

Razlika u statusu glikana između bolesnika s neurodegenerativnim bolestima i dugim COVID-19 s neurološkim smetnjama

Milić, Božica

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:923105>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I
DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINE**

Božica Milić

**RAZLIKA U STATUSU GLIKANA
IZMEĐU BOLESNIKA S
NEURODEGENERATIVNIM
BOLESTIMA I DUGIM COVID-19 S
NEUROLOŠKIM SMETNJAMA**

Diplomski rad

Osijek, 2023.

Rad je ostvaren u Kliničkom bolničkom centru Osijek.

Mentor rada: doc. prim. dr. sc. Svetlana Tomić, dr. med.

Rad ima 25 listova, 6 tablica i 1 sliku.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici doc. prim. dr. sc. Svetlani Tomić, dr. med. na stručnoj pomoći, strpljenju i savjetima pri izradi diplomskog rada.

Zahvaljujem roditeljima Željku i Renati i sestri Brigiti na podršci tijekom cijelog mog školovanja.

Zahvaljujem prijateljima i kolegama koji su mi studentske dane učinili lepšima.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Imunoglobulin G.....	1
1.1.1. Glikozilacija imunoglobulina G.....	1
1.2. Utjecaj rizičnih čimbenika na glikozilaciju imunoglobulina G.....	2
1.3. Neurodegenerativne bolesti	4
1.4. Dugi COVID-19 s neurološkim simptomima.....	5
2. CILJEVI	7
3. ISPITANICI I METODE	8
3.1. Ustroj studije.....	8
3.2. Ispitanici	8
3.3. Metode	8
3.4. Statističke metode.....	8
4. REZULTATI.....	10
5. RASPRAVA.....	14
6. ZAKLJUČCI.....	17
7. SAŽETAK.....	18
9. LITERATURA.....	20
10. ŽIVOTOPIS	25

POPIS KRATICA

ACE2 – angiotenzin-konvertirajući enzim 2 (prema engl. *Angiotensin-converting enzyme 2*)

ADCC – o protutijelima ovisna stanična citotoksičnost (prema engl. *Antibody-dependent cellular cytotoxicity*)

ADCP – o protutijelima ovisna stanična fagocitoza (prema engl. *Antibody-dependent cellular phagocytosis*)

BMI – indeks tjelesne mase (prema engl. *Body mass index*)

CDC – o komplementu ovisna citotoksičnost (prema engl. *Complement-dependent cytotoxicity*)

CGE-LIF – kapilarna gel-elektroforeza s laserom induciranom fluorescencijom (prema engl. *Capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence*)

COVID-19 – koronavirusna bolest (prema engl. *Coronavirus disease 2019*)

Fab fragment – prema engl. *Fragment antigen-binding*

Fc fragment – prema engl. *Crystallizable fragment*

FcγRs – Fcγ receptori (prema engl. *Fcγ receptors*)

GlcNAc – N-acetilglukozamin

IgG – imunoglobulin G

IL-1 – interleukin 1

IL-6 – interleukin 6

NK stanice – prirodno-ubilačke stanice (prema engl. *Natural killer cells*)

SARS-CoV-2 – virus teškog akutnog respiratornog sindroma (prema engl. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2*)

TNF-α – tumor-nekrotizirajući faktor alfa (prema engl. *Tumor necrosis factor alpha*)

1. UVOD

Glikani su složeni oligosaharidi sastavljeni od petnaest ili manje monosaharida (1). Procesom glikozilacije vežu se na ciljne makromolekule, najčešće proteine ili lipide, pri čemu nastaju glikokonjugati – glikoproteini ili glikolipidi (2). Glikozilacija je česta posttranslacijska modifikacija koja se odvija u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu gotovo svih stanica posredovanjem mnogobrojnih enzima (glikoziltransferaza i glikozidaza) (3). Glikozilacija ovisi, osim o enzimskoj aktivnosti, i o ugljikohidratnim prekursorima, strukturi organela, vrsti stanica i staničnoj signalizaciji (2). Ključna je za prepoznavanje, signalizaciju i interakciju unutar stanice i između stanica i proteina, stoga i male promjene u glikozilaciji i strukturi glikana pridonose nastanku i progresiji brojnih bolesti uključujući maligne (3).

1.1. Imunoglobulin G

Imunoglobulini su skupina plazmatskih glikoproteina među kojima je najzastupljeniji imunoglobulin G (IgG) (4). IgG čini 75 % svih protutijela i 10 - 20 % ukupnih proteina plazme (5). Proizvode ga plazma stanice u odgovoru na strane antigene mikroorganizama, toksina i malignih stanica (6, 7). Strukturno gledano, proteinski dio molekule IgG-a čine četiri polipeptidna lanca: dva teška i dva laka lanca, međusobno povezana disulfidnim vezama. Funkcionalno gledano, zaštitna uloga IgG-a proizlazi iz dvaju funkcionalnih domena: Fab fragmenta i Fc fragmenta (4). Fab fragment je mjesto vezanja antigena zaslužno za prepoznavanje i razlikovanje specifičnih struktura antigena dok Fc fragment posreduje u izvršnim ulogama IgG-a (7). Interakcijom Fc fragmenta s Fc γ receptorima (Fc γ Rs), na imunološkim stanicama ili komponentama komplekta, aktiviraju se proupalni imunološki odgovori zaduženi za uklanjanje stranih antigena: o protutijelima ovisna fagocitoza (ADCP) i citotoksičnost (ADCC) te o komplementu ovisna citotoksičnost (CDC) (4, 5, 8). Svojom aktivnošću IgG održava ravnotežu između proupalnog i protuupalnog imunološkog odgovora. Gubitak ravnoteže, izazvan promjenama Fc fragmenta, rezultira slabim imunološkim odgovorom, kroničnim upalnim bolestima ili gubitkom tolerancije te razvojem autoimunosti (2, 8).

1.1.1. Glikozilacija imunoglobulina G

Svaka IgG molekula sadrži osnovnu glikansku strukturu na oba teška lanca svog Fc fragmenta. Osnovna glikanska struktura održava Fc fragment u konformaciji pogodnoj za interakciju s Fc γ Rs i čini ju 7 saharidnih jedinica – četiri N-acetilglukozamina (GlcNAc) i tri

manoze (6, 7). Dodatkom monosaharidnih nastavaka poput galaktoze, fukoze, sijalinske kiseline ili GlcNAc na osnovnu glikansku strukturu mijenja se konformacija Fc fragmenta i afinitet prema Fc γ Rs te se modulira imunološki odgovor (7). Točan mehanizam djelovanja kojim monosaharidni nastavci reguliraju proupalne i protuupalne učinke IgG-a nije u potpunosti poznat međutim postoje određene pretpostavke utemeljene na dosadašnjim istraživanjima. Prvo, pretpostavlja se da dodatak galaktoze na osnovnu glikansku strukturu ima dvojaku ulogu. S jedne strane, povećava afinitet IgG-a za C1q komponentu komplementa i aktivirajuće Fc γ Rs i posljedično povećava CDC i ADCC. S druge strane, povećava afinitet za inhibirajuće Fc γ RIIB djelujući protuupalno. Također, glikani bez terminalne galaktoze aktiviraju sustav komplementa i smatraju se proupalnim. Stoga se, ukupno gledajući, smatra da terminalna galaktoza pridonosi protuupalnoj aktivnosti IgG-a (5). Drugo, nedostatak fukoze povećava afinitet IgG-a za aktivirajuće Fc γ RIIIA i Fc γ RIIB i poboljšava ADCC posredovan prirodno-ubilačkim stanicama (NK stanicama) i do 100 puta (5, 10, 11). I treće, sijalizacija Fc fragmenta povećava ekspresiju inhibirajućih Fc γ RIIb na makrofazima te smanjuje afinitet IgG-a prema aktivirajućim Fc γ RIIIa ili C1q komponenti komplementa smanjujući time ADCC i CDC i povećavajući protuupalnu aktivnost IgG-a (9, 10).

