

Analiza podataka koncentracija serumskog kalprotektina i CRP-a kod COVID-19 bolesnika

Butorac, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:163:901100>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-20**



Repository / Repozitorij:

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



Lucija Butorac

**Analiza podataka koncentracija serumskog
kalprotektina i CRP-a kod COVID-19 bolesnika**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju „Imunokemija“ Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, a izrađen u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Anite Somborac Bačura i suvoditeljstvom dr. sc. Lovorke Đerek, spec. medicinske biokemije.

Zahvaljujem se dr. sc. Lovorki Đerek i doc. dr. sc. Aniti Somborac Bačura na strpljenju, podršci i svim savjetima pruženim tijekom izrade ovog diplomskog rada te mr. sc. Nevenki Stančin na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

Od srca se zahvaljujem Mami, Tati i Bratu za sve, malo i veliko. Za to što su uvijek bili uz mene, pružali mi najveću podršku i imali strpljenja kada je to bilo potrebno.

Hvala mojim Prijateljicama i mojim Biokemičarkama na svim sretnim trenucima, na razumijevanju, savjetima i motivaciji.

I na kraju, hvala Rođenima koji su vjerovali u mene.

SADRŽAJ

1	UVOD	4
1.1	COVID-19	4
1.1.1	SARS-CoV-2	4
1.1.2	PATOFIZIOLOGIJA COVID-19	6
1.2	KALPROTEKTIN	9
1.2.1	KALPROTEKTIN U UPALNIM STANJIMA	11
1.2.2	SERUMSKI KALPROTEKTIN	13
1.3	C-REAKTIVNI PROTEIN	14
1.3.1	CRP I COVID-19	17
2	OBRAZLOŽENJE TEME	18
3	MATERIJALI I METODE	19
3.1	UZORCI	19
3.2	IMUNOTURBIDIMETRIJA	20
3.3	SERUMSKI KALPROTEKTIN	22
3.3.1	NAČELO ANALIZE	22
3.3.2	POTREBNA OPREMA I REAGENSI	22
3.3.3	LABORATORIJSKI PROCES	23
3.3.4	REFERENTNI INTERVALI	23
3.3.5	VERIFIKACIJA	24
3.4	CRP	25
3.4.1	NAČELO ANALIZE	25
3.4.2	REFERENTNI INTERVALI	25
3.5	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	26
4	REZULTATI	27
5	RASPRAVA	32
6	ZAKLJUČCI	34
7	POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	35
8	LITERATURA	37
9	SAŽETAK	41

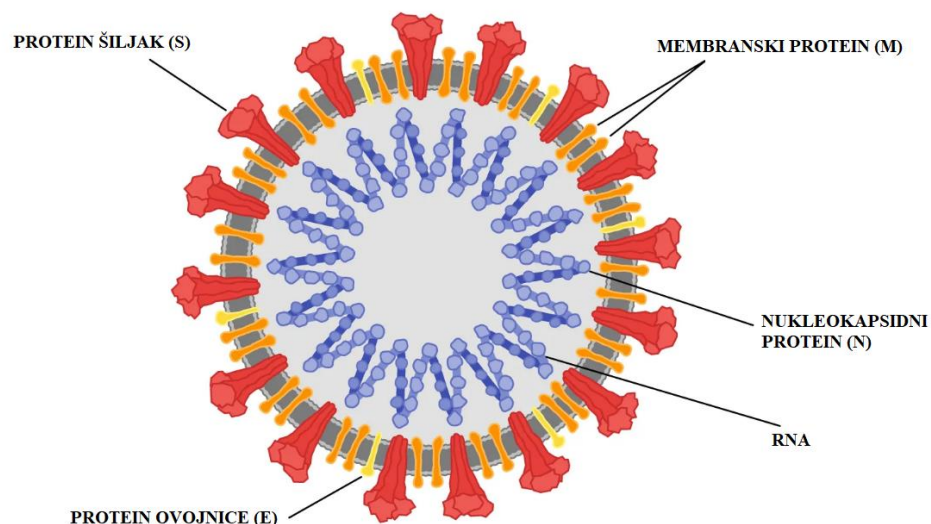
1 UVOD

1.1 COVID-19

COVID-19 (engl. *coronavirus disease 2019*) je bolest čiji su prvi slučajevi zabilježeni krajem 2019. u Kini. Uzorkovana je virusom SARS-CoV-2 (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) (Kunnumakkara i sur., 2021). 21. ožujka 2020. proglašena je pandemija bolesti COVID-19 (<https://www.who.int/>).

1.1.1 SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 je jednolančani RNA virus, prenosi se aerosolom s čovjeka na čovjeka i pripada obitelji koronavirusa (*Coronaviridae*). Obitelji koronavirusa pripadaju dvije skupine, a to su SARS-CoV (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*) i MERS-CoV (engl. *Middle East Respiratory Syndrom Coronavirus*). Prvi slučaj zaraze SARS-CoV je zabilježen u Kini 2002., a MERS-CoV 2012. u Saudijskoj Arabiji (Tay i sur., 2020).



Slika 1: Struktura virusa SARS-CoV-2 (preuzeto i prilagođeno prema www.britannica.com uz dopuštenje izdavača).

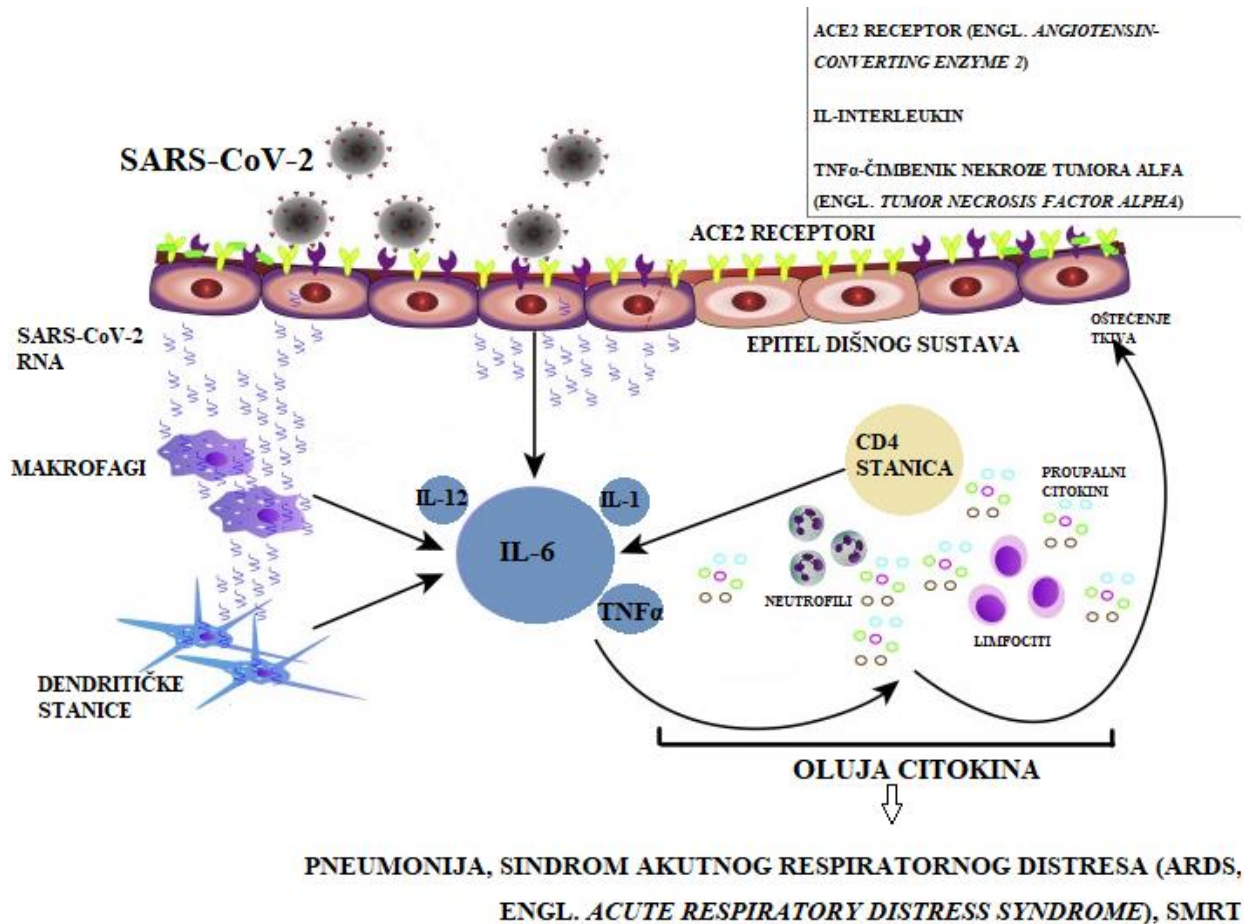
SARS-CoV-2 sadrži 4 strukturalna proteina (S, E, M i N) i 16 nestrukturalnih proteina (nsp1-16) (*Slika 1*). N protein je nukleokapsidni protein koji oblikuje kapsidu oko genoma. Na ovojnici virusa se nalaze još tri strukturalna proteina, a to su membranski protein (M), protein šiljak (engl. *spike protein*, S) i protein ovojnice (engl. *envelope*, E). Nestrukturalni proteini sudjeluju u replikaciji i transkripciji. Protein šiljak je glikoprotein koji se sastoji od dvije podjedinice, S1 i S2. Ulazak virusa u stanicu domaćina je reguliran proteinom šiljkom. S1 podjedinica se veže na stanicu domaćina, a S2 podjedinica omogućuje fuziju virusa u stanicu domaćina. Replikacija virusa odvija se pomoću kompleksa nestrukturalnih proteina od kojih je najvažnija RNA-ovisna RNA polimeraza (nsp12) (Wang i sur., 2020).

SARS-CoV-2 kao receptor koristi ACE2 (engl. *angiotensin-converting enzyme 2*), a zatim uz pomoć proteaze TMPRSS2 (engl. *transmembrane protease serine protease 2*) virus ulazi u stanicu. Virus se veže na epitelne stanice respiratornog trakta, migrira prema donjim dijelovima dišnog sustava i zatim ulazi u stanice alveolarnog epitela gdje se brzo replicira. Brza replikacija je okidač za imunosni odgovor (Hu i sur., 2021).

1.1.2 PATOFIZIOLOGIJA COVID-19

SARS-CoV-2 se veže na epitelne stanice nosa u gornjim dišnim putevima. Glavni receptor domaćina za ulazak virusa u stanice je ACE2. Virus se lokalno replicira i razmnožava te inficira cilijarne stanice dišnog sustava. Imunološki odgovor koji nastaje tijekom ove faze je ograničen. Slijedi invazija i infekcija gornjeg dišnog trakta migracijom virusa iz epitela nosa u gornje dišne puteve. Bolest se manifestira simptomima povišene temperature, malaksalosti i suhog kašlja. Imunološki odgovor je značajniji i uključuje oslobađanje kemokinskog liganda 10 motiva C-X-C (CXCL-10, engl. *C-X-C motif chemokine ligand 10*) i interferona β i λ (IFN- β i IFN- λ) iz stanica zaraženih virusom. Većina bolesnika ne napreduje dalje od ova faza jer je pojačan imunološki odgovor dovoljan da obuzda širenje infekcije (Parasher, 2021).

