N-glikozilacija imunoglobulina G u kroničnoj bolesti presatka protiv primatelja nakon presadbe alogeničnih matičnih krvotvornih stanica

Prenc, Ema

Doctoral thesis / Disertacija

2019

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:105:922441

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ema Prenc

N-glikozilacija imunoglobulina G u kroničnoj bolesti presatka protiv primatelja nakon presadbe alogeničnih matičnih krvotvornih stanica

DISERTACIJA

Zagreb, 2019.

Mjesto izrade doktorske disertacije:

Zavod za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelj rada: doc. prim. dr. sc. Dražen Pulanić, dr. med., znanstveni savjetnik

Suvoditelj rada: prof. Steven Živko Pavletić, dr. med.

Disertacija je izrađena uz potporu projekta „Clinical and biological factors determining severity and activity of chronic Graft-versus-Host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation" (Unity through Knowledge Fund), te djelomičnu potporu projekta „Novi biomarkeri kronične bolesti presatka protiv primatelja" (IP-2016-06-8046, Hrvatska zaklada za znanost).

Veliko hvala mojim mentorima na vodstvu, edukaciji i potpori, pogotovo Draženu na nesebičnoj pomoći, strpljenju i trudu koji je uložen u ovaj projekt i izradu ovog rada. Zahvaljujem prof. Pavletiću i prof. Nemetu na pruženoj prilici, kao i na jedinstvenom iskustvu ostvarenom kroz posjet cGvHD timu na NIH-u. Hvala cijelom multidisciplinarnom cGvHD timu Kliničkog bolničkog centra Zagreb na suradnji i vremenu posvećenom našim znanstvenim istraživanjima i rezultatima, a pogotovo našim pacijentima. Hvala Genosu i svim vrijednim kolegama koji su svojim znanjem i iskustvom, ali i prijateljstvom pomogli s eksperimentima, obradom podataka i ostvarenjem ovih rezultata.

Najveće hvala mojim Prencovima i Plačkovima, posebno Mladenu, bez čije potpore i strpljenja ovo ne bi bilo moguće. Hvala obitelji i prijateljima na izmjenama ideja i jadikovki, slušanju i savjetima i svemu čime su doprinijeli i začinili ovo putovanje.

Sadržaj

1. Uvod 1
1.1. Alogenična presadba krvotvornih matičnih stanica 1
1.1.1. Krvotvorne matične stanice 2
1.1.2. Izbor darivatelja 2
1.1.3. Kondicioniranje 3
1.1.4. Komplikacije nakon alogenične presadbe krvotvornih matičnih stanica 3
1.2. Bolest presatka protiv primatelja 4
1.2.1. Akutna bolest presatka protiv primatelja 4
1.2.2. Kronična bolest presatka protiv primatelja 6
1.2.2.1. Patofiziologija 6
1.2.2.2. Epidemiologija, rizični čimbenici i prevencija 8
1.2.2.3. Dijagnostika, kliničke manifestacije, stupnjevanje i klasifikacije 9
1.2.2.4. Liječenje 11
1.2.2.5. Potencijalni biomarkeri 12
1.3. Glikozilacija 12
1.3.1. N-glikozilacija proteina 14
1.3.2. Sinteza N-vezanih glikana 15
1.3.3. Glikani kao biomarkeri 16
1.3.4. Glikani imunoglobulina G 17
2. Hipoteza 20
3. Ciljevi i svrha ispitivanja 21
4. Ispitanici i metode istraživanja 22
4.1. Američki ispitanici: National Institutes of Health 22
4.2. Hrvatski ispitanici: Klinički bolnički centar Zagreb 23
4.3. Uključni i isključni kriteriji 24

4.4. Definiranje težine (stupnja) i aktivnosti kroničnog GvHD-a 25
4.4.1. Težina (stupanj) kroničnog GvHD-a 25
4.4.2. Aktivnost kroničnog GvHD-a 26
4.5. Laboratorijska analiza 28
4.5.1. Laboratorijska analiza: američki ispitanici (NIH) 28
4.5.2. Laboratorijska analiza: hrvatski ispitanici (KBC Zagreb) 28
4.5.3. Analiza glikozilacije imunoglobulina G 29
4.5.3.1. Izolacija imunoglobulina G i određivanje njegove koncentracije 30
4.5.3.2. Analiza glikozilacije imunoglobulina G postupkom tekućinske kromatografije ultra visoke razlučivosti (UPLC) 31
4.5.3.3. Analiza glikozilacije imunoglobulina G postupkom tekućinske kromatografije spregnute spektometrijom mase (LC/MS) 35
4.6. Etička odobrenja 37
4.7. Statistička analiza 37
5. Rezultati 41
5.1. Karakteristike ispitanika 41
5.1.1. Karakteristike američkih ispitanika (NIH) 41
5.1.2. Karakteristike hrvatskih ispitanika (KBC Zagreb) 45
5.1.3. Usporedba američkih i hrvatskih cGvHD bolesnika 51
5.2. Rezultati analize glikozilacije imunoglobulina G američkih cGvHD bolesnika 54
5.2.1. Rezultati analize glikana UPLC metodom 54
5.2.1.1. Težina (stupanj) kroničnog GvHD-a pojedinih zahvaćenih organskih sustava 55
5.2.1.2. Aktivnost kroničnog GvHD-a 59
5.2.2. Rezultati analize glikopeptida LC/MS metodom 66
5.2.2.1. Težina (stupanj) kroničnog GvHD-a pojedinih zahvaćenih organskih sustava 66

5.2.2.2. Aktivnost kroničnog GvHD-a 69
5.2.3. ROC analiza parametara težine i aktivnosti bolesti 73
5.2.3.1. ROC krivulje rezultata analize glikana UPLC metodom 73
5.2.3.1.1. Težina cGvHD-a pojedinih organskih sustava 73
5.2.3.1.2. Aktivnost cGvHD-a 76
5.2.3.2. ROC krivulje rezultata analize glikopeptida LC/MS metodom 77
5.2.3.2.1. Težina cGvHD-a pojedinih organskih sustava 77
5.2.3.2.2. Aktivnost cGvHD-a 79
5.3. Rezultati analize glikozilacije imunoglobulina G parova hrvatskih ispitanika 80
5.3.1. Rezultati analize uzoraka UPLC metodom 80
5.3.1.1. Usporedba glikana cGvHD bolesnika naspram kontrolnih ispitanika 80
5.3.2. Rezultati analize uzoraka LC/MS metodom 82
5.3.2.1. Usporedba glikopeptida cGvHD bolesnika naspram kontrolnih ispitanika 82
6. Rasprava 94
6.1. Usporedba američkih i hrvatskih ispitanika 95
6.2. Glikani i težina (NIH ocjena) kroničnog GvHD-a pojedinih zahvaćenih organskih sustava 96
6.3. Glikani i aktivnost cGvHD-a 99
6.4. Specifičnost i osjetljivost glikanskih mjerenja (američka populacija) 101
6.5. Diskriminativni model cGvHD-a: cGvHD bolesnici naspram uparenih kontrolnih ispitanika (hrvatska populacija) 102
7. Zaključak 104
8. Kratki sažetak na hrvatskom jeziku 105
9. Kratki sažetak na engleskom jeziku 106
10. Popis literature 107

11. Kratka biografija 120

DODACI 121

Tablica D1. Derivirani parametri glikozilacije IgG-a (UPLC) 121

Tablica D2. Rezultati univarijatne analize uzoraka američkih cGvHD pacijenata analiziranih UPLC metodom 126

A) Težina (stupanj) kroničnog GvHD-a 126

B) Aktivnost kroničnog GvHD-a 143

Tablica D3. Rezultati univarijatne analize rezultata laboratorijske obrade uzoraka američkih pacijenata metodom LC/MS 155

A) Težina (stupanj) kroničnog GvHD-a 155

B) Aktivnost kroničnog GvHD-a 171

Popis i objašnjenja oznaka i kratica

AB0 – sustav krvnih grupa zasnovan na diskriminaciji antigena A, B ili 0 na crvenim krvnim stanicama

ACN – acetonitril

ADCC – stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima (eng. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*)

aGvHD – akutna bolest presatka protiv primatelja (eng. *acute graft-versus-host disease*)

aloPKMS – alogenična presadba krvotvornih matičnih stanica

anti-dsDNA – protutijela na dvostruko uzvojitu DNA

B – račvajući GlcNAc; vidi N

BAFF – čimbenik aktivacije B-limfocita (eng. *B-cell activating factor*)

cGvHD – kronična bolest presatka protiv primatelja (eng. *chronic graft-versus-host disease)*

CMV – citomegalovirus

DLI – infuzija darivateljevih limfocita (eng. *donor lymphocyte infusion*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

Elafin – protein, poznat i kao kožna antileukoproteinaza, inhibitor elastaze

ER – endoplazmatski retikulum

F – fukoza

Fab – fragment koji veže antigen (eng. *fragment antigen binding*)

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

FcR – Fc receptor

FDA – američka agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*)

G-CSF – čimbenik stimulacije granulocitnih kolonija (eng. *granulocyte-colony stimulating factor*)

Gal – galaktoza

Glc – glukoza

GlcNAc – N-acetilglukozamin

GvHD – bolest presatka protiv primatelja (eng. *graft-versus-host disease*)

GvT/GvL – reakcija presatka protiv tumora/leukemije (eng. *graft-versus-tumor/leukemia*)

HILIC-UPLC – tekućinska kromatografije ultra visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama (eng. *hydrophilic interaction liquid chromatography - ultra performance liquid chromatography*)

HLA – sustav glavnih antigena tkivne snošljivosti u ljudi (eng. *human leukocyte antigen*)

IgG – imunoglobulin G

IL-2Rα – α lanac trimernog receptora interleukina-2 (IL-2R)

IVIg – ljudski imunoglobulin za intravensku primjenu

KMS – krvotvorne matične stanice

LC-ESI-MS – tekućinska kromatografija spregnuta spektrometrijom mase (eng. *liquid chromatography – electrospray ionisation - mass spectrometry*)

MA – mijeloablativno kondicioniranje visokog intenziteta

Man – manoza

MIG (CXCL9) – kemokin obitelji C-X-C strukture

MS – masena spektrometrija

N – račvajući GlcNAc

NCI – američki Nacionalni institut za rak (eng. *National Cancer Institute)*

NIH – američki Nacionalni instituti za zdravlje (eng. *National Institutes of Health*)

PBS – otopina fosfatnog pufera (eng. *phosphate buffer saline*)

PBSC – krvotvorne matične stanice iz periferne krvi (eng. *peripheral blood stem cells*)

PCA – statistička metoda glavnih komponenti (eng. *principal component analysis*)

PNGaza F – N-glikozidaza F, enzim koji katalizira cijepanje N-vezanih oligosaharida

RIC – kondicioniranje smanjenog intenziteta (eng. *reduced intensity conditioning*)

ROC krivulje – statistička metoda za procjenu odnosa specifičnosti i osjetljivosti klasifikatora (eng. *receiver operating characteristic*)

S – sijalinska kiselina

sCD13 – topivi (eng. *soluble*) oblik CD13 (aminopeptidaza N)

SDS – natrijev dodecil-sulfat

TFA – trifluoroacetatna kiselina

UKF – Fond jedinstvo uz pomoć znanja (eng. *Unity through Knowledge Fund*)

VIF – mjera koreliranosti varijabli (eng. *variance inflation factor*)

Xyl – ksiloza

POPIS SLIKA

Slika 1. Prikaz mehanizma nastanka akutnog GvHD-a.

Slika 2. Prikaz mehanizma nastanka kroničnog GvHD-a.

Slika 3. Tri osnovna tipa N-vezanih glikana.

Slika 4. Pojednostavljeni prikaz sinteze složenih N-glikana.

Slika 5. A) Pojednostavljeni prikaz glikoproteina imunoglobulina G i glikana na Fc fragmentu; B) Pojednostavljeni prikaz modulacije upalnog odgovora promjenom sastava IgG glikana.

Slika 6. Hodogram protokola za američke ispitanike.

Slika 7. Hodogram protokola za hrvatske ispitanike.

Slika 8. Formular za procjenu zahvaćenosti pojedinih organskih sustava i ocjenjivanje težine bolesti.

Slika 9. Prikaz rasporeda uzoraka na pločici prilikom analize glikana IgG-a.

Slika 10. Kromatografski profil N-glikana IgG-a.

Slika 11. Moguće kombinacije glikanskih struktura vezanih na IgG (Fc) protein.

Slika 12. Grafički prikaz statistički značajnih razlika direktno mjerenih i deriviranih parametara (UPLC) – NIH ocjena zglobova/fascija i kože.

Slika 13. Grafički prikaz statistički značajnih razlika direktno mjerenih i deriviranih parametara (UPLC) – aktivnost cGvHD-a.

Slika 14. Grafički prikaz statistički značajnih razlika direktno mjerenih i deriviranih parametara (LC/MS) – NIH ocjena zglobova/fascija i kože.

Slika 15. Grafički prikaz statistički značajnih razlika direktno mjerenih i deriviranih parametara (LC/MS) – aktivnost cGvHD-a.

Slika 16. Usporedba površina ispod ROC krivulja za diskriminativne modele pojedinih organskih sustava zahvaćenih cGvHD-om (UPLC).

Slika 17. Usporedba površina ispod ROC krivulja za diskriminativne modele aktivnosti cGvHD-a (UPLC).

Slika 18. Usporedba površina ispod ROC krivulja za diskriminativne modele pojedinih organskih sustava zahvaćenih cGvHD-om (LC/MS).

Slika 19. Usporedba površina ispod ROC krivulja za diskriminativne modele aktivnosti cGvHD-a (LC/MS).

Slika 20. Grafički prikaz značajnih razlika u koncentraciji glikopeptida između hrvatskih skupina cGvHD pacijenata i kontrolnih ispitanika (LC/MS).

POPIS TABLICA

Tablica 1. Pregled dijagnostičkih i distinktivnih znakova i simptoma kroničnog GvHD-a prema NIH klasifikaciji (2005.).

Tablica 2. Sastav 24 kromatografska pika (direktno mjerenih parametara) IgG glikoma metodom tekućinske kromatografije.

Tablica 3. Formule za izračunavanje razina biološki značajnih obilježja glikanske strukture (deriviranih parametara).

Tablica 4. Karakteristike američkih cGvHD bolesnika.

Tablica 5. Laboratorijski parametri američkih cGvHD ispitanika.

Tablica 6. Demografske karakteristike hrvatskih cGvHD bolesnika i kontrola.

Tablica 7. Usporedba laboratorijskih parametara hrvatskih ispitanika: a) cGvHD bolesnika i b) kontrola.

Tablica 8. Usporedba američkih i hrvatskih cGvHD bolesnika.

Tablica 9. Prikaz značajnih rezultata univarijatne analize pojedinih glikanskih struktura i deriviranih glikanskih parametara analiziranih UPLC metodom u odnosu na NIH ocjene težine cGvHD-a pojedinih organskih sustava (zglobova/fascija i kože) američkih cGvHD bolesnika.

Tablica 10. Prikaz značajnih rezultata univarijatne analize pojedinih glikanskih struktura i deriviranih glikanskih parametara analiziranih UPLC metodom u odnosu na klinički dojam o aktivnosti bolesti i intenzitet imunosupresije američkih cGvHD bolesnika.

Tablica 11. Prikaz značajnih rezultata univarijatne analize pojedinih glikopeptidnih struktura i deriviranih parametara analiziranih LC/MS metodom u odnosu na NIH ocjene težine cGvHD-a pojedinih organskih sustava (zglobova/fascija i kože) američkih cGvHD bolesnika.

Tablica 12. Prikaz značajnih rezultata univarijatne analize pojedinih glikopeptidnih struktura i deriviranih parametara analiziranih LC/MS metodom u odnosu na klinički dojam o aktivnosti bolesti i intenzitet imunosupresije američkih cGvHD bolesnika.

Tablica 13. Rezultati logističke regresije pojedinih glikanskih struktura hrvatske populacije (UPLC).

Tablica 14. Rezultati logističke regresije pojedinih glikopeptidnih struktura hrvatske populacije (LC/MS).

Tablica 15. Rezultati logističke regresije hrvatske populacije samih glikopeptidnih struktura pomoću glavnih komponenti.

Tablica 16. Statistički značajni rezultati logističke regresije hrvatske populacije samih laboratorijskih parametara pomoću glavnih komponenti.

Tablica 17. Rezultati logističke regresije hrvatske populacije s glikopeptidnim strukturama i laboratorijskim parametrima pomoću glavnih komponenti.

Tablica 18. Rezultati logističke regresije hrvatske populacije za svaki glikopeptid pomoću značajnih laboratorijskih parametara.

1. Uvod

1.1. Alogenična presadba krvotvornih matičnih stanica

Alogenična presadba krvotvornih matičnih stanica (aloPKMS) postupak je kojim se danas liječe pacijenti s brojnim zloćudnim, ali i dobroćudnim hematološkim bolestima. Istraživanja na laboratorijskim životinjama provedena četrdesetih i pedesetih godina prošlog stoljeća utrla su put ovoj vrsti liječenja. Pionirom ovog postupka u ljudi smatra se E. Donnall Thomas koji je opis svoje kliničke studije objavio 1957. godine u časopisu *New England Journal of Medicine*[1]. Šest pacijenata različitih anamneza uključenih u studiju primilo je suspenziju stanica koštane srži nakon primjene zračenja i kemoterapije. Presadbe koje su uslijedile često su završavale smrtnim ishodom. Kasnijem razvoju sigurnosti postupka i uspješnijem ishodu doprinijele su bolja suportivna njega, identifikacija i tipiziranje HLA sustava antigena, bolja kontrola bolesti prije postupka i bolja kontrola poslijetransplantacijskih infekcija i komplikacija. Broj presadbi porastao je i zahvaljujući organizaciji registara darivatelja matičnih stanica. Danas aloPKMS predstavlja potencijalno izlječenje za zloćudne i dobroćudne hematološke bolesti, autoimunosne bolesti i bolesti imunodeficijencije, urođene poremećaje metabolizma te čak i za neke solidne tumore.

Zavod za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu ima dugu tradiciju transplantacije u hematologiji, od prve aloPKMS učinjene još 1983. godine (među prvima u ovom dijelu Europe), prve autologne transplantacije 1988. godine (također među prvima u ovom dijelu Europe) sve do danas kada se u tom centru provode svi najsuvremeniji postupci u liječenju transplantacijom krvotvornih matičnih stanica. Broj transplantacija raste, a samo u Europi ih se godišnje izvede preko 40 000[2] (podaci iz 2014. godine), a kroz svjetsku organizaciju *Bone Marrow Donors Worldwide* (BMDW) dostupno je preko 33 milijuna darivatelja[3].

Cilj liječenja alogeničnom presadbom je postići reakciju presatka protiv tumora odnosno leukemije (eng. *graft-versus-tumor/leukemia effect,* GvT/GvL učinak) kao i zamijeniti oboljeli krvotvorni sustav sa zdravim, sposobnim za produkciju funkcionalnih stanica sve tri krvne loze.

1.1.1. Krvotvorne matične stanice

Krvotvorne matične stanice (KMS) nediferencirane su multipotentne stanice sa sposobnošću samoobnavljanja. Ove ishodišne stanice diferenciraju se u usmjerene prastanice mijelopoetskog i limfopoetskog sustava iz kojih procesima proliferacije i sazrijevanja nastaju sve funkcionalno zrele krvne stanice[4]. KMS nalazimo u koštanoj srži plosnatih kostiju odraslih osoba, dok ih se u perifernoj krvi može naći u značajno manjem broju. Niša koštane srži definira mikrookoliš koji matičnoj stanici pruža regulatorne signale za njezinu dormantnost, samoobnavljanje, proliferaciju i diferencijaciju[5]. KMS većinu svog života provedu u mirovanju te ih se smatra metabolički neaktivnom pričuvom stanica. „Uspavanost“ ove skupine stanica nužna je za dugotrajno očuvanje kapaciteta obnove krvnih stanica i zaštitu genetskog materijala od oštećenja i akumulacije replikacijskih mutacija. U odgovoru na stres, poput gubitka krvi, KMS se aktiviraju i ubrzano nadomještaju izgubljene ili oštećene stanice krvotvornog sustava[6].

Danas su za potrebe presadbe na raspolaganju tri izvora KMS: koštana srž, periferna krv i krv iz pupkovine. Tradicionalno ih se za presadbu prikuplja aspiracijom stražnjeg grebena ilijačne kosti darivatelja. Razvojem staničnih separatora i primjenom činitelja stimulacije granulocitnih kolonija (eng. *granulocyte-colony stimulating factor*, G-CSF) omogućilo se prikupljanje većeg broja KMS i iz periferne krvi te njihovu današnju svakodnevnu primjenu (eng. *peripheral blood stem cells*, PBSC). Najmanje diferencirane KMS dobivaju se iz krvi pupkovine, no njihov potencijal nije do danas do kraja ispunjen zbog malog volumena pohranjene krvi iz pupkovine.

1.1.2. Izbor darivatelja

U počecima presadbi krvotvornih matičnih stanica presadak se uglavnom dobivao od HLA podudarnog srodnog darivatelja. Takav darivatelj i danas čini idealan izbor prema dostupnim smjernicama i preporukama[7]. Prikladan darivatelj može biti i nepotpuno podudaran srodnik (razlika u jednom ili dva alela), a danas je u porastu i broj presadbi s nepodudarnim haploidentičnim srodnicima. Ipak za najveći broj presadbi u svijetu koriste se KMS nesrodnih podudarnih darivatelja[8].

Odluka o odabiru darivatelja i izvora KMS ovisi u prvom redu o osnovnoj bolesti i raspoloživosti darivatelja KMS.

1.1.3. Kondicioniranje

Kondicioniranje predstavlja pripremu pacijenta za postupak presadbe krvotvornih matičnih stanica. Cilj kondicioniranja je istrijebiti primarnu bolest, stvoriti prostor za nove matične stanice uništavanjem bolesnikovih i suprimirati imunosni sustav primatelja. Imunosupresija sprječava odbacivanje presatka te nastoji spriječiti nastanak bolesti presatka protiv primatelja. Potreba za imunosupresijom raste sa stupnjem HLA nepodudarnosti presatka. Glavna negativna strana kondicioniranja je toksičnost te se standardno mijeloablativno (MA) kondicioniranje smatra glavnim uzrokom morbiditeta i mortaliteta, pogotovo u starijih pacijenata. Kako bi se smanjila toksičnost, ustanovljeni su nemijeloablativni protokoli tj. kondicioniranje smanjenog intenziteta (eng. *reduced intensity conditioning*, RIC). U tom slučaju, glavni mehanizam borbe protiv maligne bolesti postaje spomenuta reakcija presatka protiv tumora/leukemije (GvT/GvL učinak) koju je u ljudi prvi opisao Mathé 1965. godine[9]. Ovaj poželjni učinak omogućava dugoročnu kontrolu bolesti prijenosom alogeničnih stanica darivatelja prilikom presadbe i/ili infuzije darivateljevih limfocita (eng. *donor lymphocyte infusion*, DLI) poslije presadbe. Darivateljeve imunokompetentne stanice djeluju protiv ostatnih stanica maligne bolesti primatelja prepoznajući ih kao strane.

1.1.4. Komplikacije nakon alogenične presadbe krvotvornih matičnih stanica

Osim velike osjetljivosti na infekcije (bakterijske, virusne i gljivične) zbog suprimiranog imunosnog sustava, pacijentima nakon aloPKMS prijeti cijeli niz drugih komplikacija. Neke komplikacije posljedica su toksičnosti kondicioniranja, prethodno primljene kemoterapije i imunosupresije, dok druge nastaju kao posljedica same aloPKMS koja može dovesti do akutne i/ili kronične bolesti presatka protiv primatelja. U aloPKMS pacijenata mogu se kasnije razviti i sekundarne maligne bolesti te druge bolesti i poremećaji, a nerijetko se moraju nositi i sa psihosocijalnim posljedicama postupka i narušenom kvalitetom života[10].

Jedna od težih posljedica same aloPKMS je bolest presatka protiv primatelja.

1.2. Bolest presatka protiv primatelja

Bolest presatka protiv primatelja (eng. *graft-versus-host disease*, GvHD) prepoznata je već na mišjim modelima alogenične presadbe krvotvornih matičnih stanica. Tada je bolest nazivana „sekundarna bolest“ ili „bolest kržljanja“ zbog tipičnih simptoma koji uključuju smanjenje tjelesne težine, proljev te u konačnici smrt. Još 1966. godine Billingham je definirao tri ključna uvjeta koja moraju biti zadovoljena kako bi došlo do GvHD-a[11]:

- presadak mora sadržavati imunološki kompetentne stanice
- tkivo primatelja mora izražavati antigene koji nisu prisutni u presatku darivatelja
- primatelj ne smije biti sposoban pokrenuti efikasnu imunološku reakciju kako bi se riješio imunokompetentnih stanica.

Prepoznajemo dva oblika ove bolesti: akutni i kronični GvHD. Prvotno su se oblici bolesti razlikovali pomoću unaprijed dogovorene vremenske granice od +100 dana nakon presadbe – pojava bolesti prije 100. dana smatrala se akutnim oblikom, dok su se kasnije manifestacije pripisivale kroničnom GvHD-u. Današnja dijagnoza temelji se na prepoznavanju zahvaćenosti određenih organskih sustava i simptomima specifičnim za određeni oblik GvHD-a neovisno o proteklom vremenu nakon presadbe matičnih stanica. U oba oblika riječ je o onesposobljavajućoj multisistemskoj bolesti koja je posljedica imunoloških poremećaja nakon aloPKMS.

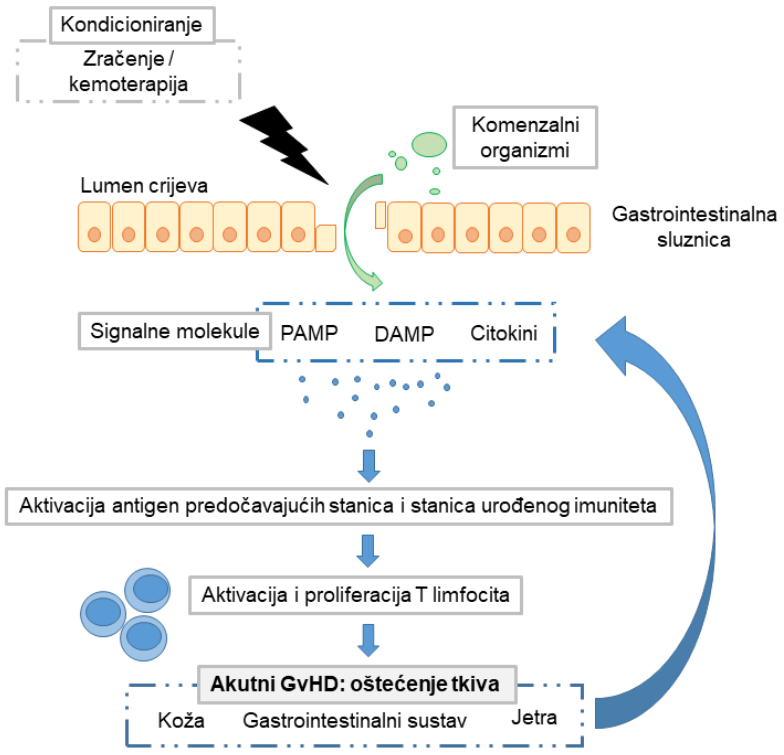
1.2.1. Akutna bolest presatka protiv primatelja

Akutna bolest presatka protiv primatelja (eng. *acute graft-versus-host disease*, aGvHD) jedna je od glavnih ranih komplikacija i jedan od glavnih uzroka ranog mortaliteta nakon aloPKMS. Bolest se dijeli u dvije potkategorije: (1) klasični akutni GvHD (prezentira se tipičnim simptomima unutar 100 dana od aloPKMS ili DLI) i (2) perzistentni, rekurentni ili kasni akutni GVHD (prezentira se nakon 100. dana od aloPKMS ili DLI).

Akutni GvHD može zahvatiti jedan ili više organskih sustava: kožu, gastrointestinalni sustav i jetru. Tipično se prezentira eritemom i makulopapularnim osipom po koži dlanova i tabana, sekretornim proljevom i kolestatskom bolesti jetre[12]. Bolest

zahvaća i do 50% pacijenata koji prime HLA podudaran presadak od srodnog darivatelja, a čak do 70% pacijenata koji presadak prime od nesrodnog darivatelja[13]. Smatra se da sljedeći čimbenici doprinose povećanom riziku za razvoj akutnog GvHD-a: nepotpuna HLA podudarnost presatka, presadak od nesrodnog darivatelja, mijeloablativno kondicioniranje visokog intenziteta, aloimunizacija darivatelja, nepoklapanje spola darivatelja i primatelja te komorbiditeti poput pretilosti, dijabetesa, kardioloških tegoba i slično[14].

Istraživanja naglašavaju ulogu urođenog imuniteta u nastanku bolesti. Zračenje i/ili kemoterapija u sklopu pripreme za presadbu uzrokuju ozljedu gastrointestinalne sluznice omogućavajući prijelaz komenzalnih bakterija iz lumena crijeva. Ozljeda uzrokuje lučenje upalnih citokina i aktivaciju antigen predočavajućih stanica i drugih stanica urođenog imuniteta, a posljedično i aktivaciju i proliferaciju darivateljevih T limfocita koji primateljeve antigene prepoznaju kao strane. Opisana reakcija pretvara se u kaskadu događaja koji, potaknuti proupalnom okolinom, uzrokuju daljnje uništenje tkiva i razvoj akutnog GvHD-a[15] (Slika 1.).



Slika 1. Prikaz mehanizma nastanka akutnog GvHD-a (prilagođeno prema Maeda 2013.[15]).

1.2.2. Kronična bolest presatka protiv primatelja

Kronična bolest presatka protiv primatelja (eng. *chronic graft-versus-host disease*, cGvHD) jedna je od najvažnijih kasnih posljedica nakon aloPKMS. Bolest se povezuje s povećanom stopom smrtnosti, poremećenim fizičkim i funkcionalnim statusom bolesnika i smanjenom kvalitetom života[16], ali i s nižom stopom relapsa primarne bolesti vjerojatno zahvaljujući GvT efektu[17]. Riječ je o aloimunosnoj i autoimunosnoj bolesti koju karakterizira deregulacija imuniteta, fibroza, imunodeficijencija i razvoj znakova i simptoma poremećaja jednog ili više organskih sustava.

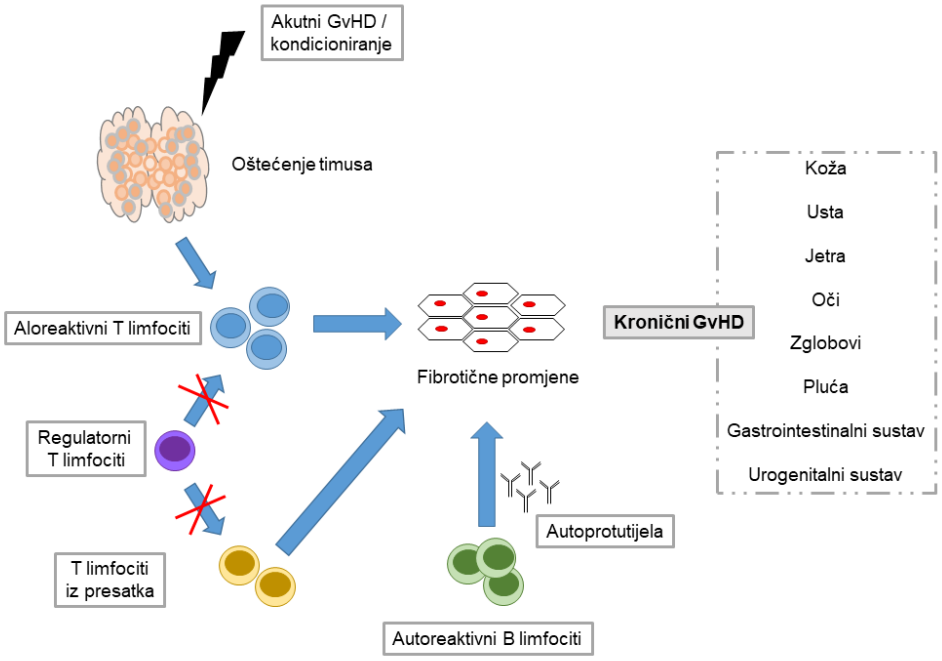
Američki National Institutes of Health (NIH) održao je 2005. godine sastanak s ciljem definiranja novog konceptualnog razumijevanja kroničnog GvHD-a. Na sastanku je postignut konsenzus o standardizaciji kriterija za dijagnozu i stupnjevanje GvHD-a temeljenih na kliničkoj slici te isključivanje vremenske granice (ranije 100. dan nakon presadbe) kao glavnog čimbenika za razlikovanje akutne bolesti od kronične. Tijekom sastanka dogovoren je novi i poboljšani način ocjenjivanja težine i aktivnosti kroničnog GvHD-a te funkcionalne onesposobljenosti bolesnika ovisno o broju i težini oštećenja zahvaćenih organskih sustava[18–23] (poglavlje 1.2.2.3.). U lipnju 2014. godine održan je drugi NIH konsenzus sastanak koji je rezultirao nadopunjenim preporukama za dijagnozu i stupnjevanje kroničnog GvHD-a, za procjenu odgovora na terapiju, potpornu terapiju, patohistologiju, razvoj biomarkera te dizajn kliničkih studija[24–29].

Unatoč velikom trudu i napretku postignutom nakon dva održana sastanka, mnoga pitanja o kroničnom GvHD-u ostaju nedovoljno razjašnjena. Potrebno je unaprijediti razumijevanje patofiziologije bolesti, predvidjeti njezin nastanak, razvoj i dugotrajni učinak, poboljšati metode dijagnoze, stupnjevanja, liječenja te odgovora na terapiju.

1.2.2.1. Patofiziologija

Koliko je danas poznato, kronični GvHD je rezultat kompleksne kaskade imunoloških interakcija koje se događaju tijekom rasta i sazrijevanja darivateljevog imunosnog sustava u antigenski različitom okruženju primatelja. Iako je već dugo poznato da su T limfociti primarne imunokompetentne stanice u mehanizmu nastanka kroničnog

GvHD-a[30], cijeli proces nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da važnu ulogu u razvoju bolesti igra oštećenje timusa (nastalo kondicioniranjem ili akutnim GvHD-om) koje uzrokuje smanjenje populacije regulatornih stanica i negativnu selekciju T limfocita. Ova devijacija, uz aktivaciju i proliferaciju darivateljevih T limfocita, u konačnici uzrokuje fibrotične promjene na zahvaćenim organima i njihov gubitak funkcije. Proces uključuje i pojavu autoreaktivnih B stanica kao i depoziciju promijenjenih imunoglobulina što doprinosi oštećenju organa i fibrozi[31,32](Slika 2.).



Slika 2. Prikaz mehanizma nastanka kroničnog GvHD-a (prilagođeno prema Blazar i sur. 2012.[31]).

Sve veći broj istraživanja posvećen je ne samo T limfocitima, nego i drugim staničnim populacijama, pogotovo B limfocitima[33,34]. Poznato je da je rekonstitucija B stanične linije zakašnjela u bolesnika s kroničnim GvHD-om, kao i da u plazmi imaju povišen omjer citokina faktora aktivacije B limfocita (eng. *B cell activating factor*, BAFF) i naivnih B stanica[35,36]. Ovo jedinstveno proupalno okruženje s visokim koncentracijama BAFF citokina pogoduje preživljavanju i diferencijaciji alo- i autoreaktivnih B limfocita[37]. Uspjeh terapije visokim dozama kortikosteroida prednizona povezuje se sa smanjenjem koncentracije BAFF-a u bolesnika s aktivnom bolesti, dok su u bolesnika koji nikad nisu razvili kronični GvHD izmjerene niže koncentracije tog citokina[38]. Aktivna uloga B limfocita u mehanizmu nastanka

bolesti bi također objasnila i djelomičan uspjeh terapije rituksimabom (anti-CD20 monoklonsko protutijelo)[39,40], lijeka koji se ponekad koristi kao druga i kasnija linija terapije u liječenju bolesti refraktorne na steroide, kao i drugih lijekova koji djeluju na molekule u aktivacijskom putu B limfocita (poglavlje 1.2.2.4.).

Nedavna studija opisala je kako bolesnici s dugotrajnim kroničnim GvHD-om pokazuju trend veće incidencije alo- i autoprotutijela u plazmi, ali pojava nije povezana s aktivnošću niti s težinom bolesti te nije sigurno jesu li ta protutijela patogene prirode ili su posljedica poremećene homeostaze B stanica[41]. Ta patološka slika poremećene homeostaze B stanične linije praćene proizvodnjom autoprotutijela tipična je za autoimunosne bolesti, a također je sukladna nekim kliničkim manifestacijama kroničnog GVHD sličnim autoimunosnim bolestima.

1.2.2.2. Epidemiologija, rizični čimbenici i prevencija

Zabilježena incidencija kroničnog GvHD-a kreće se od 30-70%[42,43], ovisno o većem broju čimbenika. Veća incidencija bolesti veže se uz HLA nepodudarnost presatka, kao i uz stariju dob primatelja i/ili darivatelja presatka. Poznato je i da se kronični GvHD češće razvije u muških primatelja sa ženskim darivateljima, pogotovo višerotkinjama. Također, kronični GvHD češće se javlja nakon presadbe perifernih matičnih krvotvornih stanica nego matičnih stanica iz koštane srži ili pupkovine. Pod rizične čimbenike za razvoj kroničnog GvHD-a ubrajaju se i AB0 inkompatibilnost krvnih grupa, kao i CMV seropozitivnost darivatelja. Dodatni rizik za razvoj kroničnog GvHD-a predstavlja pojava akutnog oblika te primjena DLI nakon presadbe[44].

Primjenom profilakse u obliku različitih kombinacija imunosupresiva (ciklosporin+metotreksat, ciklosporin+mofetil-mikofenolat, prednizon+takrolimus) pokušava se smanjiti pojavnost kroničnog GvHD-a. Kronični GvHD pokušava se spriječiti i profilaksom u obliku deplecije pojedinih staničnih populacija. Deplecijom se iz presatka specifičnim protutijelima uklanjaju T limfociti/B limfociti/NK stanice, a mogu se i pozitivno selektirati stanične populacije od interesa. Relativno veći uspjeh ove metode u prevenciji i akutnog i kroničnog oblika GvHD-a nosi svoju cijenu u obliku odgođenog primanja presatka, većoj opasnosti od infekcija zbog sporijeg oporavka pojedinih staničnih populacija te posebno u učestalijem relapsu primarne bolesti[45] te stoga zahtjeva daljnje istraživanje.

1.2.2.3. Dijagnostika, kliničke manifestacije, stupnjevanje i klasifikacije

Sastankom radne skupine na NIH-u 2005. godine prvi put su se standardizirali kriteriji za dijagnozu i stupnjevanje kroničnog GvHD-a[18]. Prema tom NIH konsenzus sastanku, za dijagnozu kroničnog GvHD-a potreban je ili barem jedan klinički dijagnostički znak ili barem jedna distinktivna manifestacija bolesti potvrđena biopsijom ili drugim odgovarajućim testom u istom ili drugom zahvaćenom organu.

Dijagnostički znakovi i simptomi kroničnog GvHD-a su one manifestacije bolesti koje nedvojbeno potvrđuju dijagnozu bez potrebe daljnjeg testiranja ili potvrde bolesti u drugim organima. Distinktivni znakovi i simptomi kroničnog GvHD-a su one manifestacije bolesti koje se obično ne nalaze u akutnom GvHD-u no same nisu dovoljne da se nedvojbeno postavi dijagnoza kroničnog GvHD-a bez daljnjeg testiranja navedenog ili drugog zahvaćenog organa. Postoje i druge manifestacije bolesti (eng. *other features*) koje su rijetke, kontroverzne ili nespecifične i nedovoljne za dijagnozu kroničnog GvHD-a (ali koje mu se mogu pripisati ako su prisutni i dijagnostički znakovi bolesti), te znakovi i simptomi koji se mogu naći i u akutnom i u kroničnom GvHD-u (eng. *common signs and symptoms*). Pregled dijagnostičkih i distinktivnih manifestacija dan je u Tablici 1. Mora se izvan svake sumnje isključiti mogućnost druge kliničke dijagnoze koja potencijalno objašnjava znakove i simptome nalik kroničnom GvHD-u.

Kronični GvHD može zahvatiti sljedeće organe: kožu, usta, oči, jetru, zglobove/fascije, pluća, gastrointestinalni te u žena genitalni sustav (prema NIH konsenzusu iz 2005. godine). Simptomi često nalikuju autoimunosnim bolestima poput Sjögrenovog sindroma, sistemskog erimatoznog lupusa, imune trombocitopenije, miozitisa i drugih. Može biti zahvaćen jedan ili više organskih sustava. Određivanje stupnja bolesti zahtjeva interdisciplinaran pristup i pažljivu procjenu stanja i funkcionalnosti svakog od sedam (muškarci), odnosno osam (žene) potencijalno zahvaćenih organskih sustava. Pomoć pri ocjenjivanju težine (stupnja) i aktivnosti bolesti pružaju ranije spomenute standardizirane NIH smjernice. Ukupna ocjena bolesti rezultat je sumiranog opažanja broja zahvaćenih organskih sustava i kliničke procjene njihovog funkcionalnog oštećenja. Način ocjenjivanja detaljno je opisan u poglavlju 4.4.

Tablica 1. Pregled dijagnostičkih i distinktivnih znakova i simptoma kroničnog GvHD-a prema NIH klasifikaciji (2005.)[18].

Organski sustav	Dijagnostički znakovi i simptomi	Distinktivni znakovi i simptomi
Koža	Poikiloderma Promjene nalik lichen-planusu Sklerotične promjene Promjene nalik morphei Promjene nalik lichen sclerosusu	Depigmentacija
Usta	Lichenoidne promjene Hiperkeratotički plakovi Restrikcija otvaranja usta zbog skleroze	Kserostomija Mukokele Atrofija sluznice Pseudomembrane Ulkusi
Oči	-	Novonastale suhe, šljunkovite ili bolne oči Keratokonjunktivitis sicca Cikatricijalni konjuktivitis Konfluirajuća područja točkaste keratopatije
Jetra	-	-
Zglobovi i fascije	Fasciitis Ukočenost i kontrakture zglobova zbog skleroze	Miozitis ili Polimiozitis
Pluća	Bronchiolitis obliterans (potvrđen biopsijom pluća)	Bronchiolitis obliterans (dijagnosticiran radiološkim metodama i funkcionalnim testovima pluća)
Gastrointestinalni sustav	Strikture ili stenoze gornje ili srednje trećine jednjaka Opne u jednjaku	-
Urogenitalni sustav (žene)	Vaginalni ožiljci ili stenoze Promjene nalik lichen-planusu	Erozije Fisure Ulkusi

Kronični GvHD uključuje dvije podskupine bolesti: (1) klasični oblik (bez simptoma ili znakova akutnog GvHD-a) i (2) preklapajući oblik (eng. *overlap*) koji se istovremeno manifestira simptomima i/ili znakovima i akutnog i kroničnog GvHD-a. Bolest također možemo klasificirati i kao (1) *de novo* (bez prijašnje pojave akutnog GvHD-a), (2) „mirujući“ (eng. *quiescent*; uz period mirovanja bolesti nakon simptoma akutnog

GvHD-a) i (3) progresivan kronični GvHD (nastavlja se neposredno nakon akutnog oblika).

Na novom konsenzus NIH sastanku za kronični GvHD (2014. godine, konsenzus publikacije objavljene 2015. godine) nadopunjene su NIH preporuke iz 2005. godine. Između ostaloga, prvi puta je uključena procjena muškog genitalnog sustava[24]. Tijekom izrade ove disertacije korištene su NIH smjernice iz 2005. godine.

1.2.2.4. Liječenje

Liječenje kroničnog GvHD-a zahtjeva multidisciplinarni pristup pacijentu i zajedničku brigu i nadzor većeg broja specijalista. Blaži oblici kroničnog GvHD-a često se kontroliraju uz pomoć lokalne terapije, poput topikalne terapije za kožu. U pacijenata s umjerenim i teškim kroničnim GvHD obično se preporuča sistemska imunosupresivna terapija. Prvu liniju sistemske terapije čine kortikosteroidi, često u kombinaciji s kalcineurin inhibitorima.

Terapija kortikosteroidima često je dugotrajna i nosi moguće posljedice poput zakašnjele rekonstitucije imunološkog sustava čime se pacijenti izlažu povećanom riziku od infekcija i drugih komplikacija, uz brojne druge nuspojave kortikosteroidne terapije (dijabetes, osteoporoza, miopatija, hipertenzija, pretilost itd.). Zbog toga je jako bitno obratiti pažnju na preventivnu i suportivnu terapiju ovih pacijenata. Nužan je dugotrajan nadzor nad simptomima bolesti, nuspojavama liječenja, ali i redoviti nadzor primarne i potencijalnih sekundarnih malignosti.

Tek nedavno je po prvi put u povijesti registriran lijek za liječenje kroničnog GVHD-a. Naime, američka Agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA) registrirala je lijek za drugu liniju liječenja kroničnog GvHD-a - ibrutinib. To je velika novost u liječenju kroničnog GVHD-a jer je poznato da su steroidi neuspješni u do čak 50% slučajeva (uz značajnu toksičnost)[46]. Lista potencijalnih lijekova za kronični GVHD je duga te je za očekivati u dogledno vrijeme registraciju i drugih lijekova za liječenje kroničnog GvHD-a[47].

1.2.2.5. Potencijalni biomarkeri

Dijagnoza kroničnog GvHD-a temelji se na kliničkoj procjeni dijagnostičkih i distinktivnih znakova i simptoma u osoba nakon aloPKMS, te po potrebi histološkoj potvrdi uzorka zahvaćenog tkiva i odgovarajućeg testa (spirometrija, laboratorijske i radiološke pretrage). Uzevši u obzir kondicioniranje sa svojim toksičnim nuspojavama, imunosupresiju i suportivnu terapiju nakon aloPKMS, kliničaru je izazovno dijagnosticirati i procijeniti aktivnost i težinu kroničnog GvHD-a. Iako mu pritom mogu pomoći laboratorijski markeri upale koji se povezuju s aktivnom bolesti, poput snižene koncentracije albumina, povišenog CRP-a i povišenog broja trombocita, oni nisu specifični za potvrdu dijagnoze[48].

Stoga su nužno potrebni pouzdani, osjetljivi, specifični i, po mogućnosti, lako dostupni biomarkeri. Biomarkerima se nazivaju karakteristike koje se mogu objektivno mjeriti i ocjenjivati kao indikatori normalnog biološkog ili patološkog procesa. Dobar biomarker koristi se za jednu ili više sljedećih svrha: predviđa rizik od razvoja bolesti i/ili potvrđuje dijagnozu, odražava trenutnu aktivnost bolesti, opisuje promjene u skladu s kliničkim opažanjima i/ili predviđa kliničke promjene prije nego one nastupe te kliničaru pruža informaciju o riziku razvoja težih komplikacija, ishodu bolesti i odgovoru na terapiju[21].

Lista potencijalnih biomarkera za kronični GvHD uključuje i sljedeće: BAFF, sCD13, elafin, IL-2Rα, MIG (CXCL9) i anti-dsDNA[49]. Unatoč većem broju kandidata koji uključuju različite stanične linije, genske polimorfizme i veći broj citokina i kemokina, do danas nijedan nije validiran i uvršten u kliničku upotrebu[26].

Nadu u pronalazak biomarkera za kronični GvHD svakako pruža tehnološki napredak i nedavni eksplozivni razvoj tzv. *–omics* tehnologija poput genomike, proteomike i glikomike. One omogućuju analizu velikog broja uzoraka i podataka te istovremenu usporedbu velikog seta molekula s brzim i cjenovno dostupnim postupkom.

1.3. Glikozilacija

Glikozilacija je proces kojim se uz pomoć enzima na proteine, lipide ili druge organske spojeve kovalentno vežu lanci šećera (glikani). Glikozilacija predstavlja

jednu od najčešćih i najvarijabilnijih poslije-translacijskih modifikacija proteina. Ona nije rezultat postojanja izravne upute u DNA prema kojem bi se glikani jednako sintetizirali u cijelom organizmu, nego je rezultat određene količine šećernih prekursora, količine proteina transportera, glikozil-transferaza i glikozidaza, te međusobne kompeticije enzima koji direktno sudjeluju u sintezi glikana.

Glikani su nelinearni, razgranati oligosaharidi, iznimno kompleksne strukture. Zbog njihove molekularne složenosti, nepostojanja genetskog predloška te analitičkih izazova, istraživanje glikana (glikomika) u prošlosti je zanemarivano te danas zaostaje za drugim znanostima poput genomike ili proteomike. Istraživanja pokazuju da je sastav glikana ovisan i o genetskim i okolišnim čimbenicima[50] te da je glikozilacija strogo reguliran proces u kojem vezanje pojedinih molekula šećera nosi veliku biokemijsku vrijednost[51,52]. Osam uobičajenih monosaharida (glukoza – Glc; manoza – Man; fukoza – F; galaktoza – Gal; sijalinska kiselina (N-acetilneuraminska kiselina) – S; N-acetilglukozamin – GlcNAc; N-acetilgalaktozamin – GalNAc; ksiloza – Xyl) slažu brojne razne kombinacije oligosaharida u eukariotskim stanicama koji variraju u tipu, broju, redoslijedu i prostornom odnosu jednostavnijih građevnih jedinica. Broj mogućih varijacija dodatno raste budući da su hidroksilne grupe različitih monosaharida podložne fosforilaciji, sulfaciji, metilaciji, acetilaciji ili acilaciji masnih kiselina. Glikani su produkt iznimno kompleksnih metaboličkih putova koji uključuju nekoliko stotina glikozidaza, glikoziltransferaza, transportnih proteina, transkripcijskih faktora i drugih molekula.

Glikoproteini su glikokonjugati u kojima se glikan kovalentno veže na proteinsku osnovicu, obično N- ili O-glikozidnom vezom. Glikani vezani N-glikozidnom vezom na atom dušika u asparaginskom ostatku u slijedu aminokiselina Asn-X-Ser/Thr polipeptidnog lanca nazivaju se N-glikani. Izostanak N-glikozilacije u embriološkom razvoju je letalan[53], dok je preko 30 do danas prepoznatih teških, onesposobljavajućih bolesti posljedica mutacija koje ometaju pravilnu glikozilaciju i time remete funkciju gotovo svih organskih sustava[54]. Ovaj podatak ne iznenađuje ako uzmemo u obzir da su glikani integralni dio gotovo svih membranskih i izlučenih proteina u organizmu[55] te značajno utječu na njihovu konformaciju, a time i na njihovu biološku funkciju u organizmu. Bitno je naglasiti da glikani igraju važnu ulogu

i u imunosnom sustavu, pogotovo kad je riječ o prepoznavanju „svojeg“ od „stranog“[53].

1.3.1. N-glikozilacija proteina

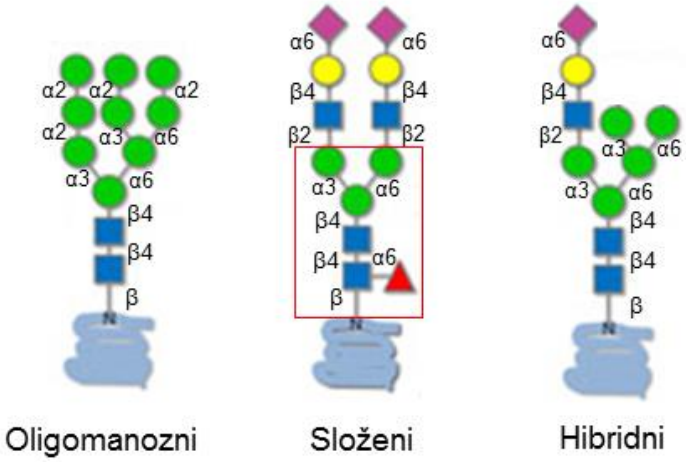
Svi N-glikani imaju jednaku jezgru strukture koja se sastoji od tri Man i dva GlcNAc-a sljedeće strukture: Manα1–6(Manα1–3)Manβ1–4GlcNAcβ1–4GlcNAcβ1-Asn. Ovisno o vrsti šećera vezanih na jezgru i njihovu načinu grananja, N-vezani glikani se dijele na tri vrste (Slika 3.):

(1) Oligomanozni – na jezgru glikana su vezane samo Man

(2) Složeni – na jezgru glikana su vezane „antene“ (pr. imunoglobulin G)

(3) Hibridni – kombinacija prethodna dva tipa.

Smatra se da vrsta N-glikana ovisi o njegovoj pristupačnosti enzimima. Ako je glikan vezan na protein manje dostupan djelovanju enzima, veća je vjerojatnost da će ostati u visoko-manoznom obliku. Pristupačnije glikanske strukture su izloženije enzimima te je veća vjerojatno da će se u njihovoj strukturi pronaći dodatni šećeri.



Slika 3. Tri osnovna tipa N-vezanih glikana. Crvenim pravokutnikom označena je jezgra glikanske strukture. Zeleni krug – Man, plavi kvadrat – GlcNAc, ljubičasti romb – S, žuti krug – Gal, crveni trokut – F (prema Varki, 2009.[56]).

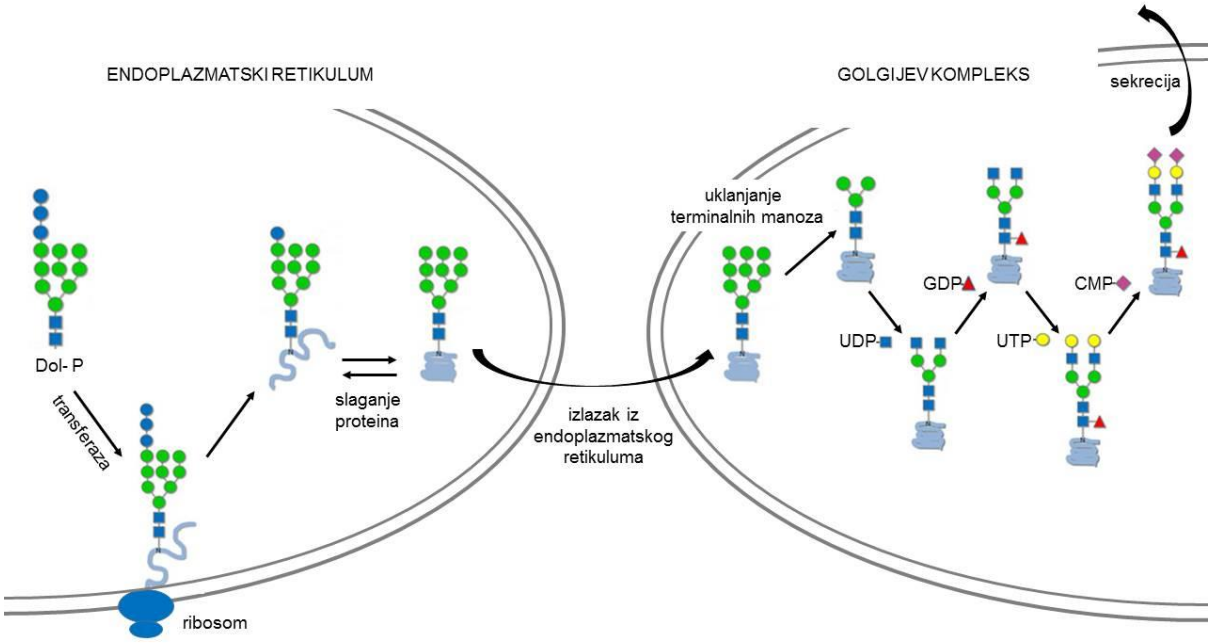
Iako je ranije navedeni slijed aminokiselina Asn-X-Ser/Thr u proteinu nužan za vezanje N-glikana, sama prisutnost tog slijeda ne znači da će se na asparagin zaista

i vezati glikan. Vezanje N-glikana prvenstveno ovisi o konformaciji proteina i pristupačnosti asparagina, ali i o okolnim aminokiselinama.

Različite molekule glikoproteina mogu na istom aminokiselinskom slijedu imati vezane različite N-glikane. Glikoprotein s više od jednog prikladnog aminokiselinskog slijeda može imati različite N-glikane na različitim potencijalnim veznim mjestima. Ovu pojavu nazivamo mikroheterogenost ili heterogenost glikana. Glikoforma je, prema tome, specifični oblik glikoproteina s obzirom na vezane šećere[53].

1.3.2. Sinteza N-vezanih glikana

Biosinteza N-vezanih glikana započinje na citoplazmatskoj strani membrane endoplazmatskog retikuluma (ER). N-acetilglukozamin fosfat (GlcNAc-P) se prenosi na prekursor dolikol fosfat (Dol-P) pomoću uridin-5'-difosfat-N-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc). Na isti način se na Dol-P veže četrnaest šećera, nakon čega se cijeli glikan prenosi na slijed aminokiselina Asn-X-Ser/Thr u proteinu sintetiziranom na ribosomu. Nastali kompleks N-vezanog glikana s proteinom se dodatno modificira u ER-u i Golgijevom kompleksu djelovanjem glikozidaza i glikozil-transferaza. Uklanjaju se terminalne manoze, dolazi do vezanja šećera (fukoze) na jezgru glikana, na terminalne GlcNAc-e (produženje antena, npr. vezanje galaktoze) i/ili do završnog vezanja šećera na produžene antene (sijalinske kiseline, fukoze, galaktoze, N-acetilgalaktozamina i sulfata) čime nastaju složeni N-glikani (Slika 4.).



Slika 4. Pojednostavljeni prikaz sinteze složenih N-glikana. Zeleni krug – Man, plavi kvadrat – GlcNAc, ljubičasti romb – S, žuti krug – Gal, crveni trokut - F. Nosači: UDP – uridin difosfat, GDP – gvanozin difosfat, CMP – citidin monofosfat (prema Varki, 2009.[56]).

1.3.3. Glikani kao biomarkeri

Glikozilacija je specifična za pojedini protein, tip i stupanj razvoja stanice, te u krajnjoj liniji za pojedini organizam. Promijenjena glikozilacija ne samo da može biti uzrok narušavanja ravnoteže u organizmu i nastanka bolesti, nego i sama bolest može uzrokovati promjene u glikozilaciji pojedinih proteina. Većina enzima odgovornih za izgradnju glikana osjetljiva je na biokemijsko i fiziološko stanje stanice u kojoj se glikoprotein eksprimira, stoga će sastav šećera u glikanu zrelog glikoproteina ovisiti o tipu i fiziološkom stanju stanice u kojoj je taj glikoprotein eksprimiran. Upravo zbog toga je tijekom razvoja i diferencijacije te u bolesti sastav glikana podložan promjenama[53]. Budući da je riječ o dinamičnom procesu koji je rezultat trenutne situacije u stanici, glikani predstavljaju veliki potencijal za biomarkere različitih bolesti. Sve veći broj istraživanja okreće se upravo glikanima i povezuje promjene u glikozilaciji s autoimunosnim bolestima, infektivnim bolestima te različitim oblicima raka[56,57].