1.2. Utjecaj rizičnih čimbenika na glikozilaciju imunoglobulina G

Glikozilacija proteina je složen biosintetski proces posredovan mnogobrojnim enzimima. Ekspresija i aktivnost enzima uključenih u biosintezu glikana nisu unaprijed definirani u genomu, nego su posljedica djelovanja velikog broja gena (oko 5 % svih gena). Konačna struktura glikana posljedica je međudjelovanja genskih polimorfizama, genske ekspresije, posttranslacijskih modifikacija i aktivnosti odgovarajućih proteina u procesu glikozilacije pri čemu i vanjski čimbenici imaju snažan utjecaj na epigenetsku regulaciju genske ekspresije (5). Stoga i glikozilacija imunoglobulina G ovisi o genetici i rizičnim (vanjskim) čimbenicima na što ukazuje i razlika IgG glikoma u pojedinaca. Oko 50 % ukupnog IgG glikoma pod utjecajem je genetike dok ostatak ovisi o utjecaju rizičnih čimbenika te fiziološkog ili patološkog stanja organizma. Na promjene IgG glikoma najviše utječu starenje, hormonski status i životni stil (12).

Starenje je fiziološki, progresivni proces propadanja organizma popraćen smanjenjem bioloških funkcija i većom podložnošću bolestima (14). U zdravih pojedinaca proces starenja temelji se na ravnoteži između proupalnih i protuupalnih imunoloških odgovora. Dugotrajna, cjeloživotna izloženost organizma endogenim ili egzogenim stimulansima izaziva gubitak

imunološke ravnoteže i posljedičnu kroničnu, asimptomatsku, blagu upalu tzv. starenje imunološkog sustava (*inflammaging*) (1, 5, 13). Starenje imunološkog sustava rezultira značajnim promjenama u glikozilaciji imunoglobulina G. U mlađoj odrasloj dobi prisutna je najveća količina protuupalnih digalaktoziliranih glikana i najmanja količina proupalnih agalaktoziliranih glikana. Starenjem se povećava udio agalaktoziliranih glikana i smanjuje udio digalaktoziliranih glikana u oba spola. Također, starenjem se smanjuje i razina protuupalnih sijaliziranih glikana (15, 16). Prevlast proupalnih glikana, prvenstveno agalaktoziliranih, još više pridonosi imunološkoj disregulaciji i održavanju kroničnog upalnog stanja (13).

Uz starenje, i hormonski status značajno utječe na promjene u glikozilaciji. Razdoblje perimenopauze u žena obilježeno je značajnim promjenama IgG glikana. Do razdoblja menopauze žena muškarci imaju veće razine agalaktoziliranih glikana u odnosu na žene. Ulaskom u perimenopauzu u žena dolazi do jačeg pada galaktoziliranih i sijaliziranih glikana te je nakon menopauze razina galaktoziliranih glikana manja u žena, nego u muškaraca i nastavlja se postepeno smanjivati jednakim tempom u oba spola. Ovakva znatnija promjena glikozilacije u periodu menopauze, vezana uz pad razine estrogena, pridonosi bržoj promjeni IgG glikoma iz protuupalnog u proupalni (5, 15, 17).

Poznato je da pravilna prehrana, redovita tjelesna aktivnost te izbjegavanje stresa, pušenja i alkohola pridonosi boljem općem stanju organizma te prevenira pojavu bolesti posebice kardiovaskularnih, metaboličkih i malignih. Zna se i da danas proširen zapadnjački stil života obilježen visokokaloričnom prehranom, sjedilačkim načinom života i stresom pridonosi stalnom povećanju kardiometaboličkih rizičnih faktora poput pretilosti, dislipidemije, hiperglikemije i hipertenzije. Manje je poznato da je blaga, kronična upala, karakteristična za starenje, u podlozi kardiometaboličkih bolesti te da kardiometabolički rizični faktori negativno utječu na promjenu glikozilacije IgG-a (18). Tome u prilog govore brojna istraživanja koja potvrđuju povezanost hipertenzije, pretilosti, dislipidemije i dijabetesa tip II sa smanjenom galaktozilacijom i sijalizacijom IgG-a. Suprotno tome, intenzivna tjelesna aktivnost, niskokalorična prehrana i gubitak tjelesne težine povezani su s povećanjem galaktozilacije i sijalizacije IgG-a (5, 18 - 31).

Uz starenje, hormonski status i životni stil i određena patološka stanja pridonose promjenama u glikozilaciji IgG-a. Autoimune, upalne, infektivne i maligne bolesti u svojoj podlozi imaju proupalni obrazac glikana. U nekima od njih takav obrazac glikana vidljiv je i prije pojave

aktivne bolesti, a u nekima korelira s aktivnošću, progresijom i jačinom bolesti te odgovorom na terapiju (1, 5).

IgG glikom svakog pojedinca jedinstven je i određen genetikom, životnim stilom te patofiziološkim stanjem organizma. IgG glikani imaju ulogu u modulaciji imunološkog odgovora, ali još uvijek je nepoznato jesu li njihove promjene posljedica starenja i bolesti ili oni sudjeluju u procesu starenja i nastanka bolesti. Neovisno o tome, profil IgG glikana dobar je pokazatelj biološke dobi, koja uspoređena s kronološkom dobi ukazuje na opće stanje organizma i tzv. zdravo starenje (1, 5, 15).

1.3. Neurodegenerativne bolesti

Neurodegenerativne bolesti su skupina bolesti različitih kliničkih manifestacija i prevalencije kojoj pripadaju: Parkinsonova bolest, progresivna supranuklearna paraliza, multipla sistemska atrofija, kortikobazalna degeneracija, Lewy body demencija, Alzheimerova bolest, frontotemporalna demencija i bolesti motornog neurona. Ove bolesti su kronične, progresivne i neizlječive, a glavni rizični čimbenik im je starenje. U podlozi neurodegenerativnih bolesti je patološko nakupljanje specifičnih proteina na različitim mjestima središnjeg i perifernog živčanog sustava što rezultira gubitkom neurona i sinaptičkog prijenosa (32, 33). Procesu neurodegeneracije pridonosi i neuroinflamacija. Neuroinflamacija je imunološki odgovor na patogene stimulanse ili oštećenja moždanog tkiva u kojemu glavnu ulogu imaju mikroglija stanice. Aktivacija mikroglija stanica ima neuroprotektivnu ulogu s primarnim ciljem uklanjanja patološkog supstrata i popravka moždanog tkiva. Međutim, dugotrajna neuroinflamacija izaziva otpuštanje proupalnih medijatora s oštećenjem okolnih neurona i krvno-moždane barijere i progresijom neurodegeneracije (34, 35). Posljednja istraživanja pokazuju, da osim upalnih promjena na samom mjestu neurodegeneracije, proupalni obrazac postoji i na periferiji. U Parkinsonovoj bolesti proupalni obrazac temelji se prvenstveno na smanjenju sijaliziranih IgG glikana dok Alzheimerovu bolest karakterizira smanjenje sijalizacije i galaktozilacije. Još uvijek nije poznato jesu li ove promjene IgG glikoma posljedica upalnog procesa u središnjem živčanom sustavu ili pridonose upali, ali je gotovo sigurno da oštećena krvno-moždana barijera posreduje u komunikaciji središnjeg živčanog sustava i perifernog imunološkog sustava i omogućuje uključivanje cjeloukupnog imunološkog sustava u progresiju neurodegeneracije (36, 37).

