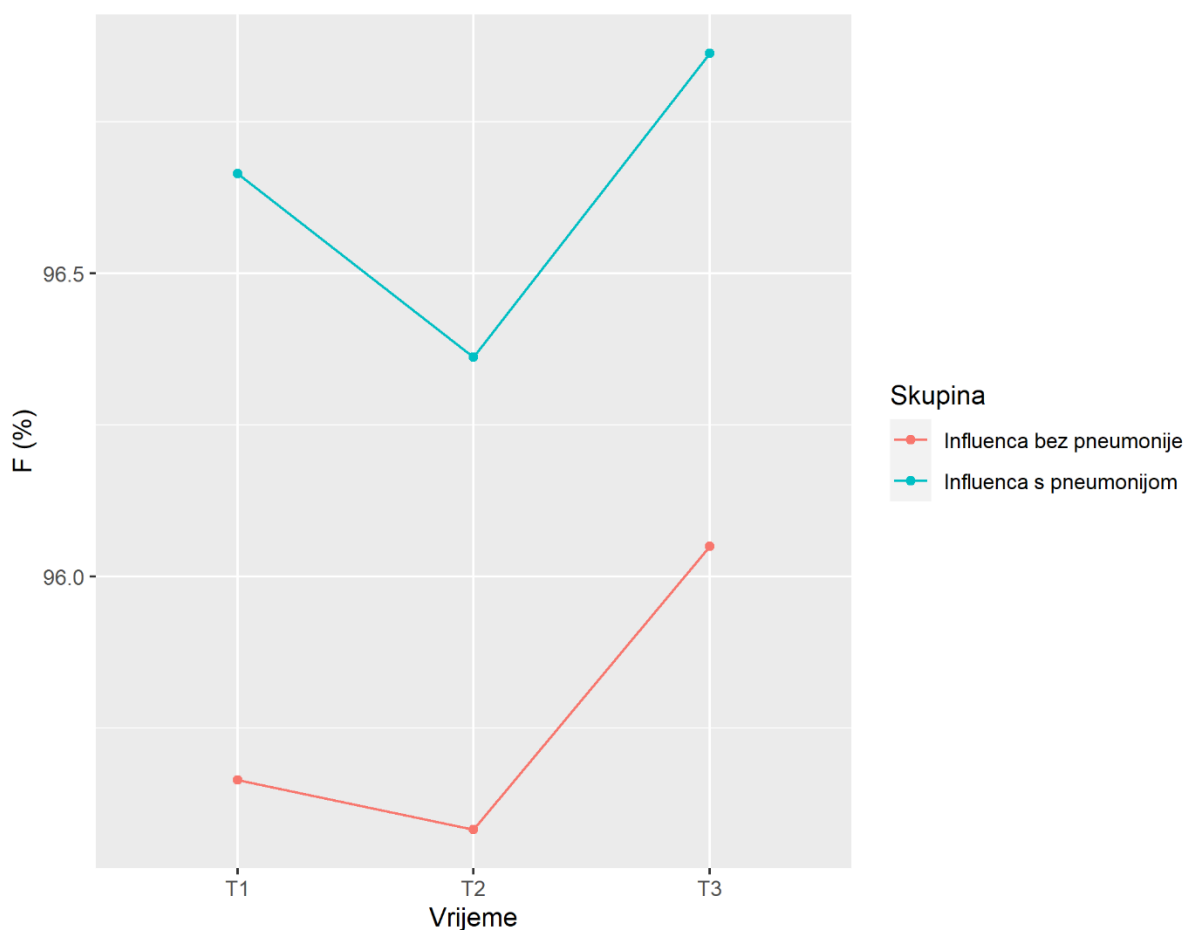
Rezultati linearnog mješovitog modela za fukozilirane N-glikane imunoglobulina G (F) pokazali su kako je glavni efekt skupine statistički značajan ( $p = 0,003$ , Tablica 38), što bi značilo da su se početni udjeli F za pojedine skupine po težini u vremenu T1 značajno razlikovali. Influenca bez pneumonije imala je niži udio F, dok je influenza s pneumonijom imala viši udio F u vremenu T1 (Slika 25).

**Tablica 38.** Tablica analize varijance vrste III za prediktore iz linearnog mješovitog modela za fukožilirane N-glikane imunoglobulina G (F) koristeći Satterthwaiteovu metodu

	Suma kvadrata	Srednji kvadrati	Stupnjevi slobode	F-statistika	p-vrijednost
Vrijeme	5,14	2,57	2	9,710	$1,4 \times 10^{-4}$
Skupina po težini	2,46	2,46	1	9,292	<b>0,003</b>
Spol	0,11	0,11	1	0,413	0,522
Godine	0,44	0,44	1	1,642	0,202
Sezona	55,79	27,89	2	105,382	$< 2,2 \times 10^{-16}$
Vrijeme:Skupina po težini	0,35	0,17	2	0,651	0,523

Satterthwaiteova metoda aproksimira broj stupnjeva slobode.

Kako bismo formalno testirali razlike u kretanju udjela F između ispitivanih skupina, u linearni mješoviti model uključili smo interakciju vremena i skupine po težini. Interakcija između vremena uzorkovanja i težine bolesti nije se pokazala statistički značajnom ( $p = 0,523$ , Tablica 38, Slika 25). Težina bolesti nije imala značajan utjecaj na kretanje udjela F kod ispitanika.



**Slika 25.** Interakcijski graf prilagođenih prosjeka udjela fukožiliranih N-glikana imunoglobulina G (F) dobivenih na temelju linearnog mješovitog modela. T1 – pri prijemu, T2 – sedmi, T3 – dvadeset i osmi dan od prijema u bolnicu.

Rezultati linearnog mješovitog modela za N-glikane imunoglobulina G s računjućim N-acetilglukozaminom (B) pokazali su kako glavni efekt skupine nije statistički značajan ( $p = 0,223$ , Tablica 39), što bi značilo da se početna mjerenja B za pojedine skupine po težini u vremenu T1 nisu značajno razlikovala.

**Tablica 39.** Tablica analize varijance vrste III za prediktore iz linearnog mješovitog modela za N-glikane s računjućim N-acetilglukozaminom (B) imunoglobulina G koristeći Satterthwaiteovu metodu

	Suma kvadrata	Srednji kvadrati	Stupnjevi slobode	F-statistika	p-vrijednost
<b>Vrijeme</b>	21,82	10,91	2	8,620	<b><math>3,4 \times 10^{-4}</math></b>
<b>Skupina po težini</b>	1,90	1,90	1	1,498	0,223
<b>Spol</b>	57,14	57,14	1	45,157	<b><math>3,35 \times 10^{-10}</math></b>
<b>Godine</b>	30,58	30,58	1	24,165	<b><math>2,44 \times 10^{-6}</math></b>
<b>Sezona</b>	1,28	0,64	2	0,507	0,603
<b>Vrijeme:Skupina po težini</b>	10,57	5,28	2	4,175	<b>0,018</b>

Satterthwaiteova metoda aproksimira broj stupnjeva slobode.

Kako bismo formalno testirali razlike u kretanju udjela B između ispitivanih skupina po težini bolesti, u linearni mješoviti model smo uključili interakciju vremena i skupine po težini. Interakcija između vremena uzorkovanja i težine pokazala se statistički značajnom ( $p = 0,018$ , Tablica 39). Težina bolesti imala je značajan utjecaj na kretanje udjela B kod ispitanika.

Iz koeficijenata linearnog mješovitog modela (Tablica 40) i Slike 26 možemo zaključiti da je promjena u udjelu B između vremena T1 i T2 ( $p = 0,007$ ) i vremena T1 i T3 ( $p = 0,042$ ) bila značajno veća u skupini influence s pneumonijom u odnosu na skupinu influence bez pneumonije.

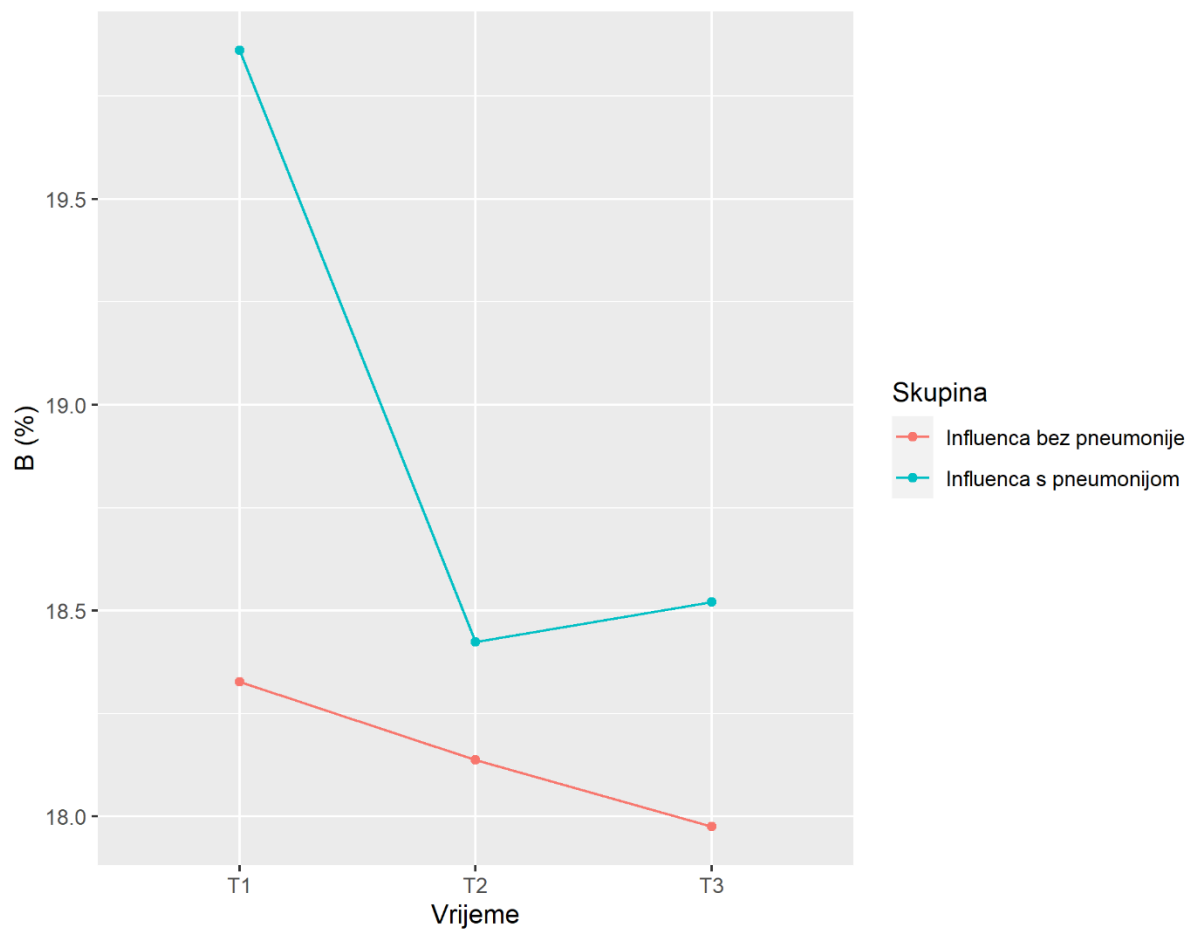
**Tablica 40.** Rezultati mješovitog linearnog modela (engl. linear mixed model) kojim se ispitala razlika u udjelu N-glikana s računjućim N-acetilglukozaminom (B) imunoglobulina G između različitih skupina bolesnika s influencom po težini bolesti pri prijemu i vremena uzorkovanja te interakcija vremena i skupine

	Zavisna varijabla: B ( $\beta$ , SE)	p-vrijednost
Odsječak na osi y	11,042 (1,371)	<b>3,23 x 10<sup>-13</sup></b>
Vrijeme T2	-0,190 (0,385)	0,623
Vrijeme T3	-0,351 (0,404)	0,386
Influenca s pneumonijom	1,534 (0,693)	<b>0,028</b>
Spol: Ženski	4,021 (0,598)	<b>3,35 x 10<sup>-10</sup></b>
Godine	0,100 (0,020)	<b>2,43 x 10<sup>-6</sup></b>
Sezona 2019	-0,511 (0,507)	0,315
Sezona 2020	-0,336 (0,895)	0,708
Vrijeme T2: Influenca s pneumonijom	-1,247 (0,452)	<b>0,007</b>
Vrijeme T3: Influenca s pneumonijom	-0,988 (0,480)	<b>0,042</b>

$\beta$ , procjena regresijskog parametra; SE, standardna pogreška.

Odsječak na osi y predstavlja prosječnu vrijednost razine B za referentne vrijednosti kategorijskih prediktora: skupinu influence bez pneumonije (referentna), vrijeme T1 (referentno), muški spol (referentno) i sezonu 2018 (referentna).

Vrijeme i skupina po težini predstavljaju fiksne efekte (engl. fixed effect), dok su ispitanici uključeni u model kao nasumični efekt (engl. random effect). Spol, dob i sezona uzorkovanja dodani su u model kao kovarijate kako bi se kontroliralo na njihov utjecaj.



**Slika 26.** Interakcijski graf prilagođenih prosjeka udjela N-glikana s račvajućim N-acetilglukozaminom imunoglobulina G (B) dobivenih na temelju linearnog mješovitog modela. T1 – pri prijemu, T2 – sedmi, T3 – dvadeset i osmi dan od prijema u bolnicu.

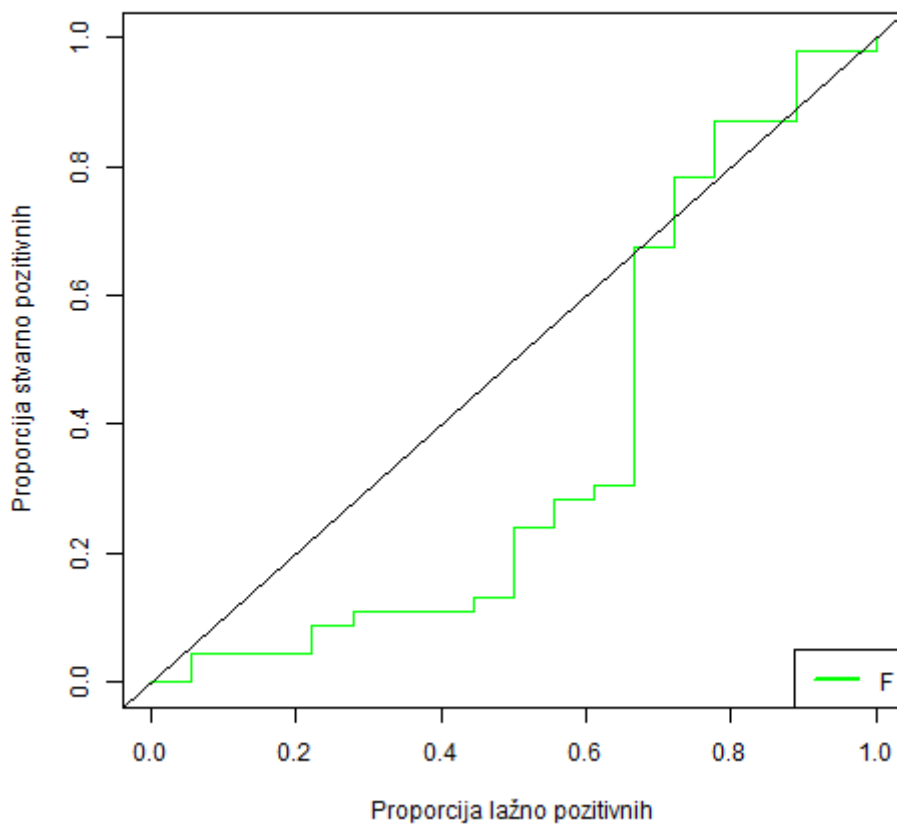


### **5.3.5. Procjena dijagnostičkog potencijala glikozilacijskog profila imunoglobulina G u razlikovanju stupnja težine bolesti u bolesnika s influencom pri prijemu**

Kako bismo procijenili dijagnostički potencijal glikozilacijskog profila imunoglobulina G u razlikovanju stupnja težine bolesti influence (influenca bez pneumonije i influenza s pneumonijom) proveli smo ROC analizu. ROC analizom ispitali smo valjanost dijagnostičkog testa kojeg smo konstruirali na dva načina:

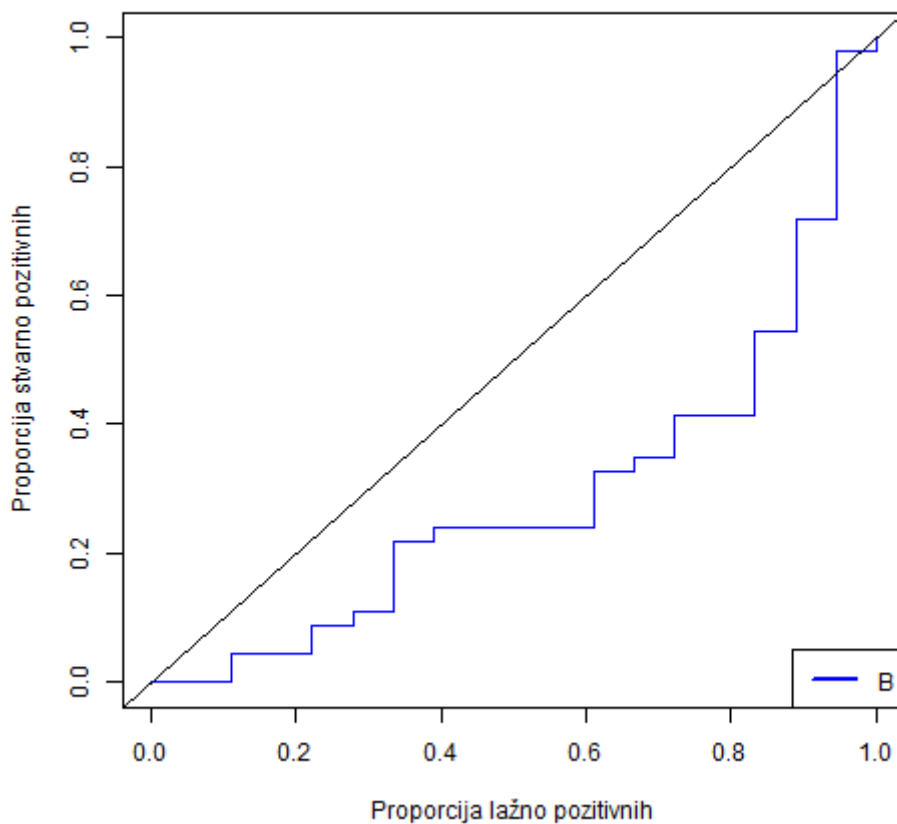
- 1.) za dijagnostičke biomarkere izabrali smo glikozilacijski parametar koji se statistički značajno razlikovao u prvom mjerenju (T1) između bolesnika s različitim stupnjem težine influence pri prijemu,
- 2.) za dijagnostički biomarker izabran je glikozilacijski parametar čije se kretanje od prvog do drugog mjerenja (T1 – T2) statistički značajno razlikovalo između bolesnika s različitim stupnjem težine influence pri prijemu.

Slika 27, predstavlja prikaz ROC krivulje dijagnostičkog test za razlikovanje blagog od teškog stupnja influence utemeljenog na prvom mjerenju (T1) za fukozilirane N-glikane imunoglobulina G (F). AUC je iznosila 36,96 % za F.



**Slika 27.** ROC krivulja za razlikovanje blage od teške influence za fukozilirane N-glikane imunoglobulina G (F). Crna dijagonalna linija predstavlja dijagnostički test s točnošću od 50% (nasumično klasificiranje). Prikazana ROC krivulja opisuje promjene u osjetljivosti i specifičnosti za navedeni dijagnostički test s kontinuiranim biomarkerom (mjeranjem).

Slika 28, predstavlja prikaz ROC krivulje dijagnostičkog testa za razlikovanje blagog od teškog stupnja influence utemeljenog na razlici drugog (T2) i prvog (T1) mjerenja za B. AUC je iznosila 28,84%.



**Slika 28.** Prikaz ROC krivulje za razlikovanje blage od teške influence za razliku drugog (T2) i prvog (T1) mjerenja za parametar B. Crna dijagonalna linija predstavlja dijagnostički test s točnošću od 50% (nasumično klasificiranje). Prikazane ROC krivulje opisuju promjene u osjetljivosti i specifičnosti za navedene dijagnostičke testove s kontinuiranim biomarkerima (mjerenjima).

### 5.3.6. Rezultati analize N-glikana imunoglobulina G unutar skupine bolesnika s bakterijskom pneumonijom prema težini bolesti pri prijemu

Rezultati linearnog mješovitog modela za agalaktozilirane N-glikane imunoglobulina G (G0) pokazali su kako je glavni efekt skupine statistički značajan ( $p = 0,001$ , Tablica 41), što bi značilo da su se početni udjeli G0 za pojedine skupine po težini u vremenu T1 značajno razlikovali. Blaga bakterijska pneumonija imala je najniži udio G0, dok je teška bakterijska pneumonija imala najviši udio G0 u vremenu T1 (Slika 29).

**Tablica 41.** Tablica analize varijance vrste III za prediktore iz linearnog mješovitog modela za agalaktozilirane N-glikane imunoglobulina G (G0) koristeći Satterthwaiteovu metodu

	Suma kvadrata	Srednji kvadrati	Stupnjevi slobode	F- statistika	p - vrijednost
<b>Vrijeme</b>	294,11	147,05	2	11,179	<b>3,69 x 10<sup>-5</sup></b>
<b>Skupina po težini</b>	196,42	98,21	2	7,466	<b>0,001</b>
<b>Spol</b>	56,41	56,41	1	4,288	<b>0,041</b>
<b>Godine</b>	52,88	52,88	1	4,019	<b>0,048</b>
<b>Sezona</b>	201,59	100,79	2	7,662	<b>0,0008</b>
<b>Vrijeme:Skupina po težini</b>	145,07	36,27	4	2,757	<b>0,031</b>

Satterthwaiteova metoda aproksimira broj stupnjeva slobode.

Kako bismo formalno testirali razlike u kretanju udjela G0 između ispitivanih skupina po težini bolesti, u linearni mješoviti model smo uključili interakciju vremena i skupine po težini. Interakcija između vremena uzorkovanja i težine pokazala se statistički značajnom ( $p = 0,031$ , Tablica 41). Težina bolesti imala je značajan utjecaj na kretanje udjela G0 kod ispitanika.

Iz koeficijenata linearnog mješovitog modela (Tablica 42) i Slike 29, možemo zaključiti da je promjena u udjelu G0 između vremena T1 i T2 te vremena T1 i T3 bila značajno veća kod srednje teške bakterijske pneumonije u odnosu na blagu bakterijsku pneumoniju ( $p = 0,018$ ,  $p = 0,010$ ).

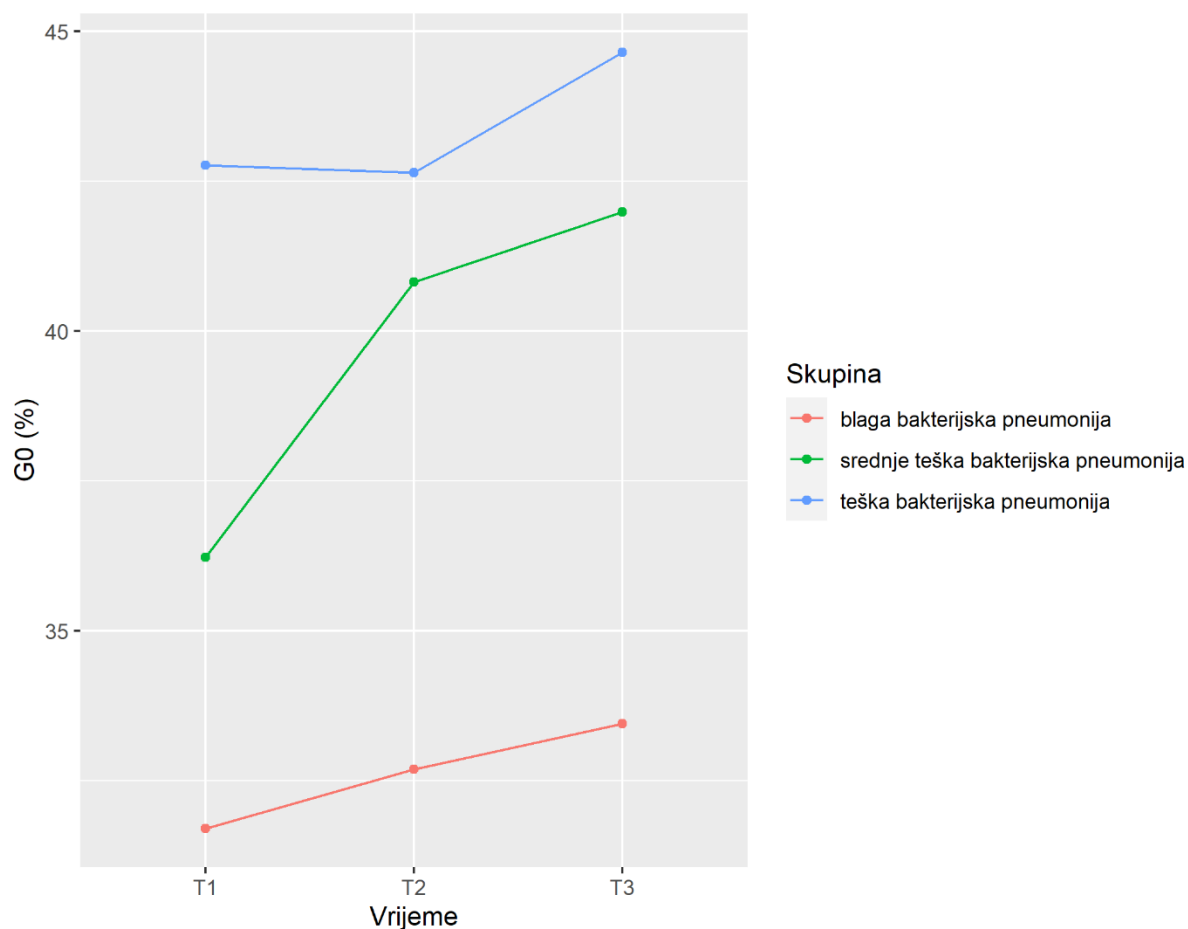
**Tablica 42.** Rezultati mješovitog linearnog modela (engl. linear mixed model) kojim se ispitala razlika u udjelu agalaktoziliranih N-glikana imunoglobulina G (G0) između različitih skupina bakterijske pneumonije po težini bolesti pri prijemu i vremena uzorkovanja te interakcija vremena i skupine

	Zavisna varijabla: G0 ( $\beta$ , SE)	p-vrijednost
Odsječak na osi y	28,591	$< 2 \times 10^{-6}$
Vrijeme T2	0,983	0,244
Vrijeme T3	1,750	0,053
Srednje teška bakterijska pneumonija	4,525	0,070
Teška bakterijska pneumonija	11,059	<b>0,0007</b>
Spol: Ženski	-3,465	<b>0,041</b>
Godine	0,132	<b>0,048</b>
Sezona 2019	-5,384	<b>0,0001</b>
Sezona 2020	-2,637	0,268
Vrijeme T2: Srednje teška bakterijska pneumonija	3,599	<b>0,018</b>
Vrijeme T3: Srednje teška bakterijska pneumonija	4,002	<b>0,010</b>
Vrijeme T2: Teška bakterijska pneumonija	-1,101	0,455
Vrijeme T3: Teška bakterijska pneumonija	0,130	0,934

$\beta$ , procjena regresijskog parametra; SE, standardna pogreška.

Odsječak na osi y predstavlja prosječnu vrijednost udjela G0 za referentne vrijednosti kategorijskih prediktora: skupinu blage bakterijske pneumonije (referentna), vrijeme T1 (referentno), muški spol (referentno) i sezonu 2018 (referentna).

Vrijeme i skupina po težini predstavljaju fiksne efekte (engl. fixed effect), dok su ispitanici uključeni u model kao nasumični efekt (engl. random effect). Spol, dob i sezona uzorkovanja dodani su u model kao kovarijate kako bi se kontroliralo na njihov utjecaj.



**Slika 29.** Interakcijski graf prilagođenih prosjeka udjela agalaktoziliranih N-glikana imunoglobulina G (G0) dobivenih na temelju linearnog mješovitog modela. T1 – pri prijemu, T2 – sedmi, T3 – dvadeset i osmi dan od prijema u bolnicu.

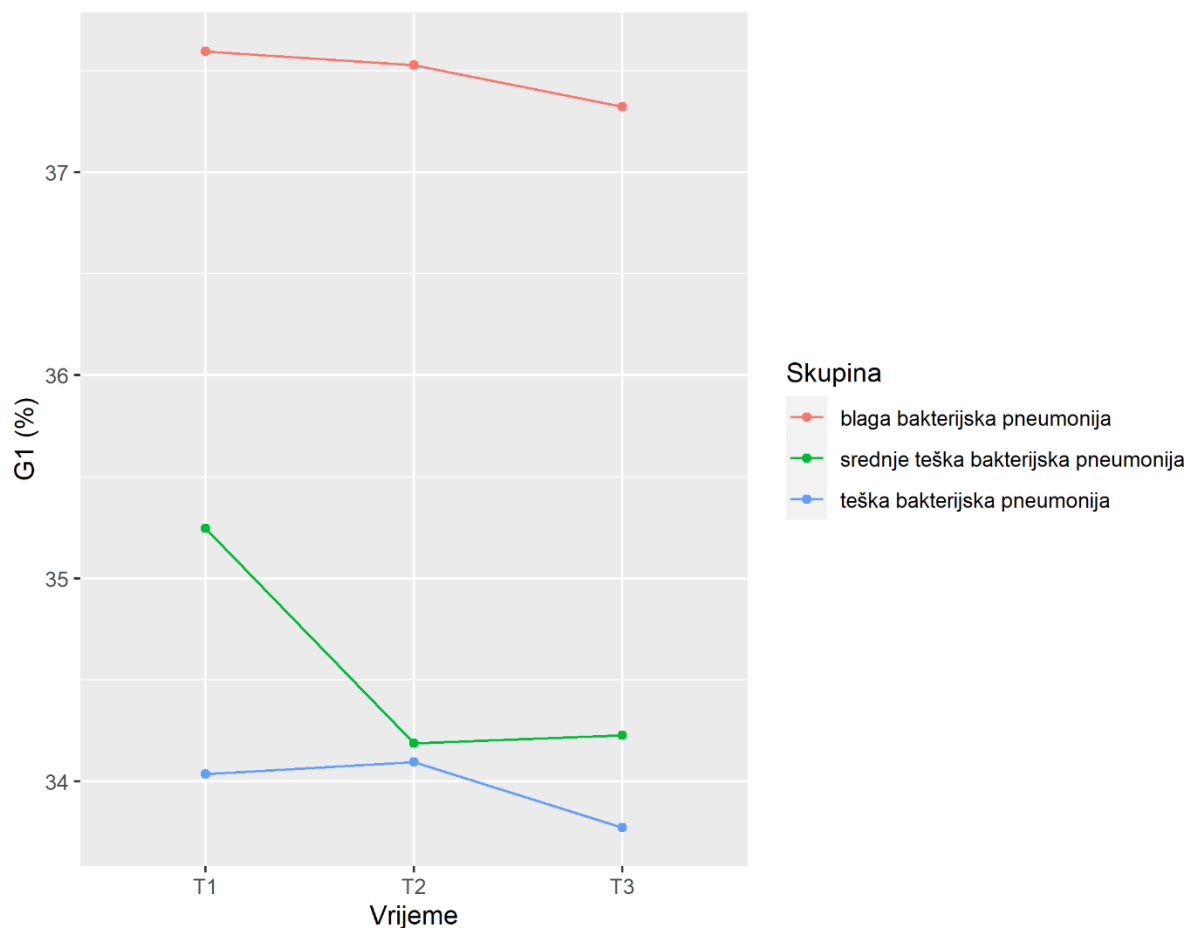
Rezultati linearnog mješovitog modela za monogalaktozilirane N-glikane imunoglobulina G (G1) pokazali su kako je glavni efekt skupine statistički značajan ( $p = 0,003$ , Tablica 43), što bi značilo da su se početni udjeli G1 za pojedine skupine po težini u vremenu T1 značajno razlikovali. Teška bakterijska pneumonija imala je najniži udio G1, dok je blaga bakterijska pneumonija imala najviši udio G1 u vremenu T1 (Slika 30).

**Tablica 43.** Tablica analize varijance vrste III za prediktore iz linearnog mješovitog modela za monogalaktozilirane N-glikane imunoglobulina G (G1) koristeći Satterthwaiteovu metodu

	Suma kvadrata	Srednji kvadrati	Stupnjevi slobode	F-statistika	p-vrijednost
<b>Vrijeme</b>	8,46	4,23	2	2,172	0,119
<b>Skupina po težini</b>	25,49	12,74	2	6,544	<b>0,003</b>
<b>Spol</b>	39,71	39,71	1	20,391	<b><math>1,65 \times 10^{-5}</math></b>
<b>Godine</b>	5,48	5,48	1	2,812	0,100
<b>Sezona</b>	247,06	123,53	2	63,437	<b><math>&lt; 2.2 \times 10^{-16}</math></b>
<b>Vrijeme:Skupina po težini</b>	7,51	1,88	4	0,964	0,431

Satterthwaiteova metoda aproksimira broj stupnjeva slobode.

Kako bismo formalno testirali razlike u kretanju udjela G1 između ispitivanih skupina, u linearni mješoviti model uključili smo interakciju vremena i skupine po težini. Interakcija između vremena uzorkovanja i težine nije se pokazala statistički značajnom ( $p = 0,431$ , Tablica 43, Slika 30). Težina bolesti nije imala značajan utjecaj na kretanje udjela G1 kod ispitanika.



**Slika 30.** Interakcijski graf prilagođenih prosjeka udjela monogalaktoziliranih N-glikana imunoglobulina G (G1) dobivenih na temelju linearnog mješovitog modela. T1 – pri prijemu, T2 – sedmi, T3 – dvadeset i osmi dan od prijema u bolnicu.

