

Promjene koncentracija proteina akutne faze i glikozilacije serumskih proteina kod akutne sistematske upale nakon radikalne resekcije kolona

Đerek, Lovorka

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:759919>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Lovorka Đerek

**PROMJENE KONCENTRACIJA PROTEINA AKUTNE
FAZE I GLIKOZILACIJE SERUMSKIH PROTEINA
KOD AKUTNE SISTEMSKE UPALE NAKON
RADIKALNE RESEKCIJE KOLONA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Lovorka Đerek

**PROMJENE KONCENTRACIJA PROTEINA AKUTNE
FAZE I GLIKOZILACIJE SERUMSKIH PROTEINA
KOD AKUTNE SISTEMSKJE UPALE NAKON
RADIKALNE RESEKCIJE KOLONA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

dr. sc. Gordan Lauc, red. prof.

Zagreb, 2019.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lovorka Đerek

**CHANGES IN ACUTE PHASE PROTEINS
CONCENTRATIONS AND SERUM PROTEINS
GLYCOSYLATION IN ACUTE SYSTEMIC
INFLAMMATION AFTER RADICAL COLON
RESECTION**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Professor Gordan Lauc, Ph.D.

Zagreb, 2019.

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

Rad je izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu i laboratoriju Genos, Genos DNA d.o.o u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALE

Zahvaljujem prof. dr. sc. Gordanu Laucu na pomoći i povjerenju te dobroj volji tijekom izrade doktorskog rada.

Veliko hvala osoblju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava na podršci i pomoći tijekom cijelog procesa izrade rada.

Puno hvala kolegicama i kolegama iz Kliničkog zavoda za kemiju, Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice na ohrabrenju i podršci tijekom konačne izrade ovog rada.

Zahvaljujem dr.sc Draženu Servisu na sjajnoj suradnji, stručnoj pomoći, pojašnjavanju kliničkih dijelova studije, susretljivosti, predanosti i entuzijazmu.

Veliko hvala osoblju Genosa na pomoći u izradi analiza, dr.sc. Maji Pučić Baković i dr.sc Ivi Ugrina koji su uvijek našli vremena za odgovore na moja pitanja.

Mojim prijateljima, posebno Tihani, Nevenki, Adriani i Domagoju koji su silnom pozitivnom energijom i humorom pomagali u rješavanju svakog problema i prepreke.

Veliko hvala mojoj mami, koja svojim primjerom pokazuje koliko su um, duh i duhovitost tajna vječne mladosti.

Posebno hvala Marku na drugom kutu gledanja i šalama na istu temu, analitičkom pristupu i velikom razumijevanju, smijehu i ljubavi.

Za Zu...

SAŽETAK

Radikalna resekcija kolona dovodi do procesa akutne upale i sindroma sistemskog upalnog odgovora (*engl. systemic inflammatory response syndrome, SIRS*). Razina i uzrok SIRS-a nastalog operativnim zahvatima prati se porastom koncentracije proteina akutne faze koji ukazuju na uzrok i tijek upalnog procesa. Sam tijek i individualni odgovor na akutnu upalu nisu u potpunosti razjašnjeni. Upravo zato u ranoj poslijeoperativnoj fazi sve veću važnost ima i praćenje promjena glikozilacije gdje su utvrđene velike individualne razlike u odgovoru na akutnu sistemsku upalu. Cilj istraživanja je bio ispitati učinak radikalne resekcije kolona na razvoj SIRS-a praćenjem promjena koncentracije sTREM -1, IL-6, prokalcitonina i CRP-a te promjena glikozilacije ukupnih proteina seruma i IgG-a u definiranim točkama mjerenja čime bi se definirala međuovisnost procesa akutne upale i razvoja SIRS-a sa specifičnim promjenama u glikomu i koncentracijama proteina akutne faze.

U istraživanje je uključeno 28 ispitanika (19 muškaraca i 9 žena) medijana dobi 71 godina (44-85) s dijagnozom kolorektalnog karcinoma koji su podvrgnuti radikalnoj resekciji kolona otvorenog tipa. Uzorci krvi uzorkovani su u četiri vremenske točke: 1 dan prije operacije (T0), 24 sata poslije operacije (T1), 48 sati poslije operacije (T2) i 7 dana poslije operacije (T3) kako bi se obuhvatio i akutni odgovor na kirurški stres, ali i popratilo jenjavanje upale ili produljena reakcija na kirurški stres.

Rezultati ovog rada pokazali su statistički značajne promjene sTREM-1, CRP-a, PCT-a i IL-6 kao i *N*-glikanskih profila ukupnih proteina seruma i *N*-glikanskih profila IgG-a prije operacije te tijekom 7 dana poslijeoperativnog praćenja ispitanika. Također su utvrđene korelacije IL-6 kao i određenih glikanskih struktura *N*-glikanskih profila ukupnih proteina seruma i *N*-glikanskih profila IgG-a s duljinom trajanja operacije. Korelacijskom analizom i linearnom regresijom ispitana je povezanost koncentracija proteina akutne faze s promjenama *N*-glikanskih profila te su nađene slabe do vrlo dobre korelacije CRP-a, IL-6 i PCT sa specifičnim strukturama od kojih je najjasnija bila korelacija CRP-a s tetragalaktosiliranom i sijaliniziranom strukturom s antenarnom fukozom. sTREM-1 nije pokazao značajnu korelaciju niti s jednim drugim ispitivanim biljekom.

Ovo je istraživanje pokazalo da radikalna resekcija kolona ne dovodi nužno do SIRS-a, a da se tijek i dinamika upale kao odgovora na kirurški stres može pratiti porastom koncentracija proteina akutne faze, pri čemu promjena koncentracija sTREM-1 može ukazati da nije došlo

do razvoja SIRS-a. Također se razjasnilo da glikanski profili pokazuju vrlo jasne obrasce promjena koji se mogu povezati s promjenama koncentracija proteina akutne faze te bi se njihovim daljnjim izučavanjem otvorila mogućnost korištenja dobivenih podataka glikanskih profila u svrhu individualnog i sveobuhvatnog praćenja ranog upalnog odgovora.

Ključne riječi: resekcija kolona, odgovor akutne faze, SIRS, glikozilacija

SUMMARY

Background

Colorectal cancer surgery, as well as all severe surgical procedures, lead to strong acute phase response and systemic inflammatory response syndrome (SIRS). The extent and the cause of SIRS are monitored with acute phase proteins that point to the cause and course of inflammatory process. As the course and the individual response to acute inflammation in early postoperative phase are not completely understood, there is also an increasing importance in monitoring glycosylation changes, where large individual differences have been identified in acute systemic inflammation response.

Aim

The aim of this study was to test the effect of radical colon resection on SIRS development by monitoring soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1), interleukin-6 (IL-6), procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP), as well as the changes in *N*-glycosylation profiles of total serum proteins and immunoglobulin G (IgG) in defined points of measurement that would define interdependence of acute inflammatory process and SIRS development with specific glycome and acute phase proteins changes.

Secondary aims included three groups of testings: testing of sTREM-1 changes during the postoperative period as well as the interconnection of duration of the surgery with the change of sTREM-1 concentrations; testing of *N*-glycosylation profiles of total serum proteins and IgG during the postoperative period as well as the the interconnection of the duration of the surgery with the changes of glycosylation profile; testing of interconnectvity in changes of acute phase proteins concentrations and of total serum proteins and IgG glycane profiles changes during the postoperative period.

Materials and methods

This study included 28 participants (19 men and 9 women) with a median age of 71 years (44-85) and with colorectal cancer diagnosis that underwent radical colon resection. Blood samples were collected in 4 measurement points: 24 hours before the surgery (T0), 24 hours after the surgery (T1), 48 hours after the surgery (T2) and 7 days after the surgery in order to

define acute response to surgical stress, as well as to define the decrease of inflammations or notice the extended reaction to surgical stress.

sTREM-1 was determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method (IQ products, Groningen, Netherlands). IL-6 was determined using ELISA method (Quantikine, R&D, Minneapolis, USA), PCT was determined using electrochemiluminescence immunoassay method on Cobas e411 analyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and CRP was determined using immunoturbidimetric method on AU 2700 plus analyzer (Beckman Coulter, Tokyo, Japan). *N*-glycosylation profiles of total serum proteins and immunoglobulin G (IgG) were determined using hydrophilic interaction chromatography - ultra performance liquid chromatography (HILIC-UPLC) method on Waters Acquity UPLC instrument (Mislford, SAD) with previous isolation of IgG and total serum proteins.

Kolmogorov-Smirnov test was used to test for normal distribution of the data and Friedman test was used for repeated measures comparisons of acute phase proteins. Differences in *N*-glycosylation profiles of total serum proteins and immunoglobulin G (IgG) were determined with repeated measures ANOVA (RM-ANOVA). To test the correlation of acute phase proteins with the duration of the surgery, correlation analysis was performed (Spearman coefficient of correlation). To test the connection of *N*-glycan changes with IL-6 concentration changes, we used linear regression. Statistical analysis was done using MedCalc Statistical Software version 18.11.6 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2019)) and IBM SPSS Statistics for Windows, version 25.0 (IBM Corp <https://www.ibm.com/analytics/spss-statistics-software>) statistical programs.

Results

The results showed statistically significant differences of sTREM-1, CRP, IL-6 and PCT, as well as changes in *N*-glycan profiles of total serum proteins and IgG before the surgery and during 7 days of postoperative recovery. There was statistically significant difference in almost all *N*-glycane structures except biantennary galactosylated and sialylated structure with bisecting GlcNAc and trigalactosylated and sialylated structure. *N*-glycan IgG analysis showed statistically significant changes in monoantennary galactosylated and biantennary galactosylated structures with core fucose and bisecting GlcNAc as well as biantennary galactosylated and sialylated structures. All *N*-glycane structures that showed statistically significant difference were decreasing in postoperative period. Significant correlations for IL-

6, as well as some N-glycan structures of total serum proteins and IgG, were discovered with the duration of the surgery. Correlation and linear regression analysis revealed weak, moderate and very good correlations between CRP, IL-6, PCT and N-glycan profiles of total serum proteins and IgG. The strongest discovered correlation was the very good correlation of CRP with tetragalactosylated and sialinised structure with antennary fucose. sTREM-1 did not reveal any significant correlation with any other tested parameter.

Conclusions

This study showed that radical colorectal cancer surgery does not necessarily lead to SIRS and the course and dynamics of inflammation as the response to surgical stress can be followed by the rise of the acute phase proteins. Changes of sTREM-1 concentrations can indicate that there was no SIRS development in patients that underwent colorectal cancer surgery. This study also clarified that glycan profiles showed very distinct patterns change that could be related to the acute phase proteins concentrations changes. N-glycane profile of IgG changes are very diverse and correspond to rapid protein concentration decrease during surgery, but also the fact that N-glycome of IgG is very individual in the early phase of inflammation. Further research of the glycan profiles could open up the possibility of using the acquired data for individual monitoring of the early inflammatory response.

Keywords: colon resection, acute phase response, SIRS, glycosylation

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Sindrom sistemskog upalnog odgovora.....	3
1.2.	Proteini akutne faze	5
1.2.1.	Topljivi okidajući receptor ekspimiran na mijeloičnim stanicama – 1.....	5
1.2.2.	Interleukin-6	7
1.2.3.	C-reaktivni protein	7
1.2.4.	Prokalcitonin	8
1.3.	Glikozilacija.....	9
1.3.1.	<i>N</i> -glikozilacija proteina	10
1.3.2.	Imunoglobulin G i <i>N</i> -glikozilacija imunoglobulina G	12
1.3.3.	Glikozilacija u upali	14
1.4.	Svrha i ciljevi rada	15
2.	MATERIJALI I METODE	16
2.1.	Materijali	17
2.1.1.	Kemikalije	17
2.1.2.	Enzimi	17
2.1.3.	Afinitetna pločica za pripremu uzoraka	17
2.1.4.	Komercijalni reagensi i kompleti reagensa	17
2.2.	Ispitanici	18
2.3.	Uzimanje uzoraka krvi.....	20

2.4.	Određivanje proteina akutne faze	21
2.4.1.	Određivanje koncentracije sTREM-1.....	21
2.4.2.	Određivanje koncentracije IL-6	22
2.4.3.	Određivanje koncentracije prokalcitonina	22
2.4.4.	Određivanje koncentracije CRP-a.....	23
2.5.	Određivanje <i>N</i> -glikanskih profila imunoglobulina G i ukupnih proteina seruma	23
2.5.1.	Priprema uzoraka glikana imunoglobulina G iz seruma	23
2.5.2.	Priprema uzoraka glikana ukupnih proteina seruma	24
2.5.3.	HILIC-UPLC metoda	24
2.6.	Statistička analiza rezultata	32
3.	REZULTATI.....	34
3.1	Utjecaj operacije na proteine akutne faze.....	37
3.2	Analiza glikana	40
3.3	Ispitivanje međusobne povezanosti promjena koncentracija proteina akutne faze i promjena <i>N</i> -glikanskih profila ukupnih proteina seruma i IgG-a	48
4.	RASPRAVA.....	51
5.	ZAKLJUČCI.....	60
6.	POPIS LITERATURE	63
7.	POPIS KRATICA	75
8.	ŽIVOTOPIS	78

1. UVOD

Karcinomi su značajan javnozdravstveni problem stanovništva Hrvatske te su drugi najvažniji uzrok smrti iza bolesti srca i krvnih žila. Kolorektalni karcinom nalazi se na trećem mjestu po učestalosti kod muškaraca, s udjelom u incidenciji od 16%, te na drugom mjestu kod žena, s udjelom u incidenciji od 12%^{1,2}. Porast incidencije kolorektalnog karcinoma u razvijenim zemljama pripisuje se starenju populacije, neprikladnim prehrabnim navikama i porastu čimbenika rizika poput pušenja, smanjene fizičke aktivnosti i pretilosti. Do kolorektalnog karcinoma dovode okolišni i genetski čimbenici, pri čemu dolazi do nakupljanja genetskih i epigenetskih promjena koje aktiviraju onkogene i inaktiviraju tumor supresorske gene. Gubitak takve genetske i epigenetske stabilnosti primijećen je u većini ranih neoplastičnih lezija u kolonu te se vjerojatno radi o centralnom molekularnom i patofiziološkom događaju u započinjanju i stvaranju kolorektalnog karcinoma^{3,4}. Operacija je glavni kurativni pristup za kolorektalni karcinom. Unatoč stalnom razvoju novih operativnih tehnika^{5,6}, radikalna resekcija kolona otvorenog tipa i dalje se smatra zlatnim standardom u liječenju kolorektalnog karcinoma⁷.

Operacije kolorektalnog karcinoma, kao i svi opsežni kirurški zahvati, različitim intenzitetom, vrstom i obujmom oštećenja uzrokuju različit fiziološki odgovor organizma. Najizgledniji je snažan odgovor akutne faze i sindrom sistemskog upalnog odgovora (engl. *systemic inflammatory response syndrome*, SIRS). Razina i uzrok SIRS-a nastalog operativnim zahvatima prati se porastom koncentracije proteina akutne faze koji ukazuju na uzrok i tijek upalnog procesa. Sam tijek i individualni odgovor na akutnu upalu nisu u potpunosti razjašnjeni. Upravo zato u ranoj poslijeoperativnoj fazi sve veću važnost ima i praćenje promjena glikozilacije gdje su utvrđene velike individualne razlike kao odgovor na akutnu sistemsku upalu. Za samu upalnu kaskadu glikozilacija je neophodan proces, a veće razumijevanje mehanizama tog procesa moglo bi dovesti do mogućnosti kontrole upale. Do promjene glikanskih struktura dolazi u različitim patološkim stanjima, zbog čega glikani mogu biti potencijalni dijagnostički biljezi raznih bolesti. Zbivanja nakon operacije dobar su model za izučavanje promjene koncentracija proteina akutne faze i profila glikozilacije koncentracija proteina akutne faze u razvoju SIRS-a, pogotovo ako se istražuje dinamika promjena kroz definirani poslijeoperativni period, kao i upalni odgovor u odnosu na duljinu trajanja operacije. Na taj bi se način vrednovao učinak operacije na upalni odgovor i glikozilaciju te ispitao individualni odgovor na akutnu upalu, ovisno o promjenama mjerenih proteina akutne faze.

1.1. Sindrom sistemskog upalnog odgovora

Sindrom sistemskog upalnog odgovora (SIRS, engl. *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) je akutna upalna reakcija sa sistemskim manifestacijama uzrokovana oslobađanjem mnogobrojnih endogenih čimbenika upale u krvotok. SIRS se smatra kliničkim sindromom koji je oblik neregulirane upale⁸, a bio je sastavni dio definicije sepse još od 90-tih godina prošlog stoljeća kada nije postojala jednoznačno prihvaćena definicija sepse, što je onemogućavalo kvalitetnu usporedbu rezultata liječenja i kliničkih istraživanja. Stoga je 1991. godine održana konferencija američkih stručnih udruženja ACCP/SCCM (engl. *American College of Chest Physicians and Society of Critical Care Medicine Consensus Conference, ACCP/SCCM Conference*) s osnovnim ciljem standardizacije definicije i klasifikacije sindroma sepse, gdje se sepsa klasificirala prema sljedećim kliničkim kategorijama:

- SIRS,
- sepsa,
- teška sepsa,
- septički šok,
- sindrom višeorganske disfunkcije (engl. *Multiple organ dysfunction syndrome, MODS*)⁹.

Definicija SIRS-a prema ACCP/SCCM klasifikaciji prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1. Definicija SIRS-a ACCP/SCCM klasifikaciji sindroma sepse

KATEGORIJE	DIJAGNOSTIČKI KRITERIJI
SIRS	<p>Sistemska upalna odgovor neovisno o uzroku – definira se ako su zadovoljena dva od navedenih uvjeta:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tjelesna temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ ili $<36^{\circ}\text{C}$ 2. Frekvencija rada srca >90 otkucaja po minuti (tahikardija) 3. Frekvencija disanja >20 udaha po minuti (tahipneja) ili $\text{pCO}_2 <4,3\text{kPa}$ (hiperventilacija) 4. Ukupni broj leukocita $>12 \times 10^9/\text{L}$ ili $<4 \times 10^9/\text{L}$ ili $>10\%$ nezrelih stanica granulocitopoeze

Prema gore navedenoj definiciji SIRS može imati infektivnu ili neinfektivnu etiologiju, a navedeni kriteriji definiraju patofiziološke promjene kao pokazatelje akutnog pogoršanja u odnosu na bazične vrijednosti u odsustvu drugih poznatih uzroka (npr. kemoterapija, inducirana neutropenija ili leukopenija). Brojna druga klinička stanja neinfektivne etiologije, poput akutnog pankreatitisa, teške traume, opekline, hemoragičnog šoka, postoperativnog stanja ili imunološki posredovanog oštećenja tkiva, mogu uzrokovati SIRS. Kako se SIRS i sepsa očituju klinički istovjetnim mjerljivim promjenama pokazatelja fizioloških funkcija, smatra se da se SIRS u kojem je suspektna ili dokazana infekcija definira kao sepsa.

Zbog svijesti o nedostacima ovakve kategorizacije SIRS-a i sepse na konferenciji za definiranje sepse održane 2001. godine ponovno je definirano da SIRS može nastati u stanjima bez infekcije, ali da su kriteriji objavljeni 1992. godine previše nespecifični te da bi se u budućnosti trebali uključiti i biokemijski kriteriji poput interleukina-6 (IL-6), C-reaktivnog proteina (CRP), prokalcitonina, adrenomedulina i ekstracelularne fosfolipaze A2 kod bolesnika koji zadovoljavaju kriterije za SIRS iz 1992. godine¹⁰. Međutim, bitno je naglasiti da se SIRS više ne smatra kategorijom u klasifikaciji sepse upravo iz razloga što može biti infektivne i neinfektivne etiologije. Osim toga, definicije stručnih društava poput

SCCM ne smatraju se kompletnom definicijom sepse jer ne uključuju specifične kriterije za identifikaciju infekcije te stoga i nisu jednoglasno prihvaćene od svih stručnih društava. Međutim, većina stručnih društava poput Službe centra za medicinsku skrb i pomoć (engl. *Center for Medicare and Medicaid Services (CMS)*) i dalje podržavaju stare definicije SIRS-a i kategorizaciju sepse, iako se oni smatraju samo sugestivnima budući da nisu dovoljno precizni da bi imali dijagnostičku vrijednost. Kako se simptomi i kliničke manifestacije SIRS-a i sepse vrlo često preklapaju, jako je bitno pratiti mogući prelazak jedne kategorije u drugu i jasno razaznati etiologiju kliničkog stanja¹¹.

SIRS nastaje kada medijatori upale poput interleukina-1 (IL-1) i/ili faktora nekroze tumora-alfa (TNF α), koji se oslobađaju na mjestu oštećenja (traume, kod pankreatitisa itd.) prelaze granicu lokalne okoline i dovode do sustavnog odgovora. Oba navedena citokina mogu izazvati vrućicu, hipotenziju, leukocitozu, ali i potaknuti stvaranje ostalih proupalnih citokina, kao i simultano aktivirati koagulaciju i fibrinolizu. Upravo iz tog razloga SIRS slijedi i porast citokina, odnosno proteina akutne faze¹².

1.2. Proteini akutne faze

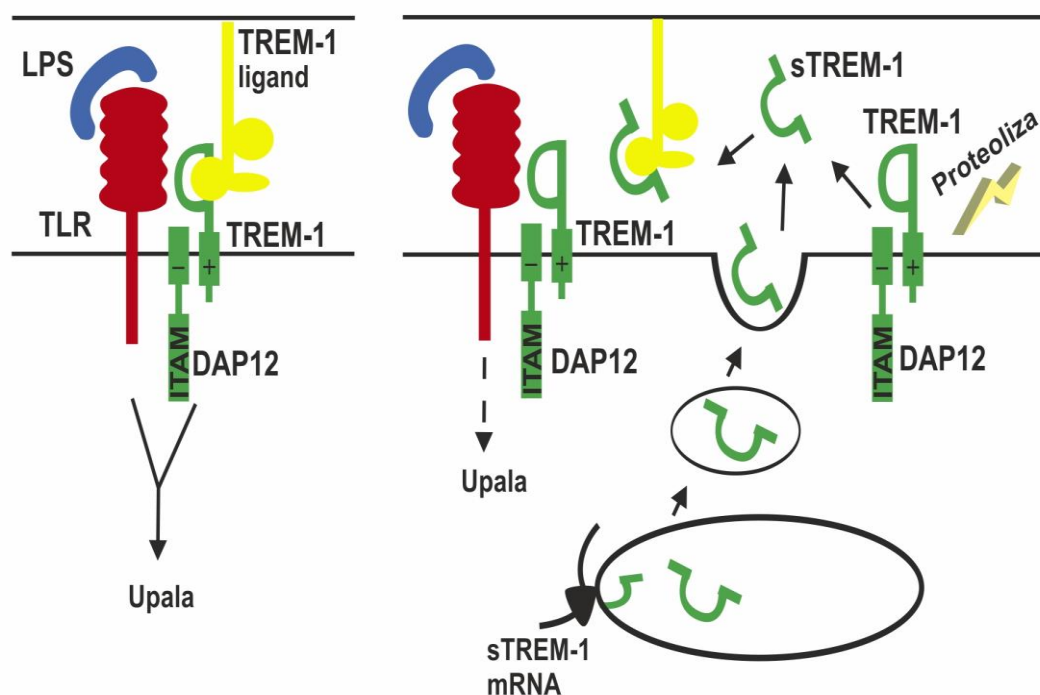
1.2.1. Topljivi okidajući receptor eksprimiran na mijeloidnim stanicama – 1

Topljivi okidajući receptor eksprimiran na mijeloidnim stanicama – 1 (engl. *Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1, sTREM-1*) topljiva je forma receptora stanica mijeloidne loze-1 (engl. *triggering receptor expressed on myeloid cells, TREM-1*) iz obitelji imunoglobulina. Pojedini članovi obitelji TREM receptora poput TREM-1 selektivno su izraženi na različitim staničnim tipovima koji nastaju diferenciranjem prethodnih stanica mijeloidne loze u koštanoj srži, uključujući neutrofilne granulocite, tkivne stanice, osteoklaste, mikroglija stanice, dendritične stanice, megakariocite i trombocite. TREM-2 receptor je izražen na makrofagima određenih tkiva, ali ne i na fagocitima periferne krvi¹³. Svi članovi skupine TREM receptora su transmembranski proteini izraženi na površini stanice, a najviše je proučavan TREM-1 receptor koji spada u skupinu receptora koji posreduju u staničnoj aktivaciji. Unatoč mnogim istraživanjima o mehanizmu djelovanja TREM-1 receptora, još uvijek nije pronađen njegov prirodni ligand poput mikroorganizma ili

endogene molekule poput proteina toplinskog šoka 70 (engl. *heat shock protein 70*, HSP 70) koja dovodi do upalnog procesa¹⁴.