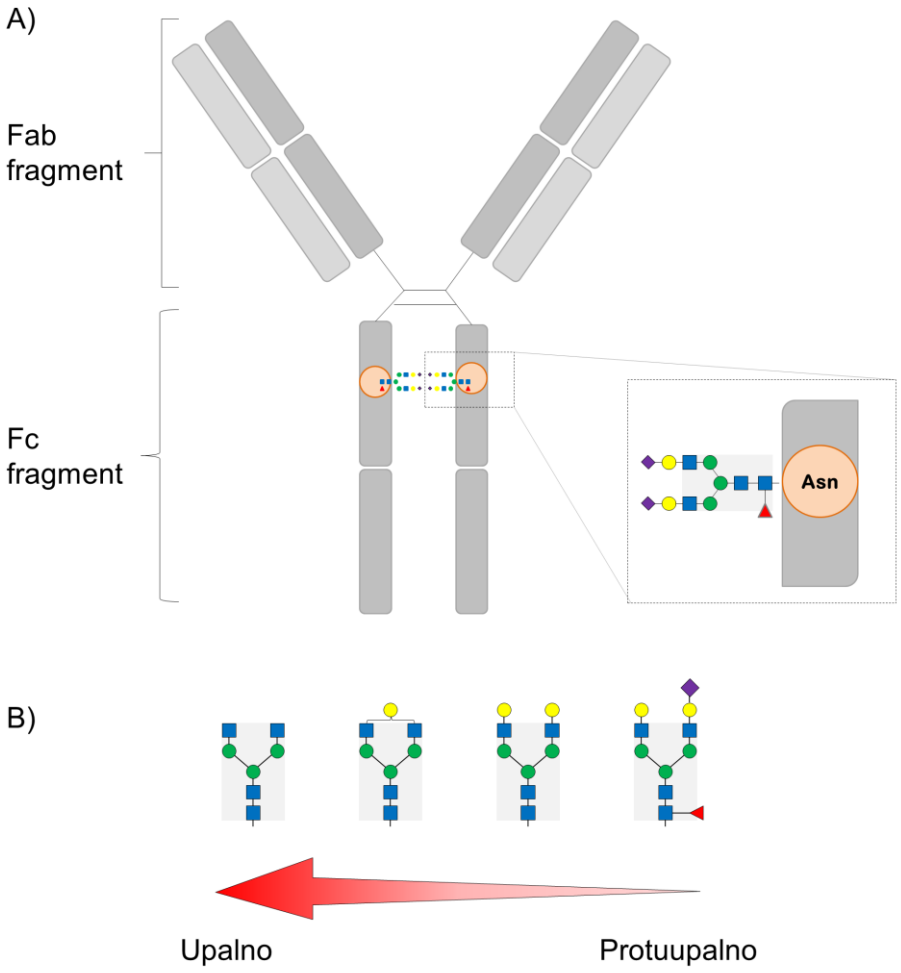
1.3.4. Glikani imunoglobulina G

Glikoprotein imunoglobulin G (IgG) najzastupljenija je klasa protutijela u ljudskoj plazmi te glavna efektorska molekula humoralnog imunosnog sustava. Uloga protutijela je obrana organizma prepoznavanjem stranih antigena. Nakon prepoznavanja promoviraju opsonizaciju antigena (označavanje patogena za unos i eliminaciju fagocitima), inicijaciju fagocitoze te vežu i neutraliziraju antigene aktivirajući staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelima (eng. *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC).

IgG protutijelo sastoji se od dva teška i dva laka polipeptidna lanca međusobno povezana disulfidnim vezama u obliku slova Y. IgG ima dvije domene međusobno odvojene fleksibilnom regijom: fragment koji veže antigen, Fab (eng. *Fragment antigen binding*) te fragment koji kristalizira, Fc (eng. *Fragment, crystallizable*) preko kojeg se IgG veže za proteine komplementa ili Fc receptore (FcR). Oblik Fc regije određuje mogućnost protutijela da se veže za određeni FcR. Postoje klasični Fc receptori (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa i FcγRIIIb) kao i neklasični (poput DC-SIGN), aktivirajući i inhibirajući, koje pronalazimo u različitim kombinacijama na stanicama imunosnog sustava. Ljudski IgG dijeli se na četiri podklase – IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4. Kombiniranjem podklasa IgG-a i glikana na Fc fragmentu postiže se veliki broj funkcionalnih odgovora imunosnog sustava[58].

Svaki teški lanac u Fc regiji nosi biantenarni N-glikan kompleksnog tipa kovalentno vezan na asparagin 297 (Asn297) u visoko konzerviranom mjestu CH2 domene protutijela. Većina IgG N-glikana je vezana na teške lance Fc regije, međutim oko 20% poliklonalnih IgG molekula u ljudskom organizmu sadrži N-glikane i unutar Fab regija[59]. Jezgru N-glikana Fc fragmenta protutijela čini heptasaharid (tri Man i četiri GlcNAc) kojeg nadopunjuju različiti, uglavnom terminalno smješteni šećeri poput N-acetilglukozamina, fukoze, galaktoze i sijalinske kiseline (Slika 5A.). Dodatak šećera na glikansku jezgru rezultira brojnim glikoformama iste molekule. Identificirano je preko 30 različitih varijacija sastava glikana za svaku od četiri podklase IgG-a[60]. Sastav IgG glikana prilično je stabilan u zdravih pojedinaca, ali i jako heterogen unutar populacije[61]. Tim razlikama među pojedincima doprinose brojni genetski, epigenetski i okolišni čimbenici[62] poput fizioloških parametara (dob, spol, trudnoća)[63] i patoloških stanja.

Unatoč velikom značaju nasljedne kontrole stabilnosti glikana[64], njegov sastav može se rapidno promijeniti u odgovoru na upalno stanje u organizmu[65]. Promjena kompozicije IgG N-glikana utječe na konformaciju proteina, a time i na odgovor komponenti imunosnog sustava poput aktivacije komplementa[66]. Već manje promjene vode do promjene afiniteta prema pojedinim Fc receptorima. Nedostatak fukoze vezane na jezgru IgG N-glikana povećava afinitet prema receptoru FcγRIIIa na limfocitima pospješujući ADCC[67]. Dodatkom terminalne sijalinske kiseline pokreće se protuupalna kaskada zahvaljujući povećanom afinitetu prema alternativnoj klasi receptora, DC-SIGN receptoru dendritičkih stanica[68]. Učinak promjene sastava IgG glikana u modulaciji imunološkog odgovora shematski je prikazan slikom 5B.



Slika 5. A) Pojednostavljeni prikaz glikoproteina imunoglobulina G i glikana na Fc fragmentu; B) Pojednostavljeni prikaz modulacije upalnog odgovora promjenom sastava IgG glikana[69]. Zeleni krug – Man, plavi kvadrat – GlcNAc, ljubičasti romb – S, žuti krug – Gal, crveni trokut – F[69,70].

Značajne razlike u sastavu IgG glikoma zabilježene su u pacijenata s različitim autoimunosnim bolestima poput upalne bolesti crijeva, sistemskog eritemskog lupusa ili Sjögrenovog sindroma, čime ih se izdvaja kao potencijalno vrijedan biomarker imunosnog poremećaja u tim bolestima[71–73]. Potencijal glikozilacije i analize glikana kao dijagnostičkog alata u području aloPKMS i kroničnog GvHD-a nedavno je analiziran i prikazan u preglednom radu[69], pri čemu je posebna pažnja dana istraživanjima glikana u autoimunosnim poremećajima s kliničkom slikom nalik kroničnom GvHD-u. Budući da je kronični GvHD multisistemski poremećaj karakteriziran deregulacijom imunosnog odgovora te ima dijagnostičke znakove i simptome nalik raznim autoimunosnim bolestima i imunosnim poremećajima, analiza glikozilacije IgG protutijela mogla bi imati značajne implikacije za razumijevanje biologije bolesti te bi potencijalno mogla postati nužno potreban biomarker kroničnog GVHD-a.

2. Hipoteza

Hipoteza ovog rada je da će N-glikozilacija imunoglobulina G iz plazme bolesnika s kroničnim GvHD-om biti povezana s kliničkim manifestacijama kroničnog GvHD-a što će doprinijeti razumijevanju biologije te bolesti i dovesti do razvoja potencijalnog dijagnostičkog ili prognostičkog biomarkera kroničnog GvHD-a.

3. Ciljevi i svrha ispitivanja

Cilj ovog istraživanja je analizirati N-glikozilaciju IgG-a u bolesnika s kroničnim GvHD-om nakon aloPKMS i u osoba koje nakon aloPKMS nisu razvile kronični GvHD, te ispitati povezanost N-glikozilacije IgG-a s manifestacijama kroničnog GvHD-a.

Specifični ciljevi ovog rada su sljedeći:

1. Utvrditi povezanost N-glikozilacije IgG-a s aktivnošću i težinom kroničnog GvHD-a te zahvaćenim organskim sustavima.
2. Utvrditi povezanost N-glikozilacije IgG-a s demografskim karakteristikama i klasičnim kliničkim manifestacijama bolesnika s kroničnim GvHD-om.
3. Utvrditi povezanost N-glikozilacije IgG-a s laboratorijskim markerima upale u bolesnika s kroničnim GvHD-om.
4. Utvrditi potencijal N-glikozilacije IgG-a kao prognostičkog i dijagnostičkog biomarkera bolesti.

Dijagnoza i stupnjevanje kroničnog GvHD-a gotovo isključivo ovise o prepoznavanju kliničkih dijagnostičkih znakova i simptoma bolesti, dok biologija i prognoza kroničnog GVHD ostaje nedovoljno istražena. Svrha ovog istraživanja je unaprjeđenje razumijevanja ove bolesti što bi moglo dovesti do razvoja potrebnog dijagnostičkog ili prognostičkog biomarkera kroničnog GvHD-a.

4. Ispitanici i metode istraživanja

4.1. Američki ispitanici: National Institutes of Health

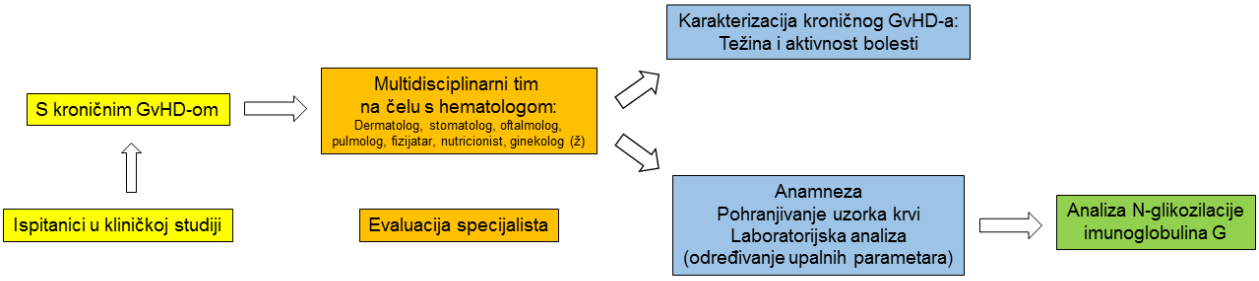
Uzorci krvne plazme 262 bolesnika s dijagnosticiranim kroničnim GVHD-om nakon aloPKMS sakupljeni su od 2004. do 2014. godine u sklopu kliničke presječne (eng. *cross-sectional*) studije „Natural History Study of Clinical and Biological Factors Determining Outcomes in Chronic Graft-Versus-Host Disease“ (04-C-0281, clinicaltrials.gov identifier: NCT00331968) koju vodi prof. dr. Steven Živko Pavletić iz Centra za istraživanje raka u Bethesdi, SAD (eng. *Center for Cancer Research, National Cancer Institute (NCI), National Institutes of Health* (NIH)). Dodatnih 10 uzoraka krvne plazme osoba bez cGvHD-a nakon aloPKMS prikupljeni su kao kontrole u navedenoj američkoj kliničkoj presječnoj studiji. Svaki ispitanik potpisao je informirani pristanak odobren od strane nadležnog Etičkog povjerenstva prije ulaska u studiju.

Prema protokolu studije, uključeni ispitanici bili su između 1-75 godina starosti i sudjelovali su u četverodnevnoj multidisciplinarnoj evaluaciji kroničnog GvHD-a.

Uključni i isključni kriteriji za ispitanike su detaljno opisani u poglavlju 4.3.

Nakon uključenja ispitanika u studiju, prikupljena je detaljna anamneza koja je uključila demografske podatke (spol, dob), prije- i poslije-transplantacijski tijek bolesti (osnovna bolest, status bolesti kod transplantacije i kod evaluacije, kondicioniranje, rane komplikacije, eventualni prethodni akutni GvHD, infekcije), informacije o darivatelju i presatku (po mogućnosti spol i dob, HLA podudarnost darivatelja, izvor matičnih stanica, DLI) te podatke o kroničnom GvHD-u (nastup bolesti, klasifikacija, simptomi, dotadašnja i aktualna terapija).

Nakon uzimanja anamneze i fizikalnog pregleda učinjen je niz specijalističkih pregleda hematologa, dermatologa, oftalmologa, stomatologa, ginekologa (za žene), fizijatra, nutricionista (a u slučaju potrebe i drugih specijalista), s ekstenzivnom laboratorijskom obradom koja je uključivala određivanje laboratorijskih markera upale (opisano u poglavlju 4.5.1.).



Slika 6. Hodogram protokola za američke ispitanike.

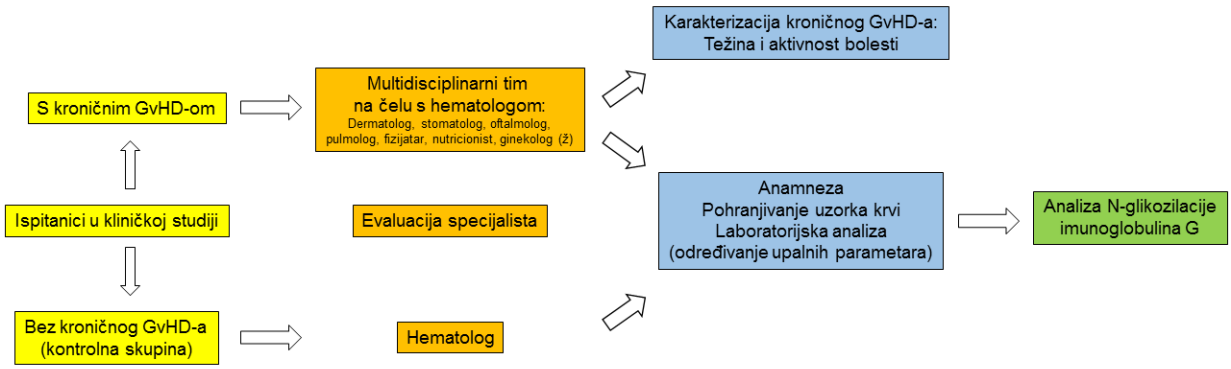
U sklopu navedenog protokola ispitaniku su izvađene i pohranjene dvije epruvete (3 mL) krvi u istraživačke svrhe. Alikvotirani krioprezervirani uzorci heparinizirane krvne plazme (100 µl po ispitaniku) poslani su u tvrtku Genos d.o.o. (Zagreb, Hrvatska) gdje je niže opisanim biokemijskim metodama visoke razlučivosti provedena analiza N-glikana imunoglobulina G (poglavlje 4.5.3.). Hodogram protokola za američke ispitanike prikazan je na Slici 6.

4.2. Hrvatski ispitanici: Klinički bolnički centar Zagreb

Uzorci krvne plazme hrvatskih ispitanika sakupljani su od 2013. do 2016. godine u sklopu protokola za kronični GvHD uz potporu međunarodnog UKF (eng. *Unity through Knowledge Fund*) projekta Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod nazivom “Clinical and biological factors determining severity and activity of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation”. Cilj projekta bio je formiranje multidisciplinarnog tima s fokusom na istraživanje kroničnog GvHD-a, kao i translacija metoda po uzoru na kliničku studiju koja se provodi na američkom NIH-u.

Svaki ispitanik je potpisao odgovarajući informirani pristanak za sudjelovanje u studiji (odobren od strane nadležnog Etičkog povjerenstva KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu). Nakon toga uzeta je detaljna anamneza i prikupljeni su opsežni klinički i laboratorijski podaci po uzoru na američku NIH kohortu.

Ispitanike s kroničnim GvHD-om pregledao je multidisciplinarni tim KBC Zagreb različitih specijalnosti predvođenih hematologom. Ulaskom u studiju svakom ispitaniku izvađena su 3 ml krvi u epruvete s etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA). Ukupno je izdvojeno i prikupljeno 60 uzorka krvne plazme: 30 uzoraka bolesnika s dijagnosticiranim kroničnim GvHD-om i 30 uzoraka osoba bez kroničnog GvHD-a nakon aloPKMS. Potonji predstavljaju kontrolnu skupinu ispitanika koji su s bolesnicima usklađeni po dobi i spolu. Uključni i isključni kriteriji za ispitanike su detaljno opisani u poglavlju 4.3. Hodogram protokola za hrvatske ispitanike prikazan je na Slici 7.



Slika 7. Hodogram protokola za hrvatske ispitanike.

4.3. Uključni i isključni kriteriji

Dijagnoza kroničnog GvHD-a američkih i hrvatskih bolesnika postavljala se na temelju etablirane NIH klasifikacije za kronični GvHD (opisano u poglavlju 1.2.2.3. i poglavlju 4.4.).

Iz studije su isključeni ispitanici za koje je detaljnom anamnezom utvrđeno da su unutar 3 mjeseca prije uključenja u studiju i vađenja krvi za istraživanje primili intravenske imunoglobuline (IVIg). IVIg je proizvod od ljudske plazme i sastoji se od pročišćenih imunoglobulina više tisuća zdravih darivatelja. Poluživot infundiranog IVIg-a je od 5 do 50 dana (najčešće 21-40 dana), ovisno o bolesti pojedinca i količini i učestalosti primjene[74]. Kako bi se izbjegla mogućnost da primjena infundiranog egzogenog IVIg-a modificira učinak analize glikana IgG-a koji se ovdje istražuje, u

završnu analizu su uključeni samo oni ispitanici koji nisu prethodno primali IVIg u navedenom razdoblju, i čija je analiza glikana IgG-a prošla kontrolu kvalitete uzorka (opisano u poglavlju 4.5.3.2.).

4.4. Definiranje težine (stupnja) i aktivnosti kroničnog GvHD-a

Težina (stupanj) i aktivnost kroničnog GvHD-a za američke i hrvatske bolesnike definiran je prema kriterijima opisan u poglavljima 4.4.1. i 4.4.2., u skladu sa NIH smjernicama objavljenim 2005. godine[18].

4.4.1. Težina (stupanj) kroničnog GvHD-a

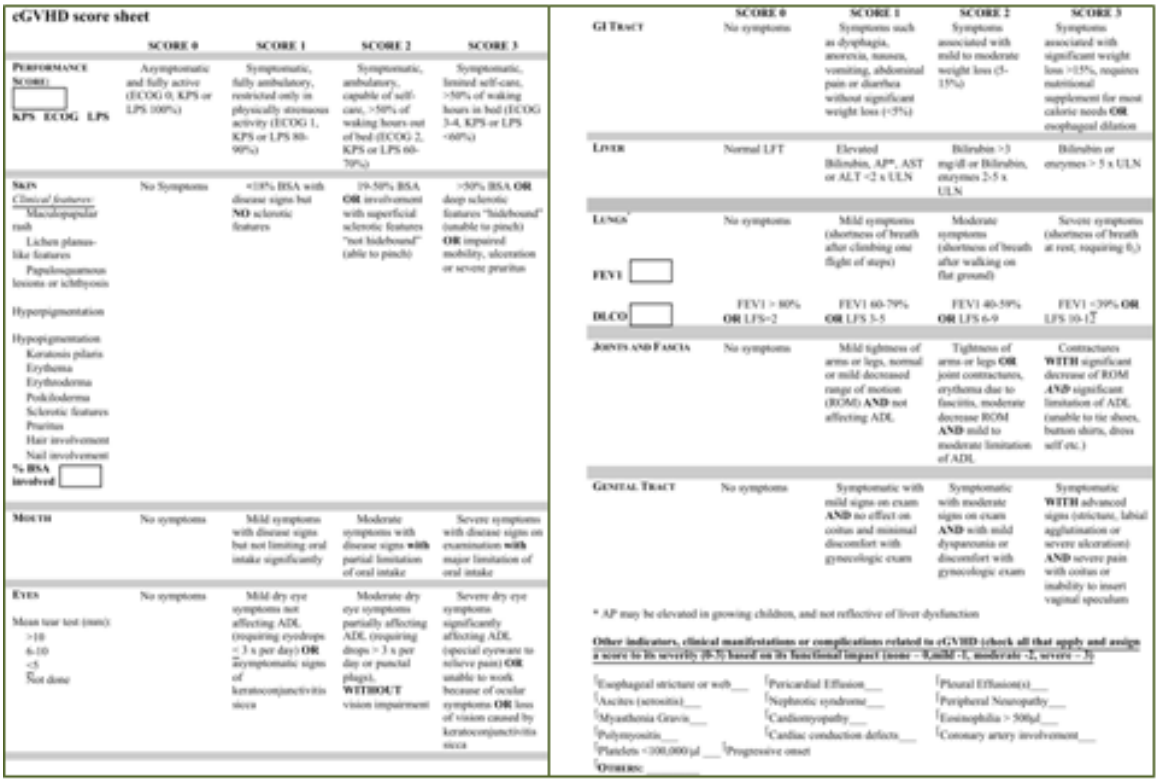
Težina (stupanj) bolesti definirana je sljedećim pojmovima:

a) Ukupna NIH ocjena (eng. *global NIH score*)

Ukupnu ocjenu bolesti, koja može biti blaga (ocjena 1), umjerena (2) ili teška (3), definira broj zahvaćenih organa, kao i stupanj njihovog funkcionalnog oštećenja. Svaki organ ocjenjuje se skalom od 0-3 gdje nula znači da organ nije zahvaćen (nema znakova kroničnog GvHD-a), a tri označava teško oštećenje i poremećenu funkciju organa.

Blagi kronični GvHD definiran je zahvaćenošću jednog ili dva organa s maksimalnom ocjenom 1. Umjereni kronični GvHD podrazumijeva zahvaćenost barem jednog organa s ocjenom 2, ili tri ili više zahvaćenih organa s ocjenom 1. Ocjena 3 bilo kojeg organskog sustava definira se kao težak oblik kroničnog GvHD-a. Iznimka u ovom sustavu ocjenjivanja su pluća čija ocjena 1 definira ukupnu ocjenu bolesti kao umjerenu, a ocjena 2 kao tešku.

Organski sustavi koji se ocjenjuju uključuju kožu, oči, usta, probavni sustav, jetru, pluća i zglobove/fascije. Urogenitalni sustav ocjenjivan je samo u ženskih bolesnica sukladno NIH konsenzusu iz 2005. godine. Formular za ocjenjivanje težine bolesti prikazan je na Slici 8.



eGVHD score sheet

	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3
PERFORMANCE SCORE: KPS ECOG LPS	Asymptomatic and fully active (ECOG 0, KPS or LPS 100%)	Symptomatic, fully ambulatory, restricted only in physically strenuous activity (ECOG 1, KPS or LPS 80-90%)	Symptomatic, ambulatory, capable of self-care, >50% of waking hours out of bed (ECOG 2, KPS or LPS 60-70%)	Symptomatic, limited self-care, >50% of waking hours in bed (ECOG 3-4, KPS or LPS <60%)
SKIN Clinical features: Maculopapular rash; Lichen planus-like features; Papulosquamous lesions or ichthyosis; Hyperpigmentation; Hypopigmentation; Keratosis pilaris; Erythema; Erythroderma; Poikiloderma; Sclerotic features; Pruritus; Hair involvement; Nail involvement; % BSA involved	No Symptoms	<18% BSA with disease signs but NO sclerotic features	19-50% BSA OR involvement with superficial sclerotic features "bidebound" (able to pinch)	>50% BSA OR deep sclerotic features "bidebound" (unable to pinch) OR impaired mobility, ulceration or severe pruritus
MOUTH	No symptoms	Mild symptoms with disease signs but not limiting oral intake significantly	Moderate symptoms with disease signs with partial limitation of oral intake	Severe symptoms with disease signs on examination with major limitation of oral intake
EYES Mean tear test (mm): >10; 6-10; <5; Not done	No symptoms	Mild dry eye symptoms not affecting ADL (requiring eyedrops < 3 x per day) OR asymptomatic signs of keratoconjunctivitis sicca	Moderate dry eye symptoms partially affecting ADL (requiring drops > 3 x per day or punctal plugs), WITHOUT vision impairment	Severe dry eye symptoms significantly affecting ADL (special eyewear to relieve pain) OR unable to work because of ocular symptoms OR loss of vision caused by keratoconjunctivitis sicca

	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2	SCORE 3
GI TRACT	No symptoms	Symptoms such as dysphagia, anorexia, nausea, vomiting, abdominal pain or diarrhea without significant weight loss (<5%)	Symptoms associated with mild to moderate weight loss (5-15%)	Symptoms associated with significant weight loss >15%, requires nutritional supplement for most calorie needs OR esophageal dilation
LIVER	Normal LFT	Elevated Bilirubin, AP*, AST or ALT <2 x ULN	Bilirubin >3 mg/dl or Bilirubin, enzymes 2-5 x ULN	Bilirubin or enzymes > 5 x ULN
LUNGS FEV1	No symptoms	Mild symptoms (shortness of breath after climbing one flight of steps)	Moderate symptoms (shortness of breath after walking on flat ground)	Severe symptoms (shortness of breath at rest, requiring O_2)
DLCO	FEV1 > 80% OR LFS<2	FEV1 60-79% OR LFS 3-5	FEV1 40-59% OR LFS 6-9	FEV1 <39% OR LFS 10-12
JOINTS AND FASCIA	No symptoms	Mild tightness of arms or legs, normal or mild decreased range of motion (ROM) AND not affecting ADL	Tightness of arms or legs OR joint contractures, erythema due to fasciitis, moderate decrease ROM AND mild to moderate limitation of ADL	Contractures WITH significant decrease of ROM AND significant limitation of ADL (unable to tie shoes, button shirts, dress self etc.)
GENITAL TRACT	No symptoms	Symptomatic with mild signs on exam AND no effect on coitus and minimal discomfort with gynecologic exam	Symptomatic with moderate signs on exam AND with mild dyspareunia or discomfort with gynecologic exam	Symptomatic WITH advanced signs (stricture, labial agglutination or severe ulceration) AND severe pain with coitus or inability to insert vaginal speculum

* AP may be elevated in growing children, and not reflective of liver dysfunction

Other indicators, clinical manifestations or complications related to cGVHD (check all that apply and assign a score to its severity [0-3] based on its functional impact (none – 0,mild -1, moderate -2, severe – 3):

Esophageal stricture or web___ Pericardial Effusion___ Pleural Effusion(s)___
Ascites (serositis)___ Nephrotic syndrome___ Peripheral Neuropathy___
Myasthenia Gravis___ Cardiomyopathy___ Eosinophilia > 500/µl___
Polymyositis___ Cardiac conduction defects___ Coronary artery involvement___
Platelets <100,000/µl ___ Progressive onset
OTHERS: _____

Slika 8. Formular za procjenu zahvaćenosti pojedinih organskih sustava i ocjenjivanje težine bolesti[18].

4.4.2. Aktivnost kroničnog GvHD-a

Aktivnost kroničnog GvHD-a definirana je sljedećim pojmovima:

a) Klinički dojam o aktivnosti bolesti (eng. *clinician's impression of activity*)

Nadležni kliničar hematolog u suradnji s drugim specijalistima na temelju simptoma i znakova, trenutne terapije bolesnika i razvoja bolesti bilježi svoj dojam o aktivnosti bolesti prema sljedećoj ljestvici:

(1) Neaktivna bolest, bez sistemske ili topikalne imunosupresije

(2) Neaktivna bolest, na sistemskoj ili topikalnoj imunosupresiji

(3) Aktivna bolest, neovisno o stupnju trenutne terapije

(4) Vrlo aktivna bolest, neovisna o stupnju trenutne terapije.

b) Intenzitet sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije (eng. *intensity of systemic immunosuppression at the time of evaluation)*[75]

Ovom ljestvicom opisan je i definiran intenzitet sistemske imunosupresije bolesnika kako slijedi:

(1) Bez sistemske imunosupresije

(2) Blaga sistemska imunosupresija: prednizon u dozi <0.5 mg/kg/dan

(3) Umjerena sistemska imunosupresija: prednizon ≥ 0.5 mg/kg/dan i/ili drugo imunosupresivno sredstvo/modalitet

(4) Jaka sistemska imunosupresija: dva ili više sredstava/modaliteta i/ili prednizon ≥ 0.5 mg/kg/dan.

Bolest se smatra aktivnijom ukoliko je u trenutku evaluacije bio prisutan veći intenzitet sistemske imunosupresije.

c) Terapijska namjera u trenutku evaluacije (eng. *therapeutic intent at the time of evaluation*)

Na temelju prikupljene anamneze i podataka prikupljenim prilikom evaluacije u studiji (pregledi specijalista, rezultati funkcionalnih testova i laboratorijske obrade) donosi se odluka o terapiji. Odluka se bilježi kako slijedi:

(1) Smanjiti sistemsku terapiju zbog poboljšanja bolesti

(2) Ne mijenjati sistemsku terapiju jer je bolest stabilna

(3) Povećati sistemsku terapiju zbog pogoršanja i napredovanja bolesti

(4) Zamijeniti terapiju zbog njezine toksičnosti

(5) Promijeniti sistemsku terapiju zbog nedostatka odgovora na istu;

(6) Ukinuti sistemsku terapiju zbog nedostatka odgovora na istu.

Bolest se smatra manje aktivnom u slučajevima (1), (2) ili (6), dok slučajevi (3), (4) ili (5) označavaju aktivniju bolest.

Aktivnost bolesti nije mogla biti utvrđena po ovom kriteriju ukoliko bolesnik nije zadovoljio nijednu od prethodno opisanih situacija.

4.5. Laboratorijska analiza

4.5.1. Laboratorijska analiza: američki ispitanici (NIH)

Uzorci krvi prikupljeni su u odgovarajuće epruvete i poslani na rutinsku laboratorijsku analizu u Odjel za laboratorijsku medicinu (eng. *Department of Laboratory Medicine, Clinical Center, NIH*). Albumin i ukupni proteini u serumu analizirani su sistemom Synchron LX20 Chemistry Analyzer (Beckman Coulter Inc., Brea, CA) i Dimension Vista sistemom (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark, DE). Serumski C-reaktivni protein (CRP) mjeren je turbidimetrijski, dok su komponenta komplementa 3 i 4 (C3, C4), IgG, IgM i IgA mjereni nefelometrijski koristeći sistem Beckman Coulter IMMAGE Immunochemistry i Siemens Dimension Vista System. Koncentracije serumskog beta-2-mikroglobulina, feritina i paratiroidnog hormona određene su koristeći kemoiluminescentni imunometrijski esej (Siemens Immulite 2500). Sedimentacija eritrocita analizirana je na uređaju Excyte 40 Automated ESR Analyzer (Vital Diagnostics). Kompletna krvna slika dobivena je automatskim hematološkim brojačima.

Uzorci seruma prikupljeni u epruvete s heparinom alikvotirani su i pohranjeni na -80°C za buduća istraživanja.

4.5.2. Laboratorijska analiza: hrvatski ispitanici (KBC Zagreb)

Uzorci krvi prikupljeni su u odgovarajuće epruvete i laboratorijski analizirani u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska. Sedimentacija eritrocita određena je po Westergrenu. Kompletna krvna slika dobivena je koristeći analizator DxH 800 analyzer, Beckman, SAD. Koagulacijski testovi izvedeni su pomoću automatiziranog analizatora Behring Coagulation System koristeći Siemens Healthcare Diagnostics reagense. Biokemijski parametri (bilirubin, aspartat-aminotransferaza (AST), alanin-aminotransferaza (ALT), G-glutamil transferaza (GGT), alkalna fosfataza (AP), laktat dehidrogenaza (LD), CRP, trigliceridi, ukupni kolesterol, HDL i LDL kolesterol, albumin (serum), ukupni proteini, IgG, IgM, IgA, beta-2-mikroglobulin, feritin, reuma faktor, C3, C4) analizirani na Cobas c 501, Roche, SAD. Antikardiolipinska protutijela IgG i IgM mjerena su pomoću komercijalno dostupnih ELISA kitova. Udjeli staničnih populacija (ukupni T limfociti, pomoćnički i citotoksični T limfociti, B limfociti,

NK stanice) u perifernoj krvi određeni su imunofenotipizacijom koristeći odgovarajuće panele monoklonskih protutijela i protočni citometar FACSCalibur s CellQuest Pro software-om (BD Biosciences). Apsolutni brojevi limfocitnih subpopulacija ustanovljeni su koristeći hematološki analizator Beckman Coulter DXH800.

4.5.3. Analiza glikozilacije imunoglobulina G

Imunoglobulin G izoliran je iz plazme afinitetnom kromatografijom pomoću proteina G vezanog na monolitne kromatografske kolonice. Glikani jednog dijela izoliranog IgG-a analizirani su postupkom tekućinske kromatografije temeljene na hidrofilnim interakcijama (eng. *hydrophilic interaction liquid chromatography - ultra performance liquid chromatography*, HILIC-UPLC). Drugi dio izoliranog imunoglobulin G tretirao se tripsinom kako bi se dobili glikopeptidi koji su analizirani postupkom tekućinske kromatografije spregnute spektometrijom mase (eng. *mass spectrometry*, MS). Navedene metode detaljno su opisane u recentnim publikacijama[61,76].

Analiza N-glikozilacije američke i hrvatske kohorte provedena je tekućinskom kromatografijom ultra visoke razlučivosti (UPLC) i postupkom tekućinske kromatografije spregnute spektrometrijom mase (LC/MS) kako bi se svladao jedan od izazova ovog istraživanja. Iako metode nisu direktno usporedive (budući da počivaju na različitim principima), upotreba dva analitička postupka donekle rješava problem relativno malog broja ispitanika karakteriziranih brojnim parametrima te ovećeg broja mogućih glikana IgG-a. Svaka metoda donosi svoje prednosti i daje svoj doprinos cjelovitoj slici glikana u kroničnom GvHD-u. UPLC analizira oslobođene glikane IgG-a, uključuje glikane i Fc i Fab dijela IgG-a te pruža uvid u izomerne glikane koje LC/MS ne razlikuje. Analiza LC/MS-om temelji se na tripsiniziranim Fc glikopeptidima IgG te omogućuje diskriminaciju podklasa IgG-a (IgG1, IgG2+IgG3 i IgG4)[77].

4.5.3.1. Izolacija imunoglobulina G i određivanje njegove koncentracije

Imunoglobulin G izoliran je iz uzoraka krvne plazme ispitanika afinitetnom kromatografijom pomoću proteina G vezanog na monolitne kromatografske kolonice u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica (Bia Separations, Ajdovščina, Slovenija) uz korištenje vakuumske pumpe. Prije nanošenja uzoraka protein G pločica je pripremljena za eksperiment ispiranjem s 2 mL ultra čiste vode (18 MΩ cm pri 25°C), 2 mL 1x koncentriranog pufera PBS pH 7,4 (137 mmol L^{-1} NaCl; 2,7 mmol L^{-1} Na_2HPO_4; 9,7 mmol L^{-1} KH_2PO_4; 2,2 mmol L^{-1} KCl; titrirano s NaOH do pH 7,4), 1 mL 0,1 mol L^{-1} HCOOH pH 2,5; 2 mL 10x koncentriranog pufera PBS pH 6,6; te uravnotežena ispiranjem s 4 mL 1x koncentriranog pufera PBS pH 7,4.

Osim uzoraka bolesnika s kroničnim GvHD-om (američkih i hrvatskih) i hrvatskih kontrolnih ispitanika, na pločice za izolaciju dodani su i alikvoti standardnog uzorka plazme (po 50 µL) i ostavljena prazna mjesta kao negativna kontrola (eng. *blank*) na položaje na pločici unaprijed određene postupkom randomizacije. Standardni uzorak plazme je plazma sakupljena od većeg broja zdravih dobrovoljaca (pozitivna kontrola). Ukupno su korištene četiri pločice za izolaciju čiji je raspored prikazan na Slici 9.

Otopljeni uzorci plazme (po 50 µL) su centrifugirani 3 minute pri 13 400 rpm (centrifuga miniSpin, Eppendorf), razrijeđeni 1x koncentriranim puferom PBS pH 7,4 (1:7 (v/v)) te filtrirani kroz 0,45 µm GHP AcroPrep filtar pločicu s 96 jažica upotrebom vakuum uređaja. Filtrirani uzorci seruma naneseni su na protein G pločicu, te isprani tri puta s 2 mL 1x koncentriranog pufera PBS pH 7,4 kako bi se uklonili nevezani proteini. Vezani IgG je eluiran s protein G pločice ispiranjem s 1 mL 0,1 mol L^{-1} HCOOH te neutraliziran s 170 µL 1 mol L^{-1} NH_4HCO_3. Nakon upotrebe, pločica je regenerirana ispiranjem i pohranjena na 4°C. Svakom eluatu izmjerena je koncentracija IgG-a mjerenjem apsorbancije pri 280 nm korištenjem spektrofotometra NanoDrop 8000 (Thermo Scientific).

PLOČICA 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	stand_15	181_USA	209_USA	24_CRO	95_USA	102_CRO	222_USA	117_USA	25_CRO	stand_6	112_USA	291_USA
B	287_USA	131_CRO	43_USA	296_USA	8_CRO	270_USA	C9005_USA	stand_20	137_USA	C9001_USA	stand_41	87_CRO
C	36_USA	14_USA	176_USA	44_USA	200_USA	71_USA	243_USA	306_USA	stand_38	118_USA	174_USA	328_USA
D	265_USA	218_USA	106_CRO	241_USA	337_USA	167_USA	249_USA	133_CRO	312_USA	266_USA	96_USA	268_USA
E	143_USA	155_USA	stand_32	73_USA	311_USA	320_USA	blank_3	248_USA	140_USA	30_USA	106_USA	stand_10
F	172_USA	134_USA	108_USA	stand_27	294_USA	stand_19	121_USA	18_CRO	77_CRO	132_USA	163_USA	317_USA
G	4_CRO	114_USA	66_USA	35_USA	315_USA	80_USA	159_USA	55_USA	256_USA	27_CRO	94_USA	216_USA
H	98_CRO	stand_30	318_USA	170_USA	C2798_USA	107_USA	63_CRO	81_USA	C146_USA	60_USA	75_CRO	108_CRO
PLOČICA 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	stand_29	314_USA	2_USA	85_USA	stand_8	111_USA	282_USA	78_CRO	66_CRO	196_USA	105_USA	C9002_USA
B	79_USA	9_USA	136_USA	94_CRO	319_USA	166_USA	309_USA	stand_18	307_USA	113_USA	283_USA	179_USA
C	C64_USA	1_CRO	293_USA	129_USA	184_USA	31_USA	194_USA	321_USA	37_USA	207_USA	133_USA	84_CRO
D	9_CRO	stand_43	26_CRO	231_USA	40_USA	34_CRO	305_USA	211_USA	186_USA	62_CRO	212_USA	131_USA
E	82_USA	285_USA	180_USA	280_USA	72_USA	119_USA	36_CRO	199_USA	87_USA	stand_34	blank_1	stand_2
F	123_USA	230_USA	127_CRO	255_USA	205_USA	300_USA	38_USA	235_USA	325_USA	284_USA	191_USA	135_USA
G	225_USA	339_USA	stand_37	213_USA	295_USA	220_USA	157_USA	23_USA	stand_7	77_USA	63_USA	118_CRO
H	20_CRO	120_CRO	244_USA	stand_26	29_CRO	stand_22	stand_12	260_USA	232_USA	329_USA	30_CRO	78_USA
PLOČICA 3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	stand_39	277_USA	13_USA	178_USA	187_USA	31_CRO	3_CRO_1	336_USA	334_USA	122_USA	171_USA	127_USA
B	21_CRO	152_USA	52_USA	182_USA	21_USA	271_USA	165_USA	223_USA	150_USA	324_USA	145_USA	12_CRO
C	190_USA	247_USA	102_USA	stand_1	32_USA	124_USA	C9003_USA	101_USA	183_USA	3_USA	C9004_USA	175_USA
D	134_CRO	22_CRO	257_USA	169_USA	121_CRO	215_USA	104_CRO	242_USA	130_CRO	stand_28	107_CRO	99_USA
E	214_USA	stand_21	stand_14	19_USA	138_USA	138_CRO	297_USA	stand_35	259_USA	258_USA	29_USA	54_USA
F	8_USA	68_USA	14_CRO	246_USA	290_USA	267_USA	83_USA	130_USA	blank_4	51_CRO	stand_9	7_USA
G	139_USA	332_USA	100_USA	146_USA	342_USA	stand_16	stand_24	162_USA	34_USA	299_USA	298_USA	stand_40
H	322_USA	96_CRO	201_USA	81_CRO	stand_4	308_USA	120_USA	3_CRO_2	100_CRO	41_USA	237_USA	217_USA
PLOČICA 4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	234_USA	16_CRO	26_USA	109_CRO	335_USA	49_CRO	198_USA	55_CRO	252_USA	331_USA	236_USA	85_CRO
B	197_USA	254_USA	103_USA	185_USA	40_CRO	76_USA	239_USA	316_USA	27_USA	292_USA	stand_3	289_USA
C	stand_25	229_USA	stand_31	221_USA	98_USA	stand_5	86_USA	135_CRO	stand_11	95_CRO	142_USA	4_USA
D	195_USA	stand_13	233_USA	326_USA	67_CRO	84_USA	147_CRO	193_USA	310_USA	304_USA	264_USA	272_USA
E	128_USA	56_USA	5_CRO	251_USA	210_USA	279_USA	144_USA	253_USA	168_USA	262_USA	64_CRO	206_USA
F	71_CRO	286_USA	57_USA	70_USA	58_USA	141_CRO	269_USA	173_USA	97_USA	stand_17	90_USA	stand_42
G	330_USA	67_USA	338_USA	75_USA	blank_2	50_USA	C9000_USA	stand_23	303_USA	273_USA	24_USA	101_CRO
H	161_USA	177_USA	149_USA	stand_36	281_USA	C228_USA	stand_33	1_USA	23_CRO	224_USA	263_USA	74_USA

Slika 9. Prikaz rasporeda uzoraka na pločici prilikom analize glikana IgG-a. Stand_XX - alikvoti standardnog uzorka plazme, *blank* – prazne jažice, negativna kontrola. Skraćenica USA nakon broja označava uzorak američkog ispitanika, a skraćenica CRO hrvatskog.

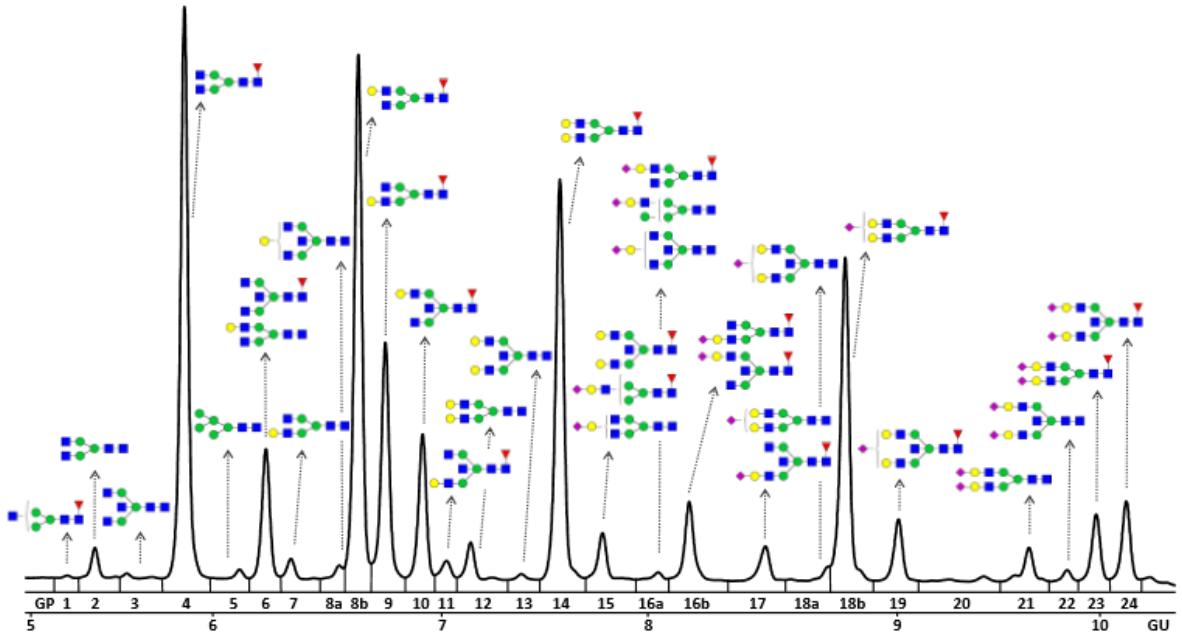
Za tekućinsku kromatografiju alikvotirano je 300 µL IgG eluata, osušeno u vakuum centrifugi (Thermo Scientific vakuum koncentrator Savant SC210A) i spremljeno na -20 °C do upotrebe. Za masenu spektrometriju alikvotirano je po 40 µL od svakog eluata i pohranjeno u zamrzivač (-20°C) do analize.

4.5.3.2. Analiza glikozilacije imunoglobulina G postupkom tekućinske kromatografije ultra visoke razlučivosti (UPLC)

Osušenom odmrznutom eluatu dodaje se 30 µL 1.33% natrijev dodecil-sulfata (SDS). Nakon temeljite resuspenzije uzorci se inkubiraju 10 min na 65°C radi denaturacije. Nakon hlađenja slijedi inkubacija s 10 µL Igepala kako bi se deaktivirao preostali suvišak SDS-a te spriječila denaturacija PNGaze F. Svakom uzorku (10 µL) dodaje se smjesa 5x PBS-a s 0,12 µL PNGaze F. Ovaj enzim katalizira otpuštanje

N-vezanih oligosaharida. Uzorci se resuspendiraju i stavljaju na inkubaciju 18 sati na 37°C. Oslobođeni N-glikani obilježavaju se fluorescentnom bojom 2-aminobenzamid (2-AB). Smjesa za obilježavanje pripravlja se otapanjem 2-AB (0,48 mg) i reducensa 2-pikolin borana (1,12 mg) u 25 µL 30% smjese octene kiseline i dimetil sulfoksida (DMSO) po uzorku. Svakom uzorku dodaje se 25 µL smjese za obilježavanje. Nakon resuspenzije slijedi inkubacija 2 sata na 65°C. Fluorescentno obilježene glikane je potrebno pročistiti od viška fluorescentne boje, neobilježenih glikana, proteina i suviška reagensa ekstrakcijom na čvrstoj fazi temeljenom na hidrofilnim interakcijama (eng. HILIC-SPE) na 0,45 µm GHP AcroPrep filtar pločici s 96 jažica. Obilježeni glikani zaostaju na filtar pločici nakon ispiranja acetonitrilom (ACN) s koje se eluiraju ultra čistom vodom i prikupljaju u pločice za analizu koje se do korištenja čuvaju na -20°C.

Fluorescentno obilježeni pročišćeni glikani analizirani su tekućinskom kromatografijom ultra visoke učinkovitosti temeljene na hidrofilnim interakcijama (HILIC-UPLC) na instrumentu Acquity UPLC (Waters) pod kontrolom programa *Empower 2*. Za razdvajanje je korištena kolona Acquity BEH Glycan (Waters) duljine 100 mm i unutarnjeg promjera 2,1 mm te veličine čestica 1,7 µm. Pokretnu fazu čini 100 mmol L^{-1} amonijevog formijata pH 4,4 kao otapalo A i acetonitril kao otapalo B uz linearni gradijent od 25% do 38% volumnog udjela otapala A pri protoku od 0,4 mL min^{-1}. Ukupno trajanje analize pojedinog uzorka bilo je 34 minute. Fluorescentno obilježeni glikani detektirani su pri valnoj duljini pobude od 250 nm, i valnoj duljini emisije od 428 nm. Kromatogrami su obrađeni programom automatskom metodom integriranja nakon čega je svaki kromatogram ručno ispravljen kako bi svi uzorci bili integrirani jednako. Svaki kromatogram sastoji se od 24 pika (Slika 10.). Udio površine svakog pika izražen je kao postotak ukupne površine svih pikova koji odgovaraju glikanskim strukturama. Kromatografski pikovi odgovaraju glikanskim strukturama prikazanim u Tablici 2.



Slika 10. Kromatografski profil N-glikana IgG-a razdvojenih u 24 kromatografska pika (GP1 do GP24) metodom tekućinske kromatografije (UPLC). Prikazane su glavne glikanske strukture koje odgovaraju svakom piku (opisane u Tablici 2.). Zeleni krug – Man, plavi kvadrat – GlcNAc, ljubičasti romb – S, žuti krug – Gal, crveni trokut – F.

U svim UPLC kromatogramima integrirana su 24 kromatografska pika, čije površine su normalizirane na način da je površina svakog pika podijeljena s ukupnom površinom svih pikova u kromatogramu (eng. *total area normalization*), čime je određen udio površine koji pojedini kromatografski pik zauzima u ukupnom kromatogramu, izražen u obliku postotka. Svaki kromatogram prolazi postupak kontrole kvalitete pomoću replikata i standarda gdje se uslijed većih nedostataka (pr. veći broj kromatografskih pikova, nemogućnost integriranja pikova) isključuju iz analize, ponajviše zbog rizika od možebitne kontaminacije.

Osim analize udjela koji svaki od 24 kromatografska glikanska pika zauzima u ukupnom glikomu IgG-a, određeni su i dodatni derivirani parametri koji predstavljaju udio skupine glikana sličnih strukturnih obilježja u ukupnom glikomu IgG-a (Dodatak 1, Tablica D1).

Tablica 2. Sastav 24 kromatografska pika (direktno mjerenih parametara) IgG glikoma metodom tekućinske kromatografije.

Kromatografski pik	Glikanska struktura	Kromatografski pik	Glikanska struktura
GP1	FA1	GP13	A2BG2
GP2	A2	GP14	FA2G2
GP3	A2B	GP15	FA2BG2
GP4	FA2	GP16	FA2G1S1
GP5	M5	GP17	A2G2S1
GP6	FA2B	GP18	FA2G2S1
GP7	A2G1	GP19	FA2BG2S1
GP8	FA2[6]G1	GP20	nije poznato
GP9	FA2[3]G1	GP21	A2G2S2
GP10	FA2[6]BG1	GP22	A2BG2S2
GP11	FA2[3]BG1	GP23	FA2G2S2
GP12	A2G2	GP24	FA2BG2S2

Kratice: GPXX – glikanski pik (eng. *glycan peak,* GP), XX – broj između 1 i 24. F – fukoza vezana na unutarnji GlcNAc jezgre glikana, Mx – broj (x) Man vezan na GlcNAc-e jezgre glikana, Ax – broj (x) antena, B – račvajući GlcNAc vezan na β1–3-vezanu Man, Gx – broj (x) β1–4-vezanih Gal na antenama, [3]G1 i [6]G1 Gal vezana na antenu β1–3- ili β1–6-vezane Man, Sx – broj (x) sijalinskih kiselina vezanih na Gal.

4.5.3.3. Analiza glikozilacije imunoglobulina G postupkom tekućinske kromatografije spregnute spektometrijom mase (LC/MS)

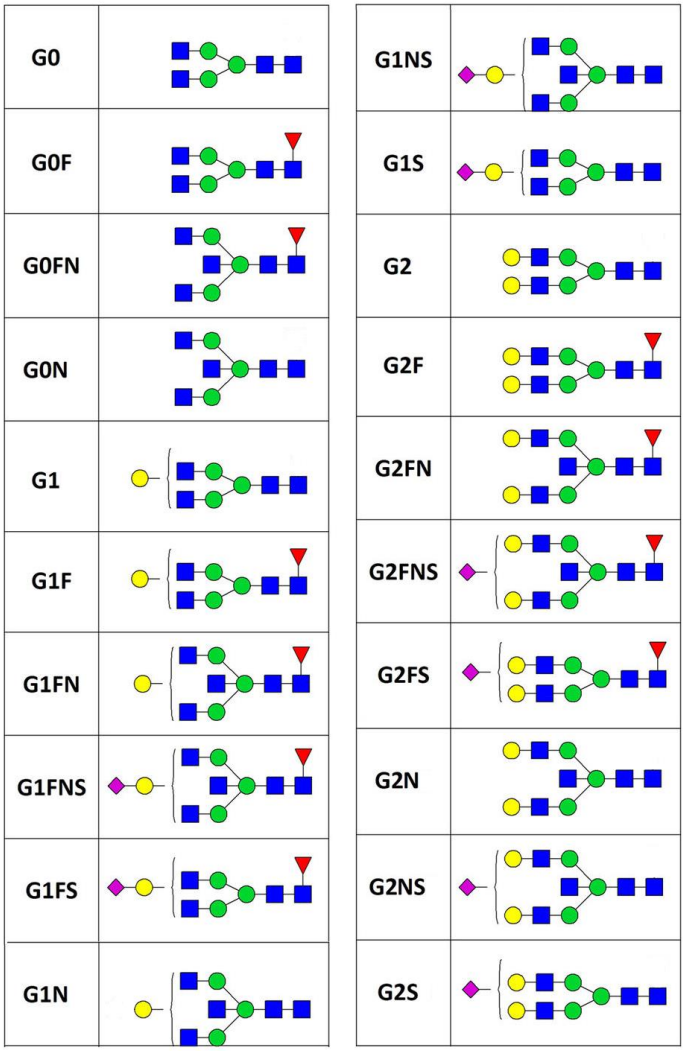
Nakon odmrzavanja izoliranog IgG-a, uzorcima je dodan tripsin (200 ng tripsina (Worthington, USA) na 25 µg IgG) te su stavljeni na inkubaciju (37°C) preko noći. Korištenjem tripsina dobivaju se peptidi na kojima su vezani intaktni glikani, a koji se mogu pouzdano analizirati masenim spektrometrom. Razlike u masama glikana vezanih na svaki od peptida, ukazuju na razlike u glikozilacijskim profilima za svaki od uzoraka. Glikopeptidni fragmenti su polarni i vežu se na čestice silike što omogućuje njihovo pročišćavanje obrnuto faznom ekstrakcijom na Chromabond C-18 silika česticama. Prije pročišćavanja, C-18 čestice se kondicioniraju smjesom 80% ACN i 0,1% trifluoroacetatna kiseline (TFA). Uzorci se razrijede 10 puta s 0,1% TFA te nanesu na pločicu s prekondicioniranim C-18 česticama. Nakon inkubacije (2 min), višak tekućine odstrani se uz pomoć vakuum pumpe. Nakon sušenja, zaostali glikopeptidi eluiraju se s 200 µL ACN + 0,1% TFA uz inkubaciju (2 min) i centrifugiranje (5 minuta, od 300 do 800 okretaja/min). Eluat se isuši centrifugiranjem s vakumom i pohrani u zamrzivač do analize.

Pripremljeni uzorci glikopeptida Fc fragmenta IgG-a analizirani su na nanoAcquity UPLC-u (Waters, Milford, MA, SAD) povezanim s CompactTOF-Q spektrometrom mase (BrukerDaltonics, Bremen, Njemačka). Ova metoda skraćeno se naziva LC-ESI-MS (eng. *liquid chromatography – electrospray ionisation - mass spectrometry*). Alikvot uzorka (9 µL) unesen je u pretkolonu Acclaim PepMap100 C8 (Thermo Scientific, Waltham,MA, SAD) i pročišćen s 0,1% TFA (otapalo A) tijekom 1 minute uz protok od 40 µL /min. Separacija glikopeptida izvršena je na HALO C18 nano-LC koloni (150mm×100mmi.d., 2.7 mm HALO čestice s porama od 90 Å; Advanced Materials technology, Wilmington, NC, SAD). Gradijentno eluiranje s kolone provedeno je gradijentom koncentracija acetonitrila - otapala B od 18% do 25% (80% ACN) tijekom 3,5 min, uz protok brzine 1 µL/ min i temperaturu kolone od 30°C. Spektar masa sniman je u području omjera mase i naboja (m/z) od 200 do 1900 i frekvencijom od 0,5 Hz. Upravljanje instrumentima i ekstrakcija podataka izvedeni su HyStar programom (verzija 3.2).

Ovom analizom odvajaju se podklase IgG protutijela, no nije moguće razlikovati IgG2 i IgG3 budući da tripsinizacijom nastaju identični glikopeptidni fragmenti. Signali su

identificirani prema ranije objavljenim izračunatim m/z vrijednostima IgG glikopeptida[78]. Glikanske strukture vezane na Fc fragment IgG-a prikazane su na Slici 11.

Za svaku podklasu izračunate su razine biološki značajnih obilježja glikanske strukture (derivirani parametri): fukozilacije, račvajućeg GlcNAc-a, agalaktozilacije, monogalaktozilacije, digalaktozilacije i sijalinizacije prema formulama priloženim u Tablici 3.



Slika 11. Moguće kombinacije glikanskih struktura vezanih na IgG (Fc) protein. Zeleni krug – Man, plavi kvadrat – GlcNAc, ljubičasti romb – S, žuti krug – Gal, crveni trokut – F. Prilagođeno prema Pezer et al. 2016.[79]

Tablica 3. Formule za izračunavanje razina biološki značajnih obilježja glikanske strukture (deriviranih parametara).

Značajno obilježje IgG glikanske strukture	Opis	Formula
Agalaktozilacija	Udio agalaktoziliranih struktura u glikanima podklase IgG-a	G0 = G0 + G0F + G0FN + G0N
Monogalaktozilacija	Udio monogalaktoziliranih struktura u glikanima podklase IgG-a	G1 = G1 + G1F + G1FN + G1FNS + G1FS + G1N + G1NS + G1S
Digalaktozilacija	Udio digalaktoziliranih struktura u glikanima podklase IgG-a	G2 = G2 + G2F + G2FN + G2FNS + G2FS + G2N + G2NS + G2S
Račvajući GlcNAc	Udio struktura s račvajućim GlcNAc-om u glikanima podklase IgG-a	N = G0FN + G0N + G1FN + G1FNS + G1N + G1NS + G2FN + G2FNS + G2N + G2NS
Sijalizacija	Udio sijaliniziranih struktura u glikanima podklase IgG-a	S = G1FNS + G1FS + G1NS + G1S + G2FNS + G2FS + G2NS + G2S

Kratice: broj galaktoza (G0, G1, G2), fukoza (F), račvajući GlcNAc (N) i sijalinska kiselina (S) u glikanskoj strukturi.

4.6. Etička odobrenja

Svi uključeni bolesnici i kontrolni ispitanici potpisali su informirani pristanak prethodno odobren od etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (za ispitanike iz KBC Zagreb), odnosno od Etičkog povjerenstva NCI/NIH (za ispitanike iz NIH, SAD).

4.7. Statistička analiza

Eksperimentalni dizajn proveo se primjerenim metodama (poput randomizacije) gdje su se u obzir uzeli kao izrazito važni parametri spol i godine. Rezultati eksperimenta prošli su kroz provjeru kvalitete pomoću replikata i standarda prije same statističke obrade.

U statističkoj obradi dobivenih rezultata koristila su se prikladna numerička obilježja deskriptivne statistike (medijan, raspon, najveća i najmanja vrijednost). Demografska

obilježja i laboratorijski parametri američkih bolesnika naspram hrvatskih, kao i hrvatskih bolesnika naspram kontrolnih ispitanika testirana su prikladnim metodama ($\chi 2$ test za kategorijske, i Mann-Whitney U test za kvantitativne parametre).