Otprilike jedna petina svih zaraženih razvija teške simptome zbog zahvaćanja donjeg dišnog trakta i progresije u sindrom akutnog respiratornog distresa (ARDS, engl. *acute respiratory distress syndrome*) (Slika 2). Virus napada i ulazi u alveolarne epitelne stanice tipa 2 preko receptora domaćina ACE2 i počinje se replicirati kako bi proizveo više virusnih nukleokapsida. Pneumociti opterećeni virusima sada oslobađaju mnoge različite citokine i upalne biljege kao što su interleukini (IL-1, IL-6, IL-8, IL-120 i IL-12), čimbenik nekroze tumora alfa (TNF α , engl. *tumor necrosis factor alpha*), IFN- λ i IFN- β , CXCL-10, monocitni kemoatraktantni protein-1 (MCP-1, engl. *monocyte chemoattractant protein-1*) i inflamatorni protein makrofaga-1 α (MIP-1 α , engl. *macrophage inflammatory protein-1 α*). Nastala citokinska oluja (engl. *cytokine storm*) djeluje kao kemoatraktant za neutrofile, CD4 pomoćne T-stanice i CD8 citotoksične T-stanice. Te su stanice odgovorne za borbu protiv virusa, ali su pritom odgovorne za naknadnu upalu i ozljedu pluća. Stanica domaćina prolazi proces apoptoze s oslobađanjem novih virusnih čestica, koje zatim inficiraju susjedne alveolarne epitelne stanice tipa 2 na isti način. Ozljeda uzrokovana upalnim stanicama i replikacijom virusa dovodi do gubitka pneumocita tipa 1 i tipa 2, a dolazi i do difuznog oštećenja alveola koje na kraju kulminira sindromom akutnog respiratornog distresa (Parasher, 2021).



Slika 2: Model citokinske oluje u teškom obliku COVID-19 bolesti i kasnija patologija (preuzeto i prilagođeno prema Lipworth B i sur., (2020) uz dopuštenje izdavača).

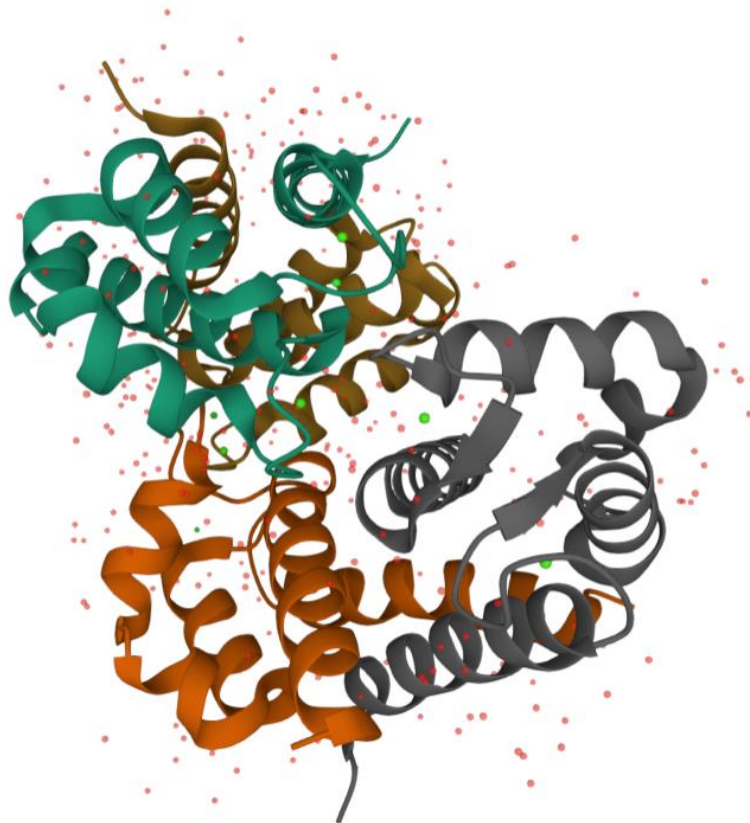
Simptomi koji se javljaju variraju od blagih do ozbiljnih respiratornih poteškoća. Bolesnici koji imaju ozbiljnije simptome razvijaju upalu pluća. Akutni respiratorni distress sindrom i zatajenje dišnog sustava su glavni uzroci smrtnosti kod COVID-19 bolesnika, a rizik se povećava kod osoba starijih od 60 godina i kod kroničnih bolesnika. Vidljive su histopatološke promjene na plućima. Dolazi do difuznog oštećenja alveola, formiranja hijaline membrane, ljuštenja pneumocita i odlaganja fibrina u plućima (Hu i sur., 2021).

COVID-19 je multisistemska bolest koja uz dišni zahvaća i brojne druge sustave organizma. Sve starosne skupine su podložne infekciji SARS-CoV-2 virusom, ali s drugačijim kliničkim manifestacijama. Najučestaliji simptomi su temperatura, zamor i suhi kašalj, a manje učestali su proizvodnja sputuma, glavobolja, hemoptiza, dijareja, anoreksija, grlobolja, bol u prsima, hladnoća, gubitak mirisa i okusa te mučnina i povraćanje (Hu i sur., 2021).

Zlatni standard za detekciju infekcije SARS-CoV-2 virusom je molekularna detekcija SARS-CoV-2 RNA (Hu i sur., 2021). Virusna RNA se nakon izolacije (uzorak brisa orofarinksa i nazofarinksa) prepisuje postupkom reverzne transkripcije u komplementarnu DNA (cDNA) i umnaža metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (q-PCR, engl. *real-time polymerase chain reaction* ili *quantitative polymerase chain reaction*) (Corman i sur., 2020).

1.2 KALPROTEKTIN

Kalprotektin je protein koji pripada S-100 obitelji kalcij-vezujućih proteina. Heterodimer je (24 kDa) i sastoji se od lakog i teškog lanca (*Slika 3*). Ovaj protein se još naziva i kompleks S100A8/S100A9, MRP8/14 (engl. *myeloid-related protein 8/14*), 27E10 antigen ili kalgranulin A/B. Laki lanac (8kDa) je nazvan S100A8 ili MRP8, a teški lanac (14 kDa) je nazvan S100A9 ili MRP14. Kalprotektin sadrži kalcij-vezujuće (EF ruka) i cink-vezujuće domene. One se nalaze na lakom i na teškom lancu proteina. Kada se kalcij veže na kalcij-vezujuću domenu dolazi do konformacijskih promjena koje omogućavaju vezanje drugih proteina na kalprotektin, ali i spajanje dimera kalprotektina u tetramere. Cink se može vezati na cink-vezujuću domenu i one su zaslužne za antibakterijsku aktivnost kalprotektina. Vezanje cinka je neovisno o vezanju kalcija na kalcij-vezujuću domenu (Stríz i Trebichavský, 2004).



Slika 3: Prikaz kristalne strukture humanog kalprotektina (S100A8/S100A9) (preuzeto iz www.rcsb.org uz dopuštenje izdavača).

Distribucija kalprotektina je najveća u neutrofilima. Ondje na njega otpada polovica proteina citoplazme. Osim u neutrofilima nalazi se i u monocitima, makrofagima akutne faze, endotelnim i epitelnim stanicama. Kalprotektin otpuštaju stimulirani neutrofili i monociti, a ostale stanice u kojima se nalazi ga otpuštaju tijekom raspada zbog stanične smrti. U konačnici može završiti u krvnoj plazmi, mokraći, tjelesnim izlučevinama, intestinalnoj tekućini ili fecesu (Stríz i Trebichavský, 2004).

1.2.1 KALPROTEKTIN U UPALNIM STANJIMA

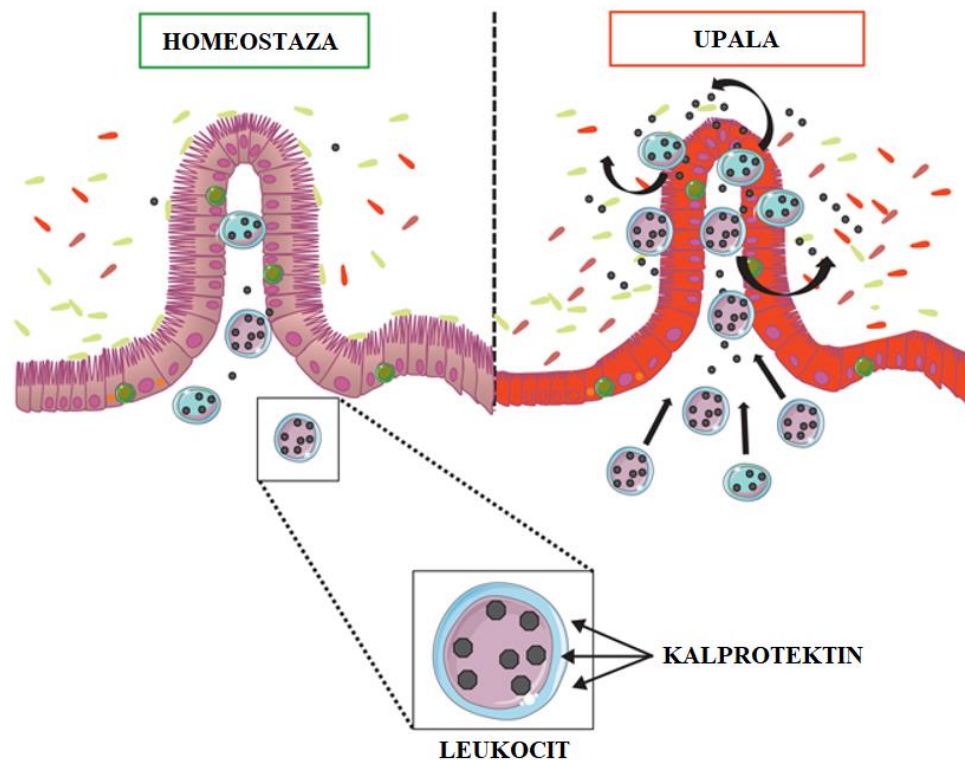
Kalprotektin se može nalaziti na membrani monocita. Povećanje njegove ekspresije uzrokuje povećanu ekspresiju i otpuštanje citokina kao što su TNF α , IL-6 i IL-1 te kemokina, matriks metaloproteinaza, angiogenih čimbenika i antiapoptotskih proteina (Shabani i sur., 2018). Monocitni membranski kalprotektin dolazi u interakciju s aktiviranim endotelom i otpušta se, a do interakcije dolazi zato što se MRP14, tj. teški lanac kalprotektina, veže na endotelne heparan-sulfat proteoglikane (Stríz i Trebichavský, 2004).

Vežanjem cinka kalprotektin ostvaruje svoju antimikrobnu ulogu i potiče apoptozu tako što inhibira matriks metaloproteinaze, cink-ovisne enzime koji sudjeluju u procesima upale, angiogeneze, oštećenja tkiva i nastanka raka (Stríz i Trebichavský, 2004).