1.4. Dugi COVID-19 s neurološkim simptomima

Koronavirusna bolest (COVID-19) je zarazna bolest uzrokovana virusom teškog akutnog respiratornog sindroma (SARS-CoV-2). Primarno je plućna bolest s respiratornim simptomima premda se pokazalo da može zahvatiti i druge organske sustave i uzrokovati spektar različitih simptoma. Oko 80 % oboljelih ima blagi do umjereno teški oblik bolesti dok ostatak razvija teški oblik bolesti. Jedan dio oboljelih u potpunosti se oporavlja nakon akutne infekcija, ali sve više oboljelih razvija trajne ili nove simptome. Ovi simptomi najčešće se javljaju u periodu od 4 do 12 tjedana nakon preboljenja, a mogu trajati tjednima i mjesecima i nazivaju se dugi COVID-19. Dugi COVID-19 javlja se neovisno o težini kliničke slike tijekom primarne infekcije, ali je češći u žena, starijih osoba, osoba s komorbiditetima te osoba koje su imale više od pet simptoma u akutnoj fazi bolesti. Klinička slika oboljelih od dugog COVID-19 znatno se razlikuje među pojedincima, a najčešći su umor, kardiorespiratorni i neurološki simptomi (38, 39). Neurološki simptomi karakteristični za dugi COVID-19 su kognitivne smetnje, moždana magla, disautonomija, kronični bolni sindrom, mišićna slabost i umor, poremećaji osjeta (parestezije), okusa (ageuzija), njuha (anosmija), sluha (gluhoća i tinitus) i sna, glavobolja, vrtoglavica i smetnje ravnoteže. Postoji nekoliko pretpostavljenih mehanizama zahvaćanja neurološkog sustava SARS-CoV-2 virusom. Virus koristi angiotenzin-konvertirajući enzim 2 (ACE2) kao receptor za ulazak u stanice domaćina. Brojna tkiva uključujući njušni epitel i endotel krvnih žila imaju eksprimiran ACE2. Stoga se pretpostavlja da virus dolazi do mozga izravno putem njušnog živca ili hematogeno kroz oštećenu krvno-moždanu barijeru. U mozgu se širi prijenosom između neurona, također putem ACE2 na neuronskim membranama. Osim toga, imunološke stanice poput limfocita, granulocita i monocita također imaju ACE2 pa mogu poslužiti kao rezervoar virusa i prijenosnik preko krvno-moždane barijere (40). Neurološki simptomi infekcije SARS-CoV-2 virusom posljedica su neuroinflamacije i modulacije funkcije središnjeg živčanog sustava. Kao i kod neurodegeneracije, kronična infekcija izaziva hiperaktivaciju mikroglia stanica s pretjeranim i dugotrajnim lučenjem proupalnih citokina što izaziva promjene neuromodulacije, neurogeneze, sinaptičke plastičnosti, neurotransmisije i neuroendokrinog sustava te u konačnici uzrokuje simptome poput moždane magle, depresije i anksioznosti (41).

IgG protutijela ključna su u zaštiti organizma od SARS-Cov-2 virusa, a promjene u IgG glikozilaciji moduliraju imunološki odgovor i utječu na težinu bolesti. Pokazalo se da su teži oblici bolesti povezani s višom razinom afukoziliranog, proupalnog IgG-a usmjerenog protiv proteina šiljka (S proteina). Za sada ne postoje dokazi o utjecaju promjena IgG glikoma na

nastanak dugog COVID-19 (42). Neovisno o tome, proupalni obrazac ipak je vidljiv u povišenju proupalnih citokina poput interleukina 6 (IL-6), interleukina 1 (IL-1), tumor-nekrotizirajućeg faktora alfa (TNF- α) itd. što ukazuje na to da je jedan od glavnih uzroka dugog COVID-19 disregulacija imunološko-upalnog odgovora. Tijekom infekcije SARS-CoV-2 virusom javlja se sustavni upalni odgovor organizma tzv. sindrom lučenja citokina. Karakterizira ga naglo povećanje proupalnih citokina, interferona i kemokina u cirkulaciji te dodatna mobilizacija imunoloških stanica koje luče citokine. Disregulacija citokinskog signalnog puta s kroničnom aktivacijom rezultira kronično sustavnom upalom s oštećenjem tkiva, endotela i vaskularnih barijera te mogućom multiorganskom disfunkcijom. Osim toga, smatra se da kroničnoj upali pridonosi stalna aktivacija urođenog i stečenog imunološkog odgovora izazvana perzistencijom virusa, virusom inficiranih stanica ili virusnih komponenti i nakon akutne infekcije. Uz kroničnu upalu, oštećenja pojedinih tkiva moguća su i uslijed autoimunog odgovora izazvanog mimikrijom virusnih proteina, otpuštanjem autoantigena iz oštećenih tkiva ili poliklonalnom aktivacijom limfocita kao posljedicom djelovanja superantigena (41, 43, 44). U mladih zdravih osoba produkcijom protuupalnih citokina održava se ravnoteža imunološkog odgovora čime se ograničava djelovanje virusa. U starijih osoba i osoba s komorbiditetima i unatoč infekciji SARS-CoV-2 virusom postoji blaga kronična upala i oslabljen protuupalni imunološki odgovor što je jedan od mogućih razloga težeg oblika i lošijeg ishoda bolesti (45).

2. CILJEVI

1. Ispitati razliku u glikanima između bolesnika s dugim COVID-19 i kontrolne zdrave skupine.
2. Ispitati razliku u glikanima između bolesnika s neurodegenerativnim bolestima i kontrolne zdrave skupine.
3. Ispitati razliku u glikanima između bolesnika s dugim COVID-19 i bolesnika s neurodegenerativnim bolestima.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ustroj studije

Istraživanje je koncipirano kao presječno (46).

3.2. Ispitanici

Istraživanjem je obuhvaćena 41 odrasla osoba: 14 s neurodegenerativnim bolestima i 15 s dugim COVID-19 koji se liječe na Klinici za neurologiju KBC Osijek te 12 ispitanika kontrolne zdrave skupine koji ne boluju niti od jedne od ovih bolesti te nemaju metaboličke ili autoimune bolesti.

3.3. Metode

Za potrebe istraživanja korišten je anketni upitnik kojim su prikupljeni demografski i klinički podatci (dob, spol, vrsta neurodegenerativne bolesti, dužina trajanja neurodegenerativne bolesti, podatci o težini COVID-19 infekcije, dužina trajanja dugog COVID-19, simptomi dugog COVID-19, cijepljenje protiv SARS-CoV-2 virusa, preboljenje COVID-19, komorbiditeti, terapija, tjelesna masa, visina, pušenje).