Za testiranje hipoteza i otkrivanje značajnih glikanskih struktura u američkoj populaciji, za obje laboratorijske analize, izvršena je univarijatna analiza neparametarskom metodom Wilcoxon testa budući da glikani IgG-a često odstupaju od normalne (Gaussove) raspodjele. Rezultati su smatrani značajnima ukoliko je p-vrijednost bila manja od 0,05[80,81]. Razina značajnosti za vrijednost p je korigirana prema Bonferronijevoj korekciji za višestruka testiranja.

Odabrane statističke metode prikladne su za analizu problema nevelikog broja uzoraka naspram relativno većeg broja parametara (obilježja bolesti i mogućih glikanskih struktura). Populacija kontrolnih uzoraka američkih cGvHD ispitanika bila je premala za dobivanje pouzdanih rezultata te je isključena iz konačne analize.

Parametri logističke regresije

Za analizu diskriminacijskog potencijala glikana koristila se logistička regresija. Zbog manjeg broja ispitanika i zapreka višestrukog ispitivanja, za potrebe statističke analize logističkom regresijom ljestvice težine (stupnja) i aktivnosti bolesti svodile su se na manji broj kategorija:

A) Težina (stupanj) kroničnog GvHD-a prema NIH ocjenama cGvHD-a

Ispitanici su podijeljeni u dvije kategorije. Američki ispitanici formirali su dvije skupine: (1) bolesnici s utvrđenim blagim i umjerenim oblikom cGvHD-a i (2) bolesnici s teškim oblikom prema NIH cGvHD ocjenama. Hrvatski ispitanici podijeljeni su u dvije skupine: (1) kontrolna skupina, bez cGvHD-a i (2) skupina s kroničnim GvHD-om (blagi, umjereni i teški oblik prema NIH cGvHD ocjenama).

B) Aktivnost kroničnog GvHD-a

B1) Klinički dojam o aktivnosti bolesti

Bolesnici američke i hrvatske populacije podijeljeni su u dvije skupine prema kliničkom dojmu aktivnosti bolesti: 1) aktivna bolest u slučajevima kada je klinički dojam bio da je bolest aktivna ili vrlo aktivna neovisno o stupnju sistemske ili

topikalne terapije, te 2) neaktivna bolest neovisno o primanju sistemske ili topikalne imunosupresije

B2) Intenzitet sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije

Bolesnici su podijeljeni u dvije skupine. Prvu skupinu činili su bolesnici bez sistemske imunosupresije ili s blagim intenzitetom sistemske imunosupresije, a drugu skupinu bolesnici s umjerenim ili visokim intenzitetom sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije.

B3) Terapijska namjera u trenutku evaluacije

Prvu skupinu činili su oni bolesnici kojima je sistemska terapija smanjena ili je ostala nepromijenjena budući da je primjećeno poboljšanje ili je bolest ocijenjena stabilnom. Drugu skupinu činili su bolesnici za koje je procijenjeno da je bolest u pogoršanju odnosno da sistemsku terapiju treba zamijeniti ili ukinuti zbog nedostatka odgovora.

Nakon izgradnje početnih modela logističke regresije glikanskih mjerenja, zbog izrazite koreliranosti kao i nevelikog broja uzoraka koristila se metoda analize glavnih komponenti (eng. *principal component analysis,* PCA) za odabir glikanskih komponenti (*glycansPC*) za izgradnju daljnjih modela. PCA metoda stvara nove kondenzirane varijable, linearne kombinacije izvornih, s (često) minimalnim gubitkom informacija, koje po definiciji nisu korelirane[82]. Broj glavnih komponenti izabran je kao minimalni broj komponenti potreban za opisivanje barem 70% ukupne varijabilnosti. Budući da je broj uzoraka nevelik, a broj glikanskih parametra ≥24 može se dogoditi da model nije dobro definiran (algoritam ne konvergira ili daje krive rezultate). Za prikaz koreliranosti varijabli koristila se VIF (eng. *variance inflation factor*) mjera.

Za potrebe statističke analize logističkom regresijom, velik broj prikupljenih laboratorijskih parametara reduciran je kako slijedi: pretragom literature identificirani su laboratorijski parametri od interesa (broj eozinofila, C3, C4 te markeri upale: albumin, CRP i broj trombocita[48]) dok je ostatak laboratorijskih parametara metodom glavnih komponenti sveden na nekorelirane varijable (*labsPC).*

ROC krivulje i diskriminativni model

Po analizi logističkom regresijom u američkoj populaciji koristila se analiza ROC krivuljama (eng. *receiver operator characteristic*) za parametre težine (NIH ocjene) cGvHD-a pojedinih organskih sustava te za parametre aktivnosti bolesti. ROC krivuljama se opisuju promjene u osjetljivosti i specifičnosti za pojedinačnu pretragu te usporedbu učinkovitosti dijagnostičke pretrage. Površina ispod ROC krivulje veća od 0,9 ukazuje na izvrstan model, dok se površina od 0,8-0,9 smatra vrlo dobrom[81]. Kod savršene pretrage područje ispod krivulje je 1,0 (gornji lijevi ugao grafa), a osjetljivost i specifičnost iznose 100%. ROC krivuljama uspoređeni su model građen pomoću laboratorijskih parametara, model građen isključivo na glikanskim mjerenjima i model u kojemu su laboratorijski parametri nadograđeni glikanima.

Za analizu diskriminativnog potencijala glikana uparenih hrvatskih ispitanika (cGvHD bolesnici naspram kontrolnih ispitanika) izgrađeni su modeli logističke regresije za svaki glikan i za glikanske parametre zajedno. Model sa samim glikanskim parametrima zbog velike koreliranosti može imati značajno krive procjene standardnih pogrešaka (pa time i p-vrijednosti). Stoga je nakon modela logističke regresije izgrađenih za svaki glikan (1) te glikanske parametre zajedno (2), izgrađen model za glikanske strukture pomoću PCA metode (3*)*. Iduće je izgrađen model s laboratorijskim parametrima ispitanika u trenutku pristupanja studiji (4). Takav model omogućuje usporedbu prediktivnih mogućnosti, potvrdu literaturnih podataka te omogućuje daljnju procjenu koliko glikanske strukture doprinose prediktivnosti modela. Izdvojeni značajni laboratorijski parametri (4) u kombinaciji sa značajnim glikanskim parametrima (3) korišteni su za izgradnju krajnjeg modela (5) za diskriminaciju cGvHD-a. Korekcijom originalnog izbora potencijalnih diskriminativnih glikanskih kandidata (1) pomoću laboratorijskih parametara koje je model (4) izdvojio kao značajne ($p<0,05$) identificirani su glikani za koje je opravdano pretpostaviti da imaju značajnu ulogu u diskriminacijskoj analizi.

5. Rezultati

5.1. Karakteristike ispitanika

5.1.1. Karakteristike američkih ispitanika (NIH)

Pregled demografskih karakteristika američkih cGvHD bolesnika, kao i karakteristika njihove bolesti prikazan je u Tablici 4.

Od inicijalno uključena 262 uzorka američkih cGvHD bolesnika, 20 uzoraka je eliminirano iz daljnje analize rezultata zbog kontaminacije uzorka (2) ili nezadovoljavajuće kvalitete uzorka i/ili preniske koncentracije IgG-a (18). Od preostala 242 uzorka američkih bolesnika s kroničnim GVHD-om iz daljnje analize isključeni su oni koji su primali IVIg unutar tri mjeseca prije vađenja krvi za istraživanje, tako da je u završnu analizu uključeno 213 američkih bolesnika s kroničnim GVHD-om: 92 žene (43,2%) i 121 muškarac (56,8%). Medijan dobi ispitanika pri ulasku u studiju bio je 45 (raspon 5-71) godina. Medijan vremena prošlog od transplantacije do uključenja u studiju iznosio je 1136 (raspon 131-7746) dana, od transplantacije do dijagnoze kroničnog GvHD-a 233 (raspon 41-4325) dana i od dijagnoze bolesti do uključenja u studiju 756 (raspon 0-6545) dana. Većina ispitanika transplantaciji je podvrgnuta zbog leukemije (64,8%) ili limfoproliferativne bolesti (28,2%), pri čemu je njih 56,8% prošlo mijeloablativno kondicioniranje. Srodnog darivatelja krvotvornih matičnih stanica imalo je 128 ispitanika (60,1%). Podjednak broj ispitanika imao je ženskog (43,7%), odnosno muškog darivatelja (48,8%), pri čemu kod dijela darivatelja nije bio poznat spol (7,5%). Izvor krvotvornih matičnih stanica u većini slučajeva bio je iz periferne krvi darivatelja (77,9%).

Prethodni akutni GvHD zabilježen je kod 141 cGvHD ispitanika (66,2%) te je kod njih nastup kroničnog GvHD-a opisan kao progresivan (36,6%) ili mirujući (29,6%). Kod većine ispitanika (85,9%) bolest je klasificirana kao klasična. Medijan linija sistemske terapije iznosio je 4 (raspon 0-9). U trenutku evaluacije umjereni intenzitet imunosupresije primalo je 32,4%, a jaki intenzitet imunosupresije 37,5% bolesnika. U svega 23,9% ispitanika nije bila potrebna modifikacija sistemske terapije, dok je sistemska imunosupresivna terapija mijenjana zbog različitih indikacija: zbog pogoršanja bolesti (28,2%), nedostatka odgovora na terapiju (15,5%), zbog poboljšanja bolesti (9,9%), ili zbog toksičnog djelovanja terapije (6,1%). U 93

ispitanika nije zabilježen klinički dojam aktivnosti bolesti, dok je u većini ostalih slučajeva prevladavao dojam aktivne bolesti (101 ispitanik). Najzahvaćeniji organski sustavi s kroničnim GvHD-om bili su oči (77,9%), pluća (77%) i koža (76,5%), a slijede ih usta (66,2%), zglobovi/fascije (61%), jetra (52,1%) i probavni sustav (43,2%). Kod 53 (57,6%) bolesnice potvrđeni je kronični GvHD genitalnog trakta. Kod većine ispitanika ukupni kronični GvHD ocijenjen je kao teški (73,7%) ili umjereni (24,4%). Medijan prosječne ocjene bolesti iznosio je 1,13 (raspon 0,13-2,14). Broj zahvaćenih organskih sustava s kroničnim GvHD-om kretao se između 1 i 8, s medijanom 5.

Tablica 4. Karakteristike američkih cGvHD bolesnika.

Demografske karakteristike cGvHD bolesnika		**N**	**%**
Spol	Ženski	92	43,2%
	Muški	121	56,8%
Dob (godine) (medijan, raspon)		45 (5-71)	
Vrijeme od transplantacije do uključenja u studiju (dani) (medijan, raspon)		1136 (131-7746)	
Vrijeme od transplantacije do dijagnoze cGvHD (dani) (medijan, raspon)		233 (41-4325)	
Vrijeme od dijagnoze cGvHD do uključenja u studiju (dani) (medijan, raspon)		756 (0-6545)	
Primarna bolest	Leukemije*	138	64,8%
	Limfoproliferativne bolesti**	60	28,2%
	Drugo***	15	7,0%
Mijeloablativno kondicioniranje	Da	121	56,8%
	Ne	89	41,8%
	Nepoznato	3	1,4%
Srodnost darivatelja	Srodan	128	60,1%
	Nesrodan	85	39,9%
Spol darivatelja	Ženski	93	43,7%
	Muški	104	48,8%
	Nepoznato	16	7,5%
Izvor krvotvornih matičnih stanica	Koštana srž	41	19,3%
	Periferna krv	166	77,9%
	Krv iz pupkovine	6	2,8%

Prethodni akutni GvHD	Da	141	66,2%
	Ne	71	33,3%
	Nepoznato	1	0,5%
Karakterizacija kroničnog GvHD-a		**N**	**%**
Nastup cGvHD-a	*De novo*	71	33,3%
	Progresivan	78	36,6%
	Mirujući	63	29,6%
	Nepoznato	1	0,5%
Klasifikacija cGvHD-a	Klasičan	183	85,9%
	Preklapajući	27	12,7%
	Nepoznato	3	1,4%
Linije sistemske terapije (medijan, raspon)	4 (0-9)		
Stupanj intenziteta imunosupresije	Nepostojeći	46	21,6%
	Blagi	18	8,4%
	Umjereni	69	32,4%
	Jaki	80	37,6%
Terapijska namjera u trenutku evaluacije	Smanjiti sistemsku terapiju (poboljšanje)	21	9,9%
	Ne mijenjati sistemsku terapiju (stabilna bolest)	51	23,9%
	Povećati sistemsku terapiju (pogoršanje)	60	28,2%
	Zamijeniti terapiju zbog toksičnosti	13	6,1%
	Promijeniti sistemsku terapiju zbog nedostatka odgovora	31	14,5%
	Ukinuti sistemsku terapiju zbog nedostatka odgovora	2	1,0%
	Nepoznato/Nije primjenjivo	35	16,4%
Klinički dojam aktivnosti cGvHD-a****	Aktivna	101	47,4%
	Neaktivna	19	8,9%
	Nepoznato	93	43,7%
Organski sustavi zahvaćeni cGvHD-om	Koža	163	76,5%
	Usta	141	66,2%
	Oči	166	77,9%
	Jetra	111	52,1%
	Probavni sustav	92	43,2%
	Pluća	164	77,0%
	Zglobovi i fascije	130	61,0%

	Genitalni trakt (žene)	53	57,6%
Ukupna ocjena cGvHD-a	Blagi	4	1,9%
	Umjereni	52	24,4%
	Teški	157	73,7%
Prosječna ocjena cGvHD-a (medijan, raspon)	1,13 (0,13-2,14)		
Broj organskih sustava zahvaćenih cGvHD-om (medijan, raspon)	5 (1-8)		

* U kategoriju „Leukemije“ uključene su akutna mijeloična leukemija, akutna limfoblastična leukemija, mijelodisplastični sindrom, kronična mijeloična leukemija i mijelofibroza.

**U kategoriju „Limfoproliferativne bolesti“ uključene su Hodgkinov i ne-Hodgkinov limfom, kronična limfocitna leukemija te multipli mijelom.

***U kategoriju „Drugo“ uključeni su sarkomi i imunodeficijencije, aplastična anemija, paroksizmalna noćna hemoglobinurija i ostale dijagnoze.

**** Klinički dojam o aktivnosti bolesti zabilježen je u 120 pacijenata: 101 bolesnik s aktivnom bolesti (medijan starosti 46,5, raspon 5-71) i 19 bolesnika s neaktivnom bolesti (medijan starosti 25, raspon 7-66).

Iz izvađene krvi ispitanika određeni su laboratorijski parametri čiji je pregled dan u Tablici 5.

Tablica 5. Laboratorijski parametri američkih cGvHD bolesnika.

Laboratorijski parametri	Medijan (raspon)	Laboratorijski parametri	Medijan (raspon)
Sedimentacija eritrocita (mm/h)	16 (1-113)	Aspartat aminotransferaza (U/L)	31 (8-256)
Eritrociti (x10^12/L)	4,10 (0,29-62,80)	Alanin aminotransferaza(U/L)	40 (12-324)
Hemoglobin (g/L)	126 (84-180)	Gama-glutamiltransferaza (U/L)	81 (7-3077)
Hematocrit (L/L)	0,39 (0,22-0,54)	Kreatin kinaza (U/L)	56 (12-387)
Retikulociti (x10^9 /L)	62,70 (1,74-443)	Laktat dehidrogenaza (U/L)	212 (105-1078)
Leukociti (x10^9 /L)	7,55 (2,28-31,30)	Kalcij (mmol/L)	2,29 (1,54-2,84)
Limfociti (x10^9 /L)	1,34 (0,15-9,79)	CRP (mg/L)	18,75 (1,6-1600)

Neutrofili (x10^9 /L)	4,85 (0,86-333,09)	Feritin (µg/L)	409 (8-5604)
Eozinofili (x10^9 /L)	0,08 (0-91,07)	Ukupni kolesterol (mmol/L)	5,28 (0,03-261,71)
Trombociti (x10^9 /L)	251 (24-663)	Trigliceridi (mmol/L)	2,15 (0,33-9,46)
T limfociti (broj stanica)	800 (56-6775)	HDL (mmol/L)	1,47 (0,004-34,70)
Pomagački T limfociti (broj stanica)	377,50 (14-2420)	LDL (mmol/L)	3,03 (0,51-33,80)
Citotoksični T limfociti (broj stanica)	330 (29-4833)	Beta 2 mikroglobulin (mg/L)	2,10 (0,9-70,74)
B limfociti (broj stanica)	114 (0-6307)	Ukupni proteini (g/L)	65 (45-89)
NK stanice (broj stanica)	180,5 (14-996)	Albumin (g/L)	37 (21-300)
PV	1,30 (0,36-6,36)	IgG (g/L)	6,55 (0,98-33,8)
APTV (s)	29,60 (13,1-190,34)	IgA (g/L)	0,63 (0,05-4,81)
Glukoza (mmol/L)	5,99 (0,07-83,11)	IgM (g/L)	0,63 (0,06-6,47)
Bilirubin (µmol/L)	8,55 (1,71-285,50)	Reumatoidni faktor (nmol/L)	10 (10-288)
Ureja (mmol/L)	5,71 (0,14-297,40)	C3 (g/L)	1,35 (0,64-2,22)
Urat (µmol/L)	255,76 (2,69-594,80)	C4 (g/L)	0,28 (0,13-7,39)
Kreatinin (µmol/L)	72,50 (1,71-583,57)	TSH (mIJ/L)	1,36 (0,02-35,6)
Alkalna fosfataza (U/L)	98 (27-1004)	PTH (pmol/L)	4,28 (0,50-47,04)

Kratice: PV- protrombinsko vrijeme, APTV – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme, CRP - C reaktivni protein, HDL – kolesterol, lipoprotein velike gustoće (eng. *high density lipoprotein*), LDL – kolesterol, lipoprotein male gustoće (eng. *low density lipoprotein*), IgG – imunoglobulin G, IgA – imunoglobulin A, IgM – imunoglobulin M, C3 – komponenta komplementa 3, C4 – komponenta komplementa 4, TSH – tireotropni hormon (eng. *thyroid-stimulating hormone*), PTH - paratiroidni hormon

5.1.2. Karakteristike hrvatskih ispitanika (KBC Zagreb)

U hrvatskoj kohorti ispitanika sudjelovalo je 30 bolesnika s potvrđenom dijagnozom kroničnog GvHD-a nakon aloPKMS i 30 osoba bez kroničnog GvHD-a nakon aloPKMS (kontrolna skupina), sparenih po spolu i dobi. Svaku skupinu činilo je 14 žena i 16 muškaraca.

Kao i u američkoj kohorti, nitko od analiziranih 30 cGvHD bolesnika i 30 kontrola nije primio IVIg unutar tri mjeseca prije uključenja u studiju.

Skupina cGvHD bolesnika nije se statistički razlikovala od kontrolne skupine po spolu (53,3% muškaraca), dobi (medijan 41,5 naspram 40,5 godina), primarnoj bolesti (76,7% leukemije), mijeloablativnom kondicioniranju (53,3% naspram 56,7%), srodnosti darivatelja (63,3% srodnih) i izvoru KMS za presadbu (periferna krv 53,3% naspram 50%). Kod cGvHD bolesnika zabilježen je značajno veći broj slučajeva akutnog GvHD-a nego u kontrola (70,0% naspram 26,7%; p=0,001). Medijan vremena od cGvHD dijagnoze do pristupanja studiji bio je 164 dana, većina bolesnika imala je teški (50%) ili umjereni (40%) oblik kroničnog GvHD-a. Za 50% bolesnika klinička procjena je ukazivala na aktivnu bolest u trenutku evaluacije, a 53,3% bolesnika je primalo sistemsku imunosupresiju. Bolesnici su imali značajno niži broj B limfocita (p=0,027), niži albumin (p=0,005) i vitamin D (p=0,018), kao i viši GGT (p=0,004), CRP (p=0,040) i beta 2 mikroglobulin (p=0,049) nego kontrole.

Pregled demografskih i laboratorijskih karakteristika hrvatskih cGvHD bolesnika i kontrola prikazan je u Tablici 6 i 7.

Tablica 6. Demografske karakteristike hrvatskih cGvHD bolesnika i kontrola.

		Bolesnici		**Kontrolna skupina**	
Demografske karakteristike		**N**	**%**	**N**	**%**
Spol	Ženski	14	46,7%	14	46,7%
	Muški	16	53,3%	16	53,3%
Dob (godine) (medijan, raspon)		41,5 (9-60)		40,5 (11-59)	
Vrijeme od transplantacije do uključenja u studiju (dani) (medijan, raspon)		466 (61-7853)		675,5 (190-3369)	
Vrijeme od transplantacije do dijagnoze cGvHD (dani) (medijan, raspon)		286 (54-3886)		-	
Vrijeme od dijagnoze cGvHD do uključenja u studiju (dani) (medijan, raspon)		164 (1-7125)		-	
Primarna bolest	Leukemije	23	76,7%	23	76,7%
	Limfoproliferativne bolesti	3	10,0%	4	13,3%
	Drugo	4	13,3%	3	10,0%
Mijeloablativno kondicioniranje	Da	16	53,3%	17	56,7%
	Ne	14	46,7%	13	43,3%
	Nepoznato	0	0,0%	0	0,0%

Srodnost darivatelja	Srodan	19	63,3%	19	63,3%
	Nesrodan	11	36,7%	11	36,7%
Spol darivatelja	Ženski	17	56,7%	14	46,7%
	Muški	11	36,7%	13	43,3%
	Nepoznato	2	6,7%	3	10,0%
Izvor krvotvornih matičnih stanica	Koštana srž	14	46,7%	15	50,0%
	Periferna krv	16	53,3%	15	50,0%
	Krv iz pupkovine	0	0,0%	0	0,0%
Prethodni akutni GvHD	Da	21	70,0%	8	26,7%
	Ne	9	30,0%	21	70,0%
	Nepoznato	0	0,0%	1	3,0%
Karakterizacija kroničnog cGvHD-a		**N**	%	**N**	**%**
Nastup cGvHD-a	*De novo*	9	30,0%	-	-
	Progresivan	12	40,0%	-	-
	Miran	9	30,0%	-	-
	Nepoznato	0	0,0%	-	-
Klasifikacija cGvHD-a	Klasičan	25	83,3%	-	-
	Preklapajući	5	16,7%	-	-
	Nepoznato	0	0,0%	-	-
Linije sistemske terapije (medijan, raspon)	2 (0-4)			-	
Stupanj intenziteta imunosupresije	Nepostojeći	14	46,7%	-	-
	Blagi	1	3,0%	-	-
	Umjereni	11	36,7%	-	-
	Jaki	4	13,3%	-	-
Terapijska namjera u trenutku evaluacije	Smanjiti sistemsku terapiju (poboljšanje)	1	3,0%	-	-
	Ne mijenjati sistemsku terapiju (stabilna bolest)	10	33,3%	-	-
	Povećati sistemsku terapiju (pogoršanje)	8	26,7%	-	-
	Zamijeniti terapiju zbog toksičnosti	0	0%	-	-
	Promijeniti sistemsku terapiju zbog nedostatka odgovora	0	0%	-	-
	Ukinuti sistemsku terapiju zbog nedostatka odgovora	0	0%	-	-
	Nepoznato/Nije primjenjivo	11	36,7%	-	-
Klinički dojam aktivnosti cGvHD-a	Aktivna	15	50,0%	-	-
	Neaktivna	15	50,0%	-	-

	Nepoznato	0	0,0%	-	-
Organski sustavi zahvaćeni cGvHD-om	Koža	16	53,3%	-	-
	Usta	12	40,0%	-	-
	Oči	15	50,0%	-	-
	Jetra	11	36,7%	-	-
	Probavni sustav	5	16,7%	-	-
	Pluća	15	50,0%	-	-
	Zglobovi i fascije	7	23,3%	-	-
	Genitalni trakt (žene)	5	35,7%	-	-
Ukupna ocjena cGvHD-a	Blagi	3	10,0%	-	-
	Umjereni	12	40,0%	-	-
	Teški	15	50,0%	-	-
Prosječna ocjena cGvHD-a (medijan, raspon)	0,57 (0,125-1,750)			-	-
Broj organskih sustava zahvaćenih cGvHD-om (medijan, raspon)	2 (1-6)			-	-

Tablica 7. Usporedba laboratorijskih parametara hrvatskih ispitanika: a) cGvHD bolesnika i b) kontrola. Podebljane p-vrijednosti smatraju se statistički značajnima.

Laboratorijski parametri	Aritmetička sredina (raspon)	p	Laboratorijski parametri	Aritmetička sredina (raspon)	P
Sedimentacija eritrocita (mm/h)	a) 33,70 (4-110) b) 23,00 (2-54)	0,121	Aspartat aminotransferaza (U/L)	a) 52,86 (16-164) b) 32,90 (19-134)	0,083
Eritrociti (x10^12/L)	a) 4,20 (2,65-6,18) b) 4,35 (3,19-5,15)	0,265	Alanin aminotransferaza (U/L)	a) 54,00 (8-215) b) 36,11 (12-114)	0,064
Hemoglobin (g/L)	a) 129,03 (81-157) b) 137,67 (104-174)	0,072	Gama-glutamiltransferaza (U/L)	a) 127,50 (9-1356) b) 35,18 (6-88)	**0,004**
Hematocrit (L/L)	a) 0,39 (0,24-0,47) b) 0,41 (0,30-0,52)	0,146	Kreatin kinaza (U/L)	a) 79,93 (18-217) b) 141,48 (43-760)	0,058
MCV	a) 93,14 (62,40-113,60) b) 92,85 (82,10-101,60)	0,581	Laktat dehidrogenaza (U/L)	a) 213,53 (118-399) b) 187,37 (131,267)	0,052

Retikulociti (x10^9 /L)	a) 56,49 (0,07-210) b) 55,99 (0,03-181)	0,441	Kalcij (mmol/L)	a) 2,29 (1,84-2,47) b) 2,37 (2,21-2,55)	0,072
Leukociti (x10^9 /L)	a) 6,99 (1,20-13,70) b) 6,36 (1,40-12,80)	0,408	Vitamin D (nmol/L)	a) 41,25 (8-91) b) 55,54 (23-108)	**0,018**
Limfociti (x10^9 /L)	a) 2,22 (0,24-5,80) b) 2,19 (0,46-4,79)	0,870	CRP (mg/L)	a) 9,23 (0,30-8,40) b) 3,90 (0,30-19,40)	**0,040**
Neutrofili (x10^9 /L)	a) 3,45 (0,42-9,45) b) 6,77 (0,78-106,10)	0,660	Feritin (µg/L)	a) 1275,4 (5- 6319) b) 753,5 (5,25-2807)	0,379
Eozinofili (x10^9 /L)	a) 0,38 (0,06-3,75) b) 0,28 (0,04-2,98)	0,717	Ukupni kolesterol (mmol/L)	a) 5,39 (3,20-7,40) b) 5,03 (3-8)	0,303
Trombociti (x10^9 /L)	a) 211,83 (17-370) b) 176,59 (35-263)	0,083	Trigliceridi (mmol/L)	a) 2,03 (0,84-4,11) b) 1,64 (0,50-3,05)	0,100
T limfociti (broj stanica)	a) 1622,93 (149-4582) b) 1525,14 (353-4118)	1,000	HDL (mmol/L)	a) 1,33 (0,35-2,75) b)1,32 (0,71-2,65)	0,726
Pomagački T limfociti (broj stanica)	a) 493,21 (31-1792) b) 546,14 (133-2034)	0,555	LDL (mmol/L)	a) 3,13 (0,98-5,18) b) 3,14 (1,37-5,05)	0,869
Citotoksični T limfociti (broj stanica)	a) 1080,83 (113-3886) b) 911,03 (132-3591)	0,750	Beta 2 mikroglobulin (mg/L)	a) 3,25 (1,40-8) b) 2,32 (1,20-5,40)	**0,049**
B limfociti (broj stanica)	a) 281,17 (0-1044) b) 436,52 (53-1396)	**0,027**	Ukupni proteini (g/L)	a) 66,13 (31-95) b) 71,04 (62-81)	0,171
NK stanice (broj stanica)	a) 222,28 (15-1069) b) 297,34 (48-1342)	0,129	Albumin (g/L)	a) 39,24 (22,2-47,6) b) 44,35 (36,90-51,90)	**0,005**

PV	a) 1,08 (0,25-1,32) b) 1,29 (0,87-4,11)	0,847	IgG (g/L)	a) 9,87 (1,53-40,82) b) 10,86 (4,91-23,99)	0,240
APTV (s)	a) 25,35 (20,60-37,60) b) 25,35 (21,60-28,70)	0,595	IgA (g/L)	a) 1,24 (0,10- 3,79) b) 1,34 (0,36- 2,79)	0,383
Glukoza (mmol/L)	a) 5,39 (3,10-11,20) b) 4,94 (1,84-6,60)	0,974	IgM (g/L)	a) 1,03 (0,17-2,70) b) 1,07 (0,25-3,66)	0,897
Bilirubin (µmol/L)	a) 10,67 (3-47) b) 9,76 (3-25)	0,813	Reumatoidni faktor (nmol/L)	a) 14,37 (10-54) b) 36,07 (1,57-397,20)	0,115
Ureja (mmol/L)	a) 5,84 (2,40-12,70) b) 5,31 (2,04-12,10)	0,453	C3 (g/L)	a) 1,22 (0,58-1,68) b) 1,16 (0,48-2,28)	0,173
Urat (µmol/L)	a) 285,68 (188-446) b) 293,96 (150-448)	0,577	C4 (g/L)	a) 0,25 (0,10-0,48) b) 0,23 (0,10-0,45)	0,268
Kreatinin (µmol/L)	a) 92,29 (39-158) b) 84,66 (39-283)	0,097	TSH (mIJ/L)	a) 2,85 (0,08-10) b) 7,31 (0,05-100)	0,650
Alkalna fosfataza (U/L)	a) 117,13 (28-320) b) 96,41 (33-365)	0,234	PTH (pmol/L)	a) 3,76 (0,20-7,70) b) 4,36 (1,50-8,20)	0,326

Kratice: MCV – prosječni volumen eritrocita (eng. *mean corpuscular volume*), PV – protrombinsko vrijeme, APTV – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme, CRP – C reaktivni protein, HDL – kolesterol, lipoprotein velike gustoće (eng. *high density lipoprotein*), LDL – kolesterol, lipoprotein male gustoće (eng. *low density lipoprotein*), IgG – imunoglobulin G, IgA – imunoglobulin A, IgM – imunoglobulin M, C3 – komponenta komplementa 3, C4 – komponenta komplementa 4, TSH – tireotropni hormon (eng. *thyroid-stimulating hormone*), PTH – paratiroidni hormon

5.1.3. Usporedba američkih i hrvatskih cGvHD bolesnika

Usporedba američkih i hrvatskih bolesnika s kroničnim GvHD-om sa statistički značajnim razlikama prikazana je u Tablici 8.

U američkih bolesnika statistički značajno više se koristila periferna krv kao izvor matičnih stanica (77,9% naspram 53,3%, p=0,009), kasnije su uključeni u studiju u odnosu na aloPKMS (vrijeme od transplantacije: 1136 naspram 466 dana, p=0,001) i dijagnozu cGvHD-a (vrijeme od dijagnoze cGvHD-a: 756 naspram 164 dana, p<0,001) te su primili više linija sistemske terapije za cGvHD (medijan 4 (raspon 0-9) naspram 2 (0-4), p<0,001) nego hrvatski bolesnici. Američki bolesnici primali su statistički značajno veći stupanj intenziteta sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije (37,5% naspram 12,9%, p=0,001), značajno je manji broj slučajeva neaktivne bolesti (8,9% naspram 50,0%, p<0,001) i viša je ukupna NIH ocjena cGvHD-a (teški oblik 73,7% naspram 50,0%, p=0,004) s većim brojem organskih sustava zahvaćenih cGvHD-om (medijan 5 (raspon 1-8) naspram 2 (1-6), p<0,001).Statistički značajna razlika (p=0,002) vidljiva je i u parametru aktivnosti bolesti terapijske namjere.

Od brojnih laboratorijskih usporedbi američkih i hrvatskih cGvHD bolesnika za istaknuti je da su američki cGVHD bolesnici imali statistički značajno veći broj neutrofila (medijan 4,85 (raspon 0,7-333) naspram 3,18 (0,42-9,45), p<0,001), trombocita (medijan 251 (raspon 24-663) naspram 213,5 (17-370), p=0,021), viši CRP (medijan 18,75 (raspon 1,6-1600) naspram 3,25 (0,3-88,4), p<0,001), C3 (medijan 1,35 (raspon 0,64-2,22) naspram 1,26 (0,58-1,68), p=0,007) i C4 (medijan 0,28 (raspon 0,13-7,39) naspram 0,24 (0,1-0,48), p=0,043), niži albumin (medijan 37 (raspon 21-300) naspram 40,75 (22,2-47,6), p=0,002), imunoglobulin G (medijan 6,55 (raspon 0,98-33,8) naspram 9,1 (1,53-40,82), p=0,027), sedimentaciju eritrocita (medijan 16 (raspon 1-113) naspram 26 (4-110), p=0,003), ukupan broj limfocita (medijan 1,34 (raspon 0,15-9,79) naspram 1,68 (0,24-5,8), p=0,012) i eozinofila (medijan 0,08 (raspon 0-91) naspram 0,15 (0,06-3,75), p=0,002), kao i niži ukupni broj T limfocita (medijan 800 (raspon 56-6775) naspram 1286 (149-4582), p=0,003) i citotoksičnih T limfocita (medijan 330 (raspon 29-4833) naspram 952 (113-3886), p<0,001). Ostali laboratorijski parametri koji su se statistički značajno razlikovali između američkih i hrvatskih cGVHD bolesnika prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. Usporedba američkih i hrvatskih cGvHD bolesnika (statistički značajne razlike: demografski i klinički parametri, zahvaćenost organskih sustava i ocjena težine bolesti, laboratorijski parametri).

		cGvHD bolesnici (SAD)		cGvHD bolesnici (HRV)		p-vrijednost
Karakteristika		**N**	**%**	**N**	**%**	
Izvor krvotvornih matičnih stanica	Koštana srž	41	19,3%	14	46,7%	**0,009**
	Periferna krv	166	77,9%	16	53,3%	
	Krv iz pupkovine	6	2,8%	0	0,0%	
Vrijeme od transplantacije do uključenja u studiju (dani) (medijan, raspon)		1136 (131-7746)		466 (61-7853)		**0,001**
Vrijeme od dijagnoze cGvHD do uključenja u studiju (dani) (medijan, raspon)		756 (0-6545)		164 (1-7125)		**<0,001**
Linije sistemske terapije (medijan, raspon)		4 (0-9)		2 (0-4)		**<0,001**
Intenzitet sistemske imunosupresije	Nepostojeći	46	21,6%	15	48,4%	**0,001**
	Blagi	18	8,5%	1	3,2%	
	Umjereni	69	32,4%	11	35,5%	
	Jaki	80	37,5%	4	12,9%	
Klinički dojam o aktivnosti bolesti	Aktivna	101	47,4%	15	50,0%	**<0,001**
	Neaktivna	19	8,9%	15	50,0%	
	Nepoznato	93	43,7%	0	0,0%	
Terapijska namjera u trenutku evaluacije	Smanjiti sistemsku terapiju (poboljšanje)	21	9,9%	1	3,0%	**0,002**
	Ne mijenjati sistemsku terapiju (stabilna bolest)	51	23,9%	10	33,3%	
	Povećati sistemsku terapiju (pogoršanje)	60	28,2%	8	26,7%	
	Zamijeniti terapiju zbog toksičnosti	13	6,1%	0	0%	
	Promijeniti sistemsku terapiju zbog nedostatka odgovora	31	14,5%	0	0%	
	Ukinuti sistemsku terapiju zbog nedostatka odgovora	2	1,0%	0	0%	
Organski sustavi zahvaćeni cGvHD-om	Koža	163	76,5%	16	53,3%	**0,004**
	Usta	141	66,2%	12	40,0%	**0,011**
	Oči	166	77,9%	15	50,0%	**<0,001**

	Jetra	111	52,1%	11	36,7%	**0,019**
	Probavni sustav	92	43,2%	5	16,7%	**0,033**
	Pluća	164	76,9%	15	48,4%	**0,001**
	Zglobovi i fascije	130	61,0%	7	23,3%	**0,001**
	Genitalni trakt (samo žene)	53	57,6%	5	33,3%	0,262
Ukupna NIH ocjena cGvHD-a	Blagi	4	1,9%	3	10,0%	**0,004**
	Umjereni	52	24,4%	12	40,0%	
	Teški	157	73,7%	15	50,0%	
Prosječna ocjena (medijan, raspon)		1,13 (0,125-2,143)		0,57 (0,125-1,750)		**<0,001**
Broj organskih sustava zahvaćenih cGvHD-om		5 (1-8)		2 (1-6)		**<0,001**

Laboratorijski parametri	**Medijan (raspon)**	**Medijan (raspon)**	**p-vrijednost**
Sedimentacija eritrocita (mm/h)	16 (1-113)	26 (4-110)	**0,003**
Neutrofili (x10^9 /L)	4,85 (0,7-333)	3,18 (0,42-9,45)	**<0,001**
Limfociti (x10^9 /L)	1,34 (0,15-9,79)	1,68 (0,24-5,8)	**0,012**
Eozinofili (x10^9 /L)	0,08 (0-91)	0,15 (0,06-3,75)	**0,002**
Retikulociti (x10^9 /L)	62,7 (1,74-443)	54 (0,07-210)	**0,009**
Trombociti (x10^9 /L)	251 (24-663)	213,5 (17-370)	**0,021**
T limfociti (broj stanica)	800 (56-6775)	1286(149-4582)	**0,003**
Citotoksični T limfociti (broj stanica)	330 (29-4833)	952 (113-3886)	**<0,001**
PV	1,3 (0,36-6,36)	1,13 (0,25-1,32)	**<0,001**
APTV (s)	29,6 (13,1-190,3)	24,8 (20,6-37,6)	**<0,001**
Glukoza (mmol/L)	5,99 (0,07-83,11)	4,8 (3,1-11,2)	**0,001**
Kreatinin (µmol/L)	72,5 (1,71-583,5)	87,5 (39-158)	**0,010**
Gama-glutamiltransferaza (U/L)	81 (7-3077)	47,5 (9-1536)	**0,026**

CRP (mg/L)	18,75 (1,6-1600)	3,25 (0,3-88,4)	**<0,001**
Albumin (g/L)	37 (21-300)	40,75 (22,2-47,6)	**0,002**
IgG (g/L)	6,55 (0,98-33,8)	9,1 (1,53-40,82)	**0,027**
IgM (g/L)	0,625(0,06-6,47)	1,01 (0,17-2,7)	**0,013**
Beta-2-mikroglobulin	2,1 (0,9-70,7)	2,5 (1,4-8)	**0,046**
Reumatoidni faktor (nmol/L)	10 (10-288)	10,1 (10-54)	**<0,001**
C3 (g/L)	1,35 (0,64-2,22)	1,26 (0,58-1,68)	**0,007**
C4 (g/L)	0,28 (0,13-7,39)	0,24 (0,1-0,48)	**0,043**

Kratice: MCV – prosječni volumen eritrocita (eng. *mean corpuscular volume*), HDL – kolesterol, lipoprotein velike gustoće (eng. *high density lipoprotein*), LDL – kolesterol, lipoprotein male gustoće (eng. *low density lipoprotein*), CRP - C reaktivni protein, PV-protrombinsko vrijeme, APTV – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme, C3 – komponenta komplementa 3, C4 – komponenta komplementa 4, IgG – imunoglobulin G, IgA – imunoglobulin A, IgM – imunoglobulin M, TSH – tireotropni hormon (eng. *thyroid-stimulating hormone*), PTH – paratiroidni hormon

5.2. Rezultati analize glikozilacije imunoglobulina G američkih cGvHD bolesnika

5.2.1. Rezultati analize glikana UPLC metodom

Od brojnih rezultata univarijatne analize pojedinih glikanskih struktura i deriviranih glikanskih parametara analiziranih UPLC metodom u odnosu na NIH ocjene težine cGvHD-a pojedinih organskih sustava, aktivnosti bolesti i intenziteta imunosupresije američkih cGvHD pacijenata, u Tablicama 9 i 10 te na Slikama 12 i 13 prikazani su značajni rezultati, dok su sve analize prikazane u Dodatku u Tablici D2.

Statistički su analizirani i sljedeći demografski podaci u usporedi s rezultatima glikanske analize metodom UPLC: izvor KMS, spol i srodnost donora, HLA podudarnost, tip kondicioniranja i primjena zračenja (TBI), primjena DLI, raniji akutni GvHD te nastup i klasifikacija cGvHD-a. Budući da statistička analiza nije pokazala značajne rezultate, oni nisu prikazani.

5.2.1.1. Težina (stupanj) kroničnog GvHD-a pojedinih zahvaćenih organskih sustava

Statistički značajne p-vrijednosti uočene su pri usporedbi glikana cGvHD bolesnika s i bez zahvaćenih zglobova/fascije s cGVHD-om, i to pri usporedbi cGvHD bolesnika bez zahvaćenosti zglobova/fascije naspram onih s ocjenom 1 (blagim), s ocjenom 2 (umjerenim) ili ocjenom 3 (teškim) cGvHD-om zglobova/fascije. Rezultati direktnih mjerenja kao i derivirana svojstva pokazuju značajno smanjenje udjela galaktoziliranih struktura (Tablica 9). Promjena je često uočena u dva ili sva tri stupnja težine zahvaćenosti zglobova i fascija cGvHD-om (GP8, NIH 2 p=0,0045; GP9, NIH 2 p=0,0182; GP14, NIH 1 p=0,0228, NIH 2 p=0,0028, NIH 3 p=0,0028; GP15, NIH 2 p=0,0386; GP18 NIH 1 p=0,0360, NIH 2 p=0,0252; IGP47, NIH 2 p=0,0045; IGP48, NIH 2 p=0,0086; IGP53, NIH 1 p=0,0230, NIH 2 p=0045, NIH 3 p=0,0182; IGP55, NIH 1 p=0,0419, NIH 2 p=0,0057, NIH 3 p=0,0360; IGP54, NIH 2 p=0,0457; IGP56, NIH 2 p=0,0028, NIH 3 p=0,0435; IGP57, NIH 1 p=0,0315, NIH 2 p=0,0237) (Tablica 9). Ista analiza ukazala je i na porast udjela agalaktoziliranih struktura (GP4, NIH 1 p=0,0340, NIH 2 p=0,0182; IGP43, NIH 1 p= 0,0360, NIH 2 p=0,0058 i NIH 3 p=0,0435). Statistički značajno veća je učestalost direktno mjerenih struktura s račvajućim GlcNAc i deriviranih parametara koji upućuju na porast njegovog udjela (GP6, NIH 2 p=0,0420; IGP36, NIH 2=0,0237, NIH 3 p=0,0045; IGP37, NIH 2 p=0,0253, NIH 3 p=0,0028; IGP38, NIH 2 p=0,0253, NIH 3 p=0,0028; IGP39, NIH 2 p=0,0435; IGP40, NIH 2 p=0,0435; IGP45 NIH 2 p=0,0433; IGP74 NIH 1 p=0,0440, NIH 2 p=0,0352, NIH 3 p=0,0352; IGP75 NIH1 p=0,0440, NIH 2 p=0,0352, NIH 3 p=0,0352). Zabilježen je i porast udjela sijaliniziranih struktura (IGP25, NIH 3 p=0,0182; IGP29 NIH 2 p=0,0182; IGP30, NIH 2 p=0,0252, NIH 3 p=0,0253; IGP31, NIH 3 p=0,0339; IGP33, NIH 3 p=0,0355), kao i pad udjela fukoziliranih struktura kroz sva tri stupnja težine cGvHD-a zglobova/fascija (F, NIH 1 p=0,0435, NIH 2 p=0,0182, NIH 3 p=0,0420; IGP76 NIH 1 p=0,0435, NIH 2 p=0,0228, NIH 3 p=0,0333; IGP77, NIH 2 p=0,0228, NIH 3 p=0,0404) (Tablica 9).

Značajne razlike uočene su i kod cGvHD bolesnika s i bez cGvHD-a kože i to pri usporedbi cGvHD bolesnika bez dijagnoze cGvHD-a kože naspram onih s ocjenom 3, i pri usporedbi cGvHD bolesnika s cGvHD-om kože ocjene 1 (blagi) naspram onih s ocjenom 3 (teški cGvHD kože). Kod bolesnika s cGvHD-om kože statistički je značajno povećan udio struktura s račvajućim GlcNAc-om (IGP36, p=0,0474; IGP37, p=0,0474; IGP38, p=0,0474). Značajno veći udio primjećen je i kod disijalinizirane

strukture IGP30 (p=0,0474), dok GP9, monogalaktozilirana struktura pokazuje suprotan trend (p=0,0474) (Tablica 9). U ostalim univarijatnim analizama pojedinih glikanskih struktura i deriviranih glikanskih parametara analiziranih UPLC metodom u odnosu na NIH ocjene težine cGvHD-a pojedinih organskih sustava i ukupnu NIH ocjenu cGvHD-a nisu nađene statistički značajne razlike (Dodatak, Tablica D2).

Tablica 9. Prikaz značajnih rezultata univarijatne analize pojedinih glikanskih struktura i deriviranih glikanskih parametara analiziranih UPLC metodom u odnosu na NIH ocjene težine cGvHD-a pojedinih organskih sustava (zglobova/fascija i kože) američkih cGvHD bolesnika.

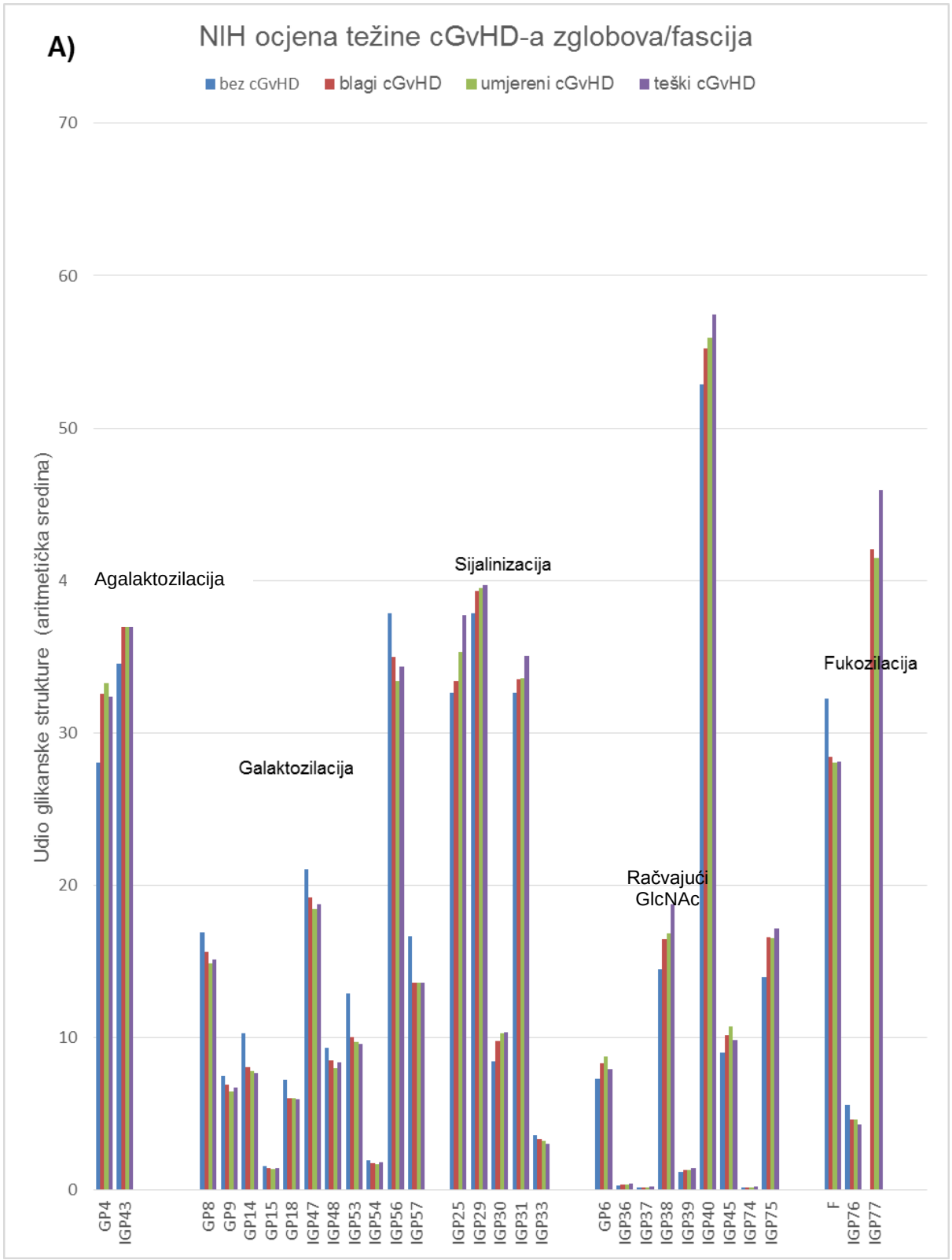
Težina (stupanj) kroničnog GvHD-a				
NIH ocjena cGvHD-a zglobova/fascija: **(0) Nepostojeći); (1) Blagi; (2) Umjereni; (3) Teški**				
Glikani	**Usporedba NIH ocjena 0-1**	**Usporedba NIH ocjena 0-2**	**Usporedba NIH ocjena 0-3**	**Promjena**
	p-vrijednost			
GP4	**0,0400**	**0,0182**	0,0888	↑
GP6	0,2125	**0,0420**	0,4417	↑
GP8	0,0934	**0,0045**	0,0994	↓
GP9	0,4725	**0,0182**	0,1385	↓
GP14	**0,0228**	**0,0028**	**0,0028**	↓
GP15	0,4005	**0,0386**	0,4725	↓
GP18	**0,0360**	**0,0252**	0,0545	↓
IGP25	0,9330	0,5347	**0,0182**	↑
IGP29	0,2365	**0,0182**	0,2634	↑
IGP30	0,0994	**0,0252**	**0,0253**	↑
IGP31	0,4417	0,2250	**0,0339**	↑
IGP33	0,1271	0,0567	**0,0355**	↓
IGP36	0,0810	**0,0237**	**0,0045**	↑

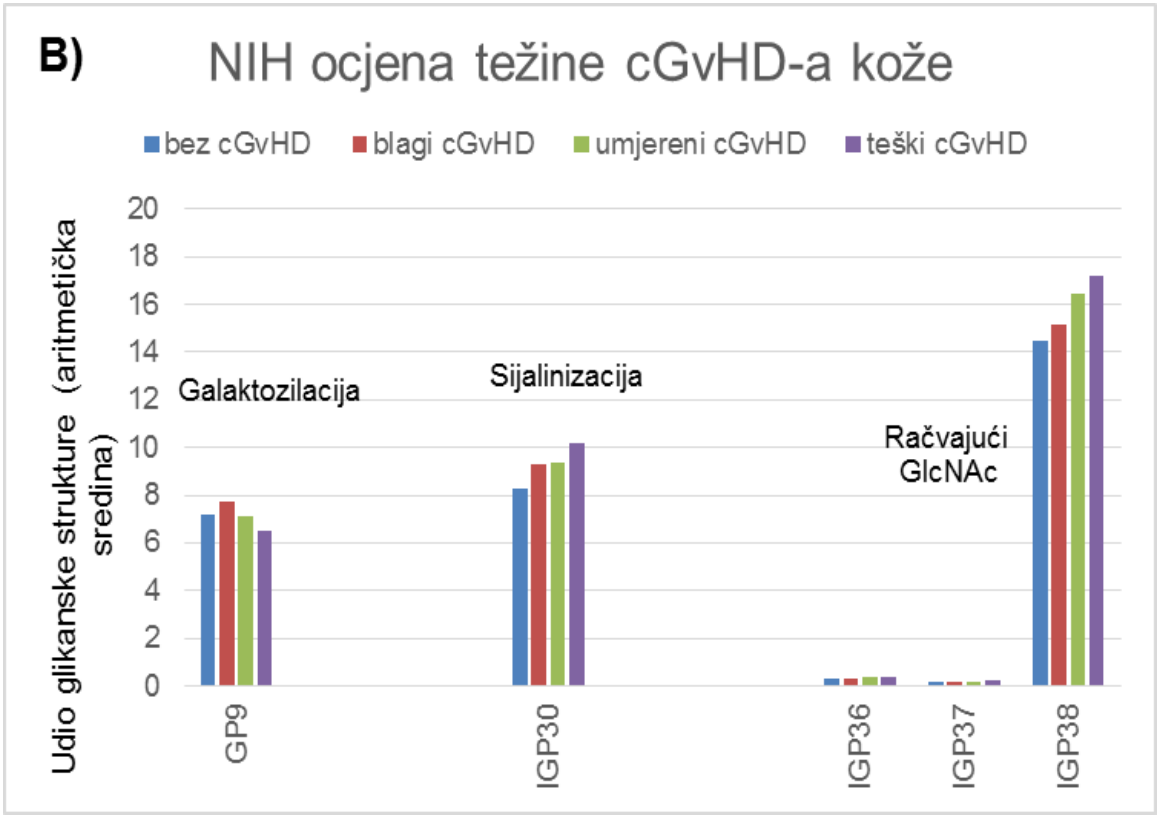
IGP37	0,1300	**0,0253**	**0,0028**	↑
IGP38	0,1300	**0,0253**	**0,0028**	↑
IGP39	0,3991	**0,0435**	0,0637	↑
IGP40	0,3991	**0,0435**	0,0637	↑
IGP43	**0,0360**	**0,0058**	**0,0435**	↑
IGP45	0,2548	**0,0433**	0,5352	↑
IGP47	0,0639	**0,0045**	0,0801	↓
IGP48	0,3371	**0,0086**	0,1645	↓
IGP53	**0,0230**	**0,0045**	**0,0182**	↓
IGP54	0,3557	**0,0457**	0,5206	↓
IGP55	**0,0419**	**0,0057**	**0,0360**	↑
IGP56	0,0702	**0,0028**	**0,0435**	↓
IGP57	**0,0315**	**0,0237**	0,0548	↓
IGP74	**0,0440**	**0,0352**	**0,0352**	↑
IGP75	**0,0440**	**0,0352**	**0,0352**	↑
IGP76	**0,0435**	**0,0228**	**0,0333**	↓
IGP77	0,0586	**0,0228**	**0,0404**	↑
F	**0,0435**	**0,0182**	**0,0420**	↓

NIH ocjena cGvHD-a kože: **(0) Nepostojeći); (1) Blagi; (2) Umjereni; (3) Teški**				
Glikani	**NIH ocjena**	**NIH ocjena**	**Promjena**	**p-vrijednost**
IGP36	0	3	↑	0,0474
IGP37	0	3	↑	0,0474
IGP38	0	3	↑	0,0474
IGP30	0	3	↑	0,0474

GP9	1	3	↓	0,0474

Kratice: GPXX – glikanski pik, XX – broj između 1 i 24, B, F, G0, G1, G2, S, IGPXX – derivirani parametar, XX – broj između 24-77. ↑ povišeno, ↓ sniženo.





Slika 12. Grafički prikaz statistički značajnih razlika direktno mjerenih i deriviranih parametara (UPLC) – NIH ocjena zglobova/fascija i kože. A) NIH ocjena težine cGvHD-a zglobova/fascija; B) NIH ocjena težine cGvHD-a kože; GP – glikanski pik, IGP – derivirano svojstvo.

5.2.1.2. Aktivnost kroničnog GvHD-a

Pri usporedbi glikana američkih cGvHD bolesnika u kojih je bolest opisana kao aktivna u odnosu na neaktivnu bolest također su uočene statistički značajne razlike. Primjećeno je da neaktivnu bolest obilježava manji udio agalaktoziliranih struktura (GP4, p=0,0432; GP6, p=0,0192; IGP45, p=0,0217; IGP55, p=0,0218), kao i veći udio galaktoziliranih struktura (mono-: GP9, p=0,0222; GP18, p=0,0192; IGP47, p=0,0222; IGP48, p=0,0192; IGP56, p=0,0218 i digalaktoziliranih: G2, p=0,0192; GP14, p=0,0304; IGP53, p=0,0218; IGP57, p=0,0222). Veći je udio sijaliniziranih struktura (S, p=0,0192; GP16, p=0,0192; GP23, p=0,0192; IGP26, p=0,0192; IGP27, p=0,0218) kao i fukoziliranih (F, p=0,0247; IGP64, p=0,0477) dok je zabilježeno manje struktura s račvajućim GlcNAc-om (IGP37, p=0,0218; IGP38, p=0,0218; IGP68, p=0,0484).

U američkoj cGvHD populaciji primjećene su i statistički značajne promjene pri usporedbi bolesnika bez sistemske imunosupresije naspram onih s umjerenim odnosno jakim intenzitetom imunosupresije (Tablica 10). Razlike između cGvHD bolesnika bez sistemske imunosupresije i onih s umjerenim intenzitetom vidljive su u porastu udjela agalaktoziliranih struktura (GP1, p=0,0012; GP3, p=0,0042; GP5, p=0,0151; IGP41, p=0,0012; IGP44, p=0,0359) te u padu galaktoziliranih i sijaliniziranih struktura u bolesnika s umjerenim stupnjem imunosupresije (GP18, p=0,0362; GP23, p=0,0360). Iste promjene vidljive su i pri usporedbi cGvHD bolesnika bez sistemske imunosupresije naspram onih s jakim intenzitetom sistemske imunosupresije gdje je također primjećen porast udjela pikova GP1 (p=0,0012), GP3 (p=0,0012), GP5 (p=0,0077), IGP41 (p=0,0012) i IGP44 (p=0,0179) te pad GP18 (p=0,0012) i GP23 (p=0,0033), ali i IGP26 (p=0,0042) koji predstavljaju agalaktozilirane strukture. U bolesnika s jakim intenzitetom imunosupresije u odnosu na one bez imunosupresije pad udjela galaktoziliranih struktura vidljiv je i u padu udjela parametara G2 (p=0,0061), GP14 (p=0,0045), IGP47 (p=0,0268), IGP53 (p=0,0042) i IGP57 (p=0,0039), dok je uočljiv porast agalaktoziliranih struktura (GP4, p=0,0259; IGP43, p=0,0251; IGP55, p=0,0151). Povećan je udio pikova i deriviranih parametara koji predstavljaju udio i učestalost glikanskih struktura s račvajućim GlcNAc-om (GP11, p=0,0359; IGP39, p=0,0089; IGP40, p=0,0089; IGP69, p=0,0042; IGP74, p=0,0151; IGP75, p=0,0151). Uočen je i smanjeni udio fukozilacije (F, p=0,0063; IGP76, p=0,0174; IGP77, p=0,0268) (Tablica 10). Nije nađena statistički značajna povezanost između pojedinih glikanskih struktura i deriviranih glikanskih parametara u odnosu na terapijsku namjeru u trenutku evaluacije (podaci nisu prikazani).

Tablica 10. Prikaz značajnih rezultata univarijatne analize pojedinih glikanskih struktura i deriviranih glikanskih parametara analiziranih UPLC metodom u odnosu na klinički dojam o aktivnosti bolesti i intenziteta imunosupresije američkih cGvHD bolesnika.