Rezultati linearnog mješovitog modela za digalaktozilirane N-glikane imunoglobulina G (G2) pokazali su kako je glavni efekt skupine statistički značajan ( $p = 0,014$ , Tablica 44), što bi značilo da su se početni udjeli G2 za pojedine skupine po težini u vremenu T1 značajno razlikovali. Teška bakterijska pneumonija imala je najniži udio G2, dok je blaga bakterijska pneumonija imala najviši udio G2 u vremenu T1 (Slika 31).

**Tablica 44.** Tablica analize varijance vrste III za prediktore iz linearnog mješovitog modela za digalaktosilirane N-glikane imunoglobulina G (G2) koristeći Satterthwaiteovu metodu

	Suma kvadrata	Srednji kvadrati	Stupnjevi slobode	F- statistika	p - vrijednost
Vrijeme	55,14	27,57	2	14,867	<b>1,77 x 10<sup>-6</sup></b>
Skupina po težini	16,69	8,35	2	4,500	<b>0,014</b>
Spol	7,62	7,62	1	4,107	<b>0,045</b>
Godine	14,17	14,17	1	7,642	<b>0,007</b>
Sezona	24,44	12,22	2	6,589	<b>0,002</b>
Vrijeme:Skupina po težini	25,93	6,48	4	3,496	<b>0,010</b>

Satterthwaiteova metoda aproksimira broj stupnjeva slobode.

Kako bismo formalno testirali razlike u kretanju udjela G2 između ispitivanih skupina po težini bolesti, u linearni mješoviti model smo uključili interakciju vremena i skupine po težini. Interakcija između vremena uzorkovanja i težine pokazala se statistički značajnom ( $p = 0,010$ , Tablica 44). Težina bolesti imala je značajan utjecaj na kretanje udjela G2 kod ispitanika.

Iz koeficijenata linearnog mješovitog modela (Tablica 45) i Slike 31 možemo zaključiti da je promjena u udjelu G2 između vremena T1 i T2 te vremena T1 i T3 bila značajno veća kod srednje teške bakterijske pneumonije u odnosu na blagu bakterijsku pneumoniju ( $p = 0,009$ ,  $p = 0,001$ ).

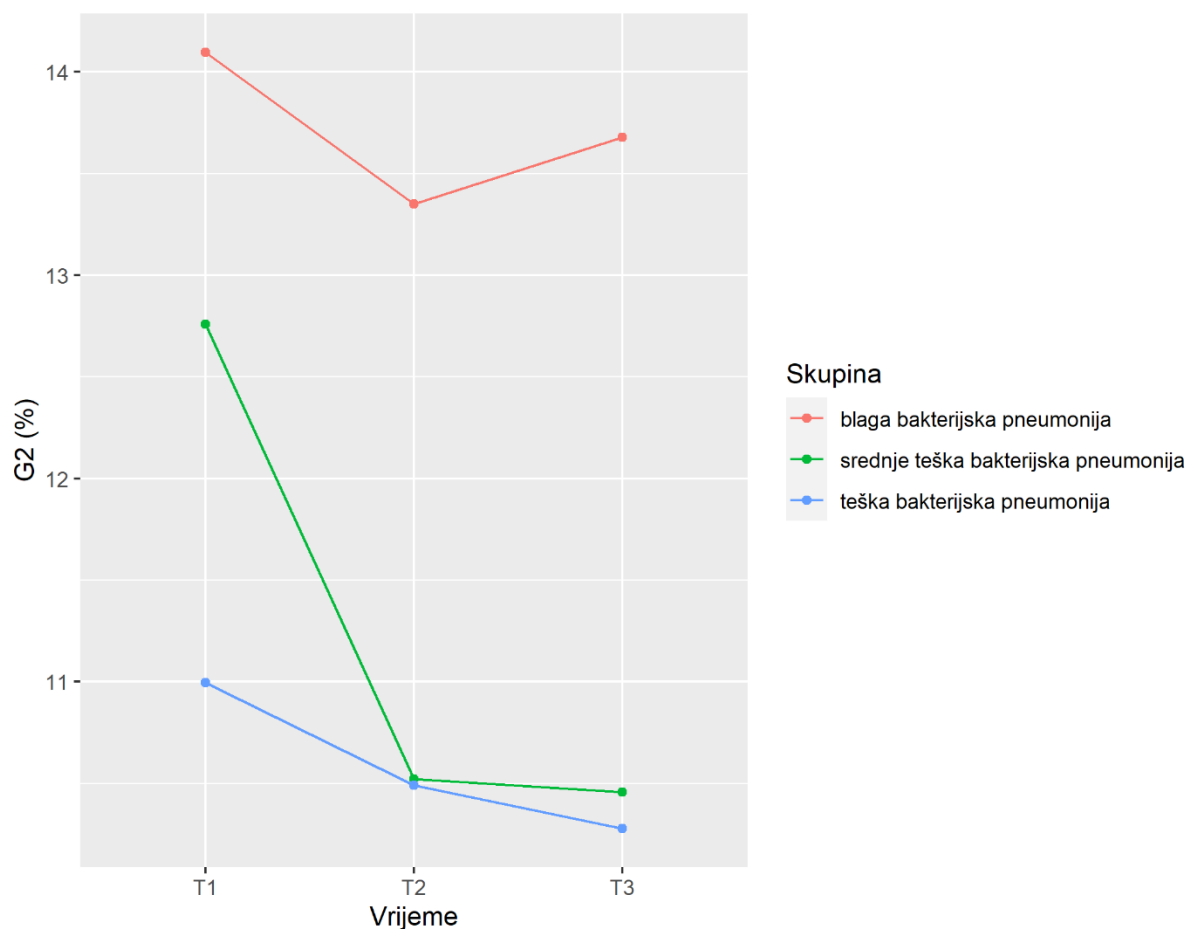
**Tablica 45.** Rezultati mješovitog linearnog modela (engl. linear mixed model) kojim se ispitala razlika u udjelu digalaktosiliranih N-glikana imunoglobulina G (G2) između različitih skupina bolesnika s bakterijskom pneumonijom po težini bolesti pri prijemu i vremenu uzorkovanja te interakcija vremena i skupine

	Zavisna varijabla: G2 (β, SE)	p-vrijednost
Odsječak na osi y	16,875	<b>&lt; 2 x 10<sup>-6</sup></b>
Vrijeme T2	-0,745	<b>0,020</b>
Vrijeme T3	-0,415	0,219
Srednje teška bakterijska pneumonija	-1,337	0,181
Teška bakterijska pneumonija	-3,100	<b>0,018</b>
Spol: Ženski	1,371	<b>0,045</b>
Godine	-0,074	<b>0,007</b>
Sezona 2019	1,885	<b>0,0007</b>
Sezona 2020	0,355	0,718
Vrijeme T2: Srednje teška bakterijska pneumonija	-1,492	<b>0,009</b>
Vrijeme T3: Srednje teška bakterijska pneumonija	-1,884	<b>0,001</b>
Vrijeme T2: Teška bakterijska pneumonija	0,242	0,662
Vrijeme T3: Teška bakterijska pneumonija	-0,301	0,611

β, procjena regresijskog parametra; SE, standardna pogreška. Odsječak na osi y predstavlja prosječnu vrijednost udjela G2 za referentne vrijednosti kategorijskih prediktora: skupinu blage bakterijske pneumonije (referentna), vrijeme T1 (referentno), muški spol (referentno) i sezonu 2018 (referentna).

Vrijeme i skupina po težini predstavljaju fiksne efekte (engl. fixed effect), dok su ispitanici uključeni u model kao nasumični efekt (engl. random effect). Spol, dob i sezona uzorkovanja dodani su u model kao kovarijate kako bi se kontroliralo na njihov utjecaj.





**Slika 31.** Interakcijski graf prilagođenih prosjeka udjela digalaktoziliranih N-glikana imunoglobulina G (G2) dobivenih na temelju linearnog mješovitog modela. T1 – pri prijemu, T2 – sedmi, T3 – dvadeset i osmi dan od prijema u bolnicu.

Rezultati linearnog mješovitog modela za sijalinizirane N-glikane imunoglobulina G (S) pokazali su kako je glavni efekt skupine statistički značajan ( $p = 0,001$ , Tablica 46), što bi značilo da su se početni udjeli S za pojedine skupine po težini u vremenu T1 značajno razlikovali. Teška bakterijska pneumonija imala je najniži udio S, dok je blaga bakterijska pneumonija imala najviši udio S u vremenu T1 (Slika 32).

**Tablica 46.** Tablica analize varijance vrste III za prediktore iz linearnog mješovitog modela za sijalinizirane N-glikane imunoglobulina G (S) koristeći Satterthwaiteovu metodu

	Suma kvadrata	Srednji kvadrati	Stupnjevi slobode	F-statistika	p-vrijednost
<b>Vrijeme</b>	69,60	34,79	2	17,806	<b><math>1,53 &lt; 10^{-7}</math></b>
<b>Skupina po težini</b>	27,40	13,70	2	7,011	<b>0,001</b>
<b>Spol</b>	2,15	2,15	1	1,103	0,296
<b>Godine</b>	0,47	0,47	1	0,239	0,626
<b>Sezona</b>	626,38	313,19	2	160,255	<b><math>&lt; 2,2 \times 10^{-16}</math></b>
<b>Vrijeme:Skupina po težini</b>	20,16	5,04	4	2,579	<b>0,041</b>

Satterthwaiteova metoda aproksimira broj stupnjeva slobode.

Kako bismo formalno testirali razlike u kretanju udjela S između ispitivanih skupina, u linearni mješoviti model uključili smo interakciju vremena i skupine po težini. Interakcija između vremena uzorkovanja i težine pokazala se statistički značajnom ( $p = 0,041$ , Tablica 46). Težina bolesti imala je značajan utjecaj na kretanje udjela S kod ispitanika.

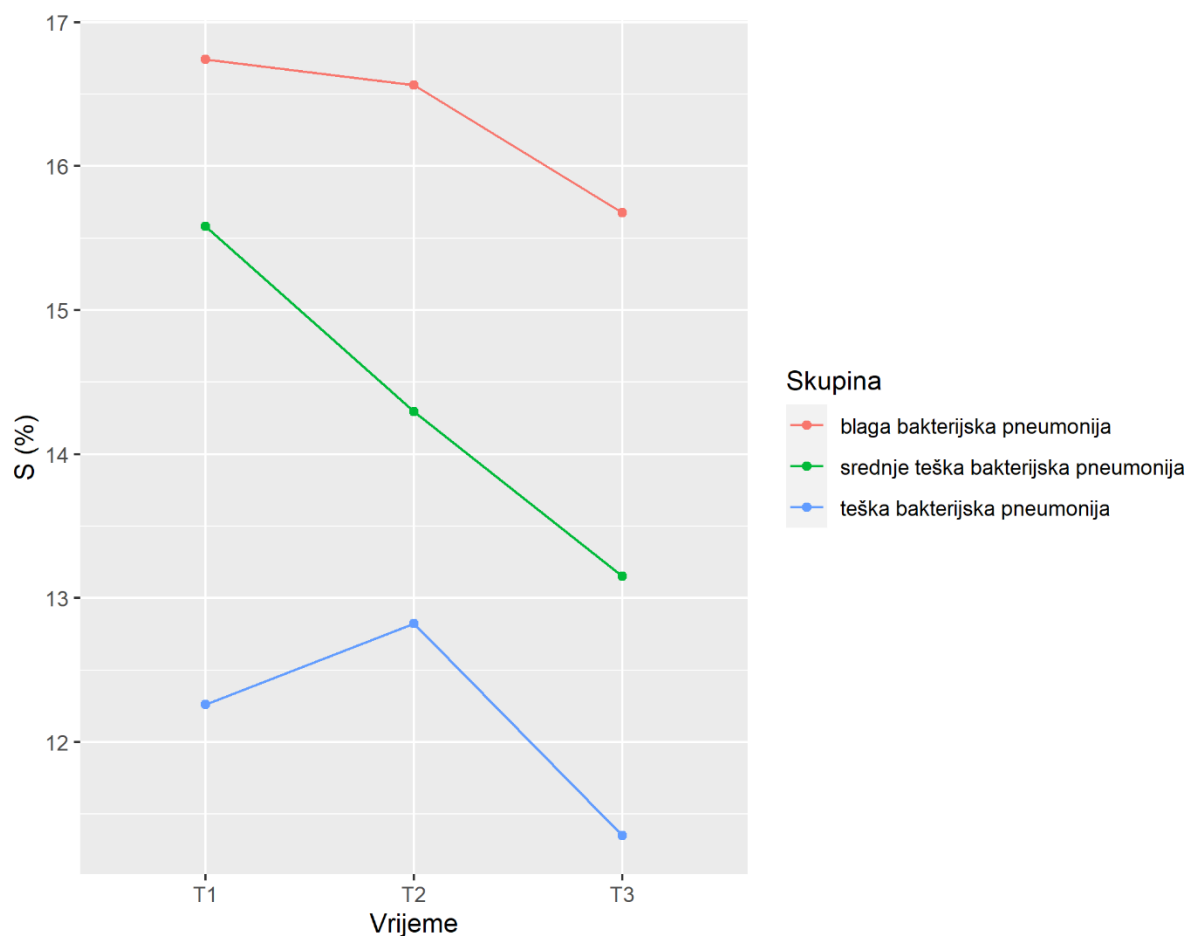
Iz koeficijenata linearnog mješovitog modela (Tablica 47) i Slike 32 možemo zaključiti da je promjena u udjelu S između vremena T1 i T3 bila značajno veća kod srednje teške bakterijske pneumonije u odnosu na blagu bakterijsku pneumoniju ( $p = 0,022$ ).

**Tablica 47.** Rezultati mješovitog linearnog modela (engl. linear mixed model) kojim se ispitala razlika u udjelu sijaliniziranih N-glikana imunoglobulina G (S) između različitih skupina bolesnika s bakterijskom pneumonijom po težini bolesti pri prijemu i vremena uzorkovanja te interakcija vremena i skupine

	Zavisna varijabla: S ( $\beta$ , SE)	p-vrijednost
Odsječak na osi y	12,144	$< 2 \times 10^{-16}$
Vrijeme T2	-0,175	0,589
Vrijeme T3	-1,062	<b>0,003</b>
Srednje teška bakterijska pneumonija	-1,157	0,216
Teška bakterijska pneumonija	-4,478	<b>0,0002</b>
Spol: Ženski	-0,661	0,296
Godine	-0,012	0,626
Sezona 2019	9,370	$< 2 \times 10^{-16}$
Sezona 2020	7,475	<b><math>1,48 \times 10^{-12}</math></b>
Vrijeme T2: Srednje teška bakterijska pneumonija	-1,113	0,057
Vrijeme T3: Srednje teška bakterijska pneumonija	-1,371	<b>0,022</b>
Vrijeme T2: Teška bakterijska pneumonija	0,736	0,196
Vrijeme T3: Teška bakterijska pneumonija	0,151	0,803

$\beta$ , procjena regresijskog parametra; SE, standardna pogreška. Odsječak na osi y predstavlja prosječnu vrijednost udjela S za referentne vrijednosti kategorijskih prediktora: skupinu blage bakterijske pneumonije (referentna), vrijeme T1 (referentno), muški spol (referentno) i sezonu 2018 (referentna).

Vrijeme i skupina po težini predstavljaju fiksne efekte (engl. fixed effect), dok su ispitanici uključeni u model kao nasumični efekt (engl. random effect). Spol, dob i sezona uzorkovanja dodani su u model kao kovarijate kako bi se kontroliralo na njihov utjecaj.



**Slika 32.** Interakcijski graf prilagođenih prosjeka udjela sijaliniziranih N-glikana imunoglobulina G (S) dobivenih na temelju linearnog mješovitog modela. T1 – pri prijemu, T2 – sedmi, T3 – dvadeset i osmi dan od prijema u bolnicu.

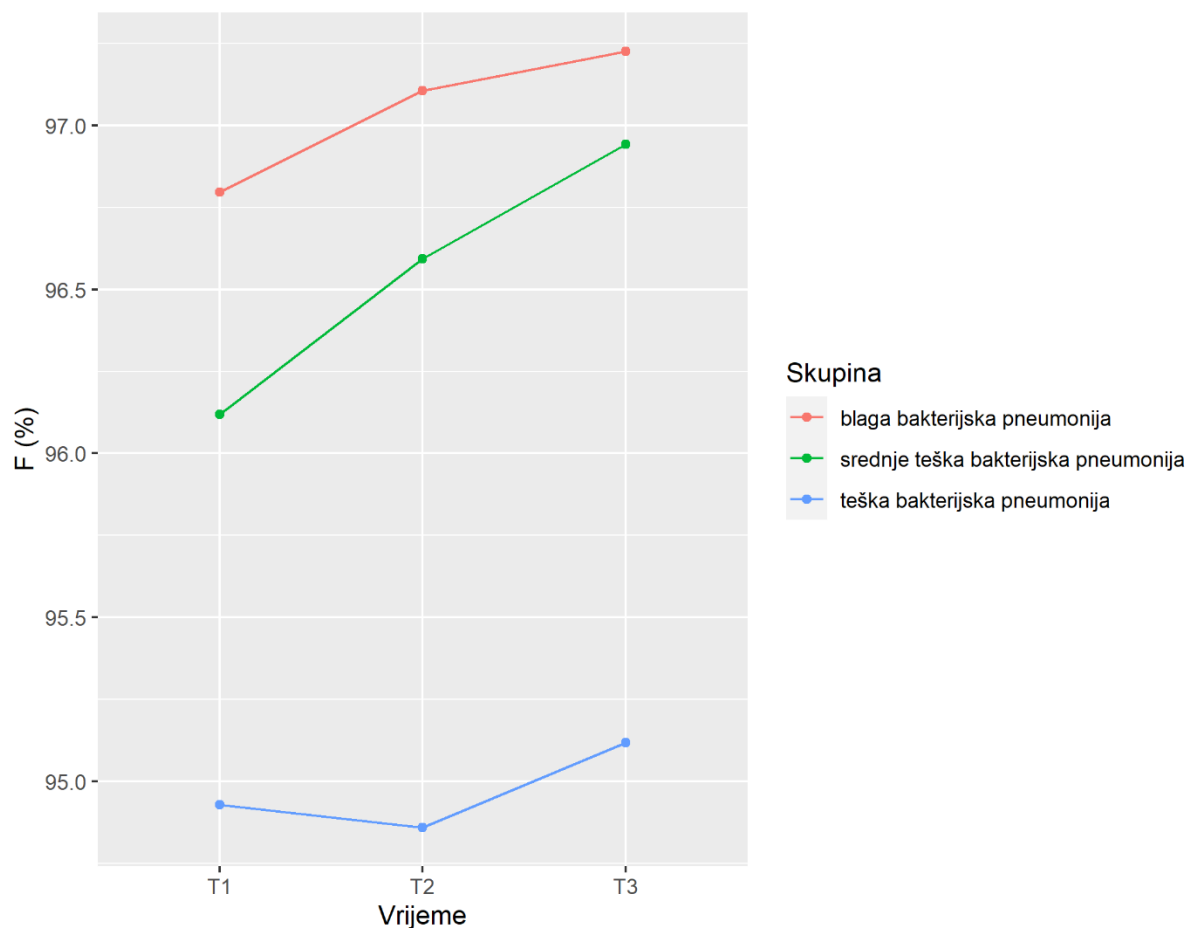
Rezultati linearnog mješovitog modela za fukozilirane N-glikane imunoglobulina G (F) pokazali su kako je glavni efekt skupine po težini statistički značajan ( $p = 2,06 \times 10^{-5}$ , Tablica 48), što bi značilo da su se početni udjeli F za pojedine skupine po težini bolesti u vremenu T1 značajno razlikovali. Teška bakterijska pneumonija imala je najniži udio F, dok je blaga bakterijska pneumonija imala najviši udio F u vremenu T1 (Slika 33).

**Tablica 48.** Tablica analize varijance vrste III za prediktore iz linearnog mješovitog modela za fukozilirane N-glikane imunoglobulina G (F) koristeći Satterthwaiteovu metodu

	Suma kvadrata	Srednji kvadrati	Stupnjevi slobode	F-statistika	p-vrijednost
<b>Vrijeme</b>	6,82	3,41	2	11,723	<b><math>2,06 \times 10^{-5}</math></b>
<b>Skupina po težini</b>	1,98	0,99	2	3,403	<b>0,037</b>
<b>Spol</b>	0,45	0,45	1	1,559	0,214
<b>Godine</b>	0,18	0,18	1	0,681	0,412
<b>Sezona</b>	38,30	19,15	2	65,881	<b><math>&lt;2.2 \times 10^{-16}</math></b>
<b>Vrijeme:Skupina po težini</b>	2,33	0,58	4	2,002	0,098

Satterthwaiteova metoda aproksimira broj stupnjeva slobode.

Kako bismo formalno testirali razlike u kretanju udjela F između ispitivanih skupina, u linearni mješoviti model uključili smo interakciju vremena i skupine po težini. Interakcija između vremena uzorkovanja i težine nije se pokazala statistički značajnom ( $p = 0,098$ , Tablica 48). Težina bolesti nije imala značajan utjecaj na kretanje udjela F kod ispitanika.



**Slika 33.** Interakcijski graf prilagođenih prosjeka udjela fukožiliranih N-glikana imunoglobulina G (F) dobivenih na temelju linearnog mješovitog modela. T1 – pri prijemu, T2 – sedmi, T3 – dvadeset i osmi dan od prijema u bolnicu.

Rezultati linearnog mješovitog modela za N-glikane s račvućim N-acetilglukozaminom (B) pokazali su kako je glavni efekt skupine po težini statistički značajan ( $p = 0,005$ , Tablica 49), što bi značilo da su se početna mjerenja B za pojedine skupine po težini u vremenu T1 značajno razlikovala. Skupina blage bakterijske pneumonije imala je najniže udjele B, dok je srednje teška bakterijska pneumonija imala najviše udjele B u vremenu T1 (Slika 34).

**Tablica 49.** Tablica analize varijance vrste III za prediktore iz linearnog mješovitog modela za N-glikane s računajućim N-acetilglukozaminom (B) koristeći Satterthwaiteovu metodu

	Suma kvadrata	Srednji kvadrati	Stupnjevi slobode	F-statistika	p-vrijednost
<b>Vrijeme</b>	149,38	74,69	2	51,612	$< 2 \times 10^{-16}$
<b>Skupina po težini</b>	16,48	8,24	2	5,694	<b>0,005</b>
<b>Spol</b>	3,91	3,91	1	2,699	0,103
<b>Godine</b>	9,85	9,85	1	6,806	<b>0,011</b>
<b>Sezona</b>	13,43	6,71	2	4,639	<b>0,012</b>
<b>Vrijeme:Skupina po težini</b>	16,84	4,21	4	2,909	<b>0,025</b>

Satterthwaiteova metoda aproksimira broj stupnjeva slobode.

Kako bismo formalno testirali razlike u kretanju udjela B između ispitivanih skupina po težini bolesti, u linearni mješoviti model smo uključili interakciju vremena i skupine po težini. Interakcija između vremena uzorkovanja i težine pokazala se statistički značajnom ( $p = 0,025$ , Tablica 49). Težina bolesti imala je značajan utjecaj na kretanje udjela B kod ispitanika.

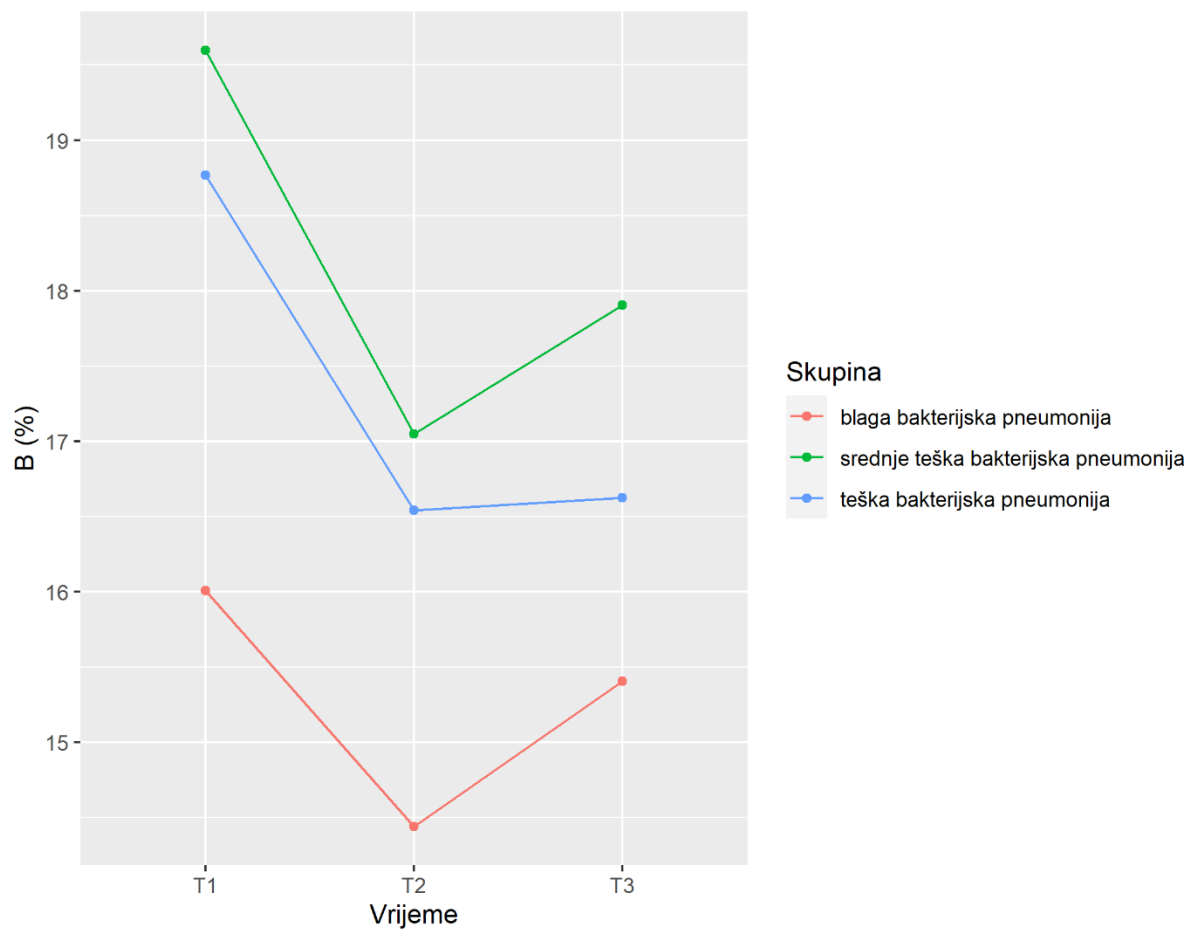
Iz koeficijenata linearnog mješovitog modela (Tablica 50) i Slike 34 možemo zaključiti da su sve tri skupine po težini imale slično kretanje udjela B od prvog (T1) do drugog (T2) mjerenja, dok su se u ukupnoj promjeni u udjelu B između prvog (T1) i zadnjeg (T3) mjerenja skupine srednje teške i teške bakterijske pneumonije značajno razlikovale u odnosu na blagu pneumoniju ( $p = 0,034$ ,  $p = 0,004$ ).

**Tablica 50.** Rezultati mješovitog linearnog modela (engl. linear mixed model) kojim se ispitala razlika u udjelu N-glikana s računjućim N-acetilglukozaminom (B) između različitih skupina bolesnika s bakterijskom pneumonijom po težini bolesti pri prijemu i vremena uzorkovanja te interakcija vremena i skupine

	Zavisna varijabla: B ( $\beta$ , SE)	p-vrijednost
Odsječak na osi y	11,379	$< 2 \times 10^{-16}$
Vrijeme T2	-1,565	$1,39 \times 10^{-7}$
Vrijeme T3	-0,601	0,045
Srednje teška bakterijska pneumonija	3,589	<b>0,0001</b>
Teška bakterijska pneumonija	2,763	<b>0,022</b>
Spol: Ženski	1,018	0,103
Godine	0,064	<b>0,011</b>
Sezona 2019	1,380	<b>0,006</b>
Sezona 2020	0,023	0,980
Vrijeme T2: Srednje teška bakterijska pneumonija	-0,983	0,051
Vrijeme T3: Srednje teška bakterijska pneumonija	-1,089	<b>0,034</b>
Vrijeme T2: Teška bakterijska pneumonija	-0,664	0,176
Vrijeme T3: Teška bakterijska pneumonija	-1,545	<b>0,004</b>

$\beta$ , procjena regresijskog parametra; SE, standardna pogreška. Odsječak na osi y predstavlja prosječnu vrijednost udjela B za referentne vrijednosti kategorijskih prediktora: skupinu blage bakterijske pneumonije (referentna), vrijeme T1 (referentno), muški spol (referentno) i sezonu 2018 (referentna).

Vrijeme i skupina po težini predstavljaju fiksne efekte (engl. fixed effect), dok su ispitivanici uključeni u model kao nasumični efekt (engl. random effect). Spol, dob i sezona uzorkovanja dodani su u model kao kovarijate kako bi se kontroliralo na njihov utjecaj.



**Slika 34.** Interakcijski graf prilagođenih prosjeka udjela N-glikana s računjućim N-acetilglukozaminom (B) dobivenih na temelju linearnog mješovitog modela. T1 – pri prijemu, T2 – sedmi, T3 – dvadeset i osmi dan od prijema u bolnicu.

### **5.3.7. Procjena dijagnostičkog potencijala glikozilacijskog profila imunoglobulina G u razlikovanju stupnja težine bolesti u bolesnika s bakterijskom pneumonijom pri prijemu**

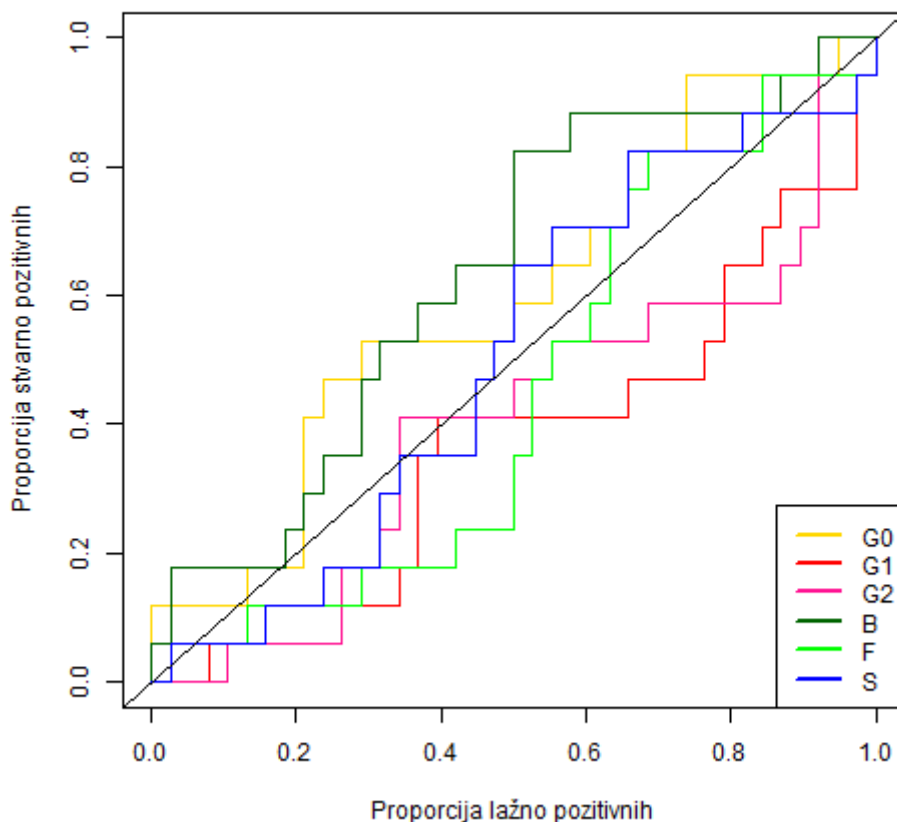
Kako bismo procijenili dijagnostički potencijal glikozilacijskog profila imunoglobulina G u razlikovanju stupnja težine bolesti bakterijske pneumonije (blaga, srednje teška i teška) proveli smo ROC analizu. ROC analizom ispitali smo valjanost dijagnostičkog testa kojeg smo konstruirali na dva načina:

- 1.) za dijagnostičke biomarkere izabrani su glikozilacijski parametri koji su se statistički značajno razlikovali u prvom mjerenju (T1) između bolesnika s različitim stupnjem težine bakterijske pneumonije pri prijemu,
- 2.) za dijagnostičke biomarkere izabrani su glikozilacijski parametri čije se kretanje od prvog do drugog mjerenja (T1 – T2) statistički značajno razlikovalo između bolesnika s različitim stupnjem težine bakterijske pneumonije pri prijemu.

Na Slici 35, vidi se usporedni prikaz ROC krivulja šest dijagnostičkih testova za razlikovanje blagog od srednje teškog stupnja bakterijske pneumonije utemeljenih na prvom mjerenju (T1) za G0, G1, G2, B, F i S.

AUC je iznosila je 59,44% za G0, 37,00% za G1, 40,25% za G2, 63,31% za B, 44,89% za F te 50,46% za S. Kao najtočniji dijagnostički test za razlikovanje blagog i srednje teškog stupnja bolesti bakterijske pneumonije temeljen na prvom mjerenju (T1) pokazao se B.