Citokini i kemokini kao proupalni čimbenici mehanizmom pozitivne povratne sprege stimuliraju neutrofilne granulocite na sintezu i opuštanje kalprotektina. Zbog strukturne sličnosti teškog lanca kalprotektina (S100A9) s neutrofilnim imobilizirajućim čimbenikom i kininogenom velike molekularne mase (HMWK, engl. *high-molecular weight kininogen*) kalprotektin sudjeluje u lokalizaciji neutrofila i monocita na mjestima upale (Shabani i sur., 2018).

Kalprotektin na nekoliko načina sudjeluje u upalnom procesu, a jedan od njih uključuje arahidonsku kiselinu (<https://www.wikipedia.org/>). Enzimi ciklooksigenaza 1 i 2 te 5-lipooksigenaza kataliziraju nastanak prostaglandina G2 i H2 i leukotriena B4, C4, D4 i E4 iz arahidonske kiseline (Abbas i sur., 2018). Prostaglandini i leukotrieni su lipidni medijatori upale. Arahidonska kiselina kao rezervoar koristi kalprotektin i zato on regulira dostupnost arahidonske kiseline, a samim time i mogućnost nastanka medijatora upale, prostaglandina i leukotriena (Shabani i sur., 2018).

Ekspresija kalprotektina je najveća u stanicama periferne krvi, a u alveolarnim makrofagima zdravih osoba iznosi svega 10 %. Upravi zato je karakterističan porast broja alveolarnih makrofaga kod kojih dolazi do ekspresije kalprotektina prilikom virusne ili bakterijske infekcije dišnog sustava (Stríz i Trebichavský, 2004).



Slika 4: Povećano lučenje kalprotektina iz neutrofila tijekom upale (preuzeto i prilagođeno prema Stéphane i sur. (2015) uz dopuštenje izdavača).

Kalprotektin se oslobađa u krvotok bez potrebe za *de novo* biosintezom proteina, za razliku od rutinski korištenih upalnih biljega kao što je CRP i zato cirkulirajući kalprotektin ima kinetičku prednost jer je on jedan od prvih odgovora organizma na upalu (Bauer i sur., 2021).

U laboratorijskoj dijagnostici već duži niz godina fekalni kalprotektin ima značajnu ulogu u praćenju aktivnosti upalnih bolesti crijeva (Chang i sur., 2015), a zadnjih godina sve je prisutniji kao serumski biljeg različitih kliničkih stanja (Bauer i sur., 2021; Kaya i sur., 2022)

Fekalni kalprotektin je biljeg intestinalne upale i infiltracije neutrofila (Slika 4). Određivanje koncentracije fekalnog kalprotektina se koristi za diferencijaciju sindroma iritabilnog kolona (IBS, engl. *irritable bowel syndrome*) od upalnih bolesti crijeva (IBD, engl. *inflammatory bowel disease*) s nastojanjem smanjenja učestalosti korištenja endoskopskih pretraga, za praćenje djelovanja terapije kod upalnih bolesti crijeva te za predviđanje relapsa bolesti. Koncentracija fekalnog kalprotektina korelira s jačinom infiltracije intestinalne mukoze segmentiranim neutrofilima. Upalne bolesti crijeva su Chronova bolest i ulcerozni kolitis, a neki od simptoma su dijareja, abdominalna bol, opća slabost i anemija. Upalne crijevne bolesti imaju faze aktivacije upalnog procesa i stanja mirovanja (Manceau i sur., 2017).

Koncentracija fekalnog kalprotektina se određuje u ekstrahiranom uzorku stolice metodom imunoturbidimetrije (Manceau i sur., 2017).

1.2.2 SERUMSKI KALPROTEKTIN

Serumski kalprotektin (sKAL) je upalni biljeg čije su povećane koncentracije očekivane u raznim upalnim bolestima, a posebice u akutnom ili Th1 uzrokovanom upalnom odgovoru. Vrijednosti sKAL-a će se brzo povećati kod bolesnika s virusnim i bakterijskim upalama (npr. meningitis, pneumonija, tuberkuloza), u slučaju odbacivanja transplantiranog organa, kod reumatoidnih bolesti, upalnih bolesti crijeva i nekih tumora (Stríz i Trebichavský, 2004).

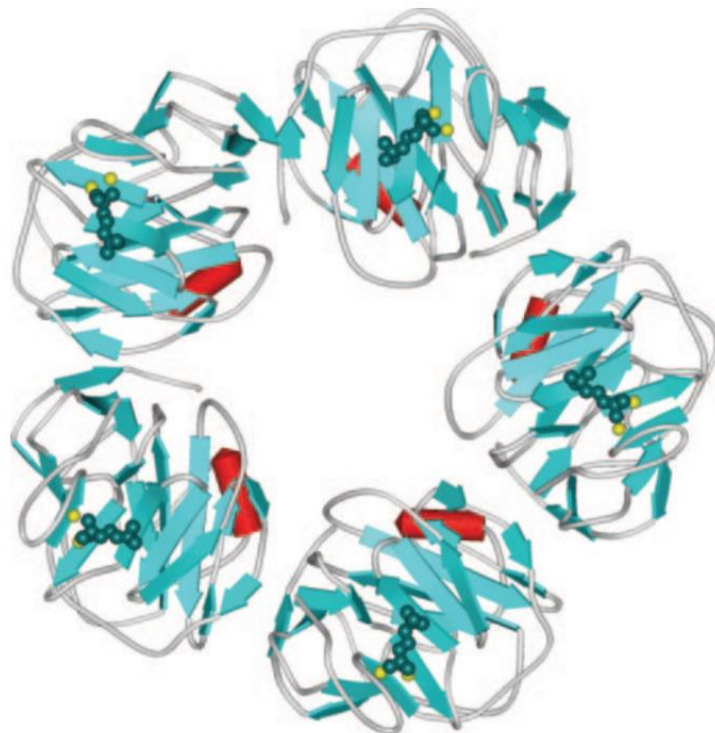
Pacijenti s dijabetesom koji imaju niže koncentracije sKAL-a nakon perkutane koronarne intervencije imaju manji rizik od restenoze i bolje se oporavljaju nakon zahvata (Wang i sur., 2019).

Koncentracije sKAL-a su povećane kod bolesnika s astmom i u korelaciji su s funkcijom pluća i postotkom neutrofila u perifernoj krvi (Lee i sur., 2020).

Povećana aktivacija neutrofila kod COVID-19 bolesnika uzrokuje povećano lučenje kalprotektina u perifernu krv. Koncentracije sKAL-a su veće u bolesnika s težim kliničkim slikama pa se zato može koristiti kao prediktivni biljeg (Udeh i sur., 2021).

1.3 C-REAKTIVNI PROTEIN

C-reaktivni protein (CRP, engl. *C-reactive protein*) je protein (118 kDa) koji se sastoji od 5 identičinih polipeptidnih monomera (*Slika 5*). Na proteinski lanac su vezana 2 Ca^{2+} iona i dio su vezujućeg mjesta za ligande. Veže se na fosforilkolin, fosforiletanolamin i polisaharide bakterija. CRP se određuje iz seruma ili plazme imunonefelometrijski ili imunotorbidimetrijski. Ovi testovi imaju niski limit detekcije i velik raspon mjerenja pa je moguće izmjeriti niske i visoke koncentracije CRP-a (Štraus i sur., 2009).

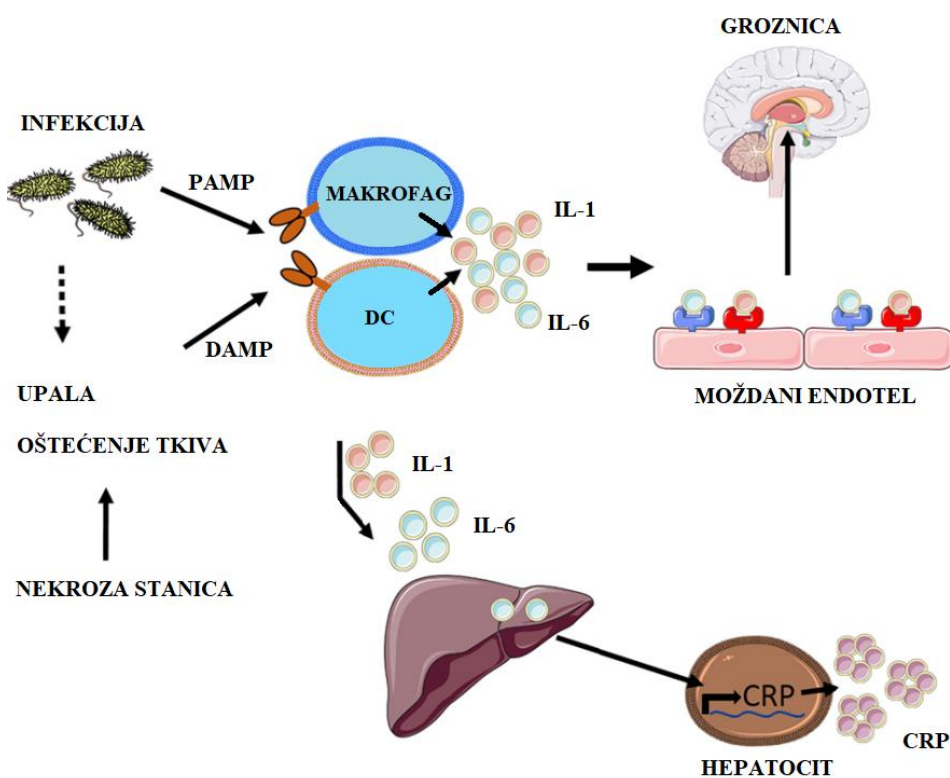


Slika 5: Kristalna struktura CRP-a u kompleksu s fosforilkolinom (preuzeto iz Black i sur. (2004) uz dopuštenje izdavača).

CRP je protein akutne faze koji se rutinski koristi za detekciju akutne faze upalnog odgovora. Dio je urođene imunosti. Stimulacijom proupalnih citokina u plazmi raste koncentracija CRP-a (*Slika 6*). Sintaza mu je u jetri pod kontrolom IL-6, IL-1 i TNF-a, cirkulacijom odlazi do oštećenog tkiva, a mogu ga makrofagi i fibroblasti izlučivati i lokalno. Poluvrijeme života mu je 19 sati, ali može biti manje ovisno o vezanju na ligande (Thomas, 2020).

Funkcije CRP-a uključuju otkrivanje, čišćenje i eliminaciju stanica apoptotičnog tkiva i njihovih proizvoda. CRP također djeluje kao obrambeni mehanizam opsonizirajući invazivne mikroorganizme za fagocitozu (Thomas, 2020).

Komplement se aktivira klasičnim putem tako da makrofagi prepoznaju C3b molekule na kompleksu CRP-ligand. CRP se može vezati i na receptore na fagocitima i na taj način postane dostupan ligandima te dolazi do aktivacije apoptoze, a uz to vezanjem CRP-a na IgG na T i B limfocitima se aktiviraju NK stanice (engl. *natural killer cells*) (Thomas, 2020).