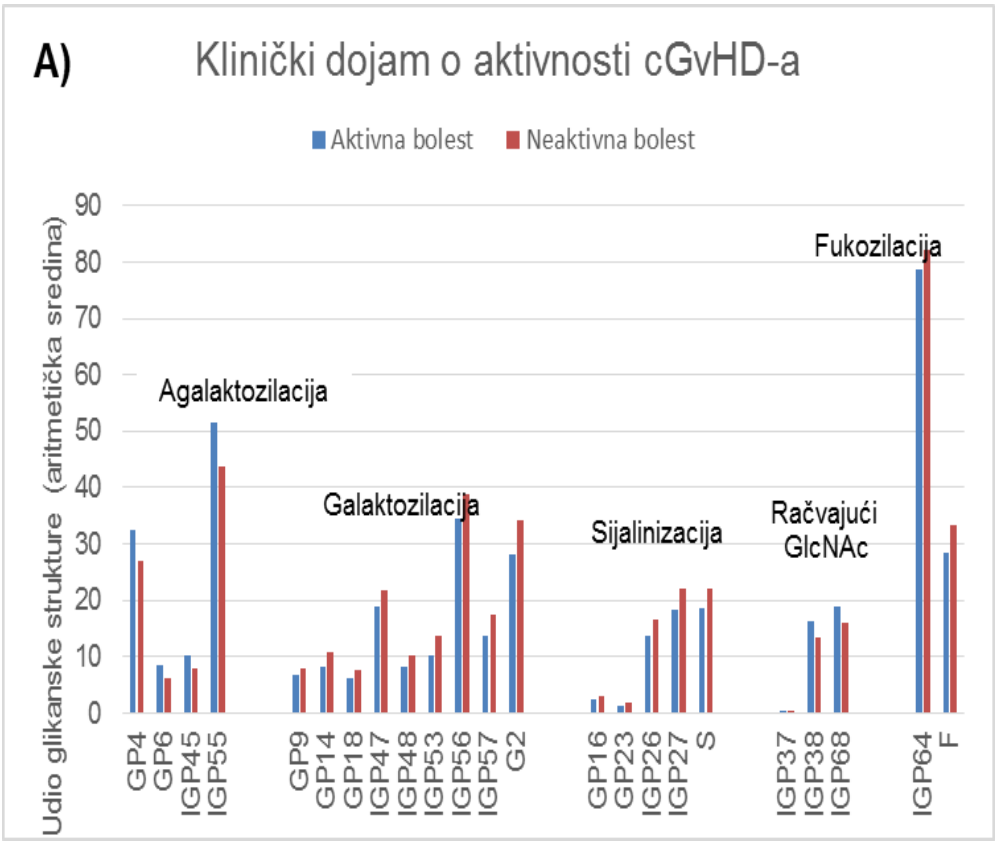
Aktivnost kroničnog GvHD-a				
Klinički dojam o aktivnosti bolesti **(1) Aktivna bolest; (2) Neaktivna bolest**				
Glikani	**Klinički dojam o aktivnosti bolesti**	**Klinički dojam o aktivnosti bolesti**	**Promjena**	**p-vrijednost**
GP23	1	2	↑	0,0192
G2	1	2	↑	0,0192
IGP48	1	2	↑	0,0192
GP6	1	2	↓	0,0192
S	1	2	↑	0,0192
IGP26	1	2	↑	0,0192
GP16	1	2	↑	0,0192
GP18	1	2	↑	0,0192
IGP45	1	2	↓	0,0217
IGP55	1	2	↓	0,0218
IGP27	1	2	↑	0,0218
IGP37	1	2	↓	0,0218
IGP38	1	2	↓	0,0218
IGP56	1	2	↑	0,0218
IGP53	1	2	↑	0,0218
GP9	1	2	↑	0,0222
IGP57	1	2	↑	0,0222
IGP47	1	2	↑	0,0222
F	1	2	↑	0,0247
GP14	1	2	↑	0,0304

GP4	1	2	↓	0,0433
IGP64	1	2	↑	0,0477
IGP68	1	2	↓	0,0484

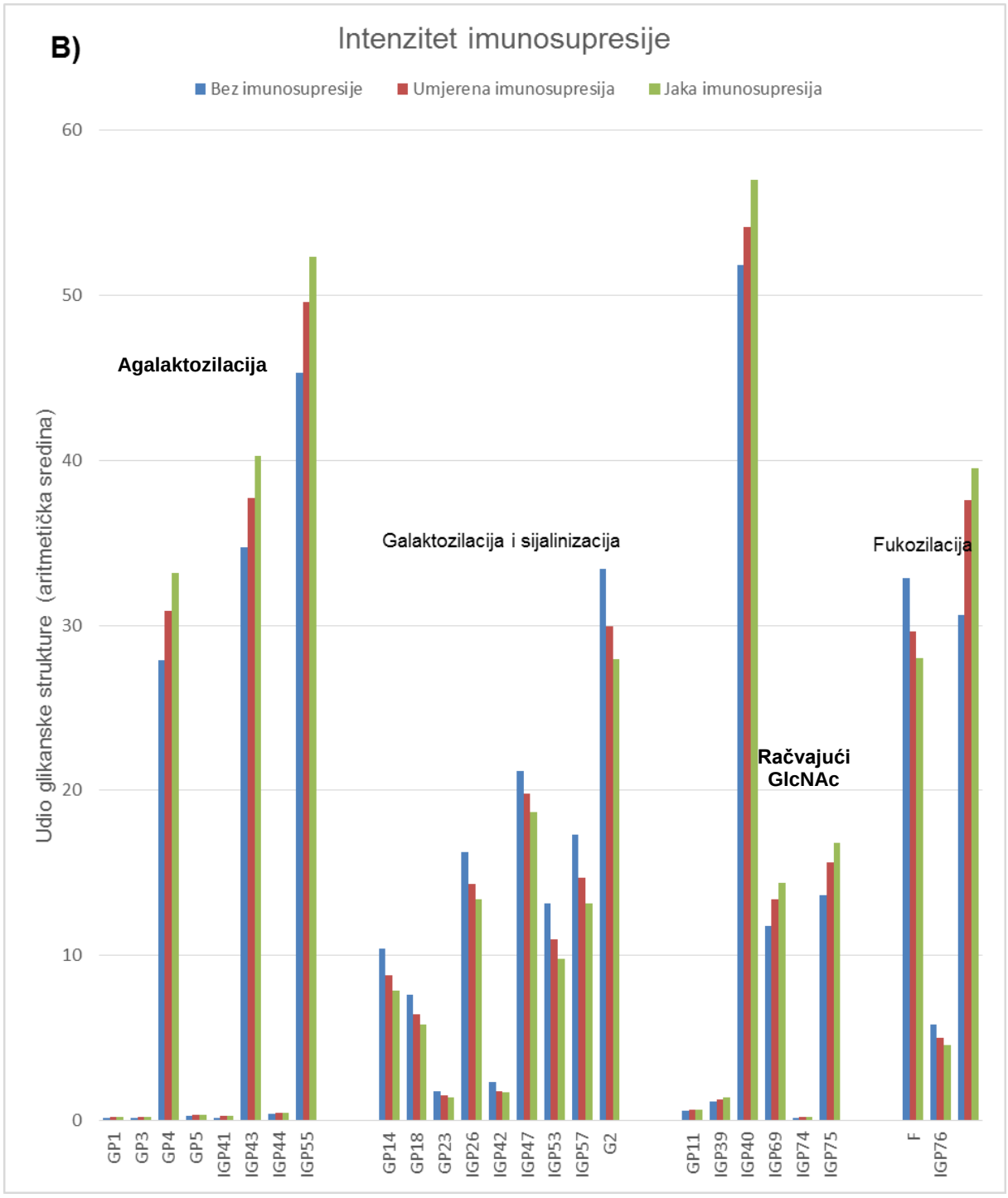
Intenzitet sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije **(1) Bez sistemske imunosupresije; (2) Blaga sistemska imunosupresija; (3) Umjerena sistemska imunosupresija; (4) Jaka sistemska imunosupresija**				
Glikani	**Intenzitet sistemske imunosupresije**	**Intenzitet sistemske imunosupresije**	**Promjena**	**p-vrijednost**
GP3	1	4	↑	0,0012
GP1	1	3	↑	0,0012
IGP41	1	3	↑	0,0012
GP1	1	4	↑	0,0012
IGP41	1	4	↑	0,0012
GP18	1	4	↓	0,0012
GP23	1	4	↓	0,0033
IGP57	1	4	↓	0,0039
IGP26	1	4	↓	0,0042
GP3	1	3	↑	0,0042
IGP53	1	4	↓	0,0042
IGP69	1	4	↑	0,0042
GP14	1	4	↓	0,0045
G2	1	4	↓	0,0061
F	1	4	↓	0,0063
GP5	1	4	↑	0,0077
IGP39	1	4	↑	0,0089

IGP40	1	4	↑	0,0089
IGP55	1	4	↑	0,0151
GP5	1	3	↑	0,0151
IGP74	1	4	↑	0,0151
IGP75	1	4	↑	0,0151
IGP76	1	4	↓	0,0174
IGP44	1	4	↑	0,0179
IGP43	1	4	↑	0,0251
GP4	1	4	↑	0,0259
IGP77	1	4	↑	0,0268
IGP47	1	4	↓	0,0268
IGP44	1	3	↑	0,0359
GP11	1	4	↑	0,0359
GP23	1	3	↓	0,0359
GP18	1	3	↓	0,0362

Kratice: GPXX – glikanski pik, XX – broj između 1 i 24, B, F, G0, G1, G2, S, IGPXX – derivirani parametar, XX – broj između 24-77. ↑ povišeno, ↓ sniženo.



Slika 13. Grafički prikaz statistički značajnih razlika direktno mjerenih i deriviranih parametara (UPLC) – aktivnost cGvHD-a. A) Klinički dojam o aktivnosti bolesti. GP – glikanski pik, IGP – derivirano svojstvo.



Slika 13. Grafički prikaz statistički značajnih razlika direktno mjerenih i deriviranih parametara (UPLC) – aktivnost cGvHD-a. B) Stupanj intenziteta imunosupresije. GP – glikanski pik, IGP – derivirano svojstvo.

5.2.2. Rezultati analize glikopeptida LC/MS metodom

Od brojnih rezultata univarijatne analize pojedinih glikopeptidnih struktura i deriviranih parametara analiziranih LC/MS metodom u odnosu na NIH ocjene težine cGvHD-a pojedinih organskih sustava, aktivnosti bolesti i intenziteta imunosupresije američkih bolesnika u Tablicama 11 i 12 te na Slikama 14 i 15 prikazani su značajni rezultati, dok su sve analize prikazane u Dodatku u Tablici D3.

Statistički su analizirani i sljedeći demografski podaci u usporedi s rezultatima glikanske analize metodom LC/MS: izvor KMS, spol i srodnost donora, HLA podudarnost, tip kondicioniranja i primjena zračenja (TBI), primjena DLI, raniji akutni GvHD te nastup i klasifikacija cGvHD-a. Budući da statistička analiza nije pokazala značajne rezultate, oni nisu prikazani.

5.2.2.1. Težina (stupanj) kroničnog GvHD-a pojedinih zahvaćenih organskih sustava

Statistički značajne razlike uočene su pri usporedbi glikopeptida cGvHD bolesnika bez cGvHD zglobova/fascija u odnosu na bolesnike s blagim (IgG4_G2FS, p=0,0241; IgG2_G0F, p=0,0392), umjerenim (IgG1_G2F, p=0,0138; IgG1_G2FS, p=0,0213; IgG2_G0F, p=0,0213; IgG2_G1F, p=0,0241; IgG1_G0F, p=0,0241, IgG2_G2F, p=0,0241; IgG4_G2F, p=0,0320; IgG4_G2FN, p=0,0320; IgG4_G2FS, p=0,0320) te teškim cGvHD-om zglobova/fascija (IgG1_G2FS, p=0,0296; IgG2_G0F, p=0,0320). Zabilježen je pad u udjelu di- i monogalaktoziliranih, kao i sijaliniziranih struktura u svim podklasama IgG-a. Istovremeno, uočen je porast udjela agalaktoziliranih struktura. Iste trendove potvrđuje i analiza deriviranih svojstava s posebnim naglaskom na podklase IgG1 i IgG2 (IgG1_dG0, p=0,0241; IgG1_dG1, p=0,0320; IgG1_dG2, p=0,0320; IgG2_dG0, p=0,0392; IgG1_dG2, p=0,0422).

Pri usporedbi cGvHD bolesnika s blagim i teškim oblikom cGvHD-a kože uočen je statistički značajan pad u udjelu digalaktozilirane fukozilirane strukture podklase IgG4 (IgG4_G2F, p=0,0217).

U ostalim univarijatnim analizama pojedinih glikanskih struktura i deriviranih glikanskih parametara analiziranih LC/MS metodom u odnosu na NIH ocjene težine

cGvHD-a pojedinih organskih sustava i ukupnu NIH ocjenu cGvHD-a nisu nađene statistički značajne razlike (Dodatak, Tablica D3).

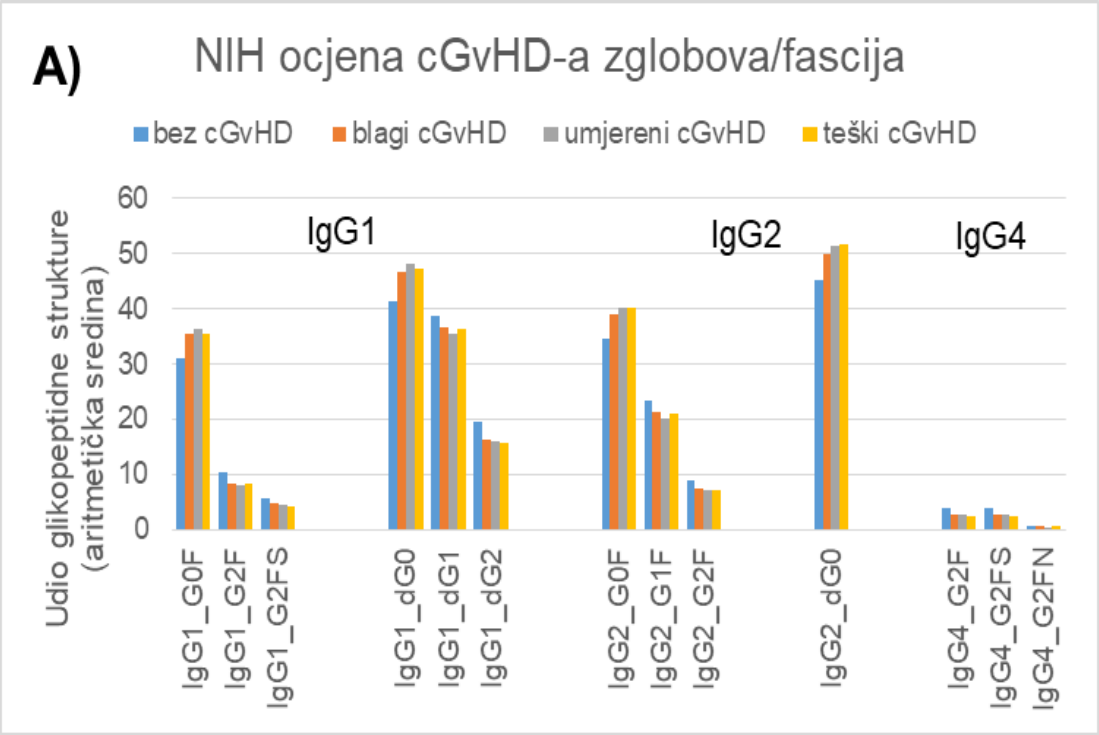
Tablica 11. Prikaz značajnih rezultata univarijatne analize pojedinih glikopeptidnih struktura i deriviranih parametara analiziranih LC/MS metodom u odnosu na NIH ocjene težine cGvHD-a pojedinih organskih sustava (zglobova/fascija i kože) američkih cGvHD bolesnika.

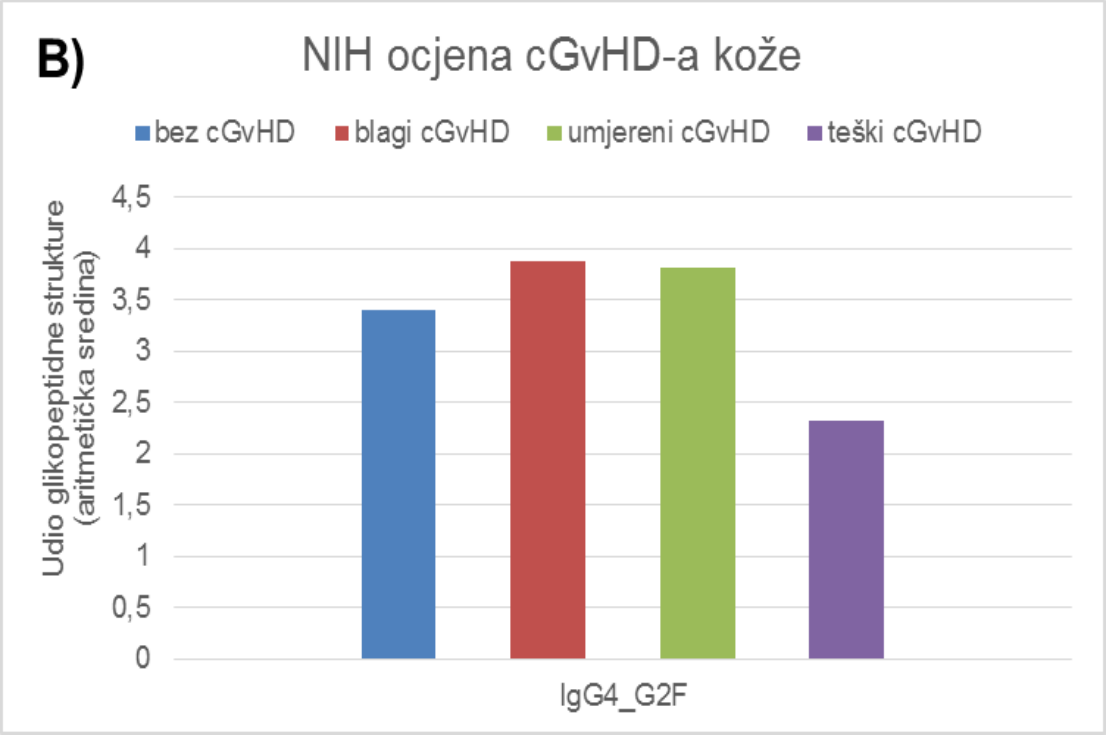
Težina (stupanj) kroničnog GvHD-a				
NIH ocjena cGvHD-a zglobova/fascija: **(0) Nepostojeći); (1) Blagi; (2) Umjereni; (3) Teški**				
Glikopeptid	**NIH ocjena**	**NIH ocjena**	**Promjena**	**p-vrijednost**
IgG1_G2F	0	2	↓	0,0138
IgG1_G2FS	0	2	↓	0,0213
IgG2_G0F	0	2	↑	0,0213
IgG2_G1F	0	2	↓	0,0241
IgG1_dG0	0	2	↑	0,0241
IgG4_G2FS	0	1	↓	0,0241
IgG1_G0F	0	2	↑	0,0241
IgG2_G2F	0	2	↓	0,0241
IgG1_G2FS	0	3	↓	0,0296
IgG1_dG1	0	2	↓	0,0320
IgG1_dG2	0	2	↓	0,0320
IgG4_G2F	0	2	↓	0,0320
IgG2_G0F	0	3	↑	0,0320
IgG4_G2FN	0	2	↓	0,0320

IgG4_G2FS	0	2	↓	0,0320
IgG2_dG0	0	2	↑	0,0392
IgG2_G0F	0	1	↑	0,0392
IgG1_dG2	0	3	↓	0,0422

NIH ocjena cGvHD-a kože: **(0) Nepostojeći); (1) Blagi; (2) Umjereni; (3) Teški**				
Glikopeptid	**NIH ocjena**	**NIH ocjena**	**Promjena**	**p-vrijednost**
IgG4_G2F	1	3	↓	0,0217

Kratice: IgGX – podklasa IgG-a, X – broj između 1 i 4. U glikanskoj strukturi, malo d označava izračunato derivirano svojstvo. ↑ povišeno, ↓ sniženo.





Slika 14. Grafički prikaz statistički značajnih razlika direktno mjerenih i deriviranih parametara (LC/MS) - NIH ocjena zglobova/fascija i kože. A) Težina (stupanj) cGvHD-a zglobova/fascija; B) Težina (stupanj) cGvHD-a kože. IgGX – podklasa IgG-a, X – broj između 1 i 4. U glikanskoj strukturi, malo d označava izračunato derivirano svojstvo.

5.2.2.2. Aktivnost kroničnog GvHD-a

Analizirajući klinički dojam o aktivnosti bolesti, utvrđena je statistički značajno manja koncentracija agalaktozilirane strukture podklase IgG4 (IgG4_G0, p=0,0485) u neaktivnoj bolesti.

Značajno smanjenje udjela digalaktozilirane fukozilirane sijalinizirane strukture primjećen je u svim podklasama IgG-a u cGvHD bolesnika s jakim intenzitetom imunosupresije (IgG1_G2FS, p=0,0011; IgG2_G2FS, p=0,0063; IgG4_G2FS, p=0,0127) naspram onih bez sistemske imunosupresije. Pri usporedbi te dvije skupine cGvHD bolesnika zabilježen je i pad udjela digalaktozilirane strukture IgG2_G2 (p=0,0236) u onih s jakim intenzitetom imunosupresije. Smanjenje udjela primjećen je i kod IgG2_G2N (p=0,0384), kao i kod IgG4_G1FS strukture, ali ovaj put i pri umjerenom i jakom stupnju intenziteta imunosupresije (p=0,0320 odnosno p=0,0374). Jedina direktno mjerena struktura koja pokazuje značajni porast udjela je IgG4_G2NS (p=0,0472). Derivirana svojstva pokazuju značajan pad udjela digalaktoziliranih i sijaliniziranih struktura kod podklasa IgG1 i IgG2 (IgG1_dS,

p=0,0011; IgG1_dG2, p=0,0056; IgG2_dS, p=0,0241; IgG2_dG2, p=0,0326), dok agalaktozilirane strukture IgG1 bilježe porast (IgG1_dG0, p=0,0327) (Tablica 12).

Nije nađena nikakva statistički značajna povezanost između pojedinih glikopeptidnih struktura i deriviranih parametara analiziranih LC/MS metodom u odnosu na terapijsku namjeru u trenutku evaluacije (podaci nisu prikazani).

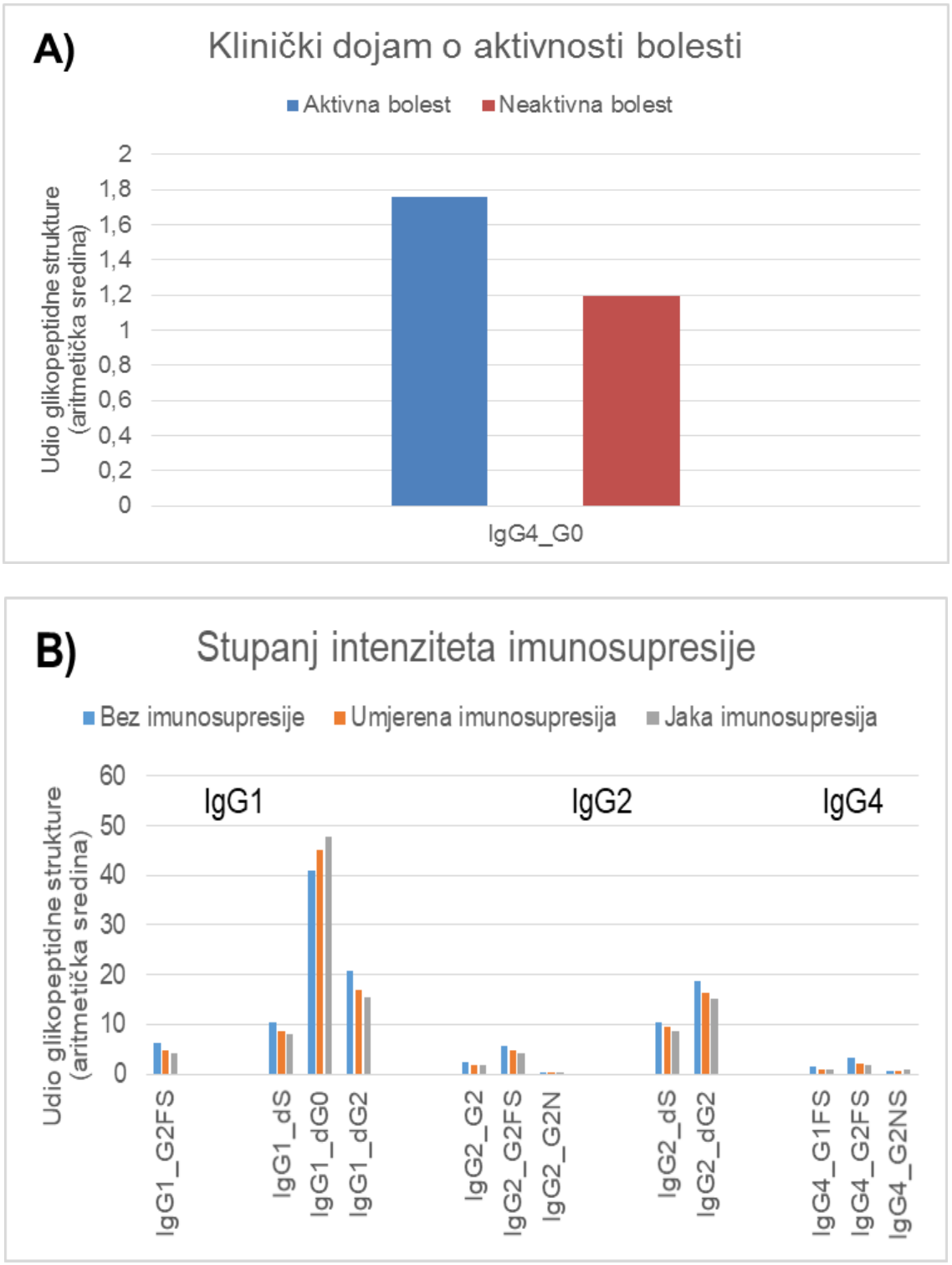
Tablica 12. Prikaz značajnih rezultata univarijatne analize pojedinih glikopeptidnih struktura i deriviranih parametara analiziranih LC/MS metodom u odnosu na klinički dojam o aktivnosti bolesti i intenzitet imunosupresije američkih cGvHD bolesnika.

Aktivnost kroničnog GvHD-a				
Klinički dojam o aktivnosti bolesti **(1) Aktivna bolest; (2) Neaktivna bolest**				
Glikopeptid	**Klinički dojam o aktivnosti bolesti**	**Klinički dojam o aktivnosti bolesti**	**Promjena**	**p-vrijednost**
IgG4_G0	1	2	↑	0,0485

Intenzitet sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije				
(1) Bez sistemske imunosupresije; (2) Blaga sistemska imunosupresija; (3) Umjerena sistemska imunosupresija; (4) Jaka sistemska imunosupresija				
Glikopeptid	**Intenzitet sistemske imunosupresije**	**Intenzitet sistemske imunosupresije**	**Promjena**	**p-vrijednost**
IgG1_G2FS	1	4	↓	0,0011
IgG1_dS	1	4	↓	0,0011
IgG1_dG2	1	4	↓	0,0056
IgG2_G2FS	1	4	↓	0,0063
IgG4_G2FS	1	4	↓	0,0127
IgG2_G2	1	4	↓	0,0236

IgG2_dS	1	4	↓	0,0241
IgG2_dG2	1	4	↓	0,0326
IgG1_dG0	1	4	↑	0,0327
IgG4_G1FS	1	3	↓	0,0327
IgG4_G1FS	1	4	↓	0,0374
IgG2_G2N	1	4	↓	0,0384
IgG4_G2NS	1	4	↑	0,0472

Kratice: IgGX – podklasa IgG-a, X – broj između 1 i 4. U glikanskoj strukturi, malo d označava izračunato derivirano svojstvo. ↑ povišeno, ↓ sniženo.



Slika 15. Grafički prikaz statistički značajnih razlika direktno mjerenih i deriviranih parametara (LC/MS) – aktivnost cGvHD-a. A) Klinički dojam o aktivnosti bolesti; B) Stupanj intenziteta imunosupresije. IgGX – podklasa IgG-a, X – broj između 1 i 4. U glikanskoj strukturi, malo d označava izračunato derivirano svojstvo.

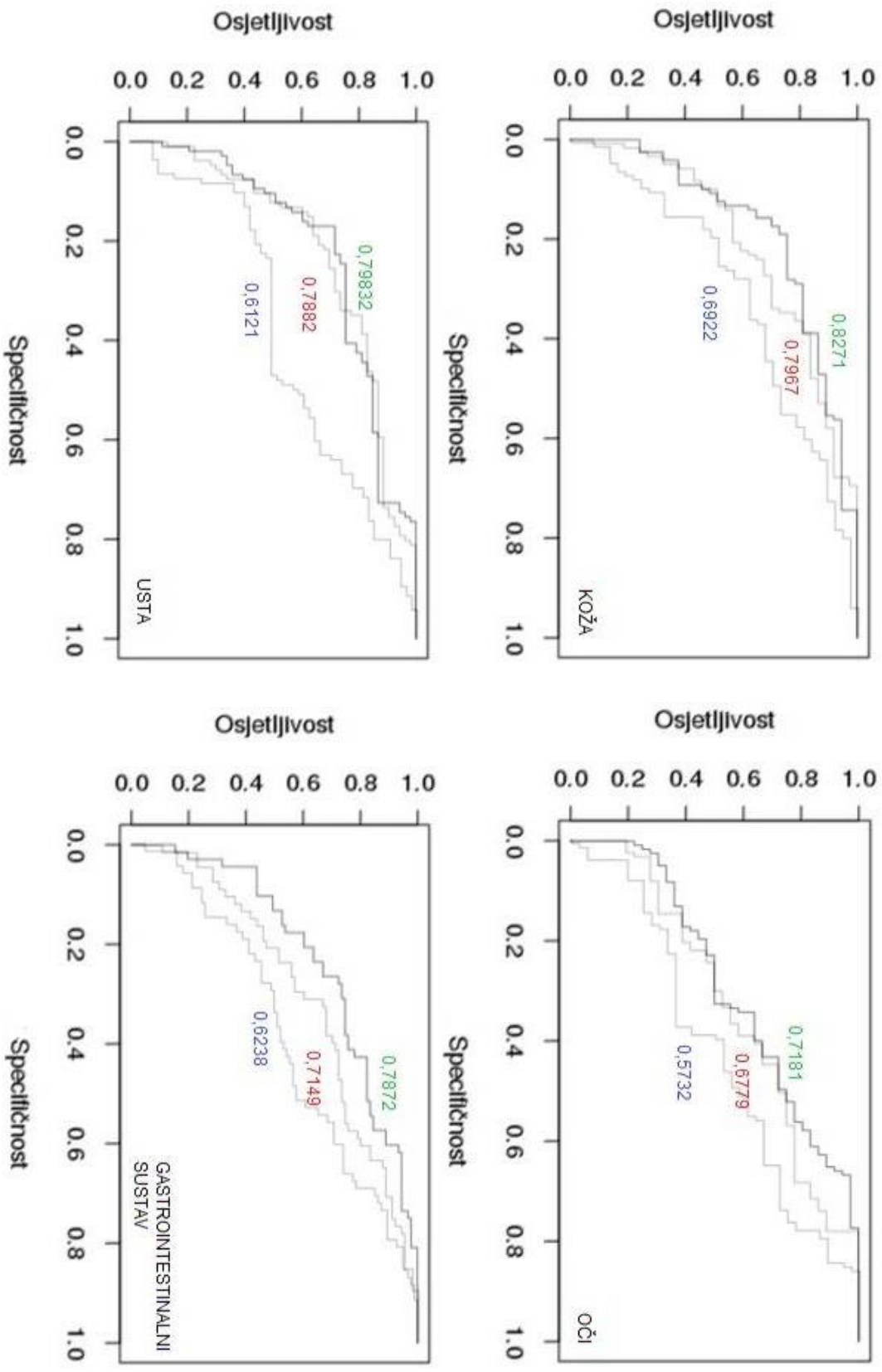
5.2.3. ROC analiza parametara težine i aktivnosti bolesti

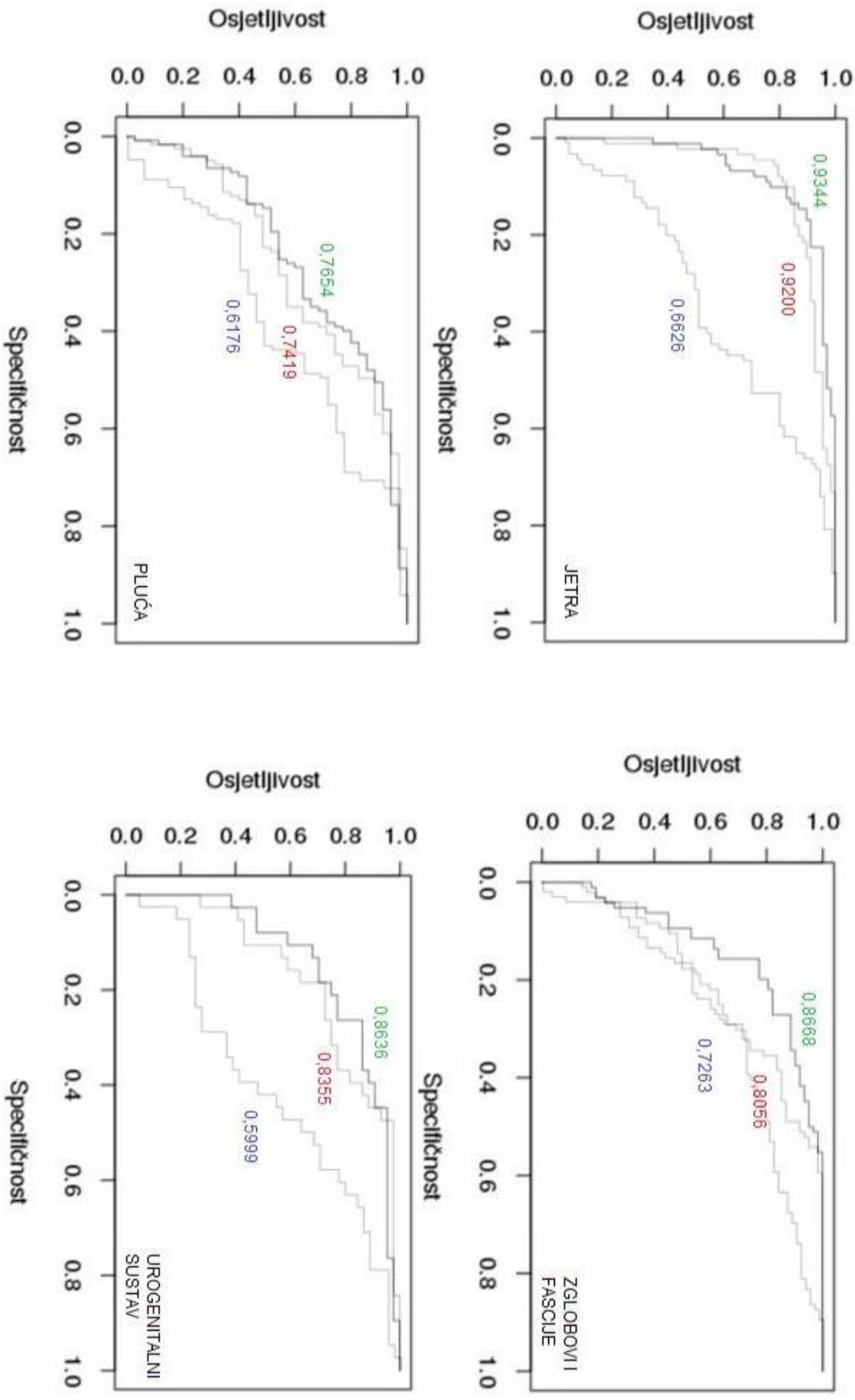
Kako bismo usporedili učinkovitost glikana kao potencijalne dijagnostičke pretrage za zahvaćenost pojedinih organskih sustava cGvHD-om, kao i za aktivnost bolesti, specifičnost i osjetljivost glikanskih mjerenja prikazani su ROC krivuljama te uspoređeni s modelom koji uključuje laboratorijske parametre, dobivene ekstenzivnom laboratorijskom obradom prilikom evaluacije bolesti. Pretragom literature određeni su parametri za koje je utvrđena važnost za diskriminativnu analizu (albumin, CRP, broj trombocita te eozinofila, C3, C4), dok je ostatak sveden na nekorelirane varijable metodom PCA (vidjeti poglavlje 4.7.). U analizu ROC krivuljama uključen je i model koji objedinjuje glikane s laboratorijskim parametrima.

5.2.3.1. ROC krivulje rezultata analize glikana UPLC metodom

5.2.3.1.1. Težina cGvHD-a pojedinih organskih sustava

ROC krivulje glikana pomoću glavnih komponenti pokazuju sljedeće rezultate: koža (0,6922), usta (0,6121), oči (0,5732), gastrointestinalni sustav (0,6238), jetra (0,6626), pluća (0,6176), zglobovi/fascije (0,7263) i urogenitalni sustav u žena (0,5999). Nadogradnja modela građenog pomoću glavnih komponenti laboratorijskih parametara u model koji uključuje glikane pokazuje povećanje površine ispod ROC krivulje svih pojedinačnih organskih sustava zahvaćenih cGvHD-om: koža (0,7967 → 0,8271), usta (0,7882 → 0,7932), oči (0,6779 → 0,7181), gastrointestinalni sustav (0,7149 → 0,7872), jetra (0,9200 → 0,9344), pluća (0,7419 → 0,7654), zglobovi/fascije (0,8056 → 0,8668) i urogenitalni sustav u žena (0,8355 → 0,8636). ROC krivulje prikazane su na Slici 16.


Osjetljivost
Specifičnost
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
KOŽA
0,8271
0,7967
0,6922
USTA
0,79832
0,7882
0,6121
OČI
0,7181
0,6779
0,5732
GASTROINTESTINALNI SUSTAV
0,7872
0,7149
0,6238

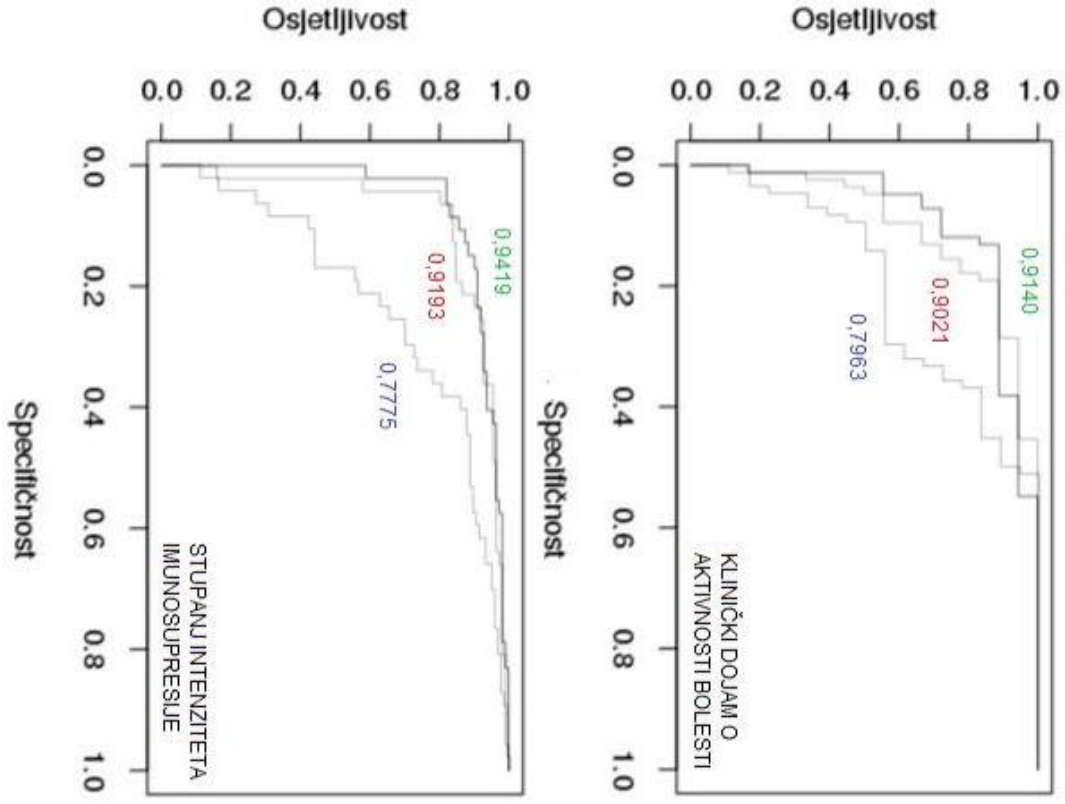


Slika 16. Usporedba površina ispod ROC krivulja za diskriminativne modele pojedinih organskih sustava zahvaćenih cGvHD-om: (crveno) laboratorijski parametri pomoću glavnih komponenti, (plavo) glikani (UPLC) i (zeleno) model koji objedinjuje laboratorijske parametre

i glikanska mjerenja (pomoću glavnih komponenti). Pripadajuća površina naznačena je odgovarajućom bojom ispod ROC krivulje.

5.2.3.1.2. Aktivnost cGvHD-a

ROC krivulje osnovnog modela glikanskih mjerenja za aktivnost cGvHD-a pokazuju sljedeće rezultate: 0,7953 za klinički dojam o aktivnosti bolesti i 0,7775 za stupanj intenziteta imunosupresije. Nadogradnja modela građenog pomoću glavnih komponenti laboratorijskih parametara u model koji uključuje glikane pokazuje povećanje površine ispod ROC krivulje za parametre aktivnosti cGvHD-a: klinički dojam o aktivnosti bolesti (0,9021 → 0,9140) i stupanj intenziteta imunosupresije (0,9192 → 0,9418). ROC krivulje prikazane su na Slici 17.

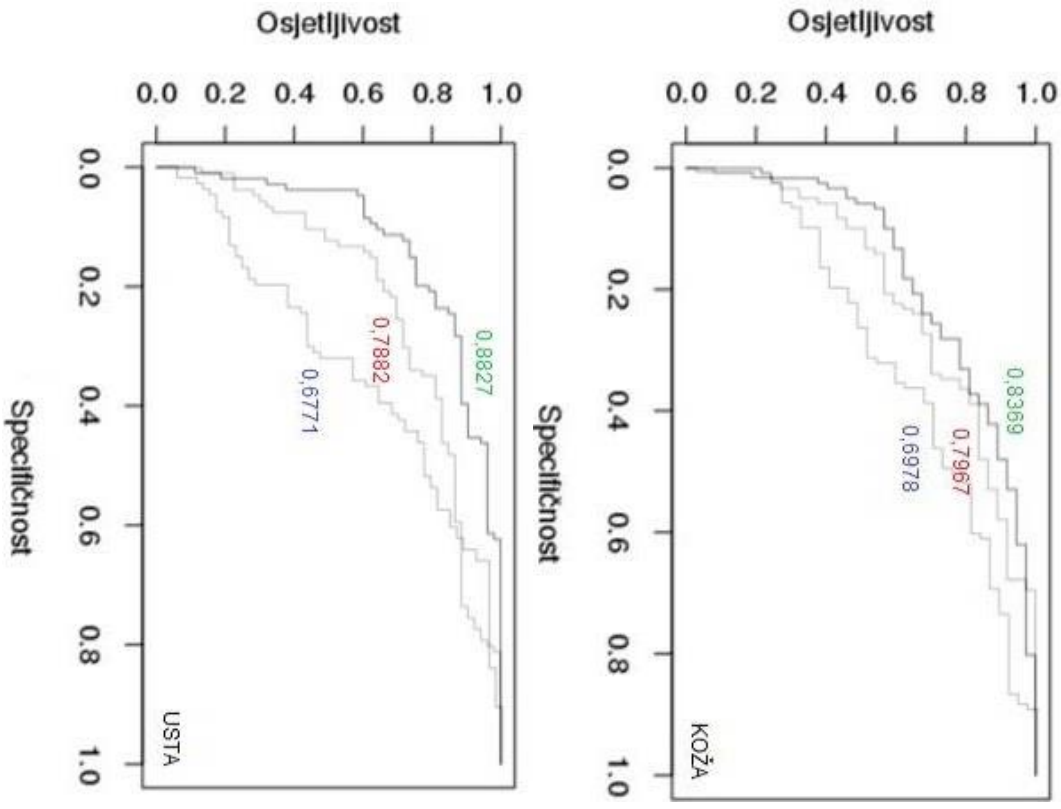


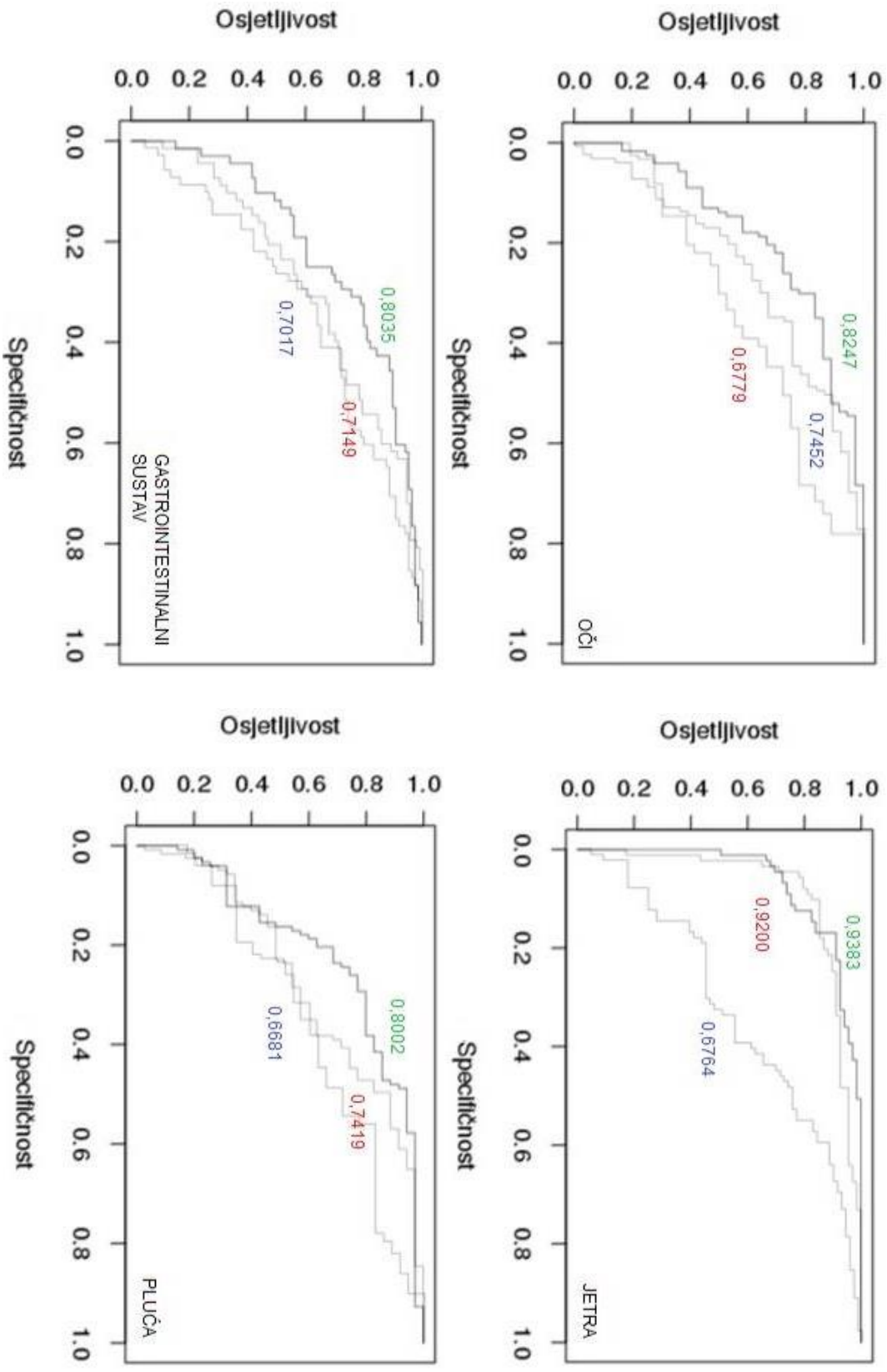
Slika 17. Usporedba površina ispod ROC krivulja za diskriminativne modele aktivnosti cGvHD-a: (crveno) laboratorijski parametri pomoću glavnih komponenti, (plavo) glikani (UPLC) i (zeleno) model koji objedinjuje laboratorijske parametre i glikanska mjerenja (pomoću glavnih komponenti). Pripadajuća površina naznačena je odgovarajućom bojom ispod ROC krivulje.

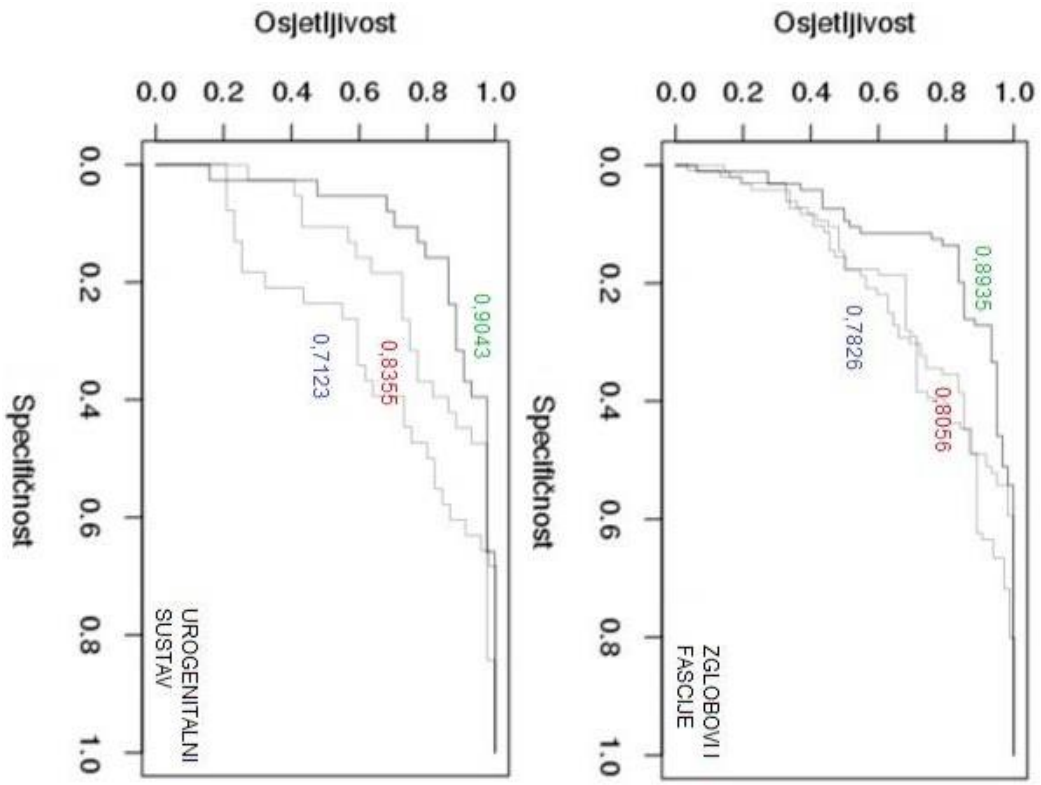
5.2.3.2. ROC krivulje rezultata analize glikopeptida LC/MS metodom

5.2.3.2.1. Težina cGvHD-a pojedinih organskih sustava

ROC krivulje glikopeptida pomoću glavnih komponenti pokazuju sljedeće rezultate: koža (0,6978), usta (0,6771), oči (0,7452), gastrointestinalni sustav (0,7017), jetra (0,6764), pluća (0,6681), zglobovi/fascije (0,7826) i urogenitalni sustav u žena (0,7123). Nadogradnja modela građenog pomoću glavnih komponenti laboratorijskih parametara u model koji uključuje glikopeptide pokazuje povećanje površine ispod ROC krivulje pojedinačnih organskih sustava zahvaćenih cGvHD-om: koža (0,7967→ 0,8369), usta (0,7882 → 0,8827), oči (0.6779 → 0.8247), gastrointestinalni sustav (0,7149 → 0,8035), jetra (0,9200 → 0,9383), pluća (0.7419 → 0,8002), zglobovi/fascije (0,8056 → 0,8935) i urogenitalni sustav u žena (0,8355 → 0,9043). ROC krivulje prikazane su na Slici 18.



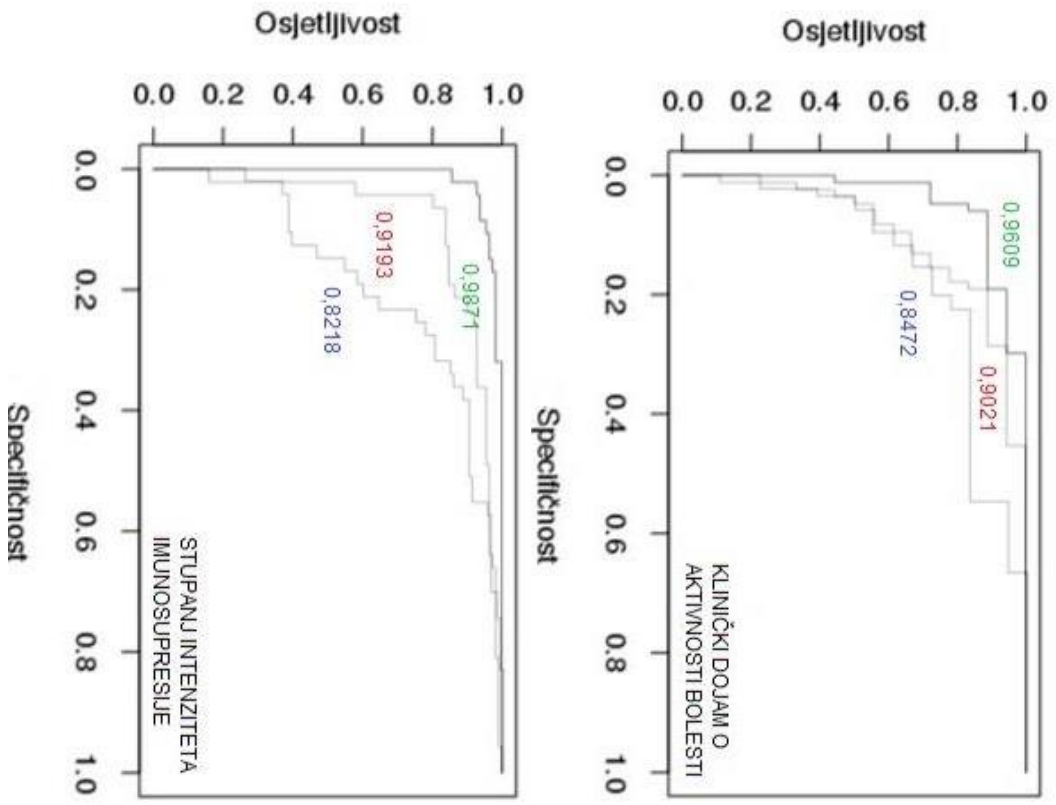

Osjetljivost
Specifičnost
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
OČI
0,8247
0,7452
0,6779
GASTROINTESTINALNI SUSTAV
0,8035
0,7017
0,7149
JETRA
0,9383
0,9200
0,6764
PLUĆA
0,8002
0,6681
0,7419



Slika 18. Usporedba površina ispod ROC krivulja za diskriminativne modele pojedinih organskih sustava zahvaćenih cGvHD-om: (crveno) laboratorijski parametri pomoću glavnih komponenti, (plavo) glikopeptidi (LC/MS) i (zeleno) model koji objedinjuje laboratorijske parametre i glikopeptidna mjerenja (pomoću glavnih komponenti). Pripadajuća površina naznačena je odgovarajućom bojom ispod ROC krivulje.

5.2.3.2.2. Aktivnost cGvHD-a

ROC krivulje glikana pomoću glavnih komponenti za parametre aktivnosti cGvHD-a pokazuju sljedeće rezultate: klinički dojam o aktivnosti bolesti (0,8472) i stupanj intenziteta imunosupresije (0,8218). Nadogradnja modela građenog pomoću glavnih komponenti laboratorijskih parametara u model koji uključuje glikopeptide pokazuje povećanje površine ispod ROC krivulje za parametre aktivnosti cGvHD-a: klinički dojam o aktivnosti bolesti (0,9021 → 0,9609) i stupanj intenziteta imunosupresije (0,9193 → 0,9871). ROC krivulje prikazane su na Slici 19.



Slika 19. Usporedba površina ispod ROC krivulja za diskriminativne modele aktivnosti cGvHD-a: (crveno) laboratorijski parametri pomoću glavnih komponenti, (plavo) glikopeptidi (LC/MS) i (zeleno) model koji objedinjuje laboratorijske parametre i glikopeptidna mjerenja (pomoću glavnih komponenti). Pripadajuća površina naznačena je odgovarajućom bojom ispod ROC krivulje.

5.3. Rezultati analize glikozilacije imunoglobulina G parova hrvatskih ispitanika

5.3.1. Rezultati analize uzoraka UPLC metodom

5.3.1.1. Usporedba glikana cGvHD bolesnika naspram kontrolnih ispitanika

Logističkom regresijom provedena je analiza diskriminacijske vrijednosti glikana mjerenih metodom UPLC pri usporedbi cGvHD bolesnika i kontrolnih ispitanika hrvatske populacije. Logistička regresija pojedinih glikanskih struktura izdvojila je glikan GP1 kao statistički značajan te je opravdano pretpostaviti da ta glikanska struktura ima značajnu ulogu u diskriminacijskoj analizi. Pregled svih rezultata dan je u Tablici 13.

Odnos broja varijabli i broja uzoraka (sparenih) ne dopušta izravnu multivarijantu analizu ukupnih glikana. Pri logističkoj regresiji samih glikana pomoću glavnih

komponenti, kao i samih laboratorijskih parametara pomoću glavnih komponenti uspješno je izgrađen model, no nema statistički značajnih rezultata (nisu prikazani). Pri kombiniranoj logističkoj regresiji s glikanskim strukturama i laboratorijskim parametrima pomoću glavnih komponenti nije dobiveno stabilno rješenje, odnosno model nije konvergirao.

Tablica 13. Rezultati logističke regresije pojedinih glikanskih struktura hrvatske populacije (UPLC). Podebljane p-vrijednosti smatraju se statistički značajnima.

Oznaka glikanske strukture	Procjena	Standardna devijacija	p-vrijednost
GP1	-19,2476	0,0000	**0,0298**
GP9	0,4424	1,5565	0,0632
GP10	0,6219	1,8625	0,0686
GP16	0,9741	2,6488	0,1129
GP5	-8,5827	0,0002	0,1737
GP23	0,8806	2,4123	0,2194
GP11	3,2136	24,8677	0,2335
GP15	0,9240	2,5195	0,2584
GP8	0,1083	1,1144	0,2909
GP4	-0,0299	0,9705	0,3229
GP14	0,0742	1,0771	0,3249
GP2	-0,1938	0,8238	0,3298
GP3	-6,7853	0,0011	0,3383
GP18	0,1010	1,1063	0,3464
GP21	-0,7321	0,4809	0,3985
GP19	0,6472	1,9102	0,4001
GP13	-1,8481	0,1575	0,4179
GP7	-0,3519	0,7033	0,4451
GP17	-0,4308	0,6500	0,4559

GP22	-0,8644	0,4213	0,4601
GP12	-0,1314	0,8768	0,6022
GP20	-0,6351	0,5299	0,6532
GP6	-0,0449	0,9561	0,7111
GP24	-0,0308	0,9697	0,9629

Kratice: GPXX – glikanski pik (eng. *glycan peak*), XX – broj između 1 i 24.