Mehanizam nastanka topljivih formi TREM receptora još nije u potpunosti razjašnjen, a jedan od predloženih mehanizama je proteolitičko cijepanje membranskog receptora, što potiče sintezu proupalnih citokina preko „*Toll-like*“ receptora (TLR). Ponašanje TREM-1 i sTREM-1 u upali prikazano je na slici 1.

TREM-1 amplificira TLR signalizaciju i posreduje upalni odgovor (lijevo). sTREM-1 nastaje ili iz proteolitičkog cijepanja ili iz rasipanja TREM-1 ekspimiranog na površini ili preko translacije ili dijeljenja TREM-1. Kada se sTREM-1 oslobodi u serum može očistiti ligande za TREM-1, čime sprječava daljnje umnožavanje upalnog signala, te tako obuzdati upalu (desno na slici).



Slika 1. TREM-1 i sTREM-1 u upali.

Prilagođeno iz: Klesney-Tait J, Turnbull IR, Colonna M The TREM receptor family and signal integration. Nature Immunology 2007;7(12):1266-73

Uloga sTREM-1 molekule najviše je istražena u sepsi i jakim sistemskim infekcijama gdje dolazi do značajnog rasta koncentracija¹⁵. Neke objavljene studije ukazuju da koncentracija sTREM-1 ne raste u upalama koje nemaju infektivnu etiologiju, dok druge ukazuju na porast i u akutnoj upali ne-infektivne etiologije pa se uloga sTREM-1 svakako povezuje s akutnom upalom, ali uloga u razlučivanju između različitih vrsta upala nije u potpunosti razjašnjena^{16,17}.

1.2.2. Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) je limfokin kojeg stvaraju T limfociti, fibroblasti, makrofagi i ostale stanice koje su diferencirajući faktori za limfocite B i timocite i koje stimuliraju stvaranje imunoglobulina u limfocitima B. IL-6 također potiče stvaranje proteina akutne faze u hepatocitima te je kofaktor u započinjanju staničnog ciklusa u hematopoetskim stanicama *in vitro*. Najvažnija imunološka uloga IL-6 je potenciranje učinka ostalih citokina¹⁸. U procesu akutnog upalnog odgovora IL-6 djeluje kao medijator protuupalnog odgovora i kontrole upalnog odgovora tkiva, dok u kroničnim bolestima započinje reakcije akutne faze, ali potiče i stanični imuni odgovor na promijenjene stanice i mukozni upalni odgovor protiv reinfekcije u svrhu vraćanja organizma u homeostazu¹⁹. Određivanje koncentracije IL-6 najčešće se koristi u praćenju upalnog odgovora kod različitih tipova operacija te za praćenje bolesnika u jedinicama intenzivne skrbi²⁰. Tijekom upale IL-6 je izuzetno važan regulator koncentracije proteina u plazmi, a tijekom tog procesa njegove promjene posljedično koreliraju s promjenama mnogih drugih proteina, poput CRP-a i imunoglobulina G, čija se koncentracija više ili manje mijenja tijekom upale. Kako se polimorfizam jednog nukleotida interleukina-6 povezuje sa sastavom IgG glikoma, moguće je da ovaj proupalni citokin također može biti uključen u promjene IgG-glikoma kod sistemske upale^{21,22}.

1.2.3. C-reaktivni protein

Određivanje C-reaktivnog proteina (CRP) je najučestalija biokemijska pretraga u populaciji bolesnika s kliničkom sumnjom na infekciju. CRP je protein akutne faze čija se koncentracija u krvi nakon ozljede tkiva ili infekcije višestruko povećava zbog povećane sinteze u hepatocitima. Povećana sinteza u hepatocitima posljedica je djelovanja medijatora upale, poput protuupalnih citokina (TNF- α , IL-6, IL-1).

CRP je β -globulin iz porodice pentraksina koji su kalcij-vezujući proteini. Ima cikličku strukturu s pet istih globularnih jedinica koje su kovalentno povezane. Biološka funkcija CRP-a je vezanje egzogenih i endogenih liganada te njihovo uklanjanje iz cirkulacije i tkiva. Upravo zato CRP ima ključnu ulogu u urođenoj imunosti koja se očituje sposobnošću prepoznavanja i vezanja fosfokolina koji je sastavni dio stanične stijenke bakterija i drugih mikroorganizama. CRP djeluje i kao opsonin, čime olakšava fagocitozu vezanjem na C1 komponentu komplementa, a vezanjem na neutrofilne granulocite i monocite potiče sintezu proupalnih citokina u tim stanicama.

U akutnoj upalnoj fazi koncentracija CRP-a počinje rasti 6-12 sati nakon okidanja upale, a vršnu koncentraciju postiže nakon 24-48 sati. Intenzitet porasta CRP-a odražava težinu akutnog upalnog odgovora. Koncentracija CRP-a viša od 100 mg/L ukazuje na bakterijsku infekciju, sistemski upalni odgovor ili sepsu. Koncentracija viša od 50 mg/L smatra se optimalnom graničnom vrijednošću koja razlučuje bakterijsku od virusne infekcije. Iako je koncentracija CRP-a značajno povišena u bolesnika s bakterijskom infekcijom i sepsom, druga brojna klinička stanja s lokaliziranim i sistemskim upalnim odgovorom neinfektivne etiologije, poput nekroze tkiva i malignih bolesti, uzrokuju značajan porast koncentracije CRP-a²³.

CRP je često istraživani protein akutne faze u opsežnim kirurškim zahvatima te se pokazao kao osjetljivi biljeg upale i prediktivni biljeg razvoja komplikacija, bez obzira radi li se o upali infektivne i neinfektivne etiologije kao i bazičnom odgovoru na kirurški stres^{24,25}.

1.2.4. Prokalcitonin

Prokalcitonin (PCT), prohormon kalcitonina od 141 aminokiseline, je glavni hormon uključen u homeostazu kalcija. U fiziološkim uvjetima prokalcitonin stvaraju tiroidne C stanice te se pretvara u zrelu formu kalcitonina u cirkulaciji. Kod bolesnika s teškim infekcijama sinteza prokalcitonina se stvara u mnogim drugim tkivima poput jetre, bubrega, pluća i gušterače. Na taj se način povećava koncentracija u cirkulaciji izvan referentnog raspona²⁶. Trenutni postojeći bodovni sustavi za procjenu sepse (host systemic inflammatory response syndrome kriteriji (SIRS), the Sequential [Sepsisrelated] Organ Failure Assessment (SOFA) i brzi SOFA (qSOFA)) koji se temelje na kliničkim i laboratorijskim podacima imaju limitiranu

dijagnostičku učinkovitost jer su validirani na predviđanju prognoze i smrti. Upravo se zato procjena sepse preko sustava bodovanja ne odnosi na ranu dijagnostiku²⁷.

Neovisno o sustavima bodovanja i algoritmima, prokalcitonin se pokazao boljim biljegom za praćenje infekcije od CRP-a zbog ranijeg postizanja vršne koncentracije i veće dijagnostičke točnosti. Međutim, njihov odnos u procjeni SIRS-a uzrokovanog kirurškim stresom nije u potpunosti procijenjen²⁸.

Kao priznat dijagnostički i prognostički biljeg, prokalcitonin je ušao u kliničke algoritme za racionalno korištenje antibiotske terapije pa kombinacija kliničkih podataka i koncentracija prokalcitonina u algoritmima za korištenje antibiotika dovodi do poboljšanja dijagnostičkog i terapijskog zbrinjavanja bolesnika²⁹.

U kontekstu praćenja poslijeoperativnog oporavka operacija kolorektalnog karcinoma prokalcitonin se pokazao dobrim prediktivnim biljegom biljegom diheccencije anastomoze drugi do treći dan poslijeoperativnog oporavka³⁰.

1.3. Glikozilacija

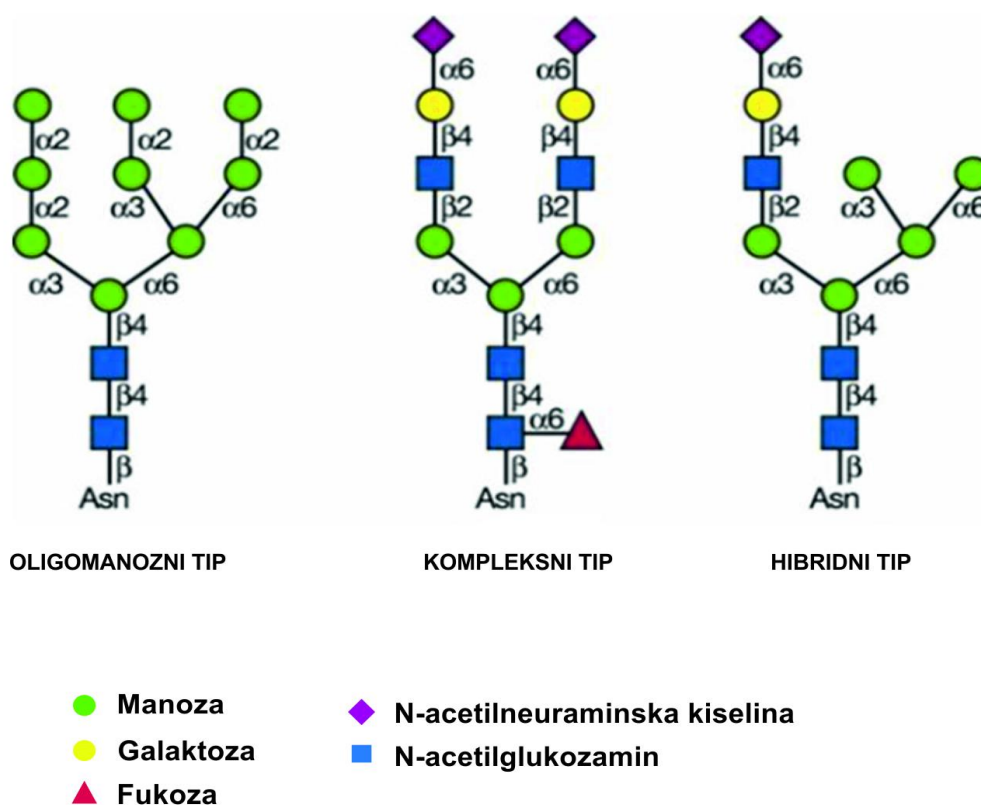
Glikozilacija je složena, visoko specifična i strogo regulirana post-translacijska modifikacija u kojoj šećeri mogu biti vezani na proteine i lipide. Uloga glikana je višestruka, ali prije svega glikani utječu na strukturu glikoproteina, njihovo pravilno smatanje i pravilnu funkciju³¹. Glikozilacija proteina odvija se u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu. Proteini se u endoplazmatskom retikulumu dorađuju vezanjem oligosaharida koji se sastoji od 14 šećernih podjedinica. U procesu nastajanja glikokonjugata sudjeluju glikozil-transferaza koja stvara glikozidnu vezu i glikozidaza koja je hidrolizira³².

Najviše proučavane vrste glikozilacije su *N*-glikozilacija, *O*-glikozilacija, *C*-glikozilacija, *P*-glikozilacija, GPI sidra i glikozaminoglikani. Dvije glavne reakcije modifikacije proteina su *O*- i *N*- glikozilacija, ovisno o aminokiselini na koju se veže šećerna struktura. *N*-vezani glikani nastaju vezanjem osnovnog oligosaharida, kojeg sačinjavaju dvije molekule *N*-acetilglukozamina, tri glukoze i devet manoze, na dušikov atom postraničnog lanca asparagina unutar slijeda Asn-X-Ser/Thr, gdje X može biti bilo koja aminokiselina osim prolina. *O*-vezani glikani nastaju vezanjem *N*-acetilgalaktozamina na kisikov atom bočnog

ogranka serina ili treonina unutar slijeda Asn-X-Ser/Thr, gdje je X bilo koja aminokiselina osim prolina. Prilikom *O*-glikozilacije dodaje se jedan po jedan monosaharid, a nastali glikokonjugat obično ima kratke oligosaharidne lance, koji često sadrže između jednog i četiri šećerna ostatka³³.

1.3.1. *N*-glikozilacija proteina

Mnogi sekretorni glikani, kao i glikani vezani za membrane, su *N*-glikani. Svi *N*-vezani glikani imaju jednaki sržni dio strukture koji se sastoji od tri manoze i dva *N*-acetilglukozamina. Ovisno o vrsti šećera i načinu grananja, *N*-vezani glikani se dijele na tri vrste, što je prikazano na Slici 2.

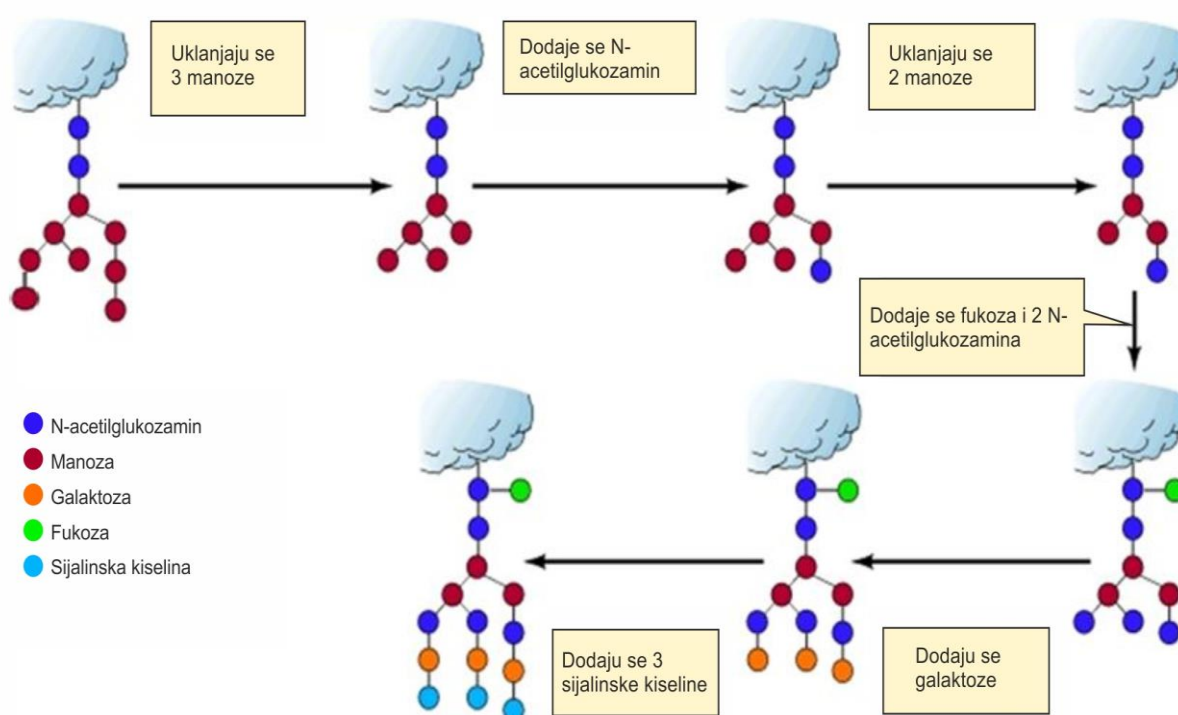


Slika 2. Tri osnovna tipa *N*-vezanih glikana. Svaki sadrži jednaku sržnu strukturu $\text{Man}_3\text{GlcNac}_2\text{-Asn}$.

Prilagođeno iz Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freez HH, Stanley P, Bertozzi CR et al. Essentials of glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory press. New York, 2nd edition. 2009.

Monosaharidi koji se javljaju kao dio *N*-glikanske strukture su fukoza, galaktoza, *N*-acetilgalaktozamin, glukoza, *N*-acetilglukozamin, glukuronska kiselina, manozna, sijalinska kiselina i ksiloza. Dok je polipeptid još u endoplazmatskom retikulumu, uklanjaju se jedna manozna i tri glukoze. Nakon toga slijedi niz reakcija koje uklanjaju ili dodaju šećere, što je prikazano na Slici 3.

Prolaskom kroz Golgijev aparat glikoproteini se doraduju ovisno o građi proteina, o količini i tipovima enzima prisutnih u Golgijevom aparatu različitih stanica pa proteini napuštaju Golgijev aparat s puno različitih *N*-vezanih oligosaharida³⁴.



Slika 3. Dorada *N*-vezanih oligosaharida u Golgijevom aparatu

Prilagođeno iz Cooper GM, Hausman RE. Stanica. Molekularni pristup. Medicinska Naklada 2004.

Ako postoji slijed aminokiselina Asn-X-Ser/Thr koji je proteinu neophodan za vezanje *N*-glikana, ne postoji garancija da će se glikan uistinu i vezati. Razlozi za to su brojni, od konformacije i pristupačnosti asparagina, o okolnim aminokiselinama i aminokiselini X. Različite molekule istog glikoproteina često na jednom aminokiselinskom Asn-X-Ser/Thr

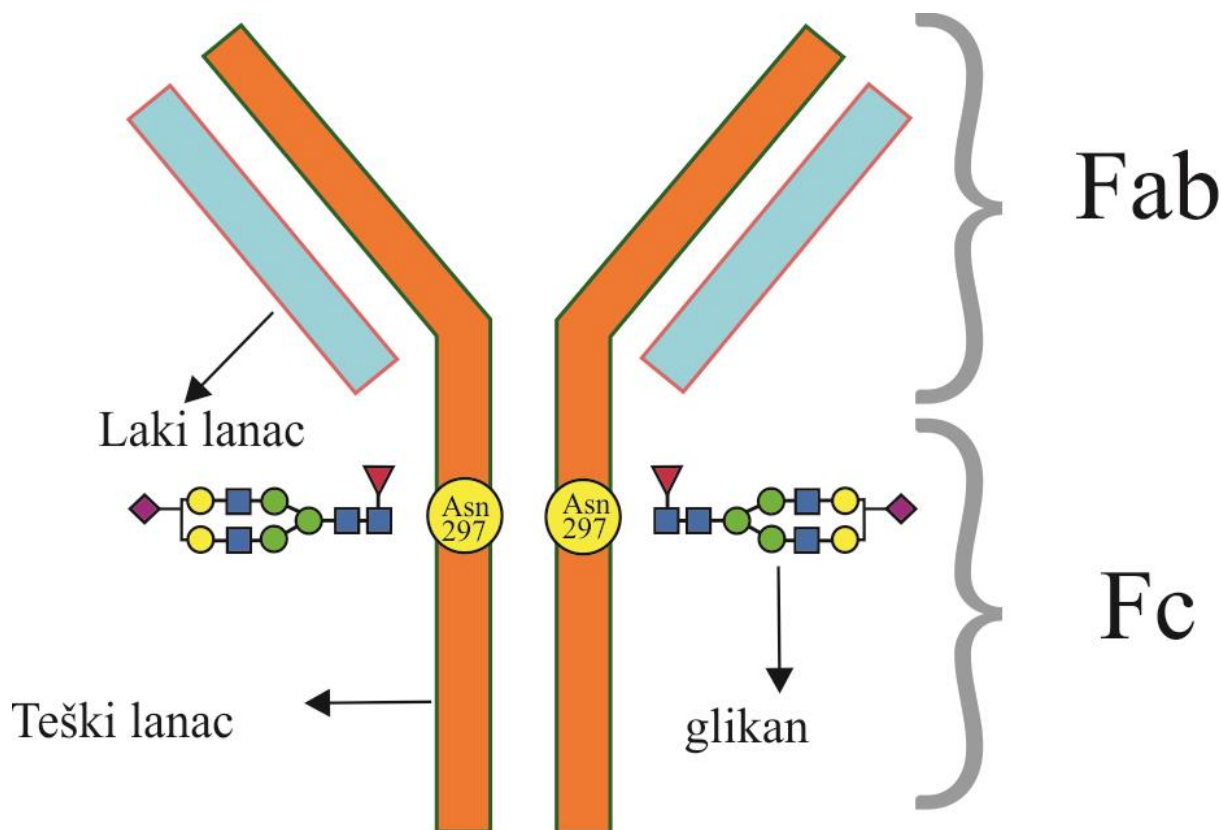
slijedu imaju vezane različite *N*-glikanske strukture. Ukoliko postoji više od jednog aminokiselinskog slijeda Asn-X-Ser, različiti glikoproteini mogu imati različite *N*-glikane na različitim veznim mjestima. Upravo se ovaj fenomen naziva mikroheterogenost ili heterogenost glikana pri čemu je bitno naglasiti da je glikoforma specifični oblik glikoproteina s obzirom na vezane šećere.

Upravo je heterogenost glikanskih jedinica važna značajka glikoproteina, a može se očitovati kao razlika u razgranatosti, gubitku šećera s određene grane glikana, vezanju ili odsustvu pojedinog monosaharida (npr. sijalinske kiseline, *N*-acetilglukozamina, fukoze) ili u promjeni veze između monosaharidnih podjedinica. U organizmu glikozilacija ima važnu ulogu u staničnom prepoznavanju, regulaciji ekspresije gena, usmjeravanju proteina unutar stanice i regulaciji imunološkog sustava³⁵. Specifična glikozilacija nije rezultat izravne upute DNA, što znači da se glikani ne sintetiziraju jednako u cijelom organizmu, nego je njihova sinteza rezultat određene količine šećernih prekursora, transportera, glikozil-transferaza i glikozidaza te međusobne kompeticije enzima koji izravno sudjeluju u sintezi glikana. Stoga je jasno da promjena u ekspresiji enzima dovodi do značajne promjene u glikozilaciji jednako kao što će narušena ravnoteža u količini šećernih prekursora, količini i aktivnosti enzima koji sudjeluju u glikozilaciji dovesti do promijenjene glikozilacije proteina. Do promjene glikanskih struktura dolazi u različitim patološkim stanjima, zbog čega glikani mogu biti potencijalni dijagnostički biljezi raznih bolesti. Kako su visoko osjetljive metode omogućile analizu glikana u velikom broju uzoraka i različitim populacijama, čime se otkrila varijabilnost glikozilacije u različitim stanjima i bolestima, ideja glikana kao dijagnostičkih biljega postala je ostvariva^{36,37,38}.