Slika 6: Shema oslobađanja proteina akutne faze. Nakon bakterijske ili virusne infekcije molekularni obrasci povezani s patogenom (PAMP, engl. *pathogen-associated molecular patterns*) oslobađaju se u cirkulaciju i tamo ih prepoznaju makrofagi i dendritičke stanice.

Dolazi do upale kao posljedica infekcije ili ozljede tkiva, a to dovodi do oslobađanja molekularnih obrazaca povezanih s oštećenjem (DAMP, engl. *damage-associated molecular patterns*). Proizvode se proupalni citokini IL-1 i IL-6 koji induciraju proizvodnju CRP-a u jetri (preuzeto i prilagođeno prema Zandstra i sur. (2021) uz dopuštenje izdavača).

Upala je uzrokovana infekcijama, poslijeoperacijskim komplikacijama, malignim tumorima i njihovim metastazama, sistemskim malignim bolestima (Hodgkin i ne-Hodgkin limfom), autoimunim bolestima, infarktom miokarda i aterosklerozom (Štraus i sur., 2009).

Određivanje CRP-a je indicirano kod osoba s povišenom tjelesnom temperaturom, leukocitozom, sumnjom na infekcije, pri intenzivnoj njezi ili u neonatologiji, tijekom poslijeoperacijskog perioda (6 dana), za vrijeme citokinske terapije, za razlikovanje virusne i bakterijske infekcije, praćenje antibiotske terapije, dijagnozu kroničnih upalnih bolesti itd. (Thomas, 2020).

Stupanj povećanja CRP-a iznad gornje granice referentnog intervala ovisi o jačini upale, količini nastalih upalnih produkata, količini oštećenog tkiva i o sposobnosti jetre da sintetizira CRP (Thomas, 2020).

Upala niskog stupnja (CRP 3-10 mg/L) se javlja zbog pretilosti, dijabetes melitusa tipa 2 ili aterosklerotske bolesti. Blaga upala (CRP 10-40 mg/L) može biti uzrokovana lokalnim apscesima, manjim operacijama i traumama, infarktom miokarda, dubokom venskom trombozom, reumatskom bolesti, metastatskim tumorom ili lokalnom virusnom infekcijom. Umjerenjena upala (CRP 40-100 mg/L) je uzrokovana teškim upalnim procesima kao što su gnojni cistitis, bronhitis, gnojne zubne infekcije, infekcije mokraćnog sustava ili genitalne infekcije. Te infekcije zahtijevaju liječenje (npr. antibioticima). Upala visokog stupnja (CRP > 100 mg/L) se javlja zbog akutne generalizirane bakterijske i gljivične infekcije ili ozbiljnog oštećenja tkiva nakon višestruke traume ili velike operacije (Thomas, 2020).

Određivanjem CRP-a mogu se razlikovati virusne i bakterijske upale, a to je važno kada virusi i bakterije uzrokuju istu bolest (npr. virusni i bakterijski meningitis ili pneumonija), ali zahtijevaju drugačije liječenje. Upale izazvane virusom rijetko uzrokuju koncentracije CRP-a iznad 40 mg/L, dok upale uzorkovane bakterijama uzrokuju koncentracije CRP-a veće od 100 mg/L (Thomas, 2020).

1.3.1 CRP I COVID-19

Povišene vrijednosti CRP-a kod težih oblika bolesti COVID-19 mogu biti povezane s prekomjernom proizvodnjom proupalnih citokina. Zbog pojačanog lučenja citokina imunološki sustav postane hiperaktivan i dolazi do oštećenja plućnog tkiva (Ali, 2020).

Bolesnici s povišenim vrijednostima CRP-a zahtijevaju praćenje jer CRP može biti rani biljeg predviđanja progresije bolesti (Ali, 2020). Značajno povišene koncentracije CRP-a mogu biti indikacija za pojačano liječenje COVID-19 (Lentner i sur., 2021).

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog rada je bio analizirati rezultate serumskog kalprotektina i CRP-a dobivenih kod četiri skupine ispitanika ovisno o težini kliničke slike SARS-CoV-2 infekcije, odnosno odsustvu bolesti COVID-19, a nakon implementacije automatizirane metode za određivanje kalprotektina u serumu na analizatoru AU 5800 (Beckman Coulter, Tokyo, Japan).

3 MATERIJALI I METODE

3.1 UZORCI

Analizirani su rezultati dobiveni iz ostalih uzoraka 143 ispitanika (70 žena i 73 muškarca) koji su uključivali bolesnike liječene u Kliničkoj bolnici Dubrava i zdrave ispitanike. Ispitanici su podijeljeni u četiri skupine ovisno o težini kliničkog stanja, stanju nakon preboljenja ili samo kao skupina zdravih dobrovoljaca. Četiri skupine definirane su kao:

- 1) skupina bolesnika s najtežom kliničkom slikom koja je zahtijevala intenzivnu skrb koja je uključivala liječenje respiratorom - IC,
- 2) skupina bolesnika sa srednje teškom kliničkom slikom koja je zahtijevala liječenje kisikom - RC,
- 3) skupina ispitanika koja je preboljela SARS-CoV-2 infekciju i prati se u post-COVID ambulanti - PC,
- 4) kontrolna skupina zdravih dobrovoljaca - K.

IC skupna uključivala je 48 ispitanika, RC skupina 22, PC skupina 39, a K skupina 34 ispitanika ujednačenih po spolu.

S obzirom da je COVID-19 bolest koja češće uzrokuje teže simptome kod pacijenata starije životne dobi nije bilo moguće odabrati skupine ujednačene po dobi.

U svim uzorcima su određene koncentracije serumskog kalprotektina i C-reaktivnog proteina.

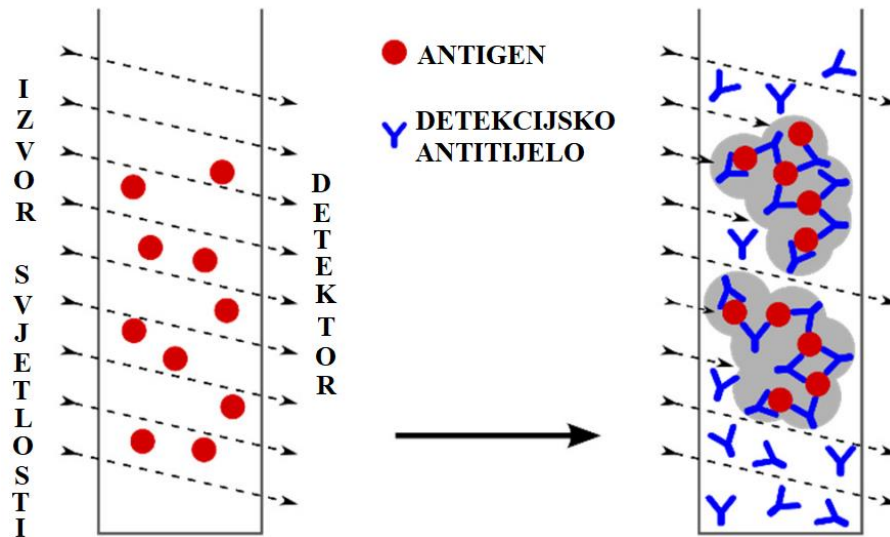
3.2 IMUNOTURBIDIMETRIJA

Imunoturbidimetrija je metoda koja mjeri koncentraciju nekog analita (antigena) u uzorku. Pripada neobilježenim, tj. izravnim imunokemijskim metodama u otopini, a reagens sadrži poliklonalna antitijela. Antitijelo reagira s analitom, zajedno stvore kompleks antigen-antitijelo i zbog toga se otopina zamuti (Štraus i sur., 2009) (*Slika 7*).

Turbidimetrija se temelji na mjerenju razlike intenziteta ulazne i izlazne zrake svjetla. Zrake svjetla prolaze kroz otopinu i ukoliko je otopina zamućena te zrake će se raspršiti pa će posljedično intenzitet izlazne zrake svjetla, tj. intenzitet one zrake koja je prešla određenu duljinu optičkog puta biti manji u odnosu na intenzitet zrake svjetla koja je ušla u otopinu. Intenzitet izlazne zrake očitava detektor (spektrofotometar). Pad intenziteta svjetla izlazne zrake u odnosu na ulaznu proporcionalan je porastu zamućenja otopine. Izvor svjetla je volframova lampa (Dodig, 2015).

Mjerenje se provodi u trenutku najveće koncentracije kompleksa antigen-antitijelo i naziva se metoda završne točke (Dodig, 2015). Reakcija stvaranja kompleksa antigen-antitijelo traje nekoliko sati, ali brzina nastanka kompleksa proporcionalno ovisi o koncentraciji analita u uzorku pa se zato mjerenje može provoditi nakon 30-60 minuta od početka reakcije. To vrijeme nije dovoljno za uspostavu prave ravnoteže nego se ona naziva pseudoravnoteža. Dodatkom polietilen-glikola se povećava reakcija vezanja (Štraus i sur., 2009).

Nedostaci ove metode su da ne daje podatak o veličini čestica nego samo o koncentraciji, ne može otkriti čestice manje od 2 μm i veće od 20 μm te ne može detektirati promjene intenziteta svjetla kod malih koncentracija analita (Rifai i sur., 2018).



Slika 7: Imunoturbidimetrija. Antitijela iz reagensa se vežu na antigene iz uzorka. Svjetlost se raspršuje pojavom замуćenja zbog nastanka kompleksa antitijelo-antigen i intenzitet na detektoru je smanjen ovisno o količini ciljnih molekula (preuzeto i prilagođeno prema www.usinfo.roche.com uz dopuštenje izdavača).

3.3 SERUMSKI KALPROTEKTIN

3.3.1 NAČELO ANALIZE

Serumski kalprotektin je kvantitativno određivan imunoturbidimetrijskom metodom na analitičkom sustavu *Beckman Coulter AU 5800* (*Beckman Coulter, Brea, SAD*). Uzorak za ovu analizu je serum venske krvi iz epruvete s crvenim čepom bez aktivatora koagulacije.

Prema originalnim uputama proizvođača (*Gentian Diagnostics ASA, Moss, Norveška*), uzorku seruma se dodaju anti-kalprotektinska antitijela i ukoliko je kalprotektin prisutan u uzorku ta će se antitijela vezati s kalprotektinom i tvoriti će netopljive agregate. Zbog nastalih agregata zamućenost otopine će se povećati i analizator će je izmjeriti te uz pomoć kalibracijske krivulje kvantitativno izraziti kao koncentraciju kalprotektina. Zamućenost otopine proporcionalna je koncentraciji kalprotektina u uzorku. Analizator automatski izračunava vrijednosti koncentracije kalprotektina u serumu i izražava ih u mg/L.

3.3.2 POTREBNA OPREMA I REAGENSI

Prema originalnim uputama proizvođača, korišteni su reagensi, kontrole i kalibratori tvrtke *Gentian Diagnostics ASA* (*Gentian Diagnostics ASA, Moss, Norveška*) (*Tablica 1*).

Tablica 1: Oprema, reagensi, kontrole i kalibratori korišteni pri određivanju kalprotektina u serumu.