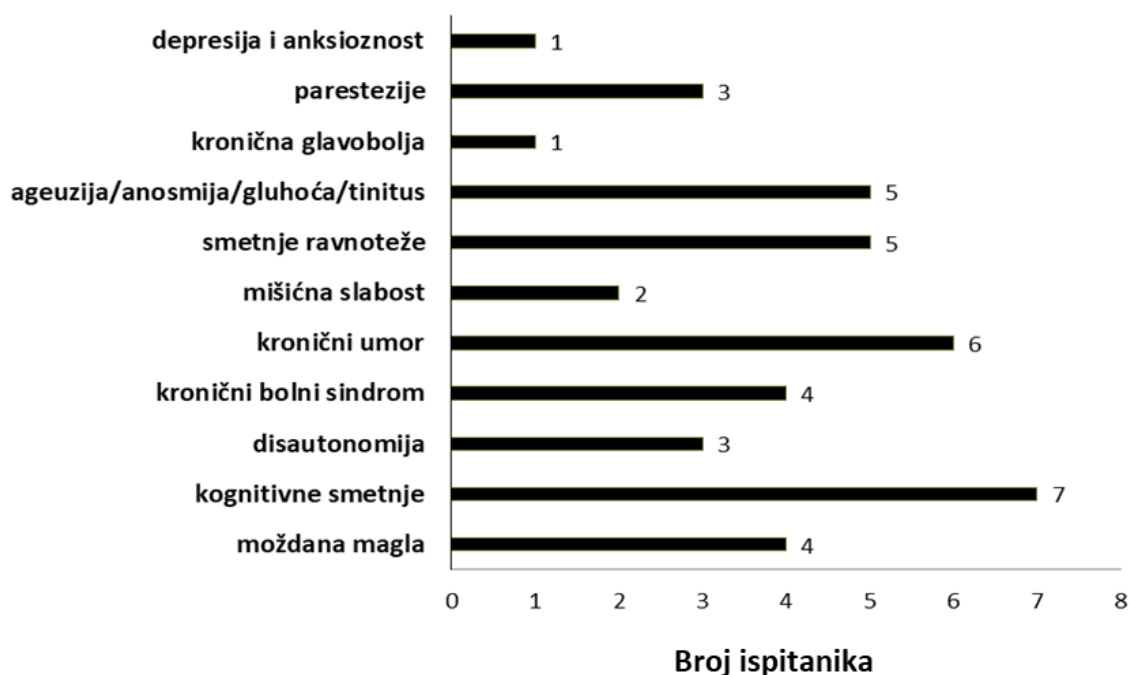
U dnevnoj bolnici Klinike za neurologiju KBC Osijek prikupljeni su uzorci krvi svakog ispitanika. Svakom ispitaniku uzeto je 5 mL pune krvi venepunkcijom u epruvete punjene antikoagulansom etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA) (*Becton Dickinson; SAD*). Uzorci krvi inkubirani su 30 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim su centrifugirani pri brzini 1670 g tijekom 10 minuta na 4 °C radi odvajanja plazme. Uzorci plazme pohranjeni su na -20 °C te su transportirani na suhom ledu u Genos laboratorij, Zagreb gdje su korišteni za analizu IgG glikana. Protokol izolacije IgG-a iz uzoraka plazme, deglikozilacije IgG-a uz oslobađanje N-glikana, fluorescentnog obilježavanja N-glikana i pročišćavanja detaljno je opisan u prethodno objavljenom znanstvenom radu (47). Analiza IgG glikana vršila se metodom kapilarne gel-elektroforeze s laserom induciranom fluorescencijom (CGE-LIF) na DNA sekvenceru (3130 *Genetic Analyzer, Thermo Fischer, SAD*). Za obradu i analizu dobivenih podataka korišten je *glyXtool software (glyXera)*. Rezultati analize glikana predstavljeni su podatcima o biološkoj dobi osobe (*GlycanAge*) te razinom pojedinih glikana (G0 – agalaktozilirani, G2 – digalaktozilirani i S – sijalizirani).

3.4. Statističke metode

Kategorijski podatci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike kategorijskih varijabli testirane su Hi-kvadrat testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Studentovim t testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U testom. Korelacije su testirane korištenjem Spearmanovog ili Pearsonovog test korelacije, ovisno o normalnosti raspodjele. Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na $P = 0,05$. Za statističku analizu korišten je statistički program SPSS (inačica 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, SAD).

4. REZULTATI

U istraživanju je obrađen 41 ispitanik, 15 (37 %) sa simptomima dugog COVID-19, 14 (34 %) bolesnika oboljelih od neurodegenerativnih bolesti i 12 (29 %) zdrave kontrolne grupe. U grupi ispitanika s neurodegeneracijom njih 6 (45 %) je preboljelo COVID-19, a u grupi ispitanika kontrolne skupine njih 8 (58 %) je preboljelo COVID-19. Na slici 1 je prikazana raspodjela simptoma dugog COVID-19 (Slika 1).



Slika 1. Raspodjela simptoma dugog COVID-19

Ispitanici se međusobno nisu razlikovali po dobi, indeksu tjelesne mase (BMI) (Tablica 1) niti prema navici pušenja (Fisherov egzaktni test, $P = 0,661$). Iako je grupa ispitanika s neurodegeneracijom imala više muških ispitanika nego žena, Fisherov egzaktni test nije pokazao statistički značajnu razliku između skupina ($P = 0,846$) (Tablica 2).

Tablica 1. Razlika u dobi i indeksu tjelesne mase između ispitivanih skupina

	DUGI COVID-19 medijan (IQR)	NEURODEGENERACIJA medijan (IQR)	KONTROLA medijan (IQR)	P^*
Dob	49 (37 - 63)	59 (51,5 - 66,25)	53 (49 - 55)	0,067
BMI	26,23 (21,97 - 29,05)	28,69 (25,84 - 33,75)	28,06 (23,74 - 30,08)	0,209

*Mann-Whitney U test; IQR – interkvartilni raspon (prema engl. *Interquartile Range*); BMI – indeks tjelesne mase (prema engl. *Body mass index*)

Tablica 2. Raspodjela ispitanika prema spolu

	DUGI COVID-19 Broj (%) ispitanika	NEURODEGENERACIJA Broj (%) ispitanika	KONTROLA Broj (%) ispitanika
Žene	7 (47 %)	4 (29 %)	5 (42 %)
Muškarci	8 (53 %)	10 (71 %)	7 (58 %)
Ukupno	15 (100 %)	14 (100 %)	12 (100 %)

Komorbidity su podijeljeni u nekoliko kategorija – bolesti metabolizma, autoimune bolesti, maligne bolesti, bolesti lokomotornog sustava, vaskularne bolesti i ostalo. Terapija je također razvrstana u nekoliko kategorija – antihipertenzivi, hipolipemici, hipoglikemici, NSAIR (nesteroidni antireumatici), opijatni analgetici, psihijatrijska terapija i ostalo. Analiza razlike u komorbiditetima i vrsti terapije između ispitivanih grupa prikazana je u tablici broj 3. Jedina statistički značajna razlika unutar komorbiditeta između ispitivanih skupina uočena je za bolesti metabolizma gdje su ispitanici s neurodegenerativnim bolestima statistički značajno više imali metaboličke bolesti u odnosu na ostale ispitivane grupe ($P = 0,034$). Prema upotrebi pojedinih skupina lijekova ispitanici se nisu statistički značajno razlikovali niti za jednu skupinu lijekova.