1.3.2. Imunoglobulin G i *N*-glikozilacija imunoglobulina G

Imunoglobulini su najzastupljeniji glikoproteini u krvi, a kako imaju ulogu obrane organizma preko prepoznavanja stranih antigena, istraživanja su se usmjerila na promjene njihove glikozilacije u upali i ostalim stanjima poremećaja homeostaze i razvoja bolesti. Imunoglobulin G (IgG) je glavni imunoglobulin kojeg stvaraju plazma stanice te predstavlja 70 do 75% ukupnih imunoglobulina, od kojih je 65% ekstravaskularno, a ostatak je u cirkulaciji. Postoje 4 podklase IgG-a: IgG₁, IgG₂, IgG₃ i IgG₄. Podklase se međusobno razlikuju po sastavu aminokiselina u zglobnoj regiji i imaju različito poluvrijeme života koje varira od 7 dana za IgG₃ do 22 dana za IgG₁, IgG₂ i IgG₄³⁹. IgG je građen od dva teška lanca

(50 do 70 kDa) i dva laka lanca, međusobno povezana disulfidnim vezama u obliku slova Y. Struktura IgG prikazana je na Slici 4.



Slika 4. Struktura imunoglobulina G

IgG ima dvije domene međusobno odvojene fleksibilnom regijom: fragment koji veže antigen, Fab (engl. *Fragment antigen binding*), te fragment koji kristalizira, Fc (engl. *Fragment, crystallizable*). Fab regija određuje specifičnost molekule IgG-a prema antigenu, dok se preko Fc domene veže za receptore FcR na površini stanica imunološkog sustava⁴⁰. Svaki teški lanac IgG-a na sebi ima jednu kovalentno vezanu biantenarni N-glikan na visokoočuvanom asparaginskom 297 kraju na svakoj CH2 domeni Fc regije molekule. Molekule IgG-a koje sadrže glikane bez sržne fukoze imaju povećani afinitet za receptore FcγRIIIA u odnosu na fukozilirane molekule IgG-a te su zato učinkovitije u aktiviranju stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (ADCC, engl. *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*)^{41,42}. Osim toga, istraživanja su pokazala da IgG može djelovati protuupalno ili proupalno, ovisno o tome sadrži li glikanski dio sijalinsku kiselinu koja je terminalno vezana^{43,44}.

Upravo se IgG zbog svojih glikozilacijskih svojstava pokazao potencijalnim biomarkerom upale.

1.3.3. Glikozilacija u upali

U kontekstu praćenja upale, praćenje glikozilacije proteina ima sve veću važnost, a manje je istražena u akutnoj fazi zbog vrlo dinamičnih i raznovrsnih promjena. Za samu upalnu kaskadu glikozilacija je neophodan proces, a veće razumijevanje mehanizama tog procesa moglo bi dovesti do mogućnosti kontrole upale. U upalnom procesu dolazi do promjena u glikozilaciji proteina plazme (alfa-1 kiselom glikoproteinu, imunoglobulinu G (IgG), imunoglobulinu A, transferinu, haptoglobinu, alfa-2-makroglobulinu i C-reaktivnom proteinu). Od navedenih molekula najviše su proučavani alfa-1 kiseli glikoprotein i IgG, a već je prije dosta vremena utvrđeno da u kroničnim i akutnim upalnim stanjima dolazi do glikozilacije C-reaktivnog proteina, što ne dovodi do značajne promjene pentraksinske strukture, ali mijenja molekulu u kemijskom smislu što može mijenjati i njegovu biološku funkciju⁴⁵.

Promjene glikozilacije događaju se u samom početku akutnog upalnog odgovora te ukazuju na važnost praćenja promjene glikozilacije unutar 24 sata od operativnog zahvata vezano uz predviđanje individualnog odgovora bolesnika na akutnu upalu^{46,47}. Pojednim modifikacijama glikanskih struktura može se promijeniti funkcija glikoproteina, kao što dodatak galaktoze i sijalinske kiseline na *N*-acetilglukozamin na Fc regiji IgG-a modificira protutijelo iz proupalnog u protuupalno⁴⁸. Upravo je to dvojno svojstvo koje IgG dobiva procesom glikozilacije od posebnog interesa u praćenju i tumačenju rane faze upalnog odgovora. IgG je jedan od najviše istraživanih proteina u kontekstu glikozilacije i kod njega se u slučaju akutne upale događaju fine promjene na Fc regiji promjenama galaktozilacije, fukoziacije i sijalinizacije⁴⁹. S obzirom da glikozilacija imunoglobulina kontrolira efektorsku funkciju protutijela, stvaraju se mnoge prilike i za tarepeutsku primjenu glikokonjugata⁵⁰. Na ukupnim proteinima plazme je primijećena promjena *N*-glikozilacije koja prati isti obrazac promjena. Kako operativni zahvati izazivaju opsežan upalni odgovor koji započinje kontaktom krvi sa stranim površinama i aktivacijom komplementa, a individualni odgovor na upalu često određuje ishod bolesti, nametnulo se pitanje može li se praćenjem promjena glikanskih profila definirati i predvidjeti upalni odgovor. Također se, uz spoznaju da IL-6

aktivno sudjeluje u regulaciji koncentracije proteina tijekom upale i utječe na sintezu IgG-a, nameće pitanje slijede li promjene u glikanskim profilima ukupnih proteina i IgG-a i promjene u koncentracijama IL-6 istu dinamiku i postoji li povezanost tih promjena. U fazi homeostaze humani glikom je prilično stabilan tako da individualne promjene glikanskog profila nakon operativnog zahvata svakako odražavaju razvoj sistemske upale, a te je promjene moguće pratiti kvantitativno i povezati ih s različitim fazama ranog upalnog odgovora koji se razvija do sistemskog upalnog odgovora. Kako se polimorfizam jednog nukleotida interleukina-6 povezuje sa sastavom IgG glikoma, moguće je da ovaj proupalni citokin također može biti uključen u promjene IgG-glikoma kod sistemske upale²².

1.4. Svrha i ciljevi rada

Primarni cilj istraživanja je ispitati učinak radikalne resekcije kolona na razvoj SIRS-a praćenjem promjena koncentracije sTREM -1, IL-6, prokalcitonina i CRP-a te promjena glikozilacije ukupnih proteina seruma i IgG-a u definiranim točkama mjerenja, čime bi se definirala međuovisnost procesa akutne upale i razvoja SIRS-a sa specifičnim promjenama u glikomu i koncentracijama proteina akutne faze.

Sekundarni ciljevi obuhvaćaju tri skupine testiranja:

- Ispitivanje promjena koncentracija sTREM-1 kao proteina akutne faze tijekom poslijeoperativnog perioda. Ispitivanje povezanosti duljine trajanja operacije s jačinom upalnog odgovora koji prati promjena koncentracije sTREM-1 molekule
- Ispitivanje promjena glikozilacije praćenjem promjena glikozilacije proteina seruma i IgG-a prije i 7 dana nakon operacije, kao i ispitivanje povezanosti duljine trajanja operacije s promjenama glikozilacijskog profila
- Ispitivanje međusobne povezanosti promjena koncentracija proteina akutne faze i promjena glikanskih profila proteina seruma i IgG-a na način da se ispita slijedi li jači upalni odgovor statistički značajna promjena u svojstvima glikozilacijskog profila te postoji li statistički značajna povezanost koncentracija IL-6 s promjenama glikanskih profila proteina seruma i IgG-a tijekom poslijeoperativnog perioda

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

U radu su korišteni sljedeći materijali:

2.1.1. Kemikalije

- 2-aminobenzamid (2-AB) (Sigma-Aldrich)
- 2-pikolin boran (2-PB) (Sigma-Aldrich)
- acetonitril (J.T.Baker)
- formijatna kiselina (Merck)
- natrijev dodecil-sulfat (SDS) (Sigma-Aldrich)
- igepal CA-630 (Sigma-Aldrich)
- otopina amonijaka (Merck)

2.1.2. Enzimi

- PNG-aza F (Prozyme)

2.1.3. Afinitetna pločica za pripremu uzoraka

- protein G pločica (BIA Separations)

2.1.4. Komercijalni reagensi i kompleti reagensa

- sTREM-1 (IQ Products BV, Groningen, Nizozemska)
- IL-6 (Quantikine, R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, Velika Britanija)
- PCT (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
- Latex CRP (Beckman-Coulter, Tokyo, Japan).

2.2. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 28 ispitanika (19 muškaraca i 9 žena) medijana dobi 71 godina (44-85) s dijagnozom kolorektalnog karcinoma koji su povrgnuti radikalnoj resekciji kolona otvorenog tipa. Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom i svi su ispitanici potpisali informirani pristanak. Istraživanje je odobreno od Etičkog povjerenstva Kliničke bolnice Dubrava (10. lipnja 2010.) i Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (broj odobrenja 643-02-18-01/02 od 6.12.2017.), a istraživanje je registrirano u registru ClinicalTrials.gov (broj NCT01244022).

Kriteriji uključanja u istraživanje obuhvaćali su izuzeće udaljenih metastaza i potpuna lokalna (R0) resekcija karcinoma kolona. Kriteriji isključenja bili su prisutnost udaljenih metastaza i razvoj sepse u periodu praćenja nakon operacije.

Za sve su ispitanike prikupljeni podaci o dobi, spolu, komorbiditetima i klasifikaciji malignih tumora (TNM klasifikacija). Stupanj proširenosti bolesti određen je standardnim protokolom koji je uključivao otkrivanje udaljenih metastaza kompjutoriziranom tomografijom (CT) prije operacije te pregledom abdominalnih organa tijekom operacije.

Podaci o ispitanicima, TNM klasifikacija i tip radikalne resekcije kolona navedeni su u Tablici 2.

Tablica 2. Komorbiditeti i TNM klasifikacija ispitanika

Karakteristika	Omjer
Komorbiditet	
arterijska hipertenzija	11/28
dijabetes mellitus tip 2	3/28
aritmija	3/28
fibrilacija atriya	1/28
osteoporoza	2/28
adenom prostate	3/28
bez komorbiditeta	11/28
TNM klasifikacija	
T1N0M0	6/28
T2N0M0	6/28
T3N0M0	7/28
T3N1M0	4/28
T3N2M0	5/28

Svi ispitanici su prije i poslijeoperativno dobivali 5000 IU dalteparinnatrija (anti-Xa) kao profilaksu od tromboembolije, a kao profilaksu od infektivnih komplikacija zbog radikalne resekcije kolona otvorenog tipa dobivali su standardiziranu antibiotsku terapiju koja se sastojala od intravenoznog davanja cefazolina (1 gram, 3 puta dnevno) i metronidazola (0,5

grama, 3 puta dnevno). Antimikrobna terapija je započeta na početku operacije i nastavila se 3 dana nakon operacije.

Tipovi provedenih operacija bili su prednja resekcija rektosigmoida ili rektuma (operacija prema Dixonu) (14/28), desna hemikolektomija (8/28), lijeva hemikolektomija (1/28), resekcija sigme (2/28), resekcija transverznog kolona (1/28), abdominoperinealna amputacija rektuma (operacija prema Milesu) (1/28) i kolektomija (1/28). Kod 3 ispitanika evidentirane su sljedeće komplikacije tijekom operacije:

- reanimacija tijekom operacije,
- kolotomija i
- limfadenektomija.

Kod 4 ispitanika zabilježene su sljedeće komplikacije nakon operacije:

- paralitički ileus,
- višestruka hemoragija,
- dehiscencija rane i
- veći potkožni hematomi.

Ostali ispitanici nisu imali nikakvih perioperativnih i poslijeoperativnih komplikacija.

Tijekom poslijeoperativnog perioda, kontroliran je eventualni razvoj infekcije kod dijela ispitanika (7 ispitanika) uzimanjem brisa rane i svi su brisevi bili ili sterilni (4/7) ili je nađena normalna mikrobiološka flora kože (3/7).

2.3. Uzimanje uzoraka krvi

Uzorci krvi uzorkovani su u četiri vremenske točke: 1 dan prije operacije (T0), 24 sata poslije operacije (T1), 48 sati poslije operacije (T2) i 7 dana poslije operacije (T3) kako bi se obuhvatio i akutni odgovor na kirurški stres, ali i popratilo jenjavanje upale ili produljena reakcija na kirurški stres.

Uzorci krvi su centrifugirani na 1370 x g u Rotina 35 R Hettich centrifuge (Tuttlingen, Germany) i, nakon odvajanja od taloga, serumi su pohranjeni u zamrzivač na -80°C do trenutka analize. Uzorci koji su korišteni za ovo ispitivanje su ostatni uzorci od krvi koje su uzorkovane za rutinsko praćenje bolesnika prije i poslije operacije. Bolesnicima su se rutinski odredili kompletna krvna slika te koncentracije glukoze, kalija, natrija, ureje, kreatinina, ukupnih proteina i albumina.

2.4. Određivanje proteina akutne faze

2.4.1. Određivanje koncentracije sTREM-1

Koncentracija sTREM-1 molekule određena je „sandwich“ enzim imunoanalizom u tekućoj fazi (ELISA) prema uputama proizvođača (IQ Products BV, Groningen, Nizozemska). Metoda se zasniva na reakciji monoklonskog protutijela koje prepoznaje sTREM-1 molekulu kojom je obložena mikrotitarska pločica. Nakon inkubacije s uzorkom ili kalibratorom, dodaje se sekundarno monoklonsko protutijelo koje prepoznaje TREM-1 i koje je vezano za biotin. Detekcija se odvija dodavanjem reagensa koji u sastavu ima streptavidin vezan na peroksidazu iz hrena (HRP). Detekcija sTREM-1 molekule odvija se korištenjem 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) kao supstrata za HRP enzim. HRP reagira s otopinom supstrata i stvara se obojani produkt koji se stvara proporcionalno s koncentracijom sTREM-1 prisutnog u kalibratoru ili uzorku seruma. Reakcija se zaustavlja dodatkom sumporne kiseline i mjeri se apsorbancija na 450 nm s referentnom valnom duljinom od 620 nm.

Za izradu kalibracijske krivulje korištena su razrjeđenja standarda sTREM-1 koji je sastavni dio ELISA kita. Originalni standard od 249 pg/mL korišten je za izradu sedam uzastopnih razrjeđenja pa je kalibracijska krivulja sadržavala 7 kalibracijskih točaka (249 pg/mL, 124,5 pg/mL, 62,3 pg/mL, 31,1 pg/mL, 15,6 pg/mL, 7,8 pg/mL i 0 pg/mL). Svako razrjeđenje testirano je u duplikatu i kalibracijska krivulja izrađena je nanošenjem srednjih vrijednosti apsorbancija za svaku koncentraciju kalibratora na ordinatu i koncentracija kalibratora na apscisu grafa. Prema podacima proizvođača, limit detekcije definiran je kao koncentracija analita koja rezultira apsorbancijom koja je značajno viša od srednje vrijednosti razrjeđenja (srednja vrijednost + 2 standarde devijacije) i iznosi 7 pg/mL. Izračunata laboratorijska međupreciznost najviše je iznosila 7%, a ukupna preciznost za test 8%.

2.4.2. Određivanje koncentracije IL-6

IL-6 određen je ELISA metodom (Quantikine, R&D Systems Europe, Ltd., Abingdon, Velika Britanija) prema uputama proizvođača. Metoda se zasniva na reakciji monoklonskog protutijela specifičnog za IL-6 kojim je obložena mikrotitarska pločica. Nakon inkubacije s uzorcima ili kalibratorima koji u sebi sadrže određenu koncentraciju IL-6 te ispiranja, dodaje se konjugat u vidu poliklonskog protutijela na IL-6 obilježenog HRP-om. Nakon ispiranja nevezanog konjugata, dodaje se TMB supstrat te se razvija boja proporcionalno s količinom IL-6 vezanog u prvom koraku. Reakcija se zaustavlja dodatkom sumporne kiseline i mjeri se apsorbancija na 450 nm s referentnom valnom duljinom od 570 nm. Za izradu kalibracijske krivulje korištena su razrjeđenja standarda IL-6 koji je sastavni dio ELISA kita. Originalni standard od 300 pg/mL korišten je za izradu sedam uzastopnih razrjeđenja pa je kalibracijska krivulja sadržavala 7 kalibracijskih točaka (300 pg/mL, 100 pg/mL, 50 pg/mL, 25 pg/mL, 12,5 pg/mL, 6,25 pg/mL i 3,12 pg/mL). Svako razrjeđenje testirano je u duplikatu i kalibracijska krivulja izrađena je nanošenjem srednjih vrijednosti apsorbancija za svaku koncentraciju kalibratora na ordinatu i koncentracija kalibratora na apscisu grafa. Prema podacima proizvođača, limit detekcije definiran je kao koncentracija analita koja rezultira apsorbancijom koja je značajno viša od srednje vrijednosti razrjeđenja (srednja vrijednost + 2 standarde devijacije) i iznosi 0,70 pg/mL. Izračunata laboratorijska međupreciznost iznosila je najviše 3,1%, a ukupna preciznost za test 3,7%.

2.4.3. Određivanje koncentracije prokalcitonina

Prokalcitonin je određen ECLIA (eng. electrochemiluminescence immunoassay) metodom na Cobas e411 analizatoru (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Metoda se zasniva na specifičnom vezanju antigena u uzorku, monoklonskog anti-PCT specifičnog protutijela vezanog za biotin i monoklonskog PCT-specifičnog protutijela obilježenog rutenijevim kompleksom u sendvič kompleks. Kompleks se veže na streptavidinom obložene mikročestice koje se magnetski hvataju na površinu elektrode. Voltaža u elektrodama inducira kemiluminiscenciju koja se mjeri fotomultiplikatorom. Analizator izravno izračunava koncentracije analiza u ng/mL Metoda je kalibrirana lot specifičnim kalibratorima te su korišteni kontrolni uzorci istog proizvođača. Limit detekcije testa iznosio je $\leq 0,02$ ng/mL.

Izračunata laboratorijska međupreciznost iznosila je za niže koncentracije (0,060 ng/mL) 8,8 %, a za više koncentracije (0,622 ng/mL) 2,1%. Ukupna preciznost za test iznosila je 8,7%.

2.4.4. Određivanje koncentracije CRP-a

Koncentracije CRP-a određivane su imunoturbidimetrijskom metodom na analizatoru AU 2700plus (Beckman-Coulter, Tokyo, Japan). Metoda se zasniva na specifičnoj reakciji CRP-a s protutijelima na humani CRP na lateks česticama tvoreći netopive agregate. Jačina apsorpcije stvorenih agregata proporcionalna je koncentraciji CRP-a u uzorku. Vrijednosti kalibratora sljedeće su prema IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) standardu CRM470. Limit detekcije testa iznosio je 0,14 mg/L. Izračunata laboratorijska međupreciznost iznosila je za niže koncentracije (6,59 mg/L) 3,2 %, a za više koncentracije (62,84 mg/L) 1,2%. Ukupna preciznost za test iznosila je 3,7%.

2.5. Određivanje *N*-glikanskih profila imunoglobulina G i ukupnih proteina seruma

N-glikanski profili IgG-a i ukupni proteina seruma određeni su tekućinskom kromatografijom izuzetno visoke djelotvornosti koja se zasniva na hidrofilnim interakcijama (HILIC-UPLC analiza – od eng. *Hydrophilic interaction chromatography - ultra performance liquid chromatography*) s prethodnom izolacijom imunoglobulina G i ukupnih proteina.

Prije početka analize izoliran je imunoglobulin G iz seruma te su pripremljeni glikani imunoglobulina G i ukupnih proteina seruma.

2.5.1. Priprema uzoraka glikana imunoglobulina G iz seruma

Uzorak seruma nanesen je na prethodno ispranu protein G pločicu (BIA Separations, Slovenija). Nakon ispiranja vezani se IgG eluira s mravljom kiselinom te se neutralizira amonijevim bikarbonatom. Osušeni izolirani IgG resuspendiran je u otopini detergenta natrijevog dodecil sulfata (SDS-a) te se 10 minuta inkubirao na 65°C. Višak SDS-a je neutraliziran igepalom te su *N*-glikani oslobođeni od proteina dodatkom PNG-aze F. Uzorci su potom inkubirani preko noći kako bi se deglikozilirali. Oslobođeni glikani su nakon inkubacije sakupljeni, derivatizirani 2-aminobenzamidom (2-AB) kao fluorescentnom bojom

u reakciji aminacije uz pomoć reducensa 2-pikolin borana na 65°C kako bi se mogli detektirati fluorescentnim detektorom.

Pročišćavanje imunoglobulina G od viška boje, neobilježenih glikana, proteina i suviška reagensa napravljeno je ekstrakcijom na suhoj fazi (HILIC-SPE, eng. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography – Solid Phase Extraction*) pomoću mikrokristalične celuloze ispiranjem acetonitrilom. Pročišćeni glikani eluirali su se s celuloze vodom te analizirani tekućinskom kromatografijom vrlo visoke djelotvornosti (UPLC-om).

2.5.2. Priprema uzoraka glikana ukupnih proteina seruma

N-glikani ukupnih proteina seruma pripremljeni su isto kao i *N*-glikani IgG-a, ali je, umjesto osušenim eluatom IgG-a, priprema započela s 10 μ L seruma.

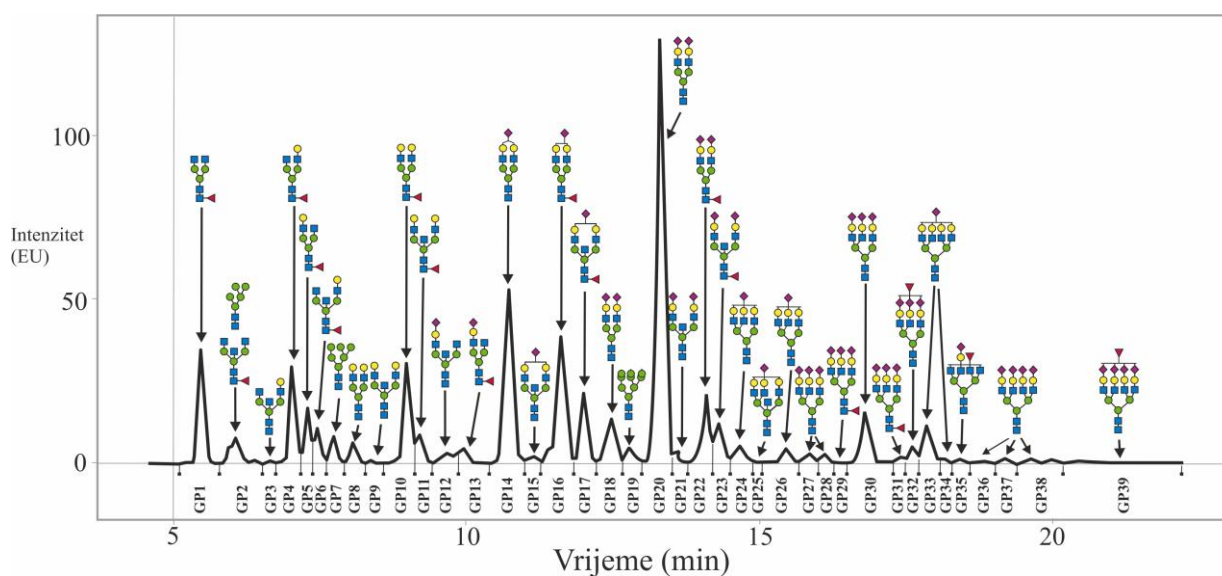
2.5.3. HILIC-UPLC metoda

Fluorescentno obilježeni i pročišćeni *N*-glikani razdvojeni su kromatografijom hidrofилnih interakcija na Waters Acquity UPLC instrumentu (Milford, SAD) s fluorescentnim detektorom, a uređaj je kontroliran programom Empower 2, 2145 verzija (Waters, Milford, USA). Za kromatografiju glikana koristila se Waters BEH kolona, dimenzija 100x2,1 mm, punjena česticama veličine 1,7 μ m. Mobilnu fazu činio je 100 mM/L amonijev formijat podešen na pH 4,4 kao otapalo A te s acetonitrilom kao otapalom B. Za analizu glikana IgG-a koristio se linearni gradijent acetonitrila od 75-62% s brzinom protoka 0,4 ml/min, tijekom 25 min, s temperaturom kolone od 600 °C. Za analizu glikana ukupnih proteina seruma koristio se linearni gradijent acetonitrila od 70-53% s brzinom protoka 0,561 ml/min, tijekom 24,81min, s temperaturom kolone od 250 °C. Sustav je bio kalibriran hidroliziranim i 2-AB obilježenim oligomerima glukoze, prema kojima su se vremena zadržavanja pojedinih glikana mogla prevesti u glukozne jedinice (*GU jedinice, engl. glucose units*). Kromatogrami su obrađeni automatskom metodom integriranja, nakon čega je svaki kromatogram ručno ispravljen kako bi svi uzorci bili integrirani na jednak način.