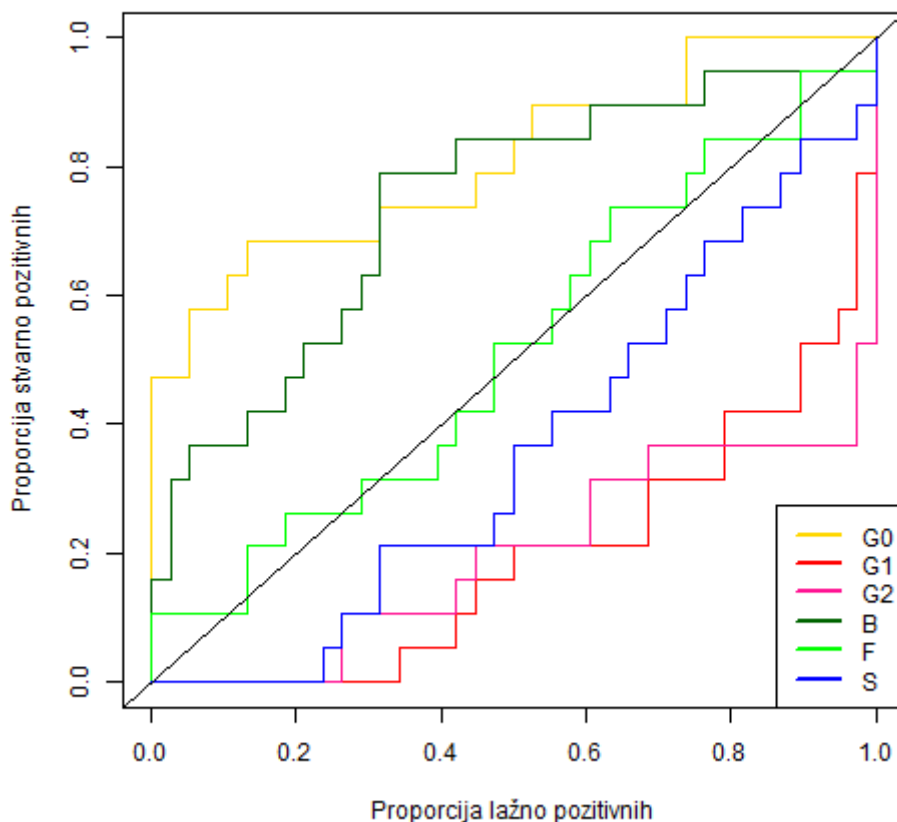




*Slika 35. Usporedni prikaz ROC krivulja za razlikovanje blage od srednje teške bakterijske pneumonije za agalaktozilirane (G0), monogalaktozilirane (G1), digalaktozilirane N-glikane (G2), N-glikane s računjućim N-acetilglukozaminom (B), fukoziirane i sijalinizirane N-glikane imunoglobulina G. Crna dijagonalna linija predstavlja dijagnostički test s točnošću od 50% (nasumično klasificiranje). Prikazane ROC krivulje opisuju promjene u osjetljivosti i specifičnosti za navedene dijagnostičke testove s kontinuiranim biomarkerima (mjerenjima).*

Na Slici 36, može se vidjeti usporedni prikaz ROC krivulja šest dijagnostičkih testova za razlikovanje blagog od teškog stupnja bakterijske pneumonije utemeljenih na prvom mjerenju (T1) za G0, G1, G2, B, F i S.

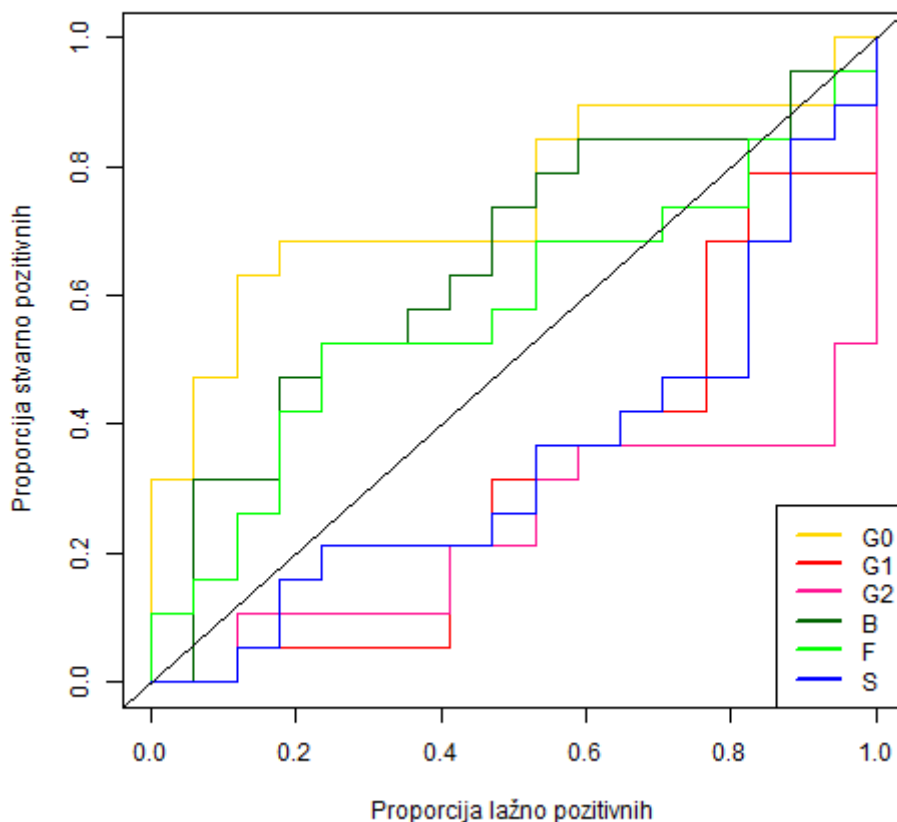
AUC je iznosila 81,02% za G0, 19,53% za G1, 19,94% za G2, 73,96% za B, 51,80% za F te 35,74% za S. Kao najtočniji dijagnostički test za razlikovanje blagog i teškog stupnja bolesti bakterijske pneumonije temeljen na prvom mjerenju (T1) pokazao se G0.



**Slika 36.** Usporedni prikaz ROC krivulja za razlikovanje blage od teške bakterijske pneumonije za agalaktozilirane (G0), monogalaktozilirane (G1), digalaktozilirane N-glikane (G2), N-glikane s računajućim N-acetilglukozaminom (B), fukožilirane i sijalinizirane N-glikane imunoglobulina G. Crna dijagonalna linija predstavlja dijagnostički test s točnošću od 50% (nasumično klasificiranje). Prikazane ROC krivulje opisuju promjene u osjetljivosti i specifičnosti za navedene dijagnostičke testove s kontinuiranim biomarkerima (mjerenjima).

Na Slici 37, može se vidjeti usporedni prikaz ROC krivulja šest dijagnostičkih testova za razlikovanje srednjeg od teškog stupnja bakterijske pneumonije utemeljenih na prvom mjerenju (T1) za G0, G1, G2, B, F i S.

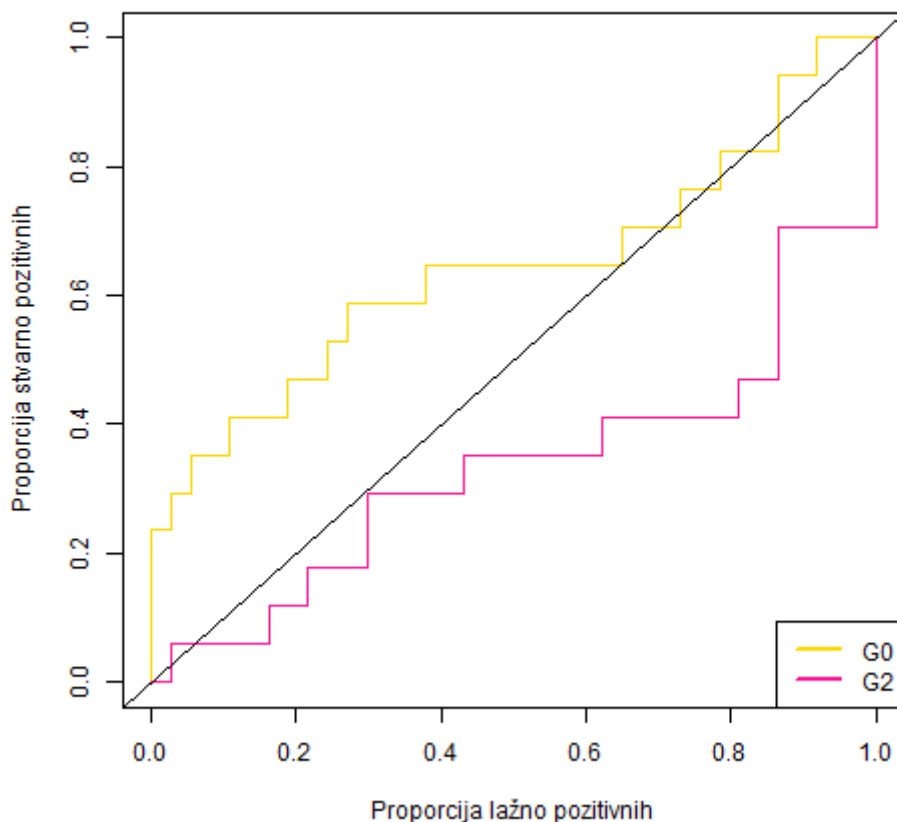
AUC je iznosila 74,92% za G0, 31,89% za G1, 23,53% za G2, 64,71% za B, 57,59% za F te 34,37% za S. Kao najtočniji dijagnostički test za razlikovanje srednjeg i teškog stupnja bolesti bakterijske pneumonije temeljen na prvom mjerenju (T1) pokazao se G0.



**Slika 37.** Usporedni prikaz ROC krivulja za razlikovanje srednje od teške bakterijske pneumonije za agalaktozilirane (G0), monogalaktozilirane (G1), digalaktozilirane N-glikane (G2), N-glikane s računjućim N-acetilglukozaminom (B), fukožilirane i sijalinizirane N-glikane imunoglobulina G. Crna dijagonalna linija predstavlja dijagnostički test s točnošću od 50% (nasumično klasificiranje). Prikazane ROC krivulje opisuju promjene u osjetljivosti i specifičnosti za navedene dijagnostičke testove s kontinuiranim biomarkerima (mjerenjima).

Na Slici 38, može se vidjeti usporedni prikaz ROC krivulja dva dijagnostička testa za razlikovanje blagog od srednje teškog stupnja bakterijske pneumonije utemeljenih na razlici drugog (T2) i prvog (T1) mjerenja za G0 i G2.

AUC je iznosila 64,23% za G0 te 33,39% za G2. Kao najtočniji dijagnostički test za razlikovanje blagog od srednje teškog stupnja bolesti bakterijske pneumonije temeljen na razlici između drugog (T2) i prvog (T1) mjerenja za pokazao se G0.



*Slika 38. Usporedni prikaz ROC krivulja za razlikovanje blage od srednje teške bakterijske pneumonije za monogalaktozilirane (G0) i digalaktozilirane (G2) N-glikane imunoglobulina G. Crna dijagonalna linija predstavlja dijagnostički test s točnošću od 50% (nasumično klasificiranje). Prikazane ROC krivulje opisuju promjene u osjetljivosti i specifičnosti za navedene dijagnostičke testove s kontinuiranim biomarkerima (mjerenjima).*

Najveću dijagnostičku točnost u razlikovanju blagog i teškog stupnja te srednje teškog i teškog stupnja bakterijske pneumonije postigao je dijagnostički test temeljen na prvom mjerenju (T1) parametra G0. Razlika između drugog (T2) i prvog (T1) mjerenja za parametar G0 je također postigla najveću točnost u razlikovanju blagog i srednje teškog stupnja bakterijske pneumonije. Drugu najveću točnost u usporedbama postigao je dijagnostički test temeljen na prvom (T1) mjerenju parametra B. Ostali glikozilacijski parametri nisu postigli zadovoljavajuću razinu dijagnostičke točnosti (Tablica 51).

**Tablica 51.** Točnost dijagnostičkih testova za razlikovanje stupnja težine bolesti u bolesnika s bakterijskom pneumonijom pri prijemu upotrebom izabranih glikozilacijskih parametara

Biomarker	Dijagnostički test	
	AUC (%)	Kvalitativna točnost testa
<b>Prvo mjerenje (T1):</b>		
<b>Blaga vs. srednje teška bakterijska pneumonija</b>		
<b>G0</b>	59,44	Nedostatan
<b>G1</b>	37,00	Beskoristan
<b>G2</b>	40,25	Beskoristan
<b>B</b>	63,31	<b>Granično dobar</b>
<b>F</b>	44,89	Beskoristan
<b>S</b>	50,46	Nedostatan
<b>Blaga vs. teška bakterijska pneumonija</b>		
<b>G0</b>	81,02	<b>Vrlo dobar</b>
<b>G1</b>	19,53	Beskoristan
<b>G2</b>	19,94	Beskoristan
<b>B</b>	73,96	<b>Dobar</b>
<b>F</b>	51,80	Nedostatan
<b>S</b>	35,73	Beskoristan
<b>Srednje teška vs. teška bakterijska pneumonija</b>		
<b>G0</b>	74,92	<b>Dobar</b>
<b>G1</b>	31,89	Beskoristan
<b>G2</b>	23,53	Beskoristan
<b>B</b>	64,71	<b>Granično dobar</b>
<b>F</b>	57,59	Nedostatan
<b>S</b>	34,37	Beskoristan
<b>Razlika između drugog i prvog mjerenja (T2 – T1):</b>		
<b>Blaga vs. srednje teška bakterijska pneumonija</b>		
<b>G0</b>	64,23	<b>Granično dobar</b>
<b>G2</b>	33,39	Beskoristan

AUC, površina ispod ROC krivulje (engl. *area under ROC curve*)

### 5.3.8. Prognostička vrijednost glikozilacije imunoglobulina G u predikciji ishoda liječenja

Prediktivnu vrijednost šest izvedenih glikozilacijskih parametara za duljinu boravka u bolnici ispitali smo modelom linearne regresije za skupine bakterijska pneumonija i influenza.

Za svaki od šest izvedenih glikozilacijskih parametara konstruirali smo model linearne regresije u kojem je zavisna varijabla bila duljina boravka, a nezavisne varijable su bile izvedeni glikozilacijski parametar u T1 uz zbunjujuće faktore – spol i dob.

Općenito se u literaturi provodi logaritamska transformacija duljine boravka obzirom da duljina boravka često prati log-normalnu distribuciju. U našem slučaju je duljina boravka bila približno normalno distribuirana pa nismo koristiti logaritamsku transformaciju. Sve pretpostavke linearne regresijske analize provjerene su dijagnostičkim grafovima u programskom jeziku R (276).

U skupini bolesnika s bakterijskom pneumonijom, pokazalo se kako galaktozilacija imunoglobulina G ima prognostički značaj u predikciji duljine boravka. Udio G0 u točki T1 se pokazao kao statistički značajan pozitivan prediktor za duljinu boravka u bolnici, kontrolirano na utjecaj dobi i spola ( $p = 0,038$ , Tablica 52). Za svako 1-postotno povećanje udjela G0 u prvom mjerenju, duljina boravka pacijenta se produljila za 0,1 dan. S druge strane, udio G1 se pokazao kao statistički značajan negativan prediktor za duljinu boravka u bolnici – kontrolirano na utjecaj dobi i spola ( $p = 0,019$ , Tablica 52). Za svako 1-postotno povećanje udjela G1, duljina boravka se skratila za 0,27 dana. Naposljetku, udio G2 se pokazao kao statistički značajan negativan prediktor za duljinu boravka u bolnici, kontrolirano na utjecaj dobi i spola ( $p = 0,049$ , Tablica 52). Za svako 1-postotno povećanje udjela G2, duljina boravka se skratila za 0,23 dana. Ostali glikozilacijski parametri nisu pokazali statistički značajnu povezanost s duljinom boravka u skupini bolesnika s bakterijskom pneumonijom.

U skupini bolesnika s influencom udio S u točki T1 se pokazao kao statistički značajan pozitivan prediktor duljine boravka ( $p = 0,015$ , Tablica 52). Za svako 1-postotno povećanje udjela S u prvom mjerenju duljina boravka bolesnika se produljila za 0,20 dana.

**Tablica 52.** Rezultati linearne regresijske analize za prediktivnu vrijednost agalaktoziliranih (G0), monogalaktoziliranih (G1) i digalaktoziliranih (G2) N-glikana imunoglobulina G

Prediktori modela	$\beta$	Duljina boravka	
		CI	p-vrijednost
<b>Skupina bakterijska pneumonija</b>			
Odsječak na osi y	2,65	-1,17 – 6,48	0,170
G0 (T1)	0,10	0,01 – 0,19	<b>0,038</b>
Godine	0,06	0,01 – 0,12	<b>0,027</b>
Spol	2,48	0,76 – 4,20	<b>0,005</b>
R <sup>2</sup> / prilagođeni R <sup>2</sup>		0,249 / 0,216	
Odsječak na osi y	16,07	6,07 – 26,07	<b>0,002</b>
G1 (T1)	-0,27	-0,50 – -0,05	<b>0,019</b>
Godine	0,06	0,01 – 0,11	<b>0,026</b>
Spol	2,12	0,39 – 3,85	<b>0,017</b>
R <sup>2</sup> / prilagođeni R <sup>2</sup>		0,262 / 0,229	
Odsječak na osi y	9,03	3,62 – 14,44	<b>0,001</b>
G2 (T1)	-0,23	-0,46 – -0,00	<b>0,049</b>
Godine	0,06	0,01 – 0,12	<b>0,030</b>
Spol	2,62	0,88 – 4,35	<b>0,004</b>
R <sup>2</sup> / prilagođeni R <sup>2</sup>		0,244 / 0,210	
<b>Skupina influenza</b>			
Odsječak na osi y	1,81	-2,60 – 6,23	0,414
S (T1)	0,20	0,04 – 0,35	<b>0,015</b>
Godine	0,05	0 – 0,10	<b>0,037</b>
Spol	0,93	-0,73 – 2,59	0,266
R <sup>2</sup> / prilagođeni R <sup>2</sup>		0,150 / 0,106	

CI, 95%-tni interval pouzdanosti za  $\beta$ ; G0, agalaktozilirani glikani; G1, monogalaktozilirani glikani; G2, digalaktozilirani glikani; N, broj ispitanika; R<sup>2</sup>, koeficijent determinacije; S, sijalinizirani glikani; T1, prvo mjerenje.

## 6. RASPRAVA

Esencijalna uloga imunoglobulina G u regulaciji imunskog sustava i borbi protiv infektivnih bolesti ne može se u potpunosti razumjeti bez razumijevanja promjena u njegovim N-glikanima vezanim za aminokiselinu asparagin na poziciji 297 u području ulomka Fc imunoglobulina G. Ovi glikani utječu na stabilnost protutijela, poluživot, sekreciju, imunogenost i efektornu funkciju (153,154,211,214).

Posljedično sve je veći interes za proučavanje promjena glikoma IgG-a u različitim infektivnim bolestima (262). U ovom istraživanju su po prvi puta sistematično proučavane i uspoređene promjene N-glikoma IgG-a u prirodnoj virusnoj infekciji (infekcija virusom influence) i bakterijskoj infekciji (bakterijska pneumonija) tijekom tri zimske sezone.

Kao najistaknutije obilježje N-glikoma IgG-a koje pokazuje promjene u suprotnom smjeru, ovisno o tome radi li se o bakterijskoj ili virusnoj infekciji, pokazala se sržna fukozilacija (F). Tijekom aktivne virusne infekcije (infekcije virusom influence) opazili smo smanjenje udjela N-glikana sa sržnom fukozom, dok se suprotno pokazalo istinito za bakterijsku infekciju (bakterijsku pneumoniju). Ove razlike u glikozilaciji IgG-a između virusne i bakterijske infekcije mogle bi se objasniti različitim molekularnim mehanizmima uključenim u imunski odgovor na ova dva tipa infekcije (210,279,280).

Infekcija virusom influence potiče oslobađanje mnoštva različitih citokina, a IFN- $\alpha$  jedan je od najznačajnijih (281–284). IFN- $\alpha$  već je dosada bio povezan sa sniženim udjelom sržne fukoze glikana IgG-a stoga povećavajući afinitet ulomka Fc imunoglobulina G za Fc $\gamma$ R11A, što rezultira aktivacijom stanica NK te posljedično značajno pojačava ADCC i protuvirusnu aktivnost stanica (195,196,285).

Naime, afukozilirani IgG ima čak 20 do 40 puta veći afinitet za Fc $\gamma$ R11A (195). Iako je već dva desetljeća poznato kako IgG kojem nedostaje sržna fukoza (afukozilirani IgG) pojačava ADCC, tek nedavno je afukozilacija antigen-specifičnog IgG-a dovedena u vezu s imunskim odgovorom na viruse s ovojnicom te povezana s težinom virusne infekcije (174,196). Pokazalo se kako imunski odgovor na različite viruse s ovojnicom, ali ne i imunski odgovor na viruse bez ovojnice, ima jednu zajedničku osobinu, a to je afukozilacija antigen-specifičnog IgG-a (174). Tako je, primjerice, afukozilirani antigen-specifični IgG u ljudi pronađen tijekom infekcije sljedećim virusima s ovojnicom: virusom humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*, HIV), virusom dengue, citomegalovirusom (CMV), virusom morbila, virusom parotitisa, hepatitis B virusom i tijekom COVID-19 (engl. *coronavirus disease 2019*)



infekcije, no do sada nije istražen tijekom prirodne infekcije virusom influence (174,253,256,267). Za razliku od Larsen i sur. (174), mi smo uspjeli pokazati, po prvi puta za viruse s ovojnicom, da promjene u fukozilaciji tj. smanjene udjela fukozilacije IgG tijekom infekcije virusom influence nije vidljivo samo na antigen-specifičnom IgG-u, već i na ukupnom IgG-u prisutnom u serumu bolesnika. Time su naši rezultati u skladu s rezultatima nedavne studije koja je povezala razinu afukoziliranosti, kako antigen-specifičnog, tako i ukupnog IgG-a s težinom bolesti u sekundarnoj dengue groznici (267). Stoga, ovi rezultati suprotno nedavno objavljenoj studiji autora Larsen i sur. (174), upućuju na to kako se promjene u fukozilaciji za neke viruse s ovojnicom kao što su virus influence i virus dengue, mogu također opaziti i na ukupnom IgG (267).

Također, zanimljivo je za uočiti da navedene promjene u fukozilaciji antigen-specifičnog IgG-a u odgovoru na viruse s ovojnicom, nisu opažene nakon podjediničnog cijepljenja (cijepljenja inaktiviranim fragmentiranim cjepivom) već samo nakon primjene atenuiranog cjepiva i prirodne infekcije virusima s ovojnicom, upućujući na zaključak kako je za nastanak afukoziliranog IgG-a potreban membranski kontekst te sugerirajući kako se na temelju uočenih promjena u glikozilaciji IgG-a nakon cijepljenja ne mogu samo tako direktno donositi zaključci o promjenama u glikozilaciji tijekom prirodne infekcije, potvrđujući važnost proučavanja glikozilacije u različitim uvjetima (174). Uistinu, do sada su promjene N-glikoma IgG-a vezano uz virus influence proučavane samo nakon primjene cjepiva protiv gripe (176,269,286). Za razliku od istraživanja Selman i sur. (269), koji nakon primjene cjepiva protiv influence nisu uočili promjene u fukozilaciji niti ukupnog niti antigen-specifičnog IgG-a, mi smo pokazali da je tijekom prirodne infekcije virusom influence uočljiv pad fukozilacije u skladu s teorijom imunskog odgovora na viruse s ovojnicom (174). Ove razlike mogle bi se objasniti longitudinalnim dizajnom naše studije što nam je omogućilo da pratimo promjene glikozilacije IgG-a tijekom vremena kod svakog pojedinca, i stoga, dokazujući da iako se na razini populacije glikozilacija može činiti poprilično stabilna tijekom infekcije, na pojedinačnoj razini može pretrpjeti značajne promjene.

Također je zanimljivo kako je i u našem istraživanju, kao i u istraživanju Larsen i sur. (174), razina fukozilacije bila najniža u vrijeme serokonverzije. Navedeno korelira s opaženim vremenom maksimalne citotoksičnosti usmjerene protiv virusom influence zaraženih stanica domaćina (78,287). Podijelom skupine bolesnika s influencom prema težini bolesti pri prijemu pokazalo se da su se početni udjeli fukoziliranih N-glikana za pojedine skupine po težini bolesti u vremenu T1 značajno razlikovali. Influenca bez pneumonije imala je statistički značajno niži

udio fukoziliranih N-glikana, dok je influenza s pneumonijom imala značajno viši udio fukoziliranih N-glikana u vremenu T1. Niski udio N-glikana sa sržnom fukozom se dosada u bolesnika s HIV infekcijom pokazao kao obilježje dobro kontrolirane infekcije (253).

Nadalje, između druge (T2) i treće (T3) vremenske točke u skupini bolesnika s influencom zabilježen je statistički značajan porast razine fukozilacije. Navedeno je u skladu s rezultatima istraživanja glikozilacije u odgovoru na viruse s ovojnicom od strane Larsen i sur. (174) .

Za razliku od skupine bolesnika s influencom, u skupini bolesnika s bakterijskom pneumonijom tijekom cijelog perioda praćenja opazili smo statistički značajan porast udjela fukoziliranih N-glikana. Istraživanja o promjenama glikozilacije IgG-a u okviru bakterijskih infekcija u ljudi su ograničena, ali na animalnom modelu se pokazalo da upala potaknuta primjenom lipopolisaharida Gram-negativnih bakterija može povećati razinu fukozilacije unutar centralnog živčanog sustava (288). Porast udjela fukoziliranih N-glikana IgG-a primijećen je i nakon primjene meningokoknog cjepiva, dok primjena pneumokoknog cjepiva nije imala utjecaj na fukozilaciju (271). Za istaknuti je da se radilo o pilot studiji sa samo sedam, odnosno četiri ispitanika (271)

Galaktozilacija čini se također prati ove dijametralno suprotne razlike u imunosnom odgovoru na bakterijsku i virusnu infekciju. Tako se udio galaktoziliranih N-glikana značajno smanjio jedino u bolesnika s bakterijskom pneumonijom (kako unutar skupine tako i odnosu na skupinu bolesnika s influencom i kontrolnu skupinu) rezultirajući većim udjelom agalaktoziliranih molekula IgG-a (G0). S druge strane, u bolesnika s influencom imamo pomak ravnoteže prema galaktoziliranim N-glikanima. Naime, unutar skupine bolesnika s influencom imamo statistički značajan porast mono- i di-galaktoziliranih N-glikana kako unutar skupine tako i odnosu na skupinu bolesnika s bakterijskom pneumonijom. Upravo je najveću dijagnostičku točnost u razlikovanju virusne (influenca) od bakterijske (bakterijska pneumonija) infekcije postigao dijagnostički test s biomarkerom definiranim kao razlikom između drugog i prvog mjerenja (T2-T1) za digalaktozilirane N-glikane IgG-a s AUC koji je iznosio 75%, upućujući na potencijalni dijagnostički potencijal digalaktoziliranih N-glikana u razlikovanju virusne od bakterijske infekcije.

Opazeno povećanje udjela agalaktoziliranih N-glikana IgG-a u bolesnika s bakterijskom pneumonijom u skladu je s rezultatima analize N-glikozilacije IgG-a u bolesnika sa subakutnim bakterijskim endokarditisom (289). Naime, Bond i sur. (289) su također opazili povećanje udjela agalaktoziliranih N-glikana IgG-a u bolesnika sa subakutnim bakterijski endokarditisom

u odnosu na kontrolnu skupinu. Ova usporedba je od posebnog značaja s obzirom da je subakutni endokarditis najčešće posljedica streptokokne infekcije, jednako kao i bakterijska pneumonija (17,20,289,290). Također, povećanje udjela agalaktoziliranih glikana IgG-a opaženo je i u bolesnika s drugim bakterijskim infekcijama kao što su lepra i infekcija klebsijelom (219).

Već je i ranije povećanje udjela agalaktoziliranih N-glikana IgG-a dovedeno u vezu s različitim imunskim mehanizmima koji se povezuju s imunskim odgovorom na bakterijsku invaziju (214). Jedan od tih mehanizama djelovanja agalaktoziliranog IgG-a je aktivacija komplementa putem klasičnog, alternativnog i/ili lektinskog puta nakon vezanja za manozu-vezujući lektin (engl. *mannose binding lectin*, MBL), što može pridonijeti protutijelima potaknutoj upali (291,292). No, rezultati istraživanja za ovaj posljednji put aktivacije (aktivacija putem MBL) nisu u potpunosti jednoznačni, te pojedina istraživanja sugeriraju kako su efekti agalaktoziliranog IgG *in vivo* ponajprije posredovani aktivacijskim Fc-receptorima (293–296). Nadalje, fagocitoza se pokazala kao još jedan mehanizam imunskog odgovora koji je ključan u obrani od izvanstaničnih bakterija (129). Tako su Mahan i sur. (263) u svojem istraživanju dokazali da razina agalaktoziliranog IgG-a pozitivno korelira s aktivnošću fagocitoze. S obzirom na važnu ulogu aktivacije komplementa i fagocitoze u obrani organizma od infekcije izvanstaničnim bakterijama, rezultati analize galaktozilacije IgG-a u bolesnika s bakterijskom pneumonijom u skladu su s poznatim mehanizmima imunskog obrane od infekcije izvanstaničnim bakterijama u ljudi (129).

Prije više od tri desetljeća je smanjenje udjela galaktoze i sialinizacije u N-glikomu IgG-a dovedeno u vezu s autoimunim bolestima tj. pojačanim proupalnim odgovorom i težinom bolesti (215). Pokazalo se kako navedeni obrazac glikozilacije IgG-a koji je do sada bio dosljedno opažan u sklopu autoimunih bolesti karakterizira i kronične infektivne bolesti, te je i u brojnim drugim bolestima kojima je zajednička karakteristika podležeća upala zablježen pomak ravnoteže prema pretežno agalaktoziliranim N-glikanima sugerirajući na moguću ulogu agalaktoziliranog i asijaliniziranog profila IgG-a kao humoralnog markera upale (217–219,297,298). Također se pokazalo kako se navedeni agalaktozilirani profil IgG-a opažen tijekom kronične infekcije, postizanjem kontrole upale može izmijeniti tj. može ponovno doći do pomicanja ravnoteže prema pretežno galaktoziliranim N-glikanima (252). Rezultati ovog doktorskog rada su pokazali da težina bakterijske pneumonije pozitivno korelira upravo s razinom agalaktoziliranih N-glikana IgG-a. Naime bolesnici s teškom bakterijskom pneumonijom su imali značajno više udjele agalaktoziliranih N-glikana u odnosu na bolesnike

s blagom bakterijskom pneumonijom te je težina bolesti imala statistički značajan utjecaj na kretanje udjela agalaktoziliranih N-glikana. Najveću dijagnostičku točnost u razlikovanju blagog i teškog stupnja te srednje teškog i teškog stupnja bakterijske pneumonije postigao je dijagnostički test temeljen na prvom mjerenju (T1) agalaktoziliranih N-glikana (AUC je iznosio 81,02%, odnosno 74,92%), dok je razlika između drugog (T2) i prvog (T1) mjerenja za agalaktozilirane N-glikane postigla je najveću točnost u razlikovanju blagog i srednje teškog stupnja bakterijske pneumonije (AUC 64,23%). Navedeno je u skladu s prethodno opaženom korelacijom galaktozilacije s težinom bolesti u različitim autoimunim i infektivnim bolestima (252,254,257,260,299).

S obzirom da navedeni obrazac glikozilacije IgG-a koji je do sada bio dosljedno opažan u sklopu autoimunih bolesti – agalaktozilacija i asijalinizacija, karakterizira i kronične infektivne bolesti i brojne druge bolesti kojima je zajednička karakteristika podležeća upala, postavljena je hipoteza da su navedene promjene u galaktozilaciji rezultat humoralnog odgovora na bilo koji imunogen (300). Naime, studija Lastra i sur. (300) je pokazala da kada se miševе prebaci iz sterilnog u nesterilno okruženje dolazi do porasta titra IgG protutijela i porasta udjela agalaktoziliranih N-glikana IgG-a, dok je pak pad titra protutijela praćen porastom udjela galaktoziliranih N-glikana. Međutim, nalazi o utjecaju upale na regulaciju galaktozilacije su kontradiktorni (262). Tako su Parekh i sur. (219) pokazali kako smanjenje udjela galaktoziliranih N-glikana nije samo posljedica akutne ili kronične upale. Također, više je drugih istraživanja ukazalo i na specifičnosti u glikozilacijskom profilu imunoglobulina G u ovisnosti o specifičnom patogenu (262). Tako je istraživanje provedeno na patogen-specifičnim protutijelima izoliranim od iste osobe, pokazalo kako za HIV-specifična IgG protutijela imaju značajno različit N-glikozilacijski profil nego za influencu-specifična protutijela inducirana cijepljenjem, dokazujući da glikozilacija može biti usmjerena ovisno o patogenu odnosno aktiviranom signalnom putu kako bi se uspješno eliminiralo ciljanog patogena (263).

Populacijske studije su pokazale da su među pojedincima razlike u glikozilaciji velike (38, 39), a navedene razlike povezane su sa sklonošću pojedinim bolestima, tijekom bolesti i odgovorom na terapiju (40-43). Stoga, glikani mogu potencijalno pomoći i u stratifikaciji bolesnika s obzirom na prijemljivost nekih bolesti, tijek i ishod bolesti. U skupini bolesnika s bakterijskom pneumonijom, pokazalo se kako galaktozilacija imunoglobulina G ima i prognostički značaj u predikciji duljine boravka. Udio G0 u točki T1 se pokazao kao statistički značajan pozitivan prediktor za duljinu boravka u bolnici. Za svako 1-postotno povećanje udjela G0 u prvom mjerenju, duljina boravka bolesnika u bolnici se produžila za 0,1 dan. S druge strane, udio G1

i G2 se pokazao kao statistički značajan negativan prediktor za duljinu boravka u bolnici. Za svako 1-postotno povećanje udjela G1 i G2, duljina boravka se skratila za 0,27 dana, odnosno za 0,23 dana. Ostali glikozilacijski parametri nisu pokazali statistički značajnu povezanost s duljinom boravka u bolnici u skupini bolesnika s bakterijskom pneumonijom. Dok ovi rezultati mogu biti posljedica kako novonastale bolesti, isto tako mogu odražavati prethodnu razinu upale u organizmu i potaknuti na razmišljanje kako prethodna razina upale u organizmu bolesnika može imati kako ulogu u jačini upalnog odgovora tako i sposobnosti uravnoteženog imunosnog odgovora organizma.