Tablica 3. Raspodjela komorbiditeta i terapije prema ispitivanim skupinama

KOMORBIDITET I TERAPIJA	DUGI COVID-19 n (da/ne)	NEURODEGENERACIJA n (da/ne)	KONTROLA n (da/ne)	P^*
Bolesti metabolizma	4/11	11/3	8/4	0,034
Autoimune bolesti	4/11	0/14	2/10	0,437
Deg. b. lokomot. s.	2/13	3/11	1/11	0,797
Maligne bolesti	0/15	1/13	1/11	0,413
Vaskularne bolesti	2/13	3/11	2/10	0,807
Ostale bolesti	7/8	7/7	5/7	0,850
Antihipertenzivi	4/11	6/8	3/9	1,000
Hipolipemici	0/15	2/12	1/11	0,483
Hipoglikemici	0/15	2/12	0/12	1,000
NSAIR	3/12	5/9	1/11	0,649
Opijatni analgetici	0/15	2/12	0/12	1,000
Psihijatrijska terapija	6/9	8/6	0/12	0,068
Ostala terapija	6/9	9/5	3/9	0,568

*Fisherov egzakti test; Deg. b. lokomot. s. – degenerativne bolesti lokomotornog sustava; NSAIR – nesteroidni antireumatici

S obzirom da bolesti metabolizma mogu utjecati na glikanski status učinjena je dodatna analiza G0, G2 i S glikana unutar grupe ispitanika s neurodegenerativnim bolestima u ovisnosti o prisutnoj metaboličkoj bolesti korištenjem Mann-Whitney U testa. Jedina statistički značajna razlika uočena je za S glikan. Raspodjela S glikana u ovisnosti o bolesti

metabolizma vizualnom inspekcijom nije bila slična te se u analizi podataka koristio središnji rang, a ne medijan. Uočili smo statistički značajno veći središnji rang za S glikan u bolesnika s bolestima metabolizma (8,82) u odnosu na one bez bolesti metabolizma (2,67) (Mann-Whitney U test, $P = 0,024$) (Tablica 4).

Tablica 4. Razlika u glikanima G0, G2 i S u ispitanika s neurodegenerativnim bolestima u ovisnosti o prisutnim bolestima metabolizma

	BOLEST METABOLIZMA	NEMA BOLEST METABOLIZMA	P^*
G0 medijan (IQR)	0,34 (0,30 – 0,39)	0,37 (0,22 – 0,38)	0,815
G2 medijan (IQR)	0,15 (0,13 – 0,18)	0,16 (0,14 – 0,36)	0,586
S medijan (IQR)	0,13 (0,10 – 0,13)	0,09 (0,08 – 0,09)	0,024

*Mann-Whitney U test; IQR – interkvartilni raspon (prema engl. *Interquartile Range*)

Analizirali smo i utjecaj preboljenja COVID-19 infekcije na glikanski status za sve tri ispitivane grupe. Medijan G0 glikana bio je statistički značajno viši u ispitanika koji nisu prethodno preboljeli COVID-19 infekciju (Mann-Whitney U test, $P = 0,006$), dok je za G2 (Mann-Whitney U test, $P = 0,006$) i S glikan (Mann-Whitney U test, $P = 0,036$) bio statistički značajno viši u ispitanika koji su preboljeli COVID-19 infekciju (Tablica 5).

Tablica 5. Medijani glikana G0, G2 i S u ovisnosti o preboljenju COVID-19 infekcije za sve tri grupe ispitanika

	PREBOLJELI	NISU PREBOLJELI	P^*
G0 medijan (IQR)	0,28 (0,23 – 0,31)	0,37 (0,29 – 0,40)	0,006
G2 medijan (IQR)	0,18 (0,16 – 0,22)	0,15 (0,13 – 0,18)	0,006
S medijan (IQR)	0,14 (0,12 – 0,15)	0,11 (0,10 – 0,13)	0,036

*Mann-Whitney U test; IQR – interkvartilni raspon (prema engl. *Interquartile Range*)

Za razliku od preboljenja, status cijepljenja nije utjecao niti na jedan glikan u sve tri ispitivane skupine. Medijan glikana G0 (Mann-Whitney U test, $P = 0,235$), glikana G2 (Mann-Whitney U test, $P = 0,329$) i glikana S (Mann-Whitney U test, $P = 0,119$) nije se statistički značajno razlikovao u ovisnosti o statusu cijepljenja.

Dužina trajanja simptoma dugog COVID-19 nije korelirala s glikanskim statusom u ispitanika s dugim COVID-19 (G0, $\rho = 0,266$, $P = 0,338$; G2, $\rho = -0,167$, $P = 0,553$; S, $\rho = -0,081$, $P = 0,775$) niti je duljina trajanja neurodegenerativne bolesti korelirala s glikanskim statusom u grupi ispitanika s neurodegenerativnim bolestima (G0, $\rho = 0,332$, $P = 0,246$; G2, $\rho = -0,357$, $P = 0,211$; S, $\rho = -0,053$, $P = 0,857$).

Kruskal-Wallis test je korišten za utvrđivanje razlike u glikanskom statusu između ispitivanih skupina. Medijani glikana G0, G2, S i glikanske dobi su bili statistički značajno različiti

između ispitivanih skupina: G0 - $\chi^2(2) = 8,225$, $P = 0,016$; G2 - $\chi^2(2) = 6,047$, $P = 0,049$; S - $\chi^2(2) = 6,492$, $P = 0,039$; biološka dob - $\chi^2(2) = 6,735$, $P = 0,034$ (Tablica 6).

Tablica 6. Medijani i IQR glikana G0, G2, S i glikanske dobi u ispitivanim skupinama

	NEURODEGENERACIJA medijan (IQR)	DUGI COVID-19 medijan (IQR)	KONTROLNA GRUPA medijan (IQR)
G0	0,35 (0,29 – 0,39)	0,28 (0,23 – 0,31)	0,28 (0,20 – 0,30)
G2	0,15 (0,13 – 0,18)	0,18 (0,11 – 0,22)	0,18 (0,17 – 0,24)
S	0,11 (0,10 – 0,13)	0,14 (0,12 – 0,15)	0,13 (0,12 – 0,16)
Glikanska dob	61,50 (59,00 – 71,25)	47,00 (38,00 – 54,00)	60,00 (33,75 – 69,50)

IQR – interkvartilni raspon (prema engl. *Interquartile Range*)

Nakon što je učinjena *post hoc* analiza s Bonferroni korekcijom za višestruke usporedbe uočene su sljedeće statistički značajne razlike: medijan glikana G0 bio je značajno veći u ispitanika s neurodegeneracijom (0,35) u odnosu na kontrolnu skupinu (0,28) ($P = 0,021$); medijan glikanske dobi u ispitanika s neurodegeneracijom (61,50) bio je veći u odnosu na ispitanike s dugim COVID-19 (47,00) ($P = 0,028$). Medijan glikana G2 i S nije se statistički značajno razlikovao između ispitivanih skupina.

5. RASPRAVA

U istraživanju je procijenjen utjecaj simptoma dugog COVID-19 na glikanski status oboljelih od neurološkog dugog COVID-19 i uspoređen s glikanskim statusom oboljelih od neurodegenerativnih bolesti i kontrolne zdrave grupe. Ispitanici se međusobno nisu razlikovali po dobi, spolnoj distribuciji, indeksu tjelesne mase (BMI) niti prema navici pušenja.