Oprema	<i>Beckman Coulter analitički sustav AU 5800</i> <i>(Beckman Coulter, Brea, SAD)</i>
Reagensi	Gentian Calprotectin Reagent Kit → R1: Reakcijski pufer (54 ml) → R2: Imunočestice (9 ml)
Kontrole	Gentian Calprotectin Control Kit (2 razine x 1 ml)
Kalibratori	Gentian Calprotectin Calibrator Kit (6 razina x 1 ml)

3.3.3 LABORATORIJSKI PROCES

Uzorak krvi se dobiva venepunkcijom u epruvete s crvenim čepom. Tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada korišteni su prethodno prikupljeni uzorci koji su bili pohranjeni na -20 °C. Uzorke je bilo potrebno odmrznuti, dobro promiješati i centrifugirati 10 minuta na 4000 rpm na centrifugi *Rotina 35R (Hettich, Tuttlingen, Njemačka)*. Nakon toga su stavljeni na stalke, a popunjeni stalci na analizator *Beckman Coulter AU 5800 (Beckman Coulter, Brea, SAD)*, upisani su identifikacijski brojevi i zadane pretrage (sKAL i CRP). Analizator je automatski izračunao vrijednosti koncentracija određivanih analita i te su vrijednosti bile dostupne na ekranu analizatora.

3.3.4 REFERENTNI INTERVALI

Referentni intervali (*Tablica 2*) su preuzeti iz originalnih uputa proizvođača (*Gentian Diagnostics ASA, Moss, Norveška*), ali nisu harmonizirani jer određivanje serumskog kalprotektina nije rutinska metoda u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava. Preporučeni referentni intervali se razlikuju ovisno o spremniku, ali u ovoj studiji su korištene serumske epruvete bez gela.

Tablica 2: Referentni interval za kalprotektin u serumu prema proizvođaču reagensa (Gentian Diagnostics ASA, Moss, Norveška).

Analit	Vrsta uzorka	Mjerna jedinica	Spol	Dob	Vrijednost
Serumski kalprotektin	Serum bez gela	mg/L	muški, ženski	odrasli	< 1,54 mg/L

3.3.5 VERIFIKACIJA

Za metodu određivanja serumskog kalprotektina na analizatoru *Beckman Coulter AU 5800* (*Beckman Coulter, Brea, SAD*) provedena je verifikacija metode (CLSI, 2014.). Ona je obuhvatila procjenu preciznosti, točnosti i mjerne nesigurnosti za pojedinu koncentracijsku razinu (Flegar, 2010).

Određivanje zadovoljava postavljene kriterije prihvatljivosti za preciznost, ali ne i za točnost prema proizvođačevim kriterijima za određivanje u serumu. Inicijalna usporedba između analizatora nije učinjena sukladno epidemiološkoj situaciji i prenamijeni bolnice u Primarni respiratorni intenzivistički centar (PRIC). Mjerne nesigurnosti na višoj koncentracijskoj razini (2,40 %) kao i ukupna pogreška (14,41 %) zadovoljavaju minimalni kriterij prihvatljivosti proizvođača za određivanje u serumu. Koeficijent varijacije (CV) preuzet iz uputa proizvođača iznosi 4,00 %, a CV (level 2) dobiven verifikacijom metode iznosi 1,20 %.

Metoda za određivanje serumskog kalprotektina na *Beckman Coulter AU 5800* (*Beckman Coulter, Brea, SAD*) analizatoru se može koristiti u rutinskoj laboratorijskoj praksi jer zadovoljava postavljene kriterije prihvatljivosti od strane proizvođača, a ne postoje drugi dostupni kriteriji biološke varijabilnosti.

3.4 CRP

3.4.1 NAČELO ANALIZE

Koncentracija CRP-a u uzorku seruma određivana je metodom imunoturbidimetrije na analitičkom sustavu *Beckman Coulter AU 5800* (*Beckman Coulter, Brea, SAD*). CRP iz uzorka specifično reagira s antitijelima na humani CRP na česticama lateksa iz reagensa (*Beckman Coulter, Brea, SAD*) te daje netopljive agregate i stvara se zamućenje. Apsorpcija svjetla je zbog prisutnosti tih agregata proporcionalna koncentraciji CRP-a u uzorku. Analizator automatski izračunava vrijednosti koncentracije CRP-a i izražava ih u mg/L (Rifai i sur., 2018).

Uzorak za ovu analizu je serum venske krvi iz epruvete s crvenim čepom bez aktivatora koagulacije.

3.4.2 REFERENTNI INTERVALI

Referentni intervali za CRP prikazani su u *Tablici 3*.

Tablica 3: Referentni intervali CRP-a u serumu (Čvorišćec i Flegar-Meštrić, 2004.).

Analit	Mjerna jedinica	Spol	Dob	Referentni interval
C-reaktivni protein (CRP)	mg/L	muški, ženski	1 - 20 dana	0,1 - 4,1
			2 mj. - 15 god.	0,1 - 2,8
			≥ 20 god.	< 5,0

3.5 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svi kvantitativni podaci ispitani su za normalnost razdiobe pomoću D'Agostino-Pearsonovog testa za normalnost razdiobe i prikazani su kao medijan i interkvartilni raspon za sve podatke koji nisu slijedili normalnu razdiobu. Za testiranje statistički značajne razlike u koncentracijama serumskog kalprotektina i CRP-a između ispitivanih skupina koristio se Kruskal-Wallis kao neparametrijski test za usporedbu skupina koje ne slijede normalnu razdiobu. Za utvrđivanje povezanosti koncentracija serumskog kalprotektina i CRP-a koristila se korelacijska analiza (Spearmanov koeficijent korelacije). Statistički značajna povezanost tumačena je sukladno Coltonovom kriteriju (za r od 0 do 0,25 ili od 0 do -0,25 kao nepostojanje povezanosti; za r od 0,26 do 0,50 ili od -0,26 do 0,50 kao slaba povezanost; za r od 0,51 do 0,75 ili od -0,51 do 0,75 kao umjerena ili dobra povezanost; za r od 0,76 do 1 ili od -0,76 do -1 kao vrlo dobra do izvrsna povezanost) (Colton, 1963). Razina značajnosti je za sve korištene testove postavljena na 0,05. Statistička analiza izrađena je s *MedCalc Statistical Software verzija 18.11.6 (MedCalc Software Bvba, Ostend, Belgium)*.

4 REZULTATI

Rezultati ispitivanja prikazani su tablično i opisno. U ispitivanju su korišteni podaci 143 ispitanika, 70 žena i 73 muškarca medijana dobi 60 godina (19 - 91).

Dob ispitivanih skupina prikazana je u *Tablici 4*.

Tablica 4: Dob ispitivanih skupina izražena u godinama.

Skupina	Broj ispitanika	Dob (medijan i raspon)
IC (najteža klinička slika, intenzivna skrb, liječenje respiratorom)	48	77 (42 - 88)
RC (srednje teška klinička slika, liječenje kisikom)	22	69 (30 - 85)
PC (preboljeli SARS-CoV-2 infekciju)	39	51 (19 - 91)
K (kontrolna skupina)	34	41 (21 - 62)

Kruskal-Wallis testom dobivena je statistički značajna razlika između ispitivanih skupina ($P < 0,00001$), a Post-hoc analizom definirano je točno između kojih skupina postoji statistički značajna razlika u dobi. Skupine IC i RC nisu se međusobno razlikovale po dobi, dok su se obje statistički razlikovale od PC i K skupine ispitanika koje su obuhvaćale mlađu populaciju. PC i K skupina također su se međusobno statistički značajno razlikovale po dobi s tim da je skupina K očekivano imala najmanji medijan dobi jer su je sačinjavali zdravi dobrovoljci čija je krv uzorkovana na sistematskom pregledu. Ovakva distribucija dobi po skupinama je očekivana s obzirom na kliničku sliku bolesti.

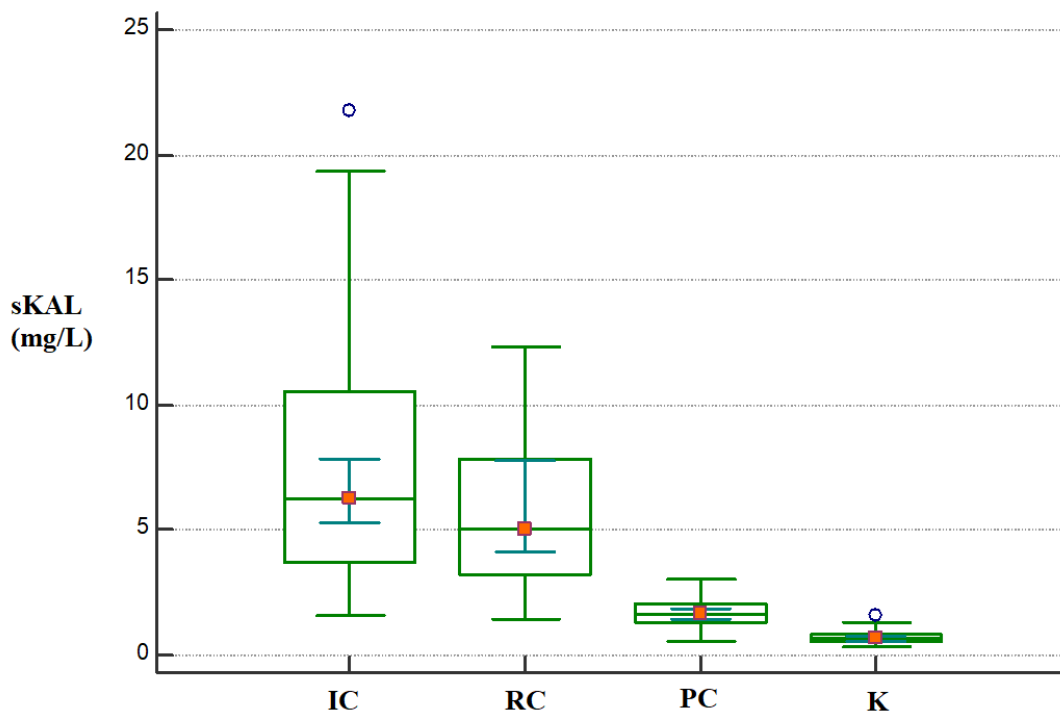
Izmjerene koncentracije serumskog kalprotektina i CRP-a ispitivanih skupina prikazane su u *Tablici 5*. S obzirom da podaci nisu slijedili normalnu razdiobu, prikazani su medijanom i interkvartilnim rasponom.

Tablica 5: Koncentracije serumskog kalprotektina (sKAL) i CRP-a ispitivanih skupina.