Nasuprot tome, s obzirom na visoki udio N-glikana bez sržne fukoze tijekom infekcije virusom influence, povećani udio galaktozilacije IgG-a može djelovati kao kontrolni mehanizam, budući da može započeti protuupalnu kaskadu putem vezanja na inhibitorni receptor FcγRIIB (301). Zanimljiv primjer navedenog je reumatoidni artritis, bolest koja često odlazi u remisiju tijekom trudnoće, što korelira s porastom galaktozilacije u trudnoći (220,221). Nadalje opaženo je tijekom primjene antivirusne terapije u bolesnika s kroničnim hepatitisom B, kako se postizanjem kontrole upale – supresijom virusne replikacije, može ponovno doći do pomicanja ravnoteže prema galaktoziliranom IgG profilu (252).

Opažene promjene u galaktozilaciji IgG-a u bolesnika s influencom u skladu su s rezultatima analize glikozilacije IgG-a u odgovoru na infekciju s virusima s ovojnicom. Naime Larsen i sur. (174) su pokazali kako je porast afukoziliranog IgG-a u odgovoru na viruse s ovojnicom često praćen istovremenim porastom udjela galaktoziliranih glikana. Također, poznato je kako cijepljenje protiv gripe dovodi do relativno brzog i prolaznog porasta galaktozilacije antigen-specifičnog IgG-a u ljudi (269).

Kao što smo ranije naglasili, INF- $\alpha$  igra važnu ulogu u obrani organizma od virusne infekcije i pokazalo se da utječe na mehanizme glikozilacije IgG-a unutar stanica B (285). Osim što povećava udio afukoziliranih N-glikana IgG-a, pokazalo se da istodobno povećava i udio galaktoziliranih N-glikana IgG-a i to posebice digalaktoziliranih N-glikana (285). Za IFN- $\gamma$ , još jedan interferon koji igra važnu ulogu tijekom infekcije virusom influence, također se pokazalo da povećava udio galaktoziliranih N-glikana IgG-a i to ponajprije monogalaktoziliranih N-glikana, povećavajući ekspresiju B4GalT1 unutar stanica B (210,238,302). Do sada su afukozilirane i galaktozilirane strukture N-glikoma IgG-a (opažene u našoj skupini bolesnika s influencom) dovedene u vezu s pojačanom ADCC i ADCP, te je udio digalaktoziliranih N-glikana pokazao pozitivnu korelaciju s trajanjem razdoblja koje je potrebno za reaktivaciju virusa nakon prekida antiretrovirusne terapije, pokazujući protektivan učinak (196,303–305).

Naime, galaktozilacija ulomka Fc pojačava afinitet afukoziliranog IgG za Fc $\gamma$ -receptor III približno dva puta i već je ranije povećanje udjela monogalaktoziliranih i digalaktoziliranih N-glikana dovedeno u vezu s pojačanom virusnom inhibicijom i boljom kontrolom bolesti (263,306). Također, opaženo povećanje udjela galaktoziliranih N-glikana u bolesnika s influencom u skladu je s opaženim padom udjela fukoziliranih N-glikana u istoj skupini bolesnika, s obzirom da se do sada pokazalo kako je aktivnost FUT8 strogo regulirana prisutnošću galaktoze. Naime vezanje galaktoze onemogućava daljnje vezanje fukoze od strane FUT8 (236,307).

Prisutnost račvajućeg GlcNAc u glikomu IgG-a povezuje se s proupalnom aktivnošću i pojačanom ADCC, no njegov se udio u našem istraživanju smanjio u obje bolesti (214,308). Smanjenje udjela račvajućeg GlcNAc u glikomu IgG-a u bolesnika s bakterijskom pneumonijom može se barem djelomično objasniti prisutnošću sržne fukoze koja ima inhibitorni učinak na dodavanje račvajućeg GlcNAc (307,309). Iako se očekuje da sržna fukoza i dodavanje račvajućeg GlcNAc idu u suprotnom smjeru, mi smo opazili smanjenje obiju ovih karakteristika u N-glikomu IgG-a u skupini bolesnika s influencom (63,307,309,310). No, naša zapažanja iako u suprotnosti s prethodno navedenim, u skladu su s promjenama antigen-specifičnog IgG-a nakon cijepljenja protiv influence i u skladu su s promjenama ukupnog serumskog glikoma u bakterijskoj sepsi na animalnom modelu – gdje je zabilježen pad razine račvajućeg GlcNAc neovisno o tome da li se radilo o Gram-pozitivnom ili Gram-negativnom uzročniku (263,269,311). Iako značenje pada razine glikana s račvajućim GlcNAc u ukupnom serumskom glikomu na animalnom modelu bakterijske sepse nije sasvim jasno, činjenica da je IgG jedan od najzastupljenijih glikoproteina plazme i zapažanje kako tijekom sepse pad razine IgG-a korelira s povećanim mortalitetom, kao moguće objašnjenje pada razine glikana s račvajućim GlcNAc-om nameće se promjena razine IgG-a ili promjena sastava glikana IgG-a, navedeno bi se moglo potkrijepiti rezultatima ovog doktorskog rada zabilježenim u skupini bolesnika s bakterijskom pneumonijom (161,311,312). Naime, osim što je u cijeloj skupini bolesnika s bakterijskom pneumonijom zabilježen pad udjela N-glikana s račvajućim GlcNAc-om između prve i druge vremenske točke (razdoblje serokonverzije), podjelom ispitanika na skupine po težini bolesti pri prijemu, zabilježeno je kako su razine N-glikana s račvajućim GlcNAc u trećoj vremenskoj točki (dvadeset i osmog dana po prijemu) u skupini bolesnika sa srednje teškom i teškom bakterijskom pneumonijom bile značajno niže u odnosu na skupinu bolesnika s blagom bakterijskom pneumonijom, odnosno značajno je bio sporiji povratak na početne razine. Upravo je dobru dijagnostičku točnost u razlikovanju blage od teške bakterijske

pneumonije postigao dijagnostički test s biomarkerom definiranim kao razina N-glikana s račvajućim GlcNAc u prvom mjerenju (T1) s AUC koji je iznosio 73%, upućujući na potencijalni dijagnostički potencijal N-glikana s račvajućim GlcNAc u razlikovanju blage od teške bakterijske infekcije.

Također, podjelom skupine bolesnika s influencom prema težini bolesti pri prijemu na dvije skupine – skupina bolesnika s influencom bez pneumonije i skupina bolesnika s influencom i s pneumonijom, zabilježena je statistički značajna uloga razine N-glikana s račvajućim GlcNAc u razlikovanju navedenih skupina po težini bolesti. Naime, bolesnici s influencom i s pneumonijom su imali značajno niže vrijednosti N-glikana s račvajućim GlcNAc u odnosu na skupinu influence bez pneumonije. Naši rezultati su u skladu s rezultatima istraživanja glikozilacije u bolesnika s teškom COVID-19 infekcijom (174,313). Naime Petrović i sur. (313) su pokazali kako je razina N-glikana s račvajućim GlcNAc u negativnoj uzajamnoj vezi s težinom COVID-19 infekcije. No, s obzirom na dizajn studije (studija presjeka), Petrović i sur. (313) nisu bili u mogućnosti donijeti zaključak da li je opažena promjena rezultat od prije prisutnih rizičnih čimbenika u bolesnika ili rezultat brze promjene glikozilacije IgG-a. S obzirom na longitudinalni dizajn naše studije i s obzirom da se ispitivane skupine bolesnika s influencom prema težini bolesti nisu razlikovale u razini N-glikana s račvajućim GlcNAc u prvoj vremenskoj točki (nulti dan po prijemu) – sugerirajući da promjena nije rezultat od ranije prisutnih razlika među bolesnicima, možda bismo mogli zaključiti kako su opažene razlike između bolesnika s influencom bez pneumonije i bolesnika s influencom i s pneumonijom u razini N-glikana s račvajućim GlcNAc rezultat povećanja udjela nosivog antigen-specifičnog IgG-a, odnosno brze promjene u glikozilaciji IgG-a. Budući da se inače povišene vrijednosti N-glikana s račvajućim GlcNAc dovede u vezu s pojačanom aktivnošću ADCC-a (koja predstavlja značajan mehanizam obrane od virusne infekcije), značajno niža razina N-glikana s račvajućim GlcNAc u bolesnika s influencom i s pneumonijom u odnosu na bolesnike bez pneumonije, može značiti nižu aktivnost ADCC-a u bolesnika s težim oblikom bolesti (235,308). Iako opažene razlike u razini N-glikana s račvajućim GlcNAc među dvijema skupinama bolesnika s influencom (bolesnici s influencom bez pneumonije u odnosu na bolesnike s influencom i s pneumonijom) nisu postigle zadovoljavajuću dijagnostičku točnost (AUC 28,84% za B T2-T1) da bi se mogla predložiti upotreba razine N-glikana s račvajućim GlcNAc kao prediktora težine influenza infekcije, zanimljivo je opažanje kako promjene glikozilacije IgG-a koje vode gubitku ADCC mogu biti jedan od molekularnih mehanizama u podlozi teške influenza infekcije. S druge pak strane, bakterijska pneumonija uzrokovana

*Streptococcus pneumoniae* poznata je komplikacija influenza infekcije (314). Naime nemetilirani CpG-slijed (engl. *CpG oligodeoxynucleotide*, CpG ODN), izvor kojeg je bakterijska DNA, ligand je za endosomalni TLR9 u limfocitima B i ima ulogu u aktivaciji i diferencijaciji limfocita B (238,315). Proučavanjem učinka nemetiliranog CpG-slijeda na diferencijaciju limfocita B, pokazalo se da stimulacija stanica B nemetiliranim CpG-slijedom rezultira nastankom IgG-a sa smanjenim udjelom N-glikana s račvajućim GlcNAc. Navedena činjenica bi mogla biti poveznica između opaženog smanjenja N-glikana s račvajućim GlcNAc u skupini bolesnika s bakterijskom pneumonijom i u skupini bolesnika s teškim oblikom influenza infekcije – influenza s pneumonijom.

Različitosti u glikozilacijskom profilu između bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom opažene su i u rezultatima analize sijaliniziranih N-glikana IgG-a. Povećanje udjela sijaliniziranih N-glikana u bolesnika s influencom između prve i druge vremenske točke, vjerojatno je posljedica sinteze antigen-specifičnog IgG-a (176). Naime, sijalinska kiselina je potrebna za uspješno vezanje virusa influence za stanicu te stoga povećana sijalinizacija IgG-a može blokirati vezanje virusa za stanicu preko hemaglutinina, oponašajući sijalosaharidne receptore na stanici domaćina (36,39,203,316). Ujedno, ta sijalinizirana IgG protutijela vezana za antigen, jedan su od faktora koji utječu na kvalitetu odgovora na antigene influence vezujući se za Fc-receptor CD23 na aktiviranim limfocitima B, čime pojačavaju ekspresiju inhibitornog Fc $\gamma$ -receptora IIB na zrelih, aktiviranim stanicama B, podižući prag za aktivaciju BCR i time potičući sazrijevanje onih stanica B koje stvaraju neutralizirajuća protutijela visokog afiniteta za vezanje antigena (176,203). Imunizacija takvim sijaliniziranim imunokompleksom (HA vezan za IgG sa sijaliniziranim ulomkom Fc), rezultirala je nastankom molekula IgG-a s visokim afinitetom za nepromjenjivi dio HA imajući potencijalnu primjenu u razvoju učinkovitije imunizacije u borbi protiv infekcije virusom influence (176,203).

Također, dodavanje sijalinske kiseline ulomku Fc IgG-a mijenja izvršni odgovor imunoglobulina G iz proupalnog u protuupalni (178,185,201,228). Upravo se terapijska, protuupalna aktivnost visokih doza IVIG pripravaka pripisuje prisutnosti sijalinske kiseline na protutijelima (178,185). Naime, sijalinizirani Fc ulomci IVIG pripravka (a prema pojedinim istraživanjima i sijalinizirani Fab ulomci) vežu se i aktiviraju tip II Fc-receptora (tzv. o glikanu ovisni receptori, primjer kojih su DC-SIGN i CD23 receptori) (154,178,185,200,211,228). Jedna od poznatih posljedica aktivacije tipa II Fc-receptora je pokretanje protuupalne aktivnosti tj. poboljšana kontrola upale (176,184). Poznato je kako je upotreba IVIG pripravaka tijekom pandemija uzrokovanih virusom influence 1918. i 2009. godine smanjila mortalitet za 26%



odnosno 50%, a nedavna istraživanja ukazuju da bi uspješnost mogla biti i veća modifikacijom za influencu specifičnih protutijela u hIVIG pripravcima (engl. *hyperimmune intravenous immunoglobulin*, hIVIG) – tzv. Flu-IVIG pripravcima (317–319). S druge pak strane, sijalinizacija imunoglobulina G nema utjecaja na pokretanje ADCC (195). Budući da se imunosni odgovor na influencu ponajprije odvija u plućima, gdje je poželjna brza eliminacija patogena bez pretjerane upale, profil glikozilacije IgG-a koji ima sposobnost pokretanja ADCC-a (opažena afukozilacija i galaktozilacija u skupini bolesnika s influencom), a istovremeno ima protuupalnu aktivnost (povećanje udjela sijaliniziranih glikana i pad udjela glikana s računjućim GlcNAc-om), bi bio primjer savršeno uravnoteženog zaštitnog imunosnog odgovora (320). Upravo profil glikozilacije koji smo mi opazili u bolesnika s influencom – porast udjela galaktoziliranih i sijaliniziranih N-glikana, uz pad udjela fukoziliranih N-glikana i N-glikana s računjućim GlcNAc-om, odgovara prethodno opisanom zaštitnom profilu glikozilacije, a isti profil glikozilacije opazili su Mahan i sur. (263) i Selman i sur. (269) na za influencu-specifičnim protutijelima nakon primjene cjepiva protiv gripe. Međutim, za razliku od ove dvije studije u kojima nisu opažene nikakve promjene na ukupnom IgG-u, mi smo opazili istovjetan profil glikozilacije, ali na ukupnom IgG-u (263,269).

Početno povećanje sijalinizacije praćeno je padom između druge i treće vremenske točke u obje bolesti. Ovaj pomak prema više proupalnom IgG glikozilacijskom profilu mogao bi biti posljedica stečenih mehanizama tijekom prolongirane infekcije putem aktivacije tipa I Fc $\gamma$ -receptora (176,214). Štoviše, u slučaju influence također bi to moglo biti posljedica promjene u mjestu nastajanja IgG iz plazmablasta u memorijske B stanice kao što je opaženo tri tjedna nakon cijepjenja protiv influence (176).

Suprotno skupini bolesnika s influencom, u skupini bolesnika s bakterijskom pneumonijom imamo statistički značajan trend pada sijalinizacije tijekom cijelog ispitivanog razdoblja. Navedeni pad sijalinizacije može se barem djelomično objasniti niskim udjelom galaktoziliranih N-glikana, budući da je za dodavanje sijalične kiseline N-glikanu IgG-a nužna prisutnost galaktoze (159). Navedena promjena u razini sijalinizacije može predstavljati prekretnicu između prirodno protuupalnog stanja organizma u stanju homeostaze prema stečenom proupalnom stanja nakon stimulacije nepoznatim antigenom (200). Pad sijalinizacije zajedno s agalaktoziliranim profilom IgG-a kojeg smo opazili u skupini bolesnika s bakterijskom pneumonijom prati proupalni profil glikozilacije IgG-a do sada opisan kod autoimunih i kroničnih infektivnih bolesti (219,252,254,255,260). Ono što je moguća podloga navedenog opažanja, a zajedničko je autoimunim bolestima i kroničnim infektivnim bolestima,

je jaka i dugotrajna upala sugerirajući na moguću ulogu agalaktoziliranog i asijaliniziranog profila IgG-a kao humoralnog markera upale (160). Navedeno ne čudi s obzirom da je potvrđeno kako glikozilacija IgG-a i upalne bolesti dijele pojedine zajedničke genetske regulatorne mehanizme (160). U prilog navedenom ide znatno jači upalni odgovor koji smo zabilježili u skupini bolesnika s bakterijskom pneumonijom u odnosu na skupinu bolesnika s influencom. Također, pokazalo se da autoimune bolesti i bakterijska pneumonija dijele zajednički citokinski profil – povišena razina IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-21, IL-17A i pojačana ekspresija citokina BAFF i APRIL, za koje se pokazalo da utječu na glikozilaciju IgG-a unutar limfocita B (10,210,321–325). Međutim Parekh i sur. (219), usporednom analizom različitih autoimunih i infektivnih bolesti, su pokazali da smanjenje galaktozilacije (kao obilježje autoimunog profila glikozilacije) nije jednoznačno posljedica akutne ili kronične upale. Stoga da li je profil glikozilacije IgG posljedica samo upale ili je reguliran ovisno o antigenu odnosno patogenu ili možda pak posljedica jednog i drugog nije još uvijek u potpunosti jasno.

Kao još jedno moguće objašnjenje profila glikozilacije opaženog u bolesnika s bakterijskom pneumonijom (smanjenje sijalinizacije i galaktozilacije) jest specifičnost imunskog odgovora u borbi protiv izvanstaničnih bakterija. Naime smanjenje sijalinizacije i galaktozilacije povezuje s pojačanom aktivacijom komplementa i pojačanom fagocitozom, obrambenim mehanizmima za koje znamo da igraju važnu ulogu u obrani organizma od infekcije uzrokovane izvanstaničnim bakterijama (263,291,292).

Za istaknuti je kako su rezultati ovog istraživanja pokazali kako je glikozilacija IgG-a unutar kontrolne skupine, za razliku od skupine bolesnika s influencom i bakterijskom pneumonijom, bila stabilna tijekom cijelog perioda praćenja.

Zaključno, rezultati ovog istraživanja upućuju na dijametralno suprotan glikozilacijski profil u bolesnika s virusnom infekcijom (bolesnici s influencom) i bolesnika s bakterijskom infekcijom (bakterijska pneumonija) upućujući na prisutnost za bolest specifičnih promjena glikozilacije i imajući potencijalnu dijagnostičku i/ili prognostičku vrijednost. Naime, obrazac glikozilacije opažen u bolesnika s bakterijskom pneumonijom karakteriziran je porastom udjela agalaktoziliranih i asijaliniziranih N-glikana što se povezuje s pojačanom upalom i pojačanom aktivacijom komplementa i fagocitozom, obrambenim mehanizmima za koje znamo da igraju važnu ulogu u obrani organizma od infekcije uzrokovane izvanstaničnim bakterijama. Suprotno tome, obrazac glikozilacije opažen u bolesnika s influencom obilježen je porastom udjela afukoziliranih i galaktoziliranih N-glikana (profil glikozilacije IgG-a koji ima sposobnost

pokretanja ADCC i o protutijelima ovisne virusne inhibicije) i povećanjem udjela sijaliniziranih glikana i padom udjela N-glikana s računajućim GlcNAc (što se povezuje s sposobnošću protutijela da neutraliziraju virus influence i protuupalnom aktivnošću). Stoga, opaženi profil u bolesnika s influencom u skladu je s dobro poznatim mehanizmima imunosne obrane u borbi protiv virusne infekcije i primjer je dobro uravnoteženog zaštitnog imunosnog odgovora usmjerenog na brzu eliminaciju patogena bez pretjerane upale. Navedene razlike u N-glikomu IgG-a između bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom jasno pokazuju kako je glikozilacija IgG-a rezultat različitih imunosnih putova u podlozi dviju navedenih bolesti.

Opažene promjene u glikozilaciji IgG-a promatrane su na ukupnom IgG-u te se na temelju rezultata ovog rada ne mogu donositi zaključci o promjenama glikozilacije antigen-specifičnog IgG-a. Tumačenje rezultata analize glikozilacije IgG-a u prvom mjerenju dijelom je ograničeno nepostojanjem podataka o profilu glikozilacije IgG-a u bolesnika tijekom perioda homeostaze, tj. prije infekcije i nepostojanjem podataka o genetskim različitostima među pojedincima za koje je također poznato da imaju utjecaj na glikozilacijski profil pojedinca. Navedena ograničenja su stoga i pokušana zaobići strogim uključnim i isključnim kriterijima, longitudinalnim dizajnom studije, ispitivanjem promjena glikozilacije IgG-a kako u skupinama bolesnika tako i u kontrolnoj skupini zdravih ispitanika (u kojoj je kretanje glikozilacije IgG-a bilo stabilno tj. bez promjena) i kontrolirajući na utjecaj dobi i spola tijekom statističke obrade podataka. S obzirom da je istraživanje provedeno u bjelačkoj populaciji, rezultati istraživanja se nemogu poopćiti na druge rase i etničke skupine.

Promjene glikozilacije imunoglobulina G u sklopu influence su do sada prema našim saznanjima opisane u ljudi samo nakon cijepljenja protiv influence te su rezultati navedenih istraživanja nekonzistentni. S obzirom da je humoralni imunosni odgovor osnova zaštitne cjepivom inducirane imunosti, dobro su poznata nastojanja da se cjepivima pokuša oponašati osobine zaštitne humoralne imunosti u sklopu prirodne infekcije. Smatramo da bi jedan od doprinosa ovog rada bilo upravo otkrivanje karakteristika zaštitnog humoralnog imunosnog odgovora u sklopu prirodne infekcije i u ovisnosti o težini kliničke slike što može pomoći u prenošenju navedenih spoznaja u svrhu razvoja učinkovitije i sigurnije imunizacije.

Problem postavljanja etiološke dijagnoze pneumonije upotrebom dosadašnjih mikrobioloških metoda potiče na potragu za novim biomarkerima u sistemskoj cirkulaciji. Razlikovanje virusne i bakterijske etiologije u akutnim respiratornim infekcijama, s obzirom na različiti terapijski

pristup, je od posebnog interesa kako za istraživače tako i za kliničare. Stoga rezultati ovog doktorskog rada koji ukazuju kako određivanje glikozilacijskog profila IgG-a može poslužiti kao dijagnostički biomarker u razlikovanju virusne (influenca) od bakterijske infekcije (bakterijske pneumonije), su od posebnog interesa.

S obzirom na važnu terapijsku ulogu nespecifične glikozilacije u ublažavanju upale, primjer čega je IVIG, razumijevanje ključnih modifikatora glikozilacije ukupnog IgG-a može, ne samo pomoći kontrolirati upalu uzrokovanu imunosnim odgovorom, već i pružiti uvid u populacije pod rizikom za pojedine infekcije. Stoga glikani mogu potencijalno pomoći u stratifikaciji bolesnika s obzirom na prijemljivost nekih bolesti, tijekom i ishod bolesti.

Također, s obzirom na povećanu rezistenciju na antibiotike i mogućnost da se laboratorijskim modifikacijama N-glikana IgG-a podesi terapijska svojstva monoklonskih protutijela i saznanje kako Fc-glikozilacija ima važno mjesto u kontroli infekcije – za patogen-specifičnim usmjeravanjem imunosnog odgovora, identificiranje različitih glikozilacijskih profila IgG-a tijekom prirodne infekcije različitim patogenima, preduvjet je za oblikovanje terapijskih protutijela koja pokreću optimalne izvršne imunosne mehanizme za eliminaciju pojedinog patogena.

I naposljetku, bilo bi zanimljivo istražiti povezanost opaženih promjena kako s različitim markerima upale tako i s različitim izvršnim imunosnim mehanizmima u ljudi tijekom prirodne infekcije ispitivanim patogenima.

## 7. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju su po prvi puta sistematično proučavane i uspoređene promjene N-glikoma imunoglobulina G u prirodnoj infekciji virusom influence i bakterijskoj infekciji (bakterijskoj pneumoniji) u ljudi.

Usporedbom N-glikozilacijskog profila imunoglobulina G u bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom opažene su dijametralno suprotne razlike u glikozilacijskom profilu imunoglobulina G. Dok je obrazac glikozilacije opažen u bolesnika s influencom obilježen porastom udjela afukoziliranih, galaktoziliranih i sijaliniziranih N-glikana, suprotno tome obrazac glikozilacije opažen u bolesnika s bakterijskom pneumonijom karakteriziran je porastom udjela fukoziliranih, agalaktoziliranih i asijaliniziranih N-glikana, ukazujući kako je glikozilacija imunoglobulina G pod utjecajem različitih molekularnih puteva specifičnih za pojedinu bolest. Ovi rezultati potvrđuju da se glikozilacija imunoglobulina G u bolesnika s influencom razlikuje od glikozilacije imunoglobulina G u bolesnika s bakterijskom pneumonijom, te su navedeni rezultati u skladu s postavljenom hipotezom.

Uzimajući u obzir i rezultate dosadašnjih istraživanja, rezultati ovog doktorskog rada upućuju na razmišljanje kako je tijekom infekcije virusom influence imunosni odgovor reguliran na način da se pojačava ADCC smanjenjem udjela fukozilacije, dok povećanje sijalinizacije neutralizira virusnu infekciju i potiče proizvodnju visokoafinitetnog neutralizirajućeg imunoglobulina G. Nasuprot tome, tijekom bakterijske pneumonije promjene N-glikoma imunoglobulina G više su usmjerene prema povećanju aktivacije komplementskog sustava kroz smanjenje galaktozilacije.

Sve prikazane promjene N-glikozilacije bile su opažene na ukupnom imunoglobulinu G, ukazujući da promjene u glikozilaciji IgG protutijela nisu posljedica samo promjene glikozilacije antigen-specifičnih protutijela, već su posljedica sistemskog odgovora na infekciju. S obzirom na sistemski karakter ovih promjena, sržna fukozilacija kao najizraženija razlika između bakterijske i virusne infekcije opažena u ranoj fazi infekcije, može biti polazna točka za buduća istraživanja u kojima bi se upravo sržna fukozilacija mogla koristiti kao dodatan alat za razlikovanje ovih dvaju tipova infekcije. Najveću dijagnostičku točnost (AUC = 75%) u razlikovanju ova dva tipa infekcije postigao je dijagnostički test s biomarkerom definiranim kao razlikom između drugog i prvog mjerenja za digalaktozilirane N-glikane imunoglobulina G, potvrđujući kako određivanje glikozilacijskog profila imunoglobulina G

može poslužiti kao dijagnostički biomarker u razlikovanju virusne (influenca) od bakterijske infekcije (bakterijske pneumonije).

Utvrđivanjem dinamike glikozilacijskog profila imunoglobulina G tijekom bolesti u obje skupine bolesnika pokazalo se da glikozilacija imunoglobulina G ima i prognostičku vrijednost u predikciji težine bolesti i ishoda liječenja u bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom. Tako je udio agalaktoziliranih N-glikana bio je značajno viši u skupini bolesnika s teškom bakterijskom pneumonijom, te se pokazao kao statistički značajan pozitivan prediktor duljine boravka u bolnici. Dok se podjelom skupine bolesnika s influencom prema težini bolesti pokazalo kako su bolesnici s influencom i s pneumonijom imali značajno niže vrijednosti N-glikana s račvajućim GlcNAc u odnosu na skupinu bolesnika s influencom bez pneumonije.

Kada se sve uzme u obzir, uočene promjene N-glikoma imunoglobulina G ukazuju na činjenicu kako je glikozilacija imunoglobulina G dinamičan i strogo reguliran proces koji omogućava fino podešavanje imunosnog odgovora domaćina na specifičnog patogena. Zaključno, glikozilacijski profil imunoglobulina G može poslužiti kao biomarker s dijagnostičkim (razlikovanje virusne od bakterijske infekcije) i prognostičkim značenjem (predikcija težine bolesti i ishoda liječenja) u bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom.

## 8. KRATKI SADRŽAJ

Cilj ovog rada je bio usporediti N-glikozilacijski profil imunoglobulina G u bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom i utvrditi može li određivanje glikozilacijskog profila imunoglobulina G poslužiti kao dijagnostički i prognostički biomarker.

U istraživanje je uključeno 75 odraslih bolesnika hospitaliziranih zbog bakterijske pneumonije, 64 odrasla bolesnika hospitalizirana zbog influence i 56 zdravih ispitanika. U tri navrata (1., 7. i 28. dana od prijema) metodama kromatografije određen je glikozilacijski profil imunoglobulina G u serumu svih bolesnika i zdravih ispitanika. Tijekom istraživanja prikupljeni su brojni podatci o težini bolesti i ishodu liječenja. Razlike u glikozilaciji među ispitivanim skupinama ispitanika su implementacijom linearnog mješovitog modela, dok smo dijagnostički potencijal procijenili koristeći se ROC analizom. Prognostički potencijal u predikciji duljine boravka u bolnici istražili smo upotrebom modela linearne regresije.

Opažene su dijametralno suprotne razlike u glikozilacijskom profilu u bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom. Dok je obrazac glikozilacije opažen u bolesnika s influencom obilježen porastom udjela afukoziliranih, galaktoziliranih i sijaliniziranih N-glikana, suprotno tome obrazac glikozilacije opažen u bolesnika s bakterijskom pneumonijom karakteriziran je porastom udjela fukoziliranih, agalaktoziliranih i asijaliniziranih N-glikana. Najveću dijagnostičku točnost ( $AUC = 75\%$ ) u razlikovanju ova dva tipa infekcije postigao je dijagnostički test s biomarkerom definiranim kao razlikom između drugog i prvog mjerenja za digalaktozilirane N-glikane imunoglobulina G. Udio agalaktoziliranih N-glikana bio je značajno viši u skupini bolesnika s teškom bakterijskom pneumonijom i pokazao se kao statistički značajan pozitivan prediktor duljine boravka u bolnici. Dok se podijelom skupine bolesnika s influencom prema težini bolesti pokazalo kako su bolesnici s influencom i s pneumonijom imali značajno niže vrijednosti N-glikana s račvajućim GlcNAc u odnosu na skupinu influence bez pneumonije.

Zaključno, glikozilacijski profil imunoglobulina G može poslužiti kao biomarker s dijagnostičkim (razlikovanje virusne od bakterijske infekcije) i prognostičkim značenjem (predikcija težine bolesti i ishoda liječenja) u bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom.

**Ključne riječi:** bakterijska pneumonija, biomarkeri, glikozilacija, imunoglobulin G, influenza.

## 9. SUMMARY

### **Comparison of Immunoglobulin G Glycosylation in Influenza and Bacterial Pneumonia Patients**

Marina Kljaković-Gašpić Batinjan, 2024.

The aim of this study was to compare the N-glycosylation profile of immunoglobulin G (IgG) in patients with influenza and patients with bacterial pneumonia, and to determine whether the glycosylation profile of IgG could serve as a diagnostic and prognostic biomarker.

The study included 75 adult patients with bacterial pneumonia, 64 adult patients with influenza, and 56 healthy subjects. Glycosylation profile of IgG in the serum of all subjects was determined by chromatographic methods on three occasions. Differences between the studied groups were examined with a linear mixed model, while the diagnostic potential was assessed using ROC analysis and the prognostic potential using a linear regression model. Diametrically opposite differences were observed in influenza and bacterial pneumonia patients (with an AUC of 0.75 for digalactosylated N-glycans). Agalactosylated N-glycans were significantly higher in the group of patients with severe bacterial pneumonia and proved to be a positive predictor of the length of hospital stay, while patients with severe influenza had significantly lower values of N-glycans with bisecting GlcNAc.

In conclusion, the glycosylation profile of immunoglobulin G could serve as a diagnostic and prognostic biomarker in patients with influenza and bacterial pneumonia.