Najčešći simptomi dugog COVID-19 uočeni u ovom istraživanju su kognitivne smetnje. Na drugom mjestu je kronični umor, a na trećem smetnje ravnoteže i vertigo te ageuzija, anosmija, gluhoća i tinitus. U jednom istraživanju iz 2022. pokazalo se da su tri najčešća neurološka simptoma dugog COVID-19 umor, kognitivne smetnje i parestezije (48). U drugom istraživanju, također iz 2022., kao najčešći neurološki simptomi navode se umor, kognitivne smetnje (moždana magla, poteškoće pamćenja i koncentracije) i poremećaji spavanja (49). Rezultati ovog istraživanja ne odstupaju od rezultata dosadašnjih istraživanja koja ukazuju da su kognitivne smetnje i kronični umor najčešći neurološki simptomi dugog COVID-19.

Analizirane su razlike u komorbiditetima i vrsti terapije između ispitivanih grupa. Uočeno je da su ispitanici s neurodegenerativnim bolestima statistički značajno više imali metaboličke bolesti u odnosu na ostale ispitivane grupe, a prema upotrebi pojedinih skupina lijekova ispitanici se nisu statistički značajno razlikovali niti za jednu skupinu lijekova. Ovakav rezultat nije neočekivan s obzirom da epidemiološki podaci pokazuju da metaboličke bolesti poput hipertenzije, dijabetesa tip II i dislipidemije povećavaju rizik za nastanak Alzheimerove bolesti dok fizička aktivnost i zdrava prehrana smanjuju rizik za nastanak kako metaboličkih tako i neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti (50, 51).

Dodatna analiza G0, G2 i S glikana unutar grupe ispitanika s neurodegenerativnim bolestima u ovisnosti o prisutnoj metaboličkoj bolesti, pokazala je statistički značajno veći središnji rang za S glikan u bolesnika s bolestima metabolizma (8,82) u odnosu na one bez bolesti metabolizma (2,67). Ovaj rezultat u suprotnosti je s rezultatima nekoliko istraživanja koja su proučavala promjene IgG glikozilacije u ovisnosti o metaboličkim bolestima ili neurodegenerativnim bolestima. Istraživanje provedeno 2018. ukazuje na smanjenje sijalinske kiseline povezano s dislipidemijom (25). Također, dva istraživanja provedena 2017. ukazuju na povezanost hipertenzije i dijabetesa tip II sa smanjenom sijalizacijom (28, 31). Osim toga, istraživanja koja su proveli Lundström i suradnici i Váradi i suradnici ukazuju na smanjenje sijalizacije u osoba s Alzheimerovom ili Parkinsonovom bolesti (52, 53).

Analiziran je i utjecaj preboljenja COVID-19 infekcije na glikanski status za sve tri ispitivane grupe. Medijan G0 glikana bio je statistički značajno viši u ispitanika koji nisu prethodno preboljeli COVID-19 infekciju, dok je za G2 i S glikan bio statistički značajno viši u ispitanika koji su preboljeli COVID-19 infekciju. Većina dosad objavljenih istraživanja je proučavala promjene IgG glikozilacije tijekom akutne infekcije SARS-CoV-2 virusom, u ovisnosti o težini bolesti i uzimajući u obzir uglavnom promjene glikozilacije specifičnog anti-S IgG-a. Stoga nije pronađeno adekvatno istraživanje za usporedbu s ovim rezultatima. Uzimajući u obzir samo aktivnost IgG-a rezultati ovog istraživanja pokazuju da osobe koje nisu preboljele COVID-19 imaju izraženiji proupalni profil IgG-a s povišenim agalaktoziliranim glikanima u odnosu na osobe koje su preboljele COVID-19 i imaju izraženiji protuupalni profil IgG-a s povišenim digalaktoziliranim i sijaliziranim glikanima. Mogući razlog rezultatima da preboljenje COVID-19 dovodi do boljeg glikanskog statusa je činjenica da su podatci o preboljenju dobiveni anamnestički od ispitanika, bez mogućnosti serološke potvrde. Serološka evaluacija protutijela nije se radila jer je veliki broj ispitanika bio procijepljen što utječe na serološki nalaz tj. nemoguće je utvrditi jesu li protutijela posljedica preboljenja ili cijepjenja. S obzirom na to, moguće je da su neki ispitanici preboljeli bolest asimptomatski, a svrstani su u skupinu osoba koje nisu preboljele COVID-19.

Medijan glikana G0, glikana G2 i glikana S nije se statistički značajno razlikovao u ovisnosti o statusu cijepjenja stoga je zaključeno da status cijepjenja nije utjecao niti na jedan glikan u sve tri ispitivane skupine.

Dužina trajanja simptoma dugog COVID-19 nije korelirala s glikanskim statusom u ispitanika s dugim COVID-19 niti je duljina trajanja neurodegenerativne bolesti korelirala s glikanskim statusom u grupi ispitanika s neurodegenerativnim bolestima.

Utvrđivanjem razlike u glikanskom statusu između ispitivanih skupina uočena je slična distribucija G0, G2, S glikana i glikanske dobi između ispitivanih grupa. Medijani glikana G0, G2, S i glikanske dobi su bili statistički značajno različiti između ispitivanih skupina. Nakon što je učinjena *post hoc* analiza s Bonferroni korekcijom za višestruke usporedbe uočene su statistički značajne razlike. Medijan glikana G0 bio je značajno veći u ispitanika s neurodegeneracijom (0,35) u odnosu na kontrolnu skupinu (0,28) i medijan glikanske dobi u ispitanika s neurodegeneracijom (61,50) bio je veći u odnosu na ispitanike s dugim COVID-19 (47,00). Medijan glikana G2 i S nije se statistički značajno razlikovao između ispitivanih

skupina. Za razliku od ovog istraživanja, Lundström i suradnici dokazali su smanjenje razine složenih galaktoziliranih i sijaliziranih glikana u osoba s Alzheimerovom bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu dok su Váradi i suradnici dokazali smanjenje sijalizacije na glikanima s dvije ili tri terminalne sijalinske kiseline u osoba s Parkinsonovom bolesti (52, 53). Kako agalaktozilirani glikani djeluju proupalno a galaktozilirani glikani protuupalno, rezultati ovog istraživanja djelomično se podudaraju s rezultatima Lundströma i suradnika jer je u oba istraživanja izražen proupalni profil IgG glikana uzrokovan promjenama galaktozilacije.

Nedostatak ovog istraživanja je mali statistički uzorak stoga se rezultati istraživanja moraju interpretirati s oprezom.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Unutar skupine ispitanika s neurodegenerativnim bolestima vrijednosti S glikana bile su više u podskupini bolesnika s bolestima metabolizma u odnosu na one bez bolesti metabolizma.
2. Ispitanici koji su prethodno preboljeli COVID-19 imali su više vrijednosti G2 i S glikana dok su vrijednosti G0 glikana bile više u ispitanika koji nisu preboljeli COVID-19.
3. Status cijepljenja nije utjecao niti na jedan glikan u sve tri ispitivane skupine, a dužina trajanja simptoma dugog COVID-19 i dužina trajanja neurodegenerativne bolesti nisu korelirali s glikanskim statusom.
4. Ispitanici s neurodegenerativnim bolestima imali su više vrijednosti G0 glikana u odnosu na kontrolnu skupinu i višu glikansku dob u odnosu na ispitanike s dugim COVID-19.