Skupina	Broj ispitanika	sKAL (mg/L) medijan i interkvartilni raspon	CRP (mg/L) medijan i interkvartilni raspon
IC (najteža klinička slika, intenzivna skrb, liječenje respiratorom)	48	6,27 (1,58 - 21,78)	100,4 (12,5 - 210,9)
RC (srednje teška klinička slika, liječenje kisikom)	22	5,04 (1,43 - 12,31)	69,3 (7,5 - 389,2)
PC (preboljeli SARS-CoV-2 infekciju)	39	1,68 (0,52 - 3,02)	2,2 (0,3 - 27,9)
K (kontrolna skupina)	34	0,68 (0,31 - 1,59)	1,3 (0,4 - 16,4)

Kruskal-Wallis testom testirana je statistička značajnost razlika koncentracija serumskog kalprotektina i dobivena je statistički značajna razlika između ispitivanih skupina ($P < 0,00001$). Post-hoc analizom definirano je točno između kojih skupina postoji statistički značajna razlika u koncentraciji sKAL. Nije nađena statistički značajna razlika u koncentracijama sKAL u IC i RC skupinama, dok su se obje statistički značajno razlikovale od PC i K skupina ispitanika. Koncentracije sKAL u IC i RC skupinama su bile više nego u PC i K skupinama. PC i K skupine su se također međusobno statistički značajno razlikovale u koncentracijama sKAL, pri čemu je PC skupina imala više koncentracije sKAL od K skupine, ali statistički značajno niže od IC i RC skupina.

Grafički prikaz dobivenih rezultata za serumski kalprotektin prikazan je na *Slici 8*.



IC - skupina bolesnika s najtežom kliničkom slikom, zahtijevala je intenzivnu skrb i liječenje respiratorom

RC - skupina bolesnika sa srednje teškom kliničkom slikom, zahtijevala je liječenje kisikom

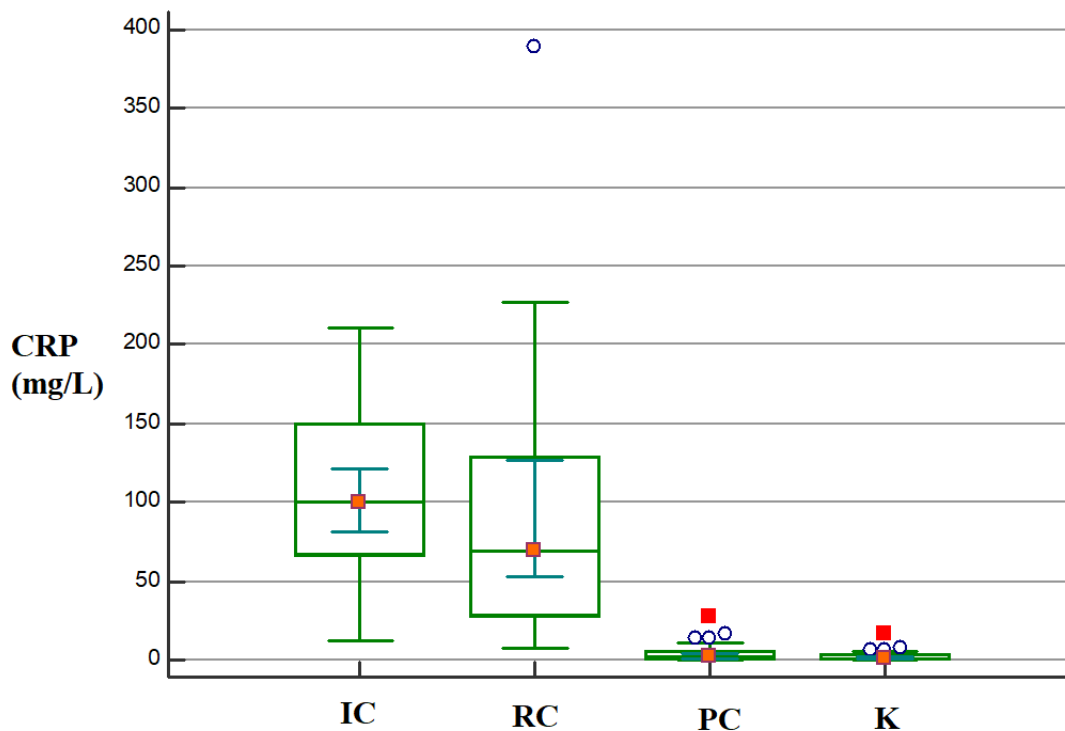
PC - skupina ispitanika koja je preboljela SARS-CoV-2 infekciju

K - kontrolna skupina zdravih dobrovoljaca

Slika 8: Grafički prikaz koncentracija serumskog kalprotektina (sKAL) između skupina.

Kruskal-Wallis testom također je testirana statistička značajnost razlika u koncentraciji CRP-a. Dobivena je statistički značajna razlika između ispitivanih skupina ($P < 0,00001$). Post-hoc analizom definirano je točno između kojih skupina postoji statistički značajna razlika u koncentraciji CRP-a. Koncentracije CRP-a u IC i RC skupini su statistički značajno više od koncentracija izmjerenih u PC i K skupinama. Nije nađena statistički značajna razlika u koncentracijama CRP-a između IC i RC skupina, kao niti između PC i K skupina.

Grafički prikaz dobivenih rezultata za CRP prikazan je na *Slici 9*.



IC - skupina bolesnika s najtežom kliničkom slikom, zahtijevala je intenzivnu skrb i liječenje respiratorom

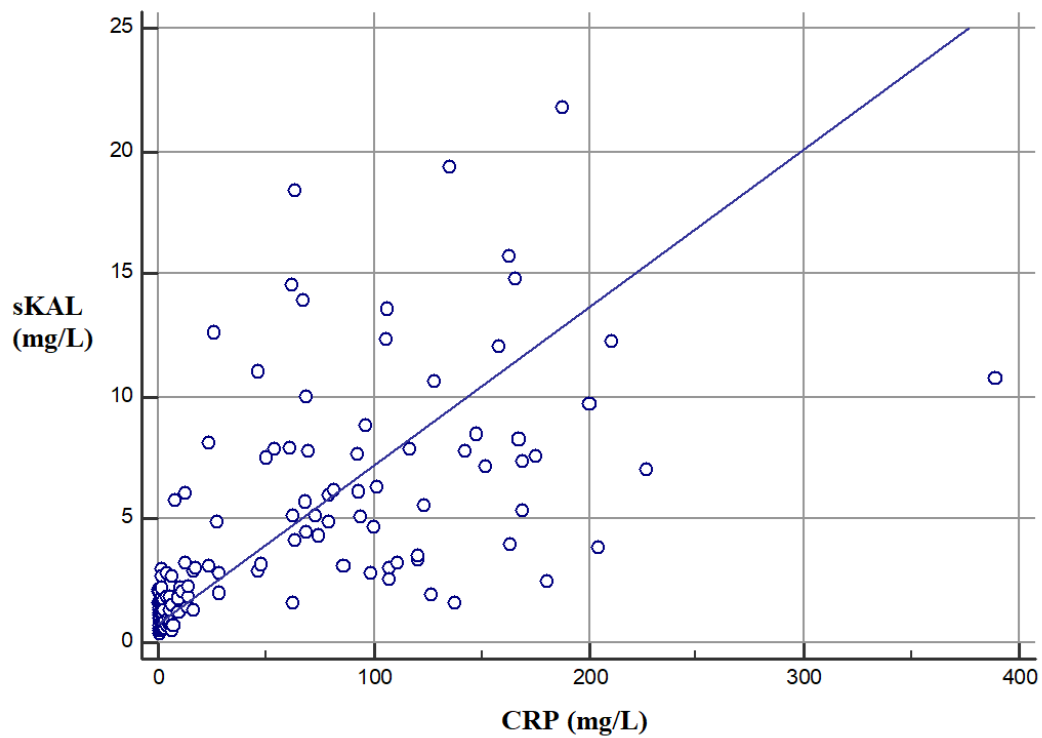
RC - skupina bolesnika sa srednje teškom kliničkom slikom, zahtijevala je liječenje kisikom

PC - skupina ispitanika koja je preboljela SARS-CoV-2 infekciju

K - kontrolna skupina zdravih dobrovoljaca

Slika 9: Grafički prikaz koncentracija CRP-a između skupina.

Dobivena je statistički značajna korelacija ($P > 0,0001$) i dobra povezanost između koncentracija sKAL i CRP-a ($r = 0,6357$) (Slika 10) što je u skladu s literaturnim podacima koji definiraju sKAL kao upalni biljeg (Bauer i sur., 2021).



Slika 10: Prikaz korelacije serumskog kalprotektina (sKAL) i CRP-a.

5 RASPRAVA

COVID-19 je bolest s izrazito ozbiljnim posljedicama kod starije populacije. Polovica starijih oboljelih od COVID-19 su razvili teže oblike bolesti, petini je potrebna intenzivna njega, a u ovoj populaciji je smrtnost veća nego u ostalim dobnim skupinama (Singhal i sur., 2021).

Sukladno spoznajama da su teži oblici bolesti učestaliji kod starije populacije, medijan dobi ispitanika na intenzivnoj njezi bio je najveći u odnosu na ostale ispitivane skupine.

Kalprotektin je protein kojeg posebno luče neutrofili u upalnim stanjima i može se koristiti kao upalni biljeg. Kako je COVID-19 multisistemska upalna bolest, moguće je korištenje sKAL kao prediktivnog biljega. Očekivano je bilo da će bolesnici s težim kliničkim slikama imati više koncentracije sKAL-a, a literaturni podaci ukazuju da se sKAL može koristiti za razlikovanje umjereno i teško oboljelih (Kaya i sur., 2020).

Chen i sur. (2020) su utvrdili da je vrijednost sKAL-a kod hospitaliziranih bolesnika s COVID-19 pokazatelj potrebe za intenzivnom njegom te da su visoke koncentracije sKAL-a povezane s visokom smrtnošću kod oboljelih od COVID-19. Shi i sur. (2020) su utvrdili da je koncentracija sKAL-a kod bolesnika koji zahtijevaju mehaničku ventilaciju bila veća od onih kojima ona nije bila potrebna.

Kako se određivanje sKAL-a u većini bolnica ne radi rutinski (Kaya i sur., 2020) bilo je zanimljivo ispitati njegovu korisnost u definiranju upalnog statusa bolesnika kao i ispitanika koji nisu u stanju akutne upale podijeljenih u PC i K skupinu, a uključuju osobe koje su preboljele COVID-19 i kontrolne ispitanike.

U ovom istraživanju ispitanici kod kojih su određivane koncentracije sKAL-a su podjeljeni u 4 skupine upravo zato što se te četiri skupine razlikuju po težini kliničke slike, odnosno odsustvu bolesti. U prvoj skupini su bili bolesnici na intenzivnoj njezi i kojima je ponekad bila potrebna mehanička ventilacija (IC), a u drugoj su bili oni kojima nije bila potrebna mehanička ventilacija, ali je bila potrebna terapija kisikom (RC). Rezultati su pokazali da se između te dvije skupine koncentracije sKAL-a ne razlikuju statistički značajno, što se može objasniti činjenicom da bolesnici iz obje grupe imaju težu kliničku sliku. Kod ispitanika koji su preboljeli COVID-19 i kod onih u kontrolnoj skupini dobivene su niže koncentracije sKAL-a nego u skupinama bolesnika u akutnoj fazi bolesti, što je u skladu s literaturnim podacima. Koncentracije sKAL-a kod ispitanika koji su preboljeli COVID-19 su iznad gornje

granice referentnog intervala, a koncentracije sKAL-a kod ispitanika iz kontrolne skupine su unutar granica referentnog intervala.

Visoke koncentracije CRP-a su povezane s lošijim ishodima i ozbiljnosti bolesti COVID-19 (Stringer i sur., 2021).