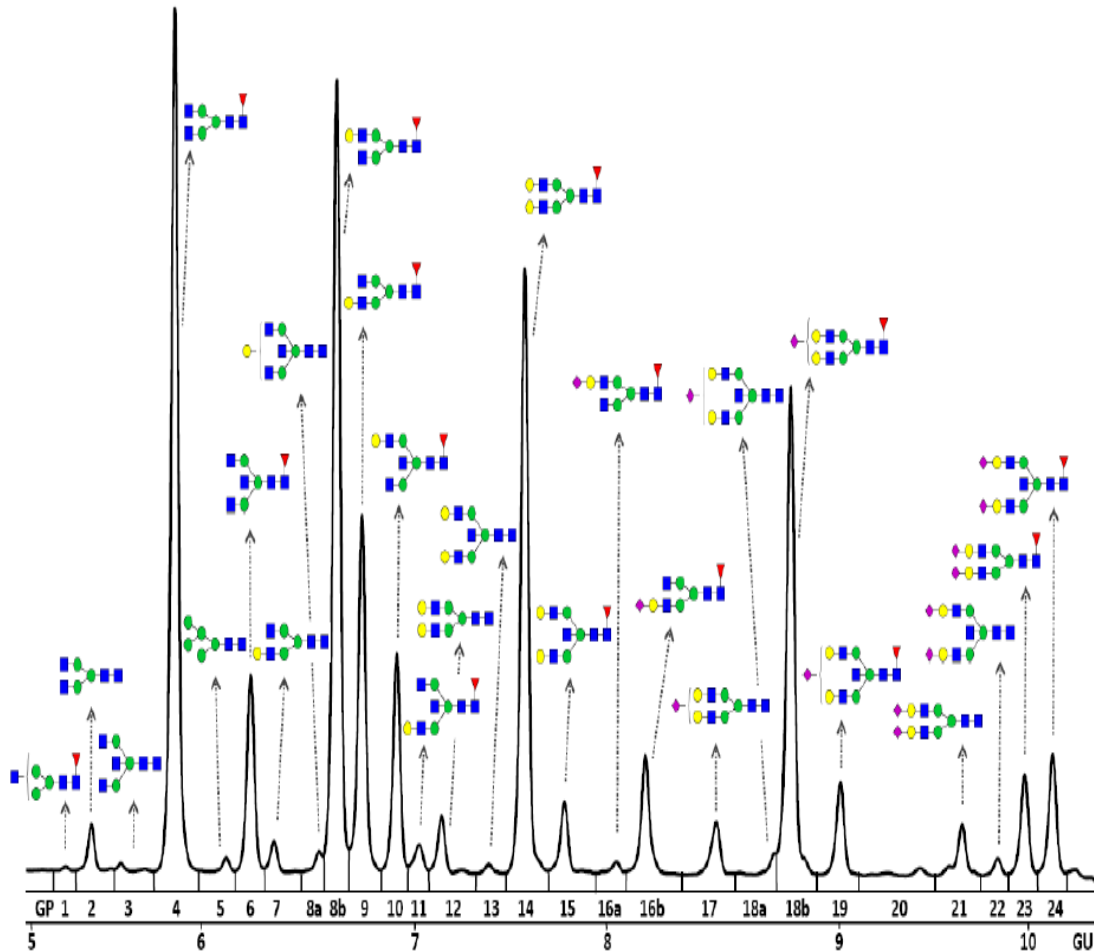
U konačnici je *N*-glikom ukupnih proteina seruma razdvojen u 42 kromatografska pika, a *N*-glikom IgG-a u 24 kromatografska pika te je udio površine svakog pika izražen kao postotak ukupne površine svih pikova koji odgovaraju glikanskim strukturama. Strukture glikana koje

odgovaraju svakom od kromatografskih pikova određene su i objavljene u ranijim publikacijama na temelju rezultata dobivenim razgradnjom glikana egzoglikozidazama i analizom glikana spektrometrijom masa^{51,52}.

Dobiveni kromatogrami za profile *N*-glikana ukupnih proteina seruma i *N*-glikana IgG-a prikazani su na Slikama 5 i 6, a sastav glikoma ukupnih proteina seruma i IgG-a prema literaturnim podacima prikazan je u tablicama 3 i 4.



Slika 5. Kromatografski profil *N*-glikana proteina seruma razdvojenih u 39 kromatografskih pikova (GP1-GP39) metodom HILIC-UPLC. Prikazane su glavne strukture koje odgovaraju svakom piku prema Tablici x. GlcNAc – plavi kvadrat, manozu – zeleni krug, galaktoza – žuti krug, sialinska kiseina, ružičasti romb, sržna fukoza – crveni trokut.



Slika 6. Kromatografski profil *N*-glikana IgG-a razdvojenih u 24 kromatografska pika (GP1-GP24) metodom HILIC-UPLC. Prikazane su glavne strukture koje odgovaraju svakom piku prema Tablici 3. GlcNAc – plavi kvadrat, manozna – zeleni krug, galaktoza – žuti krug, sijalinska kiselina - ružičasti romb, sržna fukoza – crveni trokut.

Tablica 3. Sastav glikoma ukupnih proteina seruma. *N*-glikani proteina seruma razdvojeni su u 42 kromatografska pika HILIC-UPLC metodom. Prikazano je 39 glikana dostupnih iz literaturnih podataka. F-sržna fukoza vezana α 1-6-vezom na unutarnji GlcNAc, Mx-broj (x) manozna vezana na GlcNAc-ove sržne strukture, Ax-broj (x) antena (GlcNAc-ova) vezanih na manozna sržne strukture, B-račvajući GlcNAc vezan β 1-4-vezom na β 1-3 vezanu manoznu, Gx – broj (x) β 1-4 vezanih galaktoza na antenama, [3]G1 i [6]G1 – označava galaktozu vezanu na antenu β 1-3 ili β 1-6-vezane manoze, Sx – broj (x) sijalinskih kiselina vezanih na galaktoze.

2. MATERIJALI I METODE

Kromatografski pik	Glikanska struktura*	Opis glikana
GP1	FA2	agalaktozilirani
GP2	M5,FA2B	visokomanozni (M5), agalaktoziliran s račvajućim GlcNAc-om
GP3	A2[6]BG1	monogalaktozilirani s račvajućim GlcNAc-om
GP4	FA2[6]G1	monogalaktozilirani sa sržnom fukozom
GP5	FA2[3]G1	monogalaktozilirani sa sržnom fukozom
GP6	FA2[6]BG1	monogalaktozilirani sa sržnom fukozom i račvajućim GlcNAc-om
GP7	M6	visokomanozni
GP8	A2G2	digalaktozilirani
GP9	A2BG2	digalaktozilirani s račvajućim GlcNAc-om
GP10	FA2G2	digalaktozilirani sa sržnom fukozom
GP11	FA2BG2	digalaktozilirani sa sržnom fukozom i račvajućim GlcNAc-om
GP12	A2[3]BG1S1	monogalaktozilirani s račvajućim GlcNAc-om
GP13	FA2[3]G1S1	monogalaktozilirani i sijalinizirani sa sržnom fukozom
GP14	A2G2S1	digalaktozilirani i sijalinizirani
GP15	A2BG2S1	digalaktozilirani i sijalinizirani s račvajućim GlcNAc-om

2. MATERIJALI I METODE

GP16	FA2G2S	digalaktozilirani i sijalinizirani sa sržnom fukozom
GP17	FA2BG2S1	digalaktozilirani i sijalinizirani s račvućim GlcNAc-om i sržnom fukozom
GP18	A2G2S2	digalaktozilirani i sijalinizirani
GP19	M9	visokomanozni
GP20	A2GSS2	digalaktozilirani i sijalinizirani
GP21	A2BG2S2	digalaktozilirani i sijalinizirani s račvućim GlcNAc-om
GP22	FA2G2S2	digalaktozilirani i sijalinizirani sa sržnom fukozom
GP23	FA2BG2S2	digalaktozilirani i sijalinizirani s račvućim GlcNAc-om i sržnom fukozom
GP24	A3G3S2	trigalaktozilirani i sijalinizirani
GP25	A3BG3S2	trigalaktozilirani i sijalinizirani s račvućim GlcNAc-om
GP26	A3G3S3	trigalaktozilirani i sijalinizirani
GP27	A3G3S3	trigalaktozilirani i sijalinizirani
GP28	A3G3S3	trigalaktozilirani i sijalinizirani
GP29	FA3G3S3	trigalaktozilirani i sijalinizirani sa sržnom fukozom
GP30	A3G3S3	trigalaktozilirani i sijalinizirani
GP31	FA3G3S3	trigalaktozilirani i sijalinizirani sa sržnom fukozom
GP32	A3F1G3S3	trigalaktozilirani i sijalinizirani s antenarnom fukozom

2. MATERIJALI I METODE

GP33	A4G4S3	tetragalaktozilirani i sijalinizirani
GP34	A4G4S3	tetragalaktozilirani i sijalinizirani
GP35	A4F1G3S3	tetragalaktozilirani i sijalinizirani s antenarnom fukozom
GP36	A4G4S4	tetragalaktozilirani i sijalinizirani
GP37	A4G4S4	tetragalaktozilirani i sijalinizirani
GP38	A4G4S4	tetragalaktozilirani i sijalinizirani
GP39	A4F1G4S4	tetragalaktozilirani i sijalinizirani s antenarnom fukozom

* Prilagođeno od Saldova R, Asadi Shehni A, Haakensen VD, Steinfeld I, Hilliard M, Kifer I et al. Association of N-glycosylation with breast carcinoma and systemic features using high-resolution quantitative UPLC. *J Proteome Res.* 2014;13(5):2314-27.

Tablica 4. Sastav glikoma IgG-a. *N*-glikani IgG-a razdvojeni su u 24 kromatografska pika HILIC-UPLC metodom. F-sržna fukoza vezana α 1-6-vezom na unutarnji GlcNAc, Mx-broj (x) manozna vezana na GlcNAc-ove sržne strukture, Ax-broj (x) antena (GlcNAc-ova) vezanih na manozne sržne strukture, B-račvajući GlcNAc vezan β 1-4-vezom na β 1-3 vezanu manozu, Gx – broj (x) β 1-4 vezanih galaktoza na antenama, [3]G1 i [6]G1 – označava galaktozu vezanu na antenu β 1-3 ili β 1-6-vezane manoze, Sx – broj (x) sijalinskih kiselina vezanih na galaktoze.

Kromatografski pik	Glikanska struktura*	Opis glikana
GP1	FA1	agalaktozilirani
GP2	A2	agalaktozilirani
GP3	A2B	agalaktozilirani s računjućim GlcNAc-om
GP4	FA2	agalaktozilirani
GP5	M5, FA2	visokomanozni, agalaktozilirani
GP6	FA2B, A2[6]G1	agalaktozilirani sa sržnom fukozom i računjućim GlcNAc-om, monogalaktozilirani
GP7	A2[6]G1, FA2B	Monogalaktozilirani, agalaktozilirani sa sržnom fukozom i računjućim GlcNAc-om
GP8A	A2BG1, FA2[6]G1	monogalaktozilirani s računjućim GlcNAc-om i monogalaktozilirani sa sržnom fukozom
GP8B	FA2[6]G1	monogalaktozilirani sa sržnom fukozom
GP9	FA2[3]G1	monogalaktozilirani sa sržnom fukozom
GP10	FA2[6]BG1	monogalaktozilirani sa sržnom fukozom i računjućim GlcNAc-om

2. MATERIJALI I METODE

GP11	FA2[3]BG1	monogalaktozilirani sa sržnom fukozom i račvajućim GlcNAc-om
GP12	A2G2, FA2[3]BG1	digalaktozilirani, monogalaktozilirani sa sržnom fukozom i račvajućim GlcNAc-om
GP13	A2BG2, FA2G2	digalaktozilirani s i račvajućim GlcNAc-om, digalaktozilirani sa sržnom fukozom
GP14	FA2G2	digalaktozilirani sa sržnom fukozom
GP15	FA2BG2,FA1G1S1,A2G1S1,FA2G2	digalaktozilirani i sijalinizirani s račvajućim GlcNAc-om i sržnom fukozom, monogalaktozilirani i sijalinizirani sa sržnom fukozom, monogalaktozilirani i sijalinizirani, digalaktozilirani sa sržnom fukozom
GP16A	FA2[6]G1S1,M4A1G1S1,A2BG1S1	monogalaktozilirani i sijalinizirani sa sržnom fukozom, monogalaktozilirani i sijalinizirani, monogalaktozilirani i sijalinizirani s račvajućim GlcNAc-om
GP16B	FA2[3]G1S1,FA2[6]BG1S1	monogalaktozilirani i sijalinizirani sa sržnom fukozom, monogalaktozilirani i sijalinizirani sa sržnom fukozom i račvajućim GlcNAc-om
GP17	A2G2S1,FA2[3]BG1S1	digalaktoziliranin i sijalinizirani, monogalaktozilirani i sijalinizirani sa sržnom fukozom, monogalaktozilirani i sijalinizirani sa sržnom fukozom i račvajućim GlcNAc-om
GP18A	A2BG2S1,FA2G2S1	digalaktozilirani i sijalinizirani s račvajućim GlcNAc-om, digalaktozilirani i sijalinizirani sa sržnom fukozom

GP18B	FA2G2S1	digalaktozilirani i sijalinizirani sa sržnom fukozom
GP19	FA2BG2S1	digalaktozilirani i sijalinizirani s račvućim GlcNAc-om i sržnom fukozom
GP20	Nije određeno	Nije određeno
GP21	A2G2S2	digalaktozilirani i sijalinizirani
GP22	A2BG2S2	digalaktozilirani i sijalinizirani s račvućim GlcNAc-om
GP23	FA2G2S2	digalaktozilirani i sijalinizirani sa sržnom fukozom
GP24	FA2BG2S2	digalaktozilirani i sijalinizirani s račvućim GlcNAc-om i sržnom fukozom

* Prilagođeno od Pucić M, Knezević A, Vidic J, Adamczyk B, Novokmet M, Polasek O et al. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10(10):M111.010090.

2.6. Statistička analiza rezultata

Podaci su prikazani tablično i grafički. Svi kvantitativni podaci ispitani su za normalnost razdiobe pomoću histograma te Kolmogorov-Smirnovljevog testa. Podaci koji su slijedili normalnu razdiobu prikazani su aritmetičkom sredinom (\bar{X}) i standardnom devijacijom (SD), a oni koji nisu slijedili normalnu razdiobu, prikazani su medijanom i interkvartilnim rasponom. Za testiranje statistički značajne razlike testiranih proteina akutne faze u četiri vremenske točke korišten je neparametrijski test za zavisna mjerenja (Friedmanov test) dok su razlike u N-glikanskom profilu ukupnih proteina seruma i IgG-a u četiri vremenske točke analizirane analizom varijance za ponavljana mjerenja (RM-ANOVA). Dobivena razina značajnosti obzirom na broj mjerenja dodatno je korigirana metodom prema Bonferroniju. Za utvrđivanje povezanosti koncentracija proteina akutne faze o duljini trajanja operacije koristila se korelacijska analiza (Spearmanov koeficijent korelacije), a za testiranje

povezanosti promjena glikanskih profila s promjenama IL-6 koristila se linearna regresija. Statistički značajna povezanost (uz $P < 0,05$) tumačena je sukladno Coltonovu kriteriju (za r od 0 do 0,25 ili od 0 do -0,25 kao nepostojanje povezanosti; za r 0,26 do 0,50 ili -0,26 do -0,50 kao slaba povezanost; za r 0,51 do 0,75 ili -0,51 do -0,75 kao umjerena do dobra povezanost; za r od 0,76 do 1 ili -0,76 do -1 kao vrlo dobra do izvrsna povezanost). Struktura promjena glikanskog profila utvrdila se primjenom analize glavnih komponenti (PCA) s Varimax rotacijom. Razina značajnosti postavljena je na razinu od 5%.

Statistička analiza izrađena je s MedCalc Statistical Software verzija 18.11.6 (MedCalc Statistical Software version 18.11.6 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2019)) i IBM SPSS Statistics for Windows, verzija 25.0 (IBM Corp <https://www.ibm.com/analytics/spss-statistics-software>) statističkim programima.

3. REZULTATI

U sklopu rutinske prijeoperativne i poslijeoperative obrade ispitanika pratili su se opći biokemijski i hematološki parametri, tjelesna temperatura i frekvencija rada srca. U svrhu ovog ispitivanja prikazani su samo podaci važni za praćenje razvoja SIRS-a kao i praćenja poslijeoperativnog oporavka od gubitka proteina. Promjene ispitivanih parametara u rutinskoj obradi u četiri uzastopne točke mjerenja (1 dan prije operacije (T0), 24 sata poslije operacije (T1), 48 sati poslije operacije (T2) i 7 dana poslije operacije (T3)) testirani su Friedmanovim testom. Rezultati su prikazani u Tablici 5.

Tablica 5. Promjene tjelesne temperature, pCO₂, frekvencije srca, leukocita, ukupnih proteina i albumina u četiri uzastopne točke mjerenja.

MJERENJE	Tjelesna temperatura (°C)	pCO₂ (kPa)	Frekvencija srca (bpm)	Leukociti (x10⁹/L)	Ukupni proteini (g/L)	Albumini (g/L)
T0 (24h prije)	36,4 (36,25-36,65)	5,1 (4,90-5,35)	75 (72-80)	7,5 (6,05-8,8)	73 (68-76,5)	43 (41-44)
T1 (24h nakon)	36,6 (36,4-36,8)	5,1 (4,85-5,35)	69 (64-71)	11,9 (10,3-11,9)	56 (53-58)	31 (29-35)
T2 (48h nakon)	37,0 (36,7-37,15)	5,15 (4,85-5,80)	72 (69-75)	11,0 (10,1-11,0)	56 (54,5-61)	33 (30-34)
T3 (7 dana nakon)	36,65 (36,5-36,85)	5,1 (4,90-5,45)	79 (73-81)	7,3 (6,1-9,1)	63 (59-65)	35 (32-38)
Statistički značajna razlika (P vrijednost)	<0,00001 *	P=0,6634	<0,00001 *	<0,00001 *	<0,00001 *	0,0002*

Podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajna razlika označena je sa *

U svim točkama mjerenja osim kod parcijalnog tlaka ugljičnog dioksida ($p\text{CO}_2$) utvrđena je statistički značajna razlika. Post hoc analizom definirane su razlike za sve točke mjerenja zasebno. U slučaju tjelesne temperature utvrđena statistički značajna razlika između mjerenja prije operacije s vremenima 48 sati i 7 dana nakon operacije, te između vremenske točke 24 sata nakon operacije s onom nakon 48 sati. Frekvencija rada srca bila je statistički značajno različita između mjerenja prije operacije s vremenima 24 sata, 48 sati i 7 dana nakon operacije, te između vremenske točke 24 sata nakon operacije s onom 48 sati nakon operacije. Broj leukocita nije bio statistički značajno različit prije i 7 dana nakon operacije, kao ni u točkama između 24 i 48 sati nakon operacije ali je utvrđena statistički značajna razlika između točke prije i 7 dana nakon operacije sa točkama 24 i 48 sati nakon operacije što ukazuje na vraćanje leukocita na vrijednosti prije operacije. Kod koncentracija proteina i albumina utvrđena je statistički značajno viša koncentracija prije operacije sa svim poslijeoperativnim mjerenjima, ali ne i između 24 sata i 48 sati nakon operacije i pokazuje postepeni ponovni rast koncentracija nakon gubitka zbog operacije.

3.1 Utjecaj operacije na proteine akutne faze

Promjene koncentracija proteina akutne faze u četiri uzastopne točke mjerenja (1 dan prije operacije (T0), 24 sata poslije operacije (T1), 48 sati poslije operacije (T2) i 7 dana poslije operacije (T3) testirane su Friedmanovim testom. Rezultati su prikazani u Tablici 6.

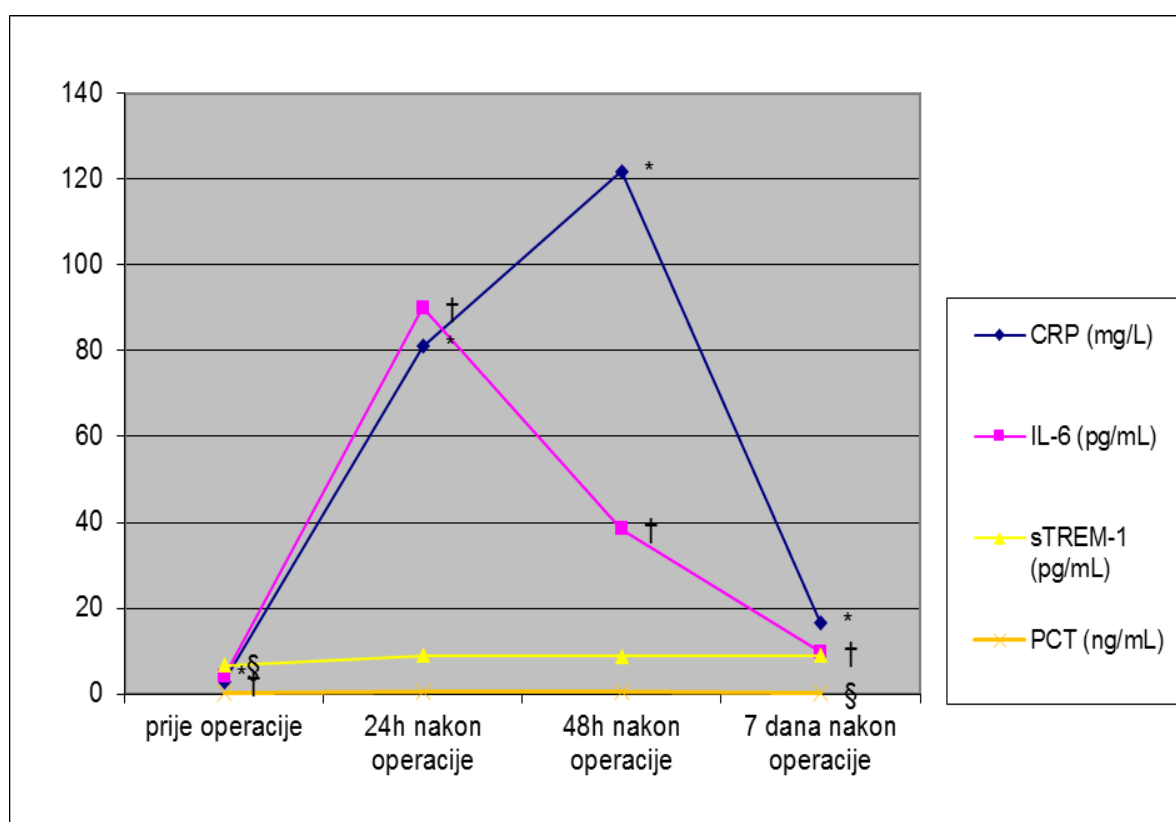
Tablica 6. Promjene CRP-a, IL-6, PCT i sTREM-1 u četiri uzastopne točke mjerenja.