**Key words:** bacterial pneumonia, biomarkers, glycosylation, immunoglobulin G, influenza.



## 10. POPIS LITERATURE

1. GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016 Oct 8;388(10053):1545–602. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31678-6
2. Stockwell MS, Reed C, Vargas CY, Wang L, Alba LR, Jia H, i sur. Five-year community surveillance study for acute respiratory infections using text messaging: findings from the MoSAIC study. *Clin Infect Dis*. 2022 Sep 29;75(6):987–95. doi: 10.1093/cid/ciac027
3. Garibaldi RA. Epidemiology of community-acquired respiratory tract infections in adults. Incidence, etiology, and impact. *Am J Med*. 1985 Jun 28;78(6B):32-7. doi: 10.1016/0002-9343(85)90361-4
4. Finley CR, Chan DS, Garrison S, Korownyk C, Kolber MR, Campbell S, i sur. What are the most common conditions in primary care? Systematic review. *Can Fam Physician*. 2018 Nov;64(11):832–40.
5. Shapiro DJ, Hicks LA, Pavia AT, Hersh AL. Antibiotic prescribing for adults in ambulatory care in the USA, 2007-09. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Jan;69(1):234-40. doi: 10.1093/jac/dkt301
6. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015 Jan 10;385(9963):117–71. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61682-2
7. Bartlett JG. Diagnostic tests for agents of community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2011 May;52 Suppl 4:S296-304. doi: 10.1093/cid/cir045
8. Kuzman I, Rakušić N, Čivljak R, Puljiz I, Kutleša M, Topić A, i sur. Hrvatske smjernice za liječenje pneumonija iz opće populacije u odraslih. *Liječ Vjesn*. 2017;177–91.
9. Woodhead M, Blasi F, Ewig S, Garau J, Huchon G, Ieven M, i sur. Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections - full version. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Nov;17 Suppl 6:E1–59. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03672.x
10. Eddens T, Kolls JK. Host defenses against bacterial lower respiratory tract infection. *Curr Opin Immunol*. 2012 Aug;24(4):424–30. doi: 10.1016/j.coi.2012.07.005
11. Cillóniz C, Civljak R, Nicolini A, Torres A. Polymicrobial community-acquired pneumonia: An emerging entity. *Respirology*. 2016 Jan 1;21(1):65-75. doi: 10.1111/resp.12663

12. Kuzman I. Pneumonije: uzročnici i dijagnostika. *Medicus*. 2005;14:71-82.
13. Amaro R, Liapikou A, Cilloniz C, Gabarrus A, Marco F, Sellares J, i sur. Predictive and prognostic factors in patients with blood-culture-positive community-acquired pneumococcal pneumonia. *Eur Respir J*. 2016 Sep 1;48(3):797-807. doi: 10.1183/13993003.00039-2016
14. Zhang D, Yang D, Makam AN. Utility of blood cultures in pneumonia. *Am J Med*. 2019 Oct;132(10):1233-8. doi: 10.1016/j.amjmed.2019.03.025
15. Signori LGH, Ferreira MW, Vieira LCHR, Müller KR, Mattos WLLD de. Sputum examination in the clinical management of community-acquired pneumonia. *J Bras Pneumol*. 2008 Mar;34(3):152-8. doi: 10.1590/s1806-37132008000300005
16. Rosón B, Carratalà J, Verdaguier R, Dorca J, Manresa F, Gudiol F. Prospective study of the usefulness of sputum Gram stain in the initial approach to community-acquired pneumonia requiring hospitalization. *Clin Infect Dis*. 2000 Oct;31(4):869-74. doi: 10.1086/318151
17. Molinos L, Zalacain R, Menéndez R, Reyes S, Capelastegui A, Cillóniz C, i sur. Sensitivity, specificity, and positivity predictors of the Pneumococcal urinary antigen test in community-acquired pneumonia. *Ann Am Thorac Soc*. 2015 Oct;12(10):1482–9. doi: 10.1513/AnnalsATS.201505-304OC
18. Sopena N, Sabrià M, Pedro-Botet ML, Reynaga E, García-Núñez M, Domínguez J, i sur. Factors related to persistence of Legionella urinary antigen excretion in patients with legionnaires' disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002 Dec;21(12):845-8. doi: 10.1007/s10096-002-0839-5
19. Schreckenberger PC, McAdam AJ. Point-counterpoint: Large multiplex PCR panels should be first-line tests for detection of respiratory and intestinal pathogens. *J Clin Microbiol*. 2015 Oct 1;53(10):3110-5. doi: 10.1128/JCM.00382-15
20. Eshwara VK, Mukhopadhyay C, Rello J. Community-acquired bacterial pneumonia in adults: An update. *Indian J Med Res*. 2020 Apr;151(4):287-302. doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_1678\_19
21. Hohenthal U, Hurme S, Helenius H, Heiro M, Meurman O, Nikoskelainen J, i sur. Utility of C-reactive protein in assessing the disease severity and complications of community-acquired pneumonia. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Nov;15(11):1026-32. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02856.x

22. Eccles S, Pincus C, Higgins B, Woodhead M; Guideline Development Group. Diagnosis and management of community and hospital acquired pneumonia in adults: Summary of NICE guidance. *BMJ*. 2014 Dec 3;349:g6722. doi: 10.1136/bmj.g6722
23. Schuetz P, Albrich W, Mueller B. Procalcitonin for diagnosis of infection and guide to antibiotic decisions: Past, present and future. *BMC Med*. 2011 Sep 22;9:107. doi: 10.1186/1741-7015-9-107
24. Menéndez R, Martínez R, Reyes S, Mensa J, Filella X, Marcos MA, i sur. Biomarkers improve mortality prediction by prognostic scales in community-acquired pneumonia. *Thorax*. 2009 Jul;64(7):587-91. doi: 10.1136/thx.2008.105312
25. Blasi F, Bocchino M, Di Marco F, Richeldi L, Aliberti S. The role of biomarkers in low respiratory tract infections. *Eur J Intern Med*. 2012 Jul;23(5):429-35. doi: 10.1016/j.ejim.2012.05.002
26. Vasileva D, Badawi A. C-reactive protein as a biomarker of severe H1N1 influenza. *Inflamm Res*. 2019 Jan;68(1):39-46. doi: 10.1007/s00011-018-1188-x
27. Finch S, Keir HR, Dicker AJ, Chalmers JD. The past decade in bench research into pulmonary infectious diseases: What do clinicians need to know? *Respirology*. 2017 Aug;22(6):1062-72. doi: 10.1111/resp.13106
28. Thompson CI, Barclay WS, Zambon MC, Pickles RJ. Infection of human airway epithelium by human and avian strains of influenza A virus. *J Virol*. 2006 Aug 15;80(16):8060-8. doi: 10.1128/JVI.00384-06
29. Puljiz I, Kuzman I. Gripa-uvijek aktualna bolest. *Medicus*. 2005;14(1):137-46.
30. Paget J, Spreeuwenberg P, Charu V, Taylor RJ, Iuliano AD, Bresee J, i sur. Global mortality associated with seasonal influenza epidemics: New burden estimates and predictors from the GLaMOR Project. *J Glob Health*. 2019 Dec;9(2):020421. doi: 10.7189/jogh.09.020421
31. Paget J, Staaedegaard L, Wang X, Li Y, van Pomeran T, van Summeren J, i sur. Global and national influenza-associated hospitalisation rates: Estimates for 40 countries and administrative regions. *J Glob Health*. 2023 Jan 27;13:04003. doi: 10.7189/jogh.13.04003
32. Tokars JI, Olsen SJ, Reed C. Seasonal incidence of symptomatic influenza in the United States. *Clin Infect Dis*. 2018 May 2;66(10):1511-8. doi: 10.1093/cid/cix1060
33. Chen L, Han X, Li Y, Zhang C, Xing X. FluA-p score: A novel prediction rule for mortality in influenza A-related pneumonia patients. *Respir Res*. 2020 May 8;21(1):109. doi: 10.1186/s12931-020-01379-z

34. Samji T. Influenza A: Understanding the viral life cycle. *Yale J Biol Med.* 2009 Dec;82(4):153-9.
35. Wiley DC, Skehel JJ. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem.* 1987;56(1):365-94. doi: 10.1146/annurev.bi.56.070187.002053
36. Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:531-69. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.531
37. Mitnaul LJ, Matrosovich MN, Castrucci MR, Tuzikov AB, Bovin N V, Kobasa D, i sur. Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus. *J Virol.* 2000;74(13):6015-20. doi: 10.1128/jvi.74.13.6015-6020.2000
38. Hashimoto G, Wright PF, Karzon DT. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against influenza virus-infected cells. *J Infect Dis.* 1983 Nov;148(5):785-94. doi: 10.1093/infdis/148.5.785
39. Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature.* 1988 Jun 2;333(6172):426-31. doi: 10.1038/333426a0
40. Basak S, Tomana M, Compans RW. Sialic acid is incorporated into influenza hemagglutinin glycoproteins in the absence of viral neuraminidase. *Virus Res.* 1985 Feb;2(1):61-8. doi: 10.1016/0168-1702(85)90060-7
41. Palese P, Tobita K, Ueda M, Compans RW. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology.* 1974 Oct;61(2):397-410. doi: 10.1016/0042-6822(74)90276-1
42. McAuley JL, Gilbertson BP, Trifkovic S, Brown LE, McKimm-Breschkin JL. Influenza virus neuraminidase structure and functions. *Front Microbiol.* 2019 Jan 29;10:39. doi: 10.3389/fmicb.2019.00039
43. de la Tabla VO, Masiá M, Antequera P, Martin C, Gazquez G, Buñuel F, i sur. Comparison of combined nose-throat swabs with nasopharyngeal aspirates for detection of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by real-time reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol.* 2010 Oct;48(10):3492-5. doi: 10.1128/JCM.01105-10

44. Vemula S, Zhao J, Liu J, Wang X, Biswas S, Hewlett I. Current approaches for diagnosis of influenza virus infections in humans. *Viruses*. 2016 Apr 12;8(4):96. doi: 10.3390/v8040096
45. Nicholson KG. Clinical features of influenza. *Semin Respir Infect*. 1992 Mar;7(1):26-37.
46. Almond MH, McAuley DF, Wise MP, Griffiths MJD. Influenza-related pneumonia. *Clin Med (Lond)*. 2012 Feb;12(1):67-70. doi: 10.7861/clinmedicine.12-1-67
47. Rello J, Rodríguez A, Ibañez P, Socias L, Cebrian J, Marques A, i sur. Intensive care adult patients with severe respiratory failure caused by Influenza A (H1N1)v in Spain. *Crit Care*. 2009;13(5):R148. doi: 10.1186/cc8044
48. Garg S, Jain S, Dawood FS, Jhung M, Pérez A, D’Mello T, i sur. Pneumonia among adults hospitalized with laboratory-confirmed seasonal influenza virus infection – United States, 2005-2008. *BMC Infect Dis*. 2015 Aug 26;15:369. doi: 10.1186/s12879-015-1004-y
49. Ishida T, Seki M, Oishi K, Tateda K, Fujita J, Kadota JI, i sur. Clinical manifestations of adult patients requiring influenza-associated hospitalization: A prospective multicenter cohort study in Japan via internet surveillance. *J Infect Chemother*. 2021 Mar;27(3):480-5. doi: 10.1016/j.jiac.2020.10.021
50. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1529-31. doi: 10.1126/science.1093616
51. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, i sur. Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1526–9. doi: 10.1126/science.1093620
52. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005 Jan;17(1):1-14. doi: 10.1093/intimm/dxh186
53. Sandler NG, Bosinger SE, Estes JD, Zhu RTR, Tharp GK, Boritz E, i sur. Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature*. 2014 Jul 31;511(7511):601-5. doi: 10.1038/nature13554
54. Kwaa AKR, Talana CAG, Blankson JN. Interferon alpha enhances NK cell function and the suppressive capacity of HIV-specific CD8+ T cells. *J Virol*. 2019 Jan 17;93(3):e01541-18. doi: 10.1128/JVI.01541-18
55. Zwirner NW, Domaica CI. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *Biofactors*. 2010;36(4):274-88. doi: 10.1002/biof.107

56. Soto JA, Gálvez NMS, Andrade CA, Pacheco GA, Bohmwald K, Berrios RV., i sur. The role of dendritic cells during infections caused by highly prevalent viruses. *Front Immunol.* 2020 Jul 16;11:1513. doi: 10.3389/fimmu.2020.01513
57. Diebold SS. Activation of dendritic cells by Toll-like receptors and C-type lectins. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(188):3-30. doi: 10.1007/978-3-540-71029-5\_1
58. Bergtold A, Desai DD, Gavhane A, Clynes R. Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity.* 2005 Nov;23(5):503-14. doi: 10.1016/j.immuni.2005.09.013
59. Garside P, Ingulli E, Merica RR, Johnson JG, Noelle RJ, Jenkins MK. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science.* 1998 Jul 3;281(5373):96-9. doi: 10.1126/science.281.5373.96
60. Ma CS, Deenick EK, Batten M, Tangye SG. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med.* 2012 Jul 2;209(7):1241-53. doi: 10.1084/jem.20120994
61. Pape KA, Catron DM, Itano AA, Jenkins MK. The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity.* 2007 Apr;26(4):491-502. doi: 10.1016/j.immuni.2007.02.011
62. McHeyzer-Williams M, Okitsu S, Wang N, McHeyzer-Williams L. Molecular programming of B cell memory. *Nat Rev Immunol.* 2011 Dec 9;12(1):24-34. doi: 10.1038/nri3128
63. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014 Oct 20;5:520. doi: 10.3389/fimmu.2014.00520
64. Wrammert J, Koutsonanos D, Li GM, Edupuganti S, Sui J, Morrissey M, i sur. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. *J Exp Med.* 2011 Jan 17;208(1):181-93. doi: 10.1084/jem.20101352
65. Lee FEH, Halliley JL, Walsh EE, Moscatiello AP, Kmush BL, Falsey AR,i sur. Circulating human antibody-secreting cells during vaccinations and respiratory viral infections are characterized by high specificity and lack of bystander effect. *J Immunol.* 2011 May 1;186(9):5514-21. doi: 10.4049/jimmunol.1002932
66. Vandervan HA, Jegaskanda S, Wheatley AK, Kent SJ. Antibody-dependent cellular cytotoxicity and influenza virus. *Curr Opin Virol.* 2017 Feb 1;22:89-96. doi: 10.1016/j.coviro.2016.12.002

67. Chiu C, Ellebedy AH, Wrammert J, Ahmed R. B cell responses to influenza infection and vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;386:381-98. doi: 10.1007/82\_2014\_425
68. Laoprasopwattana K, Libraty DH, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Ennis FA, i sur. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by plasma obtained before secondary dengue virus infections: Potential involvement in early control of viral replication. *J Infect Dis*. 2007 Apr 15;195(8):1108-16. doi: 10.1086/512860
69. Liu Q, Fan C, Li Q, Zhou S, Huang W, Wang L, i sur. Antibody-dependent-cellular-cytotoxicity-inducing antibodies significantly affect the post-exposure treatment of Ebola virus infection. *Sci Rep*. 2017 Mar 30;7(1):45552. doi: 10.1038/srep45552
70. Sulicaa A, Morel P, Metes D, Herberman RB. Ig-binding receptors on human NK cells as effector and regulatory surface molecules. *Int Rev Immunol*. 2001 Jan;20(3-4):371-414. doi: 10.3109/08830180109054414
71. Perussia B, Acuto O, Terhorst C, Faust J, Lazarus R, Fanning V, i sur. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. II. Studies of B73.1 antibody-antigen interaction on the lymphocyte membrane. *J Immunol*. 1983 May;130(5):2142-8.
72. Ritz J, Schmidt RE, Michon J, Hercend T, Schlossman SF. Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv Immunol*. 1988;42:181-211. doi: 10.1016/s0065-2776(08)60845-7
73. Perussia B, Trinchieri G, Jackson A, Warner NL, Faust J, Rumpold H, i sur. The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: Phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1984 Jul 1;133(1):180-9. doi: 10.4049/jimmunol.133.1.180
74. Nimmerjahn F, Ravetch J V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jan;8(1):34-47. doi: 10.1038/nri2206
75. De Maria A, Bozzano F, Cantoni C, Moretta L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-γ on activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jan 11;108(2):728-32. doi: 10.1073/pnas.1012356108
76. Oliva A, Kinter AL, Vaccarezza M, Rubbert A, Catanzaro A, Moir S, i sur. Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro. *J Clin Invest*. 1998 Jul 1;102(1):223-31. doi: 10.1172/JCI2323

77. Terajima M, Co MDT, Cruz J, Ennis FA. High antibody-dependent cellular cytotoxicity antibody titers to H5N1 and H7N9 avian influenza A viruses in healthy US adults and older children. *J Infect Dis.* 2015 Oct 1;212(7):1052-60. doi: 10.1093/infdis/jiv181
78. Greenberg SB, Criswell BS, Six HR, Couch RB. Lymphocyte cytotoxicity to influenza virus-infected cells. II. Requirement for antibody and non-T lymphocytes. *J Immunol.* 1977 Dec;119(6):2100-6.
79. Jegaskanda S, Luke C, Hickman HD, Sangster MY, Wieland-Alter WF, McBride JM, i sur. Generation and protective ability of influenza virus-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity in humans elicited by vaccination, natural infection, and experimental challenge. *J Infect Dis.* 2016 Sep 15;214(6):945-52. doi: 10.1093/infdis/jiw262
80. Co MD, Terajima M, Thomas SJ, Jarman RG, Rungrojcharoenkit K, Fernandez S, i sur. Relationship of preexisting influenza hemagglutination inhibition, complement-dependent lytic, and antibody-dependent cellular cytotoxicity antibodies to the development of clinical illness in a prospective study of A(H1N1)pdm09 influenza in children. *Viral Immunol.* 2014 Oct;27(8):375-82. doi: 10.1089/vim.2014.0061
81. Yu Y, Wang M, Zhang X, Li S, Lu Q, Zeng H, i sur. Antibody-dependent cellular cytotoxicity response to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients. *Signal Transduct Target Ther.* 2021 Dec 1;6(1):346. doi: 10.1038/s41392-021-00759-1
82. Bonsignori M, Pollara J, Moody MA, Alpert MD, Chen X, Hwang KK, i sur. Antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating antibodies from an HIV-1 vaccine efficacy trial target multiple epitopes and preferentially use the VH1 gene family. *J Virol.* 2012 Nov;86(21):11521-32. doi: 10.1128/JVI.01023-12
83. Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, Zolla-Pazner S, Tomaras GD, Alam SM, i sur. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N Engl J Med.* 2012 Apr 5;366(14):1275-86. doi: 10.1056/NEJMoa1113425
84. Huber VC, Lynch JM, Bucher DJ, Le J, Metzger DW. Fc receptor-mediated phagocytosis makes a significant contribution to clearance of influenza virus infections. *J Immunol.* 2001 Jun 15;166(12):7381-8. doi: 10.4049/jimmunol.166.12.7381
85. Khurana S, Loving CL, Manischewitz J, King LR, Gauger PC, Henningson J, i sur. Vaccine-induced anti-HA2 antibodies promote virus fusion and enhance influenza virus respiratory disease. *Sci Transl Med.* 2013 Aug 28;5(200):200ra114. doi: 10.1126/scitranslmed.3006366



86. Sattar SBA, Sharma S. Bacterial Pneumonia. U: StatPearls [internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023- [ažurirano 14. 8. 2023.; pristupljeno 21. 9. 2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513321/>
87. Lim WS. Pneumonia–Overview. U: Janes SM, ur. Encyclopedia of respiratory medicine [internet]. 2. izd. Sv. 4. Amsterdam: Academic Press/Elsevier; 2022 [pristupljeno 20. 9. 2023.]. Str. 185-97. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7241411/>
88. Yamada M, Fujino N, Ichinose M. Inflammatory responses in the initiation of lung repair and regeneration: Their role in stimulating lung resident stem cells. *Inflamm Regen*. 2016 Sep 12;36:15. doi: 10.1186/s41232-016-0020-7
89. GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis*. 2018 Nov;18(11):1191-210. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30310-4
90. Johansson N, Kalin M, Tiveljung-Lindell A, Giske CG, Hedlund J. Etiology of community-acquired pneumonia: Increased microbiological yield with new diagnostic methods. *Clin Infect Dis*. 2010 Jan 15;50(2):202-9. doi: 10.1086/648678
91. Walden AP, Clarke GM, McKechnie S, Hutton P, Gordon AC, Rello J, i sur. Patients with community acquired pneumonia admitted to European intensive care units: An epidemiological survey of the GenOSept cohort. *Crit Care*. 2014 Apr 1;18(2):R58. doi: 10.1186/cc13812
92. Bjarnason A, Westin J, Lindh M, Andersson LM, Kristinsson KG, Löve A, i sur. Incidence, etiology, and outcomes of community-acquired pneumonia: A population-based study. *Open Forum Infect Dis*. 2018 Feb 8;5(2):ofy010. doi: 10.1093/ofid/ofy010
93. Blasi F, Ostermann H, Racketta J, Medina J, McBride K, Garau J, i sur. Early versus later response to treatment in patients with community-acquired pneumonia: analysis of the REACH study. *Respir Res*. 2014 Jan 22;15(1):6. doi: 10.1186/1465-9921-15-6
94. Torres A, Lee N, Cilloniz C, Vila J, Van der Eerden M. Laboratory diagnosis of pneumonia in the molecular age. *Eur Respir J*. 2016 Dec;48(6):1764-78. doi: 10.1183/13993003.01144-2016

95. Gadsby NJ, Russell CD, McHugh MP, Mark H, Conway Morris A, Laurenson IF, i sur. Comprehensive molecular testing for respiratory pathogens in community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2016 Apr 1;62(7):817-23. doi: 10.1093/cid/civ1214
96. Çağlayan Serin D, Pullukçu H, Çiçek C, Sipahi OR, Taşbakan S, Atalay S, i sur. Bacterial and viral etiology in hospitalized community acquired pneumonia with molecular methods and clinical evaluation. *J Infect Dev Ctries*. 2014 Apr 15;8(4):510-8. doi: 10.3855/jidc.3560
97. Prendki V, Huttner B, Marti C, Mamin A, Fubini PE, Meynet MP, i sur. Accuracy of comprehensive PCR analysis of nasopharyngeal and oropharyngeal swabs for CT-scan-confirmed pneumonia in elderly patients: Aprospective cohort study. *Clin Microbiol Infect*. 2019 Sep;25(9):1114-9. doi: 10.1016/j.cmi.2018.12.037
98. Ellison RT, Donowitz GR. Acute pneumonia. U: Bennett J, Dolin R, Blaser MJ, ur. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. 8. izd. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. Str. 823-46.
99. Krüger S, Ewig S, Papassotiriou J, Kunde J, Marre R, von Baum H, i sur. Inflammatory parameters predict etiologic patterns but do not allow for individual prediction of etiology in patients with CAP – Results from the German competence network CAPNETZ. *Respir Res*. 2009 Dec 12;10(1):65. doi: 10.1186/1465-9921-10-65
100. Ewig S, Torres A. Severe community-acquired pneumonia: How to assess illness severity. *Monaldi Arch Chest Dis*. 1999 Jun;54(3):250-4.
101. Gardner JG, Bhamidipati DR, Rueda AM, Graviss E, Nguyen D, Musher DM. The white blood cell count and prognosis in pneumococcal pneumonia. *Open Forum Infect Dis*. 2016 Dec 1;3 Suppl 1:1245. doi: 10.1093/ofid/ofw172.948
102. Sankaran RT, Mattana J, Pollack S, Bhat P, Ahuja T, Patel A, i sur. Laboratory abnormalities in patients with bacterial pneumonia. *Chest*. 1997 Mar;111(3):595-600. doi: 10.1378/chest.111.3.595
103. Hopstaken RM, Muris JW, Knottnerus JA, Kester AD, Rinkens PE, Dinant GJ. Contributions of symptoms, signs, erythrocyte sedimentation rate, and C-reactive protein to a diagnosis of pneumonia in acute lower respiratory tract infection. *Br J Gen Pract*. 2003 May;53(490):358-64.
104. Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, Hanusa BH, Weissfeld LA, Singer DE, i sur. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *N Engl J Med*. 1997 Jan 23;336(4):243-50. doi: 10.1056/NEJM199701233360402

105. Chalmers JD, Singanayagam A, Akram AR, Mandal P, Short PM, Choudhury G, *i sur*. Severity assessment tools for predicting mortality in hospitalised patients with community-acquired pneumonia. Systematic review and meta-analysis. *Thorax*. 2010 Oct;65(10):878-83. doi: 10.1136/thx.2009.133280
106. Lim WS, van der Eerden MM, Laing R, Boersma WG, Karalus N, Town GI, *i sur*. Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: An international derivation and validation study. *Thorax*. 2003 May;58(5):377-82. doi: 10.1136/thorax.58.5.377
107. Janoff EN, Rubins JB. Invasive pneumococcal disease in the immunocompromised host. *Microb Drug Resist*. 1997 Jan;3(3):215-32. doi: 10.1089/mdr.1997.3.215
108. Balamayooran T, Balamayooran G, Jeyaseelan S. Review: Toll-like receptors and NOD-like receptors in pulmonary antibacterial immunity. *Innate Immun*. 2010 Jun;16(3):201-10. doi: 10.1177/1753425910366058
109. Davis KM, Nakamura S, Weiser JN. Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *S. pneumoniae* colonization in mice. *J Clin Invest*. 2011 Sep;121(9):3666-76. doi: 10.1172/JCI57761
110. Xu LL, Warren MK, Rose WL, Gong W, Wang JM. Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells *in vitro*. *J Leukoc Biol*. 1996 Sep;60(3):365-71. doi: 10.1002/jlb.60.3.365
111. Qi H, Egen JG, Huang AYC, Germain RN. Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science*. 2006 Jun 16;312(5780):1672-6. doi: 10.1126/science.1125703
112. Kang YS, Kim JY, Bruening SA, Pack M, Charalambous A, Pritsker A, *i sur*. The C-type lectin SIGN-R1 mediates uptake of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* in the marginal zone of mouse spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jan 6;101(1):215-20. doi: 10.1073/pnas.0307124101
113. Heesters BA, Carroll MC. The role of dendritic cells in *S. pneumoniae* transport to follicular dendritic cells. *Cell Rep*. 2016 Sep 20;16(12):3130-7. doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.049
114. Suzuki K, Grigorova I, Phan TG, Kelly LM, Cyster JG. Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells. *J Exp Med*. 2009 Jul 6;206(7):1485-93. doi: 10.1084/jem.20090209

115. Roozendaal R, Mempel TR, Pitcher LA, Gonzalez SF, Verschoor A, Mebius RE, *i sur.* Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles. *Immunity*. 2009 Feb 20;30(2):264-76. doi: 10.1016/j.immuni.2008.12.014
116. Weintraub A. Immunology of bacterial polysaccharide antigens. *Carbohydr Res*. 2003 Nov 14;338(23):2539-47. doi: 10.1016/j.carres.2003.07.008
117. Gil E, Noursadeghi M, Brown JS. *Streptococcus pneumoniae* interactions with the complement system. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Jul 28;12:929483. doi: 10.3389/fcimb.2022.929483
118. Brown JS, Hussell T, Gilliland SM, Holden DW, Paton JC, Ehrenstein MR, *i sur.* The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 24;99(26):16969-74. doi: 10.1073/pnas.012669199
119. Krarup A, Sørensen UBS, Matsushita M, Jensenius JC, Thiel S. Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern recognition molecules mannan-binding lectin, L-ficolin, and H-ficolin. *Infect Immun*. 2005 Feb;73(2):1052-60. doi: 10.1128/IAI.73.2.1052-1060.2005
120. Eisen DP, Dean MM, Boermeester MA, Fidler KJ, Gordon AC, Kronborg G, *i sur.* Low serum mannose-binding lectin level increases the risk of death due to pneumococcal infection. *Clin Infect Dis*. 2008 Aug 15;47(4):510-6. doi: 10.1086/590006
121. Roy S, Knox K, Segal S, Griffiths D, Moore CE, Welsh KI, *i sur.* MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease: A case-control study. *Lancet*. 2002 May 4;359(9317):1569-73. doi: 10.1016/S0140-6736(02)08516-1
122. Griffioen AW, Rijkers GT, Janssens-Korpela P, Zegers BJ. Pneumococcal polysaccharides complexed with C3d bind to human B lymphocytes via complement receptor type 2. *Infect Immun*. 1991 May;59(5):1839-45. doi: 10.1128/iai.59.5.1839-1845.1991
123. Peset Llopis MJ, Harms G, Hardonk MJ, Timens W. Human immune response to pneumococcal polysaccharides: complement-mediated localization preferentially on CD21-positive splenic marginal zone B cells and follicular dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol*. 1996 Apr;97(4):1015-24. doi: 10.1016/s0091-6749(96)80078-9
124. Haas KM, Hasegawa M, Steeber DA, Poe JC, Zabel MD, Bock CB, *i sur.* Complement receptors CD21/35 link innate and protective immunity during *Streptococcus*

- pneumoniae infection by regulating IgG3 antibody responses. *Immunity*. 2002 Dec;17(6):713-23. doi: 10.1016/s1074-7613(02)00483-1
125. Buchta CM, Bishop GA. Toll-like receptors and B cells: Functions and mechanisms. *Immunol Res*. 2014 Aug;59(1-3):12-22. doi: 10.1007/s12026-014-8523-2
  126. Shepherd FR, McLaren JE. T cell immunity to bacterial pathogens: Mechanisms of immune control and bacterial evasion. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 26;21(17):6144.
  127. Barrett DJ, Ayoub EM. IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides. *Clin Exp Immunol*. 1986 Jan;63(1):127-34.
  128. Samukawa T, Yamanaka N, Hollingshead S, Klingman K, Faden H. Immune responses to specific antigens of *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* in the respiratory tract. *Infect Immun*. 2000 Mar;68(3):1569-73. doi: 10.1128/IAI.68.3.1569-1573.2000
  129. Vitharsson G, Jónsdóttir I, Jónsson S, Valdimarsson H. Opsonization and antibodies to capsular and cell wall polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*. 1994 Sep;170(3):592-9. doi: 10.1093/infdis/170.3.592
  130. Sjöholm AG, Jönsson G, Braconier JH, Sturfelt G, Truedsson L. Complement deficiency and disease: An update. *Mol Immunol*. 2006 Jan;43(1-2):78-85. doi: 10.1016/j.molimm.2005.06.025
  131. Woehrl B, Brouwer MC, Murr C, Heckenberg SGB, Baas F, Pfister HW, i sur. Complement component 5 contributes to poor disease outcome in humans and mice with pneumococcal meningitis. *J Clin Invest*. 2011 Oct;121(10):3943-53. doi: 10.1172/JCI57522
  132. Ramos-Sevillano E, Ercoli G, Brown JS. Mechanisms of naturally acquired immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *Front Immunol*. 2019 Mar 1;10:358. doi: 10.3389/fimmu.2019.00358
  133. Lookeren Campagne M, Wiesmann C, Brown EJ. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol*. 2007 Sep;9(9):2095-102. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00981.x
  134. Indik ZK, Park JG, Hunter S, Schreiber AD. The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood*. 1995 Dec 15;86(12):4389-99.
  135. Brown EJ, Joiner KA, Cole RM, Berger M. Localization of complement component 3 on *Streptococcus pneumoniae*: Anti-capsular antibody causes complement deposition on the

- pneumococcal capsule. *Infect Immun.* 1983 Jan;39(1):403-9. doi: 10.1128/iai.39.1.403-409.1983
136. Allen LA, Aderem A. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Exp Med.* 1996 Aug 1;184(2):627-37. doi: 10.1084/jem.184.2.627
  137. Acharya D, Li XRL, Heineman RES, Harrison RE. Complement receptor-mediated phagocytosis induces proinflammatory cytokine production in murine macrophages. *Front Immunol.* 2020 Jan 14;10:3049. doi: 10.3389/fimmu.2019.03049
  138. Joiner K, Brown E, Hammer C, Warren K, Frank M. Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. III. C5b-9 deposits stably on rough and type 7 *S. pneumoniae* without causing bacterial killing. *J Immunol.* 1983 Feb;130(2):845-9.
  139. Torres VVL, Coggon CF, Wells TJ. Antibody-dependent enhancement of bacterial disease: Prevalence, mechanisms, and treatment. *Infect Immun.* 2021 Mar 17;89(4):e00054-21. doi: 10.1128/IAI.00054-21
  140. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, i sur., ur. *Essentials of glycobiology* [internet]. 4. izd. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022 [pristupljeno 23. 9. 2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579977/>
  141. Li J, Hsu HC, Mountz JD, Allen JG. Unmasking fucosylation: From cell adhesion to immune system regulation and diseases. *Cell Chem Biol.* 2018 May 17;25(5):499-512. doi: 10.1016/j.chembiol.2018.02.005
  142. Paleček E, Tkáč J, Bartošík M, Bertók T, Ostatná V, Paleček J. Electrochemistry of nonconjugated proteins and glycoproteins. Toward sensors for biomedicine and glycomics. *Chem Rev.* 2015 Mar 11;115(5):2045-108. doi: 10.1021/cr500279h
  143. Dalziel M, Crispin M, Scanlan CN, Zitzmann N, Dwek RA. Emerging principles for the therapeutic exploitation of glycosylation. *Science.* 2014 Jan 3;343(6166):1235681. doi: 10.1126/science.1235681
  144. Maverakis E, Kim K, Shimoda M, Gershwin ME, Patel F, Wilken R, i sur. Glycans in the immune system and the altered glycan theory of autoimmunity: A critical review. *J Autoimmun.* 2015 Feb;57:1-13. doi: 10.1016/j.jaut.2014.12.002

145. Taniguchi N, Kizuka Y. Glycans and cancer: Role of N-glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics. *Adv Cancer Res.* 2015;126:11-51. doi: 10.1016/bs.acr.2014.11.001
146. Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation. *Handb Clin Neurol.* 2013;113:1737-43. doi: 10.1016/B978-0-444-59565-2.00044-7
147. Ren JM, Rejtar T, Li L, Karger BL. N-Glycan structure annotation of glycopeptides using a linearized glycan structure database (GlyDB). *J Proteome Res.* 2007 Aug;6(8):3162-73. doi: 10.1021/pr070111y
148. Liébecq, Claude; International Union of Biochemistry and Molecular Biology. *Biochemical nomenclature and related documents: A compendium.* 2. izd. London: Portland Press, 1992.
149. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM, ur. *Principles of biochemistry.* 2. izd. New York: Worth Publishers; 1993.
150. Shivatare SS, Shivatare VS, Wong CH. Glycoconjugates: Synthesis, functional studies, and therapeutic developments. *Chem Rev.* 2022 Oct 26;122(20):15603-71. doi: 10.1021/acs.chemrev.1c01032
151. Taylor M, Drickamer K. *Introduction to glycobiology.* 3. izd. Oxford: Oxford University Press; 2011.
152. Boscher C, Dennis JW, Nabi IR. Glycosylation, galectins and cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 2011 Aug;23(4):383-92. doi: 10.1016/j.ceb.2011.05.001
153. Krapp S, Mimura Y, Jefferis R, Huber R, Sonderrmann P. Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *J Mol Biol.* 2003 Jan 31;325(5):979-89. doi: 10.1016/s0022-2836(02)01250-0
154. Sonderrmann P, Pincetic A, Maamary J, Lammens K, Ravetch JV. General mechanism for modulating immunoglobulin effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jun 11;110(24):9868-72. doi: 10.1073/pnas.1307864110
155. Prasad C, Davis KE, Imrhan V, Juma S, Vijayagopal P. Advanced glycation end products and risks for chronic diseases: Intervening through lifestyle modification. *Am J Lifestyle Med.* 2017 May 15;13(4):384-404. doi: 10.1177/1559827617708991
156. An HJ, Froehlich JW, Lebrilla CB. Determination of glycosylation sites and site-specific heterogeneity in glycoproteins. *Curr Opin Chem Biol.* 2009 Oct;13(4):421-6. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.07.022