U ovom istraživanju su uz sKAL određivane i koncentracije CRP-a. Kao i kod sKAL-a, prve dvije grupe (IC i RC) se ne razlikuju značajno u težini kliničke slike pa se koncentracije CRP-a kod bolesnika koji su na intenzivnoj njezi i kod onih na terapiji kisikom statistički značajno ne razlikuju. Koncentracije CRP-a kod tih bolesnika statistički su više od koncentracija CRP-a kod ispitanika koji su preboljeli COVID-19 i kod onih u kontrolnoj skupini.

Vrijednosti sKAL-a skupine koja je preboljela COVID-19 se statistički značajno razlikuju od sKAL-a kontrolne skupine, a vrijednosti CRP-a između skupine koja je preboljela COVID-19 i kontrolne skupine se statistički značajno ne razlikuju. To ukazuje da sKAL ostaje povišen duže nakon završetka infekcije što je u skladu s literaturnim podacima. Koncentracije CRP-a, kao proteina akutne faze, u serumu su povećane u trenutku postojanja akutne upale, a odmah nakon prolaska upale se vraćaju se u normalni raspon. Ispitanici koji su preboljeli COVID-19 više nisu u akutnoj fazi, a prate se zbog posljedica bolesti. Njihov CRP trebao bi biti unutar granica referentnog intervala kao i kod kontrolne skupine (Luan i sur., 2021). Upravo zato je za praćenje oporavka nakon upalnog procesa osjetljiviji biljeg sKAL (Chang i sur., 2015). Dobiveni rezultati vrijednosti sKAL-a kod osoba koje su preboljele neku bolest su više od vrijednosti kontrolne skupine, a to ukazuje na postojanje ostatne upale (Ometto i sur., 2017).

6 ZAKLJUČCI

Cilj ovog rada je bio analizirati rezultate određivanja kalprotektina i CRP-a u serumu dobivene imunoturbidimetrijskim metodama kako bi se uočile razlike ovisno o težini kliničke slike kod COVID-19 bolesnika, odnosno odsustvu bolesti COVID-19.

Na temelju provedenog istraživanja, obrade podataka, dobivenih rezultata i rasprave može se zaključiti da je distribucija težih oblika bolesti u starijoj skupini ispitanika očekivana s obzirom na karakteristike COVID-19 bolesti.

Bolesnici s teškim i srednje teškim kliničkim slikama su imali visoke koncentracije serumskog kalprotektina, ali ne postoji statistički značajna razlika između te dvije skupine ispitanika. Ispitanici koji su preboljeli COVID-19 i ispitanici iz kontrolne skupine su imali niže vrijednosti serumskog kalprotektina te se statistički značajno razlikuju od skupina bolesnika s teškim i srednje teškim kliničkim slikama.

Koncentracije CRP-a kod bolesnika s teškim i srednje teškim kliničkim slikama su visoke i međusobno se statistički značajno ne razlikuju, ali se razlikuju od skupina ispitanika koji su preboljeli COVID-19 i ispitanika iz kontrolne skupine jer je koncentracija CRP-a u te dvije skupine niska.

Koncentracije kalprotektina pokazuju značajnu korelaciju s drugim određivanim upalnim biljekom, a to je CRP. Statistički značajna povezanost i dobra korelacija između sKAL-a i CRP-a ukazuju da u akutnoj fazi bolesti sKAL odražava jačinu upale.

Statistički značajna razlika koncentracija sKAL-a između skupine ispitanika koji su preboljeli COVID-19 i kontrolne skupine ukazuje da sKAL ostaje duže povišen kod ispitanika koji više nisu u akutnoj fazi upale te time ne slijedi obrazac klasičnog biljega akutne faze CRP-a čija koncentracija nije povišena u stanjima bez akutne upale. Za razliku od toga, koncentracije CRP-a između skupine ispitanika koji su preboljeli COVID-19 i kontrolne skupine se značajno ne razlikuju, a to znači da su se prestankom akutne faze upale koncentracije CRP-a smanjile, što je posebno značajno za skupinu ispitanika koji su preboljeli COVID-19 jer se oni ne prate zbog akutne upale nego ostalih posljedica bolesti.

7 POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

ACE2 - engl. *angiotensin-converting enzyme 2*

ARDS - sindrom akutnog respiratornog distresa (engl. *acute respiratory distress syndrome*)

cDNA - komplementarna DNA

COVID-19 - engl. *coronavirus disease 2019*

CRP - C-reaktivni protein

CV - koeficijent varijacije

CXCL-10 - kemokinski ligand 10 motiva C-X-C (engl. *C-X-C motif chemokine ligand 10*)

DAMP - molekularni obrasci povezani s oštećenjem (engl. *damage-associated molecular patterns*)

HMWK - kininogen velike molekularne mase (engl. *high-molecular weight kininogen*)

IBD - upalna bolest crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*)

IBS - sindrom iritabilnog kolona (engl. *irritable bowel syndrome*)

IFN - interferon

IL - interleukin

MCP-1 - monocitni kemoatraktantni protein-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*)

MERS-CoV - engl. *Middle East Respiratory Syndrom Coronavirus*

MIP-1 α - inflamatorni protein makrofaga-1 α (engl. *macrophage inflammatory protein-1 α*)

MRP - engl. *myeloid-related protein*

NK stanice - engl. *natural killer cells*

PAMP - molekularni obrasci povezani s patogenom (engl. *pathogen-associated molecular patterns*)

PRIC - Primarni respiratorni intenzivistički centar

q-PCR - metoda lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu ili kvantitativni PCR (engl. *real-time polymerase chain reaction* ili *quantitative polymerase chain reaction*)

SARS-CoV-2 - engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

sKAL - serumski kalprotektin

TMPRSS2 - engl. *transmembrane protease serine protease 2*

TNF α - čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*)

8 LITERATURA

Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Stanična i molekularna imunologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2018, str. 427.

Ali N. Elevated level of C-reactive protein may be an early marker to predict risk for severity of COVID-19. *J Med Virol*, 2020, 92, 2409-2411.

Arachidonic acid, <https://www.en.wikipedia.org>, pristupljeno 05. 02. 2022.

Bauer W, Diehl-Wiesenecker E, Ulke J, Galtung N, Havelka A, Hegel JK, Tauber R, Somasundaram R, Kappert K. Outcome prediction by serum calprotectin in patients with COVID-19 in the emergency department. *J Infect*, 2021, 82, 84-123.

Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive Protein. *J Biol Chem*, 2004, 279, 48487-48490.

Chang S, Malter L, Hudesman D. Disease monitoring in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 2015, 21, 11246-11259.

Chen L, Long X, Xu Q. Elevated serum levels of S100A8/A9 and HMGB1 at hospital admission are correlated with inferior clinical outcomes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17, 992-994.

CLSI. User Verification of Precision and Estimation of Bias. Third Edition. 2014, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, CLSI document EP15-A3.

Colton T. A model for selecting one of two medical treatments. *JASA*, 1963, 58, 388-400.

Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt ML, Mulders DG, Haagmans BL, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, Goderski G, Romette JL, Ellis J, Zambon M, Peiris M, Goossens H, Reusken C, Koopmans MP, Drosten C. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*, 2020, 25, 2000045.

Čvorišćec D, Flegar-Meštrić Z, Juretić D. Harmonizacija laboratorijskih nalaza u području opće medicinske biokemije. Zagreb, HKMB, 2004, str. 22.

Dodig Slavica. Imunokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 125-131.

Flegar-Meštrić Z. Postupci ispitivanja (5.5) – kratka analitička validacija. U: Akreditacija medicinsko-biokemijskog laboratorija. Galjanić S, Vukasović I, Flegar-Meštrić Z, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 123-134.

Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19, 141-154.

Kaya T, Yaylacı S, Nalbant A, Yıldırım İ, Kocayiğit H, Çokluk E, Şekeroğlu MR, Köroğlu M, Güçlü E. Serum calprotectin as a novel biomarker for severity of COVID-19 disease. *Ir J Med Sci*, 2022, 191, 59-64.

Kunnumakkara AB, Rana V, Parama D, Banik K, Girisa S, Henamayee S, Thakur KK, Dutta U, Garodia P, Gupta SC, Aggarwal BB. COVID-19, cytokines, inflammation, and spices: How are they related? *Life Sci*, 2021, 284, 119201.

Lee YG, Hong J, Lee PH, Lee J, Park SW, Kim D, Jang AS. Serum calprotectin is a potential marker in patients with asthma. *J Korean Med Sci*, 2020, 35, 362-372.

Lentner J, Adams T, Knutson V, Zeien S, Abbas H, Moosavi R, Manuel C, Wallace T, Harmon A, Waters R, Ledford S, Vijayakrishnan R, Jagan N, Falluji N, DelCore M, Bay C, Jhamnani S. C-reactive protein levels associated with COVID-19 outcomes in the United States. *Int J Osteopath Med*, 2021, 121, 869-873.

Lipworth B, Chan R, Lipworth S, RuiWen Kuo C. Weathering the cytokine storm in susceptible patients with severe SARS-CoV-2 infection. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2020, 8, 1798-1801.

Luan YY, Yin CH, Yao YM. Update advances on C-reactive protein in COVID-19 and other viral infections. *Front Immunol*, 2021, 12, 720363.

Manceau H, Chicha-Cattoir V, Puy H, Peoc'h K. Fecal calprotectin in inflammatory bowel diseases: update and perspectives. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 55, 474-483.

Nancey S, Boschetti G, Moussata D, Draï J, Flourié B. Contribution of fecal calprotectin in monitoring the inflammatory bowel diseases. *Hepato-Gastro Oncol Dig*, 2015, 22, 477-487.

Ometto F, Friso L, Astorri D, Botsios C, Raffeiner B, Punzi L, Doria A. Calprotectin in rheumatic diseases. *Exp Biol Med*, 2017, 242, 859-873.

Parasher A. COVID-19: Current understanding of its pathophysiology, clinical presentation and treatment. *J Postgrad Med*, 2021, 97, 312-320.

Rifai N, Horvath AR, Wittwer C. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. St. Louis, Missouri, Elsevier, 2018, str. 355-356.

SARS-CoV-2 virus, 2020, <https://www.britannica.com>, pristupljeno 24. 04. 2022.

Shabani F, Farasat A, Mahdavi M. Calprotectin (S100A8/S100A9): a key protein between inflammation and cancer. *Inflamm. Res*, 2018, 67, 801-812.

Shi H, Zuo Y, Yalavarthi S. Neutrophil calprotectin identifies severe pulmonary disease in COVID-19. *J Leukoc Biol*, 2021, 109, 67-72.

Singhal S, Kumar P, Singh S. Clinical features and outcomes of COVID-19 in older adults: a systematic review and meta-analysis. *BMC Geriatr*, 2021, 21, 321-329.

Stringer D, Braude P, Myint PK, Evans L, Collins JT, Verduri A, Quinn TJ, Vilches-Moraga A, Stechman MJ, Pearce L, Moug S, McCarthy K, Hewitt J, Carter B. The role of C-reactive protein as a prognostic marker in COVID-19. *Int J Epidemiol*, 2021, 50, 420-429.