MJERENJE	CRP(mg/ml)	IL-6(pg/ml)	PCT(ng/ml)	sTREM-1(pg/ml)
T0 (24h prije)	2,85 (1,9-5,45)	4,05 (2,60-9,10)	0,035 (0,020-0,071)	6,68 (2,43-10,35)
T1 (24h nakon)	81,1 (69,52-95,54)	90,05 (55,45-209,10)	0,520 (0,285-1,395)	9,04 (5,94-12,47)
T2 (48h nakon)	121,85 (106,07-150,96)	38,45 (15,75-70,20)	0,488 (0,218-1,048)	8,86 (6,86-12,47)
T3 (7 dana nakon)	16.60 (9,74-33,49)	9.70 (5,50-25,90)	0.076 (0,045-0,263)	8.90 (4,44-13,56)
Statistički značajna razlika (P vrijednost)	<0,00001 *	<0,00001 *	<0,00001 *	0,0016*

Podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. Statistički značajna razlika označena je sa *

Friedmanovim testom dokazana je statistički značajna razlika u koncentracijama svih testiranih proteina akutne faze kroz četiri točke mjerenja. U slučaju koncentracija CRP-a i IL-6 utvrđena je statistički značajna razlika između sva četiri vremena mjerenja dok je kod koncentracija PCT utvrđena statistički značajno viša koncentracija između mjerenja prije operacije i 7 dana nakon operacije, ali ne i između 24 sata i 48 sati nakon operacije mjerenja. U slučaju koncentracija sTREM-1 molekule, koncentracije svih mjerenja nakon operacije bile su statistički značajno više od točke mjerenja prije operacije, ali između ostalih vremenskih točaka nije utvrđena statistički značajna razlika.

Dinamika tijeka promjena u četiri uzastopne točke mjerenja prikazana je na Slici 7.



Slika 7. Dinamika tijeka promjene koncentracija CRP-a, IL-6, PCT i sTREM-1 u četiri testirana vremena mjerenja.

Statistički značajne razlike između pojedinih točaka mjerenja ($P < 0.05$) za CRP, IL-6, PCT i sTREM-1 - označene su redom sa simbolima: *, †, †, §

Kako bi se ispitao učinak trajanja operacije, u smislu većeg kirurškog stresa, učinjena je korelacija promjena koncentracija sTREM-1 molekule, CPR-a, IL-6 i prokalcitonina s duljinom trajanja operacije. Za sTREM-1, CRP i PCT nisu utvrđene statistički značajne razlike s duljinom trajanja operacije. Utvrđene su statistički značajne slabe korelacije IL-6 24 sata nakon operacije ($r=0,409$ ($P=0,031$)) i 48 sati nakon operacije ($r=0,394$ ($P=0,038$)).

3.2 Analiza glikana

Utjecaj operacije na promjene *N*-glikanskih profila ispitan je u T0, T1, T2 i T3 točkama mjerenja analizom varijance za ponovljena mjerenja. Utjecaj operacije na *N*-glikanske profile ukupnih proteina seruma i *N*-glikanske profile IgG-a prikazan je u tablicama 7 i 8. U svrhu jasnijeg prikaza i razlikovanja *N*-glikanskih profila ukupnih proteina seruma i *N*-glikanskih profila IgG-a, ispred struktura *N*-glikana IgG-a glikana nadodan je IgG (npr. IgG-GP1).

Tablica 7. Prikaz promjena *N*-glikana proteina seruma i njihova relativna promjena u 4 ispitivane točke mjerenja

Glikan	Srednja vrijednost	St. pogreška	95% interval pouzdanosti		omjer (4. / 1. vrijednost)	relativna promjena	P	P prilagođeni (Bonferroni)
			donja granica	gornja granica				
GP1	5,00	0,33	4,33	5,67	0,89	-11,17%	<0,0001	<0,0001
GP2	2,13	0,09	1,94	2,32	0,82	-18,29%	<0,0001	<0,0001
GP3	0,09	0,00	0,08	0,10	0,92	-7,87%	<0,0001	<0,0001
GP4	3,44	0,16	3,10	3,77	0,85	-14,60%	<0,0001	<0,0001
GP5	1,78	0,10	1,58	1,99	0,87	-13,22%	<0,0001	<0,0001
GP6	1,27	0,04	1,18	1,36	0,82	-17,64%	<0,0001	<0,0001
GP7	0,99	0,03	0,92	1,06	0,83	-16,99%	<0,0001	<0,0001
GP8	0,79	0,02	0,75	0,84	0,98	-1,59%	<0,0001	<0,0001

3. REZULTATI

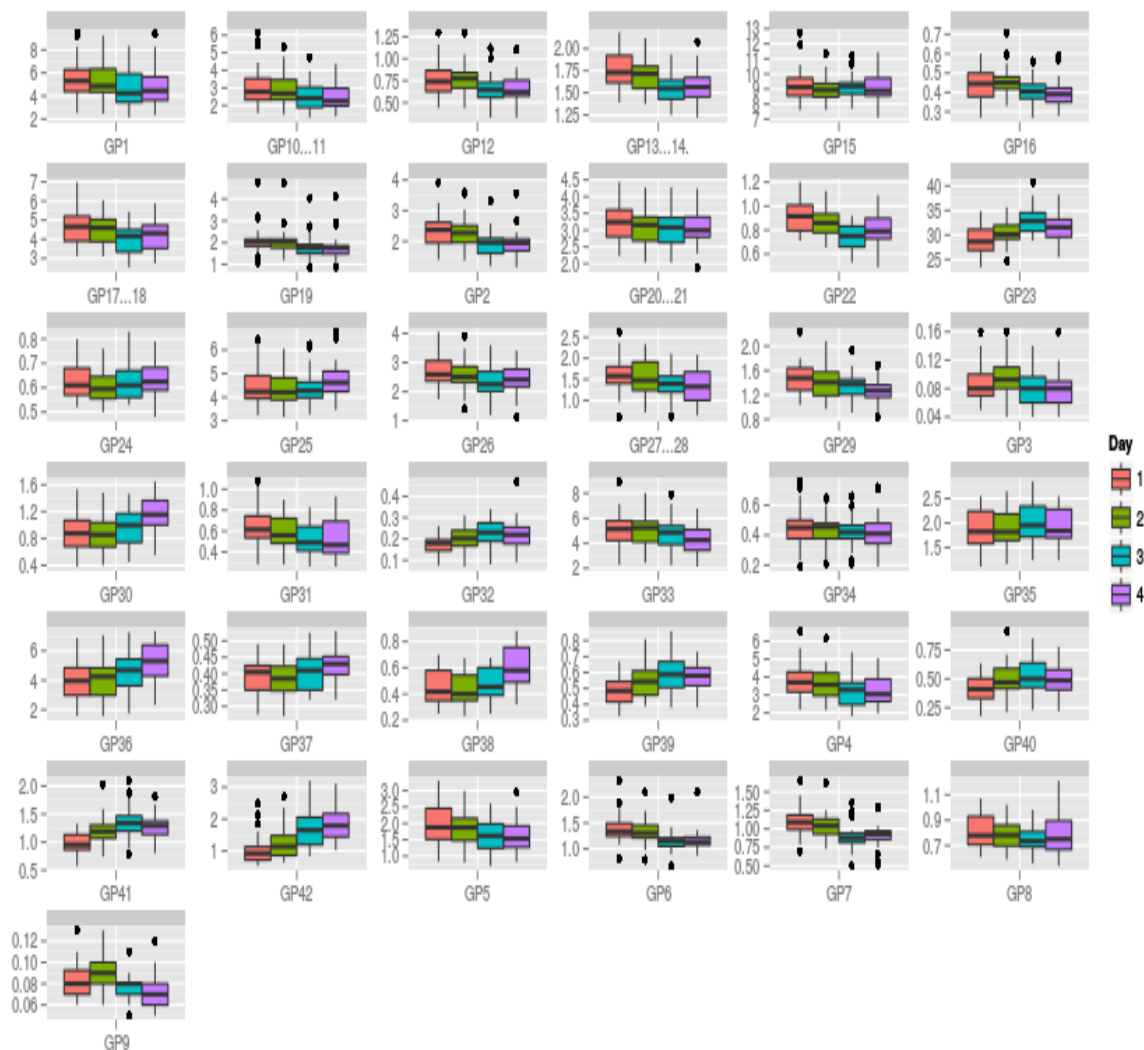
GP9	0,08	0,00	0,08	0,09	0,87	-12,75%	<0,0001	<0,0001
GP10 + 11	2,75	0,17	2,39	3,11	0,81	-19,28%	<0,0001	<0,0001
GP12	0,72	0,03	0,65	0,79	0,85	-14,53%	<0,0001	<0,0001
GP13 + 14	1,65	0,03	1,58	1,72	0,90	-9,73%	<0,0001	<0,0001
GP15	9,18	0,17	8,82	9,53	0,99	-1,41%	0,026	0,104
GP16	0,43	0,01	0,40	0,45	0,93	-6,99%	<0,0001	<0,0001
GP17 + 18	4,37	0,16	4,05	4,69	0,90	-10,43%	<0,0001	<0,0001
GP19	1,93	0,12	1,69	2,18	0,86	-14,24%	<0,0001	<0,0001
GP20 + 21	3,14	0,10	2,94	3,35	0,95	-4,68%	<0,0001	<0,0001
GP22	0,84	0,02	0,79	0,88	0,88	-11,51%	<0,0001	<0,0001
GP23	30,96	0,50	29,94	31,98	1,09	9,10%	<0,0001	<0,0001
GP24	0,63	0,01	0,60	0,65	1,02	2,10%	0,142	0,568
GP25	4,50	0,15	4,19	4,81	1,07	7,10%	<0,0001	<0,0001
GP26	2,49	0,10	2,29	2,69	0,92	-8,20%	<0,0001	<0,0001
GP27 +28	1,47	0,08	1,31	1,63	0,83	-17,01%	<0,0001	<0,0001
GP29	1,38	0,04	1,29	1,47	0,87	-13,36%	<0,0001	<0,0001
GP30	0,98	0,05	0,87	1,08	1,29	28,53%	<0,0001	<0,0001
GP31	0,57	0,03	0,51	0,64	0,81	-18,53%	<0,0001	<0,0001
GP32	0,21	0,01	0,19	0,23	1,27	27,43%	<0,0001	<0,0001

3. REZULTATI

GP33	4,84	0,24	4,35	5,33	0,86	-13,86%	0,001	0,004
GP34	0,44	0,02	0,39	0,48	0,92	-8,40%	0,003	0,012
GP35	1,93	0,07	1,78	2,08	1,03	3,03%	<0,0001	<0,0001
GP36	4,45	0,25	3,94	4,96	1,31	31,48%	<0,0001	<0,0001
GP37	0,40	0,01	0,38	0,42	1,09	9,27%	<0,0001	<0,0001
GP38	0,50	0,03	0,45	0,55	1,34	34,26%	<0,0001	<0,0001
GP39	0,55	0,02	0,51	0,58	1,18	18,47%	<0,0001	<0,0001
GP40	0,49	0,02	0,44	0,54	1,17	17,07%	<0,0001	<0,0001
GP41	1,21	0,04	1,13	1,28	1,28	28,08%	<0,0001	<0,0001
GP42	1,48	0,10	1,27	1,69	1,69	69,22%	<0,0001	<0,0001

Analiza je pokazala statistički značajnu razliku u gotovo svim udjelima *N*-glikana proteina seruma osim za digalaktoziliranu i sijaliniziranu strukturu s računjućim GlcNAc-om (GP15) te trigalaktoziliranu i sijaliniziranu strukturu (GP24).

Prikaz promjena *N*-glikanskih profila ukupnih proteina seruma u različitim vremenskim točkama prikazan je na Slici 8.



Slika 8. Prikaz promjena *N*-glikanskih profila ukupnih proteina seruma prema različitim vremenskim točkama

U prvoj poslijeoperativnoj točki mjerenja, 24 sata nakon operacije došlo je do smanjenja mono- i digalaktoziliranih struktura te povećanja tri- i tetraantenarnih sijaliniziranih struktura. Osim povećanja digalaktozilirane i sijalinizirane strukture (A2G2S2) (najobilnija struktura u serumu), 48 sati nakon operacije došlo je do povećanja triantenarnih i tetraantenarnih sijaliniziranih struktura. Kod trigalaktoziliranih i sijaliniziranih struktura s ili bez račvujućeg GlcNAc-om (GP25, GP30) i tetragalaktoziliranih i sijaliniziranih struktura (GP38) dolazi do pada 24 sata nakon operacije te ponovnog porasta 7 dana nakon operacije (T0) na razine iste ili više od preoperativnih.

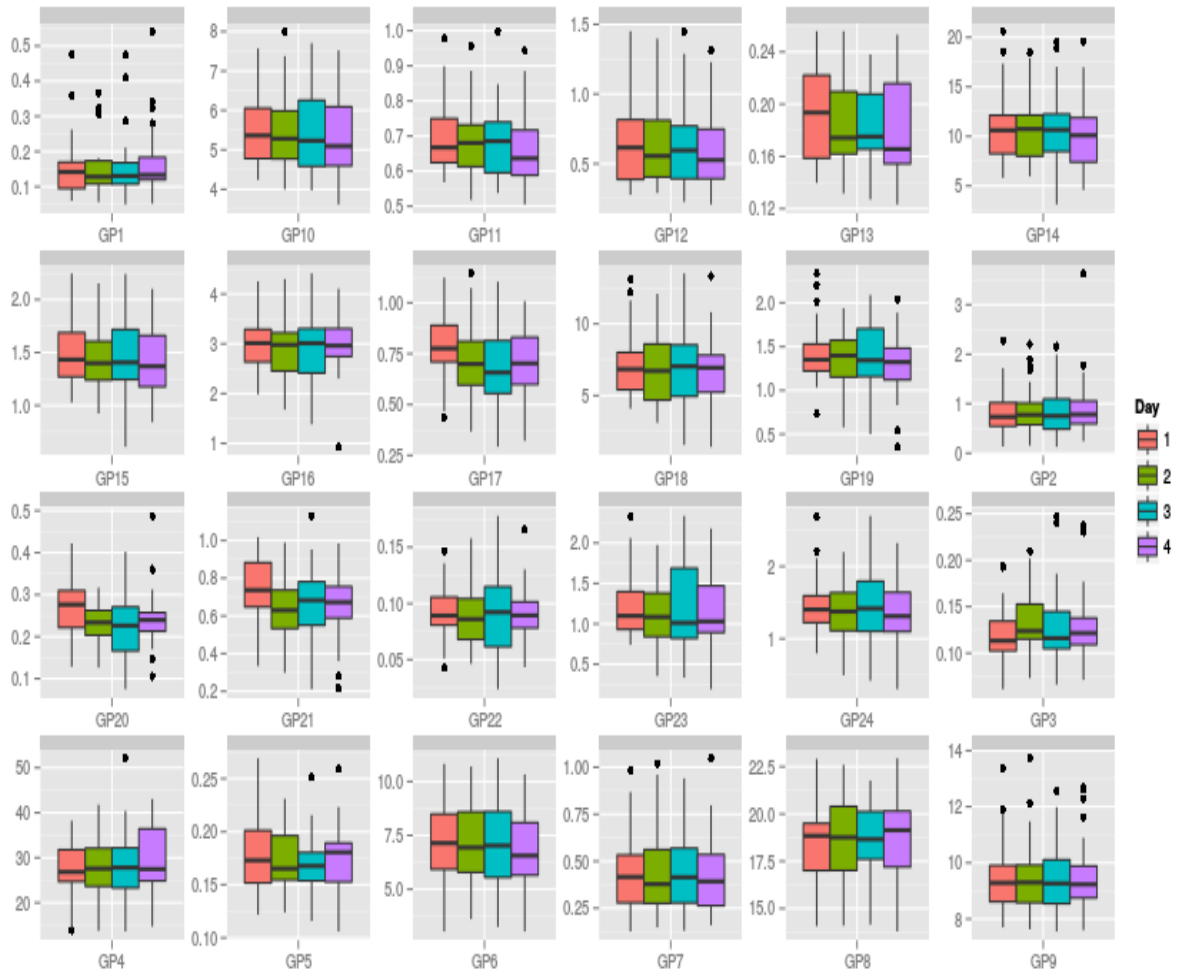
Tablica 8. Prikaz promjena *N*-glikana IgG-a i njihova relativna promjena u 4 ispitivane točke mjerenja

Glikan	Srednja vrijednost	St. pogreška	95% interval pouzdanosti		omjer (4. / 1.) vrijednost	relativna promjena	P	P prilagođeni (Bonferroni)
			donja granica	gornja granica				
IgG-GP2	0,89	0,10	0,69	1,10	1,15	14,51%	0,069	0,276
IgG-GP3	0,13	0,01	0,12	0,14	1,09	9,36%	0,267	1,000
IgG-GP4	28,34	1,31	25,66	31,02	1,06	5,88%	0,097	0,388
IgG-GP5	0,18	0,00	0,17	0,18	0,97	-2,55%	0,329	1,000
IgG-GP6	7,02	0,38	6,24	7,80	0,98	-1,88%	0,194	0,776
IgG-GP7	0,44	0,04	0,36	0,52	1,00	0,16%	0,840	1,000
IgG-GP8	18,73	0,37	17,97	19,49	1,02	2,36%	0,056	0,224
IgG-GP9	9,51	0,26	8,99	10,04	1,01	0,63%	0,292	1,000
IgG-GP10	5,43	0,19	5,05	5,82	0,96	-3,98%	0,012	0,048
IgG-GP11	0,68	0,02	0,65	0,72	0,94	-5,59%	0,007	0,028
IgG-GP12	0,63	0,06	0,51	0,74	0,91	-8,71%	0,003	0,012
IgG-GP13	0,19	0,01	0,17	0,20	0,94	-6,15%	0,093	0,372
IgG-GP14	10,63	0,68	9,25	12,02	0,93	-7,39%	0,004	0,016
IgG-GP15	1,47	0,06	1,34	1,59	0,92	-7,94%	0,010	0,040
IgG-GP16	2,93	0,10	2,74	3,13	1,01	0,87%	0,704	1,000
IgG-GP17	0,72	0,03	0,66	0,78	0,90	-10,18%	0,011	0,044
IgG-GP18	6,98	0,41	6,14	7,83	0,94	-5,78%	0,447	1,000

3. REZULTATI

IgG-GP19	1,36	0,05	1,26	1,46	0,91	-8,51%	0,419	1,000
IgG-GP20	0,24	0,01	0,22	0,26	0,89	-11,37%	0,002	0,008
IgG-GP21	0,67	0,02	0,63	0,71	0,88	-11,55%	0,010	0,040
IgG-GP22	0,09	0,00	0,08	0,10	0,98	-2,24%	0,755	1,000
IgG-GP23	1,18	0,07	1,03	1,33	0,98	-1,74%	0,805	1,000
IgG-GP24	1,40	0,06	1,27	1,53	0,93	-7,28%	0,563	1,000

Analiza *N*-glikana IgG-a pokazala je statistički značajne promjene za monogalaktozilirane i digalaktozilirane strukture sa sržnom fukozom i račvućim GlcNAc-om (IgG-GP10, IgG-GP11, IgG-GP12, IgG-GP14, IgG-GP15, IgG-GP17) te digalaktoziliranom i sijaliniziranom strukturom (IgG-GP21). Sve glikanske strukture kod kojih je utvrđena statistički značajna razlika su se smanjivale u poslijeoperativnom periodu. Prikaz promjena *N*-glikanskih profila IgG-a u različitim vremenskim točkama prikazan je na Slici 9.



Slika 9. Prikaz promjena *N*-glikanskih profila IgG-a prema različitim vremenskim točkama

Kako bi se ispitalo učinak trajanja operacije, što pretpostavlja veći obim kirurškog stresa, učinjena je korelacija promjena *N*-glikanskih profila ukupnih proteina seruma i IgG-a s duljinom trajanja operacije. Statistički značajne korelacije *N*-glikanskih profila ukupnih proteina seruma i IgG-a s duljinom trajanja operacije prikazane su u Tablici 9.

Tablica 9. Statistički značajne korelacije *N*-glikanskih profila ukupnih proteina seruma i IgG-a s duljinom trajanja operacije

Glikan	r	P
GP1	0,378	0,048
GP3	0,397	0,037
GP17,18	0,436	0,021
GP25	0,555	0,002
GP27,28	-0,381	0,045
GP29	-0,453	0,016
GP33	-0,446	0,017
GP40	-0,383	0,044
IgG-GP3	-0,405	0,032
IgG-GP5	-0,450	0,016
IgG-GP6	-0,439	0,019
IgG-GP7	-0,400	0,035
IgG-GP8	-0,381	0,048
IgG-GP10	-0,402	0,034

* r – koeficijent korelacije

Korelacijskom analizom utvrđena je slaba pozitivna korelacija agalaktoziliranih i mono- i digalaktoziliranih i sijaliniziranih struktura s ili bez računajućeg GlcNac-a *N*-glikana ukupnih proteina seruma (GP1, GP3, GP17, GP18, GP25) s duljinom trajanja operacije te slaba negativna korelacija tri- i tetragalaktoziliranih i sijaliniziranih struktura (GP27,GP28,GP29,

GP33,GP40). Kod *N*-glikana IgG-a utvrđene su slabe negativne korelacije agalaktoziliranih i monogalaktoziliranih struktura s duljinom trajanja operacije (IgG-GP3, IgG-GP5, IgG-GP6, IgG-GP7, IgG-GP8, IgG-GP10) .

U svrhu ispitivanja strukture promjena *N*-glikanskih profila ukupnih proteina seruma i IgG-a učinjena je i faktorska analiza s Varimax rotacijom čime su se i *N*-glikani ukupnih proteina seruma i IgG-a grupirali u dvije komponente. Kako različiti glikani svakoj komponenti doprinose i negativnim i pozitivnim score-om, dobivene informacije su se pokazale neinformativima za ovo istraživanje.

3.3 Ispitivanje međusobne povezanosti promjena koncentracija proteina akutne faze i promjena *N*-glikanskih profila ukupnih proteina seruma i IgG-a

Korelacijskom analizom i linearnom regresijom ispitano je slijedi li jači upalni odgovor statistički značajna promjena u svojstvima glikozilacijskog profila te postoji li statistički značajna povezanost koncentracija IL-6 s promjenama *N*-glikanskih profila proteina seruma i IgG-a tijekom poslijeoperativnog perioda. Nisu utvrđene statistički značajne povezanosti promjena *N*-glikana ukupnih proteina seruma i *N*-glikana IgG-a s koncentracijama sTREM-1. Statistički značajne povezanosti *N*-glikanskih profila s promjenama koncentracija proteina akutne faze navedene su u Tablici 10.

Tablica 10. Statistički značajne povezanosti N-glikanskih profila s promjenama koncentracija proteina akutne faze

Glikan	CRP	IL-6	PCT
	r (P)	r (P)	r (P)
GP2	-0,389 (0,045)	-	-
GP7	-0,493 (0,008)	-	-
GP13,14	-0,416 (0,028)	-	-
GP22	-0,506 (0,006)	-	-
GP23	0,425 (0,016)	0,405 (0,032)	-
GP24	-	0,483 (0,009)	-
GP29	-	-	-0,543 (0,003)
GP32	0,775 (<0,0001)	-	-
GP39	-	0,378 (0,047)	-
GP40	0,548 (0,003)	-	-
GP41	-	-	-
GP42	-	-	-
IgG-GP6	-	-0,406 (0,032)	-
IgG-GP12	-	0,375 (0,049)	-
IgG-GP14	-	0,401 (0,034)	-
IgG-GP16	-	0,556 (0,002)	-

IgG-GP17	-	0,485 (0,069)	-
IgG-GP18	-	0,546 (0,003)	-
IgG-GP19	-	0,516 (0,005)	-
IgG-GP20	-	-	0,408 (0,031)
IgG-GP21	-	0,379 (0,046)	-
IgG-GP22	-	-	0,469 (0,012)
IgG-GP23	-	0,510 (0,006)	-
IgG-GP24	-	0,476 (0,010)	-

* r – koeficijent korelacije

Porast koncentracija CRP-a pokazuje slabu do umjerenu povezanost s padom određenih visokomanoznih struktura (GP2, GP7) te s mono- i digalaktoziliranim i sijaliniziranim strukturama sa sržnom fukozom (GP13,14, GP22). CRP ujedno pokazuje slabu do umjerenu pozitivna povezanost s digalaktoziliranim i sijaliniziranim strukturama s račvajućim GlcNAc-om i sržnom fukozom (GP23) te vrlo dobru povezanost s trigalaktoziliranim i sijaliniziranim strukturama s antenarnom fukozom (GP32). Nije utvrđena povezanost promjena koncentracija CRP-a s promjenama *N*-glikanskih profila IgG-a.