157. Neelamegham S, Mahal LK. Multi-level regulation of cellular glycosylation: From genes to transcript to enzyme to structure. *Curr Opin Struct Biol.* 2016 Oct;40:145-52.
158. Aebi M, Bernasconi R, Clerc S, Molinari M. N-glycan structures: Recognition and processing in the ER. *Trends Biochem Sci.* 2010 Feb;35(2):74-82. doi: 10.1016/j.tibs.2009.10.001
159. Trzos S, Link-Lenczowski P, Pocheć E. The role of N-glycosylation in B-cell biology and IgG activity. The aspects of autoimmunity and anti-inflammatory therapy. *Front Immunol.* 2023 Jul 27;14:1188838. doi: 10.3389/fimmu.2023.1188838
160. Frkatovic A, Zaytseva OO, Klaric L. Genetic regulation of immunoglobulin G glycosylation. *Exp Suppl.* 2021;112:259-87. doi: 10.1007/978-3-030-76912-3\_8
161. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: History, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics.* 2002 Nov;1(11):845-67. doi: 10.1074/mcp.r200007-mcp200
162. Russell A, Adua E, Ugrina I, Laws S, Wang W. Unravelling immunoglobulin G Fc N-glycosylation: A dynamic marker potentiating predictive, preventive and personalised medicine. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 29;19(2):390. doi: 10.3390/ijms19020390
163. Guihot A, Luyt CE, Parrot A, Rousset D, Cavaillon JM, Boutolleau D, et al. Low titers of serum antibodies inhibiting hemagglutination predict fatal fulminant influenza A(H1N1) 2009 infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 May 15;189(10):1240-9. doi: 10.1164/rccm.201311-2071OC
164. Notarangelo LD, Duse M, Ugazio AG. Immunodeficiency with hyper-IgM (HIM). *Immunodefic Rev.* 1992;3(2):101-21.
165. Stoop JW, Zegers BJ, Sander PC, Ballieux RE. Serum immunoglobulin levels in healthy children and adults. *Clin Exp Immunol.* 1969 Jan;4(1):101-12.
166. Jazayeri MH, Pourfathollah AA, Rasaei MJ, Porpak Z, Jafari ME. The concentration of total serum IgG and IgM in sera of healthy individuals varies at different age intervals. *Biomedicine and Aging Pathology.* 2013 Oct;3(4):241-5. doi: 10.1016/j.biomag.2013.09.002
167. Li Z, Woo CJ, Iglesias-Ussel MD, Ronai D, Scharff MD. The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination. *Genes Dev.* 2004 Jan 1;18(1):1-11. doi: 10.1101/gad.1161904
168. Weiskopf K, Weissman IL. Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer. *MAbs.* 2015 Mar 13;7(2):303-10. doi: 10.1080/19420862.2015.1011450



169. Peschke B, Keller CW, Weber P, Quast I, Lünemann JD. Fc-galactosylation of human immunoglobulin gamma isotypes improves C1q binding and enhances complement-dependent cytotoxicity. *Front Immunol.* 2017 Jun 6;8:646. doi: 10.3389/fimmu.2017.00646
170. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010 Jan;20(1):34-50. doi: 10.1038/cr.2009.139
171. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med.* 2001 Apr 12;344(15):1140-4. doi: 10.1056/NEJM200104123441506
172. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 2001 Apr 5;344(14):1058-66. doi: 10.1056/NEJM200104053441406
173. Wright SD, Silverstein SC. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J Exp Med.* 1983 Dec 1;158(6):2016-23. doi: 10.1084/jem.158.6.2016
174. Larsen MD, de Graaf EL, Sonneveld ME, Plomp HR, Nouta J, Hoepel W, i sur. Afucosylated IgG characterizes enveloped viral responses and correlates with COVID-19 severity. *Science.* 2021 Feb 26;371(6532):eabc8378. doi: 10.1126/science.abc8378
175. Swanson JA, Hoppe AD. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol.* 2004 Dec;76(6):1093-103. doi: 10.1189/jlb.0804439
176. Wang TT, Maamary J, Tan GS, Bournazos S, Davis CW, Krammer F, i sur. Anti-HA glycoforms drive B cell affinity selection and determine influenza vaccine efficacy. *Cell.* 2015 Jul 2;162(1):160-9. doi: 10.1016/j.cell.2015.06.026
177. Bournazos S, Woof JM, Hart SP, Dransfield I. Functional and clinical consequences of Fc receptor polymorphic and copy number variants. *Clin Exp Immunol.* 2009 Aug;157(2):244-54.
178. Anthony RM, Wermeling F, Karlsson MCI, Ravetch JV. Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 16;105(50):19571-8. doi: 10.1073/pnas.0810163105
179. Pincetic A, Bournazos S, DiLillo DJ, Maamary J, Wang TT, Dahan R, i sur. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2014 Aug;15(8):707-16. doi: 10.1038/ni.2939
180. Ravetch J V, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:275-90. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.275

181. Takai T. Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity. *J Clin Immunol*. 2005 Jan;25(1):1-18. doi: 10.1007/s10875-005-0353-8
182. Bournazos S, Gupta A, Ravetch JV. The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. *Nat Rev Immunol*. 2020 Oct 11;20(10):633-43. doi: 10.1038/s41577-020-00410-0
183. Smith KGC, Clatworthy MR. FcγRIIB in autoimmunity and infection: Evolutionary and therapeutic implications. *Nat Rev Immunol*. 2010 May;10(5):328-43. doi: 10.1038/nri2762
184. Anthony RM, Kobayashi T, Wermeling F, Ravetch JV. Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature*. 2011 Jun 19;475(7354):110-3. doi: 10.1038/nature10134
185. Anthony RM, Nimmerjahn F, Ashline DJ, Reinhold VN, Paulson JC, Ravetch JV. Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science*. 2008 Apr 18;320(5874):373-6. doi: 10.1126/science.1154315
186. Spiegelberg HL. Biological role of different antibody classes. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1989;90 Suppl 1:22-7. doi: 10.1159/000235071
187. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:21-50. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702
188. Gornik O, Pavić T, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins – implications on evolution and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Sep;1820(9):1318-26. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.12.004
189. Kobata A. The N-Linked sugar chains of human immunoglobulin G: Their unique pattern, and their functional roles. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Mar;1780(3):472-8. doi: 10.1016/j.bbagen.2007.06.012
190. Nishima W, Miyashita N, Yamaguchi Y, Sugita Y, Re S. Effect of bisecting GlcNAc and core fucosylation on conformational properties of biantennary complex-type N-glycans in solution. *J Phys Chem B*. 2012 Jul 26;116(29):8504-12. doi: 10.1021/jp212550z
191. Allhorn M, Olin AI, Nimmerjahn F, Collin M. Human IgG/Fc γR interactions are modulated by streptococcal IgG glycan hydrolysis. *PLoS One*. 2008 Jan 9;3(1):e1413. doi: 10.1371/journal.pone.0001413

192. Borrok MJ, Jung ST, Kang TH, Monzingo AF, Georgiou G. Revisiting the role of glycosylation in the structure of human IgG Fc. *ACS Chem Biol*. 2012 Sep 21;7(9):1596-602. doi: 10.1021/cb300130k
193. Lux A, Yu X, Scanlan CN, Nimmerjahn F. Impact of immune complex size and glycosylation on IgG binding to human FcγRs. *J Immunol*. 2013 Apr 15;190(8):4315-23. doi: 10.4049/jimmunol.1200501
194. Bowden TA, Baruah K, Coles CH, Harvey DJ, Yu X, Song BD, i sur. Chemical and structural analysis of an antibody folding intermediate trapped during glycan biosynthesis. *J Am Chem Soc*. 2012 Oct 24;134(42):17554-63. doi: 10.1021/ja306068g
195. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, i sur. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem*. 2003 Jan;278(5):3466-73. doi: 10.1074/jbc.m210665200
196. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, i sur. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem*. 2002 Jul 26;277(30):26733-40. doi: 10.1074/jbc.M202069200
197. Forthal DN, Gach JS, Landucci G, Jez J, Strasser R, Kunert R, i sur. Fc-glycosylation influences Fcγ receptor binding and cell-mediated anti-HIV activity of monoclonal antibody 2G12. *J Immunol*. 2010 Dec 1;185(11):6876-82. doi: 10.4049/jimmunol.1002600
198. Yamane-Ohnuki N, Satoh M. Production of therapeutic antibodies with controlled fucosylation. *MAbs*. 2009;1(3):230-6. doi: 10.4161/mabs.1.3.8328
199. Ferrara C, Stuart F, Sondermann P, Brünker P, Umaña P. The carbohydrate at FcγRIIIa Asn-162. An element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms. *J Biol Chem*. 2006 Feb 24;281(8):5032-6. doi: 10.1074/jbc.M510171200
200. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*. 2006 Aug 4;313(5787):670-3. doi: 10.1126/science.1129594

201. Anthony RM, Ravetch JV. A novel role for the IgG Fc glycan: The anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs. *J Clin Immunol.* 2010 May;30 Suppl 1:S9-14. doi: 10.1007/s10875-010-9405-6
202. Baruah K, Bowden TA, Krishna BA, Dwek RA, Crispin M, Scanlan CN. Selective deactivation of serum IgG: A general strategy for the enhancement of monoclonal antibody receptor interactions. *J Mol Biol.* 2012 Jun 29;420(1-2):1-7. doi: 10.1016/j.jmb.2012.04.002
203. Blundell PA, Lu D, Wilkinson M, Dell A, Haslam S, Pleass RJ. Insertion of N-terminal hinge glycosylation enhances interactions of the Fc region of human IgG1 monomers with glycan-dependent receptors and blocks hemagglutination by the influenza virus. *J Immunol.* 2019 Mar 1;202(5):1595-611. doi: 10.4049/jimmunol.1801337
204. Nose M, Wigzell H. Biological significance of carbohydrate chains on monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Nov;80(21):6632-6. doi: 10.1073/pnas.80.21.6632
205. Leatherbarrow RJ, Rademacher TW, Dwek RA, Woof JM, Clark A, Burton DR, i sur. Effector functions of a monoclonal aglycosylated mouse IgG2a: Binding and activation of complement component C1 and interaction with human monocyte Fc receptor. *Mol Immunol.* 1985 Apr;22(4):407-15. doi: 10.1016/0161-5890(85)90125-7
206. Chung CY, Majewska NI, Wang Q, Paul JT, Betenbaugh MJ. Snapshot: N-glycosylation processing pathways across kingdoms. *Cell.* 2017 Sep 21;171(1):258-258.e1. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.014
207. Pučić M, Knežević A, Vidič J, Adamczyk B, Novokmet M, Polašek O, i sur. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol Cell Proteomics.* 2011 Oct;10(10):M111.010090. doi: 10.1074/mcp.M111.010090
208. Li W, Ishihara K, Yokota T, Nakagawa T, Koyama N, Jin J, i sur. Reduced alpha4beta1 integrin/VCAM-1 interactions lead to impaired pre-B cell repopulation in alpha 1,6-fucosyltransferase deficient mice. *Glycobiology.* 2008 Jan;18(1):114-24. doi: 10.1093/glycob/cwm107
209. Schachter H. Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Adv Exp Med Biol.* 1986;205:53-85. doi: 10.1007/978-1-4684-5209-9\_2

210. Cao Y, Song Z, Guo Z, Zhao X, Gong Y, Zhao K, i sur. Cytokines in the immune microenvironment change the glycosylation of IgG by regulating intracellular glycosyltransferases. *Front Immunol.* 2022 Jan 24;12:724379. doi: 10.3389/fimmu.2021.724379
211. van de Bovenkamp FS, Hafkenscheid L, Rispens T, Rombouts Y. The emerging importance of IgG Fab glycosylation in immunity. *J Immunol.* 2016 Feb 15;196(4):1435-41. doi: 10.4049/jimmunol.1502136
212. Biermann MHC, Griffante G, Podolska MJ, Boeltz S, Stürmer J, Muñoz LE, i sur. Sweet but dangerous – the role of immunoglobulin G glycosylation in autoimmunity and inflammation. *Lupus.* 2016 Jul 31;25(8):934-42. doi: 10.1177/0961203316640368
213. Bondt A, Rombouts Y, Selman MHJ, Hensbergen PJ, Reiding KR, Hazes JMW, i sur. Immunoglobulin G (IgG) Fab glycosylation analysis using a new mass spectrometric high-throughput profiling method reveals pregnancy-associated changes. *Mol Cell Proteomics.* 2014 Nov;13(11):3029-39. doi: 10.1074/mcp.M114.039537
214. Gudelj I, Lauc G, Pezer M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell Immunol.* 2018 Nov 1;333:65-79. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.07.009
215. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, i sur. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature.* 1985 Aug 1-7;316(6027):452-7. doi: 10.1038/316452a0
216. Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers.* 2008;25(4-5):267-78. doi: 10.1155/2008/493289
217. Tomana M, Schrohenloher RE, Reveille JD, Arnett FC, Koopman WJ. Abnormal galactosylation of serum IgG in patients with systemic lupus erythematosus and members of families with high frequency of autoimmune diseases. *Rheumatol Int.* 1992;12(5):191-4. doi: 10.1007/BF00302151
218. Trbojević Akmačić I, Ventham NT, Theodoratou E, Vučković F, Kennedy NA, Krištić J, i sur. Inflammatory bowel disease associates with proinflammatory potential of the immunoglobulin G glycome. *Inflamm Bowel Dis.* 2015 Jun;21(6):1237-47. doi: 10.1097/MIB.0000000000000372
219. Parekh R, Isenberg D, Rook G, Roitt I, Dwek R, Rademacher T. A comparative analysis of disease-associated changes in the galactosylation of serum IgG. *J Autoimmun.* 1989 Apr;2(2):101-14. doi: 10.1016/0896-8411(89)90148-0

220. van de Geijn FE, Wuhrer M, Selman MH, Willemsen SP, de Man YA, Deelder AM, i sur. Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: Results from a large prospective cohort study. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(6):R193. doi: 10.1186/ar2892
221. Rook GA, Steele J, Brealey R, Whyte A, Isenberg D, Sumar N, i sur. Changes in IgG glycoform levels are associated with remission of arthritis during pregnancy. *J Autoimmun.* 1991 Oct;4(5):779-94. doi: 10.1016/0896-8411(91)90173-a
222. Novokmet M, Lukić E, Vučković F, Đurić Ž, Keser T, Rajšl K, i sur. Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation. *Sci Rep.* 2014 Mar 11;4:4347. doi: 10.1038/srep04347
223. Hennig R, Cajic S, Borowiak M, Hoffmann M, Kottler R, Reichl U, i sur. Towards personalized diagnostics via longitudinal study of the human plasma N-glycome. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2016 Aug 1;1860(8):1728-38. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.03.035
224. Ruhaak LR, Uh HW, Beekman M, Koeleman CAM, Hokke CH, Westendorp RGJ, i sur. Decreased levels of bisecting GlcNAc glycoforms of IgG are associated with human longevity. *PLoS One.* 2010 Sep 7;5(9):e12566. doi: 10.1371/journal.pone.0012566
225. Krištić J, Vučković F, Menni C, Klarić L, Keser T, Beccheli I, i sur. Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2014 Jul;69(7):779-89. doi: 10.1093/gerona/glt190
226. Huffman JE, Pučić-Baković M, Klarić L, Hennig R, Selman MHJ, Vučković F, i sur. Comparative performance of four methods for high-throughput glycosylation analysis of immunoglobulin G in genetic and epidemiological research. *Mol Cell Proteomics.* 2014 Jun;13(6):1598-610. doi: 10.1074/mcp.M113.037465
227. Baković MP, Selman MHJ, Hoffmann M, Rudan I, Campbell H, Deelder AM, i sur. High-throughput IgG Fc N-glycosylation profiling by mass spectrometry of glycopeptides. *J Proteome Res.* 2013 Feb 1;12(2):821-31. doi: 10.1021/pr300887z
228. Ahmed AA, Giddens J, Pincetic A, Lomino J V, Ravetch JV, Wang LX, i sur. Structural characterization of anti-inflammatory immunoglobulin G Fc proteins. *J Mol Biol.* 2014 Sep 9;426(18):3166-79. doi: 10.1016/j.jmb.2014.07.006
229. Boyd PN, Lines AC, Patel AK. The effect of the removal of sialic acid, galactose and total carbohydrate on the functional activity of Campath-1H. *Mol Immunol.* 1995 Dec;32(17-18):1311-8. doi: 10.1016/0161-5890(95)00118-2

230. Ferrara C, Grau S, Jäger C, Sondermann P, Brünker P, Waldhauer I, i sur. Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between Fcγ<sub>3</sub> and antibodies lacking core fucose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 2;108(31):12669-74. doi: 10.1073/pnas.1108455108
231. Jefferis R. Recombinant antibody therapeutics: The impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends Pharmacol Sci*. 2009 Jul;30(7):356-62. doi: 10.1016/j.tips.2009.04.007
232. Shibata-Koyama M, Iida S, Misaka H, Mori K, Yano K, Shitara K, i sur. Nonfucosylated rituximab potentiates human neutrophil phagocytosis through its high binding for Fcγ<sub>3b</sub> and MHC class II expression on the phagocytotic neutrophils. *Exp Hematol*. 2009 Mar;37(3):309-21. doi: 10.1016/j.exphem.2008.11.006
233. Kapur R, Kustiawan I, Vestrheim A, Koeleman CAM, Visser R, Einarsdottir HK, i sur. A prominent lack of IgG1-Fc fucosylation of platelet alloantibodies in pregnancy. *Blood*. 2014 Jan 23;123(4):471–80. doi: 10.1182/blood-2013-09-527978
234. Hodoniczky J, Zheng YZ, James DC. Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc N-glycan remodeling in vitro. *Biotechnol Prog*. 2005;21(6):1644-52. doi: 10.1021/bp050228w
235. Umaña P, Jean-Mairet J, Moudry R, Amstutz H, Bailey JE. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat Biotechnol*. 1999 Feb;17(2):176-80. doi: 10.1038/6179
236. Longmore GD, Schachter H. Product-identification and substrate-specificity studies of the GDP-L-fucose:2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucoside (FUC goes to Asn-linked GlcNAc) 6-alpha-L-fucosyltransferase in a Golgi-rich fraction from porcine liver. *Carbohydr Res*. 1982 Mar 1;100:365-92. doi: 10.1016/s0008-6215(00)81049-6
237. Klarić L, Tsepilov YA, Stanton CM, Mangino M, Sikka TT, Esko T, i sur. Glycosylation of immunoglobulin G is regulated by a large network of genes pleiotropic with inflammatory diseases. *Sci Adv*. 2020 Feb 19;6(8):eaax0301. doi: 10.1126/sciadv.aax0301
238. Wang J, Balog CIA, Stavenhagen K, Koeleman CAM, Scherer HU, Selman MHJ, i sur. Fc-glycosylation of IgG1 is modulated by B-cell stimuli. *Mol Cell Proteomics*. 2011 May;10(5):M110.004655. doi: 10.1074/mcp.M110.004655

239. Shikata K, Yasuda T, Takeuchi F, Konishi T, Nakata M, Mizuochi T. Structural changes in the oligosaccharide moiety of human IgG with aging. *Glycoconj J*. 1998 Jul;15(7):683-9. doi: 10.1023/a:1006936431276
240. Deriš H, Kifer D, Cindrić A, Petrović T, Cvetko A, Trbojević-Akmačić I, i sur. Immunoglobulin G glycome composition in transition from premenopause to postmenopause. *iScience*. 2022 Mar 18;25(3):103897. doi: 10.1016/j.isci.2022.103897
241. MB, La Blunda J, Szekeres-Bartho J, Caramelo J, Miranda S. Progesterone induces a switch in oligosaccharyltransferase isoform expression: Consequences on IgG N-glycosylation. *Immunol Lett*. 2011 Jun 30;137(1-2):28-37. doi: 10.1016/j.imlet.2011.01.017
242. Furukawa K, Matsuta K, Takeuchi F, Kosuge E, Miyamoto T, Kobata A. Kinetic study of a galactosyltransferase in the B cells of patients with rheumatoid arthritis. *Int Immunol*. 1990;2(1):105-12. doi: 10.1093/intimm/2.1.105
243. Axford JS, Mackenzie L, Lydyard PM, Hay FC, Isenberg DA, Roitt IM. Reduced B-cell galactosyltransferase activity in rheumatoid arthritis. *Lancet*. 1987 Dec 26;2(8574):1486-8.
244. Axford JS, Alavi A, Bond A, Hay FC. Differential B lymphocyte galactosyltransferase activity in the MRL mouse model of rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*. 1994;17(2):157-63. doi: 10.3109/08916939409014671
245. Menni C, Keser T, Mangino M, Bell JT, Erte I, Akmačić I, i sur. Glycosylation of immunoglobulin G: Role of genetic and epigenetic influences. *PLoS One*. 2013 Dec 6;8(12):e82558. doi: 10.1371/journal.pone.0082558
246. Chen G, Wang Y, Qiu L, Qin X, Liu H, Wang X, i sur. Human IgG Fc-glycosylation profiling reveals associations with age, sex, female sex hormones and thyroid cancer. *J Proteomics*. 2012 Jun 6;75(10):2824-34. doi: 10.1016/j.jprot.2012.02.001
247. Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J, i sur. Human peripheral blood B-cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78 Suppl 1:S47-60. doi: 10.1002/cyto.b.20547
248. Youings A, Chang SC, Dwek RA, Scragg IG. Site-specific glycosylation of human immunoglobulin G is altered in four rheumatoid arthritis patients. *Biochem J*. 1996 Mar 1;314(Pt 2):621-30. doi: 10.1042/bj3140621



249. Li T, DiLillo DJ, Bournazos S, Giddens JP, Ravetch J V, Wang LX. Modulating IgG effector function by Fc glycan engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Mar 28;114(13):3485-90. doi: 10.1073/pnas.1702173114
250. Pan H, Wu Z, Zhang H, Zhang J, Liu Y, Li Z, i sur. Identification and validation of IgG N-glycosylation biomarkers of esophageal carcinoma. *Front Immunol*. 2023 Mar 14;14:981861. doi: 10.3389/fimmu.2023.981861
251. Aurer I, Lauc G, Dumić J, Rendić D, Matišić D, Miloš M, i sur. Aberrant glycosylation of IgG heavy chain in multiple myeloma. *Coll Antropol*. 2007 Mar;31(1):247-51.
252. Ho CH, Chien RN, Cheng PN, Liu JH, Liu CK, Su CS, i sur. Aberrant serum immunoglobulin G glycosylation in chronic hepatitis B is associated with histological liver damage and reversible by antiviral therapy. *J Infect Dis*. 2015 Jan 1;211(1):115-24. doi: 10.1093/infdis/jiu388
253. Ackerman ME, Crispin M, Yu X, Baruah K, Boesch AW, Harvey DJ, i sur. Natural variation in Fc glycosylation of HIV-specific antibodies impacts antiviral activity. *J Clin Invest*. 2013 May;123(5):2183-92. doi: 10.1172/JCI65708
254. Vadrevu SK, Trbojević-Akmačić I, Kossenkov AV, Colomb F, Giron LB, Anzurez A, i sur. Frontline Science: Plasma and immunoglobulin G galactosylation associate with HIV persistence during antiretroviral therapy. *J Leukoc Biol*. 2018 Sep;104(3):461-71. doi: 10.1002/JLB.3HI1217-500R
255. Moore JS, Wu X, Kulhavy R, Tomana M, Novak J, Moldoveanu Z, i sur. Increased levels of galactose-deficient IgG in sera of HIV-1-infected individuals. *AIDS*. 2005 Mar 4;19(4):381-9. doi: 10.1097/01.aids.0000161767.21405.68
256. Wang TT, Sewatanon J, Memoli MJ, Wrammert J, Bournazos S, Bhaumik SK, i sur. IgG antibodies to dengue enhanced for FcγRIIIA binding determine disease severity. *Science*. 2017 Jan 27;355(6323):395-8. doi: 10.1126/science.aai8128
257. Lu LL, Chung AW, Rosebrock TR, Ghebremichael M, Yu WH, Grace PS, i sur. A functional role for antibodies in tuberculosis. *Cell*. 2016 Oct 6;167(2):433-443.e14. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.072
258. Pilkington C, Yeung E, Isenberg D, Lefvert AK, Rook GA. Agalactosyl IgG and antibody specificity in rheumatoid arthritis, tuberculosis, systemic lupus erythematosus and myasthenia gravis. *Autoimmunity*. 1995;22(2):107-11. doi: 10.3109/08916939508995306

259. de Haan N, Boeddha NP, Ekinici E, Reiding KR, Emonts M, Hazelzet JA, i sur. Differences in IgG Fc glycosylation are associated with outcome of pediatric meningococcal sepsis. *mBio*. 2018 Jun 19;9(3):e00546-18. doi: 10.1128/mBio.00546-18
260. Rademacher TW, Parekh RB, Dwek RA, Isenberg D, Rook G, Axford JS, i sur. The role of IgG glycoforms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol*. 1988;10(2-3):231-49. doi: 10.1007/BF01857227
261. Arango MT, Shoenfeld Y, Cervera R, Anaya JM. Chapter 19: Infection and autoimmune diseases. U: Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, Levy RA, Cervera R, ur. *Autoimmunity: From bench to bedside [internet]*. Bogota (Colombia): El Rosario University Press; 2013 [ažurirano 18. 7. 2013.; pristupljeno 21. 9. 2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459437/>
262. Irvine EB, Alter G. Understanding the role of antibody glycosylation through the lens of severe viral and bacterial diseases. *Glycobiology*. 2020 Mar 20;30(4):241-53. doi: 10.1093/glycob/cwaa018
263. Mahan AE, Jennewein MF, Suscovich T, Dionne K, Tedesco J, Chung AW, i sur. Antigen-specific antibody glycosylation is regulated via vaccination. *PLoS Pathog*. 2016 Mar 16;12(3):e1005456. doi: 10.1371/journal.ppat.1005456
264. Finlay BB, McFadden G. Anti-immunology: Evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):767-82. doi: 10.1016/j.cell.2006.01.034
265. Arnold JN, Saldova R, Hamid UMA, Rudd PM. Evaluation of the serum N-linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation. *Proteomics*. 2008 Aug;8(16):3284-93. doi: 10.1002/pmic.200800163
266. Kljaković-Gašpić Batinjan M, Petrović T, Vučković F, Hadžibegović I, Radovani B, Jurin I, i sur. Differences in immunoglobulin G glycosylation between influenza and COVID-19 patients. *Engineering (Beijing)*. 2023;26(7):54-62. doi: 10.1016/j.eng.2022.08.007
267. Bournazos S, Vo HTM, Duong V, Auerswald H, Ly S, Sakuntabhai A, i sur. Antibody fucosylation predicts disease severity in secondary dengue infection. *Science*. 2021 Jun 4;372(6546):1102-5. doi: 10.1126/science.abc7303
268. Drake PM, Cho W, Li B, Prakobphol A, Johansen E, Anderson NL, i sur. Sweetening the pot: adding glycosylation to the biomarker discovery equation. *Clin Chem*. 2010 Feb;56(2):223-36. doi: 10.1373/clinchem.2009.136333

269. Selman MHJ, de Jong SE, Soonawala D, Kroon FP, Adegnika AA, Deelder AM, i sur. Changes in antigen-specific IgG1 Fc N-glycosylation upon influenza and tetanus vaccination. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Apr;11(4):M111.014563. doi: 10.1074/mcp.M111.014563
270. Hoepel W, Chen HJ, Geyer CE, Allahverdiyeva S, Manz XD, de Taeye SW, i sur. High titers and low fucosylation of early human anti-SARS-CoV-2 IgG promote inflammation by alveolar macrophages. *Sci Transl Med*. 2021 Jun 2;13(596):eabf8654. doi: 10.1126/scitranslmed.abf8654
271. Vestrheim AC, Moen A, Egge-Jacobsen W, Reubsaet L, Halvorsen TG, Bratlie DB, i sur. A pilot study showing differences in glycosylation patterns of IgG subclasses induced by pneumococcal, meningococcal, and two types of influenza vaccines. *Immun Inflamm Dis*. 2014 Aug 22;2(2):76-91. doi: 10.1002/iid3.22
272. Mozdzanowska K, Feng J, Gerhard W. Virus-neutralizing activity mediated by the Fab fragment of a hemagglutinin-specific antibody is sufficient for the resolution of influenza virus infection in SCID mice. *J Virol*. 2003 Aug;77(15):8322-8. doi: 10.1128/jvi.77.15.8322-8328.2003
273. Grund S, Adams O, Wählisch S, Schweiger B. Comparison of hemagglutination inhibition assay, an ELISA-based micro-neutralization assay and colorimetric microneutralization assay to detect antibody responses to vaccination against influenza A H1N1 2009 virus. *J Virol Methods*. 2011 Feb;171(2):369-73. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.11.024
274. Black S, Nicolay U, Vesikari T, Knuf M, Del Giudice G, Della Cioppa G, i sur. Hemagglutination inhibition antibody titers as a correlate of protection for inactivated influenza vaccines in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2011 Dec;30(12):1081-5. doi: 10.1097/INF.0b013e3182367662
275. Ohmit SE, Petrie JG, Cross RT, Johnson E, Monto AS. Influenza hemagglutination-inhibition antibody titer as a correlate of vaccine-induced protection. *J Infect Dis*. 2011 Dec 15;204(12):1879-85. doi: 10.1093/infdis/jir661
276. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing [računalni program]. R Foundation for Statistical Computing; 2020. [pristupljeno 7. 2. 2023.]. Dostupno na: <https://www.R-project.org/>
277. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2. izd. New York: Lawrence Erlbaum Associates; 1988.