5.3.2. Rezultati analize uzoraka LC/MS metodom

5.3.2.1. Usporedba glikopeptida cGvHD bolesnika naspram kontrolnih ispitanika

Logističkom regresijom provedena je analiza diskriminacijske vrijednosti glikopeptida mjerenih metodom LC/MS pri usporedbi cGvHD bolesnika i kontrolnih ispitanika hrvatske populacije (vidjeti poglavlje 4.7.). Redom su izrađeni modeli:

(1) pojedinih glikopeptidnih struktura

(2) samih glikopeptidnih struktura

(3) samih glikopeptidnih struktura pomoću metode glavnih komponenti (*glycansPC)*

(4) samih laboratorijskih parametara (parametri koji su na temelju literaturne pretrage izdvojeni kao bitni za diskriminativnu analizu (albumin, CRP, broj trombocita te eozinofila, C3, C4), uz ostatak laboratorijskih pretraga svedenih na nekorelirane parametre metodom PCA, *labsPC))*

(5) identificiranih značajnih glikopeptidnih struktura i laboratorijskih parametara pomoću glavnih komponenti

(6) korigiranih vrijednosti logističke regresije za svaki glikopeptid (a) pomoću značajnih laboratorijskih parametara (d). Za glikopeptide koje model izdvoji kao statistički značajne te je opravdano pretpostaviti da ti parametri imaju značajnu ulogu u diskriminacijskoj analizi.

1) Rezultati logističke regresije pojedinih glikopeptidnih struktura

Rezultati logističke regresije pojedinih glikopeptidnih struktura prikazani su u Tablici 14. Diskriminacijska analiza izdvojila je glikopeptidne strukture i derivirane parametre IgG2_G1FN, IgG4_dS, IgG4_G2S, IgG1_G1FN, IgG2_G1FS, IgG4_dG2, IgG2_G2FS i IgG2_dS kao značajne.

Tablica 14. Rezultati logističke regresije pojedinih glikopeptidnih struktura hrvatske populacije (LC/MS). Podebljane p-vrijednosti smatraju se statistički značajnima.

Oznaka glikopeptidne strukture	Procjena	Standardna devijacija	p-vrijednost
IgG2_G1FN	1,2085	3,3485	**0,0098**
IgG4_dS	0,1631	1,1771	**0,0128**
IgG4_G2S	0,1002	1,1054	**0,0260**
IgG1_G1FN	0,5889	1,8021	**0,0319**
IgG2_G1FS	1,1815	3,2594	**0,0368**
IgG4_dG2	0,0477	1,0488	**0,0402**
IgG2_G2FS	0,3183	1,3749	**0,0422**
IgG2_dS	0,2256	1,2530	**0,0441**
IgG1_dB	0,1960	1,2165	0,0529
IgG2_G2FN	2,1757	8,8081	0,0596
IgG2_G1F	0,1492	1,1609	0,0680
IgG2_G1	-0,1977	0,8206	0,0812
IgG2_dB	0,1847	1,2028	0,0980
IgG4_G0F	-0,0435	0,9575	0,1171
IgG2_G0	-0,1347	0,8739	0,1196
IgG1_G2FN	1,5967	4,9367	0,1291
IgG4_dG0	-0,0333	0,9672	0,1314
IgG1_G0	-0,1900	0,8269	0,1328

Oznaka glikopeptidne strukture	Procjena	Standardna devijacija	p-vrijednost
IgG1_G1FS	0,2691	1,3088	0,1451
IgG2_G2F	0,1661	1,1807	0,1457
IgG2_G1N	-0,7509	0,4719	0,1513
IgG2_G0FN	0,1733	1,1892	0,1698
IgG2_G1NS	-12,1632	0,0001	0,1711
IgG2_dG2	0,0746	1,0775	0,1716
IgG4_G2NS	-1,0438	0,3521	0,1930
IgG1_dG1	0,0588	1,0606	0,2058
IgG1_dS	0,1182	1,1255	0,2116
IgG1_dG0	-0,0295	0,9709	0,2413
IgG1_G0F	-0,0342	0,9664	0,2636
IgG4_G2N	0,2535	1,2885	0,2939
IgG4_G0	-0,5181	0,5956	0,3019
IgG4_dG1	-0,0493	0,9518	0,3028
IgG2_dG0	-0,0291	0,9713	0,3033
IgG4_G0FN	-0,0975	0,9071	0,3213
IgG2_G2FNS	5,3980	220,9781	0,3323
IgG4_G2	0,0277	1,0280	0,3499
IgG2_G0N	-0,3944	0,6740	0,3567
IgG2_G2	-0,1813	0,8342	0,3577
IgG1_G0FN	0,0899	1,0941	0,3665
IgG1_G1NS	-9,9200	0,0001	0,3846
IgG2_dG1	0,0499	1,0511	0,3984
IgG1_G1F	0,0565	1,0582	0,4188
IgG2_G2NS	-2,0998	0,1225	0,4394

Oznaka glikopeptidne strukture	Procjena	Standardna devijacija	p-vrijednost
IgG2_G1FNS	1,0689	2,9122	0,4954
IgG2_G2N	-1,1863	0,3053	0,5058
IgG1_G1	-0,0733	0,9293	0,5217
IgG1_G2NS	-4,5061	0,0110	0,5564
IgG1_G2F	0,0510	1,0524	0,5635
IgG1_G2FS	0,0703	1,0729	0,5657
IgG1_G0N	0,2965	1,3451	0,5709
IgG4_G2FN	0,5273	1,6943	0,5849
IgG4_G1FNS	-0,7344	0,4798	0,5927
IgG1_dG2	0,0239	1,0242	0,6006
IgG1_G2FNS	1,4309	4,1828	0,6208
IgG4_G2FNS	-1,4587	0,2325	0,6289
IgG4_G1	-0,0163	0,9838	0,6359
IgG4_G1F	-0,0196	0,9805	0,6392
IgG2_G0F	-0,0119	0,9881	0,6669
IgG1_G2	-0,1011	0,9039	0,6699
IgG1_G1S	0,8568	2,3557	0,6721
IgG4_G2FS	0,0365	1,0372	0,6920
IgG4_dB	-0,0328	0,9677	0,6959
IgG1_G2N	1,3776	3,9655	0,7465
IgG4_G1S	0,4259	1,5309	0,7667
IgG4_G1NS	0,3909	1,4784	0,7707
IgG1_G1N	0,1444	1,1553	0,7730
IgG4_G1N	0,0381	1,0389	0,7881
IgG4_G2F	-0,0150	0,9851	0,8669

Oznaka glikopeptidne strukture	Procjena	Standardna devijacija	p-vrijednost
IgG2_G1S	0,1096	1,1158	0,8953
IgG4_G1FN	0,0313	1,0318	0,8960
IgG1_G1FNS	0,3821	1,4654	0,8989
IgG1_G2S	0,0883	1,0923	0,9035
IgG4_G1FS	-0,0303	0,9702	0,9141
IgG2_G2S	0,0222	1,0224	0,9645
IgG4_G0N	-0,0783	0,9246	0,9703

Kratice: IgGX – glikopeptid imunoglobulina G, X - broj od 1-4 (IgG podklasa). GX (0-2) – broj galaktoza, F – fukoza, N - račvajući GlcNAc, S - sijalinska kiselina u glikanskoj strukturi glikopeptida.

2) Rezultati logističke regresije samih glikopeptidnih struktura

Odnos broja varijabli i broja uzoraka (sparenih) ne dopušta izravnu multivarijatnu analizu.

3) Rezultati logističke regresije samih glikopeptidnih struktura pomoću glavnih komponenti

Rezultati logističke regresije samih glikopeptidnih struktura pomoću glavnih komponenti prikazani su u Tablici 15.

Tablica 15. Rezultati logističke regresije hrvatske populacije samih glikopeptidnih struktura pomoću glavnih komponenti. Podebljane p-vrijednosti smatraju se statistički značajnima.

Oznaka glikopeptidne glavne komponente	Procjena	Standardna devijacija	Statistika	p-vrijednost
glycansPC1	0,1831	0,1074	1,7047	0,0882
glycansPC2	-0,1545	0,1669	-0,9261	0,3544
glycansPC3	-0,0388	0,1142	-0,3399	0,7339

glycansPC4	0,1603	0,2175	0,7369	0,4611
glycansPC5	-0,7871	0,3249	-2,4221	**0,0154**
glycansPC6	-0,2353	0,3745	-0,6283	0,5298

Logistička regresija izdvojila je parametar *glycansPC5* kao statistički značajan (p=0,0154).

d) Rezultati logističke regresije samih laboratorijskih parametara pomoću glavnih komponenti

Statistički značajni rezultati logističke regresije laboratorijskih parametara pomoću glavnih komponenti prikazani su u Tablici 16.

Tablica 16. Statistički značajni rezultati logističke regresije hrvatske populacije samih laboratorijskih parametara pomoću glavnih komponenti. Podebljane p-vrijednosti smatraju se statistički značajnima.

Oznaka laboratorijske glavne komponente	Procjena	Standardna devijacija	Statistika	p-vrijednost
labsPC1	1,3741	0,6777	2,0275	**0,0426**
labsPC2	1,8400	1,0402	1,7689	0,0769
labsPC3	1,2947	0,6938	1,8661	0,0620
Trombociti	-0,0286	0,0131	-2,1785	**0,0294**

Logistička regresija izdvojila je parametre *labsPC1* (p=0,0426) i *trombociti* (p=0,0294) kao statistički značajne.

e) Rezultati logističke regresije s glikopeptidnim strukturama i laboratorijskim parametrima pomoću glavnih komponenti

Rezultati kombinirane logističke regresije prikazani su u Tablici 17.

Tablica 17. Rezultati logističke regresije hrvatske populacije s glikopeptidnim strukturama i laboratorijskim parametrima pomoću glavnih komponenti.

Oznaka parametra	Procjena koeficijenta	Standardna pogreška	Testna statistika	p-vrijednost
trombociti	-0,0312	0,0155	-2,0112	**0,0443**
labsPC1	1,0430	0,5083	2,0519	**0,0402**
glycansPC5	-0,9153	0,3909	-2,3411	**0,0192**

Logistička regresija izdvojila je parametre *trombociti* (p=0,0443), *labsPC1* (p=0,0402) i *glycansPC5* (p=0,0192) kao statistički značajne.

f) Rezultati logističke regresije za svaki glikopeptid pomoću značajnih laboratorijskih parametara

Prvotni rezultati logističke regresije samih glikopeptidnih struktura (a) korigirani su koristeći izdvojene značajne laboratorijske parametre (d; *labsPC1* i *trombociti*). Rezultati su prikazani u Tablici 18 i Slici 20.

Tablica 18. Rezultati logističke regresije hrvatske populacije za svaki glikopeptid pomoću značajnih laboratorijskih parametara. Podebljane p-vrijednosti smatraju se statistički značajnima.

Oznaka parametra	Procjena koeficijenta	Standardna pogreška	Testna statistika	p-vrijednost
IgG1_G1FN	1,1519	0,5334	2,1594	**0,0308**
IgG4_dS	0,1660	0,0781	2,1252	**0,0336**

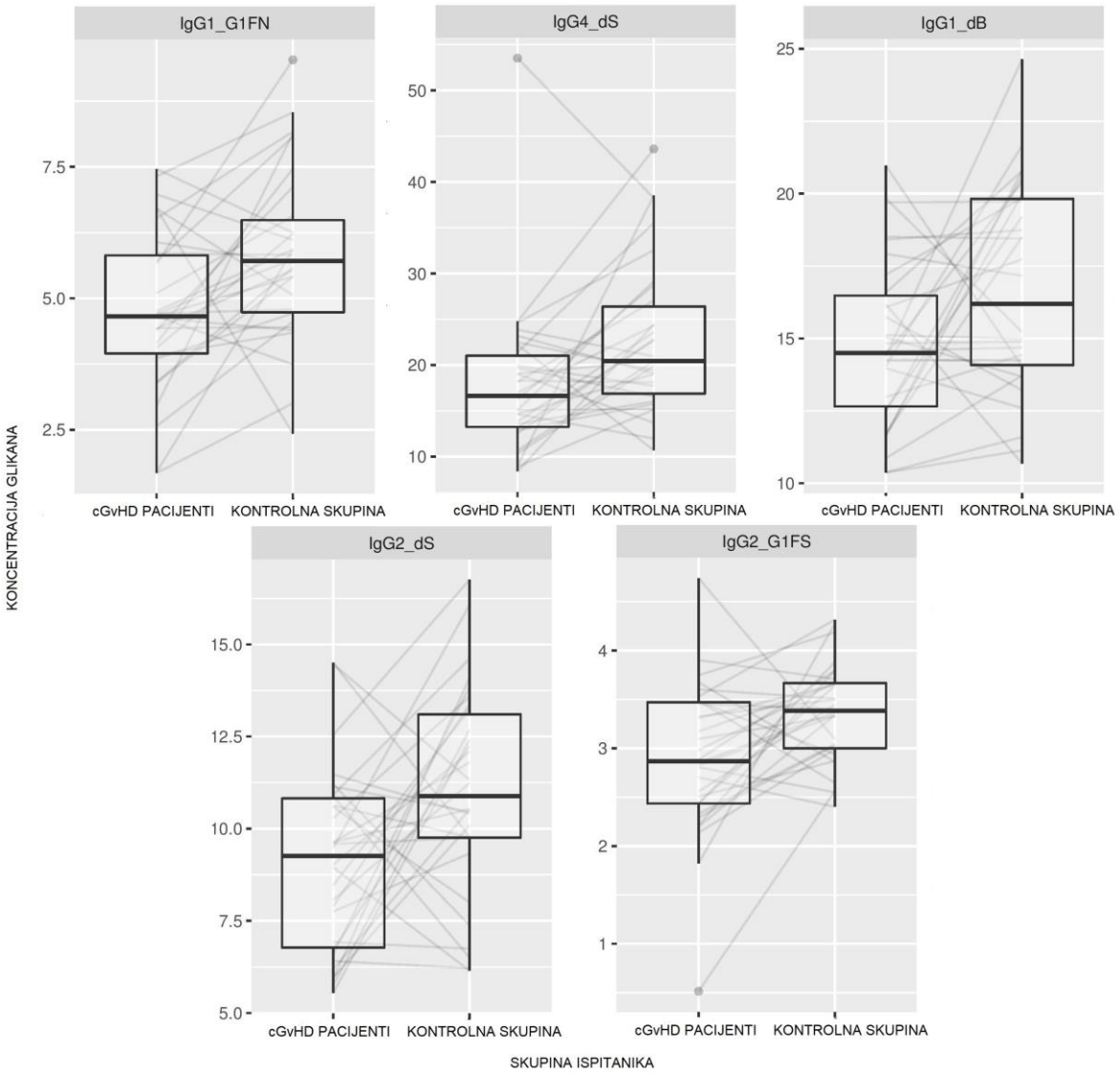
IgG1_dB	0,3213	0,1549	2,0741	**0,0381**
IgG2_dS	0,3398	0,1726	1,9687	**0,0489**
IgG2_G1FS	1,9376	0,9873	1,9625	**0,0497**
IgG2_G2FS	0.4504	0.2302	1.9568	0.0504
IgG2_dB	0.3218	0.1709	1.8824	0.0598
IgG4_dG2	0.0530	0.0287	1.8469	0.0647
IgG4_G2S	0.0979	0.0531	1.8442	0.0651
IgG1_G2FN	2.8831	1.5745	1.8311	0.0671
IgG2_G2FN	2.9496	1.6285	1.8112	0.0701
IgG2_G1FN	6.1500	3.5254	1.7444	0.0811
IgG4_dG1	-0.1312	0.0763	-1.7193	0.0856
IgG1_dG1	0.1276	0.0764	1.6699	0.0949
IgG1_G1FS	0.4927	0.3047	1.6170	0.1059
IgG2_G0FN	0.3106	0.1964	1.5813	0.1138
IgG1_G0F	-0.0695	0.0452	-1.5354	0.1247
IgG2_G1	-0.2142	0.1418	-1.5107	0.1309
IgG1_dS	0.2281	0.1571	1.4525	0.1464
IgG1_dG0	-0.0511	0.0365	-1.3989	0.1618
IgG4_G0F	-0.0514	0.0381	-1.3492	0.1773
IgG2_dG2	0.1129	0.0839	1.3447	0.1787
IgG2_G1F	0.1641	0.1251	1.3121	0.1895

IgG2_G2NS	-5.3785	4.1756	-1.2881	0.1977
IgG1_G2FNS	5.4825	4.2776	1.2817	0.1999
IgG1_G1N	0.9706	0.7587	1.2792	0.2008
IgG1_G0	-0.3238	0.2534	-1.2779	0.2013
IgG2_G2F	0.2035	0.1625	1.2523	0.2105
IgG4_dG0	-0.0350	0.0287	-1.2218	0.2218
IgG1_G1FNS	5.3028	4.3571	1.2170	0.2236
IgG2_G1N	-0.6144	0.5282	-1.1631	0.2448
IgG1_G0N	0.8728	0.7660	1.1394	0.2545
IgG2_G1NS	-12.3194	10.8364	-1.1368	0.2556
IgG2_G2N	-2.5416	2.2748	-1.1173	0.2639
IgG1_G1S	3.2490	2.9701	1.0939	0.2739
IgG4_G2FN	1.5855	1.5058	1.0529	0.2923
IgG2_G2FNS	6.5764	6.6182	0.9937	0.3204
IgG2_G1S	1.2252	1.2426	0.9859	0.3241
IgG2_G0	-0.1026	0.1096	-0.9358	0.3493
IgG4_G1	-0.0433	0.0467	-0.9256	0.3546
IgG2_G0F	-0.0458	0.0501	-0.9151	0.3601
IgG4_G2N	0.2950	0.3409	0.8652	0.3869
IgG2_G2	-0.2383	0.2772	-0.8597	0.3899
IgG4_G2	0.0316	0.0371	0.8513	0.3946

IgG2_dG0	-0.0379	0.0449	-0.8429	0.3992
IgG1_G0FN	0.1021	0.1289	0.7925	0.4281
IgG4_G2FS	0.1083	0.1368	0.7919	0.4284
IgG4_G0	-0.6192	0.7915	-0.7823	0.4340
IgG2_G1FNS	1.3219	1.6994	0.7779	0.4366
IgG1_G1F	0.0871	0.1154	0.7548	0.4504
IgG2_dG1	0.0771	0.1039	0.7418	0.4582
IgG4_G1F	-0.0425	0.0626	-0.6783	0.4976
IgG1_G2FS	0.1075	0.1816	0.5920	0.5538
IgG2_G2S	0.4276	0.7287	0.5868	0.5573
IgG1_G2N	3.0208	5.6257	0.5369	0.5913
IgG4_G1NS	0.8843	1.6599	0.5327	0.5942
IgG4_G2NS	-0.5035	0.9527	-0.5285	0.5971
IgG4_G0FN	-0.0573	0.1108	-0.5174	0.6049
IgG1_dG2	0.0289	0.0604	0.4800	0.6312
IgG1_G2F	0.0470	0.1163	0.4045	0.6859
IgG1_G2NS	-4.5212	11.2511	-0.4018	0.6878
IgG1_G1	-0.0538	0.1494	-0.3604	0.7185
IgG1_G2	-0.1103	0.3182	-0.3466	0.7289
IgG1_G2S	0.3163	0.9588	0.3299	0.7415
IgG4_G1FNS	0.5965	2.0524	0.2906	0.7713

IgG4_G2FNS	1.0308	3.7029	0.2784	0.7807
IgG4_G1N	-0.0413	0.1913	-0.2159	0.8290
IgG4_G1S	0.2896	1.8741	0.1545	0.8772
IgG4_G1FS	0.0564	0.3791	0.1488	0.8817
IgG2_G0N	-0.0878	0.6274	-0.1399	0.8887
IgG1_G1NS	1.8100	14.9586	0.1210	0.9037
IgG4_G1FN	0.0374	0.3093	0.1210	0.9037
IgG4_G0N	0.2772	2.6854	0.1032	0.9178
IgG4_dB	-0.0069	0.0994	-0.0695	0.9446
IgG4_G2F	-0.0024	0.1412	-0.0167	0.9866

Logistička regresija izdvojila je kao statistički značajno različite glikane i derivirane parametre *IgG1_G1FN* (p=0,0308), *IgG4_dS* (p=0,0336), *IgG1_dB* (p=0,0381), *IgG2_dS* (p=0,0489) i *IgG2_G1FS* (p=0,0497) između cGVHD bolesnika i kontrola te je opravdano pretpostaviti da ti parametri imaju značajnu ulogu u diskriminacijskoj analizi (Tablica 18, Slika 20).



Slika 20. Grafički prikaz značajnih razlika u koncentraciji glikopeptida između hrvatskih cGvHD bolesnika i kontrola (LC/MS).

6. Rasprava

Kronični GvHD je česta i teška kasna komplikacija koja se javlja nakon presadbe alogeničnih krvotvornih matičnih stanica. Dijagnoza i stupnjevanje, kao i procjena aktivnosti cGvHD-a temelji se na kliničkoj evaluaciji. Nužan je multidisciplinarni pristup zbog činjenice da bolest zahvaća veći broj organskih sustava i manifestira se kroz široki spektar simptoma i znakova[18]. Treba uzeti u obzir da dijagnoza često ovisi o histopatološkoj analizi zahvaćenog tkiva, a potrebna biopsija u dosta slučajeva je vrlo invazivna (jetra, pluća) ili nemoguća (oči). Pedijatrijski slučajevi dodatno su zahtjevni budući da biopsija uključuje opću anesteziju, a neki funkcionalni testovi, poput respiratornih, nisu primjenjivi. Terapija često uključuje produljenu primjenu sustavne imunosupresije kako bi se spriječilo ireverzibilno oštećenje i gubitak funkcije tkiva i organa uz rizik nastanka nuspojava i infekcija. Bolesnici s cGvHD-om imaju lošiju kvalitetu života i povećani rizik od kasnih morbiditeta i mortaliteta u usporedbi s transplantiranim bolesnicima bez cGvHD-a[83,84].

Unatoč napretku koji je donio NIH konsenzus (2005.) pruživši smjernice za standardizirani i sistematizirani pristup cGvHD bolesniku, a time i uniformirano prikupljanje podataka o bolesti, dosadašnja istraživanja nisu urodila neophodnim biomarkerom čija se aktivnost podudara s kliničkim zapažanjima o težini i/ili aktivnosti bolesti. Općenito, potraga za prikladnim biomarkerom cGvHD-a uvelike kaska u usporedbi s onom za akutni GvHD zbog većeg opsega manifestacija, velike varijacije među bolesnicima u pogledu vremena do nastupa bolesti i njezine težine, preklapanja s akutnim oblikom, kao i zbog nedovoljnog broja dostupnih pacijenata za kliničke studije i verifikaciju rezultata[85]. U obzir treba svakako uzeti i veliku heterogenost demografskih i kliničkih podataka cGvHD bolesnika.

Iako se kao potencijalni biomarker istražuje široki raspon molekula, staničnih populacija i genetskih polimorfizama[49,85] kao i laboratorijski markeri upale[48], svakako treba iskoristiti napredak modernih –*omics* alata koji omogućuju analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenskom periodu i praćenje dinamike promjena u patofiziologiji bolesti. Jedan od takvih alata potencijalno je i glikomika koja je, iako stupa na scenu kaskajući za genomikom i proteomikom, proglašena istraživačkim prioritetom idućeg desetljeća budući da je prepoznato da su glikani izravno

involvirani u patofiziologiju svake veće bolesti te da je nužan razvoj te znanstvene grane za ostvarenje ciljeva personalizirane medicine[86].

Rezultati ove disertacije potvrđuju postavljenu hipotezu da je N-glikozilacija imunoglobulina G iz plazme bolesnika s kroničnim GvHD-om povezana s kliničkim manifestacijama kroničnog GvHD-a, što može doprinijeti razumijevanju biologije te bolesti i dovesti do razvoja potencijalnog biomarkera cGVHD-a.

6.1. Usporedba američkih i hrvatskih ispitanika

U disertaciji su analizirane dvije kohorte ispitanika – američka (cGvHD bolesnici) i hrvatska (cGvHD bolesnici i kontrole) kako bi se usporedili glikani u cGvHD bolesnika različite težine i aktivnosti bolesti (američka kohorta) te glikani između cGvHD bolesnika i njihovih kontrola (osobe nakon aloPKMS bez cGvHD-a) (hrvatski ispitanici). Usporedbom demografskih i laboratorijskih parametara tih dviju kohorti cGvHD bolesnika, američke i hrvatske, uočene su statistički značajne razlike između te dvije skupine cGvHD bolesnika. Kao izvor KMS za presadbu kod američkih cGvHD pacijenata više se koristila periferna krv u usporedbi s hrvatskim bolesnicima. U američkoj populaciji prošlo je više vremena od presadbe KMS odnosno od dijagnoze cGvHD-a do uključenja u studiju. Američku populaciju karakterizira i značajno veći broj slučajeva aktivne bolesti i zahvaćenih organskih sustava, kao i ukupno teže ocijenjena bolest uz više prethodnih linija sistemske terapije. Zabilježen je veći intenzitet aktualne sistemske imunosupresije te više slučajeva terapijske namjere koja ukazuje na aktivnu bolest. Laboratorijski nalazi podržavaju demografske i kliničke opisne parametre. Niži albumin te viši CRP, veći broj trombocita i više prethodno primljenih linija sistemske terapije u američkoj kohorti, i ranije su opisivani u pacijenata s težim stupnjem cGvHD-a i aktivnijom bolesti[48]. I drugi laboratorijski pokazatelji poput višeg C3 i C4 govore u prilog slike američke kohorte kao one s više slučajeva aktivnog upalnog procesa. Niži broj imunoglobulina, niži ukupni broj T limfocita i citotoksičnih T limfocita također je u skladu s ranijim istraživanjima i inflamatornom slikom imunosnog sustava obilježenog poremećenom limfopoezom u težih stupnjeva kroničnog GvHD-a koji primaju intenzivniju imunosupresiju[87].

Velike razlike između dviju populacija cGvHD bolesnika prvenstveno se mogu objasniti samom prirodom američkog kliničkog ispitivanja pod nadležnosti NIH-a kojem ne gravitiraju lakše ocijenjeni slučajevi bolesti koji se vode u lokalnim zdravstvenim ustanovama, već se u NIH u pravilu upućuju teži slučajevi cGVHD-a nakon više neefikasnih linija terapije i uz dugo trajanje bolesti. Za razliku od američke, hrvatska populacija transplantiranih pacijenata većinom se redovito kontrolira u središnjoj zdravstvenoj instituciji Kliničkog bolničkog centra Zagreb što je omogućilo ranije uključivanje bolesnika u studiju u odnosu na postavljanje dijagnoze cGvHD-a s blažom kliničkom slikom i manjim brojem prethodnih linija imunosupresivne terapije.

Uspoređujući hrvatske cGvHD bolesnike i njihove kontrole, većinom nije bilo razlike u njihovim demografskim i laboratorijskim karakteristikama osim što su cGvHD bolesnici imali značajno više prethodnog akutnog GvHD-a (70,0% vs. 26,7%; p=0,001), što odgovara literaturnim podacima, te niži broj B limfocita (p=0,027), niži albumin (p=0,005), viši CRP (p=0,040) i beta 2 mikroglobulin (p=0,049) nego kontrole, ukazujući na pojačano inflamatorno zbivanje u odnosu na kontrole.

6.2. Glikani i težina (NIH ocjena) kroničnog GvHD-a pojedinih zahvaćenih organskih sustava

Analiza uzoraka krvne plazme američkih bolesnika ukazala je na povezanost nekoliko pokazatelja težine cGvHD-a s pojedinim glikanima i promjenama u njihovom sastavu.

NIH ocjena zahvaćenosti zglobova/fascija (NIH cGvHD zglobova/fascija)

UPLC analiza pokazala je značajno smanjenje udjela direktno mjerenih svojstava GP8 (FA2[6]G1), GP9 (FA2[3]G1), GP14 (FA2G2), GP15 (FA2BG2) i GP18 (FA2G2S1) u bolesnika s cGvHD-om zglobova/fascija. Ovaj pad udjela galaktoziliranih struktura potvrđuje i pad deriviranih parametara koji predstavljaju udio ili učestalost glikanskih struktura s jednom ili dvije galaktoze (IGP47, IGP48, IGP53, IGP54, IGP55, IGP56, IGP57). Posebno zanimljiv glikan mogao bi biti FA2G2 (GP14) čije značajno smanjenje možemo pratiti kroz sva tri stupnja težine

cGvHD-a zglobova/fascija. Smanjenje galaktozilacije IgG-a u više je navrata povezivano s reumatoidnim artritisom[88–90], dok nedavna istraživanja čak ukazuju da je promjena u sastavu IgG glikana prisutna više godina prije postavljanja dijagnoze te ukazuje na povećani rizik razvoja bolesti[91]. Istovremeno, analizom je utvrđen i značajan porast udjela GP4 (FA2), agalaktozilirane strukture. Metoda LC/MS također je potvrdila trend smanjenja galaktozilacije svih podklasa IgG-a (glikopeptidi IgG1: G2F, G2FS; glikopeptidi IgG2: G1F, G2F i glikopeptidi IgG4: G2F, G2FS, G2FN), odnosno porast udjela struktura bez galaktoze na IgG1 i IgG2 (IgG1 G0F; IgG2 G0F) kako mjerenjem direktnih svojstava tako i deriviranim parametrima (IgG1: dG0, dG1, dG2). Jong i autori smatraju smanjenu galaktozilaciju IgG1 biomarkerom aktivacije imunosnog sustava[92]. Istovremeno, agalaktozilirani glikani se povezuju s povećanim afinitetom IgG-a za FcγRIII (aktivirajući receptor) kao i za manoza vezujući lektin što rezultira aktivacijom komplementa[94,95]. Povezanost komponente komplementa C3 s cGvHD-om zglobova/fascija utvrđena je ranijim istraživanjem[48], a nedavno je potvrđena i na hrvatskoj populaciji[97]. Zanimljivo je da je u nedavnom istraživanju utvrđena veza snižene galaktozilacije s povišenim CRP-om[93], markerom upale koji je povezivan s aktivnosti cGvHD-a.

Iako je uobičajeno da kretanje sijalinizacije IgG-a slijedi galaktozilaciju budući da je postojanje galaktoze preduvjet za vezanje terminalne sijalinske kiseline, u našem istraživanju uočen je porast udjela struktura sa sijalinskom kiselinom unatoč smanjenoj galaktozilaciji. Porast nije utvrđen mjerenjem direktnih svojstava nego je vidljiv iz deriviranih svojstava (IGP25, IGP29, IGP30, IGP31 i IGP33) koja opisuju sijalinizaciju galaktoziliranih fukoziliranih struktura s ili bez račvajućeg GlcNAc-a.

Smanjeni udio Fc galaktozilacije IgG-a, prije ali i godinu dana poslije PKMS-a, nedavno je opisan i u longitudinalnoj pedijatrijskoj studiji gdje autori primjećuju nižu razinu galaktozilacije u transplantiranih bolesnika (prije i poslije PKMS-a) naspram donora KMS i zdravih kontrola uparenih po dobi, a koja je posebno izražena u skupini pacijenata transplantiranih zbog maligne dijagnoze (leukemija)[97]. Iz tog su istraživanja isključeni bolesnici s akutnim ili kroničnim GvHD-om, bolesnici ovisni o IgG suplementaciji, kao i oni koji su 7 mjeseci nakon PKMS-a na imunosupresivnoj terapiji. U istom istraživanju uočena je i povećana sijalinizacija po jedinici galaktoze koja se pripisuje povećanoj aktivnosti ekstrinzične sijalil-transferaze ST6Gal1 uslijed radijacije ili upale, odnosno povećanoj dostupnosti supstrata, CMP-sijalinske kiseline

koja se oslobađa po aktivaciji cirkulirajućih trombocita tijekom upalnog procesa[98]. Budući da je većina američkih cGvHD bolesnika ove disertacije liječena upravo zbog maligne dijagnoze (leukemije), ne može se tvrditi da je njihova snižena galaktozilacija i/ili povišena sijalinizacija povezana s cGvHD-om. Autori navedenog rada nisu uočili druge promjene u glikanima, koje su u američkoj populaciji ovog istraživanja moguće posljedica cGvHD-a ili imunosupresivne terapije.

Drugo moguće objašnjenje neobičnog kretanja udjela sijalinske kiseline je da ona potječe iz Fab, a ne Fc fragmenta IgG-a. Autori Holland i suradnici[99] u svom istraživanju ANCA-vaskulitisa opisuju hipogalaktozilaciju ograničenu na Fc fragment IgG-a dok je glikan Fab fragmenta galaktoziliran i sijaliniziran. U prilog ovoj teoriji govori činjenica da su značajne promjene udjela struktura sa sijalinskom kiselinom uočene pri analizi metodom UPLC, no nisu potvrđene i analizom Fc fragmenata metodom LC/MS. Oko 15% IgG-a ima glikozilirani Fab fragment. U usporedbi s Fc glikanom, Fab glikan je zbog svoje pozicije izloženiji aktivnosti glikozidaza i glikozil-transferaza, te na svoju heptasaharidnu biantenarnu jezgru češće veže račvajući GlcNAc, galaktozu i sijalinsku kiselinu (na obje terminalne galaktoze), uz manji postotak fukozilacije jezgre glikana. Istraživanja su pokazala da u autoimunosnim (reumatoidni artritis, Sjögrenov sindrom), ali i u malignim bolestima (mijelom, Burkittov limfom, folikularni i difuzni B–velikostanični limfom) raste broj potencijalnih glikanskih veznih mjesta na Fab fragmentu, a posljedična promjena konformacije proteina značajno utječe na svojstva IgG-a, poput vezanja za antigen i agregacije u imunosne komplekse. Unatoč nepobitnoj važnosti glikozilacije Fab fragmenta u modulaciji aktivnosti samog IgG-a ali i ostatka imunosnog sustava, ona ostaje nedovoljno istražena[100].

Porast ukupnog udjela račvajućeg GlcNAc-a, kojeg pratimo i kroz direktno mjerena svojstva (GP6 odnosno FA2B) i kroz derivirana svojstva (IGP37, IGP38, IGP39, IGP40, IGP45, IGP74 i IGP75), povezuje se s povećanim afinitetom za FcγRIIIa i posljedično povećanim ADCC-om[101]. Istovremeno je uočen smanjeni udio fukoze na jezgri IgG-a (F, IGP76 i IGP77) za koju se smatra da ima recipročan efekt od račvajućeg GlcNAc-a te da njezina prisutnost smanjuje afinitet za isti receptor, odnosno odsutnost govori u prilog povećanom ADCC-u. Isti trend ranije je primjećen kod sistemskog eritemskog lupusa[72], kronične multisistemske bolesti s kojom se cGvHD često uspoređuje. U tom istraživanju opisuje se i značajno smanjenje ranije

spomenutog GP14, kojeg se opisuje kao dobrog kandidata za prediktivni biomarker bolesti, a povezuje i s perikarditisom te pozitivnim ANA protutijelima. GP14 je glikan koji je i više puta povezan s ulcerativnim kolitisom gdje prati klinički tijek bolesti i njezinu aktivnost[102], a vrijednu ulogu mogao bi imati i u diskriminaciji bolesti[72]. U istom istraživanju, glikanskoj strukturi GP9 pridaje se najveća prediktivna vrijednost u analiziranim populacijama, dok autori smanjenje galaktozilacije IgG-a i posljedičnu promjenu inflamatornog potencijala protutijela smatraju jednim od molekularnih mehanizama involviranih u sistemski eritemski lupus i/ili autoimunost.

NIH ocjena zahvaćenosti kože (NIH cGvHD kože)

UPLC analizom uzoraka američkih cGvHD bolesnika utvrđena je značajna povezanost GP9 (FA2[3]G1), kao i IGP30, IGP36, IGP37 i IGP38 s NIH ocjenom stupnja zahvaćenosti kože, dok je LC/MS metoda izdvojila IgG4_G2F glikopeptid kao značajan. Općenito, naglašen je trend smanjenja galaktozilacije, dok dolazi do porasta udjela sijalinizacije i račvajućeg GlcNAc-a.

Kronični GvHD kože često nastaje uz cGvHD zglobova/fascije[103] te se opisuje da sklerotični oblik cGvHD-a kože značajno smanjuje opseg pokreta zgloba, kao i snagu hvata prstima[104]. Pozitivna povezanost cGvHD-a kože i zglobova/fascije potvrđena je i na nedavnoj studiji na hrvatskoj populaciji[96]. Stoga ne čudi da promjene u profilu IgG glikana cGVHD kože slijede uzorak promjena povezanih s cGvHD-om zglobova/fascije. I u ovom slučaju, literatura navodi povezanost C3 komponente komplementa s polarizacijom T stanica i razvojem cGvHD-a kože u miševa[105].

6.3. Glikani i aktivnost cGvHD-a

Analiza uzoraka UPLC metodom ukazala je na manji udio agalaktoziliranih struktura i deriviranih svojstava (GP4, GP6, IGP45, IGP55), kao i veći udio galaktoziliranih struktura (GP9, GP14, GP18, IGP47, IGP48, IGP56, IGP53, IGP57, G2) u uzorcima plazme bolesnika čiji je cGvHD smatran neaktivnim. Neaktivnu bolest karakterizira i više sijaliniziranih (GP16, GP23, IGP26, IGP27, S) te fukoziliranih struktura (F, IGP64), te manji udio struktura s račvajućim GlcNAc-om (IGP37, IGP38, IGP68) u

usporedbi s uzorcima ispitanika čiji se cGvHD smatra aktivnim. Metoda LC/MS kao značajnu je identificirala agalaktoziliranu strukturu IgG4_G0 u značajno većem udjelu u cGvHD bolesnika s neaktivnom bolesti. Ova struktura u literaturi nije ranije povezivana niti objašnjavana kao dio ijednog patološkog procesa ili bolesti. Prikazano je moguće posljedica nesrazmjernog broja aktivnih slučajeva cGvHD-a (101, medijan starosti 46,5, raspon 5-71) naspram neaktivnih (19, medijan starosti 25, raspon 7-66) za koje je zabilježen dojam o aktivnosti bolesti, kao i starosnom razlikom između dviju skupina. U ranijem istraživanju zabilježen je značajan efekt starije dobi na smanjenje koncentracije navedene strukture[79]. Spomenuto bi objasnilo i zašto isti efekt nije vidljiv na hrvatskoj populaciji s bolesnicima i kontrolama uparenima po dobi i spolu.

Još jedan pokazatelj aktivnosti cGvHD-a pokazuje konzistentne rezultate s kliničkim dojmom aktivnosti bolesti. Općenito, naspram cGvHD bolesnika bez imunosupresije, u bolesnika s umjerenim ili visokim stupnjem intenziteta sistemske imunospresije, UPLC metodom su identificirani statistički značajno viši udjeli agalaktoziliranih struktura i deriviranih parametara (GP1, GP3, GP4, GP5, IGP41, IGP43, IGP44, IGP55) i smanjeni udjeli galaktoziliranih i sijaliniziranih struktura (G2, GP14, GP18, GP23, IGP47, IGP53, IGP57). Povećani udio glikanskih struktura s račvajućim GlcNAc-om (GP11, IGP39, IGP40, IGP69, IGP74, IGP75), i smanjeni udjeli fukoziliranih struktura (F, IGP76, IGP77) također se podudaraju s kliničkim dojmom aktivnosti bolesti. Posebno zanimljivim pokazale su se strukture GP1 (FA1) i GP3 (A2B) koje su se pokazale značajno povišene i u bolesnika s umjerenim i visokim stupnjem sistemske imunosupresije te time ukazale na potencijalno veću osjetljivost na primjenjenu terapiju, ali posredno, i na povećanu aktivnost cGvHD-a.

Metodom LC/MS potvrđeno je da povećanjem stupnja intenziteta imunosupresije pada udio galaktoziliranih sijaliniziranih struktura u svim podklasama IgG-a (IgG1_G2FS, IgG2_G2FS, IgG4_G2FS i IgG4_G1S). Smanjenje udjela pokazuju i galaktozilirane glikopeptidi IgG2_G2 i IgG2_G2N, kao i odgovarajući derivirani parametri IgG1_dS, IgG1dG2 i IgG2_dS, dok parametar koji označava IgG1 agalaktozilirane glikopeptide (IgG1_dG0) pokazuje suprotno – porast udjela. Posebnu pažnju u budućim istraživanjima trebalo bi posvetiti glikopeptidu IgG4_G2NS čija se zastupljenost pokazala značajnom i pri usporedbi bolesnika bez

sistemske imunosupresije s onima s umjerenim, kao i visokim stupnjem sistemske imunosupresije.

Jedini glikopeptid kojem se udio povećava sa stupnjem intenziteta sistemske imunosupresije je IgG4 s galaktoziliranim sijaliniziranim glikanom s račvajućim GlcNAc-om (IgG4_G2NS). Situacija u kojoj vezani račvajući Glc-NAc preokreće efekt sijalinizacije glikana i time ga izdvaja od sličnih sijaliniziranih struktura, opisana je i ranije u sistemskom eritemskom lupusu[72]. U istom istraživanju zabilježen je i pad udjela galaktoziliranih struktura koji prati povećanje aktivnosti bolesti. Isti trend spominje se i u većem broju drugih autoimunosnih bolesti poput reumatoidnog artritisa i upalne bolesti crijeva[100]. Porast udjela agalaktoziliranih glikopeptida koje smo uočili deriviranim parametrom IgG1_dG0, uklapa se u ranije spomenutu sliku IgG-a kao proinflamatorne molekule čiji glikan promovira aktivaciju komplementa. Istovremeno, i smanjeni udio sijalinizacije ukazuje na smanjenu protuupalnu aktivnost IgG-a.

Zajedno, smanjena galaktozilacija i sijalinizacija te fukozilacija, ali i povećani udio agalaktoziliranih struktura i struktura s račvajućim Glc-Nac-om opisuju proupalni IgG glikom, povećani ADCC i smanjeni kapacitet IgG-a da suprimira upalu. Opisane promjene nisu neočekivane te su opisane u ranijem preglednom radu koji sumira glikanske značajke bolesti koje dijele karakteristike cGvHD-a[69].

6.4. Specifičnost i osjetljivost glikanskih mjerenja (američka populacija)

Učinkovitost glikanskih mjerenja kao potencijalne dijagnostičke pretrage za zahvaćenost pojedinih organskih sustava cGvHD-om, kao i za aktivnost bolesti, te njihovu specifičnost i osjetljivost testirali smo koristeći ROC krivulje. ROC krivulje glikanskih mjerenja uspoređene su s modelima koji prikazuju specifičnost i osjetljivost modela izgrađenog pomoću laboratorijskih parametara, kao i modelom koji navedene kombinira.

Analizom je utvrđeno da glikanska mjerenja, iako sama većinom nedovoljno specifična i osjetljiva (površine ROC krivulja manje od 0,8), uspješno nadograđuju modele građene pomoću laboratorijskih parametara, doprinoseći većoj prediktivnoj sposobnosti za diskriminaciju zdravih organskih sustava od onih zahvaćenih cGvHD-

om. Navedeno vrijedi za sve organske sustave (koža, usta, oči, probavni trakt, jetra, pluća, zglobovi/fascije, genitalni trakt u žena) kao i za ocjene aktivnosti bolesti (klinički dojam i stupanj intenziteta imunosupresije). U većem broju slučajeva vrlo dobri modeli nastali na temelju laboratorijskih parametara, kombiniranjem s glikanskim mjerenjima unaprijeđuju se u izvrsne modele visoke specifičnosti i osjetljivosti (površina ROC krivulje veća od 0,9). Navedeno se osobito odnosi na ljestvice kojima se opisuje aktivnost bolesti gdje modeli nadograđeni mjerenjima kako UPLC-om, tako i LC/MS-om daju izvrsne modele.

6.5. Diskriminativni model cGvHD-a: cGvHD bolesnici naspram uparenih kontrolnih ispitanika (hrvatska populacija)

Diskriminativna analiza pojedinih IgG glikopeptida iz plazme hrvatskih cGvHD bolesnika i njihovih uparenih kontrolnih ispitanika (osoba nakon aloPKMS bez cGvHD) metodom logističke regresije izdvojila je nekoliko potencijalnih kandidata glikopeptidnih struktura i deriviranih parametara. Sljedeći model dobiven je metodom glavnih komponenti kako bi se smanjio efekt multikolinearnosti glikana. Treći model građen je pomoću kliničkih laboratorijskih parametara koji su se pregledom literature o cGvHD-u pokazali značajnima za diskriminativnu analizu[48] (albumin, CRP, broj trombocita te eozinofila, C3, C4) te preostalih laboratorijskih parametara svedenih na glavne komponente. Konačni model koji je građen na parametrima koje su prijašnji izdvojili kao značajne identificirao je kao statistički značajne za diskriminaciju cGvHD pacijenata od kontrolnih ispitanika: povišeni broj trombocita (p=0,0443), *labsPC1* (p=0,0402) i *glycansPC5* (p=0,0192). Korekcijom originalnog izbora potencijalnih glikopeptidnih kandidata pomoću parametara *trombociti* i *labsPC1* identificirani su parametri IgG1_G1FN (p=0,0308), IgG4_dS (p=0,0336), IgG1_dB (p=0,0381), IgG2_dS (p=0,0489) i IgG2_G1FS (p=0,0497) kao statistički značajno sniženi u cGvHD bolesnika.

Derivirani parametri IgG4_dS, IgG1_dB i IgG2_dS govore u prilog diskriminacijske vrijednosti razina sijaliniziranih struktura IgG4 i IgG2 te struktura IgG1 s račvajućim GlcNAc-om. Glikopeptidi IgG1_G1FN i IgG2_G1FS ne ističu se u pregledu literature te se zasad čine kao jedinstveni kandidati vezani za diskiminaciju cGvHD-a. Budući da je riječ o modelu građenom na maloj populaciji uzoraka cGvHD bolesnika i

kontrolnih ispitanika, njihov potencijal kao cGvHD biomarkera potrebno je provjeriti na većem broj uzoraka koje zahtjeva ovaj tip istraživanja i kompleksna priroda glikana, njihova strukturalna raznolikost. Vrijednost potencijalnog biomarkera potvrdila bi se i longitudinalnim istraživanjem koje bi eliminiralo zasada neistraženi utjecaj sistemske imunosupresije, suportivne terapije i velikog broj infekcija kojima su bolesnici izloženi.

7. Zaključak

Prikazani rezultati ove disertacije potvrđuju postavljenu hipotezu da je N-glikozilacija imunoglobulina G iz plazme bolesnika s kroničnim GvHD-om povezana s kliničkim manifestacijama kroničnog GvHD-a. Pri testiranju američke populacije, korištenjem i UPLC i LC/MS metode uočena je povezanost glikozilacije IgG-a s kroničnim GvHD-om zglobova/fascije i kroničnim GvHD-om kože. U oba slučaja primjećen je pad udjela galaktoziliranih struktura, porast udjela struktura sa sijalinskom kiselinom i ukupnog udjela račvajućeg GlcNAc-a dok cGvHD zglobova dodatno karakterizira i smanjeni udio fukoze na jezgri IgG-a. Promjene u udjelu galaktozilacije povezane su i s kliničkim dojmom o aktivnosti bolesti te intenzitetom sistemske imunosupresije. Neaktivnu bolest karakterizira više sijaliniziranih te fukoziliranih struktura te manji udio struktura s račvajućim GlcNAc-om.

Diskriminativna analiza pomoću ROC krivulja pokazala je da glikozilacija IgG-a doprinosi prediktivnoj moći laboratorijskih parametara i markera upale za sve organske sustave zahvaćene cGvHD-om (oči, koža, usta, probavni trakt, pluća, jetra, zglobovi/fascije, genitalni trakt u žena) kao i za pokazatelje aktivnosti bolesti, povećavajući i osjetljivost i specifičnost tih modela.

Analiza parova hrvatskih cGvHD bolesnika i njihovih kontrola (osoba nakon aloPKMS bez cGvHD-a) pokazala je da glikozilacija IgG-a doprinosi diskriminativnom modelu cGvHD-a građenom uz pomoć laboratorijskih parametara koji uključuju markere upale. Pritom su izdvojeni pojedini glikopeptidi (IgG1_G1FN, IgG4_dS, IgG1_dB, IgG2_dS i IgG2_G1FS) za koje je opravdano pretpostaviti da imaju značajnu ulogu u diskriminacijskoj analizi.

Svi navedeni rezultati predstavljaju originalni doprinos u istraživanju kroničnog GvHD-a i razumijevanju biologije te bolesti, a ukazuju i na značaj glikozilacije IgG-a u patologiji bolesti. Ovim radom iskazan je i potencijal glikozilacije IgG-a kao biomarkera cGvHD-a, koji je potrebno potvrditi daljnjim istraživanjima.

8. Kratki sažetak na hrvatskom jeziku

Kronična bolest presatka protiv primatelja (eng. *chronic graft-versus-host disease*, cGvHD) je sistemska aloimunosna i autoimunosna bolest koja je najvažnija kasna komplikacija nakon alogenične presadbe krvotvornih matičnih stanica (aloPKMS) i vodeći uzrok ne-relapsnog morbiditeta i smrtnosti nakon aloPKMS. Bolest karakterizira poremećena homeostaza humoralnog imunološkog sustava. Glikoprotein imunoglobulin G (IgG) je glavna efektorska molekula humoralnog imunološkog odgovora. Promjene u glikozilaciji IgG-a povezane su s nizom autoimunosnih bolesti.

Glikozilacije IgG-a ispitana je u američkoj (213 cGvHD bolesnika) i hrvatskoj populaciji (30 cGvHD bolesnika i 30 ispitanika kontrolne skupine (transplantirani, bez cGvHD-a)) te je ispitana povezanost glikozilacije IgG-a s demografskim karakteristikama ispitanika i kliničkim manifestacijama cGvHD-a. Analiza američke populacije cGvHD bolesnika pokazala je značajne rezultate u pacijentima s kroničnim cGvHD-om zglobova/fascije i kože, kao i u bolesnika s aktivnim oblikom bolesti te višim stupnjem intenziteta sistemske imunosupresije. Analiza ROC krivuljama pokazala je da glikozilacija IgG-a doprinosi povećanju osjetljivosti i specifičnosti modela izgrađenog na laboratorijskim parametrima i markerima upale. Diskriminativni model izgrađen na hrvatskoj populaciji koristeći glikanske i laboratorijske parametre izdvojio je glikopeptide za koje je opravdano pretpostaviti da značajno doprinose diskriminaciji cGvHD bolesnika od kontrolne skupine.

Istraživanjem je pokazano da glikozilacija IgG-a ima ulogu u patologiji cGvHD-a te da bi daljnje istraživanje moglo doprinijeti razumijevanju biologije bolesti i dovesti do nužno potrebnog biomarkera kroničnog GVHD.

Ključne riječi: N-glikozilacija, cGvHD, IgG, alogenična presadba krvotvornih matičnih stanica, alo-PKMS

9. Kratki sažetak na engleskom jeziku

N-glycosylation of immunoglobulin G in chronic graft-versus-host disease

Chronic graft-versus-host disease (cGvHD) is a systemic alloimmune and autoimmune disorder and the major late complication and leading cause of non-relapse morbidity and mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT). The disease is characterized by an altered homeostasis of the humoral immune response. Immunoglobulin G (IgG) glycoprotein is the main effector molecule of the humoral immune response. Changes in IgG glycosylation are associated with a number of autoimmune diseases.

IgG glycosylation analysis was done on two populations, American (213 cGvHD patients) and Croatian (30 cGvHD patients and 30 controls (after alloHSCT, without cGvHD)). The American population results showed significant correlation with cGvHD NIH joint/fascia and skin score, disease activity and intensity of systemic immunosuppression. ROC analysis confirmed that IgG glycosylation increases specificity and sensitivity of models using laboratory parameters and markers of inflammation. The Croatian logistic regression model built using glycan and laboratory parameters singled out glycopeptides for which it is justified to assume that they significantly contribute to the cGvHD discrimination.

This study has shown that IgG glycosylation plays a significant role in cGvHD pathology, and that further research could contribute to the understanding of the disease biology and lead to the necessary biomarker of chronic GVHD.

Key words: N-glycosylation, cGvHD, IgG, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, alloHSCT

10. Popis literature

1. Thomas ED, Lochte HLJ, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. N Engl J Med 1957;257:491‑6.

2. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P i sur. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. Bone Marrow Transplant 2016;51:786‑92. doi: 10.1038/bmt.2016.20.

3. Bone Marrow Donors Worldwide: Number of donors per registry in BMDW. Pristupljeno 31. listopada 2018. Dostupno na: https://www.bmdw.org/numberofdonors/.

4. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: The paradigmatic tissue-specific stem cell. Am J Pathol 2006;169:338‑46. doi: [10.2353/ajpath.2006.060312].

5. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. Nature 2014;505:327‑34. doi: [10.1038/nature12984].

6. Trumpp A, Essers M, Wilson A. Awakening dormant haematopoietic stem cells. Nat Rev Immunol 2010;10:201‑9. doi: 10.1038/nri2726.

7. Howard CA, Fernandez-Vina MA, Appelbaum FR, Confer DL, Devine SM, Horowitz MM i sur. Recommendations for donor human leukocyte antigen assessment and matching for allogeneic stem cell transplantation: consensus opinion of the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN). Biol Blood Marrow Transplant 2015;21:4‑7. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.09.017.

8. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P i sur. Hematopoietic SCT in Europe 2013: recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants. Bone Marrow Transplant 2015;50(4):476-82. doi: 10.1038/bmt.2014.312.

9. Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattan A, Schneider M. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. Cancer Res 1965;25:1525‑31.

10. Majhail NS, Douglas Rizzo J, Lee SJ, Aljurf M, Atsuta Y, Bonfim C i sur. Recommended screening and preventive practices for long-term survivors after hematopoietic cell transplantation. Hematol Oncol Stem Cell Ther 2012;5:1‑30. doi: 10.5144/1658-3876.2012.1.

11. Billingham R. The biology of graft-versus-host reactions. Harvey Lect 1966;21‑78.

12. Dignan FL, Clark A, Amrolia P, Cornish J, Jackson G, Mahendra P i sur. Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease. Br J Haematol 2012;158:30‑45. doi: 10.1111/j.1365-2141.2012.09129.x.

13. Johnston L. Acute graft-versus-host disease: differing risk with differing graft sources and conditioning intensity. Best Pract Res Clin Haematol 2008;21:177‑92. doi: 10.1016/j.beha.2008.02.006.

14. Sorror ML, Martin PJ, Storb RF, Bhatia S, Maziarz RT, Pulsipher MA i sur. Pretransplant comorbidities predict severity of acute graft-versus-host disease and subsequent mortality. Blood 2014;124:287‑95. doi: 10.1182/blood-2014-01-550566.

15. Maeda Y. Pathogenesis of graft-versus-host disease: innate immunity amplifying acute alloimmune responses. Int J Hematol 2013;98:293‑9. doi: 10.1007/s12185-013-1421-x.

16. Choi SW, Levine JE, Ferrara JLM. Pathogenesis and management of graft versus host disease. Immunol Allergy Clin North Am 2010;30:75‑101. doi: 10.1016/j.iac.2009.10.001.

17. Storb R, Gyurkocza B, Storer BE, Sorror ML, Blume K, Niederwieser D i sur. Graft-versus-host disease and graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation. J Clin Oncol 2013;JCO.2012.45.0247. doi: [10.1200/JCO.2012.45.0247].

18. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ i sur. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. Biol Blood Marrow Transplant 2005;11:945‑56. doi: 10.1016/j.bbmt.2005.09.004

19. Martin PJ, Weisdorf D, Przepiorka D, Hirschfeld S, Farrell A, Rizzo JD i sur. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: VI. Design of clinical trials working group report. Biol Blood Marrow Transplant 2006;12:491‑505. doi: 10.1016/j.bbmt.2006.03.004

20. Shulman HM, Kleiner D, Lee SJ, Morton T, Pavletic SZ, Farmer E i sur. Histopathologic diagnosis of chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: II. Pathology working group report. Biol Blood Marrow Transplant 2006;12:31‑47. doi: 10.1016/j.bbmt.2005.10.023

21. Schultz KR, Miklos DB, Fowler D, Cooke K, Shizuru J, Zorn E i sur. Toward biomarkers for chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: III. Biomarker working group report. Biol Blood Marrow Transplant 2006;12:126‑37. doi: 10.1016/j.bbmt.2005.11.010

22. Pavletic SZ, Martin P, Lee SJ, Mitchell S, Jacobsohn D, Cowen EW i sur. Measuring therapeutic response in chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: IV. Response criteria working group report. Biol Blood Marrow Transplant 2006;12:252‑66. doi: 10.1016/j.bbmt.2006.01.008

23. Couriel D, Carpenter PA, Cutler C, Bolaños-Meade J, Treister NS, Gea-Banacloche J i sur. Ancillary therapy and supportive care of chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: V. Ancillary therapy and supportive care working group report. Biol Blood Marrow Transplant 2006;12:375‑96. doi: 10.1016/j.bbmt.2006.02.003

24. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW i sur. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. The 2014 Diagnosis and staging working group report. Biol Blood Marrow Transplant 2015;21:389-401.e1. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.12.001.

25. Shulman HM, Cardona DM, Greenson JK, Hingorani S, Horn T, Huber E i sur. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: II. The 2014 Pathology working group report. Biol Blood Marrow Transplant 2015;21:589‑603. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.12.031.

26. Paczesny S, Hakim FT, Pidala J, Cooke KR, Lathrop J, Griffith LM i sur. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: III. The 2014 Biomarker working group report. Biol Blood Marrow Transplant 2015;21:780‑92. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.01.003.

27. Lee SJ, Wolff D, Kitko C, Koreth J, Inamoto Y, Jagasia M i sur. Measuring therapeutic response in chronic graft-versus-host disease. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: IV. The 2014 Response criteria working group report. Biol Blood Marrow Transplant 2015;21:984‑99. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.02.025.

28. Carpenter PA, Kitko CL, Elad S, Flowers ME, Gea-Banacloche JC, Halter JP i sur. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: V. The 2014 Ancillary therapy and supportive care working group report. Biol Blood Marrow Transplant 2015;21:1167‑87. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.03.024.

29. Martin PJ, Lee SJ, Przepiorka D, Horowitz MM, Koreth J, Vogelsang GB i sur. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: VI. The 2014 Clinical trial design working group report. Biol Blood Marrow Transplant 2015;21:1343‑59. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.05.004.

30. Coghill JM, Sarantopoulos S, Moran TP, Murphy WJ, Blazar BR, Serody JS. Effector CD4+ T cells, the cytokines they generate, and GVHD: something old and something new. Blood 2011;117:3268‑76. doi: 10.1182/blood-2010-12-290403.

31. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. Nat Rev Immunol 2012;12:443‑58. doi: 10.1038/nri3212.

32. Zeiser R, Blazar BR. Pathophysiology of chronic graft-versus-host disease and therapeutic targets. N Engl J Med 2017;377:2565‑79. doi: 10.1056/NEJMra1703472.

33. Shimabukuro-Vornhagen A, Hallek MJ, Storb RF, von Bergwelt-Baildon MS. The role of B cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. Blood 2009;114:4919‑27. doi: 10.1182/blood-2008-10-161638.

