**Ispitanici**

Ovo istraživanje, u svrhu ciljanog praćenja promjene glikozilacije IgG-a pod utjecajem primjene SERM anti-estrogenske terapije, provest će detaljnu analizu uzoraka i podataka prikupljenih u Hrvatskoj u Klinici za tumore Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice. Istraživanje će biti provedeno na 42 ženske osobe. Istraživnje je odobreno od strane etičkog povjerenstva KBC Sestre milosrdnice (odobrenje pod brojem 251-29-11-20-01-2), te povjerenstva FBF-a koje je zatraženo u sklopu projekta za koji su prikupljeni uzorci. Istraživanje će se provoditi u skladu s načelima Helsinške deklaracije.

Početni biološki uzorak biti će krvna plazma ispitanica koja će se koristiti za analizu glikozilacije IgG-a. Krvna plazma je izdvojena od krvnih stanica iz 6 ml krvi. Krv je prikupilo stručno i osposobljeno osoblje rutinskom laboratorijskom procedurom venepunkcije u KBC Sestre milosrdnice. Uzorci humane plazme, njih ukupno oko 120, prikpljeni su kroz period od 6 mjeseci u razmacima od 3 mjeseca. Uzorci su prikupljeni odmah nakon operacije, te pri kontrolama nakon 3 i nakon 6 mjeseci. Nakon prikupljanja uzorci će biti skladišteni na -80C do analize.

Svi uzorci će biti kodirani specifičnim brojem kako bi se zaštitio identitet ispitanica. Svaki kodirajući broj sadrži određene podatke sistematizirane u Excel tablicama. Podaci dostupni pod brojem su opći podaci (godina rođenja), patohistološki podaci o karcinomu (dijagnoza bolesti, dosadašnje medicinske intervencije, histološki tip tumora, veličina tumora, molekularni podtip, TNM, histološki gradus, gradus jezgre, status aksilarnih limfnih čvorova, ER%, PR%, HER2/neu, SISH, Ki-67%) i podaci vezani za izuzimanje uzoraka. Za svrhu istraživanja koristit će se podaci dostupni iz upitnika koji je proveden paralelno s postupkom prikupljanja bioloških uzoraka (opći podaci i oni vezani uz izuzimanje uzoraka).

**Analiza i statistička obrada podataka**

Za analizu će se koristiti postojeća visokoprotočna metoda za analizu glikana IgG-a, a priprema uzoraka za analizu vršit će se automatizirano na platformi Freedom EVO (Tecan Group Ltd., Männedorf, Švicarska). Postupak automatizirane pripreme uzoraka uključivat će nekoliko koraka. Prvo će se provesti izolacija IgG-a afinitetnom kromatografijom korištenjem protein G monolitnih pločica iz ukupnih proteina krvne plazme. Potom će se pristupiti oslobađanju N-glikana vezanih za IgG enzimskom digestijom korištenjem enzima N-glikozidaze F. Ovaj enzim cijepa vezu između asparagina i unutarnje glikozidne jedinice N-acetil glukozamina (GlcNAc) N-glikana. Treći korak će uključivati obilježavanje slobodnih glikana IgG fluorescentnom bojom 9-aminopiren-1,4,6-trisulfonskom kiselinom (APTS-om). U posljednjem koraku će se pročistiti obilježeni glikani. Tako oslobođeni i obilježeni glikani će se razdvajati korištenjem CGE-LIF metode.

Za statističku obradu podataka koristit će se programski jezici R i Python. Prije obrade, podatci će se normalizirati na ukupnu površinu kromatograma, pri čemu se površina svakog kromatografskog pika dijeli s ukupnom površinom kromatograma. Tako dobiveni podaci biti će korigirani na razlike u serijama (engl. batch correction) koristeći ComBat metodu. Također će se izračunati dodatna derivirana svojstva iz izmjerenih glikanskih svojstava (npr. ukupna fukozilacija, galaktozilacija, sijalinizacija). Linearnom i logističkom regresijom ispitati će se promjene glikana u terapiji. Daljnji postupci i smjer istraživanja ovisit će o rezultatima i zaključcima dobivenih statističkom analizom.

**Plan istraživanja**

Prvi korak istraživanja biti će prikupljanje uzoraka koje će se provesti u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice. Uzorci će biti skupljeni kroz 6 do 10 mjeseci. Nakon prikupljanja uzoraka provest će se analiza N-glikana IgG. Nakon obavljene laboratorijske analize i obrade pripadajućih podataka s elektroferograma uslijedit će statistička analiza. Linearnom i logističkom regresijom ispitati će se utjecaj terapije na glikozilaciju IgG-a. Dodatno će se ispitati potencijal glikana kao prognostičkih biljega za predviđanje uspješnosti intervencije, kao i progresije SERM anti-estrogenske terapije kod karcinoma dojke.