278. Lauc G, Huffman JE, Pučić M, Zgaga L, Adamczyk B, Mužinić A, i sur. Loci associated with N-Glycosylation of human immunoglobulin G show pleiotropy with autoimmune diseases and haematological cancers. *PLoS Genet.* 2013 Jan;9(1):e1003225. doi: 10.1371/journal.pgen.1003225
279. Mueller SN, Rouse BT. Immune responses to viruses. U: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ, Weyand CM, ur. *Clinical immunology: Principles and practice* [internet]. 3. izd. St. Louis (MO): Mosby/Elsevier; 2008 [pristupljeno 20. 9. 2023.]. Str. 421-31. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7151814/>
280. Muruganandah V, Kupz A. Immune responses to bacterial lung infections and their implications for vaccination. *Int Immunol.* 2022 Apr 20;34(5):231-48. doi: 10.1093/intimm/dxab109
281. Liu Q, Zhou YH, Yang ZQ. The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. *Cell Mol Immunol.* 2016 Jan 1;13(1):3-10. doi: 10.1038/cmi.2015.74
282. Sandbulte MR, Boon ACM, Webby RJ, Riberdy JM. Analysis of cytokine secretion from human plasmacytoid dendritic cells infected with H5N1 or low-pathogenicity influenza viruses. *Virology.* 2008 Nov 10;381(1):22-8. doi: 10.1016/j.virol.2008.08.018
283. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, i sur. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science.* 1999 Jun 11;284(5421):1835-7. doi: 10.1126/science.284.5421.1835
284. Dalod M, Salazar-Mather TP, Malmgaard L, Lewis C, Asselin-Paturel C, Brière F, i sur. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: Pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med.* 2002 Feb 18;195(4):517-28. doi: 10.1084/jem.20011672
285. Giron LB, Colomb F, Pappasavvas E, Azzoni L, Yin X, Fair M, i sur. Interferon- $\alpha$  alters host glycosylation machinery during treated HIV infection. *EBioMedicine.* 2020 Sep;59:102945. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102945
286. Wang JR, Guan W Da, Yau LF, Gao WN, Zhan YQ, Liu L, i sur. Glycomic signatures on serum IgGs for prediction of postvaccination response. *Sci Rep.* 2015 Jan 23;5:7648. doi: 10.1038/srep07648

287. Greenberg SB, Criswell BS, Six HR, Couch RB. Lymphocyte cytotoxicity to influenza virus-infected cells: Response to vaccination and virus infection. *Infect Immun*. 1978 Jun;20(3):640–5. doi: 10.1128/iai.20.3.640-645.1978
288. Lu X, Zhang D, Shoji H, Duan C, Zhang G, Isaji T, i sur. Deficiency of  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferase promotes neuroinflammation by increasing the sensitivity of glial cells to inflammatory mediators. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2019 Mar;1863(3):598-608. doi: 10.1016/j.bbagen.2018.12.008
289. Bond A, Alavi A, Axford JS, Bourke BE, Bruckner FE, Kerr MA, i sur. A detailed lectin analysis of IgG glycosylation, demonstrating disease specific changes in terminal galactose and N-acetylglucosamine. *J Autoimmun*. 1997 Feb;10(1):77-85. doi: 10.1006/jaut.1996.0104
290. Ibrahim AM, Siddique MS. Subacute bacterial endocarditis prophylaxis. U: StatPearls [internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023- [ažurirano 5. 6. 2023.; pristupljeno 20. 9. 2023.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532983/>
291. Banda NK, Wood AK, Takahashi K, Levitt B, Rudd PM, Royle L, i sur. Initiation of the alternative pathway of murine complement by immune complexes is dependent on N-glycans in IgG antibodies. *Arthritis Rheum*. 2008 Oct;58(10):3081-9. doi: 10.1002/art.23865
292. Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM, Fischer PB, Dwek RA, Sim RB. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat Med*. 1995 Mar 1;1(3):237-43. doi: 10.1038/nm0395-237
293. Nimmerjahn F, Anthony RM, Ravetch JV. Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for in vivo activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 15;104(20):8433-7. doi: 10.1073/pnas.0702936104
294. Dekkers G, Rispens T, Vidarsson G. Novel concepts of altered immunoglobulin G galactosylation in autoimmune diseases. *Front Immunol*. 2018 Mar 19;9:553. doi: 10.3389/fimmu.2018.00553
295. van de Geijn FE, Hazes JMW, Geleijns K, Emonts M, Jacobs BC, Dufour-van den Goorbergh BCM, i sur. Mannose-binding lectin polymorphisms are not associated with rheumatoid arthritis – confirmation in two large cohorts. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Aug;47(8):1168-71. doi: 10.1093/rheumatology/ken226

296. van de Geijn FE, de Man YA, Wuhrer M, Willemsen SP, Deelder AM, Hazes JM, i sur. Mannose-binding lectin does not explain the course and outcome of pregnancy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(1):R10. doi: 10.1186/ar3231
297. Hernández-Pando R, Reyes P, Espitia C, Wang Y, Rook G, Mancilla R. Raised agalactosyl IgG and antimycobacterial humoral immunity in Takayasu's arteritis. *J Rheumatol*. 1994 Oct;21(10):1870-6.
298. Madhok R, Capell HA, Axford JS, Hay FC, Mackenzie L, Isenberg DA, i sur. Galactose residues in chronic inflammatory disease. *Lancet*. 1988 Feb 20;331(8582):418. doi: 10.1016/S0140-6736(88)91214-7
299. Gardinassi LG, Dotz V, Ederveen AH, De Almeida RP, Costa CHN, Costa DL, i sur. Clinical severity of visceral leishmaniasis is associated with changes in immunoglobulin G Fc N-glycosylation. *mBio*. 2014 Dec 2;5(6):e01844. doi: 10.1128/mBio.01844-14
300. Lastra GC, Thompson SJ, Lemonidis AS, Elson CJ. Changes in the galactose content of IgG during humoral immune responses. *Autoimmunity*. 1998;28(1):25-30. doi: 10.3109/08916939808993842
301. Karsten CM, Pandey MK, Figge J, Kilchenstein R, Taylor PR, Rosas M, i sur. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of Fc $\gamma$ RIIB and dectin-1. *Nat Med*. 2012 Sep;18(9):1401-6. doi: 10.1038/nm.2862
302. Sun K, Metzger DW. Inhibition of pulmonary antibacterial defense by interferon- $\gamma$  during recovery from influenza infection. *Nat Med*. 2008 May 27;14(5):558-64. doi: 10.1038/nm1765
303. Thomann M, Reckermann K, Reusch D, Prasser J, Tejada ML. Fc-galactosylation modulates antibody-dependent cellular cytotoxicity of therapeutic antibodies. *Mol Immunol*. 2016 May;73:69-75. doi: 10.1016/j.molimm.2016.03.002
304. Chung AW, Crispin M, Pritchard L, Robinson H, Gorny MK, Yu X, i sur. Identification of antibody glycosylation structures that predict monoclonal antibody Fc-effector function. *AIDS*. 2014 Nov 13;28(17):2523-30. doi: 10.1097/QAD.0000000000000444
305. Giron LB, Pappasavvas E, Azzoni L, Yin X, Anzurez A, Damra M, i sur. Plasma and antibody glycomic biomarkers of time to HIV rebound and viral setpoint. *AIDS*. 2020 Apr 1;34(5):681-6. doi: 10.1097/QAD.00000000000002476
306. Dekkers G, Treffers L, Plomp R, Bentlage AEH, de Boer M, Koeleman CAM, i sur. Decoding the human immunoglobulin G – glycan repertoire reveals a spectrum of Fc-

- receptor- and complement-mediated-effector activities. *Front Immunol.* 2017 Aug 2;8:877. doi: 10.3389/fimmu.2017.00877
307. Kurimoto A, Kitazume S, Kizuka Y, Nakajima K, Oka R, Fujinawa R, *i sur.* The absence of core fucose up-regulates GnT-III and Wnt target genes: A possible mechanism for an adaptive response in terms of glycan function. *J Biol Chem.* 2014 Apr 25;289(17):11704-14. doi: 10.1074/jbc.M113.502542
308. Zou G, Ochiai H, Huang W, Yang Q, Li C, Wang LX. 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 FcγIIIa receptor. *J Am Chem Soc.* 2011 Nov 23;133(46):18975-91. doi: 10.1021/ja208390n
309. Mizuochi T, Hamako J, Titani K. Structures of the sugar chains of mouse immunoglobulin G. *Arch Biochem Biophys.* 1987 Sep;257(2):387-94. doi: 10.1016/0003-9861(87)90581-9
310. Ferrara C, Brünker P, Suter T, Moser S, Püntener U, Umaña P. 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 Apr 5;93(5):851-61. doi: 10.1002/bit.20777
311. Heindel DW, Chen S, Aziz PV, Chung JY, Marth JD, Mahal LK. Glycomic analysis reveals a conserved response to bacterial sepsis induced by different bacterial pathogens. *ACS Infect Dis.* 2022 May 13;8(5):1075-85. doi: 10.1021/acsinfecdis.2c00082
312. Bermejo-Martin JF, Giamarellos-Bourboulis EJ. Endogenous immunoglobulins and sepsis: New perspectives for guiding replacement therapies. *Int J Antimicrob Agents.* 2015 Dec;46 Suppl 1:S25-8. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.10.013
313. Petrović T, Alves I, Bugada D, Pascual J, Vučković F, Skelin A, *i sur.* Composition of the immunoglobulin G glycome associates with the severity of COVID-19. *Glycobiology.* 2021 May 3;31(4):372-7. doi: 10.1093/glycob/cwaa102
314. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: Implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis.* 2008 Oct;198(7):962-70. doi: 10.1086/591708
315. Bauer S, Wagner H. Bacterial CpG-DNA licenses TLR9. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002;270:145-54. doi: 10.1007/978-3-642-59430-4\_9

316. Huang T, Chen X, Zhao C, Liu X, Zhang Z, Li T, i sur. Sialylated immunoglobulin G can neutralize influenza virus infection through receptor mimicry. *Oncotarget*. 2016 Mar 29;7(13):15606-17. doi: 10.18632/oncotarget.7244
317. Hung IFN, To KKW, Lee CK, Lee KL, Yan WW, Chan K, i sur. Hyperimmune intravenous immunoglobulin treatment: a multicentre double-blind randomized controlled trial for patients with severe 2009 influenza A(H1N1) infection. *Chest*. 2013 Aug;144(2):464-73. doi: 10.1378/chest.12-2907
318. Luke TC, Kilbane EM, Jackson JL, Hoffman SL. Meta-analysis: Convalescent blood products for Spanish influenza pneumonia: a future H5N1 treatment? *Ann Intern Med*. 2006 Oct 17;145(8):599-609. doi: 10.7326/0003-4819-145-8-200610170-00139
319. Vanderven HA, Wragg K, Ana-Sosa-Batiz F, Kristensen AB, Jegaskanda S, Wheatley AK, i sur. Anti-influenza hyperimmune immunoglobulin enhances Fc-functional antibody immunity during human influenza infection. *J Infect Dis*. 2018 Sep 22;218(9):1383-93. doi: 10.1093/infdis/jiy328
320. Humphreys IR, Edwards L, Snelgrove RJ, Rae AJ, Coyle AJ, Hussell T. A critical role for ICOS co-stimulation in immune containment of pulmonary influenza virus infection. *Eur J Immunol*. 2006 Nov;36(11):2928-38. doi: 10.1002/eji.200636155
321. Magliozzi R, Marastoni D, Calabrese M. The BAFF / APRIL system as therapeutic target in multiple sclerosis. *Expert Opin Ther Targets*. 2020 Nov;24(11):1135-45. doi: 10.1080/14728222.2020.1821647
322. Campi I, Tosi D, Rossi S, Vannucchi G, Covelli D, Colombo F, i sur. B cell activating factor (BAFF) and BAFF receptor expression in autoimmune and nonautoimmune thyroid diseases. *Thyroid*. 2015 Sep;25(9):1043-9. doi: 10.1089/thy.2015.0029
323. Kumar R, Theiss AL, Venuprasad K. ROR $\gamma$ t protein modifications and IL-17-mediated inflammation. *Trends Immunol*. 2021 Nov;42(11):1037-1050. doi: 10.1016/j.it.2021.09.005
324. Ganesh BB, Bhattacharya P, Gopisetty A, Prabhakar BS. Role of cytokines in the pathogenesis and suppression of thyroid autoimmunity. *J Interferon Cytokine Res*. 2011 Oct;31(10):721-31. doi: 10.1089/jir.2011.0049
325. Salomon BL. Insights into the biology and therapeutic implications of TNF and regulatory T cells. *Nat Rev Rheumatol*. 2021 Aug;17(8):487-504. doi: 10.1038/s41584-021-00639-6



## 11. KRATKA BIOGRAFIJA

**Marina Kljaković-Gašpić Batinjan** rođena je 21. listopada 1986. godine u Trogiru. Nakon završene gimnazije u Splitu, upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 2005. godine, te isti završava 2012. godine.

Specijalizaciju iz anesteziologije, reanimatologije i intenzivne medicine započinje 2014. godine u Klinici za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivnu medicinu i terapiju boli, Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Tijekom specijalizacije završava poslijediplomski specijalistički studij, te u ožujku 2021. godine polaže specijalistički ispit.

Rezultate dosadašnjeg istraživačkog rada prezentirala je na međunarodnim i domaćim skupovima, te je autorica više stručnih i preglednih radova. Dio rezultata ovog doktorskog rada prezentirala je u travnju 2019. godine na 29. Europskom kongresu kliničke mikrobiologije i infektivnih bolesti u Amsterdamu, u Nizozemskoj, i u lipnju 2022. godine na Međunarodnoj konferenciji o imunologiji i infektivnim bolestima u Beču, u Austriji, prilikom čega je dobila priznanje za izvanredan rad. Za istaknuti je objavu dijela rezultata u sklopu znanstvenog rada "Differences in immunoglobulin G glycosylation between influenza and COVID-19 patients" koji je objavljen u časopisu Engineering.

Član je Hrvatskog anesteziološkog i Europskog intenzivističkog društva. Uža područja njezinog interesa uključuju kardijalnu anesteziju, intenzivnu medicinu, mehaničku potporu cirkulaciji i transplantacijsku medicinu.

Aktivno se služi engleskim, njemačkim i talijanskim jezikom.

**PRIVITAK**

## PRILOG 1

**Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“  
Zavod za akutne respiratorne infekcije  
Zagreb, Mirogojska 8**

**INFORMIRANI PRISTANAK NA SUDJELOVANJE U ISTRAŽIVANJU  
“Usporedba glikozilacije imunoglobulina G u bolesnika s influencom i  
bolesnika s bakterijskom pneumonijom”  
OBRAZAC ZA ISPITANIKE/BOLESNIKE**

Poštovani,

pozivamo Vas da u svojstvu ispitanika sudjelujete u znanstvenom istraživanju u kojem se ispituju epidemiološke, kliničke, mikrobiološke i laboratorijske osobitosti te glikozilacijski profil imunoglobulina G u bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom hospitaliziranih u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu.

Voditelj istraživanja je doc. dr. sc. prim. Rok Čivljak, dr. med., nastavnik Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i pročelnik Zavoda za akutne respiratorne infekcije Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu. U istraživanje će biti uključeni još i djelatnici Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu: prof. dr. sc. Alemka Markotić, ravnateljica Klinike; prof. dr. sc. Ilija Kuzman, odjelni liječnik; Eva Huljev, dr. med., odjelni liječnik; Marina Kljaković-Gašpić Batinjan, dr. med., specijalizantica Klinike za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivnu medicinu, KBC Zagreb te studentica poslijediplomskog doktorskog studija „Biomedicina i zdravstvo“ Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te Moris Bagić, student VI. godine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje će se provesti u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ tijekom 2018. i 2019. godine.

**Molimo Vas pažljivo pročitajte ovaj Informirani pristanak na sudjelovanje u istraživanju.**

U slučaju da ne razumijete bilo koji dio Informiranog pristanka molimo Vas da se za objašnjenje obratite ispitivaču. Vaše sudjelovanje u ovom ispitivanju je dobrovoljno i možete u bilo kojem trenutku povući svoj informirani pristanak na sudjelovanje u istraživanju. Za sudjelovanje u istraživanju neće Vam biti dodijeljena nikakva financijska naknada. Informirani pristanak supotpisuje i istraživač, a jedan primjerak potpisanog Informiranog pristanka dobit ćete osobno. Drugi primjerak ostaje kod istraživača ovog ispitivanja radi arhiviranja. Liječnik-istraživač koji provodi ovo istraživanje neće primiti nikakvu financijsku naknadu za provođenje ovog istraživanja.

## **PODATCI O ISTRAŽIVANJU**

Istraživanje će obuhvatiti akutno oboljele osobe hospitalizirane u Klinici zbog influence ili bakterijske pneumonije te zdrave ispitanike.

Svrha ovog istraživanja je istražiti epidemiološke, kliničke, mikrobiološke, laboratorijske i imunološke osobitosti u bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom.

Primarni cilj je istražiti razlikuje li se glikozilacijski profil imunoglobulina G u serumu bolesnika s influencom od glikozilacijskog imunoglobulina G u serumu bolesnika s bakterijskom pneumonijom. Sekundarni ciljevi su: utvrditi može li određivanje glikozilacijskog profila imunoglobulina G u serumu bolesnika pomoći u razlikovanju virusne infekcije (influence) od bakterijske infekcije (bakterijske pneumonije); utvrditi eventualne promjene u glikozilaciji u ranoj i kasnoj fazi akutne bolesti s ciljem praćenja dinamike bolesti; istražiti potencijalnu ulogu glikozilacije u predikciji komplikacija i ishoda liječenja u bolesnika s influencom i bakterijskom pneumonijom; usporediti pojedinačne čimbenike rizika, etiologiju bolesti, klinička obilježja i terapijske intervencije (npr. težinu bolesti, trajanje antimikrobnog liječenja), zajedno s ostalim uobičajenim mjerama praćenja ishoda liječenja (npr. duljina hospitalizacije, potreba za mjerama intenzivnog liječenja, itd.).

Dobiveni podatci bi mogli poslužiti za bolje razumjevanje i daljnje istraživanje imunoloških mehanizama u podlozi virusnih i bakterijskih bolesti s ciljem boljeg praćenja dinamike bolesti i unaprijeđenja terapijskih protokola.

Radi se o opservacijskom istraživanju, bez intervencije, tijekom kojega će se prikupljati samo rutinski anamnestički, klinički, dijagnostički i terapijski podatci dobiveni tijekom hospitalizacije u Klinici. Dodatno će se u suradnoj ustanovi (laboratorij tvrtke Genos DNA laboratorij d.o.o. iz Zagreba) odrediti glikozilacijski profil imunoglobulina G u serumu bolesnika s influencom, bolesnika sa bakterijskom pneumonijom te u zdravih ispitanika koji će služiti kao kontrolna skupina. Uzorci seruma uzimati će se u tri navrata: prvog, sedmog i 28. dana po prijemu.

U ovom istraživanju neće se provoditi nikakvi oblici liječenja koji se ne bi provodili i inače u tijeku uobičajene skrbi u našoj Klinici za bolesnike s influencom i bolesnike s bakterijskom pneumonijom. Podatke o bolesnicima prikupljati će jedan od gore navedenih istraživača, a svi prikupljeni demografski, epidemiološki, klinički, laboratorijski i drugi podatci iz medicinske dokumentacije dobiveni tijekom istraživanja prikupljati će se i unositi u za ovu studiju formiranu elektronsku bazu podataka.

## **POVJERLJIVOST I PRAVO UVIDA U DOKUMENTACIJU**

Svi Vaši osobni podaci biti će pohranjeni i obrađivani u elektroničkom obliku, a voditelj istraživanja i njegovi suradnici su dužni u potpunosti poštivati propisane postupke za zaštitu osobnih podataka. Svi Vaši podaci biti će uneseni u bazu anonimno, bez mogućnosti da treće osobe dobiju uvid u Vaše osobne podatke. Samo glavni istražitelj poznavati će popis evidencijskih brojeva prema kojemu će se moći povezati Vaši podaci s kodiranom šifrom. U baze podataka Vi ćete biti uneseni inicijalima imena i prezimena i pomoću posebnog koda. Vašu medicinsku dokumentaciju će pregledavati samo voditelj istraživanja i njegovi suradnici, a Vaše ime nikada neće biti otkriveno trećim osobama. Pristup Vašoj dokumentaciji može imati i Etičko povjerenstvo Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu koje je odgovorno za odobravanje i nadzor nad provođenjem ovog istraživanja.

Vaši osobni podaci i uzorci krvi koristiti će se samo u ovom istraživanju i čuvati će se 5 godina nakon čega će biti uništeni i neće biti predani trećoj strani. U slučaju potrebe, istraživači iz ovog istraživanja mogu ih koristiti za potrebe dodatnih analiza vezanih uz prethodno navedene ciljeve ovog istraživanja.

## **ZA ŠTO ĆE KORISTITI PODATCI DOBIVENI U OVOM ISTRAŽIVANJU I KOJA JE KORIST ZA ISTRAŽIVAČA?**

Rezultati ovog istraživanja mogu biti korisni u svrhu daljnjeg razvoja znanosti. Očekuje se da se podaci dobiveni istraživanjem objave u odgovarajućim znanstvenim publikacijama. Pri tome će Vaš identitet ostati u potpunosti anonimn i zaštićen.

## **TKO ORGANIZIRA I FINANCIRA ISTRAŽIVANJE**

Istraživanje će se financirati sredstvima Znanstvenog centra izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju i Znanstvene jedinice Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu.

## **TKO JE ODOBRILO OVO ISTRAŽIVANJE**

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## **MOGUĆI RIZICI I KORISTI**

Budući se radi o opservacijskom istraživanju, bez intervencije, ovo istraživanje ne uključuje nikakav rizik za ispitanika, osim rizika vađenja krvi. Vađenje krvi je izuzetno siguran postupak

koji se izvodi rutinski i izuzetno rijetko rezultira ozbiljnim komplikacijama, no kao i svi medicinski postupci uključuje određene rizike. Vađenje krvi izvode posebno educirani zdravstveni djelatnici koji poštuju stroga pravila asepsa. Mogući rizici u svezi s vađenjem krvi uključuju stvaranje modrice, hematoma, infekcije na mjestu uboda, krvarenje, nesvjesticu i vrtoglavicu.

Ispitanik nema izravnu koristi od ovog istraživanja, ali je moguća buduća koristi za osobe s virusnim i bakterijskim oboljenjima. Za sudjelovanje u istraživanju neće Vam biti dodijeljena nikakva financijska naknada. Ukoliko dođe do trudnoće, ispitanica će se isključiti iz studije.

### **DOBROVOLJNO SUDJELOVANJE**

Sudjelovanje u ovome istraživanju je u potpunosti dobrovoljno. Vaša odluka o tome želite li ili ne sudjelovati u ovom istraživanju ni na koji način neće utjecati na način, postupke i tijek Vašeg liječenja. Ukoliko se odlučite sudjelovati u istraživanju, možete u bilo kojem trenutku prekinuti svoje sudjelovanje u njemu. O Vašoj odluci obavijestit ćete istraživača u pisanom obliku. Odluka o prekidanju sudjelovanja u istraživanju ni na koji način neće utjecati na način, postupke i tijek Vašeg liječenja.

### **SLUČAJNI NALAZI**

U slučaju da se tijekom istraživanja otkrije neki slučajni patološki nalaz (npr. otkriće genske bolesti prilikom genetičkih istraživanja, hematoloških bolesti kod uzimanja uzorka krvi) ispitanik će odmah o tome biti obaviješten. U slučaju da rezultati istraživanja ukažu na čimbenike koji uzrokuju ili značajno doprinose riziku za nastanak bolesti ispitanik će o tome biti obaviješten. Ispitanik također može biti obaviješten o rezultatima istraživanja na vlastiti zahtjev.

### **NOVI REZULTATI**

Ukoliko se dobiju tijekom ispitivanja, ispitanik će o njima biti obaviješten.

**Ovaj tekst pročitajte zajedno sa istraživačem i/ili članovima obitelji.**

### **PITANJA O ISTRAŽIVANJU I KONTAKT PODACI**

Za dodatna pitanja o samom istraživanju možete se obratiti voditelju istraživanja u našem istraživačkom centru ili jednom od suradnika u istraživanju:

**Doc. dr. sc. prim. Rok Čivljak, dr. med.**

**Broj telefona: 01/2826118**

**E-mail: [rok.civljak@bfm.hr](mailto:rok.civljak@bfm.hr)**

**Prof. dr. sc. Alemka Markotić, dr. med.**

**Broj telefona: 01/2826154**

**E-mail: [alemka.markotic@bfm.hr](mailto:alemka.markotic@bfm.hr)**

**Prof. dr. sc. Ilija Kuzman, dr. med.**

**Broj telefona: 01/2826215**

**E-mail: [ikuzman@bfm.hr](mailto:ikuzman@bfm.hr)**

**Eva Huljev, dr. med.**

**Broj telefona: 01/2826118**

**E-mail: [ehuljev@bfm.hr](mailto:ehuljev@bfm.hr)**

**Marina Kljaković-Gašpić Batinjan, dr. med.**

**Broj telefona: 099/3404040**

**E-mail: [marina.kljakovicgaspic@gmail.com](mailto:marina.kljakovicgaspic@gmail.com)**

**Moris Bagić, student medicine**

**Broj telefona: 095/7407101**

**E-mail: [moris.bagic@gmail.com](mailto:moris.bagic@gmail.com)**

## **SUGLASNOST ISPITANIKA ZA SUDJELOVANJE U ISTRAŽIVANJU**

1. Potvrđujem da sam pročitao/pročitala ovu obavijest za gore navedeno znanstveno istraživanje te sam imao/imala priliku postavljati pitanja i dobio/dobila zadovoljavajuće, jasne i potpune odgovore.
2. Dobro sam razumio/razumjela postupke i svrhu istraživanja. Suglasan/suglasna sam sudjelovati u gore navedenom istraživanju.
3. Razumijem da je moje sudjelovanje dobrovoljno te se mogu povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga i bez ikakvih posljedica po moje zdravlje ili nastavak liječenja u ovoj Ustanovi.
4. Pristajem da mojoj medicinskoj dokumentaciji imaju pristup odgovorni pojedinci, tj. glavni istraživač i njegovi suradnici. Suglasan/suglasna sam da će podaci dobiveni istraživanjem biti poznati samo liječniku/glavnom istraživaču i meni, biti povjerljivi, a moj identitet zaštićen od javnosti.
5. Suglasan/suglasna sam da se rezultati istraživanja koriste u znanstvene svrhe i objavljuju u znanstvenim časopisima.
6. Pristajem u ovome istraživanju sudjelovati dobrovoljno i ne potražujem nikakvu novčanu naknadu.
7. Pristajem da član moje obitelji/skrbnik bude upoznat s mojim sudjelovanjem u navedenom znanstvenom istraživanju.
8. Potvrđujem da sam sve navedeno dobro razumio/razumjela te da pri punoj svijesti i svojevoljno potpisujem svoju suglasnost za sudjelovanjem u ovome istraživanju.

U Zagrebu, \_\_\_\_\_(Datum)

---

Ime i prezime ispitanika

Potpis ispitanika

---

Kontakt ispitanika (telefon i/ili e-mail)



Ja, liječnik-istraživač potvrđujem da sam usmeno pružio/pružila potrebne informacije o ovom ispitivanju i dao/dala preslik Informiranog pristanka potpisanog od strane ispitanika i istraživača.

---

Ime i prezime istraživača

Potpis istraživača

***Ova obavijest je sastavljena u skladu s odredbama Zakona o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i Zakona o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04)***

## PRILOG 2

**Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“  
Zavod za akutne respiratorne infekcije  
Zagreb, Mirogojska 8**

### **INFORMIRANI PRISTANAK NA SUDJELOVANJE U ISTRAŽIVANJU**

**“Usporedba glikozilacije imunoglobulina G u bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom”**

### **OBRAZAC ZA KONTROLNU SKUPINU**

Poštovani,

pozivamo Vas da u svojstvu ispitanika sudjelujete u znanstvenom istraživanju u kojem se ispituju epidemiološke, kliničke, mikrobiološke i laboratorijske osobitosti te glikozilacijski profil imunoglobulina G u bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom hospitaliziranih u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu.

Voditelj istraživanja je doc. dr. sc. prim. Rok Čivljak, dr. med., nastavnik Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i pročelnik Zavoda za akutne respiratorne infekcije Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu. U istraživanje će biti uključeni još i djelatnici Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu: prof. dr. sc. Alemka Markotić, ravnateljica Klinike; prof. dr. sc. Ilija Kuzman, odjelni liječnik; Eva Huljev, dr. med., odjelni liječnik; Marina Kljaković-Gašpić Batinjan, dr. med., specijalizantica Klinike za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivnu medicinu, KBC Zagreb te studentica poslijediplomskog doktorskog studija „Biomedicina i zdravstvo“ Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te Moris Bagić, student VI. godine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje će se provesti u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ tijekom 2018. i 2019. godine.

**Molimo Vas pažljivo pročitajte ovaj Informirani pristanak na sudjelovanje u istraživanju.**

U slučaju da ne razumijete bilo koji dio Informiranog pristanka molimo Vas da se za objašnjenje obratite ispitivaču. Vaše sudjelovanje u ovom ispitivanju je dobrovoljno i možete u bilo kojem trenutku povući svoj informirani pristanak na sudjelovanje u istraživanju. Za sudjelovanje u istraživanju neće Vam biti dodijeljena nikakva financijska naknada. Informirani pristanak supotpisuje i istraživač, a jedan primjerak potpisanog Informiranog pristanka dobit ćete osobno. Drugi primjerak ostaje kod istraživača ovog ispitivanja radi arhiviranja. Liječnik-istraživač koji provodi ovo istraživanje neće primiti nikakvu financijsku naknadu za provođenje ovog istraživanja.

## **PODATCI O ISTRAŽIVANJU**

Istraživanje će obuhvatiti akutno oboljele osobe hospitalizirane u Klinici zbog influence ili bakterijske pneumonije te zdrave ispitanike.

Svrha ovog istraživanja je istražiti epidemiološke, kliničke, mikrobiološke, laboratorijske i imunološke osobitosti u bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom.

Primarni cilj je istražiti razlikuje li se glikozilacijski profil imunoglobulina G u serumu bolesnika s influencom od glikozilacijskog imunoglobulina G u serumu bolesnika s bakterijskom pneumonijom. Sekundarni ciljevi su: utvrditi može li određivanje glikozilacijskog profila imunoglobulina G u serumu bolesnika pomoći u razlikovanju virusne infekcije (influence) od bakterijske infekcije (bakterijske pneumonije); utvrditi eventualne promjene u glikozilaciji u ranoj i kasnoj fazi akutne bolesti s ciljem praćenja dinamike bolesti; istražiti potencijalnu ulogu glikozilacije u predikciji komplikacija i ishoda liječenja u bolesnika s influencom i bakterijskom pneumonijom; usporediti pojedinačne čimbenike rizika, etiologiju bolesti, klinička obilježja i terapijske intervencije (npr. težinu bolesti, trajanje antimikrobnog liječenja), zajedno s ostalim uobičajenim mjerama praćenja ishoda liječenja (npr. duljina hospitalizacije, potreba za mjerama intenzivnog liječenja, itd.).

Dobiveni podatci bi mogli poslužiti za bolje razumijevanje i daljnje istraživanje imunoloških mehanizama u podlozi virusnih i bakterijskih bolesti s ciljem boljeg praćenja dinamike bolesti i unaprijeđenja terapijskih protokola.

Radi se o opservacijskom istraživanju, bez intervencije, tijekom kojega će se prikupljati samo rutinski anamnestički, klinički, dijagnostički i terapijski podatci dobiveni tijekom hospitalizacije u Klinici. Dodatno će se u suradnoj ustanovi (laboratorij tvrtke Genos DNA laboratorij d.o.o. iz Zagreba) odrediti glikozilacijski profil imunoglobulina G u serumu bolesnika s influencom, bolesnika sa bakterijskom pneumonijom te u zdravih ispitanika koji će služiti kao kontrolna skupina.

## **PODATCI O POSTUPCIMA KOJI ĆE SE PROVODITI ZDRAVIM ISPITANICIMA**

Tijekom ovog istraživanja zdravi ispitanici, koji će služiti kao kontrolna skupina, doći će u posjet liječniku/istraživaču ukupno tri puta tijekom jednog mjeseca. Prilikom prve posjete liječnik/istraživač upoznat će ispitanika s istraživanjem i objasniti mu postupke. Uzeti će se osnovni podatci o zdravstvenom stanju, dosadašnjim bolestima i liječenju ispitanika. Sljedeći kontakt s istraživačem obaviti će se sedam i 28 dana nakon prve posjete. Prilikom svake posjete uzeti će se jedan uzorak krvi u količini od 2 ml. Tijekom ispitivanja neće biti potrebno boraviti u bolnici, niti će se izvoditi bilo kakvi drugi dijagnostički i terapijski zahvati. Podatke će prikupljati jedan od istraživača, a svi prikupljeni podatci unositi će se u za ovu studiju formiranu elektronsku bazu podataka.

## **POVJERLJIVOST I PRAVO UVIDA U DOKUMENTACIJU**

Svi Vaši osobni podatci biti će pohranjeni i obrađivani u elektroničkom obliku, a voditelj istraživanja i njegovi suradnici su dužni u potpunosti poštivati propisane postupke za zaštitu osobnih podataka. Svi Vaši podatci biti će uneseni u bazu anonimno, bez mogućnosti da treće osobe dobiju uvid u Vaše osobne podatke. Samo glavni istražitelj poznavati će popis evidencijskih brojeva prema kojemu će se moći povezati Vaši podatci s kodiranom šifrom. U baze podataka Vi ćete biti uneseni inicijalima imena i prezimena i pomoću posebnog koda. Vašu medicinsku dokumentaciju će pregledavati samo voditelj istraživanja i njegovi suradnici, a Vaše ime nikada neće biti otkriveno trećim osobama. Pristup Vašoj dokumentaciji može imati i Etičko povjerenstvo Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu koje je odgovorno za odobravanje i nadzor nad provođenjem ovog istraživanja.

Vaši osobni podatci i uzorci krvi koristiti će se samo u ovom istraživanju i čuvati će se 5 godina nakon čega će biti uništeni i neće biti predani trećoj strani. U slučaju potrebe, istraživači iz ovog istraživanja mogu ih koristiti za potrebe dodatnih analiza vezanih uz prethodno navedene ciljeve ovog istraživanja.

## **ZA ŠTO ĆE KORISTITI PODATCI DOBIVENI U OVOM ISTRAŽIVANJU I KOJA JE KORIST ZA ISTRAŽIVAČA?**

Rezultati ovog istraživanja mogu biti korisni u svrhu daljnjeg razvoja znanosti. Očekuje se da se podatci dobiveni istraživanjem objave u odgovarajućim znanstvenim publikacijama. Pri tome će Vaš identitet ostati u potpunosti anonimn i zaštićen.

## **TKO ORGANIZIRA I FINANCIRA ISTRAŽIVANJE**

Istraživanje će se financirati sredstvima Znanstvenog centra izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju i Znanstvene jedinice Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu.

## **TKO JE ODOBRILO OVO ISTRAŽIVANJE**

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu..

## **MOGUĆI RIZICI I KORISTI**

Budući se radi o opservacijskom istraživanju, bez intervencije, ovo istraživanje ne uključuje nikakav rizik za ispitanika, osim rizika vađenja krvi. Vađenje krvi je izuzetno siguran postupak koji se izvodi rutinski i izuzetno rijetko rezultira ozbiljnim komplikacijama, no kao i svi medicinski postupci uključuje određene rizike. Vađenje krvi izvode posebno educirani zdravstveni djelatnici koji poštuju stroga pravila asepse. Mogući rizici u svezi s vađenjem krvi uključuju stvaranje modrice, hematoma, infekcije na mjestu uboda, krvarenje, nesvjesticu i vrtoglavicu.

Ispitanik nema izravnu koristi od ovog istraživanja, ali je moguća buduća koristi za osobe s virusnim i bakterijskim oboljenjima. Za sudjelovanje u istraživanju neće Vam biti dodijeljena nikakva financijska naknada. Ukoliko dođe do trudnoće, ispitanica će se isključiti iz studije.

### **DOBROVOLJNO SUDJELOVANJE**

Sudjelovanje u ovome istraživanju je u potpunosti dobrovoljno. Ukoliko se odlučite sudjelovati u istraživanju, možete u bilo kojem trenutku prekinuti svoje sudjelovanje u njemu. O Vašoj odluci obavijestit ćete istraživača u pisanom obliku. Odluka o prekidanju sudjelovanja u istraživanju ni na koji način neće utjecati na dalje postupke prema Vama.

### **SLUČAJNI NALAZI**

U slučaju da se tijekom istraživanja otkrije neki slučajni patološki nalaz (npr. otkriće genske bolesti prilikom genetičkih istraživanja, hematoloških bolesti kod uzimanja uzorka krvi) ispitanik će odmah o tome biti obaviješten. U slučaju da rezultati istraživanja ukažu na čimbenike koji uzrokuju ili značajno doprinose riziku za nastanak bolesti ispitanik će o tome biti obaviješten. Ispitanik također može biti obaviješten o rezultatima istraživanja na vlastiti zahtjev.

### **NOVI REZULTATI**

Ukoliko se dobiju tijekom ispitivanja, ispitanik će o njima biti obaviješten.