34. Sarantopoulos S, Ritz J. Aberrant B cell homeostasis in chronic GVHD. Blood 2015;125:1703‑7. doi: https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-567834

35. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT i sur. Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. Blood 2009;113:3865‑74. doi: 10.1182/blood-2008-09-177840.

36. Jacobson CA, Sun L, Kim HT, McDonough SM, Reynolds CG, Schowalter M i sur. Post-transplantation B cell activating factor and B cell recovery before onset of chronic graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transplant 2014;20:668‑75. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.01.021.

37. Brink R. Regulation of B cell self-tolerance by BAFF. Semin Immunol 2006;18:276‑83. doi: 10.1016/j.smim.2006.04.003

38. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, Bhuiya NS, Cutler CS, Soiffer RJ i sur. High levels of B-cell activating factor in patients with active chronic graft-versus-host disease. Clin Cancer Res 2007;13:6107‑14. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1290

39. Cutler C, Kim HT, Bindra B, Sarantopoulos S, Ho VT, Chen YB i sur. Rituximab prophylaxis prevents corticosteroid-requiring chronic GVHD after

allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: results of a phase 2 trial. Blood 2013;122:1510‑7. doi: 10.1182/blood-2013-04-495895.

40. Arai S, Sahaf B, Narasimhan B, Chen GL, Jones CD, Lowsky R i sur. Prophylactic rituximab after allogeneic transplantation decreases B-cell alloimmunity with low chronic GVHD incidence. Blood 2012;119:6145‑54. doi: 10.1182/blood-2011-12-395970.

41. Kuzmina Z, Gounden V, Curtis L, Avila D, Rnp TT, Baruffaldi J i sur. Clinical significance of autoantibodies in a large cohort of patients with chronic graft-versus-host disease defined by NIH criteria. Am J Hematol 2015;90:114‑9. doi: 10.1002/ajh.23885.

42. Lee SJ, Flowers MED. Recognizing and managing chronic graft-versus-host disease. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2008:134-41. doi: 10.1182/asheducation-2008.1.134.

43. Arai S, Arora M, Wang T, Spellman SR, He W, Couriel DR i sur. Increasing incidence of chronic graft-versus-host disease in allogeneic transplantation: A report from the center for international blood and marrow transplant research. Biol Blood Marrow Transplant 2015;21:266‑74. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.10.021.

44. Flowers MED, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem HP, Petersdorf EW i sur. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. Blood 2011;117:3214‑9. doi: 10.1182/blood-2010-08-302109.

45. Lazarus HM, Laughlin MJ. Allogeneic stem cell transplantation. Springer Science & Business Media, 2010.

46. Akpek G, Lee SM, Anders V, Vogelsang GB. A high-dose pulse steroid regimen for controlling active chronic graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transplant 2001;7:495‑502. doi: 10.1053/bbmt.2001.v7.pm11669216

47. Wolff D, Schleuning M, von Harsdorf S, Bacher U, Gerbitz A, Stadler M i sur. Consensus conference on clinical practice in chronic GVHD: Second-line treatment of chronic graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transplant 2011;17:1‑17. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.05.011.

48. Grkovic L, Baird K, Steinberg SM, Williams KM, Pulanic D, Cowen EW i sur. Clinical laboratory markers of inflammation as determinants of chronic graft-versus-host disease activity and NIH global severity. Leukemia 2012;26:633‑43. doi: 10.1038/leu.2011.254.

49. Pidala J, Sarwal M, Roedder S, Lee SJ. Biologic markers of chronic GVHD. Bone Marrow Transplant 2014;49:324‑31. doi: 10.1038/bmt.2013.97.

50. Lauc G, Rudan I, Campbell H, Rudd PM. Complex genetic regulation of protein glycosylation. Mol Biosyst 2010;6:329‑35. doi: 10.1039/b910377e.

51. Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. Nat Rev Mol Cell Biol 2012;13:448‑62. doi: 10.1038/nrm3383.

52. Gornik O, Pavić T, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins — Implications on evolution and disease. Biochim Biophys Acta 2012;1820:1318‑26. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.12.004.

53. Varki A, Cummings RD, Esko JD ur. Essentials of glycobiology. 2. izd. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1908/.

54. Freeze HH. Genetic defects in the human glycome. Nat Rev Genet 2006;7:537‑51. doi: 10.1038/nrg1894.

55. Zielinska DF, Gnad F, Wiśniewski JR, Mann M. Precision mapping of an in vivo N-glycoproteome reveals rigid topological and sequence constraints. Cell 2010;141:897‑907. doi: 10.1016/j.cell.2010.04.012.

56. Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. Dis Markers 2008;25:267‑78.

57. Delves PJ. The role of glycosylation in autoimmune disease. Autoimmunity 1998;27:239‑53.

58. Jennewein MF, Alter G. The immunoregulatory roles of antibody glycosylation. Trends Immunol 2017;38:358‑72. doi: 10.1016/j.it.2017.02.004.

59. Jefferis R. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. Biotechnol Prog 2005;21:11‑6. doi: 10.1021/bp040016j.

60. Böhm S, Schwab I, Lux A, Nimmerjahn F. The role of sialic acid as a modulator of the anti-inflammatory activity of IgG. Semin Immunopathol 2012;34:443‑53. doi: 10.1007/s00281-012-0308-x.

61. Pučić M, Knežević A, Vidič J, Adamczyk B, Novokmet M, Polasek 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;10:M111.010090. doi: 10.1074/mcp.M111.010090.

62. 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;9:e1003225. doi: 10.1371/journal.pgen.1003225.

63. Knežević A, Gornik O, Polašek O, Pucic M, Redzic I, Novokmet M i sur. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. Glycobiology 2010;20:959‑69. doi: 10.1093/glycob/cwq051.

64. 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;8(12):e82558. doi: 10.1371/journal.pone.0082558.

65. Gornik O, Wagner J, Pučić M, Knežević A, Redžić I, Lauc G. Stability of N-glycan profiles in human plasma. Glycobiology 2009;19:1547‑53. doi: 10.1093/glycob/cwp134.

66. Quast I, Keller CW, Maurer MA, Giddens JP, Tackenberg B, Wang LX i sur. Sialylation of IgG Fc domain impairs complement-dependent cytotoxicity. J Clin Invest 2015;125:4160‑70. doi: 10.1172/JCI82695.

67. 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 FcγRIII and antibodies lacking core fucose. Proc Natl Acad Sci 2011;108:12669‑74. doi: 10.1073/pnas.1108455108.

68. Sondermann P, Pincetic A, Maamary J, Lammens K, Ravetch JV. General mechanism for modulating immunoglobulin effector function. Proc Natl Acad Sci 2013;110:9868‑72. doi: 10.1073/pnas.1307864110.

69. Prenc E, Pulanic D, Pucic-Bakovic M, Pezer M, Desnica L, Vrhovac R i sur. Potential of glycosylation research in graft versus host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Biochim Biophys Acta 2016;1860(8):1615-22. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.02.015.

70. 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;57:1‑13. doi: 10.1016/j.jaut.2014.12.002.

71. Trbojevic Akmacic 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;21:1237‑47. doi: 10.1097/MIB.0000000000000372.

72. Vuckovic F, Kristic J, Gudelj I, Teruel M, Keser T, Pezer M i sur. Association of systemic lupus erythematosus with decreased immunosuppressive potential of the IgG glycome. Arthritis Rheumatol 2015;67:2978‑89. doi: 10.1002/art.39273.

73. Bond A, Alavi A, Axford JS, Youinou P, Hay FC. The relationship between exposed galactose and N-acetylglucosamine residues on IgG in rheumatoid arthritis (RA), juvenile chronic arthritis (JCA) and Sjögren's syndrome (SS). Clin Exp Immunol 1996;105:99‑103.

74. Koleba T, Ensom MHH. Pharmacokinetics of intravenous immunoglobulin: A systematic review. Pharmacotherapy. 2006 Jun;26(6):813-27. doi: 10.1592/phco.26.6.813.

75. Mitchell SA, Leidy NK, Mooney KH, Dudley WN, Beck SL, LaStayo PC i sur. Determinants of functional performance in long-term survivors of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with chronic graft-versus-host disease (cGVHD). Bone Marrow Transplant 2010;45:762‑9. doi: 10.1038/bmt.2009.238.

76. Bakovic 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;12:821‑31. doi: 10.1021/pr300887z.

77. Huffman JE, Pucic-Bakovic M, Klaric L, Hennig R, Selman MH, 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;13:1598‑610. doi: 10.1074/mcp.M113.037465.

78. Selman MHJ, Derks RJE, Bondt A, Palmblad M, Schoenmaker B, Koeleman CA i sur. Fc specific IgG glycosylation profiling by robust nano-reverse phase HPLC-MS using a sheath-flow ESI sprayer interface. J Proteomics 2012;75:1318‑29. doi: 10.1016/j.jprot.2011.11.003.

79. Pezer M, Stambuk J, Perica M, Razdorov G, Banic I, Vuckovic F i sur. Effects of allergic diseases and age on the composition of serum IgG glycome in children. Sci Rep 2016;6:33198. doi: 10.1038/srep33198.

80. Pause Ž. Uvod u matematičku statistiku. Zagreb: Školska knjiga, 1993.

81. Hollander M, Wolfe DA. Nonparametric Statistical Methods. 2. izd. NY John Wiley Sons Inc 1999;189-269.

82. Wold S, Esbensen K, Geladi P. Principal component analysis. Chemom Intell Lab Syst 1987;2:37‑52.

83. Pidala J, Kurland B, Chai X, Majhail N, Weisdorf DJ, Pavletic S i sur. Patient-reported quality of life is associated with severity of chronic graft-versus-host disease as measured by NIH criteria: report on baseline data from the Chronic GVHD Consortium. Blood 2011;117:4651‑7. doi: 10.1182/blood-2010-11-319509.

84. Fraser CJ, Bhatia S, Ness K, Carter A, Francisco L, Arora M i sur. Impact of chronic graft-versus-host disease on the health status of hematopoietic cell transplantation survivors: a report from the Bone Marrow Transplant Survivor Study. Blood 2006;108:2867‑73. doi: 10.1182/blood-2006-02-003954.

85. Wolff D, Greinix H, Lee SJ, Gooley T3, Paczesny S4, Pavletic S i sur. Biomarkers in chronic graft-versus-host disease: quo vadis? Bone Marrow Transplant. 2018;53(7):832-837. doi: 10.1038/s41409-018-0092-x.

86. National research council (US) committee on assessing the importance and impact of glycomics and glycosciences. Transforming glycoscience: A Roadmap for the future. Washington (DC): National Academies Press (US), 2012. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK109958/.

87. Abrahamsen IW, Somme S, Heldal D, Egeland T, Kvale D, Tjonnfjord GE. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: the impact of stem cell source and graft-versus-host disease. Haematologica 2005;90:86‑93.

88. Parekh RB, Roitt IM, Isenberg DA, Dwek RA, Ansell BM, Rademacher TW. Galactosylation of IgG associated oligosaccharides: reduction in patients with adult and juvenile onset rheumatoid arthritis and relation to disease activity. Lancet Lond Engl 1988;1:966‑9.

89. Gińdzieńska-Sieśkiewicz E, Radziejewska I, Domysławska I, Klimiuk PA, Sulik A, Rojewska J i sur. Changes of glycosylation of IgG in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. Adv Med Sci 2016;61(2):193‑7. doi: 10.1016/j.advms.2015.12.009.

90. Ercan A, Cui J, Chatterton DEW, Deane KD, Hazen MM, Brintnell W i sur. Aberrant IgG galactosylation precedes disease onset, correlates with disease activity, and is prevalent in autoantibodies in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 62:2239‑48. doi: 10.1002/art.27533.

91. Gudelj I, Salo PP, Trbojević-Akmacic I, Albers M, Primorac D, Perola M i sur. Low galactosylation of IgG associates with higher risk for future diagnosis of rheumatoid arthritis during 10 years of follow-up. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2018;1864(6 Pt A):2034-2039. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.03.018.

92. de Jong SE, Selman MHJ, Adegnika AA, Amoah AS, van Riet E, Kruize YC i sur. IgG1 Fc N-glycan galactosylation as a biomarker for immune activation. Sci Rep 2016;6:28207. doi: 10.1038/srep28207.

93. Plomp R, Ruhaak LR, Uh H-W, Reiding KR, Selman M, Houwing-Duistermaat JJ i sur. Subclass-specific IgG glycosylation is associated with markers of inflammation and metabolic health. Sci Rep 2017;7:12325. doi: 10.1038/s41598-017-12495-0.

94. Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM, Fischer PB, Dwek RA, Sim RB. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatooid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. Nat Med 1995;1:237‑43.

95. Jefferis R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. Nat Rev Drug Discov 2009;8:226‑34. doi: 10.1038/nrd2804.

96. Vukic T, Smith SR, Ljubas Kelecic D, Desnica L, Prenc E, Pulanić D i sur. Joint and fascial chronic graft-vs-host disease: correlations with clinical and laboratory parameters. Croat Med J 2016;57:266‑75. doi: 10.3325/cmj.2016.57.266

97. de Haan N, Tol V, D MJ, Driessen GJ, Wuhrer M, Lankester AC. Immunoglobulin G fragment crystallizable glycosylation after hematopoietic stem cell transplantation is dissimilar to donor profiles. Front Immunol Internet 2018; 9:1238. doi: 10.3389/fimmu.2018.01238.

98. Manhardt CT, Punch PR, Dougher CWL, Lau JTY. Extrinsic sialylation is dynamically regulated by systemic triggers in vivo. J Biol Chem 2017;292:13514‑20. doi: 10.1074/jbc.C117.795138.

99. Holland M, Yagi H, Takahashi N, Kato K, Savage CO, Goodall DM i sur. Differential glycosylation of polyclonal IgG, IgG-Fc and IgG-Fab isolated from the sera of patients with ANCA-associated systemic vasculitis. Biochim Biophys Acta. 2006;1760(4):669-77. doi: 10.1016/j.bbagen.2005.11.021.

100. van de Bovenkamp FS, Hafkenscheid L, Rispens T, Rombouts Y. The emerging importance of IgG Fab glycosylation in immunity. J Immunol 2016;196:1435‑41. doi: 10.4049/jimmunol.1502136.

101. Davies J, Jiang L, Pan L-Z, LaBarre MJ, Anderson D, Reff M. Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FCγRIII. Biotechnol Bioeng 2001;74(4):288‑94.

102. Shinzaki S, Iijima H, Nakagawa T, Egawa S, Nakajima S, Ishii S, i sur. IgG oligosaccharide alterations are a novel diagnostic marker for disease activity and the clinical course of inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2008;103(5):1173‑81. doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01699.x.

103. Inamoto Y, Pidala J, Chai X, Kurland BF, Weisdorf D, Flowers ME, i sur. Assessment of joint and fascia manifestations in chronic graft-versus-host disease. Arthritis Rheumatol 2014;66 (4):1044‑52. doi: 10.1002/art.38293.

104. Martires KJ, Baird K, Steinberg SM, Grkovic L, Joe GO, Williams KM i sur. Sclerotic-type chronic GVHD of the skin: clinical risk factors, laboratory markers, and burden of disease. Blood 2011;118(15):4250‑7. doi: 10.1182/blood-2011-04-350249.

105. Ma Q, Li D, Carreño R, Patenia R, Tsai KY, Xydes-Smith M i sur. Complement component C3 mediates Th1/Th17 polarization in human T-cell activation and cutaneous GVHD. Bone Marrow Transplant 2014;49(7):972‑6. doi: 10.1038/bmt.2014.75.

11. Kratka biografija

Ema Prenc (rođ. Plačko) zvanje diplomiranog inženjera biologije stekla je 2011. godine diplomiravši na Prirodoslovno matematičkom fakultetu, Biološkom odsjeku među 10 najboljih studenata te godine (prosjek 4,5).

Upisala je poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2013. godine. Iduće godine pridružuje se interdisciplinarnom timu za cGvHD kao doktorandica na projektu „*Clinical and biological factors determining severity and activity of chronic graft- versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*“ financiranom od strane Fonda „Jedinstvo uz pomoć znanja“. Autorica je 3 znanstvena rada o kroničnom GVHD-u objavljena u CC/SCI časopisima, 6 kongresnih priopćenja i 3 sažetka u zbornicima skupova. Aktivno je sudjelovala u više prijava znanstvenih projekata, kao i u njihovom provođenju.

Danas je zaposlenica tvrtke Belupo lijekovi i kozmetika d.d., ponosna supruga i majka te aktivna sportašica te trenerica odbojke.

DODACI

Tablica D1. Derivirani parametri glikozilacije IgG-a (UPLC). Ukupne glikane (GP) čine kromatografski pikovi GP1 do GP24.

OZNAKA	OZNAKA SIMBOLIMA	OPIS	FORMULA
IGP24	FGS/(FG+FGS)	*Udio sijalinizacije fukoziliranih galaktoziliranih struktura bez račvajućeg GlcNAc u ukupnim IgG glikanima*	*SUM(GP16 + GP18 + GP23) / SUM(GP16 + GP18 + GP23 + GP8 + GP9 + GP14) * 100*
IGP25	FBGS/(FBG+FBGS)	*Udio sijalinizacije fukoziliranih galaktoziliranih struktura s račvajućim GlcNAc u ukupnim IgG glikanima*	*SUM(GP19 + GP24) / SUM(GP19 + GP24 + GP10 + GP11 + GP15) * 100*
IGP26	FGS/(F+FG+FGS)	*Udio sijalinizacije svih fukoziliranih struktura bez račvajućeg GlcNAc u ukupnim IgG glikanima*	*SUM(GP16 + GP18 + GP23) / SUM(GP16 + GP18 + GP23 + GP4 + GP8 + GP9 + GP14) * 100*
IGP27	FBGS/(FB+FBG+FBGS)	*Udio sijalinizacije svih fukoziliranih struktura s račvajućim GlcNAc u ukupnim IgG glikanima*	*SUM(GP19 + GP24) / SUM(GP19 + GP24 + GP6 + GP10 + GP11 + GP15) * 100*
IGP28	FG1S1/(FG1+FG1S1)	*Udio monosijalinizacije fukoziliranih monogalaktoziliranih struktura u ukupnim IgG glikanima*	*GP16 / SUM(GP16 + GP8 + GP9) * 100*
IGP29	FG2S1/(FG2+FG2S1+FG2S2)	*Udio monosijalinizacije fukoziliranih digalaktoziliranih struktura bez račvajućeg GlcNAc u ukupnim IgG glikanima*	*GP18 / SUM(GP18 + GP14 + GP23) * 100*
IGP30	FG2S2/(FG2+FG2S1+FG2S2)	*Udio disijalinizacije fukoziliranih digalaktoziliranih struktura bez račvajućeg GlcNAc u ukupnim IgG glikanima*	*GP23 / SUM(GP23 + GP14 + GP18) * 100*

IGP31	FBG2S1/(FBG2+FBG2S1+FBG2S2)	*Udio monosijalinizacije fukoziliranih digalaktoziliranih struktura s račvajućim GlcNAc u ukupnim IgG glikanima*	*GP19 / SUM(GP19 + GP15 + GP24) * 100*
IGP32	FBG2S2/(FBG2+FBG2S1+FBG2S2)	*Udio disijalinizacije fukoziliranih digalaktoziliranih struktura s račvajućim GlcNAc u ukupnim IgG glikanima*	*GP24 / SUM(GP24 + GP15 + GP19) * 100*
IGP33	$F^{total}S1/F^{total}S2$	*Omjer svih fukoziliranih (+/- račvajući GlyNAc) monosijaliniziranih i disijaliniziranih struktura u ukupnim IgG glikanima*	*SUM(GP16 + GP18 + GP19) / SUM(GP23 + GP24)*
IGP34	FS1/FS2	*Omjer fukoziliranih (bez račvajućeg GlcNAc) monosijaliniziranih i disijaliniziranih struktura u ukupnim IgG glikanima*	*SUM(GP16 + GP18) / GP23*
IGP35	FBS1/FBS2	*Omjer fukoziliranih (sa račvajućim GlcNAc) monosijaliniziranih i disijaliniziranih struktura u ukupnim IgG glikanima*	*GP19 / GP24*
IGP36	FBS^{total}/FS^{total}	*Omjer svih fukoziliranih sijaliniziranih struktura s i bez račvajućeg GlcNAc*	*SUM(GP19 + GP24) / SUM(GP16 + GP18 + GP23)*
IGP37	FBS1/FS1	*Omjer svih fukoziliranih monosijaliniziranih struktura s i bez račvajućeg GlcNAc*	*GP19 / SUM(GP16 + GP18)*
IGP38	FBS1/(FS1+FBS1)	*Učestalost račvajućeg GlcNAc u svim fukoziliranim monosijaliniziranim strukturama u ukupnim IgG glikanima*	*GP19 / SUM(GP16 + GP18 + GP19)*
IGP39	FBS2/FS2	*Omjer fukoziliranih disijaliniziranih struktura s i bez račvajućeg GlcNAc*	*GP24 / GP23*
IGP40	FBS2/(FS2+FBS2)	*Učestalost račvajućeg GlcNAc u svim fukoziliranim disijaliniziranim strukturama u ukupnim IgG glikanima*	*GP24 / SUM(GP23 + GP24)*
IGP41	$GP1^{n}$	*Udio GP1 (FA1) glikana u ukupnim neutralnim IgG glikanima (GP^{n})*	*GP1 / GP^{n}* 100*

IGP42	$GP2^n$	*Udio GP2 (A2) glikana u ukupnim neutralnim IgG glikanima (GP^n)*	*$GP2 / GP^n * 100$*
IGP43	$GP4^n$	*Udio GP4 (FA2) glikana u ukupnim neutralnim IgG glikanima (GP^n)*	*$GP4 / GP^n * 100$*
IGP44	$GP5^n$	*Udio GP5 (M5) glikana u ukupnim neutralnim IgG glikanima (GP^n)*	*$GP5 / GP^n * 100$*
IGP45	$GP6^n$	*Udio GP6 (FA2B) glikana u ukupnim neutralnim IgG glikanima (GP^n)*	*$GP6 / GP^n * 100$*
IGP46	$GP7^n$	*Udio GP7 (A2G1) glikana u ukupnim neutralnim IgG glikanima (GP^n)*	*$GP7 / GP^n * 100$*
IGP47	$GP8^n$	*Udio GP8 (FA2[6]G1) glikana u ukupnim neutralnim IgG glikanima (GP^n)*	*$GP8 / GP^n * 100$*
IGP48	$GP9^n$	*Udio GP9 (FA2[3]G1) glikana u ukupnim neutralnim IgG glikanima (GP^n)*	*$GP9 / GP^n * 100$*
IGP49	$GP10^n$	*Udio GP10 (FA2[6]BG1) glikana u ukupnim neutralnim IgG glikanima (GP^n)*	*$GP10 / GP^n * 100$*
IGP50	$GP11^n$	*Udio GP11 (FA2[3]BG1) glikana u ukupnim neutralnim IgG glikanima (GP^n)*	*$GP11 / GP^n * 100$*
IGP51	$GP12^n$	*Udio GP12 (A2G2) glikana u ukupnim neutralnim IgG glikanima (GP^n)*	*$GP12 / GP^n * 100$*
IGP52	$GP13^n$	*Udio GP13 (A2BG2) glikana u ukupnim neutralnim IgG glikanima (GP^n)*	*$GP13 / GP^n * 100$*
IGP53	$GP14^n$	*Udio GP14 (FA2G2) glikana u ukupnim neutralnim IgG glikanima (GP^n)*	*$GP14 / GP^n * 100$*
IGP54	$GP15^n$	*Udio GP15 (FA2BG2) glikana u ukupnim neutralnim IgG glikanima (GP^n)*	*$GP15 / GP^n * 100$*

IGP55	$G0^n$	*Udio agalaktoziliranih struktura u ukupnim neutralnim IgG glikanima*	*$SUM(GP1^n: GP6^n)$*
IGP56	$G1^n$	*Udio monogalaktoziliranih struktura u ukupnim neutralnim IgG glikanima*	*$SUM(GP7^n: GP11^n)$*
IGP57	$G2^n$	*Udio digalaktoziliranih struktura u ukupnim neutralnim IgG glikanima*	*$SUM(GP12^n: GP15^n)$*
IGP58	$F^{n\ total}$	*Udio svih fukoziliranih struktura (+/-račvajući GlcNAc) u ukupnim neutralnim IgG glikanima*	*$SUM(GP1^n + GP4^n + GP5^n + GP6^n + GP8^n + GP9^n + GP10^n + GP11^n + GP14^n + GP15^n)$*
IGP59	$FG0^{n\ total}/G0^n$	*Udio fukozilacije agalaktoziliranih struktura*	*$SUM(GP1^n + GP4^n + GP5^n + GP6^n) / G0^n * 100$*
IGP60	$FG1^{n\ total}/G1^n$	*Udio fukozilacije monogalaktoziliranih struktura*	*$SUM(GP8^n + GP9^n + GP10^n + GP11^n) / G1^n * 100$*
IGP61	$FG2^{n\ total}/G2^n$	*Udio fukozilacije digalaktoziliranih struktura*	*$SUM(GP14^n + GP15) / G2^n * 100$*
IGP62	F^n	*Udio fukoziliranih struktura (bez račvajućeg GlcNAc) u ukupnim neutralnim IgG glikanima*	*$SUM(GP1^n + GP4^n + GP5^n + GP8^n + GP9^n + GP14^n)$*
IGP63	$FG0^n/G0^n$	*Udio fukozilacije agalaktoziliranih struktura (bez račvajućeg GlcNAc)*	*$SUM(GP1^n + GP4^n + GP5^n) / G0^n * 100$*
IGP64	$FG1^n/G1^n$	*Udio fukozilacije monogalaktoziliranih struktura (bez račvajućeg GlcNAc)*	*$SUM(GP8^n + GP9^n) / G1^n * 100$*
IGP65	$FG2^n/G2^n$	*Udio fukozilacije digalaktoziliranih struktura (bez račvajućeg GlcNAc)*	*$GP14^n / G2^n * 100$*
IGP66	FB^n	*Udio fukoziliranih struktura (s račvajućim GlcNAc) u ukupnim neutralnim IgG glikanima*	*$SUM(GP6^n + GP10^n + GP11^n + GP15^n)$*
IGP67	$FBG0^n/G0^n$	*Udio fukozilacije agalaktoziliranih struktura (s račvajućim GlcNAc)*	*$GP6^n / G0^n * 100$*

IGP68	$FBG1^n/G1^n$	*Udio fukozilacije monogalaktoziliranih struktura (s račvajućim GlcNAc)*	$SUM(GP10^n + GP11^n) / G1^n * 100$
IGP69	$FBG2^n/G2^n$	*Udio fukozilacije digalaktoziliranih struktura (s račvajućim GlcNAc)*	$GP15) / G2^n * 100$
IGP70	FB^n/F^n	*Omjer fukoziliranih struktura s ili bez račvajućeg GlcNAc*	$FB^n/ F^n * 100$
IGP71	$FB^n/F^{n\ total}$	*Učestalost račvajućeg GlcNAc-a u svim fukoziliranim strukturama u ukupnim neutralnim IgG glikanima*	$FB^n/ F^{n\ total} * 100$
IGP72	$F^n/(B^n + FB^n)$	*Omjer fukoziliranih struktura s neračvajućim GlcNAc-a i svih struktura s račvajućim GlcNAc*	$F^n/(GP13^n + FB^n)$
IGP73	$B^n/(F^n + FB^n)$	*Omjer struktura s račvajućim GlcNAc i svih fukoziliranih struktura (+/- račvajući GlcNAc)*	$GP13^n/ (F^n+ FB^n) * 1000$
IGP74	$FBG2^n/FG2^n$	*Omjer fukoziliranih digalaktoziliranih struktura s i bez račvajućeg GlcNAc*	$GP15^n/GP14^n$
IGP75	$FBG2^n /(FG2^n + FBG2^n)$	*Učestalost račvajućeg GlcNAc u svim fukoziliranim digalaktoziliranim strukturama u ukupnim neutralnim IgG glikanima*	$GP15^n/(GP14^n + GP15^n) * 100$
IGP76	$FG2^n/(BG2^n + FBG2^n)$	*Omjer fukoziliranih digalaktoziliranih struktura s neračvajućim GlcNAc i svih digalaktoziliranih struktura s račvajućim GlcNAc u ukupnim neutralnim IgG glikanima*	$GP14^n/(GP13^n + GP15^n)$
IGP77	$BG2^n/(FG2^n + FBG2^n)$	*Omjer digalaktoziliranih struktura s račvajućim GlcNAc i svih fukoziliranih digalaktoziliranih struktuta (+/- račvajući GlcNAc) u ukupnim neutralnim IgG glikanima*	$GP15^n/(GP14^n + GP15^n) * 1000$
B	-	*Udio svih struktura koji sadrže račvajući GlcNAc u ukupnim glikanima IgG-a*	*SUM(GP3 + GP6 + GP10 + GP11 + GP13 + GP15 + GP19 + GP22 + GP24) / GP*

F	-	*Udio svih fukoziliranih struktura u ukupnim glikanima IgG-a*	*SUM(GP1 + GP4 + GP6 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11 + GP14 + GP15 + GP16 + GP18 + GP19 + GP23 + GP24) / GP*
S		*Udio svih sijaliniziranih struktura u ukupnim glikanima IgG-a*	*SUM(GP16 + GP17 + GP18 + GP19 + GP21 + GP22 + GP23 + GP24) / GP*
G0	-	*Udio svih agalaktoziliranih struktura u ukupnim glikanima IgG-a*	*SUM(GP1 + GP2 + GP3 + GP4 + GP6) / GP*
G1	-	*Udio svih monogalaktoziliranih struktura u ukupnim glikanima IgG-a*	*SUM(GP7 + GP8 + GP9 + GP10 + GP11) / GP*
G2	-	*Udio svih digalaktoziliranih struktura u ukupnim glikanima IgG-a*	*SUM(GP12 + GP13 + GP14 + GP15) / GP*

Kratice: GPXX – glikanski pik, XX – broj između 1 i 24. IGPXX – derivirani parametar IgG glikozilacije, XX – broj između 24 i 77. F – fukoza, G – galaktoza, S – sijalinska kiselina, B – račvajući GlcNAc

Tablica D2. Rezultati univarijatne analize uzoraka američkih cGvHD pacijenata analiziranih UPLC metodom

A) Težina (stupanj) kroničnog GvHD-a

Univarijatna analiza NIH ocjena pojedinih organskih sustava naspram pojedinih glikanskih struktura i deriviranih parametara. Tablica prikazuje razinu značajnosti pojedinog glikana pri usporedbi dviju NIH ocjena pojedinih organskih sustava zahvaćenih cGvHD-om. *Primjerice, za pregled značajnosti glikana GP1 pri usporedbi NIH ocjene 0 za kožu naspram NIH ocjene 3, potrebno je u koloni koja pripada NIH ocjeni kože (razina A=0, razina B=3) pronaći ćeliju koja pripada retku GP1 (p=0,2774).*

Žutom bojom i podebljanim brojevima naznačene su statističke vrijednosti koje se smatraju značajnima.

	NIH ocjena koža						NIH ocjena usta						NIH ocjena jetra					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
GP1	0,6783	0,9943	0,2774	0,6067	0,8471	0,2662	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9637	0,4397	0,4990	0,4828	0,4860	0,4397
GP2	0,8571	0,5907	0,8595	0,8912	0,5907	0,3654	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4397	0,8308	1,0000	0,8150	0,8803	0,9749
GP3	0,6748	0,9943	0,0709	0,6412	0,3654	0,0850	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,8795	0,4397	0,4397	0,5549	0,4397	0,4397
GP4	0,9943	0,9429	0,3156	0,8982	0,3156	0,2540	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,5525	0,5317	0,6707	0,9367	0,4873	0,4632
GP5	0,7876	0,9035	0,4280	0,6533	0,9396	0,4546	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9097	0,5868	0,5715	0,5070	0,6230	0,4397
GP6	0,2492	0,4254	0,4952	0,9240	0,0526	0,1484	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4397	0,8035	0,4632	0,8167	0,4397	0,4397
GP7	0,8571	0,4442	0,9943	0,8371	0,8002	0,4023	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9741	1,0000	0,8969	1,0000	0,9036	0,8709
GP8	0,9167	0,9308	0,0526	0,8824	0,0526	0,0526	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,8187	0,7682	0,4397	0,9570	0,4397	0,4397
GP9	0,5033	0,9858	0,0855	0,4472	**0,0474**	0,2774	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,5393	0,8760	0,6850	0,8682	0,5525	0,5525
GP10	0,3705	0,4043	0,1581	0,9240	0,9657	0,8489	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,5721	0,9036	0,6707	0,8445	0,5317	0,5525
GP11	0,9867	0,6412	0,7665	0,8002	0,6924	0,3555	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	1,0000	0,6273	0,4397	0,7695	0,4397	0,4397
GP12	0,9943	0,9943	0,9943	0,9858	0,9943	0,9858	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,5369	0,7861	0,8349	0,9637	0,5317	0,5721
GP13	0,9943	0,9758	0,6412	0,9943	0,6722	0,8489	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,5317	0,8963	0,8349	0,5586	0,8934	0,8795
GP14	0,9657	0,8002	0,0698	0,8571	0,0526	0,0683	0,9761	0,9924	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4843	0,5790	0,4397	1,0000	0,4397	0,4397
GP15	0,9525	0,9249	0,5483	0,8912	0,4998	0,8738	0,9929	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,5868	0,9043	0,9637	0,8678	0,9926	1,0000
GP16	0,3046	0,9612	0,7515	0,4466	0,1159	0,7985	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,8349	0,9992	0,9926	0,8528	0,9570	0,9749

	NIH ocjena koža						NIH ocjena usta						NIH ocjena jetra					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
GP17	0,7973	0,8868	0,3378	0,9880	0,7973	0,6722	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,5317	0,9741	0,9602	0,5868	1,0000	0,9333
GP18	0,8137	0,6083	0,2266	0,8489	0,1078	0,0994	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4397	0,4828	0,4397	0,9741	0,4397	0,4397
GP19	0,3410	0,3056	0,4392	0,9943	0,7876	0,7944	0,9761	0,9761	0,9924	0,9761	0,9761	0,9761	0,6911	0,8795	0,8682	0,5705	0,8963	0,8035
GP20	0,8571	0,9858	0,6973	0,9028	0,9245	0,6412	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,6850	1,0000	0,6339	0,8795	0,7456	0,6096
GP21	0,9240	0,9429	0,8492	0,8868	0,9245	0,7876	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	1,0000	0,6578	1,0000	0,7299	0,8010	0,8548	0,8349
GP22	0,9858	0,7876	0,4325	0,7876	0,4442	0,8824	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,7994	0,8934	0,9741	0,9637	0,8963	0,8795
GP23	0,1574	0,2965	0,8738	0,9534	0,2492	0,4005	0,9761	0,9761	0,9761	0,9929	0,9761	0,9761	0,4397	0,4397	0,4667	0,9570	0,4397	0,4397
GP24	0,6061	0,3934	0,3934	0,8824	0,9612	0,9249	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,8795	1,0000	0,8795	0,9637	0,9036	0,8349
IGP24	0,3811	0,5868	0,4952	0,9240	0,9249	0,9943	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,6273	0,7954	0,8035	1,0000	0,6094	0,6515
IGP25	0,2032	0,0818	0,0629	0,9119	0,9429	0,9396	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,7485	0,9218	0,8795	0,7861	0,8445	1,0000
IGP26	0,5406	0,6181	0,6722	0,8868	0,2283	0,2774	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4632	0,4910	0,5317	0,9043	0,4397	0,4397
IGP27	0,0994	0,0922	0,3608	0,9943	0,3934	0,4280	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4397	0,8795	0,6850	0,6763	0,5125	0,5721
IGP28	0,4377	0,9429	0,1159	0,5868	0,8492	0,2488	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9741	0,6301	0,4478	0,8035	0,4873	0,4397
IGP29	0,9138	0,9429	0,1581	0,8860	0,1581	0,3286	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9741	1,0000	0,6707	1,0000	0,6763	0,6763
IGP30	0,1926	0,2961	**0,0474**	0,8824	0,6209	0,4804	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	1,0000	0,9741	0,9491	0,9637	1,0000	1,0000
IGP31	0,3934	0,1159	0,3378	0,6941	0,9858	0,5990	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,7695	0,5070	0,8963	0,4397	0,8548	1,0000

	NIH ocjena koža						NIH ocjena usta						NIH ocjena jetra					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
IGP32	0,6462	0,3378	0,1581	0,8137	0,5483	0,9041	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,8963	0,8934	0,8803	0,8305	0,9036	0,9637
IGP33	0,5004	0,2593	0,0526	0,8738	0,3286	0,6083	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9097	1,0000	0,8934	1,0000	0,8778	0,9637
IGP34	0,2458	0,2961	0,0592	0,9245	0,8912	0,7876	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,8963	0,7994	0,9175	0,8963	0,8934	0,8963
IGP35	0,8137	0,9041	0,9041	0,9245	0,6412	0,8571	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,7594	0,5894	0,8795	0,4632	0,8795	1,0000
IGP36	0,8556	0,6412	**0,0474**	0,8489	0,0526	0,3378	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,7456	0,4478	0,4397	0,7249	0,4397	0,4397
IGP37	0,7876	0,5907	**0,0474**	0,9138	0,1344	0,4125	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,8760	0,4397	0,4397	0,5595	0,4397	0,4397
IGP38	0,7876	0,5907	**0,0474**	0,9138	0,1344	0,4125	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,8760	0,4397	0,4397	0,5595	0,4397	0,4397
IGP39	0,7277	0,9943	0,1581	0,8273	0,0698	0,4472	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4860	0,4397	0,4397	0,8963	0,4397	0,4397
IGP40	0,7277	0,9943	0,1581	0,8273	0,0698	0,4472	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4860	0,4397	0,4397	0,8963	0,4397	0,4397
IGP41	0,6067	0,9943	0,2774	0,5942	0,8854	0,3012	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	1,0000	0,4397	0,4990	0,4873	0,4873	0,4397
IGP42	0,8201	0,6067	0,8860	0,9138	0,5907	0,3953	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4397	0,8795	1,0000	0,8308	0,8934	0,9749
IGP43	0,9126	0,9919	0,1581	0,9028	0,2774	0,2373	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,5715	0,5715	0,5979	0,9570	0,4990	0,4397
IGP44	0,6368	0,9758	0,3934	0,7858	0,9385	0,5743	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,8308	0,6578	0,5868	0,4873	0,6763	0,4632
IGP45	0,3286	0,5141	0,4005	0,9138	0,0526	0,1378	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4632	0,8305	0,4478	0,8308	0,4397	0,4397
IGP46	0,9126	0,5244	0,9943	0,8571	0,8571	0,4998	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	1,0000	1,0000	0,9728	1,0000	0,9637	0,8963
IGP47	0,9657	0,7944	0,0850	0,7106	0,0526	0,0526	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,5868	0,6795	0,4397	1,0000	0,4397	0,4397

	NIH ocjena koža						NIH ocjena usta						NIH ocjena jetra					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
IGP48	0,4012	0,9943	0,1264	0,5002	0,0503	0,2635	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4397	0,8318	0,6763	0,8778	0,5070	0,5525
IGP49	0,4546	0,4952	0,1821	0,9249	0,9657	0,7876	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,6763	0,9741	0,7185	0,8795	0,6230	0,6515
IGP50	0,9591	0,6412	0,8040	0,8824	0,8738	0,3953	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9749	0,7083	0,4667	0,7147	0,4632	0,4397
IGP51	0,9525	0,9591	0,9858	0,9513	0,9429	0,9534	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4990	0,7609	0,8548	0,9741	0,5393	0,6096
IGP52	0,9657	0,8738	0,6137	0,9429	0,8137	0,9138	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4860	0,9741	0,8682	0,6230	0,9741	0,8963
IGP53	0,9138	0,6696	0,0994	0,8492	0,0526	0,0698	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4397	0,5525	0,4397	1,0000	0,4397	0,4397
IGP54	0,8912	0,9943	0,7376	0,9028	0,5004	0,8002	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,5070	0,8760	0,9780	0,8688	1,0000	1,0000
IGP55	0,9633	0,8824	0,1581	0,9429	0,0855	0,1440	0,9761	0,9924	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4397	0,5715	0,5317	1,0000	0,4397	0,4632
IGP56	0,9612	0,9943	0,0683	0,9943	0,0526	0,0909	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,7031	0,8035	0,6106	1,0000	0,4860	0,4873
IGP57	0,8899	0,6696	0,3555	0,7973	0,2203	0,2203	0,9761	0,9924	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4397	0,4873	0,4990	1,0000	0,4397	0,4397
IGP58	0,8492	0,7876	0,9943	0,9858	0,6232	0,5454	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9741	1,0000	0,9728	1,0000	0,9926	1,0000
IGP59	0,8571	0,6412	0,8738	0,9429	0,8868	0,7438	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,5605	0,9637	0,8803	0,8528	0,9759	0,8795
IGP60	0,8820	0,5364	0,7393	0,8806	0,4461	0,2153	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9036	1,0000	0,8035	1,0000	0,7609	0,8349
IGP61	0,9943	0,9657	0,2540	0,9919	0,3309	0,3286	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	1,0000	0,8803	0,7994	0,9036	0,7250	0,6763
IGP62	0,3449	0,2774	0,9966	0,9633	0,2961	0,2774	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,5317	0,9741	0,4631	0,7627	0,4397	0,4397
IGP63	0,2774	0,3378	0,4998	0,8571	0,5244	0,8571	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,6301	0,9741	0,8445	0,5766	0,6565	0,8795

	NIH ocjena koža						NIH ocjena usta						NIH ocjena jetra					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
IGP64	0,4012	0,3378	0,7106	0,9943	0,1566	0,1462	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4632	0,8795	0,4397	0,8445	0,4397	0,4397
IGP65	0,9943	0,8011	0,1078	0,8912	0,1378	0,0994	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,8963	0,7322	0,4828	0,8760	0,4397	0,4397
IGP66	0,2961	0,3654	0,9633	0,9591	0,2203	0,3012	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,5549	0,9637	0,4397	0,8167	0,4397	0,4397
IGP67	0,3056	0,4472	0,7277	0,8084	0,4442	0,8002	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,8688	0,8795	0,6707	0,6707	0,5715	0,5721
IGP68	0,4330	0,4125	0,8899	0,9406	0,2492	0,2705	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4990	0,8760	0,4397	0,8934	0,4397	0,4397
IGP69	0,9858	0,3654	0,1436	0,6083	0,2662	0,0994	0,9761	0,9761	0,9761	0,9924	0,9761	0,9761	0,5070	0,4397	0,4397	0,7594	0,4397	0,4397
IGP70	0,3012	0,3378	0,9429	0,9858	0,2203	0,2593	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,5317	0,9741	0,4397	0,7249	0,4397	0,4397
IGP71	0,3012	0,3378	0,9429	0,9858	0,2203	0,2593	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,5317	0,9741	0,4397	0,7249	0,4397	0,4397
IGP72	0,3303	0,3378	0,9429	0,9919	0,2433	0,2662	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,5369	0,9741	0,4397	0,7609	0,4397	0,4397
IGP73	0,9429	0,8854	0,6412	0,9429	0,8002	0,9035	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,5070	0,9763	0,8795	0,6578	0,9741	0,8795
IGP74	0,9943	0,4005	0,0526	0,6462	0,0818	0,0526	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,6763	0,5317	0,4397	0,7933	0,4397	0,4397
IGP75	0,9943	0,4005	0,0526	0,6462	0,0818	0,0526	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,6763	0,5317	0,4397	0,7933	0,4397	0,4397
IGP76	0,9867	0,5364	0,0503	0,7883	0,0546	0,0526	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,8035	0,5190	0,4397	0,8308	0,4397	0,4397
IGP77	0,9633	0,8738	0,0526	0,9385	0,0526	0,0855	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9741	0,5715	0,4397	0,5317	0,4397	0,4397
B	0,9245	0,9245	0,9633	0,8982	0,7973	0,9943	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	1,0000	1,0000	0,5979	0,9749	0,6343	0,5721
F	0,8492	0,6696	0,2774	0,7876	0,0855	0,1121	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,5070	0,5644	0,5125	1,0000	0,4397	0,4397

	NIH ocjena koža						NIH ocjena usta						NIH ocjena jetra					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
S	0,4696	0,4621	0,9927	0,8824	0,4005	0,4005	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4397	0,5317	0,6578	0,9637	0,5317	0,5525
G0	0,8912	0,5244	0,6779	0,8738	0,5603	0,2774	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4397	0,6578	1,0000	0,9203	0,8778	0,8963
G1	0,3934	0,4005	0,2492	0,9245	0,8824	0,9138	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,6301	0,9218	0,5979	0,8548	0,5125	0,5070
G2	0,5545	0,6412	0,6696	0,7883	0,2774	0,2521	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,9761	0,4397	0,4667	0,5125	1,0000	0,4397	0,4397

	NIH ocjena oči						NIH ocjena zglobovi i fascije						NIH ocjena pluća					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
GP1	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,1738	0,6870	0,4417	0,8313	0,9657	0,9081	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
GP2	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9834	0,9486	0,8264	0,9081	0,6970	0,8982	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
GP3	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0801	0,1002	0,0603	0,9528	0,8649	0,8496	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
GP4	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	**0,0400**	**0,0182**	0,0888	0,9330	0,9966	0,9330	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
GP5	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9486	0,9966	0,8313	0,9657	0,8982	0,8496	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
GP6	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,2125	**0,0420**	0,4417	0,8605	0,9330	0,7640	1,0000	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
GP7	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9081	0,8982	0,9486	0,9998	0,8982	0,8715	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969

	NIH ocjena oči						NIH ocjena zglobovi i fascije						NIH ocjena pluća					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
GP8	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0934	**0,0045**	0,0994	0,4810	0,9486	0,7735	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
GP9	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,4725	**0,0182**	0,1385	0,4810	0,8782	0,8537	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
GP10	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8782	0,2137	0,3460	0,8313	0,8496	0,9998	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
GP11	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8496	0,8194	0,8732	1,0000	0,9998	0,9966	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
GP12	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8496	0,7735	0,9528	0,9655	0,9486	0,9197	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
GP13	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8792	0,9657	0,9190	0,9081	0,9834	0,9528	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
GP14	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	**0,0228**	**0,0028**	**0,0182**	0,8264	0,8496	0,9998	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
GP15	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,4005	**0,0386**	0,4725	0,8496	0,9834	0,8363	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
GP16	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8313	0,3881	0,6468	0,8572	0,9378	0,9966	0,9969	0,9969	0,9987	0,9987	0,9987	0,9987
GP17	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9655	0,9966	0,5206	0,9657	0,7434	0,5738	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
GP18	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	**0,0360**	**0,0252**	0,0545	0,9341	0,9330	0,9834	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
GP19	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9824	0,9525	0,0567	0,9657	0,0843	**0,0419**	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
GP20	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9466	0,9330	0,7257	0,8313	0,8585	0,4798	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
GP21	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9330	0,8691	0,6774	0,9528	0,4810	0,3570	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
GP22	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,6358	0,6774	0,1955	0,9599	0,8264	0,5797	0,9981	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
GP23	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,3557	0,5352	0,9528	0,9525	0,8892	0,8715	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969

	NIH ocjena oči						NIH ocjena zglobovi i fascije						NIH ocjena pluća					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
GP24	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9998	0,9966	0,2785	0,9966	0,3417	0,2945	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP24	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8768	0,8861	0,9525	0,6970	0,9560	0,8685	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP25	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9330	0,5347	**0,0182**	0,8496	**0,0497**	0,2544	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP26	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0725	0,0900	0,1841	0,9657	0,9966	0,9657	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP27	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,6774	0,8846	0,2852	0,9466	0,0619	0,1803	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP28	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,6804	0,0636	0,6774	0,8264	0,9657	0,8982	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP29	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,2365	**0,0182**	0,2634	0,8606	0,9657	0,9525	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP30	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0994	**0,0252**	**0,0253**	0,8982	0,8496	0,9436	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP31	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,4417	0,2250	**0,0339**	0,9998	0,4579	0,2513	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP32	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,5141	0,1293	0,2106	0,8496	0,8142	0,9486	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP33	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,1271	0,0567	**0,0355**	0,9330	0,5844	0,8264	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP34	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,6666	0,2137	0,0639	0,8982	0,5413	0,8782	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP35	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9528	0,8496	0,9657	0,8496	1,0000	0,8596	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP36	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0810	**0,0237**	**0,0045**	0,9260	0,2779	0,4725	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP37	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,1300	**0,0253**	**0,0028**	0,9528	0,2250	0,2250	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP38	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,1300	**0,0253**	**0,0028**	0,9528	0,2250	0,2250	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969

	NIH ocjena oči						NIH ocjena zglobovi i fascije						NIH ocjena pluća					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
IGP39	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,3991	**0,0435**	0,0637	0,8982	0,8313	0,9466	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP40	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,3991	**0,0435**	0,0637	0,8982	0,8313	0,9466	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP41	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,2374	0,8204	0,4417	0,8264	0,9657	0,8537	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP42	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9528	0,9657	0,8501	0,8982	0,6706	0,8745	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP43	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	**0,0360**	**0,0058**	**0,0435**	0,8892	0,9657	0,9528	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP44	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9657	0,9966	0,8415	0,9998	0,8537	0,8496	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP45	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,2548	**0,0433**	0,5352	0,8264	0,9560	0,7735	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP46	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9068	0,8715	0,9617	0,9966	0,8715	0,8605	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP47	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0639	**0,0045**	0,0801	0,6030	0,9657	0,8496	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP48	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,3371	**0,0086**	0,1645	0,5738	0,9655	0,7189	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP49	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,7397	0,1117	0,2779	0,8313	0,8537	0,9998	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP50	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9486	0,9081	0,9402	0,9998	0,9966	0,9966	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP51	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8313	0,6731	0,9537	0,9560	0,9402	0,8982	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP52	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9525	0,9998	0,9486	0,9466	0,9998	0,9525	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP53	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	**0,0230**	**0,0045**	**0,0182**	0,8496	0,8496	0,9966	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP54	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,3557	**0,0457**	0,5206	0,8982	0,9657	0,8496	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969

	NIH ocjena oči						NIH ocjena zglobovi i fascije						NIH ocjena pluća					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
IGP55	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	**0,0419**	**0,0057**	**0,0360**	0,8313	0,9657	0,9330	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP56	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0702	**0,0028**	**0,0435**	0,5022	0,9330	0,8496	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP57	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	**0,0315**	**0,0237**	0,0548	0,9330	0,9560	0,9466	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP58	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9330	0,9081	0,9528	0,9657	0,8496	0,9330	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP59	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,4798	0,5572	0,9998	0,9528	0,7257	0,8537	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP60	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9998	0,8982	0,7440	0,9260	0,8496	0,8982	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP61	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,4810	0,2036	0,3460	0,9655	0,9525	0,9834	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP62	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9560	0,9160	0,9998	0,9657	0,9657	0,9560	0,9981	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP63	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8496	0,7640	0,7189	0,9824	0,9560	0,9436	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP64	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,7312	0,3525	0,9307	0,9528	0,9378	0,8605	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9981
IGP65	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,1208	0,0513	0,1184	0,9657	0,9560	0,9560	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP66	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8496	0,6358	0,9560	0,9657	0,8782	0,8496	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP67	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9617	0,9657	0,6384	0,9655	0,8892	0,7806	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP68	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,6731	0,5342	0,9190	0,9998	0,9081	0,9081	0,9969	0,9982	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP69	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,1232	0,1232	0,0545	0,9834	0,8982	0,9486	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP70	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8496	0,6030	0,9655	0,9528	0,9402	0,8537	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969

	NIH ocjena oči						NIH ocjena zglobovi i fascije						NIH ocjena pluća					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
IGP71	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8496	0,6030	0,9655	0,9528	0,9402	0,8537	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP72	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8496	0,6774	0,9657	0,9655	0,9330	0,8645	0,9987	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP73	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9528	0,9966	0,9525	0,9525	0,9966	0,9486	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP74	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	**0,0440**	**0,0352**	**0,0352**	0,9966	0,8982	0,9330	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP75	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	**0,0440**	**0,0352**	**0,0352**	0,9966	0,8982	0,9330	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP76	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	**0,0435**	**0,0228**	**0,0333**	0,9966	0,9330	0,9528	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
IGP77	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0586	**0,0228**	**0,0404**	0,9966	0,9525	0,9834	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
B	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9525	0,8496	0,9655	0,9657	0,8982	0,7987	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9987	0,9969
F	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	**0,0435**	**0,0182**	**0,0420**	0,9330	0,9525	0,9560	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
S	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,1976	0,2312	0,8365	0,9966	0,8449	0,8313	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
G0	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9836	0,8537	0,6906	0,8982	0,6399	0,8715	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
G1	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8982	0,3814	0,5738	0,8537	0,8982	0,9966	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969
G2	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0625	0,0586	0,2247	0,9655	0,9966	0,8982	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969	0,9969

	NIH ocjena gastrointestinalni sustav						NIH ocjena urogenitalni sustav (žene)						Ukupna NIH ocjena		
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**2**	**3**	**3**
GP1	0,5832	0,9873	0,9793	0,7649	0,7716	0,9898	0,8254	0,9738	0,9395	0,9063	0,9514	0,9738	0,9621	0,9505	1,0000
GP2	0,9272	0,5510	0,1304	0,5463	0,1418	0,4815	0,9738	0,9536	0,7804	0,9738	0,8399	0,7131	0,4511	0,4511	0,9971
GP3	0,5980	0,6757	0,7487	0,5463	0,5980	0,9831	0,9514	0,9514	0,9662	0,8254	0,9514	0,9738	0,8119	0,9944	0,5035
GP4	0,6391	0,9831	0,6862	0,8864	0,8910	0,8910	0,9084	0,9738	0,9738	0,9743	0,9514	0,9738	0,6636	0,5342	0,4618
GP5	0,9905	0,6782	0,2003	0,7402	0,3023	0,5980	0,9870	0,7131	0,9671	0,7131	0,8801	0,7335	0,5342	0,4683	0,6804
GP6	0,6562	0,7509	0,8030	0,6412	0,6918	0,8910	0,7131	0,9662	0,8254	0,7131	0,9738	0,7804	0,4511	0,4511	0,4511
GP7	0,8908	0,4815	0,1088	0,6432	0,1786	0,4815	0,9738	0,8083	0,7804	0,9084	0,7590	0,7131	0,6636	0,7002	0,7235
GP8	0,6562	0,9272	0,5672	0,9286	0,3320	0,6266	0,7131	0,9804	0,8566	0,7131	0,9351	0,9600	1,0000	0,7326	0,4965
GP9	0,6562	0,8910	0,6032	0,7033	0,4911	0,8117	0,9738	0,9738	0,9084	0,9878	0,9084	0,9743	0,7235	0,5569	0,4511
GP10	0,9685	0,9852	0,9873	0,9272	1,0000	0,9898	0,9804	0,8254	0,9804	0,7804	0,9878	0,8333	0,6636	0,5873	0,9505
GP11	0,6866	0,8418	0,9272	1,0000	0,6918	0,7402	0,9690	0,7131	0,8254	0,7131	0,7804	0,9028	0,9621	0,9944	0,7235
GP12	0,6615	0,8669	0,2414	0,9860	0,5173	0,5510	0,8566	0,8359	0,8407	0,9804	0,7436	0,7131	0,7326	0,9408	0,5035
GP13	0,7509	0,8318	0,1304	0,9831	0,1546	0,3320	0,9828	0,7198	0,9738	0,7335	0,9743	0,7634	0,6636	0,6636	0,7681
GP14	0,7071	0,8689	0,9852	0,6990	0,8772	0,9860	0,7634	0,9804	0,9878	0,7804	0,8711	0,9804	0,7487	0,5569	0,4511
GP15	0,6918	0,9272	0,5157	0,7402	0,6146	0,5832	0,9804	0,8566	0,9738	0,8648	0,9883	0,9531	0,6636	0,5342	0,5005
GP16	0,8719	0,9366	0,7301	0,8005	0,7509	0,6757	0,8959	0,7131	0,7131	0,8254	0,8940	0,9804	0,4511	0,4511	0,4511

	NIH ocjena gastrointestinalni sustav						NIH ocjena urogenitalni sustav (žene)						Ukupna NIH ocjena		
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**2**	**3**	**3**
GP17	0,6460	0,6562	0,0501	0,8318	0,1031	0,3320	0,9738	0,8385	0,8566	0,9536	0,7804	0,7131	0,4511	0,4511	0,5342
GP18	0,6562	0,9831	0,8030	0,8047	0,9852	0,8910	0,8172	0,9878	0,9804	0,8331	0,9514	0,9878	0,4816	0,4511	0,4511
GP19	0,8418	0,6562	0,6391	0,6070	0,7402	0,5062	0,9878	0,9738	0,9878	0,9600	0,9878	0,9804	0,7326	0,6636	0,6636
GP20	0,9930	0,5055	0,1031	0,5173	0,0981	0,6032	0,9402	0,7131	0,9870	0,7131	0,9600	0,7131	0,4683	0,4511	0,6835
GP21	0,6375	0,5980	0,0501	0,7071	0,0594	0,1518	0,9738	0,9514	0,8698	0,7804	0,9662	0,7804	0,4511	0,4511	0,4511
GP22	0,9453	0,9795	0,0981	1,0000	0,0981	0,1340	0,8385	0,7436	0,9738	0,8922	0,8648	0,7335	0,7147	0,7260	0,7736
GP23	0,7354	0,9936	0,7423	0,8772	0,9301	0,7716	0,8385	0,9878	0,9671	0,9408	0,9084	0,9804	0,4511	0,4511	0,5035
GP24	0,7716	0,6585	0,2786	0,6032	0,3971	0,2673	0,9738	0,8385	0,9531	0,9536	0,9738	0,8328	0,4511	0,4683	0,8506
IGP24	0,9860	0,8624	0,1786	0,8910	0,1758	0,1786	0,9804	0,9743	0,9738	0,9878	0,9738	0,9743	0,4511	0,4511	0,5035
IGP25	0,9272	0,6757	0,6905	0,6562	0,7487	0,6032	0,9738	0,9738	0,9878	0,9738	0,9804	0,9804	0,4511	0,4511	0,9505
IGP26	0,6757	1,0000	0,6032	0,8695	0,6757	0,6757	0,8711	0,9738	0,9878	0,9738	0,9738	0,9738	0,4511	0,4511	0,4511
IGP27	0,6918	0,6562	0,9066	0,6032	0,9868	0,7509	0,8648	0,9743	0,8698	0,8333	0,9738	0,8566	0,4511	0,4511	0,6636
IGP28	0,7649	0,7716	0,2798	0,9272	0,2770	0,2673	0,9690	0,7131	0,7335	0,7131	0,7131	0,9743	0,4683	0,4511	0,9172
IGP29	0,9936	0,6412	0,1786	0,6440	0,1786	0,6562	0,8254	0,9395	0,9738	0,7804	0,7804	0,9738	0,4511	0,6636	0,7235
IGP30	0,9453	0,9873	0,6412	0,9409	0,6070	0,7402	0,9084	0,9804	0,8711	0,9671	0,9738	0,9738	0,6636	0,7235	0,7487
IGP31	0,9898	0,8559	0,7509	0,8559	0,7509	0,7716	0,9514	0,7131	0,9804	0,7436	0,8940	0,7131	0,4613	0,5228	0,8119