IL-6, kao i CRP, pokazuje umjerenu povezanost s digalaktoziliranim i sijaliniziranim strukturama s račvajućim GlcNAc-om i sržnom fukozom (GP23), ali također i trigalaktoziliranim i sijaliniziranim strukturama (GP24) te tetragalaktoziliranim i sijaliniziranim s antenarnom fukozom (GP39). IL-6 pokazuje slabe do umjerene pozitivne korelacije s mono- i digalaktoziliranim i sijaliniziranim *N*-glikanima IgG-a neovisno o prisustvu sržne fukoze, račvajućeg GlcNAc-a ili oboje (IgG-GP6, IgG-GP12, IgG-GP14, IgG-GP16, IgG-GP18, IgG-GP19, IgG-GP21, IgG-GP23, IgG-GP24).

4. RASPRAVA

U ovom su se radu ispitivali obrasci promjena koji ukazuju na razvoj akutnog upalnog odgovora i SIRS-a nakon radikalne resekcije kolona.

Kako se u novijoj literaturi i dalje istražuju specifični upalni biljezi koji su najprimjereniji za praćenje upale, definiranje razine upalnog odgovora, dijagnozu i prognozu nakon opsežnih kirurških zahvata, ispita se učinak radikalne resekcije kolona na koncentracije sTREM-1, CRP-a, IL-6 i PCT-a te *N*-glikanskih profila proteina seruma IgG-a .

Analizom rutinski praćenih parametara koji ulaze u ACCP/SCCM definiciju SIRS-a niti jedan ispitanik nije razvio SIRS po kliničkim i laboratorijskim parametrima koje propisuju smjernice. Dobivene statistički značajne promjene u rutinski praćenim parametrima nemaju kliničku važnost.

Kako je spomenuto u uvodnom dijelu rada, mnoge stručne udruge predlažu redefiniranje SIRS-a uključivanjem upalnih biljega, od najprisutnijih proteina akutne faze pa do biljega koji se definiraju novim istraživanjima.

Analiza vremenskog tijeka promjena koncentracija proteina akutne faze u ovome radu pokazala je porast koncentracija CRP, IL-6 i PCT-a u ranom poslijeoperativnom periodu nakon radikalne resekcije kolorektalnog karcinoma. CRP doseže vršnu koncentraciju 48 sati nakon operacije, a PCT 24 sata nakon operacije (T1), što je u skladu s literaturnim podacima^{53,54}. Koncentracije PCT-a bile su u razini niskog rizika od sepse i septičkog šoka u sve četiri točke mjerenja, što je u skladu s literaturnim podacima i ukazuje da ispitanici nisu razvijali nikakve upalne komplikacije⁵⁵, a što je potvrdio i njihov klinički status, kao i minimalna potreba za mikrobiološkim praćenjem. Porast koncentracije IL-6 24 sata nakon operacije (T1) slijedi rani porast koncentracije PCT-a, ali brže pada i gotovo doseže vrijednosti preoperativne koncentracije nakon 7 dana (T3), što je također u skladu s literaturnim podacima⁵⁶. Istraživanja koja ispituju i povezuju postoperativni porast koncentracija IL-6 s komplikacijama poput dehiscencije anastomoze su ponekad oprečna, odnosno neka sugeriraju da porast koncentracija IL-6 ukazuje na razvoj komplikacija, dok druga to osporavaju^{57,58}. No kako u ovoj studiji nije bilo komplikacija te vrste, nije bilo moguće potvrditi ili osporiti takve navode, nego je prateći definiran vremenski tijek porasta i pada koncentracija IL-6 u ispitivanoj skupini samo moguće sugerirati da je takva dinamika

posljedica odgovora na kirurški stres ili neinfektivni SIRS, koje samo prema koncentracijama CRP-a, IL-6 i PCT nije moguće razlikovati.

Prema dobivenim rezultatima, svi ispitivani proteini akutne faze pokazuju trend porasta i pada u poslijeoperativnom periodu, ali kod koncentracija sTREM-1 molekule gdje su uočene statistički značajne, ali, usporedno s literaturnim podacima^{59,60}, minimalne promjene u poslijeoperativnom periodu samo u odnosu na točku mjerenja prije operacije (T0). Razlog tome može biti da nije došlo do razvoja SIRS-a u punom obliku, ali je također potrebno uzeti u obzir i druge čimbenike koji bi mogli objasniti ove rezultate. Jedan od njih je izrazito dobra supresija upale zbog korištenja optimalne antimikrobne terapije⁶¹, a drugi da je sTREM-1 podložan interferencijama mnogih endogenih (serumskih) kao i egzogenih (mikrobioloških) komponenti koje dovode do izrazite varijabilnosti između rezultata različitih proizvođača⁶². Upravo zbog prethodno spomenutih ograničenja, sTREM-1 ELISA testovi se moraju poboljšati na način da se varijabilnost između različitih testova ne mora dovoditi u pitanje kako bi se uopće mogli razmotriti za rutinsku kliničku i laboratorijsku primjenu⁶³. Kao prilog toj tezi, neke studije sugeriraju da mjerenje sTREM-1 na mjestu infekcije (poput cerebrospinalne tekućine, bronhoalveolarnog lavata itd.) ima veću kliničku značajnost nego mjerenje u serumu ili plazmi⁶⁴. Postoje studije koje definiraju sTREM-1 kao pouzdan biljeg upale i sepse⁶⁵, ali i publikacije koje sTREM-1 definiraju kao nepouzdan biljeg upale u specifičnim oboljenjima^{66,67} zbog prethodno navedenih razloga.

Uzevši u obzir da u ovom ispitivanju sTREM-1 nije pokazao statistički značajnu promjenu u ispitivanim vremenskim točkama nakon operacije nego samo u odnosu na vremensku točku prije operacije, a u skladu s ostalim kliničkim i laboratorijskim pokazateljima (leukociti, tjelesna temperatura, otkucaji srca, pCO₂), nameće se zaključak da je u ovom slučaju intenzivan upalni odgovor posljedica kirurške traume, ali da nije došlo do razvoja SIRS-a u klasičnom smislu. Kao posljedica kirurške traume, SIRS može prikriti poslijeoperativne komplikacije⁶⁸, a kako je analiza vremenskog tijeka pokazala da u koncentracijama sTREM-1 tijekom kirurškog stresa postoji samo statistički značajna razlika u odnosu na vrijeme prije operacije, ovaj bi biljeg mogao biti način razlikovanja infektivnog i neinfektivnog SIRS-a. Statistički značajna razlika dobivena za promjene koncentracija sTREM-1 molekule ne može se smatrati klinički značajnom razlikom za otkrivanje SIRS-a jer je porast koncentracija manji od onih publiciranih za SIRS, ali također sugerira da niti jedan bolesnik nije razvio potpuni

obim SIRS-a uzrokovanog kirurškom traumom, nego da je samo odraz upale kao posljedice kirurškog stresa, što je također u skladu s literaturnim podacima^{69,70}. Kako se u ovom istraživanju koncentracije CRP-a, IL-6 i PCT-a mijenjaju očekivano u kontekstu akutnog upalnog odgovora izazvanog kirurškom traumom, minimalni porast sTREM-1 govori o dobroj kontroli upalnog procesa koja se ne može definirati prema rastućim koncentracijama ostala tri proteina akutne faze, što je sukladno istraživanjima koja su definirala težinu upalnog odgovora ili sepse prema njihovim koncentracijama⁷¹. Nadalje, kako ispitanici nisu razvili infektivne komplikacije niti je ispitivana kohorta uključivala bolesnike koji su razvili sepsu, buduće studije trebale bi razjasniti ovu tezu.

Povezanost upalnih biljega s duljinom trajanja operacije ispitivana je kako bi se definirala povezanost dulje izloženosti intestinalnoj mikroflori i opsega kirurškog stresa s mjerljivim koncentracijama biljega upale, što je zapravo kvantifikacija skupnih događanja prilikom ovog tipa operacije. Rezultati ove studije pokazali su slabu pozitivnu korelaciju IL-6 i CRP-a s trajanjem operacije prva dva dana nakon operacije, što ukazuje da porast koncentracija ova dva proteina akutne faze odražava opsežniji kirurški stres. U ovom je slučaju svakako potrebno uzeti u obzir broj ispitanika koji je za korelacijsku analizu relativno malen pa bi ove rezultate trebalo potvrditi na većoj kohorti ispitanika.

Slabe i umjerene korelacije otkrile su i unakrsnu povezanost CRP-a i IL-6 jer oni slijede sličnu poslijeoperativnu kinetiku koja je vidljiva iz analize vremenskog tijeka, dok PCT i sTREM-1 nisu pokazali korelaciju niti s jednim testiranim proteinom akutne faze. U novije vrijeme često diskutira o najprikladnijem odabiru laboratorijskih testova, točnosti prilikom interpretacije laboratorijskih nalaza i racionalnoj dijagnostici u smislu izbjegavanja testova koji daju istu kliničku informaciju⁷². U skladu s navednim, doprinos dobivenih rezultata je ujedno i ukazivnje na nepotrebno usporedno određivanje koncentracija CRP-a i IL-6 u poslijeoperativnom praćenju bolesnika nakon radikalne resekcije kolona.

U kontekstu praćenja upalnog odgovora i razvoja SIRS-a, u ovom su radu ispitane promjene *N*-glikoma proteina seruma i IgG-a nakon opsežne abdominalne operacije te su se definirale statistički značajne promjene. Iako su u homeostazi *N*-glikom proteina seruma i *N*-glikom IgG-a prilično stabilni (proteini seruma CV=5,56%; IgG CV=5,9%)^{47,73,74} koristili smo uzorke prije operacije kao baznu kontrolu za svakog ispitanika i tako uklonili mogući utjecaj

interindividualne varijabilnosti u glikozilaciji. Bazalne vrijednosti, odnosno vrijednosti prije operacije, važne su i za proteine akutne faze i za *N*-glikanske profile jer bolesnici s kolorektalnim karcinomom imaju promijenjene vrijednosti svih navedenih parametara u odnosu na zdravu populaciju^{75,76,77,78,79}. Bazalne vrijednosti upalnih biljega kod bolesnika s kolorektalnim karcinomom su nešto povišene, a IgG glikom u kolorektalnom karcinomu pokazuje tri glavne razlike od zdravih ispitanika: smanjenje galaktozilacije IgG-a, smanjenje sijalinizacije IgG-a, povećanje sržne fukoze neutralnih glikana i smanjenje sržne fukoze sijaliniziranih glikana. Smanjenje galaktozilacije i sijalinizacije vidljivo je i u drugim bolestima⁴⁶, stoga se ovaj obrazac promjene ne može smatrati specifičnim za kolorektalni karcinom. Jedini obrazac koji je specifično primijećen na ovoj populaciji je obrat fukoze i sijalinizacije kod neutralnih glikana⁷⁷.

Većina promjena *N*-glikana proteina seruma opažena je 24 sata i 48 sati nakon operacije, što sugerira sistemski fiziološki odgovor i odgovara najjačem odgovoru na kirurški stres. Ovo opažanje je u skladu s literaturnim podacima koja ukazuju da glikom ne pokazuje promjene neposredno nakon operacije jer je upala još uvijek lokalizirana, nego tek nešto kasnije, što odgovara bifaznom upalnom odgovoru⁸⁰.

Nakon operacije došlo je do smanjenja gotovo svih glikanskih struktura proteina seruma, ali je obrazac promjene ipak nešto drugačiji kako upala jenjava. Odmah nakon operacije dolazi do pada mono i digalaktoziliranih struktura te *N*-glikana proteina seruma u cijelom ispitivanom vremenskom periodu. Istovremeno je uočen pad svih struktura s računjućim GlcNAc koji u upali sprječava stvaranje multiantenarnih šećernih lanaca tako što opstruira GlcNAc transferaze. Na taj način dolazi do smanjenja razgranatih glikana u upali⁸¹.

Kod trigalaktoziliranih i sijaliniziranih struktura s ili bez računjućeg GlcNAc-a te tetragalaktoziliranih i sijaliniziranih struktura dolazi do pada 24 sata nakon operacije (T1) te porasta 7 dana nakon operacije (T3) na razine koje su iste ili više od predoperativnih. Triantenarne sijalinizirane strukture odgovaraju sijalil-Lewis X antigenu koji se povezuje s upalnim odgovorom akutne faze te se smatra da porast plazmatskih proteina koji nose sijalil-Lewis X antigen u bolesnika s upalnim bolestima ima regulacijsku ulogu u kemotaksiji leukocita^{82,83}. Osim toga, poznato je da mnogi proteini akutne faze poput hemopeksina, vitronektina, α 1-kiselog glikoproteina, α 1-antitripsina i ceruloplazmina imaju puno

sijaliniziranih triantenarnih i tetraantenarnih *N*-glikana^{84,85} pa promjene koje su dokazane u ovom ispitivanju mogu biti posljedica pada koncentracije ukupnih proteina seruma ili bi mogle biti odraz molekularnog mehanizma kontrole upale. Pad koncentracije proteina je uobičajena posljedica opsežne operacije koja se odražava na *N*-glikanske profile, a molekularni mehanizam kontrole upale bi djelovao kompetitivnom inhibicijom adhezije selektina. Ovakvu je tezu teško potvrditi jer se promjene u strukturi glikoma proteina seruma ne mogu pripisati samo upali. Ovo je svakako jasan limit studije koji nije moguće ukloniti.

Najobilnija *N*-glikanska struktura proteina seruma, A2G2S2, koja je prisutna na proteinima akutne faze u smanjenju poput transferina, ali kod proteina akutne faze koji su u porastu⁸⁶, pokazuje obrazac promjene (porast) koji odgovara literaturnim podacima.

N-glikanski profili IgG-a su također pokazali određene obrasce promjene, iako daleko manje od promjena *N*-glikanskih profila proteina seruma jer su promjene IgG-a vrlo individualizirane u ranoj fazi upale pa se ponekad čine i nasumičnima. Kako IgG mijenja svoju funkciju iz proupalne u protuupalnu dodatkom jedne sijalinske kiseline te dodatkom fukoze sprječava ADCC i djeluje proupalno⁴⁹, a obrazac promjena *N*-glikoma IgG-a nije jednoznačan (istovremeni pad mono- i digalaktoziliranih struktura sa sržnom fukozom i račvujućim GlcNAc-om i digalaktozilirane i sijalinizirane strukture), govori također u prilog brzom smanjenju proteina nakon operacije, ali i činjenici da je *N*-glikom IgG-a u ranoj fazi upale vrlo individualan.

U svrhu ispitivanja učinka trajanja operacije, što pretpostavlja veći obim kirurškog stresa, ispitala se povezanost *N*-glikanskog profila ukupnih proteina seruma i *N*-glikanskih profila IgG-a s duljinom trajanja operacije. Kod *N*-glikana ukupnih proteina seruma nađene su slabe pozitivne korelacije duljine trajanja operacije s GP1, GP3, GP17,18 i umjerena pozitivna korelacija s GP25 ukupnih proteina seruma. Kako se radi o glikanima koji strukturom variraju na način da se radi o agalaktoziliranim, monogalaktoziliranim, digalaktoziliranim i sijaliniziranim sa ili bez sržne fukoze ili račvujućeg GlcNAc-a te trigalaktoziliranim i sijaliniziranim s račvujućim GlcNAc-om, a uz svijest o činjenici da se na cjelokupnoj razini glikanskog profila proteina seruma događaju značajne promjene, može se zaključiti samo da porast ovih specifičnih *N*-glikanskih struktura prati jači kirurški stres. Jednako tako, određene glikanske strukture (GP27,28, GP29, GP33, GP40), mahom trigalaktozilirane i sijalinizirane,

pokazuju pad s većim obimom kirurškog stresa. Kako se u literaturi opisuje pad triantenarnih struktura u akutnoj upali⁴⁷, lako je objašnjivo da s većim obimom kirurškog stresa te strukture pokazuju još veći pad. Za ovakvu vrstu ispitivanja bila bi pogodnija studija s više ispitanika jer bi se jasnije vidjelo jesu li slabe korelacije samo posljedica malog broja ispitanika ili realan prikaz povezanosti.

U slučaju N-glikana IgG-a nađene su slabe negative korelacije s duljinom trajanja operacije kod agalatoziliranih i monogalaktoziliranih struktura (GP3,GP5,GP6,GP7,GP8, GP10), što odgovara padu agalaktoziliranih struktura u upali, kao što je opisano u literaturi⁴⁷.

N-glikanski profili se neupitno mijenjaju u stanju akutnog upalnog odgovora, no do sada nikada nisu definirani kao upalni biljezi koji mogu biti korisni u praćenju akutnog upalnog odgovora, definiranja SIRS-a i eventualnih razvoja komplikacija. Kako bi se to barem donekle definiralo, u ovom je radu ispitana povezanost N-glikana proteina seruma i N-glikana IgG-a s CRP-om, IL-6, PCT-om i sTREM-1. Za sTREM-1 nisu utvrđene statistički značajne povezanosti niti s jednim N-glikanom ukupnih proteina seruma i IgG-a, ali su utvrđene slabe do vrlo dobre povezanosti s ostalim ispitivanim proteinima akutne faze. Upravo nedostatak korelacije s sTREM-1 sugerira da su ovdje opisani obrasci promjena N-glikanskih struktura vezani uz akutni upalni odgovor koji je posljedica kirurškog stresa kao što se moglo zaključiti iz promjena CRP-a, IL-6 i PCT-a, ali da ne opisuju sam SIRS iako se neke promjene u ta dva vrlo slična stanja preklapaju u obrascima promjena glikanskih profila.

Kod prokalcitonina je definirana samo umjerena negativna korelacija s trigalaktoziliranom i sijaliniziranim strukturom (GP29) N-glikana proteina seruma, te slabe pozitivne korelacije s digalaktoziliranim i sijaliniziranim strukturama (GP20 i GP22) N-glikana IgG-a. Ovakve izolirane, slabe korelacije teško je komentirati zbog limita broja ispitanika, ali dovoljno je sagledati iz perspektive da ovo ispitivanje nije uključivalo ispitanike sa sepsom i klasičnim SIRS-om gdje bi i koncentracije PCT-a bile više pa bi bilo moguće realnije procijeniti povezanost s promjenama glikanskih profila.

Testiranje povezanosti s koncentracijama CRP-a definiralo je slabe negativne korelacije visokomanoznih struktura N-glikana ukupnih proteina seruma GP2 i GP7 pokazuju s CRP-om, što sugerira pad visokomanoznih struktura s porastom CRP-a. Istovremeno je nađena slaba pozitivna korelacija s GP23 (digalaktozilirani i sijalinizirani s račvajućim GlcNAc i

sržnom fukozom) te vrlo dobra korelacija s trigalaktoziliranom i sijaliniziranom strukturom s antenarnom fukozom, što strukturno odgovara Sijalil-Lewis antigenu. Time se izravno povezuje porast koncentracija CRP-a kao najviše korištenog proteina akutne faze s porastom Sijalil-Lewis X antigena.

Bitno je naglasiti da je ovo istraživanje pokazalo promjene sijaliniziranih triantenarnih i tetraantenarnih sijaliniziranih struktura s fukozom na vanjskoj strani tijekom upale u točkama 24 sata nakon operacije i 48 sati nakon operacije pa zajedno s podatkom o vrlo dobroj korelaciji CRP-a s GP32 govori više da se radi o molekularnom mehanizmu kontrole upale kompetitivnom inhibicijom adhezije selektina, nego da su ove promjene posljedica pada koncentracije proteina. Nije utvrđena korelacija CRP-a niti s jednim *N*-glikanom IgG-a. Poznato je da je CRP glikoziliran u različitim patofiziološkim stanjima, stoga je izgledno da dio promjena glikanskih profila u akutnom upalnom odgovoru odgovara promjenama glikozilacije CRP-a kao i ostalih proteina akutne faze, a ne IgG-a.

U literaturi su maksimalne promjene u *N*-glikanskom profilu proteina seruma sukladne maksimalnom opisanom porastu IL-6 od 4 do 24 sata nakon operacije i povišenim razinama 48 do 72 sata nakon operacije^{87,88,89}. U ovom su istraživanju nađene slabe pozitivne korelacije s digalaktoziliranim i sijaliniziranim strukturama s račvajućim GlcNAc-om i sržnom fukozom (GP23), trigalaktoziliranim i sijaliniziranim strukturama (GP24) i tetragalaktoziliranim i sijaliniziranim strukturama (GP39). Postoje literaturni podaci o povezanosti polimorfizma jednog nukleotida IL-6 sa sastavom IgG glikoma²², čime se može povezati utjecaj IL-6 na promjene glikanskog profila seruma. Dobiveni rezultati povezanosti dinamike promjena IL-6 s promjenama *N*-glikanskog profila proteina seruma svakako idu u prilog ovoj tezi jer izravno povezuju IL-6 koji je klasičan protein akutne faze s varijacijama u *N*-glikanskom profilu proteina seruma.

Istovremeno su definirane slabe do umjerene korelacije s dosta *N*-glikana IgG-a (GP6, GP12, GP14, GP16, GP17, GP18, GP19, GP21, GP23, GP24), od kojih je samo GP14 pokazao slabu negativnu korelaciju, dok su ostali pokazali pozitivnu korelaciju. Kako se većinom radi o mono- i digalaktoziliranim strukturama koje rastu s jačim upalnim odgovorom, dobivenu povezanost je teško tumačiti s obzirom na to da neka istraživanja sugeriraju da glikoforme IgG-a bez galaktoze povećavaju proupalnu aktivnost tako što nedostatak galaktoza povećava

izloženost manozna sržne strukture te omogućava vezanje na manozna vezujući lektin (engl. *mannose binding lectin*, MBL) koji aktivira lektinski put komplementa⁹⁰, a druga da nema različite aktivnost negalaktoziliranih i galaktoziliranih glikoformi IgG-a na različitim modelnim sustavima *in vivo*⁹¹. Zbog takvih oprečnih saznanja teško je razjasniti utjecaj galaktoze na aktivnost IgG-a.

Ova studija ima vrlo homogenu skupinu ispitanika koji su podvrgnuti radikalnoj resekciji otvorenog kolona, čime se može jasno povezati sistemski upalni odgovor preko porasta IL-6 s promjenama N-glikanskih profila proteina seruma. Kako IL-6 između ostalog utječe na sintezu IgG-a koji je jedan od najviše istraživanih glikoziliranih proteina seruma u različitim stanjima, od kroničnih bolesti do akutnih stanja poput sistemske upale^{92,93}, moguće je tumačiti dobivene korelacije IL-6 i N-glikanskih profila IgG-a (većinom mono- i digalaktoziliranim strukturama) s obzirom da koncentracije IgG-a i IL-6 koreliraju u sistemske upali⁹⁴.