**Ovaj tekst pročitajte zajedno s istraživačem.**

### **PITANJA O ISTRAŽIVANJU I KONTAKT PODACI**

Za dodatna pitanja o samom istraživanju možete se obratiti voditelju istraživanja u našem istraživačkom centru ili jednom od suradnika u istraživanju:

**Doc. dr. sc. prim. Rok Čivljak, dr. med.**

**Broj telefona: 01/2826118**

**E-mail: [rok.civljak@bfm.hr](mailto:rok.civljak@bfm.hr)**

**Prof. dr. sc. Alemka Markotić, dr. med.**

**Broj telefona: 01/2826154**

**E-mail: [alemka.markotic@bfm.hr](mailto:alemka.markotic@bfm.hr)**

**Prof. dr. sc. Ilija Kuzman, dr. med.**

**Broj telefona: 01/2826215**

**E-mail: [ikuzman@bfm.hr](mailto:ikuzman@bfm.hr)**

**Eva Huljev, dr. med.**

**Broj telefona: 01/2826118**

**E-mail: [ehuljev@bfm.hr](mailto:ehuljev@bfm.hr)**

**Marina Kljaković-Gašpić Batinjan, dr. med.**

**Broj telefona: 099/3404040**

**E-mail: [marina.kljakovicgaspic@gmail.com](mailto:marina.kljakovicgaspic@gmail.com)**

## SUGLASNOST ISPITANIKA ZA SUDJELOVANJE U ISTRAŽIVANJU

1. Potvrđujem da sam pročitao/pročitala ovu obavijest za gore navedeno znanstveno istraživanje te sam imao/imala priliku postavljati pitanja i dobio/dobila zadovoljavajuće, jasne i potpune odgovore.
2. Dobro sam razumio/razumjela postupke i svrhu istraživanja. Suglasan/suglasna sam sudjelovati u gore navedenom istraživanju.
3. Razumijem da je moje sudjelovanje dobrovoljno te se mogu povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga i bez ikakvih posljedica po moje zdravlje ili nastavak liječenja u ovoj Ustanovi.
4. Pristajem da mojoj medicinskoj dokumentaciji imaju pristup odgovorni pojedinci, tj. glavni istraživač i njegovi suradnici. Suglasan/suglasna sam da će podaci dobiveni istraživanjem biti poznati samo liječniku/glavnom istraživaču i meni, biti povjerljivi, a moj identitet zaštićen od javnosti.
5. Suglasan/suglasna sam da se rezultati istraživanja koriste u znanstvene svrhe i objavljuju u znanstvenim časopisima.
6. Pristajem u ovome istraživanju sudjelovati dobrovoljno i ne potražujem nikakvu novčanu naknadu.
7. Pristajem da član moje obitelji/skrbnik bude upoznat s mojim sudjelovanjem u navedenom znanstvenom istraživanju.
8. Potvrđujem da sam sve navedeno dobro razumio/razumjela te da pri punoj svijesti i svojevrijem potpisujem svoju suglasnost za sudjelovanjem u ovome istraživanju.

U Zagrebu, \_\_\_\_\_ (Datum)

\_\_\_\_\_  
Ime i prezime ispitanika

\_\_\_\_\_  
Potpis ispitanika

\_\_\_\_\_  
Kontakt ispitanika (telefon i/ili e-mail)

Ja, liječnik-istraživač potvrđujem da sam usmeno pružio/pružila potrebne informacije o ovom ispitivanju i dao/dala preslik Informiranog pristanka potpisanog od strane ispitanika i istraživača.

\_\_\_\_\_  
Ime i prezime istraživača

\_\_\_\_\_  
Potpis istraživača

***Ova obavijest je sastavljena u skladu s odredbama Zakona o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i Zakona o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04)***

## **PRILOG 3**

**Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“**

**Zavod za akutne respiratorne infekcije**

**Zagreb, Mirogojska 8**

**ISTRAŽIVANJE: „Usporedba glikozilacije imunoglobulina G u bolesnika s influencom i bolesnika s bakterijskom pneumonijom“**

### **POSTUPNIK ZA PRIKUPLJANJE, OBRADU I POHRANU UZORAKA KRVI**

**Ovaj postupnik sastoji se od tri dijela:**

- a) Upute za prikupljanje uzoraka krvi ispitanika**
- b) Upute za odvajanje plazme**
- c) Upute za pohranu uzoraka plazme**

#### **1. PRIKUPLJANJE UZORAKA KRVI ISPITANIKA**

- Za svakog ispitanika potreban je jedan spremnik za uzorkovanje krvi s podtlakom volumena 6 ml sa etilediamintetraoctenom kiselinom (EDTA) – epruveta s ljubičastim čepom.
- Na spremnik zabilježite: ime i prezime ispitanika, datum rođenja i datum uzorkovanja.
- Prikupljanje uzoraka krvi potrebno je vršiti metodom „podveza+sustav za vađenje krvi s leptirićem“. Napuniti spremnik do oznake.
- Nakon uzorkovanja važno je dobro promiješati uzorak (učiniti barem jedan ciklus miješanja uzorka).
- Epruvete s uzorkom krvi odmah dostaviti u laboratorij (unutar **6 sati** od vađenja krvi). Uzorci krvi trebali bi biti pohranjeni u uspravnom položaju te na temperaturi od 4°C do trenutka predaje u laboratorij.

#### **2. UPUTE ZA ODVAJANJE PLAZME**

- UZORCI KRVI MORAJU SE OBRADITI ISTOG DANA KADA SU DONESENI U LABORATORIJ!
- Prije centrifugiranja ostavite epruvete u uspravnom položaju na sobnoj temperaturi sat vremena.
- Centrifugiranje uzorka krvi:
  - a) Bez mučkanja, nježno prebacite epruvete u aparat za centrifugiranje koristeći prikladan nosač.
  - b) Centrifugirajte sa centrifugalnom silom od **1620 g** deset minuta.
  - c) Ne koristite kočnicu kako bi ste zaustavili centrifugiranje.
- Prebacivanje plazme u ependorfice:
  - a) Zabilježite podatke o ispitaniku na ependorfice.
  - b) Pazite da ne dođe do miješanja na granici plazma/leukociti te odmah prebacite plazmu u ependorfice od 2 ml koristeći pipetu od 1 ml.
- Centrifugiranje uzorka plazme
  - a) Postavite ependorfice u centrifugu koristeći odgovarajući nosač te centrifugirajte uzorke plazme centrifugalnom silom od **2700 g** deset minuta.

### 3. UPUTE ZA POHRANU UZORAKA PLAZME

- Prebacivanje plazme u epruvete za smrzavanje
  - a) Zabilježite podatke o ispitaniku (ime i prezime ispitanika, datum rođenja i datum uzorkovanja) na **tri** epruvete za smrzavanje uz pomoć vodootpornog markera.
  - b) Označite tri epruvete za smrzavanje, koje sadrže plazmu istog ispitanika, brojevima **1, 2 i 3**.
  - c) Prebacite plazmu u epruvete za smrzavanje, pazeći da volumen bude jednako raspodijeljen između 3 epruvete.
- Pohranite uzorke plazme na -20 ili -80 °C
  - a) Prebacite epruvete za smrzavanje koje sadrže uzorke plazme u kutije s ledom te pohranite u zamrzivač na -20 ili -80°C
  - b) Ažurirajte sistem za evidenciju o pohrani uzoraka (excel tablica)



*Prilog, Tablica 1. Deskriptivna tablica s mjerama raspršenja za sva 24 ispitivana kromatografska vrha (GP) imunoglobulina G u tri ispitivane skupine u tri vremenske točke*

GP	T	Bakterijska pneumonija (n = 75)		Influenza (n = 64)		Kontrolna skupina (n = 56)	
		Medijan (IQR)	Min – Max	Medijan (IQR)	Min – Max	Medijan (IQR)	Min – Max
GP1	T1	0,12 (0,08)	0,03 – 0,72	0,10 (0,06)	0,00 – 0,29	0,12 (0,06)	0,00 – 0,42
	T2	0,15 (0,11)	0,04 – 1,01	0,12 (0,07)	0,00 – 0,29	0,12 (0,06)	0,04 – 0,36
	T3	0,15 (0,13)	0,03 – 0,90	0,12 (0,07)	0,00 – 0,26	0,11 (0,08)	0,00 – 0,24
GP2	T1	0,58 (0,58)	0,15 – 3,25	0,70 (0,68)	0,00 – 2,47	0,25 (0,51)	0,00 – 2,42
	T2	0,62 (0,63)	0,15 – 2,51	0,72 (0,78)	0,00 – 2,65	0,27 (0,50)	0,07 – 2,40
	T3	0,52 (0,54)	0,16 – 2,06	0,71 (0,74)	0,00 – 2,35	0,59 (0,92)	0,00 – 2,39
GP3	T1	0,12 (0,05)	0,05 – 0,27	0,11 (0,04)	0,00 – 0,25	0,13 (0,05)	0,00 – 0,66
	T2	0,13 (0,06)	0,07 – 0,26	0,11 (0,04)	0,00 – 0,20	0,13 (0,05)	0,06 – 0,21
	T3	0,14 (0,06)	0,05 – 0,27	0,11 (0,03)	0,00 – 0,19	0,13 (0,05)	0,00 – 0,20
GP4	T1	27,28 (10,00)	12,00 – 58,33	25,43 (8,30)	14,91 – 47,89	27,83 (9,67)	14,18 – 45,82
	T2	28,65 (11,52)	12,47 – 53,66	24,96 (8,87)	14,62 – 39,42	26,39 (11,30)	12,62 – 42,02
	T3	30,13 (11,30)	11,96 – 54,02	26,27 (7,39)	12,08 – 40,45	27,53 (9,61)	13,86 – 37,08
GP5	T1	0,17 (0,04)	0,11 – 0,30	0,17 (0,05)	0,00 – 0,25	0,15 (0,04)	0,00 – 0,41
	T2	0,16 (0,05)	0,10 – 0,25	0,16 (0,04)	0,00 – 0,24	0,14 (0,04)	0,09 – 0,40
	T3	0,15 (0,04)	0,11 – 0,28	0,15 (0,05)	0,00 – 0,34	0,16 (0,04)	0,00 – 0,37
GP6	T1	6,87 (3,16)	3,38 – 12,81	6,74 (3,52)	3,28 – 12,96	6,16 (2,97)	3,11 – 13,88
	T2	5,96 (2,80)	3,16 – 11,63	6,32 (3,00)	3,05 – 11,98	5,89 (2,73)	3,00 – 13,60
	T3	6,29 (2,15)	3,36 – 11,87	6,42 (2,49)	3,08 – 12,78	6,78 (2,83)	3,01 – 13,14
GP7	T1	0,33 (0,31)	0,10 – 1,31	0,43 (0,28)	0,00 – 1,35	0,18 (0,17)	0,00 – 1,20
	T2	0,33 (0,30)	0,07 – 1,04	0,48 (0,32)	0,00 – 1,27	0,18 (0,24)	0,07 – 1,16
	T3	0,30 (0,28)	0,08 – 1,06	0,43 (0,33)	0,00 – 0,96	0,31 (0,34)	0,00 – 0,15
GP8	T1	19,22 (3,44)	11,94 – 30,96	18,47 (3,59)	14,08 – 24,68	20,57 (5,24)	14,43 – 28,78
	T2	19,88 (3,67)	12,62 – 31,21	19,35 (3,75)	14,04 – 25,47	20,99 (5,51)	14,21 – 27,81
	T3	20,09 (3,44)	12,79 – 28,53	19,67 (3,58)	15,35 – 25,39	18,96 (4,73)	14,30 – 23,88
GP9	T1	9,06 (1,47)	5,01 – 11,55	9,61 (2,04)	6,38 – 12,43	10,39 (1,87)	5,92 – 14,78
	T2	8,93 (1,69)	5,55 – 11,73	9,34 (2,02)	6,62 – 12,99	10,14 (1,86)	5,95 – 14,60
	T3	8,88 (1,58)	5,54 – 11,86	9,39 (1,74)	6,38 – 12,62	9,30 (1,99)	5,99 – 11,82
GP10	T1	5,35 (1,88)	3,14 – 9,14	5,46 (1,78)	2,76 – 8,38	5,86 (2,46)	3,16 – 9,23
	T2	4,48 (1,41)	2,11 – 8,17	4,90 (1,88)	2,71 – 8,49	5,90 (2,41)	3,58 – 10,35
	T3	4,75 (1,60)	2,74 – 8,43	5,40 (1,66)	3,16 – 8,39	5,60 (1,65)	3,51 – 9,82
GP11	T1	0,70 (0,21)	0,30 – 1,28	0,73 (0,26)	0,40 – 1,24	0,66 (0,23)	0,31 – 1,33
	T2	0,60 (0,20)	0,24 – 1,21	0,67 (0,24)	0,36 – 1,09	0,67 (0,20)	0,32 – 1,35
	T3	0,61 (0,19)	0,31 – 1,15	0,68 (0,24)	0,43 – 1,07	0,73 (0,23)	0,54 – 1,30
GP12	T1	0,53 (0,55)	0,08 – 2,35	0,66 (0,51)	0,08 – 2,92	0,34 (0,28)	0,09 – 1,73
	T2	0,47 (0,52)	0,09 – 1,70	0,83 (0,57)	0,10 – 2,86	0,34 (0,37)	0,11 – 1,74
	T3	0,40 (0,52)	0,09 – 1,84	0,71 (0,58)	0,09 – 1,53	0,46 (0,61)	0,16 – 1,48
GP13	T1	0,20 (0,07)	0,07 – 0,38	0,20 (0,07)	0,12 – 0,46	0,19 (0,05)	0,11 – 0,37
	T2	0,17 (0,06)	0,08 – 0,30	0,20 (0,06)	0,12 – 0,44	0,19 (0,05)	0,11 – 0,40
	T3	0,18 (0,07)	0,07 – 0,33	0,20 (0,06)	0,11 – 0,27	0,21 (0,06)	0,13 – 0,32
GP14	T1	9,90 (4,33)	2,77 – 19,95	11,07 (4,42)	4,14 – 19,59	11,55 (5,42)	4,86 – 21,66
	T2	9,54 (4,71)	3,48 – 20,24	11,68 (4,00)	5,81 – 19,65	11,90 (6,50)	5,17 – 22,46
	T3	9,78 (4,00)	3,51 – 21,07	11,43 (4,24)	6,34 – 25,18	9,87 (7,17)	5,20 – 19,86

Prilog, Tablica 1. (nastavak)

GP	T	Bakterijska pneumonija (n = 75)		Influenca (n = 64)		Kontrolna skupina (n = 56)	
		Medijan (IQR)	Min – Max	Medijan (IQR)	Min – Max	Medijan (IQR)	Min – Max
GP15	T1	1,49 (0,57)	0,35 – 2,62	1,60 (0,43)	0,75 – 3,08	1,36 (0,58)	0,49 – 2,62
	T2	1,32 (0,53)	0,55 – 3,29	1,58 (0,43)	0,76 – 2,82	1,42 (0,54)	0,67 – 2,54
	T3	1,29 (0,58)	0,45 – 2,29	1,52 (0,43)	0,85 – 2,73	1,52 (0,45)	0,87 – 2,15
GP16	T1	3,08 (0,83)	1,60 – 5,26	3,00 (0,80)	1,75 – 4,01	2,72 (0,63)	1,76 – 4,14
	T2	3,24 (0,87)	1,53 – 5,41	3,02 (0,74)	1,93 – 4,14	2,77 (0,65)	1,65 – 4,23
	T3	2,98 (0,86)	1,75 – 4,06	2,88 (0,54)	1,88 – 3,98	2,78 (0,78)	2,08 – 4,29
GP17	T1	0,89 (0,65)	0,18 – 1,66	0,92 (0,36)	0,18 – 2,24	0,33 (0,57)	0,14 – 1,89
	T2	0,85 (0,67)	0,18 – 1,37	0,99 (0,28)	0,24 – 1,90	0,33 (0,58)	0,16 – 1,79
	T3	0,79 (0,65)	0,16 – 1,37	0,85 (0,42)	0,20 – 1,37	0,87 (0,67)	0,20 – 1,73
GP18	T1	7,40 (3,43)	1,75 – 16,08	7,73 (3,09)	2,39 – 12,89	6,21 (3,76)	2,44 – 12,94
	T2	7,07 (3,68)	2,39 – 15,66	8,42 (3,22)	3,59 – 13,62	6,81 (4,02)	2,59 – 15,58
	T3	6,48 (3,62)	2,36 – 16,04	7,87 (3,04)	3,57 – 12,68	6,56 (3,60)	3,12 – 13,18
GP19	T1	1,63 (1,49)	0,20 – 2,45	1,67 (0,66)	0,25 – 2,87	0,40 (1,40)	0,22 – 5,18
	T2	1,48 (1,36)	0,21 – 2,67	1,58 (0,65)	0,31 – 2,69	0,41 (1,37)	0,19 – 5,69
	T3	1,49 (1,53)	0,22 – 2,75	1,47 (0,82)	0,27 – 2,69	1,83 (1,81)	0,23 – 5,49
GP20	T1	0,26 (0,18)	0,05 – 0,45	0,26 (0,09)	0,06 – 0,40	0,12 (0,13)	0,05 – 0,37
	T2	0,24 (0,20)	0,04 – 1,00	0,25 (0,10)	0,08 – 0,50	0,13 (0,13)	0,04 – 0,38
	T3	0,22 (0,17)	0,04 – 0,59	0,23 (0,11)	0,06 – 0,39	0,23 (0,15)	0,07 – 0,36
GP21	T1	0,59 (0,36)	0,17 – 1,13	0,63 (0,17)	0,16 – 1,01	0,22 (0,30)	0,11 – 0,70
	T2	0,54 (0,38)	0,13 – 1,51	0,60 (0,21)	0,17 – 2,32	0,22 (0,33)	0,10 – 0,85
	T3	0,45 (0,29)	0,11 – 1,26	0,49 (0,24)	0,16 – 0,66	0,50 (0,33)	0,14 – 0,68
GP22	T1	0,10 (0,10)	0,00 – 0,28	0,11 (0,07)	0,01 – 0,46	0,02 (0,11)	0,00 – 0,25
	T2	0,09 (0,10)	0,01 – 0,26	0,11 (0,08)	0,01 – 0,31	0,02 (0,13)	0,00 – 0,29
	T3	0,07 (0,08)	0,00 – 0,24	0,09 (0,07)	0,01 – 0,21	0,14 (0,12)	0,01 – 0,22
GP23	T1	1,19 (1,16)	0,19 – 2,54	1,27 (0,72)	0,18 – 3,38	0,39 (0,70)	0,12 – 3,69
	T2	1,29 (1,33)	0,17 – 2,73	1,33 (0,74)	0,25 – 2,68	0,37 (1,00)	0,11 – 3,23
	T3	1,11 (1,19)	0,16 – 2,44	1,20 (0,88)	0,23 – 2,48	1,14 (1,52)	0,14 – 3,21
GP24	T1	1,51 (1,53)	0,15 – 2,75	1,53 (0,84)	0,19 – 2,68	0,31 (1,38)	0,13 – 4,43
	T2	1,39 (1,49)	0,15 – 2,56	1,48 (0,93)	0,22 – 2,43	0,31 (1,39)	0,13 – 4,52
	T3	1,35 (1,42)	0,17 – 2,64	1,29 (1,00)	0,18 – 2,36	1,84 (1,87)	0,17 – 4,45

GP, kromatografski vrh; IQR, interkvartilni raspon; Min – Max, minimalna i maksimalna vrijednost; T, vrijeme; T1, prvo mjerenje; T2, drugo mjerenje; T3, treće mjerenje.

Navedene vrijednosti kromatografskih vrhova (GP) izražene su kao relativni udio u ukupnom N-glikomu imunoglobulina G.

**Prilog, Tablica 2.** Promjene N-glikoma imunoglobulina G između tri vremenske točke (T1, T2 i T3) u bolesnika s influencom nakon meta-analize

Kromatografski vrh (GP)	Vremensko razdoblje	Efekt (razlika) <sup>a</sup>	Standardna pogreška	p-vrijednost	Prilagođena p-vrijednost <sup>b</sup>	Značajnost
GP1	T1 – T2	0,1225	0,1629	0,4521	1	NS
GP1	T2 – T3	-0,1700	0,0722	0,0185	1	NS
GP2	T1 – T2	0,2112	0,0532	7,18E-05	0,0103	S (p<0,05)
GP2	T2 – T3	-0,1926	0,0609	0,0016	0,2252	NS
GP3	T1 – T2	-0,0017	0,1154	0,9880	1,0000	NS
GP3	T2 – T3	0,1122	0,1047	0,2840	1,0000	NS
GP4	T1 – T2	-0,1898	0,1142	0,0964	1,0000	NS
GP4	T2 – T3	0,0339	0,0710	0,6334	1,0000	NS
GP5	T1 – T2	-0,3467	0,1059	0,0011	0,1529	NS
GP5	T2 – T3	-0,2523	0,1048	0,0161	1,0000	NS
GP6	T1 – T2	-0,1679	0,0457	0,0002	0,0343	S (p<0,05)
GP6	T2 – T3	0,0100	0,0537	0,8527	1,0000	NS
GP7	T1 – T2	0,2379	0,0662	0,0003	0,0467	S (p<0,05)
GP7	T2 – T3	-0,2362	0,0539	1,15E-05	0,0017	S (p<0,05)
GP8	T1 – T2	0,3940	0,0781	4,54E-07	6,54E-05	S (p<0,05)
GP8	T2 – T3	0,0650	0,0852	0,445307	1	NS
GP9	T1 – T2	-0,2036	0,0518	8,37E-05	0,0121	S (p<0,05)
GP9	T2 – T3	0,1160	0,0535	0,0300	1	NS
GP10	T1 – T2	-0,3167	0,1171	0,0069	0,9875	NS
GP10	T2 – T3	0,1652	0,1085	0,127712	1	NS
GP11	T1 – T2	-0,4171	0,0765	5,01E-08	7,21E-06	S (p<0,05)
GP11	T2 – T3	-0,0808	0,0813	0,3201	1	NS
GP12	T1 – T2	0,2791	0,0808	0,0006	0,0795	NS
GP12	T2 – T3	-0,3037	0,0586	2,15E-07	3,10E-05	S (p<0,05)
GP13	T1 – T2	-0,2770	0,1066	0,0093	1	NS
GP13	T2 – T3	0,0834	0,0780	0,2851	1	NS
GP14	T1 – T2	0,1242	0,0878	0,1570	1	NS
GP14	T2 – T3	0,0526	0,0688	0,4442	1	NS
GP15	T1 – T2	-0,1784	0,2244	0,4264	1	NS
GP15	T2 – T3	-0,0502	0,0822	0,5413	1	NS
GP16	T1 – T2	0,1484	0,1195	0,2142	1	NS
GP16	T2 – T3	-0,3480	0,0706	8,29E-07	0,0001	S (p<0,05)
GP17	T1 – T2	0,3185	0,0925	0,0006	0,0828	NS
GP17	T2 – T3	-0,5902	0,0731	7,06E-16	1,02E-13	S (p<0,05)
GP18	T1 – T2	0,3794	0,1302	0,0036	0,5134	NS
GP18	T2 – T3	-0,2572	0,0718	0,0003	0,0491	S (p<0,05)
GP19	T1 – T2	-0,1196	0,3207	0,7092	1	NS
GP19	T2 – T3	-0,1217	0,0753	0,1060	1	NS

Prilog, Tablica 2. (nastavak)

Kromatografski vrh	Vremensko razdoblje	Efekt (razlika) <sup>a</sup>	Standardna pogreška	<i>p</i> -vrijednost	Prilagođena <i>p</i> -vrijednost <sup>b</sup>	Značajnost
GP20	T1 – T2	-0,2921	0,1987	0,1416	1	NS
GP20	T2 – T3	-0,6279	0,1409	8,28E-06	0,001192	S (p<0,05)
GP21	T1 – T2	-0,1218	0,2028	0,5479	1	NS
GP21	T2 – T3	-0,9292	0,1180	3,47E-15	5,00E-13	S (p<0,05)
GP22	T1 – T2	-0,1982	0,0701	0,0047	0,6710	NS
GP22	T2 – T3	-0,2894	0,0819	0,0004	0,0589	NS
GP23	T1 – T2	0,4506	0,2685	0,0933	1	NS
GP23	T2 – T3	-0,4379	0,0706	5,66E-10	8,16E-08	S (p<0,05)
GP24	T1 – T2	-0,0279	0,2706	0,9180	1	NS
GP24	T2 – T3	-0,3077	0,0832	0,0002	0,0313	S (p<0,05)

<sup>a</sup> Efekt (razlika): koeficijent modela, predstavlja promjenu glikana izraženu u jedinici standardne devijacije (SD) po jednoj jedinici vremena.

<sup>b</sup> Korekcija za višestruko testiranje koristeći Benjamini–Hochberg proceduru.

GP, kromatografski vrh; NS, rezultat koji nije statistički značajan pri razini značajnosti od 5%; S, rezultat koji je statistički značajan pri razini značajnosti od 5%; T1, prvo mjerenje; T2, drugo mjerenje; T3, treće mjerenje.

**Prilog, Tablica 3.** Promjene N-glikoma imunoglobulina G između tri vremenske točke u ispitanika s bakterijskom pneumonijom nakon meta-analize

Kromatografski vrh (GP)	Vremensko razdoblje	Efekt (razlika) <sup>a</sup>	Standardna pogreška	p-vrijednost	Prilagođena p-vrijednost	Značajnost
GP1	T1 – T2	0,5275	0,0856	6,98E-10	1,00E-07	S (p<0,05)
GP1	T2 – T3	-0,1092	0,0621	0,0788	1	NS
GP2	T1 – T2	-0,0723	0,0438	0,0990	1	NS
GP2	T2 – T3	-0,1754	0,0456	0,0001	0,0173	S (p<0,05)
GP3	T1 – T2	0,1977	0,0922	0,0320	1	NS
GP3	T2 – T3	0,0460	0,0756	0,5427	1	NS
GP4	T1 – T2	0,2433	0,0588	3,51E-05	0,0050	S (p<0,05)
GP4	T2 – T3	0,1228	0,0632	0,0521	1	NS
GP5	T1 – T2	-0,2639	0,0982	0,0072	1	NS
GP5	T2 – T3	-0,1338	0,0985	0,1744	1	NS
GP6	T1 – T2	-0,4388	0,0754	5,91E-09	8,52E-07	S (p<0,05)
GP6	T2 – T3	0,3224	0,0547	3,67E-09	5,28E-07	S (p<0,05)
GP7	T1 – T2	-0,2547	0,0416	9,07E-10	1,31E-07	S (p<0,05)
GP7	T2 – T3	-0,0382	0,0402	0,3414	1	NS
GP8	T1 – T2	0,2863	0,0579	7,51E-07	0,0001	S (p<0,05)
GP8	T2 – T3	-0,1918	0,0477	5,77E-05	0,0083	S (p<0,05)
GP9	T1 – T2	0,0084	0,0427	0,8437	1	NS
GP9	T2 – T3	0,0209	0,0452	0,6434	1	NS
GP10	T1 – T2	-0,6271	0,0741	2,5492E-17	3,67E-15	S (p<0,05)
GP10	T2 – T3	0,3787	0,0767	7,97E-07	0,0001	S (p<0,05)
GP11	T1 – T2	-0,5444	0,0997	4,76E-08	6,85E-06	S (p<0,05)
GP11	T2 – T3	0,2880	0,0789	0,0003	0,0376	S (p<0,05)
GP12	T1 – T2	-0,3528	0,0427	1,33E-16	1,91E-14	S (p<0,05)
GP12	T2 – T3	0,0269	0,0603	0,6555	1	NS
GP13	T1 – T2	-0,4791	0,0847	1,53E-08	2,19E-06	S (p<0,05)
GP13	T2 – T3	0,1240	0,0691	0,0727	1	NS
GP14	T1 – T2	-0,2599	0,0665	9,24E-05	0,0133	S (p<0,05)
GP14	T2 – T3	0,0627	0,0541	0,2469	1	NS
GP15	T1 – T2	-0,4665	0,1486	0,0017	0,2438	NS
GP15	T2 – T3	0,0444	0,0952	0,6406	1	NS
GP16	T1 – T2	0,1531	0,0489	0,0017	0,2491	NS
GP16	T2 – T3	-0,4803	0,1442	0,0009	0,1247	NS
GP17	T1 – T2	-0,2014	0,0640	0,0017	0,2378	NS
GP17	T2 – T3	-0,4151	0,0792	1,57E-07	2,26E-05	S (p<0,05)
GP18	T1 – T2	-0,0436	0,0540	0,4191	1	NS
GP18	T2 – T3	-0,2846	0,0553	2,62E-07	3,78E-05	S (p<0,05)
GP19	T1 – T2	-0,3499	0,0690	3,91E-07	5,63E-05	S (p<0,05)
GP19	T2 – T3	0,1114	0,0711	0,1172	1	NS
GP20	T1 – T2	-0,2030	0,1328	0,1262	1	NS

Prilog, Tablica 3. (nastavak)

Kromatografski vrh	Vremensko razdoblje	Efekt (razlika) <sup>a</sup>	Standardna pogreška	<i>p</i> -vrijednost	Prilagodena <i>p</i> -vrijednost	Značajnost
GP20	T2 – T3	-0,2216	0,1200	0,0639	1	NS
GP21	T1 – T2	-0,4628	0,1652	0,0051	0,7315	NS
GP21	T2 – T3	-0,7120	0,2182	0,0011	0,1583	NS
GP22	T1 – T2	-0,4153	0,0924	6,98E-06	0,0010	S (p<0,05)
GP22	T2 – T3	-0,2708	0,0847	0,0014	0,1988	NS
GP23	T1 – T2	0,2931	0,1085	0,0070	0,9971	NS
GP23	T2 – T3	-0,5224	0,0751	3,43E-12	4,95E-10	S (p<0,05)
GP24	T1 – T2	-0,2826	0,0744	0,0001	0,0212	S (p<0,05)
GP24	T2 – T3	-0,0989	0,0718	0,1682	1	NS

<sup>a</sup> Efekt (razlika): koeficijent modela, predstavlja promjenu glikana izraženu u jedinici standardne devijacije (SD) po jednoj jedinici vremena.

<sup>b</sup> Korekcija za višestruko testiranje koristeći Benjamini–Hochberg proceduru.

GP, kromatografski vrh; NS, rezultat koji nije statistički značajan pri razini značajnosti od 5%; S, rezultat koji je statistički značajan pri razini značajnosti od 5%; T1, prvo mjerenje; T2, drugo mjerenje; T3, treće mjerenje.

**Prilog, Tablica 4.** Promjene N-glikoma imunoglobulina G između tri vremenske točke (T1, T2 i T3) u u zdravih kontrolnih ispitanika nakon meta-analize

Kromatografski vrh (GP)	Vremensko razdoblje	Efekt (razlika) <sup>a</sup>	Standardna pogreška	<i>p</i> -vrijednost	Prilagođena <i>p</i> -vrijednost <sup>b</sup>	Značajnost
GP1	T1 – T2	-0,0146	0,0628	0,8162	1	NS
GP1	T2 – T3	0,0450	0,1667	0,7872	1	NS
GP2	T1 – T2	-0,0465	0,0508	0,3603	1	NS
GP2	T2 – T3	0,1226	0,1954	0,5306	1	NS
GP3	T1 – T2	-0,0573	0,0685	0,4032	1	NS
GP3	T2 – T3	-0,0328	0,0922	0,7223	1	NS
GP4	T1 – T2	-0,0606	0,0499	0,2252	1	NS
GP4	T2 – T3	-0,0871	0,0457	0,0568	1	NS
GP5	T1 – T2	-0,1004	0,0953	0,2921	1	NS
GP5	T2 – T3	-0,0055	0,2444	0,9819	1	NS
GP6	T1 – T2	-0,0322	0,0334	0,3350	1	NS
GP6	T2 – T3	-0,1031	0,0413	0,0126	1	NS
GP7	T1 – T2	-0,0404	0,0406	0,3200	1	NS
GP7	T2 – T3	0,0219	0,0861	0,7993	1	NS
GP8	T1 – T2	0,0374	0,0424	0,3770	1	NS
GP8	T2 – T3	0,0163	0,0647	0,8008	1	NS
GP9	T1 – T2	-0,0300	0,0460	0,5152	1	NS
GP9	T2 – T3	-0,0018	0,0575	0,9751	1	NS
GP10	T1 – T2	0,0469	0,0374	0,2095	1	NS
GP10	T2 – T3	-0,1444	0,0712	0,0426	1	NS
GP11	T1 – T2	0,0352	0,0508	0,4875	1	NS
GP11	T2 – T3	-0,0986	0,0549	0,0725	1	NS
GP12	T1 – T2	-0,0023	0,0430	0,9570	1	NS
GP12	T2 – T3	0,0100	0,0351	0,7756	1	NS
GP13	T1 – T2	0,0977	0,0892	0,2733	1	NS
GP13	T2 – T3	-0,1827	0,1467	0,2130	1	NS
GP14	T1 – T2	0,0276	0,0406	0,4963	1	NS
GP14	T2 – T3	0,0150	0,0782	0,8484	1	NS
GP15	T1 – T2	0,0676	0,0714	0,3432	1	NS
GP15	T2 – T3	0,0218	0,0748	0,7704	1	NS
GP16	T1 – T2	-0,0531	0,0506	0,2938	1	NS
GP16	T2 – T3	-0,1781	0,2237	0,4260	1	NS
GP17	T1 – T2	0,0882	0,0878	0,3152	1	NS
GP17	T2 – T3	-0,0167	0,0811	0,8369	1	NS
GP18	T1 – T2	0,0488	0,0641	0,4459	1	NS

Prilog, Tablica 4. (nastavak)

Kromatografski vrh	Vremensko razdoblje	Efekt (razlika) <sup>a</sup>	Standardna pogreška	<i>p</i> -vrijednost	Prilagođena <i>p</i> -vrijednost <sup>b</sup>	Značajnost
GP18	T2 – T3	-0,0829	0,1658	0,6170	1	NS
GP19	T1 – T2	0,1407	0,1087	0,1957	1	NS
GP19	T2 – T3	0,1298	0,0974	0,1828	1	NS
GP20	T1 – T2	0,0955	0,1072	0,3733	1	NS
GP20	T2 – T3	-0,1637	0,1434	0,2536	1	NS
GP21	T1 – T2	0,1915	0,1495	0,2003	1	NS
GP21	T2 – T3	-0,4027	0,2788	0,1487	1	NS
GP22	T1 – T2	0,1787	0,1235	0,1479	1	NS
GP22	T2 – T3	0,1165	0,1296	0,3688	1	NS
GP23	T1 – T2	0,0746	0,0832	0,3697	1	NS
GP23	T2 – T3	-0,0912	0,1867	0,6253	1	NS
GP24	T1 – T2	0,1216	0,1174	0,3005	1	NS
GP24	T2 – T3	0,2158	0,1196	0,0711	1	NS

<sup>a</sup> Efekt (razlika): koeficijent modela, predstavlja promjenu glikana izraženu u jedinici standardne devijacije (SD) po jednoj jedinici vremena.

<sup>b</sup> Korekcija za višestruko testiranje koristeći Benjamini–Hochberg proceduru.

GP, kromatografski vrh; NS, rezultat koji nije statistički značajan pri razini značajnosti od 5%; T1, prvo mjerenje; T2, drugo mjerenje; T3, treće mjerenje.