	NIH ocjena gastrointestinalni sustav						NIH ocjena urogenitalni sustav (žene)						Ukupna NIH ocjena		
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**2**	**3**	**3**
IGP32	0,9336	0,9453	0,4734	0,9852	0,5062	0,5832	0,9514	0,8505	0,9662	0,9804	0,9084	0,7811	0,4511	0,4965	0,7002
IGP33	0,9873	0,9272	0,6032	0,9272	0,6070	0,6432	0,9531	0,9514	0,8359	0,8648	0,9084	0,8254	0,8634	0,9246	0,6636
IGP34	0,9873	1,0000	0,7301	0,9453	0,6918	0,6757	0,9743	0,9878	0,8140	0,9738	0,8333	0,9514	0,7235	0,7357	0,9274
IGP35	0,9025	0,9868	0,6266	0,8559	0,5980	0,6432	0,8254	0,7131	0,9841	0,7621	0,8399	0,7131	0,4511	0,4511	0,6554
IGP36	0,9873	0,7402	0,5510	0,7937	0,6032	0,5510	0,8385	0,9804	0,9738	0,7804	0,9738	0,8566	0,8950	0,6636	0,4511
IGP37	0,9376	0,7301	0,6432	0,8418	0,6412	0,5980	0,8563	0,9738	0,9738	0,9351	0,9600	0,9531	0,6801	0,5381	0,4965
IGP38	0,9376	0,7301	0,6432	0,8418	0,6412	0,5980	0,8563	0,9738	0,9738	0,9351	0,9600	0,9531	0,6801	0,5381	0,4965
IGP39	0,9852	0,7487	0,6266	0,8601	0,6375	0,6432	0,8711	0,7436	0,9395	0,7131	0,7804	0,8566	0,9505	0,7013	0,4511
IGP40	0,9852	0,7487	0,6266	0,8601	0,6375	0,6432	0,8711	0,7436	0,9395	0,7131	0,7804	0,8566	0,9505	0,7013	0,4511
IGP41	0,6070	0,9860	0,9453	0,8318	0,7509	0,9860	0,8254	0,9878	0,9084	0,8566	0,9738	0,9738	0,8950	0,8634	0,9172
IGP42	0,9453	0,5510	0,1138	0,5980	0,1340	0,4225	0,9738	0,9514	0,7690	0,9671	0,8566	0,7131	0,4511	0,4511	0,9944
IGP43	0,6412	0,9795	0,7716	0,9272	0,9860	0,9286	0,8566	0,9690	0,9738	0,9738	0,9402	0,9514	0,8119	0,6636	0,4511
IGP44	0,9852	0,7402	0,1546	0,7716	0,1786	0,3320	0,9878	0,7131	0,9514	0,7131	0,9514	0,7131	0,5035	0,4511	0,6636
IGP45	0,6757	0,7628	0,6757	0,6562	0,6432	0,7509	0,7131	0,9602	0,7804	0,7131	0,9804	0,7436	0,4965	0,4511	0,4511
IGP46	0,8695	0,4757	0,0981	0,6432	0,1786	0,4815	0,9738	0,7804	0,7804	0,8922	0,7634	0,7131	0,7235	0,8119	0,7013
IGP47	0,6412	0,9852	0,7716	0,9070	0,6432	0,6918	0,7131	0,9738	0,8698	0,7131	0,8566	0,9738	0,6801	0,5525	0,4511

	NIH ocjena gastrointestinalni sustav						NIH ocjena urogenitalni sustav (žene)						Ukupna NIH ocjena		
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**2**	**3**	**3**
IGP48	0,6412	0,9272	0,7071	0,6845	0,6359	0,8910	0,9662	0,9738	0,9395	0,9878	0,9514	0,9804	0,6636	0,4511	0,4511
IGP49	0,9860	0,9852	0,9852	0,9272	0,9366	0,9898	0,9738	0,7804	0,9738	0,7804	0,9738	0,8385	0,7487	0,7235	0,8613
IGP50	0,7429	0,8167	0,7487	0,9453	0,6412	0,6562	0,9671	0,7131	0,8331	0,7131	0,8331	0,9028	0,7147	0,7013	0,8119
IGP51	0,6562	0,8689	0,1786	0,9852	0,5026	0,5980	0,8566	0,8505	0,8385	0,9804	0,7634	0,7335	0,8634	0,9408	0,4683
IGP52	0,7362	0,8318	0,1138	1,0000	0,1546	0,3214	0,9878	0,7590	0,9738	0,7634	0,9804	0,7804	0,5569	0,5569	0,7002
IGP53	0,6757	0,8559	0,9905	0,6782	0,9158	1,0000	0,7804	0,9738	0,9870	0,8254	0,8801	0,9738	0,6636	0,4683	0,4511
IGP54	0,6562	0,9336	0,4734	0,6757	0,6032	0,5062	0,9804	0,8940	0,9738	0,8711	0,9804	0,9600	0,5525	0,4683	0,4739
IGP55	0,5173	0,9795	0,9860	0,7301	0,8910	0,9898	0,8254	0,9738	0,9738	0,8711	0,9084	0,9878	0,6636	0,4965	0,4511
IGP56	0,6032	1,0000	0,8772	0,8418	0,6432	0,9265	0,7804	0,9084	0,9408	0,9600	0,9738	0,9878	0,6636	0,4965	0,4511
IGP57	0,5510	0,9272	0,7444	0,6562	0,9868	0,7716	0,8254	0,9804	0,9743	0,8254	0,8399	0,9804	0,6636	0,5035	0,4548
IGP58	0,8935	0,6375	0,0981	0,6918	0,1304	0,2673	0,9738	0,8333	0,7335	0,9514	0,7198	0,7131	0,6636	0,7002	0,7235
IGP59	0,9453	0,5510	0,1088	0,6562	0,1571	0,2899	0,9514	0,8566	0,8254	0,9514	0,7335	0,7131	0,5262	0,5034	0,8119
IGP60	0,9852	0,6391	0,1031	0,6757	0,1518	0,3813	0,9804	0,8399	0,7394	0,9408	0,8254	0,7131	0,7002	0,7013	0,9374
IGP61	0,9793	0,9272	0,3320	0,9272	0,3214	0,6032	0,9738	0,8648	0,9549	0,8711	0,9351	0,7198	0,7861	0,7235	0,9374
IGP62	0,9272	0,7362	0,5463	0,7033	0,3880	0,5980	0,7811	0,8254	0,7131	0,7131	0,9738	0,7131	0,6636	0,6081	0,8583
IGP63	0,9789	0,6391	0,4581	0,6412	0,4734	0,6918	0,8566	0,9600	0,7804	0,7131	0,8940	0,7131	0,5569	0,5525	0,9944

	NIH ocjena gastrointestinalni sustav						NIH ocjena urogenitalni sustav (žene)						Ukupna NIH ocjena		
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**2**	**3**	**3**
IGP64	0,8318	0,9873	0,6757	0,8910	0,6562	0,6603	0,8333	0,7804	0,8711	0,7131	0,9878	0,7335	0,6636	0,5317	0,6319
IGP65	0,9860	0,9860	0,5173	1,0000	0,4734	0,6266	0,8331	0,8505	0,9738	0,7131	0,9738	0,7634	0,8634	0,7013	0,6636
IGP66	0,9272	0,9126	0,7237	0,8318	0,6603	0,7509	0,7131	0,8328	0,8566	0,7131	0,9738	0,7198	0,7013	0,5569	0,6636
IGP67	0,9852	0,7301	0,6562	0,7649	0,6432	0,7402	0,7804	0,8566	0,8254	0,7131	0,9743	0,7131	0,6636	0,6636	0,8119
IGP68	0,7429	0,9025	0,7649	1,0000	0,7301	0,6918	0,8254	0,8172	0,9738	0,7131	0,9514	0,8254	0,6636	0,5620	0,6636
IGP69	0,6412	0,9376	0,9025	0,9070	0,7402	0,8695	0,7335	0,8328	0,9084	0,7131	0,7131	0,9514	0,9408	0,7861	0,5366
IGP70	0,9272	0,8878	0,6562	0,7487	0,6412	0,6757	0,7335	0,8254	0,8333	0,7131	0,9738	0,7131	0,7002	0,5569	0,6636
IGP71	0,9272	0,8878	0,6562	0,7487	0,6412	0,6757	0,7335	0,8254	0,8333	0,7131	0,9738	0,7131	0,7002	0,5569	0,6636
IGP72	0,9286	0,8878	0,6562	0,7487	0,6412	0,6757	0,7335	0,8254	0,8328	0,7131	0,9738	0,7131	0,7326	0,6135	0,6804
IGP73	0,7509	0,8117	0,1138	0,9873	0,1418	0,3320	0,9828	0,7634	0,9671	0,7621	0,9804	0,7804	0,5967	0,5569	0,6636
IGP74	0,9272	1,0000	0,6918	0,9860	0,6562	0,7237	0,7131	0,8254	0,9878	0,7131	0,7131	0,8566	0,8754	0,7147	0,4683
IGP75	0,9272	1,0000	0,6918	0,9860	0,6562	0,7237	0,7131	0,8254	0,9878	0,7131	0,7131	0,8566	0,8754	0,7147	0,4683
IGP76	0,9685	0,9860	0,6432	0,9852	0,6266	0,6603	0,7131	0,8333	0,9804	0,7131	0,7131	0,7811	0,8754	0,7205	0,4683
IGP77	0,9852	0,8122	0,5283	0,8005	0,4911	0,6266	0,8254	0,8566	0,9738	0,7131	0,7804	0,8254	1,0000	0,8718	0,5342
B	0,8318	0,9868	0,6032	0,8772	0,6412	0,6032	0,9738	0,7394	0,9738	0,7394	0,9804	0,8172	0,8119	0,8271	0,9971
F	0,7033	0,8318	0,8418	0,6845	0,9852	0,7716	0,8359	0,9738	0,9738	0,9408	0,9738	0,9804	0,5569	0,4683	0,4511

	NIH ocjena gastrointestinalni sustav						NIH ocjena urogenitalni sustav (žene)						Ukupna NIH ocjena		
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**2**	**3**	**3**
S	0,5980	1,0000	0,3320	0,7402	0,5832	0,4815	0,9531	0,9600	0,9870	0,9743	0,9600	0,9514	0,4511	0,4511	0,4511
G0	0,8117	0,6032	0,1418	0,5173	0,1417	0,5283	0,9738	0,9662	0,8331	0,9738	0,9514	0,7131	0,4511	0,4511	0,9933
G1	0,9272	0,9905	0,9965	0,9272	0,9852	1,0000	0,9738	0,7804	0,9870	0,7634	0,9804	0,8385	0,6636	0,5569	0,9505
G2	0,5463	0,9852	0,6070	0,6990	0,7781	0,6757	0,8359	0,9743	0,9870	0,9514	0,9514	0,9738	0,4511	0,4511	0,4511

Kratice: (0) nepostojeći cGvHD, (1) blagi stupanj cGvHD, (2) umjeren stupanj cGvHD, (3) teški stupanj cGvHD; GP(X)X – glikanski pik, (X)X – broj od 1-24; B, F, G0, G1, G2, S, IGPXX – derivirani parametar (prema tablici D1), XX – broj između 24-77.

B) Aktivnost kroničnog GvHD-a

Rezultati univarijatne analize kliničkog dojma o aktivnosti bolesti i intenziteta sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije naspram pojedinih glikanskih struktura i deriviranih parametara. Tablica prikazuje razinu značajnosti pojedinog glikana pri usporedbi dviju ocjena koje opisuju aktivnost cGvHD-a.

Primjerice, za pregled značajnosti glikana GP1 pri usporedbi parametara Intenziteta sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije (1) naspram (4), potrebno je u koloni koja pripada ocjenama aktivnosti (1) Bez sistemske imunosupresije i (4) Jaka sistemska imunosupresija (razina A=1, razina B=4) pronaći ćeliju koja pripada retku GP1 (p=0,0012).

Žutom bojom i podebljanim brojevima naznačene su statističke vrijednosti koje se smatraju značajnima.

	Klinički dojam o aktivnosti bolesti	Intenzitet sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije					
Razina A	**(1) Neaktivna bolest**	**(1) Bez sistemske imunosupresije**			**(2) Blaga sistemska imunosupresija**		**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**
Razina B	**(2) Aktivna bolest**	**(2) Blaga sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**
GP1	0,3539	0,1702	**0,0012**	**0,0012**	0,6469	0,6771	0,9643
GP2	0,0904	0,2937	0,3989	0,7733	0,6200	0,3779	0,5682
GP3	0,2631	0,6668	**0,0042**	**0,0012**	0,3485	0,1527	0,6633
GP4	**0,0433**	0,6633	0,3430	**0,0260**	0,8951	0,5930	0,4378
GP5	0,9026	0,5396	**0,0152**	**0,0077**	0,7568	0,6771	0,9216
GP6	**0,0192**	0,6439	0,4092	0,2702	0,9704	0,8951	0,7733
GP7	0,6296	0,4092	0,5596	0,9936	0,6668	0,3593	0,4092
GP8	0,0704	0,5682	0,4265	0,0776	0,9861	0,7985	0,5891
GP9	**0,0223**	0,6771	0,8951	0,9007	0,7075	0,7568	0,9675
GP10	0,3651	0,6789	0,9936	0,9620	0,6771	0,6771	0,9646
GP11	0,3605	0,8899	0,4073	**0,0359**	0,6771	0,3989	0,6771
GP12	0,7743	0,6439	0,9643	0,5891	0,6246	0,2585	0,3989
GP13	0,5353	0,6789	0,5937	0,8776	0,9751	0,7202	0,6200
GP14	**0,0305**	0,4307	0,1527	**0,0045**	0,9646	0,5702	0,2765

	Klinički dojam o aktivnosti bolesti	Intenzitet sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije					
Razina A	**(1) Neaktivna bolest**	**(1) Bez sistemske imunosupresije**			**(2) Blaga sistemska imunosupresija**		**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**
Razina B	**(2) Aktivna bolest**	**(2) Blaga sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**
GP15	0,1998	0,9111	0,8037	0,4092	0,9142	0,7625	0,6469
GP16	**0,0192**	0,8298	0,8951	0,9455	0,8165	0,6976	0,7568
GP17	0,4867	0,5745	0,6734	0,9142	0,7625	0,5396	0,6668
GP18	**0,0192**	0,5712	**0,0362**	**0,0012**	0,7592	0,4583	0,3779
GP19	0,6532	0,8265	0,7985	0,8165	0,9646	0,9419	0,9643
GP20	0,1111	0,6771	0,1653	0,3357	0,7129	0,7800	0,8292
GP21	0,2369	0,4073	0,3532	0,6771	0,8298	0,5712	0,6369
GP22	0,9214	0,5057	0,6771	0,7933	0,6668	0,6248	0,8951
GP23	**0,0192**	0,3975	**0,0360**	**0,0033**	0,7733	0,5596	0,6771
GP24	0,2575	0,7074	0,6075	0,6976	0,8951	0,9932	0,7733
IGP24	0,0637	0,7441	0,2319	0,2290	0,7075	0,6771	0,9620
IGP25	0,1430	0,9646	0,5712	0,8776	0,6469	0,9884	0,6200
IGP26	**0,0192**	0,5930	0,1377	**0,0042**	0,7592	0,5596	0,4378
IGP27	**0,0218**	0,6771	0,3593	0,5514	0,7441	0,9704	0,6771

	Klinički dojam o aktivnosti bolesti	Intenzitet sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije					
Razina A	**(1) Neaktivna bolest**	**(1) Bez sistemske imunosupresije**			**(2) Blaga sistemska imunosupresija**		**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**
Razina B	**(2) Aktivna bolest**	**(2) Blaga sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**
IGP28	0,6487	0,6970	0,6439	0,2092	0,9646	0,6771	0,4378
IGP29	0,9627	0,6771	0,9142	0,9142	0,6439	0,8165	0,7687
IGP30	0,9214	0,9756	0,9646	0,9213	0,9419	0,9646	0,8819
IGP31	0,1111	0,8951	0,7067	0,6771	0,9646	0,8951	0,9137
IGP32	0,1981	0,7733	0,3427	0,8951	0,6976	0,9646	0,5124
IGP33	0,9512	0,9646	0,9751	0,9056	0,9704	0,9213	0,8882
IGP34	0,3651	0,8512	0,6469	0,5682	0,9646	0,7592	0,9142
IGP35	0,0867	0,7568	0,2958	0,6813	0,6771	1,0000	0,6200
IGP36	0,0673	0,6771	0,4462	0,1377	0,9646	0,6771	0,6200
IGP37	**0,0218**	0,6789	0,3989	0,1377	0,8909	0,6894	0,6970
IGP38	**0,0218**	0,6789	0,3989	0,1377	0,8909	0,6894	0,6970
IGP39	0,0741	0,6369	0,5124	**0,0090**	0,9671	0,5682	0,3427
IGP40	0,0741	0,6369	0,5124	**0,0090**	0,9671	0,5682	0,3427
IGP41	0,5751	0,1668	**0,0012**	**0,0012**	0,6668	0,6771	0,9145

	Klinički dojam o aktivnosti bolesti	Intenzitet sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije					
Razina A	**(1) Neaktivna bolest**	**(1) Bez sistemske imunosupresije**			**(2) Blaga sistemska imunosupresija**		**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**
Razina B	**(2) Aktivna bolest**	**(2) Blaga sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**
IGP42	0,1108	0,3752	0,4378	0,8951	0,6388	0,3427	0,4583
IGP43	0,0699	0,6771	0,3374	**0,0252**	0,8165	0,5712	0,4265
IGP44	0,9026	0,4378	**0,0359**	**0,0180**	0,7800	0,7074	0,9646
IGP45	**0,0218**	0,6668	0,4835	0,3873	0,9931	0,9540	0,8832
IGP46	0,7316	0,4583	0,6231	0,9646	0,6970	0,3873	0,4092
IGP47	**0,0223**	0,4949	0,3779	**0,0268**	0,9646	0,6894	0,4835
IGP48	**0,0192**	0,6771	0,8069	0,6917	0,7075	0,8298	0,8483
IGP49	0,6779	0,6200	0,9216	0,7733	0,6771	0,7568	0,8298
IGP50	0,8231	0,9704	0,5062	0,1406	0,6439	0,3787	0,7568
IGP51	0,5994	0,6789	0,9646	0,5596	0,6513	0,2702	0,4046
IGP52	0,3651	0,6789	0,6789	0,9646	0,9936	0,7074	0,5937
IGP53	**0,0218**	0,4835	0,1527	**0,0042**	0,9004	0,5596	0,2744
IGP54	0,0960	0,9142	0,7470	0,3485	0,9704	0,6771	0,6200
IGP55	**0,0218**	0,5682	0,2417	**0,0152**	0,8951	0,5937	0,4092

	Klinički dojam o aktivnosti bolesti	Intenzitet sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije					
Razina A	**(1) Neaktivna bolest**	**(1) Bez sistemske imunosupresije**			**(2) Blaga sistemska imunosupresija**		**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**
Razina B	**(2) Aktivna bolest**	**(2) Blaga sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**
IGP56	**0,0218**	0,5745	0,5596	0,1527	0,8706	0,8909	0,5702
IGP57	**0,0223**	0,6439	0,1377	**0,0039**	0,7129	0,4092	0,2765
IGP58	0,6532	0,4835	0,6369	0,9007	0,6771	0,2912	0,3427
IGP59	0,3651	0,5596	0,6734	0,8017	0,6771	0,2702	0,2958
IGP60	0,3391	0,3427	0,4583	0,7733	0,6079	0,3989	0,5712
IGP61	0,2454	0,3593	0,4265	0,5335	0,6771	0,6789	0,9646
IGP62	0,1108	0,6513	0,5990	0,8909	0,9213	0,6894	0,6789
IGP63	0,1774	0,7067	0,7067	0,7733	0,9643	0,5596	0,4378
IGP64	**0,0477**	0,7985	0,6789	0,5712	0,9796	0,9620	0,8951
IGP65	0,1360	0,4462	0,3989	0,2290	0,8474	0,9646	0,8228
IGP66	0,0733	0,9145	0,6789	0,6894	0,8909	0,9004	0,9646
IGP67	0,1706	0,9899	0,9213	0,7733	0,7868	0,9004	0,6718
IGP68	**0,0484**	0,9004	0,7711	0,4946	0,6789	0,5319	0,6789
IGP69	0,1108	0,6771	0,1406	**0,0042**	0,6771	0,2958	0,4092

	Klinički dojam o aktivnosti bolesti	Intenzitet sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije					
Razina A	**(1) Neaktivna bolest**	**(1) Bez sistemske imunosupresije**			**(2) Blaga sistemska imunosupresija**		**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**
Razina B	**(2) Aktivna bolest**	**(2) Blaga sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**
IGP70	0,0704	0,8017	0,6771	0,7074	0,9620	0,9646	0,9142
IGP71	0,0704	0,8017	0,6771	0,7074	0,9620	0,9646	0,9142
IGP72	0,0788	0,8017	0,6668	0,7687	0,9645	0,9646	0,9015
IGP73	0,3651	0,6789	0,6789	0,9704	0,9671	0,6771	0,6200
IGP74	0,1108	0,4949	0,2319	**0,0152**	0,9645	0,6469	0,5436
IGP75	0,1108	0,4949	0,2319	**0,0152**	0,9645	0,6469	0,5436
IGP76	0,1430	0,4092	0,1983	**0,0174**	0,9931	0,7074	0,5712
IGP77	0,2369	0,3779	0,1527	**0,0268**	0,9111	0,9200	0,6970
B	0,9452	0,7568	0,9619	0,7625	0,8909	0,9646	0,7390
F	**0,0247**	0,3779	0,1708	**0,0063**	0,9646	0,6734	0,4092
S	**0,0192**	0,6771	0,3779	0,0546	0,8776	0,5930	0,6200
G0	0,0704	0,2290	0,2447	0,5712	0,6771	0,3989	0,5990
G1	0,2758	0,7067	0,9646	0,9213	0,6771	0,6200	0,9899
G2	**0,0192**	0,6439	0,1653	**0,0061**	0,7733	0,4583	0,4265

	Terapijska namjera u trenutku evaluacije														
Razina A	**1**					**2**				**3**			**4**		**5**
Razina B	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**3**	**4**	**5**	**6**	**4**	**5**	**6**	**5**	**6**	**6**
GP1	0,6387	0,8195	0,9562	0,8606	0,9898	0,7621	0,6387	0,7471	0,8750	0,7714	0,9833	0,9642	0,8317	0,9880	0,9635
GP2	0,9833	0,9562	0,9420	0,9642	0,9787	0,9947	0,7716	0,8163	0,9833	0,7471	0,7716	0,9863	0,9697	0,9059	0,9833
GP3	0,9059	0,9112	0,9642	0,9833	0,9833	0,9969	0,7716	0,8195	0,9596	0,8317	0,7716	0,9754	0,9688	1,0000	1,0000
GP4	0,9059	0,6387	0,8606	0,6387	0,6387	0,6387	0,8750	0,6797	0,6387	0,9833	0,9890	0,6800	0,9787	0,6877	0,7268
GP5	0,5545	0,5545	0,9884	0,6387	0,8752	0,9823	0,6387	0,9702	0,9933	0,6387	0,9111	0,9969	0,6797	0,9059	0,9944
GP6	0,9833	0,9823	0,9237	0,8163	0,9898	0,9969	0,9562	0,8213	0,9890	0,9658	0,8600	0,9884	0,9833	0,9880	1,0000
GP7	0,9736	0,8986	0,9933	0,9969	0,9039	0,9059	0,9787	0,9730	0,9693	0,8856	0,8283	0,9059	0,9890	0,9420	0,9420
GP8	0,9820	0,7624	0,7716	0,8371	0,6387	0,7471	0,8150	0,8213	0,6387	0,9833	0,9890	0,7471	0,9697	0,7716	0,7471
GP9	0,7475	0,6387	0,6877	0,6387	0,6387	0,6387	0,9059	0,8213	0,6800	0,9697	0,9420	0,7475	0,9969	0,7716	0,6800
GP10	0,9059	0,6387	0,8794	0,9642	0,6665	0,6800	0,9823	0,9562	0,6877	0,8750	0,6387	0,7107	0,9441	0,6387	0,6387
GP11	0,7065	0,6387	0,9711	0,8539	0,9898	0,9059	0,9059	0,9197	0,9880	0,7471	0,7621	0,9754	0,9697	0,9880	1,0000
GP12	0,8986	0,9787	0,9890	0,9880	0,7716	0,9237	0,9039	0,8831	0,8163	0,9833	0,9933	0,8163	0,9880	0,7471	0,7471
GP13	0,9880	0,6800	0,9969	0,8317	0,9112	0,6665	0,9890	0,8606	0,9112	0,7716	0,9615	0,9890	0,8750	0,8819	0,9635
GP14	0,9969	0,7471	0,9884	0,6387	0,6387	0,7471	0,9884	0,6387	0,6387	0,9787	0,9420	0,7656	0,9112	0,8317	0,8087
GP15	0,7471	0,5545	0,7997	0,6387	0,6387	0,6387	0,9697	0,8213	0,7223	0,8568	0,9704	0,7969	0,9059	0,8317	0,8750
GP16	0,9420	0,6952	0,9420	0,6877	0,8752	0,7716	0,9833	0,7471	0,9420	0,9833	0,9833	0,9890	0,9059	0,9420	0,9884

	Terapijska namjera u trenutku evaluacije														
Razina A	**1**					**2**				**3**			**4**		**5**
Razina B	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**3**	**4**	**5**	**6**	**4**	**5**	**6**	**5**	**6**	**6**
GP17	0,9833	0,9697	0,9420	0,8819	0,8371	0,8848	0,9697	0,9420	0,8848	0,9947	0,7471	0,9059	0,8997	0,9420	0,8087
GP18	0,8856	0,9787	0,9823	0,7132	0,6877	0,8087	0,9688	0,6387	0,6877	0,9947	0,8163	0,8711	0,9039	0,8317	0,8848
GP19	0,9112	0,9969	0,8339	0,7716	0,8371	0,9039	0,9420	0,8666	0,7716	0,8339	0,6800	0,8542	0,9833	0,6877	0,7268
GP20	0,6387	0,6387	0,9059	0,6329	0,8371	0,9420	0,7656	0,8848	0,9420	0,7043	0,9237	0,9863	0,6387	0,8819	0,9823
GP21	0,6539	0,7475	0,8750	0,6387	0,8371	0,9441	0,9337	0,9420	0,9833	0,9969	0,7471	0,9754	0,8317	0,9880	0,9833
GP22	0,8859	0,9420	0,9933	0,9420	0,7475	0,9732	0,9059	0,7471	0,7716	0,9787	0,8213	0,7471	0,9833	0,6387	0,6387
GP23	0,9420	0,8317	0,9947	0,8859	0,8371	0,9711	0,9174	0,7471	0,9787	0,8953	0,6387	0,9697	0,9420	0,9420	0,7716
GP24	0,9890	0,9529	0,9237	0,8163	0,6387	0,8859	0,8752	0,7471	0,6387	0,7583	0,6387	0,6665	0,9833	0,6387	0,6387
IGP24	0,7475	0,6387	0,7716	0,9890	0,7475	0,9059	0,9848	0,7471	0,8953	0,9863	0,6387	0,9420	0,7716	0,9059	0,8750
IGP25	0,9420	0,6387	0,9969	0,9833	0,6387	0,6387	0,9420	0,9642	0,6387	0,6387	0,6387	0,6387	0,9890	0,6387	0,6387
IGP26	0,9562	0,9420	0,9969	0,6800	0,7475	0,8087	0,9420	0,6387	0,7716	0,9833	0,7999	0,8752	0,8819	0,9059	0,9420
IGP27	0,9969	0,8666	0,9420	0,8371	0,6387	0,7552	0,9059	0,7716	0,6387	0,7125	0,6387	0,7716	0,9863	0,6387	0,6387
IGP28	0,9787	0,9823	0,9112	0,9890	0,9420	0,9947	0,9039	0,9833	0,9693	0,8856	0,9823	0,9697	0,7874	0,9059	0,9337
IGP29	0,6387	0,5545	0,6387	0,6797	0,6387	0,7223	0,9237	0,9642	0,8163	0,9833	0,7026	0,9420	0,9059	0,9059	0,8750
IGP30	0,9596	0,6387	0,9642	0,9487	0,6387	0,6387	0,9947	0,9890	0,6387	0,7471	0,6800	0,6387	0,9947	0,6387	0,6387
IGP31	0,9944	0,7918	0,9562	0,9039	0,7421	0,7716	0,9711	0,8986	0,8750	0,9823	0,9754	0,9642	0,9969	0,8317	0,8848

	Terapijska namjera u trenutku evaluacije														
Razina A	**1**					**2**				**3**			**4**		**5**
Razina B	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**3**	**4**	**5**	**6**	**4**	**5**	**6**	**5**	**6**	**6**
IGP32	0,7969	0,6387	0,9711	0,9880	0,6387	0,6387	0,8859	0,8436	0,6387	0,6387	0,6387	0,6387	0,9969	0,6387	0,6387
IGP33	0,9890	0,6665	0,9833	0,9969	0,6387	0,6387	0,9787	0,9704	0,6387	0,6387	0,6387	0,6387	0,9833	0,6387	0,6387
IGP34	0,9890	0,6387	0,9969	0,9969	0,6387	0,6387	0,9833	0,9969	0,6387	0,6665	0,6387	0,6387	0,9969	0,6387	0,6387
IGP35	0,8750	0,6387	0,9947	0,9944	0,6387	0,9237	0,8339	0,8750	0,7471	0,6800	0,6877	0,7716	0,9947	0,6387	0,7268
IGP36	0,9890	0,8819	0,9833	0,9823	0,6387	0,6387	0,9848	0,9420	0,6387	0,8371	0,8666	0,6665	0,9833	0,6476	0,6665
IGP37	0,9516	0,9056	0,9711	0,9944	0,6665	0,6387	0,9787	0,9039	0,6387	0,9337	0,9059	0,6387	0,9833	0,7471	0,6665
IGP38	0,9516	0,9056	0,9711	0,9944	0,6665	0,6387	0,9787	0,9039	0,6387	0,9337	0,9059	0,6387	0,9833	0,7471	0,6665
IGP39	0,9890	0,9704	0,9947	0,9932	0,7475	0,9627	0,9969	0,9697	0,8087	0,9823	0,9944	0,8163	0,9863	0,8819	0,7624
IGP40	0,9890	0,9704	0,9947	0,9932	0,7475	0,9627	0,9969	0,9697	0,8087	0,9823	0,9944	0,8163	0,9863	0,8819	0,7624
IGP41	0,6387	0,7718	0,9711	0,7716	0,9833	0,7801	0,6387	0,7475	0,8317	0,7471	0,9848	0,9642	0,8087	0,9880	0,9420
IGP42	0,9833	0,9562	0,9420	0,9833	0,9787	0,9969	0,7471	0,8283	0,9880	0,7716	0,8317	0,9884	0,9688	0,9059	0,9884
IGP43	0,8666	0,6387	0,7716	0,6387	0,6387	0,6387	0,8750	0,6800	0,6387	0,9833	0,9833	0,6387	0,9880	0,6476	0,6387
IGP44	0,5545	0,5545	0,9884	0,6387	0,9039	0,9787	0,6387	0,9933	0,9890	0,6387	0,9693	0,9863	0,6387	0,9059	0,9823
IGP45	0,9890	0,9833	0,9237	0,8163	0,9898	0,9933	0,9420	0,8750	0,9969	0,9441	0,8666	0,9863	0,9863	1,0000	0,9833
IGP46	0,9787	0,8953	0,9884	0,9890	0,9642	0,9059	0,9833	0,9787	0,9596	0,8856	0,8750	0,9193	0,9969	0,9787	0,9337
IGP47	0,9787	0,7716	0,7616	0,7132	0,6387	0,8195	0,8606	0,7471	0,6387	0,9833	0,9787	0,7471	0,9947	0,8317	0,7624

	Terapijska namjera u trenutku evaluacije														
Razina A	**1**					**2**				**3**			**4**		**5**
Razina B	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**3**	**4**	**5**	**6**	**4**	**5**	**6**	**5**	**6**	**6**
IGP48	0,7132	0,6387	0,6877	0,6387	0,6387	0,6877	0,9112	0,7181	0,6665	0,9880	0,9880	0,7475	0,9890	0,7716	0,7471
IGP49	0,8856	0,6387	0,8163	0,9420	0,6387	0,7189	0,9420	0,9833	0,6877	0,9056	0,7016	0,6952	0,9787	0,6387	0,6387
IGP50	0,6877	0,6387	0,9711	0,7999	0,9833	0,9059	0,9112	0,9642	1,0000	0,7716	0,7716	0,9833	0,9420	1,0000	0,9884
IGP51	0,9059	0,9833	0,9947	0,9969	0,8371	0,9420	0,9059	0,8750	0,8371	0,9833	0,9833	0,8542	0,9969	0,7716	0,7471
IGP52	0,9833	0,6665	0,9933	0,7716	0,8752	0,6952	0,9898	0,8339	0,9056	0,7716	0,9833	0,9833	0,8371	0,8819	0,9711
IGP53	0,9890	0,7471	0,9890	0,6387	0,6387	0,7475	0,9833	0,6387	0,6387	0,9787	0,9059	0,7716	0,9059	0,8317	0,8371
IGP54	0,7475	0,6387	0,8283	0,6387	0,6387	0,6387	0,9833	0,7475	0,7471	0,8848	0,9947	0,8112	0,9059	0,9059	0,8848
IGP55	0,9420	0,6387	0,8411	0,6387	0,6387	0,6387	0,8859	0,6387	0,6387	0,9947	0,9730	0,6877	0,9787	0,7716	0,6800
IGP56	0,7716	0,6387	0,7471	0,6387	0,6387	0,6665	0,8859	0,7716	0,6387	0,9969	0,9848	0,6665	0,9933	0,6877	0,6952
IGP57	0,9833	0,8163	0,9833	0,6387	0,6387	0,6797	0,9059	0,6387	0,6387	0,9880	0,9056	0,7716	0,9059	0,7716	0,8371
IGP58	0,9833	0,9529	0,9947	0,9863	0,9833	0,9420	0,9704	0,9969	0,9596	0,9059	0,9420	0,9833	0,9833	0,9880	0,9059
IGP59	0,9059	0,7716	0,9969	0,9833	0,8371	0,9420	0,8859	0,9420	0,9420	0,7716	0,8163	0,9193	0,9833	0,8819	0,9040
IGP60	0,9947	0,9890	0,9642	0,9693	0,8371	1,0000	0,9039	0,9059	0,7223	0,9059	0,9111	0,8317	0,9863	0,8819	0,8371
IGP61	0,9193	0,8371	0,8606	0,8750	0,6387	0,9420	0,9420	0,9704	0,6387	0,9890	0,9944	0,6952	0,9833	0,6387	0,6387
IGP62	0,9420	0,8087	0,9642	0,9969	0,9039	0,8359	0,9848	0,9337	0,8953	0,8087	0,7999	0,9833	0,9890	0,8317	0,9040
IGP63	0,8856	0,6800	0,9237	0,9420	0,6665	0,6610	0,9933	0,9890	0,7016	0,7471	0,7471	0,7656	0,9969	0,6476	0,7268

	Terapijska namjera u trenutku evaluacije														
Razina A	**1**					**2**				**3**			**4**		**5**
Razina B	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**3**	**4**	**5**	**6**	**4**	**5**	**6**	**5**	**6**	**6**
IGP64	0,9833	0,9420	0,9890	0,9420	0,9787	0,9779	0,9237	0,8859	0,9833	0,9056	0,8600	0,9890	0,9947	0,9059	0,9823
IGP65	0,9884	0,9111	0,9420	0,8848	0,6665	0,9642	0,9787	0,9039	0,7016	0,9947	0,9884	0,7969	0,9969	0,7471	0,6952
IGP66	0,9863	0,8750	0,9697	0,9884	0,8752	0,9174	0,9833	0,9562	0,9112	0,9059	0,8163	0,9420	0,9969	0,8819	0,8213
IGP67	0,9884	0,7471	0,9642	0,9693	0,7475	0,7065	0,9880	0,9890	0,7471	0,8848	0,8087	0,8542	0,9933	0,6877	0,7268
IGP68	0,9863	0,9434	0,9833	0,9711	0,9833	0,9787	0,9174	0,9039	0,9833	0,8750	0,8163	0,9944	0,9890	0,9420	0,9337
IGP69	0,7716	0,9111	0,9833	0,9833	0,9420	0,9529	0,8666	0,6800	0,8661	0,9202	0,8750	0,9059	0,9933	0,9787	0,9711
IGP70	0,9697	0,8666	0,9420	0,9969	0,8752	0,9039	0,9833	0,9420	0,9056	0,9039	0,8163	0,9420	0,9880	0,7716	0,8087
IGP71	0,9697	0,8666	0,9420	0,9969	0,8752	0,9039	0,9833	0,9420	0,9056	0,9039	0,8163	0,9420	0,9880	0,7716	0,8087
IGP72	0,9596	0,8436	0,9420	0,9989	0,8752	0,9059	0,9833	0,9596	0,8953	0,9039	0,8116	0,9420	0,9947	0,8317	0,8087
IGP73	0,9704	0,6665	0,9947	0,7716	0,9112	0,7043	0,9848	0,8568	0,9059	0,7716	0,9823	0,9833	0,8371	0,8819	0,9711
IGP74	0,9420	0,9944	0,9863	0,9487	0,8163	0,9420	0,9615	0,8163	0,8163	0,9833	0,9688	0,8848	0,9880	0,9420	0,9059
IGP75	0,9420	0,9944	0,9863	0,9487	0,8163	0,9420	0,9615	0,8163	0,8163	0,9833	0,9688	0,8848	0,9880	0,9420	0,9059
IGP76	0,9697	0,9944	0,9933	0,9174	0,8371	0,9787	0,9704	0,8666	0,8163	0,9833	0,9754	0,9059	0,9890	0,8819	0,9059
IGP77	0,9969	0,9933	0,9420	0,9059	0,8752	0,9969	0,9704	0,9059	0,8953	0,9711	0,9697	0,9039	0,9833	0,8819	0,8848
B	0,9420	0,7716	0,7716	0,8750	0,9112	0,8317	0,8087	0,9112	0,9420	0,9787	0,9890	0,9812	0,9711	0,9880	0,9833
F	0,9880	0,7471	0,9237	0,6548	0,6387	0,7471	0,9420	0,6387	0,6800	0,9833	0,8859	0,8163	0,9441	0,7716	0,9420

	Terapijska namjera u trenutku evaluacije														
Razina A	**1**					**2**				**3**			**4**		**5**
Razina B	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**3**	**4**	**5**	**6**	**4**	**5**	**6**	**5**	**6**	**6**
S	0,9969	0,9787	0,9420	0,6387	0,9420	0,8750	0,9039	0,6387	0,9420	0,9833	0,6846	0,9420	0,9059	0,9787	0,9884
G0	0,9420	0,9697	0,9420	0,9420	0,9898	0,9833	0,7016	0,7471	0,9933	0,6800	0,7716	0,9833	0,9059	0,8317	0,9833
G1	0,9134	0,6387	0,9112	0,9697	0,6665	0,6877	0,9947	0,9697	0,7016	0,8317	0,6387	0,7471	0,9794	0,6387	0,6387
G2	0,9820	0,9059	0,9642	0,6387	0,7421	0,7716	0,8859	0,6387	0,7899	0,9890	0,7716	0,8953	0,9059	0,9059	0,9884

Kratice: 1) smanjiti sistemsku terapiju zbog poboljšanja bolesti, (2) ne mijenjati sistemsku terapiju jer je bolest stabilna, (3) povećati sistemsku terapiju zbog pogoršanja i napredovanja bolesti, (4) zamijeniti terapiju zbog njezine toksičnosti, (5) promijeniti sistemsku terapiju zbog nedostatka odgovora na istu, (6) ukinuti sistemsku terapiju zbog nedostatka odgovora na istu.

Tablica D3. Rezultati univarijatne analize rezultata laboratorijske obrade uzoraka američkih pacijenata metodom LC/MS

A) Težina (stupanj) kroničnog GvHD-a

Rezultati univarijatne analize NIH ocjena pojedinih organskih sustava naspram pojedinih glikopeptidnih struktura. Tablica prikazuje razinu značajnosti pojedinih glikopeptidnih struktura pri usporedbi dviju NIH ocjena pojedinih organskih sustava zahvaćenih cGvHD-om.

Primjerice, za pregled značajnosti glikopeptida IgG1_G0 pri usporedbi NIH ocjene 0 za kožu naspram NIH ocjene 3, potrebno je u koloni koja pripada NIH ocjeni kože (razina A=0, razina B=3) pronaći ćeliju koja pripada retku IgG1_G0 (p=0,4026).

Žutom bojom i podebljanim brojevima naznačene su statističke vrijednosti koje se smatraju značajnima.

	NIH ocjena koža						NIH ocjena usta						NIH ocjena jetra					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
IgG1_G0	0,9455	0,5846	0,4026	0,7180	0,4334	0,1201	0,8295	0,9975	0,8295	0,9175	0,8541	0,8295	0,6024	0,8137	0,8457	0,7959	0,7091	0,8059
IgG1_G0F	0,9414	0,8923	0,2142	0,9101	0,2658	0,3336	0,9773	0,9174	0,8295	0,9021	0,8295	0,8295	0,6024	0,6024	0,7742	0,8603	0,7166	0,6456
IgG1_G0FN	0,2916	0,9122	0,7180	0,3673	0,1142	0,7160	0,9467	0,9975	0,9975	0,9773	0,9975	0,9773	0,6024	0,7742	0,6750	0,9242	0,5813	0,6149
IgG1_G0N	0,7180	0,7259	0,9698	0,9414	0,7180	0,6918	0,9562	0,9562	0,9467	0,9975	0,9773	0,9773	0,6750	0,7544	0,8966	0,5806	0,9659	0,7760
IgG1_G1	0,9414	0,9122	0,9122	0,8366	0,8856	0,9485	0,8295	0,8295	0,9773	0,9773	0,9975	0,9773	0,9242	0,7742	0,9242	0,8974	0,8296	0,7544
IgG1_G1F	0,4334	0,9165	0,2933	0,6896	0,0965	0,4697	0,8295	0,9773	0,8295	0,8541	0,9175	0,8295	0,6149	0,9775	0,7166	0,7137	0,5813	0,7091
IgG1_G1FN	0,5237	0,5871	0,1649	0,9213	0,7954	0,7160	0,8541	0,8424	0,9340	0,9353	0,8295	0,8295	0,9069	0,9073	0,9242	0,8480	0,8817	0,9242
IgG1_G1FNS	0,8788	0,5871	0,8909	0,8366	0,7371	0,3553	0,9920	0,9773	0,8295	0,9773	0,8295	0,8295	0,8296	0,7742	0,7742	0,6750	0,7742	0,7091
IgG1_G1FS	0,3673	0,8926	0,4697	0,5889	0,9122	0,6896	0,9301	0,9021	0,8684	0,9175	0,9175	0,9562	0,5749	0,5749	0,6149	0,9416	0,7742	0,7349
IgG1_G1N	0,8781	0,7180	0,9122	0,9584	0,9165	0,8641	0,9175	0,9175	0,9806	0,9920	0,9824	0,9773	0,9242	0,6750	0,9594	0,6749	0,9242	0,8059
IgG1_G1NS	0,5355	0,7122	0,7160	0,1932	0,7954	0,2790	0,8295	0,9977	0,8295	0,9175	0,8295	0,9175	0,6750	1,0000	0,9434	0,7742	0,9776	0,9242
IgG1_G1S	0,5495	0,5889	0,7817	0,9332	0,2142	0,2625	0,9353	0,9806	0,8295	0,9562	0,8295	0,8295	0,9463	0,6750	0,5749	0,6750	0,5813	0,5749
IgG1_G2	0,8340	0,9148	0,9455	0,9414	0,7160	0,7651	0,9340	0,8295	0,9806	0,9301	0,9635	0,9175	0,6749	0,7544	0,7742	0,9260	0,6750	0,6750
IgG1_G2F	0,7180	0,8366	0,1649	0,9273	0,0999	0,1932	0,8295	0,9773	0,8295	0,8295	0,8295	0,8295	0,5749	0,7641	0,5813	0,8672	0,5749	0,5806
IgG1_G2FN	0,8366	0,3673	0,1932	0,6103	0,6023	0,9633	0,9773	0,9035	0,8295	0,9175	0,8295	0,8295	0,6149	0,7760	0,9260	0,9242	0,8953	0,8137

	NIH ocjena koža						NIH ocjena usta						NIH ocjena jetra					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
IgG1_G2FNS	0,9414	0,7180	0,7954	0,6976	0,7651	0,8366	0,9340	0,9773	0,8295	0,9773	0,8295	0,8295	0,8480	0,9242	0,8137	0,8550	0,8817	0,7760
IgG1_G2FS	0,9414	0,5425	0,1154	0,5889	0,1250	0,0817	0,8295	0,9773	0,8295	0,9175	0,8295	0,8295	0,6149	0,6749	0,5749	0,9332	0,5749	0,5749
IgG1_G2N	0,9414	0,7327	0,7180	0,8366	0,7722	0,9414	0,8295	0,9175	0,9773	0,9773	0,9773	0,9773	0,8986	0,8974	0,7757	0,7715	0,8137	0,7544
IgG1_G2NS	0,7954	0,7519	0,7180	0,4697	0,9414	0,4697	0,9773	0,9467	0,9021	0,9773	0,8684	0,8295	0,6750	0,7349	0,8986	0,5749	0,9463	0,8059
IgG1_G2S	0,9017	0,8781	0,8939	0,9552	0,7122	0,6918	0,9747	0,9021	0,9175	0,9773	0,8963	0,9021	0,6149	0,8137	0,6750	0,8480	0,5813	0,5806
IgG2_G0	0,7160	0,1154	0,9122	0,2625	0,4697	0,0817	0,9175	0,9054	0,9773	0,9340	0,9975	0,9975	0,7141	0,7544	0,5806	0,9204	0,5749	0,5749
IgG2_G0F	0,5177	0,9414	0,1154	0,6918	0,5715	0,2142	0,8295	0,8295	0,9806	0,9975	0,9175	0,9340	0,99658	1,0000	0,5749	0,9948	0,5749	0,5749
IgG2_G0FN	0,5940	0,7954	0,5916	0,8366	0,1932	0,5177	0,8295	0,9035	0,9773	0,9773	0,9128	0,9128	0,7349	0,7544	0,5749	0,9696	0,5749	0,5749
IgG2_G0N	0,3106	0,2333	0,9521	0,9414	0,1932	0,1649	0,8541	0,9128	0,9175	0,9773	0,9353	0,9773	0,7959	0,9238	0,6750	0,9570	0,6024	0,6750
IgG2_G1	0,9414	0,8751	0,8781	0,8788	0,9165	0,8856	0,9467	0,8295	0,8295	0,9021	0,8295	0,8295	0,8065	0,9659	0,7742	0,8590	0,7959	0,7544
IgG2_G1F	0,7160	0,9122	0,2142	0,9122	0,1201	0,1649	0,9773	0,9773	0,8295	0,9340	0,8295	0,8295	0,9242	0,9260	0,8137	0,9873	0,7544	0,7742
IgG2_G1FN	0,5940	0,6103	0,1932	0,9122	0,8939	0,7180	0,8794	0,8475	0,8295	0,9243	0,8295	0,8295	0,9973	0,8713	0,9260	0,8480	0,9463	0,9463
IgG2_G1FNS	0,7160	0,9122	0,6896	0,7122	0,2389	0,9122	0,9301	0,9773	0,9253	0,9822	0,9175	0,9353	0,8137	0,6750	0,7995	0,7757	0,8137	0,9139
IgG2_G1FS	0,9414	0,6292	0,2933	0,6292	0,4824	0,1154	0,9353	0,9353	0,8295	0,9773	0,8295	0,8295	0,9872	0,7742	0,6750	0,7742	0,6750	0,6750
IgG2_G1N	0,9122	0,8438	0,9414	0,7247	0,9463	0,7459	0,9562	0,8295	0,8295	0,8541	0,8295	0,8295	0,5813	0,9776	0,7742	0,7349	0,8296	0,7349
IgG2_G1NS	0,9414	0,6292	0,9414	0,7160	0,9122	0,5144	0,8541	0,8295	0,9773	0,8295	0,9773	0,9175	0,8003	0,8480	0,6750	0,9570	0,7742	0,6750

	NIH ocjena koža						NIH ocjena usta						NIH ocjena jetra					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
IgG2_G1S	0,6896	0,4334	0,7161	0,7651	0,9414	0,7054	0,9920	0,9773	0,8295	0,9773	0,8295	0,9175	0,8775	0,8137	0,9659	0,9234	0,9260	0,9242
IgG2_G2	0,8923	0,9437	0,7180	0,9414	0,9050	0,7954	0,8295	0,8295	0,8475	0,8295	0,8295	0,8295	0,9659	0,7544	0,6667	0,8137	0,6750	0,6750
IgG2_G2F	0,9017	0,7180	0,1649	0,7180	0,2023	0,1311	0,8295	0,9353	0,8295	0,9175	0,8295	0,8295	0,6750	0,7742	0,5749	0,9905	0,5749	0,5749
IgG2_G2FN	0,7160	0,8366	0,3575	0,9122	0,8781	0,7160	0,9773	0,9773	0,8295	0,9690	0,8295	0,8295	0,8953	0,7959	0,7757	0,8137	0,8137	0,7742
IgG2_G2FNS	0,9540	0,9122	0,9414	0,8814	0,9884	0,8366	0,9773	0,9175	0,8295	0,9353	0,8295	0,9562	0,6149	1,0000	0,9234	0,6925	0,8137	0,8137
IgG2_G2FS	0,8366	0,7246	0,1649	0,5177	0,3847	0,0999	0,8295	0,8295	0,8295	0,9975	0,8295	0,8295	0,8603	0,7544	0,5749	0,8510	0,5749	0,5749
IgG2_G2N	0,7180	0,7180	0,7160	0,2994	0,9965	0,2456	0,9773	0,8295	0,8295	0,8295	0,8295	0,8295	0,7122	0,9242	0,5749	0,8296	0,6149	0,6024
IgG2_G2NS	0,9769	0,7259	0,4334	0,8058	0,4697	0,8366	0,9442	0,8295	0,9353	0,8295	0,9175	0,9773	0,6149	0,6161	0,8986	0,8843	0,9659	0,9139
IgG2_G2S	0,5889	0,5806	0,8366	0,9455	0,7222	0,7160	0,8541	0,8295	0,9635	0,9175	0,9975	0,9467	0,8603	0,9242	0,8137	0,9662	0,8480	0,8480
IgG4_G0	0,8366	0,9654	0,7160	0,8926	0,9414	0,7180	0,9253	0,9773	0,8295	0,9253	0,8295	0,8295	0,5813	0,7742	0,5749	0,9319	0,6243	0,6750
IgG4_G0F	0,2142	0,8366	0,8366	0,4891	0,1649	0,7160	0,9562	0,9899	0,8295	0,9773	0,9054	0,8916	0,8986	0,7835	0,6750	0,9234	0,6750	0,6750
IgG4_G0FN	0,7601	0,9455	0,4697	0,9050	0,2171	0,4334	0,9773	0,9975	0,8955	0,9773	0,8541	0,8475	0,6149	0,7742	0,8137	0,9466	0,8296	0,9242
IgG4_G0N	0,1649	0,9463	0,9437	0,1649	0,0965	0,9122	0,8708	0,8295	0,9562	0,9021	0,9175	0,8684	0,8986	0,8986	0,8277	0,9659	0,8296	0,8137
IgG4_G1	0,7160	0,8867	0,2790	0,5806	0,0999	0,4797	0,9975	0,9773	0,9562	0,9773	0,9562	0,9175	0,6149	0,8480	0,7349	0,8137	0,6685	0,6750
IgG4_G1F	0,3135	0,7601	0,3149	0,7180	0,0817	0,1839	0,9353	0,9340	0,9175	0,9773	0,9175	0,8295	0,9173	0,8775	0,5813	0,9332	0,6005	0,5806
IgG4_G1FN	0,8808	0,9890	0,1649	0,9414	0,1142	0,1886	0,9773	0,9340	0,9353	0,9353	0,9175	0,9353	0,8510	0,8204	0,6750	0,9242	0,7544	0,7742

	NIH ocjena koža						NIH ocjena usta						NIH ocjena jetra					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
IgG4_G1FNS	0,9055	0,7122	0,9273	0,7501	0,8752	0,6322	0,9175	0,9175	0,9635	0,9806	0,9175	0,9175	0,7641	0,9537	0,8890	0,8480	0,8137	0,8603
IgG4_G1FS	0,7954	0,9584	0,3701	0,7722	0,1649	0,4026	0,9999	0,9773	0,9975	0,9353	0,9773	0,9773	0,6750	0,9139	0,6149	0,6750	0,7349	0,5815
IgG4_G1N	0,2456	0,9890	0,7180	0,3106	0,1064	0,7722	0,9467	0,9975	0,9773	0,9773	0,9975	0,9773	0,5813	0,8591	0,6024	0,7742	0,5806	0,5749
IgG4_G1NS	0,7478	0,9823	0,3575	0,7160	0,8366	0,3665	0,9562	0,9773	0,8295	0,9806	0,8295	0,8295	0,9416	0,8059	0,7544	0,8089	0,7742	0,7091
IgG4_G1S	0,8641	0,9122	0,8058	0,9122	0,9884	0,8314	0,9562	0,9773	0,9243	0,9975	0,9175	0,9253	0,9260	0,8986	0,9748	0,8591	0,9911	1,0000
IgG4_G2	0,5189	0,9122	0,8055	0,7035	0,2916	0,7180	0,8954	0,9353	0,8541	0,8541	0,9054	0,8295	0,7440	0,8603	0,5749	0,9242	0,6149	0,6024
IgG4_G2F	0,7954	0,8781	0,0965	0,9122	**0,0217**	0,1142	0,8295	0,8675	0,9920	0,9773	0,9773	0,9773	0,9204	0,6750	0,5749	0,7760	0,5749	0,5749
IgG4_G2FN	0,9568	0,7160	0,1212	0,5253	0,0965	0,4697	0,9975	0,8295	0,9773	0,8295	0,9467	0,8295	0,9872	0,8480	0,7440	0,8296	0,7742	0,6750
IgG4_G2FNS	0,8366	0,6792	0,2916	0,7180	0,4334	0,8366	0,9175	0,9773	0,9175	0,9773	0,9175	0,9353	0,9463	0,6750	0,8659	0,6960	0,8591	0,7760
IgG4_G2FS	0,9485	0,9050	0,0965	0,9332	0,1142	0,1142	0,8512	0,9175	0,9314	0,9975	0,9773	0,9773	0,9260	0,6750	0,5749	0,7244	0,5749	0,5749
IgG4_G2N	0,4810	0,7180	0,7601	0,8366	0,6976	0,8926	0,9054	0,9562	0,8295	0,9899	0,8295	0,8295	0,7959	0,7862	0,6915	0,6750	0,6750	0,7742
IgG4_G2NS	0,9017	0,7180	0,4334	0,5806	0,7054	0,1649	0,9175	0,9773	0,9243	0,9175	0,9128	0,9340	0,6925	0,6750	0,6750	0,9416	0,6750	0,6456
IgG4_G2S	0,5334	0,7954	0,8366	0,7954	0,7160	0,8926	0,9175	0,9353	0,9175	0,8295	0,9773	0,8684	0,5749	0,8953	0,7166	0,7544	0,8137	0,7742
IgG1_dB	0,2312	0,5543	0,7583	0,7180	0,3673	0,7235	0,8954	0,9353	0,9773	0,9975	0,9253	0,9253	0,7641	0,9912	0,6750	0,8137	0,6149	0,7349
IgG1_dG0	0,8781	0,9414	0,2142	0,9414	0,1649	0,2552	0,9175	0,9353	0,8295	0,8684	0,8295	0,8295	0,5749	0,6149	0,7440	0,9139	0,6024	0,6750
IgG1_dG1	0,8814	0,8923	0,2652	0,7180	0,1649	0,4334	0,9773	0,9175	0,8295	0,8512	0,8295	0,8295	0,5749	0,7742	0,9092	0,8296	0,7641	0,8603

	NIH ocjena koža						NIH ocjena usta						NIH ocjena jetra					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
IgG1_dG2	0,8641	0,7437	0,2652	0,8814	0,1741	0,2142	0,8295	0,9773	0,8295	0,8980	0,8295	0,8295	0,5749	0,6456	0,5749	0,9434	0,5749	0,5749
IgG1_dS	0,7954	0,7247	0,1741	0,4334	0,3701	0,1154	0,8295	0,9175	0,8295	0,9975	0,8295	0,8295	0,5749	0,5806	0,6149	0,9659	0,5749	0,5749
IgG2_dB	0,2142	0,6688	0,9590	0,6689	0,1741	0,6688	0,8295	0,9773	0,9773	0,9175	0,9175	0,9562	0,6750	0,8876	0,6149	0,8480	0,5806	0,5749
IgG2_dG0	0,8923	0,7247	0,2142	0,7180	0,2933	0,1567	0,8295	0,8295	0,9773	0,9975	0,8541	0,9128	0,8296	0,8052	0,5749	0,9242	0,5749	0,5749
IgG2_dG1	0,9965	0,9414	0,2023	0,9414	0,1649	0,1741	0,8684	0,9390	0,9175	0,9773	0,9635	0,9340	0,9416	0,8591	0,6054	0,8591	0,5806	0,5806
IgG2_dG2	0,7160	0,8058	0,2023	0,5177	0,5355	0,1649	0,8295	0,8295	0,8295	0,9806	0,8475	0,8916	0,7742	0,7091	0,5749	0,9093	0,5749	0,5749
IgG2_dS	0,7259	0,7180	0,2994	0,4334	0,7180	0,1649	0,8295	0,8295	0,8295	0,9562	0,8295	0,8295	0,8480	0,7544	0,5749	0,8480	0,5749	0,5749
IgG4_dB	0,2790	0,5916	0,6103	0,8042	0,5889	0,9122	0,9353	0,9920	0,9773	0,9773	0,9975	1,0000	0,5749	0,6149	0,7440	0,7959	0,5749	0,6024
IgG4_dG0	0,2658	0,8852	0,8285	0,5177	0,1649	0,7035	0,9467	0,9968	0,8295	0,9773	0,8541	0,8295	0,7790	0,7742	0,6750	0,8966	0,6750	0,6750
IgG4_dG1	0,8700	0,7180	0,5355	0,4697	0,2333	0,9122	0,9975	0,9191	0,8295	0,9175	0,8295	0,8295	0,5749	0,8344	0,8986	0,6750	0,7742	0,8966
IgG4_dG2	0,3255	0,7371	0,7160	0,7160	0,7160	0,9540	0,8295	0,9975	0,8295	0,8541	0,8717	0,8541	0,5749	0,7349	0,6750	0,9093	0,7742	0,7760
IgG4_dS	0,4322	0,6322	0,4834	0,8788	0,9031	0,9540	0,8295	0,9975	0,8541	0,9054	0,9175	0,8916	0,5813	0,8137	0,9139	0,8137	0,9594	0,9139