Sveobuhvatno, u ovom je istraživanju vidljivo da se N-glikom ukupnih proteina seruma i IgG-a značajno mijenja kada je homeostaza poremećena, a kako se definirani obrasci promjena glikanskih profila mogu izravno povezati s koncentracijama i dinamikom promjene proteina akutne faze, u kontekstu ovog istraživanja moguće je gledati na promjenu glikanskih profila kao promjenu upalnog biljeaga. N-glikanska analiza ukupnih proteina seruma prikazuje cjelokupnu sliku promjena (promjene glikozilacije i koncentracije glikoziliranih proteina akutne faze) te bi, ako se još dodatno izučiti, mogla ukazivati na stupanj i smjer upale nakon opsežne operacije.

Rezultati dobiveni u ovoj studiji govore u prilog da se ispitanicima nije razvio SIRS po klasičnoj definiciji, već da se radilo o odgovoru na kirurški stres. Stoga bi bilo zanimljivo ispitati razlike kod bolesnika koji su razvili SIRS i eventualno ušli u stanje sepse prije i neposredno nakon operacije kako bi se potencijalno otkrili bolesnici koji su većem riziku za razvoj ozbiljnog sistemskog upalnog odgovora. Time bi se i lakše moglo doći do cilja koji predstavlja kontrolu upalne kaskade.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata i rasprave može se zaključiti sljedeće:

- Operacije kolorektalnog karcinoma otvorenog tipa dovode do opsežnog odgovora akutne faze praćenog porastom koncentracija sTREM-1, CRP-a, IL-6 i PCT-a.
- sTREM-1 nije pokazao statistički značajnu promjenu u ispitivanim vremenskim točkama nakon operacije, nego samo u odnosu na vremensku točku prije operacije, za razliku od ostalih proteina akutne faze, što je sukladno činjenici da ispitanici nisu razvili niti infektivni niti ne-infektivni SIRS.
- Koncentracije sTREM-1 ne koreliraju s duljinom trajanja operacije, što govori da porast koncentracija sTREM-1 ne odražava i veći obim kirurškog stresa.
- CRP i IL-6 slijede istu dinamiku promjena nakon radikalne resekcije kolona (porast 24 i 48 sati nakon operacije i postepeni pad tijekom 7 dana nakon operacije). Stoga usporedno određivanje koncentracija CRP-a i IL-6 nije korisno u kontekstu praćenja upale poslije radikalne resekcije kolona.
- *N*-glikani ukupnih proteina seruma pokazuju statistički značajne promjene gotovo svih glikanskih struktura. Odmah nakon operacije dolazi do pada mono- i digalaktosiliranih struktura te svih struktura s račvujućim GlcNAc-om, a kod tri- i tetragalaktosiliranih i sijaliniziranih struktura dolazi do pada u 24 sata nakon operacije. Triantenarne sijalinizirane strukture odgovaraju sijalil-Lewis X antigenu koji se povezuje s upalnim odgovorom akutne faze te 7 dana nakon operacije raste do razina koje su iste ili više od predoperativnih. Ovo je prva jasnija poveznica akutne faze i promjena *N*-glikanskih profila proteina seruma.
- *N*-glikanski profili IgG-a su pokazali manje od promjena *N*-glikanskih profila proteina seruma, a obrazac promjena *N*-glikoma IgG-a nije jednoznačan (istovremeni pad mono- i digalaktosiliranih struktura sa sržnom fukozom i račvujućim GlcNAc-om i digalaktosilirane i sijalinizirane strukture). *N*-glikani IgG-a negativno koreliraju s duljinom trajanja operacije kod agalaktosiliranih i monogalaktosiliranih struktura, što odgovara padu agalaktosiliranih struktura u upali. Ovakav nepovezani obrazac

promjene govori u prilog brzom smanjenju koncentracija proteina nakon operacije i činjenici da je *N*-glikom IgG-a u ranoj fazi upale vrlo individualan.

- Za sTREM-1 nisu nađene statistički značajne povezanosti niti s jednim *N*-glikanom ukupnih proteina seruma i IgG-a, ali su nađene slabe do vrlo dobre povezanosti s ostalim ispitivanim proteinima akutne faze. Upravo nedostatak korelacije s sTREM-1 sugerira da su ovdje opisani obrasci promjena *N*-glikanskih struktura vezani uz akutni upalni odgovor koji je posljedica kirurškog stresa, a ne SIRS-a.
- Kod CRP-a je nađena vrlo dobra korelacija s trigalaktoziliranom i sijaliniziranom strukturom s antenarnom fukozom, što strukturno odgovara Sijalil-Lewis antigenu. Time se izravno povezuje porast koncentracija CRP-a, kao najviše korištenog proteina akutne faze, s porastom Sijalil-Lewis X antigena, kao najjasnijeg glikanskog biljega akutne upale.
- Slabe pozitivne korelacije IL-6 s digalaktoziliranim i sijaliniziranim strukturama s račvajućim GlcNAc-om i sržnom fukozom, trigalaktoziliranim i sijaliniziranim strukturama i tetragalaktoziliranim i sjaliniziranim strukturama te umjerene korelacije s mono- i digalaktoziliranim strukturama IgG-a ukazuju da u poslijeoperativnom periodu IL-6 i *N*-glikanski profili govore o istom stupnju upale.
- U slučaju poremećene homeostaze nakon radikalne resekcije kolona, obrasci promjena *N*-glikanskih profila mogu se izravno povezati s koncentracijama i dinamikom promjene proteina akutne faze. Stoga se na promjenu glikanskih profila može gledati kao na promjenu upalnog biljega koji pokazuje cjelokupnu sliku promjena nakon radikalne resekcije kolona.

6. POPIS LITERATURE

¹ Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2016, Bilten 41, Zagreb, 2016:293-4.

² Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Hrvatski znanstveno-statistički ljetopis za 2017. godinu. WEB izdanje, Zagreb, 2018:1-33.

³ Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *Int J Mol Sci.* 2013;14(8):16365-85.

⁴ Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 2008 ;135(4):1079-99.

⁵ Matsuda T, Yamashita K, Hasegawa H, Oshikiri T, Hosono M, Higashino N et al. Recent updates in the surgical treatment of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol Surg.* 2018; 2(2): 129–136.

⁶ Emile SH, de Lacy FB, Keller DS, Martin-Perez B, Alrawi S, Lacy AM, et al. Evolution of transanal total mesorectal excision for rectal cancer: From top to bottom. *World J Gastrointest Surg.* 2018; 10(3): 28–39.

⁷ Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Thomas Seufferlein T, Joseph J. Sung JJ, Boelens PG, van de Velde CJH et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2015; 1: 15065.

⁸ Neviere R. Sepsis syndromes in adults: Epidemiology, definitions, clinical presentation, diagnosis and prognosis. Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. <https://www.uptodate.com> (pristupljeno 22.3.2019.)

⁹ Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al.. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee:Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis.*Chest* 1992;101:1664-55.

- ¹⁰ Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003;31(4):1250-6.
- ¹¹ Pomerantz WJ, Weiss SL. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and sepsis in children: Definition, epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. <https://www.uptodate.com> (pristupljeno 22.3.2019.)
- ¹² Nevieri R. Pathophysiology of sepsis. Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. <https://www.uptodate.com> (pristupljeno 22.3.2019.)
- ¹³ Ford JW, McVicar DW. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. *Curr Opin Immunol.* 2009;21(1):38-46
- ¹⁴ Klesney-Tait J, Turnbull IR, Colonna M The TREM receptor family and signal integration. *Nature Immunology* 2007;7(12):1266-73.
- ¹⁵ Larsen FF, Petersen JA. Novel biomarkers for sepsis: A narrative review. *Eur J Intern Med.* 2017;45:46-50.
- ¹⁶ Ferat-Osorio E, Esquivel-Callejas N, Wong-Baeza I, Aduna-Vicente R, Arriaga-Pizano L, Sánchez-Fernández P et al. The increased expression of TREM-1 on monocytes is associated with infectious and noninfectious inflammatory processes. *J Surg Res.* 2008;150(1):110-7
- ¹⁷ Petric V, Brkic V, Lendak D, Mihajlovic D, Novakovic Mikic A, Lemajic Komazec S. The significance of sTREM-1 as a diagnostic biomarker of sepsis in the context of Sepsis-3 Definition. *Signa Vitae* 2018;14(1):65-70.
- ¹⁸ Rosa SA, Pinto AM. Cytokines. U: Burtis CA, Ashwood ER, Burns DE: Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. Fourth edition. Elsevier Saunders. 2006;671-675.

- ¹⁹ Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest.* 1998;101(2):311-20.
- ²⁰ Crucitti A, Corbi M, Tomaiuolo PM, Fanali C, Mazzarri A, Lucchetti D et al. Laparoscopic surgery for colorectal cancer is not associated with an increase in the circulating levels of several inflammation-related factors. *Cancer Biol Ther* 2015;16:671-7.
- ²¹ Cruickshank AM, Fraser WD, Burns HJ, Van Damme J, Shenkin A. Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. *Clin Sci (Lond).* 1990;79(2):161-5.
- ²² Lauc G, Huffman JE, Pučić M, Zgaga L, Adamczyk B, Mužinić A, et al. Loci associated with *N*-glycosylation of human immunoglobulin G show pleiotropy with autoimmune diseases and haematological cancers. *PLoS Genet.* 2013;9(1):e1003225
- ²³ Thomas L. *Inflammation.* U:Thomas L. *Clinical Laboratory Diagnostics.* 1st English ed. Frankfurt/Main. TH-Books-Verl-Ges.,1998;689-715.
- ²⁴ Santonocito C, De Loecker I, Donadello K, Moussa MD, Markowicz S, Gullo A et al. C-reactive protein kinetics after major surgery. *Anesth Analg.* 2014;119(3):624-9.
- ²⁵ Sapin F, Biston P, Piagnerelli M. Predictive value of C-reactive protein in critically ill patients after abdominal surgery. *Clinics (Sao Paulo).* 2017;72(1):23-29.
- ²⁶ Lippi G, Cervellin G. Procalcitonin for diagnosing and monitoring bacterial infections: for or against? *Clin Chem Lab Med.* 2018;56:1193-1195.
- ²⁷ Lippi G. The Irreplaceable Value of Laboratory Diagnostics: Four Recent Tests that have Revolutionized Clinical Practice. *EJIFCC.* 2019;30(1):7-13.
- ²⁸ Hunziker S, Hügle T, Schuchardt K, Groeschl I, Schuetz P, Mueller B et al. The value of serum procalcitonin level for differentiation of infectious from noninfectious causes of fever after orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Am* 2010;92:138-48.

- ²⁹ Schuetz P, Beishuizen A, Broyles M, Ferrer R, Gavazzi G, Gluck EH et al. Procalcitonin (PCT)-guided antibiotic stewardship: an international experts consensus on optimized clinical use. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(9): 1308–1318.
- ³⁰ Benedetti M, Ciano P, Pergolini I, Ciotti S, Guercioni G, Ruffo G et al. Early diagnosis of anastomotic leakage after colorectal surgery by the Dutch leakage score, serum procalcitonin and serum C-reactive protein: study protocol of a prospective multicentre observational study by the Italian ColoRectal Anastomotic Leakage (iC. *G Chir.* 2019;40(1):20-25
- ³¹ Ishino T, Wang M, Mosyak L, Tam A, Duan W, Svenson K et al. Engineering a monomeric Fc domain modality by N-glycosylation for the half-life extension of biotherapeutics. *J Biol Chem.* 2013;288(23):16529-37.
- ³² Opdenakker G, Rudd PM, Ponting CP, Dwek RA. Concepts and principles of glycobiology. *FASEB J* 1993;7: 1330-1337.
- ³³ Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freez HH, Stanley P, Bertozzi CR et al. Essentials of glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory press. New York, 2nd edition. 2009.
- ³⁴ Cooper GM, Hausman RE. Stanica Molekularni pristup. Razvrstavanje i prijenos proteina. *Medicinska Naklada* 2004. 377-379.
- ³⁵ Alavi A, Axford JS. Sweet and sour: the impact of sugars on disease. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47: 760-770.
- ³⁶ Ruhaak LR, Henning R, Huhn C, Borowiak M, Dolhian RJEM, Deelder AM, Rapp E, Wuhrer M. Optimized workflow for preparation of APTS-labeled *N*-glycans allowing high-throughput analysis of human plasma glycomes using 48-channel multiplexed CGELIF. *J Proteome Res* 2010;9: 6655-6664.
- ³⁷ Reiding KR, Bondt A, Hennig R, Gardner RA, O'Flaherty R, Trbojević-Akmačić I et al. High-throughput Serum N-Glycomics: Method Comparison and Application to Study

Rheumatoid Arthritis and Pregnancy-associated Changes. *Mol Cell Proteomics*. 2019;18(1):3-15.

³⁸ Pavić T, Gornik O. Analysis of N-Glycosylation of Total Membrane Proteins. *Methods Mol Biol*. 2017;1503:197-205.

³⁹ Johnson MA. Amino acids, Peptides and Proteinss. U: Burtis CA, Ashwood ER, Burns DE:Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. Fourth edition.Elsevier Saunders.2006;571.

⁴⁰ Anthony RM, Wermeling F, Ravetch JV. Novel roles for the IgG Fc glycan. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1253:170-80.

⁴¹ Masuda K, Kubota T, Kaneko E, Iida S, Wakitani M, Kobayashi-Natsume Y et al. Enhanced binding affinity for FcγRIIIa of fucose-negative antibody is sufficient to induce maximal antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Mol Immunol*. 2007;44(12):3122-31.

⁴² Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol*. 2007;96:179-204.

⁴³ Anthony RM, Wermeling F, Ravetch JV. Novel roles for the IgG Fc glycan. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1253:170-80.

⁴⁴ 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(3):443-53.

⁴⁵ Das T, Sen AK, Kempf T, Pramanik SR, Mandal C, Mandal C. Induction of glycosylation in human C-reactive protein under different pathological conditions. *Biochem J*. 2003;373(Pt 2):345- 355.

⁴⁶ Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Disease Markers* 2008;25: 267-278.

- ⁴⁷ Novokmet M, Lukić E, Vučković F, Đurić Ž, Keser T, Rajšl K, Remondini D, Castellani G, Gašparović H, Gornik O, Lauc G. Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation. *Scientific reports* 2014;4: 4347.
- ⁴⁸ Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 2006;313:670-673.
- ⁴⁹ Gornik O, Pavic T, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins - implications on evolution and disease. *Biochim BiophysActa* 2012;1820:1318–1326.
- ⁵⁰ Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019. [Epub ahead of print].
- ⁵¹ Saldova R, Asadi Shehni A, Haakensen VD, Steinfeld I, Hilliard M, Kifer I et al. Association of N-glycosylation with breast carcinoma and systemic features using high-resolution quantitative UPLC. *J Proteome Res.* 2014;13(5):2314-27.
- ⁵² Pucić M, Knezević A, Vidic J, Adamczyk B, Novokmet M, Polasek O et al. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10(10):M111.010090.
- ⁵³ Oberhofer D, Juras J, Pavičić AM, Rančić Žurić I, Rumenjak V. Comparison of C-reactive protein and procalcitonin as predictors of postoperative infectious complications after elective colorectal surgery. *Croat Med J* 2012;53:612–19
- ⁵⁴ Uusitalo-Seppälä R, Koskinen P, Leino A, Peuravuori H, Vahlberg T, Rintala EM. Early detection of severe sepsis in the emergency room: diagnostic value of plasma C-reactive protein, procalcitonin, and interleukin-6. *Scand J Infect Dis.* 2011;43:883-90.
- ⁵⁵ Giaccaglia V, Salvi PF, Antonelli MS, Nigri G, Pirozzi F, Casagrande et al. Procalcitonin Reveals Early Dehiscence in Colorectal Surgery: The PREDICS Study. *Ann Surg* 2016;263:967-72.

- ⁵⁶ Andersson B, Ansari D, Nordén M, Nilsson J, Andersson R. Surgical Stress Response After Colorectal Resection. *Int Surg* 2013;98:292–299.
- ⁵⁷ Sparreboom CL, Wu Z, Dereci A, Boersema GSA, Menon AG, Ji J et al. Cytokines as Early Markers of Colorectal Anastomotic Leakage: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterol Res Pract* 2016;2016:11.
- ⁵⁸ Reisinger KW, Poeze M, Hulsewé KW, van Acker BA, van Bijnen AA, Hoofwijk AG et al. Accurate prediction of anastomotic leakage after colorectal surgery using plasma markers for intestinal damage and inflammation. *J Am Coll Surg* 2014;219:744-51.
- ⁵⁹ Rivera-Chavez FA, Minei JP. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 is an early marker of infection in the surgical intensive care unit. *Surg Infect (Larchmt)* 2009;10:435-9.
- ⁶⁰ Kofoed K, Andersen O, Kronborg G, Tvede M, Petersen J, Eugen-Olsen J et al. Use of plasma C-reactive protein, procalcitonin, neutrophils, macrophage migration inhibitory factor, soluble urokinase-type plasminogen activator receptor, and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in combination to diagnose infections: a prospective study. *Crit Care*. 2007;11(2):R38.
- ⁶¹ Dupuy AM, Philippart F, Péan Y, Lasocki S, Charles PE, Chalumeau M, et al. Role of biomarkers in the management of antibiotic therapy: an expert panel review: I - currently available biomarkers for clinical use in acute infections. *Ann Intensive Care*. 2013;3:22.
- ⁶² Hasibeder A, Stein P, Brandwijk R, Schild H, Radsak MP. Evaluation and Validation of the Detection of soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1 by Enzyme-linked immunosorbent Assay. *Sci Rep* 2015;5:15381.
- ⁶³ Lemarié J, Barraud D, Gibot S. Host response biomarkers in sepsis: overview on sTREM-1 detection. *Methods Mol Biol*. 2015;1237:225-39

- ⁶⁴ Determann RM, Weisfelt M, de Gans J, van der Ende A, Schultz MJ, van de Beek D. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1: a biomarker for bacterial meningitis. *Intensive Care Med.* 2006;32:1243-7.
- ⁶⁵ Su L, Han B, Liu C, Liang L, Jiang Z, Deng J et al. Value of soluble TREM-1, procalcitonin, and C-reactive protein serum levels as biomarkers for detecting bacteremia among sepsis patients with new fever in intensive care units: a prospective cohort study. *BMC Infect Dis.* 2012;12:157.
- ⁶⁶ Wu Y, Wang F, Fan X, Bao R, Bo L, Li J et al. Accuracy of plasma sTREM-1 for sepsis diagnosis in systemic inflammatory patients: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2012;16:R229
- ⁶⁷ Lin CH, Hsieh SC, Keng LT, Lee HS, Chang HT, Liao WY et al. Prospective Evaluation of Procalcitonin, Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 and C-Reactive Protein in Febrile Patients with Autoimmune Diseases. *PLoS One* 2016;11:e0153938.
- ⁶⁸ Ni Choileain N, Redmond HP. Cell response to surgery. *Arch Surg* 2006;141:1132-40.
- ⁶⁹ Stoppelkamp S, Veseli K, Stang K, Schlensak C, Wendel HP Walker T. Identification of Predictive Early Biomarkers for Sterile-SIRS after Cardiovascular Surgery. *PLoS One.* 2015; 10(8): e0135527.
- ⁷⁰ Gámez-Díaz LY, Enriquez LE, Matute JD, Velásquez S, Gómez ID, Toro F, et al. Diagnostic accuracy of HMGB-1, sTREM-1, and CD64 as markers of sepsis in patients recently admitted to the emergency department. *Acad Emerg Med.* 2011;18(8):807-15.
- ⁷¹ Zhang J, She D, Feng D, Jia Y, Xie L. Dynamic changes of serum soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) reflect sepsis severity and can predict prognosis: a prospective study. *BMC Infect Dis.* 2011;11:53.
- ⁷² Lippi G. Sepsis biomarkers: past, present and future. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(9): 1281–3.

- ⁷³ Gornik O, Wagner J, Pucić M, Knezević A, Redzic I, Lauc G. Stability of *N*-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology*. 2009;19(12):1547-53.
- ⁷⁴ Knezević A, Polasek O, Gornik O, Rudan I, Campbell H, Hayward C. Variability, heritability and environmental determinants of human plasma *N*-glycome. *J Proteome Res*. 2009;8(2):694-701.
- ⁷⁵ Duvillard L, Ortega-Deballon P, Bourredjem A, Scherrer ML, Manton G, Delhomme JB et al. A case-control study of pre-operative levels of serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin and other potential inflammatory markers in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2014;14:912.
- ⁷⁶ Guthrie GJ, Roxburgh CS, Horgan PG, McMillan DC. Does interleukin-6 link explain the link between tumour necrosis, local and systemic inflammatory responses and outcome in patients with colorectal cancer? *Cancer Treat Rev* 2013;39:89-96.
- ⁷⁷ Mazur M, Eder P, Kołodziejczak B, Sobieska M, Krela-Kaźmierczak I, Grzymisławski M. Long-term prognostic utility of selected acute phase proteins in colorectal cancer. *Pol Arch Intern Med*. 2019;129(4):292-294.
- ⁷⁸ Vučković F, Theodoratou E, Thaçi K, Timofeeva M, Vojta A, Štambuk J et al. IgG Glycome in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2016;22(12):3078-86
- ⁷⁹ Zhang Z, Wuhler M, Holst S. Serum sialylation changes in cancer. *Glycoconj J*. 2018;35(2):139-160
- ⁸⁰ Kalff JC, Buchholz BM, Eskandari MK, Hierholzer C, Schraut WH, Simmons RL et al. Biphasic response to gut manipulation and temporal correlation of cellular infiltrates and muscle dysfunction in rat. *Surgery*. 1999;126(3):498-509.
- ⁸¹ Miwa HE, Song Y, Alvarez R, Cummings RD, Stanley P. The bisecting GlcNAc in cell growth control and tumor progression. *Glycoconj J*. 2012;29(8-9):609-18.

- ⁸² Van Dijk W, Brinkman-Van der Linden EC, Havenaar EC. Occurrence and possible function of inflammation-induced expression of sialyl Lewis-x on acute-phase proteins. *dv Exp Med Biol.* 1998;435:145-50.
- ⁸³ Brinkman-van der Linden EC, de Haan PF, Havenaar EC, van Dijk W. Inflammatio*N*-induced expression of sialyl LewisX is not restricted to alpha1-acid glycoprotein but also occurs to a lesser extent on alpha1-antichymotrypsin and haptoglobin. *Glycoconj J.* 1998;15(2):177-82.
- ⁸⁴ Harazono A, Kawasaki N, Itoh S, Hashii N, Ishii-Watabe A, Kawanishi T et al. Site-specific *N*-glycosylation analysis of human plasma ceruloplasmin using liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2006;348(2):259-68.
- ⁸⁵ Hwang H, Lee JY, Lee HK, Park GW, Jeong HK, Moon MH, et.al. IN-depth analysis of site-specific *N*-glycosylation in vitronectin from human plasma by tandem mass spectrometry with immunoprecipitation. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(30):7999-8011.
- ⁸⁶ Clerc F, Reiding KR, Jansen BC, Kammeijer GS, Bondt A, Wuhrer M. Human plasma protein *N*-glycosylation. *Glycoconj J.* 2016;33(3):309-43.
- ⁸⁷ Đerek L, Servis D, Unić A. Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 and Inflammatory Markers in Colorectal Cancer Surgery: A Prospective Cohort Study. *Chin Med J (Engl).* 2017;130(22):2691-2696.
- ⁸⁸ Ohzato H, Yoshizaki K, Nishimoto N, Ogata A, Tagoh H, Monden M et al. Interleuki*N*-6 as a new indicator of inflammatory status: detection of serum levels of interleuki*N*-6 and C-reactive protein after surgery. *Surgery.* 1992;111(2):201-9.
- ⁸⁹ Cruickshank AM, Fraser WD, Burns HJ, Van Damme J, Shenkin A. Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. *Clin Sci (Lond).* 1990;79(2):161-5.