7. SAŽETAK

CILJ: Cilj istraživanja je bio ispitati razliku u statusu IgG glikana između bolesnika s neurodegenerativnim bolestima, s neurološkim dugim COVID-19 i kontrolne grupe.

NACRT STUDIJE: Presječna studija.

ISPITANICI I METODE: U istraživanju je sudjelovao 41 ispitanik: 15 s neurološkim dugim COVID-19, 14 s neurodegenerativnim bolestima, 12 kontrolne grupe. Korišteni su podatci dobiveni upitnicima (dob, spol, vrsta bolesti, trajanje bolesti, simptomi dugog COVID-19, cijepljenje protiv SARS-CoV-2, preboljenje COVID-19, komorbiditeti, terapija, tjelesna težina, visina, pušenje) i laboratorijskom analizom uzoraka krvi (G0, G2, S).

REZULTATI: Najčešći simptomi dugog COVID-19 bili su kognitivne smetnje i kronični umor. Ispitanici se nisu razlikovali po dobi, spolnoj distribuciji, BMI i pušenju, a metaboličke bolesti bile su češće u grupi s neurodegenerativnim bolestima. U grupi s neurodegenerativnim bolestima oni s metaboličkim bolestima imali su veći središnji rang S glikana u odnosu na one bez bolesti metabolizma. Ispitanici koji nisu preboljeli COVID-19 imali su viši medijan G0 glikana dok su medijan G2 i S glikana bili viši u ispitanika koji su preboljeli COVID-19. Medijan glikana G0 bio je veći u ispitanika s neurodegeneracijom u odnosu na kontrolnu skupinu i medijan glikanske dobi u ispitanika s neurodegeneracijom bio je veći u odnosu na ispitanike s dugim COVID-19. Status cijepljenja nije utjecao niti na jedan glikan u sve tri ispitivane skupine.

ZAKLJUČAK: Za razliku od ispitanika s dugim COVID-19, ispitanici s neurodegeneracijom imaju izražen proupalni status glikana u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, ispitanici s neurodegeneracijom imaju višu glikansku dob od ispitanika s dugim COVID-19.

Ključne riječi: dugi COVID-19; glikani; IgG; neurodegenerativne bolesti

8. SUMMARY

THE DIFFERENCE IN GLYCAN STATE BETWEEN PATIENTS WITH NEURODEGENERATIVE DISEASES AND LONG COVID-19 PATIENTS WITH NEUROLOGICAL SYMPTOMS

OBJECTIVES: The aim of this study was to evaluate the difference in IgG glycan state between the patients with neurodegenerative diseases, the ones with neurological long COVID-19, and the control group.

STUDY DESIGN: Cross-sectional study.

PARTICIPANTS AND METHODS: The study involved 41 participants: 15 with neurological long COVID-19, 14 with neurodegenerative diseases, and 12 participants of control group. This study used the data collected through a questionnaire (age, sex, type of disease, duration of disease, symptoms of long COVID-19, COVID-19 vaccination and recovery from COVID-19, comorbidities, therapy, body weight, height, smoking) and laboratory analysis of blood samples (G0, G2, S).

RESULTS: The most common symptoms of long COVID-19 were cognitive impairment and chronic fatigue. There was no difference in age, sex distribution, BMI and smoking between participants, and metabolic diseases were more common in group with neurodegenerative diseases. Participants with metabolic diseases within the neurodegenerative diseases group had a higher middle rank of S glycans compared to the ones without metabolic diseases. Participants that did not have COVID-19 had higher G0 median, while participants that recovered from COVID-19 had higher G2 and S median. G0 median was higher in participants with neurodegeneration compared to control group. Glycan age median was higher in participants with neurodegeneration compared to the long COVID-19 group. Vaccination state did not affect any of glycans in any of the three examined groups.

CONCLUSION: Compared to the participants with long COVID-19, participants with neurodegeneration have more pronounced proinflammatory glycan state than the control group. Participants with neurodegeneration also have higher glycan age than COVID-19 participants.

Keywords: glycans; IgG; long COVID-19; neurodegenerative diseases

9. LITERATURA

1. Gudelj I, Lauc G, Pezer M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell Immunol.* 2018;333:65-79.
2. Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15(6):346-366.
3. Costa AF, Campos D, Reis CA, Gomes C. Targeting Glycosylation: A New Road for Cancer Drug Discovery. *Trends Cancer.* 2020;6(9):757-766.
4. 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; 19(2): 390.
5. Martinić Kavur M, Lauc G, Pezer M. Systems Glycobiology: Immunoglobulin G Glycans as Biomarkers and Functional Effectors in Aging and Diseases. U: Barchi Jr. JJ, urednik. *Comprehensive Glycoscience.* 2. izd. Maryland: Elsevier; 2021. str. 439–478.
6. Liu S, Liu X. IgG N-glycans. *Adv Clin Chem.* 2021;105:1-47.
7. Bournazos S, Ravetch JV. Diversification of IgG effector functions. *Int Immunol.* 2017;29(7):303-310.
8. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(1):34-47.
9. Li D, Lou Y, Zhang Y, Liu S, Li J, Tao J. Sialylated immunoglobulin G: a promising diagnostic and therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Theranostics.* 2021;11(11):5430-5446.
10. Zhou X, Motta F, Selmi C, Ridgway WM, Gershwin ME, Zhang W. Antibody glycosylation in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2021;20(5):102804.
11. Sun Y, Li X, Wang T, Li W. Core Fucosylation Regulates the Function of Pre-BCR, BCR and IgG in Humoral Immunity. *Front Immunol.* 2022;13:844427.
12. Štambuk J, Nakić N, Vučković F, Pučić-Baković M, Razdorov G, Trbojević-Akmačić I, i sur. Global variability of the human IgG glycome. *Aging (Albany NY).* 2020;12(15):15222-15259.
13. Dall'Olio F. Glycobiology of Aging. *Subcell Biochem.* 2018;90:505-526.
14. Paton B, Suarez M, Herrero P, Canela N. Glycosylation Biomarkers Associated with Age-Related Diseases and Current Methods for Glycan Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 5788.