	NIH ocjena oči						NIH ocjena zglobovi i fascije						NIH ocjena pluća					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
IgG1_G0	0,9224	0,9224	0,9224	0,9643	0,9224	0,9224	0,6756	0,3057	0,4520	0,9373	0,9373	0,9473	0,9813	0,9798	0,9689	0,9813	0,9689	0,9689
IgG1_G0F	0,9643	0,9510	0,9643	0,9354	1,0000	0,9643	0,0946	**0,0241**	0,0837	0,9371	0,9431	0,9617	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9772
IgG1_G0FN	0,9771	0,9354	0,9224	0,9224	0,9224	0,9224	0,3057	0,2043	0,6118	0,9591	0,9373	0,9373	0,9689	0,9910	0,9689	0,9743	0,9689	0,9689
IgG1_G0N	0,9643	0,9643	0,9224	0,9643	0,9224	0,9224	0,9617	0,9473	0,9916	0,9373	0,9617	0,9617	0,9772	0,9813	0,9689	0,9772	0,9689	0,9704
IgG1_G1	0,9354	0,9643	0,9224	0,9224	0,9224	0,9354	0,9371	0,6882	0,9916	0,9373	0,9473	0,8529	0,9772	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9772
IgG1_G1F	1,0000	0,9771	0,9224	0,9643	0,9224	0,8354	0,4520	0,0512	0,4046	0,7315	0,9617	0,8986	0,9772	0,9772	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689
IgG1_G1FN	0,9643	0,9643	0,9354	1,0000	0,9224	0,9354	0,7676	0,1133	0,4235	0,6878	0,9373	0,9473	0,9772	0,9793	0,9689	0,9743	0,9689	0,9689
IgG1_G1FNS	0,9224	0,9246	0,9224	0,9643	0,9354	0,9333	0,8529	0,7511	0,9443	0,9870	0,9443	0,9443	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9813
IgG1_G1FS	0,9224	0,9643	0,9224	0,9224	0,9643	0,9302	0,9473	0,9564	0,9131	0,9752	0,9473	0,9650	0,9689	0,9689	0,9772	0,9689	0,9689	0,9772
IgG1_G1N	0,9354	1,0000	0,9224	0,9354	0,9224	0,9224	0,9473	0,9373	0,9431	0,9770	0,9373	0,9373	0,9772	0,9772	0,9772	0,9689	0,9704	0,9793
IgG1_G1NS	0,9224	0,9224	0,9771	0,9224	1,0000	0,9354	0,8400	0,9916	0,9373	0,8347	0,9754	0,9464	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9772
IgG1_G1S	0,9771	0,9224	0,9643	0,9224	0,9771	0,9354	0,9443	0,5005	0,4910	0,7658	0,7658	0,9916	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9981
IgG1_G2	0,9224	1,0000	1,0000	0,9224	0,9224	1,0000	0,7253	0,6791	0,9373	0,9752	0,9617	0,9373	0,9772	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9772
IgG1_G2F	0,9224	0,9643	0,9224	0,9224	0,9224	0,8354	0,0512	**0,0138**	0,0512	0,9371	0,9543	0,9373	0,9981	0,9689	0,9772	0,9689	0,9772	0,9689
IgG1_G2FN	0,9224	0,9354	0,9224	0,9224	0,9874	0,9354	0,4527	0,1133	0,1422	0,9617	0,9375	0,9373	0,9689	0,9689	0,9813	0,9689	0,9704	0,9704
IgG1_G2FNS	0,9224	0,9224	0,9224	0,9604	0,9643	1,0000	0,9591	0,9371	0,6271	0,9564	0,7511	0,8529	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9912

	NIH ocjena oči						NIH ocjena zglobovi i fascije						NIH ocjena pluća					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
IgG1_G2FS	0,9224	1,0000	0,9224	0,9224	0,9224	0,9224	0,0772	**0,0213**	**0,0296**	0,9373	0,8529	0,9682	0,9772	0,9689	0,9772	0,9689	0,9793	0,9689
IgG1_G2N	0,9604	0,9643	0,9224	0,9354	0,9224	0,9224	0,6791	0,9507	0,9916	0,7891	0,8289	0,9617	0,9981	0,9704	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689
IgG1_G2NS	0,9224	0,9224	0,9224	0,9224	0,9354	1,0000	0,9473	0,9752	0,9193	0,9751	0,9373	0,9373	0,9743	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689
IgG1_G2S	0,9224	1,0000	0,9354	0,9224	0,9354	0,9354	0,4803	0,5640	0,9170	0,9876	0,9373	0,9373	0,9772	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9772
IgG2_G0	0,8354	0,9224	1,0000	0,9333	0,9224	0,9224	0,9373	0,9373	0,9371	0,9916	0,9473	0,9591	0,9813	0,9941	0,9689	0,9981	0,9689	0,9689
IgG2_G0F	0,9643	0,9354	0,9354	0,9643	0,9354	0,9224	**0,0392**	**0,0213**	**0,0320**	0,9373	0,8358	0,9473	0,9772	0,9689	0,9813	0,9772	0,9772	0,9689
IgG2_G0FN	0,9643	0,9643	0,9224	0,9771	0,9354	0,9224	0,1539	0,3405	0,3018	0,9473	0,9726	0,9617	0,9772	0,9793	0,9772	0,9772	0,9689	0,9689
IgG2_G0N	0,8354	0,9224	0,9224	0,9224	0,8354	0,9224	0,9473	0,7676	0,9831	0,9373	0,9870	0,9373	0,9941	0,9798	0,9689	0,9793	0,9689	0,9689
IgG2_G1	0,9643	0,9224	0,9224	0,9224	0,8856	0,9224	0,9668	0,9617	0,4244	0,9629	0,4224	0,3057	0,9689	0,9793	0,9689	0,9689	0,9772	0,9689
IgG2_G1F	0,9224	0,9643	0,9224	0,9354	0,8354	0,8354	0,3808	**0,0241**	0,4899	0,6118	0,9870	0,6546	0,9689	0,9772	0,9689	0,9689	0,9793	0,9689
IgG2_G1FN	0,9302	0,9643	0,9643	0,9643	0,9224	0,9643	0,8529	0,1216	0,5005	0,7103	0,9373	0,9583	0,9689	0,9689	0,9689	0,9910	0,9689	0,9689
IgG2_G1FNS	0,9354	0,9354	0,9354	0,9643	0,9643	1,0000	0,9373	0,9916	0,7676	0,9375	0,9443	0,8897	0,9689	0,9772	0,9772	0,9689	0,9689	0,9772
IgG2_G1FS	0,9354	0,9510	0,8354	0,9643	0,8354	0,8354	0,3018	0,0837	0,4910	0,9507	0,9473	0,9371	0,9941	0,9689	0,9772	0,9689	0,9743	0,9689
IgG2_G1N	0,9224	0,9224	0,6708	1,0000	0,8354	0,8354	0,9831	0,8463	0,7103	0,9373	0,8529	0,6936	0,9689	0,9704	0,9689	0,9689	0,9813	0,9689
IgG2_G1NS	0,9224	0,9390	0,9354	0,9657	1,0000	0,9643	0,9916	0,4720	0,9373	0,7511	0,9373	0,9373	0,9772	0,9689	0,9930	0,9689	0,9793	0,9689
IgG2_G1S	0,9224	0,9604	0,9643	0,9224	0,9224	0,9798	0,9916	0,5603	0,7153	0,6936	0,7658	0,9801	0,9772	0,9689	0,9772	0,9689	0,9981	0,9689

	NIH ocjena oči						NIH ocjena zglobovi i fascije						NIH ocjena pluća					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
IgG2_G2	0,9643	0,9354	0,9224	0,9643	0,9224	0,9224	0,7725	0,9371	0,4720	0,9617	0,7725	0,8457	0,9689	0,9704	0,9689	0,9772	0,9689	0,9689
IgG2_G2F	0,9891	1,0000	0,9224	0,9643	0,9224	0,9224	0,1213	**0,0241**	0,0772	0,9043	0,9373	0,9752	0,9689	0,9772	0,9813	0,9689	0,9689	0,9941
IgG2_G2FN	1,0000	0,9354	0,9224	0,9354	0,9224	0,9224	0,9617	0,1130	0,4593	0,3858	0,7098	0,9373	0,9696	0,9813	0,9689	0,9689	0,9772	0,9689
IgG2_G2FNS	0,9354	0,9354	0,9798	0,9224	0,9643	0,9354	0,9443	0,7891	0,7891	0,6118	0,6173	0,9473	0,9772	0,9689	0,9743	0,9689	0,9772	0,9689
IgG2_G2FS	0,9224	0,9224	0,9224	0,9798	0,9224	0,9224	0,4224	0,0714	0,0560	0,9115	0,6882	0,9373	0,9793	0,9689	0,9772	0,9689	0,9689	0,9772
IgG2_G2N	0,9224	0,9224	0,9224	0,9643	0,9224	0,9224	0,9373	0,9373	0,7511	0,9443	0,9371	0,9473	0,9689	0,9689	0,9689	0,9772	0,9772	0,9772
IgG2_G2NS	0,9224	0,9354	0,9354	0,9643	0,9224	0,9224	0,8457	0,9373	0,8820	0,9443	0,9870	0,9831	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9813	0,9772
IgG2_G2S	0,9224	0,9479	0,9354	0,9224	0,9224	0,9224	0,9831	0,9373	0,6791	0,9464	0,7725	0,7405	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9704
IgG4_G0	0,9224	0,9224	0,9224	1,0000	0,9604	0,9354	0,7725	0,6878	0,9373	0,9870	0,9373	0,9373	0,9689	0,9941	0,9689	0,9689	0,9689	0,9772
IgG4_G0F	0,9224	0,9416	0,9224	0,9224	1,0000	0,9224	0,9916	0,9443	0,3531	0,9373	0,6882	0,3718	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689
IgG4_G0FN	0,9224	1,0000	0,9224	0,9224	0,9354	0,9224	0,9170	0,9753	0,0837	0,9373	0,4395	0,1539	0,9689	0,9772	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689
IgG4_G0N	0,9643	0,9604	0,9354	1,0000	0,9771	0,9643	0,9373	0,9131	0,3808	0,9707	0,7153	0,6557	0,9689	0,9772	0,9689	0,9772	0,9689	0,9689
IgG4_G1	0,9771	0,9798	0,9771	0,9643	0,9643	0,9939	0,3262	0,3034	0,1264	0,9916	0,9148	0,7935	0,9831	0,9772	0,9689	0,9689	0,9743	0,9689
IgG4_G1F	0,9224	0,9643	0,9771	0,9224	0,9224	0,9939	0,3147	0,2234	0,2085	0,9473	0,9373	0,8926	0,9772	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689
IgG4_G1FN	0,9224	0,9224	0,9354	0,9354	0,9224	0,9643	0,1422	0,1216	0,1673	0,9507	0,9431	0,8926	0,9689	0,9793	0,9689	0,9704	0,9689	0,9689
IgG4_G1FNS	0,9771	0,9643	0,9643	0,9643	0,9354	0,9224	0,9373	0,6936	0,2127	0,9373	0,3597	0,0837	0,9689	0,9772	0,9772	0,9689	0,9793	0,9689

	NIH ocjena oči						NIH ocjena zglobovi i fascije						NIH ocjena pluća					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
IgG4_G1FS	0,9604	0,9643	0,9643	0,9224	0,9952	0,9224	0,0837	0,3634	0,3057	0,8457	0,9443	0,9373	0,9793	0,9772	0,9689	0,9704	0,9689	0,9689
IgG4_G1N	0,9643	1,0000	0,9224	0,9747	0,9224	0,9224	0,4046	0,6549	0,4910	0,9373	0,9870	0,9373	0,9772	0,9772	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689
IgG4_G1NS	0,9771	0,9643	0,9643	0,9354	0,9643	0,9224	0,9752	0,9373	0,5190	0,9473	0,6421	0,7511	0,9772	0,9689	0,9772	0,9689	0,9772	0,9689
IgG4_G1S	0,9643	0,9224	0,9224	0,9224	0,9224	0,8354	0,9373	0,9373	0,6271	0,9726	0,5988	0,5338	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689
IgG4_G2	0,9224	1,0000	0,9224	0,9224	0,9442	0,9224	0,9916	0,7891	0,6421	0,8271	0,7583	0,4010	0,9689	0,9772	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689
IgG4_G2F	0,9224	0,9354	0,9532	0,9643	0,9224	0,9224	0,0512	**0,0320**	0,0512	0,9916	0,9253	0,8986	0,9772	0,9689	0,9704	0,9704	0,9941	0,9689
IgG4_G2FN	0,9224	0,9224	1,0000	0,9224	0,9224	0,9224	0,3634	**0,0320**	0,3405	0,4244	0,9617	0,7658	0,9689	0,9772	0,9704	0,9704	0,9689	0,9772
IgG4_G2FNS	0,9390	1,0000	0,9643	0,9354	1,0000	0,9643	0,2234	0,1221	0,7658	0,9916	0,8457	0,8463	0,9813	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9772
IgG4_G2FS	0,9354	0,9510	1,0000	0,9643	0,9354	0,9643	**0,0241**	**0,0320**	0,1216	0,9443	0,9443	0,9617	0,9772	0,9689	1,0000	0,9689	0,9912	0,9704
IgG4_G2N	0,9224	0,9643	0,9857	0,9224	0,9224	0,9643	0,9373	0,7658	0,9473	0,9564	0,9043	0,7891	0,9772	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689
IgG4_G2NS	1,0000	0,9354	0,9354	0,9224	0,9354	0,9224	0,9373	0,9373	0,3121	0,9831	0,6878	0,6878	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9813
IgG4_G2S	0,8354	0,9224	0,9224	0,8856	0,9354	0,9224	0,7725	0,5940	0,9831	0,9443	0,9010	0,7658	0,9704	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689
IgG1_dB	0,9643	0,9643	0,9643	0,9874	0,9354	0,9354	0,8529	0,9373	0,9617	0,9373	0,7725	0,9373	0,9813	0,9772	0,9689	0,9772	0,9689	0,9689
IgG1_dG0	0,9643	0,9354	0,9224	0,9224	0,9354	0,9224	0,0837	**0,0241**	0,0837	0,8457	0,9473	0,9373	0,9772	0,9704	0,9772	0,9689	0,9689	0,9772
IgG1_dG1	1,0000	0,9643	0,9224	0,9643	0,9224	0,9224	0,4046	**0,0320**	0,3057	0,6173	0,9373	0,9170	0,9689	0,9793	0,9689	0,9689	0,9941	0,9689
IgG1_dG2	0,9224	0,9354	0,9224	0,9224	0,9354	0,9224	0,0544	**0,0320**	**0,0422**	0,9473	0,9373	0,9473	0,9793	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689	0,9772

	NIH ocjena oči						NIH ocjena zglobovi i fascije						NIH ocjena pluća					
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**
IgG1_dS	0,9224	0,9643	0,9224	0,9224	0,9771	0,9224	0,3057	0,0512	0,0621	0,9373	0,9043	0,9617	0,9689	0,9689	0,9704	0,9772	0,9813	0,9772
IgG2_dB	0,9224	0,9354	0,9224	0,9354	0,9224	0,9224	0,5120	0,7658	0,8986	0,9373	0,9373	0,9770	0,9689	0,9813	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689
IgG2_dG0	0,9604	0,9604	0,9224	1,0000	0,9224	0,9224	0,0818	**0,0392**	0,0512	0,9371	0,8876	0,9847	0,9772	0,9689	0,9743	0,9772	0,9793	0,9813
IgG2_dG1	0,9224	0,9224	0,9643	0,9354	0,9224	0,9224	0,0775	0,0512	0,0968	0,9473	0,9564	0,9617	0,9689	0,9743	0,9689	0,9981	0,9772	0,9793
IgG2_dG2	0,9643	0,9798	0,9224	0,9643	0,9354	0,9224	0,1978	0,0512	0,0813	0,9373	0,9115	0,9473	0,9983	0,9689	0,9704	0,9689	0,9689	0,9772
IgG2_dS	0,9224	0,9224	0,9224	0,9354	0,9354	0,9224	0,5129	0,1213	0,2266	0,9371	0,9373	0,9801	0,9772	0,9689	0,9772	0,9689	0,9772	0,9772
IgG4_dB	0,9643	0,9643	0,9224	0,9643	0,9224	0,9354	0,9617	0,9617	0,7103	0,9473	0,9371	0,8986	0,9704	0,9689	0,9793	0,9689	0,9813	0,9689
IgG4_dG0	0,9224	0,9643	0,9224	0,9224	0,9952	0,9224	0,9916	0,9373	0,3057	0,9373	0,5640	0,2802	0,9689	0,9793	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689
IgG4_dG1	0,9224	0,9224	0,9354	0,9643	0,9354	0,9643	0,9373	0,7079	0,1947	0,9473	0,5940	0,7658	0,9793	0,9689	0,9813	0,9689	0,9930	0,9689
IgG4_dG2	0,9224	0,9643	0,9224	0,9224	0,9643	0,9224	0,4043	0,2085	0,9837	0,9916	0,7103	0,5988	0,9689	0,9910	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689
IgG4_dS	0,8354	0,9224	0,9224	0,9224	0,9643	0,9224	0,1978	0,3270	0,9373	0,9473	0,6756	0,7575	0,9689	0,9813	0,9689	0,9689	0,9689	0,9689

	NIH ocjena gastrointestinalni sustav						NIH ocjena urogenitalni sustav (žene)						Ukupna NIH ocjena		
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**2**	**3**	**3**
IgG1_G0	0,8283	0,7753	0,2644	0,5847	0,2644	0,4801	0,9905	0,9905	0,9889	0,9889	0,9905	0,9889	0,6650	0,6650	0,9968
IgG1_G0F	0,7753	0,8903	0,8676	0,9713	0,9606	0,9606	0,9905	0,9889	0,9905	0,9905	0,9889	0,9889	0,8469	0,7648	0,6650
IgG1_G0FN	0,6321	0,8676	0,9475	0,7257	0,9670	0,9437	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,9905	0,9889	0,6650	0,6650	0,6650
IgG1_G0N	0,8676	0,9089	0,4312	0,7984	0,3824	0,6723	0,9889	0,9905	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,6650	0,6650	0,9513
IgG1_G1	0,7257	0,9670	0,5306	0,8741	0,7271	0,6723	0,9905	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,6650	0,6650	0,6718
IgG1_G1F	0,7753	0,9606	0,7960	0,9670	0,7257	0,7960	0,9889	0,9889	0,9889	0,9905	0,9905	0,9905	0,6650	0,6650	0,6650
IgG1_G1FN	0,9670	0,9768	0,7984	0,9768	0,7984	0,9437	0,9905	0,9905	0,9905	0,9905	0,9905	0,9905	0,7921	0,8469	0,8780
IgG1_G1FNS	0,9813	0,9882	0,4446	0,9768	0,4312	0,5460	0,9889	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,9889	0,9832	0,9779	0,6830
IgG1_G1FS	0,7257	0,8293	1,0000	0,9768	0,9606	0,9606	0,9905	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,6830	0,6852	0,8924
IgG1_G1N	0,7753	0,9768	0,7565	0,8676	0,8676	0,7608	0,9905	0,9905	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,6650	0,6650	0,8924
IgG1_G1NS	0,9606	0,8241	0,5847	0,7565	0,7045	0,5460	0,9905	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,9905	0,9704	0,8469	0,7335
IgG1_G1S	0,5306	0,9606	0,8903	0,9606	0,9670	0,9437	0,9905	0,9905	0,9889	0,9905	0,9889	0,9905	0,9328	0,7801	0,6650
IgG1_G2	0,7753	0,9606	0,7257	0,8799	0,8173	0,7257	0,9905	0,9905	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,6830	0,8469	0,6650
IgG1_G2F	0,8676	0,9309	0,9634	0,8326	0,9768	0,8903	0,9889	0,9905	0,9905	0,9889	0,9889	0,9905	0,6650	0,6650	0,6650
IgG1_G2FN	0,9768	0,5931	0,8065	0,6761	0,7917	0,5460	0,9905	0,9905	0,9905	0,9905	0,9905	0,9905	0,9779	0,9191	0,6650
IgG1_G2FNS	0,7257	0,8378	0,4312	0,6104	0,5306	0,5306	0,9889	0,9889	0,9905	0,9889	0,9905	0,9889	0,9968	0,8469	0,6650

	NIH ocjena gastrointestinalni sustav						NIH ocjena urogenitalni sustav (žene)						Ukupna NIH ocjena		
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**2**	**3**	**3**
IgG1_G2FS	0,7960	0,8799	0,8173	0,7753	0,9606	0,7608	0,9889	0,9905	0,9905	0,9889	0,9889	0,9905	0,9191	0,6830	0,6650
IgG1_G2N	0,9634	0,7834	0,9425	0,7753	0,8676	0,5306	0,9889	0,9905	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,6650	0,6650	0,6650
IgG1_G2NS	0,8378	0,9670	0,8820	0,8676	0,9437	0,8378	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,6650	0,6650	0,8607
IgG1_G2S	0,7426	0,9768	0,5306	0,8326	0,7257	0,5460	0,9905	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,7335	0,8736	0,6650
IgG2_G0	0,9768	0,7608	0,5569	0,7608	0,5460	0,7803	0,9905	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,7921	0,6830	0,7921
IgG2_G0F	0,6761	0,9437	0,7753	0,7257	0,5460	0,9606	0,9905	0,9905	0,9905	0,9905	0,9889	0,9905	0,8469	0,8469	0,8469
IgG2_G0FN	0,7499	0,6757	0,7565	0,5460	0,6723	0,9768	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,6830	0,6650	0,7170
IgG2_G0N	0,8676	0,7753	0,5736	0,8676	0,6757	0,7803	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,6650	0,6650	0,6650
IgG2_G1	0,9768	0,5306	0,8378	0,5306	0,8676	0,9606	0,9889	0,9889	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,8469	0,7335	0,6852
IgG2_G1F	0,8676	0,9871	0,9768	0,9606	1,0000	0,9768	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,9905	0,9889	0,6830	0,6650	0,6650
IgG2_G1FN	0,9606	0,9606	0,8241	0,9606	0,7984	0,7960	0,9905	0,9889	0,9905	0,9889	0,9905	0,9889	0,8469	0,8924	0,9241
IgG2_G1FNS	0,7960	0,5460	0,5460	0,7499	0,7177	0,9437	0,9889	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,9889	0,8469	1,0000	0,6650
IgG2_G1FS	0,7753	0,9768	0,9089	0,9600	0,9606	0,9606	0,9889	0,9905	0,9905	0,9889	0,9889	0,9905	0,6718	0,6650	0,6650
IgG2_G1N	0,9768	0,5460	0,6875	0,5460	0,7257	0,9768	0,9905	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,7921	0,6830	0,6650
IgG2_G1NS	0,9437	0,9458	0,7960	0,9606	0,8799	0,8676	0,9889	0,9889	0,9889	0,9905	0,9905	0,9905	0,8924	0,8469	0,8924
IgG2_G1S	0,8378	0,5460	0,6595	0,7362	0,7753	0,9670	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,9779	0,9832	0,8469

	NIH ocjena gastrointestinalni sustav						NIH ocjena urogenitalni sustav (žene)						Ukupna NIH ocjena		
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**2**	**3**	**3**
IgG2_G2	0,9606	0,4801	0,5306	0,4312	0,5306	0,9606	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,7648	0,6830	0,7582
IgG2_G2F	0,9606	0,9768	0,9670	0,9606	0,9670	0,9670	0,9889	0,9905	0,9905	0,9889	0,9889	0,9905	0,7335	0,6650	0,6650
IgG2_G2FN	0,9670	0,9768	0,7753	0,9652	0,7753	0,9437	0,9889	0,9889	0,9905	0,9905	0,9889	0,9889	0,9779	0,8924	0,8400
IgG2_G2FNS	0,9606	0,9768	0,7753	0,9768	0,8378	0,8676	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,9905	0,9889	0,8469	0,9241	0,9832
IgG2_G2FS	0,9458	0,9882	0,9437	0,9768	0,9606	0,9606	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,9905	0,8469	0,6830	0,6650
IgG2_G2N	0,9437	0,2730	0,6761	0,2644	0,5460	1,0000	0,9905	0,9905	0,9905	0,9905	0,9905	0,9905	0,8162	0,6892	0,8469
IgG2_G2NS	0,7565	0,9634	0,8676	0,9606	0,7271	0,8667	0,9889	0,9889	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,6650	0,7170	0,9513
IgG2_G2S	0,9458	0,9989	0,8676	0,9606	0,9437	0,8903	0,9889	0,9889	0,9905	0,9905	0,9889	0,9889	0,7921	0,6830	0,7335
IgG4_G0	0,7753	0,9606	0,9768	0,9670	0,9606	0,9670	0,9905	0,9889	0,9905	0,9889	0,9905	0,9905	0,9832	0,9832	0,8529
IgG4_G0F	0,9606	0,4312	0,5394	0,4801	0,5460	0,9606	0,9889	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,9889	1,0000	0,9752	0,9427
IgG4_G0FN	0,9126	0,4813	0,7753	0,5460	0,8650	0,9365	0,9889	0,9889	0,9889	0,9905	0,9889	0,9905	0,8469	0,8469	0,8469
IgG4_G0N	0,9670	0,9768	0,5460	0,9768	0,5236	0,5460	0,9905	0,9889	0,9905	0,9905	0,9889	0,9889	0,8469	0,9427	0,9779
IgG4_G1	0,8676	0,3001	0,5847	0,2644	0,5460	0,9768	0,9889	0,9905	0,9889	0,9905	0,9905	0,9905	0,9241	0,9832	0,6830
IgG4_G1F	0,8676	0,3001	0,3824	0,2644	0,3001	0,8173	0,9905	0,9905	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,9968	0,7801	0,6830
IgG4_G1FN	0,8799	0,2644	0,4801	0,2644	0,4446	0,9670	0,9889	0,9889	0,9905	0,9905	0,9889	0,9889	0,9191	0,9966	0,6650
IgG4_G1FNS	0,7257	0,9768	0,3824	0,8650	0,2644	0,5306	0,9889	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,9889	0,9241	0,9877	0,6830

	NIH ocjena gastrointestinalni sustav						NIH ocjena urogenitalni sustav (žene)						Ukupna NIH ocjena		
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**2**	**3**	**3**
IgG4_G1FS	0,9606	0,3001	0,6940	0,5460	0,7753	0,9768	0,9889	0,9889	0,9889	0,9905	0,9905	0,9905	0,9328	0,9832	0,6830
IgG4_G1N	0,7960	0,3001	0,5306	0,2644	0,4801	0,9670	0,9905	0,9905	0,9905	0,9905	0,9905	0,9905	0,7648	0,6830	0,7921
IgG4_G1NS	0,9606	0,7960	0,4801	0,7960	0,4801	0,8667	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,9905	0,9889	0,6650	0,6650	0,9407
IgG4_G1S	0,9437	0,8903	0,6418	0,9458	0,7753	0,9437	0,9905	0,9905	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,6650	0,6650	1,0000
IgG4_G2	0,8549	0,2644	0,3659	0,4503	0,4446	0,9437	0,9889	0,9905	0,9905	0,9905	0,9889	0,9905	1,0000	0,9779	0,8697
IgG4_G2F	0,8676	0,4312	0,4801	0,3001	0,4312	0,8378	0,9905	0,9905	0,9905	0,9905	0,9905	0,9905	0,9191	0,7291	0,6650
IgG4_G2FN	0,9606	0,4312	0,5306	0,4813	0,5306	0,9606	0,9905	0,9889	0,9905	0,9889	0,9905	0,9889	0,8697	0,6852	0,6650
IgG4_G2FNS	0,9768	0,9606	0,9989	0,9606	0,9768	0,9670	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,6650	0,6650	0,8469
IgG4_G2FS	0,8650	0,4801	0,5460	0,4801	0,5460	0,9606	0,9905	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,9905	1,0000	0,9308	0,7921
IgG4_G2N	0,9606	0,6761	0,5306	0,5569	0,4801	0,7960	0,9889	0,9905	0,9905	0,9905	0,9889	0,9905	0,9513	0,9832	0,9779
IgG4_G2NS	0,9606	0,5460	0,5306	0,5460	0,5306	0,9437	0,9889	1,0000	0,9889	0,9905	0,9889	0,9905	0,6650	0,6830	0,9662
IgG4_G2S	0,7984	0,7753	0,7257	0,9458	0,8378	0,8903	0,9889	0,9889	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,9934	0,9752	0,8469
IgG1_dB	0,8799	0,9972	0,9670	0,9713	0,9768	0,9768	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,9905	0,9889	0,6804	0,6650	0,8469
IgG1_dG0	0,5306	0,9768	0,9606	0,8799	0,9606	0,9768	0,9889	0,9889	0,9905	0,9905	0,9889	0,9905	0,6718	0,6650	0,6650
IgG1_dG1	0,5306	0,8065	0,9634	0,9799	0,7753	0,8676	0,9889	0,9889	0,9905	0,9889	0,9905	0,9905	0,6650	0,6650	0,6650
IgG1_dG2	0,5736	0,9437	0,8203	0,7753	0,9606	0,7803	0,9889	0,9905	0,9905	0,9889	0,9889	0,9905	0,7335	0,6650	0,6650

	NIH ocjena gastrointestinalni sustav						NIH ocjena urogenitalni sustav (žene)						Ukupna NIH ocjena		
Razina A	**0**			**1**		**2**	**0**			**1**		**2**	**1**		**2**
Razina B	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**1**	**2**	**3**	**2**	**3**	**3**	**2**	**3**	**3**
IgG1_dS	0,5460	0,9768	0,8378	0,8183	0,9768	0,7753	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,9427	0,7648	0,6650
IgG2_dB	0,8799	0,8650	0,6761	0,7753	0,5460	0,8173	0,9889	0,9889	0,9889	0,9889	0,9905	0,9889	0,6804	0,6650	0,6650
IgG2_dG0	0,6748	0,7753	0,7927	0,5460	0,5460	0,9768	0,9889	0,9905	0,9905	0,9889	0,9889	0,9905	0,7335	0,7170	0,7170
IgG2_dG1	0,7565	0,8421	0,9606	0,5569	0,8065	0,9606	0,9889	0,9905	0,9905	0,9889	0,9889	0,9905	0,6830	0,6830	0,6830
IgG2_dG2	0,7565	0,9606	0,9670	0,8173	0,9670	0,9606	0,9889	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,9905	0,8924	0,7921	0,6674
IgG2_dS	0,7960	0,9768	0,7753	0,9606	0,8378	0,8676	0,9889	0,9905	0,9905	0,9889	0,9889	0,9905	0,7921	0,6830	0,6650
IgG4_dB	0,5306	0,7753	0,7565	0,9670	0,6320	0,5460	0,9889	0,9905	0,9905	0,9889	0,9889	0,9889	0,7801	0,7170	0,9832
IgG4_dG0	0,9437	0,3824	0,5460	0,4801	0,6404	0,9606	0,9889	0,9889	0,9905	0,9905	0,9889	0,9889	0,9832	0,9832	0,9241
IgG4_dG1	0,9606	0,7565	0,9606	0,7045	0,9089	0,9437	0,9889	0,9889	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,9328	0,9832	0,6830
IgG4_dG2	0,8378	0,7045	0,5460	0,7960	0,7753	0,9606	0,9905	0,9905	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,9513	0,8780	0,8469
IgG4_dS	0,9089	0,9606	0,7984	0,9768	0,9437	0,9606	0,9889	0,9889	0,9889	0,9905	0,9889	0,9889	0,9968	0,9779	0,8469

Kratice: (0) nepostojeći cGvHD, (1) blagi stupanj cGvHD, (2) umjeren stupanj cGvHD, (3) teški stupanj cGvHD.

B) Aktivnost kroničnog GvHD-a

Rezultati univarijatne analize kliničkog dojma o aktivnosti bolesti i intenziteta sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije naspram pojedinih glikopeptidnih struktura. Tablica prikazuje razinu značajnosti pojedinih glikopeptida pri usporedbi dviju ocjena koje opisuju aktivnost cGvHD-a.

Primjerice, za pregled značajnosti glikopeptida IgG1_G0 pri usporedbi parametara Intenziteta sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije (1) naspram (4), potrebno je u koloni koja pripada ocjenama aktivnosti (1) Bez sistemske imunosupresije i (4) Jaka sistemska imunosupresija (razina A=1, razina B=4) pronaći ćeliju koja pripada retku IgG1_G0 (p=0,2782).

Žutom bojom i podebljanim brojevima naznačene su statističke vrijednosti koje se smatraju značajnima.

	Klinički dojam o aktivnosti bolesti	**Intenzitet sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije**					
Razina 1	**(1) Neaktivna bolest**	**(1) Bez sistemske imunosupresije**			**(2) Blaga sistemska imunosupresija**		**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**
Razina 2	**(2) Aktivna bolest**	**(2) Blaga sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**
IgG1_G0	0,1593	0,3143	0,2541	0,2782	0,8346	0,7159	0,8689
IgG1_G0F	0,0904	0,7752	0,3143	0,0692	0,5906	0,3312	0,4637
IgG1_G0FN	0,0796	0,8660	0,5807	0,3191	0,7067	0,5518	0,6733
IgG1_G0N	0,5109	0,4869	1,0000	0,7147	0,5161	0,3316	0,6947
IgG1_G1	0,6838	0,5750	0,9695	0,6494	0,4943	0,7217	0,6187

	Klinički dojam o aktivnosti bolesti	Intenzitet sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije					
Razina 1	**(1) Neaktivna bolest**	**(1) Bez sistemske imunosupresije**			**(2) Blaga sistemska imunosupresija**		**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**
Razina 2	**(2) Aktivna bolest**	**(2) Blaga sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**
IgG1_G1F	0,0904	0,5869	0,9547	0,7459	0,6061	0,3191	0,7397
IgG1_G1FN	0,9245	0,5833	0,5627	0,5869	0,9510	0,5432	0,9221
IgG1_G1FNS	0,5445	0,5935	0,7044	0,3143	0,7077	0,3191	0,4002
IgG1_G1FS	0,6794	0,9673	0,5500	0,5340	0,6845	0,2697	0,9559
IgG1_G1N	0,9216	0,6257	0,4911	0,3807	0,3191	0,7915	0,8756
IgG1_G1NS	0,7728	0,5833	0,9631	0,7554	0,5743	0,8771	0,6620
IgG1_G1S	0,0904	0,7067	0,6321	0,3143	0,4419	0,8771	0,6061
IgG1_G2	0,3848	0,7438	0,6619	0,3440	0,4339	0,7475	0,6511
IgG1_G2F	0,0796	0,4869	0,2515	0,0677	0,9356	0,2541	0,5340
IgG1_G2FN	0,6838	0,6061	0,2898	0,5377	0,7554	0,7475	0,6502
IgG1_G2FNS	0,9216	0,7803	0,8333	0,7459	0,6266	0,2782	0,8771
IgG1_G2FS	0,0796	0,3433	0,0517	**0,0011**	0,7397	0,2541	0,3924
IgG1_G2N	0,8114	0,7044	0,3143	0,2541	0,2515	0,5807	0,9041
IgG1_G2NS	0,9216	0,7803	0,4943	0,8672	0,3191	0,9831	0,5456

	Klinički dojam o aktivnosti bolesti	Intenzitet sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije					
Razina 1	**(1) Neaktivna bolest**	**(1) Bez sistemske imunosupresije**			**(2) Blaga sistemska imunosupresija**		**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**
Razina 2	**(2) Aktivna bolest**	**(2) Blaga sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**
IgG1_G2S	0,3480	0,7663	0,4637	0,3390	0,2920	0,5807	0,8645
IgG2_G0	0,4390	0,1208	0,5970	0,5750	0,2697	0,2782	0,9547
IgG2_G0F	0,4134	0,6619	0,3965	0,1929	0,9673	0,6620	0,5750
IgG2_G0FN	0,1220	0,9695	0,3143	0,2785	0,5807	0,5564	0,8442
IgG2_G0N	0,6838	0,3965	0,6807	0,8660	0,5743	0,3191	0,4869
IgG2_G1	0,5498	0,9080	0,4943	0,0553	0,5750	0,2697	0,4230
IgG2_G1F	0,1127	0,5259	0,9149	0,6511	0,5869	0,7513	0,7067
IgG2_G1FN	0,9216	0,7459	0,7397	0,7747	0,5807	0,5966	0,9356
IgG2_G1FNS	0,5978	0,4582	0,6235	0,9814	0,7067	0,3965	0,5906
IgG2_G1FS	0,0956	0,7044	0,6257	0,2515	0,9552	0,7067	0,4870
IgG2_G1N	0,5498	0,7726	0,2630	0,0579	0,6061	0,4227	0,5358
IgG2_G1NS	0,2511	0,7726	0,4297	0,7930	0,8333	0,5869	0,2364
IgG2_G1S	0,8370	0,5970	0,6061	0,9552	0,9355	0,6767	0,5983
IgG2_G2	0,8548	0,7044	0,2515	**0,0236**	0,6767	0,3143	0,5793

	Klinički dojam o aktivnosti bolesti	Intenzitet sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije					
Razina 1	**(1) Neaktivna bolest**	**(1) Bez sistemske imunosupresije**			**(2) Blaga sistemska imunosupresija**		**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**
Razina 2	**(2) Aktivna bolest**	**(2) Blaga sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**
IgG2_G2F	0,0904	0,3484	0,4568	0,1062	0,8333	0,7803	0,5133
IgG2_G2FN	0,8492	0,5377	0,8442	0,9044	0,5377	0,5807	0,7459
IgG2_G2FNS	0,6838	0,8771	0,9890	0,5259	0,8464	0,5340	0,5915
IgG2_G2FS	0,0796	0,3390	0,0954	**0,0063**	0,7397	0,5377	0,6061
IgG2_G2N	0,9216	0,6619	0,3026	**0,0384**	0,7067	0,3143	0,4799
IgG2_G2NS	0,0918	0,6257	0,4347	0,3191	0,8756	0,8343	0,9180
IgG2_G2S	0,8595	0,7397	0,6620	0,4146	0,5456	0,3390	0,6620
IgG4_G0	**0,0485**	0,9559	0,5349	0,3494	0,6483	0,4419	0,7663
IgG4_G0F	0,9099	0,5285	0,3143	0,4361	0,9552	0,7726	0,8292
IgG4_G0FN	0,6838	0,4869	0,2782	0,2449	0,9176	0,9615	0,8442
IgG4_G0N	0,3848	0,2697	0,1323	0,3352	0,9695	0,6547	0,5377
IgG4_G1	0,3480	0,7513	0,0517	0,0553	0,3143	0,3143	0,9339
IgG4_G1F	0,5272	0,5285	0,2015	0,2021	0,8029	0,7930	0,9961
IgG4_G1FN	0,8595	0,5750	0,1755	0,1116	0,7747	0,6767	0,8442

	Klinički dojam o aktivnosti bolesti	Intenzitet sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije					
Razina 1	**(1) Neaktivna bolest**	**(1) Bez sistemske imunosupresije**			**(2) Blaga sistemska imunosupresija**		**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**
Razina 2	**(2) Aktivna bolest**	**(2) Blaga sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**
IgG4_G1FNS	0,9641	0,5349	0,9631	0,5807	0,6619	0,8756	0,6107
IgG4_G1FS	0,5272	0,7017	**0,0327**	**0,0376**	0,2785	0,3143	0,7930
IgG4_G1N	0,2056	0,8333	0,2021	0,2920	0,4869	0,5869	0,7397
IgG4_G1NS	0,6838	0,4227	0,2449	0,1725	0,8946	0,9695	0,7819
IgG4_G1S	0,9685	0,5630	0,3143	0,3390	0,8771	0,8829	0,9356
IgG4_G2	0,6037	0,5349	0,5349	0,5869	0,7397	0,6767	0,9552
IgG4_G2F	0,1925	0,8292	0,2515	0,0720	0,4935	0,2785	0,6511
IgG4_G2FN	0,9245	0,7044	0,5807	0,6733	0,4536	0,5285	0,8464
IgG4_G2FNS	0,4134	0,3143	0,8442	0,8892	0,2515	0,3191	0,8464
IgG4_G2FS	0,1059	0,9041	0,0647	**0,0127**	0,3026	0,0727	0,5750
IgG4_G2N	0,9245	0,8442	0,6947	0,6619	0,9221	0,9356	0,9221
IgG4_G2NS	0,9216	0,9890	0,2697	**0,0472**	0,5377	0,3143	0,3143
IgG4_G2S	0,2935	0,7438	0,7067	0,5750	0,5564	0,4869	0,7676

	Klinički dojam o aktivnosti bolesti	Intenzitet sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije					
Razina 1	**(1) Neaktivna bolest**	**(1) Bez sistemske imunosupresije**			**(2) Blaga sistemska imunosupresija**		**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**
Razina 2	**(2) Aktivna bolest**	**(2) Blaga sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**
IgG1_dB	0,2387	0,9890	0,8946	0,9754	0,9695	0,9890	0,8452
IgG1_dG0	0,0796	0,6637	0,2469	**0,0327**	0,6619	0,3943	0,4529
IgG1_dG1	0,0812	0,9221	0,5358	0,3191	0,7367	0,6061	0,7747
IgG1_dG2	0,0796	0,5807	0,0647	**0,0056**	0,5983	0,2898	0,3965
IgG1_dS	0,0904	0,7077	0,0553	**0,0011**	0,5340	0,2697	0,4869
IgG2_dB	0,0796	0,7663	0,2697	0,3143	0,5869	0,6547	0,9221
IgG2_dG0	0,2005	0,5340	0,3390	0,1116	0,9041	0,7445	0,5750
IgG2_dG1	0,3991	0,7438	0,6455	0,3191	0,9754	0,8343	0,6766
IgG2_dG2	0,1059	0,4385	0,2563	**0,0327**	0,9921	0,6511	0,4869
IgG2_dS	0,0904	0,5970	0,2541	**0,0241**	0,7147	0,4799	0,5869
IgG4_dB	0,2511	0,9080	0,8333	0,7803	0,9961	0,9673	0,9961
IgG4_dG0	0,7728	0,4347	0,3191	0,4002	0,9041	0,7067	0,8771
IgG4_dG1	0,3009	0,9165	0,1112	0,0647	0,3143	0,2785	0,8464

	Klinički dojam o aktivnosti bolesti	Intenzitet sistemske imunosupresije u trenutku evaluacije					
Razina 1	**(1) Neaktivna bolest**	**(1) Bez sistemske imunosupresije**			**(2) Blaga sistemska imunosupresija**		**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**
Razina 2	**(2) Aktivna bolest**	**(2) Blaga sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(3) Umjerena sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**	**(4) Jaka sistemska imunosupresija**
IgG4_dG2	0,0918	0,5750	0,8132	0,6619	0,5432	0,4146	0,8442
IgG4_dS	0,0796	0,7017	0,3143	0,2169	0,2541	0,2469	0,8361

	Terapijska namjera u trenutku evaluacije														
Razina 1	**1**					**2**				**3**			**4**		**5**
Razina 2	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**3**	**4**	**5**	**6**	**4**	**5**	**6**	**5**	**6**	**6**
IgG1_G0	0,7729	0,8067	0,9794	0,9794	0,9783	0,9801	0,7057	0,6706	0,9794	0,5731	0,6191	0,9609	0,9064	0,7465	0,8275
IgG1_G0F	0,9788	0,3992	0,5731	0,4488	0,4488	0,3992	0,4631	0,4488	0,4488	0,9794	0,7845	0,6403	0,9148	0,7465	0,5421
IgG1_G0FN	0,9609	0,8536	0,8536	0,5371	1,0000	0,9305	0,9609	0,5343	0,9901	0,9794	0,6804	0,9794	0,8189	0,9148	0,8275
IgG1_G0N	0,9656	0,7360	0,9400	0,9305	0,9168	0,6563	0,9148	0,9996	0,9659	0,9374	0,7729	0,8496	0,9283	0,9609	0,9794
IgG1_G1	0,9801	0,9198	0,7729	0,9609	0,6520	0,8536	0,7488	0,9861	0,7019	0,8189	0,8633	0,6068	0,6748	0,6068	0,6344
IgG1_G1F	0,6748	0,4210	0,6844	0,4210	0,4210	0,6403	0,9448	0,6596	0,4789	0,8956	0,9400	0,5187	0,8916	0,6068	0,5421
IgG1_G1FN	0,8536	0,4166	0,7131	0,8780	0,4577	0,4050	0,7486	0,9783	0,5343	0,7744	0,4314	0,6765	0,8383	0,4488	0,4789

	Terapijska namjera u trenutku evaluacije														
Razina 1	**1**					**2**				**3**			**4**		**5**
Razina 2	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**3**	**4**	**5**	**6**	**4**	**5**	**6**	**5**	**6**	**6**
IgG1_G1FNS	0,9355	0,8336	0,8336	0,9609	0,4577	0,7110	0,7452	0,9428	0,4789	0,9794	0,8036	0,5187	0,8916	0,6811	0,4488
IgG1_G1FS	0,4483	0,4789	0,8067	0,4314	0,4577	0,9374	0,4488	0,9954	0,7744	0,4248	0,9528	0,7254	0,4257	0,4789	0,6344
IgG1_G1N	0,7254	0,9148	0,9263	0,8189	0,4789	0,7744	0,6311	0,9801	0,6068	0,7729	0,8536	0,4819	0,6197	0,4488	0,5421
IgG1_G1NS	0,9261	0,7131	0,7131	0,7973	0,5692	0,4210	0,8536	0,7244	0,5120	0,4789	0,8536	0,7398	0,6308	0,4789	0,6068
IgG1_G1S	0,8648	0,6344	0,9794	0,7057	0,9428	0,4488	1,0000	0,4725	0,9064	0,7729	0,9448	0,7737	0,7486	0,9148	0,7739
IgG1_G2	0,7057	0,8275	0,9794	0,8625	0,6068	0,8633	0,7567	0,7973	0,7744	0,8536	0,9428	0,7254	0,9064	0,6068	0,7019
IgG1_G2F	0,8536	0,4789	0,7729	0,4210	0,5304	0,4789	0,8916	0,4789	0,5875	0,9148	0,9400	0,7636	0,8648	0,6811	0,7260
IgG1_G2FN	0,8883	0,4166	0,5421	0,7019	0,4577	0,4819	0,7057	0,8145	0,6068	0,9794	0,7744	0,6254	0,7973	0,4789	0,5731
IgG1_G2FNS	0,9788	0,6532	0,7729	0,7486	0,4488	0,5343	0,7488	0,6067	0,4879	1,0000	0,9642	0,6254	0,9656	0,5421	0,5731
IgG1_G2FS	0,7488	0,9472	0,7839	0,7131	0,8883	0,6005	0,4789	0,4488	0,7651	0,7254	0,9064	0,9184	0,7729	1,0000	0,9794
IgG1_G2N	0,9374	0,9576	0,6844	0,8883	0,6520	0,9541	0,6844	0,9794	0,6068	0,7131	0,9064	0,4966	0,7729	0,4789	0,4819
IgG1_G2NS	0,9374	0,7215	0,6844	0,8952	0,7729	0,8336	0,6596	0,9794	0,7486	0,4210	0,8633	0,7973	0,4819	0,5421	0,7739
IgG1_G2S	0,4774	0,7215	0,9794	0,6765	0,6520	0,6403	0,5421	0,8336	0,9064	0,8207	0,9448	0,8536	0,8536	0,8536	0,7973
IgG2_G0	0,9374	0,5731	0,4488	0,4257	0,8883	0,5391	0,4166	0,4054	0,8536	0,6959	0,7254	0,9320	0,9374	1,0000	0,9400
IgG2_G0F	0,9400	0,9263	0,7486	0,8536	0,5692	0,9954	0,8536	0,9006	0,5692	0,7744	0,9064	0,5778	0,9028	0,4488	0,5421
IgG2_G0FN	0,9656	0,6344	0,9764	0,9374	0,4789	0,6605	0,9996	0,8189	0,4488	0,7973	0,4488	0,6765	0,9184	0,6068	0,4488

	Terapijska namjera u trenutku evaluacije														
Razina 1	**1**					**2**				**3**			**4**		**5**
Razina 2	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**3**	**4**	**5**	**6**	**4**	**5**	**6**	**5**	**6**	**6**
IgG2_G0N	0,7973	0,6908	0,4488	0,4054	0,6068	0,9005	0,6067	0,4789	0,6811	0,7973	0,6670	0,7398	0,9374	0,8536	0,7973
IgG2_G1	0,6068	0,3992	0,4488	0,4725	0,3992	0,3992	0,6748	0,9148	0,3992	0,7110	0,4166	0,3992	0,7486	0,3992	0,3992
IgG2_G1F	0,4789	0,3992	0,5875	0,4488	0,3992	0,4488	0,8536	0,7488	0,3992	0,9148	0,8633	0,4789	0,9656	0,5421	0,4166
IgG2_G1FN	0,7729	0,3992	0,7422	0,7973	0,4054	0,3992	0,8145	0,9954	0,4210	0,5993	0,3992	0,4488	0,8067	0,3992	0,4054
IgG2_G1FNS	0,3992	0,4054	0,4789	0,3992	0,5692	0,9283	0,9168	0,9064	0,4166	0,9791	0,8383	0,4210	0,8275	0,4789	0,4166
IgG2_G1FS	0,9320	0,6706	0,6748	0,9168	0,4166	0,4789	0,6697	0,8536	0,4210	0,9549	0,7973	0,4415	0,8275	0,5421	0,4054
IgG2_G1N	0,4488	0,3992	0,5731	0,4488	0,3992	0,4789	0,9528	0,9168	0,3992	0,7973	0,6811	0,3992	0,9609	0,3992	0,3992
IgG2_G1NS	0,6068	0,9148	0,7027	0,9064	0,8536	0,6596	0,9374	0,8189	1,0000	0,7845	0,9791	0,9184	0,8587	0,9609	0,9642
IgG2_G1S	0,4966	0,4819	0,5731	0,6520	1,0000	0,9788	0,9923	0,8856	1,0000	0,9981	0,9656	0,9794	0,9064	0,9609	1,0000
IgG2_G2	0,4789	0,3992	0,7636	0,5766	0,3992	0,4789	0,9448	0,9374	0,3992	0,5391	0,4789	0,3992	0,9656	0,3992	0,3992
IgG2_G2F	0,8189	0,4250	0,7131	0,4210	0,4054	0,4789	0,7744	0,5585	0,4210	0,9400	0,9801	0,5187	0,9764	0,6811	0,4210
IgG2_G2FN	0,9801	0,4166	0,7636	1,0000	0,4054	0,3992	0,7567	0,9764	0,3992	0,7465	0,3992	0,4166	0,7715	0,3992	0,4054
IgG2_G2FNS	0,4210	0,8737	0,4819	0,9791	0,4210	0,4210	0,9794	0,4166	0,4166	0,4966	0,9374	0,5343	0,4819	0,4210	0,5731
IgG2_G2FS	0,9064	0,9148	0,7486	0,7351	0,4577	0,7254	0,5993	0,6068	0,4789	0,7845	0,9213	0,5343	0,9184	0,7465	0,4488
IgG2_G2N	0,7351	0,5577	0,9148	0,6826	0,3992	0,8501	0,9374	0,9348	0,3992	0,8567	0,9320	0,3992	0,9148	0,3992	0,3992
IgG2_G2NS	0,9168	0,9374	0,6748	0,9148	0,6068	0,9794	0,5343	0,8307	0,5692	0,5692	0,8496	0,6254	0,6748	0,5421	0,5187

	Terapijska namjera u trenutku evaluacije														
Razina 1	**1**					**2**				**3**			**4**		**5**
Razina 2	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**3**	**4**	**5**	**6**	**4**	**5**	**6**	**5**	**6**	**6**
IgG2_G2S	0,4054	0,3992	0,4488	0,4483	0,3992	0,5343	0,8771	0,9400	0,4166	0,8536	0,4939	0,4166	0,8275	0,4054	0,4166
IgG4_G0	0,9374	0,7954	0,7839	0,9400	0,4577	0,7027	0,8336	0,9374	0,4789	0,5630	0,6344	0,4966	0,8916	0,4054	0,4488
IgG4_G0F	0,7465	0,8536	0,8336	0,9794	0,3992	0,4789	0,4488	0,7567	0,3992	0,9064	0,9064	0,4166	0,7351	0,3992	0,4054
IgG4_G0FN	0,7973	1,0000	0,9005	0,8189	0,3992	0,7057	0,6254	0,9523	0,3992	0,7845	0,9148	0,4210	0,7131	0,4210	0,4054
IgG4_G0N	0,8536	0,7057	0,9400	0,9374	0,4210	0,4488	1,0000	0,9609	0,4483	0,6103	0,6068	0,4488	0,9283	0,4054	0,4488
IgG4_G1	0,9764	0,8536	0,8862	0,9305	0,4166	0,8536	0,7729	0,8642	0,4210	0,6811	0,7486	0,4488	0,9028	0,4210	0,4166
IgG4_G1F	0,7890	0,9148	0,9005	0,8145	0,8067	0,7567	0,7452	0,9400	0,6605	0,9609	0,7942	0,6403	0,7567	0,4488	0,7486
IgG4_G1FN	0,7351	0,7890	0,8648	0,6403	0,5304	0,9794	0,9168	0,8625	0,4488	0,8383	0,9064	0,4789	0,7729	0,4488	0,4488
IgG4_G1FNS	0,6403	0,3992	0,8336	0,7131	0,4210	0,4166	1,0000	0,9801	0,4488	0,7019	0,4314	0,4966	1,0000	0,7465	0,4314
IgG4_G1FS	0,5051	0,8189	0,5731	0,7057	0,4577	0,7762	0,9794	0,8067	0,4488	0,8845	0,9794	0,4488	0,8916	0,4210	0,4210
IgG4_G1N	0,9355	0,7254	1,0000	0,9355	0,4210	0,5685	0,9609	0,9764	0,4483	0,7351	0,5993	0,4789	0,9148	0,4210	0,4314
IgG4_G1NS	0,7488	0,8536	0,6068	0,9027	0,3992	0,4488	0,7900	0,7567	0,3992	0,4488	0,7406	0,3992	0,7351	0,3992	0,3992
IgG4_G1S	0,9148	0,4488	0,9400	0,6353	0,4054	0,4415	1,0000	0,7681	0,3992	0,6258	0,8275	0,4054	0,8067	0,3992	0,4054
IgG4_G2	0,9320	0,5993	0,7486	0,9523	0,3992	0,4488	0,6811	0,8067	0,3992	1,0000	0,7254	0,3992	0,8536	0,3992	0,3992
IgG4_G2F	0,9064	0,9320	0,9764	0,6942	0,9783	0,9374	0,9374	0,7351	0,8496	1,0000	0,5731	0,8496	0,7452	0,9609	0,7486
IgG4_G2FN	0,9186	0,4488	0,8648	0,7465	0,7019	0,4488	0,9528	0,7567	0,7744	0,6403	0,7131	0,9387	0,8536	0,7973	0,7973

	Terapijska namjera u trenutku evaluacije														
Razina 1	**1**					**2**				**3**			**4**		**5**
Razina 2	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**3**	**4**	**5**	**6**	**4**	**5**	**6**	**5**	**6**	**6**
IgG4_G2FNS	0,7452	0,4971	0,4966	0,7729	0,7406	0,3992	0,8145	0,4488	0,6219	0,4054	0,9609	0,9320	0,4488	0,4789	0,8799
IgG4_G2FS	1,0000	0,9609	0,8536	0,7057	0,4789	0,9027	0,8067	0,6068	0,5692	0,8648	0,7729	0,6254	0,9794	0,6068	0,4789
IgG4_G2N	0,9764	0,4054	0,6748	0,8189	0,3992	0,3992	0,7057	0,8189	0,4054	0,7254	0,4797	0,4415	0,9801	0,3992	0,4054
IgG4_G2NS	0,8536	0,4210	0,6748	0,9374	0,4054	0,4210	0,7744	0,9523	0,3992	0,8336	0,4225	0,4273	0,7254	0,3992	0,4054
IgG4_G2S	0,5343	0,9198	0,4725	0,5875	0,6068	0,6254	0,3992	0,9400	0,5343	0,4054	0,7465	0,6068	0,3992	1,0000	0,4488
IgG1_dB	0,9919	0,7729	0,9148	0,8536	0,7406	0,5538	0,8625	0,9428	0,4587	0,9345	0,4789	0,8307	0,7794	0,8536	0,6344
IgG1_dG0	0,9148	0,5343	0,7027	0,4789	0,6068	0,4054	0,4879	0,4054	0,5450	0,9184	0,9005	0,7636	0,9940	0,7973	0,7973
IgG1_dG1	0,8189	0,4166	0,6068	0,4789	0,4789	0,4166	0,5421	0,5343	0,5343	0,9184	0,9027	0,7254	0,8067	0,8536	0,6344
IgG1_dG2	0,8536	0,7744	0,7729	0,4837	0,7019	0,4789	0,6067	0,4210	0,7019	0,9345	0,8694	0,8536	0,9656	0,9148	0,9064
IgG1_dS	0,4488	0,8536	0,7131	0,9791	0,8536	0,5421	0,3992	0,4488	0,8496	0,4819	0,8883	0,9764	0,5731	0,8536	0,9642
IgG2_dB	0,8536	0,8633	0,9148	0,7351	0,8067	0,4926	0,9609	0,8625	0,7486	0,7392	0,4488	0,6068	0,9428	0,9148	0,8536
IgG2_dG0	0,9794	0,9428	0,8336	0,7486	0,6068	0,9374	0,7729	0,6434	0,6403	0,7783	0,7406	0,6765	0,9801	0,4789	0,5731
IgG2_dG1	0,7729	0,8915	0,9064	0,6605	0,3992	0,9734	0,8916	0,8275	0,3992	0,8648	0,8207	0,3992	0,9764	0,3992	0,3992
IgG2_dG2	0,7845	0,9355	0,9794	0,7856	0,9783	0,5731	0,6359	0,4966	0,9320	0,9374	0,9298	0,9609	0,9609	1,0000	0,8799
IgG2_dS	0,6563	0,9794	0,9005	0,9609	0,4210	0,5875	0,6068	0,5964	0,4483	0,8207	0,9764	0,4819	0,9064	0,6068	0,4314

	Terapijska namjera u trenutku evaluacije														
Razina 1	**1**					**2**				**3**			**4**		**5**
Razina 2	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**3**	**4**	**5**	**6**	**4**	**5**	**6**	**5**	**6**	**6**
IgG4_dB	0,8633	0,4314	0,9861	0,6403	0,6068	0,6289	0,9148	0,9064	0,8536	0,5546	0,8446	0,9320	0,7351	0,6811	0,8275
IgG4_dG0	0,7486	0,9148	0,7973	0,9609	0,3992	0,5790	0,4789	0,7942	0,3992	0,8067	0,9355	0,4210	0,7452	0,4054	0,4054
IgG4_dG1	0,7729	0,5421	0,9064	0,8625	0,3992	0,8189	0,7729	0,9148	0,4210	0,6403	0,7057	0,4488	0,9064	0,4054	0,4054
IgG4_dG2	0,5421	0,7973	0,5621	0,9981	0,3992	0,4054	0,3992	0,4924	0,3992	0,7651	0,7890	0,4054	0,5731	0,4488	0,3992
IgG4_dS	0,4789	0,8654	0,4819	0,7781	0,7019	0,5343	0,3992	0,6258	0,5692	0,4166	0,9088	0,8496	0,3992	0,9148	0,7260

Kratice: 1) smanjiti sistemsku terapiju zbog poboljšanja bolesti, (2) ne mijenjati sistemsku terapiju jer je bolest stabilna, (3) povećati sistemsku terapiju zbog pogoršanja i napredovanja bolesti, (4) zamijeniti terapiju zbog njezine toksičnosti, (5) promijeniti sistemsku terapiju zbog nedostatka odgovora na istu, (6) ukinuti sistemsku terapiju zbog nedostatka odgovora na istu. IgGX – glikopeptid imunoglobulina G, X - broj od 1-4 (IgG podklasa). GX (0-2) – broj galaktoza, F – fukoza, N - račvajući GlcNAc, S - sijalinska kiselina u glikanskoj strukturi glikopeptida; d – derivirano svojstvo.