Stríz I, Trebichavský I. Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol Res*, 2004, 53, 245-253.

Štraus B, Petrik J. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 185-195.

Tay MZ, Poh CM, Rénia L. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20, 363-374.

Thomas L. C-reactive protein (CRP). U: Clinical Laboratory Diagnostics. Thomas L, urednik, 2020, poglavlje 19.04. (e-izdanje)

Turbidimetric immunoassay, 2019, <https://usinfo.roche.com>, pristupljeno 27. 04. 2022.

Udeh R, Advani S, de Guadiana Romualdo LG, Dolja-Gore X. Calprotectin, an emerging biomarker of interest in COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Med*, 2021, 10, 775-788.

Wang C, Kong Y, Ding Y, Sun J, Chen T. Serum calprotectin levels and outcome following percutaneous coronary intervention in patients with diabetes and acute coronary syndrome. *Med Sci Monit*, 2019, 25, 9517-9523.

Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, biology, and structure-based therapeutics development. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10, 587269.

WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19, 2020, <https://www.who.int>, pristupljeno 05. 03. 2022.

Zandstra J, Jongerius I, Kuijpers TW. Future biomarkers for infection and inflammation in febrile children. *Front Immunol*, 2021, 12, 631308.

9 SAŽETAK

COVID-19 je bolest uzrokovana virusom SARS-CoV-2. U organizam čovjeka virus ulazi preko dišnog sustava. Pneumociti opterećeni virusima oslobađaju različite citokine i upalne biljege, a posljedica je ozljeda pluća te difuzno oštećenje alveola koje na kraju može kulminirati sindromom akutnog respiratornog distresa. Kalprotektin je protein kojeg otpuštaju stimulirani neutrofili i monociti. Prilikom virusne ili bakterijske infekcije dišnog sustava povećava se ekspresija kalprotektina. CRP je protein akutne faze upale. Stimulacijom proupalnih citokina raste koncentracija CRP-a u plazmi.

Cilj ovog rada je bio analizirati rezultate serumskog kalprotektina i CRP-a dobivene imunoturbidimetrijskim metodama kako bi se uočile razlike ovisno o težini kliničke slike kod COVID-19 bolesnika, odnosno odsustvu bolesti COVID-19.

Korišteni su ostatni uzorci 143 ispitanika. Ispitanici su podijeljeni u četiri skupine ovisno o težini kliničkog stanja, stanju nakon preboljenja ili kao skupina zdravih dobrovoljaca. Koncentracije serumskog kalprotektina i CRP-a su određivane imunoturbidimetrijskim metodama na analitičkom sustavu *Beckman Coulter AU 5800 (Beckman Coulter, Brea, SAD)*.

Osobe najveće životne dobi su bile u skupini bolesnika koji imaju najtežu kliničku sliku. Bolesnici s težim kliničkim slikama su imali visoke koncentracije serumskog kalprotektina i CRP-a, a ispitanici koji su preboljeli COVID-19 i ispitanici iz kontrolne skupine su imali niže koncentracije. Serumski kalprotektin je bio viši kod ispitanika koji su preboljeli COVID-19, nego u kontrolnoj skupini, iako ti ispitanici više nisu bili u akutnoj fazi upale. Koncentracije serumskog kalprotektina pokazale su značajnu korelaciju s CRP-om.

Veća distribucija težih oblika bolesti COVID-19 je kod osoba starije životne dobi. Koncentracije serumskog kalprotektina i CRP-a su visoke kod bolesnika s teškim kliničkim slikama. Serumski kalprotektin ostaje duže povišen kod ispitanika koji su preboljeli COVID-19, a više nisu u akutnoj fazi upale te time ne slijedi obrazac klasičnog biljega akutne faze kao što je CRP čija koncentracija nije povišena u stanjima bez akutne upale.

SUMMARY

COVID-19 is a disease caused by the SARS-CoV-2 virus. The virus enters the human body through the respiratory system. Virus-loaded pneumocytes release various cytokines and inflammatory markers, resulting in lung injury and diffuse alveolar damage that may eventually culminate in acute respiratory distress syndrome. Calprotectin is a protein released by stimulated neutrophils and monocytes. During viral or bacterial infection of the respiratory system, the expression of calprotectin increases. CRP is an acute phase reactant. Stimulation of proinflammatory cytokines increases the concentration of CRP in plasma.

The aim of this study was to analyze the results of serum calprotectin and CRP determined by immunoturbidimetric methods in order to detect differences depending on the severity of the clinical picture in COVID-19 patients or the absence of COVID-19 disease.

The remaining samples of 143 subjects were used. Subjects were divided into four groups depending on the severity of the clinical condition, the condition after recovery, or as a group of healthy volunteers. Serum calprotectin and CRP concentrations were determined by immunoturbidimetric methods on the *Beckman Coulter AU 5800* analytical system (*Beckman Coulter, Brea, USA*).

The oldest persons were in the group of patients with the most severe clinical picture. Patients with more severe clinical pictures had high concentrations of serum calprotectin and CRP, while subjects who recovered from COVID-19 and subjects in the control group had lower concentrations. Serum calprotectin was higher in subjects who recovered from COVID-19 than in the control group, although these subjects were no longer in the acute phase of inflammation. Serum calprotectin concentrations showed a significant correlation with CRP.

There is a greater distribution of more severe forms of COVID-19 disease in the elderly. Serum calprotectin and CRP concentrations are high in patients with severe clinical pictures. Serum calprotectin remains elevated for a longer period in subjects who recovered from COVID-19 and are no longer in the acute phase of inflammation, thus not following the pattern of a classic acute phase marker such as CRP whose concentration is not elevated in conditions without acute inflammation.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Analiza podataka koncentracija serumskog kalprotektina i CRP-a kod COVID-19 bolesnika

Lucija Butorac

SAŽETAK

COVID-19 je bolest uzrokovana virusom SARS-CoV-2. U organizam čovjeka virus ulazi preko dišnog sustava. Pnevumociti opterećeni virusima oslobađaju različite citokine i upalne biljege, a posljedica je ozljeda pluća te difuzno oštećenje alveola koje na kraju može kulminirati sindromom akutnog respiratornog distresa. Kalprotektin je protein kojeg otpuštaju stimulirani neutrofil i monociti. Prilikom virusne ili bakterijske infekcije dišnog sustava povećava se ekspresija kalprotektina. CRP je protein akutne faze upale. Stimulacijom proupalnih citokina raste koncentracija CRP-a u plazmi.

Cilj ovog rada je bio analizirati rezultate serumskog kalprotektina i CRP-a dobivene imunoturbidimetrijskim metodama kako bi se uočile razlike ovisno o težini kliničke slike kod COVID-19 bolesnika, odnosno odsustvu bolesti COVID-19.

Korišteni su ostatni uzorci 143 ispitanika. Ispitanici su podijeljeni u četiri skupine ovisno o težini kliničkog stanja, stanju nakon preboljenja ili kao skupina zdravih dobrovoljaca. Koncentracije serumskog kalprotektina i CRP-a su određivane imunoturbidimetrijskim metodama na analitičkom sustavu *Beckman Coulter AU 5800 (Beckman Coulter, Brea, SAD)*.

Osobe najveće životne dobi su bile u skupini bolesnika koji imaju najtežu kliničku sliku. Bolesnici s težim kliničkim slikama su imali visoke koncentracije serumskog kalprotektina i CRP-a, a ispitanici koji su preboljeli COVID-19 i ispitanici iz kontrolne skupine su imali niže koncentracije. Serumski kalprotektin je bio viši kod ispitanika koji su preboljeli COVID-19, nego u kontrolnoj skupini, iako ti ispitanici više nisu bili u akutnoj fazi upale. Koncentracije serumskog kalprotektina pokazale su značajnu korelaciju s CRP-om.

Veća distribucija težih oblika bolesti COVID-19 je kod osoba starije životne dobi. Koncentracije serumskog kalprotektina i CRP-a su visoke kod bolesnika s teškim kliničkim slikama. Serumski kalprotektin ostaje duže povišen kod ispitanika koji su preboljeli COVID-19, a više nisu u akutnoj fazi upale te time ne slijedi obrazac klasičnog biljega akutne faze kao što je CRP čija koncentracija nije povišena u stanjima bez akutne upale.

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

Rad sadrži: 42 stranice, 10 grafičkih prikaza, 5 tablica i 40 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: COVID-19, C-reaktivni protein, serumski kalprotektin, upala

Mentor: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*; **dr. sc. Lovorka Đerek**, *spec. med. biokem., Klinička bolnica Dubrava*.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr. sc. Lovorka Đerek, *spec. med. biokem., Klinička bolnica Dubrava*

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Analysis of serum calprotectin and CRP concentration data in patients with COVID-19

Lucija Butorac

SUMMARY

COVID-19 is a disease caused by the SARS-CoV-2 virus. The virus enters the human body through the respiratory system. Virus-loaded pneumocytes release various cytokines and inflammatory markers, resulting in lung injury and diffuse alveolar damage that may eventually culminate in acute respiratory distress syndrome. Calprotectin is a protein released by stimulated neutrophils and monocytes. During viral or bacterial infection of the respiratory system, the expression of calprotectin increases. CRP is an acute phase reactant. Stimulation of proinflammatory cytokines increases the concentration of CRP in plasma.

The aim of this study was to analyze the results of serum calprotectin and CRP determined by immunoturbidimetric methods in order to detect differences depending on the severity of the clinical picture in COVID-19 patients or the absence of COVID-19 disease.

The remaining samples of 143 subjects were used. Subjects were divided into four groups depending on the severity of the clinical condition, the condition after recovery, or as a group of healthy volunteers. Serum calprotectin and CRP concentrations were determined by immunoturbidimetric methods on the Beckman Coulter AU 5800 analytical system (Beckman Coulter, Brea, USA).

The oldest persons were in the group of patients with the most severe clinical picture. Patients with more severe clinical pictures had high concentrations of serum calprotectin and CRP, while subjects who recovered from COVID-19 and subjects in the control group had lower concentrations. Serum calprotectin was higher in subjects who recovered from COVID-19 than in the control group, although these subjects were no longer in the acute phase of inflammation. Serum calprotectin concentrations showed a significant correlation with CRP.

There is a greater distribution of more severe forms of COVID-19 disease in the elderly. Serum calprotectin and CRP concentrations are high in patients with severe clinical pictures. Serum calprotectin remains elevated for a longer period in subjects who recovered from COVID-19 and are no longer in the acute phase of inflammation, thus not following the pattern of a classic acute phase marker such as CRP whose concentration is not elevated in conditions without acute inflammation.

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

Thesis includes: 42 pages, 10 figures, 5 tables and 40 references. Original is in Croatian language.

Keywords: COVID-19, C-reactive protein, Serum calprotectin, Inflammation

Mentor: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry; **Lovorka Đerek, Ph.D.** *European Specialist in Laboratory Medicine*, Clinical Hospital Dubrava.

Reviewers: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sandra Šupraha Goreta, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lovorka Đerek, Ph.D. *European Specialist in Laboratory Medicine*, Clinical Hospital Dubrava

The thesis was accepted: July 2022.