15. Krištić J, Lauc G, Pezer M. Immunoglobulin G glycans - Biomarkers and molecular effectors of aging. *Clin Chim Acta*. 2022;535:30-45.
16. Jurić J, Kohrt WM, Kifer D, Gavin KM, Pezer M, Nigrovic PA, i sur. Effects of estradiol on biological age measured using the glycan age index. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(19):19756-19765.
17. 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;25(3):103897.
18. Wang H, Li X, Wang X, Liu D, Zhang X, Cao W, i sur. Next-Generation (Glycomic) Biomarkers for Cardiometabolic Health: A Community-Based Study of Immunoglobulin G N-Glycans in a Chinese Han Population. *OMICS*. 2019;23(12):649-659.
19. Štambuk T, Klasić M, Zoldoš V, Lauc G. N-glycans as functional effectors of genetic and epigenetic disease risk. *Mol Aspects Med*. 2021;79:100891.
20. Tijardović M, Marijančević D, Bok D, Kifer D, Lauc G, Gornik O, i sur. Intense Physical Exercise Induces an Anti-inflammatory Change in IgG N-Glycosylation Profile. *Front Physiol*. 2019;10:1522.
21. Liu D, Li Q, Dong J, Li D, Xu X, Xing W, i sur. The Association Between Normal BMI With Central Adiposity And Proinflammatory Potential Immunoglobulin G N-Glycosylation. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2019;12:2373-2385.
22. Greto VL, Cvetko A, Štambuk T, Dempster NJ, Kifer D, Deriš H, i sur. Extensive weight loss reduces glycan age by altering IgG N-glycosylation. *Int J Obes (Lond)*. 2021;45(7):1521-1531.
23. Deriš H, Tominac P, Vučković F, Briški N, Astrup A, Blaak EE, i sur. Effects of low-calorie and different weight-maintenance diets on IgG glycome composition. *Front Immunol*. 2022;13:995186.
24. Russell AC, Kepka A, Trbojević-Akmačić I, Ugrina I, Song M, Hui J, i sur. Increased central adiposity is associated with pro-inflammatory immunoglobulin G N-glycans. *Immunobiology*. 2019;224(1):110-115.
25. Liu D, Chu X, Wang H, Dong J, Ge SQ, Zhao ZY, i sur. The changes of immunoglobulin G N-glycosylation in blood lipids and dyslipidaemia. *J Transl Med*. 2018;16(1):235.
26. Wang Y, Klarić L, Yu X, Thaqi K, Dong J, Novokmet M, i sur. The Association Between Glycosylation of Immunoglobulin G and Hypertension: A Multiple Ethnic Cross-Sectional Study. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(17):e3379.

27. Kifer D, Louca P, Cvetko A, Deriš H, Cindrić A, Grallert H, i sur. N-glycosylation of immunoglobulin G predicts incident hypertension. *J Hypertens*. 2021;39(12):2527-2533.
28. Gao Q, Dolikun M, Štambuk J, Wang H, Zhao F, Yiliham N, i sur. Immunoglobulin G N-Glycans as Potential Postgenomic Biomarkers for Hypertension in the Kazakh Population. *OMICS*. 2017;21(7):380-389.
29. Wu Z, Li H, Liu D, Tao L, Zhang J, Liang B, i sur. IgG Glycosylation Profile and the Glycan Score Are Associated with Type 2 Diabetes in Independent Chinese Populations: A Case-Control Study. *J Diabetes Res*. 2020;2020:5041346.
30. Li X, Wang H, Russell A, Cao W, Wang X, Ge S, i sur. Type 2 Diabetes Mellitus is Associated with the Immunoglobulin G N-Glycome through Putative Proinflammatory Mechanisms in an Australian Population. *OMICS*. 2019;23(12):631-639.
31. Lemmers RFH, Vilaj M, Urda D, Agakov F, Šimurina M, Klaric L, i sur. IgG glycan patterns are associated with type 2 diabetes in independent European populations. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2017;1861(9):2240-2249.
32. Peng C, Trojanowski JQ, Lee VM. Protein transmission in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2020;16(4):199-212.
33. Soto C, Pritzkow S. Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*. 2018 Oct;21(10):1332-1340.
34. Videira PAQ, Castro-Caldas M. Linking Glycation and Glycosylation With Inflammation and Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Front Neurosci*. 2018;12:381.
35. Araújo B, Caridade-Silva R, Soares-Guedes C, Martins-Macedo J, Gomes ED, Monteiro S, i sur. Neuroinflammation and Parkinson's Disease-From Neurodegeneration to Therapeutic Opportunities. *Cells*. 2022;11(18):2908.
36. Kronimus Y, Dodel R, Galuska SP, Neumann S. IgG Fc N-glycosylation: Alterations in neurologic diseases and potential therapeutic target? *J Autoimmun*. 2019;96:14-23.
37. Paton B, Suarez M, Herrero P, Canela N. Glycosylation Biomarkers Associated with Age-Related Diseases and Current Methods for Glycan Analysis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):5788.
38. López-Sampalo A, Bernal-López MR, Gómez-Huelgas R. Persistent COVID-19 syndrome. A narrative review. *Rev Clin Esp (Barc)*. 2022;222(4):241-250.
39. Raveendran AV, Jayadevan R, Sashidharan S. Long COVID: An overview. *Diabetes Metab Syndr*. 2021;15(3):869-875.
40. Luciew JD, Erickson RA, Kaufman TK. Post-COVID-19 neurologic syndrome: Another legacy of the pandemic. *JAAPA*. 2022;35(9):19-24.

41. Low RN, Low RJ, Akrami A. A Cytokine-based model for the pathophysiology of Long COVID symptoms 2020. Dostupno na adresi: <https://osf.io/7gcnv/>. Datum pristupa: 22. 01. 2023.
42. Pongracz T, Vidarsson G, Wuhrer M. Antibody glycosylation in COVID-19. *Glycoconj J*. 2022;39(3):335-344.
43. Buonsenso D, Piazza M, Boner AL, Bellanti JA. Long COVID: A proposed hypothesis-driven model of viral persistence for the pathophysiology of the syndrome. *Allergy Asthma Proc*. 2022;43(3):187-193.
44. Gusev E, Sarapultsev A, Solomatina L, Chereshev V. SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1716.
45. Jesuthasan A, Massey F, Manji H, Zandi MS, Wiethoff S. Emerging potential mechanisms and predispositions to the neurological manifestations of COVID-19. *J Neurol Sci*. 2021;428:117608.
46. Marušić M, urednik. *Uvod u znanstveni rad u medicini*. 6. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
47. Hanić M, Lauc G, Trbojević-Akmačić I. N-Glycan Analysis by Ultra-Performance Liquid Chromatography and Capillary Gel Electrophoresis with Fluorescent Labeling. *Curr Protoc Protein Sci*. 2019;97(1):e95.
48. Pinzon RT, Wijaya VO, Jody AA, Nunsio PN, Buana RB. Persistent neurological manifestations in long COVID-19 syndrome: A systematic review and meta-analysis. *J Infect Public Health*. 2022;15(8):856-869.
49. Premraj L, Kannapadi NV, Briggs J, Seal SM, Battaglini D, Fanning J, i sur. Mid and long-term neurological and neuropsychiatric manifestations of post-COVID-19 syndrome: A meta-analysis. *J Neurol Sci*. 2022;434:120162.
50. Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clin Geriatr Med*. 2020;36(1):1-12.
51. Silva MVF, Loures CMG, Alves LCV, de Souza LC, Borges KBG, Carvalho MDG. Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *J Biomed Sci*. 2019;26(1):33.
52. Lundström SL, Yang H, Lyutvinskiy Y, Rutishauser D, Herukka SK, Soininen H, i sur. Blood plasma IgG Fc glycans are significantly altered in Alzheimer's disease and progressive mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis*. 2014;38(3):567-79.

53. Váradi C, Nehéz K, Hornyák O, Viskolcz B, Bones J. Serum N-Glycosylation in Parkinson's Disease: A Novel Approach for Potential Alterations. *Molecules*. 2019;24(12):2220.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Božica Milić

Datum rođenja: 19. 07. 1996.

Mjesto rođenja: Osijek

E-mail: bozica.milic7@gmail.com

Obrazovanje:

2003. – 2011. Osnovna škola Ljudevita Gaja, Osijek

2011. – 2015. Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku

2016. – Medicinski fakultet Osijek, Studij medicine

Osobne vještine:

Poznavanje engleskog jezika u govoru i pismu.

Iskustvo rada u Microsoft Office programima.