- ⁹⁰ Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM, Fischer PB, Dwek RA, Sim RB. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat Med.* 1995;1(3):237-43.
- ⁹¹ Nimmerjahn F, Anthony RM, Ravetch JV. Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for in vivo activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(20):8433-7.
- ⁹² Kronimus Y, Dodel R, Galuska SP, Neumann S. IgG Fc N-glycosylation: Alterations in neurologic diseases and potential therapeutic target? *J Autoimmun.* 2019;96:14-23.
- ⁹³ Liu D, Zhao Z, Wang A, Ge S, Wang H, Zhang X et al. Ischemic stroke is associated with the pro-inflammatory potential of N-glycosylated immunoglobulin G. *J Neuroinflammation.* 2018;15(1):123.
- ⁹⁴ Gonzalez-Quintela A, Alende R, Gude F, Campos J, Rey J, Mejjide LM et al. Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clin Exp Immunol.* 2008;151(1):42-50.

7. POPIS KRATICA

2-AB - 2-aminobenzenamid

ADCC - stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima

Asn - asparagin

CRP - C-reaktivni protein

CV – koeficijent varijacije

ECLIA - elektrokemiluminiscencija

ELISA - “Sandwich“ enzimmuno analiza u tekućoj fazi

EU - jedinica emisije

Fab - fragment koji veže antigen (engl. fragment antigen binding)

Fc - fragment koji kristalizira

HILIC-UPLC - tekućinska kromatografija izuzetno visoke djelotvornosti koja se zasniva na hidrofилnim interakcijama

HRP - peroksidaza iz hrena (engl. horse raddish peroxidase)

HSP 70 - protein toplinskog šoka 70 (engl. heat shock protein 70)

IgG - imunoglobulin G

IL-1 - interleukin 1

IL-6 - interleukin 6

MBL- manosa-vezujući lektin (engl. manose binding lectin)

N-GlcNAc - N-acetilglukozamin

pCO₂ – parcijalni tlak ugljičnog dioksida

PCT - prokalcitonin

PNGazaF - peptidil-N-glikozidaza F

SDS - natrijev dodecil sulfat

Ser - serotonin

SIRS - sindrom sistemskog upalnog odgovora

SPE - ekstrakcija na suhoj fazi

sTREM-1 - topljivi okidajući receptor eksprimiran na mijeloičnim stanicama

TLR - "toll-like" receptor

TMB - 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin

TNF α - faktor nekroze tumora-alfa

TNM - TNM klasifikacija malignih tumora (T=tumor, N=okolni limfni čvorovi, M=udaljene metastaze)

TREM-1 - receptor stanica mijeloidne loze-1

8. ŽIVOTOPIS

Lovorka Đerek rođena je 31.7.1978. godine u Zagrebu gdje je pohađala osnovnu školu i VII gimnaziju. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 1996. godine. Diplomirala je 2002. godine stekavši zvanje diplomiranog inženjera medicinske biokemije. Nakon pripravničkog staža, 2003. godine zaposlila se u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava gdje je radila do 2015. godine. Specijalistički ispit iz medicinske biokemije položila je 2009. godine stekavši zvanje specijalista medicinske biokemije. Od 2015-2016. godine radila je u Kliničkom zavodu za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur a od 2016. godine do danas radi u Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice. Aktivni je član Hrvatske komore medicinskih biokemičara(HKMB) i Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku dijagnostiku (HDMBLM).

Aktivno je sudjelovala na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova. Autor je i koautor 10 znanstvenih članaka objavljenih u časopisima indeksiranim u *Current Contents* i *Web of Science Core Collection*, 4 znanstvena članka u ostalim časopisima te je autor i koautor 26 sažetaka kongresnih priopćenja objavljenim u časopisima s međunarodnom recenzijom te 2 sažetaka i kongresna priopćenja objavljena u knjigama sažetaka Simpozija Lokus.

Znanstveni radovi u časopisima indeksiranim u Current Contents (CC)

1. Jurin I, Paić F, Bulimbašić S, Rudež I, Đerek L, Jurin H, Knežević A, Starčević B, Ajduk M. Association between Circulatory and Plaque Resistin Levels with Carotid Plaque Instability and Ischemic Stroke Events. *The Heart Surgery Forum* #2018-2071 21 (6), 2018 [Epub November 2018] doi: 10.1532/HSF98.20182071
2. Đerek L, Servis D, Unić A. Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 and Inflammatory Markers in Colorectal Cancer Surgery: A Prospective Cohort Study. *Chin Med J (Engl)*. 2017 20;130(22):2691-2696.
3. Unić A, Derek L, Duvnjak M, Patrlj L, Rakić M, Kujundžić M, Renjić V, Štoković N, Dinjar P, Jukic A, Grgurević I. Diagnostic specificity and sensitivity of PIVKII, GP3, CSTB, SCCA1 and HGF for the diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Ann Clin Biochem*. 2017; 1:4563217726808. [Epub ahead of print]

4. Tešija Kuna A, Đerek L, Kozmar A, Drvar V. Current practice in laboratory diagnostics of autoimmune diseases in Croatia. Survey of the Working group for laboratory diagnostics of autoimmune diseases of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. *Biochemia Medica* 2016;26(3):376-94
5. Gudelj I, Baciarello M, Ugrina I, De Gregori M, Napolioni V, Ingelmo PM, Bugada D, De Gregori S, Đerek L, Pučić-Baković M, Novokmet M, Gornik O, Saccani Jotti G, Meschi T, Lauc G, Allegri M. Changes in total plasma and serum *N*-glycome composition and patient-controlled analgesia after major abdominal surgery. *Sci Rep.* 2016;6:31234.
6. Vučković F, Theodoratou E, Thaçi K, Timofeeva M, Vojta A, Štambuk J, Pučić-Baković M, Rudd PM, Đerek L, Servis D, Wennerström A, Farrington SM, Perola M, Aulchenko Y, Dunlop MG, Campbell H, Lauc G. IgG Glycome in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2016; [Epub ahead of print]
7. Sicaja M, Pehar M, Derek L, Starcevic B, Vuletic V, Romić Z, Božikov V. Red blood cell distribution width (RDW) as a prognostic marker in patients on chronic dialysis. *CMJ* 2013; 54(1). 25-32.
8. Serdar T, Derek L, Unic A, Marijancevic D, Markovic D, Primorac A, Petroveckí M. Occupational exposures in healthcare workers in University Hospital Dubrava--10 year follow-up study. *Cent Eur J Public Health.* 2013; 21(3):150-4
9. Cepnija M, Derek L, Unic A, Blazev M, Fistončić M, Kozaric-Kovacic D, Franić M, Romić Z. Oxidative stress markers in patients with post-traumatic stress disorder. *Coll Antropol.* 2011;35(4):1155-60.
10. Romić Z, Derek L, Burek V, Unic A, Serdar T, Marijancevic D, Morovic Vergles J, Mitrovic J, Petroveckí M. Anty-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in HIV positive patients: *Rheumatol Int.* 2011;31:1607-1610.
11. Romić Z, Unic A, Derek L, Zivkovic M, Marijancevic D, Kes P, Pehar M. Anti citrullinated protein antybody in patients with end stage renal disease on hemodialysis. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(8):959-962

Znanstveni radovi u drugim časopisima

1. Unic A, Derek L, Hodak N, Marijancevic D, Cernja M, Serdar T, Krhac M, Romic Z. Endothelins - clinical perspectives. *Biochem Med.* 2011; 21:231-242.
2. Romic Z, Unic A, Derek L , Pehar M. Biokemijski biljezi u dijagnostici akutnog koronarnog sindroma. *Acta Med Croatica* 2009;63:15-19
3. Derek L, Zivkovic M, Hasperger D, Juricek J, Romic Z. Usporedba reagensa Pathromtin SL, Dade Actin FS i STA Cephascreen za određivanje aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena. *Biochem Med.* 2008;18:81-87
4. Mayer Lj, Romic Z, Juricek J, Derek L. Praćenje promjena koncentracija TAS-a, urata i transferina u serumu bolesnika nakon ugradnje prenosnica. *Biochem Med.* 2003;13:33-38

Posterski radovi na domaćim i stranim kongresima:

1. Lovorka Đerek, Andrea Tešija Kuna, Milena Njegovan, Ines Vukasović. Verification of the new chemiluminescent immunoassay for DFS protein 70 antibodies (anti-DFS70). 14th Dresden Symposium on autoantibodies. Dresden, Njemačka, 2019.
2. Lovorka Đerek, Adriana Unić, Jasna Juriček, Nevenka Stančin. Usefulness of superoxide dismutase in assessing the severity of colorectal cancer surgery - 9. kongres Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM) s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, Hrvatska, 2018.
3. Milena Njegovan, Lovorka Đerek, Ines Vukasović, Andrea Tešija Kuna. Verification of the new chemiluminescent immunoassay for tissue transglutaminase IgA antibodies (anti-tTG IgA) 9. kongres Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM) s međunarodnim sudjelovanjem, 09.-12. svibnja 2018.
4. Milena Njegovan, Andrea Tešija Kuna, Ines Vukasović, Lovorka Đerek. Verification of the new chemiluminescent screen test for antibodies targeting extractible nuclear antigens (ENA). 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, Portugal, 16-20.5.2018

5. Milena Njegovan, Andrea Tešija Kuna, Ines Vukasović, Lovorka Đerek. Verification of the new chemiluminescent anti-dsDNA method. 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, Portugal, 16-20.5.2018
6. Andrea Tešija Kuna, Ines Vukasović, Milena Njegovan, Lovorka Đerek, Nada Vrkić. Comparison of anti-DFS70 reactivity with the line immunoassay and ELISA and concordance with dense fine speckled fluorescence pattern on Hep-2 cells. 13th Dresden Symposium on autoantibodies. Dresden, Njemačka, 2017.
7. Lovorka Đerek, Vedrana Drvar, Lidija Bilić-Zulle, Mladen Petrovečki. Precision verification of ANCA immunodot assay. 10th International Congress on Autoimmunity, Leipzig, Njemačka, 2016.
8. Vedrana Drvar, Lovorka Đerek, Lidija Bilić-Zulle, Mladen Petrovečki. Detection of ANCA in patients suspected for diagnosis of systemic vasculitis using different types of assays. 10th International Congress on Autoimmunity, Leipzig, Njemačka, April 2016
9. Lovorka Đerek, Nevenka Stančin, Adriana Unić. Verification of Chromogranin A test. 15th EFLM Continuing Postgraduate Course in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine in Zagreb, Hrvatska, 2015
10. Lovorka Đerek, Andrea Radeljak, Sonja Perkov. Performance Verification of ClinRep HPLC method for Mycophenolic Acid. 15th EFLM Continuing Postgraduate Course in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine in Zagreb, Hrvatska, 2015
11. Lovorka Đerek, Andrea Tešija Kuna, Ana Kozmar, Vedrana Drvar. Insight in antinuclear antibodies (ANA) determination in Croatia – survey results of Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine (CSMBLM) working group for guidelines in laboratory diagnosis of autoimmune diseases. 8th Croatian congress of medical biochemists with international participation, Rijeka, Hrvatska 2015
12. Adriana Unić, Lovorka Đerek, Nevenka Stančin. Comparison of quality of laboratory processes for Troponin I determination. 2nd European Joint Congress of EFCC and UEMS: Laboratory Medicine at the Clinical Interface, Dubrovnik, Hrvatska, 2012

13. Derek L, Servis D, Unic A, Juricek J, Romić Z. Usefulness of inflammatory markers in assessing the severity of colorectal cancer surgery. 2nd European Joint Congress of EFCC and UEMS: Laboratory Medicine at the Clinical Interface, Dubrovnik, Hrvatska, 2012
14. Unic A, Derek L, Marijancevic D, Serdar T, Romić Z Analytical performance of tumor markers on UniCel DxI 600 using Sigma metrics. 2nd European Joint Congress of EFCC and UEMS: Laboratory Medicine at the Clinical Interface, Dubrovnik, Hrvatska, 2012
15. T. Jendricko, J. Vincelj, A. Alegić Karin, L. Đerek, G. Oremovic, D. Kozarić-Kovacic. Development of mental disorders in patients with acute coronary syndromes: longitudinal study. 9th Congress of the Croatian Cardiac Society, Opatija, Hrvatska, 2012.
16. Romić Z, Ceprnja M, Derek L, Unic A, Serdar T, Marijancevic D. Oxidized DNA in patients with post-traumatic stress disorder. 21st International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 19th IFCC-EFCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 8th Annual Meeting of the German Society of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Berlin, Njemačka, 2011
17. Ceprnja M, Unic A, Derek L, Zivkovic M, Romić Z. Comparison of The Erythrocyte Sedimentation Rate Measured By The Two Automated Analyzers And Conventional Westergren Method. 1st European Joint Congress of EFCC and UEMS, Lisbon, Portugal, from 13th to 16th October 2010
18. Juricek J, Derek L, Unic A, Serdar T, Marijancevic D, Zivkovic M, Romić Z. Analytical evaluation of the clinical chemistry analyzer Olympus AU2700 plus 6th Croatian congress of medical biochemists with international participation, Supetar, Brač, Hrvatska 2009
19. Đerek L, Unić A, Juriček J, Marijančević D, Romić Ž. Koncentracije humanog fetuina-A kod bolesnika na hemodijalizi. 6th Croatian congress of medical biochemists with international participation, Supetar, Brač, Hrvatska 2009
20. Unić A, Đerek L, Stančin N, Serdar T, Šprajc N, Romić Ž. Usporedba CA 19-9, CEA i AFF na analizatorima Vitros Eci i Cobas e411. 6th Croatian congress of medical biochemists with international participation, Supetar, Brač, Hrvatska 2009

21. Romić Ž, Unić A, Đerek L, Živković M, Marijančević D, Serdar T. Protutijela na ciklički citrulinski protein i reumatoidni faktor u bolesnika s kroničnom bubrežnom insuficijencijom na hemodijalizi. 6th Croatian congress of medical biochemists with international participation, Supetar, Brač, Hrvatska, 2009
22. Romić Ž, Đerek L, Vitunjski-Englert B, Jeren B, Živković M, Juriček J, Šprajc N. Human fetuin-A in hemodialysed patients – a predictor of cardiovascular complications due to metastatic calcifications. 17th IFCC - FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Amsterdam, Nizozemska, 2007
23. Živković M., Đerek L., Vukelić D., Juriček J., Romić Ž. Usporedba PV, APTV, TV, i fibrinogena na koagulacijskim analizatorima BCS i STA Compact. 5th Croatian congress of medical biochemists with international participation, Poreč, Hrvatska, 2006
24. Đerek L., Živković M., Hašperger D., Šprajc N., Radovčić M., Romić Ž. Korelacija APTV određenog reagensima Pthrombin SL i Dade Actin FS na analizatoru BCS i reagensom STA Cephascreen na analizatoru STA Compact. 5th Croatian congress of medical biochemists with international participation, Poreč, Hrvatska 2006
25. Romić Z, Vucak-Novosel L, Mayer Lj, Đerek L, Vrca A, Lovrecek J, Vitunjski Englert B. Total and LDL Cholesterol, Oxidised LDL and Homocysteine in the acute phase after stroke

16th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine EUROMEDLAB 2005, Glasgow, Ujedinjeno kraljevstvo, 2005.
24. Grubišić-Ilić M, Jendričko T, Peraica T, Đerek L, Kozarić-Kovačić D. Razina homocisteina u bolesnika koji su razvili PTSP uzrokovan ratnom traumom. Drugi hrvatski kongres o psihofarmakoterapiji s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, Hrvatska, 2005
25. Jendričko T, Peraica T, Đerek L, Kovačić-Kozarić D. Razina protutijela na oksidirani LDL kod bolesnika s postraumatskim stresnim poremećajem uzrokovanim ratnom traumom. Drugi hrvatski kongres o psihofarmakoterapiji s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, Hrvatska 2005

26. Mayer Lj, Romić Z, Juricek J, Sprajc N, Radovčić M, Derek L. hsCRP – Predictor of the development of Coronary Disease in Hemodialysed Patients. 4th International Swiss MedLab and 8th Alps Adria Congress, Luzern, Švicarska, 2004

Posterski sažeci objavljeni u knjigama sažetaka simpozija Lokus

1. Nevenka Stančin, Lovorka Đerek, Marcela Živković, Jasna Juriček, Adriana Unić. Usporedna metoda za troponin I – financijska isplativost vs. dobra laboratorijska praksa. Simpozij Lokus, Tuhelj, 2016
2. Đerek L., Unić A, Stančin N: Je li opravdano analizirati ionizirani kalcij iz seruma? Simpozij Lokus, Lošinj, travanj 2015

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

PROMJENE KONCENTRACIJA PROTEINA AKUTNE FAZE I GLIKOZILACIJE SERUMSKIH PROTEINA KOD AKUTNE SISTEMSKE UPALE NAKON RADIKALNE RESEKCIJE KOLONA

LOVORKA ĐEREK

Radikalna resekcija kolona dovodi do procesa akutne upale i sindroma sistemskog upalnog odgovora (*engl. systemic inflammatory response syndrome, SIRS*). Razina i uzrok SIRS-a nastalog operativnim zahvatima prati se porastom koncentracije proteina akutne faze koji ukazuju na uzrok i tijek upalnog procesa. Sam tijekom i individualni odgovor na akutnu upalu nisu u potpunosti razjašnjeni. Upravo zato u ranoj poslijeoperativnoj fazi sve veću važnost ima i praćenje promjena glikozilacije gdje su utvrđene velike individualne razlike u odgovoru na akutnu sistemsku upalu. Cilj istraživanja je bio ispitati učinak radikalne resekcije kolona na razvoj SIRS-a praćenjem promjena koncentracije sTREM -1, IL-6, prokalcitonina i CRP-a te promjena glikozilacije ukupnih proteina seruma i IgG-a u definiranim točkama mjerenja čime bi se definirala međuovisnost procesa akutne upale i razvoja SIRS-a sa specifičnim promjenama u glikomu i koncentracijama proteina akutne faze.

U istraživanje je uključeno 28 ispitanika (19 muškaraca i 9 žena) medijana dobi 71 godina (44-85) s dijagnozom kolorektalnog karcinoma koji su podvrgnuti radikalnoj resekciji kolona otvorenog tipa. Uzorci krvi uzorkovani su u četiri vremenske točke: 1 dan prije operacije (T0), 24 sata poslije operacije (T1), 48 sati poslije operacije (T2) i 7 dana poslije operacije (T3) kako bi se obuhvatio i akutni odgovor na kirurški stres, ali i popratilo jenjavanje upale ili produljena reakcija na kirurški stres.

Rezultati ovog rada pokazali su statistički značajne promjene sTREM-1, CRP-a, PCT-a i IL-6 kao i *N*-glikanskih profila ukupnih proteina seruma i *N*-glikanskih profila IgG-a prije operacije te tijekom 7 dana poslijeoperativnog praćenja ispitanika. Također su utvrđene korelacije IL-6 kao i određenih glikanskih struktura *N*-glikanskih profila ukupnih proteina seruma i *N*-glikanskih profila IgG-a s duljinom trajanja operacije. Korelacijskom analizom i linearnom regresijom ispitana je povezanost koncentracija proteina akutne faze s promjenama *N*-glikanskih profila te su nađene slabe do vrlo dobre korelacije CRP-a, IL-6 i PCT sa specifičnim strukturama od kojih je najjasnija bila korelacija CRP-a s tetragalaktoziliranom i sijaliniziranom strukturom s antenarnom fukozom. sTREM-1 nije pokazao značajnu korelaciju s niti jednim drugim ispitivanim biljgom.

Ovo je istraživanje pokazalo da radikalna resekcija kolona ne dovodi nužno do SIRS-a, a da se tijekom i dinamika upale kao odgovora na kirurški stres može pratiti porastom koncentracija proteina akutne faze, pri čemu promjena koncentracija sTREM-1 može ukazati da nije došlo do razvoja SIRS-a. Također se razjasnilo da glikanski profili pokazuju vrlo jasne obrasce promjena koji se mogu povezati s promjenama koncentracija proteina akutne faze te bi se njihovim daljnjim izučavanjem otvorila mogućnost korištenja dobivenih podataka glikanskih profila u svrhu individualnog i sveobuhvatnog praćenja ranog upalnog odgovora.

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

Rad sadrži: 85 stranica, 9 slika, 10 tablica i 94 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: resekcija kolona, odgovor akutne faze, SIRS, glikozilacija

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

Povjerenstvo: izv.prof.dr.sc. Sanja Dabelić, izv.prof.dr.sc. Dunja Rogić, prof.dr.sc. Neven Ljubičić

Rad je prihvaćen: 20.12.2019

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral thesis

CHANGES IN ACUTE PHASE PROTEINS CONCENTRATIONS AND SERUM PROTEINS GLYCOSYLATION IN ACUTE SYSTEMIC INFLAMMATION AFTER RADICAL COLON RESECTION

LOVORKA ĐEREK

Colorectal cancer surgery, as well as all severe surgical procedures, lead to strong acute phase response and systemic inflammatory response syndrome (SIRS). The extent and the cause of SIRS are monitored with acute phase proteins that point to the cause and course of inflammatory process. The course and the individual response to acute inflammation are not completely understood. In early postoperative phase there is also an increasing importance in monitoring glycosylation changes, where large individual differences have been identified in acute systemic inflammation response. The aim of this study was to test the effect of radical colon resection on SIRS development by monitoring soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1), interleukin-6 (IL-6), procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP), as well as the changes in *N*-glycosylation profiles of total serum proteins and immunoglobulin G (IgG) in defined points of measurement that would define interdependence of acute inflammatory process and SIRS development with specific glycome and acute phase proteins changes.

This study included 28 participants (19 men and 9 women) with a median age of 71 years (44-85) and with colorectal cancer diagnosis that underwent radical colon resection. Blood samples were collected in 4 measurement points: 24 hours before the surgery (T0), 24 hours after the surgery (T1), 48 hours after the surgery (T2) and 7 days after the surgery in order to define acute response to surgical stress, as well as to define the decrease of inflammations or notice the extended reaction to surgical stress.

The results showed statistically significant differences of sTREM-1, CRP, IL-6 and PCT, as well as changes in *N*-glycan profiles of total serum proteins and IgG before the surgery and during 7 days of postoperative recovery. Significant correlations for IL-6, as well as some *N*-glycan structures of total serum proteins and IgG, were discovered with the duration of the surgery. Correlation and linear regression analysis revealed weak, moderate and very good correlations between CRP, IL-6, PCT and *N*-glycan profiles of total serum proteins and IgG. The strongest discovered correlation was the very good correlation of CRP with tetragalactosylated and sialinised structure with antennary fucose. sTREM-1 did not reveal any significant correlation with any other tested parameter.

This study showed that radical colorectal cancer surgery does not necessarily lead to SIRS and the course and dynamics of inflammation as the response to surgical stress can be followed by the rise of the acute phase proteins. Changes of sTREM-1 concentrations can indicate that there is no SIRS development. This study also clarified that glycan profiles show very distinct change patterns that can be related to the acute phase proteins concentrations changes. Further research of the glycan profiles could open up the possibility of using the acquired data for individual monitoring of the early inflammatory response.

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

Thesis includes: 85 pages, 9 figures, 10 tables and 94 references. Original is in Croatian language.

Keywords: colon resection, acute phase response, SIRS, glycosylation

Supervisors: Professor Gordan Lauc, Ph.D.

Reviewers: Assoc. Prof. Sanja Dabelić Ph.D., Assoc. Prof. Dunja Rogić, Ph.D., Professor Neven Ljubičić, Ph.D.

Accepted: 20.12.2019